

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Archive SID



واحد سازمانی مجری: پژوهشگاه ابن سینا

عنوان طرح: کشت سه بعدی فولیکول های کورتکس تخمدان انسانی با هدف حفظ  
باروری در بیماران سرطانی

کد طرح: ۹۰۰۱۰۳-۰۱۱

کد کارفرما: ۳۳-۲۲۲۸

گروه پژوهشی: جنین شناسی

مسئول اجرای طرح:

دکتر محمدمهدی آخوندی و دکتر ابوالفضل شیرازی

ماه و سال اختتام طرح: بهار ۱۳۹۵

مشخصات مسئول و همکاران طرح مطابق پرسشنامه مصوب:

ردیف	نام و نام خانوادگی	مسئولیت در طرح	رشته	رتبه	جمع کل نفر ساعت همکاری در طرح
۱	دکتر محمد مهدی آخوندی	مجری طرح	بیولوژی تکوینی	استاد تمام	۲۰۰۰
۲	دکتر ابوالفضل شیرازی	مجری طرح	مامایی و بیماریهای تولید مثل دام	استاد تمام	۲۵۰۰
۳	لاله حسینی	همکار طرح	بیوتکنولوژی تولیدمثل	دانشجو	۲۵۰۰
۴	دکتر محمدمهدی نادری	همکار طرح	دام های کوچک	استادیار	۱۸۰۰
۵	دکتر سارا برجیان	همکار طرح	دامپزشکی	مربی	۱۸۰۰
۶	علی سروری	همکار طرح	فیزیولوژی دام	مربی	۱۴۰۰
۷	سمانه صادق نیا	همکار طرح	جنین شناس	مربی	۱۸۰۰
۵	بهاره بهزادی	همکار طرح	علوم آزمایشگاهی	کارشناس	۱۴۰۰

چکیده :

هدف :

پیشرفتهای اخیر در تشخیص و درمان سرطان باعث افزایش بهیودی بیماران سرطانی و از سرگیری زندگی طبیعی است اما داروهای شیمی درمانی بکار گرفته شده در درمان سرطان با آسیب ذخایر فولیکول های تخمدانی منجر به از بین رفتن توان تولیدمثلی شخص می گردد. جداسازی و کشت فولیکول های پریموردیال و پرایمری، چشم انداز جدیدی برای حفظ باروری در بیمارانی است که بدلیل انتقال سلول های سرطانی امکان پیوند بافت تخمدان وجود ندارد. گرچه جداسازی فولیکول های پری آنترال اولیه در بعضی از گونه ها با موفقیت همراه بوده لیکن تلاش در جداسازی و تکوین این فولیکول ها در انسان موفق نبوده است. هدف از این تحقیق، تکوین فولیکول های پریموردیال و پرایمری انسانی در محیط آزمایشگاه با تقلید از شرایط *in vivo* از جمله کشت سه بعدی بصورت هم کشتی با سلول های تخمدانی در حضور فاکتورهای رشد پلاکتی می باشد.

مواد و روش ها :

تخمدان ها در محیط  $\alpha$ -MEM حاوی ۱% سرم و آنتی بیوتیک به آزمایشگاه انتقال داده شدند. تخمدان ها ابتدا با الکل ۷۰% و سپس محلول PBS حاوی ۱۰% سرم و آنتی بیوتیک به خوبی شستشو داده شدند. سپس به کمک اسکالپل مدولای آن را خارج کرده و کورتکس تخمدانی آماده شده با ضخامت ۰/۵ میلیمتر را با کمک دستگاه *tissue chopper* به قطعات ۱×۱ میلیمتر برش دادیم. بافت تخمدان بمنظور جداسازی فولیکول های تخمدانی به کمک کلاژناز IA و DNase بمدت ۶۰-۵۰ دقیقه مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. فولیکول های و سلول های تخمدانی جدا شده از بافت تخمدان بصورت جداگانه با کمک کلریدکلسیم ۰/۱ مولار در داربست آلژینات ۱% قرار گرفتند و در محیط کشت  $\alpha$ -MEM حاوی FSH، ITS، اسیداسکوربیک، GDF9، آنتی بیوتیک در ۴ گروه مختلف شامل سرم جنین گاوی، پلاسما غنی از پلاکت، ترکیب سرم جنین گاوی و پلاسما غنی از پلاکت و آلبومین سرم انسانی در حضور سلولهای تخمدانی کشت داده شدند.

نتایج:

در این مطالعه برای اولین بار کشت سه بعدی فولیکول های پریموردیال و پرایمری انسانی جدا شده از بافت تخمدان تازه و یخ گشایی شده انسان منجر به تکوین فولیکول های پری آنترال شد. نتایج نشان می دهد که قابلیت تکوین فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه در مقایسه با فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده بیشتر می باشد. همچنین نتایج نشان داد ۱۰% پلاسما غنی از پلاکت بطور قابل ملاحظه ایی باعث افزایش رشد و زنده مانی فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه و یخ گشایی شده در مقایسه با سایر گروه ها گردید. در این تحقیق علیرغم اندازه یکسان فولیکول ها در روز اول، سرعت رشد فولیکول ها حتی در شرایط یکسان محیط کشت نیز متفاوت بود بطوریکه فولیکول ها به دو دسته "فولیکول با رشد آهسته" و "فولیکول با رشد سریع" طبقه بندی شدند.

نتیجه گیری :

تیمار محیط کشت فولیکول های انسانی با پلاسمای غنی از پلاکت با تامین منبعی از فاکتورهای رشد می تواند زنده مانی و رشد بهتر فولیکول های پریموردیال و پرایمری را به مرحله پری آنترال فراهم نماید.

کلمات کلیدی: فریز بافت تخمدان، کشت سه بعدی فولیکول های تخمدانی، فاکتورهای رشد، فاکتورهای رشد پلاکت

#### مقدمه

حفظ باروری در درمان سرطان یا بیماری های بدخیم و یا به دلایل اجتماعی، چالش اصلی در طی سال های اخیر بوده است. از طرفی به دلیل پیشرفت هایی در درمان سرطان، میزان مرگ و میر حاصل از سرطان در خانم ها کاهش یافته است ولی متأسفانه شیمی درمانی، پرتودرمانی و جراحی بدلیل کاهش ذخایر فولیکول های تخمدانی می تواند باعث اختلال عملکرد تخمدان و از دست رفتن قدرت باروری فرد شود. تخمدان ها به داروهای شیمی درمانی بسیار حساس هستند بخصوص داروهای alkylating از جمله سیکلوفسفامید که بیشترین آسیب را به اووسیت و سلول های گرانولوزا به صورت وابسته به دوز وارد می کند. تخمک انسانی به رادیوتراپی نیز بسیار حساس بوده بطوریکه ۵-۱۰-۱۰٪ گری تابش برای اووسیت سمی بوده و دوز کمتر از ۲ گری نیز تا ۵۰٪ فولیکول های پریموردیال را از بین ببرد. ترکیب رادیوتراپی ناحیه شکمی و داروهای alkylating باعث ایجاد نارسایی زودرس تخمدان Premature ovarian failure (POF) و ۱۰۰٪ ناباروری می شود [۱،۲].

لذا باید قبل از اقدام به درمان، اقداماتی در زمینه حفظ باروری فرد صورت گیرد که بسته به سن، نوع سرطان و میزان پیشرفت آن روش های مختلفی وجود دارد [۳]. روش های حفظ باروری در بیماران سرطانی عبارتند از فریز جنین، فریز تخمک بالغ یا نابالغ و فریز بافت تخمدان که هرکدام محاسن و معایب خود را دارند. فریز جنین و تخمک بیشترین کاربرد را دارند ولی بدلیل نیاز به تحریک تخمدانی بمنظور استحصال تعداد بیشتر تخمک و متعاقب آن جنین باعث به تعویق انداختن درمان شده و در بیماران با بدخیمی هایی مثل لوکمی و سارکوما که نیازمند درمان سریع می باشند، کاربرد ندارد [۴]. از طرفی بدلیل افزایش میزان استروژن در بیماری هایی مثل سرطان سینه و رحم می بایست از مهارکننده های آروماتاز مانند لتروزول استفاده شود [۵،۶]. مع الوصف این دو روش فریز جنین و تخمک، در حفظ باروری در دختر بچه های نابالغ کاربرد ندارند [۷،۸].

از این رو فریز بافت تخمدان، تنها روش حفظ باروری در دختر بچه های نابالغ و همچنین خانم هایی است که نمی توانند درمان خود را به تاخیر بیندازند. البته با توجه به کاهش ذخایر فولیکول های تخمدانی با افزایش سن، معمولاً محدودیت سنی زیر ۳۷ سال برای استفاده از این روش وجود دارد. بعد از یخ گشایی بافت تخمدان دو راهکار برای استفاده از این بافت وجود دارد که شامل پیوند بافت تخمدان و یا کشت فولیکول های تخمدانی و بلوغ اووسیت های فولیکول های رشد کرده می باشد. مدت زمان از سرگیری فعالیت بافت تخمدانی ۳ تا ۶ ماه بعد از پیوند می باشد و طول مدت فعالیت بافت پیوند زده شده نیز بستگی به انجام یا عدم انجام شیمی درمانی قبل از فریز بافت تخمدان بین ۲ تا بیش از ۴ سال گزارش شده است [۹]. گرچه بیش از ۶۰٪ تولد زنده از پیوند بافت تخمدان گزارش گردیده است اما به دلیل احتمال انتقال سلول های سرطانی در بیماریهایی مانند بدخیمی های خونی کاربرد ندارد [۱۰]. همچنین از دست رفتن تعداد زیادی از فولیکول های تخمدانی بعد از پیوند بافت تخمدان گزارش شده است که می تواند بدلیل

هیپوکسی ناشی از تاخیر در عروق زایی مجدد بافت یا فعال شدن زودرس فولیکول های پریموردیال به علت حذف عوامل مهاری مانند آنتی مولرین هورمون باشد [۱۱، ۱۲].

در تکوین فولیکول های تخمدانی، حفظ ارتباطات متابولیکی بین سلول های گرانولوزا و تخمک برای رشد و بلوغ بعدی تخمک اهمیت دارد [۱۳]. بافت تخمدان، حمایت فیزیکی کافی برای حفظ انسجام ساختاری فولیکول را در طی مراحل اولیه رشد فراهم می کند. تحقیقات نشان داده که کشت بافت تخمدان روش مناسبی برای فعال سازی فولیکول های پریموردیال و تکوین آنها به مراحل بعدی می باشد اما بدلیل اختلافات فردی و حتی بین نمونه های تخمدانی یک فرد، پیش بینی اینکه آیا یک قطعه بافتی حاوی فولیکول است کار مشکلی است بخصوص در افراد مسن تر که تعداد کل فولیکول های تخمدانی با افزایش سن کاهش می یابد [۱۴، ۱۵]. بنابراین کشت فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان در مقایسه با کشت بافت تخمدان روش کارآمدتری بنظر میرسد.

کشت فولیکول های تخمدانی بعنوان روشی جایگزین پیوند بافت تخمدان برای جلوگیری از خطر انتقال سلول های سرطانی است. هدف از این روش توسعه یک سیستم *in vitro* برای رشد فولیکول های پریموردیال و پرایمری به مرحله آنترال بمنظور بدست آوردن تخمک بالغ می باشد. کشت فولیکول های تخمدانی می تواند بصورت کشت بافت یا کشت فولیکول های جدا شده یا کشت دو مرحله ای (Two – way culture) شامل کشت بافت و سپس کشت فولیکول های جدا شده باشد [۱۶].

اولین مرحله بمنظور کشت یا پیوند فولیکول های تخمدانی، جداسازی این فولیکول ها از بافت تخمدان است. در جداسازی مکانیکی بدلیل عدم آسیب به غشاء و تکا، انسجام ساختاری فولیکول و ارتباط بین سلول های گرانولوزا، تکا و اووسیت حفظ شده و این امر باعث افزایش میزان زنده مانی فولیکول های جدا شده در مقایسه با روش شیمیایی می گردد. اما این روش در جداسازی فولیکول های کوچک از استرومای متراکم انسان کاربرد ندارد [۱۷، ۱۶]. در روش هضم آنزیمی (Enzymatic digestion)، بدلیل تسهیل جداسازی فولیکول ها از کورتکس تخمدانی، تعداد بیشتری فولیکول در زمان کمتری جداسازی می شوند اما در این روش هضم پروتئولیتیکی و آسیب به سلول های تکا و غشاء پایه می تواند بر زنده مانی (Survival) و تکوین بعدی فولیکول ها تاثیر بگذارد [۱۸، ۱۹، ۲۰].

با توجه به فراوانی فولیکول های پریموردیال در بخش قشری بافت تخمدان و مقاومت بیشتر آن ها به فریز، بهینه سازی روش کشت فولیکول های پریموردیال و تکوین آن ها به فولیکول های آنترال می تواند کاربرد مهمی در حفظ باروری داشته باشد. گرچه کشت فولیکول های پریموردیال به مرحله آنترال در بعضی پستانداران مانند موش، گاو و گوسفند انجام شده [۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴] لیکن در انسان بدلیل متراکم تر بودن قشر تخمدان و حساسیت فولیکول های پری آنترال اولیه به هضم آنزیمی، تکوین این فولیکول ها با موفقیت همراه نیوده است [۱۸].

در کشت فولیکول های جدا شده از تخمدان نیز بمنظور تامین انسجام ساختاری فولیکول جدا شده از بافت تخمدان، نیاز به محیط فیزیکی مستحکم می باشد [۲۵]. در این رابطه آلژینات، ماتریکس مناسبی برای حمایت از رشد فولیکول های پری آنترال کوچک انسانی می باشد. آلژینات با حفظ ارتباطات بین اووسیت و سلول های سوماتیک اجازه رشد و تکوین به فولیکول می دهد [۲۶] و همچنین اجازه انتشار پروتئین هایی مثل هورمون محرک فولیکولی (Follicle stimulating hormone (FSH)) را که برای تکوین فولیکولی ضروری هستند میدهد.

تکوین فولیکول های تخمدانی، فرایند تکوینی پیچیده ایی است که توسط فاکتورهای اندوکراین، پاراکراین و اتوکراین مختلفی تنظیم می شود و با توجه به پیچیدگی و ویژگی های خاص مراحل مختلف فولیکولی، بمنظور حصول اووسیت

بالغ و شایسته از نظر تکاملی، محیط کشت متفاوتی با فاکتورهای رشد مختلف در هر مرحله فولیکولی لازم است. از جمله فاکتورهای رشد مورد نیاز برای رشد فولیکول های پریموردیال، 9 (Growth differentiation factor 9) (GDF9) است. در مطالعاتی نقش GDF9 در فعالسازی فولیکول های پریموردیال و انتقال از پریموردیال به پرایمری [27] و در پیشبرد تکوین فولیکولی به مرحله فولیکول ثانویه نشان داده شده است [28] GDF9 در محیط کشت فولیکول های پریموردیال علاوه بر افزایش زنده مانی باعث افزایش تکثیر سلول های گرانولوزا و افزایش ترشح استروژن و پروژسترون در این سلول ها می گردد [29].

تکوین فولیکول های پریموردیال و پرایمری در داخل بافت بدلیل فراهم شدن اثرات پاراکرینی بهتر انجام می شود و در صورت جداسازی فولیکول ها باید شرایط هم کشتی با سلول های سوماتیک تخمدانی یا سلول های استروما بمنظور تامین فاکتورهای رشد لازم فراهم شود. استرومای تخمدان، مجموعه متنوعی از انواع سلول ها شامل سلول های تکا، ماکروفاژ، سلول های اندوتلیال عروق خونی، سلول های ماهیچه صاف و انواعی از پروتئین های ماتریکس خارج سلولی می باشد. ماکروفاژها بیش از 100 سیتوکین، فاکتور رشد، ترکیبات ماتریکس خارج سلولی، لیپید و محصولات پپتیدی ترشح می کنند. سلول های گرانولوزا با ترشح کیت لیگاند ((Kit ligand (KL))، اکتیوین (Activin)، فاکتور تمایز تکا و فیبرونکتین باعث افزایش رشد و زنده مانی فولیکول های پری آنترال می شوند [30]. مطالعات حاکی از نیاز فولیکول های پرایمری به فاکتورهایی فراتر از محیط کشت عادی می باشد. گرچه این عوامل توسط هم کشتی با سلول های استروما تامین می شود، کشت فولیکول ها بصورت گروهی نیز می تواند اثر تحرکی بر تکوین آن ها داشته باشد. به نظر می رسد فولیکول زمانی که توسط فولیکول های دیگر احاطه شده باشد بهتر رشد می کند که می تواند بدلیل اثرات پاراکرین فاکتورهای ترشح شده از سایر فولیکول ها باشد [31].

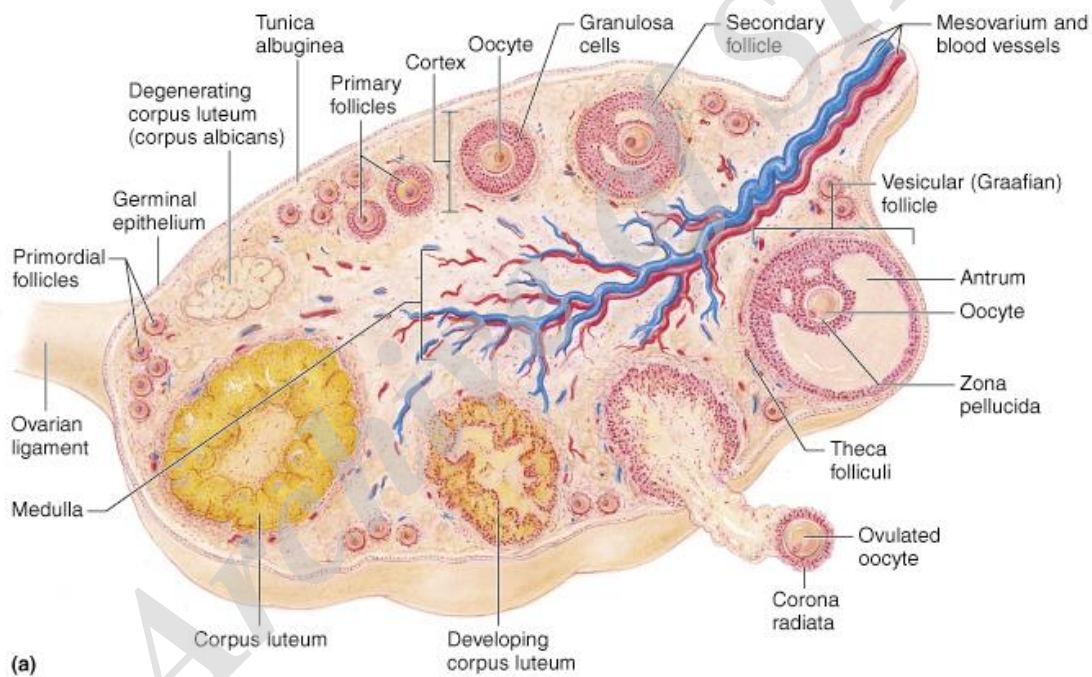
پلاسمای غنی از پلاکت یک محصول خونی است که تراکم فاکتورهای رشد مرتبط با پلاکت های آن 5-3 برابر پلاسمای می باشد و حاوی فاکتورهای رشد مختلف شامل فاکتور رشد فیبروبلاستی ((Fibroblast growth factor (FGF))، فاکتور رشد شبه انسولین (Insulin like growth factor (IGF))، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor (VEGF))، فاکتور رشد اپیدرمی ((Epidermal growth factor (EGF))، اینترلوکین 8 ((Interleukin 8 (IL8))، فاکتور رشد کراتینوسیت ((Keratinocyte growth factor (KGF)) و فاکتور رشد بافت همبند ((Connective tissue growth factor (CTGF)) می باشد [32]. گرچه نقش این سیتوکین ها در رشد و تکثیر سلول های مختلف از جمله سلول های مزانشیمی، غضروفی و استخوانی و همچنین بعنوان جایگزینی برای سرم در کشت سلول های مختلف بررسی شده اما نقش آن در تکوین فولیکول های اولیه تخمدانی مورد ارزیابی قرار نگرفته است.

هدف از این تحقیق، تکوین فولیکول های پریموردیال و پرایمری تخمدانی در محیط آزمایشگاه با فراهم کردن شرایطی مشابه محیط *in vivo* از جمله کشت سه بعدی در آلژینات، بصورت هم کشتی با سلول های تخمدانی و کشت گروهی فولیکول های تخمدانی در حضور فاکتورهای رشد مناسب می باشد. از طرفی، برای تامین فاکتورهای رشد لازم برای تکوین فولیکول های پریموردیال و پرایمری از پلاسمای غنی از پلاکت استفاده گردید.

## فصل دوم کلیات

### ۱-۲- دستگاه تولیدمثل جنسی ماده :

دستگاه تولیدمثلی ماده شامل تخمدان ها ، لوله های تخم بر، رحم و واژن می باشد. وظیفه این دستگاه، تولید و انتقال سلول های جنسی ماده یا تخمک و ترشح هورمون های جنسی ماده شامل استروژن (Estrogen) و پروژسترون (Progesteron) می باشد.



شکل ۱-۲ برش تخمدان

### ۱-۱-۲- ذخایر تخمدانی:

واژه ذخایر تخمدانی (Ovarian reserve)، به جمعیت فولیکول های پریموردیال (Primordial) موجود در کورتکس بافت تخمدانی اشاره دارد که ذخایر واقعی تخمدان نامیده می شوند. در زمینه تولیدمثل، این واژه به جمعیت فولیکول های کوچک در حال رشد (Growing follicles) اطلاق می شود.

تعداد تخمک ها در اواسط دوران جنینی ۷ میلیون می باشد که ۸۵٪ این تخمک ها قبل از تولد از بین می روند بطوریکه تعداد فولیکول های پریموردیال در هنگام تولید به ۱-۲ میلیون می رسد. بعد از تولد هیچ فولیکول یا اووسیت جدیدی تشکیل نمی شود و در هنگام بلوغ تعداد اووسیت ها به ۲۵۰۰۰۰ کاهش می یابد. این کاهش تعداد



فولیکول ها در طی دوران تولیدمثلی ادامه می یابد در این دوران تقریباً ۴۵۰ سیکل تخمک گذاری اتفاق می افتد و اکثر فولیکول ها دچار آترزی (Atresia) می شوند. آترزی فولیکولی در طی فولیکولوژنز (Folliculogenesis) و تخمک گذاری (Ovulation) همراه با آپوپتوز القاء شده با افزایش سن منجر به کاهش ذخایر فولیکولی و کاهش قدرت باروری می گردد. در زمان یائسگی (در سن ۵۱-۵۰ سالگی) ۱۰۰۰ فولیکول پریموردیال باقی می ماند [۳۳]. امروزه عقیده بر این است که در تخمدان های نابالغ دختر بچه ها، فولیکول هایی وجود دارند که دارای اووسیت غیرطبیعی اند و رشد نمی کنند و طی دوران کودکی و قبل از رسیدن به بلوغ این فولیکول ها از بین می روند [۳۴].

## ۲-۱-۲- تکوین فولیکول های تخمدانی:

واحدهای عملکردی اصلی در تخمدان پستانداران، فولیکول ها هستند. پس از تمایز گنادهای اولیه به تخمدان، سلول های جنسی اولیه اووگونی (Oogonia) نامیده می شوند که تعداد این سلول ها در انسان تا ۷ ماهگی آبستنی با انجام تقسیمات میتوزی افزایش می یابد. اووگونی ها با ورود به مرحله پروفاز میوز I به تخمک اولیه (Primary oocyte) تبدیل می شوند. تخمک اولیه به همراه یک لایه سلول اپی تللیال سنگفرشی اطراف آن فولیکول پریموردیال نامیده می شود. بطوریکه در هنگام تولد همه فولیکول های پریموردیال دارای تخمک اولیه هستند. تنها تعداد کمی از تخمک های اولیه حیوانات و انسان رشد ثانویه خود را دنبال نموده و به تخمک ثانویه (Secondary oocyte) تبدیل شده و تخمک گذاری می شوند. تعداد فولیکول های پریموردیال و فرآیند گذر آن ها به فولیکول های پرایمری، تعداد تخمک های موجود در سطح تخمدان را در تمام طول زندگی تولیدمثلی فرد تحت تاثیر قرار می دهد و هرگونه ناهنجاری در تعداد فولیکول های پریموردیال سبب بروز اختلالاتی نظیر نارسایی زودرس تخمدان می گردد [۳۵].

در دوران جنینی و قبل از بلوغ، تعداد بسیار زیادی از فولیکول های پریموردیال در فاز استراحت می باشند و تخمک های اولیه آن ها نیز در مرحله پروفاز میوز I متوقف گردیده اند. در دوران بلوغ در هر سیکل تولیدمثلی تحت تاثیر گنادوتروپین های ترشح شده از هیپوفیز از جمله FSH تعدادی از فولیکول ها شروع به رشد می کنند و فولیکول های پریموردیال فعال شده به فولیکول های پرایمری (Primary) تکوین می یابند. در فولیکول پرایمری، یک ردیف سلول مکعبی در اطراف تخمک اولیه قرار دارند و لایه گلیکوپروتئینی شفاف یا زونا پلوسیدا (Zona pellucid) بین تخمک و سلول های گرانولوزا (Granulosa cells) تشکیل می شود. در طی تبدیل فولیکول پریموردیال به پرایمری، اندازه تخمک افزایش نمی یابد و افزایش قابل ملاحظه اندازه تخمک در زمان تشکیل حفره آنترال اتفاق می افتد. با تکوین فولیکول پرایمری، تخمک به رشد خود ادامه داده و سلول های گرانولوزای اطراف تخمک تکثیر می یابند و چند لایه گرانولوزا اطراف تخمک تشکیل می شود که سلول حاصل را فولیکول ثانویه (Secondary follicle) گویند. در این زمان سلول های تکا (Theca cells) شروع به تمایز کرده و اطراف فولیکول در خارج از غشاء پایه (Basement membrane) قرار می گیرند. سلول های گرانولوزا به تکثیر ادامه داده و به سلول های کومولوس (Cumulus cells) در اطراف تخمک و سلول های مورال (Mural cells) در قسمت داخلی غشاء پایه تمایز می یابند. سلول های تکا نیز به شکل تکای داخلی (Theca interna) دارای فعالیت استروئید زایی (لایه عروقی از سلول های ترشحی) و تکا خارجی (Theca externa) فاقد فعالیت استروئید زایی (لایه خارجی از بافت همبند) تمایز می یابند. در فولیکول های پیش آنترال (Preantral) در بین سلول های گرانولوزا فضایی ایجاد می شود که در آنجا مایعی حاوی مقادیر زیادی هورمون استروژنیک تجمع می یابد سپس با بهم پیوستن این فضاها یک آنتروم واحد ایجاد شده و فولیکول

آنترال (Antral follicle) شکل می گیرد. فولیکول گراف (Graafian follicle) پیش از تخمک گذاری شامل تخمک، سلول های گرانولوزایی که تخمک را احاطه کرده (کومولوس)، حفره آنتروم سرشار از مایع فولیکولی، سلول های گرانولوزای جداری که آنتروم را احاطه نموده (سلول های مورال)، لایه تکا داخلی و تکای خارجی می باشد. علیرغم اینکه تعدادی فولیکول شروع به رشد می کنند اما تعداد زیادی دچار آترزی می شوند و فقط یکی به مرحله فولیکول گراف رسیده و تخمک گذاری می کند [۳۶].

