

جمهوری اسلامی ایران

پژوهشگاه رویان

« معاونت پژوهشی، آموزشی »

گزارش نهایی طرح

مطالعه فراساختار و بیان ژنهای بلوغ فولیکولی، رگزائی و آپوپتوزی
بافت تخمدان موش صحرائی پس از انجماد شیشه ای و پیوند به خود

کد دفتر مرکزی: 2117-33

گروه پژوهشی: جنین شناسی پژوهشگاه رویان

مسئول طرح:

دکتر مجتبی رضازاده ولوجردی

همکاران طرح:

دکتر مژده صالح نیا - روح ا... فتحی

تاریخ تهیه: بهار 1395



جمهوری اسلامی ایران

پژوهشگاه رویان

« معاونت پژوهشی، آموزشی »

گزارش نهایی طرح

مطالعه فراساختار و تغییرات بیان ژنهای بلوغ، رگزائی و آپوپتوز بافت تخمدان
موش صحرائی پس از انجماد شیشه ای و پیوند اتوگرافت

کد دفتر مرکزی: 2117-33

گروه پژوهشی: جنین شناسی پژوهشگاه رویان

مسئول طرح:

دکتر مجتبی رضازاده ولوجردی

همکاران طرح:

دکتر مزده صالح نیا- روح ا... فتحی

تاریخ تهیه: بهار 1394



مشخصات مسئول و همکاران طرح:

نام و نام خانوادگی	مسئولیت در طرح	رشته تحصیلی	مقطع تحصیلی	جمع کل نفر ساعت همکاری در طرح
دکتر مجتبی رضازاده ولوجردی	مجری طرح	آناتومی	دکترا	400
دکتر مزده صالح نیا	همکار اصلی	آناتومی	دکترا	250
روح ا... فتحی	همکار اصلی	آناتومی	فوق لیسانس	3200

Archive of SID

چکیده

هدف از مطالعه حاضر تعیین ترکیب ضد یخ مناسب برای انجماد شیشه ای بافت تخمدان کامل موش صحرایی و بررسی تغییرات هورمونی، فراساختار فولیکول ابتدایی، بیان ژنهای بلوغ فولیکولی، رگزائی و آپوپتوزی بافت تخمدان انجمادی پس از پیوند به خودی است.

برای قسمت اول مطالعه و به منظور تعیین ترکیب ضد یخ مناسب، تخمدان های موش های صحرایی ویستار 5 هفته ای به طور تصادفی به 13 گروه با عنوان کنترل (غیر انجمادی)، VI و TI (DMSO + EG)، VII و TII (PROH + EG)، VIII و TIII (PROH + DMSO)، VIV و TIV (DMSO + EG) و 0/25 مول در لیتر سوکروز، VV و TV (PROH + EG) و 0/25 مول در لیتر سوکروز، VVI و TVI (DMSO + PROH) و 0/25 مول در لیتر سوکروز) تقسیم بندی شده و با استفاده از روش های بافت شناسی معمولی، EM و ایمونوهیستوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

برای قسمت دوم مطالعه نیز پس از تعیین ترکیب ضد یخ مناسب و به منظور بررسی تغییرات پیوند به خودی بافت تخمدان انجمادی، تخمدان های موش با مشخصات فوق به صورت تصادفی در 6 گروه کنترل (غیر انجمادی غیر پیوندی)، nVTnG (غیر انجمادی پیوندی غیر گنادکتومی)، VTnG (انجمادی پیوندی غیر گنادکتومی)، nVTG (غیر انجمادی پیوندی گنادکتومی)، VTG (انجمادی پیوندی گنادکتومی) و BLG (گنادکتومی دو طرفه) تقسیم بندی شده و به مانند قسمت اول، با استفاده از روش های بافت شناسی معمولی، EM و ایمونوهیستوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفتند. علاوه بر آن در این گروه ها، بیان ژن های بلوغ فولیکولی، آپوپتوزی و رگ زایی با روش Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفته و سطح گنادوتروپین ها (LH و FSH) و هورمون های استروئیدی (استرادیول، پروژسترون و تستوسترون) در سرم خون با گروه کنترل و BLG (گنادکتومی دو طرفه) مقایسه شد.

نتایج نشان داد که گروه های انجمادی با ترکیبات مختلف ضد یخ در مقایسه با گروه کنترل، فولیکول های سالم کمتری داشته و درصد فولیکول های آپوپتوتیک آن ها بالاتر است. همچنین در بین گروه های انجمادی، گروه VIV بهترین میزان زنده مانی را به خصوص برای فولیکول های مراحل ابتدایی داشته و درصد بروز آپوپتوز آن کمتر بود. تغییرات فراساختاری در گروه اخیر در مقایسه با گروه کنترل محسوس بوده اما نسبت به گروه فاقد سوکروز (گروه VI)، چندان مزیتی را نشان نداد.

پیوند به خودی تخمدان های غیر انجمادی و انجمادی، بازگشت چرخه هورمونی و عملکرد تخمدان را به دنبال داشته و در دو گروه VTG و nVTG، به گروه کنترل نزدیک تر بود. همچنین در دو گروه اخیر، درصد بلوغ فولیکول ها و نیز فراساختار تخمدان پیوندی، وضعیت بهتری را نشان داده و بروز آپوپتوز در فولیکول های بدوی و آنترال نسبت به دو گروه VTnG و nVTnG بیشتر و در فولیکول های اولیه و پراآنترال کمتر شده بود. میزان بیان عوامل رگ زایی (CD34 و CD31) نیز در تمامی گروه های پیوندی به خصوص در تخمدان های دو گروه VTG و nVTG به گروه کنترل غیر پیوندی نزدیک تر شده بود.



از مطالعه حاضر می توان نتیجه گرفت که ترکیب ضدیخ های $DMSO + EG$ و سوکروز، نسبت به سایر ترکیبات، برای حفظ فولیکول ها به خصوص در مراحل ابتدایی، مناسبتر است و استفاده از آن می تواند عملکرد نسبی تخمدان را پس از انجماد و پیوند به خودی به همراه داشته باشد.

کلمات کلیدی: انجماد شیشه ای، بافت تخمدان، ترکیبات ضدیخ، پیوند به خودی، فراساختار فولیکول اولیه، گنادکتومی.

Archive of SID

- 1-1-1. مقدمه.....1
- 2-1-2. اثرات درمان سرطان با روشهای تهاجمی بر دستگاه تولید مثل.....2
- 3-1-3. حفظ قدرت باروری در بیماران سرطانی.....3
- 1-3-3-1. انجماد جنین.....3
- 2-3-3-1. انجماد تخمک.....3
- 3-3-3-1. انجماد تخمک بالغ.....4
- 4-3-3-1. انجماد تخمک نابالغ.....4
- 5-3-3-1. انجماد بافت تخمدان.....5
- 1-5-3-3-1. انجماد کل بافت تخمدان.....6
- 2-5-3-3-1. انجماد قطعات فشر تخمدان.....7
- 3-5-3-3-1. مقایسه روشهای مختلف انجمادی بافت تخمدان.....7
- 4-5-3-3-1. اثر ضدیخهای مختلف بر انجماد بافت تخمدان.....9
- 5-5-3-3-1. پروتئین های ضد انجمادی.....10
- 4-1-4. تاریخچه پیوند بافت تخمدان انجمادی.....11
- 5-1-5. پیوند بافت تخمدان.....12
- 1-5-5-1. مسائل و مشکلات انجماد و پیوند بافت تخمدان.....13
- 1-1-5-5-1. ارزیابی دقیق نتیجه انجماد و پیوند بافت تخمدان.....13
- 2-1-5-5-1. اثر جایگاه های مختلف بر نتیجه پیوند.....13
- 3-1-5-5-1. رگ زایی و رگ سازی مجدد پس از پیوند تخمدان.....14
- 4-1-5-5-1. کاهش کیفیت گامت ها در بافت پیوندی.....19
- 5-1-5-5-1. احتمال بازگشت سلول های سرطانی به بدن، در نتیجه پیوند.....20
- 6-1-5-5-1. محدودیت مدت زمان فعالیت بافت تخمدان پیوند زده شده.....21
- 6-1-6. تغییرات گنادو تروپین ها و استروئیدها در پیوند تخمدان.....21
- 7-1-7. مرگ سلولی و عوامل مؤثر بر آن در پیوند تخمدان.....24
- 8-1-8. تغییرات و نقش فاکتورهای رشد موضعی در پیوند تخمدان.....27
- 9-1-9. اهداف.....29
- 10-1-10. فرضیات.....31

فصل دوم: مواد و روش ها

- 1-2-1. مقدمه.....31
- 2-2-2. انجماد شیشه ای بافت تخمدان موش صحرایی (بررسی اثر ترکیبات مختلف ضدیخ).....31

- 31.....1-2-2. تهیه حیوان و نمونه تخمدان
- 32.....2-2-2. طراحی آزمایش
- 33.....3-2-2. بیهوش کردن حیوان
- 33.....4-2-2. خارج کردن تخمدان از بدن حیوان
- 34.....5-2-2. فرآیند انجماد شیشه ای و آزمون سمیت
- 35.....6-2-2. ذوب تخمدان های منجمد
- 35.....7-2-2. ارزیابی بافتی (رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین)
- 37.....8-2-2. ایمونوهیستوشیمی
-9-2-2. تهیه مقاطع نیمه نازک و فوق نازک جهت بررسی فراساختار بافت با میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM)
- 38.....3-2. پیوند بافت تخمدان منجمد - ذوب شده
- 41.....1-3-2. طراحی آزمایش
- 41.....2-3-2. پیوند تخمدان
- 43.....3-3-2. خون گیری و جدا سازی سرم به منظور تعیین سطح هورمونی
- 43.....4-3-2. روش الیزا
- 45.....5-3-2. مطالعات بافتی و فراساختار بافت تخمدان پیوندی
-6-3-2. بررسی بیان رونوشت ژن های بلوغ فولیکول، رگ زایی و آپوپتوتیک در بافت تخمدان گروه های کنترل و پیوندی
- 45.....1-6-3-2. جمع آوری نمونه و نگهداری آن
- 46.....2-6-3-2. استخراج RNA
- 46.....3-6-3-2. اندازه گیری غلظت RNA
- 47.....4-6-3-2. سنتز cDNA
- 48.....5-6-3-2. آماده سازی پرایمرها
- 49.....6-6-3-2. Real-time PCR مراحل
- 49.....7-6-3-2. Real-time PCR شرایط
- 51.....8-6-3-2. تحلیل نتایج Real-time PCR
- 51.....4-2. تجزیه و تحلیل آماری داده ها

فصل سوم: نتایج

- 59.....1-3. انجماد شیشه ای تخمدان کامل موش صحرایی (مقایسه ترکیبات مختلف ضد یخ)
- 59.....1-1-3. شمارش فولیکولهای سالم و مرده در گروه های کنترل، انجمادی و آزمون سمیت
- 65.....2-1-3. شمارش فولیکولهای آپوپتوتیک در گروه های کنترل، انجمادی و آزمون سمیت

- 3-1-3. بررسی بافت شناسی تخمدانهای موش صحرایی پس از انجماد شیشه ای (مقاطع نیمه نازک)..... 67
- 3-1-3-1. تخمدانهای غیر منجمد (گروه کنترل) 67
- 3-1-3-2. تخمدانهای آزمون سمیت (گروه های T I و T IV) 70
- 3-1-3-3. تخمدانهای منجمد (گروه های V I و V IV): 72
- 3-1-3-4. گروه آزمون سمیت T I (EG + DMSO) 81
- 3-1-3-5. گروه آزمون سمیت T IV (EG + DMSO + 0.25 mol/lit Sucrose) 82
- 3-1-3-6. گروه انجمادی V I (EG + DMSO) 83
- 3-1-3-7. گروه انجمادی V IV (EG + DMSO + 0.25 mol/lit) 84
- 3-2. پیوند به خودی تخمدان کامل موش صحرایی پس از انجماد شیشه ای 91
- 3-2-1. درصد موفقیت پیوند 91
- 3-2-2. شمارش فولیکولهای سالم و مرده 91
- 3-2-3. شمارش فولیکولهای آپوتوتیک 96
- 3-2-4. سطح گنادوتروپین ها و هورمونهای استروئیدی 98
- 3-2-4-1. هورمون تحریک کننده فولیکولی (FSH) 98
- 3-2-4-2. هورمون لوتهینه کننده (LH) 98
- 3-2-4-3. هورمون پروژسترون 98
- 3-2-4-4. هورمون استرادیول 99
- 3-2-4-5. هورمون تستوسترون 99
- 3-2-5. میزان بیان رونوشت ژنهای بلوغ فولیکولی، رگ زایی و آپوتوزی 101
- 3-2-5-1. ژن های بلوغ (TGF-b، BMP-15 و GDF-9) 101
- 3-2-5-2. ژن های رگ زایی (VEGF، CD34 و CD31) 101
- 3-2-5-3. ژن های آپوتوتیک (BAX و BCL-2) 102
- 3-2-6. بررسی بافت شناسی تخمدانهای موش صحرایی منجمد - ذوب شده پس از پیوند به خودی (مقاطع نیمه نازک) 104
- 3-2-6-1. گروه کنترل 8 هفته ای 104
- 3-2-6-2. گروه غیر منجمد پیوندی غیر گنادکتومی (nVTnG) 105
- 3-2-6-3. گروه منجمد پیوندی غیر گنادکتومی (VTnG) 106
- 3-2-6-4. گروه غیر منجمد پیوندی گنادکتومی (nVTG) 107
- 3-2-6-5. گروه منجمد پیوندی گنادکتومی (VTG) 107
- 3-2-7. بررسی فراساختار فولیکول های بدوی تخمدانهای موش صحرایی منجمد - ذوب شده پس از پیوند به خودی 114

- 114.....3-2-7-1. گروه غیر منجمد پیوندی غیر گنادکتومی (nVTnG).....
- 115.....3-2-7-2. گروه منجمد پیوندی غیر گنادکتومی (VTnG).....
- 115.....3-2-7-3. گروه منجمد پیوندی گنادکتومی (VTG).....
- 116.....3-2-7-4. گروه غیر منجمد پیوندی گنادکتومی (nVTG).....

فصل چهارم: بحث

- 123.....4-1. انجماد شیشه ای و مقایسه اثر ترکیبات مختلف ضد یخ.....
- 1-1-4. تغییرات ساختار و فراساختار تخمدان کامل موش صحرایی پس از انجماد شیشه ای با ترکیبات مختلف ضد یخ.....
- 123.....4-1-2. میزان بروز آپوتوز در تخمدان کامل موش صحرایی پس از انجماد شیشه ای با ترکیبات مختلف ضد یخ.....
- 130.....4-2. پیوند به خودی تخمدان کامل موش صحرایی پس از انجماد شیشه ای.....
- 131.....4-2-1. تغییرات ساختار و فراساختار تخمدان کامل منجمد-ذوب شده موش صحرایی پس از پیوند به خودی.....
- 131.....4-2-2. مرگ سلولی در تخمدان کامل منجمد-ذوب شده موش صحرایی پس از پیوند به خودی.....
- 136.....4-2-3. تغییرات گنادوتروپین ها، هورمون های استروئیدی، و عوامل رشد در تخمدان کامل منجمد-ذوب شده موش صحرایی پس از پیوند به خودی.....
- 139.....4-2-3-1. گنادوتروپین ها.....
- 140.....4-2-3-2. هورمون های استروئیدی (استروژن، پروژسترون و تستوسترون).....
- 143.....4-2-3-3. عوامل رشد و بلوغ فولیکول (اعضاء خانواده TGF-b).....
- 145.....4-3. تغییرات رگ زایی در تخمدان کامل منجمد-ذوب شده موش صحرایی پس از پیوند به خودی.....
- 146.....4-4. پیشنهادات.....
- 150.....
- 151..... References
- 151..... فهرست منابع.....
- 194..... Abstract

فهرست جداول

صفحه	عنوان
16	جدول 1-1: خلاصه ای از اثرات عوامل رگزا بر رشد فولیکول در بافت تخمدان
34	جدول 1-2: ترکیبات ضد یخ در محلول های انجمادی (V) و آزمون سمیت (T)
36	جدول 2-2: مراحل رنگ آمیزی H & E برای قطعات بافتی
37	جدول 2-3: مراحل ایمونوهیستوشیمی (روش میکروسکوپ نوری)
39	جدول 2-4: مراحل آماده سازی بافت و قالب گیری نهایی برای تصویربرداری با EM
40	جدول 2-5: مراحل رنگ آمیزی قطعات فوق نازک با لید سیترات و اورانیل استات
42	جدول 2-6: گروه های کنترل و پیوندی
61	جدول 3-1: درصد فولیکولهای سالم در گروههای کنترل و انجمادی
62	جدول 3-2: درصد فولیکولهای سالم در گروههای کنترل و آزمون سمیت
63	جدول 3-3: درصد فولیکولهای مرده در گروههای کنترل و انجمادی
64	جدول 3-4: درصد فولیکولهای مرده در گروههای کنترل و آزمون سمیت
66	جدول 3-5: درصد فولیکولهای آپوپتوتیک در گروههای کنترل و انجمادی
91	جدول 3-6: درصد موفقیت پیوند
94	جدول 3-7: درصد فولیکولهای سالم در گروههای کنترل، منجمد پیوندی و غیر منجمد پیوندی
95	جدول 3-8: درصد فولیکولهای مرده در گروههای کنترل، منجمد پیوندی و غیر منجمد پیوندی
97	جدول 3-9: فولیکولهای آپوپتوتیک در گروههای کنترل، منجمد پیوندی و غیر منجمد پیوندی
100	جدول 3-10: سطح گنادوتروپین ها و هورمون های استروئیدی در گروههای کنترل، منجمد پیوندی و غیر منجمد پیوندی
103	جدول 3-11: بیان رونوشتیهای ژن های بلوغ فولیکولی، رگ زایی و آپوپتوزی در تخمدان گروههای کنترل، منجمد پیوندی و غیر منجمد پیوندی

فهرست اشکال

- شکل 1-1: رشد فولیکول در گذر از مرحله پرآنترال به آنترال 28
- شکل 1-2: روش فرو بردن تخمدان به داخل نیتروژن به وسیله Cryopin 7 34
- شکل 2-2: تصویر باندهای اختصاصی به تفکیک هر پرایمر بر روی ژل آگارز 49
- شکل 3-2: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن TGF-B 51
- شکل 4-2: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن BMP-15 52
- شکل 5-2: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن GDF-9 53
- شکل 6-2: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن CD34 54
- شکل 7-2: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن CD31 55
- شکل 8-2: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن VEGF 56
- شکل 9-2: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن BCL-2 57
- شکل 10-2: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن BAX 58
- شکل 1-3: ایمونوهیستوشیمی تخمدان پس از انجماد شیشه ای 67
- شکل 2-3: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه کنترل 5 هفته ای 75
- شکل 3-3: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه آزمون سمیت T I 76
- شکل 4-3: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه آزمون سمیت T IV 77
- شکل 5-3: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه انجمادی V I 78
- شکل 6-3: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه انجمادی V IV 79
- شکل 7-3: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه کنترل 5 هفته ای 86
- شکل 8-3: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه آزمون سمیت T I 87
- شکل 9-3: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه آزمون سمیت T IV 88
- شکل 10-3: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه انجمادی V I 89
- شکل 11-3: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه انجمادی V IV 90
- شکل 12-3: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه کنترل 8 هفته ای 109
- شکل 13-3: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه nVTnG 110
- شکل 14-3: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه VTnG 111
- شکل 15-3: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه nVTG 112
- شکل 16-3: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه VTG 113
- شکل 17-3: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه nVTnG 117
- شکل 18-3: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه منجمد پیوندی غیر گنادکتومی (VTnG) 118
- شکل 19-3: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه nVTG 119
- شکل 20-3: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه VTG 120

فصل اول

مقدمه

Archive of SID

1-1. مقدمه

موفقیت در درمان سرطان با به کارگیری روشهایی چون شیمی درمانی، رادیوتراپی و پیوند مغز استخوان به ویژه پس از دهه 90، افزایش چشم گیری یافته است. با این وجود شیوع سرطان در سطح جهانی همچنان بر قربانیان خود می افزاید. انتظار می رود که تا سال 2020 تعداد بیماران سرطانی در سرتاسر جهان به 15 میلیون نفر برسد که متأسفانه 60% از موارد جدید در کشورهای کمتر توسعه یافته خواهند بود. سرطان دومین عامل مرگ زا در کشورهای توسعه یافته و سومین عامل در کشورهای جهان سوم است و به طور کلی 12% مرگ و میر جهانی، ناشی از این سونامی ناخوانده می باشد. در ایران نیز سرطان دومین عامل مرگ و میر محسوب شده و سالانه در حدود 30000 نفر جان خود را بر اثر سرطان از دست می دهند. پیش بینی شده است که سالانه 70000 مورد جدید به تعداد بیماران سرطانی در کشور افزوده شود و با توجه به افزایش امید به زندگی و نیز درصد سالمندی، میزان بروز آن در دو دهه آتی به دو برابر افزایش یابد. بر اساس گزارش "مؤسسه تحقیقات، درمان و آموزش سرطان ایران"، در سال 1386 تعداد موارد سرطانی ثبت شده در کشور 62040 نفر بوده است که از این میان تعداد قابل توجهی یعنی 44/19% آن در جمعیت زنان جامعه بروز یافته است.

در سال 2006 در ایالات متحده آمریکا 1399790 مورد سرطانی گزارش شده که از این تعداد، 679540 نفر مؤنث بوده [1] و 8% این افراد زیر سن 40 سال بودند. سرطان پستان نیز که در سن بلوغ و دوره باروری بیشتر دیده می شود، شایع ترین نوع سرطان گزارش شده و 15% از 182000 مورد بیماران دچار سرطان سینه (در ایالات متحده) زیر 45 سال قرار داشتند [2]. همچنین تعداد قابل توجهی از سرطانی های گردن رحم در آمریکا، دختران زیر سن بلوغ می باشند [3].

بیش از نیمی از بیماران سرطانی تحت یکی از انواع روش های مقابله با سرطان مانند شیمی درمانی و یا پرتودرمانی قرار می گیرند. در اکثر موارد، برای بیماران از روشهای ترکیبی استفاده می شود مانند به کار گیری پرتو درمانی و شیمی درمانی در یک زمان. متأسفانه درمان با روشهای تهاجمی، عوارض جانبی و گاهاً شدیدی را بر جای می گذارد. به دنبال استفاده از مواد سمی و تشعشعات یونیزان در درمان سرطان، فعالیت اندوکراین و چرخه تولید مثل تخمدانها به شدت تهدید می شود [4]. بیمارانی که تحت شیمی درمانی قرار می گیرند مستعد ابتلا به نقص تخمدان زودرس (POF)¹ شده که عامل مهم ناباروری در این افراد می باشد. اما به خاطر نتایج قابل قبول در بهبود سرطان و علی رغم آسیبهای جانبی، درمان با تبعات آن ترجیح داده می شود. بنابراین به منظور حفظ قدرت باروری، انجماد و پیوند بافت تخمدان² برای خانمهایی که در اثر شیمی درمانی، رادیوتراپی، ناهنجاریهای ژنتیکی و یا بیماریهای خاص دیگر مبتلا به ناباروری می شوند و برای دختران نابالغ نیز به عنوان تنها راه ممکن برای ذخیره سلولهای جنسی توصیه می گردد [1, 5-8].

¹ Premature Ovarian Failure

² Ovarian Cryopreservation and Transplantation

2-1. اثرات درمان سرطان با روشهای تهاجمی بر دستگاه تولید مثل

شیمی درمانی، رادیوتراپی تهاجمی و پیوند مغز استخوان در بیشتر از 90% دختران و خانمهای جوان مبتلا به سرطان انجام می شود [2]. از طرفی تخمدانها به خصوص زمانی که با داروهای آلكیلی تماس یابند، به درمانهای سمی بسیار حساس می شوند. تعدادی از این داروهای شایع و خطرناک برای سیستم تولید مثل عبارتند از: کلرامبوسیل، ملفالان، بیوسولفان، سیکلوفسفامید، پروکاربازین، ایفوسفامید، داکاربازین و تیوتپان [9-11].

ثابت شده است که داروهای شیمی درمانی، موجب افزایش سمیت در گنادها شده و بنابراین آسیب فولیکولها در نتیجه تخریب سیستم اندوکراین و تولید مثل تخمدانها، قطعی است، که بسته به نوع بیماری و سن بیمار شدت آن فرق می کند. به همین جهت Larsen و همکارانش در سال 2003 [12]، احتمال خطر افزایش چهار برابری POF در نوجوانان تحت درمان سرطان را گزارش کرد. سیکلوفسفامید، از جمله موادی است که به طور متداول در شیمی درمانی استفاده شده و جزء داروهای پر خطر برای گنادها و القاء کننده POF به شمار می رود [13-15]. در سال 1999، Meirou و همکاران، نقص در فولیکولهای بدوی موشهای تیمار شده با سیکلوفسفامید را گزارش کرد [15]. همچنین استفاده از دوز 5 گرمی سیکلوفسفامید در خانمهای بالای چهل سال، قطع کامل چرخه قاعدگی را به دنبال داشته و همین وضعیت بعد از استفاده از داروی فوق به میزان 9 و 20 گرم در خانمهای به ترتیب بین 30 تا 40 سال و 20 تا 30 سال دیده شده است [16]. Perez و همکاران [17] نیز با استفاده از داروی شیمی درمانی دوکسوروبیسین، آپوتوز را در سلول های گرانولوزا القاء نمودند. همچنین Takai و همکاران [18]، طی مطالعه ای نشان دادند که ژنهای Bax و Caspase 2 و 3 در موش، واسطه های بسیار مهم در تحریک سمیت بوده و بیان آنها طی شیمی درمانی افزایش می یابد.

از طرف دیگر رادیوتراپی حفره شکمی نیز موجب ناباروری 100% بیماران می شود [19]. ثابت شده که تابش دوز 5 تا 20 گری به تخمدانها در هر سنی تخریب کامل عملکرد گناد را موجب می گردد [20] و 2 گری تابش نیز می تواند 50% تخمکها را نابود کند [21]. تشعشعات یونیزان علاوه بر تخمدان، بر رحم نیز اثر تخریبی شدید می گذارد. به طوریکه Larsen و همکارانش در سال 2004 طی مطالعه ای نشان دادند که پرتودرمانی رحم، موجب کاهش حجم آن شده [22] و Critchley و همکاران نیز گزارش کردند که تابش 4 تا 30 گری تشعشع، موجب نقص عملکرد رحم می شود [23].

اگر چه تاکنون مطالعه ای بر روی کیفیت جنین یا تخمک انسانی متأثر از شیمی درمانی صورت نگرفته است، اما هیچگونه بدخیمی یا ناهنجاری در فرزندان مادرانی که پس از درمان سرطان به دنیا آمده اند، گزارش نشده است [13, 24]. با این وجود توصیه می شود که حداقل 3 تا 6 ماه باید از زمان شیمی درمانی بگذرد تا فرد بیمار باردار شود. اما اینکه چه فاصله مطمئنی بین شیمی درمانی کامل تا انجماد و پیوند تخمدان باید وجود داشته باشد، هنوز معلوم نیست.

3-1. حفظ قدرت باروری³ در بیماران سرطانی

چندین انتخاب برای بیماران سرطانی وجود دارد تا فرصت مادر شدن را پس از پشت سر گذارندن دوره بیماری مجدداً به دست آورند. که می توان به انجماد جنین، انجماد تخمک و انجماد بافت تخمدان اشاره نمود [25, 26]. قابل ذکر است که انتخاب روش مناسب به منظور کمک به حفظ قدرت باروری، بستگی به زمان رادیوتراپی، نوع سرطان، سن بیمار و وضعیت بیماری فرد دارد.

1-3-1. انجماد جنین

تنها روش مطمئن و گسترش یافته برای این منظور، انجماد جنین است. مؤسسه "پزشکی تولید مثل آمریکا"⁴ انجماد جنین را به عنوان تنها روشی معرفی می کند که اثر بخشی آن به اثبات رسیده است [27]. اما این روش برای بیماران سرطانی محدودیت هایی نیز دارد. اول نیازمند آن است که بیمار در دوره سنی بلوغ قرار داشته، در وضعیت جسمی قابل قبولی به سر برد و دهنده اسپرم مناسب داشته باشد. همچنین برای گرفتن تخمک مناسب، بیمار باید تحت فرآیند تحریک تخمدان قرار بگیرد. با توجه به حیاتی بودن زمان برای بیمار سرطانی، شیمی درمانی باید به سرعت آغاز شود، بنابراین امکان استفاده از روشهای زمان بر تحریک تخمدان، تقریباً منتفی میشود. اگرچه در برخی مراکز درمانی از روش های کوتاه مدت⁵ برای این منظور استفاده شده است، اما نتوانسته اطمینان قطعی نزد متخصصین امر به وجود بیاورد. همچنین اثبات شده است که استفاده از استرادیولها در تحریک تخمدان، رشد سلولهای سرطانی را تسریع می کند. اگر چه می توان برای خانمهای مجرد که تحت تحریک تخمدان قرار گرفته اند انجماد تخمک را انجام داد، اما موفقیت این روش بسیار پائین است (1 تا 5% حاملگی و زایمان پس از انجماد) [28, 29].

2-3-1. انجماد تخمک

انجماد تخمک نیز روشی است برای بیمارانی که شرایط لازم جهت انجماد جنین را دارند، فقط نمی توانند از اسپرم فرد دهنده استفاده کنند. در این مورد،⁶ IVF تخمکهای آنها برای تولید جنین و سپس انجماد جنین ها ممکن نیست. بنابراین تخمک های بالغ یا نابالغ این دسته از بیماران باید منجمد شود (نه جنین). در این راستا انجماد تخمکهای انسانی در چندین مرکز درمانی به صورت گسترده انجام می شود [30].

³ Fertility Preservation

⁴ American Society of Reproductive Medicine

⁵ Short Protocol

⁶ In Vitro Fertilization

3-3-1. انجماد تخمک بالغ

در نگاه اول به نظر می رسد که انجماد تخمک بالغ، روشی مناسب و دست یافتنی برای ذخیره سلولهای زاینده جنس ماده است. اگر خانمهای مجرد بتوانند مراحل تحریک تخمدان را قبل از شروع شیمی درمانی آغاز کنند، انجماد تخمک روشی مناسب برای حفظ قدرت تولید مثل آنهاست. اما برای کودکان، تحریک تخمک گذاری و جمع آوری تخمکها برای انجماد امکان پذیر نیست [31]. حدود 21 مطالعه بر روی انجماد تخمک توسط Oktay, Sonmezer و همکارانشان انجام شده است. طی این مطالعات و به طور متوسط میزان زنده ماندن تخمک پس از انجماد 47%، میزان لقاح 52/5% و میانگین حاملگی 1/52% گزارش شده است. بسیاری از مطالعات اخیر نیز نشان می دهند که با استفاده از حجم بالای سوکروز، نتایج بهتری در انجماد تخمک حاصل میشود، ولی هنوز تضمین خوبی برای تأثیر گذار بودن آن در بالین وجود ندارد [28]. در مطالعات Borini و همکارانش [28] نیز 18 بارداری بالینی از 927 تخمک منجمد شده گزارش شده است. همچنین در مطالعه دیگری میزان متوسط بارداری از 1/8% فراتر نرفت [29]. تخمک مرحله متافاز II، یک سلول بزرگ، ویژه و حساس است. به همین دلیل انجماد تخمک با آسیبهایی بسیاری همراه است که موجب پایین آمدن میزان زنده ماندن پس از ذوب می شود [32]. در این جا دو دلیل مهم وجود دارد: اول، لایه شفاف (ZP⁷) در محلول انجماد سخت شده و احتمالاً موجب ناقص ماندن عمل گرانولهای قشری⁸ می شود. بنابراین موجب عدم نفوذ اسپرم شده و لقاح طبیعی را دچار اشکال می کند. البته روش تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI⁹) تا حدودی می تواند گزینه خوبی برای جبران این حالت باشد. دومین دلیل حضور دوک تقسیم در سیتوپلاسم تخمک است که به راحتی توسط کرسنالهای یخ داخل سلولی آسیب می بیند [33]. این دلایل باعث می شود که ایجاد بانک تخمک با چالشهای بزرگی همراه باشد.

4-3-1. انجماد تخمک نابالغ

انجماد تخمک در مرحله پروفاز I (GV¹⁰) نسبت به تخمک مرحله متافاز II با درصد موفقیت بیشتری همراه است [34]. تخمک های GV اندازه کامل داشته و تقسیمات اول میوزی را نیز کامل کرده اند. اما هنوز به طور کامل بالغ نشده و دومین متافاز خود را شروع نکرده اند. اگر چه خطر سخت شدن زونا پلوسیدا و آسیب به اسکلت سلولی گریز ناپذیر است. احتمال دارد که فقدان دوک تقسیم و حضور غشاء هسته که از کروماتین محافظت می کند، از ایجاد نقایص سایتوژنتیک در طول تقسیم سلولی جلوگیری کند [35]. بالغ شدن تخمک

^v Zona Pellucida

[^] Cortical Granules

[^] Intracytoplasmic Sperm Injection

[^] Germinal Vesicle

با آزاد شدن اولین جسم قطبی¹¹ در نتیجه کامل شدن تقسیم اول میوز ارزیابی می شود، اما بلوغ سیتوپلاسم آن نیز برای انجام لقاح ضروری است [36].

اگر چه تاکنون چندین گزارش از بارداری حاصل از انتقال تخمکهای بالغ شده آزمایشگاهی ارائه گردیده، اما بارداری در نتیجه انتقال تخمکهای نابالغ حاصل از انجماد و بلوغ آزمایشگاهی، فقط یک مورد گزارش شده است [37]. همچنین Wu و همکارانش در سال 2001 [38] بارداری بیوشیمیایی در نتیجه انتقال تخمک GV منجمد-ذوب شده را گزارش دادند و Kan و همکاران نیز در سال 2004 [39]، به دنبال روش فوق یک بارداری ناموفق را که حدود 12 هفته به طول انجامید گزارش نمودند.

1-3-5. انجماد بافت تخمدان

برای بیمارانی که به شیمی درمانی سریع نیازمندند، انجماد تخمدان تنها راه ممکن و میسر است [40]. هدف اصلی این روش پس از طی دوره درمان و رهایی کامل از سرطان، بازگرداندن بافت قشری تخمدان (که حاوی سلولهای جنسی ماده است) به حفره لگنی و یا ناحیه ای شبیه بازو یا دیواره شکم می باشد [35]. روش های دیگر جهت بازگرداندن قدرت باروری بیماران سرطانی، مثل پیوند فولیکولهای بدوی جدا سازی شده و یا پیوند کل بافت تخمدان، در ادامه مورد بحث قرار می گیرند.

انجماد بافت تخمدان در بیماران سرطانی نسبت به انجماد جنین یا تخمک محاسن زیادی دارد [41]. اول اینکه، بافت قشری تخمدان دارای تعداد زیادی فولیکول بدوی می باشد. دوم، انجماد بافت تخمدان علاوه بر اینکه می تواند قدرت فعالیت درون ریز تخمدان را حفظ نماید، پس از پیوند و بازگرداندن آن به بدن می تواند محورهای هورمونی هیپوفیز-هیپوتالاموس-تخمدان را مجدداً فعال نماید، که البته این حالت بوسیله انجماد تخمک و جنین رخ نمی دهد. سوم، تخمدانها در هر زمانی و بدون توجه به چرخه قاعدگی حتی از طریق یک لاپاراسکوپ ساده به دست می آیند. چهارم، فولیکولهای بدوی بدلیل فعالیت متابولیک پائین نسبت به تخمک بالغ به کاهش دما حساسیت کمتری داشته و همچنین تخمک درون این فولیکولها در مرحله پروفاز I متوقف شده و فعالیت تکوینی کمی دارند. همچنین تخمک در فولیکولهای بدوی فاقد زوناپلوسیدا بوده و از طرف دیگر چربی داخل سیتوپلاسمی بسیار کمی دارند که حضور چربی می تواند کاهش درجه حرارت را با مشکل مواجه نماید، بنابراین آسیب های ناشی از کاهش دما را افزایش می دهد. نهایتاً، فولیکولهای بدوی که نشانگرهای مخصوص گونه ای ندارند، مدلهای خوبی برای تحقیقات به شمار می روند. این فولیکولها از نوع پیش برجسته بوده و در انسان بیش از 90% فولیکولهای قشر تخمدان را شامل می شوند. تعداد انواع دیگر فولیکولها حالت نوسانی دارد [42].

در حال حاضر انجماد تخمدان به سه طریق انجام می شود: انجماد کل تخمدان به همراه پایک عروقی¹²، انجماد قطعات قشر تخمدان¹³ و انجماد فولیکولهای جدا سازی شده¹⁴.

¹¹ Polar Body

¹² Vascular Pedicle

¹³ Ovarian Cortex

1-5-3-1. انجماد کل بافت تخمدان

بافت تخمدان انسانی حاوی فولیکولهای زنده، طی مدت 3 ساعت با موفقیت از یک شهر به شهر دیگر در کشور دانمارک منتقل شد [43]. همچنین در سال 2012 اولین تولد نوزاد حاصل از فرآیند انجماد و پیوند تخمدان انسان در آلمان گزارش گردید که اهمیت آن در انتقال بافت تخمدان از یک شهر به شهر دیگر طی مدت 12 ساعت بود [44]. این مسئله نشان داد که ذخیره سازی مؤثر تخمدان بیماران در شهرهایی که بیمارستان یا مرکز ناباروری ندارند، امکان پذیر خواهد بود. برای جلوگیری از ایجاد نواحی نکروز در بافتی که پیوند زده می شود و به منظور برقراری هر چه بهتر آناستوموزهای عروقی بعد از پیوند، انجماد کل بافت تخمدان به همراه پایک عروقی آن صورت گرفته است [45]. در مطالعه ای بر روی موش صحرایی، تمامی 8 تخمدانی که پیوند زده شدند، عملکرد مجدد یافته و یک حاملگی نیز مشاهده گردید [46]. در گوسفند نیز برقراری آناستوموزهای ریز عروقی و برگشت عملکرد هورمونی بافت تخمدان حاصل از انجماد، پس از پیوند دیده شده است [47]. در چند سال اخیر تلاش شده است تا تخمدان کامل در حیواناتی نظیر موش صحرایی [47]، خرگوش [48] و گوسفند [49] منجمد شود و پس از پیوند مورد مطالعه قرار گیرند. اولین مورد برگشت قدرت باروری پس از انجماد و پیوند بافت تخمدان توسط Wang و همکارانش در سال 2002 [47] گزارش شد. آنها نشان دادند که پیوند عروقی بافت تخمدان و مجاری تولید مثلی موش صحرایی در 4 مورد از هفت پیوند موفقیت آمیز بوده و حیوانات گیرنده بیش از 60 روز زنده مانده اند، پس از آن این گروه در ادامه مطالعات خود موفق شدند تخمک گذاری و بارداری را در موش صحرایی گزارش کنند. Chen و همکارانش نیز در سال 2006 [48] نشان دادند که پس از انجام پیوند ریز عروقی¹⁵، حدود 86% از تخمدان های منجمد-ذوب شده خرگوش می تواند تا 7 ماه به عملکرد خود ادامه دهد.

در جانوران بزرگ جثه مانند انسان، انجماد کل تخمدان بسیار دشوارتر از حیوانات کوچکتر است. بدلیل اینکه اولاً مواد ضد یخ در بافتهای بزرگ و متراکم به سختی نفوذ می کنند و در ثانی احتمال آسیب عروقی در این بافتها بر اثر شکل گیری یخ داخل عروقی¹⁶ بیشتر است. با این وجود Arav و همکارانش در سال 2005 [50] ترشح پروژسترون را 36 ماه پس از پیوند در 3 مورد از 8 بیمار مشاهده کردند و در طی مطالعه شان 6 تخمک به دست آوردند که پس از لقاح تا مرحله 8 سلولی پیش رفتند. همچنین Bedaiwy و همکارانش در سال 2003 [51] نشان دادند که برگشت عملکرد هورمونی تخمدان منجمد-ذوب شده در گوسفند پس از پیوند به خود به همراه جراحی ریز عروقی، فرآیندی امکان پذیر است، اما مشکل اساسی ایجاد لخته در روند رگ گیری مجدد بود که منجر به از بین رفتن 8 رأس حیوان از 11 مورد پیوندی شد. از طرفی ثابت شده است که پیوند به خودی کل بافت تخمدان منجمد گوسفند به همراه پایه عروقی تخمدان، منجر به بارداری و زایمان می شود

¹⁵ Isolated Follicle

¹⁶ Micro Vascular

¹⁷ Intravascular Ice

[49]. علاوه بر این، در مطالعه فوق، 6 عدد از 8 تخمدان، با عروق بزرگ بدون ایجاد لخته خون و با حفظ تمامیت ساختاری استرومای تخمدان، آناستوموز داده شد و مشاهده گردید که 18 تا 19 ماه پس از پیوند، تخمدانها همچنان فعال باقی مانده اند. Martinez-Madrid و همکاران، کل تخمدان انسانی را با پایک عروقی منجمد کردند و توانستند پس از ذوب میزان بالای زنده ماندن فولیکولها (75/1%) را گزارش نمایند. همچنین در این مطالعه سلولهای استرومایی، عروق کوچک و نیز ساختار بافتی پس از ذوب در وضعیت طبیعی باقی ماندند [52]. مطالعه دیگری نیز نشان داد که پس از انجماد و ذوب کل تخمدان انسان، افزایش آپوپتوز در سلولهای مختلف رخ نداده است [53]. بررسی میکروسکوپ الکترونی نیز نشان داد که قسمت اعظم فولیکولهای بدوی (96/7%) بعد از انجماد سالم مانده [54] و علاوه بر این 96/3% سلولهای اندوتلیال عروق خونی، ساختار طبیعی خود را حفظ کرده و درصد فعالیت Caspase-3 نیز در آنها کمتر از 1% بوده است.

1-3-5-2. انجماد قطعات قشر تخمدان

به منظور حصول بهترین نتیجه، بافت تخمدان باید قبل از شروع شیمی درمانی و یا تابش تشعشعات رادیو اکتیو از بدن خارج شود. چرا که شیمی درمانی حتی با تک دوز درمانی نیز می تواند منجر به مرگ فولیکول ها و کاهش ذخیره گامت تخمدان گردد [55]. قطعات قشر تخمدان می تواند به وسیله یک جراحی لاپاراسکوپی ساده و در اسرع وقت بدون در نظر گرفتن چرخه جنسی به دست آید. امروزه سعی می شود تا این جراحی به دلیل تحمیل بیهوشی عمومی به بیمار، با جراحی های دیگر همراه باشد تا هزینه ها و آزار بیماران نیز به حداقل برسد [56]. در لاپاراسکوپی تلاش می شود تا قشر تخمدان با حداقل چسبندگی به مدولای تخمدان از آن جدا گردد. سپس در محیط آزمایشگاه، ضخامت قشر جداسازی شده از تخمدان به حدود 1 میلی متر تقلیل می یابد. این مسئله به برقراری آناستوموزهای عروقی در قطعات قشر پیوند زده شده کمک بسزایی می کند [57]. اگر قطعه جدا شده از تخمدان بزرگ باشد و یا کل تخمدان از بدن خارج شود، بخش قشر از بافت های زیرین خود جدا شده و معمولاً به قطعات 5 × 5 × 1 میلی متر مکعب تقسیم می شود. سپس قطعات آماده شده با روش های انجماد شیشه ای و یا آهسته منجمد شده و تا زمان پیوند و یا ارزیابی های پاتولوژیک نگهداری می شوند [56]. در برخی موارد، بخش مرکزی تخمدان نیز منجمد و نگهداری می شود تا در مواقع ضروری بتوان از آن استفاده نمود.

1-3-5-3. مقایسه روشهای مختلف انجمادی بافت تخمدان

به طور کلی دو روش انجمادی برای نگهداری بافت تخمدان وجود دارد: انجماد آهسته¹⁷ و شیشه ای¹⁸. به دنبال انجماد بافت تخمدان، به خصوص در روش آهسته نتایج بسیار مختلفی ارائه شده است [31, 58]. اصلی ترین تفاوت بین انجماد شیشه ای و آهسته در سرعت کاهش درجه حرارت و غلظت ضد یخ مصرفی است. سرعت کاهش درجه حرارت در انجماد شیشه ای بر خلاف انجماد آهسته، بیش از 1500 درجه سانتیگراد در دقیقه بوده و این امر باعث می شود که آب خارج سلولی به سرعت از دمای 5- تا 15- درجه سانتیگراد بگذرد، تا اینکه کریستالهای یخ داخل و خارج سلولی فرصت تشکیل نداشته باشند. انجماد یکباره تمامی عناصر، منجر به ایجاد حالت شیشه ای شکل در سلول می شود. انجماد شیشه ای ابتدا در سال 1985 توسط Rall و همکارانش برای انجماد جنین های موشی استفاده شد [59]. امروزه از این روش در انجماد جنین [60]، تخمک [35]، بافت تخمدان و نیز انجماد سلولهای بنیادی جنینی انسانی استفاده می شود [61] اما اطلاعات و تحقیقات انجام گرفته در زمینه انجماد بافت تخمدان انسانی، اگر چه موفقیتهایی را به دنبال داشته ولی هنوز کافی نیست.

در انجماد شیشه ای از ابزارهای متنوعی برای انتقال نمونه به داخل نیتروژن استفاده می شود که با نام "انتقال دهنده"¹⁹ خوانده می شوند. مانند: کرایوتیوب، نی انجمادی²⁰، پیپتهای قابل انعطاف، گریدهای میکروسکوپ الکترونی، همی استراو، شبکه های نایلونی، کرایولوپ، کرایولیف، کرایوتاپ و کرایوپین [62].

انجماد بافت تخمدان به دلیل گوناگونی در هندسه، جمعیت سلولی و سیستم عروقی خاص، با سلولهای منفرد بسیار متفاوت است. در برخی از روشهای انجمادی به دلیل ضخامت دیواره ابزار انتقال نمونه، تغییرات درجه حرارت با سرعت پائین صورت می پذیرد. سایر وسایل نیز یا گران بوده و یا فضای زیادی برای ذخیره سازی لازم دارند. بدین جهت، در مطالعه ای از پیپت پاستور برای انتقال بافت تخمدان به درون نیتروژن استفاده شده است [29]. نتایج بافت شناسی تخمدانهای منجمد-ذوب شده نشان می دهد که 80/3% فولیکولهای بدوی²¹ دارای شکل طبیعی بوده و نتایج در مقایسه با مطالعات دیگر، آسیب جدی نشان نمی دهد (90-70%) [63, 64]. در سال 2003، Isachenkov و همکارانش [65] بافت تخمدان انسانی را منجمد کردند و بیش از 80% فولیکول بدوی سالم بدست آوردند. این نتیجه نشان داد که انجماد شیشه ای، روشی آینده دار برای ذخیره بافت تخمدان است. در سال 2005، Yeoman و همکارانش [66] نیز از گریدهای میکروسکوپ الکترونی برای انجماد بافت تخمدان استفاده و نتایج بسیار رضایتبخشی را گزارش نمودند. این ظرف تغییر شکل یافته برای انجماد بافت تخمدان انسان موثر واقع شد و بعد از ذوب اکثر فولیکولها ظاهر طبیعی خود را حفظ کردند. همچنین بافت تخمدان پس از پیوند، با عملکرد هورمونی مناسب به فعالیت حیاتی بازگشت. اما Gandolfi [67] و همکارانش

¹⁷ Slow Freezing

¹⁸ Vitrification

¹⁹ Carrier

²⁰ Cryo Straw

²¹ Primordial Follicle

در سال 2006 نتایج ضعیفی از انجماد شیشه ای بافت تخمدان انسان با استفاده از نی های پلاستیکی ارائه کردند. این امر نشان می دهد که استفاده از وسایل مختلف برای انتقال نمونه به داخل نیتروژن، اثرات متفاوتی در ساختار بافت می گذارد. به هر حال علی رغم نتایج نه چندان خوب در برخی مطالعات، این طور به نظر می رسد که در کل انجماد شیشه ای روشی آینده دار برای انجماد تخمدان به شمار می رود.

1-3-5-4. اثر ضد یخهای مختلف بر انجماد بافت تخمدان

اگر چه تاریخچه پیوند بافت تخمدان به قرن هجدهم بر می گردد، اما برای ذخیره سازی گامت های ماده، سال ها گذشت تا نهایتاً در دهه 50 قرن بیستم، با کشف کاربرد مواد ضد یخ در نگهداری مواد زیستی، انجماد بافت تخمدان در مدل‌های حیوانی آغاز گردد [5]. مطالعات اولیه بدلیل استفاده از ضدیخهای ضعیف مانند گلیسرول (glycerol) و استامید و نیز به خاطر عدم وجود روش انجمادی مناسب، نتایج خوبی را ارائه نکردند و فقط 10% فولیکولهای بدوی پس از انجماد حفظ می شدند [6]. استفاده از سایر ضدیخها از دهه 90 به بعد گسترش یافت که متداولترین آنها دی متیل سولفوکساید ($DMSO^{22}$)، اتیلن گلیکول (EG^{23}) و پروپاندیول ($PROH^{24}$) بودند. با به کارگیری این نوع از ضدیخها امکان انجماد و پیوند موفق بافت تخمدان و بازگشت قدرت باروری در حیوانات به وجود آمد [7, 8] و نتایج بسیار خوبی به دنبال داشت، در حالیکه گلیسرول و یا استامید چندان اثر گذار نبودند [4]. به هر حال این امر ثابت شده است که پاسخ به استفاده از انواع ضدیخها، به نوع گونه، سلول و یا بافت مورد آزمایش وابسته است.

Gosden و همکارانش در سال 1994 [68] از $DMSO$ برای انجماد آهسته تخمدان گوسفند استفاده کردند. در مطالعه آن ها مدتی پس از پیوند قطعات منجمد-ذوب شده، حیوان بارور شده و در نتیجه آن نیز بره ای به دنیا آمد. از آن پس چندین مطالعه موفق بر روی گونه های مختلف حیوانی مانند گوسفند [69]، بز [70]، گاو [71] و گربه [72] گزارش شد. Newton و همکارانش نیز در سال 1996 [73] از $PROH$ ، $DMSO$ ، گلیسرول و EG برای انجماد بافت تخمدان انسان استفاده کردند. سپس بافتهای منجمد-ذوب شده را در زیر کپسول کلیه موشهایی که دستگاه ایمنی آنها سرکوب شده بود²⁵، پیوند زدند. نتایج نشان داد که بالاترین میزان زنده ماندن متعلق به بافتهای تخمدان منجمد شده با EG است. در تحقیق دیگری Newton و همکاران [74]، زمان متفاوتی را برای نفوذ EG استفاده کرده و نتایج بسیار بهتری گزارش نمودند. همچنین Schmidt و همکارانش در سال 2004 موفق شدند از تخمدان انسانی حاصل از انجماد با EG و پیوند ارتوتوپیک، تخمکهای متافاز II با کیفیت خوب به دست آورد [75].

²² Dimethyl Sulfoxide

²³ Ethylene Glycol

²⁴ Propanediol

²⁵ *Immunosuppressed mice*

Gook و همکاران در سال 1999 [76]، از ترکیب PROH و سوکروز برای انجماد تخمدان انسانی استفاده کرده و نشان دادند که انجماد آهسته برنامه ریزی شده به طور معنی داری بهتر از انجماد سریع است. در این آزمایش، تماس بافت با ضد یخ به مدت 90 دقیقه، باعث ایجاد ظاهری خوب در بررسی میکروسکوپ الکترونی شد. در مطالعات بعدی زمان تماس با ضد یخ، 15 دقیقه کاهش یافت [77]، که این امر از واکنش پذیری شدن بافت جلوگیری نمود. از طرف دیگر اثر سرم معمولی و آلبومین سرم انسانی (HSA²⁶) موجود در محلول انجمادی توسط Hreinsson و همکارانش بررسی شده است. این مقایسه نشان داد که نوع سرم چندان اثر معنی داری در زنده ماندن سلولهای بافت ندارد [78].

همچنین تکنیکهای انجماد فوق سریع با غلظت بالای DMSO برای انجماد تخمدانهای جنین انسان استفاده شده است [79]. اگر چه در این روش بعد از ذوب یک نقطه مرکزی نکروزه در بافت تخمدان مشاهده شد، اما استروما و فولیکولها طبیعی بودند. در ادامه کار، بافتهای منجمد-ذوب شده در محیط کشت ارگان²⁷، زنده مانده و به فعالیت هورمونی بازگشتند. در آزمایش دیگری با استفاده از ترکیب PROH و DMSO تخمدانهای جنین انسان به روش انجماد آهسته منجمد و نتایج خوبی نیز حاصل گردید [80].

باید توجه نمود که معمولاً از ترکیب ضد یخها برای کاهش اثر سمیت یک ضد یخ به تنهایی استفاده می شود. از طرف دیگر نسبت و شدت سمیت یک ضد یخ با تراکم بافت رابطه مستقیم دارد. از این رو انجماد شیشه ای تخمدان موش نسبت به انجماد تخمدان انسان راحت تر انجام می شود، چرا که از تراکم و فشردگی کمتری برخوردار است [81]. Isachenkov و همکاران در سال 2003 تخمدان انسان را با ترکیبی از 40% EG + 0/35 مول در لیتر سوکروز و زرده تخم مرغ منجمد کردند [41] و پس از ذوب ظاهر بسیار خوب قطعات تخمدان را گزارش نمودند. به احتمال قوی، علت این موفقیت به خاطر سمیت پائین ترکیب ضد یخ به همراه آب گیری مناسب توسط این سه ماده بوده است. بررسی روشهای انجمادی نشان می دهد که با وجود مشکلات خاص، با این حال محققین زیادی اعتقاد دارند که انجماد شیشه ای نسبت به آهسته ارجحیت دارد.

1-3-5-5. پروتئین های ضد انجمادی²⁸

اگر چه مدت زمان زیادی از کشف مواد ضد یخ و تاریخچه کوتاه مدت علم کرایوبیولوژی به شکل امروزی نمی گذرد، اما اثر گذاری علوم کشف شده در دو دهه اخیر بسیار بیشتر از قرن های گذشته بوده است. همانطور که می دانیم بسیاری از جانوران و گیاهان مناطق سردسیر برای حفاظت خود در برابر سرما از مواد ضد یخ طبیعی استفاده می کنند که این امر می تواند محققین را در بهبود روش های انجمادی و کاهش آسیب های ناشی از آن یاری نماید. به طور مثال کرمی با نام علمی Bracon Cephi، در طول پاییز در مایعات بدن خود به میزان

²⁶ Human Serum Albomin

²⁷ Organ Culture

²⁸ Anti-freeze Proteins

25% گلیسرول انباشته می کند تا بتواند سرمای 50- درجه سانتیگراد را تعدیل و تحمل نماید [82]. گزارش شده است در بدن کرم دیگری با عنوان علمی *Tenebrio Larvae*، پروتئین های ضد انجمادی ساخته می شود که اثرشان از مواد موجود در بدن ماهی قطبی نیز بسیار قوی تر است [83]. از جمله موارد بسیار جذاب دیگر، تولید پروتئین های ضد انجمادی توسط ماهی های قطبی و حشرات زمستان خواب آن نواحی می باشد. پروتئین های ضد انجمادی در اصل گلیکوپپتیدهایی هستند که به وسیله فرآیند جذب-مهار از ایجاد کریستال یخ در بدن جلوگیری می نمایند. به نظر می رسد پروتئین های ضد انجمادی برای انجماد مواد زیستی با روش های فوق سریع جهت جلوگیری از تشکیل کریستال های یخ بسیار مناسب باشند. *Rubinsky* و همکارانش نشان دادند که اضافه کردن پروتئین های ضد انجمادی به محلول های انجماد شیشه ای، میزان رشد تخمک ها و جنین های کشت داده شده پس از ذوب را بهبود می بخشد [84]. همچنین این مواد ضد انجماد فقط در بدن حیوانات دیده نمی شوند بلکه در ساختار برخی گیاهان نیز به خوبی وجود داشته و در برابر کاهش دما عمل می نمایند. محققین از ریشه نوعی هویج با نام علمی *Daucus Carota*، پروتئین ضد انجمادی استخراج کرده اند که توانسته است از تشکیل کریستال های یخ به خوبی جلوگیری نماید [85]. اگر چه اثر این پروتئین ها در برابر کاهش دما مشخص گردیده اما هنوز برای استفاده بهینه از آن ها تحقیقات دیگری باید صورت پذیرد.

4-1. تاریخچه پیوند بافت تخمدان انجمادی

پس از انجماد به منظور بازگشت فعالیت حیاتی تخمدان، بافت تخمدان به بدن موجود زنده پیوند زده میشود. اگر بافت منجمد-ذوب شده به بدن خود بیمار یا حیوان اولیه که تخمدان یا قطعات تخمدان از او گرفته شده است، برگردانده شود به آن "پیوند به خود" یا اتوگرافت²⁹ گفته می شود. ولی در صورتیکه بافت تخمدان به بدن فرد و یا حیوان دیگری از همان گونه پیوند زده شود به آن "پیوند به هم گونه" یا آلوگرافت³⁰ و اگر به بدن فرد و یا حیوان دیگری از گونه ای دیگر، پیوند زده شود به "پیوند به غیر گونه" و یا زنوگرافت³¹ می گویند. حال اگر بافت تخمدان به جایگاه اولیه خودش برگردانده شود به آن "ارتوتوپیک"³² گفته می شود، ولی اگر تخمدان به جایگاه دیگری در بدن (مانند زیر پوست و یا عضله) پیوند زده شود، پیوند از نوع "هتروتوپیک"³³ میباشد. در پیوند اتوگرافت باید به این نکته دقت داشت که برگرداندن بافت به بدن بیمار باید زمانی صورت پذیرد که فرد از بیماری صعب العلاج خود نظیر سرطان رهایی کامل پیدا کرده باشد.

²⁹ Autograft

³⁰ Allograft

³¹ Xenograft

³² Orthotopic

³³ Heterotopic

گزارشات مختلفی از پیوند بافت تخمدان در حیوانات گوناگون ارائه شده است که حاکی از بازگشت فعالیت هورمونی و یا تولد نوزاد بوده است. از قدیمی ترین گزارشات مربوط به پیوند بافت تخمدان می توان به مطالعه Parkes و همکارانش در سال 1952 اشاره نمود [86] که بر روی تخمدان موش صحرایی صورت گرفته است. Deanesly و همکاران نیز در سال 1954 تخمدان موش صحرایی را پس از انجماد به بدن حیوان پیوند زدند [87]. به دنبال این یافته ها، مطالعات دیگری نیز بر روی حیوانات مختلف صورت گرفته است، که از آن جمله می توان به خرگوش [88]، همستر [89]، گوسفند [90]، موش آزمایشگاهی [91]، موش صحرایی [87]، انسان [92] و گاو [93] اشاره نمود.

باید اذعان نمود که گاهی برای حفظ یکباره تمامی سلولهای جنسی، کل بافت تخمدان پیوند زده می شود که البته توفیق چندانی در پذیرش این روش بین محققین وجود ندارد. اگر چه در رابطه با حیوانات کوچک جثه مانند موش و موش صحرایی این گونه به نظر می رسد که پیوند کل بافت تخمدان انجمادی تنها راه ممکن باشد [19].

تخمدان انسان اولین بار در سال 1996 توسط Hovatta و همکاران منجمد شد [94]. اما سابقه پیوند بافت تخمدان انسان به سالها قبل تر از آن بر میگردد. Bosma و همکارانش جزء اولین کسانی بودند که بافت تخمدان انسان را به صورت زئوگرافت در سال 1983 پیوند زدند [95]. از جمله مطالعات دیگری که در جهت پیوند زئوگرافت تخمدان انسانی صورت گرفته است، می توان به موارد زیر اشاره کرد: Oktay، [96] Gosden، [97] Abir، [98] Kim، [99] Maltaris، [100] و [54] Nottola و همکارانشان. اما پیوند اتوگرافت بافت تخمدان انسان که از درجه اهمیت بسیار بالایی برخوردار است، اولین بار در سال 1998 توسط Aubard و همکارانش انجام شد [101]. تلاش محققین، نهایتاً در سال 2004 به دست Donnez و همکارانش به بار نشست و پیوند اتوگرافت بافت تخمدان منجمد-ذوب شده انسان در بیمار سرطانی منجر به تولد نوزاد زنده گردید [7]. پس از آن تلاشهای دیگری نیز در جهت پیوند اتوگرافت بافت تخمدان منجمد-ذوب شده انسان صورت گرفته است [40] که تعداد انگشت شماری تولد نوزاد زنده را به دنبال داشته اند. این روند رو به رشد هر چند که از سرعت بالایی برخوردار نیست اما می تواند نوید خوبی برای محققینی باشد که تلاش می کنند تا در تسکین گوشه ای از آلام بشر سهیم باشند.

5-1. پیوند بافت تخمدان

اگر چه تاریخچه پیوند بافت تخمدان به قرن 18 بر میگردد، اما تنها در دهه اخیر آرزوی مادر شدن برای بیماران رها شده از سرطان تحقق پیدا کرد [7]. تاکنون تولد 22 نوزاد زنده در پی پیوند بافت تخمدان منجمد شده نشان داده است که این فرآیند توانسته از یک فرضیه به واقعیتی عملی تبدیل شود. در رابطه با حیوانات نیز بدون در نظر گرفتن بحث انجماد، برگرداندن بافت به بدن منجر به برگشت فعالیت هورمونی گردیده و تولد نوزاد

را نیز به همراه داشته است [102]. اولین گزارش های بازگشت باروری پس از پیوند به خودی³⁴ تخمدان انجمادی، در گوسفند گزارش شد [68]. با این حال مسائل حل نشده زیادی در رابطه با عملکرد تخمدان پس از پیوند وجود دارد. به همین دلیل بسیاری از محققین سعی در مطلوب نمودن شرایط پیوند دارند [103].

1-5-1. مسائل و مشکلات انجماد و پیوند بافت تخمدان

1-1-5-1. ارزیابی دقیق نتیجه انجماد و پیوند بافت تخمدان

امروزه به طور قطع می توان گفت که اکثر محققین، بررسی بافت شناسی تخمدان منجمد و یا پیوند زده شده را تنها با روش میکروسکوپ نوری کافی نمی دانند. اعتقاد بر این است که هر چقدر یک فولیکول در زیر میکروسکوپ نوری ظاهر خوب و مناسبی داشته باشد، نمی توان بدون بررسی جزئیات بیشتر و یا فراساختار آن، اظهار نظر قطعی در باره زنده بودن آن فولیکول داشت [104]. بنابراین بررسی فراساختار بافت به لحاظ وضعیت ارگانل های سیتوپلاسمی، غشاء هسته و سلول [105]، اسکلت سلولی [106]، ارتباطات بین سلولی [107]، میکروویلی ها، زوائد سطح سلولی و اپیتلیوم سطحی تخمدان و نیز وضعیت زونا پلوسیدا در تخمک مراحل پیشرفته ضروری می نماید. حتی برخی از محققین معتقدند که باید نتایج انجماد و پیوند بافت را تا تولد نوزاد زنده پی گیری نمود [104].

از طرف دیگر، برای بررسی دقیق فعال بودن بافت تخمدان منجمد شده، می توان از روش پیوند استفاده نمود. پیوند بافت نشان می دهد که روش انجمادی اتخاذ شده در مرحله قبل تا چه حدودی کاربردی و قابل استفاده است. پس از پیوند نیز با اندازه گیری سطح هورمون های مترشحه از تخمدان و یا گنادوتروپین هایی که به واسطه حضور تخمدان ترشح شده اند، می توان موفقیت تخمدان را در برقراری مجدد چرخه هورمونی ارزیابی نمود. همچنین کشت تخمدان منجمد شده نیز در کنار پیوند تخمدان، می تواند به ارزیابی وضعیت حیاتی بافت کمک نماید. اگر چه دو روش پیوند و کشت تخمدان متفاوت از یکدیگر به نظر می رسند اما کشت نیز به دلیل قابل دید بودن سیستم رشد بافت، اطلاعات خوبی از فعالیت فیزیولوژیک بافت منجمد شده در اختیار قرار می دهد.

روش دیگری که به ارزیابی دقیق اثرات انجماد و یا پیوند بر روی بافت تخمدان کمک می کند، روش های رنگ آمیزی حیاتی بافت به وسیله رنگ هایی چون تریپان بلو و یا کلسین AM/اتیديوم همودایمر [108] است. رنگ آمیزی های حیاتی نیز می توانند تا حدود زیادی درباره اثرات انجماد و پیوند اطلاعات خوبی ارائه نمایند.

2-1-5-1. اثر جایگاه های مختلف بر نتیجه پیوند

جهت پیوند می توان بافت را به جایگاه اولیه خود برگرداند و به صورت ارتوتوپیک [109] و یا در جایگاهی غیر از جایگاه اولیه به صورت هتروتوپیک [110] پیوند زد. جهت پیوند ارتوتوپیک، قشر تخمدان [111]، پریتونوم

³⁴ Autotransplantation

زیر ناف تخمدان [75] و یا بقایای تخمدان پس از درمان [7] در نظر گرفته می شود و برای پیوند هتروتوپیک نیز می توان بازو [112]، زیر پوست شکم [112]، حفره پریتونوم [8]، عضله راست شکمی [113]، عضله گلوئئال [114]، عضله دلتوئید [115]، چادرینه [116]، زیر فاسیای عضله و کپسول کلیه [117]، بند تخمدان و دیواره معده [118] و یا حفره آگزایلا [119] را مثال زد. نگرانی دیگر در رابطه با پیوند، مدت زمان ایسکمی و ریپرفیوژن بافت پیوندی است و کاهش زمان ریپرفیوژن بسیار حیاتی است. در بافت پیوندی پس از 5 روز، ریپرفیوژن و اکسیژن گیری مجدد³⁵ آغاز و پس از 21 روز تثبیت می گردد [120]. از آنجائیکه میزان ایسکمی بافت با مدت زمان برقراری ارتباط عروقی مجدد بین بافت پیوندی و بافت میزبان رابطه مستقیم دارد لذا سایت پیوند نقش بسیار مهمی در افزایش و یا کاهش این مدت زمان بازی می نماید.

وجود عروق خونی در دسترس و یا تولید بستر خونی لازم با ایجاد زخم در جایگاه پیوند، می تواند به کاهش ایسکمی کمک نماید. اثر زخم ناشی از جراحی نیز در برقراری بهتر ارتباط بین بافت پیوندی و گیرنده ثابت شده است [121]. این اثر 2 تا 4 روز پس از پیوند با تشکیل لخته فیبرینی و ترشح عوامل رشد مختلف از جمله عامل رشد فیبرو بلاست (FGF)³⁶، عامل رشد تغییر شکل دهنده (TGF)³⁷ و عامل رشد سلولهای اندوتلیالی عروقی (VEGF)³⁸ به حداکثر رسیده و با تهاجم سلولهای اندوتلیالی ادامه می یابد [122].

اگر چه پر خون بودن بافت نیز از جمله ویژگی های مهم و در اولویت است، اما استفاده راحت از جایگاه پیوند و دسترسی به بافت پیوندی با کمترین عارضه اهمیت زیادی دارد. به طور مثال گزارشاتی از تولد نوزاد موش حاصل از پیوند تخمدان زیر کپسول کلیه ارائه شده است [123]، اما این ناحیه به دلیل دست اندازی به بافت حیاتی کلیه و نیز دور از دسترس بودن، کاربرد بالینی پیدا نکرده است. از سوی دیگر تنها مورد گزارش شده از تولد نوزاد زنده در نتیجه پیوند تخمدان به زیر پوست در میمون بوده [124] و در انسان، پیوند زیر پوستی در ناحیه ساعد تنها به بارداری ناموفق ختم شده است [125].

محل پیوند اخیر مزایایی به همراه دارد: 1- بررسی راحت رشد فولیکولها [125] 2- در دسترس بودن بافت جهت گرفتن تخمک [126] 3- استفاده بافت پیوندی از دو شبکه خونی (شبکه عروق عضلات در زیر و شبکه عروق زیر پوستی در بالای بافت پیوندی).

3-1-5-1. رگ زایی و رگ سازی³⁹ مجدد پس از پیوند تخمدان

در طول رشد جنین، عروق خونی از سلولهای پیش ساز اندوتلیالی⁴⁰ تحت فرآیندی که رگسازی خوانده می شود، تمایز می یابند. اما رگزایی فرآیند شکل گیری عروق خونی جدید از عروق خونی قدیمی تر است که هم در

³⁹ Re-Oxygenesis

³⁶ Fibroblast Growth Factor (FGF)

³⁷ Transforming Growth Factor (TGF)

³⁸ Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

³⁹ Vasculogenesis

بدن جنین به خصوص و هم بزرگسالان⁴¹ به نسبت کمتر، صورت می گیرد [127]. بسیاری از تغییراتی که در بدن جنس ماده انجام می پذیرد به خصوص در دستگاه تولیدمثل بر اساس عملکرد دستگاه خونی - عروقی است [128]. این مسئله در فرآیند رشد فولیکول تخمدانی بسیار مشهود بوده و اجازه دسترسی سلولها و تخمک را به هورمونها و مواد غذایی می دهد، همچنین در زمان تشکیل جسم زرد نیز نقش به سزایی ایفاء می کند [129]. گستره ای از عوامل رشد شناخته شده اند که برخی نقش تحریکی (پیش رگزایی⁴²) و برخی نقش مهارتی (ضد رگزایی⁴³) دارند [127]. به هر حال تغییرات بیان و عملکرد یک یا دو عامل از این دست، می تواند بر قدرت تولیدمثل جنس ماده اثر گذار باشد.

دستگاه تناسلی زن تحت چندین برنامه رگ زائی قرار می گیرد، که این فرآیندها با تغییرات دوره ای، برای رسیدن یک فولیکول به مرحله پیش از تخمک گذاری و ایجاد یک شبکه ارتباطی بین سلولهای گرانولوزا و عروق خونی از طریق لایه تکا ضروری است. رگزائی در فولیکولها متفاوت است و در اصل فولیکولی برجسته⁴⁴ می شود که رگ زائی خوبی در دیواره آن رخ داده باشد. عامل رشد اندوتلیال عروق خونی یا VEGF برای تکثیر سلولهای اندوتلیال ضروری است و نقش بسیار مهمی در رگزائی بافت تخمدان دارد. امروزه مشخص شده است که عوامل زیادی در بیان VEGF نظیر اینترلوکین-6،⁴⁵ FSH،⁴⁶ HCG و آنژیوتنژین-2 می توانند نقش آفرینی کنند.

CD34⁴⁷ نیز از جمله عوامل اختصاصی عروق خونی بوده و برای مطالعه عروق خونی در تخمدان مورد توجه می باشد [130]. از جمله عوامل دیگر مؤثر در رگزائی میتوان به مولکول CD31 اشاره نمود که یک گلیکوپروتئین داخل غشائی 130 کیلو دالتونی است. این عامل در سطح سلولهای اندوتلیال عروق خونی جدید بیان شده و از موارد مهم در ارزیابی میزان رگزائی در جریان پیوند می باشد [131].

بافت پیوند زده شده در 1 تا 3 روز اول پس از پیوند فاقد عروق خونی جدید بوده و تشکیل رگهای جدید پس از 6 روز آغاز می گردد که این زمان در گونه های جانوری متفاوت است. در پیوند به خودی تخمدان موش های صحرائی جوان به صورت هتروتوپیک [132]، مشاهده شده است که رگزایی 2 روز و در پیوند تخمدان موش [133] 3 روز پس از پیوند آغاز می شود. تا زمان تشکیل رگ جدید و تغذیه خونی مجدد بافت، مرکز بافت پیوندی بیش از نواحی کناری آن آسیب می بیند.

⁴⁰ Endothelial Precursor Cells (EPCs)

⁴¹ Adult

⁴² Pro-Angiogenic

⁴³ Anti-Angiogenic

⁴⁴ Dominant Follicle

⁴⁵ Follicular Stimulating Hormone (FSH)

⁴⁶ Human Corionic Gonadotropin (HCG)

⁴⁷ Complex of Differentiation (CD)

از آسیبهای مهم دیگر در نتیجه افزایش زمان ایسکمی-ری پرفیوژن پس از پیوند، افزایش رادیکالهای آزاد اکسیژن (ROS)⁴⁸ و لیپید پراکسیدیشن می باشد [134]. برای جلوگیری از این آسیب ها عوامل حفاظتی مانند ویتامین E می تواند موثر واقع شود [133].

بنابراین، یکی از مسائل مهم در پیوند، یافتن راهی برای شتاب دادن به فرآیند رگزایی است. نشان داده شده است فولیکولهایی که در نتیجه ایسکمی پس از پیوند می میرند از تعداد فولیکولهای ناشی از آسیب انجمادی بیشتر می باشند [73]. این مطلب به خصوص در رابطه با پیوند قطعات تخمدان نسبت به پیوند کل بافت به همراه عروق خونی اهمیت می یابد.

