Archive of SID

ISSN: 2538-5887; Pathobiology Research. 2019;22(3):149-157

Germ cells Markers Expression in Mouse Premature Ovarian Failure Model

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Abedi Ghehi F.[1] *MSc*
Fathi R.*[1] *PhD,*
Abtahi N.S.[1] *MSc,*
Eivazkhani F.[1] *MSc,*
Bahrehbar Kh.1 *MSc,*
Abed Heidari E.[1] *MSc,*
Tavana S.[1] *PhD,*
Rashki Ghaleno L.[1] *MSc,*
Eimani H.[1] *PhD,*
Montazeri L.[2] *PhD*

How to cite this article
Abedi Ghehi F, Fathi R, Abtahi N.S, Eivazkhani F, Bahrehbar Kh, Abed Heidari E, Tavana S, Rashki Ghaleno L, Eimani H, Montazeri L. Germ cells Markers Expression in Mouse Premature Ovarian Failure Model. Pathobiology Research. 2019;22(3):149-157.

[1]Embryology Department, Reproductive Biomedicine Research Center, Institute for Biology & Reproductive Medicine, Royan Institute, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran
[2]Stem Cells & Developmental Biology Department, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology & Technology, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran

**Correspondence*
Address: Embryology Department, Reproductive Biomedicine Research Center, Institute for Biology & Reproductive Medicine, Royan Institute, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Hafez Alley, Bani Hashen Street, Resalat Street, .Tehran, Iran. Postal Code: 1665659911
Phone: +98 (21) 23562735
Fax: +98 (21) 22306481
rfathi79@royaninstitute.org

Article History
Received: January 27, 2019
Accepted: July 12, 2019
ePublished: August 21, 2019

ABSTRACT

Aims Premature ovarian failure is a syndrome causing amenorrhea, infertility, and increases gonadotropin levels before age 40. The use of chemotherapy drugs can be one of the reasons that lead to this disorder. The purpose of this study was to evaluate the presence of germ cells markers in mice model of premature ovarian failure following chemotherapy drugs.

Materials and Methods In this study, 24 mature female mice were used to create a premature ovarian failure model, different amount of cyclophosphamide and busulfan were applied (experimental groups 1 to 5). Bodyweight change, vaginal smear, morphological alternation of ovarian tissue in both experimental and control (without treatment) groups were evaluated and for the best model, hormonal evaluation (FSH, E2), and expression of germline markers (Oct4, Dazl) were examined.

Findings Since, in the second group estrus cycle disorder, the significant decrease in weight and ovarian reserve ($p<0.05$) were observed, compared to the control group, so this group was chosen as the best model. An increase in FSH level and reduction in estradiol level in the second group, compared with the control group ($p<0.05$), confirmed creation of the POF model. Also, genes expression of Oct-4 and Dazl showed an increase ($p<0.05$) in the second group compared with the control one.

Conclusion:The presence of germ cells markers in a mouse model of premature ovarian failure following the use of chemotherapy drugs can be a new hope in the treatment of infertility in cancer patients after chemotherapy.

Keywords Premature Ovarian Failure; Ovarian Reserve; Chemotherapy; Germ Line

CITATION LINKS

[1] Primary ovarian insufficiency: A more accurate term for premature ... [2] Spontaneous premature ovarian failure: Management ... [3] FSH-FSHR3-Stem cells in ovary surface epithelium: Basis for adult ovarian biology, failure ... [4] Premature ovarian ... [5] Premature ovarian failure: A growing ... [6] Human endometrial mesenchymal stem cells restore ... [7] Reduced ovarian function in long-term survivors of ... [8] Premature ovarian failure and its consequences: Vasomotor symptoms, ... [9] Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ... [10] Morphometric study of the human neonatal ... [11] Acute ovarian failure in the childhood cancer survivor ... [12] Female fertility loss and preservation: Threats and ... [13] Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries ... [14] Toxicity of chemotherapy and radiation on female ... [15] Cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil versus dose ... [16] Gonadal function and fertility in survivors after Hodgkin lymphoma ... [17] Methanolic extract of Curcuma caesia ... [18] Ferulic acid against cyclophosphamide-induced heart toxicity in mice by ... [19] Sphingosine-1-phosphate prevents chemotherapy-induced ... [20] Preservation of fertility and ovarian function and ... [21] Assessing reproductive status/stages ... [22] Hyaluronic acid-based hydrogel scaffold without angiogenic growth ... [23] Premature menopause in a multi-ethnic population study of ... [24] Human umbilical cord mesenchymal stem cells therapy in cyclophosphamide ... [25] Role of SDF-1/CXCR4 and cytokines in the development of ovary injury in ... [26] Primary ovarian ... [27] Premature ovarian failure ... [28] The ovarian response to standard gonadotrophin stimulation depends on FSHR ... [29] Female reproductive ageing: Current knowledge and future ... [30] Gonadotropins enhance caspase-3 and-7 activity and apoptosis ... [31] A data integration approach to mapping OCT4 gene regulatory networks ... [32] Stem cell pluripotency and transcription ... [33] Octamer 4 (Oct4) mediates chemotherapeutic drug resistance in liver ... [34] Chemotherapeutics-induced Oct4 expression contributes to drug ... [35] Aged mouse ovaries possess rare premeiotic germ cells that can ...

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

بیان عوامل سلول‌های زایا در مدل نارسایی زودرس تخمدان موش

فاطمه عابدی‌قهی MSc
گروه جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل، پژوهشگاه رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
روح‌الله فتحی* PhD
گروه جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل، پژوهشگاه رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
نعیمه‌السادات ابطحی MSc
گروه جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل، پژوهشگاه رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
فریده عیوض‌خانی MSc
گروه جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل، پژوهشگاه رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
خدیجه بهره‌بر MSc
گروه جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل، پژوهشگاه رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
الهام عابدحیدری MSc
گروه جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل، پژوهشگاه رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
سمیه توانا PhD
گروه جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل، پژوهشگاه رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
لیلا راشکی‌قلعه‌نو MSc
گروه جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل، پژوهشگاه رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
حسین ایمانی PhD
گروه جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل، پژوهشگاه رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
لیلا منتظری PhD
گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده بیولوژی و فناوری سلول‌های بنیادی رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

چکیده

اهدف: نارسایی زودرس تخمدان عارضه‌ای است که منجر به آمنوره، ناباروری و افزایش سطح گنادوتروپین قبل از سن ۴۰ سالگی می‌شود. به‌کارگیری داروهای شیمی‌درمانی می‌تواند یکی از عوامل ایجاد این اختلال باشد. هدف از این مطالعه بررسی حضور سلول‌های زایا در موش‌های مدل نارسایی زودرس تخمدان به دنبال استفاده از داروهای شیمی‌درمانی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از ۲۴ سر موش ماده بالغ برای ایجاد مدل نارسایی زودرس تخمدان و از مقادیر مختلف سیکلوفسفامید و بیوسولفان (گروه‌های آزمایشی یک تا پنج) استفاده شد. تغییرات وزن بدن، اسمیر واژن، تغییرات ساختاری بافت تخمدان در همه گروه‌های آزمایشی و گروه کنترل (بدون دریافت دارو) بررسی و بهترین مدل، تحت ارزیابی‌های هورمونی (FSH و استرادیول) و بیان عامل‌های سلول زایا (*Oct-4* و *Dazl*) قرار گرفت.

یافته‌ها: از آنجایی که در گروه دوم اختلال در چرخه استروس و کاهش معنی‌دار در متغیرهای وزن و ذخیره تخمدانی ($p<0/05$) نسبت به گروه کنترل مشاهده شد، بنابراین این گروه به‌عنوان بهترین مدل انتخاب شد. افزایش سطح FSH و کاهش سطح استرادیول در گروه دوم نسبت به گروه کنترل ($p<0/05$) نیز تاییدی بر ایجاد مدل POF بود. همچنین بیان ژن‌های *Oct-4* و *Dazl* در گروه دوم نسبت به گروه کنترل افزایش ($p<0/05$) نشان داد.