رشد فولیکول از مرحله پریموردیال به پیش از تخمک گذاری (Preovulatory) در دو فاز متفاوت انجام می شود. مرحله اول رشد خیلی آهسته بوده و بطور مستقیم به میزان گنادوتروپین ها وابسته نیست و شامل تکثیر سلول های گرانولوزا و افزایش قطر فولیکول و تخمک می باشد. این مرحله در جوندگان چند هفته و در گونه های جانوری بزرگتر از جمله انسان چندین ماه طول می کشد. در انسان، مرحله اول رشد شامل تکوین فولیکول پریموردیال ۵۰-۳۰ میکرون به فولیکول پیش آنترال ۲۰۰-۱۰۰ میکرون می باشد. مرحله دوم رشد فولیکول سریعتر است که در این مرحله به هورمون های محرک رشد فولیکولی و هورمون لوتئینی کننده (Luteinizing hormone (LH)) وابسته است و تشکیل حفره آنتروم و سنتز هورمون های استروئیدی بیانگر انتقال به مرحله آنترال تکوین فولیکول است [۳۷]. تکوین فولیکول از پریموردیال به مرحله پیش از تخمک گذاری در انسان بیش از ۸ ماه و از مرحله پرایمری به پیش از تخمک گذاری ۸۴ روز می باشد. بنظر می رسد که رشد فولیکول ها مداوم نیست و احتمال می رود که بصورت آغاز- پایان (Start-Stop) در پاسخ به تاثیرات موضعی باشد. مطالعات انجام شده روی مکانیسم های مولکولی تنظیم کننده شروع تکوین فولیکول نشان می دهد که علیرغم فعالسازی سراسری فولیکول ها، سرعت تکوین فولیکول ها متفاوت است [۳۸].

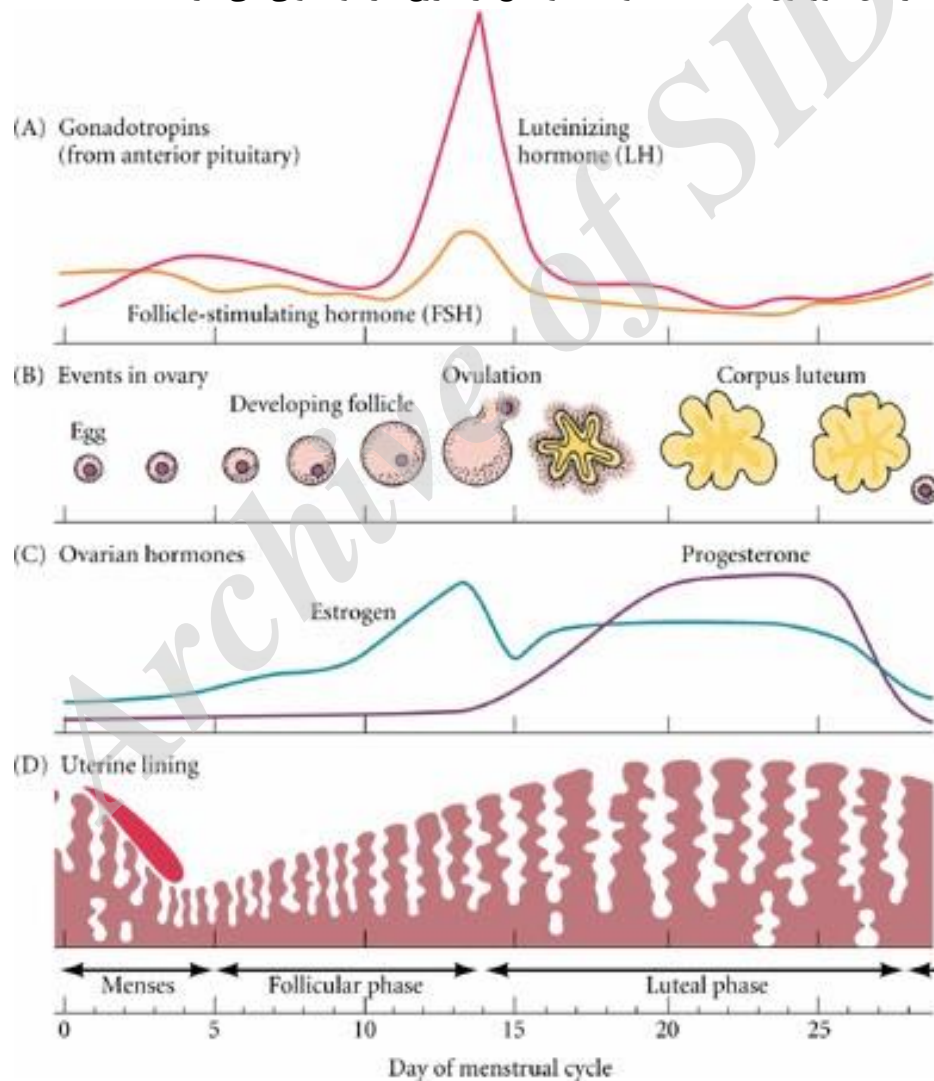
### ۲-۱-۳- انتخاب فولیکول غالب (Dominant follicle):

انتخاب فولیکول غالب، فرآیندی است که در آن یک فولیکول از مجموعه فولیکول های درحال رشد به رشد خود ادامه می دهد درحالی که رشد سایر فولیکول ها متوقف شده و دچار آترزی می گردند. تولید استرادیول (Estradiol) توسط فولیکول های درحال رشد اثر فیدبک منفی بر ترشح FSH و اثر فیدبک مثبت بر ترشح LH از هیپوفیز دارد و باعث القای تشکیل گیرنده های LH روی سلول های گرانولوزا فولیکول غالب می شود. بدنبال کاهش غلظت FSH، فولیکول های کوچکتر که فاقد قدرت پاسخگویی به LH می باشند قادر به رشد نبوده و دچار آترزی می شوند درحالی که فولیکول غالب در شرایط کاهش غلظت FSH بدلیل وجود گیرنده های LH قادر به پاسخگویی به این هورمون بوده و به رشد خود ادامه می دهد. سپس فولیکول گراف در پاسخ به اوج گنادوتروپین، تخمک گذاری می کند و تخمک بالغ (Mature oocyte) را آزاد می سازد [۳۷، ۳۹].

### ۲-۱-۴- چرخه قاعدگی (Menstrual cycle):

چرخه قاعدگی از دو فاز فولیکولی (Follicular phase) و لوتئال (Luteal phase) تشکیل شده است. فاز فولیکولی شامل رشد فولیکول های تخمدانی و تخمک گذاری می باشد. فولیکول ها تحت تاثیر هورمون FSH از هیپوفیز، رشد کرده و سلول های گرانولوزا موجود در فولیکول استروژن ترشح می کنند که این استروژن باعث افزایش ترشح LH از

هیپوفیز و افزایش گیرنده آن روی سلول ها تکا می شوند. به این ترتیب سلول ها علاوه بر FSH به LH نیز حساس شده و این دو هورمون با هم موجب تکثیر سلول های فولیکولی و افزایش فعالیت ترشحی آن ها می شوند و کل فولیکول رشد کرده و تخمک آن نیز بزرگ می گردد و در اوج LH تخمک گذاری اتفاق می افتد. در فاز لوتئال، همزمان با افزایش میزان LH در انتهای فاز فولیکولی، فولیکول از حالت ترشح کننده استروژن به وضعیت ترشح کننده پروژسترون و سلول های فولیکولی به سلول های لوتئالی تغییر می یابند و فولیکول گراف بعد از آزاد سازی تخمک به جسم زرد (Corpus luteum) تبدیل می شود که عمل ترشح استروژن و پروژسترون را انجام می دهد. حال اگر بارداری اتفاق نیفتد این جسم زرد تحلیل رفته و با کاهش میزان استروژن و پروژسترون و اثر فیدبک منفی آنها بر هیپوتالاموس- هیپوفیز، میزان گنادوتروپین ها افزایش یافته و دوباره فاز فولیکولی آغاز می شود. برعکس اگر بارداری اتفاق بیفتد، جسم زرد به جسم حاملگی تبدیل شده و با ترشح پروژسترون و اثر فیدبک منفی آن بر هیپوتالاموس - هیپوفیز مانع افزایش هورمون های FSH و LH و مانع از شروع فاز فولیکولی می گردد [۴۰].



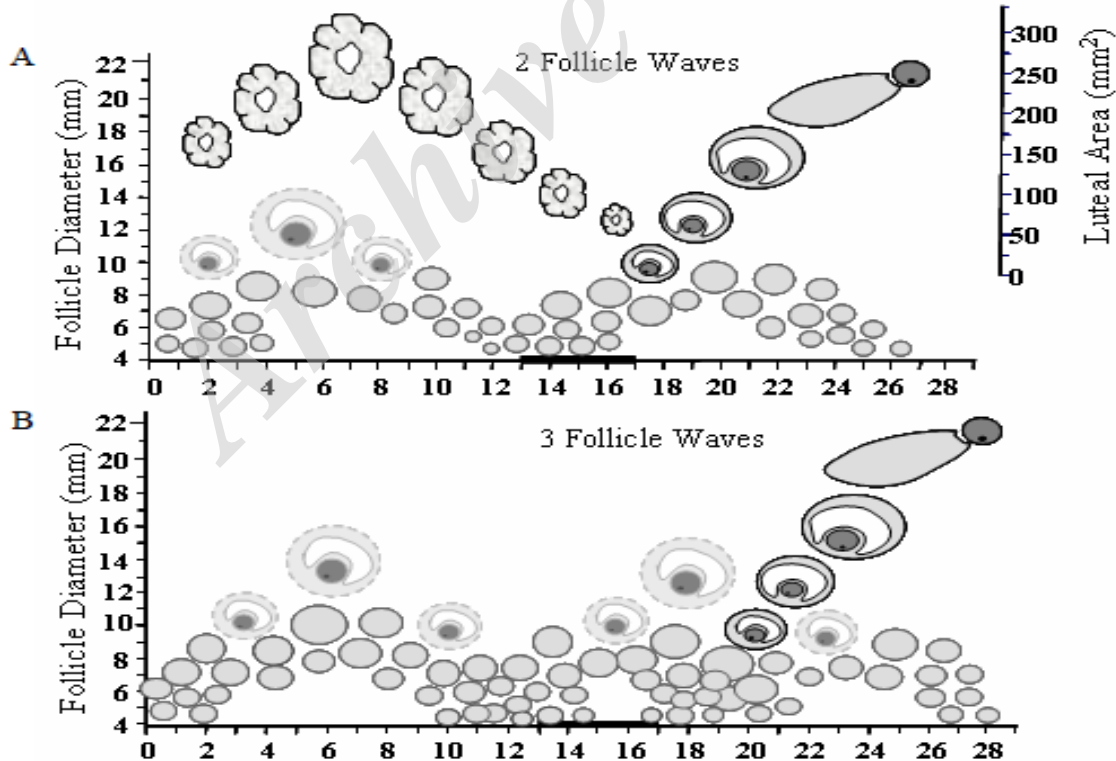
شکل ۲-۲ چرخه قاعدگی

## ۲-۱-۵- موج رشد فولیکولی (Follicular growth wave) در انسان :

در انسان ۲ یا ۳ موج رشد فولیکولی وجود دارد. در خانم های با دو موج رشد فولیکولی، اولین موج رشد فولیکولی (موج غیر تخمک گذاری) در ارتباط با اوج FSH قبل از تخمک گذاری است که منجر به تخمک گذاری نمی شود ولی دومین موج رشد فولیکولی (موج تخمک گذاری) در ارتباط با افزایش FSH در اوایل فاز فولیکولی بعد از تحلیل جسم زرد (Luteolysis) می باشد که منجر به تخمک گذاری می شود (شکل ۱-۱A).

در خانم های با سه موج رشد فولیکولی، اولین موج رشد فولیکولی (غیر تخمک گذاری) در ارتباط با اوج FSH قبل از تخمک گذاری است که منجر به تخمک گذاری نمی شود، دومین موج رشد فولیکولی (غیر تخمک گذاری) در اواسط تا اواخر فاز لوتئال است که منجر به تخمک گذاری نمی شود و موج سوم رشد فولیکولی (موج تخمک گذاری) در اوایل تا اواسط فاز فولیکولی است که منجر به تخمک گذاری می شود (شکل ۱-۱B).

در خانم های با دو موج رشد فولیکولی، اوج FSH و LH یک روز زودتر از خانم های با سه موج رشد فولیکولی است و افزایش استرادیول در اواسط-اواخر فاز فولیکولی نیز زودتر از خانم های دارای سه موج رشد فولیکولی اتفاق می افتد و سیکل جنسی کوتاهتر است. ولی تفاوتی بین روز شروع تحلیل جسم زرد بین این دو گروه مشاهده نشده است [۴۱].



شکل ۲-۳ دینامیک موج فولیکول تخمدانی. دینامیک های فولیکولی و لوتئال در خانم های با دو (A) و سه موج رشد فولیکولی (B) نشان داده شده اند.

## ۲-۱-۶- عوامل موثر بر تکوین فولیکول های تخمدانی :

تکوین فولیکول های تخمدانی توسط عوامل مختلفی تنظیم می شود. رشد اولیه فولیکول از سیگنال های بین تخمک و سلول های سوماتیک اطراف آغاز می شود و این ارتباط دوجانبه بین این سلول ها در طی تکوین فولیکول ضروری است. از انواع سلول های سوماتیک موثر در رشد فولیکول می توان به سلول های گرانولوزا و سلول های تکا اشاره نمود. این دو نوع سلول منبع ترشح هورمون های لازم برای رشد و تکوین فولیکول و تخمک می باشند. سلول های گرانولوزا، سلول های تمایز یافته ای هستند که با ایجاد لایه هایی اطراف تخمک موجب محافظت آن شده و در تکوین و بلوغ تخمک نقش دارند. سلول های تکا نیز با تشکیل دو لایه تکای داخلی و تکای خارجی در ترشح آندروژن ها (Androgens) نقش دارند. LH با تاثیر بر سلول های تکا موجب افزایش تستوسترون می شود سپس این هورمون از سلول های تکا داخلی از طریق انتشار ساده وارد سلول های گرانولوزا شده و تحت تاثیر آنزیم آروماتاز (Aromatase) به استروژن تبدیل می شوند [۴۲].

مطالعات نشان داده اند که سلول های تکا با ترشح EGF، HGF، KGF، فاکتور رشد انتقال دهنده آلفا ((Transforming growth factor-alpha (TGF- $\alpha$ )) BMP-7 (Bone morphogenetic protein 7) و آندروژن ها باعث افزایش تکثیر سلول های گرانولوزا، کاهش آپوپتوز، افزایش گیرنده FSH و افزایش اثر FSH بر سلول های گرانولوزا می شوند. در مقابل سلول های گرانولوزا با ترشح (KL) و فاکتور رشد انسولینی (Insulin growth factor (IGF)) باعث افزایش تکثیر سلول های تکا، افزایش گیرنده LH و افزایش CYP17A1 (Cytochrome p45017A1) در این سلول ها می شوند. تخمک نیز با ترشح فاکتور رشد تمایز ۹ (Growth differentiation factor-9 (GDF-9)) باعث افزایش تکثیر و تمایز سلول های تکا، افزایش تولید آندروژن و افزایش CYP17A1 در سلول های تکا و افزایش تکثیر و کاهش آپوپتوز و افزایش بیان گیرنده FSH در سلول های گرانولوزا می شود [۴۳]. فاکتورهای رشد ویژه اووسیت مانند GDF-9 و BMP-15 و کانکسین ۴۳ (Connexin 43) برای تکوین طبیعی تخمک و پیشرفت فولیکول فراتر از مرحله پرایمری ضروری هستند [۴۴].

عوامل مختلفی از جمله انسولین (Insulin)، سلنیوم (Selenium)، ترانسفرین (Transferrin)، VEGF و تستوسترون (Testosterone) در تکوین اولیه فولیکول نقش دارند. وجود گیرنده فاکتور سلول بنیادی (Stem cell factor (SCF)) یعنی KL، فاکتور مهار لوکمی (Leukemia inhibitory factor)، پروتئین های BMP4,7، فاکتور رشد (Growth factor (GF)) و Activin در تخمک فولیکول های پریموردیال انسانی بیانگر نقش این عوامل در شروع رشد فولیکول در انسان می باشد [۴۵].

مطالعات بیانگر نقش مسیر سیگنالی فسفو اینوزیتول تری کیناز (Phosphoinositide 3-kinase) در بقا و تکثیر فولیکول ها و فعال شدن این مسیر توسط SCF و گیرنده آن بعنوان تنظیم کننده اصلی تکوین اووسیت می باشد. مطالعات جدید نشان دهنده نقش مسیر Rapamycin در تکوین فولیکول ها می باشد.

## ۲-۲- اثرات درمان سرطان بر تخمدان

باروری نه تنها به سن تولیدمثلی و ذخایر تخمدانی یا تعداد فولیکول های پریموردیال باقی مانده بیمار بستگی دارد بلکه به عوامل مرتبط با درمان سرطان مانند دوز رادیوتراپی، دوز و نوع شیمی درمانی نیز بستگی دارد.

### ۲-۲-۱ رادیوتراپی

رادیوتراپی شکمی لگنی اثرات مخربی بر عملکرد تخمدان دارد. تحمل دوز تخمدان بستگی به عوامل مختلف از جمله حجم تابش، کل دوز تابش و سن بیمار در زمان درمان دارد. در مطالعه ایی اثر رادیوتراپی جمجمه و رادیوتراپی جمجمه نخاع با شیمی درمانی و بدون شیمی درمانی بر عملکرد تخمدان ۴۲ دختر بچه برای درمان تومور مغزی نشان داد که هیچ کس از بیماران دریافت کننده تابش جمجمه بدون شیمی درمانی دچار اختلال عملکرد تخمدان نشدند. برعکس در ۶۴٪ بیماران دریافت کننده تابش جمجمه نخاع و ۶۴٪ دختر بچه های دریافت کننده تابش جمجمه نخاع به همراه شیمی درمانی، اختلال عملکرد تخمدان مشاهده گردید. مشاهدات نشان داد که تابش نخاع باعث اختلال عملکرد تخمدان می شود [۴۶].

دوز تابشی که لازم است ۵۰٪ فولیکول های پریموردیال را نابود کند قبلا کمتر از ۴ گری برآورد شده بود [۴۷]. دوز موثر ناباروری، دوزی است که بعد از آن جمعیت فولیکول های پریموردیال به کمتر از ۱۰۰۰ برسد و این دوز باعث اختلال سریع تخمدان در ۹۷٫۵٪ جمعیت خانم ها می شود. دوز ناباروری موثر در رادیوتراپی تخمدان در هنگام تولد ۲۰/۳، ۱۰ سالگی ۱۸/۴، ۲۰ سالگی ۱۶/۵ و در ۳۰ سالگی ۱۴/۳ گری می باشد. همانطور که نشان داده شده است با افزایش سن اثر دوز بیشتر بطوریکه دوزهای کمتر رادیوتراپی می تواند باعث ناباروری فرد شود که بدلیل کاهش ذخایر تخمدانی با افزایش سن می باشد. تخمک انسانی نیز به ۲ گری تابش حساس است [۴۸].

### 2-2-2 شیمی درمانی

شیمی درمانی به تنهایی یا همراه با رادیوتراپی اثرات مخربی بر عملکرد تخمدان دارد. مطالعات اخیر نشان می دهد که با قرارگیری در معرض داروهای alkylating بویژه Procarbazine و Cyclophosphamide احتمال خطر اختلال تخمدان افزایش می باشد [۴۹]. اثرات مخرب شیمی درمانی نیز همانند رادیوتراپی بشدت وابسته به سن است بطوریکه خانم های بالاتر از ۲۵ سال بیشتر در خطر اختلال عملکرد تخمدان قرار دارند و احتمال خطر قاعدگی های نامنظم در خانم های بالاتر از ۳۰ سال ۱۲ برابر می باشد [۵۰].

شیمی درمانی سلول های درحال تقسیم را بطور موثری درگیر می کند و بنابراین فولیکول های بالغ تخمدان را نابود می کند. بیماران که تحت شیمی درمانی قرار می گیرند در نتیجه تخریب فولیکول های درحال رشد قاعدگی آنها

متوقف می شود. حتی مقادیر کم شیمی درمانی میتواند باعث پاک شدن جمعیت فولیکول های بالغ شود اما ذخایر تخمدانی جزئی دست نخورده باقی مانده اجازه ازسرگیری احتمالی قاعدگی را می دهد [۵۱].

#### ۲-۲-۲-۱ مکانیسم های آسیب به تخمدان در اثر شیمی درمانی

شیمی درمانی با ایجاد آپوپتوز باعث آسیب به فولیکول های پریموردیال می شود. مطالعات میکروسکوپ الکترونی نشان داده که بعد از چند ساعت شیمی درمانی، غشا پایه فولیکول های پریموردیال بطور غیرطبیعی ضخیم می شود و باعث اختلال ساختار فولیکول می گردد. زونگرفت کورتکس تخمدان انسانی شیمی درمانی شده نیز نشاندهنده آپوپتوز فولیکول های پریموردیال می باشد [۵۲].

مکانیسم دیگر شامل فیبروز بخش قشری تخمدان شیمی درمانی شده است. شیمی درمانی باعث آسیب عروق خونی تخمدان و فیبروز بخش قشری تخمدان می گردد که این آسیب با ایسکمی موضعی بر رشد و زنده مانی فولیکول های پریموردیال تاثیر می گذارد [۵۳].

یک فرضیه دیگر از دست رفتن فولیکول های پریموردیال براساس مکانیسم burn-out است. وقتی فولیکول های درحال رشد در اثر شیمی درمانی آسیب می بینند فاکتورهای رشد پاراکرین مشتق شده از سلول های گرانولوزا مانند آنتی مولرین هورمون (Anti mullerian hormone (AMH)) که باعث مهار فعال شدن فولیکول های پریموردیال دیگر می شود کاهش می یابد. در نتیجه تعداد بیشتری فولیکول های پریموردیال فعال می شوند و تحت تاثیر شیمی درمانی دچار آترزی می گردند و این امر باعث کاهش ذخایر فولیکولی می گردد. شیمی درمانی با افزایش بکارگیری فولیکول های غیرفعال به ذخایر فولیکول های درحال رشد فعال باعث کاهش فولیکول های پریموردیال می گردد [۵۴].

#### ۲-۲-۲-۲ اثرات کلینیکی شیمی درمانی

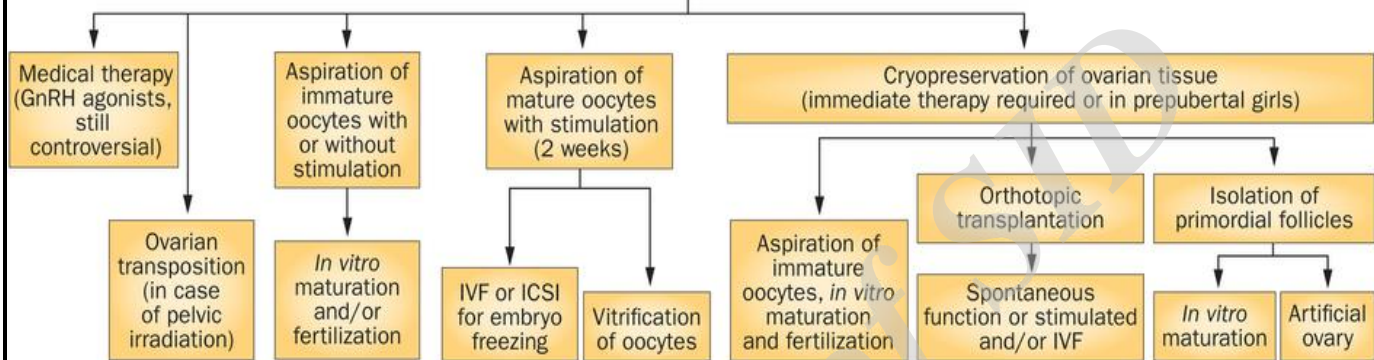
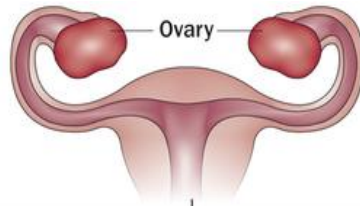
گرچه مکانیسم های دقیق آسیب تخمدان بدلیل شیمی درمانی مبهم باقی مانده است اما مبرهن است که آسیب وارد شده توسط داروهای ضد سرطان منجر به کاهش بارداری در بیماران می شود. مطالعات نشان داده که در بیماران سرطانی کاهش ۵۰٪ در بارداری مشاهده می شود [۵۵].

برای ارزیابی آسیب وارد شده از شاخص هایی مانند میزان E2 و FSH در روزهای ۲ و ۴ سیکل استفاده می شود. AMH و شمارش فولیکول های آنترال (Antral follicle count (AFC)) نیز پارامترهای ذخایر تخمدانی هستند که قبل و بعد از شیمی درمانی بررسی می شوند [۵۶].

