Original Article

Autologus Transplantation of Intact Mouse Ovaries in Gluteus Superficialis Muscle

Hossein Imani, Ph.D.[1, 2*], Seyedeh Fatemeh Siyadat, M.Sc.[1, 3, 4], Kazem Parivar, Ph.D.[4], Poopak Eftelhari Yazdi, Ph.D.[1], Mojtaba Rezazadeh Valojerdi, Ph.D.[1, 5], Abdolhossein Shahverdi, Ph.D.[1]

1. Embryology Department, Royan Institute for Reproductive Biomedicine Research Center, ACECR, Tehran, Iran
2. Anatomy Department, Baghyatallah University, Tehran, Iran
3. Biology Department, Faculty of Basic Sciences, Garmsar Azad University, Garmsar, Iran
4. Animal Biology Department, Faculty of Basic Sciences, Azad University, Tehran, Iran
5. Anatomy Department, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

** Corresponding Address: P.O.Box: 19395-4644, Embryology Department, Royan Institute for Reproductive Biomedicine Research Center, ACECR, Tehran, Iran*
Email: eimanih@royaninstitute.org

Received: 8/May/2008, Accepted: 28/Oct/2008

Abstract

Objective: Anti-cancer therapies frequently lead to ovarian damage and defective fertility. To preserve fertility, cryopreservation and subsequent transplantation of the ovaries has been suggested. The aim of this study was to investigate the survival of follicles in intact intramuscular mouse autologous ovaries, according to the time the ovarian tissue remained in the grafted site.

Materials and Methods: Ovaries (n=9) were transplanted intramuscularly into gluteus superficialis. These grafted ovaries were removed after one, two and three weeks from the grafted site. A histological examination and counting of follicles was then performed. Some ovaries (n= 3) from the same mice were selected randomly for the control group. Hematoxyline and eosin (H & E) staining was used for follicle counting and TUNEL staining for the examination of apoptosis in grafted tissues.

Results: Mean follicular survival was significantly lower in experimental groups compared to the control group (non-grafted) ($p<0.05$), because of ischemic damages. Also healthy primordial follicle numbers in grafted ovaries were higher than other types.

Conclusion: Antral follicles are the most sensitive to ischemic damages and primordial follicles are the least sensitive. Also the presence of healthy follicles in grafted tissues shows that ovarian transplantation could be a promising method for infertility treatment of patients diagnosed with cancer.

Keywords: Ovary, Transplantation, Mouse

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 2, Summer 2009, Pages: 184-189

پیوند اتولوگ تخمدان سالم و دست نخورده موش در ماهیچه سرینی سطحی

حسین ایمانی Ph.D.[۱،۲*]، سیده فاطمه سیادت M.Sc.[۱،۳،۴]، کاظم پریور Ph.D.[۴]، پوپک افتخاری یزدی Ph.D.[۱]، مجتبی رضازاده ولوجردی Ph.D.[۱،۵]، عبدالحسین شاهوردی Ph.D.[۱]

۱. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه جنین‌شناسی، تهران، ایران
۲. دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... ، گروه علوم تشریح، تهران، ایران
۳. دانشگاه آزاد اسلامی گرمسار، دانشکده علوم پایه، گروه بیولوژی، گرمسار، ایران
۴. دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه بیولوژی جانوری، تهران، ایران
۵. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه جنین‌شناسی
پست الکترونیک: Email: eimanih@royaninstitute.org

دریافت مقاله: ۸۷/۲/۲۹، پذیرش مقاله: ۸۷/۸/۷

چکیده

* **هدف:** بررسی میزان زنده ماندن فولیکول‌ها در پیوندهای آلوگرافت تخمدان‌های سالم (Intact) و دست نخورده درون ماهیچه با توجه به زمان پیوند
* **مواد و روش‌ها:** تخمدان‌های موش‌ها (n=۹) به صورت دست نخورده و سالم به ماهیچه سرینی سطحی همان موش‌ها پیوند زده شد. تعداد فولیکول‌های سالم باقی‌مانده در تخمدان‌های پیوند شده در ۳ فاصله زمانی یک، دو و سه هفته با هم مقایسه گردید. از تمام تخمدان‌های پیوندی این سه گروه به منظور بررسی‌های بافت‌شناسی و شمارش انواع فولیکول‌ها برش‌های بافتی تهیه گردید. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین برای شمارش فولیکول‌ها و تانل (TUNEL) برای بررسی آپوپتوزیس در بافت‌ها انجام گرفت.
* **یافته‌ها:** بین میانگین تعداد فولیکول‌ها در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌دار وجود داشت (p<۰/۰۵). میانگین تعداد فولیکول‌ها با گذشت زمان افزایش نشان داد ولی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. تعداد فولیکول‌های بدوی (Primordial Follicles) در هر سه گروه نسبت به بقیه انواع فولیکول‌ها بیشتر بود که نشان‌دهنده مقاومت بیشتر این نوع فولیکول‌ها به شرایط پیوند می‌باشد.
* **نتیجه‌گیری:** فولیکول‌های آنترال نسبت به شرایط ایسکمی حساس‌ترین نوع و فولیکول‌های بدوی مقاوم‌ترین آنها هستند که به نظر می‌رسد پیوند تخمدان در ماهیچه می‌تواند راهکاری باشد برای درمان ناباروری در افرادی که نیاز به شیمی درمانی یا رادیوتراپی دارند.