نتیجه‌گیری: حضور عوامل سلول‌های زایا در مدل نارسایی زودرس تخمدان موش به دنبال استفاده از داروهای شیمی‌درمانی می‌تواند امید تازه‌ای در درمان ناباروری بیماران مبتلا به سرطان پس از شیمی‌درمانی باشد.

کلیدواژه‌ها: نارسایی زودرس تخمدان، ذخیره تخمدان، شیمی‌درمانی، رده زایا

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۲۱
*نویسنده مسئول: rfathi79@royaninstitute.org

مقدمه

تخمدان یکی از ارگان‌های درون‌ریز سیستم تولیدمثل زنان است که با تولید هورمون‌های استروئیدی و پپتیدی لازم، در شروع و تداوم بلوغ و ورود به چرخه قاعدگی نقش مهمی ایفا می‌کند. بافت‌هایی همچون استخوان، پوست، پستان، عروق و بافت غدد درون‌ریز فرعی به‌طور قابل توجهی تحت تاثیر هورمون‌های تخمدان قرار می‌گیرند[1, 2]. نارسایی زودرس بافت تخمدان (POF) نقص اولیه تخمدانی است که در بسیاری از زنان قبل از سن ۴۰سالگی رخ می‌دهد[3, 4]. این در حالی است که یک نفر از ۱۰۰۰ زن بین سنین ۱۵ تا ۲۹سالگی و یک از ۱۰۰ نفر بین سنین ۳۰ تا ۳۹سالگی دستخوش نارسایی زودرس تخمدان می‌شوند. اخیراً یافته‌ها حاکی از آن است که این بیماری در جمعیت بسیار جوان‌تری در حال رخ‌دادن است[5] و ممکن است بر اثر عوامل مختلفی از جمله اتوایمنی، عفونت، عوامل سمی، دارو و نقص ژنتیکی، و غیره ایجاد شود. مطالعات اخیر نشان می‌دهند درمان سرطان با استفاده از داروهای شیمیایی می‌تواند منجر به POF شود[6]. شیمی‌درمانی و پرتودرمانی منجر به ازبین‌رفتن فولیکول و تخمک شده و باعث کاهش باروری و ایجاد یائسگی زودرس[7] که خود ممکن است با داروهای شیمی‌درمانی در بیماران سرطانی مرتبط باشد[8]. به‌علت تعداد محدودی از سلول‌های بنیادی تجدیدپذیر، تخمدان به تاثیرات نامطلوب شیمی‌درمانی و اشعه بسیار حساس است[9, 10]. طول عمر باروری زن توسط ذخیره فولیکولی تعیین می‌شود و عوامل شیمی‌درمانی باعث کاهش تعداد فولیکول‌های تخمدانی می‌شود. عوامل آلکالین و حالت پرتوافکنی لگن بیشترین خطر را روی عملکرد تخمدان دارند[11]. نارسایی تخمدان ناشی از شیمی‌درمانی عمدتاً از طریق جلوگیری از تقسیم سلولی و مهار عملکرد DNA است که می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های پیش‌گرانولوزا ایجاد کند و باعث آسیب‌رساندن به اجزای استرومایی تخمدان و منجر به نقص زودرس و قابل برگشت فولیکول‌های اولیه در حال استراحت شود[12]. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که عوامل آلکالین‌کننده می‌توانند باعث فیبروزشدن قشر تخمدان، آسیب به رگ‌های خونی و کاهش شدید فولیکول‌های اولیه شوند (که به نظر می‌رسد باعث ازبین‌رفتن عملکردهای ضروری سلول می‌شود) [13]. همچنین عوامل آلکالینی از تکثیر سلول‌های گرانولوزا با ایجاد آپوپتوز در آنها جلوگیری می‌کند[14]. سیکلوفسفامید (CTX) یکی از این عوامل آلکالینی است که معمولاً در درمان بسیاری از انواع تومورهای بدخیم مانند بیماری هوچکین و سرطان پستان مورد استفاده قرار می‌گیرد[15, 16]. به‌رغم استفاده کاربردی از CTX، اثرات جانبی آن نیز گزارش شده است. درمان با CTX می‌تواند موجب آسیب به کلیه‌ها، اثرات قلبی عروقی حاد و سرکوب مغز استخوان شود[17, 18]. CTX منجر به سمیت سلولی شده و از این طریق شکست DNA را تحریک می‌کند[19]. بنابراین کاهش تعداد فوکیلول‌ها و عملکرد تخمدان افراد تحت درمان با CTX مشاهده شده است[20].

هدف از این مطالعه بررسی تاثیرات داروهای شیمی‌درمانی سیکلوفسفامید و بیوسولفان روی ذخیره بافت تخمدان و بیان عامل‌های رده زایا بوده که دستیابی به این اهداف با ارزیابی تغییرات وزن بدن، تهیه نمونه اسمیر مایع واژن، ارزیابی بافت‌شناسی به‌منظور شمارش فولیکولی، ارزیابی سطح سرمی هورمون‌های استرادیول (E2) و محرک فولیکولی (FSH) و همچنین بررسی بیان ژن‌های رده زایا (*Oct4, Blimp1*) و شاخص‌های تخمک (*Gdf9,Dazl*) صورت گرفته است.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

حیوانات و گروه‌های آزمایشی: در این مطالعه از موش‌های بالغ ماده نژاد NMRI با سن ۶ تا ۸هفته‌ای که در آزمایشگاه بخش حیوانات آزمایشگاهی پژوهشگاه رویان با شرایط نگهداری مناسب از نظر نور، ۱۲ساعت روشنایی و ۱۲ساعت تاریکی و دمای ۲۰°C تا ۲۵°C و رطوبت ۶۰%-۴۰% برخوردار بودند، استفاده شد. موش‌ها، برای ایجاد بهترین مدل (مدل‌سازی POF)، در ۵ گروه آزمایشی و یک گروه کنترل و در هر گروه تعداد ۴ سر موش (برای ارزیابی بافت‌شناسی) تقسیم شدند. گروه‌های آزمایشی براساس مقادیر مختلف داروهای شیمی‌درمانی سیکلوفسفامید و بیوسولفان انتخاب و به‌مدت دو هفته به‌صورت تزریق درون‌صفاقی دریافت نمودند: گروه اول) تزریق ۷۵میلی‌گرم/کیلوگرم سیکلوفسفامید به‌مدت چهارده روز؛ گروه دوم) تزریق ۱۰۰میلی‌گرم/کیلوگرم سیکلوفسفامید به‌مدت چهارده روز؛ گروه سوم) تزریق ۱۰۰میلی‌گرم/کیلوگرم سیکلوفسفامید روز اول و ۲۰میلی‌گرم/کیلوگرم روزانه تا چهارده روز؛ گروه چهارم) تزریق ۱۰۰میلی‌گرم/کیلوگرم سیکلوفسفامید در روز اول و ۵۰میلی‌گرم/کیلوگرم بیوسولفان روزانه تا چهارده روز و گروه پنجم) تزریق ۷۵میلی‌گرم/کیلوگرم سیکلوفسفامید و ۳۰میلی‌گرم/کیلوگرم بیوسولفان هر روز به‌مدت چهارده روز. گروهی که تحت تیمار با داروهای شیمی‌درمانی قرار نمی‌گرفتند، به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. قبل از شروع تزریق سه چرخه استروس و وزن آنها به‌منظور بررسی تغییرات پس از شیمی‌درمانی در تمام گروه‌ها ثبت شد. پس از آن تزریق داروهای شیمی‌درمانی سیکلوفسفامید و بیوسولفان به‌مدت دو هفته طبق گروه‌بندی صورت گرفت. پس از دو هفته تزریق وزن موش‌ها مجدد ثبت و چرخه استروس آنها بررسی شد. همچنین خون‌گیری از قلب انجام شده و با استفاده از سانتریفیوژ جداسازی سرم صورت گرفت و به‌منظور ارزیابی‌های هورمونی در دمای ۸۰°C- قرار داده شدند. بافت تخمدان نیز پس از دو هفته برای ارزیابی بافت‌شناسی و شمارش فولیکولی در محلول فرمالین ۱۰% تثبیت شد. در آخر، ارزیابی‌های هورمونی و بیان ژن سلول‌های زایا و تخمک با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی (Real-Time PCR) در گروه کنترل (۵ سر موش) گروهی که به‌عنوان مدل موفق POF در نظر گرفته شد (گروه دوم: ۵ سر موش)، صورت گرفت.