1-3-1-5-1 نقش عوامل رشد رگزا 49 در موفقیت پیوند

موارد زیادی نظیر فشار اکسیژن، سن حیوان، عوامل موضعی و یا هورمونهای درون ریز بر تغییرات بیان عوامل رگزا اثر گذاشته و نتیجه پیوند را دست خوش تغییر قرار می دهند. این مسئله به صورت عمومی پذیرفته شده که کاهش فشار اکسیژن (هایپوکسی)⁵⁰ اولین عامل در القاء فرآیند رگزایی در بافتهای پیوندی می باشد [135]. در تخمدان، عوامل رگزا موجب افزایش نفوذ پذیری عروق خونی شده و از فرآیند تشکیل حفره و خود فولیکول آنترال حمایت کرده تا به مرحله تخمک گذاری برسد [136]. از عوامل مهم رگزا که در بافت تخمدان وجود دارد و یا از طریق جریان خون به آن می رسند، می توان به این موارد اشاره کرد: عامل رشد فیبروبلاست 2 (FGF-2)⁵¹، VEGF، آنژیوتنشن II (ANG II)⁵²، عامل رشد شبه انسولین 1 (IGF-1)⁵³، عامل رشد اپیتلیال (EGF)⁵⁴، آنژیوپوئتین (ANPT)⁵⁵، اندوتلین 1 (ET-1)⁵⁶ که در این میان سه عامل VEGF، FGF-2 و ANG II از همه مهمتر هستند [137]. بنابراین برقراری هر چه سریعتر جریان خون در بافت پیوند زده شده منجر به تحریک و فعال شدن عوامل رگزایی شده و در حفظ ذخایر فولیکولی تخمدان انجمادی-پیوندی که شرایط سخت کاهش دما را نیز تحمل کرده است، حائز اهمیت می باشد.

طی مطالعات دیگری این فرضیه قوت گرفت که کوتاه کردن دوره ایسکمی پس از پیوند با قرار دادن بافت تخمدان در جایگاهی پر خون، منجر به کاهش مرگ فولیکول ها و نیز افزایش تعداد فولیکول های در حال رشد خواهد شد [138]. به دنبال این فرضیه، آن ها بافت را در جایگاهی پیوند زدند که از قبل در آن برش ایجاد

⁴⁸ Reactive Oxygen Species

⁴⁹ Pro-Angiogenic Growth Factors

⁵⁰ Hypoxia

⁵¹ Fibroblast Growth Factor-2

⁵² Angiotensin II

⁵³ Insulin Like Growth Factor-1

⁵⁴ Epidermal Growth Factor

⁵⁵ Angiopoietin

⁵⁶ Endothelin-1

کرده بودند. پس از ایجاد برش در الیاف عضلانی، محل زخم با شش بخیه بسته شده و 4 روز بعد مجدداً زخم باز شد. نخ بخیه و بافت های ایجاد شده ناشی از زخم از محل خارج شد و تخمدان در جایگاه زخم پیوند زده شد. جایگاه پیوند حاوی زخم، فعالیت سریعی در جهت رگ زایی نشان داد به طوریکه در فاصله 2 تا 4 روز، رگ های جدید ظاهر شدند [138]. این فرآیند با رسوب مواد فیبرینی، عوامل رشد مانند FGF، TGF-b و VEGF همراه بوده و هجوم سلول های اندوتلیال را به محل تسریع می کند [122, 139]. در اصل عروق جدیدی که در ناحیه زخم شکل می گیرند، مواد مغذی، سلول های التهابی و اکسیژن کافی را به محل مورد نظر می رسانند [140]. اثر رگ زایی زخم ایجاد شده در محل توسط Barash و همکارانش در کاشت جنین در اندومتر بیشتر آشکار شد، زمانی که جنین در جایگاهی قرار داده شد که از قبل در آن زخم ایجاد شده بود. این روش میزان حاملگی بیشتری را باعث گردید [121]. جدول 1-1 بیانگر نقش و عملکرد برخی از مهمترین عوامل رگزایی در بافت تخمدان است.

جدول 1-1: خلاصه ای از اثرات عوامل رگزا بر رشد فولیکول در بافت تخمدان

عامل رگزا	اثر بر رشد فولیکول در تخمدان
FGF-2	- زنده ماندن سلولهای گرانولوزا و تخمک - تحریک فولیکولهای بدوی - تکثیر سلولهای گرانولوزا و تکا
VEGF	- زنده ماندن فولیکولهای بدوی - تحریک میتوز در سلولهای گرانولوزا - انتقال فولیکول از مرحله اولیه به ثانویه
ANG II	- تنظیم بلوغ تخمک - تحریک تخمک گذاری و ساخت هورمونهای استروئیدی ⁵⁷
IGF-1	- رشد و زنده ماندن فولیکولها - افزایش ساخت هورمونهای استروئیدی

1-5-1-3-2- نقش عوامل ضد رگزایی⁵⁸ در نتیجه پیوند

تخمدان به عنوان عضوی که به طور دائم در جریان رشد و مرگ سلولی قرار می گیرد و از طرفی این مرگ و میر با تشکیل شبکه های عروقی و تحلیل آن ها همراه است، عنصر بسیار مناسبی جهت مطالعات رگزایی مجدد در بافت ها محسوب می شود. رگزایی توسط عوامل مهارکننده تعدیل می شود که برخی از آنها عبارتند از:

⁵⁷ Steroidogenesis

⁵⁸ Anti-Angiogenic

ترومبواسپوندین، آنژیوستاتین، اندوستاتین، متوکسی استرادیول 2، هیالورونیک اسید، عامل رشد پلاکتی 4، عامل نکروز تومور α و اینترفرون γ . مواد فوق الذکر، تکثیر و مهاجرت سلولهای اندوتلیال و تشکیل مویرگ را در محیط کشت در ماتریکس خارج سلولی اطراف سلول های پیوند زده شده، مهار می کنند [141]. ترومبواسپوندین 1 و 2 به گیرنده خود CD36 متصل و از روند رگزائی جلوگیری کرده و آپوپتوز را در سلولهای اندوتلیال القاء می نماید. در تخمدان موش صحرائی، اگر چه mRNA مربوط به عامل ترومبواسپوندین 1 بیانی ندارد اما حضور پروتئین آن در سلولهای گرانولوزای فولیکولهای پرآنترال و آنترال فراوان بوده و در سلولهای تکا محدود است. بنابراین حضور فولیکول های بزرگتر در بافت پیوندی خود می تواند بر عدم رگ زایی در بافت پیوندی مؤثر بوده و روند برقراری جریان خونی مجدد را کند نماید. چرا که سلول های تکا به دلیل ارتباط نزدیکشان با عروق خونی زودتر دچار مرگ شده و سلول های گرانولوزا برای مهار رگ زایی فرصت خوبی پیدا می کنند. همچنین ترومبواسپوندین 1 در فولیکولهای کوچک فاقد عروق خونی بیان زیادی دارد و این نشان می دهد که این عامل با پیشرفت بلوغ فولیکولها بیان کاهشی پیدا می کند. از طرف دیگر کمبود اکسیژن در بافت پیوندی به خصوص در 3 روز اول پس از پیوند، منجر به تحریک بیان VEGF شده و می تواند میزان آن را در محل پیوند افزایش دهد. مرگ فولیکول های بزرگتر و کاهش تعداد آن ها نیز نسبت به حالت طبیعی، فید بک مثبت جهت بیان هر چه بیشتر VEGF را کاهش می دهد [142]. بنابراین یک تعادل نسبی در بیان VEGF رخ داده و به وضعیت طبیعی نزدیک تر خواهد شد.

عامل رشد پلاکتی 4 نیز از عوامل مهار رگزائی است و از طریق چسبیدن به FGF-2، از اتصال آن به گیرنده خود جلوگیری کرده [143] و به این ترتیب می تواند شروع رگزائی مجدد را در بافت پیوندی به تعویق اندازد. لازم به ذکر است VEGF نیز که به عنوان عامل نفوذپذیری عروقی (VPF^{59}) شناخته می شود، خاصیت تحریک میتوز⁶⁰ داشته و می تواند سلولهای اندوتلیالی را وادار به مهاجرت نماید [137]. این مسئله در برقراری مجدد عروق خونی در پیوند تخمدان و یا بافت های غیر تناسلی بسیار حائز اهمیت است. VEGF همچنین یک عامل زنده ماندن برای سلولهای اندوتلیال عروق ریز محسوب شده [127] و حداقل 6 عضو در خانواده خود دارد (F و A, B, C, D, E). این مولکول دارای 4 ایزوفرم می باشد که بر اساس تعداد اسیدآمین هایشان نام گذاری می شوند: VEGF 121، VEGF 165، VEGF 189 و VEGF 206 [144]. بیان VEGF در فولیکولهای پرآنترال و نیز تخمک فولیکولهای بدوی و اولیه انسان [145] و موش صحرائی دیده شده است [146]. همچنین در فولیکولهای مراحل اولیه در گاو و خوک بیان ضعیفی دارد در حالیکه بیان آن در سلولهای گرانولوزا و تکای فولیکولهای برجسته همین دو گونه افزایش می یابد [147]. بیان mRNA ژن VEGF در سلولهای گرانولوزا و تکا به همان اندازه پروتئین آن در تمامی بخشهای فولیکول، با مرحله رشد فولیکول افزایش می یابد [148]. اخیرا نیز VEGF-A در فولیکولهای پرآنترال اولیه در موش صحرائی شناسایی شده و از مرحله پرآنترال به بعد به طور کامل بیان می شود [149]. دو گیرنده نیز برای VEGF شناسایی شده است:

⁵⁹ Vascular Perforation Factor

⁶⁰ Mitogen

VEGF-R1 و VEGF-R2 که به VEGF-A متصل می شوند. VEGF-R1 در سلولهای اندوتلیال خاموش و در حال تکثیر بیان شده [150] و با اتصال به VEGF موجب تشکیل عروق خونی می شود [151] و گیرنده دوم یعنی VEGF-R2 در سلولهای اندوتلیال با قابلیت رگزایی بیان می شود و اثر VEGF را بر تکثیر و مهاجرت این سلولها تنظیم می کند [146].

حجم زیاد VEGF منجر به عدم ثبات دستگاه عروقی شده و بنابراین شبکه های جدید عروق خونی شروع به شکل گیری می کنند، از طرف دیگر نقص در میزان آن نیز منجر به تحلیل رگ ها خواهد شد [152]. Hazard و همکارانش اثبات کردند که گنادو تروپین ها نیز بر میزان ترشح VEGF در پریمات ها تأثیر می گذارند و به عنوان یک عامل تنظیم کننده برای آن محسوب می گردند [153]. در این بین هورمونهایی که بر میزان بیان VEGF اثر می گذارند مانند eCG^{61} ، HCG ، LH^{62} و FSH بسته به میزان ترشحشان از جمله عوامل کلیدی در رگزایی تخمدان محسوب می شوند. امروزه هم در *in vivo* و هم در *in vitro* ثابت شده است که بین عوامل رگزایی ارتباط نزدیکی با هم وجود دارد. مثلاً اثر VEGF به تنهایی کمتر از اثر VEGF به همراه FGF-2 خواهد بود [154].

تحقیقات سالهای اخیر نشان می دهد که VEGF قابلیت تحریک میتوز در سلولهای گرانولوزا را دارد و می تواند رشد فولیکول را در موش صحرائی تحریک نماید [155]. همچنین مشخص شده است که در این حیوان، VEGF-A یک تنظیم کننده مهم رشد فولیکولهای بدوی محسوب می شود [156]. در این جهت Danforth و همکارانش نشان دادند که VEGF تعداد فولیکولهای اولیه و ثانویه را در موش صحرائی افزایش می دهد [157]. مطالعه مشابهی نیز نشان داد که VEGF تعداد فولیکولهای اولیه به ثانویه را در گاو افزایش می دهد [158]. همچنین ثابت شده است که این مولکول برای زنده ماندن فولیکولهای بدوی بسیار ضروری است [159] و به دنبال مهارش، تعادل بین پروتئین های تحریک کننده و مهارگر آپوپتوز به هم خورده و مرگ آپوپتوزی و آرتیک شدن فولیکول ها به نسبت زیادی افزایش می یابد [149]. در تأیید یافته فوق Shimizu و Quintana و همکارانشان نشان دادند که تزریق VEGF به درون تخمدان منجر به افزایش عروق، تعداد فولیکولهای آنترال و مهار آپوپتوز می شود [160, 161].

همانطور که گفته شد هایپوکسی در تخمدان پیوند زده شده که نتیجه تأخیر در رگ زایی مجدد می باشد، اولین عامل در مرگ فولیکول ها محسوب می شود. ثابت شده است که در جوندگان، فرآیند رگزایی در تخمدان پیوند زده شده 48 ساعت پس از پیوند آغاز می شود در حالیکه این زمان در پیوند قشر تخمدان انسانی به 5 روز افزایش می یابد [162]. پس از پیوند تخمدان، بیان VEGF در نتیجه هایپوکسی افزایش یافته و این مولکول، آغاز کننده و القاءگر مهاجرت سلولی برای تشکیل عروق جدید می شود. تزریق VEGF به درون تخمدان [163] و یا استفاده از گنادوتروپین ها [164] چندان در افزایش رگزایی موفق نبوده است در حالیکه آزاد شدن کنترل شده VEGF از مواد زیستی [165] توانسته است رگ زایی را به خوبی تحریک نماید. عدم ایجاد ارتباط

⁶¹ Equine Chorionic Gonadotropin

⁶² Luteinizing Hormone

خونی مناسب و سریع بین بافت پیوند زده شده و بافت های میزبان به عدم وجود بافت همبند بین این دو و حذف حمایت های پاراکرینی از بافت میهمان بر می گردد. بافت های اطراف نقش بسزایی در چسبندگی تخمدان پیوندی به جایگاه پیوند و شروع گفتگوی دو طرفه آن ها دارند [166]. اخیراً در مطالعه Shikanov و همکارانش، نشان داده شده است که استفاده از یک ارتباط دهنده زیستی مانند فیبرین و انتشار کنترل شده VEGF توانسته است میزان رگ زایی مجدد در بافت را به طور قابل توجهی افزایش دهد [166]. جهت کنترل انتشار عوامل رشد مانند VEGF، هیپارین توسط فیبرین احاطه شده و VEGF در آن ذخیره می گردد. این مسئله منجر می شود تا در طول پیوند عوامل رشد مورد نیاز بافت، مانند HPB⁶³ و VEGF به صورت دوره ای و با غلظت یکنواخت و مناسب در اختیار بافت پیوندی قرار بگیرد. پاسخ دهی مثبت این سیستم در مطالعات دیگری نیز اثبات شده است [167].

1-5-1-4. کاهش کیفیت گامت ها در بافت پیوندی

تعداد تخمکهای گرفته شده از تخمدان پیوندی تنها به مدت فعالیت تخمدان پس از پیوند بستگی ندارد، بلکه تحریک خارجی با گنادوتروپین ها نیز بسیار مهم و مؤثر است [168]. تخمدان پیوندی در موش تا یکسال [91]، در گوسفند تا دو سال [170] و در انسان از یک سیکل ماهانه [111] تا یکسال یا بیشتر می تواند فعالیت کند [7, 8].

باید به این نکته توجه داشت که اگر چه تخمک در بافت پیوندی بالغ می شود اما ممکن است بر خلاف تخمک بالغ شده در محیط آزمایشگاه، توانایی و قابلیت لازم برای لقاح آزمایشگاهی و یا لانه گزینی را نداشته باشد [47]، [102]. این مسئله دلیل اصلی عدم موفقیت در تولد نوزاد و در نتیجه انتقال جنین های حاصله از تخمک گرفته شده بافت پیوندی است [112].

1-5-1-5. احتمال بازگشت سلول های سرطانی به بدن، در نتیجه پیوند

یکی از نگرانی های مهم در رابطه با پیوند بافت تخمدان، احتمال بازگشت سلول های سرطانی به بدن بیمار می باشد. به لحاظ بالینی برگشت سلول های بدخیم بستگی به نوع و مرحله سرطان، میزان فعالیت و حجم سلول های سرطانی دارد [171]. خوشبختانه اکثر سرطان ها به بافت تخمدان متاستاز نمی دهند به غیر از برخی انواع لوکمی، لیمفوما Burrkit، نوروبلاستما و انواع خاصی از سرطان های پیشرفته پستان و کولون [172]. در رابطه با بیماری لوکمی و بازگشت سلول های بدخیم آن نگرانی خاصی وجود دارد. چرا که در مطالعه ای دیده شده است که در 4 بیمار از 18 بیمار مورد بررسی با انواع مختلف لوکمی (CML⁶⁴ و ALL⁶⁵)، تومور لوکمی پس از پیوند زونوگرافت تخمدان در بدن موش ها بوجود آمده است [173]. اما این وضعیت در بیماران لیمفومایی

⁶³ Heparin Binding Protein

⁶⁴ chronic myelogenous leukemia

⁶⁵ acute lymphoblastic leukemia

ایجاد نشد [174]. بنابراین در این رابطه میزان خطر در انسان به طور قطع مشخص نیست و به همین لحاظ از جمله موارد مهم در مشاورهٔ بیماران سرطانی برای معرفی "بانک و روش انجماد بافت تخمدان" جهت حفظ قدرت باروری، به این مسئله اشاره می شود.

بر اساس مطالعات انجام شده برای کاهش خطر بازگشت سلول های سرطانی موارد ذیل توصیه می شود:

1- بررسی بافت شناسی بافت تخمدان بیمار، به خصوص مواردی که نمونه بافتی از نواحی مختلف تخمدان برداشت شده است.

2- مشاوره با آنکولوژیست

3- بحث و گفتگو با بخش پاتولوژی و بررسی شرایط خاص تومور و سلول های سرطانی [56].

در مورد بیماریانی که احتمال متاستاز بیماریشان به تخمدان زیاد است، پیوند بافت تخمدان صورت نمی گیرد. روش جایگزین کشت فولیکول های تخمدان بسیار کاربردی است اما در این بیماران هنوز در مرحلهٔ آزمایشگاهی قرار دارد.

6-1-5-1. محدودیت مدت زمان فعالیت بافت تخمدان پیوند زده شده

به لحاظ بالینی ثابت شده است که مدت برقراری چرخهٔ هورمونی در بیمارانی که بافت تخمدان به بدن آن ها پیوند زده شده است، بین 9 ماه تا 3 سال متغیر است [112]. Oktay و همکارانش بازگشت چرخهٔ ماهانه را 3 ماه پس از پیوند تخمدان غیر منجمد در زیر پوست ساعد بیمار 37 ساله، گزارش کردند [175]. که متأسفانه در مطالعه آن ها، بافت پیوند زده شده پس از گذشت 3 سال فعالیت خود را از دست داد. باید اضافه نمود که سن بیمار و میزان بافت پیوندی نقش بسزایی در تعیین مدت فعالیت تخمدان پیوندی دارد [56]. از طرف دیگر اگر از دست رفتن فولیکول ها در نتیجهٔ انجماد و نیز کاهش دو سوم آن ها را در نتیجهٔ ایسکمی حاصل از پیوند در نظر بگیریم، حجم نهایی ذخیره تخمدانی بسیار کمتر از میزان اولیه آن خواهد شد [176]. به همین دلیل برخی از بیماران جهت بازگرداندن فعالیت هورمونی، درخواست پیوند مجدد قطعات تخمدان را دارند [177]. بنابراین به دلیل محدودیت زمانی و فعالیت کوتاه مدت بافت تخمدان پیوند زده شده، این روش برای مواردی که لازم است فعالیت هورمونی به صورت طولانی مدت ادامه یابد، مناسب نیست.

6-1. تغییرات گنادو تروپین ها و استروئیدها در پیوند تخمدان

در صورتیکه به دنبال برنامهٔ درمان ناباروری و پس از پیوند تخمدان، جمع آوری تخمک و تولید جنین به روش های آزمایشگاهی مورد نظر باشد، افزایش تعداد تخمک های بالغ بسیار مهم می شود. بنابراین تعداد تخمک های بالغ در تخمدان پیوند زده شده، تنها به طول مدت فعالیت بافت بستگی ندارد بلکه به استفاده از گنادوتروپین ها نیز مرتبط می شود. تزریق گنادوتروپین در موشی که تخمدان هایش در زیر کیپسول کلیه پیوند زده شده بود، نتوانست به افزایش تخمک های بالغ کمک شایانی نماید [123]. همچنین اثر بخشی گنادوتروپین ها در پیوند تخمدان زیر پوستی، هنوز به خوبی اثبات نشده است. اما در پیوند تخمدان های انسانی تحریک به

وسیله گنادوتروپین ها، روشی متداول برای حمایت از بافت پیوندی محسوب می شود [126]. در مطالعه دیگری توسط Yang و همکارانش در سال 2006 [168]، در انتهای هفته سوم پیوند، 5 واحد بین المللی (IU^{66}) از PMSG و به همان میزان نیز HCG با فاصله 48 ساعت تزریق شد. در مطالعه فوق تخمدان موش به دو صورت ارتوتوپیک و هتروتوپیک پیوند زده شد و اثر تزریق گنادوتروپین بر هر دو بافت تخمدان پیوند زده شده ارزیابی گردید. در نهایت گزارش گردید که استفاده از گنادوتروپین ها منجر به القاء تقسیم میوز در بافت پیوندی شده اما در تعداد تخمک های بالغ گرفته شده از بافت، افزایش معنی داری را نشان نمی دهد.

اگر چه اثرات پیوند تخمدان به حیواناتی که تخمدان های آن ها پیش از پیوند از بدن خارج شده است، در مطالعات مختلف، متفاوت است، اما Dissen و همکارانش [132] نشان دادند که به دلیل حذف عوامل مهار کننده از تخمدان ها، سطح گنادوتروپین ها به خصوص FSH افزایش می یابد. این افزایش تکثیر و رشد سلول های گرانولوزا و حتی میزان رگ زایی در بافت را افزایش می دهد [178].

شاید اثرات مختلف FSH و LH در بافت پیوندی گونه های جانوری، ناشی از نحوه اثر آن ها در شرایط طبیعی باشد. به عبارت دیگر، اگر چه FSH اولین تنظیم کننده رشد فولیکول است، اما عوامل رشد که توسط خود سلول های فولیکولی ترشح و تولید می شوند، می توانند به شیوه پاراکرین و اوتوکرین بر عملکرد FSH، چه در شدت بخشیدن و چه در تقلیل عملکرد آن، اثر بگذارند. بنابراین فاکتورهای رشد⁶⁷ تخمدان در تغییر نتایج پیوند بسیار مؤثرند [168]. از طرفی ثابت شده است که مرحله اثر گذاری هر عامل رشد در گونه های مختلف، متفاوت است. این مسئله شاید کلید حل این معما باشد که چرا استفاده از گنادوتروپین ها در یک گونه جواب مثبت می دهد اما در گونه ای دیگر چندان اثر بخش نیست [168].

این نکته که گنادوتروپین ها به خصوص FSH برای رشد فولیکول و انتخاب شایسته ترین آن ها، نقش اساسی دارد 70 سال پیش فهمیده شد. افزایش میزان FSH خون در انتهای مرحله لوئثال و ابتدای مرحله فولیکولار، اساس نقش FSH در انتخاب فولیکول برجسته در جنس ماده است. این پدیده زمانی فهمیده شد که در عدم حضور FSH هیچ فولیکول برجسته ای رشد نکرد و تخمک گذاری نیز صورت نگرفت [179]. با توجه به اینکه سطح آستانه FSH خون موجب ترشح استروژن⁶⁸ شده و این امر خود باعث کاهش سطح FSH پلاسما و تجمع آن در گروههای فولیکولی در حال رشد می شود تا میزان FSH خون به زیر سطح آستانه بیاید، ثابت شده است که این مهم یعنی "باز پس گیری FSH" توسط فولیکولها با آپوپتوز وسیع در سلولهای گرانولوزا و نهایتاً آترزی شدن فولیکول⁶⁹ رابطه مستقیم دارد. تیمار تخمدان ها با HMG^{70} منجر به تکثیر سلولی در گروههای فولیکولی به خصوص در ابتدای مرحله فولیکولار می شود [180]. از طرفی تیمار با HMG نیز تعداد

⁶⁶ International Unit

⁶⁷ Growth Hormone

⁶⁸ Esteradiol 17β

⁶⁹ Atretic Follicle

⁷⁰ Human Menopausal Gonadotropin (HMG)

فولیکولهای برجسته را از طریق نجات بخشیدن فولیکولها از آترزی شدن افزایش می دهد. مکانیسم اثر LH نیز به همین صورت بوده و این مسئله باعث می شود که در تخمدان انسان همیشه فولیکولهای گراآف کوچک وجود داشته باشند، اگر چه تعداد واقعی آن ها مشخص نیست. [181] Gougeon گزارش کرد که تخمدان یک زن جوان حاوی گروهی از فولیکولهای گراآف به تعداد 4 تا 5 عدد می باشد که اندازه این مجموعه بسته به سن و ذخیره تخمدان متفاوت است. این مسئله که سلولهای گرانولوزا تنها سلولهایی هستند که گیرنده FSH را روی سطح خود بیان می کنند برای فهم عملکرد FSH در تخمدان ضروری است. ظهور گیرنده FSH روی سطح سلولهای گرانولوزا به منظور تمایز سلولی، بلوغ فولیکول برجسته و عملکرد ترشحی آن، تولید مایع فولیکولی (FF)، تولید استروژن و بیان گیرنده های LH امری حیاتی است [180]. با توجه به عملکرد LH می توان گفت تا زمانی که فولیکول به مرحله پیش از تخمک گذاری نرسیده، گیرنده های LH بر روی سلولهای گرانولوزا بیان نمی شوند [179].

تحریک تخمدان پیوندی با استفاده از گنادوتروپین ها 15 روز پس از پیوند، منجر به افزایش رشد فولیکول های انسانی و تخمک گذاری آن ها و نیز افزایش سطح هورمون های استروژن و به دنبال آن پروژسترون خون شد و رشد جسم زرد ناشی از تخمک گذاری فولیکول نیز با سونوگرافی به اثبات رسید [182]. همچنین اندومتر رحم تغییرات مرحله فولیکولی و جسم زرد چرخه جنسی را نشان داده و بیمار 2 هفته پس از تخمک گذاری، دچار خون ریزی ناشی از اتمام دوره جنسی گردید. در مطالعه ای که اخیراً توسط Donnez و همکارانش به چاپ رسیده است، تغییرات هورمونی، چرخه جنسی و نتیجه پیوند تخمدان به تفکیک در 13 بیمار گزارش شده است [183]. این تحقیق نشان می دهد که علاوه بر استفاده از گنادوتروپین ها و کنترل مرحله ای ترشح استروئیدها، سن بیمار عامل مهمی در حصول نتیجه مطلوب از پیوند تخمدان به شمار می رود، به طوریکه طبق گزارش "جمعیت سرطان شناسی بالینی آمریکا"⁷¹ پیوند بافت تخمدان در بیماران بالاتر از 40 سال، به دلیل اثر گذر سن بر کاهش تعداد فولیکول ها، چندان مطمئن به نظر نمی رسد [184].

در مطالعه دیگری که مجدداً توسط Donnez و همکارانش صورت گرفت، گزارش شده است که بازگشت فعالیت تخمدان پیوند زده شده انجمادی، در اکثر بیماران با افزایش سطح هورمون استروژن و کاهش میزان گنادوتروپین ها، 3/5 تا 6/5 ماه پس از پیوند مشاهده می شود [183]. در مطالعه آن ها قطعات تخمدان در اکثر موارد در حفره لگن و در یک دریچه صفاقی و یا درون مدولای تخمدان پیوند زده شدند. در تمام موارد انجماد آهسته منجر به پاسخ دهی قطعی تخمدان پیوندی شد و قطعات نیز به دو صورت اندازه بزرگ (8 تا 10 در 5 میلی متر) و یا قطعات کوچک (2 در 2 میلی متر) در جایگاه پیوند قرار گرفتند. در مطالعه Donnez، بیشتر از 50% بیماران به صورت طبیعی باردار شده و تعداد کمی نیز جهت لقاح به روش های آزمایشگاهی نیاز پیدا کردند.

⁷¹ American Society of Clinical Oncology

از جمله عوامل مهم در ادامه فعالیت یک تخمدان پیوند زده شده، هورمون های استروئیدی به خصوص استرادیول است. استرادیول تنها یک عامل تنظیم کننده در محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - تخمدان نیست، بلکه نقش بسیار مهمی در زنده ماندن سلولهای گرانولوزا دارد. سلولهای گرانولوزا منبع اصلی استرادیول بوده و زمانی که گیرنده های استروژن ($ER\alpha$ و $ER\beta$) را بر روی سطح خود بیان می کنند، هدف اصلی هورمون در موش، موش صحرائی، گوسفند، خوک، گاو و انسان [185-187] خواهند بود. همچنین استرادیول در سلولهای گرانولوزا نقش های متعددی نظیر پیشبرد فولیکولوژنز، افزایش بیان گیرنده های گنادوتروپین ها و مهار آپوپتوز بازی می کند [185]. Matsuda و همکارانش نشان دادند که در موشهای Cyp19 که از لحاظ آنزیم آروماتاز، ساپرس شده اند، توانایی ترشح استرادیول وجود ندارد و در تخمدان این موشها نیز آنترال فولیکولهای غیر طبیعی با تعداد سلول گرانولوزای متفاوت، قابل رویت است [188]. همچنین در تخمدان این موشهای عقیم، فولیکول آنترال مناسبی به دلیل ساپرس گیرنده های استرادیول دیده نشد. بنابراین در پیوند بافت تخمدان نیز ترشح استرادیول برای پیشبرد روند فولیکولوژنز بسیار مهم بوده و هدف اصلی آن سلولهای گرانولوزا می باشد. به هر حال باید اذعان نمود که انطباق عملکرد بافت پیوندی با ترشح استرادیول به دلیل تعداد متفاوت سلول های گرانولوزا در فولیکول های آنترال تخمدان های پیوندی بسیار سخت است و در افراد مختلف سطح آن متفاوت خواهد بود [189].

در مطالعه Deng و همکارانش در سال 2009 بر روی موش صحرائی، فعالیت تخمدان پیوندی منجمد-ذوب شده به مدت طولانی (18 ماه) مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه فوق تخمدان های غیر منجمد و منجمد شده موش صحرائی زیر کپسول کلیه پیوند زده شدند. 5، 8 و 10 ماه پس از پیوند، تخمدان ها از بدن خارج شده و حیوانات از نظر سلول شناسی واژن، ترشح هورمون های استروژن و پروژسترون و نیز ساختار تخمدان و مجاری تناسلی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از شمارش فولیکول های زنده و مرده مشخص گردید که علی رغم کاهش در تعداد فولیکول های بدوی در گروه انجمادی پیوندی نسبت به گروه کنترل، میزان موفقیت پیوند و نیز سطح ترشح استروئیدها در هر سه زمان باز کردن پیوند با یکدیگر و گروه کنترل برابر بوده است [190]. این نتایج نشان می دهد که تخمدان پیوندی ممکن است توانایی فعالیت طولانی مدت حتی در جوندگان را داشته باشد.

7-1. مرگ سلولی و عوامل مؤثر بر آن در پیوند تخمدان

در بسیاری از گونه های جانوری، تحریک فولیکول مرحله پراآنترال وابسته به گنادوتروپین های هیپوفیز نیستند، در حالی که فولیکولهای مرحله آنترال شدیداً به گنادوتروپینها وابسته اند. FSH مهمترین هورمون کنترل کننده رشد فولیکول است که باعث ترشح استرادیول و inhibin از فولیکولهای بزرگ می شود [188]. سلولهای گرانولوزا inhibin ترشح می کنند در حالیکه سلولهای تکا آندروژن می سازند تا جهت ساخت استرادیول 17β در اختیار سلولهای گرانولوزا قرار دهند. استرادیول و inhibin با یکدیگر بر روی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز اثر کرده و میزان ترشح FSH را کاهش می دهند. این در اصل یک فیدبک منفی برای جلوگیری از رشد

فولیکولهای تحت فرمان است. بنابراین انتظار می رود در حیوانی که یکی از تخمدانها پیوند زده شده است، تا زمان فعال شدن مجدد تخمدان، رشد دوباره فولیکول های پیشرفته و فعالیت سلول های گرانولوزا، FSH تا حدودی افزایش یابد. این مسئله در جانورانی که هر دو تخمدان آن ها خارج شده است، به خوبی دیده می شود [132, 190]. به همین سبب است که تعداد فولیکول های در حال رشد در تخمدان های پیوند زده شده به موش های گنادکتومی 2 هفته ای بیشتر از موش های طبیعی گزارش شده است [178].

در حالت طبیعی، سلولهای گرانولوزای فولیکولهای برجسته، گیرنده های LH خود را افزایش داده و منجر به ترشح بیشتر آن می شوند. بنابراین تخمک گذاری در نتیجه پاسخ به افزایش ناگهانی LH رخ می دهد. ثابت شده است که عوامل مترشحه از سلولهای گرانولوزا به خصوص استرادیول و عامل رشد شبه انسولین (IGF^{72})، نیز برای بلوغ فولیکول ها ضروری می باشند [191]. اگر فعالیت این کلیدهای حیاتی زنده ماندن کاهش یابد، سلولهای گرانولوزا نه تنها فعالیتشان مختل شده، حتی دچار مرگ سلولی می شوند. لایه سلولهای گرانولوزا ابتدا در طول غشاء پایه قرار می گیرند و در یک فولیکول سالم و در حال رشد، سلول آپوپتوتیک نیز دیده نمی شود. سلولهای آپوپتوتیک در ابتدای آترزی شدن نمایان شده و به تدریج بر تعدادشان افزوده می شود تا جائیکه منجر به اختلال در لایه سلولهای گرانولوزا شده و نهایتاً فولیکول را به سمت مرگ پیش می برند. بنابراین این فولیکول محکوم به حذف از مسیر رشد خواهد بود. تا سه روز اول پیوند و برقراری مجدد جریان خون در بافت پیوند زده شده، فولیکول های به خصوص پیشرفته، به دلیل اینکه وابستگی شدید به مواد غذایی موجود در خون دارند، دچار مرگ زود هنگام می شوند. حذف منابع سلول های گرانولوزا، کاهش عوامل زنده مانی و حمایتی فولیکول ها را به دنبال داشته و لذا مرگ سلولی در بافت افزایش می یابد.

آپوپتوز در فولیکول ابتدا در سلولهای گرانولوزای سطوح داخلی تر رخ می دهد، نه در سلولهای کومولوسی، تخمک و یا سلولهای تکای داخلی و خارجی. این نشان دهنده نقش آغازگر سلولهای گرانولوزا در شروع فرآیند آپوپتوز در فولیکول است. در فولیکول های آنترال در حال مرگ در تخمدان های پیوندی نیز این مسئله به خوبی به چشم می خورد [192]. تجمع سلول های مرده در لایه های گرانولوزا بسیار بیشتر از سایر نواحی فولیکول است و این خود اساس تعیین آترتیک بودن یک فولیکول به شمار می رود [192].

کاهش فعالیت عوامل زنده مانی و یا تحریک توسط اتصال لیگاند های آپوپتوتیک، هر دو عامل منجر به شروع روند آپوپتوز در سلولهای گرانولوزا می شوند [188]. این دو روش تحریک آپوپتوز، مسیرهای مختلفی را در سلول فعال می کنند که مهمترین آن فعال شدن Caspase 3 و سپس شکسته شدن DNA داخل هسته ای می باشد. در سالهای اخیر مولکول های بسیاری در سلول های گرانولوزا کشف شده اند که در فرآیند آپوپتوز دخیل بوده و حین فعالیت بر روی یکدیگر نیز اثر می گذارند [188]. در این میان، پروتئین های خانواده $BCL2^{73}$ (آپوپتوز با واسطه میتوکندری⁷⁴) نقش بسیار مهمی در زنده ماندن و یا آغاز روند مرگ در سلولهای

⁷² Insulin-like Growth Factor

⁷³ B Cell Lymphoma/Leukemia ۲

⁷⁴ Mitochondria-Mediated Apoptosis

گرانولوزا دارند. از عوامل بسیار مهم دیگر در جریان پیوند تخمدان، استرادیول را می توان نام برد که نقش بسزایی در کنترل مرگ سلولی برنامه ریزی شده دارد. گزارش شده است در موش های صحرایی که هیپوفیز آنها برداشته شده، تزریق استرادیول از آپوپتوز سلولهای گرانولوزا در فولیکولهای آنترال جلوگیری می کند [193]. آپوپتوز با فعال شدن یک سری از پروتئازهای سیستئینی که $Caspase^{75}$ نامیده می شوند، آغاز می شود. $Caspase$ ها شامل دو دسته پروتئاز هستند: 1- آغاز کننده⁷⁶ که شامل $Caspase 8$ و $2-9$ اثر گذار⁷⁷ که شامل $Caspase 3$ می باشد. $Caspase 6$ نیز جزء اندونوکلیتازها بوده و منجر به قطعه قطعه شدن DNA می شود. می توان گفت که $Caspase 6$ نیز جزء گروه اثر گذار بوده که البته محل اثر آن درون هسته است نه سیتوپلاسم. Liu و همکاران [178] نشان دادند که در موش، قطعه قطعه شدن DNA که با روش TUNEL اندازه گیری شد در مدت زمان کوتاهی (2 تا 12 ساعت) پس از پیوند آلوگرافت تخمدان آغاز گردید. مدت زمان کوتاهی حدود 30 دقیقه انکوبه کردن تخمدان پیوندی نیز خود منجر به بروز آپوپتوز پراکنده در مدولای تخمدان ها شد که البته الگوی افزایش سلول های آپوپتوتیک از مدولا به قشر تخمدان با گذشت زمان به همین ترتیب صورت می گیرد. همچنین در مطالعه فوق نیمی از فولیکول های بدوی در نتیجه پیوند تخمدان های انجمادی به موش های گنادکتومی شده از بین رفتند. به عبارت دیگر نتایج نشان داد که پیوند نسبت به انجماد، مرگ و میر وسیع تری را در فولیکول ها بالاخص فولیکول های بدوی رقم می زند. یافته های فوق با نتایج مطالعات دیگری نیز در این مسئله مطابقت دارد که پیوند بیش از انجماد می تواند منجر به مرگ سلولی در فولیکول ها گردد [170].

پس از انتشار سیتوکروم C از میتوکندری، دو عامل مهم یعنی عامل فعال کننده پروتئاز آپوپتوزی ($APAF1^{78}$) و $Caspase 9$ آپوپتوز را با فعال کردن $Caspase 3$ القاء می کنند [194]. $APAF1$ و $Caspase 9$ در سلولهای گرانولوزا بیان می شوند و ثابت شده است که در موش و خوک منجر به آپوپتوز می شوند [195].

برخی از اعضاء خانواده BCL2 توسط برخی دیگر از عوامل آپوپتوزی در سلولهای گرانولوزا کنترل می شوند. بیان BAX در سلولهای گرانولوزا در عدم حضور آنزیم آروماتاز Cyp 19 و عامل رشد IGF-I افزایش می یابد [196]. همچنین در سلولهای گرانولوزای گاوی، میزان بیان BAX در نتیجه عدم حضور گنادوتروپین FSH حتی پس از تیمار با عامل رشد IGF به تنهایی، افزایش پیدا می کند [197]. در کشت سلولهای گرانولوزای میمون نیز حذف گنادوتروپین ها منجر به افزایش بیان هر دو عامل BAX و $Caspase 3$ گردید [198].

موشهای فاقد ژن $Caspase 3$ اطلاعات بسیاری در این باره به ما داده اند. هنگام کشت سلولهای جسم زرد موش صحرایی در محیط فاقد سرم و عوامل رشد، در موشهای معمولی افزایش سلولهای آپوپتوتیک به همراه

⁷⁵ cystein aspartate-specific proteases

⁷⁶ Initiator Caspase

⁷⁷ Effector Caspase

⁷⁸ Apoptotic protease activating factor 1 (APAF1)

افزایش میزان بیان Caspase 3 دیده شد، در حالیکه در موشهای فاقد این ژن افزایش سلولهای آپوپتوتیک دیده نشد [199]. تخمدان موشهای فاقد ژن Caspase 3 دارای تعدادی جسم زرد می شوند اما سطح پروژسترون سرم خونشان پایین می آید. این نشان می دهد که Caspase 3 برای آپوپتوز و روند رشد طبیعی بسیار مهم است اما در کاهش ترشح استروئیدها به دلیل تحلیل جسم زرد دخالت مستقیم ندارد [199]. تزریق آنتی بادیهای تحریک کننده Fas در موشهای فاقد ژن Caspase 3 در القاء آپوپتوز ناموفق بودند در حالیکه باعث افزایش میزان بیان Caspase 8 در موشهای معمولی شدند. این نشان دهنده این است که مسیر Fas Caspase 3 – Caspase 8 – Fas – ligand در موشهای عادی و در فرآیند تحلیل جسم زرد وجود دارد. در موشهایی که از نظر BCL2 نقص یافتند، تعداد فولیکولهای بدوی و تخمک کاهش شدید پیدا کرد [200]. در حالیکه بیان بیش از حد آن موجب رشد تخمک و کاهش آپوپتوز سلولهای گرانولوزای فولیکولهای آنترال شد، این امر مسیر فولیکولوژنز را بهبود بخشید [201]. همچنین BAX در سلولهای گرانولوزا و تخمک فولیکولهای آترزی شده انسانی و خوک به شدت صورت گرفته و مهار آن موجب رشد فولیکولهای سالم دیگر می شود [202].

8-1. تغییرات و نقش فاکتورهای رشد موضعی در پیوند تخمدان

در سالهای اخیر این مسئله مهم کشف شد که فولیکولوژنز بوسیله فاکتورهای رشد مترشحه از تخمک کنترل می شود [203]. امروزه پنج فاکتور رشد بسیار مهم در تخمک پستانداران شناسایی شده است: 1- فاکتور تمایز و رشد 9 (GDF-9⁷⁹) [204] 2- پروتئین شکل دهی استخوان 15 (BMP-15⁸⁰/ GDF-9B) [205] 3- پروتئین شکل دهی استخوان 6 (BMP-6) [206] 4- فاکتور رشد تغییر شکل B₂ (TGF-B₂⁸¹) [207] 5- فاکتور رشد فیبروبلاست 8 (FGF-8⁸²) [208].

اکثر مطالعات ما در رابطه با عملکرد ژنها و پروتئینهای فوق به خصوص در مورد GDF-9 و BMP-15، بیشتر در نتیجه مطالعاتی است که بر روی موش و گوسفند انجام شده است. نتیجه این مطالعات نشان می دهند که GDF-9 و BMP-15 برای فولیکولوژنز طبیعی و باروری جنس ماده ضروری هستند. تأیید بالینی این مطلب این است که در فولیکولهای انسانی در حال رشد GDF-9 و BMP-15 به شدت بیان می شوند [209]. نکته مهم دیگر اینکه در تخمدان پستاندارانی که تاکنون بررسی شده اند، تخمک تنها سلولی است که این دو ژن را بیان می کند [81]. در موشی که ژن GDF-9 مختل شده بود، فولیکولوژنز در مراحل ابتدایی پراآنترال متوقف شد [210]. بنابراین هیچ گونه فولیکول گراآف، تخمک گذاری و حاملگی دیده نشد. فنوتیپ مشابهی در موشهای ساپرس شده از نظر BMP-15 نیز دیده شد [211]. بنابراین اگر چه در بافت تخمدان، تعداد تخمک

^{۷۹} Growth Differentiation Factor-۹

^{۸۰} Bone Morphogenetic Protein-۱۵

^{۸۱} Transforming Growth Factor-B_۲

^{۸۲} Fibroblast Growth Factor

ها بسیار کمتر از سلول های گرانولوزا می باشند، اما اثر تنظیمی آن ها بر روند رشد و بلوغ فولیکول بسیار بیشتر و مهمتر است. لذا از آنجائیکه پس از پیوند بافت تخمدان، در مجموع کل و نسبت به سلول های گرانولوزا، تخمک های کمی باقی می ماندند، تحریک فرآیند رشد فولیکول ها با واسطه تخمک نیز به کندی و با مشکل مواجه می شود [189].

سؤال مهم دیگر برای فهم عملکرد GDF-9 و BMP-15، سلولهای هدف آنها است. مدارک زیادی وجود دارند که سلولهای گرانولوزا هدف این ژنها هستند. ثابت شده است که GDF-9 نقش بسیار اساسی در تکثیر سلولهای گرانولوزا در مرحله غیر وابسته به گنادوتروپین ها داشته و عامل مهمی در انتقال فولیکول به مرحله ثانویه⁸³ است [212]. GDF-9 به طور مستقیم بر فولیکولهای پرائنترال تا مرحله برجسته شدن اثر گذاشته و باعث تحریک ساخت DNA در سلولهای گرانولوزا می شود [213]. در مورد BMP-15 نیز ثابت شده است که در *in vitro* موجب تحریک میتوز در سلولهای گرانولوزا می شود [214]. اما جنبه مهم میتوزنیک بودن این دو پروتئین، غیر وابسته بودن آنها به FSH است.

اگرچه GDF-9 و BMP-15 به تنهایی اثر کمی بر تمایز سلولهای گرانولوزای فولیکول های پرائنترال کشت داده شده دارند، اما هر دو عامل بر روی عملکرد FSH در این سلولها اثر گذارند. Vitt و همکارانش [213] ثابت کردند که GDF-9، گیرنده های LH تحریک شده با FSH و همچنین بایوسنتز استرادیول (E₂) و پروژسترون (P₄) را در سلولهای گرانولوزا مهار می کند. بنابراین به نظر می رسد که GDF-9 در سلولهای گرانولوزای تمایز نیافته، در توقف عملکرد FSH دخالت دارد. BMP-15 نیز مانند GDF-9، تولید P₄ وابسته به FSH را کاهش می دهد اما روی E₂ وابسته به FSH اثری ندارد [214]. نتیجه اینکه در مرحله فولیکولی، قدرت انتخابی FSH با واسطه E₂ صورت می گیرد و P₄ در آن نقشی ندارد. همچنین اخیراً ثابت شده است که BMP-15 اثر مهاری در بیان گیرنده FSH دارد. این نتایج این فرضیه را تقویت می کنند که ممکن است GDF-9 و BMP-15 کنترل کننده های اصلی FSH در طول فولیکولوژن باشند.

مدارک قوی وجود دارد که GDF-9 با تمایز سلولهای گرانولوزا رابطه مستقیم دارد. به طوریکه در سلولهای تمایز نیافته فولیکول های پیش از تخمک گذاری و تحریک شده با FSH/LH تأثیرات مهمی می گذارد، از جمله: بیان هیالورونان سنتز 2 (HAS2⁸⁴)، سیکلو اکسیژنز 2 (COX-2⁸⁵) و پروتئین تنظیم حاد استروئید (StAR⁸⁶) [215].

در موشهایی که از نظر GDF-9 ساپرس شده اند، تشکیل سلولهای تکا⁸⁷ مختل می شود [210]. این مسئله این فرضیه را تقویت می کند که GDF-9 یک اثرگذار قوی بر رشد سلولهای تکا نیز می باشد. در واقع از کشت

⁸³ Secondary Stage

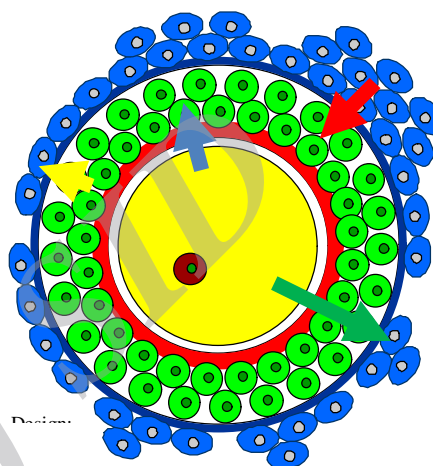
⁸⁴ Hyaluronan Synthase-2

⁸⁵ Cyclooxygenase-2

⁸⁶ Steroid Acute Regulatory Protein

⁸⁷ Theca Cells

سلولهای تکا مشخص شده است که GDF-9، ساخت آندروژن وابسته به LH را افزایش می دهد. بنابراین سلولهای تکا هدف اصلی GDF-9 بوده و این پروتئین تعیین کننده مهم تولید آندروژن توسط فولیکولهای تخمدان است. نهایتاً GDF-9 نقش مهمی در رشد تخمک به خصوص در تنظیم اندازه تخمک و تشکیل گرانولهای قشری آن بازی می کند [216] (شکل 1-1).



پیکان زرد:

سلول های سوماتیک → گرانولوزا

ساخت و ترشح IGF, KL

افزایش تکثیر سلول های سوماتیک

افزایش القاء حرکت سلول های تکا

افزایش تولید آندروژن

افزایش ساخت mRNA عامل CYP17A1

افزایش ساخت mRNA عامل LHR

پیکان سبز:

سلول های تکا → تخمک

گرانولوزا → تکا

ساخت و ترشح Androgens, EGF, TGF- α , KGF, HGF, BMP-7

افزایش تکثیر سلول های گرانولوزا

پیکان قرمز:

ساخت و ترشح GDF-9

افزایش تکثیر سلول های گرانولوزا

افزایش آپوپتوز سلول های گرانولوزا

افزایش ساخت mRNA گیرنده FSH

شکل 1-1: رشد فولیکول در گذر از مرحله پرآنترال به آنترال، وابستگی شدید به ارتباطات داخل فولیکولی (تخمک - گرانولوزا - تکا) دارد (LHR: LH Receptor, CYP17A1: 17- α hydroxylase/17, 20 lyase).

9-1. اهداف

اگر چه سالیان زیادی است که از فرآیند کاهش دما برای حفظ مواد غذایی و عناصر زیستی استفاده می گردد، اما علم کرایوبیولوژی در دو دهه اخیر توانسته است جایگاه ویژه ای در کمک به درمان برخی از بیماری ها به خصوص "حفظ قدرت باروری" در نزد محققین ایجاد نماید. به دنبال گزارش تولد نوزاد زنده انسان توسط Donnez و همکارانش در سال 2004، امید محققین پس از بیش از یک قرن تلاش در جهت بازگرداندن توانایی تولیدمثل بدنبال پیوند بافت تخمدان به بار نشست و این امر نشان داد که انجماد و پیوند بافت تخمدان می تواند به عنوان ابزاری مطمئن در اختیار علم پزشکی قرار گیرد. اما با وجود این موفقیت بزرگ و گزارشات پراکنده دیگری که حاکی از تولد نوزاد پس از پیوند بافت تخمدان انجمادی دارد، هنوز سؤالات متعددی در رابطه با انجماد بافت تخمدان و پیوند آن وجود دارد که لاینحل مانده است: اینکه آیا انجماد می تواند ساختار تمامی سلول های یک بافت را به خوبی حفظ نماید یا خیر؟ کدام روش انجمادی و برای چه نوع بافتی مؤثر تر است؟ آسیب های انجمادی ناشی از کاهش دما و یا اثر سمی ضدیخ ها تا چه حد فعالیت حیاتی بافت و سلول ها را پس از ذوب دستخوش تغییر قرار می دهد؟ کدام ضدیخ ها، به چه میزان و چه ترکیبی از آن ها برای گونه مورد نظر مناسب تر است؟ آیا آسیب ناشی از کاهش دما و یا اثر ضدیخ ها بر سلول های بافت و ارتباطات بین آن ها برگشت پذیرند؟ تا چه حدودی باید این آسیب ها مورد ارزیابی قرار بگیرند؟ مطمئناً بررسی ریخت شناسی بافت به تنهایی قادر به ارائه اطلاعات دقیق از میزان آسیب درونی نخواهد بود. درست مانند ساختمانی که تحت اثر زلزله قرار گرفته و نمای بیرونی خود را حفظ کرده اما لوازم و وسایل داخلی آن به هم ریخته باشد، در این صورت زندگی در آن با مشکلات فراوانی همراه خواهد بود. لذا برآورد میزان خسارات وارده به سلول ها و ساختار یک بافت در اثر انجماد بدون بررسی فراساختار آن، میسر نخواهد بود. حتی در مواردی نیز لازم است تا با ارزیابی نحوه فعالیت بافت منجمد شده در محیط کشت و یا بدن زنده (بدنبال پیوند آن)، این آسیب ها را تا تولید یک موجود زنده رصد نمود.

در بحث پیوند و بازگرداندن بافت به بدن موجود زنده نیز مسائل زیادی بدون حل باقی مانده اند: آیا بدنبال پیوند، سلول های بدخیم به بدن بیمار باز خواهند گشت؟ چه جایگاهی برای قرار دادن بافت در گونه مورد نظر مناسب تر است؟ اثر بافت های پذیرنده بر بافت میهمان چگونه است؟ آیا تغییرات ژنومیک و اپی ژنومیک در سلول های میهمان رخ خواهند داد؟ کدام ماده ضدیخ و کدام روش انجمادی برای پیوند بافت تخمدان به گونه مورد نظر مناسب تر است؟ تغییرات هورمون های جنسی و گنادوتروپین ها در نتیجه پیوند چگونه خواهد بود؟ محور های هیپوتالاموس-هیپوفیز-تخمدان تا چه حدی تحت تأثیر بازگشت بافت تناسلی به بدن قرار خواهند گرفت؟ خارج کردن تخمدان طرف مقابل تأثیر کمکی در بهبود نتیجه پیوند خواهد داشت یا برعکس، از روند رو به رشد جلوگیری خواهد نمود؟ مرگ سلولی که فرآیندی طبیعی و روزمره در تخمدان است، آیا در اثر انجماد و پیوند تخمدان تغییری می نماید یا خیر؟ نقش عوامل رشد موضعی مانند عوامل بلوغ فولیکول، رگ زایی و مرگ

سلولی و اثر گذاری آن ها بر بافت و روند پاسخ گویی بدن به پذیرش بافت پیوندی چگونه خواهد بود؟ این ها سؤالات متعددی است که محققین به صورت روزانه در پژوهش های خود بدنبال یافتن پاسخ های قانع کننده برای آن ها، آزمون های زیادی را طراحی می کنند تا شاید روزی بتوان به روشی کارآمد و مؤثر برای تمامی گونه های جانوری در زمینه "انجماد و پیوند بافت تخمدان" دست یافت.

بدنبال مسائل فوق اهداف پژوهش حاضر نیز در دو سطح انجماد و پیوند بافت تخمدان ارائه می شود:

1- بررسی اثرات ترکیبات مختلف ضدیخ در فرآیند انجماد شیشه ای بر ساختار، میزان وقوع آپوپتوز و فراساختار بافت تخمدان موش صحرایی

2- بررسی اثرات پیوند به خودی پس از گنادکتومی یکطرفه یا دوطرفه بر ساختار، میزان شیوع آپوپتوز، فراساختار، فعالیت هورمونی، عوامل رگ زایی و بلوغ فولیکولی بافت تخمدان موش صحرایی حاصل از انجماد شیشه ای

10-1. فرضیات

1- انجماد شیشه ای به روش کرایوپین با استفاده از ترکیب ضدیخهای DMSO + EG و 0/25 مول در لیتر سوکروز، نسبت به سایر ترکیب های ضد یخ (PROH + EG و PROH + DMSO با سوکروز و یا بدون آن) آسیب کمتری را از نظر ساختار، تعداد فولیکول های مراحل مختلف، وقوع آپوپتوز و فراساختار فولیکول های بدوی یا اولیه برای بافت تخمدان موش صحرایی خواهد داشت.

2- پیوند به خودی تخمدان غیر منجمد و منجمد شده موش صحرایی به همراه گنادکتومی یکطرفه و یا دو طرفه، ساختار و فراساختار بافت تخمدان را به صورت نسبتاً طبیعی حفظ خواهد کرد.

3- پیوند به خودی تخمدان غیر منجمد و منجمد شده موش صحرایی به همراه گنادکتومی یکطرفه و یا دو طرفه، فعالیت هورمونی را از نظر ترشح FSH, LH، استرادیول، پروژسترون و تستوسترون به حالت طبیعی باز خواهد گرداند.

4- پیوند به خودی تخمدان غیر منجمد و منجمد شده موش صحرایی به همراه گنادکتومی یکطرفه و یا دو طرفه، در میزان بیان ژنهای بلوغ فولیکول (TGF- β , GDF-9, BMP-15)، رگزائی (VEGF, CD34,) و آپوپتوز (Bax, Bcl-2) تغییر معنی داری را نسبت به گروه کنترل نخواهد داشت.

فصل دوم

مواد و روشها

فصل دوم مواد و روشها

2-1. مقدمه

روند اجرایی پژوهش حاضر، در دو بخش مستقل از هم 1- انجماد شیشه ای کل تخمدان موش صحرایی به منظور بررسی ترکیبات مختلف ضدیخ و 2- پیوند تخمدان های منجمد - ذوب شده، تعریف شده است. در بخش اول که توضیحات کامل آن در ادامه می آید، هدف، بررسی اثرات ترکیبات مختلف ضدیخ های نفوذ کننده EG، DMSO و PROH در حضور و یا عدم حضور ضدیخ غیر نافذ سوکروز بر کل بافت تخمدان موش صحرایی 5 هفته ای است. ارزیابی ها بر روی بافت تخمدان منجمد - ذوب شده عبارت است از: الف) بررسی بافت شناسی به وسیله روش رنگ آمیزی H & E و شمارش فولیکول های سالم و مرده ب) بررسی تعداد فولیکول های آپوپتوتیک به وسیله روش ایمونوهیستوشیمی جهت آشکار ساختن سلول های بیان کننده پروتئین 3 Caspase (ج) بررسی بافت شناسی به وسیله رنگ آمیزی قطعات نیمه نازک با تالوئیدین بلو د) بررسی فراساختار فولیکول های بدوی و یا اولیه بافت تخمدان منجمد - ذوب شده به وسیله میکروسکوپ الکترونی.

بخش دوم، اثر پیوند به خودی تخمدان های منجمد - ذوب شده بر دستگاه تولید مثل موش صحرایی است که ارزیابی ها پس از پیوند به صورت ذیل انجام شده است: الف) بررسی بافت شناسی به وسیله روش رنگ آمیزی H & E و شمارش فولیکول های سالم و مرده ب) بررسی تعداد فولیکول های آپوپتوتیک به وسیله روش ایمونوهیستوشیمی جهت آشکار ساختن سلول های بیان کننده پروتئین 3 Caspase (ج) بررسی بافت شناسی به وسیله رنگ آمیزی قطعات نیمه نازک با تالوئیدین بلو د) بررسی فراساختار فولیکول های بدوی و یا اولیه بافت تخمدان منجمد - ذوب شده به وسیله میکروسکوپ الکترونی ذ) بررسی سطح ترشح هورمون های استروئیدی پروژسترون، استرادیول و تستوسترون و نیز گنادو تروپین های FSH و LH در سرم خون و مقایسه آن ها با سطح هورمونی در رت های گنادکتومی دو طرفه ه) بررسی میزان بیان رونوشت های ژن های بلوغ فولیکول (TGF-b، BMP-15 و GDF-9)، رگ زایی (VEGF، CD34 و CD31) و آپوپتوتیک (BAX و BCL-2) در بافت تخمدان.

2-2. انجماد شیشه ای بافت تخمدان موش صحرایی (بررسی اثر ترکیبات مختلف ضدیخ)

2-2-1. تهیه حیوان و نمونه تخمدان

در این پژوهش از موش های صحرایی 5 هفته ای نژاد ویستار⁸⁸ که از مؤسسه تحقیقاتی پاستور (مؤسسه پاستور، ایران، تهران) تهیه شد، استفاده گردید. رت ویستار از نژادهای outbred حاصل از گونه آلبینوی *Rattus norvegicus* بوده که اولین بار در مؤسسه Wistar (1906 میلادی) برای تحقیقات در زمینه

⁸⁸ Wistar Rat

پزشکی و زیست شناسی تولید گردید. این حیوان تنها نژادی بود که مدتها در آزمایشات استفاده می شد تا زمانی که موش خانگی⁸⁹ وارد این عرصه گردید. ایجاد بیش از نیمی از نژادهای رت های آزمایشگاهی، حاصل تلاش سه پیشکسوت این زمینه یعنی فیزیولوژیست Henry Donaldson، محقق بزرگ Milton J. Greenman و پژوهشگر ژنتیک/جنین شناسی Helen Dean King می باشند. رت ویستار عمومی ترین رت آزمایشگاهی است که با سر پهن، گوش بزرگ و دم طویلی که همیشه از طول بدنش کوتاهتر است شناخته می شود. همچنین رت ویستار نسبت به نژادهای دیگر به خصوص اسپراگودالی به لحاظ فیزیکی، فعال تر می باشد.

2-2-2. طراحی آزمایش

در هر بار آزمایش، ابتدا تخمدانها از بدن 7 سر موش صحرایی 5 هفته ای که در مرز بلوغ قرار داشتند، با وزن 70 تا 80 گرم به نحوی که در ذیل می آید، خارج و در محیط کشت 199 حاوی HEPES (HEPES 10% آلبومین سرم انسانی (human serum albumin, HSA) قرار داده شدند. سپس 14 تخمدان به دست آمده به صورت تصادفی در 13 گروه کنترل و آزمایشی، تقسیم بندی شدند:

1- گروه کنترل: 2 تخمدان به عنوان گروه کنترل یا غیر انجمادی در نظر گرفته و بلافاصله در محلول بوئن (Bouin's) تثبیت شدند.

2- گروه های انجمادی: 6 تخمدان به صورت تصادفی در 6 گروه انجمادی V I (اتیلن گلیکول + دی متیل سولفوکساید)، V II (اتیلن گلیکول + پروپاندیول)، V III (دی متیل سولفوکساید + پروپاندیول)، V IV (اتیلن گلیکول + دی متیل سولفوکساید + 0/25 مول در لیتر سوکروز)، V V (اتیلن گلیکول + پروپاندیول + 0/25 مول در لیتر سوکروز) و V VI (دی متیل سولفوکساید + پروپاندیول + 0/25 مول در لیتر سوکروز) قرار گرفتند.

3- گروه های آزمون سمیت: 6 تخمدان نیز به صورت تصادفی در 6 گروه آزمون سمیت T I (اتیلن گلیکول + دی متیل سولفوکساید)، T II (اتیلن گلیکول + پروپاندیول)، T III (دی متیل سولفوکساید + پروپاندیول)، T IV (اتیلن گلیکول + دی متیل سولفوکساید + 0/25 مول در لیتر سوکروز)، T V (اتیلن گلیکول + پروپاندیول + 0/25 مول در لیتر سوکروز) و T VI (دی متیل سولفوکساید + پروپاندیول + 0/25 مول در لیتر سوکروز) قرار گرفتند.

هر آزمایش 5 بار تکرار و آزمون سمیت نیز برای گروه های انجمادی که شرح آن در ادامه می آید، انجام شد.

⁸⁹ Mus musculus

2-2-3. بیهوش کردن حیوان

در این مطالعه برای بیهوش کردن موش های صحرایی و قبل از عمل جراحی، از ترکیب داروهای کتامین⁹⁰ و زایلازین⁹¹ استفاده گردید. به این ترتیب که 200 میکرولیتر از داروی کتامین + 400 میکرولیتر از داروی زایلازین با سرم فیزیولوژی قابل تزریق به حجم 1000 میکرولیتر رسانده و به ازای هر 100 گرم از وزن بدن، حدود 120 میکرولیتر از ترکیب فوق به صورت درون صفاقی⁹² به حیوان تزریق شد. این میزان دارو برای بیهوش ماندن حیوان در طول جراحی و پیوند مناسب بود و در موارد نادری که حیوان در طول جراحی به هوش می آمد، 100 میکرولیتر دیگر نیز تزریق گردید.

2-2-4. خارج کردن تخمدان از بدن حیوان

پس از بیهوشی، حیوان را به پشت خوابانده و با نوک پنس به آرامی به ناحیه روی پوست زیر لبه آخرین دنده ها، مابین ستون فقرات و کناره های بدن، فشار آورده تا فرو رفتگی ناحیه پهلو⁹³ که بهترین علامت برای به دست آوردن جایگاه تخمدان است، مشخص گردد. سپس موهای ناحیه مورد نظر تراشیده شده و جایگاه آن با الکل 70 درصد کاملاً شستشو و بر روی پوست آن، یک شکاف ساجیتال به طول 0/5 سانتیمتر و موازی با خط وسط بدن ایجاد گردید. پس از باز کردن پوست، چربی زیر پوستی که در موش صحرایی 5 هفته ای، چندان گسترده و ضخیم نیست، با نوک قیچی باز شد. سعی گردید که عروق خونی بافت چربی بریده نشوند، اما در صورت قطع عروق خونی، برای جلوگیری از خون ریزی، با نوک یک پنس داغ، مقاطع عروقی سوزانده شد. سپس صفاق و لایه های عضلانی متصل به آن نفوذ به داخل شکم منطبق بر برش پوست، بریده شد. در نمای آناتومیک دستگاه تناسلی موش صحرایی، تخمدان، حد فاصل لوله رحمی و چربی اطراف تخمدان (توده چربی⁹⁴) قرار گرفته است که مسیر عبور عروق خونی به سمت تخمدان را تعیین می نماید. تخمدان همچنین توسط یک لایه شفاف از بافت همبند (بورسای تخمدان⁹⁵) احاطه شده است که معمولاً حاوی مایع شفافی است. برای جدا کردن تخمدان دقت شد که آسیب به فولیکول های تخمدانی وارد نشود. بدین منظور ابتدا با یک پنس نوک باریک اما دنداندار، شاخ رحمی⁹⁶ گرفته و به آرامی توسط قیچی تیز و ظریف، بورسای اطراف تخمدان پاره شد، به طوریکه خارج شدن مایع شفاف درون آن به خوبی قابل مشاهده بود.

⁹⁰ Ketamin (Alfasan Germany)

⁹¹ Xylazine (Alfasan Germany)

⁹² Intraperitoneal (IP)

⁹³ Flank

⁹⁴ Fat Pad

⁹⁵ Ovarian Bursa

⁹⁶ Uterine Horn

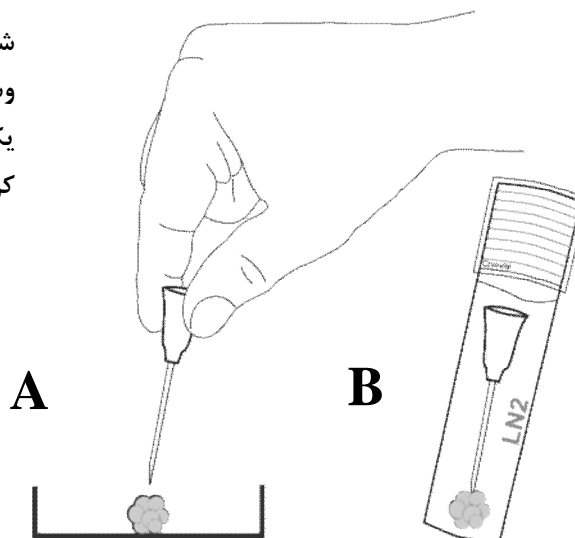
پس از آن تخمدان، از توده چربی اطراف آن و لوله رحمی جدا شد. در این مرحله از آنجائیکه فولیکول ها شدیداً به افزایش دما حساس بوده و سریعاً آسیب می بینند، به جای استفاده از پنس داغ، برای جلوگیری از خون ریزی، لبه های بافت بریده شده با پنس بدون حرارت به مدت چند ثانیه فشرده شدند. در انتها بافت تخمدان پس از خارج شدن از محل خود، در محیط کشت HTCM حاوی HSA قرار گرفت و محل جراحی نیز بخیه گردید.

2-2-5. فرآیند انجماد شیشه ای و آزمون سمیت

تمامی مواد پژوهش حاضر مگر آن هایی که اشاره میشوند، از شرکت سیگما (Germany, MO, St.,) (Louise) تهیه شده است.

انجماد شیشه ای در دو مرحله و در محلول های انجمادی V1 و V2 با ترکیبی متفاوت از ضد یخ های EG, DMSO و PROH و هر مرحله 5 دقیقه، انجام شد (جدول 1-2). HTCM حاوی 10% HSA، به عنوان محلول پایه برای تهیه محلول های انجمادی در نظر گرفته شد (جدول 1-2). بر این اساس تخمدان ها توسط هر دو محلول V1 و V2 در دمای 4°C (بر روی یخ آب) آب گیری شده و سپس توسط Cryopin [62] (شکل 1-2) از درون محلول انجمادی دوم برداشته شده و درون نیتروژن مایع (-196°C) فرو برده شدند. نهایتاً هر تخمدان به همراه کرایوپین مربوط به خود، در کرایوویال حاوی نیتروژن قرار داده شد. سپس کرایوویال حاوی نمونه انجمادی به تانک نیتروژن منتقل و به مدت یک هفته در آن ذخیره گردید. تمامی مراحل انجماد و ذوب بر روی شیکر صورت گرفت.

شکل 1-2: روش فرو بردن تخمدان به داخل نیتروژن به وسیله cryopin پس از آب گیری. (A) برداشتن تخمدان با یک سوزن (B) قرار دادن نمونه به همراه سوزن در داخل کرایوویال حاوی نیتروژن.



جدول 2-1- ترکیبات ضد یخ در محلول های انجمادی (V) و آزمون سمیت (T)

V 2	V 1	محلول انجمادی گروه ها
DMSO %15 + EG %15	DMSO %7/5 + EG %7/5	T I و V I
PROH %15 + EG %15	PROH %7/5 + EG %7/5	T II و V II
PROH %15 + DMSO %15	PROH %7/5 + DMSO %7/5	T III و V III
0/25 + DMSO %15 + EG %15 مول در لیتر سوکروز	DMSO %7/5 + EG %7/5	T IV و V IV
0/25 + PROH %15 + EG %15 مول در لیتر سوکروز	PROH %7/5 + EG %7/5	T V و V V
0/25 + PROH %15 + DMSO %15 مول در لیتر سوکروز	PROH %7/5 + DMSO %7/5	T VI و V VI

2-2-6. ذوب تخمدان های منجمد

ذوب در 4 مرحله انجام شد و هر مرحله 5 دقیقه به طول انجامید. اول، تخمدان های منجمد از نیتروژن مایع خارج شده و بلافاصله در محلول ذوب اول (W1) (HTCM + 1 مول در لیتر سوکروز) قرار گرفتند. سپس ادامه مرحله آب دهی در محلول های ذوب دوم، سوم و چهارم به ترتیب ذیل ادامه یافت:

1- W2: HTCM + 0/5 مول در لیتر سوکروز

2- W3: HTCM + 0/25 مول در لیتر سوکروز

3- W4: HTCM + 0/125 مول در لیتر سوکروز

تمامی مراحل در دمای اتاق و بر روی شیکر انجام شد به غیر از مرحله اول آب دهی که در حمام آب 37 درجه سانتیگراد صورت گرفت. تمامی تخمدان های ذوب شده مانند گروه کنترل به مدت 20 تا 30 دقیقه در انکوباتور (37 درجه سانتیگراد و 5% CO₂) و در محلول پایه انکوبه شده و سپس جهت انجام فرآیند آماده سازی بافتی در محلول بوئن یا گلو تار آلدهید، تثبیت شدند.

2-2-7. ارزیابی بافتی (رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین⁹⁷)

تخمدان های تثبیت شده در بوئن، طی فرآیند بافت شناسی، تحت آب گیری قرار گرفته و به وسیله پارافین مایع، قالب گیری شدند. سپس قالب های حاوی بافت تخمدان، به صورت متوالی و با ضخامت 6 میکرومتر قطع زده و قطعات به صورت 1 به 5، بر روی لام آغشته به چسب آلومین قرار داده شدند. سپس قطعات بافت تخمدان با روش H & E رنگ آمیزی شده و به لحاظ ساختاری و تعداد فولیکول های مرده و زنده بر اساس روش Gougeon در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. بر این اساس ائوزینوفیلیک شدن شدید سیتوپلاسم تخمک، جمع شدن و متراکم شدن شدید هسته به ترتیبی که هستک ها قابل تشخیص نباشند و از هم گسیختگی غشاء هسته، نشانه های آنرزی در نظر گرفته شدند. ترتیب قرار دادن قطعات در محلول ها در رنگ آمیزی H & E در جدول 2-2 آمده است.