#### ۲-۳- روش های حفظ باروری :

امروزه علیرغم افزایش سرطان، بدلیل پیشرفت هایی در تشخیص و درمان آن، میزان زنده مانی افراد سرطانی نیز افزایش یافته است. اما درمان هایی مانند شیمی درمانی و پرتو درمانی با آسیب به ذخایر فولیکول های تخمدانی می

تواند منجر به اختلالات تولیدمثلی و از جمله ناباروری فرد بعد از بهبود از سرطان شود. لذا باید قبل از اقدام به درمان، اقداماتی در زمینه حفظ باروری فرد صورت گیرد که بسته به سن، نوع سرطان و میزان پیشرفت آن روش های مختلفی وجود دارد [۳].



شکل ۲-۴ روش های حفظ باروری

### ۲-۳-۱- کاربرد آگونیست GnRH برای حفظ باروری:

داروهای شیمیایی استفاده شده در درمان سرطان باعث آپوپتوز فولیکول های تخمدانی و متعاقب آن کاهش استروئیدهای جنسی می گردد که این کاهش استروئیدها با اثر فیدبک منفی بر هیپوتالاموس و هیپوفیز باعث افزایش ترشح FSH می گردد. افزایش FSH باعث افزایش از سرگیری رشد فولیکول های پری آنترال می شود و به این ترتیب تعداد بیشتری فولیکول در معرض اثرات گنادوتوکسیک قرار می گیرند. بکارگیری آگونیست های هورمون های آزاده کننده گنادوتروپین (Gonadotropin-releasing hormone) با جلوگیری از افزایش FSH از طریق غیرحساس کردن مسیر هیپوفیز - غدد جنسی باعث مهار از سرگیری رشد تعداد بیشتر فولیکول های تخمدانی می شوند و در نتیجه حساسیت تخمدان به درمان های سیتوتوکسیک کمتر می گردد [۵۷]. مطالعه ای نشان داد که استفاده از این روش در بیماران مبتلا به سرطان سینه که شیمی درمانی با سیکلوفسفامید دریافت کرده اند اثر مثبتی ندارد [۵۸]. محققین به این نتیجه رسیده اند که این آگونیست ها باعث کاهش معنی دار اختلال زودرس تخمدان نمی شوند و تا چندین هفته پس از کاربرد آنها، سرکوب کامل تخمدان حاصل نمی شود لذا کاربرد این روش در حفظ باروری سوال برانگیز است [۵۹،۶۰].

### ۲-۳-۲- جابجایی تخمدان (Oophoropexy):



این روش شامل جابجایی تخمدان ها به مکانی غیر از محل تابش پرتو ( معمولاً ۳ تا ۵ سانت بالاتر از ناف ) به کمک لاپاراسکوپ می باشد تا تخمدان ها از قرارگرفتن در معرض تابش پرتو محافظت شوند. این روش در مورد بیماران با سرطان پیشرفته سرویکس پیشنهاد می شود. در رادیوتراپی لنفوئیدی، تخمدان ها به ناحیه میانی بالای رحم و دور از گره لنفاوی لگن منتقل می شوند و در سایر بدخیمی های لگنی از تکنیک جابجایی جانبی تخمدان ها استفاده می شود [۶۱].

در بررسی انجام شده در سال ۲۰۰۳ جابجایی لاپاراسکوپیک تخمدان در خانم های کمتر از ۴۰ سال منجر به حفظ عملکرد تخمدان در ۸۶٪ موارد شده است [۶۲]. در بررسی دیگری در سال ۲۰۱۳ در ۹۰٪ افرادی که از این روش استفاده کرده اند میزان FSH و استرادیول در حد طبیعی بوده است [۶۳]. بر اساس بررسی های انجام شده این روش، کارآمد و ایمن می باشد.

### ۲-۳-۳- فریز جنین (Embryo cryopreservation) :

فریز جنین روشی است که بطورگسترده ای در حفظ باروری در جنس ماده کاربرد دارد. میزان بارداری در این روش موفق بین ۳۰-۴۰٪ می باشد. این روش ایمن و کارآمد در موارد مختلف بالینی مانند خطر احتمال سندرم تحریک بیش از حد تخمدان (ovarian hyperstimulation syndrome) و اندومتريوز نیز کاربرد دارد [۶۴]. امروزه نشان داده شده که انتقال جنین فریز نسبت به انتقال جنین تازه (Fresh embryo transfer) دارای موفقیت بیشتری است که شاید بدلیل بهبود همزمانی جنین- آندومتر (embryo-endometrium synchrony) می باشد [۶۵]. این روش مستلزم ۲-۶ هفته تحریک تخمدانی (Ovarian hyperstimulation) شامل تزریق FSH از شروع خونریزی بمنظور بدست آوردن تعداد بیشتری تخمک می باشد. این تاخیر در شروع درمان سرطان، باعث می شود روش فریز جنین در بیماران با بدخیمی هایی مثل لوکمی و سارکوما که نیازمند درمان سریع می باشند، کاربرد نداشته باشد [۴]. همچنین بدلیل افزایش میزان استروژن در بیماری های وابسته به استروژن مثل سرطان سینه و رحم باید از داروهایی مانند لتروزول (Letrozole) و تاموکسیفن (Tamoxifen) بعنوان مهارکننده های آروماتازی (Aromatase inhibitors) (با متوقف کردن فعالیت آروماتازی اندروژن به استروژن و کاهش غلظت استروژن) استفاده شود [۵، ۶].

همچنین فریز جنین بدلیل نیاز به پروتکل تحریک تخمدانی و اسپرم در حفظ باروری در دختر بچه های نابالغ و در خانم های بالغی که دسترسی به اسپرم ندارند کاربرد ندارد [۷، ۸].

### ۲-۳-۴- فریز تخمک (Oocyte cryopreservation) :

فریز تخمک در موارد عدم دسترسی به اسپرم کاربرد دارد. اما تخمک در مقایسه با جنین بدلیل نسبت سطح به حجم کم، محتوای چربی بالا و حساسیت دوک تقسیم (Mitotic spindle) به دما به آسیب های حاصل از فریز حساس تر است [۶۶]. در این روش نیز مانند روش فریز جنین نیاز به تحریک تخمدانی برای استحصال تخمک (Egg)

retrieval) می باشد و بنابراین باعث تاخیر در درمان سرطان می شود و همچنین در مورد دختر بچه های نابالغ نیز کاربرد ندارد [۷].

نتایج فریز تخمک مشابه نتایج حاصل از تخمک های تازه می باشد [۶۷]. در سال ۱۹۸۰، اثرات تخریبی فریز بر دوک تقسیم عنوان شده بود اما مطالعات ۵ سال اخیر نشان دهنده عدم آسیب به دوک تقسیم و جدا شدن کروموزوم ها و تولید جنین از تخمک های فریز شده می باشد [۶۸، ۶۹]. مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۰ نشان می دهد که میزان بقا و بارداری حاصل از فریز تخمک بترتیب ۹۲/۵٪ و ۴۳/۷٪ می باشد که نشاندهنده کارایی بالای این روش است. اما میزان تولد زنده نسبت به تخمک فریز شده حتی در با تجربه ترین تیم ها در دنیا ۵/۷٪ می باشد [۷۰].

ترکیبی از فریز تخمک و بافت تخمدان می تواند باعث افزایش کارایی حفظ باروری شود و در مورد بیماران جوان سرطانی شانس بیشتری برای باروری فراهم نماید. اما فریز بافت تخمدان در روز استحصال تخمک مشکل و ناکارآمد است. بنابر این بهتر است در مرحله اول استحصال تخمک بالغ و فریز آن انجام گیرد و سپس بافت تخمدان فریز شود [۷۱]. بلوغ تخمک های نابالغ و فریز آن ها، سپس لقاح آزمایشگاهی این تخمک ها پس از ازدواج فرد و انجماد آهسته جنین های حاصل و انتقال جنین ها ۱۴ ماه بعد از دومین عمل جراحی یک خانم منجر به تولد زنده در سال ۲۰۱۴ شد که اولین گزارش تولد زنده حاصل از بلوغ تخمک های نابالغ می باشد [۷۲].

## ۲-۳-۵- فریز بافت تخمدان:

فریز بافت تخمدان در موارد زیر کاربرد دارد:

- ۱- تنها روش حفظ باروری در دختر بچه های نابالغ
- ۲- در خانم هایی که نمی توانند درمان خود را به تاخیر بیندازند مانند لوکمی
- ۳- در بیماری های خود ایمن مانند لوپوس
- ۴- در بیماریهای مانند گالاتوزمیا و اساسا POF
- ۵- در خانم هایی که بدلائل اجتماعی یا اقتصادی می خواهند دیرتر باردار شوند

از مزایای این روش این است که با فریز بافت تخمدان، صدها تا هزاران فولیکول پریموردیال موجود در کورتکس تخمدان ذخیره می شوند و همچنین با پیوند بافت تخمدان عملکرد اندوکرینی آن از سر گرفته شده و حفظ می شود. با نظر به اینکه ذخایر فولیکولی تخمدان وابسته به سن است، قبل از پیشنهاد فریز بافت تخمدان بعنوان یک روش حفظ باروری، سن بیمار باید در نظر گرفته شود و معمولا محدودیت سنی زیر ۳۷ سال وجود دارد [۹].

در مورد میزان برداشت بافت تخمدان بمنظور فریز، در موارد پرتودهی تمام بدن یا ناحیه لگنی، در موارد دریافت دوز بالای داروهای شیمی درمانی و در دختر بچه ها (بدلیل کوچک بودن اندازه تخمدان) بهتر است کل تخمدان خارج شده و فریز شود. در خانم های بالغ معمولا ۴-۵ قطعه بافتی به طول ۱ سانتیمتر، به عرض ۴-۵ میلیمتر و به قطر ۱ میلیمتر در بیشتر دنیا مرسوم است و در بعضی کشورها تمام تخمدان سمت چپ برداشته می شود [۷۳].

## ۲-۳-۵-۱ روش های انجماد بافت تخمدان

انجماد با کاهش دما و کاهش فعالیت های متابولیکی سلول ها باعث حفظ سلول ها، بافت ها و اندام ها می گردد. گرچه انجماد بدون اختلال در زنده مانی، اجازه ذخیره سلول یا بافت را می دهد اما کاهش و افزایش دما در حین سرد کردن و ذوب کردن معمولاً باعث آسیب می شود. جهت انجماد بافت تخمدان دو روش متداول انجماد آهسته (Slow freezing) و انجماد شیشه ای (Vitrification) وجود دارد [۷۴].

### انجماد آهسته

این روش شامل استفاده از غلظت های پائین ضد یخ (۲-۱ مول) و سرعت نسبتاً پائین سرد کردن (۱-۱/۰ درجه سانتیگراد در دقیقه) است. در انجماد بدلیل تشکیل کریستال های یخ احتمال آسیب سلولی زیاد است لذا پیش از انجماد یا در مرحله سرد شدن نمونه باید آب داخل سلولی را خارج نموده یا بحداقل رساند. آب داخل سلولی را می توان با دو روش استفاده از محلول غلیظ ضد یخ (Cryoprotectant) و با القای یخ زدگی که باعث تشکیل کریستال های یخ خارج سلولی می شود خارج کرد. با تشکیل کریستال های یخ خارج سلولی، محیط اطراف نمونه غلیظ تر شده و غلظت نمک و املاح افزایش می یابد که باعث خروج آب از سلول می گردد. انجماد آهسته بطور وسیعی در انجماد بافت تخمدان استفاده می شود.

مراحل انجماد آهسته شامل:

- ۱- آبگیری بافت تخمدان با استفاده از ترکیبات حاوی ضد یخ
- ۲- سرد کردن نمونه تا برودت زیر صفر درجه سانتیگراد
- ۳- القای یخ زدگی دربرودت ۷- درجه و تشکیل یخ سلولی
- ۴- نگهداری در نیتروژن مایع (دمای ۱۹۶- درجه سانتیگراد)
- ۵- ذوب نمونه و رقیق کردن محیط برای خروج ضد یخ از سلول

### انجماد شیشه ای

در روش انجماد شیشه ای از غلظت بالای ضد یخ (۷-۵ مول) و سرعت خیلی بالای سرد کردن (۲۵۰۰۰-۲۰۰۰ درجه سانتیگراد بر دقیقه) استفاده می شود. در روش انجماد شیشه ای، سلول ها با قرارگیری در معرض غلظت بالای ضد یخ آبگیری می شوند و این تکنیک یخ داخل سلولی را کاملاً حذف می کند. در این روش بدلیل استفاده از غلظت بالای ضد یخ ممکن است سلول ها آسیب ببینند.

استراتژی انجماد شیشه ای حذف کلی تشکیل یخ و سپس تلاش برای کاهش سمیت و تغییرات اسمزی است. روند فیزیکی انجماد شیشه ای را می توان به صورت انجماد سازی شیشه شیشه محلول ها در دمای پایین بدون تشکیل یخ تعریف کرد. این پدیده می تواند با افزایش غلظت و یا با افزایش سرعت انجماد و ذوب به دست آید.

نتایج انجماد بافت تخمدان نشان می دهد که گرچه بیشتر تولدهای زنده تاکنون از انجماد آهسته (Slow freezing) بافت تخمدان گزارش شده است اما استفاده از روش انجماد شیشه ای (Vitrification) در حال حاضر رو به افزایش است [۷۵]. روش انجماد شیشه ای در مقایسه با انجماد آهسته، باعث حفظ انسجام ساختارهای فولیکولی و استروما [۷۶] و کاهش میزان فرگمانتاسیون دی ان ا (DNA fragmentation) فولیکول ها و افزایش بقای آن ها می شود که می تواند منجر به بهبود عملکرد بافت بعد از پیوند (Transplantation) گردد [۷۷]. البته در بعضی موارد نتایج مشابه ای از لحاظ افزایش میزان بقای فولیکول با روش انجماد آهسته بدست آمده است [۹].

## ۲-۳-۵-۲ عوامل موثر در انجماد بافت تخمدان

از عوامل موثر در انجماد بافت تخمدان می توان به اندازه و کیفیت نمونه، نوع و غلظت مواد محافظ انجمادی (Cryoprotectants)، دمای محیط های انجمادی، نوع Carrier، و مهارت تکنیکی فرد اشاره نمود.

### نوع و غلظت ضد یخ

در انجماد شیشه ای از غلظت های بالاتر یک یا چند ضد یخ (۴۰٪) و ترکیباتی مانند قند استفاده می شود که کمک به آگیری می کند. این مواد، مواد شیمیایی نیستند که بطور طبیعی در سلول یافت می شود حداقل نه با این غلظت بالا و می توانند سمی باشند یا باعث آسیب اسمزی شوند [۷۸]. بمنظور کاهش سمیت ضد یخ ها می توان ترکیبی از چند ضد یخ با غلظت های نسبتا پائین را استفاده نمود. مزیت این روش این است که نفوذپذیری ترکیب چند ضد یخ بیشتر از نفوذپذیری هر کدام از آن ها است و حداقل باید یک از آن ها نفوذپذیر باشد حتی اگر بقیه نفوذناپذیرند [۷۹]. انواع ضد یخ ها شامل ضد یخ های قابل نفوذ مانند اتیلن گلیکول (EG)، دی متیل سولفوکساید (DMSO)، گلیسرول (GLY)، پروپیلن گلیکول (PROH)، استامید و فورامید و ضد یخ های غیرقابل نفوذ شامل پروتئین های سرم، قندها و پلیمرها می باشد که در دماهای پائین، ویسکوزیته بالایی نشان می دهند و مانع از اتصال مولکول های آب به کریستال های یخ می شوند. سوکروز (Sucrose)، تری هالوز (Trehalose)، رافینوز (Raffinose) و سایر قندها با تشکیل پیوندهای هیدروژنی با فسفولیپیدهای غشاء قادر به حفظ انسجام ساختاری غشاء هستند [۸۰]. این مواد با عمل آگیری، خطر تشکیل کریستال های یخ را کاهش داده و بنابراین اثرات سمی ضد یخ های نفوذپذیر کمتر می شود. قندها همچنین در طی حذف ضد یخ های نفوذپذیر از سلول از شوک های اسمزی شدید و از آگیری سریع جلوگیری می کنند [۸۱].

### سرعت سرد کردن (Cooling rate)

سرعت انجماد یکی از معیارهای اصلی بقای سلول در زمان انجماد است. سرعت انجماد خیلی آهسته ممکن است سلول ها را به خاطر مواجهه طولانی مدت با یک محلول غلیظ از بین ببرد. به علاوه سرمادهی خیلی آهسته می تواند باعث مرگ سلولی با تشکیل کریستال یخ شود.

زمانی که سلول ها در محلولی تا دمای زیر صفر درجه سرد می شوند کریستال های یخ ابتدا در محلول خارج سلولی شکل گرفته و سیتوپلاسم سلول دچار فرا سرما (Supercooling) می شود. چنانچه سیتوپلاسم سلول تا دمای پایین تر سرد شود (زیر ۱۰- یا ۱۵- درجه سانتی گراد) کریستال های یخ ممکن است به طور ناگهانی در خود سیتوپلاسم تشکیل شوند. این رخداد اغلب برای سلول مرگ آور است.

از آن جایی که دو فاکتور خیلی مهم برای انجام انجماد شیشه‌ای موفق، سرعت انجماد بالا و غلظت بالای ضد یخ است، بنابراین ایجاد توازن بین به حداکثر رسانیدن سرعت انجماد و به حداقل رسانیدن غلظت ضد یخ، از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. سرعت ایده‌آل برای انجماد شیشه‌ای سرعتی است که به آب داخل سلولی فرصت خارج شدن به‌منظور انجماد و یا شیشه‌ای شدن در خارج سلول را می‌دهد. بنابراین استراتژی اولیه هر پروتکل انجماد شیشه‌ای موفق باید گذر سریع از دمای بحرانی که بین ۱۵ تا ۵- درجه سانتی‌گراد است و در آن احتمال ایجاد آسیب‌های برودت بالا می‌رود، باشد [۷۴].

### دما در زمان قرارگیری در معرض ضد یخ ها

راه دیگر برای کاهش سمیت ضد یخ ها، کاهش دما در زمان قرارگیری بافت تخمدان در معرض ضد یخ ها است. از آنجائیکه دما بر قدرت نفوذ ضد یخ اثر می‌گذارد، دمای پائین تر باعث افزایش مدت زمان قرارگیری در معرض ضد یخ و در نتیجه افزایش احتمال آسیب اسمزی می‌شود. بنابراین افزایش دما محلول انجمادی، اجازه نفوذ سریع تر ضد یخ را می‌دهد و مدت زمان قرارگیری در معرض ضد یخ و آسیب های احتمالی را کاهش می‌دهد [۷۸]. در انجماد شیشه ای بافت تخمدان در بیشتر پروتکل ها از دمای ۴- تا ۰- درجه سانتیگراد استفاده می‌شود. مطالعه ای در مورد انجماد شیشه ای بافت تخمدان موش نشان داد که انجماد در دمای اتاق بطور موثری بر زنده مانی فولیکول های تخمدانی تاثیر دارد [۸۲].

### اندازه نمونه

اندازه قطعات بافت تخمدان نقش مهمی در موفقیت انجماد شیشه ای دارد. برای مثال بمنظور نفوذ محلول های انجمادی به بخش های داخلی تر نمونه های بزرگتر بافت تخمدان زمان بیشتری لازم است و سلول های سطحی بدلیل قرارگیری زیاد در معرض ضد یخ ها دچار آسیب می‌شوند. زمانیکه نمونه ها در داخل نیتروژن مایع فرو برده می‌شوند، بخار وسیعی سطح آن ها را می‌پوشاند و سرعت سرد شدن را پائین می‌آورد [۷۹]. برای کاهش مدت زمان تشکیل پوشش بخار و افزایش سرعت سرد شدن نمونه ها بهتر است اندازه بافت های تخمدانی کوچکتر باشد.

### نوع Carrier

بمنظور کاهش حجم محلول های انجمادی، وسایل مختلف در انجماد شیشه ای بافت تخمدان شامل straw های پلاستیکی و دستی، copper grid، کرایووایال، کرایوتاپ و سوزن استفاده شده اند. اما بیشتر وسایل انجمادی ابعاد بزرگ و دیواره های ضخیمی دارند و از مواد نارسانا تشکیل شده اند که اثر منفی بر سرعت سرد شدن دارد. بعضی از محققین از سیستم های carrierless دیگری از جمله Solid surface vitrification (SSV) و Minimum drop size (MDS) استفاده کرده اند [۷۴].

### سرعت ذوب Warming rate

مرحله مهم بعدی مرحله ذوب بافت تخمدان است. در این مرحله، نمونه‌ها از دمایی عبور می‌کنند که ممکن است در مکان‌هایی که ضد یخ با غلظت مناسب نفوذ نکرده باشد کریستال‌های یخ تشکیل شود و این عمل با افزایش سرعت ذوب یا کاهش اندازه نمونه قابل کاهش است [۷۸].

### ۳-۵-۳-۲ راهکارهای افزایش کارایی فریز بافت تخمدان

روش Needle immersed vitrification (NIF) یا استفاده از نیدل که با افزایش سرعت سرد شدن باعث کاهش غلظت ضد یخ‌ها و در نتیجه کاهش آسیب وارده به بافت می‌شود [۸۳]. کاربرد کولین در محیط فریز بجای سدیم با تثبیت ساختار غشا سلولی باعث حفظ غشاء در برابر آسیب‌های حاصل از فریز شده و اووسیت و سلول‌های فولیکولی را بهتر حفظ می‌کند [۸۴]. استفاده از Trolox (انالوگ ویتامین ای) با کاهش استرس وارد شده به شبکه اندوپلاسمی باعث افزایش زنده‌مانی فولیکول‌های بافت تخمدان در میمون شد [۸۵]. استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌هایی مانند NAC در محیط انجمادی باعث افزایش کارایی انجماد بافت تخمدان انسان گردید [۸۶]. نگهداری نمونه تخمدان بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه با کاهش متابولیسم سلولی باعث کاهش آسیب احتمالی از فریز شد [۸۷].

### ۴-۵-۳-۲ انجماد فولیکول‌های تخمدانی

در مطالعات قبلی در انسان نشان داده شده بود که تفاوت معنی‌داری بین فریز بافت تخمدان و فریز فولیکول‌های تخمدانی وجود ندارد [۸۸]. ولی مطالعات جدید نشان می‌دهد که فریز فولیکول‌های تخمدانی کارآمدتر از فریز بافت تخمدان است [۸۹].

دلایل ارجحیت فریز فولیکول‌های تخمدانی این است که بافت تخمدان ساختار پیچیده‌تری دارد و دارای جمعیت هتروژنی از سلول‌ها (سلول‌های گرانولوزا، اووسیت و سلول‌های استروما) با ویژگی‌های متفاوت است و به منظور نفوذ مناسب ضد یخ‌ها بافت تخمدان باید مدت زمان بیشتری در معرض آن‌ها قرارگیرد در نتیجه آسیب به سلول‌ها بیشتر است. اما در روش فریز فولیکول‌های تخمدانی بدلیل نفوذ سریع و راحت ضد یخ‌ها می‌توان از غلظت پائین‌تر و مدت زمان کمتر استفاده کرد. از طرق دیگر با جدا سازی فولیکول‌های تخمدانی و فریز آن‌ها شاید بتوان تعداد بیشتری فولیکول برای کشت یا پیوند بدست آورد چون فریز بافت تخمدان باعث کاهش فولیکول‌های جدا شده از تخمدان می‌شود [۸۹].

### ۶-۳-۲ کاهش اثرات درمانی گنادوتوکسیک بعنوان راهکار آتی:

کاهش اثرات مضر شیمی‌درمانی، شامل محصور سازی درغشاء (encapsulation) عوامل شیمی‌درمانی با نانوذرات است که بنظر میرسد باعث مهار اثرات آپوپتوزی سریع شیمی‌درمانی بر فولیکول‌های پریموردیال می‌شود [۹۰].

تعدیل مسیرهای مرتبط با آپوپتوز به کمک عواملی مانند اسفنگوزین-۱- فسفات (Sphingosine 1 phosphate (S1P)) بعنوان روش درمانی جدید احتمالی می باشد که باعث کاهش مرگ فولیکول های پریموردیال و مهار آپوپتوز در بافت های تخمدانی کشت داده شده می شود [۹۱]. البته کاربرد کلینیکی S1P هنوز مورد بحث است زیرا مصرف سیستمیک این ماده بدلیل دارا بودن اثرات عروق زایی (Angiogenesis) و ضدآپوپتوزی (Anti apoptotic)، می تواند باعث افزایش خطر پیشرفت بیماری شود [۹۲].

## ۲-۴- پیوند بافت تخمدان :

بمنظور شروع مجدد فعالیت تخمدانی و تکوین فولیکول های تخمدانی بعد از بهبود از سرطان، بافت کورتکس تخمدان (Ovarian cortex tissue) بعد از یخ گشایی (Thawing) به بدن بیمار پیوند زده می شود که این پیوند می تواند بصورت پیوند اورتوتوپیک (Orthotopic transplantation) یا هتروتوپیک (Heterotopic transplantation) باشد. شاخص های از سرگیری فعالیت بافت تخمدانی شامل افزایش میزان هورمون استرادیول و AMH و کاهش FSH می باشد.

## ۲-۴-۱- پیوند اورتوتوپیک بافت تخمدان:

قطعات بافت کورتکس تخمدان یخ گشایی شده در صورت وجود تخمدان، به ناحیه مدولای تخمدان (Ovarian medulla) یا زیر کورتکس و در صورت عدم وجود تخمدان، در ناحیه پریتنئوم (Peritoneum) در نزدیکی لوله فالوپ پیوند زده می شود. در صورت پیوند قطعات بافتی بزرگ (۴×۱۰ میلی متر) این قطعات باید بعد از حذف کورتکس (Decortications) تخمدان به ناحیه مرکزی بخیه زده شوند اما در مورد قطعات بافتی کوچک (۲×۲ میلی متر) این قطعات می توانند روی مدولای تخمدانی که کورتکس آن برداشته شده قرار داده شوند و به کمک یک عامل چسبنده قابل جذب که خودش به باقی مانده کورتکس تخمدان اصلی بخیه زده می شود نگهداری شوند [۹۳، ۹۴]. از مزایای پیوند اورتوتوپیک، ایجاد محل ایده ال برای رشد فولیکول های تخمدانی و امکان بارداری طبیعی (Natural pregnancy) است ولی از حیث تعداد قطعات پیوندی محدودیت وجود دارد.