* **کلیدواژگان:** تخمدان، پیوند، موش

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۸، صفحات: ۱۸۹-۱۸۴

مقدمه

خانم‌هایی که از بیماری‌های بدخیم نظیر سرطان رنج می‌برند معمولا به وسیله روش شیمی درمانی یا رادیوتراپی درمان می‌شوند. هم‌چنین امکان تشخیص و درمان برخی از بیماری‌های سرطانی در سنین کودکی وجود دارد، از طرفی این درمان‌ها چه در سنین کودکی یا بزرگسالی نارسایی عملکرد تخمدان و به دنبال آن ناباروری را به دنبال دارد (۱).

یکی از روش‌های رایج برای حفظ باروری در این گونه بیماران، انجماد تخمدان (۲) سپس پیوند آن می‌باشد (۶-۳).

در مطالعات گذشته پیوند تخمدان به روش‌های مختلف و در مکان‌های متفاوتی صورت پذیرفته است (۱۹-۷). در مطالعات جانوری معمولا به دلیل چسبندگی‌ها، مشکلاتی که در بررسی مستقیم رشد فولیکول‌ها وجود دارد و خطاهای تکنیک‌های جراحی از پیوندهای هتروتوپیک (پیوند در مکان دیگری غیر از جایگاه اصلی آن عضو) استفاده می‌گردد.

در بسیاری از گزارش‌ها انتقال مجدد سلول‌های سرطانی در برخی از انواع سرطان از طریق پیوند اورتوتوپیک گزارش شده است هر چند خطر آن ناچیز است (۴، ۲۰).

در پیوند غیر از مکان اصلی بافت تخمدان نظیر زیر پوست (۱۸، ۲۳-۲۱)، کپسول کلیه (۹، ۱۰، ۱۶)، بورسای تخمدان (۱۳)، یا درون بافت ماهیچه (۲۴، ۲۵) به سیستم آندوکرین اجازه فعالیت داده می‌شود، از طرفی امکان جمع‌آوری تخمک‌ها برای انجام بلوغ آزمایشگاهی (*In vitro* Maturation) و لقاح آزمایشگاهی (*In vitro* Fertilization) فراهم می‌گردد (۱۶، ۱۷). از این روی یافتن روشی برای حفظ فولیکول‌ها به منظور دریافت بیشترین میزان تخمک از بافت تخمدان پیوندی، برای IVM و IVF امری ضروری است. تعداد فولیکول‌های بدوی بافت تخمدان پیوندی نسبت به انواع دیگر فولیکول‌ها بیشتر است. اما کشت فولیکول‌های بدوی یا قسمت‌های قشری تخمدان بسیار مشکل است. تا کنون رشد کامل تخمک‌های موش از فولیکول‌های بدوی به مرحله متافاز II در محیط *In vitro* تنها توسط یک گروه با موفقیت گزارش شده است (۲۶). اما به نظر می‌رسد بقا و رشد فولیکولی فولیکول‌های بدوی بعد از پیوند بافت تخمدان بیشتر از زمانی است که این فولیکول‌ها یا برش‌های کورتیکال بافت تخمدان به طور جداگانه در محیط آزمایشگاهی کشت داده شدند. البته راهکارهای متفاوتی برای این کار ارایه شده است به عنوان نمونه اگر تخمدان به بافت گرانوله شده (Granulation Tissue) پیوند زده شود، آسیب ناشی از عدم خون‌رسانی کاهش می‌یابد (۲۴). مشخص شده است که تعداد

فولیکول‌های آسیب دیده در پیوندهای درون ماهیچه‌ای به طور معنی‌داری نسبت به پیوند زیر پوستی کمتر می‌باشد (۲۵). در بسیاری از مطالعات معلوم شده است که تعداد فولیکول‌های در حال رشد بلافاصله یا مدت کوتاهی پس از پیوند کاهش می‌یابد اما با گذر زمان به علت رگ‌زایی در بافت پیوندی و خون‌رسانی بهتر این تعداد افزایش می‌یابد. (۲۵) دراین مطالعه نیز سعی شد تا زمان اپتیمم برای به دست آوردن بیشترین بازیافت فولیکولی به دست آید لذا بعد از پیوند بافت تخمدان با فواصل زمانی یک، دو و سه هفته بافت‌های پیوندی از مکان خود خارج شد و بررسی‌های بافت‌شناسی و شمارش انواع فولیکول‌ها روی آنها صورت پذیرفت.

