

انجماد شی‌شهای فولیکول‌زده‌آنت در مقایسه با انجماد شی‌شهای بافت‌نشده در موش

المیرا حسین‌زاده (M.Sc)، سعید زواره (Ph.D)*، تقی لشکر بلوکی (Ph.D)
دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

چکیده

هدف: تکنیک‌های انجمادی وشی مفید برای ذخیره‌ی فولان‌ی سلول‌های بافت‌های نگاه تواید مثلی بوب می‌شوند. این مطالعه حاضر بررسی روش تکوین فولیکول‌های زده‌آنت انجماد شده در مقایسه با فولیکول‌های زده‌آنت از تخمدان انجماد می‌شود.

روش: فولیکول‌های زده‌آنت تخمدان‌های زده‌آنت ۱۴ تا ۱۶ نژاد NMRI با تصادفی سه گروه شدند. گروه اول: فولیکول‌های زده‌آنت انجماد شده از تخمدان‌های زده‌آنت (گروه دوم: فولیکول‌های زده‌آنت انجماد شده از تخمدان‌های زده‌آنت انجماد شده. پس از آن، فولیکول‌های زده‌آنت در محیط کشت MEM- α حاوی ۵ صد FBS، ۱۰ میلی‌لیتر hFSH، ۱ صد ITS، ۱۰ میلی‌لیتر EGF کشت شدند. تخمک‌گذاری انجام دادند ۱/۵ در میانی لیت‌ر hCG روز ۱۲ کشت‌التهاء گردید. اندازه فولیکول‌های زده‌آنت، و نرخ تشکیل جنین آنتروم - ل تشکیل تخمک‌های زده‌آنت شده ارزیابی شد.

افته‌ها: نتایج نشان داد که نرخ بقاء فولیکول‌های زده‌آنت انجمادی در معنی‌اری بیش‌تر فولیکول‌های زده‌آنت از تخمدان انجمادی است. ط اندازه فولیکول‌های زده‌آنت نرخ تشکیل جنین آنتروم و تخمک‌های حله MII فولیکول‌های زده‌آنت ال انجمادی در معنی‌اری به فولیکول‌های زده‌آنت جدا از تخمدان انجمادی بیش‌تر بود. نتیجه‌ی: فولیکول‌های زده‌آنت انجماد شده نسبت به فولیکول‌های زده‌آنت تخمدان انجمادی برای انجماد تخمک مناسب‌تر بودند.

اژه‌ها: کلیدی: انجماد شی‌شهای، فولیکول تخمدان، تخمدان

مقدمه

انجماد، از جمله راه‌کارهای جدید حفظ باروری در بیماران مبتلا به سرطان می‌باشد که تحت شیمی‌درمانی و پرتودرمانی قرار گرفته‌اند. محققان از این تکنیک برای حفظ سیستم‌های زیستی مانند تخمک، جنین، فولیکول‌ها و بافت تخمدان پستانداران در جهت پیشبرد تکنیک‌های کمک تولید

مثلی بهره می‌برند [۱-۵]. تکنیک‌های انجمادی روش‌های مفیدی برای ذخیره‌ی طولانی‌مدت و حفظ سلول و بافت‌های مختلف دستگاه تولید مثلی محسوب می‌شوند. ذخیره‌ی بافت تخمدان و فولیکول‌های پره‌آنترال نسبت به تخمک و جنین دارای امتیازاتی می‌باشند از جمله این‌که فرصت مناسبی فراهم می‌کند برای بلوغ آزمایشگاهی فولیکول و حفظ باروری در

[۱۷]. بنابراین موفقیت‌های حاصل از این روش خیلی چشم‌گیر نبوده و دلیلی شده است تا راه‌کارهای جدیدی پیشنهاد شود.

امروزه بهبود روش‌های کشت آزمایشگاهی فولیکول‌ها به منظور دست‌یابی به تخمک‌ها با قابلیت باروری بالا، توجه محققان و بیش‌تر مراکز درمان ناباروری و تولیدات دامی را به خود معطوف داشته است. از دیگر سو، تولید تخمک‌های بارور و به دنبال آن تولدهای زنده بعد از کشت آزمایشگاهی بلندمدت فولیکول‌ها در جهت پیشبرد این مهم بسیار دل‌گرم‌کننده بوده است [۱۸، ۱۹]. با توجه به بهبود روش‌های کشت فولیکول‌های پره‌آنترال و با توجه به مشکلات موجود در انجماد بافت تخمدان به نظر می‌رسد که انجماد فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان در مقایسه با فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان منجمد دارای مزایای فراوان باشد. بنابراین هدف از مطالعه حاضر، بررسی رشد و تکوین فولیکول‌های پره‌آنترال انجمادی در مقایسه با فولیکول‌های جداشده از تخمدان منجمد شده پس از ذوب بود.

مواد و روش‌ها

تمام مواد مصرفی در آزمایش حاضر از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich, UK) خریداری شد به استثناء آن‌هایی که در متن اشاره شده است. همچنین محیط‌های کشت با آب دیونیزه (Mili-Q) ساخته شد.

حیوانات آزمایشگاهی - موش - ح آزمایش در این بررسی آزمایشگاهی از تعداد ۱۲ سر موش سوری نژاد NMRI ماده با سن تقریبی ۱۶-۱۴ روزه به دلیل داشتن تخمدان‌های کوچک فاقد بافت فیروزه اضافی استفاده شد. موش‌ها از موسسه سرم و واکسن‌سازی رازی ایران تهیه شد و در شرایط مناسب ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲۰-۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰-۴۰ درصد و با آب و غذای کافی در حیوان‌خانه نگهداری شدند. سپس موش‌ها به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند و تخمدان‌های آن

بیماران سرطانی و حتی دخترانی که می‌بایست هر چه سریع‌تر شیمی‌درمانی و یا رادیوتراپی را آغاز کنند [۶].