تهیه نمونه اسمیر از واژن موش: موش‌های مورد نظر به‌منظور حذف استرس ناشی از نقل و انتقال در حیوان‌خانه به‌مدت ۳ تا ۴ روز نگهداری شدند. دو هفته قبل از تزریق داروهای شیمی‌درمانی، بین ساعات ۸ تا ۱۰ صبح، اسمیر واژن از حیوانات گرفته شد. به این ترتیب که به کمک سرسمپلر استریل، ۵۰میکرولیتر نرمال سالین ۰/۹% استریل با دمای ۳۷°C به داخل واژن موش‌ها به‌آرامی تزریق و پس از سه‌بار پیپتاژ، نمونه‌ها روی اسلاید شیشه‌ای قرار داده شد و لامل روی آنها قرار گرفت و در زیر میکروسکوپ در حالی که کندانسور بسته بود با بزرگ‌نمایی ۴۰۰x مشاهده شد. چرخه تولیدمثلی یا استروس در موش‌ها ۴ تا ۵ روز به طول می‌انجامد و شامل ۴ مرحله است که شامل پرواستروس، استروس، مت‌استروس، و دی استروس هستند. در اسمیر واژن در مرحله پرواستروس سلول‌های گرد هسته‌دار بیشتر مشاهده می‌شود. در مرحله استروس اغلب سلول‌های قابل مشاهده زیر میکروسکوپ، سلول‌های بدون هسته شاخی است. در مرحله مت‌استروس جمعیت یکسانی از سه نوع سلول اپیتلیالی هسته‌دار، سلول شاخی و لکوسیت‌ها دیده می‌شوند و در مرحله دی‌استروس غالب سلول‌ها لوکوسیت‌ها هستند[21]. به این ترتیب چرخه تولیدمثلی هر موش به‌صورت روزانه تا دو هفته قبل و پس از شروع تزریق ثبت شد.

ارزیابی‌های بافت‌شناسی: موش‌ها پس از دو هفته تزریق داروی شیمی‌درمانی، با ترکیب داروهای کتامین و زایلازین بی‌هوش شدند، تخمدان‌ها ابتدا یک روز در بوئن و سپس در فرمالین به‌مدت دو روز تثبیت شده و سپس طی فرآیند بافت‌شناسی، تحت آب‌گیری قرار گرفته و به‌وسیله پارافین مایع قالب‌گیری شدند. سپس قالب‌های بافت تخمدان، به‌صورت متوالی و با ضخامت ۵میکرومتر قطع زده شد و قطعات به‌طور کامل (از ابتدا تا انتهای بافت)، روی لام آغشته به چسب آلبومین قرار داده شدند. سپس قطعات بافت تخمدان با روش هماتوکسیلین و اِئوزین[22] رنگ‌آمیزی شده و به لحاظ ساختاری و تعداد فولیکول‌های زنده و مرده زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. برای جلوگیری از شمارش فولیکول بیش از یک‌بار، مشاهده هسته تخمک در هر فولیکول به‌عنوان شاخص شمارش در نظر گرفته شد. برای بررسی مورفولوژی فولیکول‌ها از بزرگ‌نمایی ۴۰۰X و ۱۰۰۰X، همچنین برای شمارش فولیکول‌ها از بزرگ‌نمایی ۴۰۰X استفاده شد. براساس مورفولوژی، می‌توان فولیکول‌های سالم و صدمه‌دیده را از یکدیگر تشخیص داد. فولیکول‌های سالم دارای سلول‌های گرانولوزای فعال با رنگ‌پذیری طبیعی بوده که به‌صورت فشرده در کنار هم قرار گرفته و به تخمک با سیتوپلاسم شفاف، اتصال داشتند و به‌ندرت سلول‌های گرانولوزای جداشده با هسته پیکنوتیک در آنها دیده می‌شد. فولیکول‌هایی مرده در نظر گرفته می‌شدند که سیتوپلاسم تخمک تیره و چروکیده شده و سلول‌های گرانولوزای آن دارای هسته‌های پیکنوتیک بودند. هسته تخمک دژنره و فشرده شده و شدیداً رنگ‌پذیر (بازوفیلیک) بودند. طبقه‌بندی فولیکول‌های تخمدان بدین‌ترتیب بود که فولیکول بدوی به فولیکولی اطلاق می‌شود که تخمک فاقد زوناپلوسیدا توسط یک لایه سلول‌های پیش‌گرانولوزای پهن سنگفرشی احاطه شده باشد. فولیکول پرایمری، تخمک به‌وسیله یک لایه از سلول‌های گرانولوزای مکعبی‌شکل احاطه شده است. در فولیکول پرآنترال، تخمک‌ها به‌وسیله دو یا چند لایه از سلول‌های گرانولوزای احاطه شده و در مورد فولیکول آنترال تخمک‌ها به‌وسیله دو لایه یا بیشتر از سلول‌های گرانولوزا همراه با حفره آنتروم احاطه شده‌اند[22].

اندازه‌گیری هورمون استرادیول و FSH: پس از اتمام دوره تزریق داروهای شیمی‌درمانی، حیوان بیهوش شده و به‌منظور تهیه سرم به‌منظور اندازه‌گیری هورمون استرادیول و هورمون محرک فولیکولی (FSH)، خون‌گیری از قلب انجام شد. بعد از تشکیل لخته (حدود ۳۰دقیقه) با کمک اپلیکاتور به‌آرامی لخته از جدار لوله آزمایش جدا شده و در دستگاه سانتریفیوژ گذاشته شد (به‌مدت ۲۰دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه). سرم‌های جداشده به میکروتیوپ ۱/۵میلی‌لیتری منتقل و تا زمان بررسی هورمونی در فریزر ۸۰°C- نگهداری شدند. به‌منظور بررسی هورمون‌های استرادیول (E2) و (FSH) به‌ترتیب از کیت‌های Mouse FSH Elisa Kit Cat.No:E0256Mo و Mouse E2 Elisa Kit Cat. No: E0072Mo (Bioassay Technology؛ چین) استفاده شد.

اندازه‌گیری سطح بیان ژن‌ها: با استفاده از روش Real-Time PCR، بررسی بیان رونوشت چهار ژن *Oct4*، *Dazl*، *Blimp1* و *Gdf9* در تخمدان حیوانات گروه کنترل (۵ سر موش) و گروه دوم (۵ سر موش) مورد بررسی قرار گرفت. پس از طراحی پرایمر برای ژن‌های مذکور (جدول ۱)، استخراج RNA (با استفاده از محلول ترایزول و با روش فنل کلروفرم) و ساخت cDNA (با استفاده از کیت Kit Revert

www.SID.ir

Archive of SID

Aid™H Minus First Strand cDNA Synthesis) انجام شد. ساخت رشته DNA مکمل از روی RNAهای استخراج‌شده صورت پذیرفت. به‌منظور ارزیابی کمی بیان ژن‌ها از دستگاه StepOne Plus (ABI؛ ایالات متحده آمریکا) استفاده شد. برنامه زمانی طبق کیت SYBR (تاکارا؛ ژاپن) انجام شد.

