بسم الله
الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای روح اله فتحی رشته **علوم تشریح** رساله **دکتری** خود را با عنـوان « **مطالعه فراساختار و بیان ژنهای بلوغ فولیکولی، رگزائی و آپوپتوزی بافت تخمدان موش صحرایی پـس از انجماد شیشه ای و پیوند به خود** » در تاریخ **۱۳۹۲/۶/۲۰** ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنـرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنما	دکتر مجتبی رضا زاده	
استاد مشاور	دکتر مژده صالح نیا	
استاد ناظر	دکتر تقی طریحی	
استاد ناظر	دکتر سید جواد مولا	
استاد ناظر	دکتر پوپک افتخاری یزدی	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر منصوره موحدین	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **روح الله فتحی** دانشجوی رشته **علوم تشریحی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۷** مقطع **دکتری** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ ۹۲/۶/۲۰

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

کتاب حاضر، حاصل **رساله دکتری** نگارنده در رشته **علوم تشریحی** است که در سال **۱۳۹۲** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **استاد مجتبی رضازاده ولوجردی** و مشاوره **سرکار خانم دکتر مژده صالح نیا** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **روح الله فتحی** دانشجوی رشته **علوم تشریحی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی روح‌الله فتحی

تاریخ و امضا

۹۲/۶/۲۰

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته علوم تشریحی

عنوان

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

نگارش

روح الله فتحی

استاد راهنما

دکتر مجتبی رضازاده ولوجردی

استاد مشاور

دکتر مژده صالح نیا

تابستان ۱۳۹۲

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 ضدیخ مناسب، تخمدان های موش های صحرایی ویستار ۵ هفته ای به طور تصادفی به ۱۳ گروه با عنوان کنترل (غیر انجمادی)، VI و TI (DMSO + EG)، VII و TII (EG + PROH)، VIII و TIII (PROH + DMSO)، VIV و TIV (DMSO + EG) و ۰/۲۵ مول در لیتر سوکروز)، VV و TV (PROH + EG و ۰/۲۵ مول در لیتر سوکروز) و VVI و TVI (PROH + DMSO و ۰/۲۵ 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 ضدیخ مناسب و به منظور بررسی تغییرات پیوند به خودی بافت تخمدان انجمادی، تخمدان های موش با مشخصات فوق به صورت تصادفی در ۶ 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 ضدیخ 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 چرخهٔ 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 nVTnG و VTnG بیشتر و در فولیکول های اولیه و پرآنترال 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.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱
۱-۱. مقدمه ۲
۱-۲. اثرات درمان سرطان با روشهای تهاجمی بر دستگاه تولید مثل ۳
۱-۳. حفظ قدرت باروری در بیماران سرطانی ۵
۱-۳-۱. انجماد جنین ۵
۱-۳-۲. انجماد تخمک ۶
۱-۳-۳. انجماد تخمک بالغ ۶
۱-۳-۴. انجماد تخمک نابالغ ۷
۱-۳-۵. انجماد بافت تخمدان ۸
۱-۳-۵-۱. انجماد کل بافت تخمدان ۹
۱-۳-۵-۲. انجماد قطعات قشر تخمدان ۱۱
۱-۳-۵-۳. مقایسه روشهای مختلف انجمادی بافت تخمدان ۱۲
۱-۳-۵-۴. اثر ضدیخهای مختلف بر انجماد بافت تخمدان ۱۴
۱-۳-۵-۵. پروتئین های ضد انجمادی ۱۶
۱-۴. تاریخچه پیوند بافت تخمدان انجمادی ۱۷
۱-۵. پیوند بافت تخمدان ۱۹
۱-۵-۱. مسائل و مشکلات انجماد و پیوند بافت تخمدان ۲۰
۱-۵-۱-۱. ارزیابی دقیق نتیجهٔ انجماد و پیوند بافت تخمدان ۲۰
۱-۵-۱-۲. اثر جایگاه های مختلف بر نتیجه پیوند ۲۱
۱-۵-۱-۳. رگ زایی و رگ سازی مجدد پس از پیوند تخمدان ۲۳
۱-۵-۱-۳-۱. نقش عوامل رشد رگزا در موفقیت پیوند ۲۵
۱-۵-۱-۳-۲- نقش عوامل ضد رگزایی در نتیجه پیوند ۲۷
۱-۵-۱-۴. کاهش کیفیت گامت ها در بافت پیوندی ۳۱
۱-۵-۱-۵. احتمال بازگشت سلول های سرطانی به بدن، در نتیجه پیوند ۳۱
۱-۵-۱-۶. محدودیت مدت زمان فعالیت بافت تخمدان پیوند زده شده ۳۲
۱-۶. تغییرات گنادو تروپین ها و استروئیدها در پیوند تخمدان ۳۳
۱-۷. مرگ سلولی و عوامل مؤثر بر آن در پیوند تخمدان ۳۷
۱-۸. تغییرات و نقش فاکتورهای رشد موضعی در پیوند تخمدان ۴۲
۱-۹. اهداف ۴۶
۱-۱۰. فرضیات ۴۸
فصل دوم: مواد و روشها ۴۹
۲-۱. مقدمه ۵۰
۲-۲. انجماد شیشه ای بافت تخمدان موش صحرایی (بررسی اثر ترکیبات مختلف ضدیخ) ۵۱
۲-۲-۱. تهیهٔ حیوان و نمونه تخمدان ۵۱
۲-۲-۲. طراحی آزمایش ۵۲
۲-۲-۳. بیهوش کردن حیوان ۵۳
۲-۲-۴. خارج کردن تخمدان از بدن حیوان ۵۳
۲-۲-۵. فرآیند انجماد شیشه ای و آزمون سمیت ۵۴
۲-۲-۶. ذوب تخمدان های منجمد ۵۶

