نگاهی به روش‌های کمک باروری با استفاده از انجماد

شکوه چگینی[1]، مینا رمضانی[2]*

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد سلولی تکوینی، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. دانشیار سلولی تکوینی، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۹/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۰۱)

چکیده

مسئله ناباروری از دیرباز یکی از مسائل مهم پزشکی محسوب می‌شده که با گذشت زمان و پیشرفت دانش و تکنولوژی راهکارهای درمانی بسیاری بدست آمده است. در مواردی که باروری به روش‌های طبیعی صورت نمی‌گیرد از روش‌های کمک باروری استفاده می‌شود. محققان معتقداند که انتخاب روش‌های رایج حفظ باروری مانند: انجماد کورتکس تخمدان، تخمک و جنین به پارامتر های متعددی از جمله نوع بیماری و زمان شروع درمان و یا علت‌های ناباروری و همچنین سن بیمار و وضعیت تاهل فرد دارد. امروزه با پیشرفت علم پزشکی، زنان نابارور و یا در معرض بیماریهای پر خطر نظیر سرطان و یا زنانی که به دلایل مختلف، سن باروری آنها به تعویق افتاده است، می‌توانند قدرت باروری خود را با استفاده از روشهای انجماد، شامل انجماد تخمک، انجماد کورتکس تخمدان و انجماد جنین حفظ نمایند. استفاده از این روشها بر اساس علت ناباروری، شرایط زنان نابارور، ابتلا به بیماری های خاص و یا سرطان متفاوت خواهد بود. در طول سال‌های گذشته تکنیک انجماد شیشه‌ای به عنوان یک عملکرد بالینی معرفی شده است که همواره در حال بررسی، مقایسه و تغییرات است.

کلیدواژگان

انجماد، تخمک، جنین، ناباروری.

* نویسنده مسئول، رایانامه: m.ramezani@iauctb.ac.ir

مقدمه

اولین انجماد موفقیت آمیز جنین موش از دو گروه تحقیقاتی مستقل از هم در سال ۱۹۷۲ گزارش شد (۳-۱) و در سال ۱۹۷۳ تولد اولین گوساله از جنین منجمد شده گزارش شد (۴). اولین تولد از حاملگی با تخمک منجمد انسانی در سال ۱۹۸۶ به دست آمد (۵). به طور کلی روش‌های انجماد شامل: انجماد آهسته (Slow frezzing)، انجماد شیشه‌ای (Vitrification) و انجماد فوق سریع (Ultra- rapid freezing) می‌باشد (۳۲). در این بررسی روش‌های حفظ باروری از طریق انجماد و اصول اساسی و روش‌های انجماد به طور خلاصه بیان شده است.

انجماد جنین

در درمان ناباروری، گامتهای زیادی از زوجین گرفته خواهد شد که جنینهای متعددی تولید می شود. جهت جلوگیری از چند قلوزایی، نباید همه آنها را به رحم منتقل نمود. بلکه بهتر است از نیتروژن مایع برای ذخیره سازی جنین های اضافی استفاده کرد. انجماد جنین، مزایای متعددی در برنامه‌های IVF انسان و انتقال جنین دارد که درافزایش نرخ باروری مؤثر است. انجماد جنین های اضافی به دست آمده از یک سیکل IVF اجازه انتقال یک، دو و یا چندین جنین را می دهد. بنابراین از حاملگی‌های چند قلویی جلوگیری می‌کند و در نتیجه نرخ باروری افزایش می‌یابد (۷،۶). همچنین انجماد رویان می‌تواند برای به تعویق انداختن انتقال جنین در بیماران مبتلا به سرطان که برای شیمی درمانی و یا رادیو تراپی آماده شده اند، مناسب باشد. همچنین در مواردی که انتقال جنین به رحم مادر به تعویق می‌افتد، به عنوان مثال در صورت ایجاد سندرم تحریک بیش از حد تخمدان که عمل لانه گزینی را به خطر می‌اندازد، خونریزی آندومتر، افزایش میزان پروژسترون سرم و دیگر رویدادهای ناخواسته، ذخیره جنین‌ها بصورت منجمد مناسب است. از طرفی، انجماد جنین تعداد انتقال جنین تازه را به رحم کاهش داده و موفقیت سیکل IVF را به حداکثر می‌رساند (۹-۷).

