

**ผลของความเข้มข้นของสารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในน้ำยาวิตรีฟิเคชัน
และระยะเวลาที่อยู่ในน้ำยาวิตรีฟิเคชันต่อการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อรังไข่โค****Effects of Concentration of Cryoprotective Agents in Vitrification Medium
and Time Expose to Vitrification Medium on Survival of Bovine Ovarian Tissue**

ศิริลักษณ์ สำเร็จงาน¹ จิตตนันท์ ศรีสุทัศน์¹ วรวัลย์ สำนวณ¹ อภิชาติ เงินสูงเนิน² ปิยดา เงินสูงเนิน² และ รังสรรค์ พาลพ่าย^{1*}
Sirilak Somredngan¹, Jittanun Srisutush¹, Worawalan Samruan¹, Apichart Ngernsoungnern²,
Piyada Ngernsoungnern² and Rangsun Pampai^{1*}

¹ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

²สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

¹Embryo Technology and Stem Cell Research Center, Institute of Agricultural Technology,
Suranaree University of Technology

²Institute of Science, Suranaree University of Technology

*E-mail: rangsun@g.sut.ac.th

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็ง เช่น เคมีบำบัดหรือรังสีรักษา สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งได้จำนวนมาก ในขณะที่เดียวกันก็สามารถทำลายเซลล์ไข่ภายในรังไข่และเสี่ยงต่อภาวะมีบุตรยากได้เช่นกัน การแช่แข็งรังไข่แบบ vitrification เซลล์จะถูกแช่แข็งด้วยอัตราความเร็วสูงร่วมกับการใช้สารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง (Cryoprotective agents; CPA) ที่ซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยใช้โคเป็นโมเดลในการศึกษาความเข้มข้นของ dimethyl sulfoxide (DMSO) และ ethylene glycol (EG) และระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่แข็งเนื้อเยื่อรังไข่ ผลการย้อมสีเนื้อเยื่อรังไข่ พบว่าเปอร์เซ็นต์จำนวนฟอลลิเคิลในระยะต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันในทุกกลุ่มการทดลอง โดยเมื่อมีการเพิ่มเวลาในการแช่ในน้ำยาพบว่ามีส่วนช่วยให้สาร CPA ซึมเข้าเนื้อเยื่อรังไข่ได้ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับผลการเปรียบเทียบคุณภาพฟอลลิเคิลพบว่ากลุ่ม Solution control 1-2 (S1-2) แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ของจำนวนฟอลลิเคิลที่มีคุณภาพดีมากกว่าฟอลลิเคิลคุณภาพไม่ดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งคล้ายกับที่พบในกลุ่มควบคุม การตรวจสอบการเกิด apoptosis ของชิ้นเนื้อเยื่อรังไข่ที่ผ่านการแช่แข็งและทำลาย ผลพบว่าทุกกลุ่มการทดลองมีการเกิด apoptosis จำนวนเล็กน้อยเท่านั้น โดยสรุปแล้วเนื้อเยื่อรังไข่กลุ่ม Vitrification 1-2 (V1-2) เป็นกลุ่มที่มีแนวโน้มที่ดีในการช่วยให้ผลจำนวนฟอลลิเคิลระยะ primordial มีอัตราการรอดสูงกว่ากลุ่มอื่นหลังการแช่แข็งและทำลาย แม้จะพบการเกิด apoptosis แต่ไม่ส่งผลต่อฟอลลิเคิล

คำสำคัญ: โค เนื้อเยื่อรังไข่ การแช่แข็ง สารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง

Abstract

Presently, cancer treatments such as chemotherapy or radiotherapy increase the survival rate of cancer patients. At the same time, they also destroy the egg cells inside the ovary and leading to infertility. During ovarian tissue vitrification, cells were frozen at high speed in the cryoprotective agent (CPA) solution. CPA are permeable to the cell membrane and change the liquid inside the cell to be glasslike state. In this

study, we used cattle as a model to study the concentration of dimethyl sulfoxide (DMSO) and ethylene glycol (EG) with different durations of vitrification. The results of ovarian tissue morphology showed the percentage of follicles at different stages was not different in all experimental groups. After increasing the immersion time in the solution, the results of primordial follicular numbers showed that CPA could infiltrate into the ovarian tissue better than before. The results of primordial follicular numbers consistent with the results of follicular quality, found that in Solution control 1-2 (S1-2) group showed percentage of normal follicles significantly higher than damaged follicles. Similarly, high percentage of normal follicle results were found in control group. However, the results of apoptosis analysis in ovarian tissue after vitrification and thawing showed a small amount of apoptosis in all experimental groups. In conclusion, the Vitrification 1-2 (V1-2) ovarian tissue groups showed the trend of results that improved the survival rate of primordial follicles after vitrification and thawing. Apoptosis also was found in V1-2 groups, but did not affect the follicles.