انجماد آهسته روشی رایج در ذخیره سلول و بافت می‌باشد [۳]. در انجماد آهسته امکان تشکیل کریستال‌های یخ خارج سلولی که برای بافت‌های اطراف آن مضر می‌باشد، وجود دارد [۷]. در سال‌های اخیر، روش انجمادی ساده، اقتصادی و سریعی به نام انجماد شیشه‌ای معرفی شده است [۸]. انجماد شیشه‌ای، انجماد فوق‌سریع با استفاده از غلظت‌های بالا مواد ضد یخ می‌باشد که به دنبال آن از تشکیل کریستال یخ جلوگیری می‌شود [۹]. در انجماد شیشه‌ای دو نکته بسیار مهم می‌باشد: انتخاب ضد یخ و غلظت مناسب آن. این دو عامل باید به گونه‌ای باشند که کریستال یخ در داخل و خارج سلول شکل نگیرد و غلظت به‌کار گرفته شده مواد ضد یخ برای سلول کشنده نباشد [۷، ۱۰].

انجماد بافت تخمدان بر خلاف انجماد فولیکول پیچیده می‌باشد. زیرا بافت تخمدان از چندین نوع سلول تشکیل شده است که نیازهای مختلفی برای زنده ماندن دارند [۳]. اما تخمدان‌ها محتوی فولیکول‌هایی در مراحل مختلف تکوین می‌باشد که در برابر انجماد مقاومت متفاوتی دارند. از این میان فولیکول‌های بدوی به علت ویژگی‌های خاص از جمله: تعداد زیاد، سایز کوچک، تعداد کم سلول گرانولوزا و عدم وجود لایه‌ی شفاف اطراف تخمک و گرانول‌های قشری در مقایسه با سایر مراحل تکوینی فولیکول تحمل بالایی به آسیب ناشی از انجماد و ذوب دارند [۱۱-۱۵].

دو راه‌کار دست‌یابی به تخمک‌های بالغ پس از انجماد بافت تخمدان وجود دارد: پیوند تخمدان به خود شخص و یا کشت و بلوغ آزمایشگاهی فولیکول‌های جدا شده از تخمدان. این در حالی است که به نظر می‌رسد پیوند بافت تخمدان منجمد احتمال بازگشت سلول‌های سرطانی به بیمار را افزایش می‌دهد [۱۵، ۱۶]. هم‌چنین در طی انجماد و ذوب بافت تخمدان فاکتورهای زیادی مانند ناتوانی نفوذ ضد یخ به مرکز بافت و تشکیل کریستال یخ و بروز مشکلات اسمزی در طی مراحل انجماد و ذوب می‌تواند باعث تغییرات بسیاری شود

دقیقه به محلول‌های فسفات بافر سالین حاوی ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ مولار ساکارز با فواصل زمانی پنج دقیقه انتقال یافتند. در نهایت تخمدان‌ها جهت حذف محلول ذوب در قطره- α MEM حاوی ۱۰ درصد FBS شسته شده و به قطرات ۲۵ میکرولیتری محیط کشت α -MEM غنی شده با ۱۰ درصد FBS، ۲/۲ گرم در لیتر سدیم بیکربنات، ۲۵ میلی‌مولار HEPES، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر استریتومایسین منتقل شده و در انکوباتور CO₂ به مدت ۲۰ دقیقه به منظور رسیدن به شرایط متعادل نگهداری شدند.

انجماد فولیکول‌های پره‌آنترال با روش Kuwayama و همکاران [۲۱]، با کمی تغییر و با استفاده از حامل کرایوتاپ، محلول تعادلی (۷/۵ درصد EG، ۷/۵ درصد DMSO و ۲۰ درصد FBS) و محلول انجمادی (۱۵ درصد EG، ۱۵ درصد DMSO، سوکروز ۰/۵ مولار و ۲۰ درصد FBS) انجام شد. مدت زمان به تعادل رسیدن برای فولیکول در محیط تعادلی ۳ دقیقه و برای محیط انجمادی ۳۰ ثانیه بود. پس از سپری شدن این مدت بلافاصله فولیکول‌ها با استفاده از پیتی که قسمت راسی آن کشیده شده بود، برداشته شدند و در انتهای نازک نوار کرایوتاپ بارگیری شدند. نهایتاً نمونه‌ها در نیتروژن مایع قرار گرفتند.

ذوب نیز مانند بافت تخمدان بلافاصله پس از خروج از نیتروژن مایع با محلول‌های نزولی فسفات بافر سالین (PBS) محتوی سوکروز ۱، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ مولار سوکروز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. مدت زمان قرار گرفتن فولیکول‌ها در هر یک از محلول‌ها به ترتیب در محلول ۱ مولار ۳۰ ثانیه و در دو محلول بعدی هر کدام برای ۳ دقیقه بود. در نهایت فولیکول‌های پره‌آنترال در محیط کشت α -MEM غنی شده با ۱۰ درصد FBS، ۲/۲ گرم در لیتر سدیم بیکربنات، ۲۵ میلی‌مولار HEPES، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر استریتومایسین شستشو شدند و به و محیط کشت بلوغ منتقل گردیدند.

بلافاصله از بدن خارج شد و برای ادامه آزمایش‌ها در محیط کشت α -MEM غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنینی گاو (FBS)، ۲/۲ گرم در لیتر سدیم بیکربنات، ۲۵ میلی‌مولار HEPES، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر استریتومایسین که از قبل آماده شده بود، قرار داده شدند.

تخمدان‌های موش‌ها در سه گروه مطالعاتی قرار گرفتند (۴ سر موش در هر گروه): گروه اول (کنترل): تخمدان‌های تازه، که بلافاصله فولیکول‌های پره‌آنترال آن‌ها جدا و به محیط کشت منتقل شدند، گروه دوم: تخمدان‌های انجمادی که فولیکول‌های پره‌آنترال آن‌ها پس از انجماد و ذوب تخمدان جدا و به محیط کشت منتقل شدند و گروه سوم: تخمدان‌های تازه‌ای که فولیکول‌های پره‌آنترال آن‌ها جدا و منجمد شدند و پس از ذوب به محیط کشت منتقل گردیدند.