⁹⁷ Hematoxylin - Eosin (H & E)

به منظور مقایسه نسبی تعداد فولیکول ها بین گروه های مختلف، درصد هر نوع فولیکول سالم و یا مرده محاسبه و نسبت به کل تعداد فولیکول های همان تخمدان طبق فرمول زیر، درصدگیری شد. به طور مثال در گروه کنترل از تعداد کل 500/33 فولیکول، تعداد 202/33 عدد فولیکول بدوی سالم وجود داشت که درصد فولیکول های بدوی سالم آن طبق فرمول ذیل می شود: 202/33 تقسیم بر 500/33 ضربدر 100، که برابر است با 40/43%.

$$\text{درصد فولی کول بدوی سالم} = \frac{\text{تعداد فولی کول های بدوی سالم در همان تخمدان از گروه کنترل}}{\text{تعداد کل فولی کول های همان تخمدان از گروه کنترل}} \times 100$$

تعداد کل فولیکول ها = فولی کول های (بدوی + اولیه + پراآنترال + آنترال) سالم و مرده + جسم زرد

جدول 2-2: مراحل رنگ آمیزی H & E برای قطعات بافتی

ردیف	مرحله	ماده	زمان
1	پارافین زدایی	زایلل 1	4 دقیقه
		زایلل 2	4 دقیقه
2	آب دهی	الکل 1-100	1/5 دقیقه
		الکل 2-100	1/5 دقیقه
		الکل 96%	1 دقیقه
		الکل 70%	1 دقیقه
		آب دیونیزه	1 دقیقه
3	رنگ کردن هسته	هماتوکسیلین	1 دقیقه
4	شستشو	شستشو	3 دقیقه
5	حذف رسوبات رنگ	اسید الکل	یک ضربه
6	شستشو	شستشو	3 دقیقه
7	رنگ کردن سیتوپلاسم	اُئوزین	20 ثانیه
8	آب گیری	الکل 70%	1 دقیقه
		الکل 96%	1 دقیقه
		الکل 1-100	1 دقیقه
		الکل 2-100	1 دقیقه
9	شفاف زایی	زایلل 1	3 دقیقه
		زایلل 2	5 دقیقه
10	قرار دادن لامل روی لام	چسب انتلان	

8-2-2. ایمونوهیستوشیمی⁹⁸

آزمون ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی بادی 3 rabbit anti-pro and active caspase و نیز روش⁹⁹ avidin-biotin-immunoperoxidase بر روی قطعات بافت تخمدان قالب گیری شده با پارافین صورت گرفت. مقاطع مورد ارزیابی در ایمونوهیستوشیمی از همان نمونه هایی انتخاب گردید که برای رنگ آمیزی H & E در نظر گرفته شده بودند. به این ترتیب که از هر نوار تهیه شده در برش گیری قالب های پارافینی حاوی تخمدان، قطعات پس از اولین قطعه سمت چپ و آخرین قطعه سمت راست که برای H & E انتخاب شده بودند، برداشته شده و از هر نمونه دو لام برای ایمونوهیستوشیمی تهیه گردید. مقاطع قبل از انکوبه شدن با آنتی بادی اولیه (با رقت 1 به 500)، با پراکسید هیدروژن 3% تیمار شده و سپس تحت احیای آنتی ژن با روش آنزیمی (تریپسین + CaCl₂/2H₂O) به مدت 30 دقیقه و در دمای 37 درجه سانتیگراد قرار گرفتند (جزئیات بیشتر هر مرحله در جدول 2-3 آمده است). در این آزمایش، فولیکولهایی که تخمک و یا بیش از 50 درصد سلولهای کومولوسی آنها در رنگ آمیزی، Caspase 3 مثبت بودند (سلول های با سیتوپلاسم قهوه ای رنگ به دلیل اثر DAB)، به عنوان فولیکول آپوپتوتیک در نظر گرفته شده و درصد آن ها بر اساس فرمول شمارش فولیکول ها در مبحث ارزیابی H & E محاسبه گردید.

جدول 2-3: مراحل ایمونوهیستوشیمی (روش میکروسکوپ نوری)

ردیف	مرحله	تکرار	دما	زمان
1	زدودن پارافین	2	دمای اتاق	هر بار 10 دقیقه
2	آب دهی	1	الکل 100 اول	هر بار 3 دقیقه
			الکل 100 دوم	
			الکل 96	
			الکل 70	
	آب			
3	مهار پرواکسیدازهای داخل سلولی	1	4 درجه	30 دقیقه
4	شستشو	2	دمای اتاق	هر بار 5 دقیقه
5	بازخوانی آنتی ژن ¹⁰⁰	1	37 درجه	30 دقیقه

⁹⁸ Immunohistochemistry (IHC)

⁹⁹ Vector Labs, Burlingame, CA

¹⁰⁰ Antigen Retrieval

6	شستشو	2	PBS Tween	دمای اتاق	هر بار 5 دقیقه
7	نفوذ پذیر کردن غشاء ¹⁰¹		تریتون X 100	دمای اتاق	10 دقیقه
8	حذف آنتی ژن های مشترک دو گونه ¹⁰²	1	سرم بز	37 درجه	1 ساعت
9	شستشو	2	PBS Tween	دمای اتاق	هر بار 5 دقیقه
10	آنتی بادی اولیه	1	با رقت 1 به 500	37 درجه	2 ساعت
				4 درجه	12 ساعت (over night)
11	شستشو	2	PBS Tween	دمای اتاق	هر بار 10 دقیقه
12	آنتی بادی ثانوی	1	با رقت 1 به 500	37 درجه	1 ساعت
13	تغییر دهنده پراکسیداز ¹⁰³	1	HRP (Horse radish Peroxidase)	دمای اتاق	30 دقیقه
14	شستشو	2	PBS Tween	دمای اتاق	هر بار 10 دقیقه
15	نوری کردن رنگ	1	DAB	دمای اتاق	5 تا 15 دقیقه
<p>تهیه محلول DAB: دو نوع محلول DAB وجود دارد: 1- محلول 1 DAB: بسیار سمی و خطرناک است و باید در دمای 15- تا 25- درجه سانتیگراد نگهداری شده و به هنگام استفاده، ظرف حاوی آن، نباید از فریزر خارج شود. این محلول X 10 بوده و باید با محلول 2 DAB به صورت X 1 درآید. 2- محلول 2 DAB: در اصل پروکسید بافر بوده و به صورت منجمد به آزمایشگاه می آید. باید توجه داشت که این محلول منجمد به آرامی از حالت انجماد خارج شود. بدین منظور ظرف منجمد آن در یخچال 4 درجه سانتیگراد گذاشته شده تا پس از ساعتی از حالت انجماد خارج گردد. اگر قرار است محلول 1 DAB بیشتر از 6 ماه در آزمایشگاه بماند، باید تقسیم بندی شده و در نیتروژن مایع ذخیره شود (گاهی محلول آماده کار DAB در کیت شرکت های مختلف موجود است و نیازی به آماده کردن آن نیست)</p>					
16	رنگ آمیزی شمارشی ¹⁰⁴	1	هماتوکسیلین	دمای اتاق	20 ثانیه
17	آب گیری ¹⁰⁵		الکل 70	دمای اتاق	هر بار 3 دقیقه
			الکل 96		
			الکل 100 اول		
			الکل 100 دوم		
18	شفاف سازی ¹⁰⁶	1	زایلل 1 و 2	دمای اتاق	هر بار 5 دقیقه
19	لام گذاری ¹⁰⁷	1	چسب انتلان	دمای اتاق	تا زمان خشک شدن

¹⁰¹ Permeabilization

¹⁰² Blocking

¹⁰³ POD convertor

¹⁰⁴ Counter Staining

¹⁰⁵ Rehydration

¹⁰⁶ Clearing

¹⁰⁷ Mounting

2-2-9. تهیه مقاطع نیمه نازک و فوق نازک جهت بررسی فراساختار بافت با میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM¹⁰⁸)

به منظور بررسی فراساختار بافت تخمدان، ابتدا نمونه های بافت تثبیت شده در گلو تار آلدهید¹⁰⁹ 2/5% در دمای 4 درجه سانتیگراد قرار گرفتند و 48 ساعت بعد برای فرآیند آماده سازی به دستگاه پروسسور خودکار با برنامه ریزی طبق جدول 2-4 منتقل شدند. پس از انجام فرآیند آماده سازی، نمونه ها با ترکیبات رزین قالب گیری شده و برای قطع زدن آماده گردیدند.

به منظور تعیین محل دقیق فولیکول های بدوی و یا اولیه و نیز برش گیری نهایی برای تهیه گریدهای میکروسکوپ الکترونی، مقاطع نیمه نازک از قالب ها با دستگاه اولترامیکروتوم¹¹⁰ در آزمایشگاه بافت شناسی پژوهشگاه رویان (ایران، تهران) و با ضخامت حدود 200 تا 500 نانومتر تهیه و به وسیله تالوئیدین بلو رنگ آمیزی شدند. به این ترتیب که پس از قرار گیری مقاطع نیمه نازک بر روی لام، یک قطره از رنگ فوق بر روی آن ها ریخته شده و لام روی صفحه گرم با دمای 100 درجه سانتیگراد قرار گرفت. چند ثانیه بعد (پس از زرد شدن کناره های قطره تالوئیدین بلو)، لام از روی صفحه گرم برداشته شده و رنگ، با الکل 70 درصد و یا آب دیونیزه، شستشو داده شد تا رسوبات رنگ کاملاً از روی قطعه نیمه نازک برداشته شود و برای مشاهده با میکروسکوپ نوری آماده گردد.

پس از بررسی دقیق قطعه نیمه نازک و تعیین محل فولیکول بدوی و یا اولیه، قالب بافتی، برای گرفتن قطعات فوق نازک، کوچکتر¹¹¹ شد. سپس قطعات فوق نازک با ضخامت 50 تا 70 نانومتر تهیه گردیدند. قطعات فوق نازک بر روی گریدهای میکروسکوپ الکترونی قرار گرفته و برای رنگ آمیزی آماده شدند.

رنگ آمیزی گریدهای EM با روش اشاره شده در جدول 2-5، و با رنگ های "اورانیل استات"¹¹² و "لید سیترات"¹¹³ صورت گرفت. پس از رنگ شدن قطعات فوق نازک روی گریدها، برای مشاهده با دستگاه میکروسکوپ الکترونی به دو مرکز مراجعه گردید: 1- برای دیدن نمونه های انجمادی، نمونه ها در مرکز میکروسکوپ الکترونی بیمارستان سان رافائله¹¹⁴ شهر میلان دیده شدند و 2- برای بررسی نمونه های پیوندی که در ادامه با آن اشاره خواهد شد، مرکز پاتولوژی بیمارستان بقیه الله (عج) (ایران، تهران) مورد استفاده قرار گرفت.

جدول 2-4: مراحل آماده سازی بافت و قالب گیری نهایی برای تصویربرداری با EM

¹⁰⁸ Transmission Electron Microscopy (TEM)

¹⁰⁹ Glutaraldehyde

¹¹⁰ LEICAEMUC₆ (US)

¹¹¹ Trim

¹¹² Uranyl Acetate

¹¹³ Lead Citrate

¹¹⁴ San Raffaele (Milan, Italy)

مرحله	ماده مورد استفاده	زمان
تثبیت پروتئین ها	گلو تار آلدهید 2/5%	10 دقیقه
	¹¹⁵ PBS	2 ساعت
	PBS	2 ساعت
شستشو	PBS	2 ساعت
	PBS	3 ساعت
تثبیت چربی ها	تترا اکسید اسمیوم 1%	3 ساعت
	شستشو	30 دقیقه
آبگیری	استون 30%	60 دقیقه
	استون 50%	60 دقیقه
	استون 70%	60 دقیقه
	استون 90%	60 دقیقه
	استون 100% (3X)	60 دقیقه
جایگزینی استون با رزین	استون/رزین 1:3	3 ساعت
	استون/رزین 1:1	4 ساعت
	استون/رزین 3:1	6 ساعت
قالب گیری	رزین	15 ساعت
پلیمریزاسیون	اوون 65 درجه سانتیگراد	2 روز

جدول 2-5: مراحل رنگ آمیزی قطعات فوق نازک با لید سیترات و اورانیل استات

مرحله	ماده مورد استفاده	زمان
رنگ آمیزی هسته و پروتئین	اورانیل استات 5%	60 دقیقه
شستشو	اتانول 50%	20 ضربه
شستشو	اتانول 50%	20 ضربه
شستشو	آب دیونیزه	20 ضربه
شستشو	آب دیونیزه	20 ضربه
...	خشک کردن	...
رنگ آمیزی غشاء، گلیکوژن و RNA	لید سیترات 0/5%	50 دقیقه
شستشو	آب + 3NaOH	20 ضربه
شستشو	آب + 3NaOH	20 ضربه
شستشو	آب دیونیزه	20 ضربه
شستشو	آب دیونیزه	20 ضربه
...	خشک کردن	...

¹¹⁵ Phosphate Buffered Saline (PBS)

3-2. پیوند بافت تخمدان منجمد - ذوب شده

1-3-2. طراحی آزمایش

در بخش دوم از این پژوهش، پس از آنکه غلظت مناسب ضدیخ برای انجماد بافت تخمدان، در قسمت اول تعیین شد، اثرات پیوند به خودی بر بافت انجمادی، 3 هفته پس از پیوند (هفته هشتم) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور تخمدان موش های صحرایی طبق جدول 2-6، به 6 گروه تقسیم بندی شدند:

1- کنترل 8 هفته ای (Control): حیوانات 5 هفته ای به صورت دست نخورده در بخش علوم حیوانات آزمایشگاهی و در شرایطی یکسان با سایر حیوانات نگهداری شدند. پس از گذشت 3 هفته (معادل مدت زمان پیوند در گروه های آزمایشی) تخمدان های این گروه از بدن خارج شده و ارزیابی های لازم بر روی بافت تخمدان و نیز سرم خون حیوان صورت گرفت.

2- گروه غیر منجمد پیوندی غیر گنادکتومی ($nVTnG^{116}$): در این گروه تخمدان موش صحرایی 5 هفته ای بدون انجماد، زیر پوست گردن پیوند زده شد و تخمدان طرف مقابل نیز بر جای خود باقی ماند. پس از گذشت سه هفته از پیوند، تخمدان پیوندی از بدن خارج شده و ارزیابی های لازم مانند گروه کنترل بر روی آن صورت گرفت.

3- گروه منجمد پیوندی غیر گنادکتومی ($VTnG^{117}$): در این گروه تخمدان موش صحرایی 5 هفته ای پس از انجماد، زیر پوست گردن پیوند زده شد و تخمدان طرف مقابل نیز بر جای خود باقی ماند. پس از گذشت سه هفته از پیوند، تخمدان پیوندی از بدن خارج شده و ارزیابی های لازم مانند سایر گروه ها بر روی آن صورت گرفت.

4- گروه غیر منجمد پیوندی گنادکتومی ($nVTG^{118}$): در این گروه تخمدان موش صحرایی 5 هفته ای بدون انجماد، زیر پوست گردن پیوند زده شد و تخمدان طرف مقابل نیز از بدن خارج گردید. پس از گذشت سه هفته از پیوند، تخمدان پیوندی از بدن خارج شده و ارزیابی های لازم مانند سایر گروه ها بر روی آن صورت گرفت.

5- گروه منجمد پیوندی گنادکتومی (VTG^{119}): در این گروه تخمدان موش صحرایی 5 هفته ای پس از انجماد، زیر پوست گردن پیوند زده شد و تخمدان طرف مقابل نیز از بدن خارج گردید. پس از گذشت سه هفته از پیوند، تخمدان پیوندی از بدن خارج شده و ارزیابی های لازم مانند سایر گروه ها بر روی آن صورت گرفت.

¹¹⁶ Non-Vitrified Transplanted non-Gonadectomized (nVTnG) Group

¹¹⁷ Vitrified Transplanted non-Gonadectomized (VTnG) Group

¹¹⁸ Non-Vitrified Transplanted Gonadectomized (nVTG) Group

¹¹⁹ Vitrified Transplanted Gonadectomized (VTG) Group

6- گروه گنادکتومی دو طرفه (BLG¹²⁰): در این گروه هر دو تخمدان در هفته 5 رشد، از بدن خارج شده و حیوان مدت سه هفته در شرایطی یکسان با گروه های دیگر نگهداری شد. گروه مذکور تنها برای بررسی اثر برداشت کامل گنادها بر سطح ترشح هورمون های مورد ارزیابی تعیین گردید

جدول 2-6: گروه های کنترل و پیوندی

گروه گنادکتومی دو طرفه (BLG)	گروه منجمد پیوندی گنادکتومی (VTG)	گروه غیر منجمد پیوندی گنادکتومی (nVTG)	گروه منجمد پیوندی گنادکتومی (VTnG)	گروه غیر منجمد پیوندی غیر گنادکتومی (nVTnG)	گروه کنترل 8 هفته ای (Control)
⊗					تخمدان خارج نشده
○					تخمدان غیر منجمد پیوندی
●					تخمدان منجمد پیوندی
●					تخمدان خارج شده غیر پیوندی

¹²⁰ Bilateral Gonadectomized (BLG) Group

2-3-2. پیوند تخمدان

برای انجام پیوند لازم است پس از بیهوشی، محل پیوند را به صورت زیر آماده نمود. ابتدا حیوان به صورت رو به شکم¹²¹ خوابانده شده و سپس موهای بدن حیوان در محل پیوند (پوست پشت گردن) تراشیده شد. در همین زمان که حیوان در حال گرفتن بیهوشی است، تخمدان های ذوب شده در انکوباتور در حال انکوبه شدن و برگشت به حالت فیزیولوژیک می باشند. پس از تراشیدن موها، محل پیوند که درست در خط وسط بدن¹²² و پشت زوائد خاری مهره های گردنی قرار دارد، به دقت با الکل 70 درصد ضد عفونی شده و از عدم وجود موهای اضافه و بقایایی آن ها بر روی پوست اطمینان حاصل شد. سپس با تیغ جراحی بر روی پوست ناحیه ذکر شده، یک برش ساجیتال به طول 0/5 سانتیمتر و مطابق بر خط وسط بدن ایجاد گردید. نوک قیچی، زیر پوست باز شده قرار گرفته و چندین بار به طرفین باز و بسته شد تا برای قرار دادن تخمدان زیر پوست فضای کافی ایجاد گردد.

تخمدان ذوب شده از محل کشت با پنس نوک باریک خارج و در محل پیوند و زیر پوست قرار داده شد. بدون دوختن تخمدان به بافت های محل پیوند، پوست باز شده روی تخمدان با نخ غیر قابل جذب بسته شد. موش های صحرایی جراحی شده تا زمان بهبودی و یا تا زمانی که از زنده ماندن آن ها اطمینان حاصل گردد، در محیط آزمایشگاه نگهداری و سپس به واحد علوم حیوانات آزمایشگاهی منتقل شدند. برای جلوگیری از توقف چرخه جنسی ناشی از در کنار هم قرار دادن حیوانات جراحی شده، موش های صحرایی به طور جداگانه در قفس های انفرادی با غذا و آب کافی، در شرایط 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی و در دمای متوسط 21 درجه سانتیگراد و نیز رطوبت 50 درصد نگهداری شدند.

2-3-3. خون گیری و جدا سازی سرم به منظور تعیین سطح هورمونی

برای بررسی میزان ترشح هورمون های استروئیدی پروژسترون، استرادیول و تستسترون و همچنین بررسی سطح گنادوتروپین های FSH و LH، سرم خون گروه های مختلف پیوندی از جمله گروه گنادکتومی دو طرفه، جدا سازی شد. به این ترتیب که حیوان مورد نظر با ترکیب داروهای گفته شده در بخش پیوند، بیهوش و طاق باز¹²³ خوابانده شد و خون گیری با استفاده از سرنگ انسولین اما با سوزن گیج 22 انجام پذیرفت. بدین منظور نوک سوزن پس از رانده شدن به زیر زائده نیه ای جناغ سینه به داخل قلب فرو برده شده و خون به طور مستقیم از قلب آسپیره گردید. در انتها خون حاصل به آرامی از سرنگ بدون سوزن، به درون لوله آزمایش 5 میلی لیتری ریخته و بلافاصله به دستگاه سانتریفیوژ منتقل و با دور 3500 و به مدت 3 دقیقه، سانتریفیوژ شد. در پایان، محلول شفاف روی قسمت قرمز رنگ و پر سلول به آرامی و با سمپلر کشیده و درون ویال های

¹²¹ Prone

¹²² Midline

¹²³ Supine

اپندروم 0/5 میلی لیتری ریخته و تا زمان بررسی با روش الایزا¹²⁴ در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

2-3-4. روش الایزا

برای بررسی سطح هورمونی، سرم خون از حالت انجماد خارج شده و در چاهک های ظروف 96 چاهکی تقسیم بندی شدند. اساس کار روش الایزا بر اساس آشکار سازی مولکول های متصل شونده به بایوتین¹²⁵ می باشد. همچنین در روش الایزا تعیین غلظت هورمون های موجود در سرم با مقایسه با محلول های استاندارد به دست می آید. برای هر محلول استاندارد (که تعداد آن ها برای هر هورمون و در هر کیت متفاوت بوده و در حدود 7 یا 8 محلول می باشد) یک OD¹²⁶ مشخص توسط شرکت سازنده تعریف شده است. در اصل غلظت هورمون های موجود در سرم نیز به وسیله مقایسه با محلول های استاندارد به دست می آید. روند اجرایی کار به تفکیک در ذیل آمده است. از آنجائیکه مدت زمان تیمار با هر محلول و نیز تعداد دفعات تکرار برای هر هورمون، متفاوت و بر اساس کیت مربوطه است، لذا برای مثال، زمان ها و میزان محلول های مورد استفاده در انتهای هر مرحله و در پرانتز فقط برای هورمون استرادیول آورده شده است:

- 1- در این روش از ظرف های 96 چاهکی¹²⁷ ته صاف استفاده شد. به دلیل اینکه خوانش طول موج خاص به صورت عمود بر کف چاهک می باشد بنابراین ظرف های ته صاف مناسب تر از ظرف های ته گرد می باشند.
- 2- در چاهک اول تا چاهک شماره 7 یا 8، محلول استاندارد ریخته و بلافاصله در چاهک های بعدی نمونه مورد نظر که در اینجا سرم جدا سازی شده خون بود، ریخته شدند (25 میکرولیتر محلول استاندارد و همان میزان سرم در چاهک مربوط به خود).
- 3- سپس بر روی تمامی چاهک های حاوی محلول های استاندارد و نمونه مورد نظر، Biotin اضافه گردید (50 میکرولیتر بایوتین اضافه، 25 ثانیه شیک شده و سپس 0/5 ساعت در دمای اتاق باقی ماند).
- 4- در مرحله بعد آنزیم کونژوگه که منجر به اتصال بایوتین به مولکول های نمونه مورد نظر می شد، اضافه گردید (به هر چاهک 50 میکرولیتر آنزیم کونژوگه اضافه و ظرف 96 چاهکی، 90 دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد).
- 5- پس از گذشت مدت زمان مورد نظر، 3 مرتبه با محلول PBS مخصوص (0/1 مولار با Ph= 4/7) شستشو داده شدند.

¹²⁴ ELISA

¹²⁵ Biotin

¹²⁶ Opacity Density

¹²⁷ Well

- 6- سپس دو رنگ A و B با نسبت برابر اضافه گردیدند که این دو رنگ با بایوتین واکنش داده و رنگ آبی تولید شد. هر چقدر واکنش بیشتر باشد رنگ آبی شدیدتر خواهد بود (پس از افزودن هر رنگ به میزان 50 میکرولیتر، 15 دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگه داشته شد).
- 7- به منظور توقف واکنش از یک محلول اسیدی (حاوی اسید سولفوریک یا H₂SO₄ رقیق شده) به نام Stop استفاده گردید که واکنش بین بایوتین و رنگ را متوقف نمود (50 میکرولیتر محلول Stop در هر چاهک اضافه شد).
- 8- بلافاصله پس از اضافه کردن Stop و توقف واکنش، رنگ زرد که قابل شناسایی برای دستگاه بود، تولید گردید. دستگاه خوانش الیزا¹²⁸ توانایی خواندن OD رنگ زرد را دارد. OD رنگ زرد خوانده شده و با OD های محلول های استاندارد مقایسه و غلظت واقعی هورمون مورد نظر محاسبه گردید. دو طول موج 450 و 630 نانومتر برای خواندن OD ها استفاده گردید. در اصل OD رنگ زرد تولید شده در طول موج 450 نانومتر قابل شناسایی است، اما برای اینکه احيانا OD های دیگر از دست نروند، از طول موج 630 به صورت کمکی استفاده شد.

2-3-5. مطالعات بافتی و فراساختار بافت تخمدان پیوندی

پس از خون گیری از رت ها، بافت تخمدانی تمامی گروه ها مطابق آنچه که در طراحی این قسمت آمد، خارج و در محلول بوئن و یا گلو تار آلدئید تثبیت شدند. سپس شمارش فولیکولی در مقاطع بافتی و تغییرات فراساختاری در مقاطع نیمه نازک و فوق نازک، طبق آنچه که در قسمت اول پژوهش ذکر شد مورد ارزیابی قرار گرفت. در ضمن وقوع آپوپتوز نیز با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی به مانند آنچه که شرح آن در قسمت اول پژوهش آمد، در نمونه های پیوندی مورد ارزیابی قرار گرفت.

2-3-6. بررسی بیان رونوشت ژن های بلوغ فولیکول، رگ زایی و آپوپتوتیک در بافت تخمدان گروه

های کنترل و پیوندی

به منظور بررسی بیان رونوشت ژن های بلوغ فولیکولی (BMP15، GDF-9 و TGF- β 1)، ژن های رگزایی (VEGF، CD34 و CD31) و ژن های آپوپتوتیکو آنتی آپوپتوتیک (BAX و BCL-2) در بافت تخمدان کنترل و پیوندی، از روش Real-time PCR¹²⁹ استفاده شد. این قسمت از پژوهش شامل جمع آوری نمونه و استخراج RNA، ساخت رشته مکمل mRNA (ساخت cDNA¹³⁰)، مرحله Real-time PCR و در نهایت تجزیه تحلیل داده های به دست آمده است.

¹²⁸ ELISA Reader

¹²⁹ Real-time Polymerase Chain Reaction

¹³⁰ Complementary DNA

2-3-6-1. جمع آوری نمونه و نگهداری آن

تخمدان خارج شده از بدن بلافاصله و بدون وقفه در محلول RA1¹³¹ کیت استخراج RNA که در ویالهای 0/5 میلی لیتر انداخته شد. بلافاصله ویال حاوی نمونه در نیتروژن مایع (196- درجه سانتیگراد) غوطه ور شده و تا زمان شروع فرآیند استخراج RNA در فریزر 70- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

2-3-6-2. استخراج RNA

جهت استخراج RNA از کیت NucleoSpin RNA II¹³² به ترتیب زیر انجام شد:

1- ابتدا تخمدان از فریزر 70- خارج شده و در ویال 1/5 میلی لیتری محتوی 3/5 میکرولیتر بتا مرکاپتواتانول و 350 میکرولیتر محلول RA1 غوطه ور شدند. به منظور خرد شدن کامل تخمدان (لیز شدن کامل سلول ها)، ابتدا بافت بوسیله تیغ جراحی تا حد امکان ریز گشته و سپس در درون ویالهای فوق 1 دقیقه به شدت ورتکس شدند.

2- به منظور کاهش چسبندگی ترکیب به دست آمده و جدانمودن قطعات باقیمانده بافت، محلول فوق در فیلتر 2 میلی لیتری بنفش رنگ کیت به مدت 1 دقیقه با سرعت 11000 xg سانتریفیوژ شد (بهتر است در این مرحله از سانتریفیوژ یخچال دار استفاده گردد).

3- به منظور همگن نمودن مخلوط فوق و آماده سازی RNA جهت اتصال به فیلتر دوم، ابتدا فیلتر اول درون ویال دور انداخته شده و سپس 350 میکرولیتر اتانول 70 درصد به ترکیب حاوی بافت لیز شده¹³³ اضافه گردید. سپس بوسیله پیپت کردن (حداقل 5 بار) بخوبی ترکیب با اتانول مخلوط شد. برای حصول اطمینان این عمل در 350 میکرولیتر الکل جدید در ویال دیگری به مدت 10 ثانیه و با ورتکس کردن، تکرار شد.

4- جهت اتصال RNA (مرحله Bind RNA)، از فیلتر آبی رنگ کیت استفاده شد. به این ترتیب که فیلتر آبی در یک ویال سانتریفیوژ 2 میلی لیتری قرار داده شد و مخلوط لیز شده بر روی فیلتر منتقل و پس از چند بار پیپتاژ کردن، به مدت 30 ثانیه با سرعت 11000 xg سانتریفیوژ شدند. سپس مخلوط دور ریخته شده و فیلتر آبی به ویال 2 میلی لیتری جدید منتقل شد.

5- 350 میکرولیتر محلول MDB¹³⁴ (Membrane Desalting Buffer) بر روی فیلتر آبی درون ویال جدید اضافه و به مدت 1 دقیقه با سرعت 11000 xg تا خشک شدن کامل فیلتر، سانتریفیوژ شدند.

¹³¹ Lysis buffer (Machery-Nagel, Germany)

¹³² Nucleo Spin, RNA II (Machery-Nagel, Germany)

¹³³ Lysate samples

¹³⁴ Membrane Desalting Buffer (MDB) (Machery-Nagel, Germany)

6- برای آماده کردن محلول واکنش دهنده DNase (مرحله Digest DNA) از ویال استریل 1/5 میلی لیتری استفاده شد. به این ترتیب که 10 میکرولیتر آنزیم rDNase به همراه 90 میکرولیتر Reaction Buffer بر روی فیلتر درون ویال اضافه و به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند

7- روند شستشو به ترتیب زیر و در سه مرحله انجام شد:

1- **شستشوی اول:** 200 میکرولیتر بافر RA2¹³⁵ به فیلتر آبی اضافه و به مدت 30 ثانیه با سرعت 11000 سانتریفیوژ شدند (فیلتر به ویال 2 میلی لیتری جدید منتقل شد).

2- **شستشوی دوم:** 600 میکرولیتر بافر RA3 به فیلتر آبی اضافه و به مدت 30 ثانیه با سرعت 11000 سانتریفیوژ شدند. مایع حاصل دور ریخته شده و فیلتر به همان ویال برگشت داده می شود (قبل از استفاده از RA3 کیت، ابتدا باید 50 میلی لیتر اتانول مطلق به ظرف اصلی اضافه کنیم).

3- **شستشوی سوم:** جهت خشک شدن کامل فیلتر، مجدداً 250 میکرولیتر بافر RA3 به فیلتر اضافه و به مدت 2 دقیقه با سرعت 11000 xg سانتریفیوژ شدند. پس از این مرحله، فیلتر به ویال جدید 1/5 میلی لیتری منتقل گردید.

8- به منظور جداسازی RNA از روی صفحه فیلتر (مرحله Elute RNA)، 60 میکرولیتر آب عاری از RNase¹³⁶ روی فیلتر اضافه و به مدت 1 دقیقه با سرعت 11000 xg سانتریفیوژ شدند. به منظور اثر گذاری بیشتر، بهتر است که این فرآیند در دو مرحله 30 ثانیه ای و در هر مرحله با 30 میکرولیتر آب صورت بگیرد. از این زمان به بعد محلول حاوی RNA باید با دقت و بر روی یخ نگهداری شود.

3-6-3-2. اندازه گیری غلظت RNA

برای تعیین غلظت RNA از دستگاه نانودراپ استفاده شد. حداکثر جذب RNA در طول موج 260 نانومتر بوده و در طول موج 280 نانومتر نیز پلی ساکاریدها بیشترین جذب را دارند. بنابراین تعیین نسبت 260 به 280، درجه خلوص RNA را مشخص می کند. به این منظور، ابتدا دستگاه را با یک میکرولیتر آب مقطر صفر (blank) می کنیم. سپس 1 میکرولیتر از محلول حاوی RNA استخراج شده را با دقت بر روی منفذ دستگاه قرار داده و سپس غلظت را اندازه می گیریم. بهترین میزان غلظت RNA در حد 1/9 است. مقادیر بالاتر و پایین تر از آن یعنی آلودگی با عناصر دیگر مانند فنول و یا پروتئین.

¹³⁵ Wash buffer (Machery-Nagel, Germany)

¹³⁶ RNase Free

2-3-6-4. سنتر cDNA 137

با استفاده از نسخه برداری معکوس (RT-PCR)¹³⁸، رشته DNA از روی الگوی RNA ساخته شد. بدین منظور از پرایمرهای الیگو dT، هگزامرهای تصادفی یا پرایمرهای ویژه یک ژن استفاده گردید. در واقع، الیگو dT مکمل دم پلی-A در mRNA است ولی هگزامرهای تصادفی تمام RNA را مورد هدف قرار می دهد و به خصوص برای نسخه های بلند مفید است. در انجام این پروژه برای سنتر cDNA از پرایمرهای هگزامر تصادفی برای شروع فرآیند نسخه برداری معکوس استفاده شد.

برای انجام نسخه برداری معکوس مراحل زیر انجام شد:
- به هر لوله مواد زیر اضافه گردید:

2 میکرولیتر	Total RNA (extracted)
1 میکرولیتر	Random Hexamer (0.2 µg/µl)
تا 12 میکرولیتر	Distilled water

- مخلوط حاصله به طور مختصر سانتریفیوژ و به مدت 5 دقیقه در دمای 70 درجه سانتیگراد انکوبه شد.
- سپس نمونه ها روی یخ قرارداده شدند و پس از گذشت 3 تا 4 دقیقه، مواد زیر به ترتیب به آنها اضافه شد:

4 میکرولیتر	Reaction buffer (5x)
1 میکرولیتر	Ribonuclease inhibitor (20 U/ML)
2 میکرولیتر	dNTP mix (10 mM)

- مخلوط فوق به طور مختصر سانتریفیوژ و در دمای 25 درجه سانتیگراد به مدت 5 دقیقه انکوبه گردید.
- به مقدار 1 میکرولیتر آنزیم RT RevertAid به مخلوط فوق افزوده شد (به نمونه های RT منفی، آنزیم RT را اضافه نمی کنیم).
- سپس مخلوط فوق به مدت 10 دقیقه در دمای 25 درجه سانتیگراد و در نهایت به مدت یک ساعت در دمای 42 درجه سانتیگراد انکوبه شد.

¹³⁷ Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, UK)

¹³⁸ Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

- در مرحله بعد به منظور غیرفعال کردن آنزیم RT، مخلوط فوق به مدت 10 دقیقه در 70 درجه سانتیگراد انکوبه شد (مراحل فوق در دستگاه ترموسایکلر¹³⁹ انجام گردید).
- در نهایت cDNA بدست آمده در دمای 20- و باقیمانده RNA نیز در دمای 70- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.
- بعلاوه برای کنترل مثبت و ارزیابی واکنش RT از ACT1 که یک ژن مرجع¹⁴⁰ است استفاده گردید

2-3-6-5. آماده سازی پرایمرها

پرایمرها بصورت لیوفیلاز تهیه شده و برای آماده سازی به هر ویال پرایمر حجم مشخصی آب مقطر استریل (بر اساس مشخصات ارسالی از شرکت سازنده پرایمر) اضافه و به مدت 24 ساعت در یخچال نگهداری شدند. غلظت این پرایمرها 100 پیکومول بوده که بر اساس فرمول $Dil \times [0.01 \times N] \times A260$ و سپس با استفاده از فرمول $N1V1 = N2V2$ از آنها غلظت 5 پیکومول ساخته و تکثیر cDNA به روش زیر انجام شد. به منظور کنترل کیفیت پرایمرها و اطمینان از طراحی مناسب آنها، عملکردشان با روش RT-PCR یا PCR معمولی، ارزیابی شد. به این ترتیب که محصول PCR بر روی ژل آگارز Load شد و باندهای اختصاصی به دست آمده از هر پرایمر حاکی از صحت طراحی توالی و کیفیت پرایمر مورد نظر بود:

1- آماده سازی trey: دو طرف لیه هر trey با چسب شیشه ای بسته شد تا از بیرون ریختن ژل آگارز جلوگیری نماید. سپس شانه های مخصوص با اندازه و تعداد دلخواه دندانها و با توجه به تعداد پرایمرهای در دست بررسی، در trey قرار داده شدند.

2- ساختن ژل آگارز: برای این منظور ژل 3% ساخته شد. به این ترتیب که 3 گرم ژل آگارز در 100 میلی لیتر بافر TAE¹⁴¹ ریخته شد. مخلوط تهیه و تا زمان شفاف شدن درون ماکروفر با دمای 100 درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از شفاف شدن و خروج حباب های هوا از ژل داغ، کمی زمان داده شد تا ژل سرد شود. سپس ژل با دقت درون trey مخصوص ریخته شد.

3- رنگ زدن نمونه ها: به این منظور از رنگ مخصوص 6X DNA loading dye استفاده شد. ابتدا نمونه های حاوی محصول PCR اسپین شده تا یکنواخت گردند. سپس 1 تا 2 میکرولیتر رنگ به 5 میکرولیتر محصول PCR اضافه شد (1:5). چند ضربه به ظرف حاوی مخلوط زده شد تا کاملاً یکنواخت گردد.

4- بردن نمونه روی ژل: پس از سرد شدن ژل و بستن آن درون trey، شانه مخصوص ایجاد چاهک از ژل خارج شد. چسب های کناره ژل نیز از آن جدا شد تا جریان الکتریسیته بتواند به راحتی از ژل بگذرد. سپس ژل به نحوی درون تانک الکتروفورز قرار گرفت که بافر مخصوص درون تانک، سطح ژل را کاملاً پوشاند. 2 میکرولیتر از نمونه رنگ شده، با دقت زیاد به درون هر چاهک منتقل شد. پس از پر شدن تمامی چاهک های مورد انتظار،

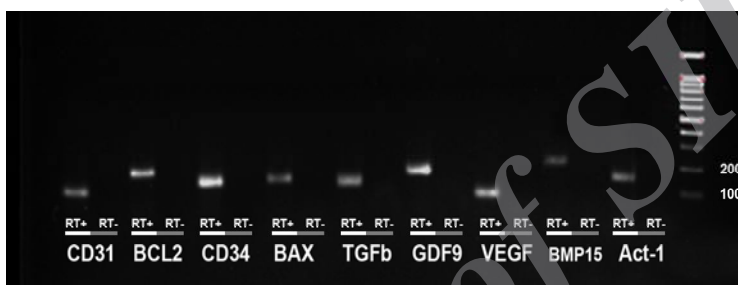
¹³⁹ Thermal cycler (Eppendorf, Germany)

¹⁴⁰ Housekeeping

¹⁴¹ Tris Acetic Acid EDTA

ولتاژ دستگاه الکتروفورز روی ولتاژ 80 تا 90 تنظیم شده و الکترودهای قطب مثبت و منفی به دستگاه وصل و جریان الکتریسیته برقرار گردید.

5- **مشاهده باندها:** پس از حدود یک ساعت، باندهای اختصاصی در ژل آگارز حرکت کرده و در جایگاه خود قرار می گیرند. به منظور رنگ آمیزی باندهای محصول PCR، ژل آگارز به محلول اتیدیوم بروماید به مدت 30 دقیقه آغشته شد. سپس جهت آشکارسازی باندها، به وسیله دستگاه Gel Duc، طیف نور فرابنفش¹⁴² به ژل آگارز تابانده و نهایتاً از ژل مذکور در درون دستگاه عکس تهیه شد (شکل 2-2).



شکل 2-2: تصویر باندهای اختصاصی به تفکیک هر پرایمر بر روی ژل آگارز

2-6-3-2. مراحل Real-time PCR

پس از اطمینان از صحیح بودن توالی پرایمرها، واکنش Real-time PCR به وسیله دستگاه Applied Biosystem Real-Time PCR¹⁴³ انجام شد. به ازاء هر واکنش مواد زیر با مقادیر ذکر شده مورد استفاده قرار گرفتند:

10 میکرولیتر	Power syBR Green PCR master mix (2x)
1 میکرولیتر	Forward primer (5 Pmol/μL)
1 میکرولیتر	Reverse primer (5 Pmol/μL)
2 میکرولیتر	cDNA
6 میکرولیتر	Distilled water
20 میکرولیتر	Total

¹⁴² Ultraviolet (UV)

¹⁴³ Applied Biosystem Real-Time PCR (Model: ۷۵۰۰, UK)

2-3-6-7. شرایط Real-time PCR

- جهت فعال سازی آنزیم و مرحله واسرشتی اول، در دمای 95 درجه سانتیگراد 10 دقیقه
- جهت واسرشتی هر سیکل، در دمای 95 درجه سانتیگراد 15 ثانیه
- جهت مرحله Annealing و خواندن فلورسنت تابیده شده در پایان هر سیکل، در دمای 60 درجه سانتیگراد 60 ثانیه. سیکل ها نیز به تعداد 50 بار تکرار گردید.

2-3-6-8. تحلیل نتایج Real-time PCR

جهت افزایش دقت در بررسی نتایج، هر واکنش بصورت دوتایی انجام شده و برای هر گروه آزمایشی نیز 3 تکرار در نظر گرفته شد. علاوه بر واکنش های فوق، به ازاء هر ژن یک واکنش بدون نمونه (144 NTC) نیز صورت گرفت. همچنین با استفاده از cDNA ساخته شده از RNA و تهیه رقت های متوالی 1، 1:5، 1:25، 1:125، 1:625 به عنوان الگو، واکنش هایی انجام شد که از روی 145 Ct بدست آمده و لگاریتم غلظت به ازاء هر رقت، خطی (شیب 146 غلظت) رسم گردید. سپس جهت تجزیه و تحلیل داده های حاصل با استفاده از نرم افزار Applied Biosystem 147 ، Ct متناظر با هر نمونه تهیه و نهایتاً نسبت میانگین داده های تکرارهای هر ژن نمونه با ژن مرجع بین گروه های مختلف مقایسه گردید.

2-4. تجزیه و تحلیل آماری داده ها

تمامی داده ها در هر دو بخش مطالعه انجماد و پیوند، ابتدا توسط آزمون کولموگروف اسمیرنوف به لحاظ نرمال بودن بررسی شدند. سپس داده های مربوط به شمارش فولیکول های سالم، مرده و آپوپتوتیک، به وسیله آزمون ANOVA و آزمون وابسته LSD و داده های مربوط به بررسی سطح ترشح هورمون ها و نیز رونوشت ژن ها، به وسیله آزمون Mann-Whitney و تحت نرم افزار 148 SPSS 19، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. داده ها به همراه میانگین خطای استاندارد (149 SEM) ارائه و با سطح معنی داری $P < 0/5$ بررسی شدند.

¹⁴⁴ None Template Control (NTC)

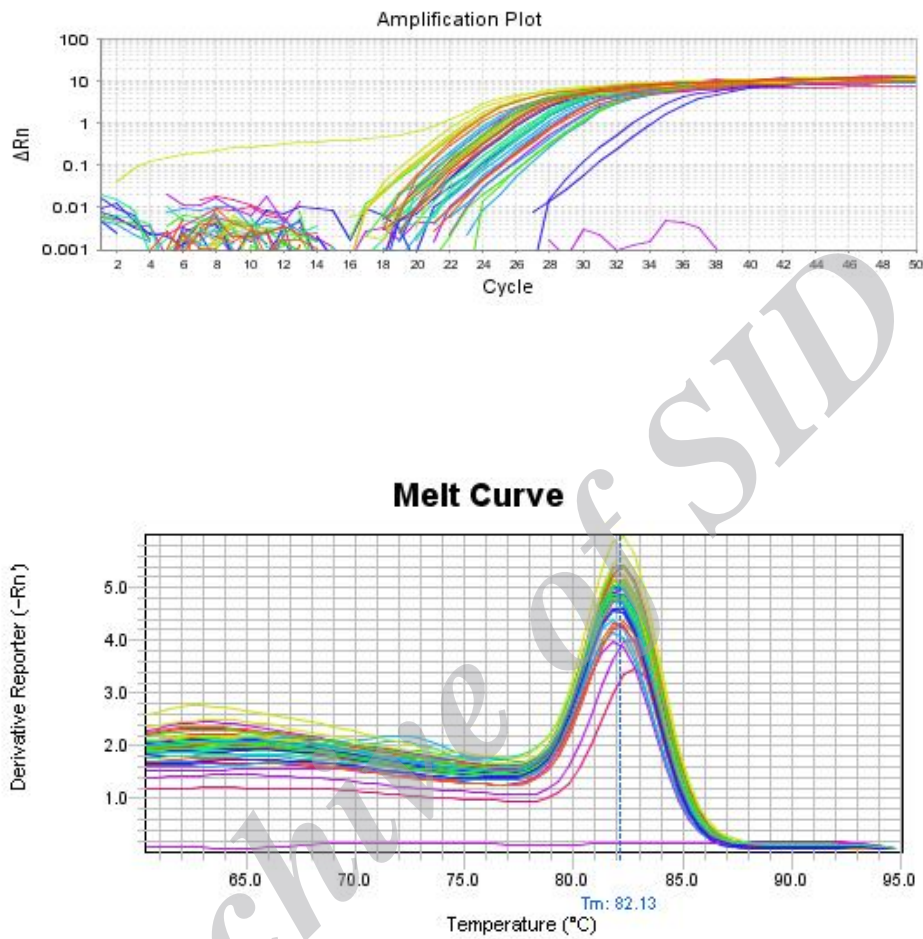
¹⁴⁵ Cycles of Thershold

¹⁴⁶ Slope

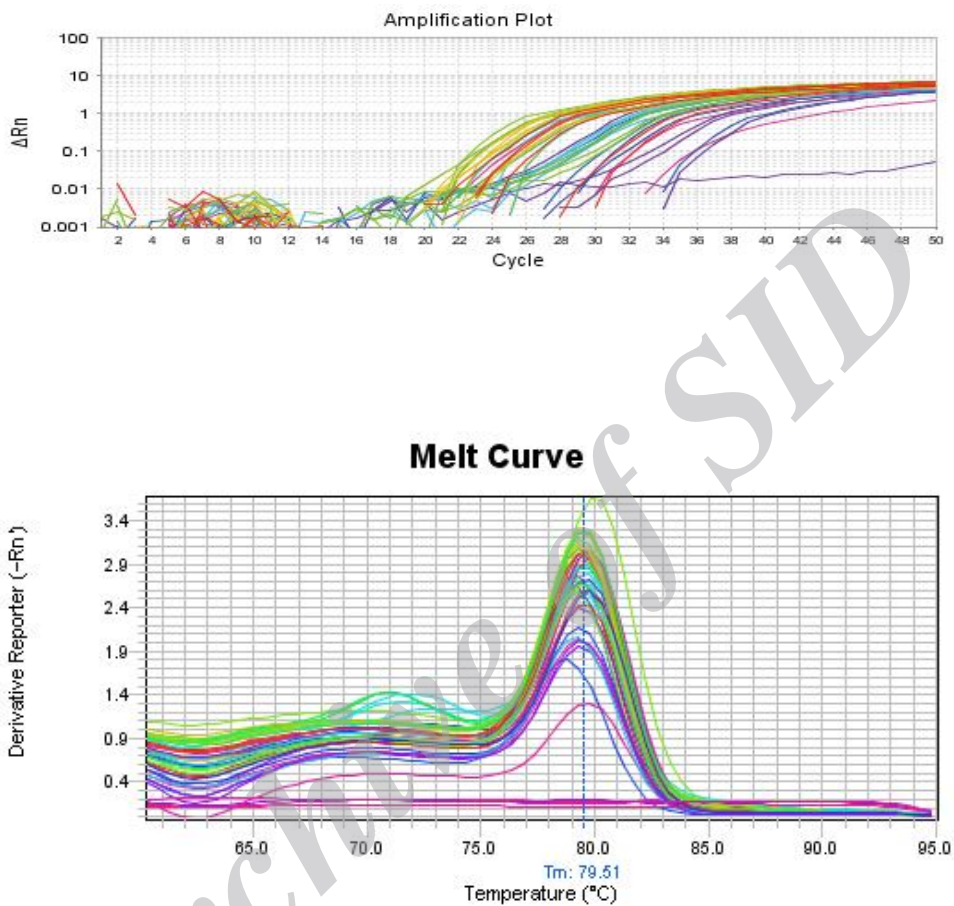
¹⁴⁷ Applied Biosystem [StepOne Software v۲.۱]

¹⁴⁸ Package for the Social Sciences (IBM SPSS software, version ۱۹)

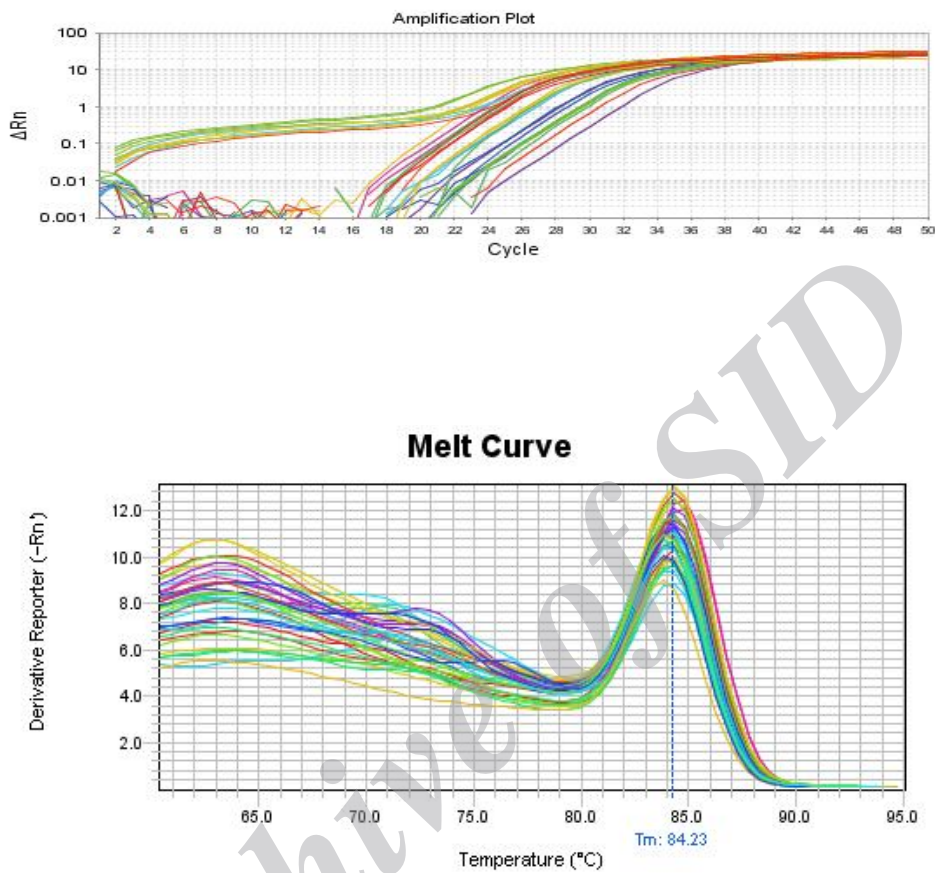
¹⁴⁹ Standard Error Mean (SEM)



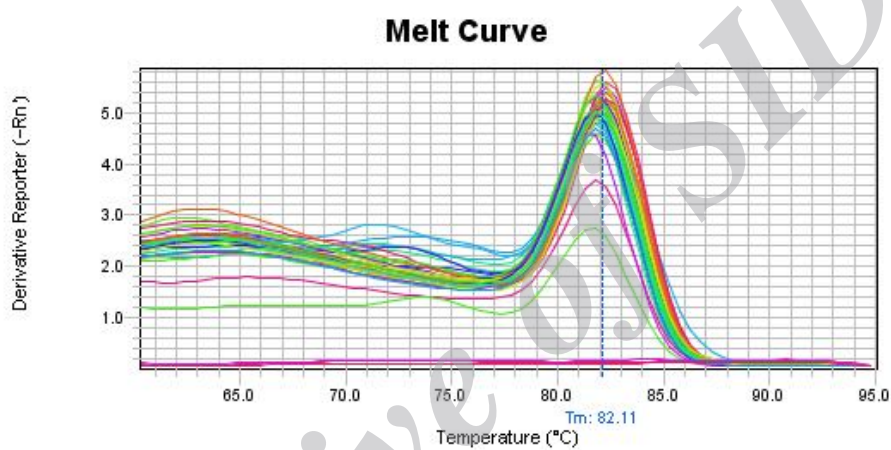
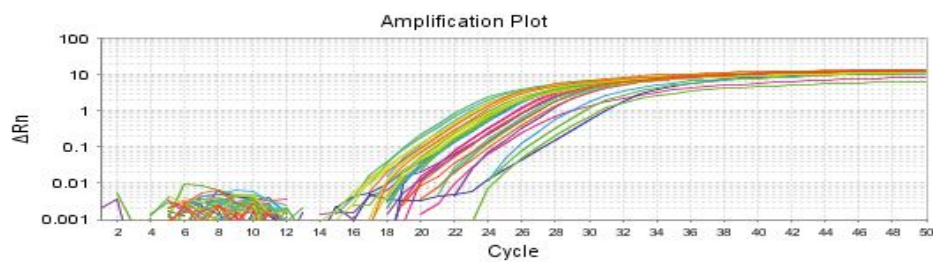
شکل 2-3: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن TGF-B



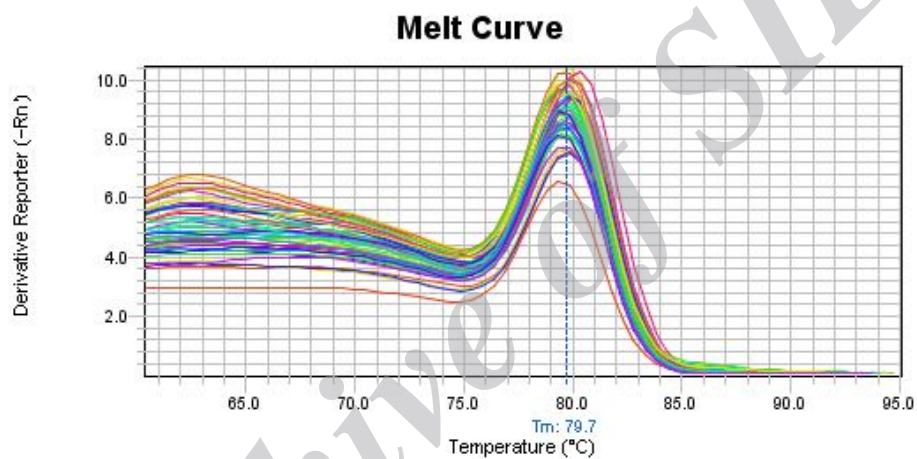
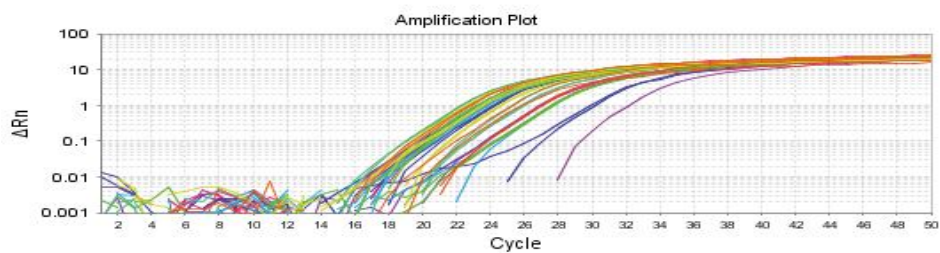
شکل 2-4: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن BMP-15



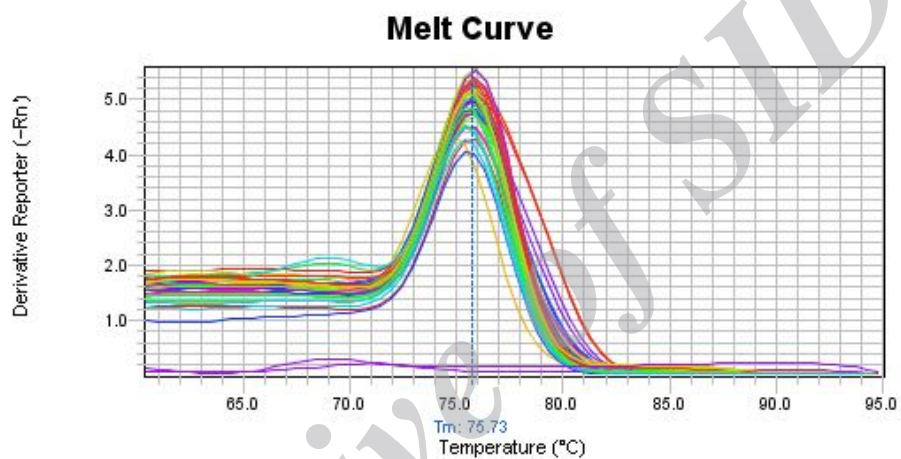
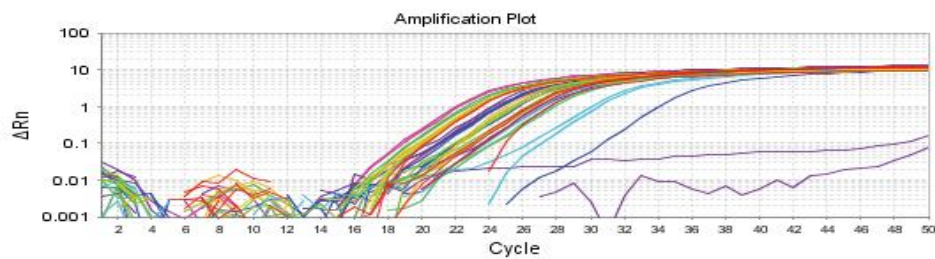
شکل 2-5: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن GDF-9



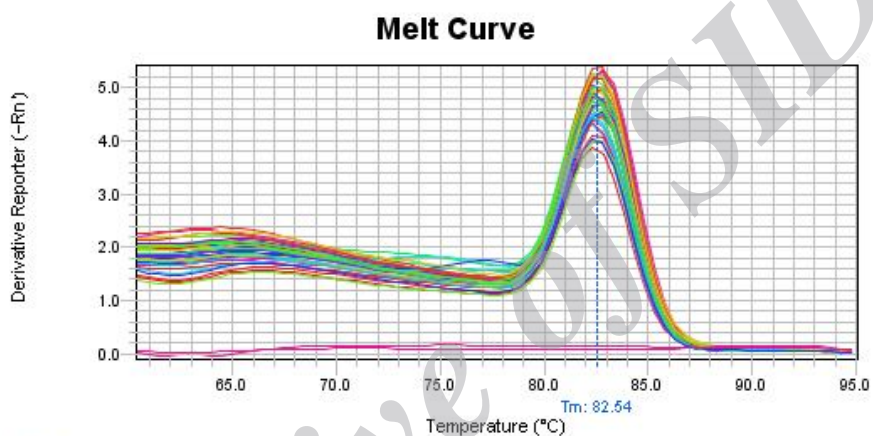
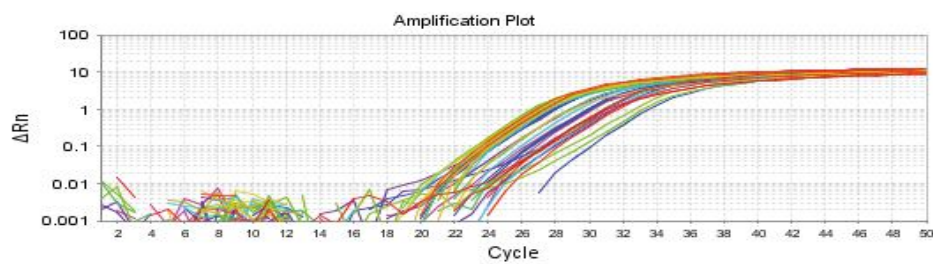
شکل 2-6: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن CD34



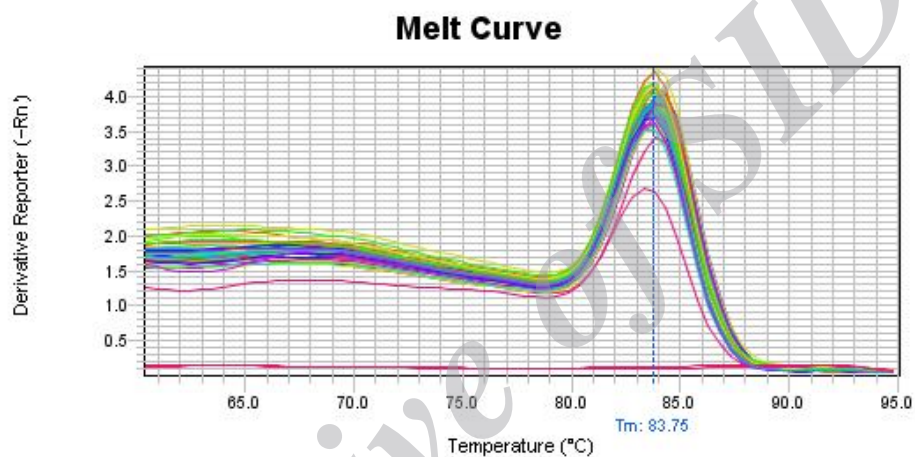
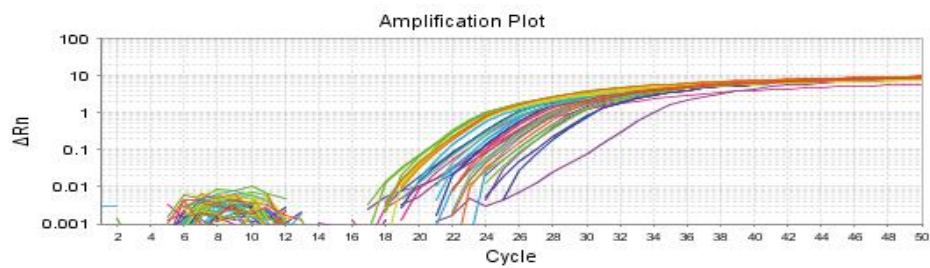
شکل 2-7: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن CD31



شکل 2-8: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن VEGF



شکل 2-9: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن BCL-2



شکل 2-10: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن BAX

فصل سوم

نتایج

فصل سوم نتایج

**3-1. انجماد شیشه ای تخمدان کامل موش صحرایی (مقایسه ترکیبات مختلف ضد یخ)
3-1-1. شمارش فولیکولهای سالم و مرده در گروه های کنترل، انجمادی و آزمون سمیت**

تعداد فولیکولهای بدوی سالم در تمامی گروههای انجمادی نسبت به گروه کنترل ($36/53\% \pm 0/03$) کاهش معنی دار نشان داد ($P < 0/05$). در بین گروههای انجمادی این تعداد در گروه V VI ($0/02 \pm$) 8/81% پائین ترین و در گروه V IV ($19/04\% \pm 0/03$) بالاترین میزان بود که اختلاف این دو گروه با یکدیگر به لحاظ آماری معنی دار بود ($P < 0/05$). اما تعداد فولیکولهای اولیه، پراآنترال و آنترال سالم در تمامی گروههای آزمایشی نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی دار نشان نداد (جدول 3-1).

در گروههای آزمون سمیت، اگر چه تفاوت معنی داری در تعداد فولیکولهای اولیه سالم در گروههای انجمادی با خودشان و نیز با گروه کنترل دیده نشد اما این میزان در سایر انواع فولیکولها بر خلاف گروههای انجمادی بود. به طوریکه در تعداد فولیکولهای بدوی سالم در دو گروه T IV ($15/58\% \pm 0/00$) و T VI ($22/67\% \pm 0/02$) نسبت به گروه کنترل ($36/53\% \pm 0/03$) کاهش معنی دار نشان داد ($P < 0/05$). همچنین تعداد فولیکولهای بدوی سالم در گروه T IV نسبت به چهار گروه T I ($27/77\% \pm 0/07$)، T II ($0/05 \pm$) 28/88%، T III ($28/92\% \pm 0/00$) و T V ($33/61\% \pm 0/00$) کاهش معنی دار داشت ($P < 0/05$). تعداد فولیکولهای بدوی سالم نیز در گروه T IV نسبت به گروه T V افزایش معنی دار داشت ($P < 0/05$) (جدول 3-2).

تعداد فولیکولهای پراآنترال سالم بین تمامی گروههای آزمون سمیت نسبت به خودشان تفاوت معنی دار نداشت ولی به طور کلی نسبت به گروه کنترل ($9/01\% \pm 0/00$) افزایش نشان دادند که این افزایش در دو گروه T III ($18/15\% \pm 0/01$) و T VI ($16/04\% \pm 0/00$) با گروه کنترل معنی دار بود ($P < 0/05$). همچنین تعداد فولیکولهای پراآنترال سالم در گروه T I ($8/16\% \pm 0/00$) نسبت به سه گروه T III ($0/01 \pm$) 18/15%، T IV ($15/43\% \pm 0/02$) و T VI ($16/04\% \pm 0/00$) کاهش معنی دار داشت ($P < 0/05$) (جدول 3-2).

تعداد فولیکولهای آنترال سالم نیز مانند فولیکولهای پراآنترال سالم در تمامی گروههای آزمون سمیت مشابه بوده ولی در دو گروه T I ($10/99\% \pm 0/02$) و T III ($11/62\% \pm 0/02$) نسبت به گروه کنترل ($0/02 \pm$) 19/86% کاهش آن معنی دار بود ($P < 0/05$) (جدول 3-2).

تعداد فولیکولهای مرده نیز در مراحل مختلف رشد فولیکولی و در تمامی گروههای انجمادی نسبت به گروه کنترل ($2/91\% \pm 0/001$) افزایش معنی دار داشت ($P < 0/05$)، بجز گروه V III ($4/47\% \pm 0/002$) که در تعداد فولیکولهای بدوی کمترین تعداد مرده را داشته و به لحاظ آماری با گروه کنترل تفاوتی نشان نداد. در بین گروههای انجمادی تعداد فولیکولهای بدوی مرده، در گروه V II ($11/67\% \pm 0/01$) نسبت به دو گروه V III ($4/47\% \pm 0/002$) و V IV ($7/46\% \pm 0/01$) افزایش و در گروه V III نسبت به سه گروه V IV،

V V (14/07% ± 0/02) و V VI (11/68% ± 0/02) و نیز در گروه V IV نسبت به گروه V V کاهش معنی دار نشان دادند (جدول 3-3).

در تعداد فولیکولهای مرده اولیه و پراآنترال بین گروههای انجمادی تفاوت معنی دار دیده نشد، اما تعداد فولیکولهای آنترال مرده در گروه V VI (9/73% ± 0/01) نسبت به دو گروه V V (5/81% ± 0/00) و II (5/95% ± 0/00) افزایش معنی دار نشان داد (جدول 3-3) (P<0/05).

تعداد فولیکولهای بدوی مرده در اکثر گروههای آزمون سمیت نسبت به گروه کنترل (2/91% ± 0/00) افزایش معنی دار داشت به غیر از دو گروه T IV (3/24% ± 0/00) و T VI (2/31% ± 0/00) که اختلاف معنی داری نسبت به گروه کنترل نشان ندادند (جدول 3-4) (P<0/05). بر این اساس تعداد فولیکولهای بدوی مرده در دو گروه T IV و T VI نسبت به سه گروه T I (7/30% ± 0/01)، T II (7/24% ± 0/01) و T III (6/94% ± 0/03) کاهش معنی دار نشان دادند، همچنین اختلاف در این تعداد بین دو گروه T V (2/31% ± 0/00) و T VI (4/99% (P<0/05) 0/00) (جدول 3-4) (P<0/05).

افزایش تعداد فولیکولهای اولیه مرده در تمامی گروههای آزمون سمیت با گروه کنترل (3/26% ± 0/600) معنی دار بود به غیر از گروه T V (4/23% ± 0/005) که با گروه کنترل اختلاف معنی داری نشان نداد. کمترین تعداد فولیکولهای اولیه مرده در بین گروههای آزمون سمیت به ترتیب مربوط به دو گروه T و T VI (6/94% ± 0/004) بود که این اختلاف در گروه T V با سه گروه T I (10/70% ± 0/03)، T II (0/02) و T IV (11/07% ± 0/01) (16/76% ± 0/01) و نیز اختلاف گروه T VI با گروه T IV معنی دار بود (جدول 3-4) (P<0/05).

تعداد فولیکولهای پراآنترال مرده در گروههای آزمون سمیت تقریباً مشابه گروه کنترل (1/49% ± 0/00) بود. این میزان در گروه T V (5/20% ± 0/00) بیشترین تعداد را شامل شد که نسبت به دو گروه کنترل و T I (2/47% ± 0/00) افزایش معنی دار نشان داد (جدول 3-4) (P<0/05).

تعداد فولیکولهای آنترال مرده نیز در گروههای آزمون سمیت تفاوت معنی داری با گروه کنترل (0/00) ر (2/70% نداشتند به غیر از گروه T III (1/01% ± 0/005) که کمترین تعداد فولیکولهای آنترال مرده را به خود اختصاص داد. این تعداد در گروه T III و T V (1/31% ± 0/004) به دو گروه T II (4/49% ± 0/03) و T VI (3/55% ± 0/008) کاهش معنی دار نشان دادند. همچنین فولیکولهای آنترال مرده در گروه T II نسبت به T I (1/85% ± 0/01) افزایش معنی دار داشت (جدول 3-4) (P<0/05).

جدول 3-1: درصد فولیکولهای سالم در گروههای کنترل و انجمادی

گروه	فولیکول	بدوی	اولیه	پر آنترال	آنترال
کنترل		^A 36/53 ± 0/03	24/20 ± 0/03	9/01 ± 0/00	19/86 ± 0/02
V I		^a 14/37 ± 0/02	21/83 ± 0/02	7/05 ± 0/02	17/10 ± 0/02
V II		^a 11/28 ± 0/01	19/37 ± 0/02	10/23 ± 0/01	21/63 ± 0/01
V III		^a 11/28 ± 0/04	19/03 ± 0/03	12/58 ± 0/01	18/75 ± 0/02
V IV		^{ab} 19/04 ± 0/03	21/26 ± 0/01	8/92 ± 0/01	17/02 ± 0/02
V V		^a 17/53 ± 0/02	18/35 ± 0/01	10/04 ± 0/00	14/87 ± 0/01
V VI		^{ab} 8/81 ± 0/02	17/55 ± 0/04	8/60 ± 0/00	21/39 ± 0/01

داده ها به صورت میانگین درصد ± میانگین خطای استاندارد (SEM) ارائه شده اند. گروه کنترل: تخمدان موش صحرائی دست نخورده 5 هفته ای، V I: گروه انجماد شیشه ای با ترکیب اتیلن گلایکول + دی متیل سولفوکساید، V II: گروه انجماد شیشه ای با ترکیب اتیلن گلایکول + پروپاندیول، V III: گروه انجماد شیشه ای با ترکیب دی متیل سولفوکساید + پروپاندیول، V IV: گروه انجماد شیشه ای با ترکیب اتیلن گلایکول + دی متیل سولفوکساید + 0/25 مول در لیتر سوکروز، V V: گروه انجماد شیشه ای با ترکیب اتیلن گلایکول + پروپاندیول + 0/25 مول در لیتر سوکروز، V VI: گروه انجماد شیشه ای با ترکیب دی متیل سولفوکساید + پروپاندیول + 0/25 مول در لیتر سوکروز. داده های دارای حروف انگلیسی بزرگ و کوچک مشابه (A با a، B با b و ...) در هر ستون با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند (P<0/05).



جدول 3-2: درصد فولیکولهای سالم در گروههای کنترل و آزمون سمیت

گروه	فولیکول	بدوی	اولیه	پرانترال	آنترال
کنترل		^A 36/53 ± 0/03	24/20 ± 0/03	^A 9/01 ± 0/00	^A 19/86 ± 0/02
T I		^c 27/77 ± 0/07	30/72 ± 0/05	^B 8/16 ± 0/00	^a 10/99 ± 0/02
T II		^c 28/88 ± 0/05	18/03 ± 0/02	10/46 ± 0/02	14/79 ± 0/03
T III		^c 28/92 ± 0/00	21/88 ± 0/001	^{ab} 18/15 ± 0/01	^a 11/62 ± 0/02
T IV		^{aC} 15/58 ± 0/00	26/32 ± 0/03	^b 15/43 ± 0/02	15/95 ± 0/02
T V		^{bc} 33/61 ± 0/00	19/94 ± 0/01	12/77 ± 0/00	17/90 ± 0/01
T VI		^{aB} 22/67 ± 0/02	21/75 ± 0/006	^{ab} 16/04 ± 0/00	22/23 ± 0/03

داده ها به صورت میانگین درصد ± میانگین خطای استاندارد (SEM) ارائه شده اند. گروه کنترل: تخمدان موش صحرائی دست نخورده 5 هفته ای، T I: گروه آزمون سمیت با ترکیب اتیلن گلایکول + دی متیل سولفوکساید، T II: گروه آزمون سمیت با ترکیب اتیلن گلایکول + پروپاندیول، T III: گروه آزمون سمیت با ترکیب دی متیل سولفوکساید + پروپاندیول، T IV: گروه آزمون سمیت با ترکیب اتیلن گلایکول + دی متیل سولفوکساید + 0/25 مول در لیتر سوکروز، T V: گروه آزمون سمیت با ترکیب اتیلن گلایکول + پروپاندیول + 0/25 مول در لیتر سوکروز، T VI: گروه آزمون سمیت با ترکیب دی متیل سولفوکساید + پروپاندیول + 0/25 مول در لیتر سوکروز. داده های دارای حروف انگلیسی بزرگ و کوچک مشابه (A با a، B با b و ...) در هر ستون با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند (P<0/05).