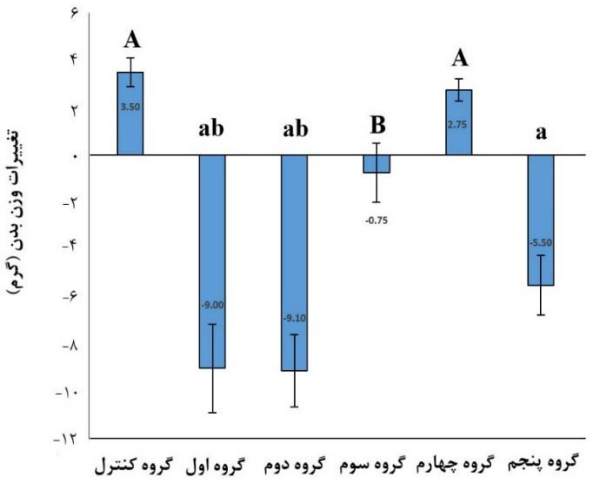
جدول ۱) اطلاعات مربوط به پرایمر

ژن	طول محصول	جفت پرایمر (۳' ⟵ ۵')	دمای اتصال
Gdf9	۷۰۹	F: TGCCTCCTTCCCTCATCTTG R: CACTTCCCCCGCTCACACAG	۶۰°C
Dazl	۱۲۷	F: TCCTTGACTTGTGGTTGCTG R: CCACCTTCGAGGTTTTACCA	۶۰°C
Blimp1	۱۶۱	F: CAGAAACACTACTTGGTACAC R: CACAAATTGCGTAAACTTGG	۶۰°C
Oct4	۱۹۱	F: AGAACCTTCAGGAGATATGCAAA R: AGAACCATACTCGAACCACAT	۶۰°C
GAPDH	۱۱۹	F: AACCTGCCAAGTATGATGA R: GGAGTTGCTGTTGAAGTC	۶۰°C

آنالیز آماری: در این مطالعه از نرم‌افزار SPSS 20 استفاده و سطح معنی‌داری آماری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. به‌منظور مقایسه بین گروه‌ها آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه با تست تعقیبی توکی و آزمون t مستقل به کار رفتند. آزمون کولموگروف- اسمیرنف به‌منظور تایید توزیع نرمال اعداد استفاده شد.

یافته‌ها

یافته‌های بررسی تغییرات وزن موش قبل و پس از تزریق داروهای شیمی‌درمانی: وزن موش‌ها قبل و پس از تزریق، در تمام گروه‌های آزمایشی بررسی شد. نتایج حاصل نشان‌دهنده کاهش وزن حیوانات در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل بود که در گروه‌های آزمایشی یک، دو و پنج این کاهش نسبت به گروه کنترل معنی‌دار (p<۰/۰۵) بود (نمودار ۱).



نمودار ۱) تغییرات وزن بدن موش (n=۴) در گروهای آزمایشی نسبت به گروه کنترل طی دو هفته تزریق داروهای شیمی‌درمانی سیکلوفسفامید و بیوسولفان حروف بزرگ در مقابل حروف کوچک (A با a، B با b) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها است (p<۰/۰۵).

بررسی چرخه استروس: چرخه استروس موش‌های گروه آزمایشی قبل و پس از تزریق بررسی شد. قبل از تزریق داروی شیمی‌درمانی چرخه استروس منظم و هر چهار مرحله مشاهده شد، در حالی که پس از تزریق چرخه استروس نامنظم و مرحله استروس و پرواستروس طولانی و به‌ندرت مرحله مت‌استروس و دی‌استروس نسبت به قبل از تزریق بروز یافت.

ارزیابی مورفولوژیکی بافت تخمدان: فولیکول‌های زنده و مرده در مراحل مختلف رشدونمو در گروه‌های آزمایشی و کنترل بررسی شد. در بین گروه‌های آزمایشی، گروه دوم که میزان ۱۰۰میلی‌گرم/کیلوگرم سیکلوفسفامید به‌مدت دو هفته دریافت کرده بود، آسیب بیشتری به بافت تخمدان و استرومای آن و همچنین اندازه تخمدان وارد نمود و تعداد زیاد فولیکول‌های آترزی‌شده در مراحل مختلف بلوغ و در نتیجه آن کاهش حضور جسم زرد بیانگر اختلال در فرآیند تخمک‌گذاری در گروه دوم نسبت به سایر گروه‌ها و گروه کنترل بود (شکل ۱).

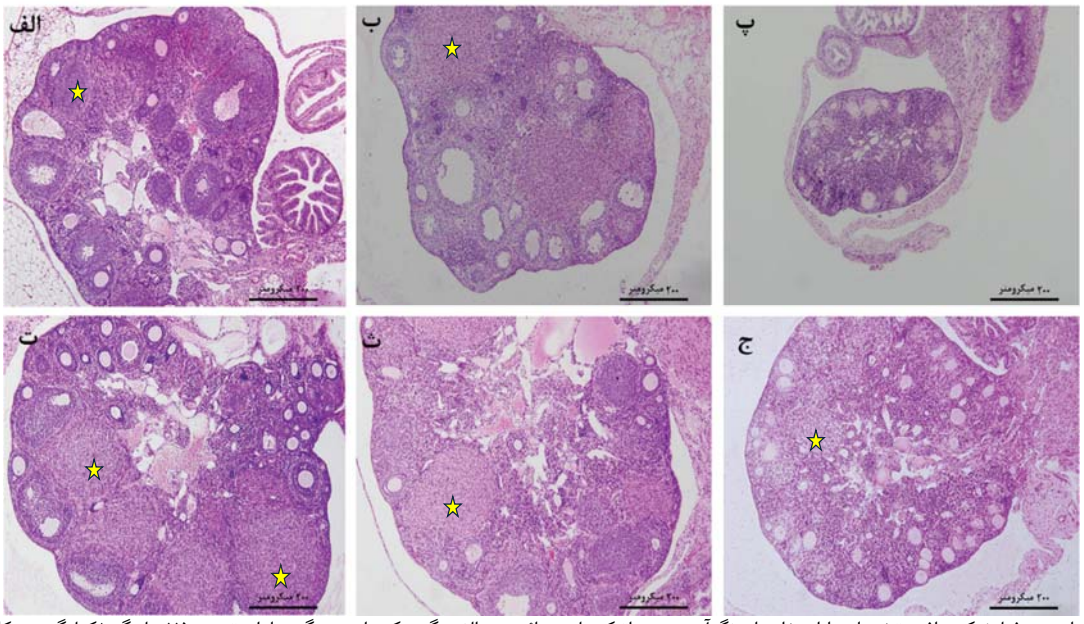
نتایج حاصل از شمارش فولیکول‌ها حاکی از کاهش معنی‌دار (p<۰/۰۵) ذخیره کلی فولیکول‌ها در تمام گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل بود. همچنین کاهش معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) در درصد زنده‌مانی فولیکول‌های بدوی در تمام گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد و بین گروه‌ها، گروه دوم نسبت به گروه چهارم کاهش معنی‌دار (p<۰/۰۴۳) نشان داد. در درصد زنده‌مانی فولیکول‌های پرایمری افزایش معنی‌داری در گروه‌های اول، سوم و چهارم (p<۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل مشاهده شد و این در حالی است که کاهش این شاخص در گروه دوم نسبت به گروه‌های اول، سوم و چهارم بارز بود (p<۰/۰۰۱). از طرفی نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار (p<۰/۰۵) در درصد زنده‌مانی فولیکول‌های پرایمری در گروه اول و چهارم نسبت به گروه پنجم بود. در درصد زنده‌مانی فولیکول‌های پرآنترال، گروه اول نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار (p<۰/۰۱) و گروه دوم نسبت به گروه‌های اول، سوم، پنجم (p<۰/۰۰۱) و گروه چهارم کاهش معنی‌دار (p<۰/۰۱) نشان داد. نتایج حاصل از درصد زنده‌مانی فولیکول‌های آنترال نشان داد که گروه سوم و چهارم نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار (p<۰/۰۵) داشته است و در گروه دوم کاهش معنی‌داری خفیف نسبت به گروه اول (p<۰/۰۵) و قوی‌تر نسبت به گروه سوم و چهارم (p<۰/۰۰۱) مشاهده شد. همچنین کاهش معنی‌دار در گروه پنجم نسبت به گروه سوم و چهارم (p<۰/۰۰۱) بارز بود (نمودار ۲).

ارزیابی هورمون‌های استرادیول و FSH: نتایج حاصل از ارزیابی هورمون FSH نشان‌دهنده افزایش معنی‌داری (p<۰/۰۵) در گروه آزمایشی دوم نسبت به گروه کنترل بود. همان‌طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، هورمون استرادیول کاهش معنی‌داری (p<۰/۰۵) در گروه آزمایشی دوم که میزان ۱۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی سیکلوفسفامید دریافت کرده بود نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد (نمودار ۳).

