مقایسه انجماد بافت تخمدان گاو به دو روش انجماد سریع و آرام

دکتر معصومه رضایی[1*]، دکتر فردین فتحی[2]، دکتر فریبا سیدالشهدایی[3]، دکتر رامش راه حق[4]

۱. استادیار گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، کردستان، ایران.
۲. دانشیار گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، کردستان، ایران.
۳. استادیار گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، کردستان، ایران.
۴. استادیار گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، کردستان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۷/۴ **تاریخ پذیرش مقاله:** ۱۳۹۰/۱۲/۱۵

خلاصه

مقدمه: کرایو یا انجماد تخمدان روش بسیار خوبی جهت حفظ تعداد زیادی تخمک در مواردی است که به هر علتی مانند شیمی درمانی و رادیوتراپی و یا سایر علل قابل انتظار امکان نارسایی تخمدان وجود دارد. انجماد تخمدان به دو روش آرام و سریع انجام می شود. این روش ها در گونه های مختلف حیوانات مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر دو روش انجماد سریع و آرام بر روی قطعات تهیه شده از تخمدان گاو و مقایسه میزان نکروز در این دو روش انجام شد.

روش کار: نوع مطالعه مقطعی و مقایسه دو روش آزمایشگاهی بود. ۲۰ قطعه به ابعاد ۵×۱میلی متر و قطر نیم میلی متر از بافت تخمدان گاو تازه ذبح شده که بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شده بود، جدا شد و سپس در ۲۰ سی سی ماده محافظت کننده که حاوی ۰/۱ مول سوکروز و ۲ سی سی سرم جنینی گوساله و ۱/۵ مول دی متیل سولفوکسید و محیط کشت لیبوویتز بود، فرو برده شدند. سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه بر روی غلتک مخلوط کننده قرار داده شدند. بعد از مرحله به تعادل رسیدن، بافت به ظرف حاوی مواد محافظت کننده در برابر انجماد منتقل شد و نصف آن ها به روش آرام و نصف دیگر به روش سریع منجمد شدند. در انجماد به روش آرام، فرایند انجماد با گذاشتن نمونه ها در صفر درجه با استفاده از فریزر قابل برنامه ریزی شروع شد. سپس درجه انجماد به تدریج تا ۱۴۰- درجه سانتی گراد رسانده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در این درجه نگه داشته شد، سپس در داخل نیتروژن مایع فرو برده شد. در انجماد به روش سریع، ویال ها مستقیماً در داخل نیتروژن مایع فرو برده شد. در مرحله بعد، ذوب مجدد در هر دو گروه ایجاد و قطعات بافتی به ظرف حاوی کربوکسی فلورنسین دی استات سوکسینیمیدیل استر (CFDA) و پروپیدیوم آیوید منتقل و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شدند و زیر میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند.

یافته ها: میزان نکروز در انجماد سریع (۳۶٪) به طور قابل ملاحظه ای بیشتر از روش آرام (۱۲٪) بود ($p<0/05$).

نتیجه گیری: جهت انجماد و حفظ بافت تخمدان گاو استفاده از روش انجماد آرام مؤثرتر از روش سریع است.

کلمات کلیدی: انجماد تخمدان، تخمدان، روش آرام، روش سریع

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر معصومه رضایی؛ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، کردستان، ایران. **همراه:** ۰۹۱۸۳۷۳۳۱۶۶؛ **پست الکترونیک:** mrezaie2001@yahoo.com