جدول 3-3: درصد فولیکولهای مرده در گروههای کنترل و انجمادی

فولیکول گروه	بدوی	اولیه	پرآنترال	آنترال
کنترل	$A_2/91 \pm 0/01$	$A_3/26 \pm 0/06$	$A_1/49 \pm 0/00$	$A_2/70 \pm 0/00$
V I	$a_9/36 \pm 0/02$	$a_{18}/0.6 \pm 0/03$	$a_5/79 \pm 0/00$	$a_6/40 \pm 0/00$
V II	$aB_{11}/67 \pm 0/01$	$a_{14}/49 \pm 0/01$	$a_5/34 \pm 0/01$	$aB_5/95 \pm 0/00$
V III	$bC_4/47 \pm 0/02$	$a_{17}/0.2 \pm 0/04$	$a_5/61 \pm 0/01$	$a_8/44 \pm 0/02$
V IV	$abcD_7/46 \pm 0/01$	$a_{14}/15 \pm 0/03$	$a_5/86 \pm 0/00$	$a_6/25 \pm 0/01$
V V	$acd_{14}/0.7 \pm 0/02$	$a_{14}/0.9 \pm 0/02$	$a_5/20 \pm 0/01$	$aC_5/81 \pm 0/00$
V VI	$ac_{11}/68 \pm 0/02$	$a_{16}/0.7 \pm 0/01$	$a_6/14 \pm 0/00$	$abc_9/73 \pm 0/01$

داده ها به صورت میانگین درصد \pm میانگین خطای استاندارد (SEM) ارائه شده اند. گروه کنترل: تخمدان موش صحرائی دست نخورده 5 هفته ای، V I: گروه انجماد شیشه ای با ترکیب اتیلن گلایکول + دی متیل سولفوکساید، V II: گروه انجماد شیشه ای با ترکیب اتیلن گلایکول + پروپاندیول، V III: گروه انجماد شیشه ای با ترکیب دی متیل سولفوکساید + پروپاندیول، V IV: گروه انجماد شیشه ای با ترکیب اتیلن گلایکول + دی متیل سولفوکساید + 0/25 مول در لیتر سوکروز، V V: گروه انجماد شیشه ای با ترکیب اتیلن گلایکول + پروپاندیول + 0/25 مول در لیتر سوکروز، V VI: گروه انجماد شیشه ای با ترکیب دی متیل سولفوکساید + پروپاندیول + 0/25 مول در لیتر سوکروز. داده های دارای حروف انگلیسی بزرگ و کوچک مشابه (A با a، B با b و ...) در هر ستون با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند ($P < 0/05$).

جدول 3-4: درصد فولیکولهای مرده در گروههای کنترل و آزمون سمیت

گروه	فولیکول	بدوی	اولیه	پرانترال	انترال
کنترل		$A_2/91 \pm 0/00$	$A_3/26 \pm 0/006$	$a_1/49 \pm 0/00$	$A_2/70 \pm 0/00$
T I		$abc_7/30 \pm 0/01$	$ab_10/70 \pm 0/03$	$a_2/47 \pm 0/00$	$D_1/85 \pm 0/01$
T II		$abc_7/24 \pm 0/01$	$ab_11/07 \pm 0/02$	$4/57 \pm 0/01$	$bcd_4/94 \pm 0/03$
T III		$abc_6/94 \pm 0/03$	$a_8/39 \pm 0/01$	$3/05 \pm 0/01$	$a^C_1/01 \pm 0/005$
T IV		$C_3/24 \pm 0/00$	$abc_16/76 \pm 0/01$	$4/28 \pm 0/002$	$2/40 \pm 0/002$
T V		$ab_4/99 \pm 0/00$	$B_4/23 \pm 0/005$	$A_5/20 \pm 0/00$	$B_1/31 \pm 0/004$
T VI		$B_2/31 \pm 0/00$	$a^C_6/94 \pm 0/004$	$4/47 \pm 0/01$	$bc_3/05 \pm 0/008$

داده ها به صورت میانگین درصد \pm میانگین خطای استاندارد (SEM) ارائه شده اند. گروه کنترل: تخمدان موش صحرایی دست نخورده 5 هفته ای، T I: گروه آزمون سمیت با ترکیب اتیلن گلیکول + دی متیل سولفوکساید، T II: گروه آزمون سمیت با ترکیب اتیلن گلیکول + پروپاندیول، T III: گروه آزمون سمیت با ترکیب دی متیل سولفوکساید + پروپاندیول، T IV: گروه آزمون سمیت با ترکیب اتیلن گلیکول + دی متیل سولفوکساید + 0/25 مول در لیتر سوکروز، T V: گروه آزمون سمیت با ترکیب اتیلن گلیکول + پروپاندیول + 0/25 مول در لیتر سوکروز، T VI: گروه آزمون سمیت با ترکیب دی متیل سولفوکساید + پروپاندیول + 0/25 مول در لیتر سوکروز. داده های دارای حروف انگلیسی بزرگ و کوچک مشابه (A با a، B با b و ...) در هر ستون با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند ($P < 0/05$).

3-1-2. شمارش فولیکولهای آپوپتوتیک در گروه های کنترل، انجمادی و آزمون سمیت

آزمون ایمونوهیستوشیمی برای ارزیابی میزان بیان پروتئین 3 Caspase و سنجش میزان وقوع مرگ سلولی برنامه ریزی شده فقط در گروههای انجمادی و کنترل صورت گرفت (شکل 3-1). پس از شمارش، مشخص گردید که تعداد فولیکولهای بدوی آپوپتوتیک در تمامی گروههای انجمادی نسبت به گروه کنترل $(2/13\% \pm 0/009)$ افزایش معنی دار داشته به غیر از گروه $V III$ $(3/70\% \pm 0/01)$ که کمترین میزان وقوع مرگ سلولی برنامه ریزی شده در این گروه مشاهده گردید. این میزان در گروه $V III$ نسبت به دو گروه $V I$ $(6/50\% \pm 0/02)$ و $V V$ $(7/43\% \pm 0/01)$ کاهش معنی دار نشان داد (جدول 3-5) $(P < 0/05)$.

فولیکولهای اولیه آپوپتوتیک در تمامی گروههای انجمادی نسبت به گروه کنترل $(2/92\% \pm 0/03)$ افزایش معنی دار نشان دادند. همچنین این تعداد در سه گروه $V I$ $(12/77\% \pm 0/05)$ ، $V III$ $(\pm 0/07)$ و $V IV$ $(11/23\% \pm 0/02)$ نسبت به گروههای $V II$ $(6/74\% \pm 0/02)$ ، $V V$ $(6/58\% \pm 0/02)$ و $V VI$ $(5/91\% \pm 0/001)$ افزایش معنی دار داشتند (جدول 3-5) $(P < 0/05)$.

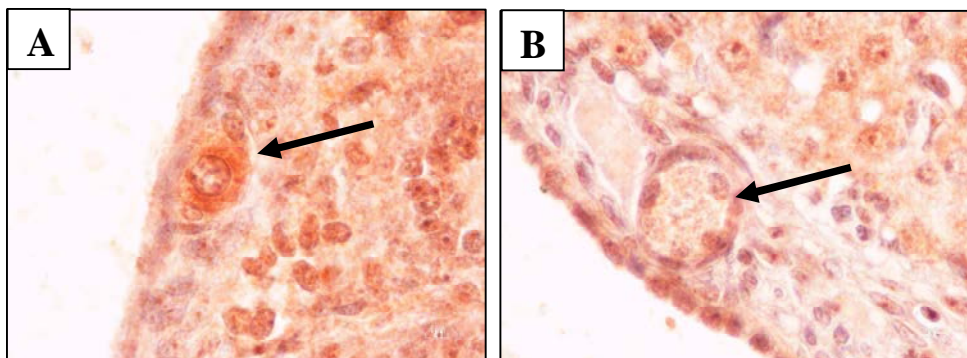
تعداد فولیکولهای پرآنترال آپوپتوتیک نیز در دو گروه $V I$ $(1/95\% \pm 0/003)$ و $V II$ $(2/81\% \pm 0/01)$ نزدیک به گروه کنترل $(1/28\% \pm 0/01)$ بوده و سایر گروههای انجمادی افزایش معنی دار با گروه کنترل داشتند. همچنین این میزان در سه گروه فوق با گروههای $V IV$ $(4/12\% \pm 0/02)$ ، $V V$ $(5/27\% \pm 0/01)$ و $V VI$ $(5/44\% \pm 0/02)$ اختلاف معنی دار نشان دادند (جدول 3-5) $(P < 0/05)$.

میزان افزایش در تعداد فولیکولهای آنترال آپوپتوتیک نیز به غیر از دو گروه $V I$ $(1/15\% \pm 0/03)$ و $V IV$ $(1/55\% \pm 0/02)$ در سایر گروههای انجمادی نسبت به گروه کنترل $(0/08\% \pm 0/02)$ معنی دار بود. همچنین این میزان در دو گروه انجمادی فوق نسبت به گروههای $V III$ $(2/99\% \pm 0/04)$ و $V VI$ $(0/07 \pm 3/97\%)$ اختلاف معنی دار نشان داد (جدول 3-5) $(P < 0/05)$.

جدول 3-5: درصد فولیکولهای آپوتوتیک در گروههای کنترل و انجمادی

فولیکول گروه	بدوی	اولیه	پرآنترال	آنترال
کنترل	$A_{2/13} \pm 0/009$	$A_{2/92} \pm 0/03$	$A_{1/28} \pm 0/01$	$A_{0/08} \pm 0/02$
V I	$ab_{6/50} \pm 0/02$	$aD_{12/77} \pm 0/05$	$B_{1/95} \pm 0/03$	$B_{1/15} \pm 0/03$
V II	$a_{5/70} \pm 0/01$	$abcd_{6/74} \pm 0/02$	$C_{2/81} \pm 0/01$	$a_{2/50} \pm 0/04$
V III	$B_{3/70} \pm 0/01$	$aB_{14/62} \pm 0/07$	$a_{3/97} \pm 0/01$	$abc_{2/99} \pm 0/04$
V IV	$a_{4/87} \pm 0/02$	$aC_{11/23} \pm 0/02$	$abc_{4/12} \pm 0/02$	$C_{1/55} \pm 0/02$
V V	$ab_{7/43} \pm 0/01$	$abcd_{6/58} \pm 0/02$	$abc_{5/27} \pm 0/01$	$a_{2/12} \pm 0/02$
V VI	$a_{4/58} \pm 0/002$	$abcd_{5/91} \pm 0/001$	$abc_{5/44} \pm 0/02$	$abc_{3/97} \pm 0/07$

داده ها به صورت میانگین درصد \pm میانگین خطای استاندارد (SEM) ارائه شده اند. گروه کنترل: تخمدان موش صحرائی دست نخورده 5 هفته ای، V I: گروه انجماد شیشه ای با ترکیب اتیلن گلیکول + دی متیل سولفوکساید، V II: گروه انجماد شیشه ای با ترکیب اتیلن گلیکول + پروپاندیول، V III: گروه انجماد شیشه ای با ترکیب دی متیل سولفوکساید + پروپاندیول، V IV: گروه انجماد شیشه ای با ترکیب اتیلن گلیکول + دی متیل سولفوکساید + 0/25 مول در لیتر سوکروز، V V: گروه انجماد شیشه ای با ترکیب اتیلن گلیکول + پروپاندیول + 0/25 مول در لیتر سوکروز، V VI: گروه انجماد شیشه ای با ترکیب دی متیل سولفوکساید + پروپاندیول + 0/25 مول در لیتر سوکروز. داده های دارای حروف انگلیسی بزرگ و کوچک مشابه (A با a، B با b و ...) در هر ستون با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند ($P < 0/05$).



شکل 3-1: ایمونوهیستوشیمی تخمدان موش صحرایی پس از انجماد شیشه ای با آنتی بادی علیه Caspase 3 جهت آشکار ساختن فولیکول های آپوپتوتیک (فلش). (A) فولیکول بدوی Caspase 3+ (B) فولیکول بدوی Caspase 3-.

3-1-3. بررسی بافت شناسی تخمدانهای موش صحرایی پس از انجماد شیشه ای (مقاطع نیمه نازک)¹

3-1-3-1. تخمدانهای غیر منجمد (گروه کنترل)

در مقطع نیمه نازک رنگ آمیزی شده تخمدان موش صحرایی 5 هفته ای با تالوئیدین بلو از گروه کنترل و با بزرگ نمایی 100X، انواع مختلف فولیکولها تا مرحله آنترال قابل مشاهده می باشند. در تخمدان موش صحرایی 5 هفته ای، به دلیل قرار گرفتن حیوان در شروع مرحله بلوغ، جسم زرد دیده نمی شود. در هر صورت بافت تخمدان را به لحاظ تجمعات فولیکولی و رنگ پذیری استروما به دو بخش متفاوت می توان تقسیم کرد:

1- منطقه قشری²: شامل بخشی از بافت تخمدان بوده که در فاصله بین اپیتلیوم سطحی و مرکز تخمدان قرار گرفته است. این منطقه از تراکم فولیکولی و سلول های استرومایی کمتری برخوردار بوده و به همین دلیل نسبت به نواحی دیگر روشن تر دیده می شود و وسعت آن بسته به همجواری بودن با فولیکولهای مراحل پیشرفته متفاوت می باشد (شکل 3-2-A). به عبارت دیگر وجود فولیکول رشد کرده، منجر به کاهش وسعت این ناحیه می گردد. فولیکول های بدوی و اولیه تنها در این قسمت از بافت تخمدان دیده می شوند و به سمت مرکز تخمدان پراکندگی شان کاهش می یابد. از دیگر ویژگی های این ناحیه، کاهش در تعداد مقاطع عروق خونی و نیز قطر آنها می باشد که تأییدی بر این نظریه است که فولیکولهای مراحل پایین تر وابستگی خونی کمتری داشته و رشد آنها به هورمونهای مترشحه در خون غیر وابسته است.

¹ Semi Thin

² Cortical Region

در بزرگنمایی بیشتر، سلولهای استرومایی در ناحیه قشری، چند شکلی دیده می شوند به طوری که که نمای خاصی برای هسته این سلولها نمی توان در نظر گرفت. در حاشیه عمقی این ناحیه خط مشخصی وجود دارد که از چند ردیف سلول دوکی شکل بوجود آمده است و توده های سلولی اطراف هر فولیکول پیشرفته را از منطقه قشری تخمدان جدا می کند. به عبارت دیگر این مرز، مشخص کننده حد خارجی و داخلی تخمدان بوده و فولیکولهای کوچک را از توده فولیکولهای بزرگ مجزا می کند (شکل A-2-3 و B).

در حاشیه خارجی ناحیه قشری (شکل A-2-3 و B)، اپیتلیومی متشکل از سلول های مکعبی و یا سنگفرشی قرار گرفته است که سلول های آن اکثراً هسته های گرد، بزرگ و یوکروماتین دارند. لایه اخیر اگر چه به طور کامل در مراحل پاساژ بافتی حفظ نشده، اما بر روی غشاء پایه ای ضخیم به خوبی قابل مشاهده است. تونیکا آلبوزینه که از چند ردیف سلول دوکی شکل و منظم تشکیل شده است در زیر اپیتلیوم سطحی تخمدان قرار گرفته و بلافاصله در زیر آن، عروق زیر کپسولی به صورت مقاطع متناوب در یک ردیف خودنمایی می کنند.

2- منطقه مرکزی¹: منطقه ای است پر سلول که به دلیل تجمع زیاد سلولها، رنگ پذیری شدیدتری نسبت به بخش قشری دارد. وسعت این ناحیه بسته به حضور فولیکولهای مراحل پیشرفته تر تغییر می کند. به نظر می رسد که این توده های سلولی در اطراف فولیکولی شروع به تشکیل می کنند که وارد چرخه رشد شده و هر چقدر فولیکول به مرحله بلوغ نزدیک تر می شود، وسعت این سلولها نیز افزایش می یابد. یعنی این بخشهای سلولی جزئی از یک فولیکول در حال رشد می باشند که البته از لایه های تکا جدا هستند. از دیگر ویژگی این قسمت از بافت تخمدان، جداسازی بخشهای مختلف آن توسط رگه هایی از بافت همبند است که همانند داربستی توده های سلولی را از یکدیگر مجزا می نماید (شکل B-2-3 و C). در تصویری سه بعدی و مجازی از این ساختار، می توان گفت که رگه های بافت همبند به صورت صفحاتی عمودی ستونهای سلولی را در بر گرفته و هر ستون سلولی محدوده مشخصی را به خود اختصاص داده است (شکل B-2-3 و C). وجود عروق خونی فراوان با اقطار مختلف در صفحات همبندی از خصوصیات بارز و مشخص ناحیه مرکزی می باشد. عروق خونی شاخه های متعدد و کوچکتر را در لابلاهی دستجات سلولی منشعب می سازند و خونرسانی را به شکل بسیار گسترده صورت می دهند. هر چه به مرکز توده و حاشیه فولیکول نزدیک می شویم، مقاطع عروقی افزایش یافته و قطرشان نیز کاهش می یابد به نحوی که در دیواره این مویرگها اکثراً تنها یک سلول اندوتلیالی قابل مشاهده می باشد (شکل C-2-3).

سیتوپلاسم سلولهای ناحیه مرکزی، حاوی قطرات لیپیدی فراوان بوده که به شدت تالوئیدین بلو رنگ گرفته اند. در نمایی بزرگتر، در هر توده سلولی، رگه های بسیار باریکتر از بافت همبند، سلولها را به صورت چند عددی از یکدیگر جدا می نماید (شکل A-2-3، B و C). این توده های سلولی توسط تکای خارجی که خود شامل چند لایه به هم فشرده از سلولهای دوکی شکل است، از فولیکول جدا می شوند (شکل A-2-3، B و C).

¹ Medullary Region

فولیکول های بدوی از یک لایه سلول فولیکولی سنگفرشی که تخمکی با هسته گرد و بزرگ (GV) را احاطه کرده، بوجود آمده است. این فولیکول ها در سطحی ترین ناحیه قشری تخمدان بوده و گاهاً توسط فولیکول های آنترال رشد یافته، از یکدیگر مجزا می گردند. رشد فولیکول آنترال در حال پیشرفت، برجستگی های متعددی را نیز بر روی سطح تخمدان بوجود می آورد (شکل 3-2-A).

هر فولیکول آنترال با سه لایه سلولی مشخص مشاهده می شود. تخمک بزرگ، گرد و یا بیضی شکل در مرکز فولیکول و در حالیکه توسط توده ای از سلولهای گرانولوزا در بر گرفته شده است، دیده می شود. هسته مرکزی گرد و یا بیضی شکل در مرکز تخمک، با هستک واضح و مشخص قرار گرفته و در یک فولیکول آنترال، کاملاً حالت یوکروماتین دارد. قطر هسته در حدود 20 تا 25 میکرومتر بوده و غشاء هسته در اکثر موارد صاف و یکنواخت است. در فولیکول آنترال اولیه، هسته به خوبی دیده شده و هستک کاملاً متراکم با قطر حدود 7 میکرومتر در مرکز آن نمایان است. گاهی غشاء هسته به صورت موج دیده می شود که شاید نشان دهنده شروع فرآیند شکسته شدن غشاء هسته تخمک (GVBD) و عبور از توقف اول تقسیم میوز باشد (شکل 3-2-D). سیتوپلاسم تخمک در مرحله فولیکول آنترال سرشار از ارگانل های سیتوپلاسمی بوده به طوریکه اکثر آنها در زیر غشاء تخمک تجمع یافته اند (شکل 3-2-D). به عبارت دیگر در فولیکولی که وارد مرحله آنترال شده است، ارگانلها از اطراف هسته به سمت محیط سیتوپلاسم تخمک حرکت می کنند، به نحوی که در سیتوپلاسم یک فولیکول آنترال ارگانلها را در دو دسته، اطراف هسته و یا زیر غشاء تخمک می توان دید و در این حالت حد واسط هسته تا غشاء پلاسمایی به دلیل کاهش در تعداد ارگانلها، روشن تر است (شکل 3-2-D). غشاء تخمک، صاف و به صورت خطی تیره درست زیر لایه زونا پلوسیدا قرار گرفته است.

اگر مقطع گرفته شده از تخمک فولیکول آنترال، از وسط آن گذشته باشد ضخامت زونا پلوسیدا در حدود 5 میکرومتر بوده که در فولیکول های آنترال پیشرفته تر ضخامت آن تا دو برابر افزایش می یابد. در بعضی از مناطق، زونا توسط زوائد سلولهای گرانولوزا و نیز میکروویلی های تخمک قطع می گردد. سطح داخلی زونا پلوسیدا به دلیل اتصال به غشاء تخمک کاملاً صاف بوده اما سطح خارجی آن به دلیل نفوذ زوائد سلولهای گرانولوزا¹ متخلخل و نامنظم است. این مسئله می تواند حاکی از سلامت تخمک و حمایت آن توسط سلولهای گرانولوزا باشد (شکل 3-2-D).

همچنین در فولیکول آنترال، سلولهای گرانولوزای اطراف تخمک، در چند ردیف سلولی قرار گرفته اند که هسته های یوکروماتین با هتروکروماتین پراکنده و غیر مارژینال در آنها دیده می شود. سلولهای متصل به تخمک در یک ردیف به صورت مکعبی و یا استوانه ای کوتاه قرار گرفته اند که معمولاً هسته گرد و یا بیضی شکل بزرگ در مرکز آن دیده می شود (شکل 3-2-D). در بلای سلولهایی که مستقیماً به تخمک اتصال دارند، سلولهای در حال تقسیم نیز دیده می شوند. پراکندگی کروموزومها در سیتوپلاسم حاکی از آن است که سلول در کدام مرحله از تقسیم میتوز قرار گرفته است (شکل 3-2-D). لایه سلولهای گرانولوزا در فولیکول آنترال تا 8 لایه سلولی هم می رسد. خارجی ترین ردیف سلولهای گرانولوزا، بر روی غشاء پایه ای متصل

¹ Spike of granulosa cells

هستند که به صورت خطی کاملاً شفاف در مرز بین سلولهای گرانولوزا و لایه تکای داخلی قرار گرفته است. سلولهای گرانولوزای محیطی، فشرده تر بوده و حالت اپیتلیوم استوانه ای مطابق را به خود می گیرند (شکل 3-B-2). این سلولهای استوانه ای بلند و یا کوتاه در فولیکولهای مراحل اولیه، زوائد خود را به سمت تخمک فرستاده و باعث آن می گردند که طول سلول گرانولوزا بیشتر به نظر آید.

سلولهای گرانولوزای مجاور، با قطعات متعددی از سیتوپلاسم¹ به یکدیگر متصل شده (شکل 3-D-2) و سلولهای حاشیه آنتروم که دچار مرگ سلولی شده اند، گاهاً هسته خود را از دست داده و فقط بقایای سیتوپلاسمی آنها بر جای مانده است. گاهی در بین سلولهای گرانولوزای فولیکولهای پراآنترال که سلولهای آنها از 2 یا 3 لایه تجاوز نمی کنند، فضاهایی دیده می شود که نباید آنها را با آنتروم اشتباه گرفت. به این فواصل بین سلولی "فضاهای وزیکولی"² می گویند.

در فولیکول های آنترال، سلولهای لایه تکای داخلی، به صورت پهن و موازی با غشاء تخمک در 3 تا 5 لایه سلولی به نحوی دیده می شوند که دو نوع سلول با ریخت شناسی متفاوت را می توان در آن تشخیص داد: 1- سلولهای 3 تا 4 لایه داخلی فاقد قطرات لیپیدی بوده و هسته های یوکروماتین با هتروکروماتین پراکنده دارند. 2- خارجی ترین سلولهای تکای داخلی کاملاً شکل سلولهای استرومایی را به خود گرفته و مانند آنها دارای قطرات لیپیدی فراوان هستند، این لایه در مقایسه با لایه داخلی تیره تر بوده و سلول های آن حجیم به نظر می رسند (شکل 3-B-2 و C). عروق خونی متعدد در لایه تکای داخلی و به صورت هم ردیف مشاهده می شوند به طوریکه بیشترین تعداد آنها نزدیک به لایه های خارجی تکای داخلی قرار گرفته اند (شکل 3-C-2). سلولهای تکای خارجی نیز به صورت لایه ای ضخیم از بافت فیبروز کم سلول در خارج لایه تکای داخلی و در ارتباط با استروما قرار گرفته است و عروق خونی بسیار کمی دارد، به طوریکه به ندرت مقطع رگ خونی در ارتباط نزدیک با سلولهای آن می توان یافت.

2-3-1-3. تخمدانهای آزمون سمیت (گروه های TI و TIV)

در مقطع نیمه نازک از گروه آزمون سمیت (EG + DMSO) TI، نمای کلی بافت نشان می دهد که تفاوت چندانی نسبت به گروه کنترل رخ نداده است. دو بخش اصلی بافت تخمدان (شفاف و گرانولر) به صورت کاملاً مجزا بوده و قابل تفکیک و ارزیابی می باشند (شکل 3-A-3). در اینجا نیز اپیتلیوم سطحی بر اثر فرآیند آماده سازی بافت جهت رنگ آمیزی از بین رفته و تونیکا آلبوژینه آخرین لایه های سلولی را ایجاد نموده است (شکل 3-A-3). عروق خونی زیر کپسولی مانند گروههای انجمادی به صورت متسع³ و با لومن گشاد دیده نمی شوند و به خصوص حالت کف آلودگی در پلاسمای رگ خونی نمود ندارد. توده سلولهای ناحیه گرانولر در استروما مانند گروه کنترل با رگه هایی از بافت همبند از یکدیگر جدا شده و به دلیل فراوانی گرانولهایشان، این

¹ Cytoplasmic bridges

² Vesicular Space

³ Dilated

قسمت از بافت شدیداً رنگ پذیر شده است (شکل 3-3-A). شاخه های عروق خونی همانند تخمدان های گروه کنترل در این ناحیه به خوبی پراکنده شده و تا نزدیکی فولیکول تعدادشان افزایش می یابد (شکل 3-3-C و D). در سیتوپلاسم سلولهای استرومایی این ناحیه، واکوئل ها به شدت کاهش یافته و به ندرت دیده می شوند.

فولیکولهای کوچک در سطح تخمدان، در ردیفهای منظمی به دنبال هم و اکثراً سالم و دست نخورده دیده می شوند (شکل 3-3-A). تونیکا آلبوزینه در اکثر نواحی منظم و یکپارچه بوده و در چند لایه از سلولهای دوکی شکل نمایان می باشد، اما در برخی نواحی نیز دچار آسیب و به هم ریختگی در ساختار شده است. تخمک در فولیکولهای آنترال به ندرت دچار چروکیدگی شده است و حالت دایره یا بیضی شکل خود را حفظ کرده اند (شکل 3-3-B). هسته گرد، بزرگ و یوکروماتین در سیتوپلاسم خود نمایی کرده و ارگانلهای سیتوپلاسمی نیز در دو جایگاه اطراف هسته و زیر غشاء تخمک قرار گرفته اند (شکل 3-3-B). غشاء تخمک نیز مانند یک خط شفاف و منظم مرز بین تخمک و زونا را مشخص کرده است (شکل 3-3-B). زونا پلوسیدا با ضخامت مناسب و سرشار از زوائد سلولی و میکروویلی های تخمک، دو سطح صاف داخلی و نامنظم خارجی را به خوبی نشان می دهد (شکل 3-3-B). سلولهای گرانولوزا بدون افزایش در شدت رنگ پذیری، اتصالات سیتوپلاسمی متعددی با یکدیگر ایجاد کرده اند (شکل 3-3-B).

لایه تکای داخلی و خارجی در اطراف فولیکولهای آنترال به وضوح و مستقل از محدوده فولیکولهای مجاور، مشخص بوده و حرکت سلولهای استرومایی برای قرار گیری در اطراف فولیکول های کوچک (اولیه و پرآنترال) به منظور تشکیل لایه تکای داخلی، کاملاً مشخص و بارز می باشد (شکل 3-3-C و D). در برخی نواحی از بافت تخمدان، در لابلای سلولهای تکای داخلی، فواصلی ایجاد شده که البته منجر به از هم گسیختگی در بافت نگردیده است (شکل 3-3-C و D). به عبارت دیگر فاصله گرفتن سلول ها در این نواحی گسترش زیادی ندارد. در بین سلولهای فولیکولهای کوچکتر به خصوص پرآنترال اولیه، فضاهای بین سلولی (فضای وزیکولار) به خوبی قابل مشاهده می باشد (شکل 3-3-C). گاهی در داخل بافت تخمدان، تعدادی فولیکولهای در حال آترزی دیده می شوند که البته این پدیده ناشی از چرخه رشد طبیعی فولیکول ها می باشد.

مقاطع نیمه نازک تخمدان گروه آزمون سمیت T IV (EG + DMSO + 0.25 mol/lit Sucrose)، نیز مانند گروه T I پس از رنگ آمیزی با تالوئیدین بلو، در زیر میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت. اپیتلیوم سطحی مانند گروه های قبل، در همه جا دیده نشده و به ندرت سلول های اپیتلیومی را می توان دید که گاهی از لایه زیرین خود جدا شده و واکوئلهای متعددی در سیتوپلاسمشان دیده می شود (شکل 3-4-A). تونیکا آلبوزینه در اکثر نواحی غیر منظم بوده به طوری که از استرومای زیرین خود قابل تفکیک نمی باشد (شکل 3-4-A). افزایش شدت رنگ پذیری در سلولهای تونیکا آلبوزینه و استروما دیده می شود، اگر چه این افزایش رنگ پذیری چندان مانند گروههای انجمادی (V I و V IV) شدید و همه گیر نمی باشد (شکل 3-4-C). عروق خونی زیر کپسولی اگر چه گاهی آسیب دیده اند، اما مانند گروههای انجمادی، گشاد نشده اند. عروق عمقی نیز تا حدودی بهتر از گروه های انجمادی حفظ شده اند و مشخصاً نمای کف آلود پلاسمای عروق

خونی گروه های منجمد را ندارند. البته برخی از عروق عمقی دچار چروکیدگی بیش از اندازه شده تا جائیکه دهانه رگ خونی در مقطع بافتی، بوسیله حرکت سلول اندوتلیال به داخل لومن بسته شده است (شکل 3-4-D). واکوئل در سیتوپلاسم سلول های استرومایی تا حدودی دیده می شود اما بسیار کمتر از میزان آنها در گروههای انجمادی بوده است (شکل 3-4-C). اثر ترکیبات ضد یخ در تخمدان های این گروه، منجر به فاصله گرفتن سلول های استروما و لایه های نزدیک به فولیکول از یکدیگر شده است. اگر چه شدت این وضعیت مانند گروه انجمادی نیست اما تفاوت مشخصی با گروه آزمون سمیت بدون سوکروز (T I) دارد (شکل 3-4-A, D).

برخی فولیکول های بدوی و اولیه در زیر اپیتلیوم سطحی، دچار آسیب شده اند که ایجاد واکوئل در سیتوپلاسم تخمک و یا سلول های گرانولوزا به خوبی در آنها دیده می شود (شکل 3-4-A). تعدادی دیگر از این نوع فولیکول ها دارای وضعیت طبیعی بوده و به صورت کاملاً سالم و دست نخورده قابل مشاهده می باشند. یک نمای جالب توجه از فولیکولهای کوچک در حال مرگ، این است که گاه در بین سلول های گرانولوزای فولیکول اولیه، تخمک قابل مشاهده نیست. می توان این مسئله را حاکی از آن دانست که تخمک در یک فولیکول در حال مرگ غیر مرکزی شده، به حاشیه فولیکول رفته و سپس از فولیکول به بیرون انداخته می شود (شکل 3-4-A).

تخمک در فولیکول آنترال طبیعی به ندرت دچار چروکیدگی مانند گروه انجمادی شده و دارای سیتوپلاسمی با دو ناحیه ارگانلی اطراف هسته ای و زیر غشائی است. زونا پلوسیدا وضعیت طبیعی خود را حفظ کرده، مگر در شرایطی که تخمک دچار مرگ سلولی شده باشد (شکل 3-4-B). شدت رنگ پذیری سلول های گرانولوزا و تکا تغییر محسوسی نداشته است اما شکل هسته ها تا حدودی دچار چند شکلی¹ شده اند (شکل 3-4-C, D). لایه های تکای داخلی و خارجی نیز بدون تغییر محسوسی، دیده می شوند.

در بین سلولهای گرانولوزای یک فولیکول آنترال طبیعی، گاهی چندین سلول پیکنوزه و در حال مرگ با کروماتین متراکم و واکوئل در سیتوپلاسم آن دیده می شوند (شکل 3-4-B). در این حالت یکی از نشانه های شروع روند آترزی شدن و یا مرگ فولیکول، جمع شدن زوائد سلولهای گرانولوزا و کاهش حمایت تخمک توسط این سلول هاست. با دقت بیشتر می توان این اثر را بر روی سطح خارجی زونا و صاف شدن آن مشاهده کرد.

3-3-1-3. تخمدانهای منجمد (گروه های V I و V IV):

در بررسی مقاطع نیمه نازک از بافت تخمدان منجمد گروه (EG + DMSO) V I، تغییراتی در یکپارچگی و یکنواختی بافت، اتصالات بین سلولی، میزان مرگ سلولی و ساختار عروق خونی نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. اپیتلیوم سطحی تخمدان به دلیل حساسیت بالای آن به مراحل پاساژ بافتی، در بیشتر

¹ Polymorphism

نواحی از بین رفته و قابل مشاهده نیست و لایه تونیکا آلبوژینه خارجی ترین سلولهای بافت تخمدان را شامل می شود. در بخشهای کوچکی از سطح تخمدان سلولهای اپیتلیوم سطحی به صورت پراکنده دیده شده که اتصال سلولهایش با لایه های زیرین، سست و نا پایدار شده است (شکل D-5-3). تونیکا آلبوژینه در برخی نواحی به صورت منظم، لایه بندی خود را حفظ کرده است، اگر چه اندکی حالت موجی شکل به خود نیز گرفته است (شکل D-5-3). در بافت های منجمد - ذوب شده، اکثر سلولها وضعیت هایپرکروماتیک پیدا می کنند. این مسئله به این دلیل است که فرآیند آب گیری و به دنبال آن کاهش دما منجر به متراکم شدن کروماتین در هسته شده و رنگ پذیری آن را افزایش می دهد (شکل A-D-5-3). در سایر نواحی، لایه آلبوژینه و سلولهای استرومایی زیر آن دچار به هم ریختگی و بی نظمی شده و اتصالات بین سلولی آنها سست شده است (شکل D-5-3).

عروق خونی زیر کپسولی که در زیر تونیکا آلبوژینه قرار دارند، گاه بدون آسیب باقی مانده و گاه کاملاً آسیب دیده و ساختار طبیعی خود را از دست داده اند (شکل D-5-3). به نظر می رسد که قطر این دسته از عروق خونی، در این گروه انجمادی نسبت به کنترل افزایش یافته است. عروق خونی عمقی تر آسیب بیشتری نسبت به عروق سطحی دیده اند. گاهاً سلولهای اندوتلیال از دیواره آنها جدا شده و بر خلاف عروق سطحی، گلبولهای قرمز طبیعی در آنها کمتر دیده می شود. پلاسمای عروق عمقی حالت کف آلود به خود گرفته و در اکثر موارد تمام فضای داخلی رگ را پر کرده است (شکل B-5-3).

در بین سلولهای استروما، گاهاً فواصل بین سلولی افزایش یافته و لایه های سلولی نیز از این آسیب مستثنی نبوده اند (شکل D-5-3). در سیتوپلاسم سلولهای استروما، واکوئل های بزرگی شکل گرفته است که محتویات آنها در رنگ آمیزی با تالوئیدین بلو به رنگ سبز کم رنگ در آمده است (شکل B-5-3).

اکثر فولیکولهای مراحل بدوی و اولیه (در سطح تخمدان) دچار آسیب شده اند، به این ترتیب که واکوئل در سیتوپلاسم تخمک ایجاد شده و سلولهای گرانولوزا از تخمک فاصله گرفته اند. هسته تخمک گاهاً دچار پیکنوز شده و مرگ سلولی در آن رخ داده است.

تخمک فولیکولهای آنترال گاهاً دچار چروکیدگی شده و گاه دست نخورده باقی مانده است (شکل 5-3-5-A). در اکثر موارد چروکیدگی در تخمک منجر به از دست دادن ارتباط آن با سلولهای گرانولوزا نشده و همچنان سطح خارجی زونا پلوسیدا دارای تخلخل خوب و پیوستگی مناسب با سلولهای گرانولوزاست (شکل 5-3-A). این تخلخل حاکی از آن است که زوائد سلولهای گرانولوزا همچنان از خارج به سمت تخمک حرکت کرده و تخمک به خوبی توسط سلولهای گرانولوزا حمایت می شود. در این وضعیت در ضخامت زونا پلوسیدا، زوائد سلولی و نیز میکروویلی های تخمک به خوبی نمایان هستند. غشاء هسته تخمک دچار چروکیدگی شدید شده و هتروکروماتین پراکنده در آن افزایش یافته است (شکل 5-3-C). پراکندگی ارگانلها در سیتوپلاسم مشهود بوده و می تواند ناشی از آسیب به اسکلت سلولی و عدم پایداری در ساختمان سیتوپلاسم باشد (شکل 5-3-A). علاوه بر هایپرکروماتیک شدن اکثر سلولهای بافت به خصوص سلولهای گرانولوزا در گروه انجمادی بدون سوکروز (V I)، هتروکروماتینی مارژینال و فشردگی سلولها نیز بیشتر شده است. غشاء

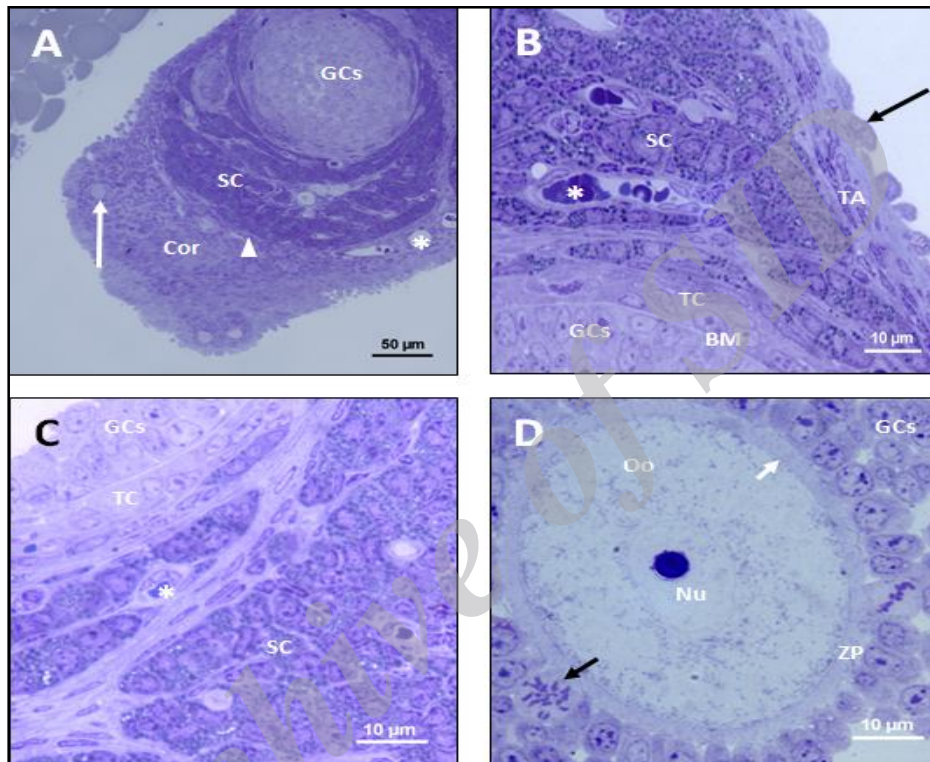
پایه سلولهای گرانولوزا تا حدود زیادی دست نخورده باقی مانده و همچنان به صورت خط ضخیم شفاف بین سلول های گرانولوزا و تکای داخلی خود نمایی می کند (شکل B, C-5-3). گاهی در سیتوپلاسم سلولهای گرانولوزا و تکای داخلی، واکوئل‌های کوچکی دیده می شود که چندان بافت را دچار تغییر شکل نساخته است، اگر چه تا حدودی افزایش فواصل بین سلولی در لایه های گرانولوزا و تکای داخلی نیز دیده می شود (شکل B-5-3). لایه تکای داخلی در این گروه (V I) کمترین آسیب را نسبت به لایه های سلولی دیگر، متحمل شده و در اکثر موارد پیوستگی لایه های سلولی در آن حفظ شده است. همچنین عروق خونی تکای داخلی نیز در بین سلولهای آن قابل مشاهده می باشند. تکای خارجی نیز متشکل از چند ردیف بافت همبند رشته ای با سلول های دوکی شکل، حدود خارجی فولیکول را احاطه کرده است (شکل B, C-5-3).

در بررسی مقاطع نیمه نازک تخمدانهای گروه V IV (EG + DMSO + 0.25 mol/lit Sucrose)، آسیب هایی به بخشهای مختلف بافت قابل مشاهده است. اگر چه اپیتلیوم سطحی تخمدان در اینجا نیز پس از فرآیند آماده سازی بافت به خوبی حفظ نشده، اما کمابیش در برخی نقاط سطح تخمدان، قابل مشاهده و ارزیابی می باشد (شکل A-6-3). در این گروه نیز مانند گروه فاقد سوکروز (V I)، اپیتلیوم سطحی دارای سلولهای مکعبی و یا سنگفرشی بوده و در برخی نقاط از روی لایه آلبوژینه به صورت ورقه ای جدا شده و در سیتوپلاسم اکثر سلولهای اپیتلیوم سطحی، واکوئل‌های متعددی دیده می شود (شکل A-6-3). تونیکا آلبوژینه در اکثر نواحی دچار بی نظمی و به هم ریختگی شده و فواصل بین سلولی آنها افزایش یافته است. در این گروه نکته قابل توجه، هایپرکروماتیکی شدید در سلولهای استرومایی بوده که نمای شدیداً رنگ پذیر به بخش قشری استروما داده است (شکل A, D-6-3). برخی از عروق خونی زیر کپسولی نیز به طور کلی آسیب دیده و شدت کف آلودگی عروق خونی در عمق نسبت به گروه V I بسیار بیشتر است، هر چند که عروق سطحی کمتر این شرایط را پیدا کرده اند (شکل A-6-3).

واکوئل‌های بزرگ و کوچک در سیتوپلاسم سلولهای استرومایی ایجاد شده و احتمالاً به دلیل خالی شدن آنها از ترکیبات لیپیدی، خیلی رنگ پذیر نبوده اند (شکل C, D-6-3). فولیکولهای بدوی نزدیک به سطح تخمدان گاهی دچار آسیب شدید شده که در مقایسه با آسیب به فولیکولهای اولیه و پرآنترال کوچک، کمتر است (شکل A-6-3). ایجاد واکوئل، جدا شدن سلولهای گرانولوزا از تخمک، چروکیدگی سیتوپلاسم تخمک و نیز غیر مرکزی شدن آن در فولیکول از نشانه های فولیکول در حال مرگ است. برخی از فولیکولها نیز کاملاً ساختار خود را از دست داده و دچار مرگ سلولی شده اند (شکل A-6-3).

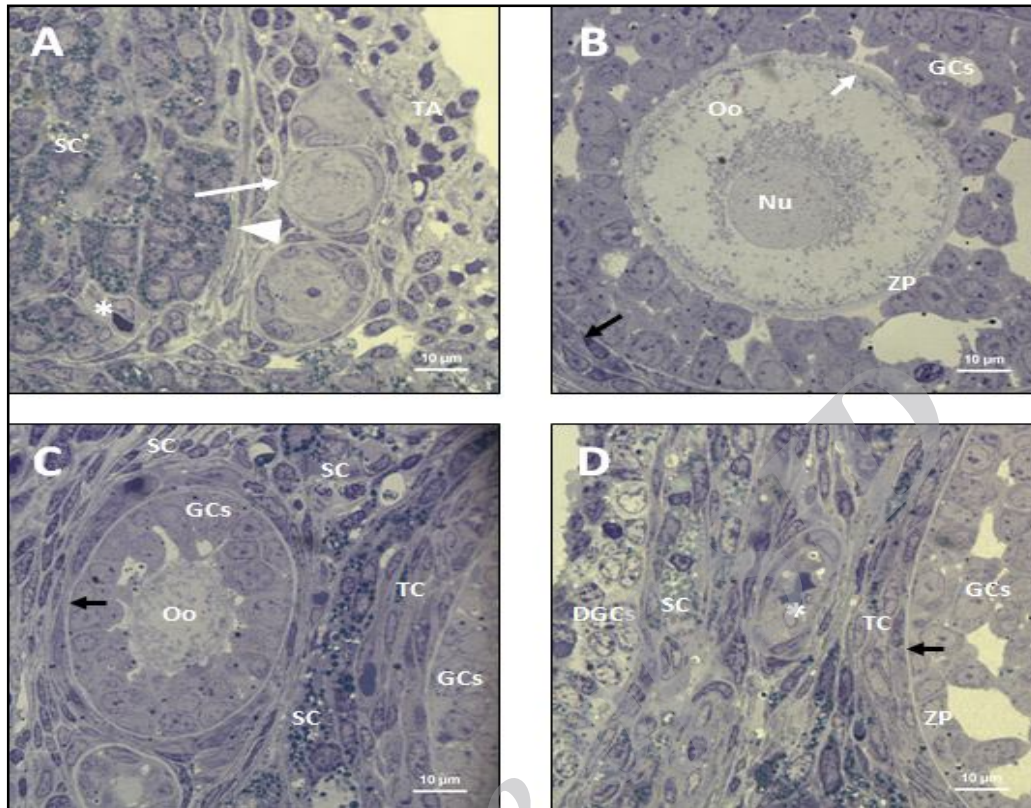
در فولیکول آنترال، اکثر تخمک ها دچار چروکیدگی شده اند که این چروکیدگی در برخی از تخمک ها منجر به از دست دادن ارتباطشان با سلولهای گرانولوزا شده است (شکل B-6-3). به این ترتیب که آسیب شدید به تخمک و آغاز روند مرگ سلولی در آن، باعث می شود که سلولهای گرانولوزا حمایت خود را از تخمک برداشته و زوائد خود را جمع می کنند. لذا در این حالت، سطح خارجی زوناپلوسیدا کاملاً صاف بوده و در ضخامت آن نیز به ندرت زوائد سلولی و میکروویلی های تخمک را می توان دید (شکل A-6-3). افزایش رنگ پذیری و هتروکروماتین مارژینال در سلولهای گرانولوزا و تکای داخلی نیز دیده شده و تشکیل واکوئل‌های

فراوان سیتوپلاسمی در لایه تکا بارز است (شکل 3-6-D, C). تکای خارجی همچنان دست نخورده ترین لایه فولیکولی را شامل می شود، اگر چه در برخی نواحی از لایه تکای داخلی فاصله گرفته است (شکل 3-6- C, D). غشاء پایه سلولهای گرانولوزا نیز کاملاً واضح و قابل مشاهده است. فقط در فولیکول آنترالی که دچار مرگ سلولی شده است، سلولهای گرانولوزا از غشاء فاصله گرفته و نمایی خالی از ارگانلهای سیتوپلاسمی را بوجود آورده است.



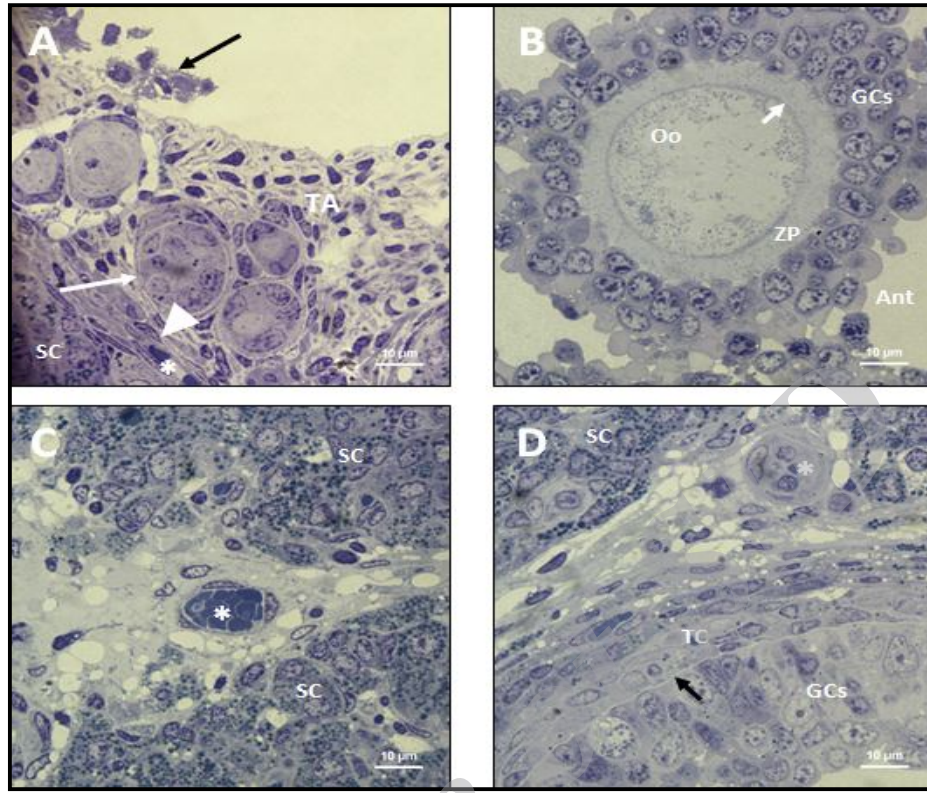
شکل 3-2: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه کنترل 5 هفته ای

- Oo: Oocyte
- GCs: Granulosa Cells
- SC: Stroma Cell
- TC: Theca Cell
- Cor: Cortex
- BM: Basement Membrane
- TA: Tunica Albuginea
- Nu: Nucleus
- Ns: Nucleolus
- ZP: Zona Pellucida
- *: Blood vessels
- Large White Arrow: Small Follicles
- Large Black Arrow: Surface Epithelium
- Small White Arrow: Oolema
- Small Black Arrow: Proliferative Granulosa Cells
- Arrow Head: Corticomedullary Junction



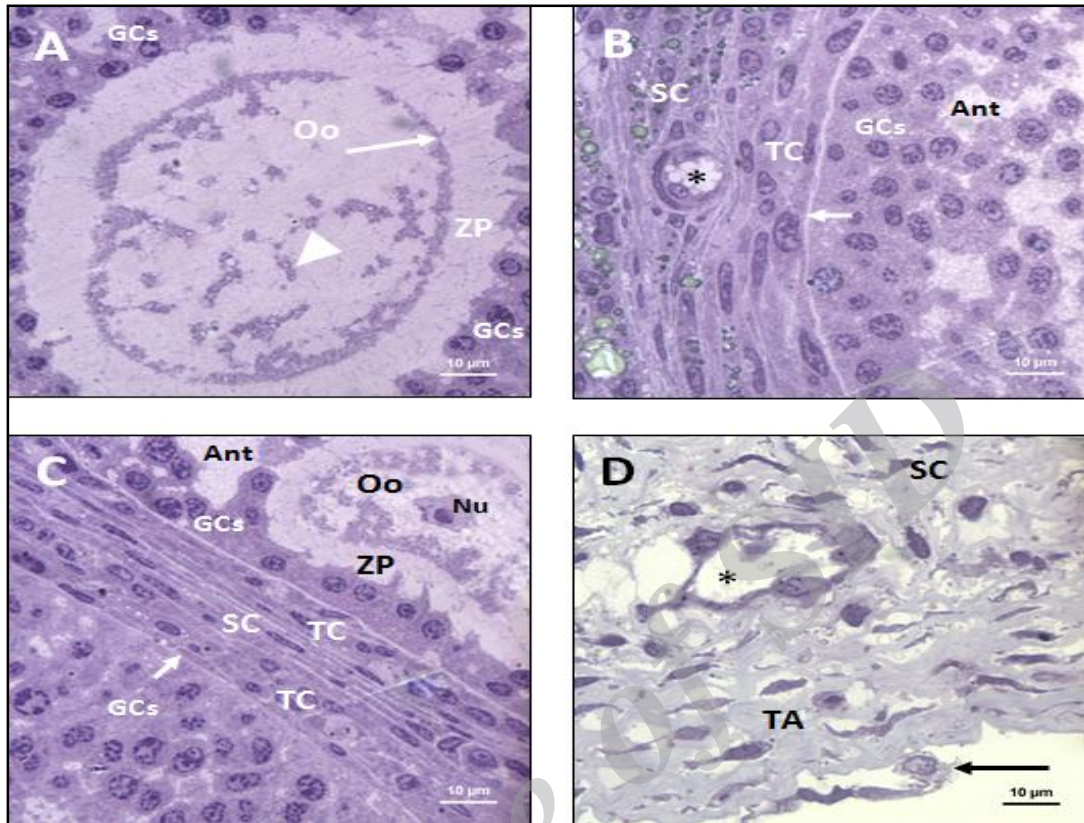
شکل 3-3: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه آزمون سمیت T I (EG + DMSO)

- Oo: Oocyte
- GCs: Granulosa Cells
- DGCs: Degenerated Granulosa Cells
- SC: Stroma Cell
- TC: Theca Cell
- TA: Tunica Albuginea
- Nu: Nucleus
- ZP: Zona Pellucida
- *: Blood vessels
- Large White Arrow: Small Follicles
- Small White Arrow: Oolema
- Small Black Arrow: Basement Membrane
- Arrow Head: Corticomedullary Junction



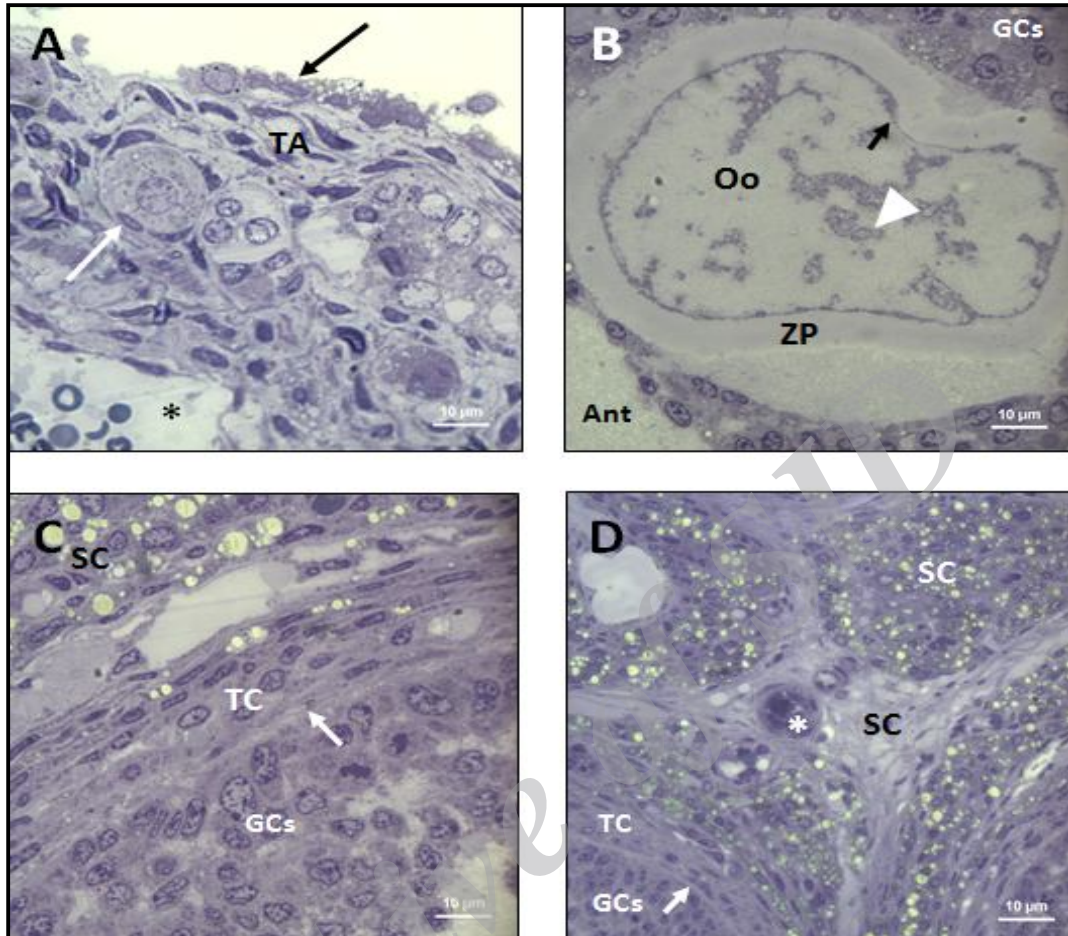
شکل 3-4: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه آزمون سمیت T IV (۰.۲۰ mol/lit) EG + DMSO + (Sucrose)

Oo: Oocyte
 GCs: Granulosa Cells
 SC: Stroma Cell
 TC: Theca Cell
 TA: Tunica Albuginea
 Nu: Nucleus
 ZP: Zona Pellucida
 *: Blood vessels
 Large White Arrow: Small Follicles
 Small White Arrow: Oolema
 Large Black Arrow: Surface Epithelium
 Small Black Arrow: Basement Membrane
 Arrow Head: Corticomedullary Junction



شکل 3-5: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه انجمادی V I (EG + DMSO)

- Oo: Oocyte
- GCs: Granulosa Cells
- SC: Stroma Cell
- TC: Theca Cell
- TA: Tunica Albuginea
- Nu: Nucleus
- ZP: Zona Pellucida
- *: Blood vessels
- Large White Arrow: Oolema
- Small White Arrow: Basement Membrane
- Large Black Arrow: Surface Epithelium
- Arrow Head: Diffuse Cytoplasmic Organelles



شکل 3-6: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه انجمادی IV (EG + DMSO + 0.25 mol/lit Sucrose)

- Oo: Oocyte
- GCs: Granulosa Cells
- SC: Stroma Cell
- TC: Theca Cell
- TA: Tunica Albuginea
- ZP: Zona Pellucida
- *: Blood vessels
- Large White Arrow: Small Follicles
- Small White Arrow: Basement Membrane
- Large Black Arrow: Surface Epithelium
- Small Black Arrow: Oolema
- Arrow Head: Diffuse Cytoplasmic Organelles

به دلیل اینکه ارزیابی موفقیت پیوند وابسته به حضور و یا عدم حضور فولیکول های بدوی در بافت پیوندی است، لذا در بررسی با میکروسکوپ الکترونی، تنها به مشاهده این نوع فولیکول و یا نهایتاً فولیکول اولیه اقدام گردید.

در بررسی مقاطع فوق نازک¹ (60 تا 70 نانومتری) از تخمدان های گروه کنترل که هیچ گونه تیماری بر روی آنها صورت نگرفته بود، یک فولیکول اولیه سالم، مورد ارزیابی قرار گرفت. در این نماها، تخمک فولیکول اولیه، سیتوپلاسمی روشن داشته که هسته گرد و یوکروماتین آن در مرکز سیتوپلاسم خودنمایی می کند. هستک در گوشه ای از نوکلئوپلاسم نمایان است و هتروکروماتین مارژینال و پراکنده بسیار کوچک در آن دیده می شود. غشاء هسته تخمک دارای محدوده واضح بوده و دو لایه آن توسط منافذ هسته² به یکدیگر وصل شده اند (شکل 3-7-A, B, C, D). سیتوپلاسم تخمک در وسعت کمی به صورت یک نوار محیطی و شفاف، هسته را احاطه کرده و ارگانل های آن در سیتوپلاسم پراکنده شده اند، اگر چه به نظر می رسد تعداد ارگانل ها در اطراف هسته بیشتر از نواحی کناری سیتوپلاسم است (شکل 3-7-A, B, C). میتوکندری ها در تخمک اولیه، به شکل فاقد کریستا و یا با کریستهای کم دیده می شوند، که البته عدم دیده شدن کریستها می تواند ناشی از قطع خوردن میتوکندری از ناحیه ای باشد که کریستا در آن وجود ندارد (شکل 3-7-C). میتوکندری تخمک اولیه به شکل دایره ای بوده از نشانه های آن ها در تخمک نابالغ، کنار کشیده شدن کریستها می باشد. دستگاه گلژی نیز حجیم شده و در کنار هسته و چندین ناحیه سیتوپلاسم دیده می شود (شکل 3-7-C). در میان ارگانل های سیتوپلاسمی، اجسام وزیکولی (MVB)³ نیز دیده می شوند که گاهاً به صورت مجتمع سازمان یافته خودنمایی می کنند (شکل 3-7-B).

غشاء پلاسمایی تخمک در بزرگنمایی پایین، صاف و بدون چین خوردگی دیده می شود (شکل 3-7-A). اما در بزرگنمایی بالاتر، کاملاً چین خورده است (شکل 3-7-B). این غشاء به سلول های گرانولوزای اطراف کاملاً اتصال داشته و ارتباط نزدیکی با آن ها برقرار کرده است. اگر چه فولیکول اولیه فاقد زونا پلوسیدا است، اما میکروویلی های تخمک در تعداد زیاد بین غشاء تخمک و غشاء سلول های گرانولوزا به خوبی دیده می شوند. غشاء پلاسمایی سلولهای گرانولوزا نیز به صورت برآمدگی و زوائدی به غشاء تخمک رسیده و اتصال شکاف دار ایجاد کرده اند (شکل 3-7-B). دو لایه غشاء تخمک و سلول گرانولوزا به خوبی در تصویر 1-C دیده می شود که به صورت کاملاً دست نخورده و شفاف در کنار یکدیگر قرار گرفته اند. از دیگر عناصر قابل مشاهده در سیتوپلاسم تخمک شبکه اندوپلاسمیک صاف و خشن⁴ (RER, SER) است که به صورت پراکنده وجود دارند (شکل 3-7-C).

سلول های گرانولوزای فولیکول اولیه به صورت مکعبی بوده و در اطراف تخمک قرار گرفته اند (شکل 3-7-A). هسته این سلول ها نمایی خاص دارند که مختص مرحله فولیکول اولیه است به این ترتیب که گوشه ای از هسته تمامی سلول های گرانولوزای مکعبی فرو رفته و تبادلات مواد بین هسته و سیتوپلاسم در این نواحی به خوبی مشهود است (شکل 3-7-A, B, G). سیتوپلاسم این سلول ها دارای ارگانل های فراوان بوده

¹ Ultra Thin

² Nuclear Pores

³ Multi Vesicular Body (MVB)

⁴ Rough and Smooth Endoplasmic Reticulum (RER and SER)

و شبکه اندوپلاسمیک صاف، میتوکندری لوله ای و دستگاه گلژی تکامل یافته، در آن ها بارز است (شکل E, F-7-3).

سلول های استرومایی در حال استقرار در اطراف فولیکول اولیه قدری سازمان یافته به نظر می رسند (شکل G-7-3). این سلول ها ظاهری کشیده داشته و هسته ای دوکی شکل با هتروکروماتین مارژینال شدید در آن ها دیده می شود (شکل G-7-3). سیتوپلاسم این سلول ها سرشار از ارگانل بوده و به دلیل پر شدن اکثر فضا توسط هسته، سیتوپلاسم به صورت نوار بسیار باریکی دیده می شود. فضای بین سلول های گرانولوزا و این سلول های استرومایی را میکروویلی های متعلق به این دو رده سلول اشغال کرده است (شکل H-7-3). از آنجائیکه فولیکول های مراحل پیشرفته در ساعات اولیه پیوند و به دلیل عدم خون رسانی به بافت از بین می روند، فولیکول های بدوی و اولیه (فولیکول های مراحل ابتدایی رشد) به دلیل عدم فعالیت فیزیولوژیک بالا، کم بودن تعداد سلول ها و نیز کوچک بودنشان، نسبت به شرایط سخت و آسیب رسان مقاوم تر می باشند. لذا در مرحله پیوند، فولیکول های کوچکتر از اهمیت بالایی برخوردار می شوند. بر اساس موارد فوق و بنابر شمارش فولیکول های مرده و سالم طی رنگ آمیزی H & E، دو گروه انجمادی V I و V IV در حفظ فولیکول های بدوی و اولیه موفق تر از سایر ترکیبات ضد یخ نشان دادند. به همین دلیل به نظر می رسد که این دو گروه انجمادی در مرحله پیوند نیز جوابگوی نیازهای پروژه حاضر باشند. بنابراین برای بررسی فراساختار بافت نیز دو گروه انجمادی فوق به همراه گروه های آزمون سمیت مربوطه (T I و T IV) انتخاب شدند. پس از بررسی فراساختار تخمدان های حاصل از دو گروه انجمادی V I و V IV، تفاوت چندانی در تغییرات ایجاد شده ناشی از انجماد در آن ها مشاهده نگردید، لذا انتخاب ترکیب ضدیخ مناسب برای انجماد تخمدان های مرحله پیوند، بر اساس بررسی H & E صورت گرفت که در این بین گروه انجمادی V IV با ترکیب EG + DMSO + 0/25 مول در لیتر سوکروز انتخاب گردید.

2-4-1-3. گروه آزمون سمیت T I (EG + DMSO)

در گروه آزمون سمیت T I (گروه بدون سوکروز)، مقاطع فوق نازک از بافت تخمدان حاوی یک فولیکول بدوی است که تخمک آن توسط دو سلول گرانولوزا احاطه شده است (شکل E, F, G-8-3). در نمای کلی از این فولیکول که توسط سلول های استرومایی در بر گرفته شده است، میزان آسیب وارده به بافت تخمدان تا حدودی قابل پیش بینی می باشد. شدت آسیب وارده در نتیجه اثر ضد یخ ها، کمتر از گروه های انجمادی بوده، اگر چه تا حدودی جدا شدن سلول ها در برخی نواحی استروما را می توان دید (شکل A-8-3).

هسته گرد و بزرگ تخمک در مرکز سیتوپلاسم مشاهده می شود که نسبت به گروه کنترل مقدار کمی تیره تر شده است (شکل A-8-3). هتروکروماتینی در تمامی نواحی هسته پراکنده و یکنواخت است. غشاء هسته اگر چه تا حدودی چروکیده شده، اما منافذ هسته خود را در نواحی بسیاری حفظ کرده است و تعداد آن ها تقریباً با گروه کنترل برابری می کند (شکل B, C-8-3). ارگانل ها به تعداد قابل توجه و در سراسر سیتوپلاسم، پراکنده می باشند. دستگاه گلژی بزرگ و غیر متورم که نزدیک تر به هسته قرار داشته و

میتوکندری های دایره ای شکل با کریستاهای طبقه ای که در گوشه ها تجمع یافته اند، در سراسر سیتوپلاسم پراکنده اند (شکل C, D-8-3). برخی از میتوکندری ها دچار تورم شده و کریستاهای خود را از دست داده اند و یا به تعداد بسیار کمی در یک سمت میتوکندری قرار گرفته اند. از جمله عناصر قابل توجه در سیتوپلاسم تخمک، حضور اجسام متراکم در زیر غشاء تخمک می باشد که به احتمال زیاد ساختار گرانول های قشری را دارند، علاوه بر آن ها اجسام متراکم (DB^1) و اجسام تیغه ای دیگری نیز در سیتوپلاسم تخمک دیده می شود (شکل C, D-8-3). غشاء تخمک کاملاً دست نخورده و در کنار غشاء سلول های گرانولوزا قرار گرفته و دو لایه هر دو غشاء و نیز اتصالات بین آن ها به خوبی قابل مشاهده هستند. میکروویلی های فراوان و با ضخامت مناسب در بین سلول های گرانولوزا و تخمک دیده شده که جهت گیری های متفاوتی دارند (شکل B, C, D-8-3).

سلول های گرانولوزا به صورت پهن و کشیده اطراف تخمک را به نحوی احاطه کرده اند که زوائد سیتوپلاسمی آن ها از دو طرف تخمک را در بر گرفته و با زائده سلول گرانولوزای دیگر تماس پیدا کرده است (شکل A, B, F-8-3). افزایش دانسیته کروماتین گرانولوزا نیز کاملاً مشهود است، اگر چه به اندازه گروه های انجمادی نیست (شکل B, G-8-3). میتوکندری های سلول های گرانولوزا، میله ای بوده و کریستاهای طبقه ای طوری قرار گرفته اند که از یک سمت شروع شده و گاهاً به سمت دیگر میتوکندری نمی رسند (شکل G-8-3). غشاء پایه سلول های گرانولوزا به طور پیوسته در اطراف سلول مشخص بوده و همچنان به صورت خط شغافی نمایان می باشد. در برخی مناطق بین سلول های گرانولوزا و سلول های استرومایی فاصله افتاده است. در نواحی دیگر که ارتباط نزدیک بین سلول های گرانولوزا و استروما وجود دارد، میکروویلی مابین دو سلول به میزان زیاد دیده می شود (شکل H-8-3).

3-4-1-3. گروه آزمون سمیت T IV (EG + DMSO + 0.25 mol/lit Sucrose)

در مقاطع فوق نازک از گروه آزمون سمیت با سوکروز (T IV)، فولیکول بدوی مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل A-9-3). تخمک فولیکول بدوی دچار چروکیدگی شدیدتری نسبت به گروه آزمون سمیت بدون سوکروز (T I) شده و همچنین افزایش الکترون دانسیته در هسته تخمک از گروه T I بیشتر شده است. در گوشه ای از هسته نیز هستکی با ظاهری چروکیده به چشم می خورد (شکل A-9-3). غشاء هسته اگر چه دو لایه خود را حفظ کرده است اما تعداد منافذ هسته در آن کاهش یافته و در برخی نواحی در لایه خارجی نیز گسیختگی ایجاد شده است (شکل B, C-9-3). سیتوپلاسم حاوی ارگانل های زیادی بوده اما میتوکندری خالی از کریستا در آن افزایش یافته است. همچنین دستگاه گلژی وسعت یافته در برخی نواحی سیتوپلاسم دیده می شود (شکل B, C-9-3). در سیتوپلاسم، میتوکندری دایره ای با کریستاهای متمرکز در وسط و دانسیته بالاتر نسبت به سایر میتوکندریها و اجسام تیغه ای و وزیکولار در حال شکل گیری قابل مشاهده می باشند (شکل D, E-9-3). در این گروه نیز مانند گروه T I برخی از میتوکندری ها که تعدادشان نسبتاً زیاد

¹ Dens Body

بوده و نسبت به گروه سمیت بدون سوکروز بارزتر می باشند، متورم شده و کریستاهای کمشان در گوشه ای از میتوکندری متمرکز شده اند. غشاء تخمک بدون فاصله گرفتن از سلول های گرانولوزا و به صورت کاملاً یک دست دیده شده، در حالیکه میکروویلی های با ضخامت مختلف از خود بروز داده است (شکل G-9-3, C). سیتوپلاسم سلول های گرانولوزا گاهاً دستخوش تشکیل واکوئل شده اما در احاطه کردن تخمک خللی ایجاد نشده است (شکل A-9-3). این سلول ها با یکدیگر و تخمک ارتباط نزدیکی برقرار کرده، فقط در مناطقی که مقاطع میکروویلی ها قابل رؤیت می باشد، دو غشاء قدری از یکدیگر فاصله می گیرند (شکل 3-C). سیتوپلاسم سلول های گرانولوزا مانند گروه T I دارای میتوکندری های کشیده و لوله ای شکل بوده که کریستاهای منظم و عرضی در آن به خوبی قابل مشاهده می باشند (شکل H-9-3). بر خلاف تمامی گروه های آزمایشی و گروه کنترل در سیتوپلاسم سلول های گرانولوزای این گروه، اجسام متراکم و کوچکی دیده می شوند که به طور یکنواخت سرتاسر سیتوپلاسم را پوشانده اند. همچنین دستگاه گلژی با کمی تورم در لایه های عملکردی خود و RER واضح نیز در سیتوپلاسم به چشم می خورد (شکل G-9-3). اتصالات سلول های گرانولوزا با یکدیگر به خوبی حفظ شده و سلول ها از قاعده بر روی غشاء پایه ای ضخیم قرار گرفته اند (شکل G-9-3).

هسته سلول های گرانولوزا و استروما، رنگ پذیری شدید را نشان داده و هتروکروماتینی مارژینال در آن ها افزایش یافته است. همچنین غشاء این دو سلول شدیداً چین خورده و حتی لایه خارجی آن در هر دو سلول به خصوص استروما، حالت دندانمانند ای شکل به خود گرفته است (شکل H-9-3). سلول های استرومایی دور تر از فولیکول، نیز دستخوش آسیب قرار گرفته اند و نسبت به گروه های دیگر، مرگ سلولی در آن ها افزایش نشان می دهد (شکل A-9-3).