اسازی فولیکول فولیکول‌های پره‌آنترال تخمدان‌ها به روش مکانیکی با کمک سرنگ انسولین مجهز به سوزن با سایز ۲۹G جداسازی شدند. پس از جداسازی، فولیکول‌های با قطر ۱۴۰-۱۶۰ میکرومتر که دارای تخمک مرکزی با ۲-۳ لایه سلول گرانولوزا و سلول‌های تکا برای ادامه آزمایش انتخاب شدند.

انجماد فولیکول‌ها در تخمدان بافت تخمدان با روش Chen و همکاران با کمی تغییر انجام شده است [۲۰]. به طور خلاصه در ابتدا تخمدان‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول تعادلی شامل ۷/۵ درصد اتیلن گلیکول (EG)، ۷/۵ درصد دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) و ۲۰ درصد سرم جنینی گاو (FBS) قرار داده شدند و سپس در محلول انجمادی که حاوی ۱۵ درصد EG، ۱۵ درصد DMSO، ۰/۵ مولار ساکاروز و ۲۰ درصد FBS به مدت ۲ دقیقه قرار داده شد و بلافاصله تخمدان‌ها در حامل کرایویوئال قرار داده شدند و به تانک ازت منتقل شدند.

به منظور ذوب، بافت تخمدان بلافاصله پس از خروج از تانک ازت در محلول ذوب فسفات بافر سالین (PBS) محتوی ۱ مولار ساکارز قرار گرفت. تخمدان‌ها پس از گذشت پنج

یک (MI) و تخمک متافاز دو (MII) بر اساس مورفولوژی طبقه‌بندی شدند. به این ترتیب که تخمک متافاز یک (MI) تخمکی بود که هسته ژمینال وزیکول محو شده بود و تخمک متافاز دو (MII) تخمکی بود که اولین جسم قطبی آن مشخص بود.

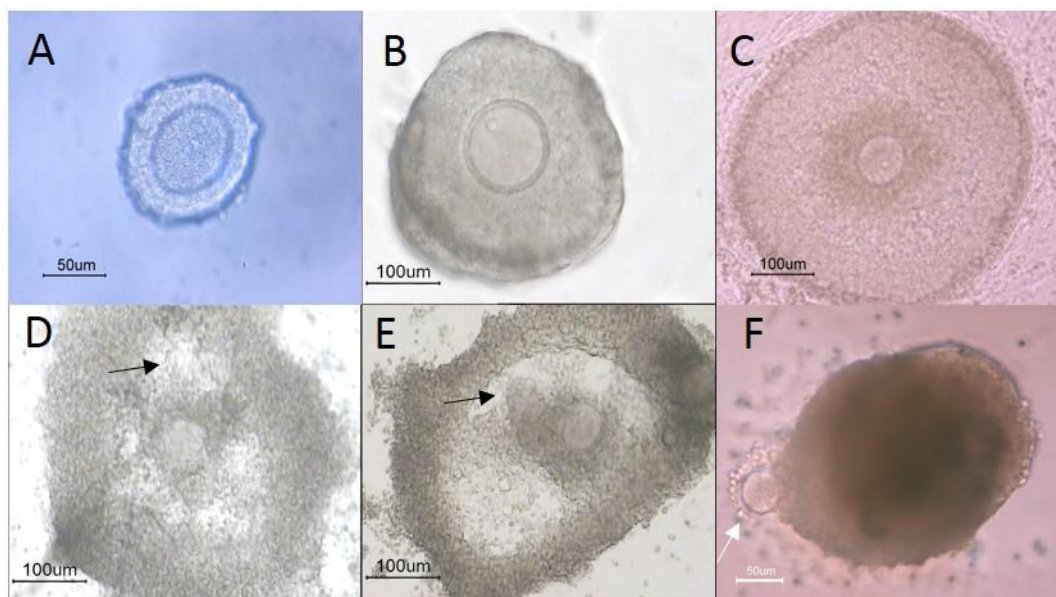
آنالیز آماری آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام گرفت. جهت آنالیز میزان رشد فولیکول‌ها، نرخ بقای فولیکول‌ها، تشکیل حفره آنتروم و تخمک MI و MII از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و تست تکمیلی LSD استفاده شد. $P < 0.05$ به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد. نرخ بقای فولیکول‌ها، تشکیل حفره آنتروم، تخمک‌های MI و MII از تقسیم تعداد آن‌ها به تعداد کل فولیکول‌ها در شروع کشت به صورت درصد محاسبه شد.

نتایج

در روز دوم بعد از شروع کشت به دلیل رشد و تکثیر سلول‌های گرانولوزا، فولیکول‌ها به کف ظرف کشت چسبیده و بی حرکت شدند و بر قطر آن‌ها افزوده شد، میزان این تکثیر در روز چهارم کشت بیش تر شده به طوری که شکل و ظاهر فولیکول را بهم زده و امکان تعیین قطر آن‌ها را بعد از روز چهارم دشوار کرد. روند رشد هم‌چنان ادامه داشت و در روزهای ششم تا هشتم بعد از کشت حفراتی مانند حفره آنتروم در اطراف تخمک نمایان شد که تقریباً از روز دهم بهم پیوسته و حفره واحد آنتروم را تشکیل دادند. علاوه بر این سلول‌های کومولوسی اطراف تخمک نیز به خوبی مشخص بودند. در طی دوره کشت، فولیکول‌هایی با ظاهری طبیعی و رنگ روشن که حاوی تخمک سالم همراه با زوناپلاسدای شفاف بودند، فولیکول سالم محسوب شدند و در غیر این صورت فولیکول دژنره تلقی شدند. بعلاوه هر گونه تغییری از جمله آزاد شدن خود به خودی تخمک، توقف رشد و یا تیره شدن فولیکول‌ها، آن‌ها را در گروه فولیکول‌های دژنره قرار داد.

کشت آیمایه گاهی فولیکول‌ها در آنترال فولیکول‌های پره آنترال منجمد/ذوب شده و فولیکول‌های پره آنترال جدا شده از بافت تخمدان تازه و بافت تخمدان منجمد/ذوب شده در قطره‌ها ۲۵ میکرولیتری از محیط کشت MEM- α غنی شده با ۵ درصد FBS، ۰/۱ واحد در میلی لیتر هورمون محرک فولیکول انسانی (hFSH)، یک درصد انسولین، ترنسفرین و سلنیوم (ITS)، ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، ۲/۲ گرم در لیتر سدیم بیکربات، ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین و ۷۵ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین برای مدت ۱۲ روز در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۹۶ درصد رطوبت و ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند. در طول دوره کشت جهت بررسی شرایط کشت و میزان پیشرفت تکوین فولیکول‌ها، قطر و تغییرات مورفولوژیک بررسی شد.