انجماد تخمک

بهترین گزینه، برای حفظ باروری در زنان و دختران مبتلا به سرطان که در معرض خطر از دست دادن باروری به دلایل شیمی درمانی و اشعه درمانی‌اند و یا دچار مشکلات ارگانهای تولید مثلی‌اند و یا تخمدان‌های نارس دارند و همچنین زنانی که مبتلا به بیماریهای مزمن هستند و یا به دلایل شخصی بارداری را به تعویق انداخته‌اند، انجماد تخمک است. این روش نگرانی‌های مذهبی، اخلاقی و حقوقی ذخیره سازی جنین را به همراه نخواهد داشت(۱۳-۱۰). ذخیره سازی انجمادی تخمک، می‌تواند در اهدای تخمک و تأسیس بانک تخمک مؤثر باشد (۱۴). البته انجماد تخمک بالغ، مشکلاتی به همراه دارد: اول اینکه تشکیل دوکها را برای رویدادهای لقاح در تکمیل میوز به خطر می‌اندازد و در نتیجه تخریب و یا فقدان دوک ها، توانایی تخمک را برای لقاح وتکوین نرمال جنین به خطر می‌اندازد. تخمک‌های بالغ که در متافاز میوز دو قرار دارند، اندازه‌شان بزرگ است، حساس به دما بوده و حاوی مقادیر زیادی آب می‌باشند. همچنین نسبت سطح به حجم آنها کم است که باعث می‌شود در حین فرآیند انجماد دوکها آسیب دیده و یخ درون سلولی تشکیل گردد. دوم اینکه سخت شدن زونا پلوسیدا که به علت اگزوسیتوز گرانول‌های کورتیکال در روند انجماد رخ می‌دهد نیز اثرات مضری بر لقاح طبیعی خواهد داشت (۱۰،۱۱،۱۵).

انجماد تخمک‌ها در مرحله ژرمینال (دیپلوتن پروفاز یک) بهتر از مرحله متافاز دو است (۱۶).

تخمک‌های نابالغ، به علت فقدان دوک متافازی و اندازه کوچک، به آسیب های ناشی از فرآیند انجماد، مقاومتر می باشند. اما پس از انجماد و بالغ سازی آنها در محیط کشت، ناهنجاری در تشکیل دوک مشاهده می شود(۱۷). در مطالعات نشان داده شده که بارداری‌هایی که با کمک انجماد تخم صورت گرفته، افزایش خطر زایمان و یا ناهنجاری‌های مادرزادی را نشان نداده است (۱۸). همچنین هیچگونه افزایشی در تعداد غیر طبیعی کروموزوم ها و یا از دست رفتن کروموزوم ها مشاهده نشده است (۱۹،۲۰). از طرفی، اختلال در کاریوتایپ و شکل‌گیری اندام‌ها، اختلال فکری و یا کمبود رشد در بچه‌های متولد شده از تخمک‌های منجمد نیز گزارش نشده است(۲۱،۲۲).

انجماد بافت تخمدان

از این تکنولوژی برای بیماران مبتلا به کیست‌های تخمدانی برگشت‌پذیر و اندومتریوز که ممکن است در معرض خطر یائسگی بسیار زودرس باشند، بدون درمان هورمونی و هر گونه تحریک تخمدانی و یا در زنان و دختران جوان که نیازمند رادیوتراپی و شیمی درمانی فوری برای درمان سرطان هستند و یا در زنانی با نارسایی تخمدان به علت سرطان و اختلالات ژنتیکی و بیماریهای خاص استفاده می‌شود (۲۴،۲۳).

اولین انجماد موفق بافت تخمدان در سال ۱۹۵۰ به وسیله Deansely و همکاران انجام شد. انجماد بافت تخمدان انسان در سال ۱۹۵۵ توسط Zhang پیشنهاد گردید (۲۶،۲۵).