مدت زمان از سرگیری فعالیت بافت تخمدانی در صورت عدم شیمی درمانی قبل از انجماد بافت تخمدان ۴/۵ - ۳/۵ ماه بعد از پیوند و در صورت انجام شیمی درمانی ۶/۵ - ۵/۵ ماه می باشد. طول مدت فعالیت بافت پیوند زده شده نیز در صورت عدم شیمی درمانی قبل از انجماد بافت تخمدان بیش از ۴ سال و در صورت انجام شیمی درمانی کمتر از ۲ سال می باشد [۹].

اولین تولد زنده حاصل از پیوند اورتوتوپیک بافت تخمدان در سال ۲۰۰۴ گزارش شده است [۹۳]. تاکنون بیش از ۶۰ مورد تولد زنده از پیوند اورتوتوپیک بافت تخمدان گزارش شده است [۹۵]. اولین تولد زنده حاصل از پیوند بافت تخمدان یخ گشایی شده دختر بچه نابالغ در سال ۲۰۱۵ گزارش گردید [۹۶]. در طی تحقیق بعمل آمده از مراکز در اسپانیا، بلژیک و دانمارک در صد حاملگی حاصل از پیوند اورتوتوپیک بافت تخمدان ۲۱٪ و درصد تولد زنده ۱۰٪ گزارش شده است [۹].

بررسی ۱۲ ساله در مورد نتایج پیوند بافت تخمدانی نشان داد که ۹۰٪ بیماران دارای AMH پائین تر از حد نرمال (کمتر از 0/5 نانوگرم در میلی لیتر) و ۳۰٪ مبتلا به POF بودند. میزان POF در بیماران مبتلا به سرطان سینه در مقایسه با بیماران مبتلا به بدخیمی های خونی علیرغم سن بالاتر در گروه اول، کمتر بود. نتایج حاصل از انتقال در دختران نابالغ حاکی از بروز قاعدگی طبیعی، FSH نرمال بوده لیکن تعداد فولیکول های آنترال و حجم تخمدان بطور قابل ملاحظه ای کوچکتر از همسالان بوده است. بیشتر حاملگی های گزارش شده در افرادی است که در زمان فریز بافت تخمدان جوانتر از ۳۰ سال بوده اند [۹۷].

#### ۲-۴-۲- پیوند هتروتوپیک بافت تخمدان:

در پیوند هتروتوپیک، کورتکس تخمدانی در بازو یا زیر پوست دیواره شکم پیوند زده می شود. در این روش محدودیتی از لحاظ تعداد قطعات پیوندی وجود ندارد و همچنین امکان مشاهده تکوین فولیکول های تخمدانی وجود دارد. اما در این روش امکان بارداری طبیعی وجود ندارد و نیاز به استحصال اووسیت، انجام لقاح (In vitro fertilization) و انتقال جنین (Embryo transfer) می باشد. از نتایج حاصل از این پیوند، تنها یک بارداری گزارش شده و بنابراین کاربرد آن تا حدودی سوال برانگیز است [۹۸].

#### ۲-۴-۳- محدودیت های پیوند بافت تخمدان:

##### ۲-۴-۳-۱- کاهش ذخایر فولیکولی:

گرچه پیوند بافت تخمدان منجر به تولد زنده شده است اما مطالعات بیانگر اختلال در فولیکولوژنز است و میزان بالای فولیکول های خالی، اووسیت های نابالغ یا غیرطبیعی در پیوند بافت تخمدان گزارش گردیده است. این اختلالات می تواند به دلیل عدم همزمانی بلوغ سلول های گرانولوزا و تخمک، تاخیر در عروق زایی مجدد بافت پیوندی و فعال شدن زودرس (premature activation) فولیکول های تخمدانی و کاهش ذخایر تخمدانی باشد [۹۹]. کاهش فولیکول ها می تواند بدلیل هیپوکسی (Hypoxia) ناشی از تاخیر در عروق زایی مجدد بافت و ایسکمی (Ischemia) باشد. مطالعات نشان داده که ایسکمی و استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) با مصرف داروهایی از جمله VEGF و S1P که باعث تحریک عروق زایی می شوند، قابل کاهش است [۱۰۰]. مکانیسم دیگری که باعث کاهش ذخایر فولیکولی تخمدان بعد از پیوند می شود، حذف عوامل مهاری مانند AMH است. پس از پیوند بدلیل کاهش تعداد فولیکول های آنترال و کاهش ترشح اینهبین آ (Inhibin A) و AMH، میزان FSH افزایش یافته و ذخایر فولیکولی شروع به رشد می کنند. استفاده از AMH می تواند با مهار فعال شدن زودرس فولیکول های پریموردیال باعث حفظ ذخایر فولیکول ها در بافت پیوند زده شود [۱۰۱].

##### ۲-۴-۳-۲- احتمال انتقال سلول های سرطانی :

یک مسئله جدی در مورد پیوند بافت تخمدان، احتمال انتقال سلول های بدخیم (Malignant cells) متعاقب پیوند بافت می باشد. نتایج واکنش زنجیره ای پلیمرز (Polymerase chain reaction (PCR)) بافت تخمدان بیماران



مبتلا به لوکمی نشان می دهد که وجود سلول های بدخیم در بیش از ۵۰٪ بیماران گزارش شده است و محققان به این نتیجه رسیده اند که پیوند بافت تخمدان در مورد این بیماران روش مناسبی نمی باشد [۱۰].

بدلیل اینکه سرطان سینه یکی از شایعترین سرطان ها در خانم ها است، مطالعاتی در مورد وجود سلول های بدخیم در کورتکس تخمدانی منجمد شده در این بیماران انجام شده است. بررسی های بافتی (Histological assessment) و ایمنوهیستوشیمی (Immunohistochemical detection)، عدم وجود سلول های بدخیم را در قطعات کورتکس تخمدانی بیماران مبتلا به سرطان سینه در مراحل اولیه نشان می دهد (Sanchez 2009, Rosendahl 2011). در بررسی ۱۳ مورد سرطان سینه پیشرفته، علیرغم عدم حضور سلول های بدخیم در بررسی های بافتی و ایمنوهیستوشیمی، بررسی های PCR بیانگر بیان ژن ماماگلوبین بی (Mammaglobin B) در ۵ مورد می باشد. لذا برای اثبات ایمنی پیوند بافت تخمدان در خانم های مبتلا به سرطان سینه پیشرفته، استفاده از روش های PCR و زونوگرافت (Xenograft) مورد نیاز می باشد [۱۰۲].

بمنظور حفظ باروری در مورد بیمارانی که خطر انتقال سلول های سرطانی و عود مجدد سرطان وجود دارد، روش های دیگری مانند جداسازی فولیکول های تخمدانی و کشت (Isolated Follicle culture) یا پیوند فولیکول های جدا شده (Isolated follicle implantation) پیشنهاد می گردد [۱۰۳].

#### ۲-۴-۴ راهکارهای افزایش کارایی پیوند بافت تخمدان

استفاده از بعضی مواد می تواند با افزایش میزان عروق زایی و کاهش آپوپتوز فولیکول های تخمدانی باعث افزایش کارایی پیوند بافت تخمدان شود.

SIP با مهار مسیر مرگ سلولی و کاهش آپوپتوز فولیکول های پریموردیال و افزایش عروق زایی بافت پیوند زده شده باعث افزایش کارایی پیوند بافت تخمدان انسانی به موش گردید [۱۰۴، ۱۰۵].

ترکیب Simvastatin و Methylprednisolone اثرات مفیدی بر کیفیت و عملکرد بافت تخمدان پیوند زده شده در موش دارد [۱۰۶].

5-(N-ethylcarboxamido) adenosine با افزایش بیان ژن پروتئین آنژیوپوئین ۱ (Angiopoietin-1 (Ang1)) ، Ang2 ، VEGF-121 و VEGF-189 باعث افزایش عروق زایی در پیوند بافت تخمدان انسانی به موش شد [۱۰۷].

قطعه قطعه کردن بافت تخمدان با مهار مسیر Hippo و استفاده از مواد فعال کننده مسیر AKT (مسیرفعالسازی فولیکول های پریموردیال) باعث افزایش موفقیت پیوند بافت تخمدان انسانی و منجر به تولد زنده گردید [۱۰۸].

#### پیوند کل تخمدان:

۲-۴-۴-

مزیت پیوند کل تخمدان، کاهش ایسکمی در فاصله زمانی بین پیوند و عروق زایی مجدد است که مانع از دست رفتن تعداد زیادی از فولیکول ها می شود. اما مشکل در فرآیند فریز کل تخمدان است که بدلیل عدم نفوذ کافی ضد یخ ها، خطر آسیب عروقی ناشی از تشکیل کریستال های یخ و ترومبوزیس (Thrombosis) وجود دارد. استفاده از روش های میکروجرراحی با برش عروق تخمدانی و تزریق عروقی مواد محافظ انجمادی منجر به بهبود نتایج گردیده است. پیوند

کل تخمدان یخ گشایی شده با آناستوموز عروق (Vessels anastomosis) و عروق زایی سریع می تواند ایسکمی بعد از پیوند را به حداقل برساند [۷۳].

اولین گزارش فریز کل تخمدان انسان توسط Donnez و همکاران و Jadoul و همکاران گزارش شده ولی ادامه نیافته است [۱۰۹]. میزان موفقیت پیوند کل تخمدان به اندازه موفقیت پیوند قطعات کورتکس تخمدانی نبوده است و از دست رفتن ۴ تخمدان از ۱۰ تخمدان پیوند زده شده بدلیل ترومبوزیس گزارش شده است [۱۱۰]. اخیراً Campbell و همکاران نشان داد که پیوند کل تخمدان یخ گشایی شده با بهینه سازی نفوذ مواد محافظ انجمادی و استفاده از عوامل ضد ترومبوز (Anti thrombotic) برای جلوگیری از تشکیل لخته در عروق تخمدان می تواند منجر به تولد زنده در گوسفند شود [۱۱۱].

#### ۲-۴-۵- زنگرفت یا پیوند بافت تخمدان به جانور دیگر:

زنگرفت، پیوند بافت تخمدان انسانی به موش سرکوب شده ایمنی (Immunodeficient) است. موش های SCID (Sever combined immunodeficiency) بدلیل عدم پاسخ ایمنی به بافت پیوند شده، مدل مناسبی برای مطالعات پیوند تخمدان می باشند. بمنظور عروق زایی بافت پیوند زده شده، بافت تخمدان باید در زیر پوست (Subcutaneous)، داخل عضله (Intramuscular) یا زیر کپسول کلیه (Subrenal capsule) پیوند زده شود. این روش برای بررسی تکوین فولیکول های تخمدانی، ارزیابی و بهبود روش فریز، ارزیابی خطر انتقال سلول های سرطانی کارآمد می باشد. همچنین بعنوان روشی برای بلوغ اووسیت بمنظور غلبه بر مشکلات کشت فولیکول های تخمدانی کاربرد دارد. اما مشکل اصلی امکان انتقال ویروس و پریون از موش به انسان (از جمله آدنووایروس ها و سائتومگالوویروس) و ایمنی نوزادان حاصل از این روش (از جمله تغییرات اپی ژنتیک) است که جواب این سوالات بعد از عملی شدن این روش قابل حصول است لذا تا زمانی که مشکل ایمن بودن آن حل نشود کاربرد بالینی ندارد [۱۱۲].

#### ۲-۵- کشت بافت یا فولیکول های جدا شده تخمدانی:

کشت فولیکول های تخمدانی بعنوان روشی جایگزین پیوند بافت تخمدان برای جلوگیری از خطر انتقال سلول های سرطانی است. هدف از این روش توسعه یک سیستم *in vitro* برای رشد فولیکول های پریموردیال و پرایمری به مرحله آنترال بمنظور بدست آوردن تخمک بالغ می باشد. یک سیستم کشت چند مرحله ای بمنظور تامین هریک از مراحل تکوین فولیکولی و در نهایت بدست آوردن اووسیت شایسته تکاملی لازم می باشد. بدلیل پیچیدگی تولید فولیکول ها در محیط *in vivo*، هنوز تحقیقات بسیاری در زمینه کشت مورد نیاز است تا نتایج بتواند کاربرد کلینیکی پیدا کند [۱۱۳].

کشت فولیکول های تخمدانی می تواند بصورت کشت بافت یا کشت فولیکول های جدا شده یا کشت دو مرحله ای (Two – way culture) شامل کشت بافت و سپس کشت فولیکول های جدا شده باشد.

#### ۲-۵-۱- کشت بافت تخمدان:

کشت ۸ روزه کل تخمدان (Whole ovary culture) موش تازه متولد شده و سپس جداسازی و کشت تخمک- سلول گرانولوزا از فولیکول های ثانویه تکوین یافته منجر به تولد زنده شد [۱۱۴]. کشت کل تخمدان بدلیل کوچک بودن آن در موش امکان پذیر است اما این روش در پریمات (Primate) و بیشتر گونه های اهلی، بدلیل بزرگ بودن تخمدان امکانپذیر نمی باشد. بهمین دلیل در گونه های دیگر، کشت قطعات کوچک بافت تخمدان (Ovarian tissue slices) مورد توجه قرار گرفته است [۱۱۵، ۱۱۶].

کشت قطعات کورتکس تخمدانی، فولیکول ها را از عوامل پاراکرین (Paracrine factors) و اندوکرینی (Endocrine) تنظیم کننده رشد جدا می کند اما ارتباطات بین فولیکول ها و بین فولیکول ها و سلول های استروما هنوز باقی است. آشکار است که شکل بافت و تراکم استروما عوامل مهمی در تنظیم سرعت رشد فولیکول در محیط invitro می باشند بطوریکه در قطعات توپر میزان ازسرگیری رشد کمتر است [۱۱۷]. برعکس حذف سلول های استروما و کشت قطعات بافتی تازه بصورت ورقه های پهن باعث افزایش سرعت رشد فولیکول ها می شود [۱۶]. البته در مطالعه انجام شده روی کشت قطعات بافت تخمدانی منجمد شده، کشت قطعات ضخیم باعث تکوین فولیکولی بهتر در مقایسه با کشت قطعات نازک تر شد که شاید بدلیل آسیب حاصل از نازک کردن بافت ها با روش دستی باشد [۱۱۸].

در کشت بافت تخمدانی بمنظور پیشبرد تکوین و افزایش بقا فولیکول ها از هورمون ها و عوامل رشد مختلف مانند FSH، انسولین، Activin، GDF9، FGF، گوانوزین مونوفسفات حلقوی (Cyclic guanosine monophosphate (cGMP) و N-acetylcysteine (NAC)) استفاده می شود. [۱۱۵، ۱۱۹، ۱۲۰، ۱۲۱].

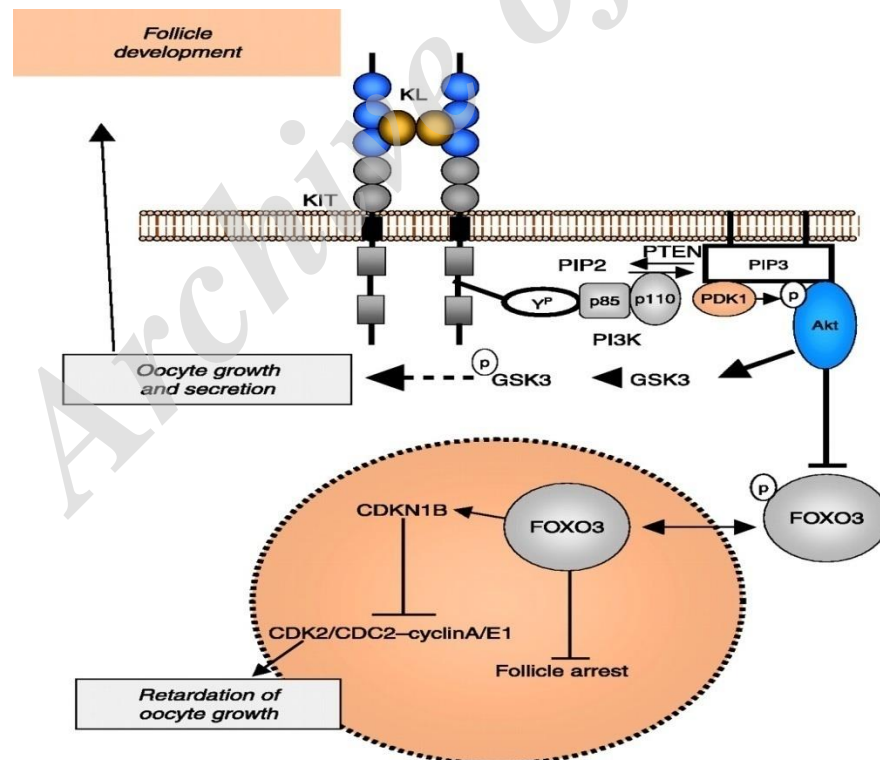
تحقیق انجام شده توسط Telfer و همکاران در سال 2008 نشان داده است که کشت ۶ روزه قطعات کورتکس بافت تخمدان انسانی می تواند منجر به تولید فولیکول های ثانویه شود سپس جداسازی فولیکول های ثانویه و کشت آنها بمدت ۴ روز در حضور Activin منجر به تشکیل فولیکول آنترال گردید [۱۶].

کشت قطعات بافتی منجمد شده تخمدان انسانی بر روی داربست آلژینات (Alginate scaffold) در مقایسه با کشت قطعات بافتی منجمد شده بر روی ماتریژل بمدت ۱۴ روز باعث افزایش تعداد فولیکول های درحال رشد و کاهش فولیکول های آترتیک (Atretic follicles) گردید [۱۲۲]. کشت قطعات بافتی منجمد شده تخمدان انسانی در داخل ژل فیبرینوژن اتیلن گلیکول (Ethylene glycol fibrinogen) بمدت یک هفته باعث فعالسازی فولیکول های پریموردیال و تکوین آن ها گردید. فیبرین، فاکتورهای رشد را بدام می اندازد و از طرفی تجزیه فیبرین توسط پروتئازهای ترشح شده توسط سلول های بافت تخمدانی فضای لازم برای رشد فولیکول های تخمدانی را فراهم می آورد [۱۱۸].

زمانیکه رشد فولیکول در داخل قطعه بافتی آغاز می شود، فولیکول ها می توانند به مرحله فولیکول چند لایه ای (Multilayer follicle) تکوین یابند، در این زمان محیط کورتکس برای رشد بعدی فولیکول مهار کننده می شود. بنابراین کشت قطعات بافتی نمی تواند تکوین مناسب تمام مراحل را حمایت کند و یک سیستم کشت چند مرحله ای لازم است.

## ۲-۵-۲- فعالسازی فولیکول های پریموردیال :

بافت کورتکس تخمدان حاوی تعداد زیادی فولیکول پریموردیال است که با کشت بافت تخمدان شروع به فعال شدن می کنند و به فولیکول پرایمری و ثانویه تکوین می یابند. بر اساس مطالعات انجام شده بر روی مکانیسم های مولکولی تنظیم کننده شروع تکوین فولیکول ها، با فعالسازی مسیره های AKT و PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) و مهار مسیر سیگنالی Pten (Phosphatase and tensin homolog singnalling pathway) و یا مسیر hippo (Hippo signaling pathway) می توان به روند تکوین فولیکول های پریموردیال به پرایمری و ثانویه سرعت بخشید [۱۲۳، ۱۲۴]. البته با مهار مسیر Pten در کشت بافت قطعات منجمد شده تخمدان انسانی، میزان دژنره شدن فولیکول ها افزایش یافت و این احتمال می رود که قطعات بافتی منجمد شده بدلیل حساسیت باید در معرض غلظت پائین تر ماده مهار کننده Pten (Pten inhibitor) قرار گیرند [۱۱۸]. داروهای پلیمریزه کننده اکتین مانند JASP (Jasplakinolide) و S1P با پلیمریزاسیون اکتین باعث مهار مسیر hippo و بیان فاکتورهای رشد بافت همبند می شوند که در نهایت باعث افزایش رشد فولیکول های تخمدانی می گردند [۱۲۵]. در مطالعه دیگری کشت قطعات بافت تخمدان انسانی با مهار مسیر Pten باعث فعالسازی فولیکول های پریموردیال و تکوین آن ها به فولیکول ثانویه شد اما جداسازی فولیکول های ثانویه و رشد آن ها با مهار مسیر Pten باعث کاهش بقا این فولیکول ها گردید. بنظر میرسد استرومای تخمدان قادر به تعدیل اثرات تخریبی ماده مهار کننده Pten در کشت بافت می باشد و در کشت فولیکول های جدا شده بدلیل عدم وجود استروما و تعدیل اثرات تخریبی این ماده، کاهش بقا فولیکول ها مشاهده می گردد (124).



شکل ۲-۵ مسیر های فعالسازی فولیکول های پریموردیال تخمدانی

## ۲-۵-۳- جداسازی و کشت فولیکول های تخمدانی:

اولین مرحله بمنظور کشت یا پیوند فولیکول های تخمدانی، جداسازی این فولیکول ها از بافت تخمدان است. روش های مکانیکی و آنزیمی برای جداسازی فولیکول های تخمدانی در انسان و سایر جانوران استفاده شده است. [۱۶، ۱۸].

در روش جداسازی مکانیکی (Mechanical isolation)، فولیکول های تخمدانی با کمک سوزن های ۲۱-۲۵ و اسکالپل از بافت تخمدان جدا می شوند. در این روش بدلیل عدم آسیب به تکا و غشاء پایه، انسجام ساختاری فولیکول و ارتباط بین سلول های گرانولوزا، تکا و اووسیت حفظ می شود و این امر باعث افزایش میزان زنده مانده فولیکول های جدا شده در مقایسه با روش شیمیایی می گردد. اما روش مکانیکی زمان بر و مشکل است و محدودیت این روش در جداسازی فولیکول های کوچک و همچنین جداسازی فولیکول ها از استرومای متراکم مانند استرومای تخمدان پستانداران بزرگ و از جمله انسان می باشد [۱۶، ۱۷].

در روش هضم آنزیمی (Enzymatic digestion)، فولیکول های تخمدانی به کمک آنزیم های کلاژناز (Collagenase) و دئوکسی ریبونوکلاژ (Deoxyribonuclease) یا آنزیم لیبراز (Liberase enzyme) از بافت تخمدان جدا می شوند. در این روش بدلیل تسهیل جداسازی فولیکول ها از کورتکس تخمدانی، تعداد بیشتری فولیکول در زمان کمتری جداسازی می شوند. اما در این روش هضم پروتئولیتیکی و آسیب به سلول های تکا و غشاء پایه می تواند بر زنده مانده (Survival) و تکوین بعدی فولیکول ها تاثیر بگذارد [۱۸، ۱۹، ۲۰]. (آنزیم لیبراز بمنظور کاهش آسیب فولیکول های تخمدانی و افزایش کیفیت فولیکول های جدا شده در هضم آنزیمی بافت تخمدان انسانی استفاده شده است [۱۲۶، ۱۲۷].

هدف کشت و تکوین فولیکول، بدست آوردن تخمک شایسته از نظر تکاملی (Developmental competency) است. برای بدست آمدن شایستگی تکاملی اووسیت، اووسیت باید بلوغ هسته ای و سیتوپلاسمی را پشت سر بگذارد تا قادر به لقاح و تولید جنین باشد. بنابراین سیستم کشت فولیکول باید قادر به تولید محیطی باشد که نه تنها باعث رشد تخمک می شود بلکه اجازه تکمیل بلوغ هسته و سیتوپلاسم را نیز بدهد.

## ۲-۵-۴- اهمیت حفظ ساختار فولیکولی:

رشد تخمک و شایستگی تکاملی سیتوپلاسمی آن وابسته به اتصالات سوراخدار (Gap junction) بین تخمک و سلول های گرانولوزا می باشد. این اتصالات باعث ارتباط سلول های گرانولوزا و اووسیت و تبادل عوامل پاراکرینی ترشح شده از هر دو سلول می شود. شواهد نشان می دهد که تکثیر سلول های گرانولوزا و فرآیندهای متابولیسمی خاص در این سلول ها توسط ترشحات مشتق شده از تخمک کنترل می شود [۱۲۸]. همچنین تخمک بدون مشارکت سلول های گرانولوزا قادر به انتقال بعضی از اسید آمینه ها، انجام گلیکولیز (Glycolysis) و بیوسنتز کلسترول نمی باشد و برای تنظیم فعالیت های متابولیکی و تعادل PH وابسته به سلول های گرانولوزا اطراف است [۱۲۹]. آسیب به اتصالات سوراخدار و ارتباطات بین سلولی در طی کشت *in vitro* باعث تخمک گذاری پیش از بلوغ (Premature ovulation) و در نهایت دژنره شدن تخمک رها شده می گردد. بنابراین حفظ ساختار سه بعدی و ارتباطات تخمک-سلول های گرانولوزا برای بلوغ موفق فولیکول ها در محیط *In vitro* ضروری است [۱۳].

## ۲-۵-۵- سیستم کشت دو بعدی (Two dimensional culture) :

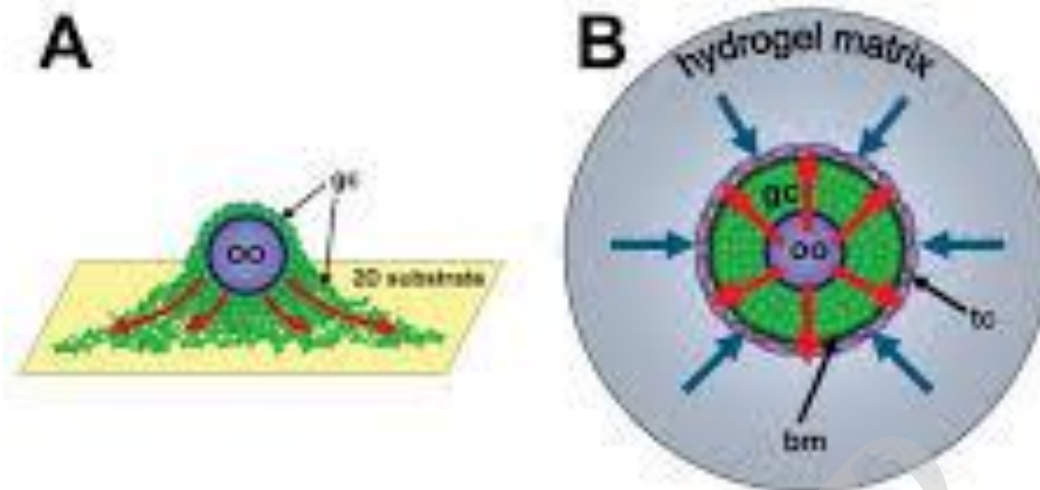
در این سیستم، فولیکول های جدا شده روی سطح دوبعدی دیش کشت با پروتئین های ماتریکس خارج سلولی (Extracellular matrix proteins) از قبیل کلاژن (Collagen) یا پلی لیزین (Polylysine) قرار داده می شوند. در این سیستم کشت، سلول های گرانولوزا در حال رشد به سطح دیش چسبیده و از اووسیت جدا می شوند و بدلیل آسیب به اتصالات سوراخدار و از بین رفتن اتصال بین تخمک و سلول های گرانولوزا، فرآیند بلوغ تخمک مختل می شود [۱۳۰].