اندازه گیری قطر فولیکول‌ها اندازه گیری قطر فولیکول‌ها در روزهای شروع کشت (روز صفر)، دوم و چهارم پس از کشت با استفاده از بزرگ‌نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ اینورت (Nikon, Japan) که دارای عدسی چشمی کالیبره بود با تعیین میانگین دو قطر عمود بر هم بر حسب میکرومتر انجام شد. بررسی تغییرات مورفولوژیک و بقاء در طول دوره کشت میزان بقاء فولیکول‌ها مورد بررسی قرار گرفت و فولیکول‌های تیره، فاقد تخمک و یا آن گروهی که توقف رشد داشتند به عنوان فولیکول دژنره محسوب شدند. در طول مدت کشت، تشکیل فضاهای روشن بین سلول‌های گرانولوزای فولیکول به عنوان حفره آنتروم در نظر گرفته شد. و تعداد این فولیکول‌ها نسبت به تعداد کل فولیکول‌ها در شروع کشت محاسبه شد. انتخاب تخمک گذاری القای تخمک گذاری بر اساس روشی صورت گرفت که پیش از این شرح داده شده است [۲۲]. به طور خلاصه، در روز ۱۲، محیط کشت با محیط کشت غنی شده با ۰/۱ واحد در میلی لیتر گنادوتروپین کوریونیک انسان (hCG) تعویض شد. بعد از گذشت ۱۶ تا ۴۸ ساعت میزان تخمک گذاری با میکروسکوپ اینورت (Nikon, Japan) مورد بررسی قرار گرفت و تخمک‌های آزاد شده به تخمک متافاز



شکل ۱. فولیکول پره آنترال در روزهای مختلف کشت آزمایشگاهی: A: روز نخست، B: روز ۲، C: روز ۶، D: روز ۱۰، E: روز ۱۲ و F: روز تخمک گذاری. پیکان مشکی نشان دهنده حفره آنتروم و پیکان سفید نشان دهنده تخمک آزاد شده

(۲۹۰ میکرومتر) به طور معنی داری ($P < 0/05$) بیش تر از دو گروه دیگر بود، در حالی که متوسط قطر فولیکول های پره آنترال منجمد شده (۲۰۴ میکرومتر) نسبت به گروه فولیکول های پره آنترال جدا شده از بافت تخمدان منجمد شده (۱۷۸ میکرومتر) به طور معنی داری بیش تر بود ($P < 0/05$).

در طی دوره ۱۲ روزه کشت، به موازات ثبت و سنجش میزان رشد فولیکول های پره آنترال گروه های آزمایشی، نسبت بقاء، تشکیل حفره آنتروم و بلوغ تخمک ها نیز مورد بررسی قرار گرفت که به طور کامل در جدول ۲ آورده شده است. درصد بقاء فولیکول های پره آنترال در گروه فولیکول های پره آنترال انجمادی با کرایوتاپ و فولیکول های پره آنترال جدا شده از بافت تخمدان منجمد شده به ترتیب: ۵۹ درصد و ۴۸ درصد بود. هر دو گروه از لحاظ آماری با گروه کنترل (۷۵ درصد) تفاوت معنی داری نشان دادند ($P < 0/05$). در حالی که نسبت بقاء فولیکول های پره آنترال منجمد شده با کرایوتاپ از لحاظ آماری نسبت به فولیکول های پره آنترال جدا شده از بافت تخمدان منجمد شده بیش تر بود ($P < 0/05$). هم چنین درصد تشکیل حفره آنتروم در دو گروه مذکور از لحاظ آماری با هم تفاوت داشت ($P < 0/05$). میزان تشکیل

تغییرات قطر فولیکول های پره آنترال هر سه گروه در طی روزهای دوم و چهارم بعد از کشت به تفصیل در جدول ۱ درج شده است. در روز آغازین کشت، قطر متوسط فولیکول های پره آنترال غیر انجمادی (کنترل)، فولیکول های پره آنترال انجمادی و فولیکول های پره آنترال جدا شده از بافت تخمدان منجمد شده به ترتیب ۱۵۴، ۱۵۴ و ۱۵۳ میکرومتر بود که تفاوت معناداری میان گروه های آزمایشی وجود نداشت. در روز دوم بعد از کشت، متوسط قطر فولیکول ها به ترتیب برای، فولیکول های پره آنترال غیر انجمادی (کنترل) ۲۲۹ میکرومتر، فولیکول های پره آنترال انجمادی ۱۷۶ میکرومتر و فولیکول های پره آنترال جدا شده از بافت تخمدان منجمد شده ۱۶۱ میکرومتر بود که میان هر سه گروه از لحاظ آماری تفاوت معناداری وجود داشت ($P < 0/05$) و افزایش قطر در فولیکول های پره آنترال غیر انجمادی (کنترل) به طور معنی داری بیش تر از دو گروه دیگر بود ($P < 0/05$). بعلاوه فولیکول های پره آنترال انجمادی نسبت به فولیکول های پره آنترال جدا شده از بافت تخمدان منجمد شده به طور معنی دار از افزایش قطر بیش تری برخوردار بودند ($P < 0/05$) متوسط قطر فولیکول های پره آنترال گروه کنترل در روز چهارم

بین این دو گروه تفاوت معناداری داری وجود داشت ($P < 0/05$). هر چند درصد تخمک‌های استحصال شده از فولیکول‌های پره‌آنترال منجمد شده با کرایوتاپ از لحاظ آماری نسبت به تخمک‌های استحصال شده از فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از بافت تخمدان منجمد شده بیش‌تر بود ($P < 0/05$) اما درصد تخمک MI استحصال شده از فولیکول‌های جدا شده از بافت تخمدان منجمد از لحاظ آماری نسبت به درصد بلوغ تخمک‌های استحصال شده از فولیکول‌های پره‌آنترال انجامادی تفاوت معنی‌داری نداشت.