انجماد بافت تخمدان در هر مرحله از سیکل زندگی و همچنین در اشکال مختلف مثل قطعات، برشها، نیمه و یا کل تخمدان می‌تواند صورت پذیرد. برای انجماد کورتکس تخمدان دو روش وجود دارد: اولین روش، پیوند بافت تخمدانی منجمد شده است که در این روش قطعاتی از کورتکس تخمدان جدا و منجمد می‌شود تا پس از شیمی درمانی و یا رادیوتراپی و آمادگی بیمار برای بارداری در حفره لگنی و یا یک جایگاه هتروتوپیک پیوند زده شود. از آنجائیکه کورتکس تخمدان حاوی فولیکول‌های اولیه یا تخمک‌های مهارشده در پروفاز دیپلوتن اولین تقسیم میتوزی هستند که نسبت به آسیب‌های ناشی از انجماد مقاوم‌تراند، دومین روش با بلوغ آزمایشگاهی این فولیکول‌ها و بدست‌آوردن تخمک بالغ از تخمدان منجمد انجام می‌شود (۲۹-۲۷،۲۳). از معایب روش پیوند بافت تخمدان، امکان انتقال سلول‌های توموری در صورت درگیرشدن بافت تخمدان به تومور می‌باشد (۳۰).

ذخیره سازی طولانی مدت جنین‌ها و تخمک‌ها به دماهای زیر ۱۳۰°C- نیاز دارد و در عمل آسان‌ترین و مطمئن‌ترین راه ذخیره سازی آنها انجماد در نیتروژن مایع و در دمای ۱۹۶°C- می باشد آزمایشات تجربی نشان داده که انجماد طولانی مدت، اثرات مضری روی نتایج سیکل انجماد- ذوب نخواهد داشت (۳۱).

به‌طور کلی روش‌های انجماد شامل: انجماد آهسته، انجماد شیشه‌ای و انجماد فوق سریع می‌باشد. در هر سه روش برای افزایش قدرت بقای تخمکها در جریان فرآیند انجماد باید از تشکیل کریستال یخ در داخل و خارج سلول‌ها جلوگیری کرد (۳۲،۳۳). در جریان مطالعات اخیر، انجماد جنین به وسیله این روش‌ها مقایسه شده است. نتایج متاآنالیز نشان می‌دهد که جنین‌های منجمد شده به روش انجماد شیشه‌ای برتری بیشتری از نظر بقای جنین‌ها، نرخ حاملگی کلینیکال و نرخ لانه گزینی نسبت به جنین‌های منجمد شده با دو روش دیگر دارند (۳۳).

انجماد شیشه‌ای

انجماد شیشه‌ای اولین بار توسط Fahy وRall در سال ۱۹۸۵ معرفی شد، که امروزه بطور گسترده‌ای

برای انجماد جنین‌های پستانداران استفاده می‌شود (۳۴).

در انجماد شیشه‌ای، یک محلول از حالت مایع به حالت شیشه‌ای درمی‌آید در حالیکه دما کاهش یافته و ویسکوزیته افزایش می‌یابد، کریستال یخ تشکیل نمی‌شود و سلولها در معرض غلظت زیاد ضدیخ (نفوذپذیر و نفوذناپذیر) قرار می‌گیرند (۳۶،۳۵). محلول‌هایی که برای انجماد شیشه‌ای استفاده می‌شود شامل مخلوطی از مواد نفوذپذیر شامل (اتیلن‌گلایکول، گلیسرول، پروپیلن گلایکول، استامید و دی‌متیل سولفوکسید) و مواد نفوذناپذیر (ساکارز،تره‌هالوز) می‌باشد (۳۹،۳۸،۳۷). در انجماد شیشه‌ای، جنین‌ها پس از قرار گرفتن در معرض ضدیخ‌ها با قرار گرفتن در معرض سرعت بالای خنک کنندگی به سرعت وارد یک مرحله شیشه‌ای مانند می‌شوند (۴۰).