بیشتر تحقیقات اولیه در کشت فولیکول در محیط *In vitro* با استفاده از سیستم کشت دو بعدی بوده است. علیرغم موفقیت های بدست آمده در تولید تخمک با کیفیت و تولد زنده در موش [۱۳۱] این سیستم در کشت فولیکول های گاو، گوسفند و انسان موفق نبوده است [۱۳۲، ۱۳۳]. بعلاوه در گونه های جانوری بزرگتر از جمله انسان، بدلیل کشت طولانی مدت فولیکول ها و اندازه بزرگتر آن ها در طی مدت زمان کشت، حفظ ارتباطات سلولی بین سلول های گرانولوزا و تخمک مشکل تر می باشد [۱۳۴].

## ۲-۵-۶- سیستم کشت سه بعدی (Three dimensional culture) :

پی بردن به اهمیت ارتباطات بین سلولی، زمینه استفاده از کشت سه بعدی را فراهم آورد. سیستم کشت سه بعدی قادر به حفظ شکل کرووی فولیکول های تخمدانی و ارتباط سلول-سلول (Cell-cell interaction) و سلول - ماتریکس (Cell - matrix interaction) می باشد و اجازه بلوغ موفق را به تخمک می دهد [۲۶]. کشت سه بعدی فولیکول های تخمدان انسانی در کلاژن باعث رشد فولیکول ها گردید در حالی که کشت دو بعدی فولیکول ها روی سطح پوشیده شده با کلاژن باعث افزایش اندازه فولیکول ها نشد [۱۳۵].

مطالعات انجام شده نشان می دهد که کشت سه بعدی باعث تعدیل رفتار سلول، رشد، ترشحات، پاسخ به تحریکات و ارتباط بین سلول ها می گردد. تحقیقی نشان می دهد که مهار گیرنده های سطح سلولی اینتگرین بتا ( $\text{Integrin } \beta 1$ ) باعث تغییر رفتار سلول های سرطانی سینه در محیط کشت سه بعدی می شود در حالی که در سیستم کشت دوبعدی این تغییر مشاهده نمی شود [۱۳۶]. همچنین گزارش شده که پروفایل بیان ژن سلول های کشت شده در محیط کشت سه بعدی بیشتر به محیط *In vivo* شباهت دارد و کاملاً با بیان ژن سلول های کشت داده شده در محیط دوبعدی تفاوت دارد [۱۳۷]. ماتریکس خارج سلولی علاوه بر سازماندهی فضایی سلول ها (Cell spatial rearrangement)، در ارتباط سلولی، کنترل تمایز سلولی (Cell differentiation) تعدیل پاسخ به سیگنال های بیوشیمیایی از محیط سلولی نیز نقش دارد [۱۳۸].



شکل ۲-۶ مقایسه کشت دو بعدی (A) و کشت سه بعدی (B) فولیکول های تخمدانی

#### ۲-۴-۶-۱- پارامترهای طراحی بیومتریال (Biomaterial) برای کشت سه بعدی:

علیرغم مزیت های کشت سه بعدی، انتخاب بهترین سیستم کشت از لحاظ نوع بیومتریال موجود، ویژگی، نفوذپذیری، سمیت و تسهیل کار در طی کشت و جداسازی بعدی فولیکول مهم می باشد. گونه جانوری و مدت زمان مورد نیاز برای کشت فولیکول باید در انتخاب نوع سیستم کشت سه بعدی مورد توجه قرار گیرد. بعنوان مثال با توجه به اختلاف تراکم بافت تخمدان موش با پریمات بنظر می رسد که فولیکول های پریمات نیاز به بیومتریال سخت تری برای کشت *In vitro* و رشد داشته باشند بطوریکه میزان رشد و تکوین فولیکول های پریمات در غلظت ۰/۵٪ آلژینات بیشتر از غلظت ۰/۲۵٪ می باشد [۱۳۹].

اولین و مهمترین نکته در انتخاب بیومتریال این است که ترکیب شیمیایی باید غیرسمی (Non-toxic) باشد بطوریکه سلول در طی مدت زمان کشت زنده بماند. قابلیت ارتجاعی (Elasticity) داربست نیز باید به گونه ای باشد که علاوه بر تامین نیروی کافی برای جلوگیری از جداشدن سلول های گرانولوزا و حفظ ساختار کروی فولیکول، اجازه رشد سلول ها را نیز بدهد [۱۴۰]. همچنین علاوه بر حفظ ساختار، اجازه تبادلات گازی، انتشار موادمغذی و حذف مواد دفعی را نیز بدهد. افزایش عروق زایی در بخش های عمقی تر تخمدان که فولیکول های ثانویه و پری آنترال رشد می کنند، بیانگر نیاز بیشتر این فولیکول ها به اکسیژن در مراحل انتهایی بلوغ فولیکول می باشد. بلوغ فولیکول از پرایمری به آنترال در انسان بیش از ۱۲۰ روز طول می کشد و بعلاوه قطر فولیکول آنترال اولیه انسانی ۵-۲ میلیمتر است و سیستم کشت سه بعدی باید هم امکان انتشار مواد غذایی را برای این فولیکول های چند لایه ای فراهم آورد و هم اجازه این افزایش رشد را به فولیکول بدهد [۱۴۱]. در سیستم کشت سه بعدی انتشار، با تولید منافذ با اندازه های مختلف امکانپذیر است [۱۴۲].

یک ویژگی مهم دیگر، سختی (Stiffness) بیومتریال است که مقاومت در مقابل تغییرشکل با اعمال نیرو می باشد. سختی بیومتریال بر قطر فولیکول، تشکیل تکا، تشکیل آنتروم، تولید استروژن و میزان ازسرگیری میوز (Meiotic resumption) تاثیر دارد و می تواند برای مقایسه نتایج کشت سه بعدی فولیکول مورد استفاده قرار گیرد [۱۴۳]. سختی و تراکم آلژینات بر میزان انبساط فولیکول ثانویه، تولید هورمون و بلوغ اووسیت موثر است [۱۳].

ملاک ارزیابی بیومتریال، افزایش قطر فولیکول، تشکیل حفره آنتروم و کیفیت تخمک است. مطالعات نشان دهنده ارتباط بین سختی ژل کلسیم آلژینات و میزان رشد فولیکول و میزان تشکیل آنتروم می باشد. بطوریکه میزان تشکیل لایه تکا، حفره آنتروم و کیفیت تخمک موشی در فولیکول های کشت شده در غلظت پائین تر آلژینات بیشتر از فولیکول های کشت شده در غلظت بالاتر این ژل می باشد [۱۴۳، ۱۳].

#### ۲-۴-۶-۲- ماتریکس های کشت فولیکول:

ژل های مورد استفاده برای کشت شامل هیدروژل های طبیعی مانند آگار (Agar) ، کلسیم آلژینات (Calcium alginate) و هیالورونان (Hyaluronan) و همچنین پلی مرهای مصنوعی (Synthetic hydrogel) شامل پلی اتیلن گلیکول (Poly ethylene glycol) و پلی وینیل الکل (Polyvinyl alcohol) می باشد. هیدروژل شامل پلیمرهایی است که کراس لینک (Cross link) کرده و این کراس لینک سه بعدی باعث سختی ژل می شود. دما و شرایط cross از عوامل مهم در تکوین بعدی فولیکول می باشند. برای مثال آگار بدست آمده از جلبک دریایی (Seaweed) برای ذوب قبل از cross نیاز به دمای بالای غیرفیزیولوژیک دارد که می تواند باعث آسیب به فولیکول شود. میزان بالای آترزی در فولیکول های رشد کرده روی آگار در مقایسه با کشت سه بعدی فولیکول ها روی یک غشاء هیدروفوبیک (Hydrophobic membrane) گزارش شده است [۱۴۴]. آگارز با نقطه ذوب پائین می تواند ماتریکس بهتری برای کشت فولیکول ها باشد و اجازه encapsulation را در دمایی مناسب تر برای ادامه رشد سلول دهد [۱۴۵].

کلاژن، پروتئینی است که در بافت همبند یافت می شود و غنی از اسید آمینه گلیسین و پرولین است و با حرارت می تواند هیدرولیز شود. این هیدروژل بطور گسترده ای برای کشت فولیکول استفاده شده است. از محدودیت های این ژل، چروک شدن با گذشت زمان است که بر خصوصیات ژل تاثیر می گذارد و باعث کاهش شفافیت آن بمنظور ارزیابی های میکروسکوپی می شود. همچنین خارج سازی فولیکول ها از ژل مستلزم هضم آنزیمی ژل و آسیب احتمالی به تخمک است [۱۴۶].

یک داربست دیگر، ماتریکس خارج سلولی است که متشکل از کلاژن، لامینین (laminin) و فیبرونکتین (Fibronectin) می باشد. یکی از ماتریکس های خارج سلولی تجاری دردسترس که در رشد فولیکول کاربرد دارد، ماتریژل (Matrigel) است. ماتریژل ترکیب کلاژن IV، لامینین، فیبرونکتین، انتاکتین (Entactin)، پروتئو گلیکان های هپارین سولفات (Heparin sulphate proteoglycan) و فاکتورهای رشد مختلف شامل فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF) (Platelet derived growth factor)، EGF، FGF و فاکتور رشد شبه انسولین می باشد



[۱۴۷]. در کشت بافت تخمدان انسانی روی غشاهای پوشیده شده با ماتریژل، زنده مانای بالای فولیکول ها گزارش شده است [۱۴۸].

کاربردی ترین هیدروژل برای کشت سه بعدی فولیکول ها، آلژینات است. آلژینات یک پلیمر طبیعی تولید شده توسط جلبک قهوه ای است و متشکل از الفا - ال - گلوکورونیک اسید ( $\alpha$ - L- glucuronic acid) و بتا - دی - مانورونیک اسید ( $\beta$ - D- mannaric acid) می باشد. این هیدروژل در حضور کلسیم، Cross می کند بنابراین مانند سایر ژل ها نیاز به حرارت ندارد و بعلاوه با چیلاتورهایی (Chelators) مانند اتیلن گلیکول تترااسید استیک قابل تجزیه است. [۱۸]. روش دیگر برای خارج سازی فولیکول از این هیدروژل، تجزیه پلیمر آلژینات توسط آنزیم آلژینات لیاز (alginate lyase) است.

#### ۲-۵-۷- نتایج کشت فولیکول های تخمدانی :

کشت فولیکول های پریموردیال پریمات در غلظت های مختلف آلژینات ۱٪ و ۲٪ نشان داد که فولیکول های پریموردیال بمنظور تکوین نیازمند غلظت بالاتر آلژینات می باشند [۲۵]. کشت فولیکول های ثانویه پریمات در آلژینات ۰/۲۵٪ منجر به تولید فولیکول های ثانویه گردید و بلوغ اووسیت های حاصل از این فولیکول های ثانویه و در پی آن لقاح این اووسیت ها منجر به تولید مورولا گردید [۲۴].

بلوغ اووسیت های حاصل از تکوین فولیکول های پری آنترال گوسفندی کشت داده شده به روی آگار منجر به تولید مورولا شد [۲۱]. در سال ۲۰۱۳ کشت فولیکول های پرایمری گاوی بمدت ۲۱ روز در حضور فاکتورهای رشد منجر به تشکیل فولیکول های آنترال گردید [۲۳].

فولیکول های پریموردیال پرایمری جدا شده انسانی در ژل کلاژن بیش از ۲۴ ساعت باقی نماندند [۱۴۹]. کشت فولیکول های پریموردیال جدا شده از بافت تخمدان فریز انسانی در آلژینات ۱٪ منجر به افزایش اندازه فولیکول ها از ۴۵ به ۶۰ میکرون شد [۱۸]. کشت فولیکول های پری آنترال جدا شده از بافت تخمدان تازه انسانی بمدت ۳۰ روز در آلژینات ۰/۵٪ باعث تکوین فولیکول ها به مرحله آنترال گردید [۱۵۰]. کشت فولیکول های ۹۰ میکرونی جدا شده از بافت تخمدان تازه در حضور FGF بمدت ۶ روز در آلژینات باعث تکوین فولیکول های ۱۵۰ میکرونی شد [۱۵۱].

#### ۲-۵-۸- سیستم هم کشتی (Co-culture system) :

علیرغم موفقیت هایی در کشت فولیکول های ثانویه در پریمات، محدودیتی در زمینه کشت فولیکول های پریموردیال و پرایمری وجود دارد بطوریکه این فولیکول ها براحتی رشد نمی کنند. تکوین فولیکول های پریموردیال و پرایمری در داخل بافت بدلیل فراهم شدن اثرات پاراکرینی بهتر انجام می شود و در صورت جداسازی فولیکول ها باید شرایط هم کشتی با سلول های سوماتیک تخمدانی یا سلول های استروما بمنظور تامین فاکتورهای رشد لازم فراهم شود.

استرومای تخمدان، مجموعه متنوعی از انواع سلول ها شامل سلول های تکا، ماکروفاژ، سلول های اندوتلیال عروق خونی، سلول های ماهیچه صاف و انواعی از پروتئین های ماتریکس خارج سلولی می باشد. ماکروفاژها بیش از ۱۰۰ سیتوکین، فاکتور رشد، ترکیبات ماتریکس خارج سلولی، لیپید و محصولات پپتیدی ترشح می کنند. سلول های گرانولوزا با ترشح Activin، K1، فاکتور تمایز تکا و فیبرونکتین باعث افزایش رشد و زنده مانی فولیکول های پری آنترال می شوند. سلول های مزانشیمی نیز با ترشح پروتئین های ماتریکس خارج سلولی، ترکیبات غشاء پایه، TGF- $\alpha$ ، KGF و HGF در رشد و بقای فولیکول ها نقش دارند. بعلاوه KGF باعث مهار آپوپتوز سلول های گرانولوزا می شود. کشت فولیکول های تخمدانی بصورت هم کشتی با سلول های استروما تخمدان، باعث افزایش رشد و بقا فولیکول های تخمدانی شد. در هم کشتی با سلولهای استروما، بیان ژن هایی مانند اینترلوکین ۶، KGF، فاکتور محرک کلنی ماکروفاژ (Macrophage colony stimulating factor (MCSF)) افزایش می یابد [۳۰].

هم کشتی فولیکول های پرایمری و ثانویه موشی در هیدروژل آلژینات با سلول های فیبروبلاست جنینی (Embryonic fibroblast cells) بمدت ۱۴ روز باعث افزایش قطر فولیکول ها و تشکیل حفره آنتروم گردید در حالی که در شرایط عدم هم کشتی با سلول های فیبروبلاست، تمام فولیکول ها در روز ۱۰-۶ دژنره شدند. فولیکول های آنترال حاصل حاوی اووسیت هایی هستند که قادرند در پاسخ هورمونی به متافاز II برسند. این افزایش اندازه در فولیکول های با سایز بزرگتر مشهودتر است و بیانگر اهمیت اندازه اولیه فولیکول ها در تکوین بعدی آن ها می باشد [۱۵۲].

هم کشتی فولیکول های پری آنترال بوفالو (Buffalo) با سلول های سوماتیک تخمدانی (سلولهای کومولوس و سلول های گرانولوزا) باعث افزایش زنده مانی و قدرت تکوین فولیکول ها گردید [۱۵۳].

## ۲-۵-۹- کشت گروهی (Group culture) فولیکول های تخمدانی:

حمایت از رشد و بقا فولیکول های پریموردیال و پرایمری، چالش مهمی در زمینه کشت فولیکول می باشد. رشد اولیه فولیکول تحت کنترل سیگنال های اتوکراین و پاراکراین متعددی در تخمدان شامل سلول های استروما، ماکروفاژها و سایر فولیکول ها می باشد (30). مطالعات حاکی از نیاز فولیکول های پرایمری به فاکتورهایی فراتر از محیط کشت عادی می باشد. گرچه این عوامل توسط هم کشتی با سلول های استروما یا فیبروبلاست جنینی تامین می شود، کشت فولیکول ها بصورت گروهی نیز می تواند اثر تحریکی بر تکوین آن ها داشته باشد. در مطالعه ایی در بررسی ارتباط فضایی فولیکول ها در تخمدان، اثر تحریکی فولیکول های در حال رشد روی سایر فولیکول ها نشان داده شده است. به نظر می رسد فولیکول زمانی که توسط فولیکول های دیگر احاطه شده باشد بهتر رشد می کند که می تواند بدلیل اثرات پاراکراین فاکتورهای ترشح شده از سایر فولیکول ها باشد [۱۵۴].

هم کشتی فولیکول های پرایمری موش باعث افزایش بقا و رشد این فولیکول ها گردید که این تاثیر با افزایش تعداد فولیکول ها بیشتر است. کشت گروهی فولیکول ها با افزایش استتاله های عبوری از زونا (Trans zonal projection) در فولیکول ها، مانع جدایی اووسیت از سلول های گرانولوزا و باعث حفظ انسجام ساختاری فولیکول و پیشبرد رشد و تکوین فولیکول تا مرحله آنترال می گردد. کاهش کیفیت فولیکول های تخمدانی با افزایش سن (کاهش تعداد فولیکول های تخمدانی) می تواند بیانگر تاثیر عوامل پاراکراین مترشحه از فولیکول ها بر تکوین سایر

فولیکول ها باشد (31). کشت گروهی فولیکول های پری آنترال بز باعث افزایش زنده مانی، رشد و تشکیل حفره آنتروم در طی کشت گردید [۱۵۴].

## ۲-۵-۱۰- نقش فاکتورهای رشد در تکوین فولیکول های تخمدانی:

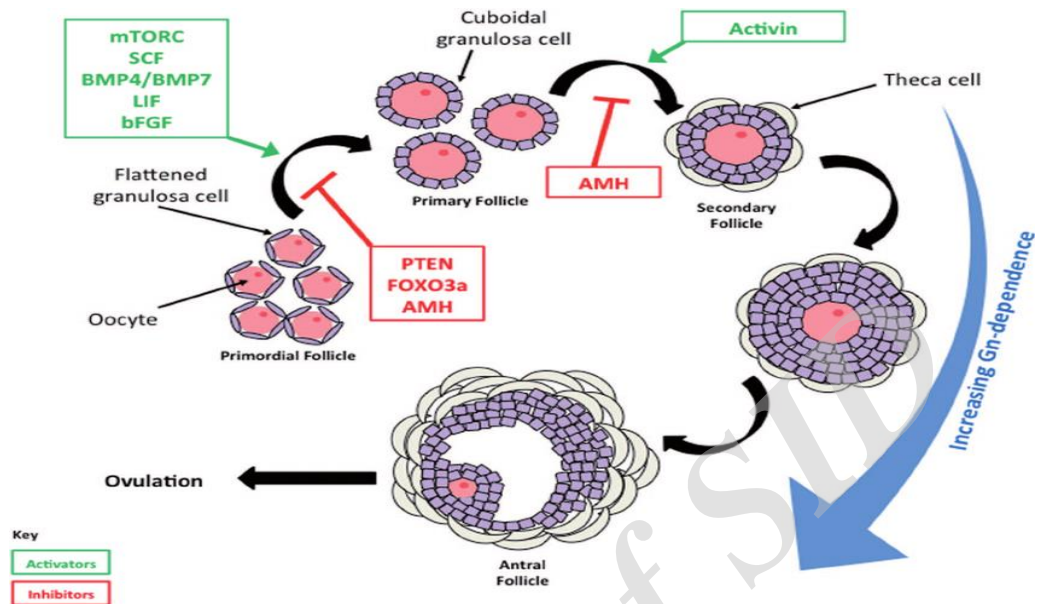
فاکتورهای رشد متعددی از جمله اعضاء خانواده  $TGF-\beta$ ، KGF و KL در تکوین فولیکول های تخمدانی نقش دارند. نقش FSH در فولیکولوژنز بخوبی شناخته شده است. این هورمون در محیط *In vivo* برای تحریک آنزیم آروماتازو فعالیت استروئیدزایی، تمایز سلول های گرانولوزا و القا بیان گیرنده های LH ضروری است. همچنین برای تنظیم اتصالات بین تخمک و سلول های گرانولوزا اطراف نیز نقش دارد [۱۵۵]. بعلاوه باعث فعال شدن بیان پروتئین های ضد آپوپتوزی در سلول های گرانولوزا می شود [۱۵۶]. FSH باعث افزایش بیان گیرنده های BMP در سلول های گرانولوزا فولیکول های آنترال گوسفندی می گردد. اضافه کردن FSH بصورت افزایش دوز در طی کشت، اثر قابل ملاحظه ایی بر تکوین فولیکول های پری آنترال بز دارد و این اثر در حضور LH موثرتر می باشد [۱۵۷]. استفاده از FSH در محیط فریز بافت تخمدان موش منجر به حفظ بقای تخمدان در طی انجماد شده همچنین باعث کاهش آپوپتوز سلول های گرانولوزا و افزایش عروق زایی متعاقب پیوند بافت می گردد. بیان Connexin 43، Connexin 37، VEGF و گیرنده VEGF افزایش و بیان کاسپاز ۳ (Caspase-3) کاهش می یابد [۱۲۵].

غلظت کم LH در طی تکوین فولیکول های پرایمری و ثانویه باعث می شود که فولیکول ها به رشد وابسته به LH در مراحل نهایی رشد پاسخ دهند [۱۵۸]. گرچه اثر LH در مراحل نهایی فولیکولوژنز است اما ترکیب آن با FSH باعث تکثیر و تمایز سلولی، تولید استروژن و بلوغ تخمک های حاصل از رشد فولیکول های پری آنترال می باشد و اثر آن بر تشکیل حفره آنتروم موثرتر از اثر FSH به تنهایی است [۱۵۹]. اما مطالعات در مورد پرمات نشان می دهد که اضافه کردن LH به محیط کشت همراه با FSH، اثر منفی بر رشد و بقا فولیکول ها دارد و بهترین نتایج در صورت استفاده از FSH به تنهایی است. اضافه کردن LH قبل از رسیدن به مرحله مناسب تکوین، باعث اختلال در سیگنال های فولیکولی و جلوگیری از بلوغ مناسب فولیکول در پرمات می گردد [۱۶۰].

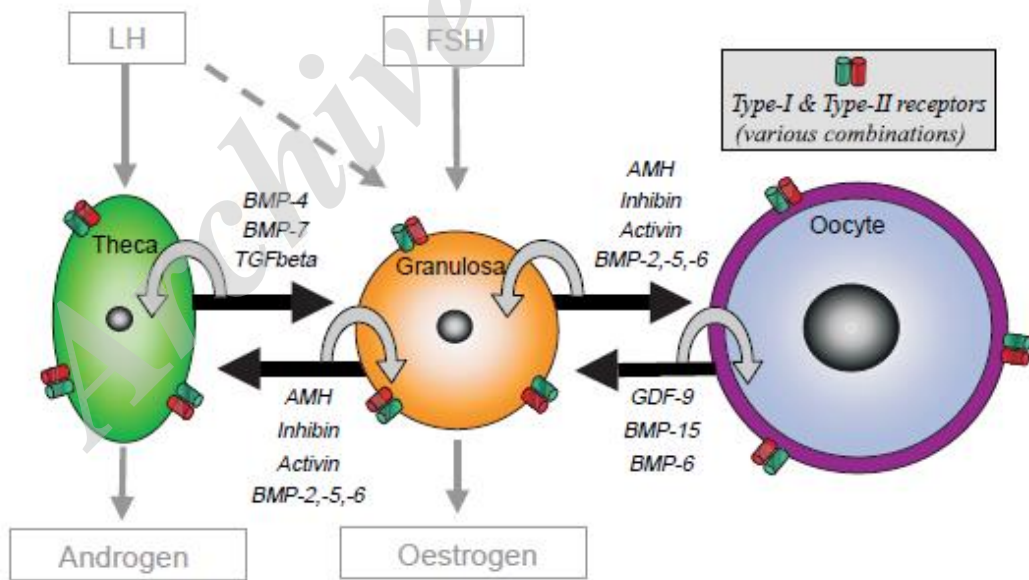
GDF-9 یکی از اعضاء خانواده  $TGF-\beta$  می باشد که از اووسیت ترشح می شود و در فعالسازی فولیکول های پرموردیال و انتقال از پرموردیال به پرایمری [۲۷] و در پیشبرد تکوین فولیکولی به مرحله فولیکول ثانویه نیز نقش دارد [۲۸]. فقدان GDF-9 باعث توقف رشد فولیکول در مرحله پرایمری و ناباروری می گردد [۱۶۱]. این فاکتور رشد باعث افزایش تکثیر سلول های گرانولوزا و تکا و افزایش بیوسنتز اندروژن از سلول های تکا می شود [۱۶۲]. ترکیب FSH و GDF9 باعث افزایش اثر FSH روی شروع رشد فولیکول پرموردیال و رشد متعاقب آن به فولیکول های درحال رشد می گردد [۱۶۳]. GDF9 و FSH در تنظیم TZP نیز نقش دارند [۱۶۴].

Activin نیز یکی از اعضاء خانواده  $TGF-\beta$  است که نقش مهمی در فولیکولوژنز دارد. با القاء تکثیر سلول های گرانولوزا و افزایش بیان گیرنده FSH و آنزیم آروماتاز باعث افزایش رشد فولیکول های پری آنترال می شود [۱۶۵]. ولی با مهار لوتئینی شدن (Luteinization) سلول های گرانولوزا و مهار ترشح پروژسترون از بلوغ زودرس تخمک

جلوگیری می کند. Activin همچنین با افزایش بیان پروتئین های Connxin و تاثیر بر ارتباط بین سلول های گرانولوزا و تخمک در تکوین فولیکولی موثر است [۱۶۶].



