Archive of SID

Original Article

The effects of ovarian encapsulation with alginate hydrogel on morphology and follicular count of vitrified mouse ovary

Shirazi-Tehrani A[1], Mazoochi T[1*], Akhavan-Taheri M[1], Salehnia M[2]

1- Gametogenesis Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R. Iran.
2- Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran.

Received: 2019/02/6 | Accepted: 2019/08/26

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 10:45 +0330 on Sunday January 19th 2020

Abstract:

Background: Ovarian tissue cryopreservation is a way of preserving fertility in women with cancer and premature ovarian failure. Maintenance of follicular reserve is mandatory after ovary cryopreservation. This study was performed to determine the effect of alginate hydrogel as a capsule on morphology and follicular count of vitrified mouse ovary.

Materials and methods: In this experimental study, mature mice ovaries were divided into four groups: non-vitrified ovary, vitrified ovary, ovaries that have been encapsulated with alginate hydrogel with a concentration of 0.5 and 1% and then were vitrified (Experimental1 and Experimental2, respectively). The vitrification was performed with ethylene glycol and dimethyl sulfoxide solutions. Morphological study was done using hematoxylin and eosin staining. Average number of intact and atretic follicles was evaluated in each group. Data were compared by one-way ANOVA and post hoc test. Values of $P<0.05$ were considered statistically significant.

Results: Follicular counting results showed that the mean of total follicles in all groups was not significantly different. The highest and lowest number of intact follicles were observed in non-vitrified and experimental group 1, respectively. The observed decrease in the average number of intact follicles in experimental groups was not significant as compared with the vitrified group, but it was significant in comparison with the non-vitrified group ($P<0.05$). The average number of atretic follicles in the vitrified and experimental groups significantly increased than the non-vitrified group ($P<0.05$).

Conclusion: Encapsulation of ovaries at concentration of 0.5 and 1% of alginate hydrogel could not improve the morphology and preserve intact follicles of vitrified ovaries any better.

Keywords: Vitrification, Alginate hydrogel, Mouse, Ovary

***Corresponding Author:**
Email: taherehmazoochi@gmail.com
Tel: 0098 913 361 0153
Fax: 0098 315 562 1158

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, December, 2019; Vol. 23, No 5, Pages 467-475

Please cite this article as: Shirazi-Tehrani A, Mazoochi T, Akhavan-Taheri M, Salehnia M. The effects of ovarian encapsulation with alginate hydrogel on morphology and follicular count of vitrified mouse ovary. ***Feyz*** 2019; 23(5): 466-75.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 10:45 +0330 on Sunday January 19th 2020

تأثیر انکپسوله‌کردن تخمدان با هیدروژل آلژینات بر مورفولوژی و شمارش فولیکولی تخمدان انجماد شیشه‌ای‌شده موش

عاطفه شیرازی تهرانی [۱]، طاهره مازوچی [۱*]، مریم اخوان طاهری [۱]، مژده صالح‌نیا [۲]

خلاصه:

سابقه و هدف: انجماد بافت تخمدان یکی از روش‌های حفظ باروری زنان مبتلا به سرطان و نارسایی زودرس تخمدان است. حفظ ذخایر فولیکولی پس از انجماد تخمدان، ضروری است. این مطالعه به منظور تعیین اثر غلظت‌های مختلف هیدروژل آلژینات به‌عنوان کپسول بر مورفولوژی و شمارش فولیکولی تخمدان انجماد شیشه‌ای‌شده موش انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، تخمدان موش‌های بالغ به ٤ گروه تقسیم شدند: تخمدان غیرانجمادی، تخمدان انجمادی، تخمدان‌هایی که در هیدروژل آلژینات با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد انکپسوله و سپس منجمد شدند (به‌ترتیب، گروه آزمایشی ۱ و ۲). انجماد شیشه‌ای با محلول‌های اتیلن گلیکول و دی متیل سولفوکسید انجام شد. ارزیابی مورفولوژی بااستفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین صورت گرفت و میانگین تعداد فولیکول‌های سالم و اترتیک در هر گروه ارزیابی شد. داده‌ها بااستفاده از آزمون آنالیز one-way ANOVA و آزمون تعقیبی tukey مقایسه شدند. مقادیر $P<۰/۰۵$ به لحاظ آماری معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج: میانگین تعداد کلّ فولیکول‌ها در همه گروه‌ها تفاوت معناداری نداشت. بیشترین و کمترین تعداد فولیکول‌های سالم به‌ترتیب در گروه غیرانجمادی و گروه آزمایشی ۱ مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). کاهش مشاهده‌شده در میانگین کل، فولیکول‌های سالم در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه انجمادی معنادار نبود، ولی نسبت به گروه غیرانجمادی معنادار بود ($P<۰/۰۵$). میانگین تعداد فولیکول‌های اترتیک به‌صورت معناداری در گروه‌های انجمادی و آزمایشی نسبت به گروه غیرانجمادی افزایش پیدا کرد ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: انکپسوله‌کردن تخمدان با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد هیدروژل آلژینات، نتوانست سبب بهبود مورفولوژی و حفظ بیشتر فولیکول‌های سالم تخمدان انجماد شیشه‌ای‌شده شود.

واژگان کلیدی: انجماد شیشه‌ای، هیدروژل آلژینات، تخمدان، موش

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره بیست و سوم، شماره ۵، آذر و دی ۹۸، صفحات ٤٧٥-٤٦٧

مقدمه

در سال‌های اخیر با پیشرفت علم پزشکی، میزان بهبود بیماران سرطانی افزایش یافته‌است. روش‌های رایج جهت درمان سرطان به‌ویژه شیمی‌درمانی و پرتودرمانی اثرات مخربی بر سلول‌های جنسی می‌گذارد و درنتیجه موجب ناباروری بیمار می‌شود. به همین علت این بیماران، قبل از شروع درمان می‌بایست از روش‌های کمک باروری بهره گیرند. انجماد بافت تخمدان، انجماد تخمک بالغ و نابالغ و انجماد جنین از جمله این روش-هاست [۲،۱].