انجماد آهسته

در انجماد آهسته هم، از ضد یخ‌ها برای روند انجماد استفاده می‌شود، جنین‌ها به دنبال قرار گیری در محلول انجمادی روی نی‌هایی قرار می‌گیرند و سپس در۳ مرحله سرد می‌شوند. ابتدا با سرعت ۰/۳- درجه سانتیگراد در دقیقه در دمای $-۳۰^{\circ C}$ و سپس با سرعت ۱۰- درجه سانتیگراد در دقیقه در دمای $-۱۵۰^{\circ C}$ سردتر شده و در آخر در نیتروژن مایع $-۱۹۶^{\circ C}$ ذخیره می‌شوند (۴۰). البته پروتکلهای متفاوتی وجود دارد.

انجماد آهسته، یک روش زمانبر است و نیازمند تجهیزات گران‌قیمت می‌باشد در حالیکه انجماد شیشه‌ای، یک تکنیک سریع و مقرون به‌صرفه است که در مقایسه با انجماد آهسته، نیاز به وسایل گران قیمت ندارد، اما هنوز مشکلاتی مثل سمیت ضدیخ‌ها و خطر آلودگی‌ها باقی است (۴۲،۴۱).

بحث

محققین بسیاری تفاوت‌های انجماد آهسته و انجماد شیشه‌ای را بررسی کرده‌اند. بر طبق تحقیقات انجام شده، انجماد جنین‌های انسان با روش انجماد شیشه‌ای، منجر به بقای بیشتر جنین‌ها و میزان رشد و نمو بالاتر بلاستوسیست‌ها و همچنین افزایش نرخ لانه‌گزینی و بارداری می‌شود (۴۵-۴۳).

Ciotti و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش کردند که ترمیم دوک‌ها در تخمک‌های منجمد شده به روش انجماد شیشه‌ای نسبت به روش انجماد آهسته سریعتر صورت می‌پذیرد (۴۶).

Cobo و همکاران در تحقیقاتی بر روی بیش از ۳۰۰۰ تخمک منجمد شده با روش انجماد شیشه‌ای و ۳۰۰۰ تخمک تازه در یک برنامه اهدای تخمک تأیید کردند که تکنیک انجماد شیشه‌ای هیچ اثر مضری روی نتایج متعاقب لقاح، تکوین و یا لانه گزینی جنین‌ها ندارد (۴۷).

خطر بالقوه وبزرگترین چالش در ارتباط با روش انجماد شیشه‌ای، غلظت بالای ضدیخ است که می‌تواند سلول‌ها را سمی کند و با کاهش غلظت و زمان در معرض قرارگیری جنین‌ها در مقابل ضدیخ‌ها، این سمیت محدود می‌شود و همچنین با مخلوط کردن ضدیخ‌های مختلف می‌توان میزان سمیت را کاهش داد (۳۸). انجماد شیشه‌ای بطور وسیعی در عملکردهای بالینی برای سلول‌های تولیدمثلی انسان استفاده می‌شود. در طول روند انجماد شیشه‌ای سلولها و بافت نیاز دارند که به مقدار زیادی و با سرعت سردکنندگی بالا سرد شوند، به منظور افزایش بیشتر میزان برودت لازم برای انجماد شیشه‌ای موفقیت‌آمیز، از سیستم‌های حامل خاصی استفاده می‌شود که شامل سیستمهای باز و بسته می‌باشد. سیستم‌های حامل باز مثل، Open Pulled Straw، Cryotop، Cryoleaf، Cryoloop، Cryolock، Vitriinga، Hemi-Straw و غیره استفاده می‌شود تا

حجم محلول انجمادی کاهش یافته و تشکیل کریستال یخ بطور چشمگیری کاهش یابد. با این‌حال اگر نیتروژن مایع بطور تصادفی آلوده شود این سیستمها نمی‌توانند خطر آلودگی با میکروارگانیسم‌ها را کاهش دهند. در مقابل سیستم‌های حامل بسته وجود دارد (Straw-in-Straw) که طوری طراحی شده‌اند که از تماس مستقیم سلول و بافت با نیتروژن مایع جلوگیری می‌کند اما سبب کاهش سرعت سردشدن می‌شود و بطور معمول در انجماد بالینی تخمک استفاده نمی‌شود. در انواع سیستم‌های بسته مانند Cryotip، Cryopette سرعت سرد کنندگی بالاتر است. برای جلوگیری از خطر بالقوه آلودگی با میکروارگانیسم‌ها استریلیزاسیون نیتروژن مایع و ظروف ذخیره سازی قبل از روند انجماد شیشه‌ای توصیه می‌گردد (۴۸،۳۸).