حفره آنتروم در گروه فولیکول‌های پره‌آنترال منجمد شده با روش کرایوتاپ (۵۵ درصد) نسبت به میزان تشکیل حفره آنتروم در گروه فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از بافت تخمدان منجمد شده (۴۴ درصد)، به طور معنی‌داری بیش‌تر بود ($P < 0/05$).

میزان بلوغ تخمک‌های استحصال شده از فولیکول‌های پره‌آنترال پس از ۱۲ روز از شروع کشت در گروه‌های مختلف آزمایشی در جدول ۳ درج شده است و به ترتیب در فولیکول‌های پره‌آنترال انجامادی ۲۱ درصد و در فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از بافت تخمدان منجمد شده ۱۴ درصد بود.

جدول ۱. قطر فولیکول‌های پره‌آنترال گروه‌های غیرانجمادی (کنترل)، انجامادی و فولیکول‌های جدا شده از بافت تخمدان منجمد

گروه‌ها	تعداد فولیکول	روز صفر ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	روز دوم ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	روز چهارم ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)
فولیکول پره‌آنترال تازه (کنترل)	۷۸	۱۵۴/۰ ± ۶/۷	۲۲۹/۲ ± ۵۳/۱	۲۹۰/۶ ± ۹۳/۷
فولیکول پره‌آنترال جدا شده از تخمدان منجمد/ذوب شده	۸۷	۱۵۳/۴ ± ۵/۳	۱۶۱/۱ ± ۱۴/۲*	۱۷۸/۷ ± ۱۷/۷*
فولیکول پره‌آنترال منجمد/ذوب شده	۸۳	۱۵۴/۲ ± ۶/۹	۱۷۶/۶ ± ۱۰/۰**	۲۰۴/۴ ± ۱۲/۱**

** بیان‌کننده تفاوت معنی‌داری دار با گروه کنترل ($P < 0/05$). #: بیان‌کننده تفاوت معنی‌داری دار با گروه فولیکول پره‌آنترال جدا شده از تخمدان منجمد/ذوب شده ($P < 0/05$).

جدول ۲. نرخ بقا و مراحل تکوینی فولیکول‌های پره‌آنترال غیرانجمادی (کنترل)، انجامادی و فولیکول‌های جدا شده از بافت تخمدان منجمد

گروه	تعداد کل فولیکول پره‌آنترال	میزان بقا ($\% \pm \text{SD}$)	میزان دژنراسیون ($\% \pm \text{SD}$)	میزان تشکیل حفره آنتروم ($\% \pm \text{SD}$)	تخمک‌گذاری ($\% \pm \text{SD}$)	تخمک MI ($\% \pm \text{SD}$)	تخمک MII ($\% \pm \text{SD}$)
فولیکول پره‌آنترال تازه (کنترل)	۷۸	(۷۵/۷۸ ± ۳/۸۸)	(۲۴/۲۲ ± ۳/۸۸)	(۶۲/۰ ± ۸/۶۹)	(۴۰/۸۹ ± ۵/۱۲)	(۱۱/۵۵ ± ۲/۸۹)	(۳۰/۶۷ ± ۳/۶۵)
فولیکول پره‌آنترال جدا شده از تخمدان منجمد/ذوب شده	۸۷	(۴۸/۸۰ ± ۷/۴۵)*	(۵۱/۲۰ ± ۷/۴۵)*	(۴۴/۶۴ ± ۳/۹۰)*	(۲۰/۷۷ ± ۴/۵۷)*	(۵/۹۴ ± ۳/۹۹)*	(۱۴/۸۲ ± ۱/۴۹)*
فولیکول پره‌آنترال منجمد/ذوب شده	۸۳	(۵۲/۵۶ ± ۸/۰۷)*#	(۴۰/۴۴ ± ۸/۰۷)*#	(۵۵/۲۳ ± ۶/۶۷)*#	(۲۲/۹۵ ± ۲/۹۸)*	(۱/۳۳ ± ۲/۹۸)*	(۲۱/۶۲ ± ۲/۳۱)*#

** بیان‌کننده تفاوت معنی‌داری دار با گروه کنترل ($P < 0/05$). #: بیان‌کننده تفاوت معنی‌داری دار با گروه فولیکول پره‌آنترال جدا شده از تخمدان منجمد/ذوب شده ($P < 0/05$).

جدول ۳. نرخ تخمک‌گذاری و مراحل رشد تخمک‌های رها شده از فولیکول‌های پره‌آنترال غیرانجمادی (کنترل)، انجامادی و فولیکول‌های جدا شده از بافت تخمدان منجمد

گروه	تعداد کل فولیکول پره‌آنترال	تخمک‌گذاری ($\% \pm \text{SD}$)	تخمک MI ($\% \pm \text{SD}$)	تخمک MII ($\% \pm \text{SD}$)
فولیکول پره‌آنترال تازه (کنترل)	۷۸	(۴۰/۸۹ ± ۵/۱۲)	(۱۱/۵۵ ± ۲/۸۹)	(۳۰/۶۷ ± ۳/۶۵)
فولیکول پره‌آنترال جدا شده از تخمدان منجمد/ذوب شده	۸۷	(۲۰/۷۷ ± ۴/۵۷)*	(۵/۹۴ ± ۳/۹۹)*	(۱۴/۸۲ ± ۱/۴۹)*
فولیکول پره‌آنترال منجمد/ذوب شده	۸۳	(۲۲/۹۵ ± ۲/۹۸)*	(۱/۳۳ ± ۲/۹۸)*	(۲۱/۶۲ ± ۲/۳۱)*#

** بیان‌کننده تفاوت معنی‌داری دار با گروه کنترل ($P < 0/05$). #: بیان‌کننده تفاوت معنی‌داری دار با گروه فولیکول پره‌آنترال جدا شده از تخمدان منجمد/ذوب شده ($P < 0/05$).