www.SID.ir

مقدمه

کرایو یا انجماد تخمدان روش بسیار خوبی جهت حفظ تعداد زیادی تخمک در مواردی است که به هر علتی مانند شیمی درمانی و رادیوتراپی و یا سایر علل قابل انتظار امکان نارسایی تخمدان وجود دارد؛ برای مثال در افراد نوجوان مبتلا به سندرم ترنر می توان قبل از دست دادن کل فولیکول، تخمدان ها را خارج و منجمد کرد (۱). ۸ درصد سرطان ها در سن زیر چهل سال می باشد که با پیشرفت های حاصل در زمینه تشخیص و درمان سرطان ها در زمان کودکی، نوجوانی و سنین باروری، امید به زندگی در زنان قبل از یائسگی افزایش یافته است (۲). از هر ۲۵۰ نفر در سنین باروری یک نفر، از سرطان در دوران کودکی جان سالم به در می برند (۳). در واقع ۹۰٪ کودکان مبتلا به سرطان ها با شیمی درمانی، رادیوتراپی و پیوند مغز استخوان بهبود کامل می یابند. این درمان ها منجر به بقای طولانی این کودکان می شود ولی نازایی و نارسایی زودرس تخمدان در انتظار آنان است (۴). در زمان درمان سرطان زمان کافی جهت تحریک تخمدان و گرفتن تخمک بالغ شده و یا حتی جمع آوری تخمک های نابالغ جهت بلوغ آزمایشگاهی (IVM[1]) وجود ندارد (۵). داروهای مورد استفاده در تحریک تخمک گذاری گران قیمت بوده و تعداد تخمک ها و جنین های حاصل از آن ها کم می باشد؛ از طرفی استفاده از سیکل های استروژنی برای دختران غیر بالغ امکان پذیر نمی باشد. بنابراین انجماد تخمک در این سنین کمک کننده نمی باشد (۶).

از آنجایی که در متافاز تقسیم میتوزی دوم که هم زوناپلوسیدا و هم گرانول های سطحی ایجاد شده متوقف می شوند، انجماد تخمک در این فاز باعث آزاد شدن قبل از موقع گرانول های سطحی و در نتیجه سخت شدن زوناپلوسیدا خواهد شد (۷). همچنین انجماد اووسیت در این موقعیت باعث فلج شدن دوک های تقسیم در این مرحله خواهد شد (۸). در حالی که در انجماد تخمک های غیر بالغ در داخل تخمدان ها هیچ کدام از مسائل فوق وجود ندارد (۹). تعداد بسیار زیادی تخمک نابالغ در داخل فولیکول های پره ناتال قرار گرفته اند و به علت مشخصات منحصر به فرد خود نظیر اندازه کوچک (کمتر از ۲۰ میلی متر)؛ تعداد سلول های گرانولوزای کم؛ تشکیل ۹۰٪ از فولیکول های تخمدان و متابولیسم غیر فعال جهت انجماد بسیار مناسب تر هستند (۱۰). به علاوه فولیکول های نارس پتانسیل بیشتری جهت ترمیم آسیب های غیر کشنده در طی فاز رشد دارند. همچنین این سلول ها در فاز ذوب مجدد مقاومت بیشتری از خود نشان می دهند (۱۱). مطالعات متعددی در گونه های مختلف حیوانی مانند موش، گوسفند و پرندگان و اخیراً تخمدان انسان انجام شده است و در حال حاضر در برخی از مراکز ناباروری، انجماد بافت تخمدان انجام می شود (۱۲). در گونه های حیوانی این روش مؤثر بوده و باروری بعد از پیوند اتو گرافت آن موفقیت آمیز بوده است. مشکل اساسی در انجماد بافت تخمدان، وجود سلول های مختلف با نیازمندی های متفاوت جهت بقای بعد از انجماد می باشد. سلول های گرانولوزا، اووسیت و رگ های خونی اجزای مختلف بافت تخمدان با نیازمندی های متفاوت هستند (۱۳).

بافت تخمدان جهت انجماد به دو صورت مورد استفاده قرار می گیرد؛ یکی استفاده از کل بافت تخمدان جهت پیوند مجدد و دیگری به کارگیری تکه هایی از بافت تخمدان که در واقع حاوی فولیکول است؛ که این بافت جهت رشد فولیکول و تخمک بعد از ذوب به کار برده می شود (۱۴). انجماد تخمدان به دو روش آرام و سریع انجام می گیرد. اخیراً از روش شیشه ای[2] هم به این منظور استفاده شده است (۱۵). در روش شیشه ای مواد محافظت کننده با غلظت بالا به نمونه اضافه می شوند. این مواد مانند ضد یخ عمل می کنند و دمای انجماد را پایین می آورند. با کاهش دما این شربت غلیظ به شیشه تبدیل می شود. در روش انجماد آرام که همان انجماد به روش قابل برنامه ریزی است؛ نمونه بعد از به تعادل رسیدن با ماده محافظت کننده، در دمای ۴ درجه در داخل فریزهایی که درجه حرارت آن ها قابل برنامه ریزی است قرار داده می شود و دمای آن به تدریج کاهش می یابد. نمونه بعد از منجمد شدن در دمای ۱۴۰- به داخل محفظه حاوی ازت فرو برده می شود. کاهش با روش

[1] In Vitro Maturation

[2] Vitrification

Archive of SID

www.SID.ir

آرام باعث خروج تدریجی آب داخل سلولی و جلوگیری از ایجاد کریستال های داخل سلولی خواهد شد. در روش انجماد سریع، نمونه بعد از به تعادل رسیدن با ماده محافظت کننده در دمای ۴ درجه مستقیماً به داخل تانک ازت فرو برده می شود. مزیت این روش سریع بودن و مقرون به صرفه بودن آن است.