شکل ۲-۷ نقش فاکتورهای رشد در تکوین فولیکول های تخمدانی



شکل ۲-۸ اعضاء خانواده  $TGF-\beta$ : ارتباط دوجانبه بین سلول های تکا و گرانولوزا، سلول های گرانولوزا و اووسیت. سیگنال های اتوکراین (فلش های خاکستری) و پاراکراین (فلش های سیاه) بستگی به بیان ارتباطات مناسب گیرنده های نوع I و II روی سطح سلول ها دارد.

## PRP - ۱۱-۵-۲

پلاسمای غنی از پلاکت، یک محصول خونی با غلظت بالای پلاکت و غلظت سه تا پنج برابر فاکتورهای رشد نسبت به پلاسمای می باشد. فاکتورهای رشد در گرانول های آلفا (Alpha granules) پلاکت ذخیره شده اند که با اضافه کردن ترومبین و کلسیم یا با روش فریز آزاد می شوند. این فاکتورها شامل EGF، VEGF، IGF، FGF، TGF- $\beta$ ، PDGF، KGF، IL8 و CTGF می باشد [۱۶۷]. این سیتوکین ها نقش مهمی در تکثیر و تمایز سلول های مزانشیمی و سایر سلول ها و پیشبرد عروق زایی دارند [۱۶۸].

لیز پلاکتی (Platelet lysates) انسان می تواند جایگزین مناسبی برای سرم در کشت سلولی باشد. پیوند بافت تخمدان با فاکتورهای رشد PRP منجر به پیشبرد عروق زایی و تولد زنده گردید [۱۶۹]. استفاده از لیز پلاکتی در پیوند فولیکول های تخمدانی، میزان بقای فولیکول های تخمدانی را بهبود می بخشد. تاخیر در عروق زایی بدلیل هیپوکسی در روزهای اول پیوند بافت تخمدان منجر به از دست رفتن تعداد زیادی از فولیکول های نابالغ می گردد و پلاسمای غنی از پلاکت بدلیل دارا بودن فاکتورهای رشد مختلف قادر به عروق زایی سریع بافت پیوندی و کاهش آسیب های پیوند می باشد [۱۷۰].

## ۲-۶- پیوند فولیکول های تخمدانی یا تخمدان مصنوعی (Artificial ovary) :

پیوند فولیکول های تخمدانی جدا شده با کمک داربست باعث تکوین فولیکول ها بدون خطر انتقال سلول های بدخیم می شود. در این روش با بازگشت فولیکول ها به بدن امکان تکوین طبیعی فولیکول ها، از سرگیری فعالیت تخمدانی و همچنین امکان بارداری طبیعی وجود دارد. هدف از تخمدان مصنوعی، تکوین یک داربست زیست سازگار (Biocompatible) و قابل تجزیه است که با حفظ ساختار سه بعدی فولیکول ها اجازه رشد و تکوین را نیز به آن ها بدهد و امکان عروق زایی مجدد را نیز فراهم سازد.

پیوند فولیکول های تخمدان انسانی به موش در داربستی از لخته پلازما (Plasma clot) بمدت یک هفته باعث کاهش فولیکول های پریموردیال و افزایش فولیکول های پرایمری و ثانویه گردید که نشان دهنده تکوین فولیکول های پریموردیال می باشد [۱۷۱]. پیوند فولیکول های جدا شده انسانی به موش بمدت ۶ هفته باعث تکوین فولیکول های پریموردیال و پرایمری به فولیکول آنترال گردید [۹۹]. پیوند سلول های تخمدانی در قالب داربست آلژینات همراه با میکروسفرهای (Microsphere) حاوی آلژینات لیاز، نشان دهنده توانایی تجزیه، عروق زایی و ایجاد پاسخ ایمنی پائین این داربست بعد از پیوند می باشد [۱۷۲]. پیوند فولیکول های تخمدان موش به همراه سلول های تخمدانی در داربستی از فیبرینوژن و ترومبین بمدت یک هفته باعث تکوین فولیکول ها به مرحله آنترال گردید که بیانگر توانایی تجزیه ای مناسب این داربست و تامین فضای مناسب برای رشد فولیکول می باشد [۱۰۳]. در سال ۲۰۱۵ پیوند فولیکول های پریموردیال موش در داربست فیبرین و تیمار شده با VEGF منجر به تولد زنده گردید [۱۷۳].

بافت های بدون سلول شده (decellularized) از جمله بافت تخمدانی بدون سلول شده می تواند بعنوان وسیله ای برای پیوند فولیکول های تخمدانی مورد استفاده قرار گیرد. با حذف سلول ها از بافت، ماتریکس خارج سلولی اندام باقی مانده و می تواند برای انتقال سلول ها یا فولیکول های تخمدانی کاربرد داشته باشد. در مطالعه ای توسط Laronda و همکاران در سال ۲۰۱۵ بافت تخمدان گاو و انسان بدون سلول شده و بعنوان داربستی برای انتقال سلول های تخمدانی موش مورد استفاده قرار گرفت پس از انتقال این داربست به بدن موش بدون تخمدان شده (ovariectomized)، ترشح استرادیول و علائم بلوغ ظاهر شد که نشان داد بافت بدون سلول شده می تواند در ساخت ارگان های زنده با عملکرد اندوکروینی و همچنین بعنوان داربستی برای پیوند فولیکول های تخمدانی در آینده کاربرد داشته باشد [۱۷۴].

در پیوند فولیکول های تخمدانی، میزان بازیابی (recovery rate) فولیکول های پریموردیال و ثانویه در روز ۲ بترتیب ۱۶ و ۴۰٪ و در روز ۷ بترتیب ۶ و ۲۸٪ گزارش شده است. با توجه به بالاتر بودن میزان بازیابی فولیکول های ثانویه، این فولیکول ها برای پیوند مناسب تر از فولیکول های پریموردیال و پرایمری می باشند و به نظر می رسد فولیکول های پریموردیال و پرایمری به جداسازی و پیوند حساس تر می باشند [۱۷۵]. بهترین منبع سلول های استروما برای ساخت تخمدان مصنوعی، بخش مرکزی تخمدان تازه است بطوریکه فولیکول های جدا شده نیازمند حمایت ساختاری و یک شبکه عروقی غنی برای زنده مانی و تکوین دارند که توسط سلول های استروما تامین می شود [۱۷۶].

## ۲-۶-۱ خطر انتقال سلول های سرطانی در پیوند فولیکول های تخمدانی

در مطالعه انجام شده توسط Amorim و همکاران نشان داده شد که در صورت آلودگی بافت تخمدان، امکان برداشت سلول های سرطانی با فولیکول های تخمدانی جدا شده وجود دارد اما روش ساده چندین بار شستشوی فولیکول های تخمدانی راه موثری برای حذف سلول های سرطانی می باشد. در صورت سه بار شستشوی فولیکول های جدا شده تخمدانی ۱ سلول سرطانی از ۷۷۲ فولیکول برداشت می شود درحالی که در صورت عدم سه بار شستشو، ۱۹۶ سلول سرطانی از ۴۹۹ فولیکول برداشت می شود [۱۷۷].

فصل سوم  
مواد و روش ها

۱-۳ مواد آزمایشگاهی

لیست مواد مورد نیاز در مطالعه در جدول ۱-۳ آورده شده است.

جدول ۱-۳ مواد آزمایشگاهی

شماره کاتالوگ	نام شرکت	نام ماده	شماره کاتالوگ	نام شرکت	نام ماده
B2261	Sigma	<b>Hoechst</b>	M0644	Sigma	<b><math>\alpha</math>-MEM</b>
I3146	Sigma	<b>ITS</b>	A4403	Sigma	<b>Ascorbic acid</b>
P5405	Sigma	<b>KCl</b>	338-AC-10- CF	R & D	<b>Activin a (rhActA)</b>
05401119001	Roche	<b>Liberase TM</b>	180947	Sigma	<b>Alginic acid sodium</b>
S5761	Sigma	<b>NaHco3</b>	A1603	Sigma	<b>Alginate lyase</b>
S5886	Sigma	<b>NaCl</b>	C9157	Sigma	<b>Activated charcoal</b>
S5136	Sigma	<b>Na2Hpo4</b>	A8806	Sigma	<b>BSA(fraction V)</b>

N2889	Sigma	<b>Neutral red</b>	A3311	Sigma	<b>BSA(FAF)</b>
P3032	Sigma	<b>Penicilin</b>	C9891	Sigma	<b>Collagenase IA</b>
10270	Gibco	<b>PBS</b>	11284932001	Roche	<b>DNase</b>
P5288	Sigma	<b>PVA</b>	293237	Sigma	<b>Ethylene glycol</b>
				Merck	<b>FSH</b>
S1277	Sigma	<b>Streptomycin</b>	10270-106	Gibco	<b>FBS</b>
S1888	Sigma	<b>Sucrose</b>	SRP4872	Sigma	<b>GDF9</b>
M5017	Sigma	<b>TCM</b>	10064	Vitrolife	<b>Human serum albumin</b>

### ۲-۳ آماده سازی محلول ها و محیط ها

اغلب ترکیبات مورد استفاده بصورت پودری و یا لیوفیلیزه بودند که در حلال های مناسب توصیه شده توسط سازنده، حل شده و به غلظت مناسب رسیدند. محلول بدست آمده براساس مقدار مورد نیاز برای استفاده در هر نوبت به مقادیر کوچکتر تقسیم شده و در شرایط مناسب نگهداری گردید.

### ۱-۲-۳ محلول شستشوی تخمدان

بمنظور شستشوی تخمدان ها از محلول فسفات بافر سالین (PBS) (جدول ۲-۳) حاوی ۱٪ سرم استفاده گردید.

### ۲-۲-۳ محلول جدا سازی فولیکول های تخمدانی :

برای جداسازی فولیکول های پریموردیال و پرایمری از بافت تخمدان تازه و یخ گشایی شده از Krebs Ringer Bicarbonate Buffer (KRBB) (جدول ۳-۳) و آنزیم های کلاژناز IA و DNase استفاده شد (جدول ۳-۴).

### ۳-۲-۳ محلول خنثی سازی هضم آنزیمی :

برای خنثی سازی هضم از محلول (Bicarbonate buffered M199 (BTCM)) (جدول ۶-۳) حاوی ۱۰٪ سرم استفاده شد.

### ۴-۲-۳ محلول شستشو بعد از هضم آنزیمی :

این محلول شامل Hepes TCM (جدول ۵-۳) و 4mg/ml BSA و 3mg/ml PVA می باشد.

### ۵-۲-۳ محیط کشت فولیکول ها و سلول های تخمدانی



محیط کشت فولیکول ها و سلول ها تخمدانی شامل محیط  $\alpha$ -MEM (جدول ۳-۷) و اجزاء دیگر می باشد که در جدول ۳-۸ قید شده است.

### ۳-۲-۶ محلول های مورد استفاده جهت رنگ آمیزی فولیکول

۳-۲-۶-۱ رنگ تریپان بلو: ۰/۴ گرم پودر تریپان بلو را در ۱۰۰ میلی لیتر آب آنالار ریخته و حل می کنیم.

۳-۲-۶-۲ رنگ هماتوکسیلین و ائوزین:

هماتوکسیلین یک رنگ فلورسنت آبی برای رنگ آمیزی هسته و ائوزین یک رنگ فلورسنت قرمز برای رنگ آمیزی سیتوپلاسم و کلاژن است.

۳-۲-۷ بافر جهت بسته شدن ژل آلژینات :

روش تهیه بافر کلرید کلسیم ۰/۱ مولار برای بسته شدن ژل آلژینات در جدول شماره ۳-۹ ذکر شده است.

### ۳-۲-۸ محلول (TBS) Tris Buffered Saline

از محلول TBS که اجزای تشکیل دهنده آن در جدول شماره ۳-۱۰ قید شده بمنظور رقیق کردن ترومبین استفاده شد.

#### جدول ۳-۲ اجزای تشکیل دهنده Phosphate buffer saline

مقدار	اجزای تشکیل دهنده
۸ گرم	Nacl
۰/۲ گرم	Kcl
۱/۱۵ گرم	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
۰/۲ گرم	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
۱۰۰۰ میلی لیتر	Milli-Q water

#### جدول ۳-۳ اجزای تشکیل دهنده Krebs ringer bicarbonate buffer

مقدار	اجزای تشکیل دهنده
۰/۱۸ گرم	D -Glucose

۰/۰۰۴۶ گرم	Mgcl2 (Anhydrous)
۰/۰۳۴ گرم	Kcl
۰/۰۱ گرم	Na2HPO4
۰/۰۱۸ گرم	NaH2PO4
۵۰ میلی لیتر	Milli- Q water

PH : ۷/۲ - ۷/۴

اسمولاریته : ۲۷۵ - ۲۸۵ میلی اسمول

جدول ۳-۴ اجزای تشکیل دهنده محیط هضم آنزیمی

مقدار	اجزای تشکیل دهنده
۵ میلی لیتر	KRBB
۱ میلی گرم / میلی لیتر	Collagenase IA
۱ میلی گرم / میلی لیتر	DNase

جدول ۳-۵ اجزای تشکیل دهنده HEPES buffered M199

مقدار	اجزای تشکیل دهنده
۰/۴۷۵ گرم	M199 Sigma M5017
۰/۰۲۱ گرم	NaHCO3
۰/۰۰۱ گرم	Na pyruvate
۰/۱۱۹۱ گرم	HEPES (Free acid)
۰/۱۳۰۱ گرم	HEPES (Na salt)
۰/۰۰۳ گرم	Penicillin-G
۰/۰۰۲۵ گرم	Streptomycin
۵۰ میلی لیتر	Milli- Q water

PH : ۷/۲ - ۷/۴

اسمولاریته : ۲۷۵ - ۲۸۵ میلی اسمول

جدول ۳-۶ اجزای تشکیل دهنده Bicarbonate buffered M199

مقدار	اجزای تشکیل دهنده
۰/۴۷۵ گرم	M199 Sigma M5017
۰/۱۰۵ گرم	NaHCO <sub>3</sub>
۰/۰۰۱ گرم	Na pyruvate
۰/۰۰۳ گرم	Penicillin-G
۰/۰۰۲۵ گرم	Streptomycin
۵۰ میلی لیتر	Milli- Q water

اسمولاریته : ۲۷۵ - ۲۸۵ میلی اسمول

جدول ۳-۷ اجزای تشکیل دهنده محیط  $\alpha$ -MEM

مقدار	اجزای تشکیل دهنده
۱/۰۱ گرم	$\alpha$ -MEM
۰/۲۲ گرم	NaHCO <sub>3</sub>
۱۰۰ میلی لیتر	Milli- Q water

PH : ۷/۲ - ۷/۴

اسمولاریته : ۲۷۵ - ۲۸۵ میلی اسمول

جدول ۳-۸ اجزای تشکیل دهنده محیط کشت فولیکول ها و سلول های تخمدانی

مقدار	اجزای تشکیل دهنده
۱ میلی لیتر	$\alpha$ -MEM
۵۰ میکرولیتر	PRP
۵۰ میکرولیتر	FBS
۱۰۰ نانوگرم / میلی لیتر	FSH
۱۰۰ نانوگرم / میلی لیتر	GDF9
۵۰ میکروگرم / میلی لیتر	Ascorbic acid
۱۰ میکروگرم I / ۵ / ۵ میکروگرم T / ۵ نانوگرم / میلی لیتر S	ITS
۵۰ میکروگرم / میلی لیتر	Pen/Strep

جدول ۳-۹ اجزای تشکیل دهنده بافر کلرید کلسیم ۰/۱ مولار

مقدار	اجزای تشکیل دهنده
۰/۷۳۵۱ گرم	Cacl2
۰/۴۲۳۶ گرم	Nacl
۰/۱۱۹۱ گرم	HEPES (Free acid)
۰/۱۳۰۱ گرم	HEPES (Na salt)
۵۰ میلی لیتر	Milli- Q water

PH: ۷/۲ - ۷/۴

### جدول ۳-۱۰ اجزای تشکیل دهنده Tris Buffered Saline

مقدار	اجزای تشکیل دهنده
۰/۶۰۵ گرم	Tris
۰/۸۷ گرم	Nacl
۲/۹۴ گرم	Cacl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O
۱۰۰ میلی لیتر	Milli- Q water

PH: ۷/۲ - ۷/۴

### ۳-۳ جمع آوری بافت تخمدان

بافت تخمدان از خانم های بین ۱۶ تا ۳۰ سال دچار مرگ مغزی متعاقب رضایت کتبی جمع آوری شد. نمونه های تخمدان بعد از استحصال در محیط حاوی  $\alpha$ -MEM و ۱٪ سرم و آنتی بیوتیک پنی سیلین/ استرپتومایسین در دمای ۴ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه در مدت زمان کمتر از ۱ ساعت منتقل شد.

### ۳-۴ آماده سازی بافت تخمدان :

تخمدان ها پس از انتقال به آزمایشگاه ابتدا با الکل ۷۰٪ و سپس محلول PBS حاوی ۱۰٪ سرم و آنتی بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین به خوبی شستشو داده می شوند. تخمدان را به دو نیم کرده و با کمک اسکالپل مدولای آن را خارج می کنیم. سپس کورتکس تخمدانی آماده شده به ضخامت تقریبی ۱ میلی متری را با کمک دستگاه tissue chopper به قطعات ۰/۵ × ۱ × ۱ میلیمتر برش می دهیم.



تصویر ۳-۱ آماده سازی بافت تخمدان

### ۳-۵ انجماد و یخ گشایی بافت تخمدان

بعد از برش کورتکس تخمدان و تولید قطعات تخمدانی، فریز قطعات تخمدانی به روش زیر صورت می گیرد.

#### ۳-۵-۱ آماده سازی محلول های انجماد و ذوب

محیط پایه

محیط  $\alpha$ -MEM دارای ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر BSA

محلول تعدیل کننده (EQ)

محیط پایه + ۲/۵ درصد DMSO + ۶/۵ درصد EG

محلول انجماد شیشه ای ۱ (VS1)

محیط پایه + ۵ درصد DMSO + ۱۳ درصد EG

محلول انجماد شیشه ای ۲ (VS2)

محیط پایه + ۱۰ درصد DMSO + ۲۶ درصد EG + ۲/۵٪ محلول PVA (10/000) و ۱ مول بر لیتر سوکروز

### محلول ذوب اول (WS1)

محیط  $\alpha$ -MEM + ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر BSA + ۱ مول سوکروز

### محلول ذوب دوم (WS2)

محیط  $\alpha$ -MEM + ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر BSA + ۰/۵ مول سوکروز

### محلول ذوب سوم (WS3)

محیط  $\alpha$ -MEM + ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر BSA + 0/25 مول سوکروز

### ۳-۵-۲ پروتکل انجماد و یخ‌گشایی بافت تخمدان

بعد از قطعه قطعه کردن بافت تخمدان توسط دستگاه tissue chopper، قطعات توسط فیلتر ۰/۲۲ میکرونی در پتری دیش ۶ سانت حاوی ۷ میلی لیتر محیط تعادل در دمای ۴ درجه سانتیگراد گذاشته می‌شوند. پس از گذشت ۵ دقیقه قطعات تخمدانی به محیط انجمادی ۱ انتقال داده می‌شوند. بعد از گذشت ۵ دقیقه قطعات به محیط انجمادی ۲ منتقل شده و بعد از گذشت ۱ دقیقه با حداقل محیط به کرایو ویال انتقال می‌یابد و بعد از بستن درب کرایو ویال در داخل ازت مایع فرو برده می‌شود.

ویال فریز بعد از خروج از تانک ۳۰ ثانیه در معرض هوا قرار داده می‌شود و سپس در آب با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد یخ‌گشایی می‌گردد. یک میلی لیتر از محلول ذوب اول داخل ویال ریخته و قطعات تخمدانی و محیط موجود در ویال را به فیلتر ۰/۲۲ میکرونی قرار داده شده داخل پتری دیش حاوی ۶ میلی لیتر محیط تعادل منتقل می‌کنیم. پس از ۱ دقیقه فیلتر حاوی قطعات بافتی را در پتری دیش حاوی محلول ذوب دوم می‌گذاریم. بعد از گذشت ۵ دقیقه قطعات بافتی را در محلول ذوب سوم قرار می‌دهیم و سپس شستشوی نهایی در محلول پایه بمدت ۵ دقیقه انجام گرفت. تمام مراحل در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انجام شد [۱۷۸].

### ۳-۶ جداسازی فولیکول‌ها و سلول‌های تخمدانی:

قطعات بافت تخمدانی در فالکون ۱۵ حاوی ۵ میلی لیتر کربس رینگر بیکربنات بافر حاوی ۱ میلی گرم / میلی لیتر کلاژناز 1 و یک میلی گرم / میلی لیتر DNase در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بمدت ۶۰-۵۰ دقیقه قرار گرفت. سپس بمنظور خنثی سازی آنزیم، ۵ میلی لیتر محیط کشت بیکربنات حاوی ۱۰٪ سرم ۴ درجه سانتیگراد به لوله اضافه گردید. سوسپانسیون بمدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰g در ۴ درجه سانتیفوژ شد. بعد محلول رویی تخلیه شده و محیط کشت Hepes حاوی ۴ میلی گرم / میلی لیتر آلبومین و ۳ میلی گرم / میلی لیتر پلی وینیل الکل به رسوب اضافه شد و بمنظور خروج فولیکول‌ها عمل پیپتاژ با سمپلر صورت گرفت. سپس سوسپانسیون حاصل بمنظور حذف قطعات بافتی هضم نشده از فیلتر ۷۰ میکرون عبور داده شد و برداشت فولیکول‌ها توسط پیپت زیر استریومیکروسکوپ انجام گرفت [۲۰]. فولیکول‌های جدا شده بعد از ۳ بار شستشو در محیط  $\alpha$ -MEM حاوی ۱۰٪ سرم برای محصور شدن در ژل آلژینات آماده گردیدند. ۱۰ فولیکول نیز بمنظور ارزیابی زنده مانی توسط تریپان بلو رنگ آمیزی شدند.

بمنظور جداسازی سلول های تخمدانی، سوسپانسیون سلولی بعد از جدا کردن فولیکول های تخمدانی از فیلتر ۴۰ میکرون عبور داده شد و بمدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۶۰ سانتیفریوژ شد. محلول رویی تخلیه شده و محیط  $\alpha$ -MEM حاوی ۱۰٪ سرم به رسوب اضافه شد و غلظت ۵۰۰۰۰ سلول در ۳ میکرولیتر محیط برای محصور شدن در ژل مورد استفاده قرار گرفت [۱۰۳].

### ۳-۷ آماده سازی ژل آلژینات:

۰/۱ گرم پودر آلژینات را در ۱۰ میلی لیتر آب آنالار می ریزیم و روی استیرر قرار می دهیم تا حل شود. بعد از حل شدن پودر آلژینات، ۰/۰۵ گرم ذغال فعال بمنظور جدا سازی ناخالصی های آلژینات اضافه می کنیم و روی استیرر می گذاریم تا حل شود. سپس بمنظور جدا کردن ذغال فعال از پمپ خلاء استفاده می کنیم. کاغذ صافی را روی دهانه قیف بوختر متصل به پمپ خلاء گذاشته و محلول آلژینات ذغال را به آرامی روی آن می ریزیم. در نهایت محلول شفافی بدست می آید که با گذراندن از فیلتر ۲۲ میکرونی در زیر هود استریل شده و به داخل پلیت های چند خانه ای ریخته شده و در ۸۰- درجه سانتیگراد قرار می دهیم. سپس با قرارگیری در Freeze drier لیوفیلیزه شده و به پودر خالص شده آلژینات تبدیل می شود. بمنظور تهیه ژل ۰/۱٪، ۰/۱ گرم از پودر خالص شده را در ۱۰ میلی لیتر از محلول  $\alpha$ -MEM ریخته و در بن ماری قرار می دهیم تا حل شود [۱۴۳].





تصویر ۲-۳ مراحل آماده سازی آلژینات : از بالا سمت چپ به پائین حل کردن پودر آلژینات - حل کردن ذغال فعال بمنظور حذف ناخالصی های آلژینات - جداسازی ذغال فعال از آلژینات به کمک پمپ

### ۳-۸ قرار دادن فولیکول ها و سلول های تخمدانی در ژل :

قطرات ۶-۵ میکرونی از ژل آلژینات ۱٪ را روی پلیت گذاشته سپس ۱۰-۵ فولیکول ( با قطر ۵۰ میکرون) را با کمک پیپت در داخل قطره قرار می دهیم.

برای کشت سلول های تخمدانی، ۵۰۰۰۰ سلول در ۳ میکرولیتر محیط نیز در قطرات ۷-۶ میکرونی از ژل آلژینات ۱٪ قرار داده می شوند. سپس قطرات آلژینات حاوی فولیکول ها و سلول ها را بصورت جداگانه با سر سمپلر کشیده و به آرامی در بافر ۱/۱ مولار کلسیم (۱۰۰ میکرومولار کلرید کلسیم و ۱۴۰ میلی مولار کلرید سدیم) می اندازیم. بعد از ۳ دقیقه ژل ها را با پنس از بافر خارج می کنیم و بمنظور حذف بافر در محیط  $\alpha$ -MEM حاوی ۱٪ سرم سه بار شستشو می دهیم. سپس ژل ها کشت داده می شوند [۱۵۰].