بحث و نتیجه‌گیری

انجماد بافت تخمدان و فولیکول‌های پره‌آنترال از جمله جدیدترین راه‌کارهای حفظ باروری در زنان و دختران جوانی که به منظور درمان سرطان، در معرض شیمی‌درمانی و یا رادیوتراپی قرار گرفته‌اند، قلمداد می‌شود. از روش‌های مطرح انجماد فولیکول، دو روش محصور در بافت تخمدان (انجماد بافت تخمدان) [۲۴،۲۳] و یا پس از جداسازی مکانیکی و یا آنژیومی از بافت تازه می‌باشد [۲۵]. به هر حال، در هر دو حالت حفظ باروری نیازمند بلوغ در محیط زنده و یا آزمایشگاهی می‌باشد.

فولیکول‌های پستانداران در محاصره بافت استروما تخمدان می‌باشند، از این رو در حین انجماد بافت تخمدان، اولین سلول‌های که در طی انجماد صدمات بیش‌تری را متحمل می‌شوند سلول‌های استروما می‌باشند [۲۶،۲۷]. به همین دلیل انجماد آهسته بافت تخمدان با غلظت‌های کم مواد ضدیخ و سرعت‌های پایین سرد کردن ممکن است روش مناسبی برای بقاء فولیکول‌ها باشد اما به نظر می‌رسد شایستگی لازم برای انجماد بافت قشری تخمدان را دارا نمی‌باشد [۲۴] و با توجه به این که تکنیک انجماد شیشه‌ای توانسته است نسبت به انجماد آهسته نتایج بهتری را برای حفظ تمامیت بافت و ساختار سلولی آن به نمایش بگذارد، آن را به عنوان روشی مناسب برای انجماد بافت تخمدان و فولیکول‌های پره‌آنترال معرفی کرده‌اند [۲۸]. چرا که، فرو بردن مستقیم بافت تخمدان و فولیکول‌ها در نیتروژن مایع، باعث کم شدن حجم مواد ضدیخ می‌شود که به واسطه‌ی آن، عوامل محدودکننده‌ی همچون افزایش سرعت سرد کردن در فرایند انجماد آهسته و میزان سمیت مواد ضدیخ نیز کاهش می‌یابد. از طرف دیگر استفاده از حامل‌های مختلف به این امر کمک بیش‌تری کرده است [۲۰].

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نرخ تکوین فولیکول‌های پره‌آنترال هر دو گروه فولیکول‌های انجمادی/ذوب شده و فولیکول‌های جدا شده از تخمدان منجمد/ذوب شده نسبت به گروه‌های فولیکول‌های تازه (کنترل) کم‌تر بود. این تغییرات و

کاهش نسبت رشد در گروه‌های انجمادی را می‌توان به اثرات القایی انجماد بر فراساختار و شرایط فیزیکی و شیمیایی فولیکول‌ها نسبت داد چرا که مشخص شده است انجماد ویژگی‌های غشاء و پراکسیداسیون لیپیدها را تغییر می‌دهد که به نوبه خود منجر به تخریب تمامیت غشاء و اسکلت سلولی، دپلاریزه شدن میتوکندری‌ها و افزایش تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژنی خواهد شد [۲۹]. در این راستا، حاتمی و همکارانش در آزمایشاتی مشابه، نسبت رشد کم فولیکول‌های جدا شده از بافت تخمدان منجمد شده را به افزایش نسبت گونه‌های واکنشگر اکسیژنی مربوط دانستند [۳۰]. این تغییرات اغلب به دنبال فشار اسمزی اعمال شده در طی آب‌گیری، سرد کردن، آب‌دهی و یا گرم کردن نمونه، رخ می‌دهند و به طور عمده روی فعالیت‌های سیتوپلاسمی مانند عمل‌کرد میتوکندریایی و مسیرهای سیگنالینگ درون سلولی و سیتوپلاسمی تأثیر می‌گذارند. تعداد و توزیع میتوکندری‌ها و هم‌چنین تولید ATP از جمله فاکتورهای حیاتی هستند که نه تنها بلوغ و تکوین تخمک‌ها را متأثر می‌کنند بلکه بر روی لقاح و متعاقباً تکوین جنین‌ها نیز اثر گذارند [۳۱،۳۲] به طوری که هر گونه نقص در ساختار و فعالیت متابولیک میتوکندری‌ها با ناتوانی در بلوغ تخمک و توقف و یا تکوین نا به‌هنجار جنین هم‌راه است [۳۲]. داده‌ها نشان می‌دهند که انجماد شیشه‌ای بر توزیع میتوکندری‌های سلول تخم موش و تخمک‌های مرحله MII اثر داشته و ترکیبات تکوینی آن‌ها را کاهش می‌دهد [۳۳،۳۴]. Wang نیز معتقد است که قرار گرفتن سلول‌های منجمد در شرایط فقدان اکسیژن تولید بالای الکترون و در نهایت ROS را در پی دارد [۳۵]. Rahimi نیز در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۳ داشت، بیان می‌کند که انجماد بافت تخمدان منجر به افزایش جزئی در سطح ROS و آپاپتوز بعد از گرم کردن، خواهد شد [۲۹].

بعلاوه نتایج این تحقیق نشان داد که انجماد فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان موش در مقایسه با آن دسته که از بافت تخمدان منجمد شده جدا شده بودند با توجه به بهبود میزان رشد، بقای فولیکول، تشکیل آنتروم و میزان بلوغ

تکونین آزمایشگاهی فولیکول را به تأخیر اندازد [۲]. زیرا سلول‌های گرانولوزا در انتهای دوره‌ی کشت فولیکول‌های جدا شده از بافت تخمدان منجمد کم‌تر بوده و از آن جایی که تعداد و کافی بودن سلول گرانولوزا برای تکونین مناسب فولیکول‌ها ضروری است. این خود می‌تواند دلیلی برای تأخیر تکونین فولیکول‌های جدا شده از بافت تخمدان منجمد باشد [۲-۴].