۲-۲-۷. ارزیابی بافتی (رنگ آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین) ۵۶
۲-۲-۸. ایمونوهیستوشیمی ۵۹
۲-۲-۹. تهیه مقاطع نیمه نازک و فوق نازک جهت بررسی فراساختار بافت با میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) ۶۱
۲-۳. پیوند بافت تخمدان منجمد – ذوب شده ۶۴
۲-۳-۱. طراحی آزمایش ۶۴
۲-۳-۲. پیوند تخمدان ۶۶
۲-۳-۳. خون گیری و جدا سازی سرم به منظور تعیین سطح هورمونی ۶۷
۲-۳-۴. روش الایزا ۶۸
۲-۳-۵. مطالعات بافتی و فراساختار بافت تخمدان پیوندی ۷۰
۲-۳-۶. بررسی بیان رونوشت ژن‌های بلوغ فولیکول، رگ زایی و آپوپتوتیک در بافت تخمدان گروه های کنترل و پیوندی ۷۰
۲-۳-۶-۱. جمع‌آوری نمونه و نگهداری آن ۷۰
۲-۳-۶-۲. استخراج RNA ۷۱
۲-۳-۶-۳. اندازه‌گیری غلظت RNA ۷۳
۲-۳-۶-۴. سنتز cDNA ۷۳
۲-۳-۶-۵. آماده سازی پرایمرها ۷۵
۲-۳-۶-۶. مراحل Real-time PCR ۷۶
۲-۳-۶-۷. شرایط Real-time PCR ۷۷
۲-۳-۶-۸. تحلیل نتایج Real-time PCR ۷۷
۲-۴. تجزیه و تحلیل آماری داده ها ۷۸
فصل سوم: نتایج و یافته‌ها ۸۷
۳-۱. انجماد شیشه ای تخمدان کامل موش صحرایی (مقایسه ترکیبات مختلف ضد یخ) ۸۸
۳-۱-۱. شمارش فولیکولهای سالم و مرده در گروه های کنترل، انجمادی و آزمون سمیت ۸۸
۳-۱-۲. شمارش فولیکولهای آپوپتوتیک در گروه های کنترل، انجمادی و آزمون سمیت ۹۵
۳-۱-۳. بررسی بافت شناسی تخمدانهای موش صحرایی پس از انجماد شیشه ای (مقاطع نیمه نازک) ۹۸
۳-۱-۳-۱. تخمدانهای غیر منجمد (گروه کنترل) ۹۸
۳-۱-۳-۲. تخمدانهای آزمون سمیت (گروه های T I و T IV) ۱۰۳
۳-۱-۳-۳. تخمدانهای منجمد (گروه های V I و V IV): ۱۰۶
۳-۱-۴. بررسی فراساختار فولیکول های بدوی تخمدان موش صحرایی پس از انجماد شیشه ای ۱۱۶
۳-۱-۴-۱. گروه کنترل ۱۱۶
۳-۱-۴-۲. گروه آزمون سمیت T I (EG + DMSO) ۱۱۸
۳-۱-۴-۳. گروه آزمون سمیت T IV (EG + DMSO + 0.25 mol/lit Sucrose) ۱۲۰
۳-۱-۴-۴. گروه انجمادی V I (EG + DMSO) ۱۲۲
۳-۱-۴-۵. گروه انجمادی V IV (EG + DMSO + 0.25 mol/lit) ۱۲۳
۳-۲. پیوند به خودی تخمدان کامل موش صحرایی پس از انجماد شیشه ای ۱۳۰
۳-۲-۱. درصد موفقیت پیوند ۱۳۰
۳-۲-۲. شمارش فولیکولهای سالم و مرده ۱۳۱
۳-۲-۳. شمارش فولیکولهای آپوپتوتیک ۱۳۷
۳-۲-۴-۱. هورمون تحریک کننده فولیکولی (FSH) ۱۴۰
۳-۲-۴-۲. هورمون لوتئینه کننده (LH) ۱۴۰
۳-۲-۴-۳. هورمون پروژسترون ۱۴۱
۳-۲-۴-۴. هورمون استرادیول ۱۴۱