۱. مرکز تحقیقات تولید سلول‌های جنسی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۲. گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت‌مدرس، تهران، ایران

* نشانی نویسنده مسؤول:
دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات تولید سلول‌های جنسی

تلفن: ۰۹۱۳۳۶۱۰۱۵۳ دورنویس: ۰۳۱۵۵۵۷۵۰۵۸

پست الکترونیک: mazoochi45@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۱۷ تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۶/۴

انجماد بافت تخمدان به‌دلایلی از قبیل: بهره‌گیری از تعداد زیادی فولیکول‌های در حال رشد، عدم تأخیر در روند درمان سرطان، عدم نیاز به تحریک تخمدانی و همچنین عدم نیاز به داشتن همسر یا اهدای گامت در زمان انجماد، نسبت به روش‌های مذکور مزیت دارد و تنها راه ممکن جهت حفظ سلول‌های جنسی و توانایی باروری است که برای دختران نابالغ توصیه می‌شود [۳]. انجماد به دو صورت انجماد آهسته (Slow Freezing) و انجماد شیشه‌ای (Vitrification) انجام می‌شود. باوجود بهره‌برداری از روش انجماد آهسته برای حفظ جمعیت فولیکول‌های بدوی بافت تخمدان، اما به‌دلیل زمان‌بر بودن و هزینه بالا و احتمال تشکیل کریستال‌های یخ داخل سلولی و تخریب اندامک‌های سلول در این نوع انجماد، بهره‌برداری از انجماد شیشه‌ای توصیه شده‌است [٥،٤]. انجماد شیشه‌ای فرآیند ساده‌ای دارد و نیازی به تجهیزات خاص و گران‌قیمت ندارد، ولی از آن‌جایی که غلظت بالایی از ضدّیخ استفاده می‌شود، می‌تواند سبب آسیب بافتی شود [٦]. گزارش‌های متناقضی در مورد اثرات انجماد شیشه‌ای در بافت تخمدان وجود دارد [۱۰-۷]. بااین‌وجود، مستقل از روش انجماد، ممکن است در اثر انجماد و گرم‌شدن تخمدان، آسیب ناگهانی رخ دهد [۱۲،۱۱].

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 10:45 +0330 on Sunday January 19th 2020

اخیراً انکپسوله‌کردن برای محافظت از بافت‌ها و سلول‌ها در شرایط مختلف از جمله انجماد مورد بررسی قرار گرفته و پیشنهاد شده است. Haung و همکاران نشان دادند که انکپسوله‌کردن سلول‌های بنیادی جنینی در هیدروژل آلژینات می‌تواند به‌طور مؤثری تشکیل کریستال یخ داخل سلولی را که در طی گرم‌کردن ایجاد می‌شود، مهار کند [۱۳]. هیدروژل آلژینات به‌طور گسترده در مهندسی بافت استفاده می‌شود. آلژینات یک پلیمر طبیعی است که توسط جلبک قهوه‌ای تولید می‌شود و شامل اسیدگولورونیک و اسیدمانورونیک است و پس از پیوند با کلسیم، هیدروژل آلژینات بدون نیاز به مواد شیمیایی، نور یا درجه حرارت تشکیل می‌شود [۱٤]. در مطالعه Brito و همکاران در سال ۲۰۱٤ گزارش شده که انکپسوله‌کردن فولیکول‌های جداشده از بافت تخمدان در هیدروژل آلژینات، از رشد فولیکول و بلوغ تخمک در شرایط آزمایشگاهی حمایت می‌کند [۱۵]. در مطالعه‌ای که توسط Shikanov در سال ۲۰۱۱ به‌منظور بررسی انکپسوله‌کردن تخمدان تازه بر بهبود رگزایی و کاهش ایسکمی بعد از پیوند انجام گرفت، بیان شد که انکپسوله‌کردن تخمدان می‌تواند رگزایی و ایسکمی بافت بعد از پیوند را بهبود بخشد [۱٦]. همچنین بافت تخمدان انجمادی قبل از پیوند با هیدروژل‌های مختلف انکپسوله شد [۱۸،۱۷]. از آن‌جایی که تأثیر انکپسوله‌کردن تخمدان قبل از انجماد جهت بهبود اثرات سوء احتمالی انجماد بررسی نشده‌است، در این مطالعه اثر انکپسوله‌کردن با هیدروژل آلژینات بر مورفولوژی و شمارش فولیکولی تخمدان انجماد شیشه‌ای‌شده مورد بررسی قرار گرفته‌است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی حیوانات آزمایشگاهی

این مطالعه تجربی بر روی ۲۰ سر موش ماده نژاد NMRI (۸ هفته‌ای) انجام شد. حیوانات در حیوان‌خانه تحت شرایط مناسب (درجه حرارت حدود ۲۵°C، میزان رطوبت ۵۵ درصد، ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) نگهداری شدند و دسترسی آسان به غذای استاندارد و آب داشتند. همه مراحل آزمایش مطابق با قوانین کار با حیوانات آزمایشگاهی و اصول مصوب کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان (کد.IR.Kaums.Rec.1396.69) صورت گرفت.