این روش ها در گونه های مختلف حیوانات مورد استفاده قرار گرفته است. هر چند روش انجماد آرام در اکثر مطالعات روش بسیار مطمئن تری از لحاظ حفظ و زنده ماندن بافت بوده است، ولی روش سریع هم از نظر اقتصادی و هم از نظر زمان مقرون به صرفه است (۱۶).

مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر دو روش انجماد سریع و آرام بر روی برش های تهیه شده از تخمدان گاو و مقایسه میزان نکروز در این دو روش مختلف انجام شد.

روش کار

این مطالعه مقطعی و مقایسه دو روش آزمایشگاهی بود. ۲۰ قطعه به ابعاد ۵×۱میلی متر و قطر نیم میلی متر از بافت تخمدان گاو تازه ذبح شده که بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شده بود، جدا شد و در ۲۰ سی سی ماده محافظت کننده در برابر انجماد که حاوی ۰/۱ مول سوکروز و ۲ سی سی سرم جنین گاو و ۱/۵ مول دی متیل سولفوکسید[1] و محیط کشت لیبوویتز[2] فرو برده شد. سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه در ماده محافظ انجماد بر روی غلتک مخلوط کننده قرار داده شد. این مرحله که به تعادل رسیدن[3] نام دارد طی آن دی متیل سولفوکسید در دمای ۴ درجه سانتی گراد به تعادل ۷۶٪ خواهد رسید. اگر چه ۳۰ دقیقه بهترین زمان برای تعدیل نمی باشد اما این زمان به دلیل کاهش اثرات سمیت دی متیل سولفوکسید انتخاب شده است. در دمای ۴ درجه دی متیل سولفوکسید نفوذ بافتی بهتری را با کمترین اثر سمی دارد. بعد از مرحله متعادل شدن، بافت به ظروف انجماد منتقل شده و نصف آن به روش آرام و نصف دیگر به روش سریع منجمد می شود. در انجماد به روش آرام، فرایند انجماد با گذاشتن نمونه ها در صفر درجه با استفاده از فریزر برنامه ریزی شده شروع شد. فریزر مورد استفاده، Planer Biomed Sunbury Middlesex, UK) بود. سپس انجماد با سرعت کاهش ۲ درجه در دقیقه تا ۹- درجه ادامه یافت. ویال ها ده دقیقه در دمای ۹- نگهداری شدند، سپس با سرعت ۰/۳ درجه سانتی گراد در دقیقه انجماد تا ۴۰- درجه سانتی گراد و در نهایت انجماد با سرعت ۱۰ درجه سانتی گراد در دقیقه تا به ۱۴۰- درجه سانتی گراد ادامه یافت و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۴۰- درجه سانتی گراد نگه داشته شد و سپس در داخل نیتروژن مایع فرو برده شد. در روش انجماد سریع ویال ها مستقیماً در داخل نیتروژن مایع فرو برده می شود.

روش ذوب بافت تخمدان:

ویال ها از داخل نیتروژن مایع خارج و به مدت ۳۰ ثانیه در دمای اتاق نگهداری می شوند و پس از آنکه به مدت ۳۰ ثانیه در ظرف حاوی آب دارای دمای محیط فرو برده شدند، به ظرف حاوی مواد محافظت کننده در برابر انجماد منتقل می شوند. برش های بافتی در داخل محیط کشت که حاوی سرم جنین گاو ۱۰٪ و یک مول دی متیل سولفوکسید و ۱٪ مول سوکروز است، قرار داده می شوند و پس از آن داخل محفظه مخصوص در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس مایع مذکور دور ریخته شد و محتویات باقی مانده با محلول سالن نرمال استریل و با پیپت ۱۰ سی سی شستشو داده شدند. سپس این محلول با ۱۰٪ FCS و نیم مول دی متیل سولفوکسید برای ۱۰ دقیقه دیگر در ۴ درجه سانتی گراد مخلوط شدند.