رمضانی و همکاران در تحقیقاتی تکنیک انجماد شیشه‌ای را در جنین‌های دو سلولی موش با روش نی معمولی (conventiona straw)، نی کشیده باز (open pulled straw) ونی کشیده بسته (closed pulled straw) مقایسه نمودند و گزارش کردند که میزان بقای جنین‌ها در انجماد شیشه‌ای با سیستم نی کشیده بسته نسبت به دو روش دیگر بیشتر است و روش مؤثرتر، آسان‌تر و سریعتری نسبت به دو روش دیگر می‌باشد (۴۹).

همچنین گزارش شده که انجماد جنین‌ها در مراحل آخر جنینی، مثل ۸ سلولی و ۱۶ سلولی (مورولا)، تکوین بهتر بلاستوسیست‌ها را پس از ذوب آنها، نسبت به انجماد جنین‌های مراحل اولیه تکوین نشان داده است (۵۰). علت این است که در این مراحل تعداد سلول‌ها بیشتر شده اما هنوز تخصصی نشده‌اند و اگر سلولی از بین برود، سلول‌های دیگر جایگزین آنها شده و همچنین امکان بررسی ژنتیکی جنین‌ها از جهت وجود ناهنجاری‌های ژنتیکی وجود دارد.

نتیجه‌گیری

در تحقیقات نشان داده شده که هر چه سن مادر افزایش یابد شانس لقاح، سرعت تسهیم و کیفیت جنین‌ها، لانه‌گزینی و باروری کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد که با شناسایی و کنترل عوامل مؤثر بر درمان ناباروری به کمک انجماد جنین و تخمک در زنان و بالغین وهمچنین با انجماد بافت تخمدان در کودکان مبتلا به سرطان و بیماری‌هایی که باروری را تحت تأثیر قرار می‌دهند، می‌توان شانس باروری را در این افراد افزایش داد. انجماد موفقیت آمیز جنین، نیازمند استفاده مناسب از ضدیخ‌ها، قندها و ماکرومولکول‌ها است که سبب بالاترین نرخ بقا، باروری و تولد زنده به دنبال انتقال جنین خواهد شد.گرچه این تکنولوژی بیش از سه دهه قدمت دارد اما هنوز در تحقیقات مختلف نتایج متغیری نشان داده می‌شود که به عوامل متعددی از جمله مرحله جنینی و کیفیت جنین‌ها و شرایط کشت آنها بستگی دارد. تلاش برای بهینه سازی شرایط کشت جنین‌ها و تکوین آنها، افزایش بقا و نرخ تولد زنده را افزایش خواهد داد. بنابر این، هنوز تحقیقات بیشتری در مورد انتخاب بهترین روش کمک باروری در بیماران سرطانی و افراد نابارور، انتخاب بهترین راه انجمادی مورد استفاده در روش های کمک باروری، انتخاب بهترین مرحله تکوینی برای انجماد جنین و همچنین اصلاح روش های انجمادی موجود، مورد نیاز است. اگرچه گزارشی از ایجاد ناهنجاری در فرزندان حاصل از روش‌های انجمادی کمک باروری گزارش نشده با وجود نتایج امیدوار کننده، هنوز نگرانی‌هایی در مورد امکان آنوپلوئیدی و یا اختلالات کاریوتیپیک، ناهنجاری‌های اندامی و دیگر مسائل تکوینی وجود دارد.