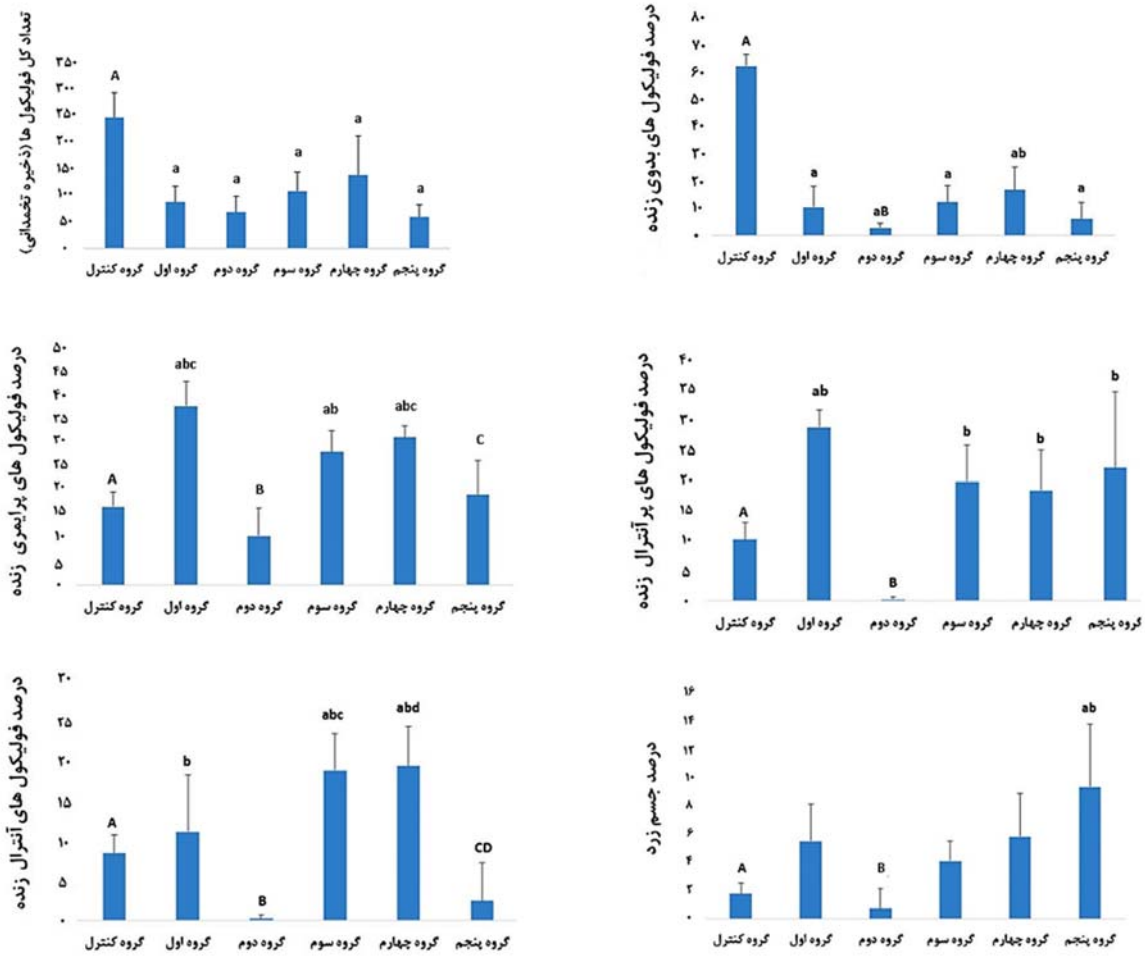
بررسی بیان ژن‌های مخصوص تخمک و رده زایا: نتایج حاصل از بیان ژن‌های *Gdf9*، *Dazl*، *Blimp1* و *Oct4* نشان‌دهنده افزایش بیان معنی‌دار عامل Oct4 (p<۰/۰۱) و Dazl (p<۰/۰۳) در گروه آزمایشی دوم نسبت به گروه کنترل بود که حاکی از باقی‌ماندن عامل سلول زایا و احتمالا حضور تخمک در گروه دریافت‌کننده سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل است (نمودار ۴).

www.SID.ir

Archive of SID



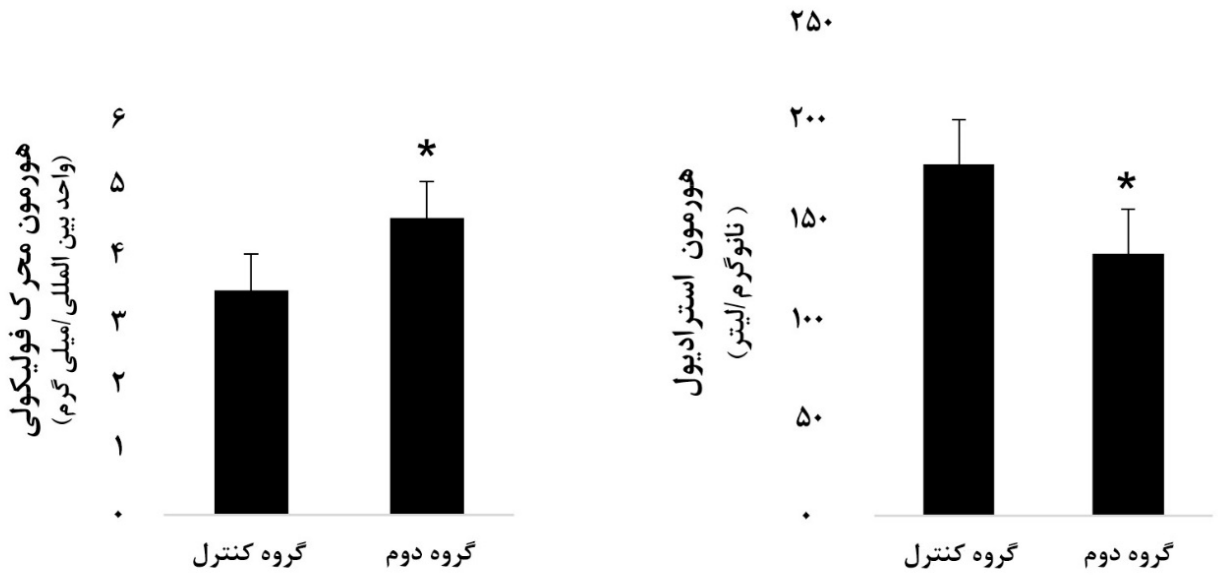
شکل ۱) ارزیابی مورفولوژیکی بافت تخمدان با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین؛ الف) گروه کنترل، ب) گروه اول: تزریق ۷۵میلی‌گرم/کیلوگرم سیکلوفسفامید، پ) گروه دوم: تزریق ۱۰۰میلی‌گرم /کیلوگرم سیکلوفسفامید به‌مدت چهارده روز، ت) گروه سوم: ۱۰۰میلی‌گرم/کیلوگرم روز اول و ۲۰میلی‌گرم سیکلوفسفامید روزانه تا چهارده روز، ث) گروه چهارم: تزریق ۱۰۰میلی‌گرم/کیلوگرم سیکلوفسفامید در روز اول و ۵۰میلی‌گرم/کیلوگرم بیوسولفان روزانه تا چهارده روز و ج) گروه پنجم: تزریق ۷۵میلی‌گرم/کیلوگرم سیکلوفسفامید و ۳۰میلی‌گرم/کیلوگرم بیوسولفان هر روز به‌مدت چهارده روز. علامت ستاره زرد نشان‌دهنده جسم زرد است.