مجدداً این محلول دور ریخته شده و به ظرفی که حاوی محیط کشت لیبوویتز با سرم جنین گاو ۱۰٪ است منتقل شد. بافت تخمدان پس از برش به صورت بسیار نازک، به ظرف های بسیار کوچک حاوی محیط کشت منتقل و سپس در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۰ دقیقه در محلول کربوکسی فلورنسین دی استات سوکسینیمیدیل استر (CFSE)[4] تلقیح شد. این ماده

[1] Demethyle Sulfoxide
[2] Leibovitz
[3] Equilibration
[4] Caxboxy flurenscein diacetate,succinmidylester

Archive of SID
www.SID.ir

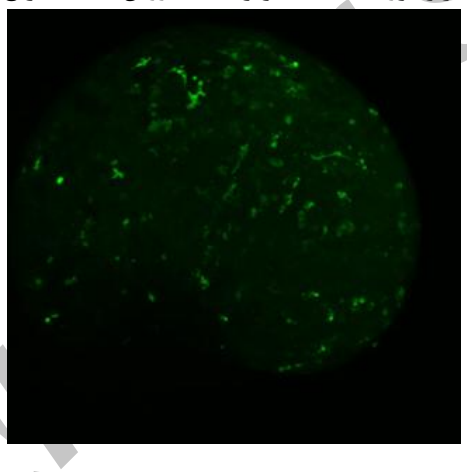
جهت رنگ آمیزی سلول های مرده و نکروزه شده استفاده می شود و بر خلاف سلول های زنده قادر است از غشاء نفوذپذیر سلول های نکروتیک مرده عبور کند. سپس قطعات بافتی به ظرف حاوی یدید پروپیدیوم[1] به مدت ۵ دقیقه منتقل شدند. سرانجام در محیط کشت حاوی ۱۰٪ جنین گوساله لیبوویتز به مدت ۵ دقیقه دیگر نگهداری شده و برش های بافتی رنگ آمیزی شده با میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند.

یافته ها

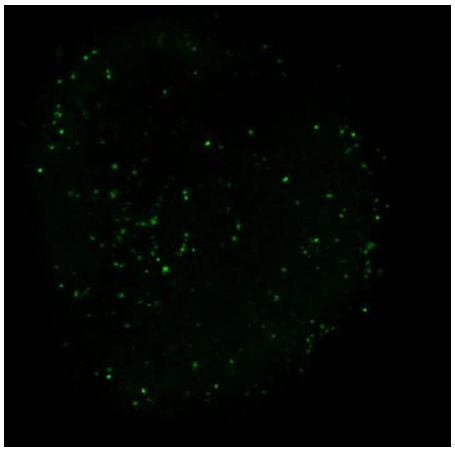
جهت بررسی تأثیر مواد محافظت کننده انجماد بر روی سلول های پره موردیال بافت تخمدان، میزان نکروز بافتی با استفاده از شمارش سلول های نکروتیکی که در اثر نفوذپذیر بودن به ماده فلورسنت (CFSE) سبز شده بودند، بررسی شد.

در این روش میزان نکروز بافت ها پس از انجماد آنها به دو روش آرام و سریع مقایسه شد. به این منظور سلول های نکروتیکی که در اثر نفوذ ماده فلورسنت CFDA و تابش نور اولترا ویوله و پس از بررسی با فیلتر فلورسین ایزوتیوسیانیت[2] به رنگ سبز درآمده بودند، بررسی و شمارش شدند. نتایج بررسی های انجام شده نشان داد که درصد سلول های نکروتیک در گروه انجماد آرام بسیار کمتر از گروه انجماد سریع بود به طوری که میزان نکروز در روش سریع ۳۶٪ (شکل ۱، جدول ۱) و در روش آرام ۱۲ درصد بود (شکل ۲، جدول۱) ($p<۰/۰۵$).