تعیین سیکل تخمدانی و گروه‌های مورد بررسی

از آن‌جایی که مورفولوژی تخمدان در هر فازی متفاوت است، باید سیکل تخمدانی حیوانات هم‌فاز شود. برای این منظور سالین ۹ درصد سه‌بار در واژن پیپتاژ شده، پس از قرار دادن محتوای موجود در سرسمپلر روی لام، با میکروسکوپ نوری (بزرگ‌نمایی ٤۰۰x) مشاهده شد. باتوجه به سیتولوژی اسمیر واژینال، موش‌ها در یکی از چهار فاز (پرواستروس، استروس، مت‌استروس و دی‌استروس) طبقه‌بندی شدند [۱۹]. در این پژوهش از موش‌هایی که در فاز دی‌استروس سیکل استروسی قرار داشتند، به‌دلیل طولانی‌بودن این فاز و مشاهده بهتر سلول‌ها استفاده شد. سپس موش‌ها به‌روش قطع نخاع گردنی کشته شدند و تخمدان‌های سمت راست با ایجاد شکاف عرضی در ناحیه شکم خارج شد. تخمدان‌ها به‌صورت تصادفی به ٤ گروه تقسیم شدند (۵ عدد در هر گروه). تخمدان‌های غیر انجمادی (به‌عنوان گروه شم)، تخمدان‌های انجمادی (به‌عنوان گروه کنترل)، تخمدان‌هایی که در هیدروژل آلژینات با غلظت ۰/۵ و ۱ درصد انکپسوله و سپس منجمد شدند (به‌ترتیب گروه‌های آزمایشی ۱ و ۲).

تمامی مواد مصرف‌شده در این مطالعه از شرکت (Sigma-Aldrich, UK) تهیه شد، به‌جز مواردی که ذکر شده است.

انکپسوله‌کردن تخمدان با هیدروژل آلژینات

در گروه‌های آزمایشی قبل از انجماد، تخمدان‌ها با هیدروژل آلژینات انکپسوله شدند. به این منظور، سدیم آلژینات با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد در بافر فسفات نمکی (Phosphate Buffer Saline) ساخته و پس از فیلترشدن با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر، در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و برای ایجاد پیوند کلسیم و تشکیل هیدروژل، به حمام کلسیم که ترکیبی از ۱٤۰ میلی‌مول $CaCl_2$ و ۵۰ میلی‌مول NaCl است، منتقل شد و پس از دو دقیقه هیدروژل آلژینات اطراف تخمدان شکل گرفت.

انجماد شیشه‌ای و گرم‌کردن تخمدان

فرآیند انجماد شیشه‌ای و گرم‌کردن تخمدان بر طبق روش کاگاوا انجام شد [۱۷]. به‌طور خلاصه: در مرحله اوّل، تخمدان‌ها در محلول تعادلی حاوی HTCM-199 (Gibco, UK)، ضدّیخ اتیلن‌گلیکول (EG) و دی‌متیل سولفوکسید (DMSO; Merck, Germany) هرکدام به میزان ۷.۵ درصد و سرم آلبومین انسانی ۲۰ درصد (Csl Behring, Germany) به‌مدت ۲۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. در مرحله دوم، تخمدان‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول انجمادی حاوی HTCM-199، EG و DMSO هرکدام به میزان ۲۰ درصد و ۰/۵ مول سوکروز قرار داده شد. سپس تخمدان روی کرایوتاپ قرار گرفت و بلافاصله در نیتروژن مایع (۱۹٦°C-) به‌مدت ۱۵ دقیقه فرو برده شد.

به‌منظور گرم‌کردن، تخمدان‌ها از داخل نیتروژن مایع خارج شدند و گرم‌کردن در سه مرحله انجام شد: ابتدا تخمدان‌ها در محلول HTCM-199 و ۱ مول سوکروز قرار گرفت (به‌مدت ۱ دقیقه در دمای ۳۷° C). سپس در محلول HTCM-199 همراه با ۰/۵ مول

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 10:45 +0330 on Sunday January 19th 2020

سوکروز قرار گرفت (به‌مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق). در مرحله سوم در محلول HTCM-199 به تنهایی، قرار گرفت (به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق). در تمامی مراحل انجماد شیشه‌ای و گرم‌کردن، تخمدان‌ها درون ۱ میلی‌لیتر از محلول‌های گفته‌شده قرار گرفتند و بر روی شیکر (Shaker) تکان داده شدند.

تست سمیت

برای بررسی اثر سمیت محلول انجمادی بر مورفولوژی، تمامی مراحل آبگیری و آبدهی مطابق روش انجماد شیشه‌ای انجام شد و فقط مرحله فروبردن در نیتروژن مایع حذف شد.

ارزیابی مورفولوژی و شمارش فولیکولی و جسم زرد

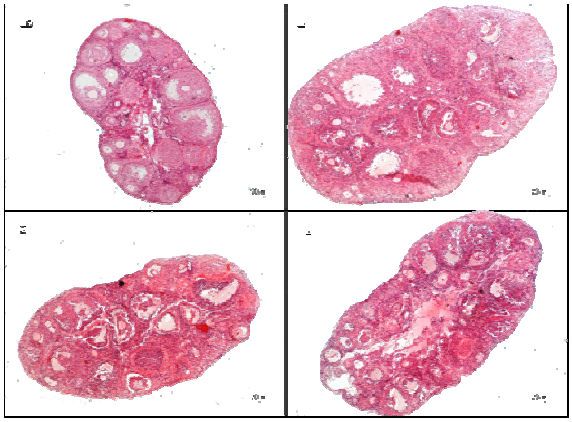
پس از گرم‌کردن تخمدان‌ها، تثبیت تخمدان به‌وسیله محلول بوئن (۲ ساعت) و فرمالین ۱۰ درصد (۲٤ ساعت) صورت گرفت. پس از مراحل پاساژ بافتی و تهیه بلوک پارافینی، برش‌های سریالی با ضخامت ۵ میکرومتر زده‌شد و از آن‌جایی که هسته تخمک قطری حدود ۲۰ میکرون دارد، برش‌ها با اینتروال ۵ انتخاب و بر روی لام قرار داده شد. پس از رنگ‌آمیزی H&E کلّ مقطع در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد و فولیکول‌های تخمدانی (با هسته تخمک واضح) شمارش شدند. فولیکول‌ها براساس مورفولوژی و لایه‌های سلول‌های گرانولوزا (GCs) به‌صورت زیر طبقه‌بندی شدند [۲۰]: فولیکول بدوی: دارای یک لایه از GCs سنگ‌فرشی، فولیکول اوّلیه: دارای یک لایه GCs مکعبی، فولیکول پره آنترال: دارای دو یا چند لایه GCs مکعبی و عدم مشاهده آنتروم، فولیکول آنترال: دارای چند لایه GCs مکعبی و وجود حفره آنتروم. در بررسی مورفولوژی فولیکول‌ها، فولیکول‌های سالم دارای گرانولوزای سالم و به‌هم فشرده با رنگ‌پذیری طبیعی و متصل به تخمک هستند. فولیکول‌های اترتیک دارای سلول‌های گرانولوزای آسیب‌دیده و هسته‌های پیکنوتیک و همچنین سیتوپلاسم ائوزینوفیلیکی‌شده، هستند. برش‌های تهیه‌شده با اینتروال ۸۰ جهت شمارش جسم زرد انتخاب شد و جمع تعداد جسم زرد در برش‌ها به عنوان تعداد جسم زرد در تخمدان محاسبه شد.