منابع و مآخذ

1. Whittingham D. G, Leibo P S, Mazur P. “Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science*. 1972; 178(4059):411–414.
2. Wilmut I, “The low temperature preservation of mammalian embryos,” *Journal of Reproduction and Fertility*. 1972; 31(3):513–514.
3. Wilmut I. “The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development of survival of mouse embryos during freezing and thawing,” *Life Sciences 2: Biochemistry, General and Molecular Biology*. 1972; 11(22):1071–1079.
4. Wilmut I, Rowson L. E. A. “Experiments on the low temperature preservation of cow embryos,” *Veterinary Record*. 1973; 92(26):686–690.
5. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. Lancet. 1986;1(8486): 884-6.
6. Elder K, Dale B. In vitro fertilization. Second edition. United Kingdom: Cambridge university press; 2003; 45.
7. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight cell embryo. Nature. 1983;305: 707–709.
8. De Jong D, Eijkemans M.J, Beckers N.G, Pruijsten R.V, Fauser B.C , and Macklon N.S, “The added value of embryo cryopreservation to cumulative ongoing pregnancy rates per IVF treatment: is cryopreservation worth the effort?” Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2002; 19(12):561–568.
9. Ozmen B, Schultze-Mosgau A, Schopper B, Griesinger G, Diedrich K, Al-Hasani S. Ongoingpregnancy after revitrification of cleavage stage embryo. MEFSJ. 2006;11: 222-6.
10. Wunder D, “Social freezing in Switzerland and worldwide—a blessing for women today?” *Swiss Medical Weekly*. 2013; 143, Article ID w13746.
11. Borini A, Levi Setti P. E, Anserini P, et al., “Multicenter observational study on slow-cooling oocyte cryopreservation: clinical outcome,” *Fertility and Sterility*. 2010; 94(5):1662–1668.
12. American Cancer Society, “Cancer facts and figures-2001,” Atlanta, Ga, USA, American Cancer Society, 2001, National Cancer Institute, Cancer Incidence Public-Use Database, 1973–1996, August 1998.
13. Lore A.W , Mangu P. B, Beck L. N , Magdalinski A. J , Partridge A. H, and Oktay K , “Fertility preservation for patients with cancer:American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update” *Journal of Clinical Oncology*. 2013; 31(19):2500–2510.
14. Mandelbaum J, Anastasiou O, Levy R, Guerin JF, Larouziere V, Antoine JM. Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes. Obstet Gynecol 2004; 113S:S17-S23.
15. 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. Fertil Steril. 1990; 54(1):102-8.
16. Boiso I, Martí M, Santaló J, Ponsá 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. Hum Reprod. 2002;17(7):1885-91.
17. Park SE, Son WY, Lee SH, Lee KA, Ko JJ, Cha KY. Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured in vitro after cryopreservation at the germinal vesicle stage. Fertil Steril. 1997;68(5):920-6.

18. Noyes N, Porcu E and Borini A, “Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies,” *Reproductive BioMedicine Online*. 2009; 18(6):769–776.

19. Gook D.A, Osborn S.M, Bourne H and Johnston W.I, “Fertilization of human oocytes following cryopreservation: normal karyotypes and absence of stray chromosomes,” *HumanReproduction*. 1994; 9(4):684–691.

20. Cobo A, Rubio C, Gerli S, Ruiz A, Pellicer A, and Remohi J, “Use of fluorescence in situ hybridization to assess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes,” *Fertility and Sterility*. 2001; 75(2):354–360.

21. Porcu E , Fabbri R , Seracchioli R , de Cesare R , Giunchi S , and Caracciolo D , “Obstetric, perinatal outcome and follow up of children conceived from cryopreserved oocytes,” *Fertility and Sterility*. 2000; 74(3), supplement 1, p. S48.

22. Chian R.C, Huang J.Y.J, Tan S.L, et al., “Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes,” *Reproductive BioMedicine Online* 2008; 16(5):608–611.

23. Abedelahi A, Rezaei-Tavirani M, Mohammadnejad D,Fertility Preservation Among the Cancer Patients by Ovarian Tissue Cryopreservation, Transplantation, and Follicular Development. Iran J Cancer Prev. 2013;3:123-32

24. Herraiz S, NovellaMaestre E, Rodriguez B, Diaz C, SanchezSerrano M, Mirabet V, et al. Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices. Fertil Steril. 2014; 101(3):775–84.

25. Deanesly R. Immature rat ovaries grafed after freezing and thawing. J Endocrinol. 1954; 11: 197-200.

26. Zhang J, Dimattina M. Extracorporeal development and ultrarapid freezing of human fetal ovary. J Assist Reprod Genet. 1995; 912:361-8.

27. Demeestere I, Simon P, Buxant F, Robin V, Fernandez SA, Centner J, et al. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report. Hum Reprod.2006;21(8):2010-4.