Keywords: Bovine, Ovarian Tissue, Vitrification, Cryoprotectant Agents

บทนำ

ในปัจจุบันมีความก้าวหน้าในการวินิจฉัยและการรักษาโรคมะเร็งเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งได้จำนวนมาก ในขณะที่การรักษาโรคมะเร็ง เช่น เคมีบำบัดหรือรังสีรักษา จะนำไปสู่การทำลายเซลล์ในรังไข่ และเสี่ยงต่อภาวะมีบุตรยาก (Jeruss and Woodruff, 2009) การแช่แข็งเนื้อเยื่อรังไข่และการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อรังไข่จึงเป็นตัวเลือกที่สำคัญในการรักษาภาวะเจริญพันธุ์สำหรับผู้ป่วยมะเร็งเพศหญิง โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ที่ต้องการเก็บไข่และเนื้อเยื่อรังไข่ก่อนเข้ารับการรักษา การแช่แข็งเนื้อเยื่อรังไข่ได้รับการพัฒนาครั้งแรกในแกะ ด้วยวิธีการแช่แข็งแบบ slow freezing (การแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิลงช้า ๆ) แล้วนำไปปลูกถ่ายกลับคืนให้แกะตัวเดิม (Gosden et al., 1994) เทคนิคนี้ถูกนำมาใช้ในมนุษย์ในเวลาต่อมา โดยการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อรังไข่ที่ประสบความสำเร็จครั้งแรกในผู้ป่วยมะเร็งต่อม้าน้ำเหลืองชนิดฮอดจ์กินโดย Donnez et al. (2004) รายงานการแช่แข็งเนื้อเยื่อรังไข่แบบ slow freezing แล้วนำไปปลูกถ่ายกลับให้ผู้ป่วย (Donnez and Dolmans, 2015) อย่างไรก็ตาม อัตราการตั้งครรภ์หลังจากการแช่แข็งและการปลูกถ่ายยังต่ำเนื่องจากปริมาณของฟอลลิเคิลและคุณภาพของเซลล์ไข่ที่ลดลง (Anderson and Wallace, 2011) จำนวนฟอลลิเคิลจะลดลงไปถึงครึ่งหนึ่งซึ่งเกิดจากความเครียดจากการขาดออกซิเจนไปเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่ (Donnez and Dolmans, 2013) เช่นเดียวกันกับการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อรังไข่ของโค (Gavish et al., 2014) มีรายงานว่าพบการลดลงของฟอลลิเคิลซึ่งสัมพันธ์กับการลดความหนาของเนื้อเยื่อรังไข่ ซึ่งเกี่ยวข้องกันกับกระบวนการในการสร้างฟอลลิเคิลของเนื้อเยื่อรังไข่ อย่างไรก็ตาม การแช่แข็งแบบ slow freezing ในปัจจุบัน ให้ผลอัตราการตั้งครรภ์เพียง 20-30% เท่านั้น (Schmidt et al., 2011)

การแช่แข็งแบบ vitrification (การแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว) เป็นวิธีการแช่แข็งที่ง่าย รวดเร็วและราคาไม่แพง ได้ถูกพัฒนาเพื่อใช้แช่แข็งเนื้อเยื่อรังไข่ส่วนนอก การแช่แข็งรังไข่แบบ vitrification เซลล์ถูกแช่แข็งในอัตราเร็วสูงมาก เนื่องจากต้องการเปลี่ยนแปลงของเหลวภายในเซลล์ให้มีลักษณะคล้ายแก้ว (Glasslike state) และหลีกเลี่ยงการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งแบบคริสตัลภายในเซลล์ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ ซึ่งมักเกิดจากการแช่แข็งแบบ slow freezing โดยในระหว่างการ vitrification มีการใช้สารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง (Cryoprotective agents; CPA) ที่ซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เช่น dimethyl sulfoxide (DMSO) และ ethylene glycol (EG) โดยจะจับกับน้ำภายในเซลล์และเกิดปฏิกิริยากับ

ออร์แกนอลไลน์ไซโตพลาสซึม (Fahy et al., 1990) การแช่แข็งแบบ vitrification ได้ถูกนำมาใช้กับการแช่แข็งเนื้อเยื่อรังไข่ในสัตว์หลายชนิด เช่น ม้า (Alves et al., 2016) หนูแรท (Özcan et al., 2015) แกะ (Fransolet et al., 2014) และลิง (Telfer and Zelinski, 2013) ซึ่งการแช่แข็งเนื้อเยื่อรังไข่ของสัตว์เหล่านี้ถูกใช้เป็นโมเดลในการปรับปรุงวิธีแช่แข็งให้ดียิ่งขึ้น และยังเป็นข้อมูลสำคัญในการปรับใช้กับมนุษย์ได้เช่นกัน (Araújo et al., 2014) ตัวอย่างการใช้ CPA ในงานวิจัยเกี่ยวกับการแช่แข็งเซลล์ไข่และเนื้อเยื่อรังไข่ของแมวแบบ vitrification โดยใช้ EG (Brito et al., 2016) และ EG ร่วมกับ DMSO (Alves et al., 2012) พบว่า การแช่แข็งแบบ vitrification อาจจะไม่ประสบความสำเร็จได้หากใช้น้ำยาแช่แข็งที่มี phenol red ผสมอยู่ (Brito et al., 2016) และขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่เหมาะสมของ CPA ในระหว่างที่แช่แข็งเนื้อเยื่อรังไข่ (Mouttham and Comizzoli, 2016) และที่สำคัญในระหว่างการแช่แข็งเนื้อเยื่อแบบ vitrification จะมีการสร้างสารอนุมูลอิสระ (Reactive oxygen species; ROS) ระดับ ROS จะเพิ่มขึ้นมากเมื่อเซลล์ถูกนำม่อุ่นละลายหลังถูกแช่แข็ง (Özcan et al., 2015) โดยมีการศึกษาเพื่อลดความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากการแช่แข็งจากการกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptotic การสะสมของสารอนุมูลอิสระ การสูญเสียกลูตาไธโอนออกภายนอกเซลล์ และความเสียหายของดีเอ็นเอและเยื่อหุ้มเซลล์ (Gupta et al., 2010; Zullo et al., 2016) การศึกษาการแช่แข็งรังไข่จะมีการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อรังไข่ก่อนแช่แข็งและหลังจากนำม่อุ่นละลาย (Dalman et al., 2017; Fabbri et al., 2016) พร้อมกับการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์จากการแช่แข็งและศึกษาการเลี้ยงต่อได้ในห้องทดลองและการนำไปปลูกถ่าย (Amorim et al., 2012; Donfack et al., 2018)

เนื้อเยื่อรังไข่ส่วนนอกจะพบจำนวนของฟอลลิเคิลชนิด primordial และ preantral มาก แตกต่างจากไข่ที่พัฒนาขึ้นอย่างสมบูรณ์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 120 μm) ไข่จากฟอลลิเคิลชนิด primordial และ preantral เหมาะสำหรับการแช่แข็งเนื่องจากมีขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 30 μm) ไม่มี zona pellucida และ metabolic quiescence (Newton et al., 1996) นอกจากนี้ไข่จากฟอลลิเคิลเหล่านี้มีความสามารถในการซ่อมแซมความเสียหายซึ่งเป็นผลมาจากวิธีการแช่แข็งเนื่องจากใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตหลังการแช่แข็ง (Shaw et al., 2000) จึงทำให้มีการพัฒนาวิธีการแช่แข็งเนื้อเยื่อรังไข่ขึ้นนอก