شکل ۱- بررسی ایمونوفلورسانت بافت فریز شده به روش انجماد سریع میزان نکروز ۳۶٪



شکل ۲- بررسی ایمونوفلورسانت بافت فریز شده به روش انجماد آرام میزان نکروز ۱۲٪



[1] Ioaid Propidiom

[2] flurenscein Isotiocianatit

www.SID.ir

جدول ۱- مقایسه میزان نکروز بافتی به دو روش انجماد آرام و سریع

روش انجام انجماد	درصد بافت نکروز	درصد بافت زنده	سطح معنی داری*
روش آرم	٪۱۲	٪۸۸	p<۰/۰۵
روش سریع	٪۳۶	٪۶۴	

*آزمون تی

آپوپتوز و نکروز با میکروسکوپ فلورسنت با افزایش نقاط سبز رنگ که در زیر میکروسکوپ قابل رؤیت هستند بررسی شده است.

بحث

مطالعات محدودی در مورد مقایسه روش های مختلف انجماد تخمدان وجود دارد. تاکنون مطالعاتی بر روی گاو، موش و انسان انجام شده است (۱، ۲، ۴، ۶). در مطالعه حاضر از دو روش آرام و سریع جهت انجماد تخمدان استفاده شد. نتایج مطالعه نشان داد که با استفاده از روش انجماد آرام میزان نکروز در بافت تخمدان به طور قابل توجهی کمتر از روش انجماد سریع است (۱۲٪ در مقابل ۳۶٪). وقتی سلول و یا بافتی منجمد می شود تغییرات شیمیایی و یا بیولوژیک در بافت به وجود می آید. سرما با متوقف کردن تخریب بافتی، سلول را حفظ می کند (۳، ۴) ولی باعث تخریب برگشت ناپذیر برخی از اعمال سلولی می شود. علت اصلی تخریب سلولی در حین انجماد، ایجاد کریستال های یخ داخل سلولی و رسوب نمک در داخل آنها می باشد. بنابراین جهت جلوگیری از ایجاد این کریستال ها باید آب داخل سلول ها را خارج کرد برای این هدف از مواد محافظت کننده در برابر انجماد استفاده می شود (۱، ۹).

مواد محافظت کننده در برابر انجماد یا مانند سوکروز باعث خروج مایع داخل سلولی به علت خاصیت اسموتیک شده و یا مانند DMSO به داخل سلول نفوذ می کنند (۵، ۱۷). در بافت تخمدان به علت پرسلول بودن بافت، نفوذپذیری مواد به سلول های آن نسبت به سلول های مجزا متفاوت می باشد و زمان بیشتری جهت نفوذ به قسمت های مرکزی بافت مورد نیاز است (۵، ۱۷). این افزایش زمان خود باعث افزایش میزان سمیت مواد کرایوپروتکتانت[1] خواهد شد. این مواد از طریق واکنش با مواد زیست مولکولی داخل سلولی و ایجاد مواد سمی باعث صدمه به سلول ها می شوند. اگر این مواد در غلظت های بالا و یا دمای بالا استفاده شوند و زمان کافی جهت تماس با سلول را داشته باشند، تأثیر سمیت آنها ظاهر خواهد شد که این خود باعث مرگ و تخریب سلول بعد از مرحله ذوب خواهد شد (۹، ۱۱، ۱۷).

انجماد به روش آرام تاکنون بهترین روش در مورد انجماد بافت بوده است. در مطالعه حاضر میزان نکروز در انجماد به روش آرام ۱۲٪ در مقابل ٪۳۶ با استفاده از روش سریع بوده که اختلاف چشمگیری داشت.

در مطالعه ایزاکنکوف و همکاران (۲۰۰۷) انجماد به روش آرام بهترین روش جهت انجماد تخمدان شناخته شد (۱۵). در مطالعه دیگری که توسط رحیمی و همکاران (۲۰۰۴) انجام شد، تفاوت چشمگیری در میزان نکروز بافت تخمدان انسان در دو روش سریع و آرام وجود نداشت (۱۶). هر چند در مطالعه رحیمی و همکاران میزان نکروز بافتی در دو روش، اختلاف معنی داری نداشت ولی مشکلات عدیده ای هنوز در ارتباط با استفاده از روش سریع و فرو بردن مستقیم ویال ها در داخل نیتروژن مایع وجود دارد (۱، ۱۵). در انجماد به روش آرام تماس مستقیم بافت با نیتروژن مایع وجود ندارد ولی در روش سریع قبل از منجمد شدن، مستقیماً به داخل مخزن های نیتروژن فرو برده می شود. این تماس مستقیم می تواند باعث آلودگی ویال ها با ویروس هایی شود که هم به انجماد مقاوم هستند و هم بعد از انجماد بدخیم تر خواهند شد. این ویروس ها شامل هپاتیت، پاپو ویروس ها، ویروس استوماتیت وزیکولار[2] و ویروس هرپس می باشد (۱، ۱۵). با توجه به اینکه هر گونه روش مدیکال از لحاظ آلودگی به ویروس ها بایستی ضمانت اجرایی داشته باشد، این مسئله یکی از مهم ترین