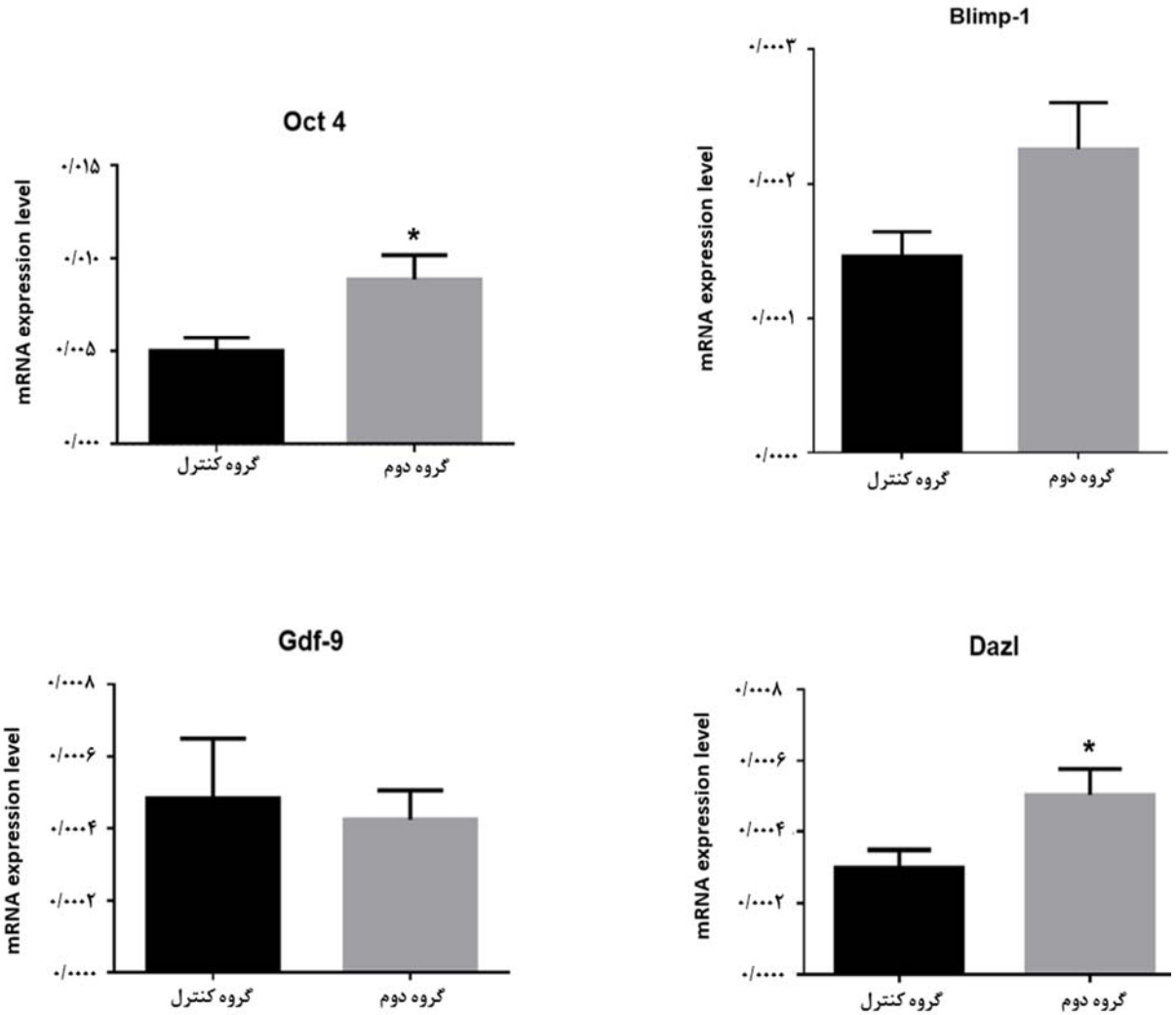
نمودار ۲) تاثیر داروی سیکلوفسفامید و بیوسولفان روی مراحل مختلف رشد فولیکول‌ها، تعداد کل فولیکول‌ها و درصد فولیکول‌های زنده مراحل مختلف؛ انواع فولیکول‌ها در تمام گروه‌ها شمارش شدند و به گروه‌های مختلف فولیکول بدوی، پرایمری، پر آنترال، آنترال، جسم زرد طبقه‌بندی شدند. گروه کنترل: بدون دریافت داروی شیمی‌درمانی، گروه اول: تزریق ۷۵میلی‌گرم/کیلوگرم سیکلوفسفامید، گروه دوم: تزریق ۱۰۰میلی‌گرم/کیلوگرم سیکلوفسفامید به‌مدت چهارده روز، گروه سوم: ۱۰۰میلی‌گرم/کیلوگرم روز اول و ۲۰میلی‌گرم سیکلوفسفامید روزانه تا چهارده روز، گروه چهارم: تزریق ۱۰۰میلی‌گرم/کیلوگرم سیکلوفسفامید در روز اول و ۵۰میلی‌گرم/کیلوگرم بیوسولفان روزانه تا چهارده روز و گروه پنجم: تزریق ۷۵میلی‌گرم/کیلوگرم سیکلوفسفامید و ۳۰میلی‌گرم/کیلوگرم بیوسولفان هر روز به‌مدت چهارده روز

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۳) نتایج تاثیر داروی شیمی‌درمانی سیکلوفسفامید پس از دو هفته بر ترشح هورمون استرادیول و FSH در مقایسه با گروه کنترل (p<۰/۰۵)



نمودار ۴) بیان ژن‌های رده زایا و تخمکی در گروه کنترل و آزمایشی که دریافت‌کننده سیکلوفسفامید به مقدار ۱۰۰میلی‌گرم در کیلوگرم به‌مدت دو هفته است (p<۰/۰۵). علامت * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن است.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

اخیراً اثرات شیمی‌درمانی در ایجاد نقص تخمدان زودرس (POF) مورد توجه قرار گرفته است[11, 23]. از آنجایی که عوامل شیمی‌درمانی، سلول‌ها را به سمت مرگ برنامه‌ریزی‌شده پیش می‌برد، در نتیجه، بازسازی مداوم سلول‌های آسیب‌دیده تخمدان در اثر عوامل شیمی‌درمانی، مشکل‌تر می‌شود[24]. مطالعه حاضر نشان داد که داروهای شیمی‌درمانی سیکلوفسفامید و بیوسولفان موجب آسیب به بافت تخمدان و ذخیره فولیکولی در گروه‌های آزمایشی پس از دو هفته شده است.

در مطالعه *دن‌سونگ* و همکاران در سال ۲۰۱۶، نشان داده شد که مدل نارسایی زودرس تخمدان توسط داروی شیمی‌درمانی سیکلوفسفامید ایجاد شده و استفاده از CTX به‌طور قابل توجهی موجب کاهش اندازه تخمدان موش‌ها، کاهش خون‌رسانی به بافت و ایجاد ظاهر رنگ‌پریده و نهایتاً موجب بروز POF شده است[24]. در مطالعه دیگری مشخص شد که بیوسولفان یک هفته پس از تزریق موجب آسیب جدی به بافت تخمدان و ایجاد POF شده و نیز منجر به ظهور فولیکول‌های آترزی با سلول‌های گرانولوزای کم، چرخه‌های غیرطبیعی استروس و کاهش فولیکولوژنز شده است[25]. این علایم مشابه اثرات درمان با سیکلوفسفامید در مطالعه حاضر است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از داروی شیمی‌درمانی بیوسولفان و سیکلوفسفامید موجب کاهش معنی‌دار در درصد زنده‌مانی فولیکول‌های بدوی در تمام گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل شده است. اینها نشان‌دهنده آسیب به سیستم هورمونی فرد بالغ شده و باعث فعال‌شدن به یکباره فولیکول‌های بدوی در حال استراحت و در نتیجه حرکت فولیکول‌ها به سمت بلوغ شده است.

در یک مطالعه مشخص شد که تیمار با داروی شیمی‌درمانی سیکلوفسفامید به‌مدت هفت روز می‌تواند منجر به آسیب شدید به ذخیره فولیکول‌های اولیه در حال استراحت شود و علاوه بر این، قشر تخمدان‌ها را دچار فیبروز نماید. همچنین کاهش شدید فولیکول‌ها به‌ویژه فولیکول‌های بدوی را به دنبال داشته است. آسیب بیشتر فولیکول‌های بدوی را به تاثیری که سیکلوفسفامید بر مسیر پیام‌رسانی PI3K/Akt/mTOR می‌گذارد، بیان کرده‌اند. مسیر PI3K/Akt/mTOR مسئول فعال‌سازی فولیکول‌های بدوی در حال استراحت است. حفظ حالت خاموشی فولیکول‌های بدوی در این مسیر بر عهده PTEN است و با جلوگیری از فسفریلاسیون و فعال‌شدن این مسیر منجر به باقی‌ماندن ذخیره فولیکول‌های بدوی می‌شود. در این مطالعه مشخص شد هنگامی که تخمدان توسط داروی شیمی‌درمانی سیکلوفسفامید در طی مدت هفت روز تیمار می‌شود، باعث فعال‌شدن مسیر PI3K/Akt/mTOR شده و در نتیجه فسفریلاسیون mTOR Akt و پروتئین‌های پایین‌دست آن درون تخمک اتفاق افتاده که در نتیجه فولیکول‌های بدوی از حالت استراحت خارج و به یک‌باره فعال می‌شوند. این مساله ممکن است علت کاهش سریع و نابه‌هنگام ذخیره فولیکول‌های بدوی باشد که نتایج آن نیز با نتیجه مطالعه حاضر منطبق است.