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ให้ความสนใจกับขนาดของเนื้อเยื่อรังไข่ในการนำไปแช่แข็ง พบว่าขนาด 1 x 1 x 2 มม. (ยาว x กว้าง x หนา) ให้ผลดีกว่าในแง่ของการแพร่กระจายของ CPA เข้าและออกจากเนื้อเยื่อ (Ferreira et al., 2010) โดยแสดงจำนวนการอยู่รอดของฟอลลิเคิลเพิ่มมากขึ้นเมื่อแช่แข็งเนื้อเยื่อรังไข่ด้วยขนาด ≤ 2 มม. เปรียบเทียบกับการแช่แข็งเนื้อเยื่อ รังไข่ที่ขนาดใหญ่กว่านี้ (Jeremias et al., 2003) ดังเช่นที่พบในการศึกษาขนาดของเนื้อเยื่อรังไข่โคที่นำไปแช่แข็งแบบ vitrification ด้วย CPA ที่มีส่วนประกอบของ 15% EG และ 15% DMSO ในน้ำยาแช่แข็ง ซึ่งพบว่าเซลล์รอบ ๆ ฟอลลิเคิลชนิด Primordial มีลักษณะเซลล์ปกติในเนื้อเยื่อแช่แข็งที่ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ (1 x 1 x 3 มม.) มากกว่าตัดเป็นชิ้นใหญ่ (1 x 1 x 5 มม.) (Dupont et al., 2022)

การศึกษาก่อนหน้านี้ ทดลองแช่เนื้อเยื่อรังไข่ขนาด 1 x 10 x 10 มม. ในน้ำยา equilibration ที่มีส่วนผสมของ 7.5% EG และ 7.5 % DMSO เป็นเวลา 20 นาที แล้วแช่ในน้ำยา vitrification ที่มีส่วนผสมของ 15% EG และ 15% DMSO เป็นเวลา 15 นาที พบว่าในเนื้อเยื่อรังไข่โคและมนุษย์ ไม่มีความแตกต่างของอัตราการรอดของฟอลลิเคิล (> 89%) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม fresh และกลุ่มแช่แข็ง (Kagawa et al., 2009) นอกจากนี้ น้ำยา equilibration และน้ำยา vitrification ที่ความเข้มข้นนี้ยังถูกนำไปพัฒนาใช้ร่วมกับซูโครสเพื่อศึกษาการเพิ่มอัตราการรอดของฟอลลิเคิลเช่นกัน แต่ผลการทดลองพบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีซูโครสหรือไม่ซูโครส (Mouttham and Comizzoli, 2016)

จากรายงานการวิจัยข้างต้น ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยใช้โคเป็นโมเดลในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ความเข้มข้นของสารที่ป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (DMSO และ EG) ซึ่งซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ด้วยวิธี vitrification

วิธีการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้จะทำการทดลอง ณ ห้องทดลองศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สารเคมีที่ใช้ในการทดลองซื้อจากบริษัท Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA) ถ้าไม่ใช่จะระบุไว้

1. วิธีเตรียมรังไข่โค

เก็บรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ที่อุณหภูมิห้องขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ จากนั้นใช้เข็มเบอร์ 18G ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 ml ดูดไข่ออกจากถุงไข่ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-8 มม. จากนั้นใช้กรรไกรตัดส่วนของ cortex ให้เป็นชิ้นขนาด กว้าง 2 x ยาว 2 x หนา 2 มม. ในน้ำยา TCM199-Hepes ที่เติมด้วย 20% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) แล้วเสียบรังไข่เข้าไว้กับเข็มฉีดยาขนาด 27G ที่ต่อกับฝาหลอด cryotube (4 ชิ้นต่อเข็ม) เพื่อเตรียมนำไปแช่แข็งต่อไป ซึ่งวิธีนี้เรียกว่า needle immersion vitrification (Mouttham and Comizzoli, 2016) แช่เข็มที่มีรังไข่ในน้ำยา TCM199-Hepes ที่เติมด้วย 20% FBS ระหว่างรอนำไปใช้ในขั้นตอนถัดไป

2. การแช่แข็งเนื้อเยื่อรังไข่โค

นำเข็มที่มีเนื้อเยื่อรังไข่ไปแช่ในน้ำยา equilibration solution (ES) ที่ประกอบด้วย TCM199-Hepes ที่เติมด้วย 20% FBS (base medium) ที่เติมด้วย EG และ DMSO ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นนำเข็มที่มีเนื้อเยื่อรังไข่ไปแช่ในน้ำยา Vitrification solution (VS) ที่ประกอบด้วย base medium ที่เติมด้วย 0.5 M sucrose, EG และ DMSO ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 แล้วนำเข็มที่มีเนื้อเยื่อรังไข่ไปปิดหลอด cryotube แล้วนำหลอด cryotube ไปจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวทันที แล้วเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว ไปล้างแบบต่อเนื่องนานอย่างน้อย 72 ชั่วโมง

สำหรับการละลายเนื้อเยื่อรังไข่โคแช่แข็ง จะทำที่อุณหภูมิ 37 °C บนแท่นให้ความร้อน โดยนำเข็มที่มีเนื้อเยื่อรังไข่แช่แข็งจากไนโตรเจนเหลวไว้ในอากาศ 10 วินาที แล้วนำมาจุ่มในน้ำยา base medium ที่เติมด้วย 0.5, 0.25 และ 0.125 M sucrose น้้ายาละ 5 นาที ตามลำดับ หลังจากนั้นนำไปล้างในน้ำยา base medium 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วใช้กระดาษทิชชูปลอดเชื้อซับน้ำยาที่อยู่รอบเนื้อเยื่อรังไข่ แล้วนำเนื้อเยื่อรังไข่ไปแช่ไว้ในน้ำยา 4% paraformaldehyde แล้วเก็บไว้ที่ 4 °C นาน 1 วัน