4-4-1-3. گروه انجمادی (EG + DMSO) V I

در نمای کلی از مقاطع فوق نازک از گروه انجمادی بدون سوکروز نیز فولیکول اولیه مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل A-10-3). همانطور که در بخش بررسی قطعات نیمه نازک گفته شد، اثرات ضد یخ ها و کاهش دما، منجر به هایپرکروماتیک شدن هسته اکثر سلول ها می شود. در اینجا نیز هسته تخمک اولیه و به خصوص برخی از سلول های گرانولوزا نسبت به گروه کنترل الکترون دندسته¹ بیشتری را نشان می دهند (شکل A, B-10-3). هتروکروماتینی مارژینال نسبت به گروه کنترل در تخمک افزایش یافته است که البته می تواند ناشی از افزایش شدت رنگ پذیری باشد. سیتوپلاسم تخمک وسعت کمتری دارد و در بزرگنمایی بیشتر، تمرکز ارگانل ها را در اطراف هسته می توان دید. در این حالت زیر غشاء تخمک و یا نواحی محیطی سیتوپلاسم تخمک، روشن تر از اطراف هسته آن است (شکل C-10-3). غشاء هسته، دو لایه خود را به خوبی حفظ کرده و فاصله مناسب بین آن ها وجود دارد. منافذ هسته اگر چه در بزرگنمایی بالا و در طول دو لایه به

¹ Electron Density

خوبی دیده می شوند، اما نسبت به گروه های کنترل و سمیت تعدادشان کاهش یافته، به صورت نامنظم توزیع شده و در برخی از منافذ نیز بخش خارجی آن آسیب دیده و یا حذف گردیده است (شکل C, D-10-3). در سیتوپلاسم تخمک، میتوکندری هایی با کریستاهای طبقه ای¹ و کاملاً تیره افزایش یافته اند که به دلیل عدم وجودشان در گروه های سمیت، می تواند ناشی از کاهش دما باشد (شکل C, D-10-3). افزایش MVB و اجسام تیغه ای (LB²) نیز در سیتوپلاسم مشهود است (شکل C, D-10-3). غشاء تخمک، حالت چین دار پیدا کرده است اما در طول خود به خوبی ارتباط را با سلول های گرانولوزا حفظ کرده است (شکل 3-10-A, B, F). اگر چه میکروویلی های تخمک در طول غشاء کاهش یافته و در برخی نواحی به صورت پراکنده دیده می شود، اما اتصالات شکاف دار بین تخمک و سلول های گرانولوزا به خوبی حفظ شده و قابل مشاهده می باشند (شکل E, F-10-3).

سلول های گرانولوزا به صورت کاملاً فشرده در کنار یکدیگر قرار داشته و در برخی نواحی اتصالات بین آن ها به خوبی قابل مشاهده است. اگر چه گاهی نیز غشاء دو سلول گرانولوزا از یکدیگر فاصله گرفته اند (شکل E-10-3). در لابلای سلول های گرانولوزا، سلول های ماکروفاژی چند هسته ای نیز قابل مشاهده می باشند (شکل A-10-3). سیتوپلاسم سلول های گرانولوزا دارای ارگانل های زیادی بوده، میتوکندری های دایره ای و قطرات لیپیدی بزرگ در آن ها بارز هستند (شکل E, F, G-10-3). در سیتوپلاسم سلول گرانولوزا بر خلاف تخمک، دستگاه گلژی پیشرفته دیده نمی شود. غشاء خارجی هسته در سلول های گرانولوزای مکعبی، حالت کاملاً چین دار پیدا کرده و در مناطقی که هسته به داخل سلول فرو رفته است، فاصله بین دو غشاء برای تبادل مواد با سیتوزول، افزایش یافته است (شکل A, B, G, H-10-3). غشاء پایه فولیکول به صورت خطی کاملاً واضح بین گرانولوزا و سلول های استروما که به صورت دوکی شکل در اطراف در حال آرایش هستند، قرار گرفته است (شکل H-10-3).

3-4-1-5. گروه انجمادی V IV (EG + DMSO + 0.25 mol/lit)

در مقاطع بسیار نازک از گروه انجمادی با سوکروز (V IV)، یک فولیکول اولیه که در حال افزایش سلول های گرانولوزای خود بوده، مورد ارزیابی قرار گرفته است (شکل A-11-3). هسته تخمک در این مقطع قابل مشاهده نبوده و ارگانل ها در مرکز سیتوپلاسم به نحوی تجمع پیدا کرده اند که سیتوپلاسم را به دو منطقه روشن (محیطی) و تیره (مرکزی) تقسیم نموده است (شکل A-11-3). در این تجمعات ارگانلی اثری از میتوکندری و دستگاه گلژی طبیعی وجود نداشته و اکثر ارگانل ها دچار آسیب ساختاری شده اند. در عوض افزایش اجسام تیغه ای (LB) و یا اجسام مالتی و زیکولار (MVB) افزایش قابل توجه یافته است (شکل B,

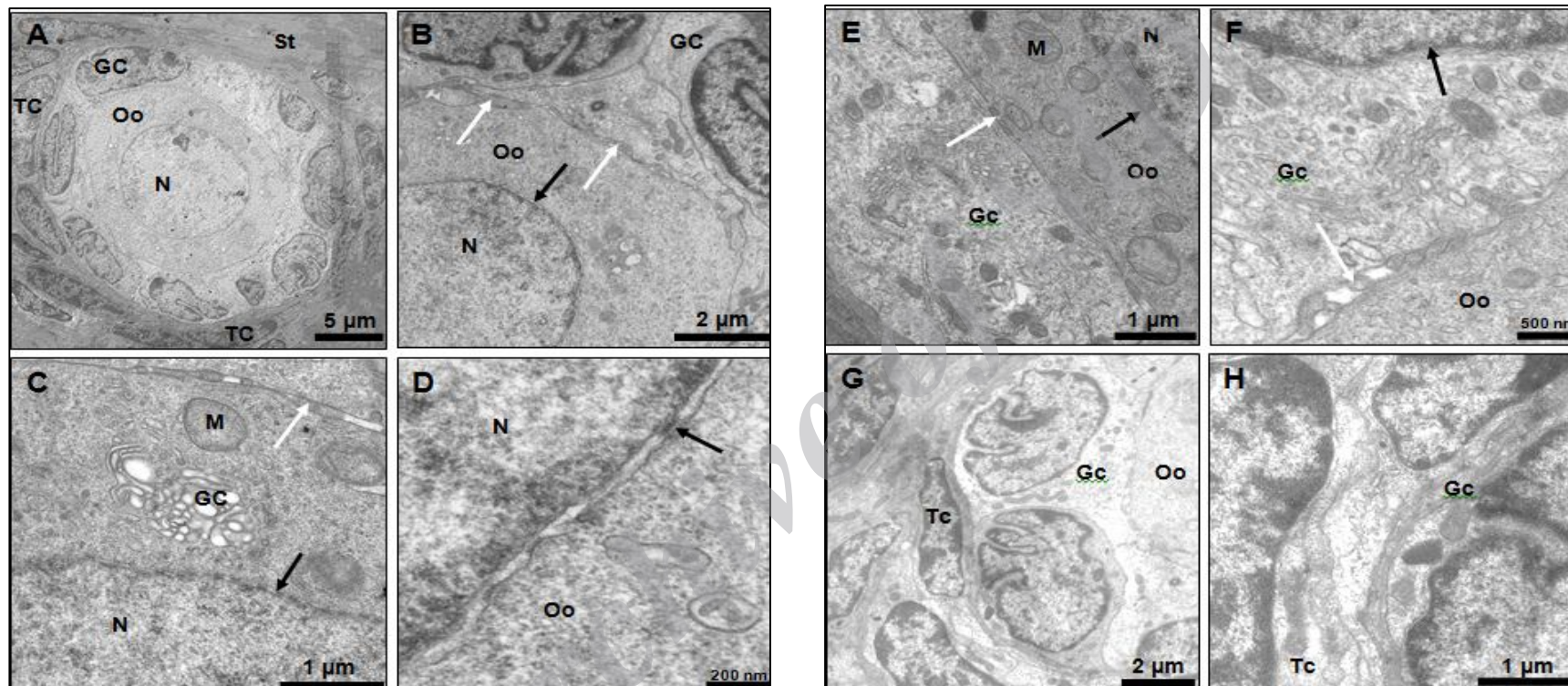
¹ Shelflike Cristae

² Lamellar Body

(C-11-3). زونا پلوسیدا در حد خارجی تخمک دچار چروکیدگی شدید شده و در برخی نواحی به طور کامل ارتباط خود را با سلول های گرانولوزا از دست داده است. در ضخامت زونا، مقاطعی از میکروویلی های تخمک به خوبی دیده می شود (شکل A-11-3). در مناطقی که تخمک و زونا در کنار سلول های گرانولوزا دیده می شود، غشاء تخمک، محدوده مشخصی نداشته و اتصالات تخمک از طریق زونا با سلول های اطراف به ندرت قابل تشخیص می باشد (شکل F-11-3).

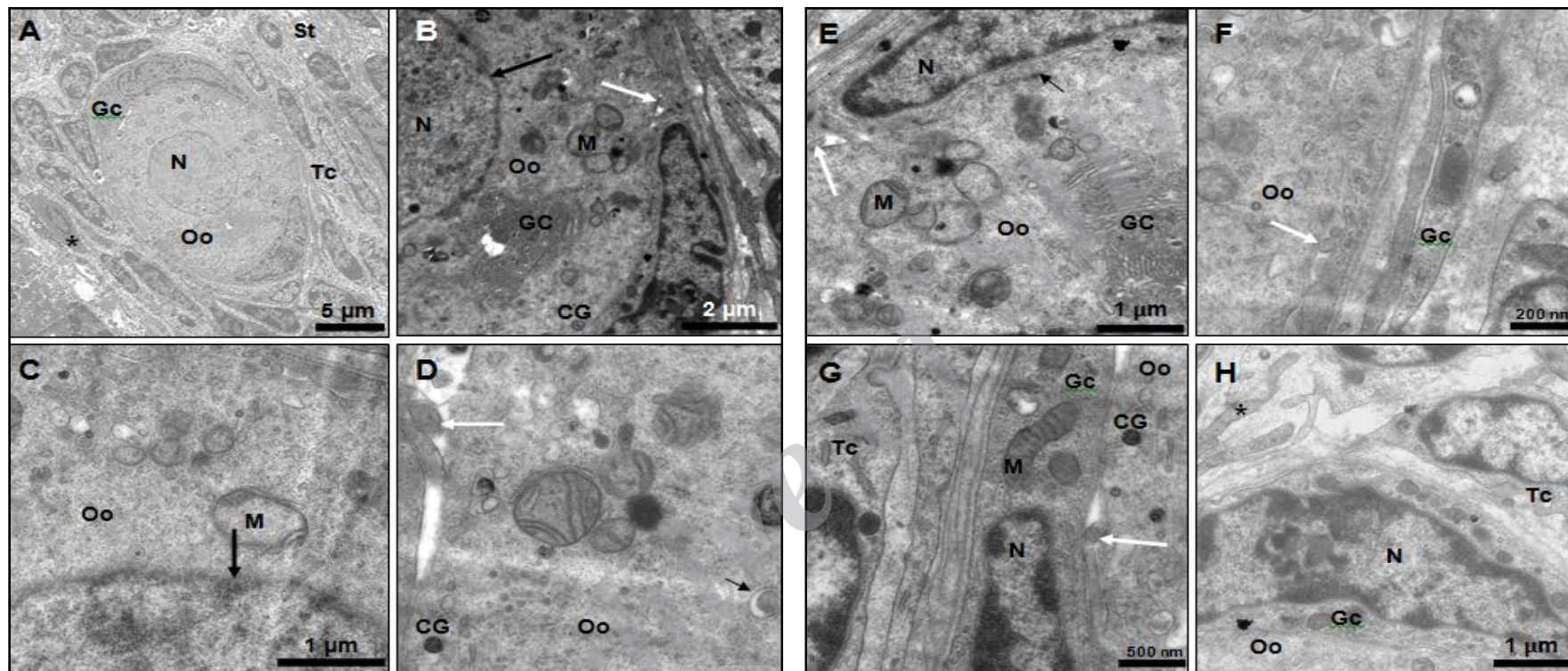
سلول های گرانولوزا، به صورت فشرده در کنار یکدیگر آرایش یافته اند اما حدود آن ها قابل تشخیص نیست (شکل A-11-3). سیتوپلاسم این سلول ها نیز از آسیب حفظ نشده و بر خلاف گروه کنترل و سایر گروه های آزمایشی دچار تغییرات اساسی شده اند. ارگانل های گرانولوزا همانند تخمک دچار آسیب جدی شده و غشاء سلولی نیز تمامیت خود را از دست داده است (شکل D, E, F-11-3). هسته سلول های گرانولوزا الکترون دندسته به خود گرفته و هتروکروماتین مارژینال و حتی پراکنده در آن ها افزایش یافته است (شکل A, D, E-11-3). غشاء هسته، چروکیده شده و در برخی نواحی نیز از هم گسیخته است (شکل E, F, G-11-3).

سلول های تکای داخلی، با افزایش در الکترون دندسته خود و کاهش در نظم سیتوپلاسمی در اطراف غشاء پایه ضمیمه و دست نخورده سلول های گرانولوزا صف آرایی کرده اند (شکل H-11-3).



شکل 3-7: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه کنترل 5 هفته ای

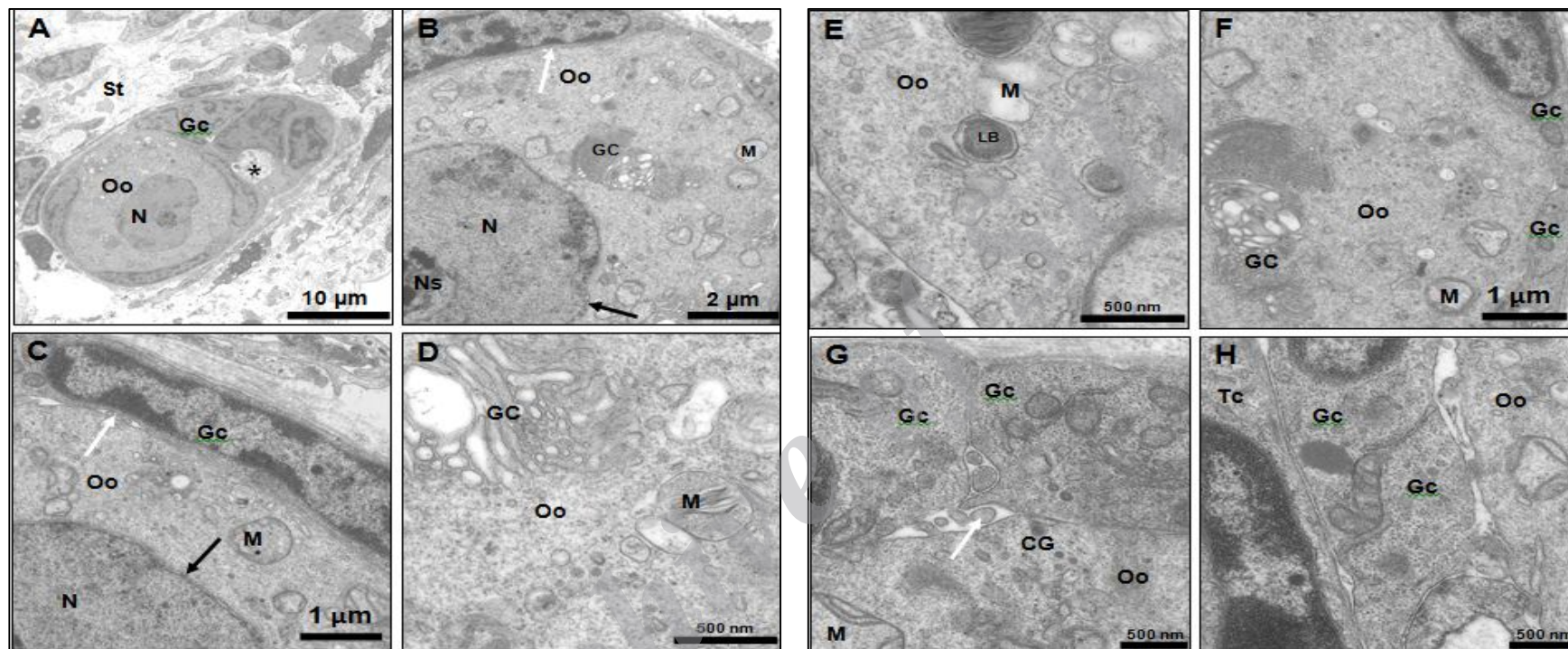
Oo: Oocyte, Gc: Granulosa cell, N: Nucleus, GC: Golgi Complex, Tc: Theca cell, St: Stroma, M: Mitochondria, White arrow: Microvilli, Black arrow: Nuclear Pore



شکل 3-8: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه آزمون سمیت T I (EG + DMSO)

تغییرات بافت تخمدان پس از آزمون سمیت در گروه T I ناچیز بوده و با گروه های کنترل و آزمون سمیت T IV تفاوت بارزی نشان

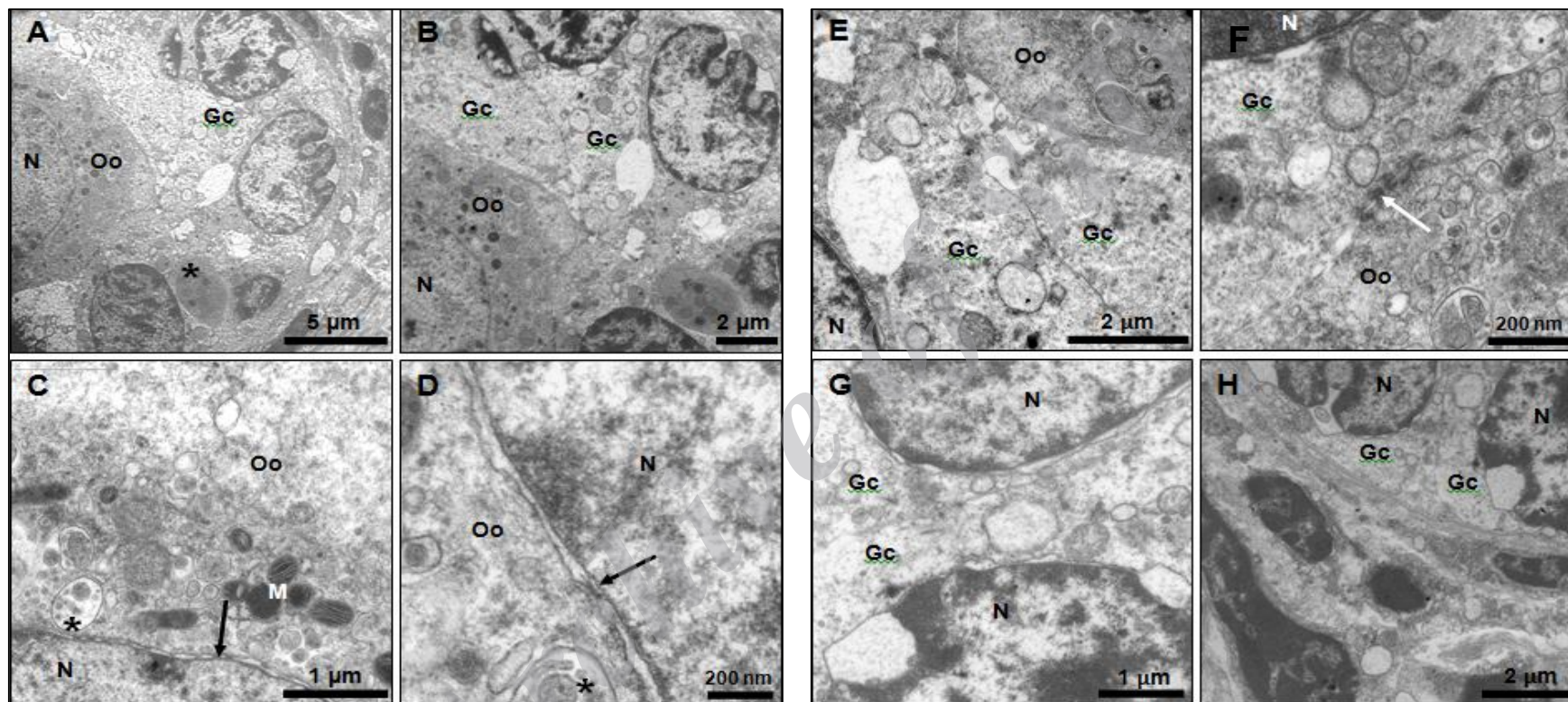
نمی دهد. Oo: Oocyte, Gc: Granulosa cell, N: Nucleus, GC: Golgi Complex, CG: Cortical Granule, Tc: Theca cell, St: Stroma, M: Mitochondria, White arrow: Microvilli of



شکل ۳-۹: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه آزمون سمیت T IV (EG + DMSO + ۰.۲۵ mol/lit sucrose)

تغییرات بافت تخمدان پس از آزمون سمیت ناچیز بوده و نسبت به گروه کنترل و آزمون سمیت T I تفاوت چندانی ندارد، فقط در برخی موارد واکوتل ها افزایش یافته است.

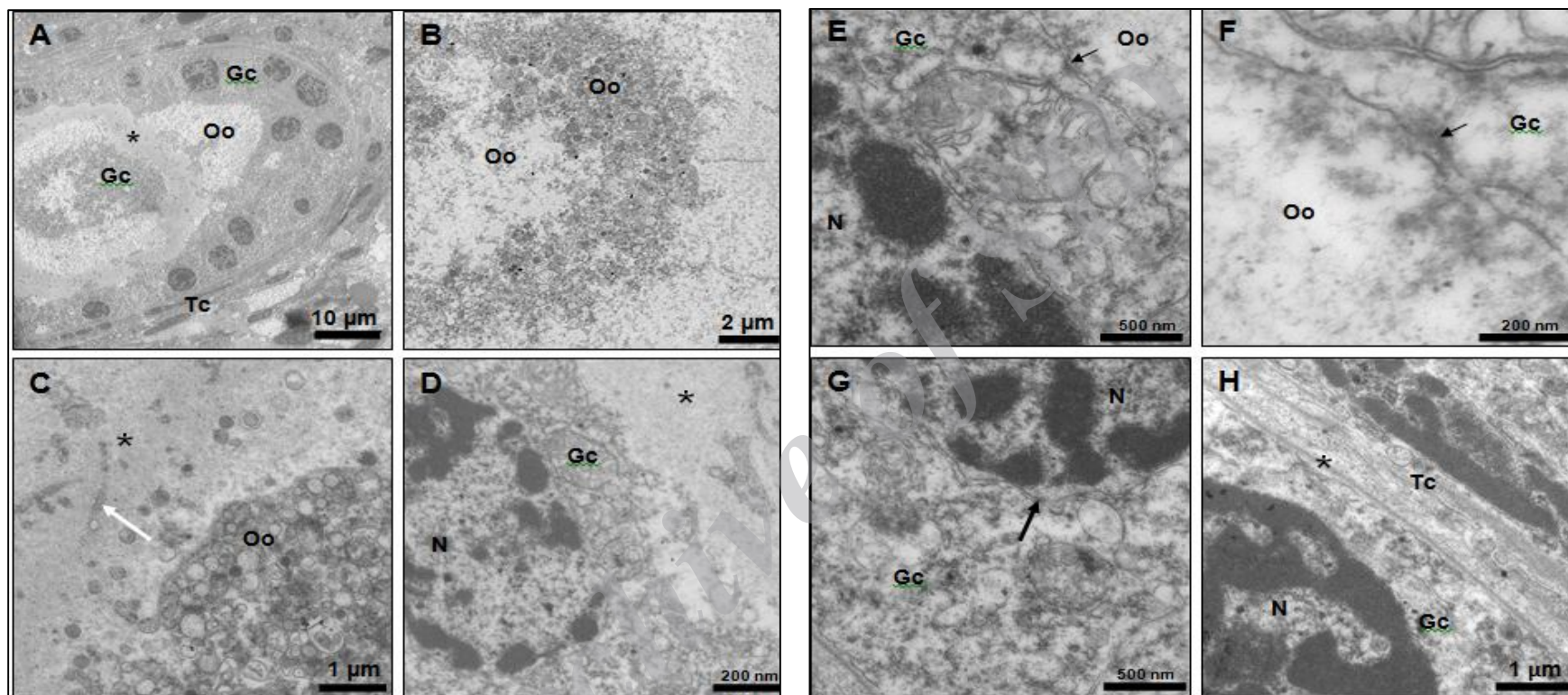
Oo: Oocyte, Gc: Granulosa cell, N: Nucleus, GC: Golgi Complex, CG: Cortical Granule, Tc: Theca cell, St: Stroma, M: Mitochondria, White arrow: Microvilli of oocyte, Black arrow: Nuclear Pore, Short arrow (H): Junction between granulosa cells, *A: Vacuolization of Granulosa cells



شکل 3-10: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه انجمادی VI (EG + DMSO)

تغییرات بافت تخمدان پس از انجماد و ذوب در گروه VI نسبت به گروه کنترل و آزمون سمیت T I و T IV شدیدتر بوده اما نسبت به گروه انجمادی V IV تفاوت چندانی نشان نمی دهد.

Oo: Oocyte, Gc: Granulosa cell, N: Nucleus, GC: Golgi Complex, Tc: Theca cell, St: Stroma, M: Mitochondria, White arrow: Microvilli of oocyte, Black arrow: Nuclear Pore, *A: Multi nuclear macrophage cell, *C: Multi vesicular body



شکل 3-11: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه انجمادی V IV (EG + DMSO + ۰.۲۵ mol/lit sucrose)

تغییرات بافت تخمدان پس از انجماد و ذوب در گروه V IV نسبت به گروه کنترل و آزمون سمیت T I و T IV شدیدتر بوده اما نسبت به گروه انجمادی V I تفاوت چندانی نشان نمی دهد.

Oo: Oocyte, Gc: Granulosa cell, N: Nucleus, GC: Golgi Complex, Tc: Theca cell, St: Stroma, M: Mitochondria, White arrow: Microvilli of oocyte, Black arrow: Nuclear Pore, Short arrow (E, F): Oocyte-Granulosa Junction, *A, B, C, D: Shrinkage Zona Pellucida, *H: Basal Lamina of Granulosa cells

2-3. پیوند به خودی تخمدان کامل موش صحرایی پس از انجماد شیشه ای

1-2-3. درصد موفقیت پیوند

در گروههای پیوندی درصد موفقیت پیوند به این صورت محاسبه گردید که پس از گذشت سه هفته و با خارج کردن بافت پیوندی، جهت ارزیابی نتیجه پیوند به ظاهر بافت اکتفاء نشد. پس از فرآیند پاساژ و سکشن گیری از بافت، قطعات تخمدان تحت رنگ آمیزی H & E قرار گرفتند. سپس قطعات تخمدان قرار گرفته بر روی لام، در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند. حتی در صورت مشاهده فولیکولهای مراحل بدوی و اولیه پیوند را موفقیت آمیز گزارش کرده و نتیجه آن در آمار دخالت داده شد. به این ترتیب در بین گروههای پیوندی، بیشترین درصد موفقیت پیوند متعلق به گروههای پیوندی غیر انجمادی بود، به طوریکه گروه nVTnG (73/52%) بیشترین میزان و گروه nVTG (70/83%) در رده دوم قرار گرفت. درصد موفقیت پیوند در گروههای انجمادی اگر چه نسبت به گروههای پیوندی غیر انجمادی کاهش داشت اما این اختلاف معنی دار نبود. این میزان در گروه پیوندی انجمادی گنادکتومی شده (VTnG: 66/66%) و به لحاظ آماری نزدیک به گروههای پیوندی غیر انجمادی بود و در گروه پیوندی انجمادی گنادکتومی نشده (VTnG: 58/06%) کمترین میزان را به خود اختصاص داده که این اختلاف درصد در موفقیت پیوند با گروه nVTnG معنی دار بود (جدول 6-3). (P<0/05).

جدول 6-3: درصد موفقیت پیوند در گروههای کنترل، منجمد پیوندی و غیر منجمد پیوندی

تعداد پیوندهای گرفته (%)	تعداد تخمدانهای پیوند زده شده	گروه
25 (73/52)	34	nVTnG
18 (58/06)	31	VTnG
17 (70/83)	24	nVTG
24 (66/66)	36	VTG

nVTnG: گروه غیر منجمد پیوندی و گنادکتومی نشده، VTnG: گروه منجمد پیوندی و گنادکتومی نشده، nVTG: گروه غیر منجمد پیوندی و گنادکتومی شده، VTG: گروه منجمد پیوندی و گنادکتومی شده. داده های دارای حروف انگلیسی بزرگ و کوچک مشابه (A با a، B با b و ...) در هر ستون با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند (P<0/05).

2-2-3. شمارش فولیکولهای سالم و مرده

تعداد فولیکولهای سالم در گروههای مختلف پیوندی شمارش و طبق جدول شماره 7-3، نتایج آن در گروههای مختلف آزمون و نیز با گروه کنترل مقایسه گردید. برای هر یک از گروههای آزمون بر اساس تعداد

کلی فولیکولهای سالم، یک درصد زنده مانی¹ تعریف شد که این میزان در گروه VTG ($74/32\% \pm 4/00$) بیشترین و به لحاظ آماری به گروه کنترل ($84/87\% \pm 1/50$) نزدیک بود. همچنین کمترین میزان زنده مانی متعلق به گروه VTnG ($63/48\% \pm 2/00$) بود که نسبت به دو گروه فوق کاهش معنی دار نشان داد (جدول 7-3) ($P<0/05$).

تعداد فولیکولهای بدوی سالم در گروه کنترل ($40/43\% \pm 3/97$) بیشترین و در گروه VTG ($1/87 \pm 12/00\%$) کمترین میزان را شامل بود که این تعداد در گروه اخیر با تمامی گروههای پیوندی ($30/84\% \pm 1/56$) nVTnG: $27/03\% \pm 1/72$ و VTnG: $35/29\% \pm 1/34$ و گروه کنترل اختلاف معنی دار نشان داد. همچنین اختلاف در تعداد فولیکولهای بدوی سالم بین گروه کنترل و VTnG معنی دار بود (جدول 7-3) ($P<0/05$).

بیشترین تعداد فولیکولهای اولیه سالم در گروه nVTnG ($23/21\% \pm 2/18$) مشاهده گردید که به لحاظ آماری به گروه کنترل ($23/05\% \pm 2/04$) نزدیک بود. این تعداد در گروه VTnG ($2/35\% \pm 0/45$) کمترین میزان بود که نسبت به تمامی گروههای پیوندی و کنترل کاهش معنی دار نشان داد. همچنین کاهش تعداد فولیکولهای اولیه سالم در گروه VTG ($13/67\% \pm 1/58$) نیز نسبت به دو گروه کنترل و nVTnG معنی دار بود (جدول 7-3) ($P<0/05$).

تعداد فولیکولهای پرآنترال سالم در تمامی گروههای پیوندی نسبت به گروه کنترل ($11/32\% \pm 1/41$) کاهش و یا افزایش معنی دار نشان ندادند. در گروههای پیوندی انجمادی تعداد فولیکولهای پرآنترال سالم ($VTG: 14/33\% \pm 1/83$ و $VTnG: 11/75\% \pm 2/43$) به لحاظ آماری بیشتر از سایر گروههای پیوندی غیر انجمادی بود ($nVTnG: 6/52\% \pm 0/10$ و $nVTG: 7/11\% \pm 1/39$) (جدول 7-3) ($P<0/05$).

بر اساس جدول شماره 7-3، بیشترین تعداد فولیکولهای آنترال سالم در گروه VTG ($29/00\% \pm 2/05$) مشاهده گردید که این افزایش بین گروه فوق با گروه کنترل ($8/26\% \pm 0/25$) و دو گروه پیوندی غیر انجمادی nVTnG ($5/88\% \pm 0/10$) و nVTG ($7/43\% \pm 0/35$) معنی دار بود. اگر چه تعداد فولیکولهای آنترال سالم در دو گروه پیوندی غیر انجمادی nVTnG و nVTG نسبت به گروه کنترل کاهش داشت اما این اختلاف معنی دار نبود. همچنین افزایش تعداد فولیکولهای آنترال سالم در گروه پیوندی انجمادی VTnG ($1/71 \pm 15/28\%$) نیز نسبت به گروههای کنترل، nVTnG و nVTG معنی دار نبود (جدول 7-3) ($P<0/05$).

میزان تشکیل جسم زرد در هر دو گروه گنادکتومی nVTG ($2/79\% \pm 0/35$) و VTG ($5/33\% \pm 1/5$) بیشترین را شامل بود که به لحاظ آماری با گروه کنترل ($1/80\% \pm 0/70$) و هر دو گروه غیر گنادکتومی ($0/50 \pm 1/59\%$ nVTnG و $1/36\% \pm 0/10$ VTnG) اختلاف معنی دار نشان دادند. همچنین بین سه گروه اخیر، تفاوت معنی داری در شکل گیری جسم زرد مشاهده نشد (جدول 7-3) ($P<0/05$).

¹ Survival Rate

طبق جدول شماره 3-8 نیز برای هر یک از گروههای کنترل و پیوندی بر اساس تعداد کلی فولیکولهای مرده یک میزان مرگ و میر¹ تعریف گردید. به این ترتیب درصد مرگ و میر تمامی گروههای پیوندی نسبت به گروه کنترل ($1/5 \pm 15/12\%$) افزایش معنی دار نشان داد. در میان گروههای پیوندی، بیشترین میزان مرگ و میر فولیکولی از آن گروه VTnG ($2/00 \pm 36/46\%$) و کمترین آن متعلق به گروه VTG ($4/00 \pm 25/67\%$) بود. همچنین اختلاف در میزان مرگ و میر بین گروههای پیوندی با یکدیگر معنی دار نبود (جدول 3-8) ($P < 0/05$).

کمترین تعداد فولیکولهای بدوی مرده متعلق به گروه VTG ($0/02 \pm 0/83\%$) بود که این میزان نسبت به گروه کنترل و تمامی گروههای پیوندی کاهش معنی دار نشان داد. بیشترین میزان مرگ فولیکولهای بدوی نیز به گروه VTnG ($0/4 \pm 10/59\%$) تعلق داشت که این اختلاف فقط با گروههای کنترل و VTG معنی دار بود. همچنین تعداد فولیکولهای بدوی مرده در دو گروه پیوندی nVTnG ($0/58 \pm 4/93\%$) و nVTG ($0/4 \pm 5/88\%$) به لحاظ آماری با گروه کنترل اختلاف نشان ندادند (جدول 3-8) ($P < 0/05$).

افزایش مرگ و میر در فولیکولهای اولیه در تمامی گروههای پیوندی نسبت به گروه کنترل ($0/08 \pm 7/79\%$) معنی دار بود. بیشترین تعداد فولیکولهای اولیه مرده به گروه nVTG ($1/15 \pm 21/36\%$) و کمترین آن نیز به گروه VTnG ($0/04 \pm 17/65\%$) تعلق داشت، اگر چه این اختلافات بین گروههای پیوندی معنی دار نبود (جدول 3-8) ($P < 0/05$).

اختلاف در تعداد فولیکولهای پرآنترال مرده بین گروه کنترل ($0/5 \pm 2/33\%$) و دو گروه پیوندی غیر گنادکتومی (nVTnG: $0/1 \pm 5/09\%$ و VTnG: $0/65 \pm 4/71\%$) معنی دار بود. کمترین تعداد فولیکولهای پرآنترال مرده در گروه VTG ($0/25 \pm 2/00\%$) مشاهده گردید که این میزان با دو گروه پیوندی غیر گنادکتومی nVTnG و VTnG اختلاف معنی دار نشان داد (جدول 3-8) ($P < 0/05$).

در تعداد فولیکولهای آنترال مرده نیز افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل ($0/01 \pm 0/40\%$) فقط در گروه VTnG ($1/44 \pm 3/53\%$) دیده شد. همچنین کمترین این تعداد مربوط به گروه nVTG ($0/02 \pm 0/31\%$) بوده که نسبت به دو گروه پیوندی VTnG و VTG ($0/09 \pm 1/67\%$) اختلاف معنی دار نشان داد (جدول 3-8) ($P < 0/05$).

¹ Death Rate

جدول 3-7: درصد فولیکولهای سالم در گروههای کنترل، منجمد پیوندی و غیر منجمد پیوندی

جسم زرد	آنترال	پرآنترال	اولیه	بدوی	میزان زنده مانده	فولیکول گروه
$ab_{1/80} \pm 0/70$	$a_{8/26} \pm 0/25$	$11/32 \pm 1/41$	$ab_{23/05} \pm 2/04$	$aB_{40/43} \pm 3/97$	$a_{84/87} \pm 1/5$	کنترل
$ab_{1/59} \pm 0/50$	$a_{5/88} \pm 0/10$	$A_{6/52} \pm 0/10$	$ab_{23/21} \pm 2/18$	$a_{30/84} \pm 1/56$	$68/04 \pm 2/2$	nVTnG
$ab_{1/36} \pm 0/10$	$15/28 \pm 1/71$	$a_{11/75} \pm 2/43$	$A_{2/35} \pm 0/45$	$ab_{27/03} \pm 1/72$	$A_{63/48} \pm 2/00$	VTnG
$A_{2/79} \pm 0/35$	$a_{7/43} \pm 0/35$	$A_{7/11} \pm 1/39$	$a_{16/72} \pm 4/20$	$a_{35/29} \pm 1/34$	$69/34 \pm 0/9$	nVTG
$B_{5/33} \pm 1/5$	$A_{29/00} \pm 2/05$	$a_{14/33} \pm 1/83$	$aB_{13/67} \pm 1/58$	$A_{12} \pm 1/87$	$a_{74/32} \pm 4/00$	VTG

داده ها به صورت میانگین درصد \pm میانگین خطای استاندارد (SEM) ارائه شده اند. گروه کنترل: تخمدان موش صحرائی دست نخورده 8 هفته ای، nVTnG: گروه غیر منجمد پیوندی و گنادکتومی نشده، VTnG: گروه منجمد پیوندی و گنادکتومی نشده، nVTG: گروه غیر منجمد پیوندی و گنادکتومی شده، VTG: گروه منجمد پیوندی و گنادکتومی شده. داده های دارای حروف انگلیسی بزرگ و کوچک مشابه (A با a, B با b و ...) در هر ستون با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند ($P < 0/05$).

جدول 3-8 درصد فولیکولهای مرده در گروههای کنترل، منجمد پیوندی و غیر منجمد پیوندی

آنترال	پراآنترال	اولیه	بدوی	درصد مرگ	فولیکول گروه
$^A 0.40 \pm 0.01$	$^A 2/33 \pm 0.5$	$^A 7/79 \pm 0.08$	$^{ab} 4/60 \pm 0.3$	$^A 15/12 \pm 1.5$	کنترل
$1/27 \pm 0.05$	$^{ab} 5/0.9 \pm 0.1$	$^a 20/67 \pm 2/22$	$^{ab} 4/93 \pm 0.58$	$^a 31/96 \pm 2/2$	nVTnG
$^{ab} 3/53 \pm 1/44$	$^{ab} 4/71 \pm 0.65$	$^a 17/65 \pm 0.04$	$^{aB} 10/59 \pm 0.4$	$^a 36/46 \pm 2/00$	VTnG
$^B 0/31 \pm 0.02$	$3/40 \pm 0.10$	$^a 21/36 \pm 1/15$	$^a 5/88 \pm 0.4$	$^a 30/96 \pm 0.9$	nVTG
$^b 1/67 \pm 0.09$	$^B 2/00 \pm 0.25$	$^a 21/17 \pm 2/83$	$^A 0/83 \pm 0.2$	$^a 25/67 \pm 4/00$	VTG

داده ها به صورت میانگین درصد \pm میانگین خطای استاندارد (SEM) ارائه شده اند. گروه کنترل: تخمدان موش صحرائی دست نخورده 8 هفته ای، nVTnG: گروه غیر منجمد پیوندی و گنادکتومی نشده، VTnG: گروه منجمد پیوندی و گنادکتومی نشده، nVTG: گروه غیر منجمد پیوندی و گنادکتومی شده، VTG: گروه منجمد پیوندی و گنادکتومی شده. داده های دارای حروف انگلیسی بزرگ و کوچک مشابه (A با a، B با b و ...) در هر ستون با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند ($P < 0/05$).

3-2-3. شمارش فولیکولهای آپوتوتیک

بر اساس جدول 3-9، شیوع آپوتوز در فولیکولهای بدوی در گروه nVTG ($17/72\% \pm 0/88$) بیشترین تعداد بوده که با تمامی گروههای پیوندی و گروه کنترل ($5/37\% \pm 0/94$) اختلاف معنی دار داشته است. کمترین تعداد فولیکولهای بدوی آپوتوتیک نیز مربوط به گروه کنترل بوده است که این میزان علاوه بر گروه nVTG با دو گروه پیوندی انجمادی VTnG ($10/29\% \pm 0/88$) و VTG ($9/82\% \pm 0/96$) نیز اختلاف معنی دار نشان داده است (جدول 3-9) ($P < 0/05$).

بیشترین تعداد فولیکولهای اولیه آپوتوتیک نیز در دو گروه غیر گنادکتومی nVTnG ($15/05\% \pm 0/88$) و VTnG ($15/44\% \pm 1/32$) مشاهده گردید که اختلاف این تعداد در هر دو گروه مذکور با دو گروه کنترل nVTG ($6/65\% \pm 1/16$) و VTG ($6/93\% \pm 0/55$) معنی دار بوده است. همچنین بروز آپوتوز در گروه nVTG ($8/86\% \pm 0/44$) در فولیکولهای اولیه، در حد متوسط بوده، بنابراین نسبت به سایر گروههای کنترل و پیوندی اختلاف معنی داری نداشته است (جدول 3-9) ($P < 0/05$).

جدول شماره 3-9 نشان می دهد که در تعداد فولیکولهای پرآنترال آپوتوتیک، دو گروه پیوندی غیر گنادکتومی (nVTnG: $7/52\% \pm 0/44$ و VTnG: $10/29\% \pm 0/58$) نسبت به سایر گروههای پیوندی گنادکتومی (nVTG: $2/53\% \pm 0/13$ و VTG: $3/46\% \pm 0/37$) و کنترل ($2/81\% \pm 0/37$) افزایش معنی دار داشته اند. این میزان بین سه گروه اخیر اختلاف معنی دار نشان نداده است (جدول 3-9) ($P < 0/05$).

تغییرات در تعداد فولیکولهای آنترال آپوتوتیک در بین گروههای پیوندی تا حدودی با سایر انواع فولیکولها متفاوت بود. به این ترتیب که در دو گروه پیوندی گنادکتومی (nVTG: $8/86\% \pm 0/02$ و VTG: $4/62\% \pm 0/33$) بیشترین تعداد را شامل شده و این افزایش با گروه کنترل ($0/76\% \pm 0/27$) و دو گروه پیوندی غیر گنادکتومی (nVTnG: $2/15\% \pm 0/13$ و VTnG: $2/18\% \pm 0/18$) معنی دار بود، اما بین خود گروههای گنادکتومی (nVTG و VTG) به لحاظ آماری تفاوت معنی دار نبود (جدول 3-9) ($P < 0/05$).

جدول 3-9: درصد فولیکولهای آپوپتوتیک در گروههای کنترل، منجمد پیوندی و غیر منجمد پیوندی

گروه فولیکول	بدوی	اولیه	پرآنترال	آنترال
کنترل	$Ab_{5/37} \pm 0/94$	$B_{6/65} \pm 1/16$	$ab_{2/81} \pm 0/37$	$ab_{0/76} \pm 0/27$
nVTnG	$b_{7/52} \pm 0/44$	$ab_{15/05} \pm 0/88$	$A_{7/52} \pm 0/44$	$ab_{2/15} \pm 0/13$
VTnG	$ab_{10/29} \pm 0/88$	$ab_{15/44} \pm 1/32$	$B_{10/29} \pm 0/58$	$a_{2/20} \pm 0/18$
nVTG	$B_{17/72} \pm 0/88$	$8/86 \pm 0/44$	$ab_{2/53} \pm 0/13$	$A_{8/86} \pm 0/02$
VTG	$ab_{9/82} \pm 0/96$	$A_{6/93} \pm 0/55$	$ab_{3/46} \pm 0/37$	$B_{4/62} \pm 0/33$

داده ها به صورت میانگین درصد \pm میانگین خطای استاندارد (SEM) ارائه شده اند. گروه کنترل: تخمدان موش صحرائی دست نخورده 8 هفته ای، nVTnG: گروه غیر منجمد پیوندی و گنادکتومی نشده، VTnG: گروه منجمد پیوندی و گنادکتومی نشده، nVTG: گروه غیر منجمد پیوندی و گنادکتومی شده، VTG: گروه منجمد پیوندی و گنادکتومی شده. داده های دارای حروف انگلیسی بزرگ و کوچک مشابه (A با a، B با b و ...) در هر ستون با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند ($P < 0/05$).

3-2-4. سطح گنادوتروپین ها و هورمونهای استروئیدی

3-2-4-1. هورمون تحریک کننده فولیکولی (FSH)

با توجه به داده های ارائه شده در جدول شماره 3-10، سطح ترشح FSH (IU/ml) پس از گذشت سه هفته در حیوانی که هر دو تخمدان آن خارج شده است (گروه BLG: $0/39 \pm 3/45$) از گروه کنترل ($0/33 \pm 1/34$) و نیز سایر گروههای پیوندی بالاتر بوده و این اختلاف با تمامی گروهها معنی دار بوده است. همچنین سطح ترشح FSH در تمامی گروههای پیوندی کاهش معنی دار نسبت به گروه کنترل نشان داد در حالیکه اختلاف بین خود گروههای پیوندی معنی دار نبود ($0/15 \pm 0/30$ nVTnG: $0/11 \pm 0/35$ VTnG: $0/03 \pm 0/11$ و $0/02 \pm 0/12$ VTG) (جدول 3-10) ($P < 0/05$).

3-2-4-2. هورمون لوتئینه کننده (LH)

سطح ترشح هورمون LH نیز بر اساس هر واحد بین المللی در هر میلی لیتر (IU/ml) همانند FSH در گروه BLG ($0/2 \pm 3/00$) نسبت به گروه کنترل ($0/48 \pm 2/21$) و نیز سایر گروههای پیوندی افزایش معنی دار داشته است. کاهش سطح ترشح این هورمون در گروههای پیوندی غیر گنادکتومی ($0/10 \pm 0/29$ nVTnG: $0/22 \pm 0/67$) نسبت به گروه کنترل و گروههای پیوندی غیر گنادکتومی ($0/37 \pm 1/88$ nVTG: $0/10 \pm 1/32$ VTG) معنی دار بوده است. همچنین اختلاف در میزان ترشح LH در بین گروههای گنادکتومی با خودشان و نیز بین گروههای غیر گنادکتومی با خودشان معنی دار نبوده است (جدول 3-10) ($P < 0/05$).

3-2-4-3. هورمون پروژسترون

ارزیابی میزان ترشح پروژسترون در خون بر اساس ng/ml صورت گرفت. حذف دو تخمدان (منابع ترشح هورمون پروژسترون) در گروه BLG ($0/10 \pm 0/49$)، منجر به کاهش شدید و معنی دار سطح این هورمون نسبت به گروه کنترل ($5/08 \pm 39/16$) و سایر گروههای پیوندی شد. بیشترین میزان ترشح پروژسترون مربوط به گروه کنترل و کمترین آن نیز در گروههای پیوندی متعلق به گروه nVTG ($3/30 \pm 17/50$) بوده است. کاهش سطح پروژسترون در گروه اخیر نسبت به گروه کنترل و دو گروه پیوندی nVTG ($5/32 \pm 34/73$) و VTnG ($2/87 \pm 36/33$) معنی دار و نسبت به گروه پیوندی VTG ($5/32 \pm 27/33$) غیر معنی دار بوده است (جدول 3-10) ($P < 0/05$).

3-2-4-4. هورمون استرادیول

سطح ترشح هورمون استرادیول که بر اساس pg/ml سنجیده شد، در تمامی گروههای پیوندی نزدیک به گروه کنترل ($39/85 \pm 4/18$) بوده و اختلاف معنی دار با آن نداشته است. تغییرات ترشح هورمون استرادیول نیز مطابق با پروژسترون در گروه BLG ($0/37 \pm 0/02$) نسبت به گروه کنترل و سایر گروههای پیوندی غیر گنادکتومی ($nVTnG: 33/23 \pm 5/17$ و $VTnG: 32/40 \pm 3/64$) و پیوندی گنادکتومی ($nVTG: 27/50 \pm 2/02$ و $VTG: 28/75 \pm 2/10$) کاهش معنی دار نشان داد (جدول 3-10). ($P < 0/05$)

3-2-4-5. هورمون تستوسترون

میزان ترشح هورمون تستوسترون نیز بر اساس واحد ng/ml ارزیابی شد و مشخص گردید که سطح ترشح این هورمون در تمامی گروههای پیوندی ($nVTnG: 0/50 \pm 0/11$ ، $VTnG: 0/40 \pm 0/15$ ، $nVTG: 0/44 \pm 0/10$ و $VTG: 0/43 \pm 0/08$) نسبت به گروه کنترل ($0/54 \pm 0/10$) اختلاف معنی دار ندارند. اما میزان ترشح آن در گروه BLG ($1/09 \pm 0/20$) نسبت به گروه کنترل و سایر گروههای پیوندی افزایش معنی دار داشته است (جدول 3-10). ($P < 0/05$)

جدول 3-10: سطح گنادوتروپین ها و هورمون های استروئیدی در گروههای کنترل، منجمد پیوندی و غیر منجمد پیوندی

هورمون گروه	FSH (IU/ml)	LH (IU/ml)	پروژسترون (ng/ml)	استرادیول (pg/ml)	تستوسترون (ng/ml)
کنترل	$A_{1/34} \pm 0/33$	$ab_{2/21} \pm 0/48$	$ab_{39/16} \pm 0/08$	$Ba_{39/85} \pm 4/18$	$a_{0/54} \pm 0/10$
nVTnG	$ab_{0/30} \pm 0/10$	$aB_{0/29} \pm 0/10$	$ab_{3/73} \pm 0/32$	$a_{33/23} \pm 0/17$	$a_{0/50} \pm 0/11$
VTnG	$ab_{0/35} \pm 0/11$	$aB_{0/67} \pm 0/22$	$ab_{3/33} \pm 2/87$	$a_{32/40} \pm 3/64$	$a_{0/40} \pm 0/10$
nVTG	$ab_{0/11} \pm 0/03$	$ab_{1/88} \pm 0/37$	$Ba_{1/50} \pm 3/30$	$ba_{27/50} \pm 2/20$	$a_{0/44} \pm 0/10$
VTG	$ab_{0/12} \pm 0/02$	$ab_{1/32} \pm 0/10$	$a_{2/33} \pm 0/32$	$a_{28/75} \pm 2/10$	$a_{0/43} \pm 0/08$
BLG	$B_{3/45} \pm 0/39$	$A_{3/00} \pm 0/2$	$A_{0/49} \pm 0/10$	$A_{0/37} \pm 0/02$	$A_{1/09} \pm 0/20$

داده ها به صورت میانگین درصد \pm میانگین خطای استاندارد (SEM) ارائه شده اند. گروه کنترل: تخمدان موش صحرائی دست نخورده 8 هفته ای، nVTnG: گروه غیر منجمد پیوندی و گنادکتومی نشده، VTnG: گروه منجمد پیوندی و گنادکتومی نشده، nVTG: گروه غیر منجمد پیوندی و گنادکتومی شده، VTG: گروه منجمد پیوندی و گنادکتومی شده، BLG: گروه بدون پیوند و جفت تخمدان خارج شده. داده های دارای حروف انگلیسی بزرگ و کوچک مشابه (A با a، B با b و ...) در هر ستون با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند ($P < 0/05$).

3-2-5. میزان بیان رونوشت ژنهای بلوغ فولیکولی، رگ زایی و آپوپتوزی

3-2-5-1. ژن های بلوغ (GDF-9 و BMP-15, TGF-b)

طبق جدول شماره 3-11، میزان بیان رونوشت ژنهای مختلف بر اساس میزان بیان ژن کنترل ACT-1 (Actin-1) ارزیابی و سپس در گروههای مختلف با یکدیگر مقایسه شد.

بیان ژن TGF-b در گروه کنترل ($1/02 \pm 0/003$) در حد متوسط بوده و نسبت به سایر گروههای پیوندی اختلاف معنی دار نشان نداد. کمترین میزان بیان رونوشتهای این ژن در گروه nVTnG ($0/016 \pm 0/097$) مشاهده شد که کاهش آن نسبت به دو گروه VTnG ($1/04 \pm 0/003$) و VTG ($1/03 \pm 0/011$) معنی دار بود. همچنین بیان ژن TGF-b در گروه nVTG ($0/99 \pm 0/011$) نیز نسبت به دو گروه اخیر کاهش معنی دار نشان داد (جدول 3-11) ($P < 0/05$).

اگر چه میزان بیان رونوشت ژن BMP-15 در گروههای پیوندی نسبت به گروه کنترل ($1/52 \pm 0/22$) کاهش داشت اما این اختلاف معنی دار نبود. همچنین بیشترین کپی از رونوشت ژن BMP-15 بین گروههای پیوندی در گروه VTG ($1/16 \pm 0/26$) مشاهده شد که البته، اختلاف در میزان بیان رونوشت این ژن ما بین گروههای پیوندی نیز معنی دار نبود (جدول 3-11).

ژن GDF-9 نیز که یکی دیگر از مولکولهای مهم دخیل در روند بلوغ فولیکول است، در تخمدانهای منجمد پیوندی ($0/03 \pm 0/01$ VTnG و $0/08 \pm 0/01$ VTG) نسبت به گروه کنترل ($0/77 \pm 0/03$) کاهش معنی دار داشته است اما این کاهش در گروههای غیر منجمد پیوندی ($0/23 \pm 0/03$ nVTnG و $0/04 \pm 0/26$ nVTG) نسبت به گروه کنترل معنی دار نبوده است. کمترین میزان بیان رونوشت ژن GDF-9 بین گروههای پیوندی، متعلق به گروه VTnG ($0/03 \pm 0/01$) بوده که این کاهش نسبت به گروههای کنترل و غیر منجمد پیوندی معنی دار بوده است (جدول 3-11) ($P < 0/05$).

3-2-5-2. ژن های رگ زایی (VEGF, CD34 و CD31)

میزان بیان رونوشت ژن VEGF در تمامی گروههای پیوندی نزدیک به گروه کنترل ($1/01 \pm 0/007$) بوده و نیز اختلاف در بیان این رونوشت میان خود گروههای پیوندی غیر معنی دار بود. به طوریکه در هر دو گروه منجمد پیوندی ($1/03 \pm 0/01$ VTnG و $1/03 \pm 0/008$ VTG) میزان بیان کمی بیشتر از دو گروه غیر منجمد پیوندی ($1/02 \pm 0/006$ nVTnG و $1/02 \pm 0/01$ nVTG) بود اگر چه اختلاف معنی دار نشان نداد (جدول 3-11) ($P < 0/05$).

ژن CD34 تا حدودی وضعیتی متفاوت با VEGF داشت. بیان رونوشت این ژن در تمامی گروههای پیوندی اگر چه با گروه کنترل ($3/62 \pm 0/69$) اختلاف داشتند اما این تفاوتها معنی دار نبود. بیان رونوشت CD34 در دو گروه غیر منجمد پیوندی ($6/31 \pm 0/94$ nVTnG و $6/11 \pm 0/47$ nVTG) بیشترین میزان بوده که اختلاف هر دو گروه مذکور با گروه منجمد پیوندی VTnG ($2/51 \pm 0/63$) با کمترین بیان

در بین گروههای پیوندی، معنی دار بود. گروه VTG نیز با بیان رونوشت CD34 به میزان $4/41 \pm 0/37$ حد متوسط را داشته که با هیچ کدام از گروههای دیگر به لحاظ آماری اختلافی نشان نداد (جدول 3-11) ($P < 0/05$).

یکی دیگر از عوامل رگ زایی که پس از طی دوره پیوند مورد بررسی قرار گرفت ژن CD31 بود. رونوشت این ژن به میزان $3/36 \pm 0/4$ در گروه کنترل، به طور میانگین به دو گروه پیوندی غیر گنادکتومی ($0/5 \pm$ و $nVTnG: 3/86$ و $VTnG: 3/63 \pm 0/69$) نزدیک بوده و اختلاف معنی دار با آن دو نداشت. اما دو گروه پیوندی گنادکتومی ($nVTG: 4/66 \pm 0/36$ و $VTG: 4/34 \pm 0/35$) در میزان بیان رونوشت ژن CD31 نسبت به گروه کنترل و سایر گروههای پیوندی افزایش نشان دادند که البته این افزایش فقط نسبت به گروه کنترل معنی دار بود (جدول 3-11) ($P < 0/05$).

3-5-2-3. ژن های آپوپتوتیک (BAX و BCL-2)

افزایش میزان BAX در دو گروه غیر منجمد پیوندی ($nVTnG: 1/33 \pm 0/20$ و $2/09 \pm 0/20$) نسبت به گروه کنترل ($1/29 \pm 0/15$) غیر معنی دار و نسبت به دو گروه منجمد پیوندی ($0/15$ و $VTnG: 0/71 \pm 0/10$ و $VTG: 0/83 \pm 0/10$) معنی دار بود. کاهش میزان بیان رونوشت ژن BAX در دو گروه اخیر نسبت به گروه کنترل، قابل توجه بوده اما اختلاف معنی داری نشان ندادند (جدول 3-11) ($P < 0/05$).

رونوشت ژن BCL-2 نیز همانند BAX در دو گروه منجمد پیوندی ($VTnG: 1/01 \pm 0/17$) و VTG ($1/23 \pm 0/16$) کمترین میزان بیان را داشت. این کاهش نسبت به تمامی گروههای غیر منجمد پیوندی ($nVTnG: 1/93 \pm 0/12$ و $nVTG: 1/96 \pm 0/12$) و کنترل ($1/82 \pm 0/18$) معنی دار بود. همچنین سطح بیان رونوشت ژن BCL-2 در دو گروه غیر منجمد پیوندی نسبت به یکدیگر و نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی دار نداشت (جدول 3-11) ($P < 0/05$).

به منظور ارزیابی بهتر و مقایسه مفیدتر بین میزان بیان رونوشت ژنهای BAX و BCL-2، نسبت بیان رونوشت آنها (BCL-2/BAX) نیز ما بین تمامی گروههای کنترل و پیوندی با یکدیگر مقایسه شد. به این ترتیب کمترین سطح بیان نسبی BCL-2/BAX متعلق به دو گروه $nVTG: 0/93 \pm 0/14$ و VTG ($1/01 \pm 0/20$) بود که این کاهش تنها نسبت به گروه $nVTnG: 1/45 \pm 0/23$ با بیشترین نسبت بیان، معنی دار بود. در سایر گروههای پیوندی نیز سطح BCL-2/BAX به گروه کنترل ($1/41 \pm 0/25$) نزدیک بوده و اختلاف آماری با آن نداشت (جدول 3-11) ($P < 0/05$).



جدول 3-11: میزان بیان رونوشت‌های ژن های بلوغ فولیکولی، رگ زایی و آپوپتوزی نسبت به ژن مرجع (Act-1) در تخمدان گروه‌های کنترل، منجمد پیوندی و غیر منجمد پیوندی

ژن گروه	BCL-2/BAX	BCL-2	BAX	CD31	CD34	VEGF	GDF-9	BMP-15	TGF-b
کنترل	1/41 ± 0/25	1/82 ± 0/18 ^{ab}	1/29 ± 0/15	3/36 ± 0/4 ^A	3/62 ± 0/69	1/01 ± 0/07	0/77 ± 0/03 ^A	1/52 ± 0/22	1/02 ± 0/03
nVTnG	1/45 ± 0/23 ^A	1/93 ± 0/12 ^{ab}	1/33 ± 0/20 ^A	3/86 ± 0/5	6/31 ± 0/94 ^a	1/02 ± 0/06	0/23 ± 0/03 ^b	0/98 ± 0/15	0/97 ± 0/16 ^A
VTnG	1/43 ± 0/11	1/01 ± 0/17 ^A	0/71 ± 0/15 ^{ab}	3/63 ± 0/69	2/51 ± 0/63 ^A	1/03 ± 0/01	0/03 ± 0/01 ^{Ba}	0/81 ± 0/16	1/04 ± 0/03 ^{ab}
nVTG	0/93 ± 0/14 ^a	1/96 ± 0/12 ^{ab}	2/09 ± 0/20 ^B	4/66 ± 0/36 ^a	6/11 ± 0/47 ^a	1/02 ± 0/01	0/26 ± 0/04 ^b	0/91 ± 0/15	0/99 ± 0/11 ^B
VTG	1/01 ± 0/20 ^a	1/23 ± 0/16 ^B	0/83 ± 0/10 ^{ab}	4/34 ± 0/35 ^a	4/41 ± 0/37	1/03 ± 0/008	0/08 ± 0/01 ^a	1/16 ± 0/26	1/03 ± 0/11 ^{ab}

داده ها به صورت میانگین میزان بیان رونوشت‌های ژن های بلوغ فولیکولی، رگ زایی و آپوپتوزی (نسبت به ژن Act-1) ± میانگین خطای استاندارد (SEM) ارائه شده اند. گروه کنترل: تخمدان موش صحرایی دست نخورده 8 هفته ای، nVTnG. گروه غیر منجمد پیوندی و گنادکتومی نشده، VTnG: گروه منجمد پیوندی و گنادکتومی شده، nVTG: گروه غیر منجمد پیوندی و گنادکتومی شده، VTG: گروه منجمد پیوندی و گنادکتومی شده، BLG: گروه بدون پیوند و جفت تخمدان خارج شده. داده های دارای حروف انگلیسی بزرگ و کوچک مشابه (A با a، B با b و ...) در هر ستون با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند (P<0/05).

3-2-6. بررسی بافت شناسی تخمدانهای موش صحرایی منجمد - ذوب شده پس از پیوند به

خودی (مقاطع نیمه نازک)

3-2-6-1. گروه کنترل 8 هفته ای

این گروه، تخمدانهایی را شامل می شود که به صورت طبیعی در بدن موش صحرایی رشد کرده و در سن 8 هفته ای (دوره بلوغ) از بدن خارج شده است. در بررسی مقاطع نیمه نازک تخمدان های این گروه، اپیتلیوم سطحی تخمدان در اکثر نواحی به صورت سنگفرشی و گاهی نیز با سلول های مکعبی دیده می شود (شکل 3-12-B). در زیر اپیتلیوم سطحی، تونیکا آلبوژینه همچنان قابل مشاهده می باشد اگر چه نظم و شدت لایه بندی آن مانند یک تخمدان 5 هفته ای نمی باشد. عروق زیر کپسولی در ردیف های منظم و در زیر تونیکا آلبوژینه قرار گرفته اند (شکل 3-12-B). ضخامت دیواره و تعداد مقاطع این عروق نسبت به گروه کنترل 5 هفته ای، افزایش قابل توجهی یافته است.

قشر تخمدان محدوده مشخص داشته و فولیکول های کوچکتر در آن دیده می شوند. فولیکول های بدوی و اولیه با هسته بزرگ دایره ای و مرکزی در لایه قشری و در زیر تونیکا آلبوژینه نا منظم، دیده می شوند (شکل 3-12-B). مدولای تخمدان در موش صحرایی 8 هفته ای، تا حدودی مشابه با تخمدان 5 هفته ای بوده و سلول های استرومایی در ارتباط با فولیکول های بزرگ بالاخص آنترال دیده می شوند، اگر چه در برخی مناطق نظم خاص تخمدان موش صحرایی 5 هفته ای را ندارد. از نکات قابل توجه در تخمدان موش صحرایی 8 هفته ای وجود سلول هایی بزرگ در سمت داخل بخش قشری تخمدان می باشد. این سلول ها کاملاً شبیه تخمک فولیکول بدوی بوده، با این تفاوت که توسط هیچ سلولی در بر گرفته نشده اند (شکل 3-12-B). شاید بتوان در رابطه با این سلول های بزرگ اندازه، این فرضیه را عنوان کرد که چون تشکیل فولیکول های بدوی در موش صحرایی پس از تولد صورت می گیرد، تعدادی از PGC ها هنوز توسط سلول های فولیکولی در بر گرفته نشده اند و آماده شکل دهی یک فولیکول جدید می باشند. که البته این مسئله برای تأیید نیاز به مطالعات دیگری دارد.

همچنین در بخش مدولا، فولیکول آنترال دیده شده که تخمک آن از وسعت بسیار خوب و شفافیت بالایی برخوردار است. تقریباً اکثر ارگانلهای سیتوپلاسمی در زیر غشاء تخمک قرار گرفته اند و مرکز سیتوپلاسم به دلیل کاهش در تعداد ارگانل، شفاف تر به نظر می رسد. غشاء تخمک به سطح داخلی و صاف زونا پلوسیدا بدون فاصله ای چسبیده و در ضخامت زونا نیز مقاطع زوائد سلولی و میکروویلی های تخمک به خوبی قابل مشاهده است (شکل 3-12-A). در این فولیکول، سلول های کومولوسی با تراکم زیاد، تخمک را احاطه کرده و اتصالات مناسبی به وسیله زوائد سیتوپلاسمی با یکدیگر بر قرار کرده اند. میتوز در بین سلول های گرانولوزا دیده می شود و فضاهای بین سلولی نسبت به گروه کنترل 5 هفته ای کاهش یافته است (شکل 3-12-A). لایه های تکای داخلی نیز به صورت بارز قابل مشاهده می باشند.

عنصر دیگری که به طور خاص در تخمدان های 8 هفته ای قابل ارزیابی می باشد، جسم زرد است. در ساختار جسم زرد علاوه بر مقاطع عروقی فراوان و با اقطار مختلف، دو نوع سلول با ریخت شناسی متفاوت می توان دید: 1- سلولهایی با هسته بزرگ و شفاف و سیتوپلاسم کاملاً روشن که حاوی مقادیر زیادی قطرات لیپیدی بوده که حاکی از فعالیت بالای ترشح استروئیدها توسط این نوع سلول ها می باشد (شکل C-12-3). 2- دسته دوم سلول ها، سیتوپلاسم تیره و سرشار از قطرات لیپیدی داشته و هسته مرکزی آنها کوچکتر از هسته سلول های نوع اول و کشیده تر می باشند (شکل C-12-3). این قطرات لیپیدی در رنگ آمیزی با تالوئیدین بلو به رنگ زرد در آمده اند. سلول های کوچکتر در تعداد نیز بیشتر از سلول های بزرگ تر می باشند. هر دو نوع سلول ارتباط بسیار نزدیکی از جهات مختلف با عروق خونی برقرار کرده اند به طوریکه یک رگ خونی را تعداد بسیاری از سلول ها احاطه کرده اند (شکل C-12-3).

3-2-6-2-3. گروه غیر منجمد پیوندی غیر گنادکتومی (nVTnG)

مقاطع نیمه نازک گروه غیر منجمد پیوندی غیر گنادکتومی، نشان دهنده بستری از سلول های استرومایی است که تعدادی از فولیکول های مراحل مختلف بر روی آن قرار گرفته است. سلول های اپیتلیوم سطحی تخمدان در نمایی کاملاً متفاوت با گروه کنترل و نیز سایر گروه های پیوندی دیده می شود. به این ترتیب که شکل کلی سلول های اپیتلیوم، مکعبی بوده و در برخی مناطق به صورت استوانه ای کشیده در آمده اند. سیتوپلاسم سلول ها شدیداً واکوئلیزه شده و نمایی شبیه به لانه زنبور را ایجاد کرده اند. در زیر اپیتلیوم سطحی، تونیکا آلبوژینه با سلولهای کشیده دیده می شود که در اینجا تا حدودی به ضخامت عرضی هسته های آن افزوده شده است (شکل D-13-3). فولیکول های بدوی در حالیکه سیتوپلاسم سرشار از ارگانل دارند، در زیر لایه آلبوژینه و کاملاً سالم به چشم می خورد (شکل D-13-3). گاهی تخمک فولیکول اولیه در بخش هایی ارتباط خود را با سلول های گرانولوزا از دست داده (شکل 3-13 A) و در مناطقی از استروما نیز بقایای فولیکول های کوچک از بین رفته رؤیت می شوند (شکل 3-13 A, D). سلول های استرومای تخمدان حاوی قطرات لیپیدی فراوان بوده و در برخی نواحی دچار واکوئلیزیشن شدید شده اند (شکل C-13-3 A). همچنین سلول های غول پیکر (PGCs) که در گروه کنترل بدانها اشاره شد در اینجا به چشم نمی خوردند. عروق خونی زیر کپسولی به شدت تحلیل رفته و عروق بزرگ با دیواره ضخیم، در عمق توده بافت پیوندی، تمرکز یافته اند (شکل C, D-13-3).

از ویژگی فولیکول های آنترال در تخمدان های پیوندی این است که لایه های سلولهای گرانولوزا بسیار کمتر از فولیکول های تخمدان طبیعی می باشند (شکل B-13-3). گویی فولیکول ها در تخمدان پیوندی روند بلوغ را زودتر از فولیکول های تخمدان طبیعی طی می کنند به نحوی که گاهی لایه های سلول های گرانولوزا از 3 تا 4 عدد بیشتر تجاوز نمی کنند. گاهی در سیتوپلاسم این سلول ها، واکوئل های کوچکی نیز قابل مشاهده می باشد. سیتوپلاسم تخمک آنترال، سرشار از ارگانل است که بخشی در اطراف هسته و بخشی در زیر غشاء تخمک قرار گرفته اند. غشاء هسته بزرگ تخمک، مواج بوده و هستک مشخصی در

مرکز آن دیده می شود (شکل 3-13-B). اگر چه اندازه تخمک، طبیعی به نظر می رسد اما همانطور که گفته شد، فولیکول آنترال اندازه طبیعی را دارا نیست. زونا پلوسیدا در سطح خارجی خود شدیداً متخلخل بوده و ارتباط خوبی با سلول های گرانولوزای اطراف برقرار کرده است. علی رغم کاهش در تعداد سلول های گرانولوزا، لایه تکای داخلی کامل بوده، سلول های خارجی آن قطرات لیپیدی فراوان دارند و عروق خونی زیادی ما بین سلول های تکای داخلی دیده می شود. تکای خارجی نیز محدوده مشخصی را برای فولیکول ایجاد نموده است (شکل 3-13-B).

3-6-2-3. گروه منجمد پیوندی غیر گنادکتومی (VTnG)

در مقاطع نیمه نازک از گروه VTnG، این طور به نظر می رسد که لایه های سطحی زیرین اپیتلیوم تخمدان به سمت تشکیل بافت فیبروز پیش رفته اند. چرا که اپیتلیوم سطحی مشخص نبوده و جای خود را به بافت فیبروز احاطه کننده عروق سطحی داده است. تونیکا آلبوژینه نیز شدیداً فیبروز شده، از تعداد سلول های آن کاسته شده و حالت موج به خود گرفته است. عروق خونی سطحی تا حدودی نسبت به گروه nVTnG، وسعت پیدا کرده و در بعضی از مناطق، گلبول های سفید در مقاطع عروق عمقی مشاهده می شوند. همچنین تعدادی از ماست سل هایی که سیتوپلاسم آنها سرشار از گرانول های قهوه ای رنگ است در استروما گاهاً قابل مشاهده هستند. در عمق بافت پیوندی، عروق جدید و در حال تشکیل نیز به چشم می خورند که البته اثری از سلول های خونی در آن دیده نمی شود (شکل 3-14-C). فولیکول های بدوی به صورت نامنظم در لابلای سلول های استروما دیده شده که سیتوپلاسم پر ارگانل دارند و هسته بزرگ، گرد و مرکزی آنها به صورت شفاف در مرکز سیتوپلاسم قرار گرفته است (شکل 3-14-B). سلول های استرومایی نیز دارای قطرات چربی زیاد بوده که در بسیاری از موارد دچار تشکیل واکوئل شده اند (شکل 3-14-B).

فولیکول آنترال در حد نسبتاً طبیعی بوده و در بعضی مقاطع مانند شکل 3-14-A، در محل تخمک تنها خطوط نامنظمی مشاهده می شود که نشانگر زونای تو خالی بوده و تخمک آن در اثر آماده سازی بافت از دست رفته است. در اینجا نیز مانند گروه nVTnG، تعداد لایه های سلول های گرانولوزا از 4 یا 5 عدد تجاوز نکرده و هسته این سلول ها به صورت چند شکلی دیده می شود (شکل 3-14-A). نظم سلول های تکای داخلی نیز به هم ریخته و تکای خارجی خیلی گسترده نشده است.