پژوهش انجام شده به عنوان یک مطالعه اولیه برای روش‌های انجماد و پیوند انجام شده است. از آنجایی که در بیشتر مطالعات انجام شده تاکید شده است که عامل پیوند بیش از انجماد باعث آسیب رساندن به فولیکول‌ها می‌شود (۱۴، ۱۵) ابتدا بر آن شدیم که در مورد پیوند و مکان و روش مناسب آن آزمایش نماییم. لذا برای بار اول و به منظور خون‌رسانی بهتر، تخمدان را در ماهیچه سرینی سطحی Gluteus Superficialis پیوند زدیم و زمان‌های مختلف قرار دادن بافت تخمدان را در مکان پیوند مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد مطالعه از انستیتو پاستور ایران (کیلومتر ۲۵جاده تهران کرج) تهیه و قبل از انجام آزمایش برای تطابق با محیط، یک هفته در حیوان‌خانه پژوهشکده رویان نگهداری شدند.

پیوند تخمدان

در این تحقیق، دهنده و گیرنده پیوند یک فرد از یک گونه بود و تخمدان جداشده به همان موش پیوند زده شد (پیوند اتولوگ)؛ موش‌های ماده نژاد NMRI (Naval Medical Research Institute) (n=۹)، باسن ۴ تا ۶ هفته با تزریق درون صفاقی کتامین (۵۰میکروگرم در میلی لیتر Rotexmedica Germany) و زایلازین (۲/۲۰میلی‌گرم درصد Alfasan) بی‌هوش شدند. تخمدان چپ از طریق یک برش پشتی جانبی کوچک بیرون آورده شد و ضمن جدا کردن اویداکت و چربی‌ها از آن زیر میکروسکوپ استریو به صورت دست نخورده و بدون ایجاد برش در آنها مستقیما در ماهیچه همان موش پیوند زده شد (ظرف مدت ۳۰ تا ۴۰ ثانیه)؛ به این طریق که ابتدا یک برش درمی کوچک به اندازه ۰/۵ سانتی‌متر درپوست روی ماهیچه سرینی سطحی ایجاد گردید سپس برش کوچکی در طول فیبرهای این ماهیچه ایجاد شد و تخمدان روی ماهیچه زیری ضمیمه شد. ناحیه صفاق با نخ قابل جذب ۵-۰ (Ethicon)، و پوست با نخ غیر قابل جذب ۴-۰ (Silk-Ethicon) بخیه شد. فیبرهای ماهیچه با نخ جراحی ۴-۰ (Noab-sorbable–Silk-Ethicon) به منظورشناسایی مکان پیوند، بخیه شد (۲۴، ۲۵) (شکل ۱).

بازیافت بافت پیوندی

موش‌های دریافت کننده پیوند، به سه گروه تقسیم شدند و یک، دو و سه هفته بعد از پیوند به وسیله جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته و تخمدان‌های پیوندی آنها جدا و فیکس شدند. در تعدادی ازاین موش‌ها تخمدان سمت دیگر (به صورت تصادفی) به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد.

بافت‌شناسی

تخمدان‌ها (با مقداری از بافت ماهیچه اطرافشان) به مدت ۲۴ ساعت درون فیکساتیو بوئن قرار داده شدند و بعد از مراحل آب‌گیری با الکل در پارافین بلوک‌گیری شدند. سپس از کل نمونه برش‌هایی با ضخامت ۶ میکرومتر تهیه شد. دو سری لام تهیه گردید که سری اول با هماتوکسیلین و ائوزین و سری دوم با TUNEL رنگ‌آمیزی شدند.

آپوپتوز در بافت به وسیله کیت پروکسیداز TUNEL (In situ cell death detection kit-POD, Roche, USA) طبق دستوری که در خود کیت وجود داشت نشان داده شد .به طور خلاصه برش‌ها پارافین‌زدایی و آبدهی شدند سپس با تریتون ۰/۱۵ درصد (X-100 ,Sigma) در دمای اتاق و در محیطی مرطوب به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه انکوبه شدند سپس لام‌ها دو بار با PBS شست‌وشو داده شدند؛ مخلوط واکنش تانل اضافه و روی لام‌ها با درپوشی پوشانده شد. لام‌ها در تاریکی و محیط مرطوب انکوبه و بعد از آن سه بار با PBS شسته شدند سپس converter-POD روی نمونه‌ها اضافه گردید. لام‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در محیطی مرطوب انکوبه شدند پس ازسه بارشست‌وشو با PBS ماده DAB یا Alternative POD اضافه گردید. لام‌ها مجددا با PBS شسته و با هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شدند.