۳-۲-۴-۵. هورمون تستوسترون ۱۴۱
۳-۲-۵. میزان بیان رونوشت ژنهای بلوغ فولیکولی، رگ زایی و آپوپتوزی ۱۴۴
۳-۲-۵-۱. ژن های بلوغ (TGF-b، BMP-15 و GDF-9) ۱۴۴
۳-۲-۵-۲. ژن های رگ زایی (VEGF، CD34 و CD31) ۱۴۵
۳-۲-۵-۳. ژن های آپوپتوتیک (BAX و BCL-2) ۱۴۶
۳-۲-۶. بررسی بافت شناسی تخمدانهای موش صحرایی منجمد – ذوب شده پس از پیوند به خودی (مقاطع نیمه نازک) ۱۴۸
۳-۲-۶-۱. گروه کنترل ۸ هفته ای ۱۴۸
۳-۲-۶-۲. گروه غیر منجمد پیوندی غیر گنادکتومی (nVTnG) ۱۵۰
۳-۲-۶-۳. گروه منجمد پیوندی غیر گنادکتومی (VTnG) ۱۵۱
۳-۲-۶-۴. گروه غیر منجمد پیوندی گنادکتومی (nVTG) ۱۵۲
۳-۲-۶-۵. گروه منجمد پیوندی گنادکتومی (VTG) ۱۵۳
۳-۲-۷. بررسی فراساختار فولیکول های بدوی تخمدانهای موش صحرایی منجمد – ذوب شده پس از پیوند به خودی ۱۶۰
۳-۲-۷-۱. گروه غیر منجمد پیوندی غیر گنادکتومی (nVTnG) ۱۶۰
۳-۲-۷-۲. گروه منجمد پیوندی غیر گنادکتومی (VTnG) ۱۶۱
۳-۲-۷-۳. گروه منجمد پیوندی گنادکتومی (VTG) ۱۶۲
۳-۲-۷-۴. گروه غیر منجمد پیوندی گنادکتومی (nVTG) ۱۶۳
فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۱۶۹
۴-۱. انجماد شیشه ای و مقایسهٔ اثر ترکیبات مختلف ضد یخ ۱۷۰
۴-۱-۱. تغییرات ساختار و فراساختار تخمدان کامل موش صحرایی پس از انجماد شیشه ای با ترکیبات مختلف ضدیخ ۱۷۰
۴-۱-۲. میزان بروز آپوپتوز در تخمدان کامل موش صحرایی پس از انجماد شیشه ای با ترکیبات مختلف ضدیخ ۱۸۰
۴-۲. پیوند به خودی تخمدان کامل موش صحرایی پس از انجماد شیشه ای ۱۸۲
۴-۲-۱. تغییرات ساختار و فراساختار تخمدان کامل منجمد-ذوب شدهٔ موش صحرایی پس از پیوند به خودی ۱۸۲
۴-۲-۲. مرگ سلولی در تخمدان کامل منجمد-ذوب شدهٔ موش صحرایی پس از پیوند به خودی ۱۸۹
۴-۲-۳. تغییرات گنادوتروپین ها، هورمون های استروئیدی، و عوامل رشد در تخمدان کامل منجمد-ذوب شدهٔ موش صحرایی پس از پیوند به خودی ۱۹۴
۴-۲-۳-۱. گنادوتروپین ها ۱۹۶
۴-۲-۳-۲. هورمون های استروئیدی (استروژن، پروژسترون و تستوسترون) ۱۹۹
۴-۲-۳-۳. عوامل رشد و بلوغ فولیکول (اعضاء خانوادهٔ TGF-b) ۲۰۲
۴-۳. تغییرات رگ زایی در تخمدان کامل منجمد-ذوب شدهٔ موش صحرایی پس از پیوند به خودی ۲۰۵
۴-۴. پیشنهادات ۲۱۰
فهرست منابع ۲۱۳
چکیده انگلیسی ۲۲۹