با توجه به یافته‌های به دست آمده از تحقیق حاضر مشخص شد که انجماد فولیکول‌های پره‌آنترال روشی موثرتری در استحصال تخمک نسبت به انجماد کل بافت تخمدان می‌باشد چرا که بقای فولیکول، تشکیل حفره آنتروم و میزان تکونین تخمک در این روش بیش‌تر از انجماد کل بافت تخمدان می‌باشد. پیشنهاد می‌شود به منظور مشخص شدن مکانیسم‌های دخیل در کاهش تکونین فولیکول‌های استحصال شده از تخمدان منجمد/ ذوب، تغییرات پروفایل اکسیداتیو، فراساختار فولیکول‌ها و فرایندهای آپوتوز بررسی گردد.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه علوم پایه دامغان بابت حمایت از این طرح تشکر می‌شود.

منابع

- [1] Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O, Flamigni C. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 1997; 68: 724-726.
- [2] Choi J, Lee B, Lee E, Yoon BK, Bae D, Choi D. Cryopreservation of ovarian tissues temporarily suppresses the proliferation of granulosa cells in mouse preantral follicles. *Cryobiology* 2008; 56: 36-42.
- [3] Choi J, Lee Jy, Lee E, Yoon BK, Bae D, Choi D. Cryopreservation of the mouse ovary inhibits the onset of primordial follicle development. *Cryobiology* 2007; 54: 55-62.
- [4] Choi WJ, Yeo HJ, Shin JK, Lee S, Lee JH, Paik WY. Effect of vitrification method on survivability, follicular growth and ovulation of preantral follicles in mice. *J Obstet Gynaecology Res* 2007; 33: 128-133.
- [5] Amorim CA, Gonçalves PB, Figueiredo JR. Cryopreservation of oocytes from pre-antral follicles. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 119-129.
- [6] Son WY, Yoon SH, Park SJ, Yoon HJ, Lee WD, Lim JH. Ongoing twin pregnancy after vitrification of blastocysts produced by in-vitro matured oocytes retrieved from a woman with polycystic ovary syndrome: case report. *Human Reprod* 2002; 17: 2963-2966.

تخمک موثرتر می‌باشد. این تفاوت را می‌توان به تفاوت ویژگی‌های مورفولوژیکی و کرایوبیولوژی آن‌ها نسبت داد. به نظر می‌رسد که انجماد بافت تخمدان در مقایسه با انجماد فولیکول‌های پره‌آنترال با برخی از موانع مانند نسبت حجم بالا به سطح پایین کل تخمدان مواجه است که باعث می‌شود میزان انجماد و ذوب آن کم‌تر موفق باشد [۳۶]. این ویژگی باعث می‌شود که انتقال دما به قسمت‌های مرکزی تخمدان به آرامی صورت گیرد و به نوبه‌ی خود باعث افزایش احتمال تشکیل کریستال یخ و آسیب‌های شدید شود [۳۷]. علاوه بر این، از آن جایی که در بافت تخمدان فولیکول‌های تکامل یافته‌تر مانند فولیکول پره‌آنترال در نقاط عمیق‌تر بافت قرار گرفته و مدت زمان مواجه با مواد ضدیخ نیز محدود می‌باشد، انتشار این مواد به عمق و کل بافت همگن نبوده و فولیکول‌های بخش عمقی در معرض آسیب‌های انجمادی قرار خواهند گرفت و مهم‌تر این که همین پیچیدگی ساختار بافتی تخمدان نسبت به فولیکول‌ها، توانایی نفوذ مواد ضدیخ به بافت، حرکت آب در طی آگیری و یا آب‌دهی سلولی و یا حذف ضدیخ‌ها به هنگام رقیق‌سازی را متأثر می‌نماید [۴،۳]. بنابراین ضخامت بافت تخمدان از نفوذ مواد ضدیخ به کل بافت تخمدان در مدت زمانی که در معرض محلول تعادلی و انجمادی قرار می‌گیرد، جلوگیری می‌کند و در نتیجه باعث تشکیل یخ می‌شود. به منظور غلبه بر این مشکل، زمان قرار گرفتن در محلول تعادلی و انجمادی باید افزایش یابد که به نوبه‌ی خود باعث مسمومیت در بخش سطحی می‌شود. هم‌چنین بافت تخمدان از انواع سلول‌های هتروژنی تشکیل شده که رفتارهای متفاوتی نسبت به نفوذ مواد ضدیخ و انجماد از خود نشان می‌دهند [۳۸]. در راستای نتایج مطالعه حاضر، Choi و همکاران معتقد هستند که زیست‌پذیری فولیکول‌ها ارتباط مستقیمی با غلظت و دمای محلول انجمادی و هم‌چنین مدت زمان مواجه شدن با محلول‌های انجمادی دارد [۴،۳]. هم‌چنین مشخص شده است که انجماد بافت تخمدان می‌تواند تکثیر سلول‌های گرانولوزا را از طریق تنظیم‌کنندگان چرخه سلولی و یا مرگ اولیه سلول‌ها پس از ذوب به طور آنی متوقف کند و

glutathione peroxide activity. *Hum Reprod* 2010; 25: 977-985.

[23] Gook DA, Edgar D, Stern C. Cryopreservation of human ovarian tissue. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 113: S41-S44.

[24] Gook DA, Edgar D, Stern C. The effects of cryopreservation regimens on the morphology of human ovarian tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169: 99-103.

[25] Eimani H, Behbahanian A, Zeinali B, Valoujerdi MR, Eftekhari P, Shahverdi A, et al. Heterotopic autotransplantation of vitrified mouse ovary. *Reprod Med Biol* 2011; 10: 267-275.

[26] Kim SS, Battaglia DE, Soules MR. The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: fertility and beyond. *Fertil Steril* 2001; 75: 1049-1056.

[27] Kim SS, Yang HW, Kang HG, Lee HH, Lee HC, Ko DS, Gosden RG. Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. *Fertil Steril* 2004; 82: 679-685.

[28] Dahl SL, Chen Z, Solan AK, Brockbank KG, Niklason LE, Song YC. Feasibility of vitrification as a storage method for tissue-engineered blood vessels. *Tissue Eng* 2006; 12: 291-300.