سیستم غدد درون‌ریز، با ترشح انواع هورمون‌های استروئیدی، رشد و بقای فولیکول را از طریق مکانیزم پاراکرین یا اتوکرین تنظیم می‌کند. اختلال در ترشح هورمون نه‌تنها علت، بلکه عامل اصلی در ایجاد اختلالاتی مانند POF است[26]. نارسایی تخمدان با اندازه‌گیری سطح هورمون در خون تشخیص داده می‌شود که از لحاظ بیوشیمیایی با سطح پایین استروژن و سطح بالای FSH مشخص می‌شود[25]. این هورمون‌ها شاخص‌های اولیه و مهم برای تشخیص نارسایی زودرس تخمدان هستند[27]. البته سطح و میزان هورمون در خون بسیار حائز اهمیت بوده، همچنین نوع و غلظت داروی شیمی‌درمانی مورد استفاده نیز در میزان شدت اختلال موثر است. نتایج ما نشان داد در گروهی که میزان ۱۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی شیمی‌درمانی سیکلوفسفامید دریافت کرده بود، تغییراتی در عملکرد اندوکرینی بافت تخمدان ایجاد شده است که با تغییرات هورمونی در اختلال POF، که شامل افزایش غلظت هورمون FSH و کاهش هورمون استرادیول در خون است مطابقت دارد و تاییدی در ایجاد موفقیت‌آمیز مدل POF در این گروه است. مطالعه‌هایی که به‌ترتیب در سال‌های ۲۰۱۶ و ۲۰۱۷ انجام شده است، نشان داد که تیمار با CTX و بیوسولفان بر عملکرد اندوکرین تخمدان اثر گذاشته به‌طوری که سطح E2 سرمی کاهش و سطح هورمون FSH در سرم در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافته است[24, 25]. گیرنده‌های FSH (FSHR) عمدتاً روی سلول‌های گرانولوزا بیان می‌شوند[28, 29]. کاهش سریع ذخایر فولیکولی در تخمدان منجر به حذف هورمون مهارکننده یا Inhibin شده و در نتیجه افزایش سطح FSH را به دنبال خواهد داشت. از طرفی هورمون استرادیول که عمدتاً توسط سلول‌های گرانولوزا تولید می‌شود بازخورد منفی روی ترشح FSH در محور هیپوتالاموس- هیپوفیز ایجاد می‌کند. آپوپتوز بیش از حد سلول‌های گرانولوزا ناشی از اثر داروهای شیمی‌درمانی نیز باعث کاهش سطح هورمون استرادیول و ازبین‌رفتن اثر مهاری بر FSH و افزایش آن می‌شود[24, 30].

در مطالعه حاضر، میزان بیان *Oct4* و *Dazl* افزایش معنی‌داری نشان داد که حاکی از حضور بیشتر عامل‌های رده زایا در گروه دوم نسبت به گروه کنترل است. یکی از عامل‌های رده زایا، *Oct4* است که از اعضای خانواده POU homeobox بوده که در حفظ، بقای و خود تجدیدی سلول‌های بنیادی جنینی عمل می‌کند[31, 32]. بیان *Oct4* در جمعیت سلول‌های بنیادی سرطانی نه‌تنها باعث افزایش رشد سلول می‌شود، بلکه در برابر شیمی‌درمانی نیز مقاومت ایجاد می‌کند[33] و بیانگر نقش *Oct4* در تنظیم مقاومت به دارو است. از طرفی مطالعه‌ای که توسط *چیا-سینگ‌لو* و همکاران انجام شد، بیانگر این مطلب بود که سطح پروتئین *Oct4* به‌طور قابل توجهی در سلول‌های سرطانی مثانه پس از درمان با داروی شیمی‌درمانی سیس‌پلاتین در ۲۴ساعت افزایش یافته است. در این حالت سلول‌های سرطانی مثانه، بیان‌کننده سطوح بالاتری از mRNA *Oct4* نسبت به سلول‌های طبیعی پوشش مجاری مثانه انسانی بودند[34]. این موضوع یعنی افزایش بیان Oct4 در سلول‌های سرطانی در معرض داروهای شیمی‌درمانی مانند سیس‌پلاتین گزارش‌شده در مطالعات قبلی، با یافته‌های حاصل در مطالعه کنونی نیز مطابقت دارد. اخیراً گروه *تیلی* و همکاران آزمایش‌های مهمی در تخمدان موش بالغ انجام داده و دریافتند که ژن‌های متعهد میوزی اختصاصی رده زایای Stra-8 و Dazl در تخمدان‌های پیر و آتروفی که با فقدان شدید فولیکول همراه است، بیان می‌شوند[35]. در لایه سطحی اپیتلیوم تخمدان‌های پیر، آنها یک جمعیت نادر از سلول‌های پیش‌رده زایا یافتند که ژن *Stra8* را بیان نموده ولی قادر به تکوین آن به سمت تخمک نبودند. این سلول‌ها هنگامی که به موش جوان پیوند زده شدند و در معرض محیط میزبان جوان قرار گرفتند، ظرفیت تبدیل‌شدن به تخمک را پیدا نمودند. به نظر می‌رسد که سلول‌های پیش‌رده زایا در تخمدان‌هایی که دچار آتروفی شده‌اند به‌طور آشکار وجود دارند و در نتیجه درمان سالم باقی می‌مانند، اما توانایی آنها برای ورود به میوز و تبدیل آنها به تخمک مسدود شده است.

موارد زیر برای مطالعات آینده پیشنهاد می‌شود:

www.SID.ir

Archive of SID

۱) به‌منظور تایید حضور سلول‌های رده زایا در بافت تخمدان مدل شیمی‌درمانی، آزمون‌های تکمیلی مانند ایمونوهیستوشیمی انجام شود.
۲) تلاش برای جداسازی سلول‌های رده زایا از بافت تخمدان مدل شیمی‌درمانی
۳) استفاده از سلول‌های زایای جداسازی‌شده یا سوسپانسیون تخمدان مدل شیمی‌درمانی به‌منظور ساخت تخمدان مصنوعی و تلاش برای بازگرداندن چرخه هورمونی در مدل پیوند تخمدان

نتیجه‌گیری

در یک نگاه کلی می‌توان گفت، اگرچه داروی‌های شیمی‌درمانی مانند سیکلوفسفامید و بیوسولفان تاثیرات مخربی روی بافت تخمدان گذاشته و باعث ازبین‌رفتن فولیکول‌ها و مانع رشد آنها در نتیجه ایجاد نارسایی بافت تخمدان می‌شوند، اما سلول‌های رده زایا هنوز در بافت باقی‌مانده و برای مطالعات آینده قابل استناد و پیگیری هستند.

تشکر و قدردانی: از موسسه ملی توسعه تحقیقات پزشکی ایران (NIMAD) به‌دلیل حمایت‌های مالی براساس اختصاص گرنت به شماره ۹۵۷۶۵۹ صمیمانه تشکر می‌شود. همچنین از جناب آقای دکتر *وحید اکبرنژاد* به پاس همراهیشان در این طرح و آنالیز بخشی از داده‌های آن تشکر و قدردانی می‌شود.

تاییدیه‌اخلاقی: طرح حاضر از دو سازمان معتبر تاییدیه‌اخلاقی داشته است که در ذیل اشاره شده است:
۱) شناسه: IR ACECR ROYAN REC IR ACECR .۱۹۲/۱۳۹۵ ROYAN REC، محل بررسی: کمیته اخلاق در پژوهش پژوهشگاه رویان جهاد دانشگاهی
۲) شناسه: IR NIMAD REC 1396 093، محل بررسی: کمیته اخلاق در پژوهش موسسه توسعه ملی تحقیقات علوم پزشکی ایران

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که در مطالعه حاضر، هیچ‌گونه تعارض منافع بین عوامل شرکت‌کننده در تولید این مقاله اعم از حامیان مالی، پشتیبانان علمی و نویسندگان وجود ندارد.