بررسی تعداد فولیکول‌ها در مراحل مختلف تکوین

برش‌ها ی تهیه شده از هر تخمدان به صورت سریال تهیه شد. در سری اول لام‌هایی که با H&E رنگ‌آمیزی شده بودند از هر ۶ برش یک برش بررسی و فولیکول‌های آنها شمارش گردید. تعداد برش‌های شمارش شده در نمونه‌های پیوندی حدود ۴۰ و در نمونه‌های کنترل حدود ۷۰ برش بود.

فولیکول‌های شمارش شده در ۴ گروه طبقه‌بندی شدند:
الف. فولیکول‌های بدوی (Primordial Follicles; POFs) حاوی یک تخمک که با یک لایه سلول سنگفرشی ساده احاطه شده است.
ب. فولیکول‌های اولیه (Primary Follicles; PFs): شامل یک تخمک که با یک لایه سلول مکعبی ساده احاطه شده‌اند.
ج. فولیکول‌های پرآنترال (Preantral Follicles; PAFs): حاوی تخمک با بیشتر از یک لایه سلول مکعبی ساده بدون حفره آنتروم
د. فولیکول‌های آنترال (Antral Follicles; AFs): حاوی تخمک با بیشتر از یک لایه سلول مکعبی ساده با حفره‌ای درون سلول‌های گرانولوزابه نام آنتروم. برای اجتناب از شمارش مجدد همان فولیکول و برای اطمینان از اینکه برش مورد شمارش بزرگترین برش عرضی آن فولیکول باشد، شمارش فولیکول‌ها در برشی انجام پذیرفت که هستک‌ها در درون هسته تخمک حباب زاینده (Germinal Vesicle; GV) مشخص بودند. فولیکول‌های بدوی زمانی شمارش شدند که غشاء هسته تخمک کاملا مشخص بود (۱۵).

بررسی‌های آماری

داده‌ها به وسیله نرم‌افزار EXCEL بررسی شدند. برای مقایسه میانگین تعداد فولیکول‌ها با گروه کنترل از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده گردید. برای بررسی پراکندگی طبیعی گروه‌ها از تست Kolmogorov-smirnov استفاده شد. با استفاده از Least Significant Differences Fisher's (LSD) مقایسه بین میانگین‌ها به صورت دو به دو انجام گرفت. همه داده‌ها به صورت Mean ± SEM بیان شد و سطح $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته‌شد.

یافته‌ها

پیوند تخمدان درون ماهیچه

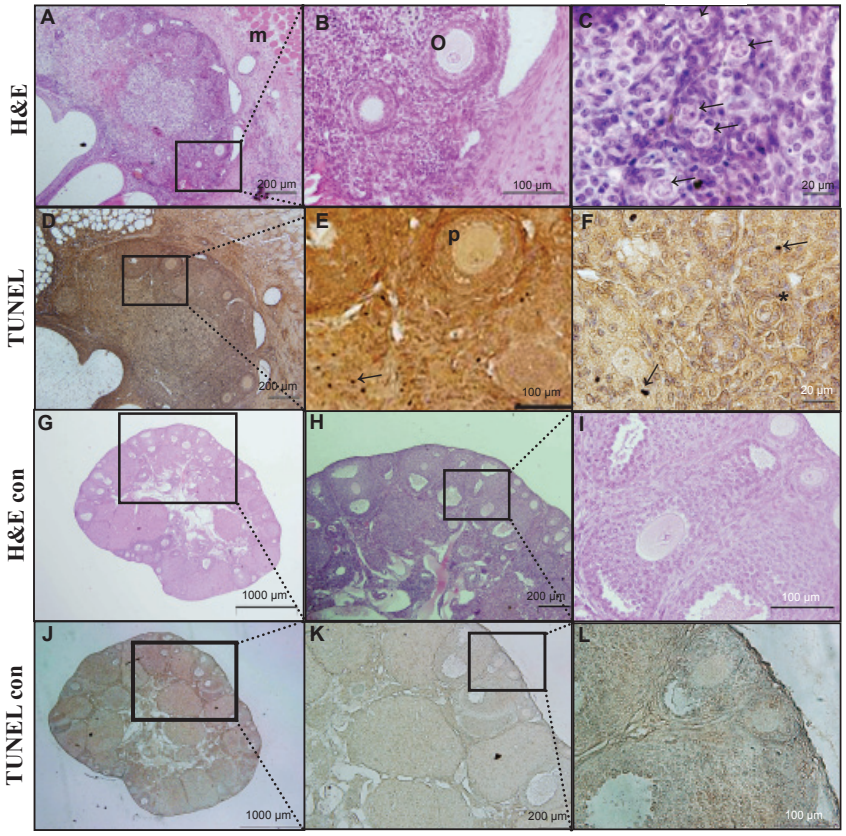
شمارش فولیکول‌ها به روشی که قبلا توضیح داده شد، انجام گرفت و تعداد فولیکول‌های بدوی، اولیه، پرآنترال و آنترال در برش‌ها شمارش شدند و تعداد آنها به صورت Mean ± SEM درجدول ۱ خلاصه شد. تعداد تمام انواع فولیکول‌ها در گروه‌های تجربی به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل کمتر و دارای اختلاف معنی‌دار بود (p<۰/۰۵).