در این گروه نیز مانند گروه کنترل و گروه nVTnG، جسم زرد دیده می شود. سلولهای بزرگ و کوچک در کنار یکدیگر و در حالیکه سرشار از قطرات لیپیدی بوده، قرار گرفته اند اما ارتباط آنها با عروق خونی به گستردگی گروه nVTnG نیست.

3-2-6-4. گروه غیر منجمد پیوندی گنادکتومی (nVTG)

اپیتلیوم سطحی در این گروه و در مقطع نیمه نازک به خوبی نمایان بوده و در برخی نقاط حالت مکعبی داشته و در برخی نقاط دیگر، وضعیت سنگفرشی به خود گرفته است. اتصال سلول های اپیتلیوم سطحی به لایه زیرین خود، محکم بوده اگر چه واکوئل های ریز و کوچک در سیتوپلاسم سلول های آن ها دیده می شود (شکل 3-15-A). تونیکا آلبوژینه در اکثر نواحی شدیداً حالت فیبروز پیدا کرده و عروق زیر کپسولی به ندرت دیده می شود. در سایر مناطق سطح تخمدان، بر اثر رشد فولیکول آنترال، دیواره تخمدان نازک شده و تونیکا آلبوژینه منظم تری بوجود آمده است (شکل 3-15-A). اگر چه سلول های استرومایی دارای قطرات لیپیدی زیادی هستند اما مانند دو گروه nVTG و VTnG خیلی دستخوش فرآیند تشکیل واکوئل نشده اند (شکل 3-15-C). جسم زرد نیز در این گروه با مشخصاتی که برای گروه های قبل گفته شد دیده می شود، با این تفاوت که در اینجا نیز مانند گروه غیر منجمد پیوندی غیر گنادکتومی (nVTG) و بر خلاف گروه منجمد پیوندی غیر گنادکتومی (VTnG)، ارتباط سلول های جسم زرد با عروق خونی زیاد است (شکل 3-15-D). عروق خونی در عمق تخمدان گسترش خوبی دارد و بر خلاف گروه VTnG، تعداد گلبول های سفید بسیار کاهش یافته اند.

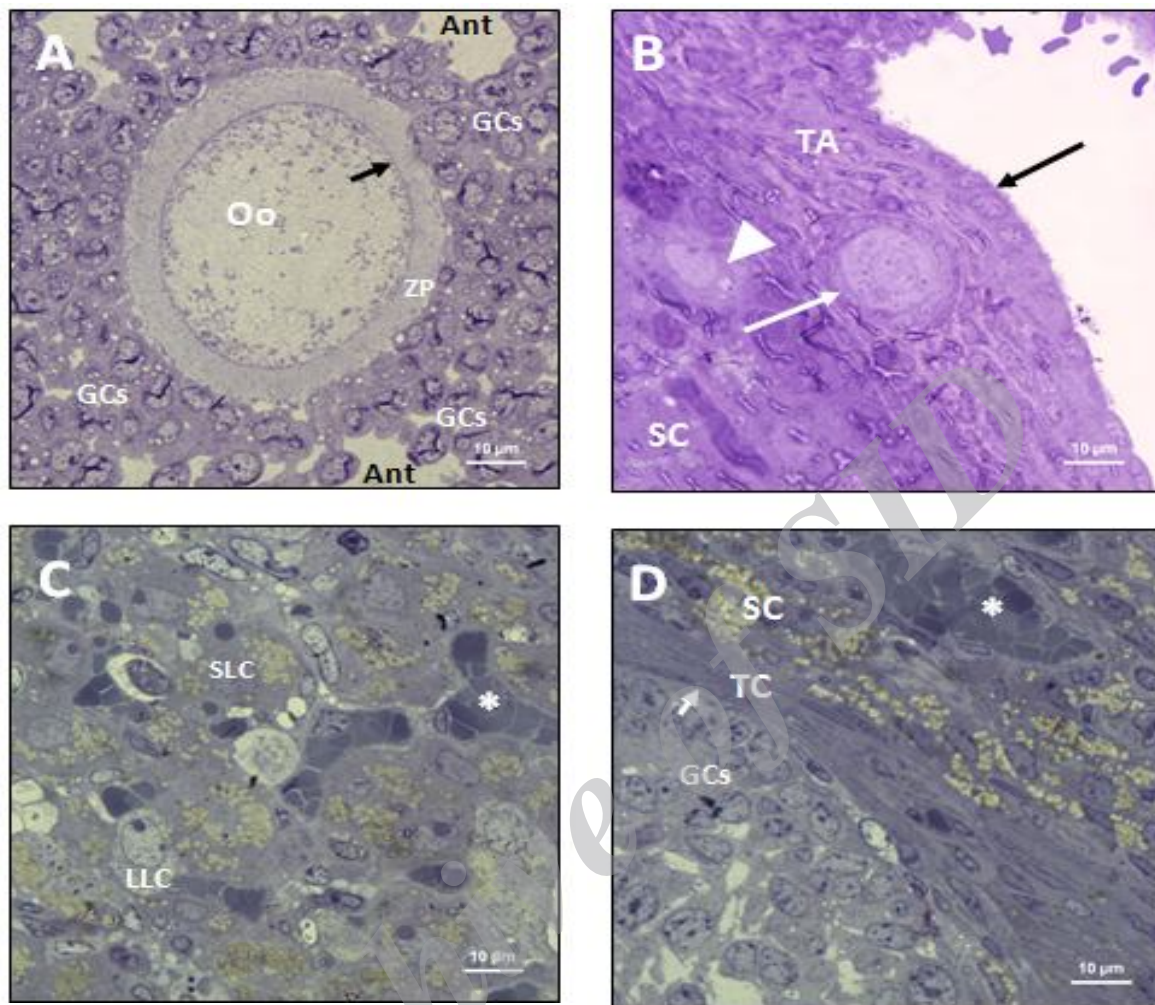
تخمک فولیکول آنترال با هسته گرد و کناری در گوشه ای از فولیکول به چشم می خورد. هسته حاوی هستک واضح بوده و ارگانل ها در سراسر سیتوپلاسم پراکنده می باشند (شکل 3-15-A). اگر چه زونا پلوسیدا با سلول های گرانولوزی کمتری در ارتباط است، اما این ارتباط کاملاً مشخص بوده و حتی زوائد سیتوپلاسمی سلول های گرانولوزا که بر روی غشاء پایه قرار گرفته اند، تا تخمک نیز کشیده شده اند (شکل 3-15-B). لایه های تکای داخلی و خارجی نیز در اطراف فولیکول آنترال با لایه بندی نزدیک به گروه کنترل به صورت کاملاً منظم دیده می شوند (شکل 3-15-B).

3-2-6-5. گروه منجمد پیوندی گنادکتومی (VTG)

در مقاطع نیمه نازک از تخمدان گروه VTG، نمای مطلوبی از اپیتلیوم سطحی به دست نیامد. تونیکا آلبوژینه محدوده معینی نداشته و سلول های دوکی منظم در آن دیده نمی شود. سلول های استروما کمابیش دارای قطرات لیپیدی بوده و گاهاً این قطرات به واکوئل تبدیل شده اند (شکل 3-16-C). مقاطع عروق خونی در سطح تخمدان بسیار کم بوده و در عمق نیز چندان گسترش پیدا نکرده اند. همچنین در این گروه نیز گلبول های سفید نسبت به گروه VTnG، بسیار کمتر می باشند. فولیکول های اولیه و بدوی نیز به صورت پراکنده در استروما قرار گرفته اند. در اینجا بر خلاف حالت طبیعی که سلول های استرومایی لایه تکای داخلی را در اطراف فولیکول های در حال رشد بوجود می آورند، به صورت زودرس لایه تکا را برای فولیکول های اولیه ایجاد می کنند (شکل 3-16-B).

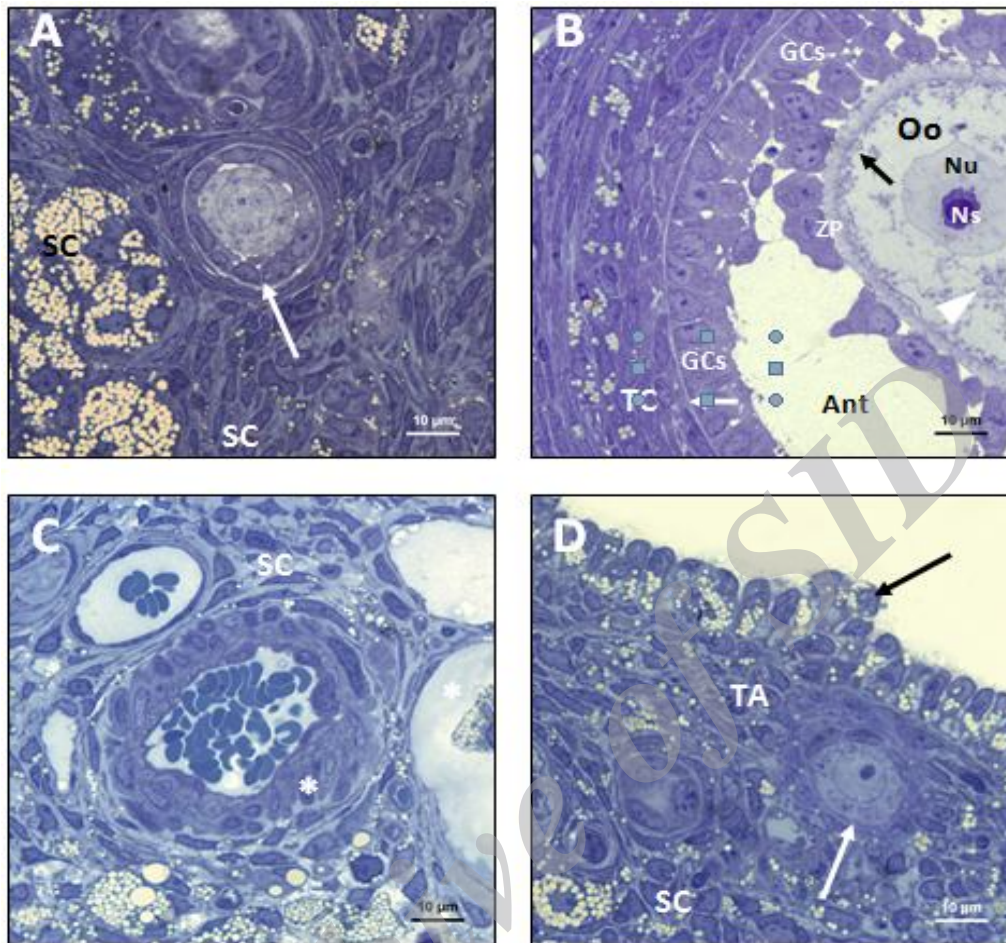
در فولیکول آنترال این گروه، تخمک با اندازه ای مناسب و سیتوپلاسمی که حاوی دو دسته ارگانل بوده (مرکزی و محیطی) خودنمایی می کند (شکل A-16-3). زونا پلوسیدا به صورت مناسبی حاوی زوائد سلولی و میکروولی تخمک در ارتباط با سلول های گرانولوزا قرار دارد (شکل A-16-3). هسته سلول های گرانولوزا گرد، بزرگ و روشن بوده، سلول های گرانولوزا نسبت به سایر گروه های پیوندی از تعداد بیشتری برخوردارند و دیواره ای ضخیم را در اطراف تخمک ایجاد نموده اند (شکل A, B-16-3). لایه تکای داخلی با عروق خونی مناسب در اطراف فولیکول و در سمت داخل لایه تکای خارجی به چشم می خورد. جسم زرد، کوچک و شامل هر دو نوع سلول بزرگ و کوچک می باشد که البته تعداد سلول های بزرگ آن کاهش قابل توجهی یافته است (شکل D-16-3).

Archive of SID



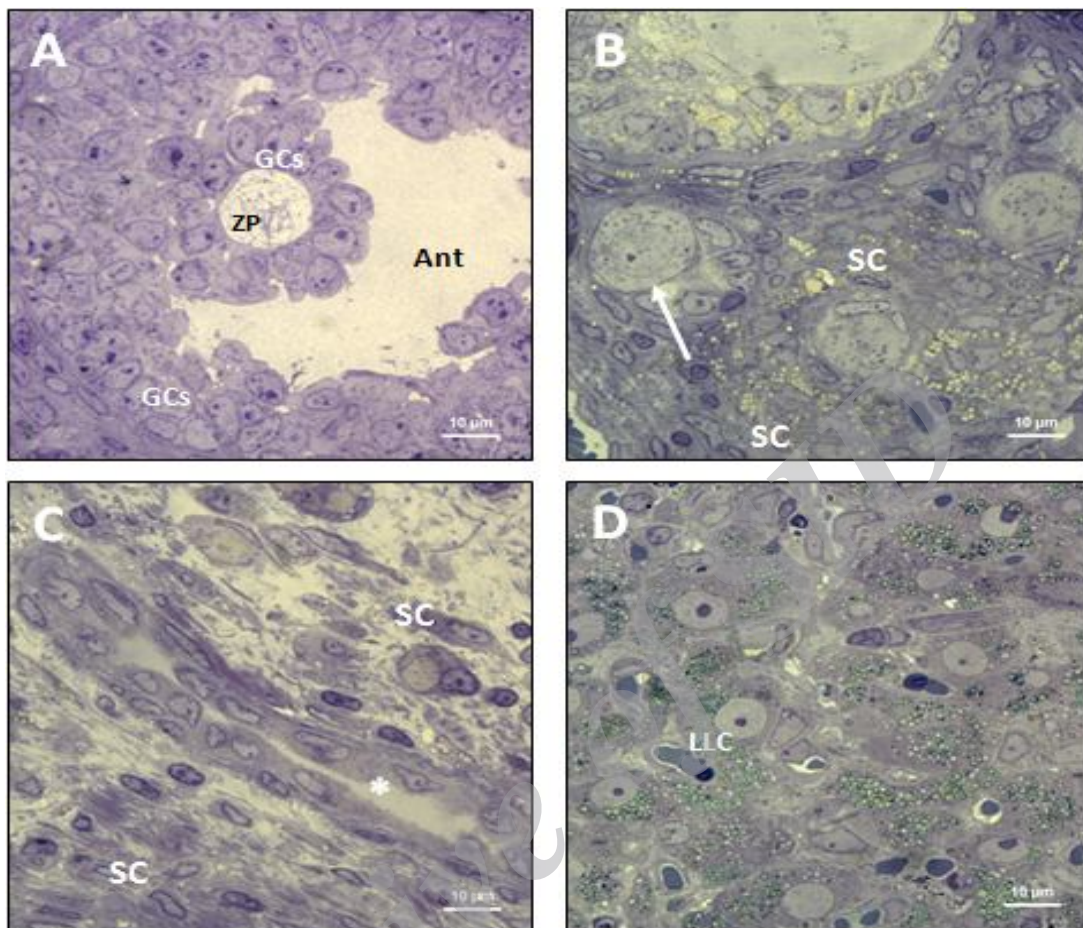
شکل 3-12: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه کنترل 8 هفته ای

- Oo: Oocyte
- GCs: Granulosa Cells
- SC: Stroma Cell
- TC: Theca Cell
- TA: Tunica Albuginea
- LLC: Large Luteal Cell
- SLC: Small Luteal Cell
- Ant: Antrum
- ZP: Zona Pellucida
- *: Blood vessels
- Large White Arrow: Small Follicles
- Small White Arrow: Basement Membrane
- Large Black Arrow: Surface Epithelium
- Small Black Arrow: Oolema
- Arrow Head: Germ Cells



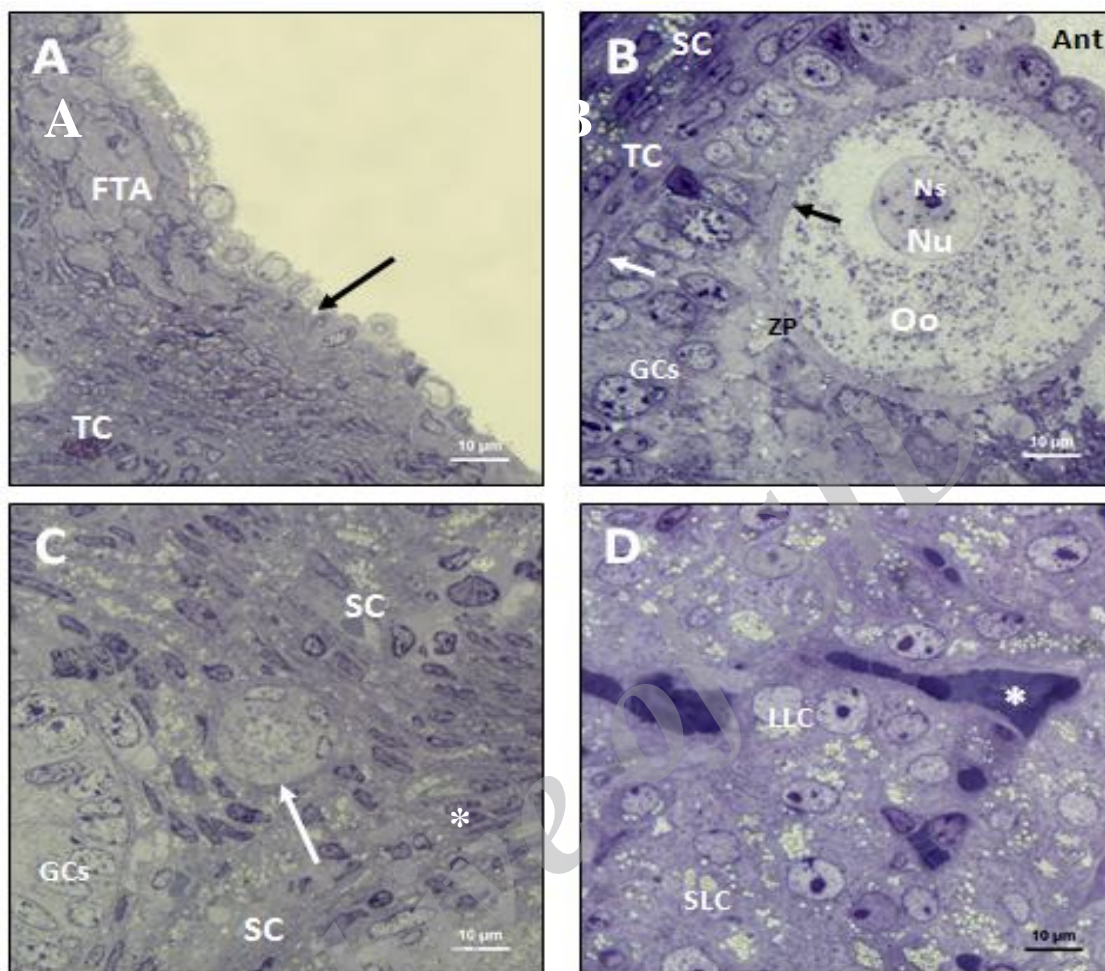
شکل 3-13: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه غیر منجمد پیوندی غیر گنادکتومی (nVTnG)

- Oo: Oocyte
- GCs: Granulosa Cells
- SC: Stroma Cell
- TC: Theca Cell
- TA: Tunica Albuginea
- Ant: Antrum
- ZP: Zona Pellucida
- *: Blood vessels
- Large White Arrow: Small Follicles
- Small White Arrow: Basement Membrane
- Large Black Arrow: Surface Epithelium
- Small Black Arrow: Oolema
- Arrow Head: Diffuse Cytoplasmic Organelles



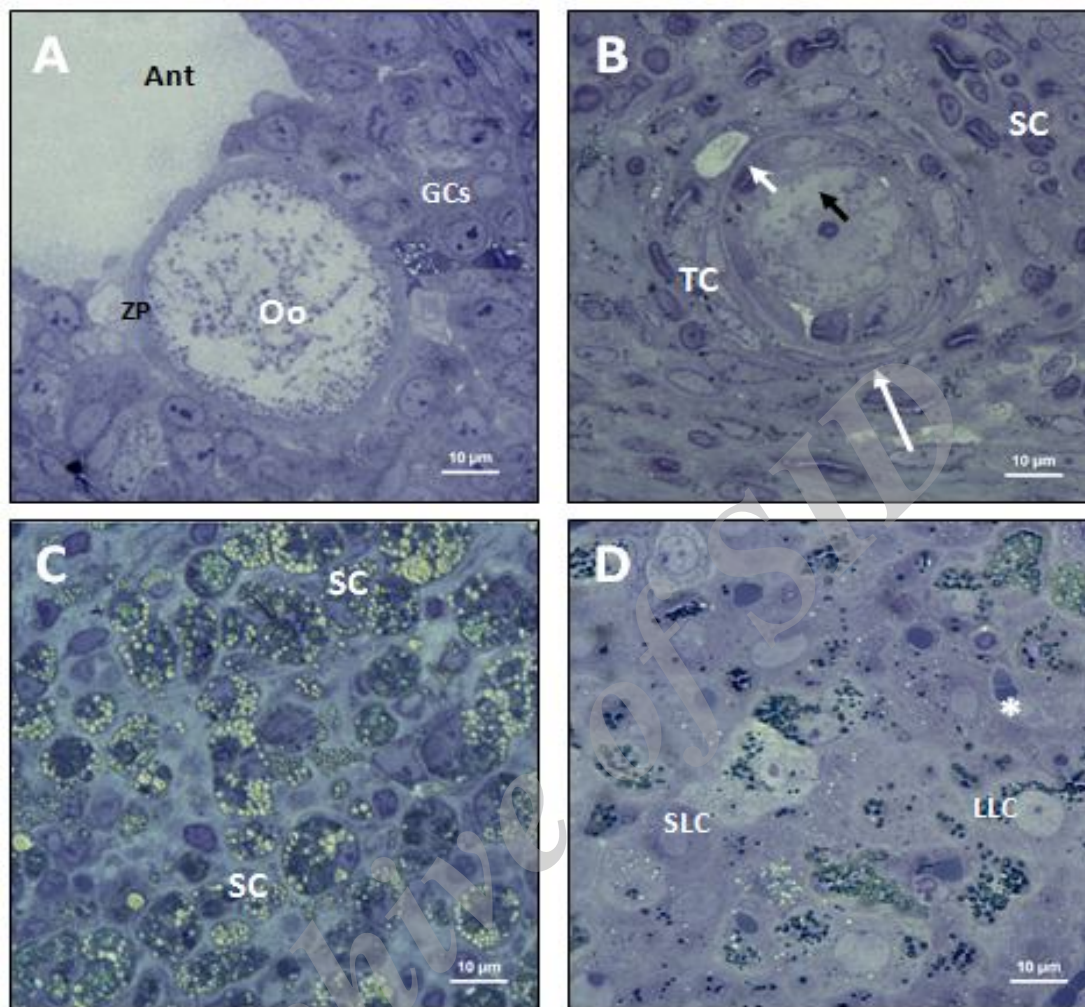
شکل 3-14: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه منجمد پیوندی غیر گنادکتومی (VTnG)

GCs: Granulosa Cells
 SC: Stroma Cell
 TC: Theca Cell
 TA: Tunica Albuginea
 LLC: Large Luteal Cell
 SLC: Small Luteal Cell
 ZP: Zona Pellucida
 Ant: Antrum
 *: Neo-Vasculogenesis
 Large White Arrow: Small Follicles



شکل 3-15: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه غیر منجمد پیوندی گنادکتومی (nVTG)

- Oo: Oocyte
- GCs: Granulosa Cells
- SC: Stroma Cell
- TC: Theca Cell
- FTA: Fibrotic Tunica Albuginea
- LLC: Large Luteal Cell
- SLC: Small Luteal Cell
- Ant: Antrum
- ZP: Zona Pellucida
- *: Blood vessels
- Large White Arrow: Small Follicles
- Small White Arrow: Basement Membrane
- Large Black Arrow: Surface Epithelium
- Small Black Arrow: Oolema



شکل 3-16: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه منجمد پیوندی گنادکتومی (VTG)

- Oo: Oocyte
- GCs: Granulosa Cells
- SC: Stroma Cell
- TC: Theca Cell
- LLC: Large Luteal Cell
- SLC: Small Luteal Cell
- Ant: Antrum
- ZP: Zona Pellucida
- *: Blood vessels
- Large White Arrow: Small Follicles
- Small White Arrow: Bamentse Membrane
- Small Black Arrow: Oolema

3-2-7. بررسی فراساختار فولیکول های بدوی تخمدانهای موش صحرایی منجمد - ذوب شده

پس از پیوند به خودی

3-2-7-1. گروه غیر منجمد پیوندی غیر گنادکتومی (nVTnG)

در مقطع فوق نازک از تخمدان گروه nVTnG، پس از 3 هفته پیوند، فولیکول اولیه با یک لایه سلول مکعبی مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل 3-17-A). هسته تخمک به صورت گرد و مرکزی در وسط سیتوپلاسم قرار گرفته کاملاً یوکروماتین می باشد. غشاء هسته تمامیت خود را حفظ کرده، اما تعداد منافذ هسته نسبت به گروه کنترل، کاهش یافته و نامنظم دیده می شوند (شکل 3-17-B, C). سیتوپلاسم ارگانل های زیاد و پراکنده دارد که میتوکندری های تو خالی حجیم شده و یا حاوی کریستاهای کم و حاشیه ای در آن نسبت به گروه کنترل افزایش یافته اند (شکل 3-17-D, B). افزایش اجسام مالتی وزیکولار (MVB) نیز از دیگر ویژگی های این گروه است (شکل 3-17-E). در سیتوپلاسم تخمک فولیکول اولیه در اکثر گروه های پیوندی، عناصر تیره رنگی وجود دارند که مشابه گرانول های قشری (CG¹) بوده و در بیشتر موارد نزدیک به غشاء تخمک قرار گرفته اند (شکل 3-17-B). غشاء تخمک اگر چه تمامیت خود را حفظ کرده، اما در برخی نواحی از سلول های گرانولوزا فاصله گرفته است (شکل 3-17-A, B). میکروویلی های تخمک در فضای خارج سلولی قرار گرفته و حتی در مناطقی که دو غشاء از یکدیگر فاصله گرفته اند، میکروویلی ها توانسته اند خود را تا غشاء سلول های گرانولوزا نیز برسانند (شکل 3-17-B, D). سلول های گرانولوزا دارای هسته هایی تقریباً چهار وجهی بوده، اما نسبت به گروه کنترل از میزان فرو رفتگی های غشاء هسته که در حالت طبیعی در اکثر سلول های گرانولوزا دیده می شود، به شدت کاسته شده است (شکل 3-17-A, D). سیتوپلاسم سرشار از ارگانل بوده ولی تعداد قابل توجهی از میتوکندری ها آسیب دیده اند اگر چه میتوکندری میله ای کوتاه و طبیعی که کریستاهای عرضی زیادی دارند نیز به چشم خورده و قطرات لیپیدی نیز در سیتوپلاسم مشاهده نمی شود (شکل 3-17-H). هسته سلول گرانولوزا نسبتاً تیره بوده و هتروکروماتین مارژینال بارزی دارد (شکل 3-17-A, G). سلول های گرانولوزا با یکدیگر ارتباط نزدیکی داشته، میکروویلی های آنها نیز در فضای بین دو غشاء سلول های گرانولوزا و تخمک قابل مشاهده هستند (شکل 3-17-H). غشاء پایه سلول های گرانولوزا نسبت به گروه های دیگر ضخیم بوده و تا چند برابر افزایش یافته است (شکل 3-17-G, H). سلول های تکا به دنبال هم اطراف سلول های گرانولوزا را احاطه کرده و زوائد سلولی آنها در سمت داخل خود، با یکدیگر هم پوشانی می کنند (شکل 3-17-G, H). سیتوپلاسم سلول های تکا به دلیل حضور هسته حجیم بسیار باریک بوده و حاوی ارگانل های کمی است. بزرگترین عنصر در سیتوپلاسم هسته تیره ای است که هتروکروماتین مارژینال شدید در آن دیده می شود (شکل 3-17-A, G, H).

¹ Cortical Granules

3-2-7-2-3. گروه منجمد پیوندی غیر گنادکتومی (VTnG)

در مقطع بسیار نازک از گروه VTnG، فولیکول اولیه حاوی یک ردیف سلول گرانولوزای مکعبی مورد بررسی قرار گرفت (شکل A-18-3). در نمای کلی سیتوپلاسم تخمک سرشار از ارگانل بوده و می توان گفت که بیشترین تعداد ارگانل چه نسبت به گروه کنترل و چه نسبت به گروه های پیوندی دیگر را دارا می باشد (شکل A-18-3). در تخمدان این گروه، هسته تخمک کاملاً گرد و مرکزی بوده، غشاء هسته دست نخورده و دارای منافذ هسته ای کمتر از گروه کنترل و تقریباً معادل گروه nVTnG دیده می شود (شکل A, B-18-3). میتوکندری با اشکال مختلف در سیتوپلاسم تخمک این گروه دیده می شود؛ میله ای طبیعی با کریستاهای عرضی، میتوکندری توخالی و فاقد کریستا، دایره ای طبیعی با کریستاهای کناری و دایره ای با کریستاهای مرکزی متراکم و تیره (شکل B-18-3). دستگاه گلژی فعال در کنار هسته در برخی نواحی سیتوپلاسم دیده شده و SER نیز بارزتر از گروه nVTnG در کنار میتوکندری ها نمایان است (شکل B, C, E-18-3). از دیگر عناصر بارز در این گروه MVB است که در مرکز سیتوپلاسم و به تعداد قابل توجهی خود نمایی می کنند (شکل F-18-3). غشاء تخمک در ارتباط بسیار نزدیک با سلول های گرانولوزا بوده و در مناطق بسیار کمی از این سلول ها فاصله گرفته است. اتصالات شکاف دار نیز به وضوح و با تعداد مناسب قابل تشخیص هستند. همچنین در بین غشاء سلول های فوق میکروویلی های طبیعی و در تعداد زیاد نسبت به گروه های کنترل و nVTnG دیده می شوند (شکل D-18-3).

سلول های گرانولوزا دارای هسته یوکروماتین بوده و به مقدار کمی هتروکروماتین مارژینال در آن ها دیده می شود. در بین سلول های گرانولوزا، سلول آرتیک و نیز ماکروفاژهای هجوم آورده به فولیکول نیز دیده می شوند (شکل A-18-3). سلول های گرانولوزا نیز با یکدیگر ارتباط بسیار نزدیکی داشته و میکروویلی های آن ها در فاصله دو غشاء قابل تشخیص است (شکل A, G, H-18-3). افزایش سطح سیتوپلاسم در سلول های گرانولوزا منجر به افزایش ارگانل ها به خصوص میتوکندری های میله ای شکل و SER شده است (شکل G, H-18-3). سلول های تکای داخلی نیز با نمایی کاملاً متفاوت با گروه nVTnG به صورت یوکروماتین در سمت خارج غشاء پایه ضخیم سلول های گرانولوزا صف آرایی کرده اند (شکل A, G, H-18-3).

3-3-7-2-3. گروه منجمد پیوندی گنادکتومی (VTG)

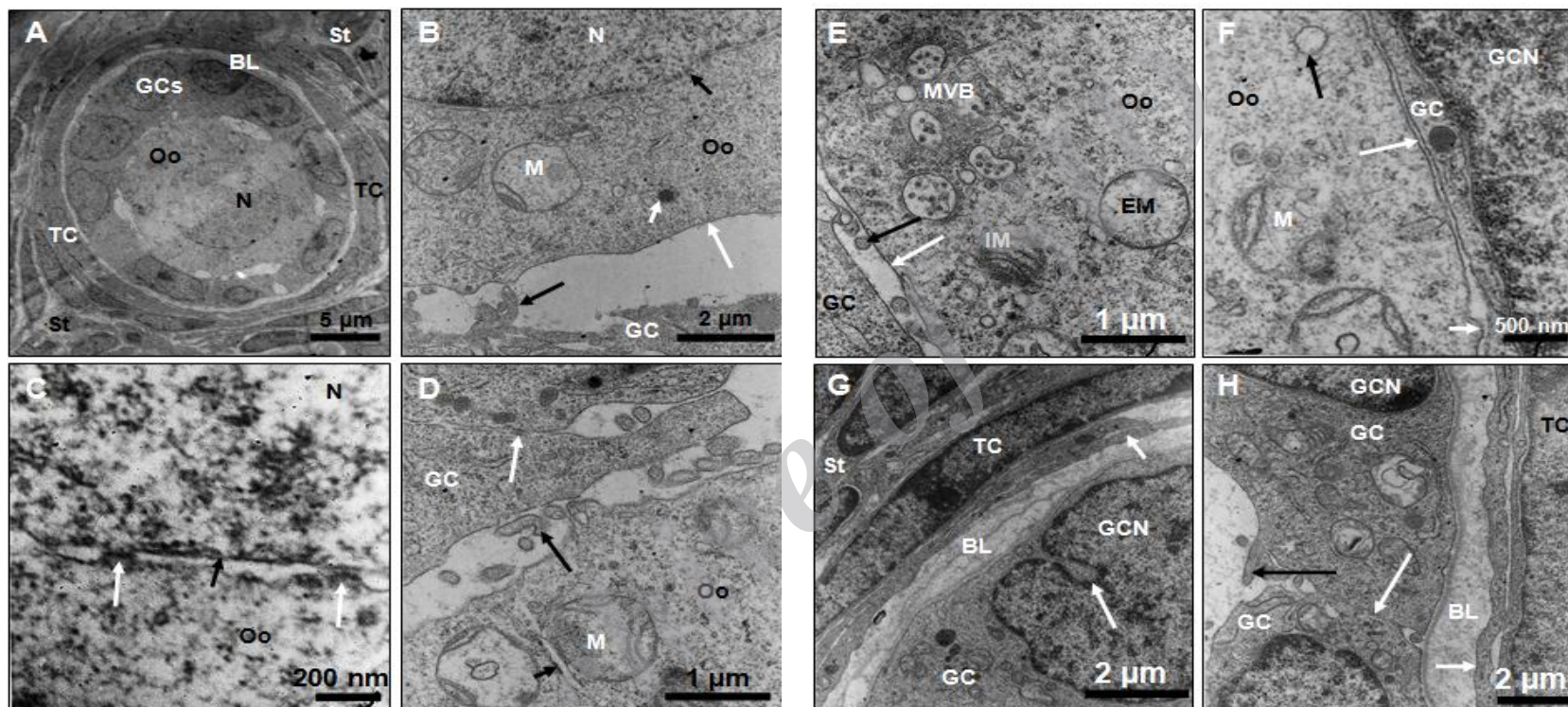
مقطع بسیار نازک از تخمدان گروه VTG، نمایی از یک فولیکول بدوی را نمایش می دهد (شکل 3-19). هسته تخمک اولیه گرد، بزرگ و یوکروماتین در مرکز سیتوپلاسم قرار داشته و تا حدودی هتروکروماتین مارژینال در آن افزایش پیدا کرده است (شکل A-19-3). هتروکروماتینی هسته در گروه های گنادکتومی نسبت به گروه های غیر گنادکتومی افزایش نشان می دهد. منافذ هسته کمتر از دو گروه غیر گنادکتومی (nVTnG و VTnG) می باشد. سیتوپلاسم تخمک سرشار از ارگانل است که البته از گروه های غیر گنادکتومی کمتر می باشد (شکل A-19-3). میتوکندری ها دایره ای، حجیم و حاوی

کریستاهای بیشتر و منظم تری نسبت به دو گروه دیگر هستند. همچنین دستگاه گلژی فعالی در کنار دسته ای از میتوکندری ها قابل مشاهده است. از جمله نکات قابل توجه در سیتوپلاسم تخمک گروه های گنادکتومی، اجسام متراکم و تیره ای می باشند که نمای گرانول های قشری را دارند. این عناصر ابتدا در کنار میتوکندری دیده شده و بیشتر آن ها در محیط سیتوپلاسم و نزدیک غشاء تخمک جا گرفته اند (شکل B, C, D-19-3). در کنار میتوکندری ها SER واضح و مشخص نیز به چشم می خورد (شکل D-19-3). علاوه بر این در بخش هایی از سیتوپلاسم، میتوکندری های غیر طبیعی با کریستاهای متراکم و تیره وجود داشته که در کنار آن ها اجسام مالتی وزیکولار (MVB) نیز دیده می شود (شکل G-19-3). یکی دیگر از عناصر قابل توجه در تخمک این گروه، حضور اجسام متراکم رشته ای است در زیر غشاء که رشته های آن عمود بر غشاء و موازی با یکدیگر دیده می شوند (شکل H-19-3). غشاء تخمک بدون فاصله گرفتن از سلول های گرانولوزا، تمامیت خود را حفظ کرده و میکروویلی های با تعداد و اندازه های طبیعی را در خارج سلول نمایان ساخته است (شکل F-19-3).

سلول های گرانولوزا هسته های کشیده و با هتروکروماتینی مارژینال داشته که البته نسبت به دو گروه غیر گنادکتومی کمتر شده است (شکل G-19-3).

3-2-7-4. گروه غیر منجمد پیوندی گنادکتومی (nVTG)

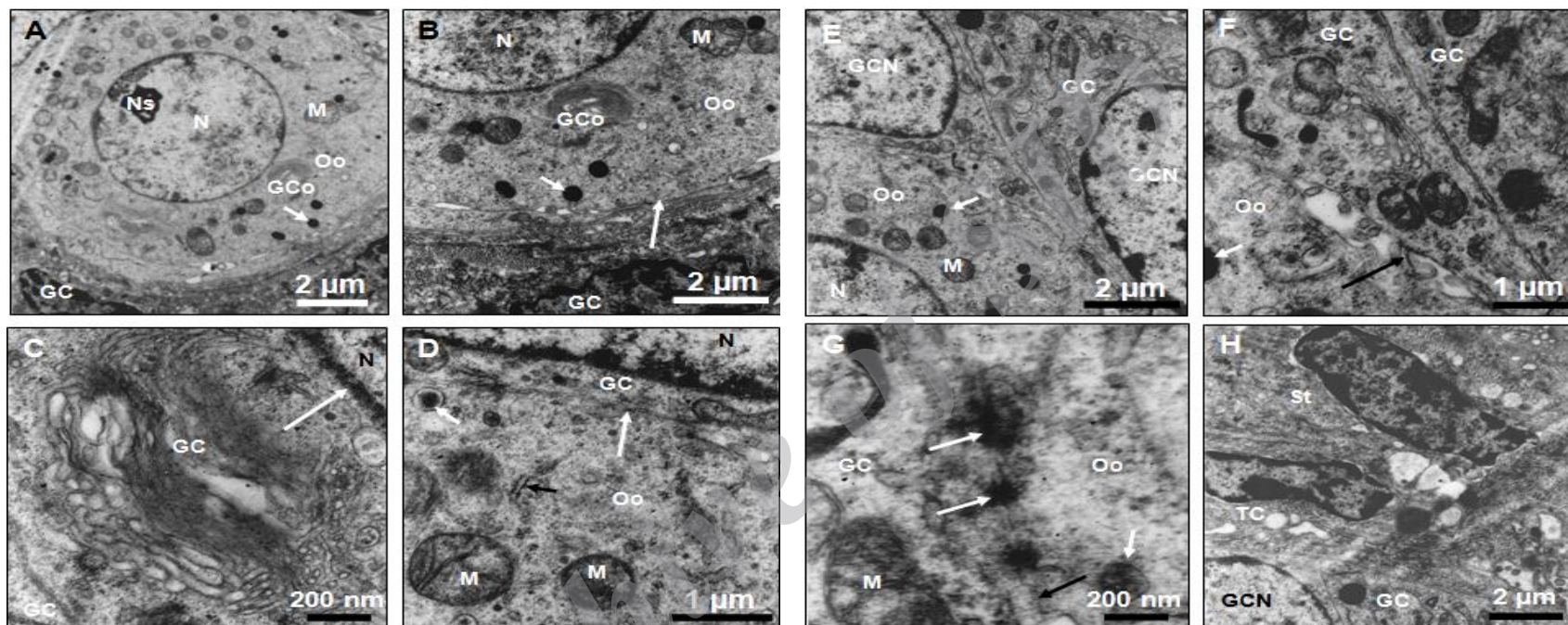
مقطع فوق نازک از گروه nVTG، تا حدود زیادی تغییراتی مشابه گروه VTG داشته است. در مقطع تخمدان این گروه یک فولیکول بدوی مورد ارزیابی قرار گرفته است (شکل A-20-3). هسته همانند گروه دیگر گنادکتومی از هتروکروماتینی بیشتری برخوردار شده، منافذ آن نیز کاهش یافته و هستک در گوشه ای از هسته دیده می شود (شکل A, B, C-20-3). سیتوپلاسم حاوی ارگانل زیاد بوده و میتوکندری دایره ای طبیعی با کریستاهای کناری در آن دیده می شود. دستگاه گلژی فعال در کنار هسته به وضوح قابل مشاهده است (شکل C, D-20-3). در این گروه نیز مانند گروه گنادکتومی VTG، گرانول های زیادی مشابه گرانول های قشری (CG) دیده می شود که از ویژگی گروه های گنادکتومی است (شکل 3-A, B-20). سلول های گرانولوزا به شدت سرشار از ارگانل های طبیعی بوده و برخی هسته یوکروماتین و برخی هتروکروماتین دارند. همچنین اتصالات کامل و بسیار فشرده بین سلول های گرانولوزا دیده می شود (شکل A, E-20-3). هسته سلول های تکا و سلول های استرومایی نزدیک فولیکول نسبت به گروههای دیگر تیره تر و متراکم تر می باشد (شکل H-20-3).



شکل 3-17: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه غیر منجمد پیوندی غیر گنادکتومی (nVTnG). تغییرات فراساختار فولیکول اولیه در گروه nVTnG نسبت به سایر گروه های

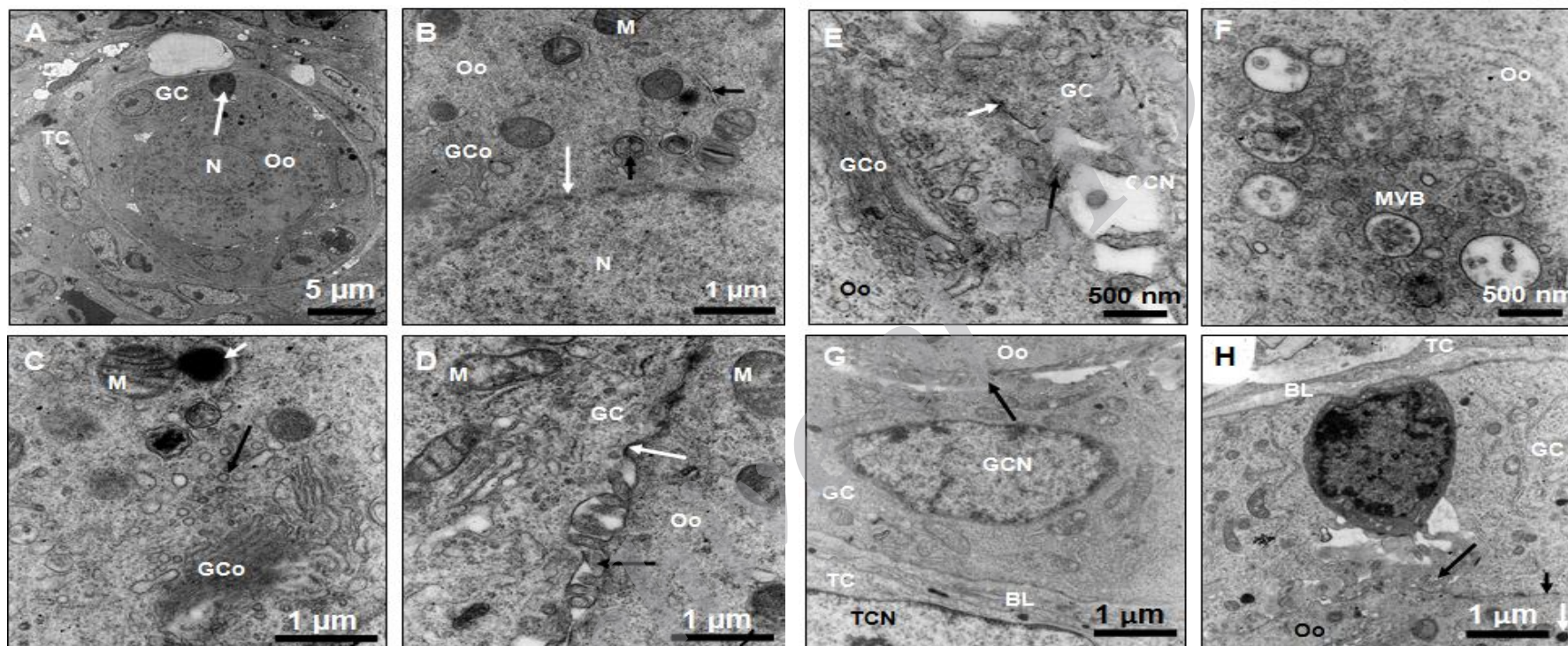
پیوندی و کنترل تفاوت چندانی نشان نمی دهد.

Oo: Oocyte, GC: Granulosa Cell, GCN: Granulosa Cell Nucleus, N: Nucleus, Ns: Nucleolus, M: Mitochondria, IM: Immature Mitochondria, EM: Empty Mitochondria, MVB: Multi Vesicular Body, GCo: Golgi Complex, BL: Basal Lamina, TC: Theca Cell, St: Stroma, Large White Arrow: B, E, F) Oolema, C) Nuclear Pores, D, H) Gap Junction between Granulosa cells, G) Nuclear Transportation, Small White Arrow: B) Cortical Granule, F) Gap Junction



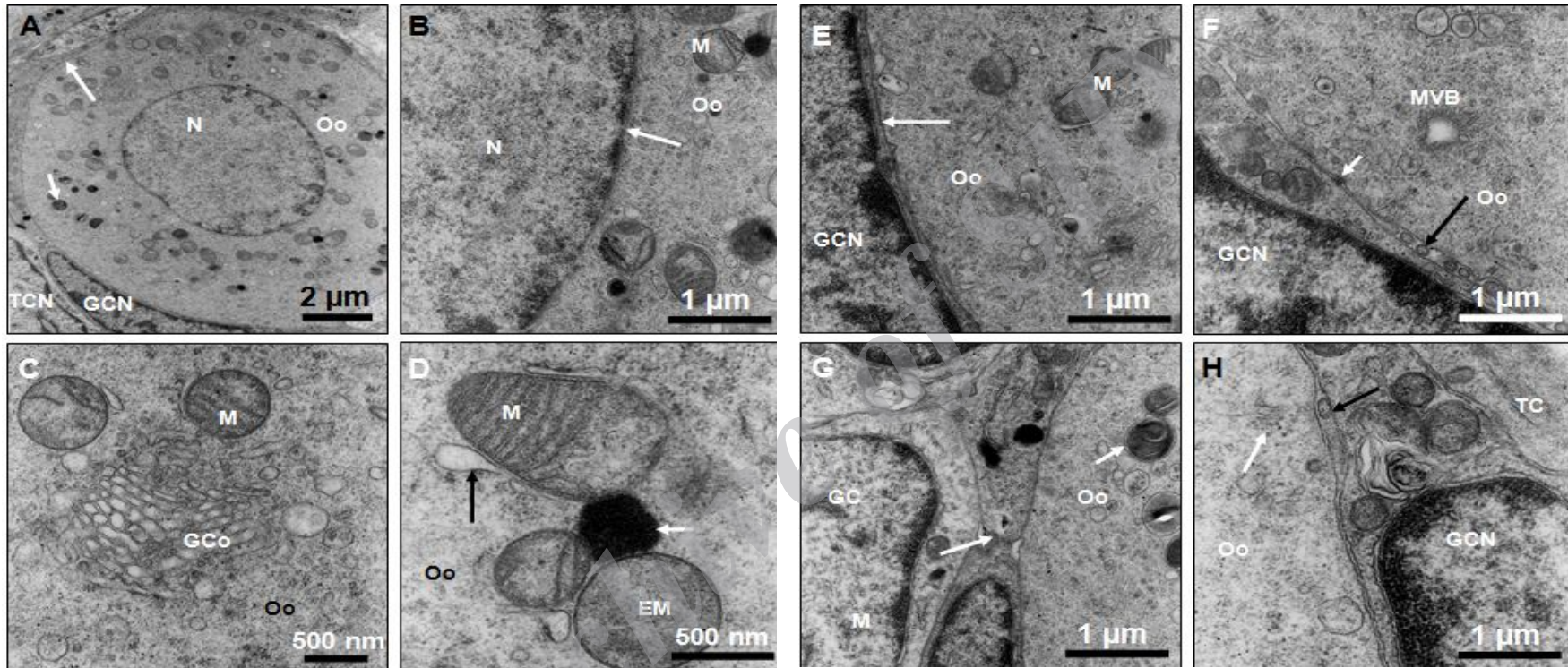
شکل ۳-۱۸: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه منجمد پیوندی غیر گنادکتومی (VTnG). تغییرات فراساختار فولیکول بدوی در گروه VTnG نسبت به سایر گروه های پیوندی و کنترل تفاوت چندانی نشان نمی دهد.

Oo: Oocyte, GC: Granulosa Cell, GCN: Granulosa Cell Nucleus, N: Nucleus, Ns: Nucleolus, M: Mitochondria, IM: Immature Mitochondria, MVB: Multi Vesicular Body, GCo: Golgi Complex, BL: Basal Lamina, TC: Theca Cell, St: Stroma, Large White Arrow: B) Oolema, C) Nuclear Pores, D) Gap Junction between Granulosa cells, D, G) Gap Junction between Oocyte and Granulosa Cell, Small White Arrow: A, B, E, G) Cortical Granule, Large Black Arrow: F) Oocyte Microvilli, F) Vacuole, G) Oolema, Small Black Arrow: B, C) Nuclear Envelop, D) Rough Endoplasmic Reticulum



شکل 3-19: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه غیر منجمد پیوندی گنادکتومی (nVTG). تغییرات فراساختار فولیکول اولی، در گروه nVTG نسبت به سایر گروه های پیوندی و کنترل تفاوت چندانی نشان نمی دهد.

Oo: Oocyte, GC: Granulosa Cell, GCN: Granulosa Cell Nucleus, N: Nucleus, Ns: Nucleolus, M: Mitochondria, IM: Immature Mitochondria, MVB: Multi Vesicular Body, GCo: Golgi Complex, BL: Basal Lamina, TC: Theca Cell, St: Stroma, Large White Arrow: A) Pyknotic Granulosa Cells, B) Nuclear Pores, D) Gap Junction between Granulosa cells, Small White Arrow: C, H) Cortical Granule, E) Gap Junction between Oocyte and Granulosa Cell, Large Black Arrow: C) Secretory Materials from Golgi Complex, D, E, G, H) Oocyte Microvilli, Small Black Arrow: B) Rough Endoplasmic Reticulum, H) Colema



شکل 3-20: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه منجمد پیوندی گنادکتومی (VTG). تغییرات فراساختار فولیکول بدوی در گروه VTG نسبت به سایر گروه های پیوندی و کنترل تفاوت چندانی نشان نمی دهد.

Oo: Oocyte, GC: Granulosa Cell, GCN: Granulosa Cell Nucleus, N: Nucleus, Ns: Nucleolus, M: Mitochondria, EM: Empty Mitochondria, MVB: Multi Vesicular Body, GCo: Golgi Complex, BL: Basal Lamina, TC: Theca Cell, St: Stroma, Large White Arrow: A, E) Oolema, B) Nuclear Pores, G) Gap Junction between Granulosa cells, Small White Arrow: A) Cortical Granule, F) Gap Junction between Oocyte and Granulosa Cell, D, G) Degenerated Mitochondria, Large Black Arrow: F) Oocyte Microvilli, Small Black Arrow: D) Rough Endoplasmic Reticulum

فصل چہارم

بحث

Archive of SID

فصل چهارم بحث

1-4. انجماد شیشه ای و مقایسه اثر ترکیبات مختلف ضد یخ

1-1-4. تغییرات ساختار و فراساختار تخمدان کامل موش صحرایی پس از انجماد شیشه ای با

ترکیبات مختلف ضد یخ

در مطالعه حاضر تأثیر ترکیبات مختلف ضد یخ بر میزان سالم ماندن فولیکولها و نیز بروز آپوپتوز پس از انجماد شیشه ای تخمدان کامل موش صحرایی 5 هفته ای بررسی شده است. مطالعات مشابهی نیز در مقایسه اثرات ضد یخ های مختلف بر بافت تخمدان انسان [74, 217]، گوسفند [218, 219]، بز [70, 220]، گاو [221]، گربه [222]، جنین [223] و سمن گراز [224] صورت گرفته است. همچنین در مطالعات دیگری فراساختار بافت تخمدان گاو تحت تأثیر ضد یخهای مختلف مورد بررسی قرار گرفته [71] و گزارش شده که ترکیب ضد یخهای DMSO و PROH در حفظ بافت تخمدان گاو نسبت به سایر ضد یخ ها موفقتر بوده است. پس از انجماد به سلولها و بافت اجازه بیشتری برای برگشت به حالت طبیعی می دهد. بنابراین ما نیز پس از انجماد در حدود 0/5 ساعت تخمدانها را انکوبه نمودیم.

در پژوهش حاضر اثر ترکیبات مختلف سه ضد یخ EG، DMSO و PROH بر بافت تخمدان کامل موش صحرایی 5 هفته ای بررسی شد. از طرف دیگر اثر این ترکیبات در حضور سوکروز و یا بدون آن نیز مقایسه گردید. به منظور بررسی میزان سمیت محلولهای انجمادی، برای هر گروه آزمایشی تست سمیت نیز صورت گرفت. به این ترتیب که تخمدانها ابتدا با محلول انجمادی تیمار شده، سپس بدون ورود به نیتروژن بلافاصله وارد مرحله ذوب (آب دهی) شدند. با این روش می توان دریافت که آسیبهای وارد شده به بافت تخمدان در نتیجه کاهش دما بوده یا اینکه محلول های حاوی ضد یخ های سمی موجب آن شده است.

بیشترین میزان فولیکولهای سالم در بافت تخمدان گروه کنترل فولیکولهای بدوی بودند ($36/53 \pm 0/03$ %). پس از انجماد در همه گروههای انجمادی بیشترین آسیب بر این نوع فولیکول وارد شد به طوری که در دو گروه انجمادی V_{II} ($11/28 \pm 0/01$ %) و V_{VI} ($8/81 \pm 0/02$ %) کمترین تعداد فولیکولهای بدوی سالم مشاهده گردید که البته اختلاف در تعداد فولیکولهای بدوی در تمامی گروههای انجمادی با گروه کنترل معنی دار بود. در این بین بیشترین تعداد فولیکولهای سالم مربوط به گروه V_{IV} ($19/04 \pm 0/03$ %) بوده که البته این میزان با گروه کنترل و گروه V_{VI} ($8/81 \pm 0/02$ %) تفاوت معنی دار داشت. اما به نظر می رسد زمانی که سوکروز به میزان 0/25 مول در لیتر به ترکیبات ضد یخ ها اضافه شده است، در هر ترکیب اثر گذاری متفاوتی در حفظ گونه های مختلف فولیکولی داشته است. به طوری که در برخی گروهها موجب کاهش فولیکولهای سالم و در بعضی دیگر موجب حفظ آنها شده است. البته این اثرات چندان بین گروههای انجمادی معنی دار نبوده است. شاید به همین دلیل است که در برخی مطالعات سوکروز را از ترکیبات ضد یخ خارج می کنند و نقش دی ساکاریدها را

در فرآیند انجماد ناچیز دانسته و به همین دلیل از محلولهای فاقد سوکروز¹⁶⁹ استفاده می کنند [227]. با این حال سوکروز به عنوان یک دی ساکارید نقش بسزایی در موفقیت انجماد داشته است [228]، چرا که استفاده از آن موجب کاهش میزان سمیت مواد ضدیخ شده و سرعت نفوذ ضدیخهای نفوذ کننده را افزایش می دهد [229]. همچنین سوکروز به عنوان یک دی ساکارید، به دلیل اینکه در اطراف سلول قرار می گیرد، می تواند نقش بالشتکی را ایفاء کند که سلول را تا حدودی از آسیبهای فیزیکی و مکانیکی حفظ می نماید [230]. البته این نکته مهم به نظر می رسد که باید اثر سوکروز بر فراساختار بافت نیز بررسی شود تا جنبه های مختلف اثرات آن مشخص گردد، چرا که در بسیاری از موارد ظاهر سلول و بافت حکایت درستی از ساختار درونی آن ندارد [231]. زمانی که گروههای تست سمیت مورد ارزیابی دقیقتری قرار گرفتند، مشاهده شد که سوکروز با ترکیبات ضدیخهای DMSO + EG و DMSO + PROH (به ترتیب گروههای T_{VI} و T_{IV}) موجب افزایش سمیت محلولهای انجمادی شده، به طوریکه در حفظ اکثر فولیکولها ناموفق بوده است. اما سوکروز به همراه ترکیب دو ضدیخ EG + PROH (گروه T_V) در حفظ انواع مختلف فولیکولها اثر بهتری داشته است. از آنجائیکه DMSO در دو گروه T_{VI} و T_{IV} مشترک است، می توان گفت که شاید سوکروز به همراه DMSO موجب افزایش سمیت محلول انجمادی می شود. البته این نتیجه تا حدودی با نتایج مطالعه قبلی ما متفاوت است. در مطالعه قبلی، ما اثر ترکیب ضدیخهای EG + DMSO به همراه 0/25 مول در لیتر سوکروز را بر روی قطعات قشر تخمدان گوسفند بررسی کردیم [62]. نتایج نشان داد که در گروه تست سمیت تقریباً کل فولیکولها نسبت به گروه انجمادی بهتر حفظ شده بودند، که این میزان در تعداد فولیکولهای پراآنترال معنی دار بود (به ترتیب 80/00 ± 2/00% و 42/00 ± 1/90%). این امر نتیجه آن است که احتمالاً ترکیبات مختلف ضدیخ در گونه های جانوری اثرات متفاوتی دارند و این اثرات وابسته به گونه است و حتی اثر استفاده از آن در سلولها و بافتهای مختلف یک گونه نیز می تواند متفاوت باشد [232]. بنابراین استفاده از سوکروز به عنوان یک دی ساکارید در تمامی گونه ها و نمونه ها ضروری به نظر نمی رسد.

EG و DMSO در بسیاری از مطالعات به عنوان ضدیخهای مناسب در انجماد بافت تخمدان معرفی شده اند. از جمله می توان به موارد زیر اشاره نمود: گاو [221]، بز [70, 220]، گوسفند [62, 219]، انسان [43] و گربه [222]. در برخی مطالعات EG بهتر از DMSO معرفی شده [220, 221] و در برخی دیگر نتایج معکوس است [71, 219]. مطالعاتی نیز به دلیل نفوذ خوب DMSO، آن را برای انجماد انواع مجموعه های سلولی مثبت دانسته اند [233]. همچنین Lucci و همکارانش اثر ضدیخهای فوق و PROH را به تنهایی بر بافت تخمدان گاو بررسی نموده و نتیجه گرفته است که EG ضعیفترین اثر را در حفظ فولیکولها داشته است [71]. Newton و همکاران در سال 1998 اثر ضدیخهای DMSO، EG، PROH و Glys را بر بافت تخمدان انسانی ارزیابی و اشاره نمود که قدرت نفوذ ضدیخهای DMSO و EG به دلیل داشتن وزن ملکولی کمتر نسبت به سایرین بهتر بوده است [74]. همچنین به دلیل نفوذ ناپذیری اکثر سلولها به گلیسرول Glys، این ضدیخ می تواند موجب بروز شوک اسمزی و آسیب جدی به سلولها شود [234]. اما در گزارش دیگری از

¹⁶⁹ Free Sucrose Media

گلیسرول برای انجماد سمن گراز استفاده و گزارش شد که نسبت به DMSO و دی متیل استامید (DMA) اثر بهتری دارد [235]. به هر حال همانطور که اشاره شد بدلیل سمی بودن گلیسرول و تخریب سلولها به دلیل ایجاد شوک اسمزی این ضدیخ چندان محبوبیت پیدا نکرد اگر چه در برخی مطالعات از آن استفاده شده است. به منظور مقایسه اثر ضدیخ ها باید به سه نکته اساسی اشاره نمود: 1- سرعت نفوذ ضدیخ به داخل سلول 2- میزان سمیت آن 3- نوع سلول و بافت. سرعت نفوذ یک ضدیخ به دو عامل بستگی دارد: وزن ملکولی و چگالی آن. در بین سه ضدیخ مورد بررسی در این مطالعه، EG با فرمول مولکولی $C_2H_6O_2$ ، کمترین وزن مولکولی ($62/068 \text{ g/mol}$) و بیشترین چگالی را دارد ($1/1132 \text{ g/cm}^3$).

EG اولین بار در سال 1859 توسط شیمی دان فرانسوی Charles-Adolphe Wurtz از ترکیب استات اتیلن گلایکول و از طریق ساپونیفیکیشن با هیدروکسید پتاسیم و در سال 1860 از آبدی اکسید اتیلن به دست آمد. تقریباً 60% اتیلن گلایکول تولیدی در جهان به عنوان ماده ضدیخ و بقیه در صنایع پلیمر به کار می رود. اگر چه EG به دلیل داشتن وزن مولکولی پائین، قدرت نفوذ بهتری نسبت به سایر ضدیخ ها دارد [236]، باید توجه داشت که اثر این ویژگی می تواند با توجه به اندازه متفاوت و عدم یکنواختی سلولها به خصوص در بافت تخمدان تغییر کند. چرا که سرعت جابجائی بین آب و EG در سلولهای با اندازه های متفاوت متغیر است. در این حالت EG به سرعت وارد سلول می شود ولی آب نمی تواند با همان سرعت از سلول خارج گردد، بنابراین موجب ترکیدن سلول می گردد. در زمان آب دهی مجدد نیز همین مسئله، چروکیدگی بیش از حد سلول و آسیب جدی به ارگانلهای داخلی به خصوص اسکلت سلولی و غشاء را به دنبال دارد [237]. هر کدام از موارد فوق به تنهایی می توانند موجب القاء آپوپتوز و نکروز بافتی شود.

میزان سمیت EG نیز نسبت به دو ضدیخ DMSO و PROH کمتر است [238]. البته این مسئله می تواند وابسته به گونه باشد. یعنی ممکن است EG در بافت تخمدان Rat سمی باشد اما در بافت تخمدان گوسفند سمی نباشد و یا اینکه EG نسبت به DMSO و PROH بر بافت تخمدان گاو اثرات سمی بیشتری داشته باشد [71]. به این نکته در مطالعه حاضر و قبلی ما اشاره شده است [62]. این مسئله نیز بسیار مهم است که هر چقدر بر درصد ضدیخ در محلول افزوده می شود، نقطه انجمادی محلول نیز کاهش می یابد. به عنوان مثال نقطه انجماد محلول حاوی 5% EG، 5°C است. اما محلولی با 10% EG نقطه انجمادی در حدود -4°C دارد. البته در غلظت بیش از 70% EG، نقطه انجماد به صورت عکس با افزایش غلظت، بالا رفته و مجدداً به صفر نزدیک می شود.

DMSO با فرمول مولکولی C_2H_6OS دارای وزن مولکولی $78/13 \text{ g/mol}$ و چگالی $1/1004 \text{ g/cm}^3$ است. DMSO از اولین موادی است که برای حفاظت در برابر سرما استفاده شده است و تا حدودی در این مسئله بیش از EG محبوبیت دارد. DMSO ابتدا در سال 1866 توسط شیمی دان روسی Alexander Zaytsev ساخته شد. اکسید کردن دی متیل سولفاید با اکسیژن یا در اکسید نیتروژن باعث ایجاد DMSO می شود. بدلیل قدرت حلالیت بالای DMSO، در بسیاری از واکنش های شیمیایی از آن استفاده می شود. این حلالیت بالا می تواند در کاهش چسبندگی محلول و افزایش تماس سلولها با DMSO مؤثر باشد. اگر چه DMSO نسبت به سایر ترکیبات هم خانواده خود نظیر دی متیل فرمامید و دی متیل استامید از کمترین

میزان سمیت برخوردار است اما به طور کلی نسبت به ضدیخ های متداول دیگر مانند EG سمیت بیشتری دارد [239]. البته همانطور که گفته شد این مسئله می تواند وابسته به گونه باشد.

پروپاندیول (PROH) با فرمول مولکولی $C_3H_8O_2$ دارای وزن مولکولی $76/09 \text{ g/mol}$ و چگالی $1/0597 \text{ g/cm}^3$ نسبت به EG قدرت نفوذ کمتری دارد. اگرچه PROH در تحقیقات زیاد استفاده شده اما در بالین چندان موفقیتی نداشته است. میزان سمیت PROH پائین است تا جائیکه حتی تنفس بخارات آن هم خطری در بر ندارد.

نکته دیگر در ارزیابی اثر ضدیخ ها، نوع بافت و سلول است. از آنجائیکه بافت تخمدان حاوی مجموعه ای از سلولها با اندازه های متفاوت است، لذا اثر گذاری ضدیخ ها در آن سلول به سلول متغیر می شود. سلولهایی با قطر حدود $2 \mu\text{m}$ مانند سلولهای استرومایی و اندوتلیال تا تخمکی با قطر حدود $120 \mu\text{m}$ در تخمدان مشاهده می شوند. همچنین وجود فضاهائی با اندازه های متفاوت در لابلائی سلولهای گرانولوزا نفوذ و عبور ضدیخ ها را به سمت تخمک با مشکل مواجه می کند. از طرف دیگر فاصله فولیکولهای بزرگتر از سطح تخمدان، تأثیر پذیری آنها را از ضدیخها سخت تر می نماید. فولیکولهای بدوی و اولیه به دلیل نزدیک بودنشان به سطح، سریعتر با ضدیخ تماس حاصل کرده و آگیری می شوند. در حالی که تخمک در این فولیکولها وارد فاز چروکیدگی می شود، تخمکهای موجود در عمق بافت تخمدان که در دل فولیکولهای آنترال و یا پراآنترال بزرگ قرار دارند، هنوز با ضدیخ تماس حاصل نکرده اند [71]. بنابراین هماهنگی مناسب بین زمان اکسپوز با ضدیخ، غلظت و نوع ضدیخ بسیار حائز اهمیت است.

بر خلاف این اعتقاد عمومی که فولیکول های بزرگتر نسبت به انواع کوچکتر آسیب بیشتری می بینند، در مطالعه حاضر، نتیجه تا حدودی بر عکس بود و فولیکولهای آنترال نسبت به فولیکولهای کوچکتر آسیب کمتری دیدند. اگرچه فولیکولهای بدوی به دلیل اندازه کوچک، فعالیت متابولیکی پائین، عدم وجود لایه زونا و گرانولهای قشری و نیز میزان کم چربی درون سیتوپلاسمی حساس به کاهش دما [71]، نسبت به فولیکولهای دیگر به آسیبهای انجمادی مقاومت بیشتری نشان می دهند، اما نتایج نشان دادند که شاید میزان سرعت نفوذ و نیز سمیت ضدیخ ها در بافت تخمدان موش صحرائی، در درجه اول اهمیت قرار داشته و این امر بر سالم ماندن فولیکولها به خصوص فولیکولهای بدوی نزدیک به سطح، تأثیر گذار بوده است. از آنجائیکه در مطالعات بعدی قصد بر استفاده از بافت تخمدان منجمد در پیوند می باشد، لذا ترکیبی از ضدیخ ها مفیدتر می باشد که در حفظ فولیکولهای با اندازه کوچک موفقیت بیشتری داشته است. در این بین گروه V_{IV} با ترکیب EG، DMSO و $0/25$ مول در لیتر سوکروز نتایج بهتری نشان داد.

در کنار استفاده از دی ساکاریدها به منظور کمک به روند نفوذ هر چه بهتر ضدیخ های نفوذ کننده، ماکرومولکول هایی نظیر فایکول نیز مورد توجه بوده و در برخی از مطالعات استفاده شده اند [240, 241]. اگرچه گسترش کاربرد آن ها مانند دی ساکاریدها نبوده است. Abed-elahi و همکارانش نشان دادند که استفاده از ترکیب EG، سوکروز و فایکول با یکدیگر جواب بهتری در حفظ بافت تخمدان موش در جریان انجماد نسبت به EG به تنهایی داشته است [240]. همچنین گزارش شده است که استفاده از سوکروز و فایکول در ترکیبات ضدیخ، میزان تشکیل کریستال یخ را به طور قابل توجهی کاهش می دهد [242]. به دنبال

این، مطالعات دیگری نیز اثر ترکیبی مثبت EG با ماکرومولکول ها را در زنده ماندن بیشتر فولیکول ها در انجماد تخمدان انسان و حیوانات دیگر گزارش کرده اند [78, 243]. بنابراین به طور کلی می توان گفت که تغییر در ترکیب مواد ضدیخ، تغییر در محلول های تعادلی و دمای آن ها، استفاده از دی ساکاریدها و ماکرومولکول ها و تغییر در شرایط آب گیری و آب دهی می تواند آسیب های ناشی از کاهش دما را به حداقل برساند.

برخی از آسیب های انجماد که ناشی از روش کار هستند، با تغییراتی در شیوه انجمادی، تا حدودی بهبود می یابند. در حقیقت تعداد بی شماری روش های انجماد آهسته و شیشه ای وجود دارند که محیط های مایع متفاوتی را در طول فرآیند آب گیری و آب دهی، اطراف سلول های تخمدانی فراهم کرده و با وجود این مواد سمی و آسیب رسان به همراه کاهش دمای بافت تخمدان، آسیب های جدی به سلول ها و ارگانل های سیتوپلاسمی آن ها وارد می آید. از جمله مهمترین این آسیب ها می توان به بر هم خوردن نظم اسکلت سلولی و دوک میوزی [244]، چسبندگی سلول های رده میوزی و سوماتیک [245] و از بین رفتن نظم ساختاری درونی تخمک و سلول های گرانولوزا [246] اشاره نمود.

در این مسئله که بررسی وضعیت سلول و بافت فقط از طریق بافت شناسی معمولی قابل اعتماد نیست، توافق کلی وجود دارد. مطالعات گذشته بر روی انجماد بافت تخمدان نشان داده اند که نتایج بافت شناسی همیشه پس از بررسی با میکروسکوپ الکترونی (EM) تأیید نمی شود [71, 231]. از طرف دیگر اگرچه اطلاعات به دست آمده از بررسی بافت شناسی می تواند به ارزیابی ما از نتایج انجماد کمک بسیاری نماید اما با توانایی رشد و زنده ماندن سلول ها و یا بافت مورد بررسی، مطابقت کامل ندارند [247]. به عبارت دیگر با استناد به بافت شناسی نمی توان از زنده بودن سلول ها اطلاع دقیق حاصل کرد. بنابراین برای حصول اطمینان از زنده بودن سلول ها و یا بافت و نیز توانایی حیات آن ها روش های دیگری از جمله رنگ آمیزی های حیاتی ضروری می نماید [218]. در پژوهش حاضر نیز از جمله نکات مهم، تغییرات غیر قابل مشاهده با میکروسکوپ نوری و قابل مشاهده به وسیله میکروسکوپ الکترونی می باشد. جهت ارزیابی فراساختار بافت تخمدان های انجمادی، گروه های کنترل، V I و V IV از گروه های انجمادی (با ترکیب EG, DMSO و سوکروز) و تخمدان های آزمون سمیت معادل آن ها یعنی گروه های T I و T IV بر اساس پاسخ دهی مناسب در حفظ فولیکول های کوچک، انتخاب شدند. از آنجائیکه پس از طی دوره پیوند آنچه که در ارزیابی موفقیت این عمل مورد توجه قرار می گیرد، بیشتر فولیکول های مراحل ابتدایی یعنی بدوی و اولیه هستند لذا در بررسی میکروسکوپ الکترونی نیز به مطالعه تصادفی این دو نوع فولیکول پرداخته شد.