تحلیل آماری

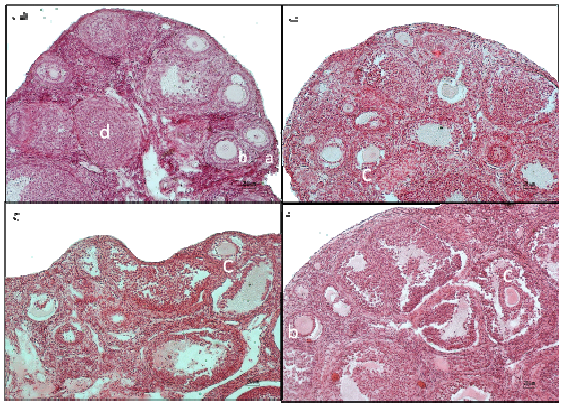
داده‌ها بااستفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۰ و آزمون‌های one-way ANOVA و Tukey تجزیه‌وتحلیل شد. نتایج حاصل از داده‌ها، به‌صورت میانگین±انحراف معیار بیان شد. سطح معناداری $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته‌شد.

نتایج

براساس نتایج مورفولوژی، در همه گروه‌ها مورفولوژی تخمدان حفظ شد. بافت تخمدان از خارج به‌وسیله یک اپیتلیوم مکعبی پوشیده شده و طبقه اپیتلیوم ژرمینال را تشکیل داده بود. در زیر اپیتلیوم ژرمینال، لایه استروما قرار داشت. در کورتکس تخمدان فولیکول‌های در حال رشد قرار داشتند، به‌صورتی‌که فولیکول‌های دارای رشد بیشتر قشری‌تر بودند. مرکز بافت تخمدان محتوی بافت هم‌بند و مقدار زیادی عروق بود. در بعضی مقاطع تخمدان‌های گروه انجمادی و گروه‌های آزمایشی به‌خصوص در نواحی مرکزی‌تر تخمدان، بین داخلی‌ترین سلول‌های گرانولوزا و تخمک فاصله ایجاد شده بود که می‌توان به‌عنوان صدمات انجمادی و یا انکپسوله‌کردن در نظر گرفت (شکل شماره ۱ و ۲).



شکل شماره ۱- مقطع عرضی بافت تخمدان در گروه‌های مختلف (رنگ‌آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی × ٤۰). الف. گروه غیرانجمادی. ب. گروه انجمادی. ج. گروه آزمایشی ۱ (تخمدان انکپسوله‌شده با غلظت ۰/۵ درصد هیدروژل آلژینات). د. گروه آزمایشی ۲ (تخمدان انکپسوله‌شده با غلظت ۱ درصد هیدروژل آلژینات).



شکل شماره ۲- مقطع عرضی بافت تخمدان در گروه‌های مختلف (رنگ‌آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی × ۱۰۰). الف: گروه غیرانجمادی. ب: گروه انجمادی. ج: گروه آزمایشی ۱ (تخمدان انکپسوله‌شده با غلظت ۰/۵ درصد هیدروژل آلژینات). د: گروه آزمایشی ۲ (تخمدان انکپسوله‌شده با غلظت ۱ درصد هیدروژل آلژینات).

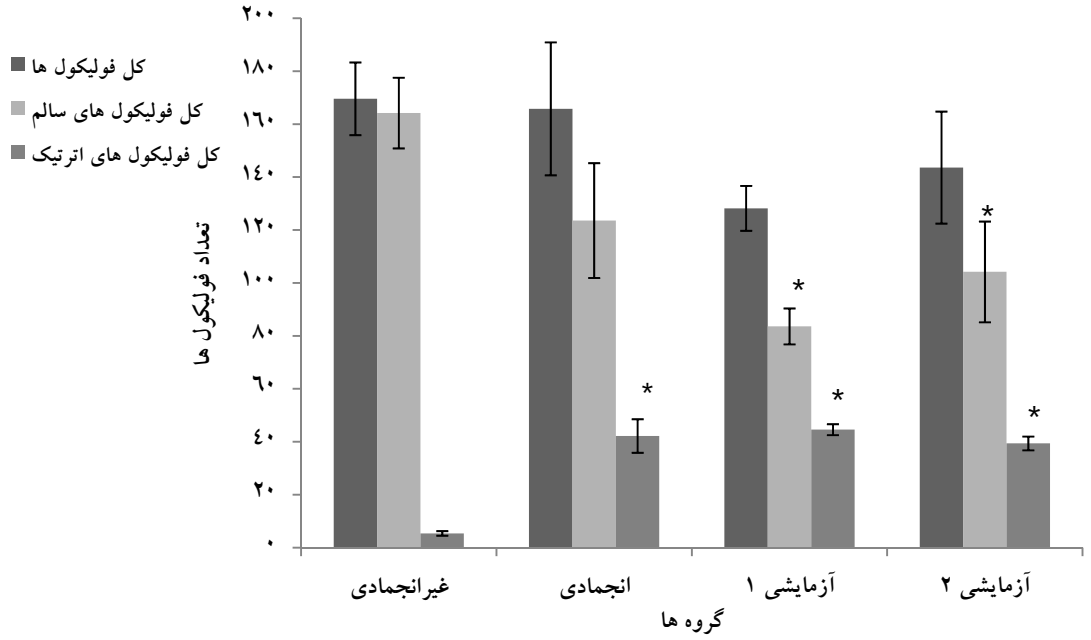
a: فولیکول اوّلیه. b: فولیکول ثانویه. c: فولیکول اترتیک. d: جسم زرد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 10:45 +0330 on Sunday January 19th 2020