فهرست جداول

جدول ۱-۱: خلاصه ای از اثرات عوامل رگزا بر رشد فولیکول در بافت تخمدان ۲۶
جدول ۲-۱- ترکیبات ضد یخ در محلول های انجمادی (V) و آزمون سمیت (T) ۵۵
جدول ۲-۲: مراحل رنگ آمیزی H & E برای قطعات بافتی ۵۸
جدول ۲-۳: مراحل ایمونوهیستوشیمی (روش میکروسکوپ نوری) ۶۰
جدول ۲-۴: مراحل آماده سازی بافت و قالب گیری نهایی برای تصویربرداری با EM ۶۳
جدول ۲-۵: مراحل رنگ آمیزی قطعات فوق نازک با لید سیترات و اورانیل استات ۶۴
جدول ۲-۶- گروه های کنترل و پیوندی ۶۶
جدول ۳-۱: درصد فولیکولهای سالم در گروههای کنترل و انجمادی ۹۱
جدول ۳-۲: درصد فولیکولهای سالم در گروههای کنترل و آزمون سمیت ۹۲
جدول ۳-۳: درصد فولیکولهای مرده در گروههای کنترل و انجمادی ۹۳
جدول ۳-۴: درصد فولیکولهای مرده در گروههای کنترل و آزمون سمیت ۹۴
جدول ۳-۵: درصد فولیکولهای آپوپتوتیک در گروههای کنترل و انجمادی ۹۷
جدول ۳-۶: درصد موفقیت پیوند ۱۳۱
جدول ۳-۷: درصد فولیکولهای سالم در گروههای کنترل،
منجمد پیوندی و غیر منجمد پیوندی ۱۳۵
جدول ۳-۸: درصد فولیکولهای مرده در گروههای کنترل،
منجمد پیوندی و غیر منجمد پیوندی ۱۳۶
جدول ۳-۹: فولیکولهای آپوپتوتیک در گروههای کنترل،
منجمد پیوندی و غیر منجمد پیوندی ۱۳۹
جدول ۳-۱۰: سطح گنادوتروپین ها و هورمون های استروئیدی در گروههای کنترل،
منجمد پیوندی و غیر منجمد پیوندی ۱۴۳
جدول ۳-۱۱: بیان رونوشتهای ژن های بلوغ فولیکولی، رگ زایی و آپوپتوزی در تخمدان
گروههای کنترل، منجمد پیوندی و غیر منجمد پیوندی ۱۴۷