กลุ่มควบคุมจะแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มรังไข่สด fresh control ซึ่งจะไม่มีการบ่มในน้ำยา ES และ VS และไม่ได้ทำการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว กลุ่มควบคุมอีกหนึ่งกลุ่มคือ กลุ่ม solution control เป็นการศึกษาความเป็นพิษของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (EG และ DMSO) และระยะเวลา ที่อยู่ในน้ำยา ES และ VS โดยทำการบ่มเนื้อเยื่อรังไข่ในน้ำยา ES และ VS ตามความเข้มข้นและเวลาที่กำหนด แต่จะไม่นำรังไข่ไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว และทำการบ่มในน้ำยาทำละลายเหมือนกับกลุ่ม vitrification (ตารางที่ 1) แล้วนำไปแช่ไว้ในน้ำยา 4% paraformaldehyde แล้วเก็บไว้ที่ 4 °C นาน 1 วัน

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (EG และ DMSO) และระยะเวลาที่อยู่ในน้ำยา ES และ VS ในการแช่แข็งเนื้อเยื่อรังไข่โค

Treatments	Groups	Equilibration			Vitrification		
		EG	DMSO	Time (min)	EG	DMSO	Time (min)
Fresh	Non-expose	-	-	-	-	-	-
Solution control	S1-1	7.5%	7.5%	15	15%	15%	5
	S1-2	7.5%	7.5%	20	15%	15%	10
	S2-1	10%	10%	15	20%	20%	5

Treatments	Groups	Equilibration			Vitrification		
		EG	DMSO	Time (min)	EG	DMSO	Time (min)
	S2-2	10%	10%	20	20%	20%	10
Vitrification	V1-1	7.5%	7.5%	15	15%	15%	5
	V1-2	7.5%	7.5%	20	15%	15%	10
	V2-1	10%	10%	15	20%	20%	5
	V2-2	10%	10%	20	20%	20%	10

EG = ethylene glycol, DMSO = dimethyl sulfoxide

3. การศึกษาลักษณะปรากฏ (Morphological analysis) ของรังไข่โดยการย้อมด้วยสี hematoxylin-eosin

นำเนื้อเยื่อรังไข่กลุ่มละ 4 ชิ้น มาแช่ใน 4% paraformaldehyde ซ้ำคืน จากนั้นล้างด้วยน้ำยา phosphate buffer saline (PBS) 3 ครั้ง จากนั้นทำให้แข็งโดยการแช่ใน ethanol ความเข้มข้น 70%, 90%, 95% และ 100% ตามลำดับ นำเนื้อเยื่อรังไข่ฝังในพาราฟินแล้วตัดด้วยมีด microtome ให้มีขนาดบาง 5 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปวางบนสไลด์ และทิ้งให้แห้งข้ามคืน เลือก 3 สไลด์จากแต่ละกลุ่ม โดยมีระยะห่างระหว่างแต่ละชิ้น 60 ไมโครเมตร นำสไลด์มาย้อมด้วยสี H&E แล้วไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Nikiforov et al., 2018) hematoxylin ให้สีน้ำเงินหรือม่วง ซึ่งย้อมติดส่วนประกอบของเซลล์ที่มีความเป็นกรด เช่น นิวเคลียส ส่วน eosin ให้สีแดงหรือชมพู ซึ่งย้อมติดส่วนประกอบเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นเบส เช่น ไซโตพลาสซึม

ทำการบันทึกลักษณะของฟอลลิเคิลทั้งหมด โดยนับเฉพาะฟอลลิเคิลที่ตัดโดนตำแหน่งนิวเคลียสเพื่อหลีกเลี่ยงการนับซ้ำ ฟอลลิเคิลที่พบถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มฟอลลิเคิลที่มีคุณภาพดีและกลุ่มคุณภาพไม่ดี (Damaged) โดยฟอลลิเคิลกลุ่มที่มีคุณภาพดีจะมีลักษณะดังนี้คือ ไม่พบการหดตัวของไซโตพลาสซึม และไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่นิวเคลียส (Pyknotic nuclear, นิวเคลียสเหี่ยวและมีสีน้ำเงินเข้ม เนื่องจาก DNA รวมตัวเป็นก้อน) มีช่องว่างรูปร่างกลม (Vacuolization) ในไข่ได้ไม่เกิน 10% มีเซลล์แกรนูโลซา (Granulosa cells) ล้อมรอบไข่ เซลล์แกรนูโลซาไม่หด ไม่บวม และไม่มีช่องว่างขนาดใหญ่ระหว่างเซลล์ มี basement membrane ที่มีลักษณะปกติและติดกับเซลล์แกรนูโลซา (มีส่วนที่ไม่ติดกับเซลล์แกรนูโลซาได้ไม่เกิน 50%) ในส่วนของฟอลลิเคิลกลุ่มคุณภาพไม่ดีจะมีลักษณะตรงข้ามจากที่กล่าวมาข้างต้น (Fujihara et al., 2012) นอกจากนี้จากฟอลลิเคิลคุณภาพดีถูกจำแนกฟอลลิเคิลในแต่ละระยะที่พบอีกครั้ง ได้แก่ primordial, primary, secondary และ antral follicles แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์เพื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่ม

4. การตรวจสอบการเกิด apoptosis ของเนื้อเยื่อรังไข่แช่แข็งด้วยวิธี TUNEL assay

ทำการตรวจสอบ apoptosis ขึ้นรังไข่โดยประยุกต์ใช้การตรวจวัด DNA fragmentation ด้วยวิธี terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) assay (Merck Millipore, Germany) โดยนำเนื้อเยื่อรังไข่ที่อยู่บนสไลด์ไปแช่ใน xylene, ethanol ความเข้มข้น 100%, 95%, 90% และ 70% ตามด้วย deionized water และ PBS ขึ้นตอนละ 5 นาที จากนั้นนำไปบ่มในน้ำยา 20 µg/ml Proteinase k นาน 15 นาที แล้วนำมาบ่มด้วยน้ำยา permeabilization (0.2% Triton-X, 2% BSA, 5% NGS ที่ละลายใน PBS) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปบ่มกับ 180 µl TUNEL reaction mixture ที่เติมเอนไซม์ terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 60 นาที เก็บกล่องไว้ในที่มืด จากนั้นย้อมนิวเคลียสด้วย Hoechst 33342 เป็นเวลา 5 นาที หลังจากล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้งแล้ว หยดน้ำยา mounting medium (Glycerol: PBS) ลงบนสไลด์ แล้วนำไปส่องภายใต้แสงยูวีด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ เซลล์ที่มี DNA fragmentation จะติดสีเขียว ดังนั้นฟอลลิเคิลที่มีไซโตสปีชีแว และ/หรือเซลล์แกรนูโลซาติดสีเขียวมากกว่า 50% จะนับเป็นฟอลลิเคิลที่เกิด apoptosis