براساس نتایج شمارش فولیکولی، بین میانگین تعداد کلّ فولیکول‌ها در همه گروه‌ها تفاوت معناداری وجود نداشت. میانگین تعداد کلّ فولیکول‌های سالم در گروه انجمادی نسبت به گروه غیرانجمادی کاهش یافت، اما این کاهش معنادار نبود. در گروه‌های آزمایشی میانگین تعداد کلّ فولیکول‌های سالم نسبت به گروه‌های غیرانجمادی و انجمادی کاهش یافته بود که این کاهش نسبت به گروه غیرانجمادی معنادار گزارش شد ($P<۰/۰۵$) (نمودار شماره ۱). میانگین تعداد فولیکول‌های بدوی/ اوّلیه سالم در گروه‌های آزمایشی و گروه انجمادی کمتر از گروه غیرانجمادی بود اما این کاهش از لحاظ آماری معنادار نبود. بین گروه‌های آزمایشی و گروه انجمادی نیز از لحاظ تعداد فولیکول‌های بدوی/ اوّلیه تفاوت معناداری مشاهده نشد. میانگین تعداد فولیکول‌های ثانویه سالم در گروه‌های انجمادی و آزمایشی نسبت به گروه غیرانجمادی کاهش معناداری پیدا کرده‌بود ($P<۰/۰۵$). تفاوت معناداری از لحاظ تعداد فولیکول‌های ثانویه سالم بین گروه انجمادی و گروه‌های آزمایشی وجود نداشت. بین میانگین تعداد فولیکول‌های آنترال سالم در همه گروه‌ها تفاوت معناداری وجود نداشت (نمودار شماره ۲). کمترین و بیشترین تعداد فولیکول‌های اترتیک به‌ترتیب در گروه غیرانجمادی و گروه آزمایشی ۱ مشاهده شد. میانگین تعداد کلّ فولیکول‌های اترتیک در بین گروه انجمادی با گروه‌های آزمایشی تفاوت معناداری نداشت. در حالی که در گروه انجمادی و گروه‌های آزمایشی به‌طور معناداری نسبت به گروه غیرانجمادی افزایش پیدا کرده بود ($P<۰/۰۵$) (نمودار شماره ۱). در این مطالعه تعداد جسم زرد در هر تخمدان از گروه‌های مختلف شمارش شد (نمودار شماره ۲). میانگین تعداد جسم زرد در همه گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت. میانگین تعداد جسم زرد در گروه آزمایشی ۲ نسبت به گروه انجمادی و گروه آزمایشی ۱ افزایش پیدا کرده بود اما این افزایش معنادار نبود.



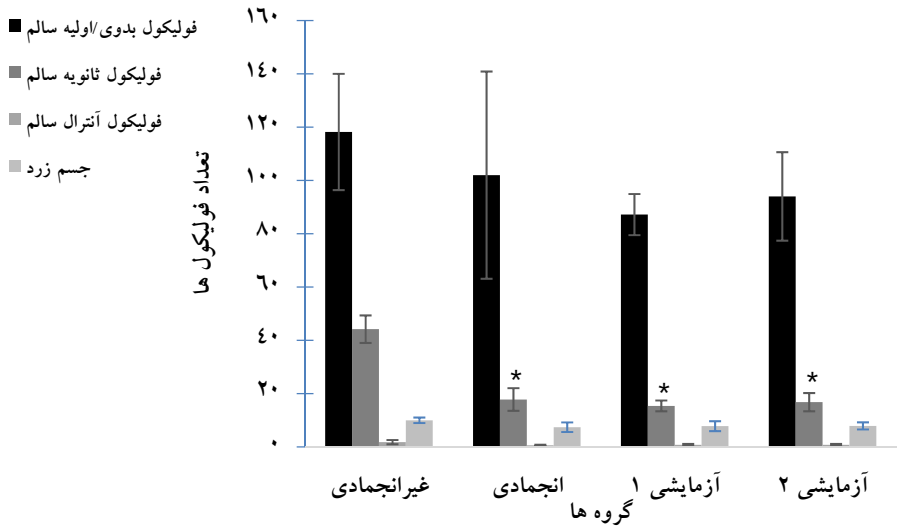
نمودار شماره ۱- میانگین و انحراف معیار کلّ فولیکول‌ها در گروه‌های مختلف.

* اختلاف معنادار در مقایسه با گروه غیرانجمادی ($P<۰/۰۵$). گروه آزمایشی ۱ (تخمدان انکپسوله‌شده با غلظت ۰/۵ درصد هیدروژل آلژینات).
گروه آزمایشی ۲ (تخمدان انکپسوله‌شده با غلظت ۱ درصد هیدروژل آلژینات).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 10:45 +0330 on Sunday January 19th 2020



نمودار شماره ۲- میانگین و انحراف معیار فولیکول‌های سالم در گروه‌های مختلف.