### ۳-۹ کشت فولیکول ها و سلول های تخمدانی محصور در ژل:

ژل های حاوی فولیکول را در قطرات ۱۰۰ میکرولیتری (۲ ژل در یک قطره) محیط کشت حاوی MEM- $\alpha$ ، ۱٪ انسولین / ترانسفرین / سلنیوم، ۵۰ میکروگرم / میلی لیتر اسید اسکوربیک، ۱۰۰ نانوگرم / میلی لیتر FSH و ۱۰۰ نانوگرم / میلی لیتر GDF9 و ۵۰ میکروگرم / میلی لیتر پنی سیلین استرپتومایسین در ۴ گروه مختلف شامل:

۱- ۱۰٪ FBS

۲- ۱۰٪ PRP

۳- ۵٪ FBS + ۵٪ PRP

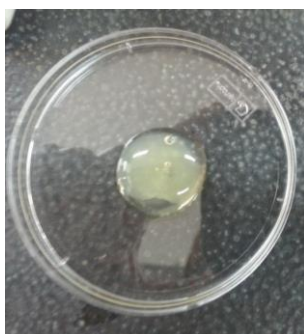
۴- ۱۰٪ HSA

کشت می دهیم. ژل حاوی سلول های تخمدانی را نیز در این قطرات ۱۰۰ میکرولیتری قرار می دهیم. ژل های حاوی فولیکول و حاوی سلول های تخمدانی بمدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه، رطوبت ۹۵٪ و دی اکسید کربن ۵٪ کشت داده می شوند. نیمی از محیط کشت هر دو روز یکبار تعویض می گردد. لازم به ذکر است که محیط کشت باید حداقل ۲ ساعت قبل از مصرف در انکوباتور قرار داده شده باشد.

### ۳-۱۰ تهیه پلاسمای غنی از پلاکت:

۹ میلی لیتر خون در لوله محتوی ۱۰٪ سدیم سیترات (بعنوان ضدانعقاد خون) ریخته شد. سپس بمدت ۲۰ دقیقه در دور ۲۰۰ g در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید. قسمت بالایی و میانی محلول شامل پلاسما و پلاکت ها به لوله جدیدی منتقل گردید و بمدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ g سانتریفوژ گردید. پلاسمای رویی تخلیه گردید و ۵/۰ میلیتر پلاسما به همراه پلاکت های رسوب داده شده با عمل پیپت کردن بخوبی مخلوط شد و بعنوان پلاسمای غنی از پلاکت در نظر گرفته شد.

بمنظور آزاد شدن فاکتورهای رشد از گرانول های موجود در پلاکت، ترومبین IU ۲۰ به پلاسمای غنی از پلاکت اضافه شد و بدلیل آزاد شدن کامل فاکتورهای رشد بمدت یک ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس بمنظور رسوب debris و باقی مانده های پلاکتی، لخته حاصل با دور ۴۰۰۰ g بمدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید و محلول رویی جدا و در دمای ۲۰- درجه تا زمان مصرف نگهداری گردید [۱۷۹، ۱۸۰].



تصویر ۳-۳ لخته شدن پلاسمای غنی از پلاکت با اضافه کردن ترومبین

### ۳-۱۱ ارزیابی فولیکول ها:

بمنظور بررسی رشد و تکوین فولیکول های تخمدانی، ارزیابی های مختلفی از جمله ظاهری، زنده مانی و بافتی انجام گرفت.

### ۳-۱۱-۱ ارزیابی ظاهری فولیکول ها توسط میکروسکوپ:

خصوصیات فولیکول هایی با کیفیت مطلوب

- غشاء پایه دست نخورده،
- سلول های گرانولوزا و تکای شفاف و یکدست
- اووسیت دارای سیتوپلاسم یکدست

آسیب غشاء پایه، سیاه شدن اووسیت و سلول های گرانولوزا و کاهش قطر فولیکول نشان دهنده دژنره شدن فولیکول می باشد. قطر تمام فولیکول ها در طی مدت زمان کشت با کمک عدسی مدرج اندازه گیری و ثبت گردید.

### ۳-۱۱-۲ ارزیابی زنده مانی فولیکول ها توسط تریپان بلو:

بمنظور ارزیابی زنده مانی فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه و یخ گشایی شده از روش رنگ آمیزی تریپان بلو استفاده شد. فولیکول ها بلافاصله بعد از جداسازی، بعد از یخ گشایی و بعد از یک هفته کشت برای زنده مانی مورد بررسی قرار گرفتند. در این روش فولیکول ها بمدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق در تریپان بلو ۰/۴٪ انکوبه می شوند و سپس با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار می گیرند [۱۸۱].

فولیکول های مرده : اووسیت یا بیش از ۵۰٪ سلول های گرانولوزا به رنگ آبی می باشند.  
فولیکول های زنده : تعداد سلول های گرانولوزای آبی کمتر از ۵۰٪ می باشد.

### ۳-۱۱-۳ ارزیابی بافتی فولیکول های موجود در ژل:

فولیکول های محصور در ژل ۱٪ در فرمالدئید ۱۰٪ بافر شده بمدت ۲ ساعت فیکس شدند. سپس در داخل basket هایی که بوسیله کاغذ فیلتر پوشیده شده بود قرار داده شدند و بمنظور دهیدراتاسیون در شیشه حاوی اتانول مطلق و کمی رنگ اتوزین قرار گرفتند. بعد از گذشت نیم ساعت basket های حاوی فولیکول های محصور در ژل در شیشه حاوی گزیلول گذاشته شدند. بعد از گذشت نیم ساعت این basket ها به ظرف حاوی پارافین مایع منتقل شدند. ژل های حاوی فولیکول بعد از گذشت نیم ساعت از basket خارج شده و در پارافین قالب گیری شدند و برش های ۵ میکرونی با دستگاه میکروتوم تهیه شد. برش های بافتی بر روی لام قرار داده شدند و با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شدند و با میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفتند [۱۸۲].

### روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین :

ابتدا لام حاوی فولیکول را در گزیلول فرو می بریم و بعد از گذشت ۵ دقیقه از گزیلول خارج می کنیم و صبر می کنیم تا کامل خشک شود. بعد بمدت ۱ دقیقه در الکل ۹۰ فرو برده و خارج می کنیم و صبر می کنیم تا کامل خشک شود. لام بعد از قرارگیری بمدت ۱۵ دقیقه در هماتوکسیلین خارج کرده و ۳-۴ بار در آب شستشو داده می شود. سپس لام سریع در اسید الکل زده شده و ۳-۲ بار در آب شستشو می شود. مرحله بعد لام در کربنات لیتیم زده شده

و ۲-۳ در آب شستشو می شود. بعد لام در ائوزین قرار داده می شود و بعد از گذشت ۱۵ دقیقه از آن خارج شده و ۲-۳ بار در آب شستشو می گردد. سپس بمدت ۱ دقیقه در الکل ۹۰ درجه و سپس گزیرلول بمدت ۵ دقیقه مراحل آخر رنگ آمیزی را سپری می کند.

### ۱۲-۳ گروه های آزمایشی و طراحی مطالعه

در این تحقیق دو گروه آزمایشی شامل فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه و بافت تخمدان یخ گشایی شده مورد مطالعه قرار گرفت.

### ۱-۵-۳ کشت فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه :

در این گروه ۵۰ فولیکول جدا شده از بافت تخمدان تازه در سه گروه شامل FBS ۱۰٪، PRP ۱۰٪ و FBS ۵٪+PRP ۵٪ کشت داده شدند.

### ۲-۵-۳ کشت فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده :

در این گروه ۲۲۹ فولیکول جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده در چهار گروه شامل FBS ۱۰٪، PRP ۱۰٪، FBS ۵٪+PRP ۵٪ و HSA ۱۰٪ کشت داده شدند.

### ۱۳-۳ آنالیز آماری و نرم افزارهای مورد استفاده :

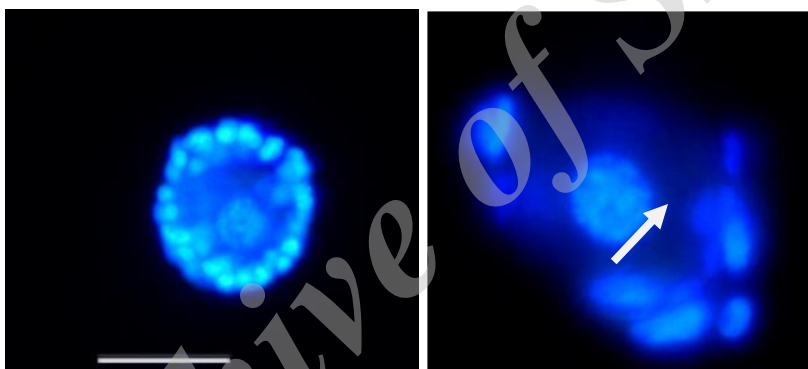
تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از SPSS 16.0 انجام گرفت. در این پژوهش، در مقایسه اثر تیمارها و روز بر روی متغیری همچون رشد از آزمون واریانس یکطرفه (One Way Anova) و تست تکمیلی Tukey استفاده شد. در مقایسه اثر تیمارها بر متغیر زنده ماننی از تحلیل ناپارامتری کروسکال-والیس و مت ویتنی Kruskal-Wallis and (Mann-Whitney test) استفاده شده است. داده ها بصورت  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  و در سطح معنی داری  $P < 0.05$  گزارش شدند.

## فصل چهارم

### نتایج

#### ۱-۴ نتایج جداسازی فولیکول های تخمدانی:

سلول های جدا شده در این روش، شامل سلول های گرانولوزا، اووسیت و سلول های استرومایی می باشد. جداسازی فولیکول های پریموردیال و پرایمری از بافت تخمدان، مشکل است زیرا این فولیکول ها در ماتریکس متراکم احاطه شده اند و برای جداسازی آن ها نیاز به هضم آنزیمی قوی و مدت زمان طولانی می باشد ولی از طرفی ارتباط بین سلول های گرانولوزا و اووسیت حداقل است لذا افزایش زمان هضم آنزیمی می تواند باعث آسیب به سلول های گرانولوزا و اووسیت شود.



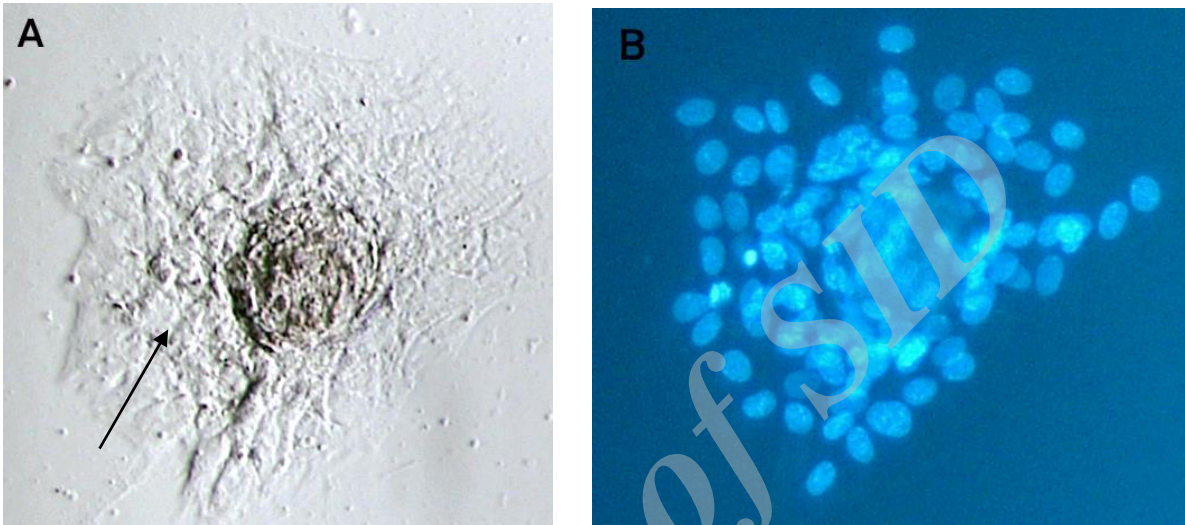
تصویر ۱-۴ رنگ آمیزی **Hoechst** فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان انسانی .

الف- فولیکول سالم با یک ردیف سلول های گرانولوزا در اطراف اووسیت . مقیاس ۵۰ میکرون

ب- فولیکول با سلول های گرانولوزا جدا شده از اطراف فولیکول بدلیل هضم آنزیمی نامناسب. فلش نشان دهنده اووسیت می باشد.

## ۲-۴ نتایج کشت دو بعدی فولیکول های تخمدانی

کشت دو بعدی فولیکول های تخمدانی باعث جدا شدن سلول های گرانولوزا از اووسیت و چسبیدن سلول های گرانولوزا به دیش می شود.



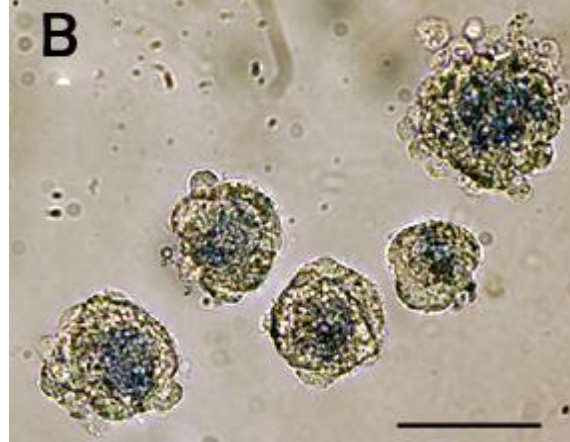
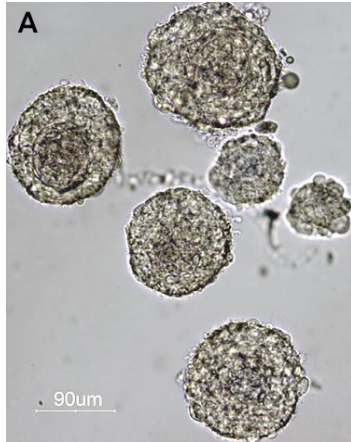
تصویر ۲-۴: کشت دو بعدی فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان انسانی

**A** کشت دو بعدی فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان

**B** رنگ آمیزی Hoechst فولیکول های کشت شده بصورت دو بعدی . فلش نشان دهنده سلول های گرانولوزا می باشد.

## ۳-۴ نتایج کشت فولیکول های تخمدانی بدون حضور سلول های تخمدانی

در کشت سه بعدی فولیکول های تخمدانی بدون هم کشتی سلول های تخمدانی بعد از یک هفته، افزایش اندازه فولیکول ها مشاهده شد. اما تمام فولیکول ها در جاتی از دژنره شدن را نشان دادند. لذا در ادامه تحقیقات کشت سه بعدی فولیکول ها با حضور سلول های تخمدانی انجام شد.



تصویر ۳-۴: رنگ آمیزی تریپان بلو فولیکول های تکوین یافته بعد از ۱۰ روز کشت در حضور و عدم حضور سلول های تخمدانی  
 A. فولیکول های تکوین یافته در هم کشتی با سلول های تخمدانی  
 B. فولیکول های تکوین یافته بدون هم کشتی سلول های تخمدانی

#### ۴-۴ نتایج کشت فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه در ژل آلژینات

۵۰ فولیکول جدا شده از بافت تخمدان تازه در سه گروه شامل ۱۰٪ سرم، ۱۰٪ پلاسمای غنی از پلاکت و ترکیبی از ۵٪ سرم و ۵٪ پلاسمای غنی از پلاکت بمدت ۲۰ روز کشت داده شد که نتایج به صورت زیر است:

##### ۱-۴-۴ افزایش اندازه فولیکول ها

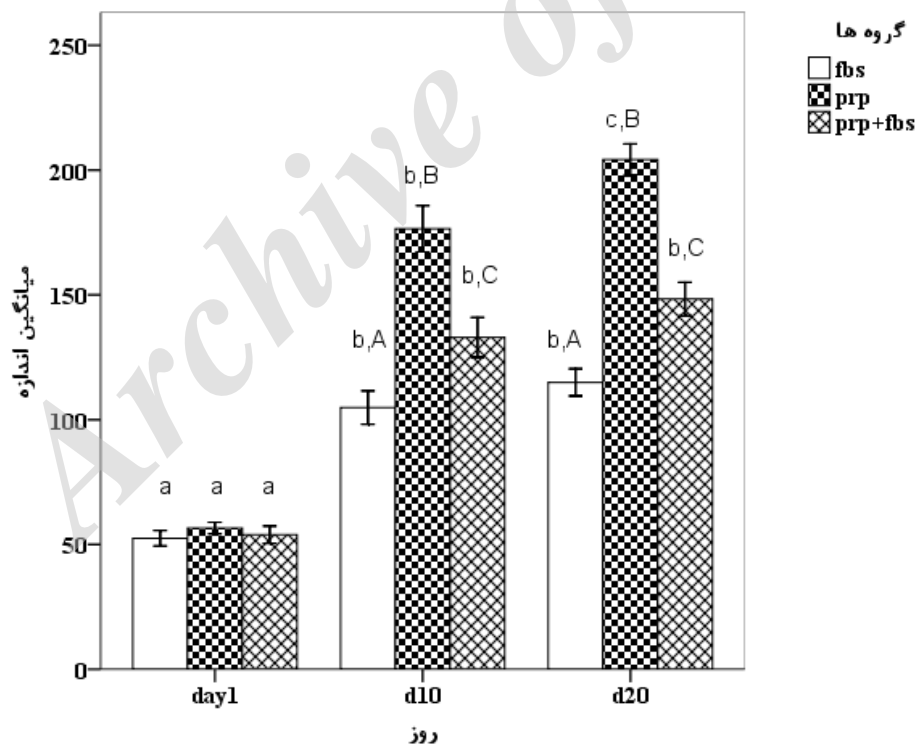
همانطور که در جدول ۱-۴ و نمودار ۱-۴ آشکار است، اندازه فولیکول ها بعد از ده روز کشت در تمام گروه ها بطور قابل ملاحظه ای افزایش یافت ( $P < 0.001$ ) اما سرعت رشد در گروه های مختلف متفاوت بود. مقایسه بین گروهها نشان داد که افزایش اندازه فولیکول ها در حضور ۱۰٪ پلاسمای غنی از پلاکت بطور معنی داری بیشتر از دو گروه دیگر بود (جدول ۱-۴). بعلاوه افزایش اندازه بین روز ده و بیست فقط در گروه تیمار شده با PRP بطور معنی دار تفاوت داشت.



جدول ۴-۱ افزایش اندازه و زنده مانی فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه پس از کشت در ژل آلژینات ۱٪ در محیط های مختلف (mean±SEM)

گروه	اندازه فولیکول های جدا شده از تخمدان تازه (µm) بعد از کشت*		زنده مانی (%)**	
	روز ۱	روز ۱۰	روز ۱	روز ۲۰
سرم جنین گاوی	۵۲,۵۰ ± ۱,۴۴ <sup>a</sup>	۱۰۴,۸۴ ± ۳,۱۴ <sup>b,A</sup>	۱۰۰ <sup>a</sup>	۱۱۴,۹۳ ± ۲,۵۵ <sup>b,A</sup>
پلاسمای غنی از پلاکت	۵۶,۵۶ ± ۱,۰۹ <sup>a</sup>	۱۷۶,۴۹ ± ۴,۳۵ <sup>b,B</sup>	۱۰۰ <sup>a</sup>	۲۰۴,۱۸ ± ۲,۹۵ <sup>c,B</sup>
پلاسمای غنی از پلاکت + سرم	۵۳,۸۸ ± ۱,۶۴ <sup>a</sup>	۱۳۲,۹۸ ± ۳,۷۷ <sup>b,C</sup>	۱۰۰ <sup>a</sup>	۱۴۸,۳۳ ± ۳,۱۸ <sup>b,C</sup>

حروف کوچک انگلیسی متفاوت، بیانگر تفاوت معنی دار در یک ردیف است. حروف بزرگ انگلیسی متفاوت، بیانگر تفاوت معنی دار در یک ستون است (\*P < 0.001, \*\* P < 0.05).

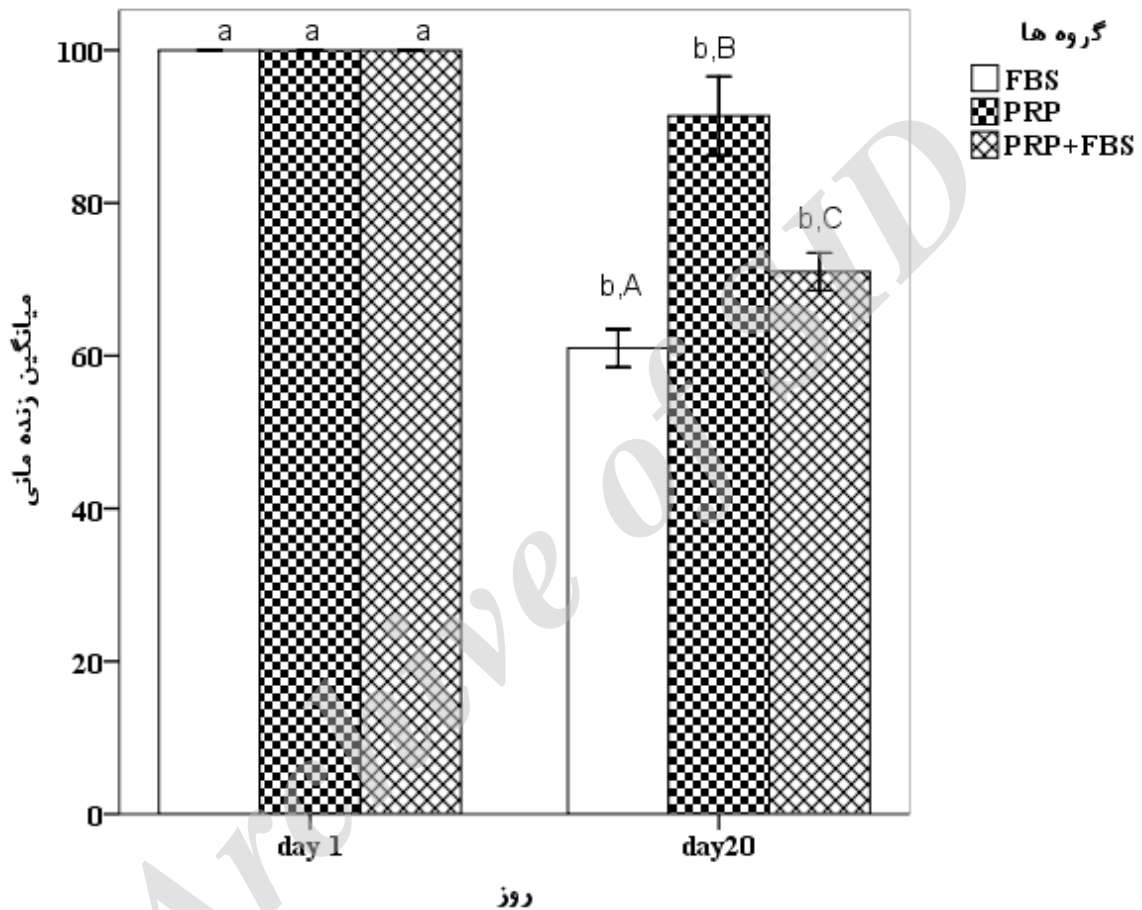


نمودار ۴-۱ افزایش اندازه فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه پس از کشت در ژل آلژینات ۱٪ (mean±SEM) حروف کوچک انگلیسی متفاوت، بیانگر تفاوت معنی دار در یک گروه بین روز های مختلف است (P<0.001). حروف بزرگ انگلیسی متفاوت، بیانگر تفاوت معنی دار بین گروه ها در یک بازه زمانی است (P<0.001).



#### ۲-۴-۴ درصد زنده مانی فولیکول ها

همانطور که در جدول ۱-۴ و نمودار ۲-۴ نشان داده شده است، پس از بیست روز کشت، میزان زنده مانی فولیکول ها بطور معنی داری در تمام گروه ها کاهش یافت ( $P < 0.05$ ). از لحاظ کاهش زنده مانی فولیکول ها تفاوت معناداری بین گروه های مختلف دیده شد بطوریکه فولیکول های تیمار شده با PRP ۱۰٪ نسبت به فولیکول های موجود در دو گروه دیگر زنده مانی بالاتری نشان دادند.

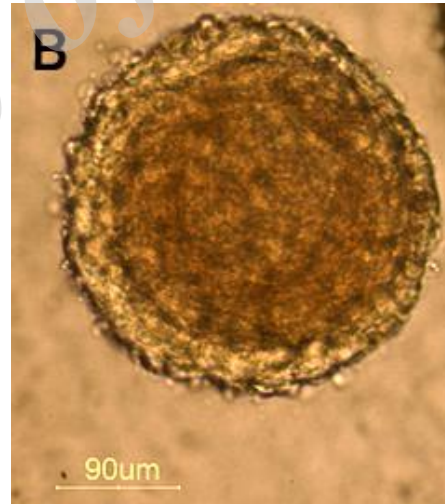
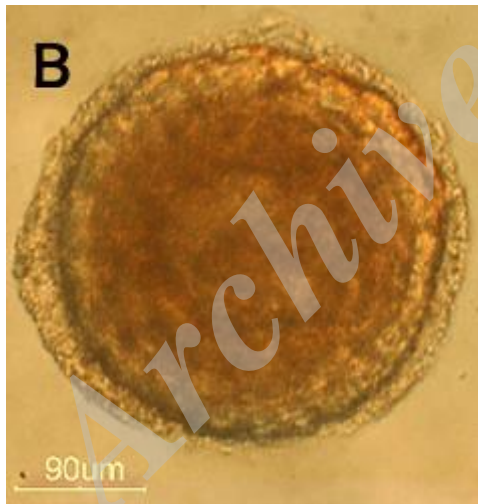
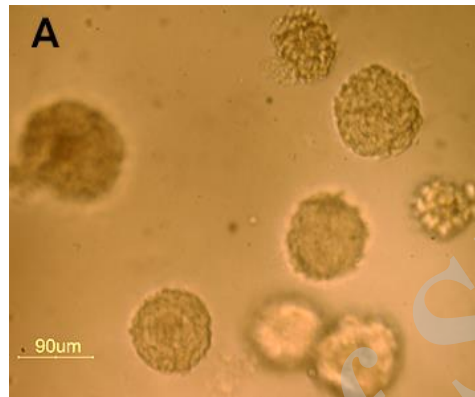


نمودار ۲-۴ زنده مانی فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه پس از ۲۰ روز کشت در ژل آلژینات ۱٪ (mean±SEM)

حروف کوچک انگلیسی متفاوت، بیانگر تفاوت معنی دار در یک گروه بین روزهای مختلف است ( $P < 0.05$ ). حروف بزرگ انگلیسی متفاوت، بیانگر تفاوت معنی دار بین گروه ها در یک بازه زمانی است ( $P < 0.05$ ).