سهم نویسندگان: فاطمه عابدی‌قهی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰%)؛ روح‌الله فتحی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۰%)؛ نعیمه‌السادات ابطحی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۵%)؛ فریده عیوض‌خانی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۵%)؛ خدیجه بهره‌بر (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی (۵%)؛ الهام عابدحیدری (نویسنده ششم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۵%)؛ سمیه توانا (نویسنده هفتم)، نگارنده مقدمه/نگارنده بحث (۵%)؛ لیلا راشکی‌قلعه‌نو (نویسنده هشتم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۵%)؛ حسین ایمانی (نویسنده نهم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/نگارنده بحث (۵%)؛ لیلا منتظری (نویسنده دهم)، روش‌شناس (۵%)

منابع مالی: تحقیق حاصل بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشجویی است که با حمایت پژوهشگاه رویان صورت گرفته است.

منابع

1- Welt CK. Primary ovarian insufficiency: A more accurate term for premature ovarian failure. Clin Endocrinol. 2008;68(4):499-509.
2- Kalu E, Panay N. Spontaneous premature ovarian failure: Management challenges. Gynecol Endocrinol. 2008;24(5):273-9.
3- Bhartiya D, Singh J. FSH-FSHR3-Stem cells in ovary surface epithelium: Basis for adult ovarian biology, failure, aging and cancer. Reproduction. 2015;149(1):R35-48.
4- De Moraes-Ruehsen M, Jones GS. Premature ovarian failure. Fertil Steril. 1967;18(4):440-61.
5- Panay N, Fenton A. Premature ovarian failure: A growing concern. Climacteric. 2008;11(1):1-3.
6- Lai D, Wang F, Yao X, Zhang Q, Wu X, Xiang C. Human endometrial mesenchymal stem cells restore ovarian function through improving the renewal of germline stem cells in a mouse model of premature ovarian failure. J Transl Med. 2015;13(1):155.
7- Larsen EC, Müller J, Schmiegelow K, Rechnitzer C, Andersen AN. Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation-and chemotherapy-treated childhood cancer. Obstet Gynecol Surv. 2004;59(5):354-5.
8- Schover LR. Premature ovarian failure and its consequences: Vasomotor symptoms, sexuality, and fertility. J Clin Oncol. 2008;26(5):753-8.
9- Johnson J, Canning J, Kanedo T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. Nature. 2004;428(6979):145-50.
10- Forabosco A, Sforza C, De Pol A, Vizzotto L, Marzona L, Ferrario VF. Morphometric study of the human neonatal ovary. Anat Rec. 1991;231(2):201-8.
11- Chemaitilly W, Mertens AC, Mitby P, Whitton J, Stovall M, Yasui Y, et al. Acute ovarian failure in the childhood cancer survivor study. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(5):1723-8.
12- Salama M, Winkler K, Murach KF, Seeber B, Ziehr SC, Wildt L. Female fertility loss and preservation: Threats and opportunities. Ann Oncol. 2013;24(3):598-608.
13- Meirow D, Dor J, Kaufman B, Shrim A, Rabinovici J, Schiff E, et al. Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. Hum Reprod. 2007;22(6):1626-33.
14- Meirow D, Biederman H, Anderson RA, Wallace WH. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. Clin Obstet Gynecol. 2010;53(4):727-39.
15- Burnell M, Levine MN, Chapman JAW, Bramwell V, Gelmon K, Walley B, et al. Cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil versus dose-dense epirubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel versus doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel in node-positive or high-risk node-negative breast cancer. J Clin Oncol. 2010;28(1):77-82.
16- Behringer K, Mueller H, Goergen H, Thielen I, Eibl AD, Stumpf V, et al. Gonadal function and fertility in survivors after Hodgkin lymphoma treatment within the German Hodgkin study group HD13 to HD15 trials. J Clin Oncol. 2013;31(2):231-9.
17- Devi HP, Mazumder PB. Methanolic extract of Curcuma caesia Roxb. prevents the toxicity caused by cyclophosphamide to bone marrow cells, liver and kidney of mice. Pharmacogn Res. 2016;8(1):43-9.
18- Song Y, Zhang C, Wang C, Zhao L, Wang Z, Dai Z, et al. Ferulic acid against cyclophosphamide-induced heart toxicity in mice by inhibiting NF-κB pathway. Evid Based Complement Altern Med. 2016;2016:1261270.
19- Li F, Turan V, Lierman S, Cuvelier C, De Sutter P, Oktay K. Sphingosine-1-phosphate prevents chemotherapy-

www.SID.ir

Archive of SID

standard gonadotrophin stimulation depends on FSHR, SHBG and CYP19 gene synergism. J Assist Reprod Genet. 2012;29(11):1185-91.
29- Broekmans FJ, Knauff EAH, Te Velde ER, Macklon NS, Fauser BC. Female reproductive ageing: Current knowledge and future trends. Trends Endocrinol Metab. 2007;18(2):58-65.
30- Yacobi K, Wojtowicz A, Tsafriri A, Gross A. Gonadotropins enhance caspase-3 and-7 activity and apoptosis in the theca-interstitial cells of rat preovulatory follicles in culture. Endocrinology. 2004;145(4):1943-51.
31- Jung M, Peterson H, Chavez L, Kahlem P, Lehrach H, Vilo J, et al. A data integration approach to mapping OCT4 gene regulatory networks operative in embryonic stem cells and embryonal carcinoma cells. PloS One. 2010;5(5):e10709.
32- Pan GJ, Chang ZY, Schöler HR, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. Cell Res. 2002;12(5-6):321-9.
33- Wang XQ, Ongkeko WM, Chen L, Yang ZF, Lu P, Chen KK, et al. Octamer 4 (Oct4) mediates chemotherapeutic drug resistance in liver cancer cells through a potential Oct4-AKT-ATP-binding cassette G2 pathway. Hepatology. 2010;52(2):528-39.
34- Lu CS, Shieh GS, Wang CT, Su BH, Su YC, Chen YC, et al. Chemotherapeutics-induced Oct4 expression contributes to drug resistance and tumor recurrence in bladder cancer. Oncotarget. 2017;8(19):30844-58.
35- Niikura Y, Niikura T, Tilly JL. Aged mouse ovaries possess rare premeiotic germ cells that can generate oocytes following transplantation into a young host environment. Aging Albany NY. 2009;1(12):971-8.
induced human primordial follicle death. Hum Reprod. 2014;29(1):107-13.
20- Blumenfeld Z. Preservation of fertility and ovarian function and minimalization of chemotherapy associated gonadotoxicity and premature ovarian failure: The role of inhibin-A and-B as markers. Mol Cell Endocrinol. 2002;187(1-2):93-105.
21- Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice. Curr Protoc Neurosci. 2009;48(1):A-4I.1-8.
22- Tavana S, Azarnia M, Rezazadeh Valojerdi M, Shahverdi A. Hyaluronic acid-based hydrogel scaffold without angiogenic growth factors enhances ovarian tissue function after autotransplantation in rats. Biomed Mater. 2016;11(5):055006.
23- Luborsky JL, Meyer P, Sowers MF, Gold EB, Santoro N. Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. Hum Reprod. 2003;18(1):199-206.
24- Song D, Zhong Y, Qian C, Zou Q, Ou J, Shi Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells therapy in cyclophosphamide-induced premature ovarian failure rat model. BioMed Res Int. 2016;2016:2517514.
25- Luo Q, Yin N, Zhang L, Yuan W, Zhao W, Luan X, et al. Role of SDF-1/CXCR4 and cytokines in the development of ovary injury in chemotherapy drug induced premature ovarian failure mice. Life Sci. 2017;179:103-9.
26- Nelson LM. Primary ovarian insufficiency. New Engl J Med. 2009;360:606-14.
27- Anasti JN. Premature ovarian failure: AN update. Fertil Steril. 1998;70(1):1-15.
28- Lazaros LA, Hatzi EG, Pamporaki CE, Sakaloglou PI, Xita NV, Markoula SI, et al. The ovarian response to

www.SID.ir