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าเปอร์เซ็นต์ฟอลลิเคิลคุณภาพดี คุณภาพไม่ดี และเปอร์เซ็นต์ฟอลลิเคิลในแต่ละระยะของแต่ละกลุ่มการทดลอง วิเคราะห์โดยหาค่าความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้ one way ANOVA แล้วตามด้วย t-Test ด้วยวิธี Tukey-Kramer Honest Significant Difference (HSD) โดยค่า P น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติ นำมาสร้างเป็นแผนภูมิโดยโปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism version 5 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA)

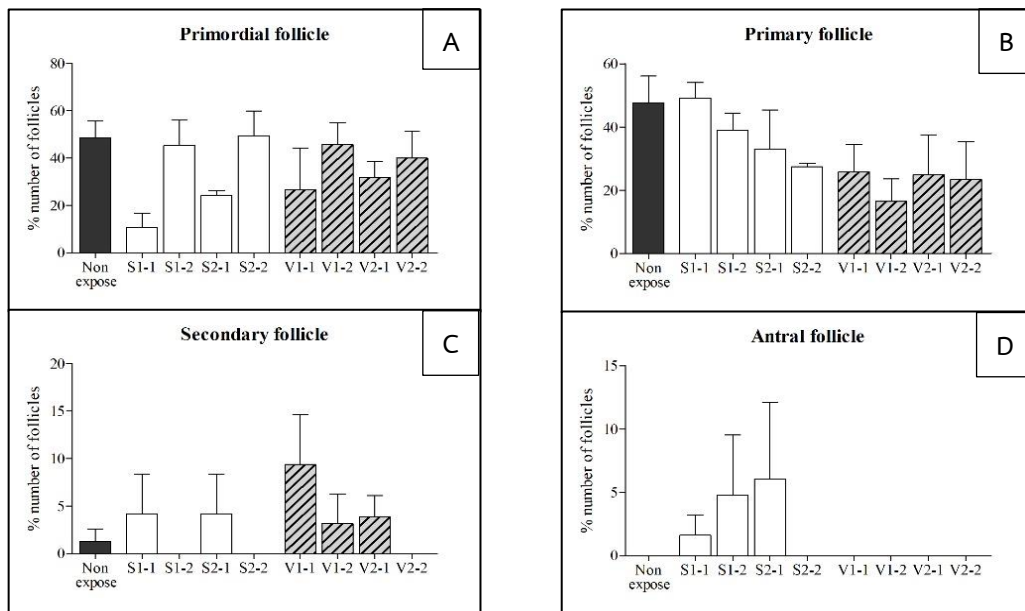
ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาลักษณะปรากฏของเนื้อเยื่อรังไข่โดยการย้อมด้วยสี H&E

หลังจากเนื้อเยื่อรังไข่ในแต่ละกลุ่มถูกนำมาย้อมสี H&E ลักษณะของฟอลลิเคิลที่พบจะถูกบันทึก (ภาพที่ 1) โดยจำนวนเปอร์เซ็นต์ของฟอลลิเคิลในระยะต่าง ๆ เช่น primordial, primary, secondary และ antral follicles ไม่มีความแตกต่างในทุกกลุ่มการทดลอง อย่างไรก็ตามในกลุ่ม V1-1 และกลุ่มของ V2-1 ที่ถูกนำไปแช่แข็งมีแนวโน้มที่จะแสดงผลของจำนวนฟอลลิเคิลระยะ primordial สูงกว่ากลุ่ม S1-1 และ S2-2 ที่ถูกแช่ในน้ำยาชนิดเดียวกันแต่ไม่นำไปแช่แข็ง แต่หลังจากเพิ่มเวลาการแช่ในน้ำยา ส่งผลให้ไม่มีความต่างกันของฟอลลิเคิลระยะ primordial ในกลุ่ม S1-2, S2-2, V1-2 และ V2-2 โดยกลุ่มการทดลองดังกล่าวแสดงผลฟอลลิเคิลระยะ primordial สูงทั้งหมด ซึ่งตรงกับการทดลองก่อนหน้านี้ที่กล่าวว่าการ CPA ซึ่งก็คือ DMSO และ EG ในการทดลองนี้ มีส่วนช่วยในการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และเปลี่ยนแปลงของเหลวภายในเซลล์ให้มีลักษณะคล้ายแก้ว หลีกเลียงการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งแบบคริสตัลภายในเซลล์ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ (Fahy et al., 1990) ซึ่งเมื่อมีการเพิ่มเวลาในการแช่ในน้ำยาอาจมีส่วนช่วยให้สาร CPA ซึมเข้าเนื้อเยื่อรังไข่ได้ดีกว่า

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบลักษณะฟอลลิเคิลที่พบของชิ้นเนื้อเยื่อรังไข่ที่ผ่านการแช่แข็ง โดยการย้อมด้วยสี H & E (Mean ± SEM)