28. Deng X, Zheng H, Yu X, Yu H, Zhang C, Chao L, et al. cryopreserved ovarian tissue can maintain a long term function after heterotopic autotransplantation in rat. Reproduction. 2009; 138:519-23.

29. 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? Fertil Steril. 2008;90(4):1550-8.

30. Fain-Kahn V, Poirot C, Uzan C, Prades M, Gouy S, Genestie C, et al. Feasibility of ovarian cryopreservationin borderline ovarian tumours. Hum Reprod. 2009;24(4):850-5.

31. Leibo S , “The early history of gamete cryobiology,” in Life in Frozen State, Fuller B, Lane N and Benson E, Eds., pp. 347–370, CRC Press, New York, NY, USA, 2004.

32. Mazur,P.,the role of intra cellular freezing in the death of cooled to supra optional rates, Cryobiology. 1977;14(3):251-272.

33. Faten F, AbdelHafez a, Nina Desai a, Ahmed M Abou-Setta b, Tommaso Falcone a, James Goldfarb a. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. Reproductive BioMedicine Online. 2010; 20:209–222.

34. Rajabpour-Niknam M, Totonchi M, Shahhosseini M, Farrokhi A, Alipour H, Eftekhari-Yazdi P.Quantitative expression of developmental genes, Pou5f1 (Oct4) and Mest (Peg1), in vitrified mouse embryos. Iran J Reprod Med. 2013; 11(9):733–740.

35. Tucker M, Morton P, Liebermann J. Human oocyte cryopreservation: a valid alternative to embryo cryopreservation?. Obstet Gynecol 2004; 113S:S24-S27.

36. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. Theriogenology 2007; 67:73-80.

37. Rall W.F and Fahy G.M. "Ice-free cryopreservation of mouse embryos at −196°C by vitrification," Nature.1985; 313(6003):573–575.

38. Fahy G. M and Rall W.F , "Vitrification: an overview," in Vitrification in Assisted Reproduction, Tucker M. J and Liebermann J, Eds.,Informa Healthcare, London UK. 2007.

39. Liebermann J, Nawroth F, Isachenko v, Isachenko E, Rahimi G, and Tucker M.J, "Potential importance of vitrifi cation in reproductive medicine," Biology of Reproduction, 2002; 67(6): 1671–1680.

40. Shin M.R, Choi H.W, Kim M.K, Lee S H, Lee H.S, and Lim C.K, *In vitro* development and gene expression of frozen thawed 8cell stage mouse embryos following slow freezing or vitrification Clin Exp Reprod Med. 2011; 38(4):203-209.

41. Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker MJ. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? Reprod Biomed Online. 2003;7:623–633.

42. Bielanski A, NadinDavisS, Sapp T, LutzeWallace C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. Cryobiology. 2000;40:110–116.

43. Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A, Larman MG, Hamilton R, et al. A randomized controlled study of human Day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. Hum Reprod. 2008;23:1976–1982.

44. Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and metaanalysis. Fertil Steril. 2008;90:186–193.

45. Kolibianakis EM, Venetis CA, Tarlatzis BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: which one is better? Curr Opin Obstet Gynecol. 2009;21:270–274.

46. Ciotti P. M , Porcu E , Notarangelo L , Magrini O , Bazzocchi A, and Venturoli S , "Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing," Fertility and Sterility.2009;91(6):2399-407.

47. A. Cobo, M. Meseguer, J. Remohi, and A. Pellicer, "Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial," Human Reproduction. 2010; 25(9):2239–2246.

48. Parmegiani L, Troilo E, Arnone A, Manuel Maccarini A, Rastellini A, Lanzilotti S, Bernardi S. Aseptic procedures for vitrification, warming and cryostorage. 2014; 1(1):17–22.

49. Ramezani M , Rezazadeh Valojerdi M, Parivar K. Effect of three vitrification methods on development of two-cell mouse embryos. 2005; CryoLetters 26 (2):85-92.

50. Miyake T, Kasai M, Zhu SE, Sakurai T, Machida T. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycolbased solution by a simple method. Theriogenology. 1993;40:121–134.