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱: رشد فولیکول در گذر از مرحله پرآنترال به آنترال ۴۵
شکل ۲-۱: روش فرو بردن تخمدان به داخل نیتروژن به وسیلهٔ Cryopin ۵۵
شکل ۲-۲: تصویر باندهای اختصاصی به تفکیک هر پرایمر بر روی ژل آگارز ۷۶
شکل ۲-۳: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن TGF-B ۷۹
شکل ۲-۴: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن BMP-15 ..... ۸۰
شکل ۲-۵: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن GDF-9 ..... ۸۱
شکل ۲-۶: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن CD34 ..... ۸۲
شکل ۲-۷: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن CD31 ..... ۸۳
شکل ۲-۸: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن VEGF ۸۴
شکل ۲-۹: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن BCL-2 ..... ۸۵
شکل ۲-۱۰: نمودارهای Amplification و Melt Curve مربوط به ژن BAX ۸۶
شکل ۳-۱: ایمونوهیستوشیمی تخمدان پس از انجماد شیشه ای ۹۷
شکل ۳-۲: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه کنترل ۵ هفته ای ۱۱۱
شکل ۳-۳: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه آزمون سمیت T I ۱۱۲
شکل ۳-۴: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه آزمون سمیت T IV ۱۱۳
شکل ۳-۵: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه انجمادی V I ۱۱۴
شکل ۳-۶: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه انجمادی V IV ۱۱۵
شکل ۳-۷: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه کنترل ۵ هفته ای ۱۲۵
شکل ۳-۸: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه آزمون سمیت T I ۱۲۶
شکل ۳-۹: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه آزمون سمیت T IV ۱۲۷
شکل ۳-۱۰: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه انجمادی V I ۱۲۸
شکل ۳-۱۱: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه انجمادی V IV ۱۲۹
شکل ۳-۱۲: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه کنترل ۸ هفته ای ۱۵۵
شکل ۳-۱۳: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه nVTnG ۱۵۶
شکل ۳-۱۴: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه VTnG ۱۵۷
شکل ۳-۱۵: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه nVTG ۱۵۸
شکل ۳-۱۶: مقاطع نیمه نازک از تخمدان های گروه VTG ۱۵۹
شکل ۳-۱۷: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه nVTnG ۱۶۵
شکل ۳-۱۸: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه VTnG ۱۶۶
شکل ۳-۱۹: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه nVTG ۱۶۷
شکل ۳-۲۰: مقاطع فوق نازک از تخمدان های گروه VTG ۱۶۸

فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. مقدمه

موفقیت در درمان سرطان با به کارگیری روشهایی چون شیمی درمانی، رادیوتراپی و پیوند مغز استخوان به ویژه پس از دهه ۹۰، 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 ۲۰۲۰ تعداد بیماران سرطانی در سرتاسر جهان به ۱۵ میلیون نفر برسد که متأسفانه ۶۰٪ 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 ۱۲٪ 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 ۳۰۰۰۰ نفر جان خود را بر اثر سرطان از دست می دهند. پیش بینی شده است که سالانه ۷۰۰۰۰ 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 ۱۳۸۶ تعداد موارد سرطانی ثبت شده در کشور ۶۲۰۴۰ نفر بوده است که از این میان تعداد قابل توجهی یعنی ۴۴/۱۹٪ آن در جمعیت زنان جامعه بروز یافته است.

در سال ۲۰۰۶ در ایالات متحده آمریکا ۱۳۹۹۷۹۰ مورد سرطانی گزارش شده که از این تعداد، ۶۷۹۵۴۰ نفر مؤنث بوده [۱] و ۸٪ این افراد زیر سن ۴۰ سال بودند. سرطان پستان نیز که در سن بلوغ و دوره باروری بیشتر دیده می شود، شایع ترین نوع سرطان گزارش شده و ۱۵٪ از ۱۸۲۰۰۰

مورد بیماران دچار سرطان سینه (در ایالات متحده) زیر ۴۵ سال قرار داشتند [۲]. همچنین تعداد قابل توجهی از سرطانی های گردن رحم در آمریکا، دختران زیر سن بلوغ می باشند [۳].