* اختلاف معنادار در مقایسه با گروه غیرانجمادی ($P<۰/۰۵$). گروه آزمایشی ۱ (تخمدان انکپسوله‌شده با غلظت ۰/۵ درصد هیدروژل آلژینات).

گروه آزمایشی ۲ (تخمدان انکپسوله‌شده با غلظت ۱ درصد هیدروژل آلژینات).

بحث

انجماد شیشه‌ای، روشی سریع و ساده است که برای حفظ باروری در خانم‌های مبتلا به سرطان، قبل از شیمی‌درمانی و رادیوتراپی و همچنین نارسایی زودرس تخمدان پیشنهاد می‌شود. آسیب بافت ممکن است به‌دلیل استفاده از غلظت بالای ضدّیخ و همچنین دمای پایین که برای حفظ بافت استفاده می‌شود، ایجاد شود. اخیراً، انکپسوله‌کردن برای محافظت از بافت‌ها و سلول‌ها در شرایط مختلف از جمله انجماد مورد بررسی قرار گرفته‌است [۱۷،۱۶،۱۳]. در این مطالعه، تأثیر انکپسوله‌کردن تخمدان قبل از انجماد شیشه‌ای بااستفاده از هیدروژل آلژینات در غلظت‌های مختلف برای جلوگیری از آسیب احتمالی که انجماد شیشه‌ای به بافت وارد می‌کند، به‌وسیله ارزیابی مورفولوژی و شمارش فولیکولی تخمدان مورد بررسی قرار گرفت. در گروه‌های آزمایشی، زمانی که تخمدان‌ها با غلظت‌های مختلف آلژینات انکپسوله و سپس انجماد شیشه‌ای شدند، برخلاف انتظار میانگین فولیکول‌های سالم در مقایسه با گروه غیرانجمادی و انجمادی کاهش یافت که این کاهش در مقایسه با گروه غیرانجمادی معنادار بود ($P<۰/۰۵$). با مقایسه نتایج دو گروه آزمایشی به‌نظر می‌رسد غلظت ۱ درصد آلژینات در حفظ فولیکول‌های سالم بهتر از غلظت ۰/۵ درصد است. احتمالاً، بااستفاده از غلظت‌های بالای هیدروژل آلژینات، نتایج بهتری به‌دست می‌آید. Xu و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که کشت فولیکول‌های موش با غلظت ۱/۵ درصد اجازه رشد طبیعی و تکوین فولیکول را می‌دهد [۲۱].

Hornick در سال ۲۰۱۲ نشان داد که درصد زنده‌ماندن فولیکول‌های پره‌آنترال میمون کپسوله‌شده با غلظت ۲ درصد سدیم آلژینات در مقایسه با آن‌هایی که با غلظت ۰/۵ درصد کپسوله شدند، بسیار بالاتر بود [۲۲]. همچنین در گروه‌های آزمایشی این مطالعه، میانگین تعداد فولیکول‌های اترتیک به‌طور معناداری بیشتر از گروه غیرانجمادی ($P<۰/۰۵$) و مشابه با گروه انجمادی بود. آترزی فولیکولی در تمامی مراحل فولیکول‌های تخمدانی مشاهده می‌شود. گفته می‌شود که مرگ سلولی از طریق آپوپتوز صورت می‌گیرد. انجماد می‌تواند تعداد فولیکول‌های اترتیک را به‌وسیله آپوپتوز افزایش دهد. برخلاف انتظار، انکپسوله‌کردن بافت تخمدان قبل از انجماد، نتوانست اثرات احتمالی را که انجماد روی بافت تخمدان می‌گذارد، بهبود بخشد و تعداد فولیکول‌های اترتیک را کاهش دهد. عبدی و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه‌ای به مقایسه‌ی کشت دو بعدی و سه بعدی فولیکول‌های تخمدانی بااستفاده از غلظت‌های مختلف سدیم آلژینات پرداختند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که انکپسوله‌کردن فولیکول‌های جداشده از تخمدان با آلژینات سدیم در کشت سه بعدی به فولیکول آسیب نمی‌رساند و احتمالاً ساختار اتصال بین سلول‌ها و غشای سلول-های گرانولوزا را حفظ خواهد کرد و مانع از مرگ فولیکول‌ها خواهد شد. بالاترین میزان بقا، تکوین و بلوغ فولیکول‌ها در کشت سه بعدی در فولیکول‌های کپسوله‌شده با غلظت ۰/۵ درصد سدیم آلژینات مشاهده شد [۱۴]. در مطالعه Camboni و همکاران در سال ۲۰۱۳، فولیکول‌های بدوی/ اوّلیه را از تخمدان منجمدشده

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 10:45 +0330 on Sunday January 19th 2020