پس از تجزیه و تحلیل داده های حاصل از شمارش فولیکول ها با روش H&E، مشخص گردید که درصد انواع مختلف فولیکول های سالم در تمامی گروه های انجمادی نزدیک به یکدیگر بوده و با گروه کنترل اختلاف معنی دار ندارند. به جزء در فولیکول های بدوی سالم که تمامی گروه های انجمادی نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی دار نشان دادند. جهت مطالعه به وسیله میکروسکوپ الکترونی، به محض دیده شدن یک فولیکول بدوی و یا اولیه نسبتاً سالم در بزرگنمایی پایین، اقدام به تصویر برداری در بزرگنمایی های بالاتر گردید. لذا انتخاب فولیکول ها به صورت تصادفی صورت گرفت. بیشترین تعداد فولیکول های بدوی سالم متعلق به گروه V IV که

محلول انجمادی آن حاوی EG، DMSO و 0/25 مول در لیتر سوکروز بود که این میزان پس از بررسی توسط میکروسکوپ نوری حاصل شد. اما زمانی که فولیکول بدوی در همین گروه توسط EM مورد بررسی قرار گرفت، مشاهده گردید که آسیب های ناشی از انجماد در این گروه نیز قابل توجه می باشند. علاوه بر میکروسکوپ الکترونی در بررسی مقاطع نیمه نازک همین گروه ها نیز تفاوت های بسیار مهمی به چشم می خورد که در روش های H&E و EM قابل مشاهده نبوده و منحصر به مقاطع نیمه نازک رنگ آمیزی شده با تالوئیدین بلو می باشد. چرا که اول، به دلیل کاهش ضخامت قطعات بافتی به میزان 200 تا 500 نانومتر (حدود 20 برابر نازک تر از مقاطع H&E) و عبور بهتر نور از خلال بافت، ویژگی های آن بسیار جزئی تر دیده شده و دقیق تر مورد بررسی قرار می گیرد. دوم، مساحت سطحی از بافت که در مقاطع نیمه نازک مورد بررسی قرار می گیرد چندین برابر بیشتر از سطحی است که بر روی گریدهای EM مطالعه می شود. لذا اگرچه اطلاعات به دست آمده از مقاطع نیمه نازک نسبت به مقاطع فوق نازک در EM جزئی تر نیست، اما وسیعتر بوده و ارزیابی بخش های بیشتری از ساختارهای بافتی مانند انواع دیگر فولیکول ها، جسم زرد، استروما و عروق خونی آن، قشر تخمدان و تونیکا آلبوژینه و نیز اپیتلیوم سطحی تخمدان را ممکن می سازد.

با توجه به مطالب فوق، گروه V IV حاوی EG، DMSO و سوکروز اگرچه در تعداد فولیکول های سالم و مرده نسبت به گروه های دیگر انجمادی بهتر از سایر گروه ها نشان داد اما در بررسی مقاطع نیمه نازک تخمدان های این گروه، آسیب به تمامی بخش های بافت مشاهده گردید. آسیب به اپیتلیوم سطحی تخمدان، عروق زیر کپسولی، کف آلوده شدن عروق عمقی، چروکیدگی و فاصله گرفتن تخمک از سلول های گرانولوزا، به هم ریختگی تونیکا آلبوژینه و هایپر کروماتیک شدن سلول ها، از مواردی است که در بافت تخمدان منجمد-ذوب شده این گروه به چشم می خورد که این تغییرات کمتر از گروه فاقد سوکروز (V I) نمی باشد. حتی در برخی موارد مانند به هم ریختگی تونیکا آلبوژینه و واکوئلایز شدن شدید سلول های استرومایی که حاصل خالی شدن قطرات چربی از محتویات خود است و نیز چروکیدگی تخمک فولیکول های آنترال، آسیب شدیدتر می باشد. همین وضعیت نیز در گروه های آزمون سمیت (T I و T IV) نیز دیده می شود. اثر افزایش چروکیدگی در تخمک فولیکول های آنترال که سیتوپلاسمی بسیار بزرگتر از سلول های دیگر دارند، می تواند ناشی از اثر سوکروز و عدم خارج شدن کامل آن باشد. این مطلب که تخمک نسبت به سلول های گرانولوزا در برابر شرایط انجماد آسیب پذیر تر بوده ثابت شده و در مطالعه Braw-Tal و همکارانش نیز گزارش شده است [248]. آن ها نشان دادند که تخمک فولیکول های پراآنترال خوک که با EG و DMSO منجمد شده بودند، نسبت به سلول های گرانولوزا دچار آسیب های فراساختاری جدی تر و گسترده تر مانند تورم میتوکندری و شبکه اندوپلاسمیک شده است [248]. این نتایج با تورم میتوکندری در گروه های انجمادی حاوی سوکروز در مطالعه حاضر تطابق دارد به طوریکه افزایش قطر میتوکندری و نیز تورم دستگاه گلژی به خوبی در گروه T IV و نیز V IV مشهود است. باید توجه داشت که بر اساس مطالعات Silva و همکارانش، تورم میتوکندری و شبکه اندوپلاسمیک پیش آگهی خوبی نداشته و از اولین علائم شروع مرگ تخمک و نهایتاً فولیکول به شمار می رود [231]. در اصل تورم میتوکندری در پی از بین رفتن تعادل یونی غشاء سلولی بوده [249] و در مطالعه ما نیز وجود میتوکندری های متورم به خصوص در گروه های آزمون سمیت (گروه حاوی سوکروز) می تواند حاصل از

شوک اسمزی ناشی از نفوذ ضدیخ ها به داخل سلول باشد که با یافته های Borges و همکارانش [226] نیز مطابقت دارد. از آنجائیکه آسیب به میتوکندری از اهمیت بالایی برخوردار است در مطالعات زیادی به بررسی آن پرداخته شده است. از جمله Abed-Elahi و همکارانش نشان دادند که روش حمل نمونه به داخل نیتروژن تفاوت های اساسی در آسیب به ارگانل های سیتوپلاسمی به خصوص میتوکندری ایجاد می کند [240]. به این ترتیب که در روش متداول انجماد شیشه ای (CV^{170}) آسیب میتوکندری در فولیکول های تخمدان کمتر از روش مستقیم انجمادی (DCV^{171}) است. از طرف دیگر حفظ توانایی رشد آزمایشگاهی فولیکول های جداسازی شده از تخمدان های انجمادی با روش متداول (CV) توسط Mazochi [250]، Haidari [251] و همکارانشان نشان داد که استفاده از روش انجمادی مطمئن می تواند آسیب تخمدان را به حداقل میزان خود برساند. این مطلب می تواند دلیل تغییر روش حمل نمونه تخمدان به نیتروژن در پژوهش حاضر باشد. ثابت شده است که حمل نمونه به داخل نیتروژن با سوزن نتایج خوبی به دست می دهد [252, 253]. در مطالعه حاضر، ما از سوزن سرنگ انسولین یا همان Cryopin طبق روشی که در مطالعه گذشته، تخمدان های گوسفندی منجمد شدند، استفاده نمودیم [62]. تفاوت این روش و مزیت آن با روشی که توسط Wang و همکارانش برای اولین بار در سال 2008 به کار برده شد [253]، این است که با هر سوزن انسولین یک نمونه تخمدان به داخل نیتروژن برده می شود و در هنگام ذوب جهت مطالعه بر روی تخمدان انجمادی نیز نمونه ها به صورت انفرادی از تانک خارج می شوند. Wang [253] و Xiao [252] و همکارانشان برای فرو بردن نمونه های تخمدان به داخل نیتروژن از سوزن طب چینی بهره بردند و در هر مرتبه چند عدد بافت تخمدان را در یک سوزن قرار داده و مجموعاً ذخیره نمودند. قرار دادن چند تخمدان در یک سوزن در هنگام ذوب می تواند مسئله ساز باشد، چرا که برای مطالعه یک نمونه مجبور به ذوب اجباری چند تخمدان دیگر نیز خواهیم بود.

به هر حال تغییرات جزئی ایجاد شده در ساختار و فراساختار فولیکول های گروه T I حاکی از روند طبیعی آب گیری و آب دهی در فرآیند آزمون سمیت است. اما آسیب های جدی تر مانند افزایش چروکیدگی تخمک و تراکم هسته آن، افزایش میتوکندری های متورم که خود نشان از آغاز مرگ سلولی دارند، تورم در دستگاه گلژی، افزایش واکوئل در سیتوپلاسم و تراکم در هسته سلول های گرانولوزا و استروما و نیز افزایش فاصله بین دو سلول اخیر در برخی نواحی اطراف فولیکول، همه نشان از تداخل اثر سوکروز در فرآیند آب گیری و آب دهی سلول ها دارد.

بررسی فراساختار فولیکول های گروه های انجمادی که تخمدان آن ها بر خلاف گروه های آزمون سمیت، مرحله کاهش دما را هم تجربه کرده اند، اطلاعات متفاوتی به دست می دهد. در گروه های انجمادی اگرچه میتوکندری های متورم زیاد دیده نمی شوند اما میتوکندری های کاملاً تیره و متراکم افزایش قابل توجهی یافته اند که پیش آگهی خوبی برای ادامه فعالیت فیزیولوژیک ندارند، چرا که آسیب به میتوکندری متابولیسم سلول را تهدید می نماید [254, 255]. به خصوص در گروه انجمادی با سوکروز (V IV) که در بزرگنمایی پایین، فولیکول آن

¹⁷⁰ Conventional Vitrification (CV)

¹⁷¹ Direct Cover Vitrification (DCV)

نمای طبیعی دارد، در بزرگنمایی بالا افزایش MVB و اجسام تیغه ای و نیز بر هم خوردن نظم ارگانل ها، چروکیدگی شدید زونا و فاصله گرفتن تخمک از سلول های گرانولوزا به خوبی دیده می شود. افزایش دامنه آسیب به تخمک و نیز سطوح خارجی فولیکول، در گروه های آزمون سمیت و انجمادی پس از استفاده از سوکروز کاملاً مشهود و بارز است.

در مطالعه Boonkusol و همکارانش [256] بر روی انجماد شیشه ای تخمک، نشان داده شد که تجمع قطرات و وزیکول های چربی زیر غشاء تخمک ناشی از فرآیند انجماد شیشه ای می باشد. این یافته تا حدودی با نتایج ما در بررسی فراساختار تخمدان های موش صحرایی پس از انجماد شیشه ای مطابق است. چرا که چروکیدگی سیتوپلاسم سلول بزرگی چون تخمک منجر به کاهش سطح سیتوپلاسم آن شده و به صورت طبیعی ارگانل ها به غشاء تخمک نزدیک تر می شوند.

2-1-4. میزان بروز آپوپتوز در تخمدان کامل موش صحرایی پس از انجماد شیشه ای با ترکیبات

مختلف ضدیخ

نزدیک بودن نتایج حاصل از شمارش فولیکول های سالم و مرده در رنگ آمیزی بافت شناسی معمولی به واقعیت با رنگ آمیزی عوامل زنده مانی و یا مرگ سلولی دیگر تأیید می شود. به همین سبب در پژوهش حاضر رنگ آمیزی تخمدان های انجمادی برای ارزیابی میزان بروز مرگ سلولی آپوپتوز پس از انجماد، به وسیله روش ایمنونوهیستوشیمی تشخیص ساخت پروتئاز سیستئینی Caspase 3 به وسیله آنتی بادی ضد آن صورت گرفت. پس از رنگ آمیزی سلول هایی که روند مرگ سلولی را آغاز کرده اند، Caspase 3 بیان شده در سیتوپلاسم و به رنگ قهوه ای دیده می شود. به دلیل اینکه در روند آپوپتوز بیان Caspase 3 در مراحل ابتدایی و پیش از بروز ظواهر مرگ در سلول مانند قطعه قطعه شدن DNA، تغییرات آسیمتریک غشاء سلول و تشکیل اجسام آپوپتوزی می باشد، لذا ممکن است ظاهر یک سلول در رنگ آمیزی H&E طبیعی به نظر برسد اما روند مرگ را آغاز کرده باشد. بنابراین پس از رنگ آمیزی با Caspase 3 شاید برخی از سلول های با ظاهر طبیعی، سیتوپلاسم حاوی Caspase 3 را به رنگ قهوه ای بروز دهند.

میزان بروز مرگ سلولی در هر دو گروه انجمادی (تقریباً 20% کل فولیکول ها) به طور کلی نسبت به گروه کنترل (تقریباً 5% کل فولیکول ها) 4 برابر افزایش یافت. همانطور که در مبحث قبل اشاره شد، Paynter [225]، [226] Borges و همکارانشان نشان دادند که برای برگشت بافت تخمدان انجمادی به حالت طبیعی و فعالیت فیزیولوژیک عادی، مدت زمان کوتاهی در حدود نیم ساعت انکوبه کردن کافی می باشد. ما نیز همچون مطالعه گذشته [62]، تخمدان ها را پس از ذوب حدود نیم ساعت انکوبه کردیم. این مدت زمان به سلول هایی که تحت اثر عوامل القاء کننده آپوپتوز قرار گرفته اند مانند بیان Caspase 3، اجازه بروز آن را می دهند. اما باید توجه داشت که انکوبه کردن بیش از این مدت نیز می تواند منجر به تداخل اثرات کشت بافت و عوامل محیط کشت با نتایج حاصل از انجماد شود که این امر مطلوب نخواهد بود.

نهایتاً باید اذعان داشت که نتایج حاصل از انجماد شیشه ای بر اساس روش های مختلف ارائه شده و تفاوت در استفاده از انواع ترکیبات ضدیخ ها و نیز زمان های مختلف آب گیری و آب دهی، نوع انتقال دهنده نمونه به نیتروژن و مهمتر از همه گونه جانوری مورد استفاده، متفاوت خواهد بود. از طرفی باید توجه داشت که آسیب های ناشی از انجماد اگر چه ممکن است در بررسی های بافتی معمول جزئی به نظر برسند، اما در ارزیابی فراساختار، شدت آسیب به نحو دیگری تعریف می شود.

4-2. پیوند به خودی تخمدان کامل موش صحرایی پس از انجماد شیشه ای

4-2-1. تغییرات ساختار و فراساختار تخمدان کامل منجمد-ذوب شده موش صحرایی پس از پیوند

به خودی

در بخش دوم این مطالعه اثر پیوند به خودی تخمدان کامل موش صحرایی پس از انجماد شیشه ای مورد بررسی قرار گرفت. تخمدان ها پس از ذوب حدود نیم ساعت انکوبه شدند و سپس در زیر پوست پشت گردن مطابق آنچه که در بخش مواد و روش ها آورده شد پیوند زده شدند. موفقیت و یا عدم آن در گرفتن پیوند با فولیکول های کوچک تخمین زده شد. به این ترتیب که اگر در بافت پیوندی فولیکول های مراحل پایین دیده شوند، یک پیوند موفق در نظر گرفته می شود. با این توجیه که پس از گذشت سه هفته وجود فولیکول های کوچک، حکایت از برقراری حتمی جریان عروقی و باقی ماندن بافت تخمدان پیوندی در مسیر رشد دارد. به این ترتیب بر اساس جدول 3-6، درصد موفقیت پیوند در گروه های انجمادی تا حدودی کمتر از گروه های غیر انجمادی بود که می تواند دلیلی بر آسیب به ذخیره فولیکولی در نتیجه انجماد باشد.

به نظر می رسد که در موفقیت پیوند، برداشتن تخمدان طرف مقابل نقشی نداشته است. اگر چه در برخی مطالعات به این موضوع اشاره شده است که برداشت تخمدان طرف مقابل و یا هر دو تخمدان (در پیوندهای آلوگرافت یا زنوگرافت)، موجب افزایش سطح FSH خون شده و بنابراین بستر مناسبی را برای پیوند بافت تخمدان آماده می نماید. در اصل با حذف دو تخمدان، مهار کننده ها و یا تنظیم کننده های تخمدانی گنادو تروپین ها حذف شده و سطح LH و به خصوص FSH بالا می رود. ثابت شده است که FSH می تواند در تحریک رگ زایی مؤثر باشد و همچنین عامل اصلی تکثیر سلول های گرانولوزا و نهایتاً بلوغ فولیکول می باشد [257]. تغییرات هورمونی ناشی از برداشت تخمدان ها در بخش مربوط به اثر پیوند بر تغییرات هورمونی و گنادوتروپین ها مورد بررسی بیشتر قرار خواهد گرفت.

به هر حال موفقیت پیوند بستگی به عوامل متعدد دارد، از جمله: نوع روش انجمادی و ترکیبات ضدیخ مورد استفاده در محلول های انجمادی، گونه جانوری، جایگاه پیوند، هورمون درمانی، برداشت تخمدان طرف مقابل، ایجاد زخم در بستر پیوند و نهایتاً استفاده از داربست های زیستی برای کمک به تسریع در فرآیند رگ زایی. بررسی اثر پیوند بر تخمدان های انجمادی فقط با بررسی بافت شناسی کامل نمی شود، حتی اگر چرخه هورمونی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تخمدان فعال شده باشد. بلکه اعتقاد بر این است که اثر پیوند باید تا تولد نوزاد زنده پی گیری شود و پس از آن است که می توان گفت پیوند انجام شده، نتیجه مطلوب را به دست داده

است. نکته قابل توجه این است که اگر چه ممکن است فولیکول در بافت پیوندی تا مرحله آنترال و نزدیک به تخمک گذاری پیش رود، اما نشان داده شده است که گاهی کیفیت تخمک های بالغ شده موش صحرایی در بافت پیوندی برای لقاح آزمایشگاهی و تولید جنین مناسب نیستند [54]. از طرف دیگر حتی در صورت موفقیت پیوند و دیده شدن فولیکول های در حال رشد در بافت پیوندی، به دلیل حذف محیط خاص تخمدانی اطراف فولیکول های بافت میهمان، و نیز حذف و تضعیف عوامل مهاری و یا فعال کننده با واسطه تخمدان، کیفیت تخمک ها با وجود ظاهر مناسب، چندان مطلوب نبوده و لذا از میزان پایینی در موفقیت لقاح و تولید جنین بهره می برند [166]. در مطالعه حاضر میزان زنده ماندن کلی فولیکول ها در گروه انجمادی پیوندی گنادکتومی (VTG) (حدود 74%) نزدیک به گروه کنترل (حدود 85%) و بیشتر از سایر گروه های آزمایشی می باشد. به نظر می رسد که در گروه VTG، کاهش در تعداد فولیکول های بدوی (حدود 13%) آسیب جدی به حجم فولیکولی را موجب گردیده، اما پس از بررسی رده های دیگر فولیکولی مشاهده می شود که به نوعی در این گروه سرعت رشد فولیکول ها افزایش یافته است، چرا که نسبت فولیکول های رسیده به مرحله آنترال (29%) به طور معنی داری بیشتر از تمامی گروه های کنترل و آزمایشی بوده است. اگر چه اعتقاد بر این است که کاهش در تعداد فولیکول های بدوی نتیجه تأخیر در رگ زایی مجدد بافت تخمدان پیوندی است [166]، اما رشد قابل توجه فولیکول های آنترال در گروه گنادکتومی دو طرفه (BLG)، همانطور که در قبل گفته شد، نشان از افزایش هورمون FSH و اثر آن در بلوغ فولیکول دارد. البته به این نکته مهم باید توجه داشت که تعداد فولیکول ها (حجم یا ذخیره فولیکولی) با درصد فولیکول ها (نسبت فولیکولی) متفاوت است. بدیهی است که در گروه های انجمادی VTG و VTnG، میزان ذخیره و یا حجم فولیکولی پایین آمده به طوریکه تعداد کل فولیکول ها در گروه VTG به یک سوم ذخیره فولیکولی گروه کنترل تقلیل می یابد، اما در نسبت رشد از آن پیشی می گیرد. به هر حال انجماد و مهمتر از آن پیوند، از ذخیره فولیکول های بافت تخمدان کاسته و بدین ترتیب دوره فعالیت آن را محدود می سازد [73, 101]. به طوریکه گزارش شده است فعالیت تخمدان پیوندی در جانوران مختلف، متفاوت بوده و از یک ماه تا دو تا سه سال به طول می انجامد.

یکی از نکات مهم در حفظ فولیکول های بافت پیوندی، اثر گذاری جایگاه پیوند در تسریع برقراری آناستوموزهای عروقی است. اثر تخریبی ایسکمی ناشی از کمبود اکسیژن گاه از اثر کاهش دما در فرآیند انجماد بیشتر و شدیدتر است [178]. در اینجا یک جایگاه پیوند خوب از نظر رگ زایی می تواند بسیار کمک کننده باشد. جایگاه زیر پوست اگرچه به لحاظ خون رسانی همانند زیر کیپسول کلیه و یا بافت داخل عضلانی نیست، اما دسترسی به تخمک و استخراج آن و همچنین بررسی مرحله به مرحله فرآیند بلوغ فولیکول به خصوص به وسیله سونوگرافی را امکان پذیر می نماید [178]. با این وجود زیر پوست پشت گردن از نظر برقراری ارتباط عروقی توانایی قابل توجهی دارد، چرا که از دو شبکه خون رسانی زیر پوستی و عضلانی بهره می برد. البته در بیشتر موارد پس از پیوند، بافت تخمدان به زیر پوست چسبیده و عروق خونی از اطراف به صورت شعاعی به آن وارد می شوند. تجربه ما نشان داده است در صورتی که تخمدان به فاسیای عضله زیرین خود پیوند خورد و عروق خونی را از بافت های عضلانی دریافت کند، کیفیت بافت پیوندی به لحاظ ذخیره فولیکول و ایجاد کیست بهتر خواهد بود.

در جوندگانی چون موش و موش صحرایی فرآیند تشکیل جسم زرد و روند تحلیل آن تا حدودی با پریمات ها متفاوت می باشد. در انسان تحلیل جسم زرد با پروستاگلندین ها، استروژن و اکسی توسین القاء می شود. القاء دژنره شدن و تحلیل جسم زرد در اواخر مرحله لوتئال و با عمل پروستاگلندین ها آغاز می گردد. از مهمترین این عوامل پروستاگلندین $F2\alpha$ (PF2 α) می باشد. PF2 α به طور عمده توسط اندومتر ترشح شده و از طریق جریان خون به جسم زرد موجود در تخمدان می رسد [258]. در انسان منبع دیگر ترشح این ماده خود جسم زرد است اما در جوندگانی مانند موش صحرایی، فقط توسط اندومتر ترشح می شود. نکته مهم دیگر این که PF2 α در موش صحرایی از اندومتر شاخ رحمی طرف مقابل ترشح شده و بر روی جسم زرد تخمدان مقابل اثر می گذارد. به همین دلیل در صورت ایجاد اختلال در مسیر جریان خون بین شاخ رحمی طرف مقابل و تخمدان طرف دیگر، PF2 α به جسم زرد مقابل نمی رسد و بنابراین تحلیل آن به تأخیر می افتد [258]. در این صورت جسم زرد های بزرگی در تخمدان طرف مقابل دیده می شود. اتفاقی که در پژوهش حاضر هم در تعداد و هم در اندازه جسم زردها برای گروه های گنادکتومی رخ داد. افزایش تعداد جسم زردها حاکی از عدم رسیدن PF2 α به جسم زرد و ادامه فرآیند رشد آن ها دارد. جسم زردی که شروع به تحلیل می کند و یا روند تحلیل را باید آغاز کند، شروع به افزایش سطح اکسید نیتروژن درون تخمدان کرده و سپس منجر به افزایش ترشح PF2 α می شود. PF2 α پس از رسیدن به تخمدان، جریان خون رسیده به جسم زرد را کاهش داده و باعث مرگ سلول های جسم زرد از طریق کاهش مواد غذایی و اکسیژن به آن ها می شود. سپس سلول های ایمنی که ابتدا ماکروفاژها و بعد T لنفوسیت ها می باشند به جسم زرد نفوذ و شروع به ترشح عوامل خود یعنی سایتوکائین ها و کموکائین ها کرده و سلول های بیشتری را به محل فرا می خوانند. سپس سلول های حاضر در جسم زرد شروع به حذف بقایای سلول های مرده می کنند [258]. اگر چه در انسان و جوندگان اکسید نیتروژن تولید شده در جسم زرد، روند تحلیل را القاء می کند، اما برای جلوگیری از تحلیل کافی است که از رسیدن عامل مهم PF2 α به تخمدان مثلاً از طریق برداشت تخمدان و مجاری تناسلی طرف مقابل جلوگیری شود.

افزایش حجم تخمدان، پس از برداشتن تخمدان طرف مقابل و حذف آن در خرگوش [259] و موش صحرایی [192] گزارش شده است. همچنین افزایش ضخامت تونیکا آلبوژینه و گشاد شدگی عروق سطحی نیز در تخمدان هایی که یک طرفه باقی مانده اند، گزارش شده است [260]. ضخیم شدن تونیکا آلبوژینه در تخمدان های کنترل 8 هفته ای در بررسی مقاطع نیمه نازک پژوهش حاضر نیز نشان از رشد تخمدان و افزایش حجم آن دارد. همچنین علاوه بر افزایش ضخامت تونیکا آلبوژینه، عروق زیر کپسولی نیز گشادتر شده و دیواره ضخیم تری یافته اند.

نکته قابل توجه دیگر وجود ماست سل ها در مقاطع نیمه نازک بافت تخمدان پیوندی است. حضور این سلول ها در تخمدان طبیعی نیز به اثبات رسیده و از جمله سلول های بسیار مهم در ارتباط با ساختارهای چهارگانه عملکردی در تخمدان به نام "واحد غددی بینابینی (IGU)"¹⁷² می باشند [261]. این ساختار از سلول های ترشحي بافت بینابینی، مویرگ های خونی، فیبروسیت ها و الیاف کلاژن تشکیل می شود. ماست سل ها جزء

¹⁷² Interstitial Glandular Unit (IGU)

سلول های موجود در کنار این مجموعه بوده و همانطور که گفته خواهد شد، در رگ زایی نقش بسزایی دارند [262].

Razi و همکارانش، نشان دادند که تعداد ماست سل ها در گروه آزمایشی ULO¹⁷³ یعنی تخمدانی که در جای خود رشد کرده، در حالیکه که تخمدان طرف مقابل از بدن خارج شده، افزایش یافته است. بر اساس مطالعات محققین بسیاری، ماست سل ها از جمله سلول های مهم در فرآیند رگ زایی می باشند [262]. بر این اساس تعداد ماست سل ها در رحم گاو و در مرحله استروس بیشتر از مرحله لوتئال گزارش شده اند [263]. این سلول ها در ارتباط نزدیکی با عروق خونی جدید بوده که در حال شکل گیری در بافت تخمدان هستند. بنابراین از ماست سل ها می توان به عنوان یک عامل زیستی¹⁷⁴ برای شناسایی عروق در حال تشکیل استفاده نمود. در موش صحرایی، ماست سل در فولیکول آنترال و جسم زرد دیده نشده در حالیکه تعدادشان در مدولای تخمدان در مرحله استروس حداکثر، در مرحله مت-استروس میانه و در مرحله پرو-استروس حداقل بوده است [264]. در مطالعه Razi و همکارانش، پراکندگی و حضور ماست سل ها در گروه ULO از گروه های کنترل و شم بیشتر گزارش شده است که این خود حکایت از افزایش رگ زایی در این گروه دارد. در پژوهش حاضر، افزایش تعداد گلبول های سفید در مقاطع عروقی به خصوص عروق عمقی تخمدان ناشی از تحریک سیستم ایمنی در محل پیوند و فراخوانی ماکروفاژها برای برداشت سلول های مرده ناشی از مرگ سلولی است. اما بیشترین تعداد گلبول سفید در مقاطع عروق خونی و نیز بیشترین تعداد ماست سل ها در مدولای تخمدان در گروه VTnG دیده شد. اگرچه گلبول های سفید ناشی از التهاب در جایگاه پیوند بوده و می تواند حکایت از رد پیوند نیز داشته باشند، اما افزایش ماست سل ها یک پیش آگهی خوب برای افزایش سرعت میزان رگ زایی می باشد.

در مقاطع نیمه نازک از تخمدان های پیوندی، بر خلاف گروه کنترل، نظم خاصی که دو ناحیه قشر و مرکز تخمدان را از یکدیگر جدا می کند وجود ندارد و به طور واضح می توان گفت که نظم درونی بافت تخمدان پیوندی از بین می رود. این مسئله تا حدود زیادی می تواند با مرگ فولیکول ها و از دست رفتن اتصالات و ارتباطات سلولی و عروقی در مرکز تخمدان مرتبط باشد. به خصوص هنگامی که یک فولیکول آنترال آترزی می شود، فضای وسیعی از تخمدان را دستخوش تغییر قرار می دهد. به هر حال در ایسکمی ناشی از پیوند، فولیکول های بزرگ بیشتر از انواع کوچکتر دچار مرگ می شوند، این مسئله می تواند سطح وسیعی از تخمدان را تخریب کرده و ساختار منظم آن را دگرگون سازد، هر چند اپیتلیوم سطحی تخمدان در اکثر گروه های پیوندی با تغییراتی دیده می شود. به همین دلیل است که در تخمدان پیوندی، فولیکول های کوچکتر را می توان در مرکز تخمدان و به صورت پراکنده نیز ملاحظه کرد. در گروه کنترل 8 هفته ای و در مرز قشر و مرکز تخمدان، سلول های غول پیکری نیز دیده می شوند که ساختاری بسیار شبیه سلول های زایا¹⁷⁵ دارند. همانطور که در بخش

¹⁷³ Unilateral Ovariectomy (ULO)

¹⁷⁴ Bio-marker

¹⁷⁵ Germ Cell

نتایج نیز بدان اشاره شد، حضور این سلول ها به دلیل این است که در اکثر جوندگان به خصوص موش صحرایی، تشکیل فولیکول های بدوی بعد از تولد صورت می گیرد.

یکی دیگر از تفاوت های اساسی در مقاطع نیمه نازک بین تخمدان های پیوندی و کنترل که تقریباً در تمامی گروه های پیوندی دیده می شود، کاهش لایه های سلول های گرانولوزا به 4 تا 5 لایه در اطراف فولیکول آنترال است. این مطلب می تواند ناشی از بلوغ زودرس فولیکول ها در بافت های پیوندی باشد [69]. اگر چه تخمک دارای اندازه طبیعی است اما کل فولیکول به لحاظ تعداد سلول ها به حد طبیعی نرسیده است. در این صورت فرضیه حذف عوامل مهارکننده و یا تنظیم کننده در تخمدان پیوندی که منجر به بروز بلوغ زودرس می شود، تقویت می گردد [69]. این مطلب می تواند کیفیت تخمک های حاصل از بافت پیوندی را کاهش داده و توانایی لقاح آن ها را تضعیف نماید. در گروه انجمادی پیوندی گنادکتومی (VTG) بیشترین تعداد سلول های گرانولوزا در اطراف فولیکول های آنترال دیده شد که این امر می تواند ناشی از اثر تکثیر FSH باشد که در نتیجه برداشت تخمدان طرف مقابل افزایش ناگهانی یافته است.

در پژوهش حاضر ما به ارزیابی اثر انجماد و پیوند به خودی کل تخمدان موش صحرایی بر فراساختار آن پرداختیم تا تحلیل درستی از میزان و نحوه آسیب به سلول ها و بافت پیوندی حاصل کنیم. ثابت شده است که در حیوانات [265] و انسان [7, 8]، پیوند به خودی بافت تخمدان منجر به بازگشت فعالیت هورمونی شده است. اما همانطور که قبلاً هم گفته شد، از دست رفتن 50 تا 80 درصد فولیکول ها طی فرآیند پیوند، آسیب جدی به بافت تخمدان محسوب می شود [170, 266]. این آسیب وسیع به دنبال هایپوکسی و ایسکمی شدید قبل از برقراری ارتباط عروقی می باشد [91]. در پیوند قطعات تخمدان انسانی به موش های ایمونوسپرس پس از انجماد آهسته، فراساختار فولیکول های بدوی/اولیه مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که فراساختار طبیعی می تواند تا حدود زیادی مرتبط با توانایی رشد خوب در فولیکول ها باشد [266]. این مطلب بسیار مهم است چرا که حفظ فراساختار، ارتباط نزدیک و مستقیم با میزان توانایی رشد و بلوغ تخمک خواهد داشت [258]. به همین دلیل است که بررسی اثرات انجماد و پیوند بر بافت تخمدان بدون بررسی فراساختار، کامل نخواهد بود. مطابق با یافته های Nottola و همکارانش [54]، نتایج بررسی تخمدان انسانی با TEM¹⁷⁶ نسبت به LM¹⁷⁷ تفاوت قابل توجهی داشت. به این ترتیب که گاهاً فولیکول هایی که در بررسی LM سالم به نظر می رسیدند، در TEM فراساختار نامناسبی را ارائه کردند. ظواهری که در بررسی TEM دیده می شوند با رنگ آمیزی معمول بافت مشاهده نمی شوند. به طور مثال می توان به حضور اجسام مالتی وزیکولر (MVB) و تغییرات آن در بافت پیوندی اشاره نمود. MVB در تخمک گروه کنترل نیز دیده می شود، اما در تخمک تخمدان های پیوندی افزایش می یابند. به خصوص در گروه های غیر گنادکتومی (VTnG و nVTnG) افزایش قابل توجهی دارند و به صورت تجمعی در کنار یکدیگر دیده می شوند. اما تعداد آن ها در گروه های گنادکتومی بسیار کمتر شده است. افزایش این عناصر حکایت از تغییرات رو به زوال سلول دارد، در حالیکه در

¹⁷⁶ Transmission Electron Microscopy (TEM)

¹⁷⁷ Light Microscopy (LM)

LM به هیچ وجهی قابل مشاهده نبوده و ارزیابی از سالم یا ناسالم بودن فولیکول ها را غیر واقعی خواهد نمود. ارتباطات و اتصالات بین سلولی، میکروویلی های تخمک و سلول های گرانولوزا، ظاهر و چگونگی وضعیت میتوکندری ها، دستگاه گلژی، ظاهر غشاء هسته و غشاء سلولی، تعداد منافذ و وضعیت دو لایه غشاء هسته از جمله مواردی هستند که برای قضاوت در مورد سالم بودن یک سلول، باید با جزئیات بیشتری و به وسیله TEM بررسی شوند. در تمامی گروه های پیوندی ظاهر فولیکول بدوی مورد بررسی مانند گروه کنترل بوده و فقط در برخی جزئیات با آن تفاوت داشتند. افزایش ارگانل های سیتوپلاسمی و پراکنندگی آن ها در سلول و نیز افزایش تعداد میتوکندری هایی که کریستاهای کناری داشته و تا حدودی متورم بودند، از جمله این تفاوت ها بود. در گروه های گنادکتومی، عناصر متراکمی در کنار میتوکندری و بعد در زیر غشاء تخمک دیده می شوند که ساختاری شبیه گرانول های قشری دارند. احتمال می رود که روند بلوغ زودرس در تخمدان های پیوندی، بر فولیکول های مراحل پائین تر نیز اثر گذاشته باشد.

4-2-2-2. مرگ سلولی در تخمدان کامل منجمد-ذوب شده موش صحرایی پس از پیوند به خودی

نکته قابل توجه در رابطه با آسیب به فولیکول ها پس از پیوند بافت تخمدان، افزایش مرگ در فولیکول های اولیه و در تمامی گروه های پیوندی است. اگرچه در گروه کنترل نیز تعداد فولیکول های اولیه مرده از سایر انواع فولیکول های مرده بیشتر بودند، اما این تعداد در گروه های پیوندی به حداقل سه برابر گروه کنترل رسیده که البته این روند در فولیکول های آپوپتوتیک نیز به چشم می خورد. در پژوهش حاضر میزان کلی مرگ در تمامی گروه ها نسبت به گروه کنترل معنی دار است. اما این میزان در گروه گنادکتومی VTG و nVTG نسبت به گروه های غیر گنادکتومی به طور ناچیزی کمتر است. افزایش درصد مرگ فولیکولی در مرحله اولیه حکایت از عدم توانایی فولیکول ها برای گذر از این مرحله دارد. مرحله ای که پاسخ گویی فولیکول ها به گنادوتروپین ها به تدریج آغاز می شود. افزایش در تعداد فولیکول های مرده آنترال نیز به دنبال بالا رفتن تعداد فولیکول های آنترال سالم، منطقی به نظر می رسد. کمترین میزان مرگ فولیکول های آنترال نیز در گروه های گنادکتومی VTG و nVTG بود که باز می توان گفت حاصل اثر کمکی FSH افزایش یافته در نتیجه گنادکتومی است. آنچه که مشخص است در چند روز اول پیوند بر اثر هایپوکسی و ایسکمی و به دنبال آن ایجاد رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS) و نیز پدیده پراکسیداسیون چربی ها، مرگ سلولی افزایش می یابد [138]. در مطالعه ای به این موضوع اشاره شده است که در سلول های گرانولوزا به وسیله رنگ آمیزی TUNEL و anti-active-caspase 3، آپوپتوز مشخص گردید اما در تخمک تنها TUNEL توانست آپوپتوز را نمایان سازد، به عبارتی تخمک بیان کننده active-caspase 3 دیده نشد [138]. این شاید به این دلیل باشد که روش TUNEL، آپوپتوز را در مراحل پیشرفته و پس از قطعه قطعه شدن DNA¹⁷⁸ نشان می دهد. اگر چه بیان انواع دیگر مولکول های Caspase در تخمدان دیده شده است [267]. البته در پژوهش حاضر ما توانستیم بیان Caspase 3 را در تخمک فولیکول بدوی که ظاهر کاملاً سالم داشت نیز نمایش دهیم (شکل 3-1). به هر حال

¹⁷⁸ DNA Fragmentation

مرگ در تخمک و سلول های اندوتلیالی می تواند ناشی از نکروز نیز باشد، چرا که اثر گذاری مثبت ویتامین E و C به عنوان آنتی اکسیدان در حمایت از بافت پیوندی به همراه ایجاد زخم در جایگاه پیوند در کاهش مرگ نکروز به اثبات رسیده است [133].

از موارد بسیار مهم و کنترل کننده آپوپتوز، هورمون FSH می باشد. این هورمون برای ساخت هورمون های استروئیدی به وسیله تحریک آنزیم آروماتاز (P450)، تمایز سلول های گرانولوزا از طریق تحریک بیان گیرنده های LH و نیز تشکیل حفره آنتروم، بسیار ضروری است. همچنین FSH از طریق تنظیم ارتباطات بین سلول های گرانولوزا و تخمک از طریق زونا پلوسیدا¹⁷⁹، روند مرگ سلولی را کنترل می نماید [268]. همچنین گنادوتروپین های FSH و LH با تحریک ساخت و ترشح عوامل ضد آپوپتوتیک در سلول های گرانولوزا، مرگ سلولی آپوپتوز را کنترل می نمایند [47]. در پژوهش حاضر جهت بررسی ارتباط بین گنادوتروپین ها و میزان بروز آپوپتوز باید به سه نکته اساسی توجه کرد:

1- میزان بیان FSH در گروه های گنادکتومی افزایش قابل توجه ندارد، اگرچه اختلاف در این میزان بین گروه های پیوندی معنی دار نبوده است.

2- اما LH در گروه های گنادکتومی نسبت به گروه های غیر گنادکتومی افزایش معنی دار داشته است.

3- از طرف دیگر درصد کلی فولیکول های آپوپتوتیک از زمانی که وابستگی به گنادوتروپین ها آغاز می شود (یعنی مجموع فولیکول های اولیه، پرآنترال و آنترال آپوپتوتیک بدون در نظر گرفتن فولیکول های بدوی) در گروه های گنادکتومی نسبت به گروه های غیر گنادکتومی کمتر می باشد.

با توجه به موارد فوق، باید اذعان داشت که پیوند در پژوهش حاضر تا حدودی توانسته است چرخه هورمونی را بازگرداند اما در هیچ کدام از گروه های پیوندی گنادکتومی و غیر گنادکتومی به گروه کنترل نرسیده است. البته باید به این موضوع اشاره کرد که بهتر است تغییرات هورمونی در طول پیوند و از زمان صفر و حتی قبل از پیوند تا زمان برداشت بافت و حتی مدتی پس از آن بررسی شود و با اندازه گیری هورمون های جنسی فقط در زمان برداشت بافت پیوندی نمی توان در مورد نحوه اثر گذاری پیوند بر ترشح هورمون ها و نواسانات آن قضاوت کامل و دقیقی داشت. به هر حال کاهش درصد فولیکول های آپوپتوتیک وابسته به گنادوتروپین ها (اولیه، پرآنترال و آنترال) نشان دهنده اثر ضد آپوپتوتیک گنادوتروپین ها به خصوص LH بر بافت های پیوندی است. همانطور که قبلاً هم گفته شد مهار FSH فقط منبع تخمدانی دارد اما مهار LH از هر دو منبع هیپوفیز و تخمدان صورت می گیرد. کاهش سطح FSH در گروه های گنادکتومی یک پیش آگهی خوب برای تشکیل ارتباطات عروقی و برقراری تبادل پیام در محور هیپوفیز-تخمدان است و نشان می دهد که تخمدان پیوندی به تنهایی توانسته است پس از برقراری جریان خون با بافت پذیرنده، با ترشح مهار کننده های FSH و اثر بر هیپوفیز، سطح آن را کاهش داده و پایین تر از گروه های غیر گنادکتومی قرار بگیرد. اما اینکه سطح FSH در حد گروه کنترل و به اندازه طبیعی نرسیده است باید به این نکته مهم اشاره کرد که همانطور که در جدول 3-9 دیده می شود، در میان فولیکول های آپوپتوتیک در تمامی گروه ها، فولیکول های آنترال به خصوص در هر دو گروه گنادکتومی

¹⁷⁹ Trans-Zonal Connection

شده (VTG و nVTG) نسبت به سایر گروه ها افزایش معنی دار دارند. در زمان شروع مرگ آپوپتوز در تخمدان و به خصوص در فولیکول های آنترال پدیده ای رخ می دهد به نام "باز پس گیری FSH" [180]. در این حالت FSH سرم خون به حد آستانه رسیده سپس استروژن برای کاهش آن افزایش می یابد. زیاد شدن استروژن منجر به بازگشت FSH به تخمدان شده و در فولیکول های آنترال تجمع می یابد. تجمع FSH در فولیکول های آنترال منجر به آغاز آپوپتوز وسیع در سلول های گرانولوزا و سوماتیک و نهایتاً آترزی شدن فولیکول آنترال می شود. بنابراین اگر در این زمان FSH اندازه گیری شود مطمئناً سطح آن در سرم خون کاهش نشان می دهد، اتفاقی که در رابطه با گروه های گنادکتومی رخ داده است.

نکته بسیار مهم دیگر اینکه استرادیول تنها یک عامل تنظیم کننده در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تخمدان نیست، بلکه نقش بسیار مهمی نیز در زنده ماندن سلولهای گرانولوزا دارد. سلول های گرانولوزا منبع اصلی استرادیول هستند، همچنین زمانی که گیرنده های استروژن ($ER\alpha$ و $ER\beta$) را بر روی سطح خود بیان می کنند، هدف اصلی این هورمون در موش، موش صحرايي، گوسفند، خوک، گاو و انسان [185-187] می شوند. استرادیول نقش های متعددی در سلولهای گرانولوزا بازی می کند، از جمله، پیشبرد روند بلوغ فولیکول ها، افزایش بیان گیرنده گنادوتروپین ها و مهار وقوع آپوپتوز [185, 269]. در پژوهش حاضر نیز کاهش نسبی فولیکول های آپوپتوتیک در رده های اولیه و پراآنترال در گروه های گنادکتومی نسبت به سایر گروه های غیرگنادکتومی حاصل همین افزایش ترشح استروژن است. اما این افزایش نتوانسته روند مرگ آپوپتوز در فولیکول های بدوی را کاهش دهد. در رابطه با فولیکول های آنترال نیز افزایش استروژن خون منجر به بازگشت FSH سرمی به فولیکول های آنترال شده و کلید های مرگ آپوپتوز را بیش از گروه های دیگر در آن ها روشن نموده است.

تمامی مسیرهای لیگاند-گیرنده، چه از طریق میتوکندری باشد و یا غیر از آن، قبل از فعال شدن Caspase 3، تحت یکی از مسیرهای فعالیت Caspase 8 قرار می گیرند [194]. اعضاء خانواده BCL-2 که هم شامل عوامل زنده مانی ($BCL-2$ ، B Cell Lymphoma/Leukemia (BCLX) و ...) و هم عوامل پیش آپوپتوزی (BCL-2 interacting domain (BID)، BCL-2L11، BAX، BCL-2 homologues (antagonist killer (BAK) هستند، عوامل کلیدی تنظیم آپوپتوز می باشند که جایگاه عملکردشان غشاء میتوکندری است. کاهش میزان یک عامل زنده مانی منجر به تحریک میتوکندری و القاء مرگ سلولی می شود. عوامل زنده مانی از انتشار سیتوکروم C ($Cyt\ c^{180}$) جلوگیری کرده در حالیکه عوامل آپوپتوزی باعث انتشار آن از میتوکندری می شوند. اعضاء خانواده BCL-2، در مسئله مرگ و زنده مانی سلولهای زایا و نیز سلولهای سوماتیک دخالت کرده و اینگونه در فرآیند آترزی و زنده ماندن فولیکولها دخالت می کنند. در موشهایی که از نظر BCL-2 نقص یافتند، تعداد فولیکولهای بدوی و تخمک کاهش شدید پیدا کرد [200]. در حالیکه بیان بیش از حد آن موجب رشد تخمک و کاهش آپوپتوز سلولهای گرانولوزای فولیکولهای آنترال شد، این امر مسیر رشد فولیکول را بهبود بخشید [201]. BAX در سلول های گرانولوزا و تخمک بیان و مهار آن موجب ادامه

¹⁸⁰ Cytochrome c

رشد فولیکولهای سالم دیگر می شود [202]. همچنین نشان داده شده است که بیان BAX در سلولهای گرانولوزای فولیکولهای آترزی انسانی و خوک به شدت صورت می گیرد [202, 270]. با توجه به گفته های فوق، سطح ترشح مناسب عوامل رگ زایی، کاهش تقریبی بیان BAX و افزایش بیان β -2 BCL نزدیک به گروه کنترل در گروه های پیوندی گنادکتومی شده، نشان از برقراری جریان خون بین تخمدان پیوندی و بافت میزبان و همچنین کاهش روند مرگ در تخمدان آن ها داشته است.

پس از بررسی داده های حاصل از انجماد شیشه ای تخمدان کامل موش صحرائی، مشخص گردید که نتایج ارائه شده توسط LM و TEM می توانند گاهاً متفاوت و حتی مخالف یکدیگر باشند. به هر حال روش انجمادی با ترکیب ضدبخ های اتیلن گلاکول، دی متیل سولفوکساید و سوکروز اگر چه در حفظ ذخیره فولیکول های تخمدان موش صحرائی موفق بوده است اما آسیب های قابل توجهی را در سطح فراساختار و مرگ سلولی آپوپتوز نیز وارد نموده است. از طرف دیگر در بررسی تعداد فولیکول های مرده در H&E و فولیکول های آپوپتوتیک با ایمونو هیستوشیمی عامل Caspase 3 به نظر می رسد که بهترین ترکیب برای انجماد شیشه ای تخمدان موش صحرائی، DMSO + EG و سوکروز است اما داده های EM نشان داد که تغییرات ناشی از انجماد شیشه ای می تواند نسبت به LM متفاوت باشد. بدین جهت در بررسی EM به نظر می رسد استفاده از سوکروز نسبت به گروه فاقد سوکروز، چندان به نفع حفظ فراساختار بافت تخمدان موش صحرائی نبوده است. نهایتاً اینکه به نظر می رسد بررسی فراساختار در کنار بررسی ساختار معمول بافت، امری ضروری برای ارزیابی نتایج حاصل از فرآیند انجماد است.

3-2-4. تغییرات گنادوتروپین ها، هورمون های استروئیدی، و عوامل رشد در تخمدان کامل منجمد -

ذوب شده موش صحرائی پس از پیوند به خودی

همانطور که گفته شد در فرآیند پیوند، برای بررسی تغییرات هورمون های جنسی و گنادوتروپین ها و نیز عوامل رشد که در ارتباط نزدیک با FSH و LH قرار دارند، نباید به ارزیابی ترشح آن ها فقط در یک زمان اکتفاء نمود و لازم است تا در طول زمان پیوند سطح ترشح اندازه گیری شده و بعد متناسب با تغییرات رشد انواع فولیکول ها مورد تجزیه و تحلیل قرار بگیرد.

زمان بندی رشد فولیکول ها در بافت تخمدان نشان می دهد که فولیکول های اولیه (پرانترال) که در لایه های عمقی تر بافت تخمدان قرار دارند، در فعالیت اولیه تخمدان و سطح باروری جاندار نقش اساسی دارند [166]. از طرف دیگر این نوع از فولیکول ها به تغییرات جریان خون و نیز کاهش آن بالاترین حساسیت را دارند. مطالعات نشان داده اند که در تخمدان های پیوند زده شده به همراه فیبرین حاوی دو عامل VEGF و 181 HBP، فولیکول های پرانترال در تولد فرزندان نقش اساسی را داشته اند در حالیکه بارداری در گروه کنترل بدون استفاده از عوامل فوق، حاصل رشد فولیکول های بدوی بوده است [166].

¹⁸¹ Heparin Binding Protein (HPB)

از مسائل مورد توجه در جریان پیوند بافت تخمدان، زمان بازگشت فعالیت هورمونی است. از عوامل مؤثر بر این مسئله می توان به روش انجمادی، جایگاه پیوند، تزریق خارجی گنادوتروپین ها، پیوند به همراه ایجاد آناستوموزهای عروقی و یا استفاده از داربست های زیستی که گاهاً حاوی عوامل رشد هستند، اشاره نمود. اخیراً Silber به همراه همکارانش، فهرست کاملی را از مطالعات انجام گرفته بر انجماد و پیوند بافت تخمدان ارائه کرده است که در آن تغییرات هورمونی هر بیمار را از یک تا چهار سال مورد بررسی قرار داده است [271]. در این مطالعه، جایگاه ارتوتوپیک، دقت در تهیه قطعات نازک بافت تخمدان و نیز قرار دادن بافت پیوندی در یک بستر عروقی مناسب و فراهم کردن جریان خون در دسترس آن از مهمترین عوامل در موفقیت پیوند شناخته شده اند [271]. استفاده از جایگاه اولیه تخمدان در روش ارتوتوپیک این اجازه را به بیمار می دهد تا به صورت طبیعی باردار شود، نتیجه ای که در بیش از 50% گزارشات تولد نوزاد انسانی به چشم می خورد. Callejo و همکارانش پیوند تخمدان را در دو جایگاه زیر پوست و پریتونئوم مورد بررسی قرار دادند و بازگشت فعالیت تخمدان را در هر مورد گزارش نمودند. تخمدان های پیوند زده شده به خودی در مطالعه فوق تا 6 ماه پس از پیوند به فعالیت ترشحی ادامه دادند [272]. اثر مثبت استفاده از جایگاه زیر پوست در برقراری مجدد فعالیت تخمدان در مطالعات دیگری نیز اشاره شده است [273]. همچنین تخمدان های موش صحرایی به پریتونئوم بدون ایجاد آناستوموز عروقی پیوند زده شده و متعاقب آن بازگشت فعالیت تخمدان گزارش شده است [138]. از طرف دیگر گزارش داده شده است که پیوند تخمدان به عضلات سطحی، راهی مناسب برای برقراری مجدد فعالیت تخمدانی و حفظ حداکثری بافت پیوندی در بدن می باشد.

این طور که به نظر می رسد، اثر گذاری جایگاه های مختلف پیوند تخمدان در گونه های جانوری، بر اساس گونه بوده و این مطلب به خوبی در مطالعات محققین این زمینه به چشم می خورد. در پژوهش حاضر نیز در ابتدای شروع تحقیق طرحی نسبتاً گسترده به صورت پابلوت برای پیدا کردن بهترین جایگاه پیوند تخمدان در موش صحرایی انجام شد که در آن چهار جایگاه زیر پوست پشت گردن، داخل عضلات کنار ستون فقرات در پشت، زیر فاسیای عضله و زیر پوست ناحیه پهلو (بین پوست و دیواره پشتی تنه) مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت. نهایتاً و در نتیجه این مطالعه (که داده های آن در این رساله نیامده است) جایگاه زیر پوست پشت گردن و داخل عضله برابر با هم و بهترین نتایج را ارائه دادند. تنها مزیت جایگاه زیر پوست گردن، حفظ تمامیت بافت و عدم تلاشی کردن آن بود، اتفاقی که در جایگاه عضله به خصوص عضلات عمقی به وفور دیده می شود.

4-2-3-1. گنادوتروپین ها

استفاده از گنادوتروپین ها برای حمایت از بافت پیوندی و نیز کشت تخمدان و یا فولیکول ها کمک شایانی به تداوم رشد آن ها می نماید [168, 274]. اثر FSH در کشت بافت تخمدان و فولیکول های جداسازی شده آن به اثبات رسیده و امروزه به ندرت محلول کشت بافت تخمدان و یا فولیکول را می توان یافت که فاقد FSH باشد، اگرچه استفاده از LH به صورت متداول صورت نمی گیرد [275]. از FSH به سه شکل مورد استفاده

قرار می‌گیرد: 1- rFSH¹⁸² و یا FSH نو ترکیب 2- FSH فرآوری شده از ادرار (uFSH¹⁸³) و 3- گنادوتروپین منوپوز انسانی (HMG¹⁸⁴). نشان داده شده است که HMG در افزایش قطر فولیکول‌ها و نیز میزان ترشح استروئیدها موفق تر بوده است [276]. استفاده از تزریق گنادوتروپین‌ها در خانم‌هایی که دچار نقص تخمدان زودرس و یا فیزیولوژیک شده‌اند نیز صورت می‌گیرد که البته بدون عوارض جانبی نخواهد بود [277].

اما همانطور که اشاره شد، یکی از مهمترین موارد استفاده از تزریق گنادوتروپین در حمایت از بافت تخمدان پیوندی انجام می‌شود [168, 274]. تقریباً در تمامی پیوند‌های تخمدان انسانی تزریق FSH و یا ترکیبات اشاره شده آن مورد استفاده قرار می‌گیرد. بازگشت فعالیت هورمونی تقریباً در مادران تمامی 13 نوزاد متولد شده در نتیجه فرآیند انجماد و پیوند بافت تخمدان دیده شده است. شروع فعالیت مجدد تخمدان 3/5 تا 6/5 ماه پس از پیوند با یک افزایش در میزان E2 و نیز کاهش در سطح FSH بوده است [183]. اگر چه به طور عمده در زمان بازگشت چرخه تخمدانی، افزایش در میزان E2 رخ می‌دهد و در انسان [278] و گوسفند [69] نیز گزارش شده، اما گاهی نتایج متفاوتی نیز ارائه گردیده است. بازگشت فعالیت هورمونی در بیمارانی که قبل از پیوند دوره شیمی درمانی داشته‌اند 1/5 تا 2 ماه دیرتر از بیمارانی بوده است که این دوره درمانی را تجربه نکرده‌اند [183]. Meirow و همکارانش در گزارش خود دلیل این مسئله را آسیب به عروق ناحیه پیوند در نتیجه شیمی درمانی و یا رادیوتراپی دانسته‌اند [103].

LH و FSH گلیکوپروتئین‌های هیپوفیزی بوده که دارای سه زیر واحد (زیر واحد آلفای مشترک و زیر واحد بتای مجزا) می‌باشند. در موش صحرایی، ژن کد کننده مربوط به هر زیر واحد بر روی کروموزوم مجزایی قرار دارد. یعنی برای سه زیر واحد، سه ژن بر روی سه کروموزوم دیده می‌شود. در موش‌های صحرایی ماده، اگر چه اولین تنظیم کننده گنادوتروپین‌ها، دکاپیتید GnRH است ولی سه هورمون Activin، Inhibin و Follistatin تنظیم کننده‌های اصلی ترشح FSH β محسوب می‌شوند. Activin از دو منبع گناد و سلولهای Gonadotrop هیپوفیز که خود ترشح کننده گنادوتروپین‌ها هستند، ترشح می‌شود. اما Inhibin فقط منشاء گنادی دارد. لذا در صورت فقدان گناد، مهار کننده Inhibin که مهمترین عامل است، حذف می‌شود و از طرفی Activin همچنان به فعالیت خود ادامه داده و این می‌تواند منجر به افزایش میزان FSH شود. ترشح گنادوتروپین‌ها به صورت متفاوتی پس از گنادکتومی تنظیم می‌شود:

1- پس از برداشتن تخمدانها و در نتیجه افزایش GnRH، LH، سرم خون به آرامی بالا می‌رود. بیان mRNA زیر واحد های آلفا و بتای LH، 3 تا 4 روز پس از برداشت تخمدانها افزایش می‌یابد که البته با تزریق GnRH می‌توان از آن جلوگیری کرد [279].

¹⁸² Recombinant FSH (rFSH)

¹⁸³ Urinary Purified FSH (uFSH)

¹⁸⁴ Human Menopausal Gonadotropin (HMG)

2- بر خلاف LH، FSH خون و بیان mRNA مربوط به FSH بتا، به سرعت پس از برداشتن گنادها افزایش می یابد. به طوریکه بیان mRNA مربوط به FSH بتا، یک ساعت پس از برداشتن تخمدانها و سطح FSH سرم خون پس از 8 ساعت حتی در حضور آنتاگونیست GnRH افزایش را نشان می دهند [279]. این افزایش GnRH-independent در اصل در نتیجه از دست رفتن Inhibin می باشد که در تخمدان بیان می شده است.

3- در افزایش میزان بیان mRNA مربوط به FSH بتا و نیز ترشح FSH (منطبق با افزایش زیر واحد های LH)، یک افزایش ثانویه نیز وجود دارد. زمانی که سطح بیان mRNA و ترشح LH بتا و آلفا توسط آنتاگونیست GnRH پائین می آید، سطح بیان mRNA و ترشح FSH بالا می رود. این تغییر انتخابی در بیان mRNA گنادوتروپینی به تغییر در ترجمه و یا ثبات mRNA گنادوتروپین ها نسبت داده می شود. یعنی در صورت عدم بیان mRNA یک گنادو تروپین (مثل LH)، سلولهای گنادوتروپ هیپوفیز می توانند بیان mRNA نوع دیگر (مثل FSH) را به صورت جبرانی افزایش دهند [280].

نقش اصلی GnRH در تنظیم بیان ژنهای گنادوتروپین ها با تنظیم سنتز mRNA آنها می باشد. نسخه برداری از ژنهای زیر واحدها در موش صحرایی گنادکتومی شده به صورت بلند مدت افزایش می یابد و افزایش بلافاصله پس از برداشت تخمدانها کاملاً وابسته به GnRH می باشد. همانطور که گفته شد، بیان زیر واحد های LH وابسته به GnRH بوده اما FSH به GnRH غیر وابسته است. یعنی استفاده از آنتاگونیست GnRH می تواند میزان سنتز زیر واحدهای LH را کاهش دهد اما در تنظیم ساخت زیر واحدهای FSH اثر چندانی ندارد. این مسئله حاکی از آن است که تنظیم کننده های FSH بیشتر همان Inhibin، Activin و Follistatin بوده اما مکانیسم دقیق این تنظیم هنوز نامعلوم است [279].

در پژوهش حاضر به منظور ارزیابی بهتر و دقیق تر تغییرات هورمون های جنسی و گنادوتروپین ها پس از پیوند یک گروه دیگر به نام "گنادکتومی دوطرفه (BLG)" به گروه های آزمایشی اضافه گردید. به این ترتیب در هفته 5 رشد دو تخمدان موش های صحرایی از بدن آن ها خارج شده و بعد از جراحی به مدت سه هفته در واحد حیوانات آزمایشگاهی در شرایط یکسان با سایر حیوانات نگهداری شدند. پس از گذشت سه هفته، حیوانات بیهوش شده و سرم خون آن ها جداسازی و میزان ترشح هورمون های جنسی و گنادوتروپین ها ارزیابی شد. پس از مشاهده داده ها طبق جدول 3-10، مشخص گردید که سطح گنادوتروپین ها در گروه BLG بالا بوده (FSH تقریباً 3/5 و LH در حدود 3 IU/ml) به طوریکه هر دو هورمون نسبت به گروه کنترل و تمامی گروه های آزمایشی اختلاف معنی دار داشتند. این مطلب وابستگی تنظیمات هیپوفیز به تخمدان، در رابطه با ترشح FSH و LH را اثبات می کند. در دو گروه گنادکتومی یک طرفه انجمادی (VTG) و غیر انجمادی (nVTG) سطح FSH نسبت به سایر گروه های غیر گنادکتومی انجمادی (VTnG) و غیر انجمادی (nVTnG) و نیز نسبت به گروه کنترل کاهش نشان می دهد. این مطلب نشان می دهد که پس از گذشت سه هفته و برقراری چرخه تخمدانی و فعال شدن محور هیپوفیز-تخمدان، سطح FSH بر اثر عمل مهار کننده های تخمدانی به زیر گروه کنترل و گروه های گنادکتومی رسیده است. همانطور هم که قبلاً گفته شد، تنظیم ترشح FSH تنها با Inhibin تخمدانی صورت می گیرد [279, 280]. بنابراین تا زمان برقراری ارتباط خونی مجدد بین تخمدان و

جایگاه پیوند، سطح این هورمون همچنان بالا خواهد بود. عدم تنظیم دقیق ترشح این هورمون و منطبق نشدن با میزان ترشح آن در گروه کنترل را می توان به حضور فقط یک تخمدان در این گروه دانست که فیدبک های تبادللی بین تخمدان و هیپوفیز را به حداقل کاهش می دهد. در رابطه با LH هم وضعیتی شبیه FSH دیده می شود. با این تفاوت که ترشح LH در ابتدای زمان پیوند و قبل از برقراری چرخه تخمدانی و فعال شدن محور هیپوفیز-تخمدان، بالا می رود اما پس از مدتی به حالت نسبتاً پایداری پایین می آید. دلیل این مسئله این است که تنظیمات LH تنها وابسته به تخمدان نیست و Inhibin های تخمدانی در کنار نوع هیپوفیزی به تنظیم ترشح LH می پردازند. بنابراین در ابتدا بر اثر حذف مهارکننده تخمدانی میزان ترشح LH افزایش می یابد اما پس از مدتی مهارکننده هیپوفیزی، ترشح LH را تنظیم کرده و پایین می آورد. در اینجا نیز ترشح LH در هر دو گروه گنادکتومی به گروه کنترل نزدیک شده و این اختلاف ترشح نسبت به FSH کمتر خود نمایی می کند.

4-2-3-2. هورمون های استروئیدی (استروژن، پروژسترون و تستوسترون)

اگر چه منبع اولیه ترشح استروژن تخمدان است، اما در انسان تمورهای سینه ای نیز می تواند با شدت بالایی این هورمون را ترشح کنند. تمورهای سینه حاوی آنزیمهای لازم مانند HSD¹⁸⁵ برای تبدیل استرون سولفات به استرادیول بوده و مطالعات انجام شده نشان داده اند که این مسیر می تواند حتی بسیار پر رنگ تر از سایر مسیرهای زیستی عمل نماید (جمعیت منوپوز آمریکای شمالی NAMS¹⁸⁶). استروژن به عنوان مهمترین هورمون در حفظ سلامتی و رشد اندام تناسلی، آبکی شدن غدد سرویکس و ارتجاعی شدن واژن به شمار رفته و به خوبی در خون گردش می نماید. استروژن در طول منوپوز به طور طبیعی کاهش می یابد، اما به تدریج به حالت معمولی باز می گردد. گاهی ترشح استروژن در طول دوره پیش از منوپوز¹⁸⁷ بیشتر از گذشته خواهد بود اما به طور معمول به میزان حداقل کاهش می یابد. کاهش تولید استروژن با شروع دوره پیش از منوپوز آغاز می شود و بر رفتارهای جنسی اثر مستقیم دارد مانند خشک شدن واژن و به صورت غیر مستقیم نیز بر حالاتی چون تعریق شبانه، ایجاد چهره گر گرفته¹⁸⁸ و یا تمایل به همسر اثر غیر مستقیم دارد.

دو هورمون پروژسترون و تستوسترون هم در طول منوپوز کاهش می یابند. کاهش در میزان تولید پروژسترون بر چرخه جنسی تأثیر بیشتری دارد تا بر رفتارهای جنسی. کاهش در میزان تولید تستوسترون وابسته به افزایش سن است نه منوپوز، لذا این کاهش ممکن است قبل از منوپوز آغاز شود ولی کمتر از استروژن خواهد بود. بیشترین حد ترشح این هورمون در سن 20 سالگی است و به تدریج کاهش می یابد. تستوسترون حتی زمانی که تولید استروژن متوقف شده باشد، تولید می شود و ترشح آن توسط غده فوق کلیه¹⁸⁹ حتی پس از منوپوز هم

¹⁸⁵ Hydroxysteroid Dehydrogenase (HSD)

¹⁸⁶ North American Menopause Society (NAMS)

¹⁸⁷ Perimenopause

¹⁸⁸ Hot Flashes

¹⁸⁹ Adrenal Gland

ادامه دارد، اگر چه میزان آن کاهش می یابد. بنابراین در ارزیابی هورمون تستوسترون باید به منبع دیگر و بسیار مهم آن یعنی غده فوق کلیه نیز توجه داشت [281].

در پژوهش حاضر، میزان هورمون های پروژسترون و استروژن در گروه غیر گنادکتومی (VTnG و nVTnG) بسیار نزدیک به گروه کنترل بود و تفاوت معنی داری نسبت به آن نداشتند. اما در دو گروه گنادکتومی، این دو هورمون نسبت به گروه های کنترل و غیر گنادکتومی کاهش نشان دادند. در گروه گنادکتومی دو طرفه (BLG) نیز سطح ترشح این دو هورمون بسیار کم بوده و در حد کمتر از 0/5 واحد اندازه گیری خود رسیدند. شاید در نظر اول این طور به نظر برسد که گروه های غیر گنادکتومی در برقراری فعالیت تخمدانی نسبت به دو گروه گنادکتومی موفق تر عمل کرده اند. اما باید به این نکته توجه کرد که در گروه های غیر گنادکتومی و گروه کنترل، دو تخمدان به ترشح هورمون های استروژن و پروژسترون مشغولند. بنابراین منبع ترشح، دو برابر منبع ترشح این هورمون ها در گروه های گنادکتومی می باشد. به عبارت دیگر در گروه های گنادکتومی، پس از برداشتن تخمدان طرف مقابل و حذف یکی از منابع ترشح هورمون، تخمدان باقی مانده به زیر پوست گردن پیوند زده شد. تخمدان پیوندی پس از برقراری ارتباط خونی و رشد فولیکول ها، به تنهایی و بدون حضور تخمدان طرف مقابل، شروع به ترشح دو هورمون استروژن و پروژسترون می کند. در هر دو گروه گنادکتومی انجمادی (VTG) و غیر انجمادی (nVTG) ترشح دو هورمون فوق به گروه های غیر گنادکتومی و کنترل نزدیک شده و تفاوت معنی داری با آن ها نداشتند، فقط استرادیول ترشحاتی در گروه nVTG با گروه های غیر گنادکتومی و کنترل کاهش معنی دار نشان داد. ترشح تستوسترون در تمامی گروه های آزمون به گروه کنترل نزدیک شده به طوریکه اختلاف معنی داری با یکدیگر نشان ندادند اما در گروه BLG تستوسترون افزایش قابل توجهی یافته و نسبت به تمامی گروه های آزمون و کنترل، معنی دار بوده است. همانطور که گفته شد تستوسترون حتی در زمانی که ترشح استروژن متوقف می شود، ساخته شده و به خون ترشح می شود. در گروه BLG که هر دو تخمدان از بدن خارج شده است، تستوسترون از غده فوق کلیه ترشح شده [281] به طوریکه حتی از گروه کنترل نیز سطح بالاتری می یابد. این مسئله می تواند این فرضیه را مطرح کند که تنظیم کننده اصلی ترشح تستوسترون از غده فوق کلیه، عوامل تخمدانی می باشند اما غده فوق کلیه نیز می تواند به صورت جبرانی تستوسترون را ترشح نماید. این مطلب با نگاهی به میزان ترشح هورمون تستوسترون در سایر گروه های پیوندی و کنترل قوی تر می شود. به این ترتیب که در تمامی گروه های پیوندی و کنترل میزان ترشح تستوسترون نزدیک به هم بوده و اختلاف معنی دار ندارند. این موضوع نشان می دهد که به هر حال حضور یک تخمدان به تنهایی و سه هفته پس از پیوند، که تخمدان در انجام فعالیت هورمونی تثبیت شده است، توانسته است روند ترشح هورمون در غده فوق کلیه را کنترل و در حد طبیعی نگه دارد. اما در گروهی که هر دو تخمدان از بدن خارج شده است، پس از گذشت سه هفته و بدون حضور کنترل کننده اصلی یعنی تخمدان، ترشح تستوسترون به صورت قابل توجهی بالا رفته است.

البته این فرآیند در جنس مذکر تا حدودی متفاوت می شود، چرا که Li و همکارانش 22 روز پس از خارج کردن بیضه های موش نر نژاد Kunming، مشاهده کردند که میزان ترشح هورمون تستوسترون از حدود 38 nmol/L به 1/5 nmol/L کاهش یافته است. این مطلب نشان می دهد که در موش نر بر خلاف موش

پروتئینهای فوق به خصوص در مورد GDF-9 و BMP-15، بیشتر از مطالعاتی است که بر روی موش و گوسفند انجام شده است. نتیجه این مطالعات نشان می دهند که GDF-9 و BMP-15 برای رشد فولیکول طبیعی و باروری جنس ماده ضروری هستند. تأیید بالینی این مطلب این است که در فولیکولهای انسانی در حال رشد، GDF-9 و BMP-15 به شدت بیان می شوند. نکته مهم دیگر اینکه در تخمدان پستاندارانی که تاکنون بررسی شده اند، تخمک تنها سلولی است که این دو ژن را بیان می کند [285]. مدرک دیگر برای ضروری بودن این مولکول ها جهت باروری جنس ماده، در مطالعاتی بدست آمد که عملکرد ژن هایشان در موجود زنده مختل شده بود. به طور مثال در موشی که در آن ژن GDF-9 مختل شده بود، رشد فولیکول در مراحل ابتدایی پراثرال متوقف شد [286]. بنابراین هیچ گونه فولیکول گراآف، تخمک گذاری و حاملگی دیده نشد. همچنین فنوتیپ مشابهی در موشهای ساپرس شده از نظر BMP-15 دیده شد [285].

سؤال مهم دیگر برای فهم عملکرد GDF-9 و BMP-15، سلولهای هدف آنها می باشند. مدارک زیادی وجود دارند که سلولهای گرانولوزا هدف این دو ژن هستند. امروزه ثابت شده است که GDF-9 نقش بسیار اساسی در تکثیر سلولهای گرانولوزا در مرحله غیر وابسته به گنادوتروپین ها دارد. عاملی که باعث انتقال فولیکول به مرحله ثانویه¹⁹⁸ می شود [287]. GDF-9 به طور مستقیم بر فولیکولهای پراثرال تا مرحله فولیکول بارز اثر گذارده و باعث تحریک سنتز DNA در سلولهای گرانولوزا می شود [287]. این مسئله به صورت آزمایشگاهی نیز ثابت شده است [286]. در مورد BMP-15 نیز ثابت شده است که در *in vitro* موجب تحریک میتوز در سلولهای گرانولوزا می شود. اما جنبه مهم میتوژنیک بودن این دو پروتئین غیر وابسته بودن آنها به FSH است.

اگرچه GDF-9 و BMP-15 به تنهایی اثر کمی بر تمایز سلولهای گرانولوزای فولیکولهای پراثرال کشت داده شده دارند، اما هر دو عامل بر روی عملکرد FSH در این سلولها اثر گذارند [248]. Vitt و همکارانش [213] ثابت کردند که GDF-9، گیرنده های LH تحریک شده با FSH و همچنین بایوسنتز E2 و P4 را در سلولهای گرانولوزا مهار می کند. بنابراین به نظر می رسد که GDF-9 در سلولهای گرانولوزای تمایز نیافته، در توقف عملکرد FSH دخالت دارد. BMP-15 نیز مانند GDF-9، تولید P4 وابسته به FSH را کاهش می دهد اما روی E2 وابسته به FSH اثری ندارد [213]. نتیجه اینکه در مرحله فولیکولار قدرت انتخابی FSH با واسطه E2 صورت می گیرد و P4 در آن نقشی ندارد. همچنین اخیراً ثابت شده است که BMP-15 اثر مهاری در بیان گیرنده FSH دارد. این نتایج این فرضیه را تقویت می کنند که ممکن است GDF-9 و BMP-15 کنترل کننده های اصلی FSH در طول رشد فولیکول باشند. این مطلب با نتایج پژوهش حاضر در رابطه با میزان بیان FSH و نیز مولکول های BMP-15 و GDF-9 منطبق می باشد. اگر چه بیان GDF-9 در گروه های گنادکتومی کاهش یافته، اما BMP-15 و TGF-b در هر دو گروه بیان نزدیک به گروه کنترل داشته است. این مطلب می تواند بر نقش تنظیمی مولکول های بلوغ فولیکول بر FSH ترشح شده در سرم خون تأکید نماید با توجه به اینکه در این دو گروه FSH کاهش و استروژن افزایش قابل توجهی یافته اند.

¹⁹⁸ Secondary Stage

از طرف دیگر در موشهایی که از نظر GDF-9 ساپرس شده اند، تشکیل سلولهای تکا¹⁹⁹ نیز مختل می شود [288]. این مسئله این فرضیه را تقویت می کند که GDF-9 یک اثرگذار قوی بر رشد سلولهای تکا می باشد. در واقع از کشت سلولهای تکا مشخص شده است که GDF-9، ساخت آندروژن وابسته به LH را افزایش می دهد [289]. بنابراین سلولهای تکا هدف اصلی GDF-9 بوده و این پروتئین تعیین کننده مهم تولید آندروژن توسط فولیکولهای تخمدان است. نهایتاً GDF-9 نقش مهمی در رشد تخمک به خصوص در تنظیم اندازه تخمک و تشکیل گرانولهای قشری آن بازی می کند [290].