تعداد فولیکول‌های بدوی، اولیه، پرآنترال و فولیکول‌های آنترال به ترتیب بیشترین میزان فولیکول‌ها را در بافت پیوندی تشکیل می‌داد. تعداد فولیکول‌های بدوی در بافت پیوندی سه هفته‌ای (۵/۱۹ ± ۳/۳۹) نسبت به دو گروه یک هفته‌ای و دو هفته‌ای به ترتیب ۷/۲۰ ± ۷/۲۳، ۱۴ ± ۳۳) بیشتر بود. همچنین بر خلاف افزایش تعداد فولیکول‌های اولیه (۶/۸ ± ۱۲) و آنترال (۱ ± ۱) در این گروه نسبت به دو گروه دیگر این تفاوت در سطح p>۰/۰۵ معنی‌دار نبود (جدول ۱).

جدول ۱: تعداد فولیکول‌های سالم باقی مانده در تخمدان‌های پیوندی یک، دو و سه هفته بعد از پیوند

تخمدان‌ها	* (آنترال) n	تعداد فولیکول‌ها (Mean ± SEM)			
		بدوی	اولیه	پرآنترال	آنترال
یک هفته	۳ (۱)	۲۳/۷ ± ۲۰/۷	۶/۷ ± ۵/۲	۴ ± ۳	۰/۳ ± ۰/۳
دو هفته	۳ (۰)	۳۳ ± ۱۴	۸ ± ۴	۵/۳ ± ۴/۳	۰ ± ۰
سه هفته	۳ (۱)	۳۹/۳ ± ۱۹/۵	۱۲ ± ۸/۶	۳/۳ ± ۲/۳	۱ ± ۱
کنترل	۳ (۳)	۴۱۷/۳ ± ۵۲/۱	۱۳۴ ± ۱۴	۱۸۵/۳ ± ۵۶/۶	۵۶/۷ ± ۱۰/۶

*در پرانتز تعداد جانورانی که در آنها فولیکول‌های آنترال سالم یافت شد آورده شده است.
n= تعداد تخمدان‌ها



شکل ۱: آپوپتوز در تخمدان‌های پیوندی و غیرپیوندی (کنترل). A-C: تخمدان‌های پیوندی رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین D-F: تخمدان‌های پیوندی رنگ‌آمیزی شده با کیت تانل. G-I: تخمدان‌های غیرپیوندی (کنترل) رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین. J-L: تخمدان‌های غیرپیوندی (کنترل) رنگ‌آمیزی شده با کیت تانل. پیکان‌ها در شکل C فولیکول‌های بدوی را نشان می‌دهد. پیکان‌ها در شکل E و F سلول‌هایی را که با تانل رنگ گرفته‌اند را نشان می‌دهد. ستاره، فولیکول‌های بدوی سالم را نشان می‌دهد. تصویر B کادر مشخص شده در تصویر A است. و به همین ترتیب E تصویر بزرگ شده کادر تصویر Dاست و I تصویر بزرگ شده کادر تصویر H و H تصویر بزرگ شده کادر تصویر G و L تصویر بزرگ شده کادر تصویر K و K تصویر بزرگ شده کادر تصویر J است. m=muscle, O=oocyte, P=preantral follicle.

تعداد فولیکول‌های آنترال در این گروه‌ها نسبت به بقیه انواع فولیکول‌ها کمتر بود. در گروه دو هفته‌ای اصلا فولیکول آنترالی مشاهده نشد. در مجموع در کل این سه گروه از ۹ تخمدان پیوندی تنها در دو عدد از آنها فولیکول آنترال مشاهده شد (جدول ۱).

بررسی‌های بافت‌شناسی نشان داد یک هفته بعد از پیوند نواحی آسیب دیده بیشتر به نواحی مرکزی پیوند محدود شده بود که این موضوع به وسیله رنگ‌آمیزی TUNEL تایید شد (شکل ۱). با گذشت زمان (دو و سه هفته بعد از پیوند) به تدریج آسیب به محیط پیوند گسترش یافت و تنها فولیکول‌هایی زنده ماندند که از مرکز نکروتیک دور بودند (شکل 1A-F).