جدا کرده، در یک هیدروژل متشکل از آلژینات انکپسوله کردند و سپس فولیکول‌های جداشده را کشت دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از یک ماتریس آلژینات به‌عنوان یک حمایت‌کننده برای فولیکول‌های تخمدانی در برابر انجماد، گرم‌شدن و کشت، دارای مزایای متعدد است [۲۳]. علت تفاوت در نتایج می‌تواند به‌دلیل این باشد که در مطالعه Camboni و همکاران فولیکول‌ها در مراحل ابتدایی رشد از تخمدان انجمادی، جدا و سپس انکپسوله شدند؛ ولی در مطالعه حاضر تخمدان که دارای اجزای سلولی متفاوت ناهمگن و فولیکول‌هایی در مراحل مختلف رشد است، ابتدا انکپسوله شد و سپس انجماد شیشه‌ای انجام گرفت. براساس نتایج مطالعه حاضر، انکپسوله‌کردن و انجماد تخمدان عمدتاً بر روی فولیکول‌های بزرگ‌تر تخمدانی اثرات نامطلوب دارد و فولیکول‌های بدوی/ اوّلیه کمتر تحت‌تأثیر قرار می‌گیرند. بنابراین اگر پس از انکپسوله‌کردن و انجماد تخمدان، فولیکول‌ها در مراحل ابتدایی رشد جدا شده، کشت داده شوند، نتایج بهتری به‌دست خواهد آمد. اگرچه کشت فولیکول‌های بدوی نیز زمان‌بر بوده، با مشکلاتی روبه‌رو است [۲٤]. مقایسه نتایج بین گروه غیرانجمادی و گروه انجمادی نشان داد که میانگین تعداد فولیکول‌های بدوی/ اوّلیه سالم در دو گروه تفاوت معناداری وجود ندارد. اما، میانگین تعداد فولیکول‌های ثانویه سالم پس از انجماد شیشه‌ای به‌طور معناداری کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). این به این معنی است که انجماد شیشه‌ای تأثیر منفی بر فولیکول‌های بدوی/ اوّلیه ندارد؛ در حالی که فولیکول‌های ثانویه در برابر انجماد شیشه‌ای آسیب‌پذیرترند. این یافته‌ها مطابق با مطالعات قبلی است. نتایج نشان داده‌اند که انجماد شیشه‌ای قادر به حفظ مورفولوژی فولیکول‌های بدوی/ اوّلیه است [۲٦،۲۵]. همچنین در مطالعات دیگر، آسیب به تخمک و سلول‌های گرانولوزا (جدا شدن تخمک و سلول‌های گرانولوزا و از دست دادن محتوای سلولی) در اکثر فولیکول‌های ثانویه جداشده از تخمدان منجمدشده، مشاهده شد [۲۸،۲۷]. عواملی از جمله ناتوانی نفوذ ضدّیخ به مرکز بافت و تشکیل کریستال یخ و بروز مشکلات اسمزی در طی مراحل برودت و یا گرم‌شدن می‌تواند در بروز کاهش تعداد فولیکول‌های ثانویه سالم مؤثر باشد [۲۹]. همچنین تعداد لایه‌های سلول‌های فولیکولار نیز می‌تواند در این امر مؤثر باشد. هرچه تعداد سلول‌های فولیکولی بیشتر باشد، قادر به ممانعت بیشتر در برابر نفوذ یا خروج ضدّیخ می‌باشند. از طرف دیگر، قدرت نفوذ سلول می‌تواند با رشد فولیکول‌ها تغییر کند و با افزایش لایه‌های سلولی گرانولوزا و لایه تکا، ارتباطات سلولی پیچیده‌تر می‌شوند [۳۰]. در مطالعه حاضر، مقایسه نتایج بین گروه‌های غیرانجمادی و انجمادی نشان داد که میانگین تعداد فولیکول‌های اترتیک در گروه انجمادی به‌طور معنا‌داری بیشتر از گروه غیرانجمادی بود ($P<۰/۰۵$) که با مطالعات قبلی هم‌خوانی دارد. در مطالعه Zhang و همکاران میزان بیشتری از مرگ آپوپتوز در بافت تخمدان انجماد شیشه‌ای نسبت به غیرانجمادی مشاهده شد [۳۱]. Isachenko و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند که انجماد شیشه‌ای روش مناسبی برای انجماد بافت تخمدان برای حفظ بهتر کیفیت فولیکول و فعالیت هورمونی نیست [۳۲].

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد اگرچه انجماد تخمدان اثرات سوء بر روی فولیکول‌های بدوی و اوّلیه ندارد، اما سبب کاهش فولیکول‌های ثانویه می‌شود. انکپسوله‌کردن تخمدان قبل از انجماد شیشه‌ای با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد هیدروژل آلژینات نتوانست سبب بهبود مورفولوژی و حفظ بیشتر فولیکول‌های سالم تخمدان‌های انجماد شیشه‌ای شود. از آن‌جایی که با افزایش غلظت هیدروژل آلژینات نتایج مورفولوژی بهتر می‌شد، پیشنهاد می‌شود غلظت‌های بالاتر هیدروژل آلژینات بررسی شود. همچنین پیشنهاد می‌شود از مواد دیگری مثل فیبرین، هیالورونیک اسید و غیره جهت انکپسوله‌کردن تخمدان قبل از انجماد استفاده و نتایج آن بررسی شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم عاطفه شیرازی تهرانی به شماره ۹٦٦۹ می‌باشد. بدینوسیله از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان که حمایت مالی این طرح را به عهده داشتند تقدیر و تشکر می‌شود.

References:

[1] Fathi R, Rezazadeh Valojerdi M, Salehnia M, Ebrahimi B, SalmanYazdi R. Ovarian Tissue Transplantation: Advantages, Disadvantages and Upcoming Challenges (A Review Article). ***J Mazandaran Univ Med Sci*** 2014; 24(113): 253-65. [in Persian]

[2] Dittrich R, Maltaris T, Hoffmann I, Oppelt PG, Beckmann MW, Mueller A. Fertility preservation in cancer patients. ***Minerva Ginecol*** 2010; 62(1): 63-80.

[3] Donnez J. Introduction: fertility preservation, from cancer to benign disease to social reasons: the

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 10:45 +0330 on Sunday January 19th 2020

challenge of the present decade. ***Fertil Steril*** 2013; 99(6): 1467-8.

[4] Rezaie M, Fathi F, Seyyedoshohadaie F, RAH HR. Comparison of Cryopreservation of Bovine Ovarian Tissue: Slow and Rapid Cryopreservation. ***Iran J Obstet Gynecol Infertil*** 2012; 15(2):1-75.

[5] Youm HW, Lee JR, Lee J, Jee BC, Suh CS, Kim SH. Optimal vitrification protocol for mouse ovarian tissue cryopreservation: effect of cryoprotective agents and in vitro culture on vitrified-warmed ovarian tissue survival. ***Hum Reprod*** 2014; 29(4): 720–30.

[6] Choi J, Lee B, Lee E, Yoon BK, Bae D, Choi D. Cryopreservation of ovarian tissues temporarily suppresses the proliferation of granulosa cells in mouse preantral follicles. ***Cryobiology*** 2008; 56(1): 36-42.