3-4. تغییرات رگ زایی در تخمدان کامل منجمد-ذوب شده موش صحرائی پس از پیوند به خودی

مهمترین نگرانی در رابطه با پیوند بافت تخمدان، کاهش زمان ایسکمی و آسیب های ناشی از آن است که خود منجر به پائین آمدن میزان مرگ فولیکولی و افزایش تعداد در حال رشد آن ها خواهد شد [291]. این مسئله حتی می تواند در افزایش کیفیت تخمک های به دست آمده از بافت پیوندی جهت لقاح و تولید جنین نقش بسزایی داشته باشد [291]. Soleimani و همکارانش نشان دادند که افزایش و یا تسریع در فرآیند رگ زایی در بافت تخمدان پیوندی با کاهش هایپوکسی بافت و درصد فولیکول های آپوپتوتیک رابطه مستقیم دارد [292]. همچنین تسریع در زمان رگ زایی مجدد بافت پیوندی منجر به شروع هر چه زودتر فعالیت تخمدان و نیز افزایش طول مدت رشد آن خواهد شد [166]. برای یک بافت با فعالیت فیزیولوژیک بالا مانند تخمدان سرعت نفوذ مواد غذایی به داخل بافت بسیار اهمیت داشته و البته انتشار مواد در آن تا حدودی محدود است [293] و از طرفی نیز تعداد فولیکول های شکل گرفته، کاملاً وابسته به سرعت رگزایی خواهد بود [294]. بنابراین این گونه به نظر می رسد که تراکم عروقی²⁰⁰ با میزان بروز آپوپتوز و شدت هایپوکسی در بافت رابطه معکوس دارد، یعنی هر چقدر تراکم عروقی بیشتر باشد دو عامل اخیر نیز کاهش می یابند [292]. اینکه هایپوکسی عامل اصلی و اولیه در شروع رگ زایی است امروزه مورد قبول همگان است. مانند وضعیتی که در دوران جنین برای رگ زایی در بدن جنین رخ می دهد. هنگامیکه بافت دچار هایپوکسی می شود، عامل رشد اندوتلیال عروق خونی (VEGF) بیان می شود [292]. با بیان VEGF سلول های پیش ساز اندوتلیال عروق خونی شروع به مهاجرت کرده و برای ساخت یک رگ جدید آماده می شوند.

VEGF که به عنوان عامل نفوذپذیری عروقی (VPF²⁰¹) نیز شناخته می شود، خاصیت تحریک میتوز²⁰² داشته و می تواند سلولهای اندوتلیالی را وادار به مهاجرت نماید [137]. همچنین یک عامل زنده مانی نیز برای سلولهای اندوتلیال عروق ریز محسوب می شود [127]. بیان VEGF در تخمک فولیکولهای اولیه موش صحرائی دیده شده است [146]. همچنین بیان mRNA ژن VEGF در سلولهای گرانولوزا و تکا به همان

¹⁹⁹ Theca Cells

²⁰⁰ Vascular Density

²⁰¹ Vascular Penetrate Factor (VPF)

²⁰² Mitogen

اندازه پروتئین آن در تمامی بخشهای فولیکول، با مرحله رشد فولیکول افزایش می یابد [148]. اخیراً نیز VEGF در فولیکولهای پرآنترال اولیه در موش صحرایی شناسایی شده و ثابت شده است که از مرحله پرآنترال به بعد به طور کامل بیان می شود [295].

حجم زیاد VEGF منجر به عدم ثبات دستگاه عروقی شده و بنابراین شبکه های جدید عروق خونی شروع به شکل گیری می کنند، از طرف دیگر نقص در میزان آن نیز منجر به تحلیل رگ ها خواهد شد [152]. Hazard اثبات کرد که گنادو تروپین ها بر میزان ترشح VEGF در پریمات ها تأثیر می گذارند و به عنوان یک عامل تنظیم کننده برای آن محسوب می گردند [153]. در این بین هورمون هایی که بر میزان بیان VEGF اثر می گذارند مانند hCG، eCG²⁰³، LH و FSH بسته به میزان ترشحشان از جمله عوامل کلیدی در رگزایی تخمدان محسوب می شوند. امروزه هم به صورت *in vivo* و *in vitro* ثابت شده است که بین عوامل رگزایی ارتباط نزدیکی با هم وجود دارد. مثلاً اثر VEGF به تنهایی کمتر از اثر VEGF به همراه FGF-2 خواهد بود [154].

تحقیقات سالهای اخیر نیز نشان می دهد که VEGF قابلیت تحریک میتوز را در سلولهای گرانولوزا را دارد و می تواند رشد فولیکول در موش صحرایی را تحریک نماید [155]. همچنین مشخص شده است که در این گونه جانوری VEGF یک تنظیم کننده مهم برای رشد فولیکولهای بدوی محسوب می شود [156]. در این جهت Danforth نیز نشان داد که VEGF تعداد فولیکولهای اولیه و ثانویه را در موش صحرایی افزایش می دهد [157]. همچنین ثابت شده است که مهار فعالیت VEGF منجر به افزایش آپوپتوز و عدم تعادل بین پروتئین های تحریک کننده و مهارگر آپوپتوز می گردد به طوریکه تعداد فولیکولهای آترتیک را به نسبت زیادی افزایش می دهد [149].

با توجه به موارد فوق باید گفت که VEGF نقش بسیار مهمی در رگ زایی مجدد بافت دارد. در پژوهش حاضر نیز سعی شد تا تغییرات بیان این عامل رگ زایی مورد بررسی قرار گیرد. اما از آنجائیکه در تمامی بافت های پیوندی، هایپوکسی در ساعات اولیه پیوند در بافت القاء می شود بنابراین می توان گفت که VEGF نیز از همان ابتدای امر تولید و فرآیند رگ زایی آغاز می شود. اما اینکه دقیقاً چه مدت زمانی طول می کشد تا این روند آغاز گردد در گونه های مختلف متفاوت بوده و کاملاً نیز مشخص نمی باشد. در مطالعه حاضر در تمامی بافت های پیوندی بیان VEGF دقیقاً نزدیک به گروه کنترل بوده و تفاوتی با آن نداشت. این حاکی از آن است که حتی سه هفته پس از پیوند، بیان این عامل رگ زایی در بافت تخمدان پیوندی به شدت صورت می گیرد. با توجه به اینکه تخمدان بافتی است که به صورت فعال رگ سازی در آن انجام می شود، می توان گفت که در بافت های پیوندی نیز VEGF به طور فعال ترشح شده و در رگ زایی بافت دخالت می کند. استفاده از VEGF در حمایت از بافت تخمدان پیوندی جهت افزایش رگ زایی در بسیاری از مطالعات صورت گرفته است. Shikanov و همکارانش نشان دادند که استفاده از داربست فیبرینی حاوی VEGF به همراه HBP در نتیجه پیوند بسیار مؤثر است [166]. داربست فیبرینی و HBP موجود در آن این امکان را می دهد تا VEGF به

^{۲۰۳} Equine Chorionic Gonadotropin

صورت منظم و با فواصل زمانی مناسب در اختیار بافت قرار گیرد. فیبرین در اطراف سلول ها محیطی ژله مانند ایجاد می کند که اجازه مهاجرت راحت سلول ها را فراهم می کند. مشخص شده است که استفاده از فیبرین اثر عوامل رشد مورد استفاده را نیز افزایش می دهد [296].

باید اشاره کرد که به دلیل تداخل عوامل زیادی در داخل بدن و اثر گذاری بر فرآیند رگ زایی، بررسی عوامل رشد و هورمون های مؤثر، بیشتر در فرآیند کشت تخمدان و فولیکول صورت گرفته است. در کنار VEGF عوامل دیگری نیز در فرآیند رگ زایی دخالت می کنند که در مطالعات مختلفی به بررسی آن ها پرداخته شده است. از جمله این موارد می توان به دو عامل مهم رگ زایی یعنی $CD31^{204}$ و $CD34$ اشاره نمود. $CD31$ که با عنوان $PECAM-1^{205}$ نیز خوانده می شود نقش مهمی در خارج کردن نوتروفیل های مسن از بدن بازی می کند. $CD31$ بر روی لوکوسیت ها، مونوسیت ها و نوتروفیل ها بیان شده و نیز بر روی بخش اعظمی از اتصالات بین سلول های اندوتلیال ظاهر می شود و در مهاجرت لوکوسیت ها، ارتباطات اینتگرینی و نیز رگ زایی دخالت می کند [297]. ایمونوهیستوشیمی $CD31$ برای شناسایی عروق جدید و در حال شکل گیری در قطعات بافتی انجام می شود و به خصوص در ارزیابی میزان پیشرفت و رگ زایی تمورها نقش بسزایی دارد. Halmark و همکارانش پس از پیوند به خودی تخمدان موش صحرایی نژاد اسپراگو دالی نشان دادند که میزان بیان VEGF و $CD31$ در تخمدان هایی که در جایگاه حاوی زخم از پیش تشکیل شده، پیوند زده شده اند بیشتر از سایر جایگاه های پیوند حتی عضله می باشد (<http://www.research-degree-thesis.com/showinfo-52-430928-0.html>). Soleimani و همکارانش نیز اثر اسفینگوزین فسفات $S1P^{206}$ را بر میزان بیان $CD31$ در پیوند تخمدان انسانی به صورت زنوگرافت مطالعه و گزارش کردند که $S1P$ نه تنها میزان تشکیل عروق جدید را در بافت تخمدان پیوندی افزایش داده است بلکه از طریق القاء تکثیر سلول های اندوتلیالی بر سرعت رگ زایی نیز افزوده است [292]. $CD34$ نیز به عنوان یک گلیکوپروتئین سطح سلولی شناخته شده و در فرآیندهای سلول با سلول شرکت می نماید [298]. این مولکول همچنین در اتصالات سلول های بنیادی به ماتریکس خارج سلولی مغز استخوان و یا به طور مستقیم در اتصال آن ها به سلول های استرومایی نقش ایفاء می کند. $CD34$ در اصل جزء خانواده ای از سیالوموسین های عرض غشائی بوده که بر روی سلول های هماتوپوئیتیک و سلول های وابسته به دستگاه عروقی بیان می شود. همچنین $CD34$ به طور گسترده بر روی سلول های اندوتلیالی و پیش ساز اندوتلیالی بیان شده و در شناسایی عروق قدیمی و رگ زایی در محل استفاده می گردد [299]. همانطور که گفته شد در پژوهش حاضر، VEGF در تمامی گروه های پیوندی بیان بالایی داشته و این میزان به گروه کنترل رسیده است. بیان دو عامل دیگر یعنی $CD31$ و $CD34$ نیز در تمامی گروه های پیوندی نسبت به گروه کنترل افزایش داشته و در برخی از گروه ها نیز مانند دو گروه گنادکتومی nVTG و VTG معنی دار بوده است. این مطلب نشان دهنده آن است که جایگاه زیر پوست پشت گردن به لحاظ

²⁰⁴ Cluster of differentiation 31 (CD31)

²⁰⁵ Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)

²⁰⁶ Sphingosine-1-phosphate (S1P)

میزان رگ زایی جدید و کمک به بازسازی عروق قدیمی خود تخمدان نیز موفق بوده است. افزایش رشد فولیکول های آنترال، افزایش تشکیل جسم زرد و بالا رفتن سطح هورمون های استروئیدی در این دو گروه نیز تأییدی است بر این مسئله که گنادکتومی یعنی برداشت تخمدان طرف مقابل در هنگام پیوند تخمدان، با افزایش سطح ترشح گنادوتروپین ها به خصوص FSH و حذف عوامل تحلیل برنده جسم زرد، می تواند کمک بسیاری در موفقیت پیوند داشته باشد.

از طرف دیگر در پژوهش حاضر، پیوند به خودی تخمدان های غیر انجمادی و انجماد شیشه ای شده، بازگشت چرخه هورمونی و عملکرد تخمدان را به دنبال داشت. از طرف دیگر چرخه هورمونی و عملکرد تخمدان در هیچ یک از گروه های پیوندی، 3 هفته پس از پیوند به خود به گروه کنترل نرسید، اما در دو گروه گنادکتومی، نتیجه به شرایط کنترل نزدیک تر بود، چرا که به لحاظ ترشح LH با گروه کنترل تفاوت آماری نداشتند. فولیکول های بدوی در تخمدان هر دو گروه غیر انجمادی و انجمادی پیوند زده شده در جایگاه زیر پوست گردن رشد کرده و تا مرحله بلوغ پیش رفتند. اگر چه درصد رشد به مرحله بلوغ پس از برداشت تخمدان طرف مقابل وضعیت بهتری را نشان داد. بررسی فراساختار فولیکول های کوچک نشان داد که احتمال بلوغ زودرس در گروه های پیوندی به خصوص گنادکتومی وجود دارد به علاوه اینکه در نتایج مقاطع نیمه نازک، دیده شد که فولیکول های آنترال پیوندی از سلول های گرانولوزای کمی برخوردارند. بروز آپوپتوز در دو گروه گنادکتومی در فولیکول های بدوی و آنترال بیشتر و در فولیکول های اولیه و پرآنترال بیشتر از دو گروه غیر گنادکتومی بودند. اگر چه در تمامی گروه های پیوندی و در تمام مراحل فولیکولی، بروز آپوپتوز نسبت به گروه کنترل افزایش نسبی نشان داد. میزان رگ زایی در تمامی گروه های پیوندی به گروه کنترل نزدیک بود به خصوص اینکه گروه های گنادکتومی بیان بیشتری در میزان RNA دو عامل CD31 و CD34 نشان دادند.

همچنین در دو گروه اخیر، درصد بلوغ فولیکول ها و نیز فراساختار تخمدان پیوندی، وضعیت بهتری را نشان داده و بروز آپوپتوز در فولیکول های بدوی و آنترال نسبت به دو گروه nVTnG و VTnG بیشتر و در فولیکول های اولیه و پرآنترال کمتر شده بود. میزان بیان عوامل رگ زایی (CD31 و CD34) نیز در تمامی گروه های پیوندی به خصوص در تخمدان های دو گروه VTG و nVTG به گروه کنترل غیر پیوندی نزدیک تر شده بود. از مطالعه حاضر می توان نتیجه گرفت که پیوند به خودی تخمدان های غیر انجمادی و انجمادی، بازگشت چرخه هورمونی و عملکرد تخمدان را به دنبال دارد به خصوص پس از برداشت تخمدان طرف مقابل، در گروه های گنادکتومی (VTG و nVTG)، برگشت فعالیت هورمونی تخمدان و تأثیر آن بر محور هیپوفیزی و نیز تغییرات فراساختاری فولیکول های کوچک، شرایطی نزدیک به گروه کنترل را ایجاد نموده است. در تمامی گروه های پیوندی، رگ زایی مجدد به خوبی صورت گرفته و برداشت تخمدان طرف مقابل نیز باعث تحریک و تشدید بیشتر خون گیری مجدد و بیان عوامل رشد و بلوغ فولیکولی در بافت پیوندی گردیده است. نهایتاً اینکه پیوند به خودی تخمدان انجمادی در موش صحرائی نشان داد که این روش می تواند به عنوان الگویی مناسب و مطمئن به منظور بازگرداندن چرخه هورمون های جنسی و به دنبال آن کمک به ایجاد شرایط باروری برای بیماران انسانی مورد استفاده قرار گیرد.

4-4. پیشنهادات

- 1- برای بررسی بهتر ترکیبات ضد یخ استفاده شده در این تحقیق، اثر گذاری آن ها در پیوند به خود تخمدان های کامل موش صحرایی نیز بررسی شود.
- 2- به منظور بررسی اثرات انجماد، کشت آزمایشگاهی تخمدان منجمد-ذوب شده نیز می تواند شبیه سازی مناسبی از فرآیند های رشد، محاسن و معایب روش انجمادی و ترکیبات متفاوت ضد یخ ارائه نماید.
- 3- اثرات پیوند بافت تخمدان تا مرحله تخمک گیری، IVF، IVM و حتی تولد نوزاد حاصل از انتقال جنین های تشکیل شده در فرآیند IVF مورد بررسی قرار گیرد.
- 4- بررسی فراساختار بافت در صورت لزوم در مراحل ابتدایی کار، برای ارزیابی و انتخاب بهتر گروه ها صورت پذیرد.
- 5- به دنبال بررسی تغییرات ژنومیک، عوامل مؤثر در اپی ژنوم مولکول های دخیل در بلوغ فولیکول مورد ارزیابی قرار بگیرد.

فصل پنجم

منابع

Archive of SID

فصل پنجم: منابع و مأخذ

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, et al. Cancer statistics, 2006. CA: a cancer journal for clinicians. 2006;56(2):106-30.
2. Stiller CA, Desandes E, Danon SE, Izarzugaza I, Ratiu A, Vassileva-Valerianova Z, et al. Cancer incidence and survival in European adolescents (1978-1997). Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. European journal of cancer. 2006;42(13):2006-18.
3. Wu XC, Chen VW, Steele B, Roffers S, Klotz JB, Correa CN, et al. Cancer incidence in adolescents and young adults in the United States, 1992-1997. The Journal of adolescent health : official publication of the Society for Adolescent Medicine. 2003;32(6):405-15.
4. Donnez J, Godin PA, Qu J, Nisolle M. Gonadal cryopreservation in the young patient with gynaecological malignancy. Current opinion in obstetrics & gynecology. 2000;12(1):1-9.
5. Gosden RG. Gonadal tissue cryopreservation and transplantation. Reproductive biomedicine online. 2002;4 Suppl 1:64-7.
6. Hovatta O. Cryobiology of ovarian and testicular tissue. Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology. 2003;17(2):331-42.
7. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. Lancet. 2004;364(9443):1405-10.
8. 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. The New England journal of medicine. 2005;353(3):318-21.
9. Mackie EJ, Radford M, Shalet SM. Gonadal function following chemotherapy for childhood Hodgkin's disease. Medical and pediatric oncology. 1996;27(2):74-8.
10. Viviani S, Santoro A, Ragni G, Bonfante V, Bestetti O, Bonadonna G. Gonadal toxicity after combination chemotherapy for Hodgkin's disease. Comparative results of MOPP vs ABVD. European journal of cancer & clinical oncology. 1985;21(5):601-5.
11. Tauchmanova L, Selleri C, Rosa GD, Pagano L, Orio F, Lombardi G, et al. High prevalence of endocrine dysfunction in long-term survivors after allogeneic bone marrow transplantation for hematologic diseases. Cancer. 2002;95(5):1076-84.
12. Larsen EC, Muller J, Schmiegelow K, Rechnitzer C, Andersen AN. Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation- and chemotherapy-treated childhood cancer. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2003;88(11):5307-14.
13. Sanders JE, Hawley J, Levy W, Gooley T, Buckner CD, Deeg HJ, et al. Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. Blood. 1996;87(7):3045-52.
14. Warne GL, Fairley KF, Hobbs JB, Martin FI. Cyclophosphamide-induced ovarian failure. The New England journal of medicine. 1973;289(22):1159-62.
15. Meirow D, Lewis H, Nugent D, Epstein M. Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. Human reproduction. 1999;14(7):1903-7.
16. Shalet SM. Effects of cancer chemotherapy on gonadal function of patients. Cancer treatment reviews. 1980;7(3):141-52.
17. Perez GI, Maravei DV, Trbovich AM, Cidlowski JA, Tilly JL, Hughes FM, Jr. Identification of potassium-dependent and -independent components of the apoptotic machinery in mouse ovarian germ cells and granulosa cells. Biology of reproduction. 2000;63(5):1358-69.



18. Takai Y, Canning J, Perez GI, Pru JK, Schlezinger JJ, Sherr DH, et al. Bax, caspase-2, and caspase-3 are required for ovarian follicle loss caused by 4-vinylcyclohexene diepoxide exposure of female mice in vivo. *Endocrinology*. 2003;144(1):69-74.
19. Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonck A, Demylle D, Dolmans MM. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Human reproduction update*. 2006;12(5):519-35.
20. Wallace WH, Anderson RA, Irvine DS. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *The lancet oncology*. 2005;6(4):209-18.
21. Wallace WH, Thomson AB, Kelsey TW. The radiosensitivity of the human oocyte. *Human reproduction*. 2003;18(1):117-21.
22. Larsen EC, Schmiegelow K, Rechnitzer C, Loft A, Muller J, Andersen AN. Radiotherapy at a young age reduces uterine volume of childhood cancer survivors. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2004;83(1):96-102.
23. Critchley HO, Wallace WH. Impact of cancer treatment on uterine function. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 2005(34):64-8.
24. Hawkins MM. Pregnancy outcome and offspring after childhood cancer. *Bmj*. 1994;309(6961):1034.
25. Donnez J, Bassil S. Indications for cryopreservation of ovarian tissue. *Human reproduction update*. 1998;4(3):248-59.
26. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Human reproduction update*. 2004;10(3):251-66.
27. Ethics Committee of the American Society for Reproductive M. Fertility preservation and reproduction in cancer patients. *Fertility and sterility*. 2005;83(6):1622-8.
28. Borini A, Sciajno R, Bianchi V, Sereni E, Flamigni C, Coticchio G. Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration. *Human reproduction*. 2006;21(2):512-7.
29. Levi Setti PE, Albani E, Novara PV, Cesana A, Morreale G. Cryopreservation of supernumerary oocytes in IVF/ICSI cycles. *Human reproduction*. 2006;21(2):370-5.
30. Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Fratto R, Giunchi S, Venturoli S. Oocyte cryopreservation in oncological patients. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2004;113 Suppl 1:S14-6.
31. Akar M, Oktay K. Restoration of ovarian endocrine function by ovarian transplantation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2005;16(8):374-80.
32. Van der Elst J. Oocyte freezing: here to stay? *Human reproduction update*. 2003;9(5):463-70.
33. Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertility and sterility*. 1990;54(1):102-8.
34. Boiso I, Marti M, Santalo J, Ponsa M, Barri PN, Veiga A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Human reproduction*. 2002;17(7):1885-91.
35. Oktay K, Newton H, Aubard Y, Salha O, Gosden RG. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertility and sterility*. 1998;69(1):1-7.
36. Cha KY, Chian RC. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Human reproduction update*. 1998;4(2):103-20.
37. Tucker MJ, Wright G, Morton PC, Massey JB. Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro maturation. *Fertility and sterility*. 1998;70(3):578-9.
38. Wu J, Zhang L, Wang X. In vitro maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *Reproduction*. 2001;121(3):389-93.

39. Kan A, Kilani S, Tilia L, Mitchell F, Burns K, Chapman M. Pregnancy from intracytoplasmic injection of a frozen-thawed oocyte. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology*. 2004;44(3):262-3.
40. Silber SJ. Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation. *Molecular human reproduction*. 2012;18(2):59-67.
41. Isachenko E, Isachenko V, Rahimi G, Nawroth F. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2003;108(2):186-93.
42. Li YB, Zhou CQ, Yang GF, Wang Q, Dong Y. Modified vitrification method for cryopreservation of human ovarian tissues. *Chinese medical journal*. 2007;120(2):110-4.
43. Schmidt KL, Ernst E, Byskov AG, Nyboe Andersen A, Yding Andersen C. Survival of primordial follicles following prolonged transportation of ovarian tissue prior to cryopreservation. *Human reproduction*. 2003;18(12):2654-9.
44. Dittrich R, Lotz L, Keck G, Hoffmann I, Mueller A, Beckmann MW, et al. Live birth after ovarian tissue autotransplantation following overnight transportation before cryopreservation. *Fertility and sterility*. 2012;97(2):387-90.
45. Bedaiwy MA, Falcone T. Ovarian tissue banking for cancer patients: reduction of post-transplantation ischaemic injury: intact ovary freezing and transplantation. *Human reproduction*. 2004;19(6):1242-4.
46. Yin H, Wang X, Kim SS, Chen H, Tan SL, Gosden RG. Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Human reproduction*. 2003;18(6):1165-72.
47. Wang X, Chen H, Yin H, Kim SS, Lin Tan S, Gosden RG. Fertility after intact ovary transplantation. *Nature*. 2002;415(6870):385.
48. Chen CH, Chen SG, Wu GJ, Wang J, Yu CP, Liu JY. Autologous heterotopic transplantation of intact rabbit ovary after frozen banking at -196 degrees C. *Fertility and sterility*. 2006;86(4 Suppl):1059-66.
49. Imhof M, Bergmeister H, Lipovac M, Rudas M, Hofstetter G, Huber J. Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and live birth. *Fertility and sterility*. 2006;85 Suppl 1:1208-15.
50. Arav A, Revel A, Nathan Y, Bor A, Gacitua H, Yavin S, et al. Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary. *Human reproduction*. 2005;20(12):3554-9.
51. Bedaiwy MA, Jeremias E, Gurunluoglu R, Hussein MR, Siemianow M, Biscotti C, et al. Restoration of ovarian function after autotransplantation of intact frozen-thawed sheep ovaries with microvascular anastomosis. *Fertility and sterility*. 2003;79(3):594-602.
52. Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A, Defrere S, Donnez J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertility and sterility*. 2004;82(5):1390-4.
53. Martinez-Madrid B, Camboni A, Dolmans MM, Nottola S, Van Langendonck A, Donnez J. Apoptosis and ultrastructural assessment after cryopreservation of whole human ovaries with their vascular pedicle. *Fertility and sterility*. 2007;87(5):1153-65.
54. Nottola SA, Camboni A, Van Langendonck A, Demyelle D, Macchiarelli G, Dolmans MM, et al. Cryopreservation and xenotransplantation of human ovarian tissue: an ultrastructural study. *Fertility and sterility*. 2008;90(1):23-32.
55. Oktay K, Oktay K. A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve. *Cancer research*. 2007;67(21):10159-62.
56. Kondapalli LA, Dillon KE, Sammel MD, Ray A, Prewitt M, Ginsberg JP, et al. Quality of life in female cancer survivors: is it related to ovarian reserve? *Quality of life research : an international journal of quality of life aspects of treatment, care and rehabilitation*. 2013.
57. Silber SJ, Gosden RG. Ovarian transplantation in a series of monozygotic twins discordant for ovarian failure. *The New England journal of medicine*. 2007;356(13):1382-4.



58. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Human reproduction*. 2001;16(3):411-6.
59. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*. 1985;313(6003):573-5.
60. Valojerdi MR, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Hassani F, Movaghar B. Effect of laser zona thinning on vitrified-warmed embryo transfer at the cleavage stage: a prospective, randomized study. *Reproductive biomedicine online*. 2010;20(2):234-42.
61. Beier AF, Schulz JC, Zimmermann H. Cryopreservation with a twist - towards a sterile, serum-free surface-based vitrification of hESCs. *Cryobiology*. 2013;66(1):8-16.
62. Fathi R, Valojerdi MR, Eimani H, Hasani F, Yazdi PE, Ajdari Z, et al. Sheep ovarian tissue vitrification by two different dehydration protocols and needle immersing methods. *Cryo letters*. 2011;32(1):51-6.
63. Oktay K, Nugent D, Newton H, Salha O, Chatterjee P, Gosden RG. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertility and sterility*. 1997;67(3):481-6.
64. Fabbri R, Venturoli S, D'Errico A, Iannascoli C, Gabusi E, Valeri B, et al. Ovarian tissue banking and fertility preservation in cancer patients: histological and immunohistochemical evaluation. *Gynecologic oncology*. 2003;89(2):259-66.
65. 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;55(3):261-8.
66. Yeoman RR, Wolf DP, Lee DM. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. *Fertility and sterility*. 2005;83 Suppl 1:1248-54.
67. Gandolfi F, Paffoni A, Papasso Brambilla E, 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. *Fertility and sterility*. 2006;85 Suppl 1:1150-6.
68. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. *Human reproduction*. 1994;9(4):597-603.
69. Baird DT, Campbell B, de Souza C, Telfer E. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and autotransplantation of cryopreserved cortical strips. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2004;113 Suppl 1:S55-9.
70. Rodrigues AP, Amorim CA, Costa SH, Matos MH, Santos RR, Lucci CM, et al. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Animal reproduction science*. 2004;84(1-2):211-27.
71. Lucci CM, Kacinskis MA, Lopes LH, Rumpf R, Bao SN. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology*. 2004;61(6):1101-14.
72. Bosch P, Hernandez-Fonseca HJ, Miller DM, Wininger JD, Massey JB, Lamb SV, et al. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. *Theriogenology*. 2004;61(2-3):581-94.
73. Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Human reproduction*. 1996;11(7):1487-91.
74. Newton H, Fisher J, Arnold JR, Pegg DE, Faddy MJ, Gosden RG. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Human reproduction*. 1998;13(2):376-80.
75. Tryde Schmidt KL, Yding Andersen C, Starup J, Loft A, Byskov AG, Nyboe Andersen A. Orthotopic autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to a woman cured of cancer - follicular growth, steroid production and oocyte retrieval. *Reproductive biomedicine online*. 2004;8(4):448-53.
76. Gook DA, Edgar DH, Stern C. Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1, 2-propanediol. *Human reproduction*. 1999;14(8):2061-8.

77. Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker MJ. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reproductive biomedicine online*. 2003;7(6):623-33.
78. Salehnia M, Abbasian Moghadam E, Rezazadeh Vellojerdi M. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. *Fertility and sterility*. 2002;78(3):644-5.
79. Tokieda Y, Ishiwata I, Segino M, Ishikawa H, Sato K. Establishment of a novel method for cryopreservation and thawing of the mouse ovary. *Human cell*. 2002;15(4):230-7.
80. Migishima F, Suzuki-Migishima R, Song SY, Kuramochi T, Azuma S, Nishijima M, et al. Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biology of reproduction*. 2003;68(3):881-7.
81. Erickson GF, Shimasaki S. The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2000;11(5):193-8.
82. Rubinsky B, Arav A, Devries AL. The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from antarctic fishes. *Cryobiology*. 1992;29(1):69-79.
83. Graham LA, Liou YC, Walker VK, Davies PL. Hyperactive antifreeze protein from beetles. *Nature*. 1997;388(6644):727-8.
84. Rubinsky B, Coger R, Ewart KV, Fletcher GL. Ice-crystal growth and lectins. *Nature*. 1992;360(6400):113-4.
85. Smallwood M, Worrall D, Byass L, Elias L, Ashford D, Doucet CJ, et al. Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*). *The Biochemical journal*. 1999;340 (Pt 2):385-91.
86. Parkes AS. Preservation of living cells at low temperatures. *Lectures on the scientific basis of medicine*. 1952;2:250-68.
87. Deanesly R. Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. *The Journal of endocrinology*. 1954;11(2):197-200.
88. Petroianu A, de Souza Vasconcellos L, Alberti LR, Fonseca de Castro LP, Barbosa Leite JM. Natural pregnancy in rabbits that underwent oophorectomy and orthotopic allogeneic or autologous ovarian transplantation. *Fertility and sterility*. 2002;77(6):1298-9.
89. Parrott DM. Orthotopic ovarian grafts in the golden hamster. *The Journal of endocrinology*. 1959;19:126-38.
90. Salle B, Demirci B, Franck M, Rudigoz RC, Guerin JF, Lornage J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertility and sterility*. 2002;77(2):403-8.
91. Shaw JM, Cox SL, Trounson AO, Jenkin G. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. *Molecular and cellular endocrinology*. 2000;161(1-2):103-10.
92. Bedaiwy MA, Falcone T. Harvesting and autotransplantation of vascularized ovarian grafts: approaches and techniques. *Reproductive biomedicine online*. 2007;14(3):360-71.
93. Grazul-Bilska AT, Banerjee J, Yazici I, Borowczyk E, Bilski JJ, Sharma RK, et al. Morphology and function of cryopreserved whole ovine ovaries after heterotopic autotransplantation. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2008;6:16.
94. Hovatta O, Silye R, Krausz T, Abir R, Margara R, Trew G, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Human reproduction*. 1996;11(6):1268-72.
95. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*. 1983;301(5900):527-30.
96. Gosden RG, Boulton MI, Grant K, Webb R. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. *Journal of reproduction and fertility*. 1994;101(3):619-23.
97. Oktay K, Newton H, Gosden RG. Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice. *Fertility and sterility*. 2000;73(3):599-603.
98. Abir R, Orvieto R, Raanani H, Feldberg D, Nitke S, Fisch B. Parameters affecting successful transplantation of frozen-thawed human fetal ovaries into immunodeficient mice. *Fertility and sterility*. 2003;80(2):421-8.

99. Kim SS. Ovarian tissue banking for cancer patients. To do or not to do? *Human reproduction*. 2003;18(9):1759-61.
100. Maltaris T, Koelbl H, Fischl F, Seufert R, Schmidt M, Kohl J, et al. Xenotransplantation of human ovarian tissue pieces in gonadotropin-stimulated SCID mice: the effect of ovariectomy. *Anticancer research*. 2006;26(6B):4171-6.
101. Aubard Y. [Indications for the cryopreservation of ovarian tissue. Study Group for the Cryopreservation of Ovarian Tissue]. *Contraception, fertilité, sexualité*. 1998;26(7-8):580-3.
102. Almodin CG, Minguetti-Camara VC, Meister H, Ceschin AP, Kriger E, Ferreira JO. Recovery of natural fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in ewes subjected to radiotherapy. *Fertility and sterility*. 2004;81(1):160-4.
103. Meirow D, Baum M, Yaron R, Levron J, Hardan I, Schiff E, et al. Ovarian tissue cryopreservation in hematologic malignancy: ten years' experience. *Leukemia & lymphoma*. 2007;48(8):1569-76.
104. Kim GA, Kim HY, Kim JW, Lee G, Lee E, Lim JM. Ultrastructural deformity of ovarian follicles induced by different cryopreservation protocols. *Fertility and sterility*. 2010;94(4):1548-50, 50 e1.
105. Sadeu JC, Cortvindr R, Ron-El R, Kasterstein E, Smitz J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen-thawed human fetal ovarian tissue. *Fertility and sterility*. 2006;85 Suppl 1:1130-41.
106. Zampolla T, Spikings E, Srirangarajah S, Rawson DM, Zhang T. Impact of cryoprotectants and cryopreservation on metabolic activity and cytoskeleton proteins of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian fragments. *Cryo letters*. 2011;32(6):525-36.
107. Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *Journal of ovarian research*. 2009;2(1):9.
108. Sanfilippo S, Canis M, Ouchchane L, Botchorishvili R, Artonne C, Janny L, et al. Viability assessment of fresh and frozen/thawed isolated human follicles: reliability of two methods (Trypan blue and Calcein AM/ethidium homodimer-1). *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2011;28(12):1151-6.
109. Kim SS. Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions. *Fertility and sterility*. 2006;85(1):1-11.
110. Kiran G, Kiran H, Coban YK, Guven AM, Yuksel M. Fresh autologous transplantation of ovarian cortical strips to the anterior abdominal wall at the pfannenstiell incision site. *Fertility and sterility*. 2004;82(4):954-6.
111. Radford JA, Lieberman BA, Brison DR, Smith AR, Critchlow JD, Russell SA, et al. Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high-dose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma. *Lancet*. 2001;357(9263):1172-5.
112. Oktay K, Tilly J. Livebirth after cryopreserved ovarian tissue autotransplantation. *Lancet*. 2004;364(9451):2091-2; author reply 2-3.
113. Posada MN, Kolp L, Garcia JE. Fertility options for female cancer patients: facts and fiction. *Fertility and sterility*. 2001;75(4):647-53.
114. Soleimani R, Heytens E, Van den Broecke R, Rottiers I, Dhont M, Cuvelier CA, et al. Xenotransplantation of cryopreserved human ovarian tissue into murine back muscle. *Human reproduction*. 2010;25(6):1458-70.
115. Terazono T, Kaedei Y, Tanihara F, Namula Z, Viet V, Takagi M, et al. Follicle formation in the canine ovary after autografting to a peripheral site. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 2012;47(2):e16-21.
116. Diaz-Garcia C, Milenkovic M, Groth K, Dahm-Kahler P, Olausson M, Brannstrom M. Ovarian cortex transplantation in the baboon: comparison of four different intra-abdominal transplantation sites. *Human reproduction*. 2011;26(12):3303-11.
117. Aerts JM, Martinez-Madrid B, Leroy JL, Van Aelst S, Bols PE. Xenotransplantation by injection of a suspension of isolated preantral ovarian follicles and stroma cells under the kidney capsule of nude mice. *Fertility and sterility*. 2010;94(2):708-14.

118. Abedi GR, Sotoudeh A, Bazzazan A, Ganjai A. Experimental ovarian transplantation on stomach for bone repair in ovariectomized rabbits. *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia*. 2013;28(6):412-8.
119. Laufer MR, Upton J, Schuster SR, Grier H, Emans SJ, Diller L. Ovarian tissue autologous transplantation to the upper extremity for girls receiving abdominal/pelvic radiation: 20-year follow-up of reproductive endocrine function. *Journal of pediatric and adolescent gynecology*. 2010;23(2):107-10.
120. Van Eyck AS, Jordan BF, Gallez B, Heilier JF, Van Langendonck A, Donnez J. Electron paramagnetic resonance as a tool to evaluate human ovarian tissue reoxygenation after xenografting. *Fertility and sterility*. 2009;92(1):374-81.
121. Barash A, Dekel N, Fieldust S, Segal I, Schechtman E, Granot I. Local injury to the endometrium doubles the incidence of successful pregnancies in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertility and sterility*. 2003;79(6):1317-22.
122. Li J, Zhang YP, Kirsner RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microscopy research and technique*. 2003;60(1):107-14.
123. Waterhouse T, Cox SL, Snow M, Jenkin G, Shaw J. Offspring produced from heterotopic ovarian allografts in male and female recipient mice. *Reproduction*. 2004;127(6):689-94.
124. Lee DM, Yeoman RR, Battaglia DE, Stouffer RL, Zelinski-Wooten MB, Fanton JW, et al. Live birth after ovarian tissue transplant. *Nature*. 2004;428(6979):137-8.
125. Oktay K, Buyuk E, Rosenwaks Z, Rucinski J. A technique for transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *Fertility and sterility*. 2003;80(1):193-8.
126. Oktay KH, Yih M. Preliminary experience with orthotopic and heterotopic transplantation of ovarian cortical strips. *Seminars in reproductive medicine*. 2002;20(1):63-74.
127. Stouffer RL, Martinez-Chequer JC, Molskness TA, Xu F, Hazzard TM. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Archives of medical research*. 2001;32(6):567-75.
128. Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*. 2003;125(5):759-67.
129. Fraser HM, Lunn SF. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. *British medical bulletin*. 2000;56(3):787-97.
130. Barth PJ, Ramaswamy A, Moll R. CD34(+) fibrocytes in normal cervical stroma, cervical intraepithelial neoplasia III, and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2002;441(6):564-8.
131. Tachezy M, Reichelt U, Melenberg T, Gebauer F, Izbickei JR, Kaifi JT. Angiogenesis index CD105 (endoglin)/CD31 (PECAM-1) as a predictive factor for invasion and proliferation in intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) of the pancreas. *Histology and histopathology*. 2010;25(10):1239-46.
132. Dissen GA, Lara HE, Fahrenbach WH, Costa ME, Ojeda SR. Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. *Endocrinology*. 1994;134(3):1146-54.
133. Nugent D, Newton H, Gallivan L, Gosden RG. Protective effect of vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian grafts. *Journal of reproduction and fertility*. 1998;114(2):341-6.
134. Kadkhodae M, Aryamanesh S, Faghihi M, Zahmatkesh M. Protection of rat renal vitamin E levels by ischemic-preconditioning. *BMC nephrology*. 2004;5:6.
135. Hazzard TM, Stouffer RL. Angiogenesis in ovarian follicular and luteal development. *Bailliere's best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2000;14(6):883-900.
136. Tamanini C, De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 2004;39(4):206-16.

137. Redmer DA, Doraiswamy V, Bortnem BJ, Fisher K, Jablonka-Shariff A, Grazul-Bilska AT, et al. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biology of reproduction*. 2001;65(3):879-89.
138. Barros FS, de Oliveira RM, Alves FM, Sampaio M, Geber S. Successful ovarian autotransplant with no vascular reanastomosis in rats. *Transplantation*. 2008;86(11):1628-30.
139. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *The American journal of pathology*. 1998;152(6):1445-52.
140. Lingen MW. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2001;125(1):67-71.
141. Espinosa Cervantes M, Rosado Garcia A. [Angiogenesis in reproductive physiology. Follicular development, formation and maintenance of the corpus luteum]. *Ginecologia y obstetricia de Mexico*. 2002;70:17-27.
142. Petrik JJ, Gentry PA, Feige JJ, LaMarre J. Expression and localization of thrombospondin-1 and -2 and their cell-surface receptor, CD36, during rat follicular development and formation of the corpus luteum. *Biology of reproduction*. 2002;67(5):1522-31.
143. Perollet C, Han ZC, Savona C, Caen JP, Bikfalvi A. Platelet factor 4 modulates fibroblast growth factor 2 (FGF-2) activity and inhibits FGF-2 dimerization. *Blood*. 1998;91(9):3289-99.
144. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*. 2004;25(4):581-611.
145. Harata T, Ando H, Iwase A, Nagasaka T, Mizutani S, Kikkawa F. Localization of angiotensin II, the AT1 receptor, angiotensin-converting enzyme, aminopeptidase A, adipocyte-derived leucine aminopeptidase, and vascular endothelial growth factor in the human ovary throughout the menstrual cycle. *Fertility and sterility*. 2006;86(2):433-9.
146. Celik-Ozenci C, Akkoyunlu G, Kayisli UA, Arici A, Demir R. Localization of vascular endothelial growth factor in the zona pellucida of developing ovarian follicles in the rat: a possible role in destiny of follicles. *Histochemistry and cell biology*. 2003;120(5):383-90.
147. Greenaway J, Connor K, Pedersen HG, Coomber BL, LaMarre J, Petrik J. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology*. 2004;145(6):2896-905.
148. Taylor PD, Hillier SG, Fraser HM. Effects of GnRH antagonist treatment on follicular development and angiogenesis in the primate ovary. *The Journal of endocrinology*. 2004;183(1):1-17.
149. Abramovich D, Parborell F, Tesone M. Effect of a vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitory treatment on the folliculogenesis and ovarian apoptosis in gonadotropin-treated prepubertal rats. *Biology of reproduction*. 2006;75(3):434-41.
150. Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *The Journal of endocrinology*. 2000;167(3):371-82.
151. Boonyaprakob U, Gadsby JE, Hedgpeth V, Routh PA, Almond GW. Expression and localization of hypoxia inducible factor-1alpha mRNA in the porcine ovary. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*. 2005;69(3):215-22.
152. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*. 1997;277(5322):48-50.
153. Hazzard TM, Molskness TA, Chaffin CL, Stouffer RL. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin regulation by gonadotrophin and steroids in macaque granulosa cells during the peri-ovulatory interval. *Molecular human reproduction*. 1999;5(12):1115-21.
154. Asahara T, Bauters C, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, et al. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation*. 1995;92(9 Suppl):II365-71.



155. Otani N, Minami S, Yamoto M, Shikone T, Otani H, Nishiyama R, et al. The vascular endothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(10):3845-51.
156. Kezele PR, Ague JM, Nilsson E, Skinner MK. Alterations in the ovarian transcriptome during primordial follicle assembly and development. *Biology of reproduction*. 2005;72(1):241-55.
157. Danforth DR, Arbogast LK, Ghosh S, Dickerman A, Rofagha R, Friedman CI. Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. *Biology of reproduction*. 2003;68(5):1736-41.
158. Yang MY, Fortune JE. Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro. *Molecular reproduction and development*. 2007;74(9):1095-104.
159. Roberts AE, Arbogast LK, Friedman CI, Cohn DE, Kaumaya PT, Danforth DR. Neutralization of endogenous vascular endothelial growth factor depletes primordial follicles in the mouse ovary. *Biology of reproduction*. 2007;76(2):218-23.
160. Shimizu T. Promotion of ovarian follicular development by injecting vascular endothelial growth factor (VEGF) and growth differentiation factor 9 (GDF-9) genes. *The Journal of reproduction and development*. 2006;52(1):23-32.
161. Quintana R, Kopcow L, Sueldo C, Marconi G, Rueda NG, Baranao RI. Direct injection of vascular endothelial growth factor into the ovary of mice promotes follicular development. *Fertility and sterility*. 2004;82 Suppl 3:1101-5.
162. Van Eyck AS, Bouzin C, Feron O, Romeu L, Van Langendonck A, Donnez J, et al. Both host and graft vessels contribute to revascularization of xenografted human ovarian tissue in a murine model. *Fertility and sterility*. 2010;93(5):1676-85.
163. Schnorr J, Oehninger S, Toner J, Hsiu J, Lanzendorf S, Williams R, et al. Functional studies of subcutaneous ovarian transplants in non-human primates: steroidogenesis, endometrial development, ovulation, menstrual patterns and gamete morphology. *Human reproduction*. 2002;17(3):612-9.
164. Yang H, Lee HH, Lee HC, Ko DS, Kim SS. Assessment of vascular endothelial growth factor expression and apoptosis in the ovarian graft: can exogenous gonadotropin promote angiogenesis after ovarian transplantation? *Fertility and sterility*. 2008;90(4 Suppl):1550-8.
165. Fischbach C, Mooney DJ. Polymers for pro- and anti-angiogenic therapy. *Biomaterials*. 2007;28(12):2069-76.
166. 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 engineering Part A*. 2011;17(23-24):3095-104.
167. Johnson PJ, Parker SR, Sakiyama-Elbert SE. Controlled release of neurotrophin-3 from fibrin-based tissue engineering scaffolds enhances neural fiber sprouting following subacute spinal cord injury. *Biotechnology and bioengineering*. 2009;104(6):1207-14.
168. Yang HY, Cox SL, Jenkin G, Findlay J, Trounson A, Shaw J. Graft site and gonadotrophin stimulation influences the number and quality of oocytes from murine ovarian tissue grafts. *Reproduction*. 2006;131(5):851-9.
169. Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. *Human reproduction*. 2000;15(6):1300-4.
170. 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. *Endocrinology*. 1999;140(1):462-71.
171. Donnez J, Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Demylle D, Van Langendonck A. The role of cryopreservation for women prior to treatment of malignancy. *Current opinion in obstetrics & gynecology*. 2005;17(4):333-8.
172. Yada-Hashimoto N, Yamamoto T, Kamiura S, Seino H, Ohira H, Sawai K, et al. Metastatic ovarian tumors: a review of 64 cases. *Gynecologic oncology*. 2003;89(2):314-7.
173. Dolmans MM, Marinescu C, Saussoy P, Van Langendonck A, Amorim C, Donnez J. Reimplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with acute lymphoblastic leukemia is potentially unsafe. *Blood*. 2010;116(16):2908-14.

174. Kim SS, Radford J, Harris M, Varley J, Rutherford AJ, Lieberman B, et al. Ovarian tissue harvested from lymphoma patients to preserve fertility may be safe for autotransplantation. *Human reproduction*. 2001;16(10):2056-60.
175. Oktay K, Economos K, Kan M, Rucinski J, Veeck L, Rosenwaks Z. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2001;286(12):1490-3.
176. Sonmezer M, Oktay K. Assisted reproduction and fertility preservation techniques in cancer patients. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2008;15(6):514-22.
177. Kim SS, Lee WS, Chung MK, Lee HC, Lee HH, Hill D. Long-term ovarian function and fertility after heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue: 8-year experience in cancer patients. *Fertility and sterility*. 2009;91(6):2349-54.
178. Liu J, Van der Elst J, Van den Broecke R, Dhont M. Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. *Human reproduction*. 2002;17(3):605-11.
179. Sirotkin AV, Chrenek P, Darlak K, Valenzuela F, Kuklova Z. Some endocrine traits of transgenic rabbits. II. Changes in hormone secretion and response of isolated ovarian tissue to FSH and ghrelin. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2008;57(5):745-51.
180. Drummond AE. The role of steroids in follicular growth. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2006;4:16.
181. Gougeon A. [Regulation of resting follicle activation]. *Gynecologie, obstetrique & fertilite*. 2011;39(9):511-3.
182. Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K. Recent advances in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2012;26(3):391-405.
183. Donnez J, Silber S, Andersen CY, Demeestere I, Piver P, Meirow D, et al. Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. a review of 13 live births. *Annals of medicine*. 2011;43(6):437-50.
184. Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(18):2917-31.
185. Rosenfeld CS, Wagner JS, Roberts RM, Lubahn DB. Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction*. 2001;122(2):215-26.
186. Berisha B, Pfaffl MW, Schams D. Expression of estrogen and progesterone receptors in the bovine ovary during estrous cycle and pregnancy. *Endocrine*. 2002;17(3):207-14.
187. Juengel JL, Heath DA, Quirke LD, McNatty KP. Oestrogen receptor alpha and beta, androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localisation within the developing ovary and in small growing follicles of sheep. *Reproduction*. 2006;131(1):81-92.
188. Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *The Journal of reproduction and development*. 2012;58(1):44-50.
189. Schubert B, Canis M, Darcha C, Artonne C, Smitz J, Grizard G. Follicular growth and estradiol follow-up after subcutaneous xenografting of fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertility and sterility*. 2008;89(6):1787-94.
190. Deng X, Zheng H, Yu X, Yu H, Zhang C, Chao L, et al. Cryopreserved ovarian tissues can maintain a long-term function after heterotopic autotransplantation in rat. *Reproduction*. 2009;138(3):519-25.
191. Hillier SG, Zeleznik AJ, Knazek RA, Ross GT. Hormonal regulation of preovulatory follicle maturation in the rat. *Journal of reproduction and fertility*. 1980;60(1):219-29.
192. Kagabu S, Umezu M. Transplantation of cryopreserved mouse, Chinese hamster, rabbit, Japanese monkey and rat ovaries into rat recipients. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*. 2000;49(1):17-21.
193. Billig H, Furuta I, Hsueh AJ. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*. 1993;133(5):2204-12.

194. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO journal*. 1998;17(6):1675-87.
195. Matsui T, Manabe N, Goto Y, Inoue N, Nishihara S, Miyamoto H. Expression and activity of Apaf1 and caspase-9 in granulosa cells during follicular atresia in pig ovaries. *Reproduction*. 2003;126(1):113-20.
196. Kadakia R, Arraztoa JA, Bondy C, Zhou J. Granulosa cell proliferation is impaired in the Igf1 null ovary. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*. 2001;11(4):220-4.
197. Mani AM, Fenwick MA, Cheng Z, Sharma MK, Singh D, Wathes DC. IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. *Reproduction*. 2010;139(1):139-51.
198. Uma J, Muraly P, Verma-Kumar S, Medhamurthy R. Determination of onset of apoptosis in granulosa cells of the preovulatory follicles in the bonnet monkey (*Macaca radiata*): correlation with mitogen-activated protein kinase activities. *Biology of reproduction*. 2003;69(4):1379-87.
199. Carambula SF, Matikainen T, Lynch MP, Flavell RA, Goncalves PB, Tilly JL, et al. Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. *Endocrinology*. 2002;143(4):1495-501.
200. Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, Sorenson CM, Tilly JL. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology*. 1995;136(8):3665-8.
201. Hsu SY, Lai RJ, Finegold M, Hsueh AJ. Targeted overexpression of Bcl-2 in ovaries of transgenic mice leads to decreased follicle apoptosis, enhanced folliculogenesis, and increased germ cell tumorigenesis. *Endocrinology*. 1996;137(11):4837-43.
202. Kugu K, Ratts VS, Piquette GN, Tilly KI, Tao XJ, Martimbeau S, et al. Analysis of apoptosis and expression of bcl-2 gene family members in the human and baboon ovary. *Cell death and differentiation*. 1998;5(1):67-76.
203. Erickson GF, Shimasaki S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertility and sterility*. 2001;76(5):943-9.
204. McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Molecular endocrinology*. 1995;9(1):131-6.
205. Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Molecular endocrinology*. 1998;12(12):1809-17.
206. Lyons KM, Pelton RW, Hogan BL. Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2a RNA suggest that transforming growth factor-beta-like genes coordinately regulate aspects of embryonic development. *Genes & development*. 1989;3(11):1657-68.
207. Schmid P, Cox D, van der Putten H, McMaster GK, Bilbe G. Expression of TGF-beta s and TGF-beta type II receptor mRNAs in mouse folliculogenesis: stored maternal TGF-beta 2 message in oocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 1994;201(2):649-56.
208. Valve E, Penttila TL, Paranko J, Harkonen P. FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997;232(1):173-7.
209. Ebrahimi B, Valojerdi MR, Eftekhari-Yazdi P, Baharvand H, Farrokhi A. IVM and gene expression of sheep cumulus-oocyte complexes following different methods of vitrification. *Reproductive biomedicine online*. 2010;20(1):26-34.
210. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*. 1996;383(6600):531-5.
211. Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature genetics*. 2000;25(3):279-83.

212. Elvin JA, Yan C, Wang P, Nishimori K, Matzuk MM. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Molecular endocrinology*. 1999;13(6):1018-34.
213. Vitt UA, Hayashi M, Klein C, Hsueh AJ. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biology of reproduction*. 2000;62(2):370-7.
214. Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M, et al. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology*. 1999;140(3):1236-44.
215. Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Molecular endocrinology*. 1999;13(6):1035-48.
216. Carabatsos MJ, Elvin J, Matzuk MM, Albertini DF. Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Developmental biology*. 1998;204(2):373-84.
217. Sobaniec-Lotowska ME, Lebensztejn DM. Ultrastructure of Kupffer cells and hepatocytes in the Dubin-Johnson syndrome: a case report. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2006;12(6):987-9.
218. Capacchietti G, Cecconi S, Gioia L, Turriani M. Effect of cryoprotectant agents on the potential development of sheep preantral follicles. *Veterinary research communications*. 2004;28 Suppl 1:173-6.
219. Santos RR, Rodrigues AP, Costa SH, Silva JR, Matos MH, Lucci CM, et al. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. *Animal reproduction science*. 2006;91(3-4):249-63.
220. Santos RR, Tharasanit T, Figueiredo JR, van Haeften T, van den Hurk R. Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. *Cell and tissue research*. 2006;325(3):523-31.
221. Celestino JJ, dos Santos RR, Lopes CA, Martins FS, Matos MH, Melo MA, et al. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. *Animal reproduction science*. 2008;108(3-4):309-18.
222. Lima AK, Silva AR, Santos RR, Sales DM, Evangelista AF, Figueiredo JR, et al. Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. *Theriogenology*. 2006;66(6-7):1664-6.
223. Fornari DC, Ribeiro RP, Streit D, Godoy LC, Neves PR, de Oliveira D, et al. Effect of cryoprotectants on the survival of cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) embryos stored at -8 degrees C. *Zygote*. 2011:1-6.
224. Zhang W, Yi K, Chen C, Hou X, Zhou X. Application of antioxidants and centrifugation for cryopreservation of boar spermatozoa. *Animal reproduction science*. 2012;132(3-4):123-8.
225. Paynter SJ, Cooper A, Fuller BJ, Shaw RW. Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture in vitro. *Cryobiology*. 1999;38(4):301-9.
226. Borges EN, Silva RC, Futino DO, Rocha-Junior CM, Amorim CA, Bao SN, et al. Cryopreservation of swine ovarian tissue: effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. *Cryobiology*. 2009;59(2):195-200.
227. El-Gayar M, Gauly M, Holtz W. One-step dilution of open-pulled-straw (OPS)-vitrified mouse blastocysts in sucrose-free medium. *Cryobiology*. 2008;57(3):191-4.
228. Jin B, Mochida K, Ogura A, Hotta E, Kobayashi Y, Ito K, et al. Equilibrium vitrification of mouse embryos. *Biology of reproduction*. 2010;82(2):444-50.
229. Liu Z, Foote RH, Brockett CC. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology*. 1998;37(3):219-30.
230. Yap LV, Noor NM, Clyde MM, Chin HF. Cryopreservation of *Garcinia cowa* shoot tips by vitrification: the effects of sucrose preculture and loading treatment on ultrastructural changes in meristematic cells. *Cryo letters*. 2011;32(3):188-96.

231. Silva JR, Bao SN, Lucci CM, Carvalho FC, Andrade ER, Ferreira MA, et al. Morphological and ultrastructural changes occurring during degeneration of goat preantral follicles preserved in vitro. *Animal reproduction science*. 2001;66(3-4):209-23.
232. Kohaya N, Fujiwara K, Ito J, Kashiwazaki N. High developmental rates of mouse oocytes cryopreserved by an optimized vitrification protocol: the effects of cryoprotectants, calcium and cumulus cells. *The Journal of reproduction and development*. 2011;57(6):675-80.
233. Cabrita E, Robles V, Chereguini O, Wallace JC, Herraéz MP. Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Cryobiology*. 2003;47(3):204-13.
234. Amorim CA, Rondina D, Lucci CM, Goncalves PB, Figueiredo JR, Giorgetti A. Permeability of ovine primordial follicles to different cryoprotectants. *Fertility and sterility*. 2006;85 Suppl 1:1077-81.
235. Kim S, Lee YJ, Ji DB, Kim YJ. Evaluation of different cryoprotectants (CPAs) in boar semen cryopreservation. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. 2011;73(7):961-3.
236. Voelkel SA, Hu YX. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology*. 1992;37(3):687-97.
237. Katkov, II, Pogorelov AG. Influence of exposure to vitrification solutions on 2-cell mouse embryos: II. Osmotic effects or chemical toxicity? *Cryo letters*. 2007;28(6):409-27.
238. Szurek EA, Eroglu A. Comparison and avoidance of toxicity of penetrating cryoprotectants. *PloS one*. 2011;6(11):e27604.
239. Liu WX, Lu H, Luo MJ, Xu LZ. Effects of different cryoprotectants and cryopreservation protocols on the development of 2-4 cell mouse embryos. *Cryo letters*. 2011;32(3):240-7.
240. Abedelahi A, Salehnia M, Allameh AA. The effects of different concentrations of sodium selenite on the in vitro maturation of preantral follicles in serum-free and serum supplemented media. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2008;25(9-10):483-8.
241. Fathi R, Valojerdi MR, Eftekhari-Yazdi P. Effect of laser-assisted hatching and necrotic blastomere removal on the development of vitrified-warmed four-cell mouse embryos. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2008;25(7):333-9.
242. Nagano M, Atabay EP, Atabay EC, Hishinuma M, Katagiri S, Takahashi Y. Effects of isolation method and pre-treatment with ethylene glycol or raffinose before vitrification on in vitro viability of mouse preantral follicles. *Biomedical research*. 2007;28(3):153-60.
243. Gook DA, Edgar DH, Borg J, Archer J, McBain JC. Diagnostic assessment of the developmental potential of human cryopreserved ovarian tissue from multiple patients using xenografting. *Human reproduction*. 2005;20(1):72-8.
244. Vincent C, Johnson MH. Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. *Oxford reviews of reproductive biology*. 1992;14:73-100.
245. Gilchrist RB, Nayudu PL, Nowshari MA, Hodges JK. Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocyte-somatic cell associations. *Biology of reproduction*. 1995;52(6):1234-43.
246. Navarro-Costa P, Correia SC, Gouveia-Oliveira A, Negreiro F, Jorge S, Cidado AJ, et al. Effects of mouse ovarian tissue cryopreservation on granulosa cell-oocyte interaction. *Human reproduction*. 2005;20(6):1607-14.
247. van den Hurk R, Spek ER, Hage WJ, Fair T, Ralph JH, Schotanus K. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. *Human reproduction update*. 1998;4(6):833-41.
248. Braw-Tal R, Yossefi S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Journal of reproduction and fertility*. 1997;109(1):165-71.
249. Coss RA, Dewey WC, Bamburg JR. Effects of hyperthermia (41.5 degrees) on Chinese hamster ovary cells analyzed in motosis. *Cancer research*. 1979;39(6 Pt 1):1911-8.
250. Mazoochi T, Salehnia M, Valojerdi MR, Mowla SJ. Morphologic, ultrastructural, and biochemical identification of apoptosis in vitrified-warmed mouse ovarian tissue. *Fertility and sterility*. 2008;90(4 Suppl):1480-6.

251. Haidari K, Salehnia M, Rezazadeh Valojerdi M. The effect of leukemia inhibitory factor and coculture on the in vitro maturation and ultrastructure of vitrified and nonvitrified isolated mouse preantral follicles. *Fertility and sterility*. 2008;90(6):2389-97.
252. Xiao Z, Wang Y, Li L, Luo S, Li SW. Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation. *Fertility and sterility*. 2010;94(6):2323-8.
253. Wang Y, Xiao Z, Li L, Fan W, Li SW. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. *Human reproduction*. 2008;23(10):2256-65.
254. Kaasik A, Safiulina D, Choubey V, Kuum M, Zharkovsky A, Veksler V. Mitochondrial swelling impairs the transport of organelles in cerebellar granule neurons. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(45):32821-6.
255. Safiulina D, Veksler V, Zharkovsky A, Kaasik A. Loss of mitochondrial membrane potential is associated with increase in mitochondrial volume: physiological role in neurones. *Journal of cellular physiology*. 2006;206(2):347-53.
256. Boonkusol D, Faisaikarm T, Dinnyes A, Kitiyanant Y. Effects of vitrification procedures on subsequent development and ultrastructure of in vitro-matured swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Reproduction, fertility, and development*. 2007;19(2):383-91.
257. Li F, Tao Y, Zhang Y, Li Y, Fang F, Liu Y, et al. Follicle growth and oocyte development after ovary transplantation into back muscle of immune-intact adult castrated male mice. *Reproduction*. 2010;140(3):465-76.
258. Motta PM, Nottola SA, Familiari G, Makabe S, Stallone T, Macchiarelli G. Morphodynamics of the follicular-luteal complex during early ovarian development and reproductive life. *International review of cytology*. 2003;223:177-288.
259. Etingen LE. [the Dynamics of Vasculo-Tissue Changes in the Rabbit Ovary after Unilateral Ovariectomy]. *Biulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*. 1963;56:79-84.
260. Redmer DA, Christenson RK, Ford JJ, Day BN. Effect of unilateral ovariectomy on compensatory ovarian hypertrophy, peripheral concentrations of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian venous concentrations of estradiol-17 beta in prepuberal gilts. *Biology of reproduction*. 1984;31(1):59-66.
261. Nottola SA, Makabe S, Stallone T, Macchiarelli G, Correr S, Motta PM. Ultrastructure and distribution of interstitial glandular cells and associated elements in human fetal ovaries. *Archives of histology and cytology*. 2000;63(4):345-55.
262. Ozen A, Asti RN, Kurtdede N. Light and electron microscopic studies on mast cells of the bovine oviduct. *DTW Deutsche tierärztliche Wochenschrift*. 2002;109(9):412-5.
263. Likar IN, Likar LJ. Acid Mucopolysaccharides and Mast Cells in the Bovine Uterus at Different Stages of the Sexual Cycle. *Acta endocrinologica*. 1964;46:493-506.
264. Krishna A, Beesley K, Terranova PF. Histamine, mast cells and ovarian function. *The Journal of endocrinology*. 1989;120(3):363-71.
265. Gunasena KT, Villines PM, Critser ES, Critser JK. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. *Human reproduction*. 1997;12(1):101-6.
266. Nisolle M, Casanas-Roux F, Qu J, Motta P, Donnez J. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertility and sterility*. 2000;74(1):122-9.
267. Yacobi K, Wojtowicz A, Tsafirri A, Gross A. Gonadotropins enhance caspase-3 and -7 activity and apoptosis in the theca-interstitial cells of rat preovulatory follicles in culture. *Endocrinology*. 2004;145(4):1943-51.
268. Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*. 2001;121(5):647-53.
269. Robker RL, Richards JS. Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1. *Molecular endocrinology*. 1998;12(7):924-40.

270. Sai T, Goto Y, Yoshioka R, Maeda A, Matsuda F, Sugimoto M, et al. Bid and Bax are involved in granulosa cell apoptosis during follicular atresia in porcine ovaries. *The Journal of reproduction and development*. 2011;57(3):421-7.
271. Silber S, Kagawa N, Kuwayama M, Gosden R. Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation. *Fertility and sterility*. 2010;94(6):2191-6.
272. Callejo J, Jauregui MT, Valls C, Fernandez ME, Cabre S, Lailla JM. Heterotopic ovarian transplantation without vascular pedicle in syngeneic Lewis rats: six-month control of estradiol and follicle-stimulating hormone concentrations after intraperitoneal and subcutaneous implants. *Fertility and sterility*. 1999;72(3):513-7.
273. von Eye Corleta H, Corleta O, Capp E, Edelweiss MI. Subcutaneous autologous ovarian transplantation in Wistar rats maintains hormone secretion. *Fertility and sterility*. 1998;70(1):16-9.
274. Yuan JH, Gao JS, Zhan ZF, Liu HW, Jin WJ, Li ZD. Development-promoting effect of chicken embryo membrane on chicken ovarian cortical pieces of different age. *Poultry science*. 2009;88(11):2415-21.
275. Fabbri R, Pasquinelli G, Keane D, Mozzanega B, Magnani V, Tamburini F, et al. Culture of cryopreserved ovarian tissue: state of the art in 2008. *Fertility and sterility*. 2009;91(5):1619-29.
276. Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y, Delbaere A. Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction*. 2005;130(2):147-56.
277. Holmberg L, Iversen OE, Rudenstam CM, Hammar M, Kumpulainen E, Jaskiewicz J, et al. Increased risk of recurrence after hormone replacement therapy in breast cancer survivors. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008;100(7):475-82.
278. Jeruss JS, Woodruff TK. Preservation of fertility in patients with cancer. *The New England journal of medicine*. 2009;360(9):902-11.
279. Burger LL, Dalkin AC, Aylor KW, Workman LJ, Haisenleder DJ, Marshall JC. Regulation of gonadotropin subunit transcription after ovariectomy in the rat: measurement of subunit primary transcripts reveals differential roles of GnRH and inhibin. *Endocrinology*. 2001;142(8):3435-42.
280. Dorsch M, Wedekind D, Kamino K, Hedrich HJ. Orthotopic transplantation of rat ovaries as a tool for strain rescue. *Laboratory animals*. 2004;38(3):307-12.
281. Gore AC, Attardi B, DeFranco DB. Glucocorticoid repression of the reproductive axis: effects on GnRH and gonadotropin subunit mRNA levels. *Molecular and cellular endocrinology*. 2006;256(1-2):40-8.
282. Vendola K, Zhou J, Wang J, Famuyiwa OA, Bievre M, Bondy CA. Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary. *Biology of reproduction*. 1999;61(2):353-7.
283. Weissman A, Gotlieb L, Colgan T, Jurisicova A, Greenblatt EM, Casper RF. Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse. *Biology of reproduction*. 1999;60(6):1462-7.
284. Knight PG, Glistler C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 2006;132(2):191-206.
285. Kedem A, Fisch B, Garor R, Ben-Zaken A, Gizunterman T, Felz C, et al. Growth differentiating factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 both activate development of human primordial follicles in vitro, with seemingly more beneficial effects of GDF9. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(8):E1246-54.
286. Tang K, Yang WC, Li X, Wu CJ, Sang L, Yang LG. GDF-9 and bFGF enhance the effect of FSH on the survival, activation, and growth of cattle primordial follicles. *Animal reproduction science*. 2012;131(3-4):129-34.
287. Nilsson EE, Skinner MK. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biology of reproduction*. 2002;67(3):1018-24.



288. Harlow CR, Davidson L, Burns KH, Yan C, Matzuk MM, Hillier SG. FSH and TGF-beta superfamily members regulate granulosa cell connective tissue growth factor gene expression in vitro and in vivo. *Endocrinology*. 2002;143(9):3316-25.
289. Solovyeva EV, Hayashi M, Margi K, Barkats C, Klein C, Amsterdam A, et al. Growth differentiation factor-9 stimulates rat theca-interstitial cell androgen biosynthesis. *Biology of reproduction*. 2000;63(4):1214-8.
290. Wu LM, Liu YS, Tong XH, Shen N, Jin RT, Han H, et al. Inhibition of follicular development induced by chronic unpredictable stress is associated with growth and differentiation factor 9 and gonadotropin in mice. *Biology of reproduction*. 2012;86(4):121.
291. Wu D, Lei Y, Tong Y, Tang F, Qian Y, Zhou Y. Angiogenesis of the frozen-thawed human fetal ovarian tissue at the early stage after xenotransplantation and the positive effect of *Salviae miltiorrhizae*. *Anatomical record*. 2010;293(12):2154-62.
292. Soleimani R, Heytens E, Oktay K. Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. *PLoS one*. 2011;6(4):e19475.
293. Redding GP, Bronlund JE, Hart AL. Mathematical modelling of oxygen transport-limited follicle growth. *Reproduction*. 2007;133(6):1095-106.
294. Donnez J, Squifflet J, Dolmans MM. Frozen-thawed ovarian tissue retransplants. *Seminars in reproductive medicine*. 2009;27(6):472-8.
295. Abramovich D, Rodriguez Celin A, Hernandez F, Tesone M, Parborell F. Spatiotemporal analysis of the protein expression of angiogenic factors and their related receptors during folliculogenesis in rats with and without hormonal treatment. *Reproduction*. 2009;137(2):309-20.
296. Sakiyama-Elbert SE, Hubbell JA. Controlled release of nerve growth factor from a heparin-containing fibrin-based cell ingrowth matrix. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2000;69(1):149-58.
297. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC, 2nd, Lyman S, Paddock C, et al. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*. 1990;247(4947):1219-22.
298. Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG, Seed B. Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. *Journal of immunology*. 1992;148(1):267-71.
299. Furness SG, McNagny K. Beyond mere markers: functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis. *Immunologic research*. 2006;34(1):13-32.

Abstract

The aim of this study was to determine a suitable cryoprotectant combination for whole rat ovarian vitrification and evaluate hormonal changes, the ultrastructure of the initial follicle, and follicle maturational, angiogenic and apoptotic gene expression of vitrified ovary following autotransplantation.

In the first part of this study we sought to determine the suitable cryoprotectant combination. Wistar rat ovaries were randomly divided into 13 groups as follows: control (nonvitrified); VI and TI (EG + DMSO); VII and TII (EG + PROH); VIII and TIII (DMSO + PROH); VIV and TIV (EG + DMSO + 0.25 mol/l sucrose); VV and TV (EG + PROH + 0.25 mol/l sucrose); and VVI and TVI (EG + PROH + 0.25 mol/l sucrose). Groups were evaluated by standard histology techniques, EM and immunohistochemistry.

In the second part of this study we investigated the effects of ovarian autotransplantation by using the appropriate previously determined cryoprotectant combination. The six groups of rat ovaries were divided as follows: control (nonvitrified nontransplanted); nVTnG (nonvitrified transplanted nongonadectomized); VTnG (vitrified transplanted nongonadectomized); nVTG (nonvitrified transplanted gonadectomized); VTG (vitrified transplanted gonadectomized); and BLG (bilateral gonadectomized). These groups were evaluated by standard histology techniques, EM and immunohistochemistry. Expressions of follicle maturational, angiogenic and apoptotic genes were studied by Real-time PCR. The levels of gonadotropins (LH, FSH) and steroid hormones (estradiol, progesterone and testosterone) in blood serum were compared to the control and BLG groups.

The results showed that vitrified groups had lower numbers of intact follicles and higher numbers of apoptotic follicles compared to the control group. Between vitrified groups, the VIV group had the best survival rate, particularly for initial follicles. This group had a lower incidence of apoptosis. Ultrastructural changes of the last group were considerable compared to the control but this result did not differ compared to the sucrose-free (VI) group.

Vitrified and nonvitrified ovarian autotransplantation caused restoration of the hormone cycle and ovarian function; these results approximated the controls in both of the nVTG and VTG groups. In the recent groups, the percentage of follicular maturation and ultrastructure of transplanted ovaries were in better condition. In these groups, however, the incidence of apoptosis in primordial and antral follicles was higher, whereas the incidence of apoptosis in primary and preantral follicles was lower than the VTnG and nVTnG groups. Also the rate of expressions of angiogenic factors (CD31 and CD34) in all of the transplanted groups, particularly in the nVTG and VTG groups, were comparable with the control.

The results of this study showed that a combination of EG + DMSO and sucrose was more suited for follicular preservation, particularly at the initial stage could relatively restore ovarian function after vitrification and autotransplantation.

Keywords: Vitrification, Ovarian tissue, Cryoprotectant combinations, Autotransplantation, Ultrastructure of initial follicle, Gonadectomy.



ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

***Iranian Academic Center for Education, Culture & Research
Royan Institute***

Title

Study of ultrastructure and follicular maturation,
angiogenic and apoptotic genes expression of rat ovarian
tissue after vitrification and autotransplantation

Code: ۲۱۱۷- ۳۳

Research Group: Embryology

Responsible:

Mojtaba Rezazadeh Valojerdi (Ph.D)

Spring ۲۰۱۵