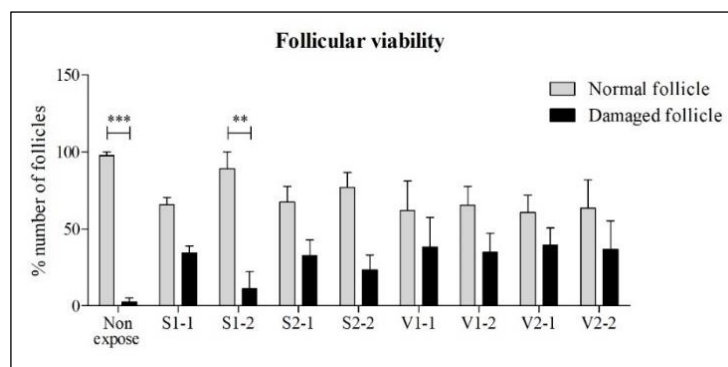
Groups	จำนวนฟอลลิเคิล ที่พบทั้งหมด	% Normal follicle				% Damaged follicle
		Primordial follicle	Primary follicle	Secondary follicle	Antral follicle	
Non-expose	25.67 ± 3.18	48.49 ± 7.12	47.66 ± 8.44	1.28 ± 1.28	0 ± 0	2.56 ± 2.56
S1-1	13.00 ± 4.04	10.83 ± 5.83	49.05 ± 4.97	4.17 ± 4.17	1.59 ± 1.59	34.37 ± 4.71
S1-2	8.67 ± 2.67	45.24 ± 10.74	38.89 ± 5.56	0 ± 0	4.76 ± 4.76	11.11 ± 11.11
S2-1	8.00 ± 1.73	24.09 ± 2.15	33.03 ± 12.31	4.17 ± 4.17	6.06 ± 6.06	32.65 ± 10.20
S2-2	7.33 ± 0.33	49.40 ± 10.53	27.38 ± 1.19	0 ± 0	0 ± 0	23.21 ± 9.83
V1-1	8.67 ± 1.86	26.67 ± 17.64	25.76 ± 8.69	9.39 ± 5.26	0 ± 0	38.18 ± 19.16
V1-2	9.25 ± 1.70	45.63 ± 8.10	16.47 ± 6.17	3.13 ± 2.71	0 ± 0	37.77 ± 10.64
V2-1	10.25 ± 1.65	31.85 ± 6.58	24.85 ± 12.63	3.87 ± 2.25	0 ± 0	37.43 ± 11.15
V2-2	10.00 ± 2.89	40.00 ± 11.55	23.33 ± 12.02	0 ± 0	0 ± 0	36.67 ± 18.56



ภาพที่ 1 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์จำนวนฟอลลิเคิลในระยะต่าง ๆ A) primordial B) primary C) secondary และ D) antral follicles จากการวิเคราะห์ลักษณะปรากฏของเนื้อเยื่อรังไข่โดยการย้อมด้วยสี H & E

2. ผลการเปรียบเทียบระหว่างฟอลลิเคิลที่มีคุณภาพดีและคุณภาพไม่ดี

พบว่าเฉพาะกลุ่ม non-expose และกลุ่ม S1-2 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ของจำนวนฟอลลิเคิลที่มีคุณภาพดีมากกว่า ฟอลลิเคิลคุณภาพไม่ดียิ่งมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$ และ $P < 0.001$ ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกับผลของฟอลลิเคิลระยะ primordial ที่พบในปริมาณสูงเช่นเดียวกันในกลุ่มดังกล่าว โดยเนื้อเยื่อรังไข่ส่วน cortex จะพบฟอลลิเคิลชนิด primordial จำนวนมาก ไขจากฟอลลิเคิลชนิด primordial มีความเหมาะสมสำหรับการแช่แข็งเนื่องจากมีขนาดเล็ก (Newton et al., 1996) นอกจากนี้ไขจากฟอลลิเคิลเหล่านี้ยังมีความสามารถในการซ่อมแซมความเสียหายของเซลล์จากการแช่แข็งได้อีกด้วย (Shaw et al., 2000) โดยไม่พบความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์ของจำนวนฟอลลิเคิลที่มีคุณภาพดีและไม่ดีในกลุ่มอื่น ๆ เช่น กลุ่ม S1-1, S2-1, S2-2, V1-1, V1-2, V2-1 และ V2-2 (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์จำนวนฟอลลิเคิลที่มีคุณภาพดี (Normal follicle) และฟอลลิเคิลคุณภาพไม่ดี (Damage follicle) จากการวิเคราะห์ลักษณะปรากฏของเนื้อเยื่อรังไข่โดยการย้อมด้วยสี H & E

(** $P < 0.01$ และ *** $P < 0.001$)

3. ผลการตรวจสอบการเกิด apoptosis ของชิ้นเนื้อเยื่อรังไข่ที่ผ่านการแช่แข็งและทำละลาย ด้วยวิธี TUNEL assay

พบว่าทุกกลุ่มการทดลองมีการเกิด apoptosis จำนวนเล็กน้อยเท่านั้น (เปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis กลุ่ม non-expose = 1.45 ± 0.91 , S1-1 = 2.34 ± 0.69 , S1-2 = 2.87 ± 1.35 , S2-1 = 4.22 ± 1.83 , S2-2 = 1.78 ± 0.92 , V1-1 = 2.57 ± 0.57 , V1-2 = 3.19 ± 1.02 , V2-1 = 2.23 ± 0.88 และกลุ่ม V2-2 = 1.69 ± 1.01) แต่ในกลุ่ม V2-1 และ V2-2 พบการเกิด apoptosis ที่ชั้น Germinal epithelium และ Tunica albuginea ของเซลล์เนื้อเยื่อรังไข่เป็นจำนวนมากกว่ากลุ่มอื่น ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อชั้นนอก ก่อนที่จะเป็นชั้นที่พบฟอลลิเคิล ซึ่งต่างจากผลการทดลองการแช่แข็งเนื้อเยื่อรังไข่ในแคะ ด้วยน้ำยาแช่แข็งที่มีส่วนประกอบของ 1 M EG, 1 M propylene glycol, 1.5 M sucrose และ 10% Ficoll เป็นเวลา 10 นาที เมื่อนำเนื้อเยื่อออกมาละลาย โดยการแช่ในน้ำยาที่มีส่วนประกอบของ 1 M sucrose และลดความเข้มข้นลงเรื่อย ๆ ผลการเกิด apoptosis ของฟอลลิเคิลเนื้อเยื่อรังไข่ในแคะสูงเกือบถึง 30% ในบางกลุ่มการทดลอง (Nikiforov et al., 2018) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการเกิด apoptosis ในการทดลองนี้แล้วพบว่าเกิดการ apoptosis น้อยมาก (เฉลี่ยทุกกลุ่ม 2.48%)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