فراگمنته شدن DNA در تخمدان پیوندی:

نواحی آسیب دیده در تخمدان‌های پیوند شده و کنترل به وسیله رنگ‌آمیزی تانل مشخص شدند، (شکل 1D-F) نقاط آپوپتوتیک به نواحی مرکزی تر بافت تخمدان پیوندی محدود می شد و نقاط دچار آپوپتوز شده در این نواحی بیشتر دیده می‌شد.

نقاط آپوپتوتیک در فولیکول‌های بدوی یا در سلول‌های گرانولوزای احاطه‌کننده آنها در نواحی سطحی‌تر تخمدان بسیار کمتر دیده شد (شکل1F) در صورتی که در همین تخمدان‌ها در نواحی مرکزی تر نسبت به سطح نقاط آپوپتوتیک فراوان‌تری دیده شد (شکل 1E). سلول‌هایی که با تانل رنگ‌آمیزی شدند به صورت نقاط قهوه‌ای تیره در شکل دیده می‌شوند.

بحث

هدف اصلی پیوند بافت تخمدان حفظ باروری به وسیله به حداقل رساندن آسیب به فولیکول‌های بدوی و تخمک‌ها و به حد اپتیمم رساندن تکوین فولیکول‌ها می‌باشد (۲۴). فولیکول‌های بدوی نسبت به فولیکول‌های در حال رشد به علت ماندن در حالت رکود و کم بودن میزان متابولیسم آنها به اثر ایسکمی مقاوم‌ترند. به طوری که با گذشت زمان به نظر می‌رسد به علت رگ‌زایی و خون‌رسانی بهتر، تعدادی از فولیکول‌های بدوی یا اولیه زنده مانده در پیوند، رشد کرده و به مرحله آنترال برسد (۲۴) در مطالعه‌ای که توسط لیو و همکارانش انجام گرفت، پیوندها هم به صورت تازه و هم به صورت منجمد بررسی گردیدند و در پیوندهای تازه ۵۸ درصد جمعیت فولیکول‌ها ودر تخمدان‌های منجمد شده پیوندی ۴۹ درصد فولیکول‌ها در موش زنده ماندند (۱۵).

در مطالعه حاضر میزان زنده ماندن فولیکول‌های بدوی نسبت به بقیه انواع فولیکول‌ها بیشتر بوده است. همچنین بافت پیوند یک و سه هفته بعد از پیوند دارای فولیکول آنترال بود اما دو هفته بعد از پیوند، فولیکول آنترالی وجود نداشت. به نظر می‌رسد که تعداد فولیکول‌های در حال رشد در هفته اول کاهش می‌یابد اما طی هفته بعد احتمالا تعدادی از فولیکول‌های بدوی رشد کرده به مرحله آنترال می‌رسند. در مطالعات گذشته نیز چنین کاهش و افزایشی در تعداد فولیکول‌ها مشاهده شده بود (۲۴). همچنین برای جلوگیری از مرگ و میر در موش‌های با سن کم که تحمل دو جراحی هم‌زمان را نداشتند، از موش‌های بالغ استفاده کردیم که تعداد فولیکول‌های آنترال و پرآنترال در آنها نسبت به موش‌های با سنین کم بیشتر بوده و همان‌گونه که قبلا نیز ذکر شد این فولیکول‌ها نسبت به آسیب ایسکمی حساس‌ترند، بنابراین به طور کلی تعداد فولیکول‌های بزرگ در هر سه گروه نسبت به بقیه انواع فولیکول‌ها کمتر بود.

لیو و همکارانش فولیکول‌های بیشتری را در تخمدان‌های پیوندی موش نسبت به مطالعه حاضر شمارش کردند که احتمالا دلیل آن مکان پیوند (کپسول کلیه) و برداشتن تخمدان‌های موش‌های گیرنده قبل از پیوند بوده است.