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 اندوکرین و چرخه تولید مثل تخمدانها به شدت تهدید می شود [۴]. 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 تخمدان[2] 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 [۱, ۵-۸].

۱-۲. اثرات درمان سرطان با روشهای تهاجمی بر دستگاه تولید مثل

شیمی درمانی، رادیوتراپی تهاجمی و پیوند مغز استخوان در بیشتر از ۹۰٪ دختران و خانمهای جوان مبتلا به سرطان انجام می شود [۲]. از طرفی تخمدانها به خصوص زمانی که با داروهای آلکیلی 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 [۹-۱۱].

[1] Premature Ovarian Failure
[2] Ovarian Cryopreservation and Transplantation

ثابت شده است که داروهای شیمی درمانی، موجب افزایش سمیت در گنادها شده و بنابراین آسیب فولیکولها در نتیجه تخریب سیستم اندوکرین 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 ۲۰۰۳ [۱۲]، احتمال خطر افزایش چهار برابری POF در نوجوانان تحت درمان سرطان را گزارش کرد. سیکلوفوسفامید، از جمله موادی است که به طور متداول در شیمی درمانی استفاده شده و جزء داروهای پر خطر برای گناد ها و القاء کننده POF به شمار می رود [۱۳-۱۵]. در سال ۱۹۹۹، Meirow و همکاران، نقص در فولیکولهای بدوی موشهای تیمار شده با سیکلو فوسفامید را گزارش کرد [۱۵]. همچنین استفاده از دوز ۵ گرمی سیکلوفوسفامید در خانمهای بالای چهل سال، قطع کامل چرخه قاعدگی را به دنبال داشته و همین وضعیت بعد از استفاده از داروی فوق به میزان ۹ و ۲۰ گرم در خانمهای به ترتیب بین ۳۰ تا ۴۰ سال و ۲۰ تا ۳۰ سال دیده شده است [۱۶]. Perez و همکاران [۱۷] نیز با استفاده از داروی شیمی درمانی دوکسوروبیسین، آپوپتوز را در سلول های گرانولوزا القاء نمودند. همچنین Takai و همکاران [۱۸]، طی مطالعه ای نشان دادند که ژنهای Bax و Caspase 2 و3 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 ۱۰۰٪ بیماران می شود [۱۹]. ثابت شده که تابش دوز ۵ تا۲۰ گری به تخمدانها در هر سنی تخریب کامل عملکرد گناد را موجب می گردد [۲۰] و ۲ گری تابش نیز می تواند ۵۰٪ تخمکها را نابود کند [۲۱]. تشعشعات یونیزان علاوه بر تخمدان، بر رحم نیز اثر تخریبی شدید می گذارد. به طوریکه Larsen و همکارانش در سال ۲۰۰۴ طی مطالعه ای نشان دادند که پرتودرمانی رحم، موجب کاهش حجم آن شده [۲۲] و Critchley و همکاران نیز گزارش کردند که تابش ۴ تا۳۰ گری تشعشع، موجب نقص عملکرد رحم می شود [۲۳].

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 [۱۳, ۲۴]. با این وجود توصیه می شود که حداقل ۳ تا ۶ 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.

۱-۳. حفظ قدرت باروری[1] 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 [۲۵, ۲۶]. 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.

۱-۳-۱. انجماد جنین

تنها روش مطمئن و گسترش یافته برای این منظور، انجماد جنین است. مؤسسه "پزشکی تولید مثل آمریکا[2]" انجماد جنین را به عنوان تنها روشی معرفی می کند که اثر بخشی آن به اثبات رسیده است [۲۷]. 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 مدت[3] برای این منظور استفاده شده است، اما نتوانسته اطمینان

[1] Fertility Preservation
[2] American Society of Reproductive Medicine
[3] Short Protocol

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 (۱ تا ۵٪ حاملگی و زایمان پس از انجماد) [۲۸, ۲۹].

۱-۳-۲. 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، IVF[1] 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 [۳۰].