1. เปอร์เซ็นต์ของฟอลลิเคิลในแต่ละระยะไม่มีความแตกต่างในทุกกลุ่มการทดลอง แต่พบฟอลลิเคิลระยะ primordial ในกลุ่ม V1-1 และกลุ่ม V2-1 สูงกว่ากลุ่ม S1-1 และ S2-2 ที่ถูกแช่ในน้ำยาชนิดเดียวกันแต่ไม่นำไปแช่แข็ง ซึ่งหลังจากเพิ่มเวลาการแช่ในน้ำยา ES1 เป็น 20 นาที, VS1 เป็น 10 นาที และ ES2 เป็น 20 นาที, VS2 เป็น 10 นาที ส่งผลให้ไม่มีความต่างกันของจำนวนฟอลลิเคิลระยะ primordial ในกลุ่ม S1-2, S2-2, V1-2 และ V2-2

2. ผลการเปรียบเทียบระหว่างฟอลลิเคิลที่มีคุณภาพดีและคุณภาพไม่ดี สอดคล้องกับผลของฟอลลิเคิลระยะ primordial ที่พบในปริมาณสูงในกลุ่ม non-expose และกลุ่ม S1-2

3. ผลการตรวจสอบการเกิด apoptosis ของชิ้นเนื้อเยื่อรังไข่ที่ผ่านการแช่แข็งและทำละลาย พบว่าทุกกลุ่มการทดลองมีการเกิด apoptosis จำนวนเล็กน้อยเท่านั้น แต่ในกลุ่ม V2-1 และ V2-2 พบการเกิด apoptosis ที่ชั้น Germinal epithelium และ Tunica albuginea ของเนื้อเยื่อรังไข่เป็นจำนวนมากกว่ากลุ่มอื่น ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อชั้นนอกไม่ส่งผลต่อฟอลลิเคิล

4. เนื้อเยื่อรังไข่กลุ่ม V1-2 เป็นกลุ่มที่มีแนวโน้มที่ดีในการช่วยให้ผลจำนวนฟอลลิเคิลระยะ primordial มีอัตราการรอดสูงกว่ากลุ่มอื่นหลังการแช่แข็งและทำละลาย และพบการเกิด apoptosis เพียงเล็กน้อย โดยส่วนที่พบก็เป็นเพียงเซลล์ชั้นนอกไม่ส่งผลต่อฟอลลิเคิล

ข้อเสนอแนะ

1. หากมีการทดสอบการเกิด apoptosis เพิ่มเติมในวิธีอื่น ๆ ที่สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของระดับ ROS กับการแช่แข็ง จะทำให้ผลการทดลองมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

2. ควรเลือกเนื้อเยื่อรังไข่กลุ่ม V1-2 ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีแนวโน้มที่ดีในการช่วยให้ผลจำนวนฟอลลิเคิลระยะ primordial มีอัตราการรอดสูงกว่ากลุ่มอื่นหลังการแช่แข็งและทำละลาย แม้จะพบเกิด apoptosis แต่ไม่ส่งผลต่อฟอลลิเคิล ไปปลูกถ่ายให้กับหนูเมาส์พร้อมภูมิคุ้มกัน เพื่อศึกษาการเจริญของฟอลลิเคิล

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ 2565

เอกสารอ้างอิง

- Alves, A. E., Kozel, A. C., and Luvoni, G. C. (2012). Vitrification with DAP 213 and cryotop of ex situ and in situ feline cumulus-oocyte complexes. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(6), 1003-1008. <https://doi.10.1111/j.1439-0531.2012.02006.x>.
- Alves, K. A., Alves, B. G., Gastal, G. D. A., de-Tarso, S. G. S., Gastal, M. O., Figueiredo, J. R., Gambarini, M. L. and Gastal, E. L. (2016). The mare model to study the effects of ovarian dynamics on preantral follicle features. *PLOS ONE*, 11(2), e0149693. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149693>.
- Amorim, C. A., Dolmans, M. M., David, A., Jaeger, J., Vanacker, J., Camboni, A., Donnez, J. and Langendonck, A. V. (2012). Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. *Fertility and Sterility*, 98(5), 1291-1298. <https://doi.10.1016/j.fertnstert.2012.07.1109>.
- Anderson, R. A., and Wallace, W. H. B. (2011). Fertility preservation in girls and young women. *Clinical Endocrinology*, 75(4), 409-419. <https://doi.10.1111/j.1365-2265.2011.04100.x>.
- Araújo, V. R., Gastal, M. O., Figueiredo, J. R., and Gastal, E. L. (2014). In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12, 78-7. <https://doi.10.1186/1477-7827-12-78>.
- Brito, D. C., Domingues, S. F. S., Silva, J. K., Wu, X., Santos, R. R., and Pieczarka, J. C. (2016). Detrimental effect of phenol red on the vitrification of cat (*Felis Catus*) ovarian tissue. *Biopreservation and Biobanking*, 14(1), 17-22. <https://doi.10.1089/bio.2015.0025>.
- Dalman, A., Deheshkar Gooneh Farahani, N. S., Totonchi, M., Pirjani, R., Ebrahimi, B., and Rezazadeh Valojerdi, M. (2017). Slow freezing versus vitrification technique for human ovarian tissue cryopreservation: An evaluation of histological changes, WNT signaling pathway and apoptotic genes expression. *Cryobiology*, 79, 29-36. <https://doi.10.1016/j.cryobiol.2017.09.007>.
- Donfack, N. J., Alves, K. A., Alves, B. G., Rocha, R. M. P., Bruno, J. B., Lima, L. F., Lobo, C. H., Santos, R. R., Domingues, S. F. S., Bertolini, M., Smitz, J. and Rodrigues, A. P. R. (2018). In vivo and in vitro strategies to support caprine preantral follicle development after ovarian tissue vitrification. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(8), 1055-1065. <https://doi.10.1071/RD17315>.
- Donnez, J. and Dolmans, M. M. (2013). Fertility preservation in women. *Nature Reviews Endocrinology*, 9(12), 735-749. <https://doi.10.1056/NEJMra1614676>.
- Donnez, J. and Dolmans, M. M. (2015). Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(8), 1167-1170. <https://doi.10.1007/s10815-015-0544-9>.
- Donnez, J., Dolmans, M. M., Demylle, D., Jadoul, P., Pirard, C., Squifflet, J., Martinez-Madrid, B. and Langendonck, A. V. (2004). Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *The Lancet*, 364(9443), 1405-1410. [https://doi.10.1016/S0140-6736\(04\)17222-X](https://doi.10.1016/S0140-6736(04)17222-X).
- Dupont, Á., Sanguinet, E., Ferreira, M., Ramos, L., Lothhammer, N., Frantz, N., and Bos-Mikich, A. (2022). Morphological study on the effects of sample size on ovarian tissue vitrification. *Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida*, 26(3), 374-378. <https://doi.10.5935/1518-0557.20210075>.