برداشتن تخمدان‌های افراد گیرنده پیوند منجر به دو تغییر فیزیولوژی در بدن آنها می‌شود: میزان گونادوتروپینها در گردش خون افزایش می‌یابد و فاکتورهایی که به وسیله تخمدان‌های سالم افراد گیرنده پیوند ترشح می‌شوند با برداشتن تخمدان‌ها حذف می‌شوند. FSH میتوز سلول‌های گرانولوزا و بلوغ فولیکول‌ها را تحریک می‌کند و آپوپتوز را در سلول‌های گرانولوزا متوقف می‌کند، همچنین نقش مثبتی در رگ‌زایی بعد از پیوند ایفا می‌کند (۲۷). بنابراین میزان بالای FSH در گیرنده‌هایی که تخمدان‌های آنها قبلا جدا شده ممکن است به زنده ماندن و تکوین فولیکول‌ها در تخمدان پیوند شده کمک کند. موش‌هایی که در مطالعه حاضر به عنوان گیرنده استفاده شد، همان موش‌های دهنده‌ای بودند که تخمدان راست آنها در جای خود باقی مانده بود و تخمدان چپ آنها به ماهیچه چپ سرینی سطحی پیوند شده بود. بعد از گذشت یک، دو و سه هفته، هم تمام تخمدان‌های پیوند شده و هم تخمدان‌های سمت راست در برخی از موش‌ها (گروه کنترل) جدا شده و تعداد فولیکول‌های آنها شمارش شده بود. به عبارت دیگر طی زمانی که یک تخمدان در پیوند بود تخمدان دیگر در جای خود قرار داشت. در نتیجه احتمالا تحت اثر تخمدان باقی مانده در این موش‌ها افزایش در میزان گونادوتروپین‌ها و میتوز سلول‌های گرانولوزا حاصل نشده است. در این مطالعه نیز اگر قبل از جراحی تخمدان سمت مقابل از جای خود خارج شده بود احتمالا میزان زنده ماندن فولیکولی بیشتر وجود داشت. در برخی از مطالعات به اثر منفی تخمدان باقی‌مانده بر رشد بافت تخمدان پیوند شده، اشاره شده است (۱۵).

در این مطالعه فولیکول‌هایی شمارش شدند که هستک‌های تیره رنگ در میان هسته‌های تخمک آنها مشاهده شد. قطر هستک‌های تخمک در فولیکول‌های پرآنترال و آنترال در موش حدود ۷ تا ۱۰ میکرومتر است؛ بنابراین امکان شمارش مجدد آنها وجود داشت دقت کافی به عمل آمد تا زمانی که با فولیکول‌های پرآنترال یا آنترال مواجه می‌شویم از شمارش مجدد فولیکول‌ها در برش‌های مجاور همان برش اجتناب گردد (برش‌ها به صورت سریال بودند و دسترسی به تمام برش‌ها وجود داشت و هیچ برشی دور ریخته نشده بود). قطر هستک‌ها به عنوان یک نشانه برای فولیکول‌های بدوی حدود ۲ میکرومتر برآورد شده است بنابراین احتمال شمارش مجدد در برش‌های با ضخامت ۶ میکرومتر کاهش می‌یابد (۱۵).

مقایسه بین میانگین‌ها نشان داد که بین میانگین تعداد فولیکول‌ها در سه گروه آزمایشی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد به این ترتیب زمان اپتیمم برای پیوند مشخص نمی‌گردد و مطالعات بیشتری در این زمینه لازم است.

بررسی آپوپتوز نشان داد که آسیب فولیکول‌ها بیشتر به نواحی مرکزی محدود می‌شود و درنواحی سطحی بافت تخمدان پیوندی بقای فولیکولی بیشتر است (شکل ۱). این موضوع با مطالعات گذشته مطابقت داشت (۱۵، ۲۴). هم‌چنین پراکندگی سلول‌های آپوپتوتیک بیشتر در نواحی مرکزی بافت پیوندی مشاهده گردید که می‌تواند نشان دهنده این باشد که سلولهای گرانولوزا و استرومایی نسبت به سلول‌های تخمک فولیکول بدوی، به روش پیوند حساس‌تر هستند (شکل ۱). مطالعات دیگر نیز این مطلب را تایید می‌کنند (۱۵، ۲۴). با این وجود نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه احساس می‌شود.

در این مطالعه، ماهیچه به عنوان مکان پیوند انتخاب شد چون مکان زیر پوستی هتروژن است و از نظر رگ‌های خونی به اندازه ماهیچه غنی نیست (۲۴). ماهیچه به عنوان یک مکان پیوند، هوموژنوس‌تر است و رگ‌های خونی بیشتری دارد (۲۴). میزان زنده ماندن فولیکول‌ها زمانی که بافت تخمدان به طور کامل به ماهیچه اسکلتی پیوند گردید، بیشتر شد (۲۴، ۲۵) مکان پیوند زیر پوستی مکانی است که دسترسی به پیوند در آنجا راحت‌تر است اما به نسبت از نظر خون‌رسانی و ظرفیت رگ‌زایی ضعیف‌تر است. کپسول کلیه از نظر رگ‌های خونی غنی‌تر است اما به دست آوردن تخمک‌ها و فولیکول‌ها از این مکان، نیازمند جراحی باز حفره شکمی است (۱۱، ۱۲، ۱۸، ۲۵).

نتیجه گیری

بنابراین پیوند تخمدان به ماهیچه می‌تواند مزیت‌های هر دو روش پیوند زیر پوستی و کپسول کلیه را داشته باشد در عین حال پیگیری بافت در این روش راحت‌تر و دسترسی به تخمک‌ها برای انجام IVM و IVF نیز آسان‌تر می‌باشد.