[7] Mazoochi T, Salehnia M, Valojerdi MR, Mowla SJ. Morphologic, ultrastructural, and biochemical identification of apoptosis in vitrified-warmed mouse ovarian tissue. ***Fertil Steril*** 2008; 90(4): 1480-6.

[8] Lee D, Ouhibi N, Battaglia D. Cryopreservation of ovarian tissue: banking reproductive potential for the future. ***Curr Women's Health Rep*** 2001; 1(2): 152-6.

[9] Keros V, Xella S, Hultenby K, Pettersson K, Sheikhi M, Volpe A, et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. ***Hum Reprod*** 2009; 24(7): 1670-83.

[10] Gandolfi F, Paffoni A, Brambilla EP, Bonetti S, Brevini TA, Ragni G. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. ***Fertil Steril*** 2006; 85: 1150-6.

[11] Mazoochi T, Khamechian T, Ehteram M, Kashani HH. The effect of melatonin on expression of p53 and ovarian preantral follicle development isolated from vitrified ovary. ***Comp Clin Pathol*** 2018; 27(1): 83-8.

[12] Posillico S, Kader A, Falcone T, Agarwal A. Ovarian tissue vitrification: Modalities, challenges and potentials. ***Curr Women's Health Rev*** 2010; 6(4): 352-66.

[13] Huang H, Choi JK, Rao W, Zhao S, Agarwal P, Zhao G, et al. Alginate hydrogel microencapsulation inhibits devitrification and enables large-volume low-CPA cell vitrification. ***Adv Funct Mater*** 2015; 25(44): 6839-50.

[14] Abdi S, Salehnia M, Hosseinkhani S. Comparison of Survival and Developmental rates of Mouse Ovarian Follicles after Two and Three Dimensional Cultures. ***J Adv Biomed Pathobio Res*** 2013; 16(2): 51-63. [in Persian]

[15] Brito IR, Lima IM, Xu M, Shea LD, Woodruff TK, Figueiredo JR. Three-dimensional systems for in vitro follicular culture: overview of alginate-based matrices. ***Reprod Fertil Dev*** 2014; 26(7): 915-30.

[16] Shikanov A, Zhang Z, Xu M, Smith RM, Rajan A, Woodruff TK, et al. Fibrin encapsulation and vascular endothelial growth factor delivery promotes ovarian graft survival in mice. ***Tissue Eng part A*** 2011; 17(23-24): 3095-104.

[17] Akhavan Taheri M, Rezazadeh Valojerdi M, Ebrahimi B. Intramuscular autotransplantation of vitrified rat ovary encapsulated with hyaluronic acid hydrogel. ***Biopreserv Biobanking*** 2016; 14(2): 114-21.

[18] Gao JM, Yan J, Li R, Li M, Yan LY, Wang TR, et al. Improvement in the quality of heterotopic allotransplanted mouse ovarian tissues with basic fibroblast growth factor and fibrin hydrogel. ***Hum Reprod*** 2013; 28(10): 2784-93.

[19] Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice. ***Curr Protoc Neurosci*** 2009; 48(1): A-4I.

[20] Mofarahe ZS, Novin MG, Jafarabadi M, Salehnia M, Noroozian M, Ghorbanmehr N. Effect of human ovarian tissue vitrification/warming on the expression of genes related to folliculogenesis. ***Iran Biomedical J*** 2015; 19(4): 220.

[21] Xu M, West E, Shea LD, Woodruff TK. Identification of a stage-specific permissive in vitro culture environment for follicle growth and oocyte development. ***Biol Reprod*** 2006; 75(6): 916-23.

[22] Hornick JE, Duncan FE, Shea LD, Woodruff TK. Isolated primate primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow in vitro. ***Hum Reprod*** 2012; 27(6): 1801-10.

[23] Camboni A, Van Langendonckt A, Donnez J, Vanacker J, Dolmans MM, Amorim CA. Alginate beads as a tool to handle, cryopreserve and culture isolated human primordial/primary follicles. ***Cryobiology*** 2013; 67(1): 64-9.

[24] O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. ***Biol Reprod*** 2003; 68(5): 1682-6.

[25] Paynter SJ, Cooper A, Fuller BJ, Shaw RW. Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culturein vitro. ***Cryobiology*** 1999; 38(4): 301-9.

[26] Harlow CR, Shaw HJ, Hillier SG, Hodges JK. Factors influencing follicle-stimulating hormone-responsive steroidogenesis in marmoset granulosa cells: effects of androgens and the stage of follicular maturity. ***Endocrinology*** 1988; 122(6): 2780-7.

[27] Chang HJ, Moon JH, Lee JR, Jee BC, Suh CS, Kim SH. Optimal condition of vitrification method for cryopreservation of human ovarian cortical tissues. ***J Obstet Gynaecol Res*** 2011; 37(8): 1092-101.

[28] Ting AY, Yeoman RR, Lawson MS, Zelinski MB. In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. ***Hum Reprod***

www.SID.ir

Archive of SID

2011; 26(9): 2461-72.
[29] Xiao Z, Wang Y, Li L, Luo S, Li SW. Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation. ***Fertil Steril*** 2010; 94(6): 2323-8.
[30] Silber S, Kagawa N, Kuwayama M, Gosden R. Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation. ***Fertil Steril*** 2010; 94(6): 2191-6.
[31] Zhang J, Liu J, Xu KP, Liu B, DiMattina M. Extracorporeal development and ultrarapid freezing of human fetal ova. ***J Assist Reprod Genet*** 1995; 12(6): 361-8.
[32] Isachenko E, Isachenko V, Rahimi G, Nawroth F. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. ***Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*** 2003; 108(2): 186-93.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 10:45 +0330 on Sunday January 19th 2020

www.SID.ir