- Fabbri, R., Vicenti, R., Macciocca, M., Martino, N. A., Dell'Aquila, M. E., Pasquinelli, G., Morselli-Labate, A. M., Seracchioli, R. and Paradisi, R. (2016). Morphological, ultrastructural and functional imaging of frozen/thawed and vitrified/warmed human ovarian tissue retrieved from oncological patients. *Human Reproduction*, 31(8), 1838-1849. <https://doi.10.1093/humrep/dew134>.
- Fahy, G. M., Lilley, T. H., Linsdell, H., Douglas, M. S. J., and Meryman, H. T. (1990). Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms. *Cryobiology*, 27(3), 247-268. [https://doi.10.1016/0011-2240\(90\)90025-y](https://doi.10.1016/0011-2240(90)90025-y).
- Ferreira, M., Bos-Mikich, A., Frantz, N., Rodrigues, J. L., Brunetto, A. L., and Schwartzmann, G. (2010). The effects of sample size on the outcome of ovarian tissue cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(1), 99-102. <https://doi.10.1111/j.1439-0531.2008.01261.x>.
- Fransolet, M., Labied, S., Henry, L., Masereel, M.-C., Rozet, E., Kirschvink, N., Nisolle, M. and Munaut, C. (2014). Strategies for using the sheep ovarian cortex as a model in reproductive medicine. *PLOS ONE*, 9(3), e91073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091073>.
- Fujihara, M., Comizzoli, P., Wildt, D. E. and Songsasen, N. (2012). Cat and dog primordial follicles enclosed in ovarian cortex sustain viability after *in vitro* culture on agarose gel in a protein-free medium. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 Suppl 6(06), 102-108. <https://doi.10.1111/rda.12022>.
- Gavish, Z., Peer, G., Roness, H., Cohen, Y. and Meirou, D. (2014). Follicle activation and 'burn-out' contribute to post-transplantation follicle loss in ovarian tissue grafts: the effect of graft thickness. *Human Reproduction*, 29(5), 989-996. <https://doi.10.1093/humrep/deu015>.
- Gosden, R. G., Baird, D. T., Wade, J. C. and Webb, R. (1994). Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. *Human Reproduction*, 9(4), 597-603. <https://doi.10.1530/REP-08-0099>.
- Gupta, M. K., Uhm, S. J. and Lee, H. T. (2010). Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and *in vitro* development of oocytes vitrified before or after *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility*, 93(8), 2602-2607. <https://doi.10.1016/j.fertnstert.2010.01.043>.
- Jeremias, E., Bedaiwy, M. A., Nelson, D., Biscotti, C. V. and Falcone, T. (2003). Assessment of tissue injury in cryopreserved ovarian tissue. *Fertility and Sterility*, 79(3), 651-653. [https://doi.10.1016/s0015-0282\(02\)04810-0](https://doi.10.1016/s0015-0282(02)04810-0).
- Jeruss, J. S. and Woodruff, T. K. (2009). Preservation of Fertility in Patients with Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 360(9), 902-911.
- Kagawa, N., Silber, S. and Kuwayama, M. (2009). Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online*, 18(4), 568-77. [https://doi.10.1016/s1472-6483\(10\)60136-8](https://doi.10.1016/s1472-6483(10)60136-8).
- Moutham, L. and Comizzoli, P. (2016). The preservation of vital functions in cat ovarian tissues during vitrification depends more on the temperature of the cryoprotectant exposure than on the sucrose supplementation. *Cryobiology*, 73(2), 187-195. <https://doi.10.1016/j.cryobiol.2016.07.013>.

- Newton, H., Aubard, Y., Rutherford, A., Sharma, V. and Gosden, R. (1996). Ovary and ovulation: Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Human Reproduction*, 11(7), 1487-1491. <https://doi.10.1093/oxfordjournals.humrep.a019423>.
- Nikiforov, D., Russo, V., Nardinocchi, D., Bernabò, N., Mattioli, M. and Barboni, B. (2018). Innovative multi-protectoral approach increases survival rate after vitrification of ovarian tissue and isolated follicles with improved results in comparison with conventional method. *Journal of Ovarian Research*, 65(2018), 1-15. <https://doi.10.1186/s13048-018-0437-5>.
- Özcan, P., Fiçicioğlu, C., Yıldırım Ö, K., Özkan, F., Akkaya, H. and Aslan, İ. (2015). Protective effect of resveratrol against oxidative damage to ovarian reserve in female Sprague-Dawley rats. *Reproductive BioMedicine Online*, 31(3), 404-410. <https://doi.10.1016/j.rbmo.2015.06.007>.
- Schmidt, K. T., Rosendahl, M., Ernst, E., Loft, A., Andersen, A. N., Dueholm, M., Ottosen, C. and Andersen, C. Y. (2011). Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue in 12 women with chemotherapy-induced premature ovarian failure: the Danish experience. *Fertility and Sterility*, 95(2), 695-701. <https://doi.10.1016/j.fertnstert.2010.07.1080>.
- Shaw, J. M., Oranratnachai, A. and Trounson, A. O. (2000). Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53(1), 59-72. [https://doi.10.1016/s0093-691x\(99\)00240-x](https://doi.10.1016/s0093-691x(99)00240-x).
- Telfer, E. E. and Zelinski, M. B. (2013). Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. *Fertility and Sterility*, 99(6), 1523-1533. <https://doi.10.1016/j.fertnstert.2013.03.043>.
- Zullo, G., De Canditiis, C., Pero, M. E., Albero, G., Salzano, A., Neglia, G. and Gasparrini, B. (2016). Crocetin improves the quality of in vitro - produced bovine embryos: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and apoptosis. *Theriogenology*, 86(8), 1879-1885. <https://doi.10.1016/j.theriogenology.2016.06.011>.