[1] crayoprotectant

[2] Vesicular Stomatitis Virus

Archive of SID

www.SID.ir

عیوب انجماد به روش سریع خواهد بود که در روش حفاظت به روش سریع به آن بایستی توجه کامل داشت (۲۱، ۲۲). بنابراین حتی اگر در برخی بررسی ها میزان نکروز در هر دو روش یکسان باشد، با توجه به احتمال آلودگی ویروس در روش انجماد سریع، نمی تواند جایگزین روش قدیمی تر انجماد به روش آرام باشد (۱۵) انجام مطالعات بیشتر باید قدرت حیات بهتر و عدم آلودگی ویال ها را تضمین کند (۶، ۷، ۱۶، ۱۸).

جهت تشخیص تأثیر روند انجماد بر روی بافت تخمدان از روش های مختلفی استفاده می شود که از آن جمله می توان به بررسی هیستولوژیک و شمارش سلول های نارس (۲، ۹، ۱۴)؛ کشت بافت تخمدان به مدت ۱۵-۵ روز و سپس بررسی تولید هورمون های استروئیدی و بررسی هیستولوژیک و شمارش فولیکول های رشد کرده در بافت کشت داده شده؛ بررسی هورمونی سطح استرادیول پروژسترون بافت بعد از کشت یک ماهه (۱۴، ۱۵، ۱۸)؛ بررسی میزان ریبونوکلئیک اسید پیامبر تولید شده در تخمدان کشت داده شده با روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)[1] (۱۷،۱۸) و بررسی میزان مرگ سلولی با استفاده از روش ایمونو فلورسنت اشاره کرد (۱۸). در مطالعه حاضر از روش اخیر استفاده شد. سلول های نکروز به مقدار بیشتری با مواد فلورسنت رنگ آمیزی می شوند ولی سلول های زنده به علت دارا بودن غشای سلولی نرمال، نسبت به مواد فلورسنت غیر قابل نفوذ هستند و به میزان کمتری این مواد را به خود جذب می کنند، در نتیجه فقط سلول های مرده رنگ آمیزی خواهند شد (۱۰، ۱۴، ۱۵).

استفاده از رنگ آمیزی هیستولوژیک با فلورسنت تا سال های اخیر یکی از روش های انتخابی جهت بررسی قدرت حیات بافت های منجمد بوده است ولی اخیراً مطالعات نشان داده که این روش دارای نتایج مثبت کاذب می باشد (۱۸). این روش به خصوص در مورد بافت قلب و کلیه موش دارای نتایج مثبت بالایی بوده است (۱۴، ۱۵، ۱۷). به علاوه مسئله مهم تر در ارتباط با این روش، ناتوانی آن در مشخص کردن نوع سلول مرده می باشد. این که کدام نوع سلول اعم از فولیکول بافت استروما یا عروق از بین رفته است با این روش قابل بررسی نمی باشد (۱۵).

علاوه بر مسائل ذکر شده در فوق، مشکلات دیگری در انجماد بافت تخمدان ها به خصوص در انسان وجود دارد که یکی از آنها وجود کانون هایی از متاستاز در بافت تخمدان می باشد. با توجه به اینکه این بافت ها قبل از شروع شیمی درمانی یا رادیوتراپی از بیمار، جمع آوری می شوند، امکان عود بعد از پیوند در برخی موارد به خصوص در کانسرهایی که امکان متاستاز به تخمدان را دارند، وجود دارد (۱-۳). نیوتن و همکاران مطالعه ای بر روی بافت منجمد ۵ بیمار با لنفوم هوچکین و ۱۳ بیمار با لنفوم غیر هوچکین انجام دادند. این ۱۸ مورد بافت به موش هایی که نقص ایمنی داشتند دوباره پیوند شده بود و فقط در یک مورد از لنفوم غیر هوچکین عود سرطان مشاهده شد. جهت کاهش میزان بازگشت سرطان باید از نمونه های متعدد قبل از انجماد تخمدان بررسی هیستولوژیک به عمل آید (۱۲).مشکل عمده دیگر عروق سازی مجدد (رواسکولاریزاسیون) بافت تخمدان بعد از پیوند می باشد که ممکن است با ایجاد عروق جدید بافت ها با کمبود اکسیژن و از بین رفتن تعداد زیادی از فولیکول مواجه شوند (۱۲، ۱۹).