تقدیر و تشکر

کلیه هزینه‌های طرح حاضر از بودجه طرح پیوند تخمدان موش، توسط پژوهشکده رویان تامین شده است.

بر خود فرض می دانیم که تشکر خود را از تمامی مسئولین پژوهشکده و همکاران گروه جنین‌شناسی به جهت انجام این طرح اعلام داریم.

References

1. Maltaris T, Seufert R, Fischl F. The effect of cancer treatment on female fertility and strategies for preserving fertility. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2007;130: 148-155.
2. Migishima F, Suzuki-Migishima R, Song SY. Successful cryopreservation of mouse ovaries by Vitrification. Biol Reprod. 2003; 68: 881-887.
3. Newton H. The cryopreservation of ovarian tissue as a strategy for preserving the fertility of cancer patients. Hum Reprod Update.1998; 4: 237-247.
4. Rogerio A, Lobo M D. Potential options for preservation of fertility in women. N Engl J Med. 2005; 353: 64-73.
5. Sonmezer M, Oktay K Fertility preservation in female patients. Hum Reprod Update. 2004; 10: 251-266.
6. Kim S. S. Ovarian tissue banking for cancer patients to do or not to do? Hum Reprod. 2003; 18: 1759-1761
7. Arav A, Revel A, Nathan Y. Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary. Hum Reprod. 2005; 20: 3554-3559.
8. Bordes A, Lornage J, Demirci B. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. Hum Reprod. 2005; 20: 2745-2748.
9. Gook D A, McCully B A, Edgar D H. Development of antral follicles in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting .Hum Reprod. 2001; 16: 417-422.
10. Kaneko H, Kikuchi K, Noguchi J. Maturation and fertilization of porcine oocytes from primordial follicles by a combination of xenografting and *In Vitro* Culture. Biol Reprod. 2003; 69: 1488-1493.
11. 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): 1405-1410.
12. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D. Restoration of ovarian function after orthotopic (intraovarian and periovarian) transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a woman treated by bone marrow transplantation for sickle cell anemia. Hum Reprod. 2006; 21:183-188.
13. Sztein J, Sweet H, Farley J, Mobraaten L. Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: New approach in gamete banking. Biol Reprod. 1998; 58(4): 1071-1074.
14. Liu J, Van der Elst J, Van den Broecke R, Dumortier F, Dhont M. Maturation of mouse primordial follicles by combination of grafting and in vitro culture. Biol Reprod. 2000; 62(5): 1218-1223.
15. Liu J, Van der Elst J, Van den Broecke R, Dhont M. Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. Hum Reprod. 2002; 17(3): 605-611.
16. Liu J, Van der Elst J, Van den Broecke R, Dhont M. Live offspring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. Biol Reprod. 2001; 64, 171-178.
17. Waterhouse T, Cox S L, Snow M. Offspring produced from heterotopic ovarian allograft in male and female recipient mice. Reproduction. 2004; 127: 689-694.
18. Aubard Y, Piver P, Cogni Y. Orthotopic and heterotopic autografts of frozen-thawed ovarian cortex in sheep. Hum Reprod. 1999; 14: 2149-2154.
19. Gunasena KT, Villines PM, Critser ES. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. Hum Reprod. 1997; 12: 101-106.
20. Revel A, Schenker J. Ovarian tissue banking for cancer patients: is ovarian cortex cryopreservation presently justified? Hum Reprod. 2004; 19: 14-19.
21. Weissman A, Gotlieb L, Colgan T. Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse. Biol Reprod. 1999; 60: 1462-1467.
22. Nisolle M, Casanas-Roux F, Qu J. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen–thawed human ovarian xenografts in nude mice. Fertil Steril. 2000; 74: 122-129.
23. Van den Broecke R, Liu J, Handyside A. Follicular growth in fresh and cryopreserved human ovarian cortical grafts transplanted to immunodeficient mice. Eur J Obst Gynecol Reprod Biol. 2001; 97:193-201.
24. Israely T, Nevo N, Harmelin A. Reducing ischemic damage in rodent ovarian xenografts transplanted into granulation tissue. Hum Reprod. 2006; 21: 1368-1379.
25. Israely T, Dafni H, Granot D. Vascular remodeling and angiogenesis in ectopic ovarian transplants: a crucial role of pericytes and vascular smooth muscle cells in maintenance of ovarian grafts. Biol Reprod. 2003; 68: 2055-2064.
26. Eppig JJ, Obrien MJ. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. Biol Reprod. 1996; 54: 197-207.
27. Dissen G A, Lara H E, Fahrenbach W H, Ojeda S R. Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show gonadotropin-dependent incrise in angiogenic factor gene expression. Endocrinol. 1994; 134: 1146-1154.