[29] Rahimi G, Isachenko E, Sauer H, Isachenko V, Wartenberg M, Hescheler J, et al. Effect of different vitrification protocols for human ovarian tissue on reactive oxygen species and apoptosis. *Reprod Fertil Dev* 2003; 15: 343-349.

[30] Hatami S, Zavareh S, Salehnia M, Lashkarbolouki T, Ghorbanian MT, Karimi I. The impact of alpha lipoic acid on developmental competence of mouse vitrified pre-antral follicles in comparison to those isolated from vitrified ovaries. *Iranian J Reprod Med* 2014; 12: 57.

[31] Wang LY, Wang DH, Zou XY, Xu CM. Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *J Zhejiang Univ Sci B* 2009; 10: 483-492.

[32] De los Reyes M, Palomino J, Parraguez VH, Hidalgo M, Saffie P. Mitochondrial distribution and meiotic progression in canine oocytes during in vivo and in vitro maturation. *Theriogenology* 2011; 75: 346-353.

[33] Brenner CA, Kubisch HM, Pierce KE. Role of the mitochondrial genome in assisted reproductive technologies and embryonic stem cell-based therapeutic cloning. *Reprod Fertil Dev* 2004; 16: 743-751.

[34] Nagai S, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Kasai T, Yokota S, et al. Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. *Tohoku J Exp Med* 2006; 210: 137-144.

[35] Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, Anderson DJ, Loughlin KR. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* 1997; 49: 921-925.

[36] Taghavi A, Voloojerdi R, Foroozandeh M. Comparison of apoptosis, viability and maturation in mouse preantral follicle after slow freezing and cryotop vitrification. *Tehran Tarbiat Modares* 2009. (Persian).

[37] Huang L, Mo Y, Wang W, Li Y, Zhang Q, Yang D. Cryopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; 139: 193-198.

[38] Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online* 2004; 9: 680-691.

[7] Mathias FJ, D'Souza F, Uppangala S, Salian SR, Kalthur G, Adiga SK. Ovarian tissue vitrification is more efficient than slow freezing in protecting oocyte and granulosa cell DNA integrity. *Syst Biol Reprod Med* 2014; 60: 317-322.

[8] Kagabu S, Umezu M. Transplantation of cryopreserved mouse, Chinese hamster, rabbit, Japanese monkey and rat ovaries into rat recipients. *Exp Anim* 2000; 49: 17-21.

[9] Pegg D. The current status of tissue cryopreservation. *Cryo Lett* 2000; 22: 105-114.

[10] Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Krivokharchenko A, Alabart J, Nawroth F. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen: negative effect of disaccharides in vitrification solution. *Cryo Lett* 2002; 23: 333-344.

[11] Oktay K, Karlikaya GG, Aydin BA. Ovarian cryopreservation and transplantation: basic aspects. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169: 105-108.

[12] Oktay K, Oktem O. Ovarian cryopreservation and transplantation for fertility preservation for medical indications: report of an ongoing experience. *Fertil Steril* 2010; 93: 762-768.

[13] Shaw J, Cox S-L, Trounson A, Jenkin G. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 161: 103-110.

[14] Shaw J, Oranratnachai A, Trounson A. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 2000; 53: 59-72.

[15] Shaw JM, Bowles J, Koopman P, Wood EC, Trounson AO. Fresh and cryopreserved ovarian tissue samples from donors with lymphoma transmit the cancer to graft recipients. *Hum Reprod* 1996; 11: 1668-1673.

[16] Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *The Oncologist* 2007; 12: 1437-1442.

[17] Paynter S, Cooper A, Fuller B, Shaw R. Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture in vitro. *Cryobiology* 1999; 38: 301-309.

[18] Salle B, Demirci B, Franck M, Berthollet C, Lornage J. Long-term follow-up of cryopreserved hemiovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. *Fertil Steril* 2003; 80: 172-177.

[19] Silber S, DeRosa M, Pineda Je, Lenahan K, Grenia D, Gorman K, Gosden R. A series of monozygotic twins discordant for ovarian failure: ovary transplantation (cortical versus microvascular) and cryopreservation. *Hum Reprod* 2008; 23: 1531-1537.

[20] Chen SU, Chien CL, Wu MY, Chen TH, Lai SM, Lin CW, Yang YS. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. *Hum Reprod* 2006; 21: 2794-2800.

[21] Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 2007; 67: 73-80.

[22] Abedelahi A, Salehnia M, Allameh AA, Davoodi D. Sodium selenite improves the in vitro follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and

The comparison of developed mouse vitrified preantral follicle with isolated preantral follicles from vitrified ovary

Elmira Hosseinzade (M.Sc), Saeed Zavareh (Ph.D)*, Taghi Lashkarboluki (Ph.D)
School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran

(Received: 15 Mar 2015; Accepted: 30 Dec 2015)

Introduction: Cryopreservation techniques are useful methods for long-term storage of cells and tissues of the reproductive system. The purpose of this study was to investigate the development and survival rate of vitrified preantral follicles compare with those of isolated preantral follicles from vitrified ovaries.

Materials and methods: Preantral follicles of 14 to 16 days-old of NMRI mice ovaries were randomly divided into three groups. Group I: preantral follicles derived from fresh ovaries (control). Group II: preantral follicles derived from vitrified ovaries and group 3: vitrified preantral follicles. After thawing, preantral follicles were cultured in α - MEM medium containing 5% FBS, 100 mIU/ml hFSH, 1% ITS and 10 ng/ml EGF. At the day 12 of culture, ovulation was induced by adding 1.5 IU/ml hCG. The preantral follicle diameter and the rates of survival, antrum formation and developmental stages of released oocytes were evaluated.

Results: The results showed that the survival rate of vitrified preantral follicles was significantly higher than that of isolated preantral follicle from vitrified ovaries. The mean diameter of preantral follicles, the rates of antrum formation and MII stage oocytes in vitrified preantral follicles were significantly higher than those of isolated preantral follicles from vitrified ovaries.

Conclusion: Vitrified preantral follicles were more suitable to develop to mature oocytes in comparison with isolated preantral follicles from vitrified ovaries.

Keywords: Vitrification, Ovarian Follicle, Ovary

* Corresponding author. Tel: +98 23 35220223
zavareh.s@du.ac.ir