نتیجه گیری

انجماد به روش آرام مؤثرتر از روش سریع جهت انجماد و حفظ بافت تخمدان می باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقای پروفسور کمپل رئیس بخش زنان مامایی دانشگاه ناتینگهام که نظارت و راهنمایی این مطالعه را بر عهده داشتند و همچنین از همکاران مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی دانشگاه کردستان تشکر و قدردانی می شود.

[1] polymerase chain reaction

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

1. Isachenko E, IsachenkoV, Rahimi G, Nawroth F. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2003 Jun 10;108(2):186-93
2. Oktay K. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications for cancer patients. Hum Reprod Update 2001 Nov-Dec;7(6):526-34.
3. Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. N Engl J Med 2005 Jul;353(3):318-21.
4. Ledda S, Leoni G, Bogliolo L, Naitana S. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. Theriogenology 2001 Apr 1;55(6):1359-71.
5. Oktay K, Karlikaya GG, BA.Aydin. Ovarian cryopreservation and transplantation: basic aspects. Mol Cell Endocrinol 2000 Nov 27;169(1-2):105-8.
6. Aubard Y, Poirot C, PiverP, Galinat S, Teissier MP. Are there indications for ovarian tissue cryopreservation? Fertil Steril 2001 Aug;76(2):414-5.
7. Al-aghbari AM, Menino AR. Survival of oocytes recovered from vitrified sheep ovarian tissue. Anim Reprod Sci 2002 May 15;71(1-2):101-10.
8. Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. Theriogenology 2000 Jan 1;53(1):59-72.
9. Ledda S, Leoni G, Bogliolo L, Naitana S. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. Theriogenology 2001 Apr 1;55(6):1359-71.
10. Gosden RG, Boulton MI, Grant K, Webb R. Follicular development from ovarian xenogfrafts in SCID mice. J Reprod Fertil 1994 Aug;101(3):619-23.
11. Choi J, Lee JY, Lee E, Yoon BK, Bae D, Choi D. Cryopreservation of the mouse ovary inhibits the onset of primordial follicle development. Cryobiology 2007 Feb;54(1):55-62.
12. Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. Hum Reprod 1996 Jul;11(7):1487-91.
13. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Resoration of fertility in oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. Hum Reprod 1994 Apr;9(4):597-603.
14. Baird DT, Webb R, Campbell BK, Harkness LM, Gosden RG. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196 C. Endocrinolog 1999 Jan;140(1):462-71.
15. Isachenko V, Isachenko E, Reinsberg J, Montag M, van der Ven K, Dorn C, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of rapid and conventional freezing. Cryobiology 2007 Dec;55(3):261-8.
16. Rahimi G, Isachenko E, Isachenko V, Sauer H, Wartenberg M, Tawadros S, et al. Comparison of necrosis in human ovarian tissue after conventional slow freezing or vitrification and transplantation in ovariectomized SCID mice. Reprod Biomed Online 2004 Aug;9(2):187-93.
17. Van den Broecke R, Liu J, Handyside A, Van der Elst JC, Krausz T, Dhont M, et al. Follicular growth in fresh and cryopreserved human ovarian cortical grafts transplanted to immunodeficient mice. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2001 Aug;97(2):193-201.
18. Hovattao O, Sily R, Krausz T, Abir R, Margara R, Trew G, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol –sucrose as cryoprotectant. Hum Reprod 1996 Jun;11(6):1268-72.
19. Newton H, Illingworth P. In-vitro growth of murine pre-antral follicles after isolation from cryopreserved ovarian tissue. Hum Reprod 2001 Mar;16(3):423-9.
20. Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. Hum Reprod 2000 Jun;15(6):1300-4.
21. Merdassi G, Mazoyer C, Guerin JF, Saad A, Salle B, Lornage J. Examination of viability and quality of ovarian tissue after cryopreservation using simple laboratory methods in ewe. Reprod Biol Endocrinol 2011 Jun 8;9:78.
22. KerosV, 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 Jul;24(7):1670-83.

Archive of SID

www.SID.ir