۱-۳-۳. 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 [۳۱]. حدود ۲۱ مطالعه بر روی انجماد تخمک توسط Sonmezer، Oktay و همکارانشان انجام شده است. طی این مطالعات و به طور متوسط میزان زنده ماندن تخمک پس از انجماد ۴۷٪، میزان لقاح ۵۲/۵٪ و میانگین حاملگی ۱/۵۲٪ گزارش شده است. بسیاری از مطالعات اخیر نیز نشان می دهند که با

[1] In Vitro Fertilization

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 [۲۸].

در مطالعات Borini و همکارانش [۲۸] نیز ۱۸ بارداری بالینی از ۹۲۷ تخمک منجمد شده گزارش شده است. همچنین در مطالعه دیگری میزان متوسط بارداری از ۱/۸٪ فراتر نرفت [۲۹]. تخمک مرحله متافاز II، یک سلول بزرگ، ویژه و حساس است. به همین دلیل انجماد تخمک با آسیبهای بسیاری همراه است که موجب پایین آمدن میزان زنده ماندن پس از ذوب می شود [۳۲]. در این جا دو دلیل مهم وجود دارد: اول، لایه شفاف (ZP[۱]) در محلول انجماد سخت شده و احتمالاً موجب ناقص ماندن عمل گرانولهای قشری[۲] می شود. بنابراین موجب عدم نفوذ اسپرم شده و لقاح طبیعی را دچار اشکال می کند. البته روش تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI[۳]) تا حدودی می تواند گزینه خوبی برای جبران این حالت باشد. دومین دلیل حضور دوک تقسیم در سیتوپلاسم تخمک است که به راحتی توسط کرستالهای یخ داخل سلولی آسیب می بیند [۳۳]. این دلایل باعث می شود که ایجاد بانک تخمک با چالشهای بزرگی همراه باشد.

۱-۳-۴. انجماد تخمک نابالغ

انجماد تخمک در مرحله پروفاز I (GV[۴]) نسبت به تخمک مرحله متافاز II با درصد موفقیت بیشتری همراه است [۳۴]. 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

[1] Zona Pellucida
[2] Cortical Granules
[3] Intracytoplasmic Sperm Injection
[4] Germinal Vesicle

سلولی جلوگیری کند [۳۵]. بالغ شدن تخمک با آزاد شدن اولین جسم قطبی[1] در نتیجه کامل شدن تقسیم اول میوز ارزیابی می شود، اما بلوغ سیتوپلاسم آن نیز برای انجام لقاح ضروری است [۳۶].

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 [۳۷]. همچنین Wu و همکارانش در سال ۲۰۰۱ [۳۸] بارداری بیوشیمایی در نتیجه انتقال تخمک GV منجمد-ذوب شده را گزارش دادند و Kan و همکاران نیز در سال ۲۰۰۴ [۳۹]، به دنبال روش فوق یک بارداری ناموفق را که حدود ۱۲ هفته به طول انجامید گزارش نمودند.

۱-۳-۵. انجماد بافت تخمدان

برای بیمارانی که به شیمی درمانی سریع نیازمندند، انجماد تخمدان تنها راه ممکن و میسر است [۴۰]. 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 [۳۵]. 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 [۴۱]. 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

[1] Polar Body

بدون توجه به چرخه قاعدگی حتی از طریق یک لاپاراسکوپی 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 ۹۰٪ فولیکولهای قشر تخمدان را شامل می شوند. تعداد انواع دیگر فولیکولها حالت نوسانی دارد [۴۲].

در حال حاضر انجماد تخمدان به سه طریق انجام می شود: انجماد کل تخمدان به همراه پایک عروقی[۱]، انجماد قطعات قشر تخمدان[۲] و انجماد فولیکولهای جدا سازی شده[۳].

۱-۳-۵-۱. انجماد کل بافت تخمدان

بافت تخمدان انسانی حاوی فولیکولهای زنده، طی مدت ۳ ساعت با موفقیت از یک شهر به شهر دیگر در کشور دانمارک منتقل شد [۴۳]. همچنین در سال ۲۰۱۲ 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 ۱۲ ساعت بود [۴۴]. 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

[1] Vascular Pedicle
[2] Ovarian Cortex
[3] Isolated Follicle