#### ۳-۴-۴ نتایج کشت فولیکول ها در گروه PRP بعد از ۳۰ روز کشت

همانطور که در تصویر ۳-۴ نشان داده شده است، فولیکول های کشت داده شده در گروه ۱۰٪ PRP از ۶۰ میکرون به حدود ۲۵۰ میکرون و فولیکول های با اندازه بزرگتر ۹۰ میکرون به اندازه ۳۲۰ میکرون در روز ۳۰ رسیدند. بعد از انتقال این فولیکول های بزرگتر از ۳۰۰ میکرون به ژل ۰/۵٪ بمنظور فراهم سازی فضای لازم برای افزایش اندازه این فولیکول ها، فولیکول ها در کمتر از ۱۲ ساعت به هم چسبیدند.



تصویر ۴-۴ تکوین فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه انسانی بعد از ۳۰ روز کشت در گروه تیمار شده با PRP  
A. فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه در روز اول B. فولیکول های پری آنترال بعد از ۳۰ روز کشت

#### ۱-۴ نتایج کشت فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده در ژل آلژینات

۲۲۹ فولیکول جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده در سه گروه شامل ۱۰٪ سرم ، ۱۰٪ پلاسما غنی از پلاکت ، ترکیبی از ۵٪ سرم و ۵٪ پلاسما غنی از پلاکت و ۱۰٪ آلبومین سرم انسانی بمدت ۱۰ روز کشت داده شد که نتایج به صورت زیر است:

#### ۱-۵-۴ افزایش اندازه فولیکول ها

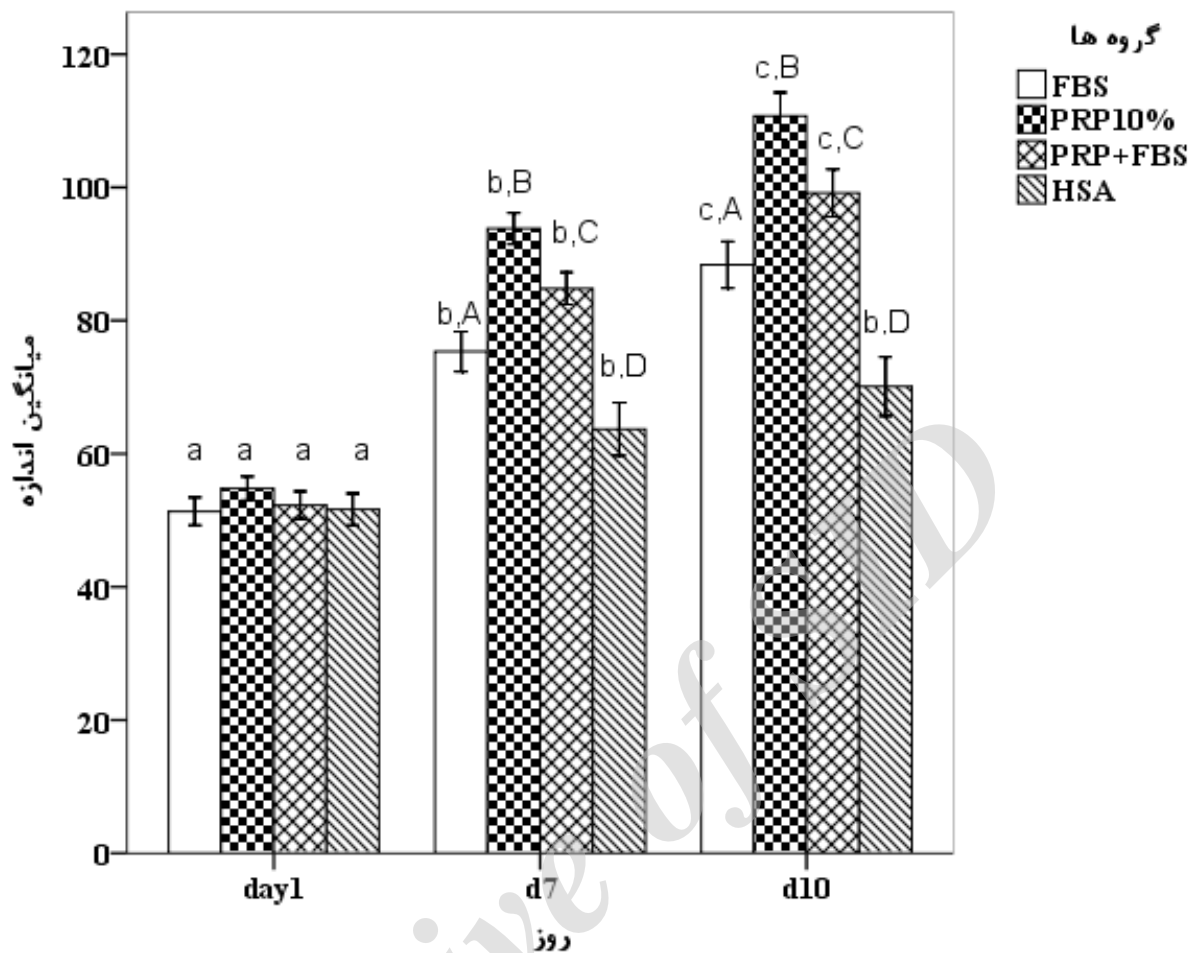
همانطور که در جدول ۲-۴ و نمودار ۳-۴ آشکار است، اندازه فولیکول ها بعد از کشت بمیزان قابل ملاحظه ای افزایش یافت و تفاوت در میزان رشد بین گروه ها حتی در روز ۷ بعد از کشت نیز قابل ملاحظه بود ( $P < 0.001$ ). حضور پلاسما غنی از پلاکت به تنهایی دارای بیشترین اثر مثبت بر رشد فولیکول بود. کمترین میزان رشد در گروه تیمار شده با آلبومین سرم انسانی مشاهده شد بعلاوه در این گروه افزایش اندازه بین روز هفت و ده نیز تفاوتی نداشت.

جدول ۲-۴ افزایش اندازه و زنده مانی فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده پس از کشت در ژل آلژینات ۱٪ در محیط های مختلف (mean±SEM)

گروه	اندازه فولیکول های جدا شده از تخمدان تازه ( $\mu\text{m}$ ) بعد از کشت*				زنده مانی (%)**
	روز ۱	روز ۷	روز ۱۰	روز ۲۰	
سرم جنین گاوی ۵۹	$51,23 \pm 1,04^a$	$75,35 \pm 1,49^{b,A}$	$88,39 \pm 1,74^{c,A}$	$100^a$	$1,18^{b,A}$
پلاسما غنی از پلاکت ۸۱	$54,77 \pm 0,89$	$93,82 \pm 1,18^{b,B}$	$110,73 \pm 1,76^{c,B}$	$100^a$	$2,72^{b,B}$
پلاسما غنی از پلاکت+ سرم آلبومین سرم انسانی ۵۴	$52,28 \pm 1,03^a$	$84,83 \pm 1,20^{b,C}$	$99,15 \pm 1,78^{c,C}$	$100^a$	$1,22^{b,A}$
	$51,63 \pm 1,18^a$	$63,69 \pm 1,98^{b,D}$	$70,10 \pm 2,19^{b,D}$	$100^a$	$1,87^{b,A}$

حروف کوچک انگلیسی متفاوت، بیانگر تفاوت معنی دار در یک ردیف است.

حروف بزرگ انگلیسی متفاوت، بیانگر تفاوت معنی دار بین دو گروه در یک ستون است ( $P < 0.05$  \*\*,  $P < 0.001$  \*).



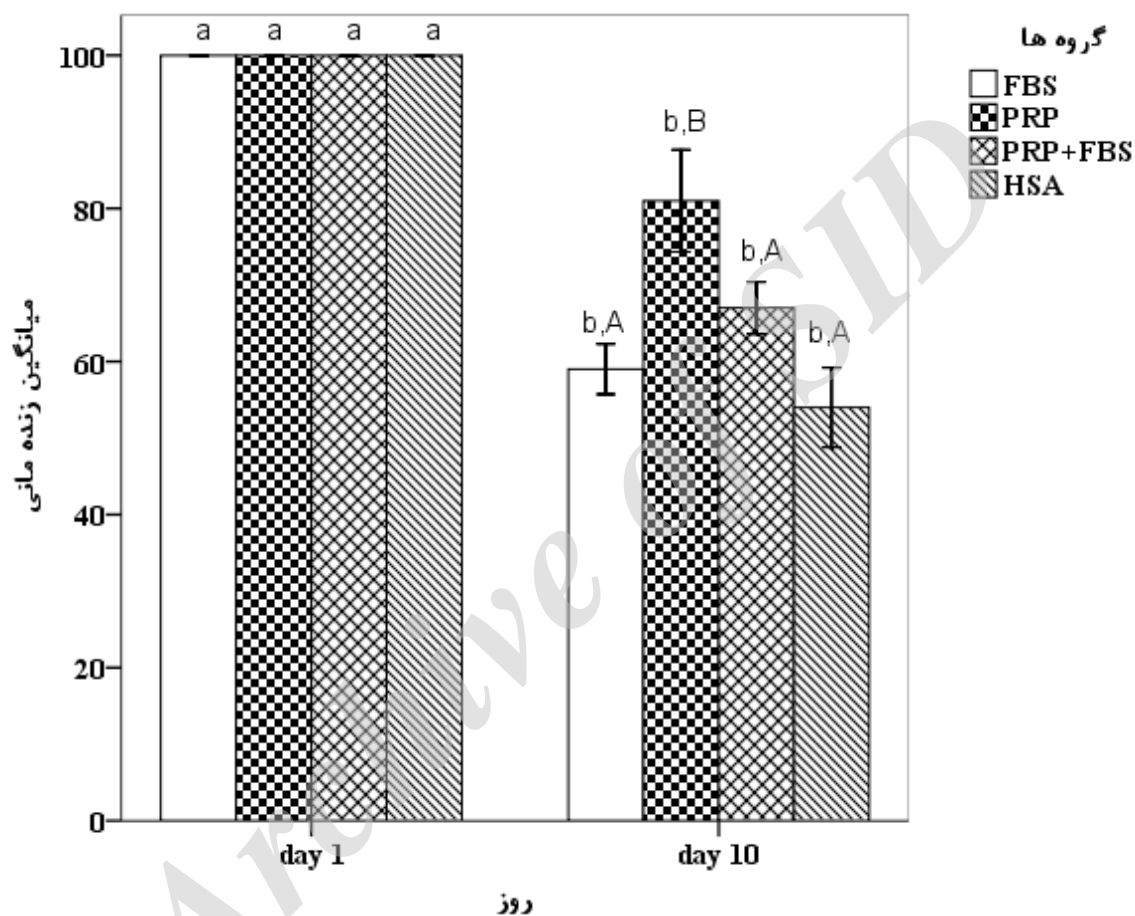
نمودار ۳-۴ افزایش اندازه فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده پس از کشت در ژل آلژینات ۱٪ (mean±SEM)

حروف کوچک انگلیسی متفاوت، بیانگر تفاوت معنی دار در یک گروه بین روز های مختلف است (P<0.001).

حروف بزرگ انگلیسی متفاوت، بیانگر تفاوت معنی دار بین گروه ها در یک بازه زمانی است (P<0.001).

#### ۴-۵-۲ درصد زنده مانی فولیکول ها

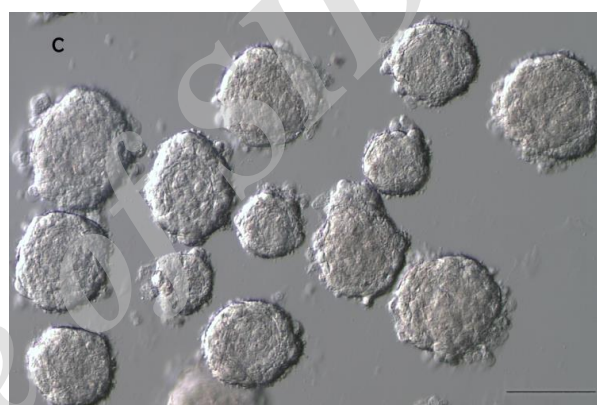
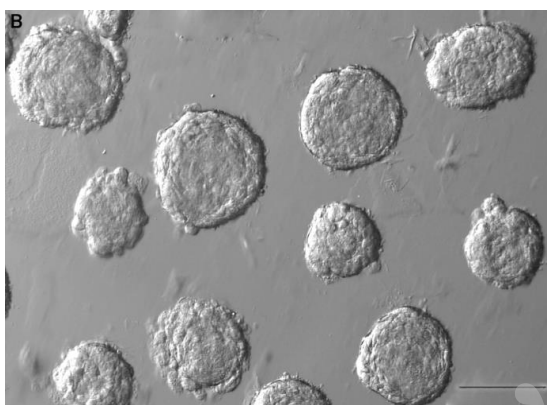
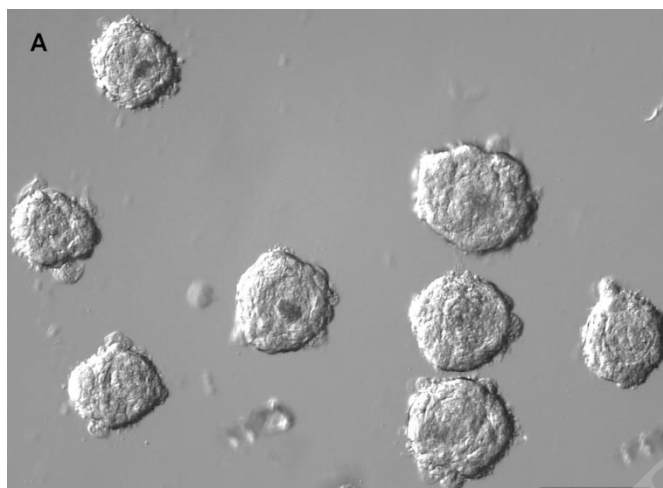
پس از ده روز کشت، میزان زنده مانی فولیکول ها بطور معنی داری در تمام گروه ها کاهش یافت. تفاوت معناداری از لحاظ کاهش میزان زنده مانی بین گروه تیمار شده با پلاسمای غنی از پلاکت با سایر گروه ها مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). فولیکول های تیمار شده با پلاسمای غنی از پلاکت و آلبومین سرم انسانی بترتیب بیشترین و کمترین میزان زنده مانی را نشان دادند



نمودار ۴-۴ زنده مانی فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده پس از ۱۰ روز کشت در ژل آلزینات ۱٪  
(mean±SEM)

حروف کوچک انگلیسی متفاوت، بیانگر تفاوت معنی دار در یک گروه بین روزهای مختلف است ( $P < 0.05$ ).

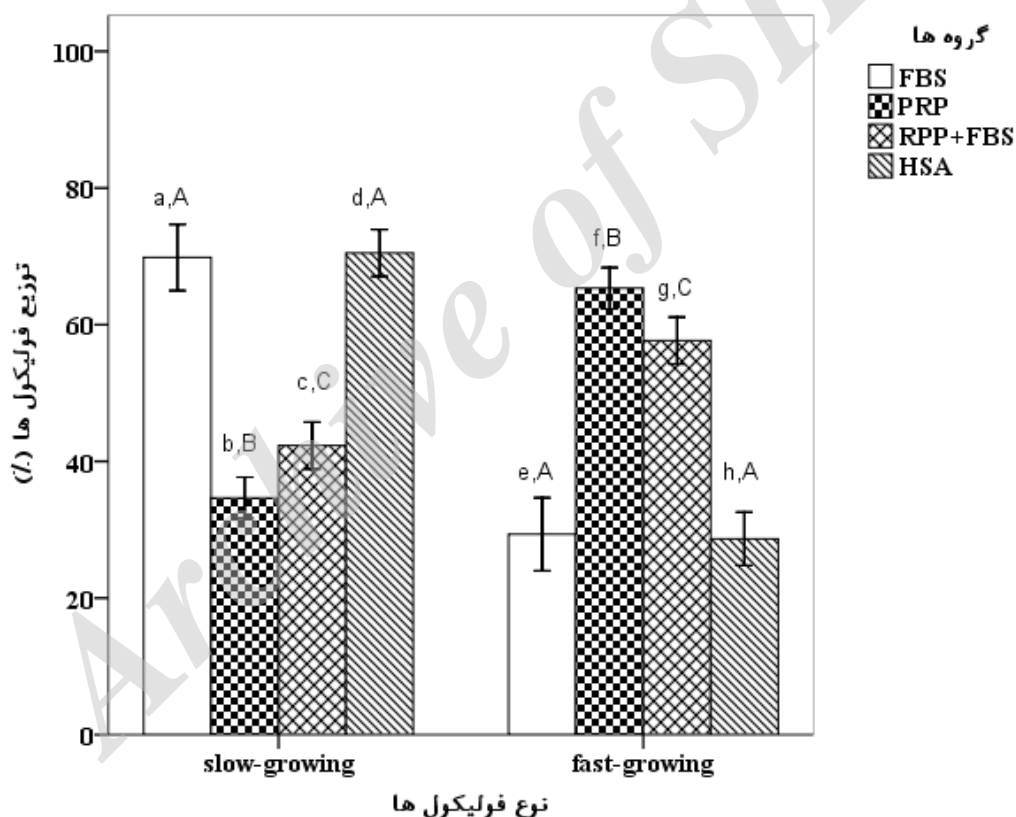
حروف بزرگ انگلیسی متفاوت، بیانگر تفاوت معنی دار بین گروه ها در یک بازه زمانی است ( $P < 0.05$ ).



تصویر ۴-۵ تکوین فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی انسانی بعد از ۱۰ روز کشت در گروه های مختلف  
 A. فولیکول های تکوین یافته در حضور FBS. B. فولیکول های تکوین یافته در حضور FBS + PRP.  
 C. فولیکول های تکوین یافته در حضور PRP

۴-۵-۳ توزیع فولیکول های با "رشد-آهسته" و "رشد-سریع" بعد از ۱۰ روز کشت فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده

همانطور که در نشان داده شده، براساس سرعت رشد دو گروه متفاوت از فولیکول ها مشاهده شدند (نمودار ۴-۵). فولیکول هایی که اندازه آنها در طول ۱۰ روز کشت به ۲ برابر افزایش یافت بعنوان فولیکول های با "رشد-سریع" و فولیکول هایی که سرعت رشدشان از این میزان کمتر بود تحت عنوان فولیکول های با "رشد-آهسته" نامیده شدند. میزان توزیع فولیکول هایی با "رشد-سریع" و "رشد-آهسته" در بین گروه های تیمار شده با پلاسمای غنی از پلاکت با سایر گروه ها تفاوت معنی دار وجود داشت ( $P < 0.001$ ). بالاترین و پائین ترین میزان فولیکول های با "رشد-سریع" بترتیب در گروه تیمار شده با پلاسمای غنی از پلاکت و آلبومین سرم انسانی مشاهده گردید. قابل ذکر است که بین توزیع فولیکول های با "رشد-سریع" و همچنین با "رشد-آهسته" در بین دو گروه تیمار شده با سرم جنین گاو و آلبومین سرم انسانی تفاوت معنی داری وجود نداشت.



نمودار ۴-۵ توزیع فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده پس از ۱۰ روز کشت در ژل آلژینات ۱٪ (mean±SEM)

حروف کوچک انگلیسی متفاوت، بیانگر تفاوت معنی دار در یک گروه است ( $P < 0.001$ ). حروف بزرگ انگلیسی متفاوت، بیانگر تفاوت معنی دار بین گروه های مختلف است ( $P < 0.001$ ).

## ۶-۴ اثرات پلاسمای غنی از پلاکت

### ۱-۶-۴ تکوین فولیکول های پریموردیال و پرایمری به مرحله پیشرفته :

در روز ۱، تمام فولیکول ها در مراحل پریموردیال و پرایمری بودند و تفاوت قابل ملاحظه ایی از نظر اندازه فولیکول ها بین گروه های مختلف وجود نداشت. بعد از کشت، بیشتر فولیکول ها به مراحل پیشرفته تکوین یافتند بطوریکه افزودن ۱۰٪ پلاسمای غنی از پلاکت به محیط کشت بیشترین تاثیر را روی رشد فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه و یخ گشایی شده داشت (جدول ۴-۱ و ۴-۲). البته افزایش اندازه فولیکول ها در فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه در مقایسه با فولیکول ها جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده در مدت زمان مشابه بیشتر بود (جدول ۴-۳).

### ۲-۶-۴ افزایش زنده مانی فولیکول های کشت شده:

میزان زنده مانی فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه و یخ گشایی شده در تمام گروه های آزمایشی بعد از کشت کاهش یافت. بالاترین میزان زنده مانی نیز در گروه های تیمار شده با ۱۰٪ پلاسمای غنی از پلاکت مشاهده گردید (جدول ۴-۱ و ۴-۲).

### ۳-۶-۴ افزایش میزان فولیکول های با "رشد-سریع" :

فولیکول های پری آنترال کوچک جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده قادر به بقا و رشد در محیط کشت بودند اما سرعت رشد فولیکول ها متفاوت بود. در محیط های کشت حاوی سرم جنین گاوی و آلبومین سرم انسانی، بیشتر فولیکول ها (۷۰٪) از نوع فولیکول های با "رشد-آهسته" بودند در حالیکه در گروه های تیمار شده با پلاسمای غنی از پلاکت بیشتر فولیکول ها را فولیکول های با "رشد-سریع" تشکیل می دادند (نمودار ۴-۵).



۷-۴ مقایسه رشد و زنده مانی فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه و یخ گشایی شده بعد از ۱۰ روز کشت:

۱-۷-۴ افزایش اندازه فولیکول ها:

همانطور که در جدول ۳-۴ و نمودار ۶-۴ نشان داده شده، اندازه فولیکول ها بعد از ده روز کشت در هر دو گروه فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه و یخ گشایی شده افزایش یافت اما این افزایش اندازه در گروه اول بیشتر از گروه دوم بود ( $P < 0.001$ ) (تصویر ۲-۴).

۲-۷-۴ در صد زنده مانی فولیکول ها :

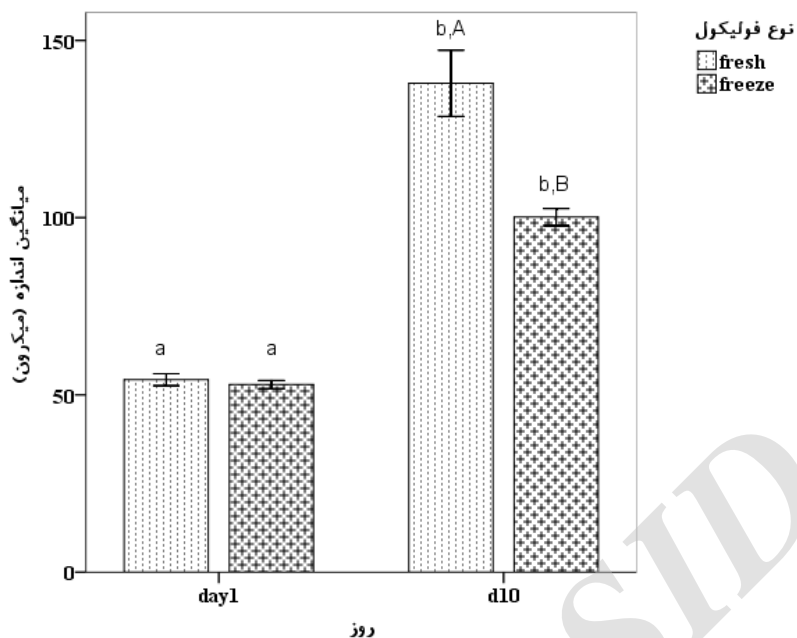
براساس مشاهدات جدول ۳-۴ و نمودار ۷-۴، علیرغم کاهش زنده مانی فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه و یخ گشایی شده بعد از کشت، زنده مانی فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه در مقایسه با گروه دوم بالاتر بود ( $P < 0.001$ ).

جدول ۳-۴ مقایسه افزایش اندازه و درصد زنده مانی فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه و یخ گشایی شده پس از ۱۰ روز کشت در ژل آلزینات ۱٪ (mean±SEM)

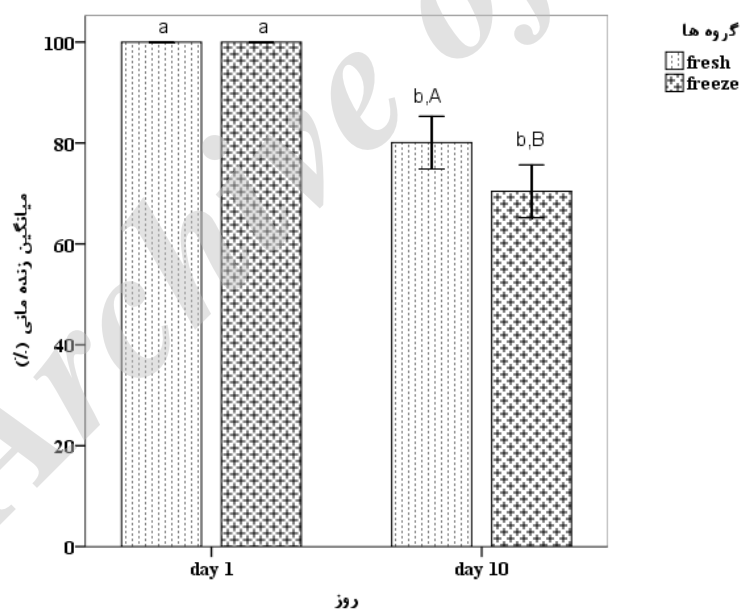
گروه	اندازه فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان (µm) بعد از کشت*		زنده مانی (%)**	
	روز ۱	روز ۱۰	روز ۱	روز ۲۰
بافت تازه	۵۴,۳۰ ± ۰,۸۴ <sup>a</sup>	۱۳۷,۹۰ ± ۴,۶۵ <sup>b,A</sup>	۱۰۰ <sup>a</sup>	۲,۶۱ <sup>b,A</sup>
بافت یخ گشایی شده	۵۲,۹۲ ± ۰,۵۷ <sup>a</sup>	۱۰۰,۱۶ ± ۱,۲۲ <sup>b,B</sup>	۱۰۰ <sup>a</sup>	±۲,۶۱ <sup>b,B</sup>
				۷۰,۴۱

حروف کوچک انگلیسی متفاوت، بیانگر تفاوت معنی دار در یک گروه بین روزهای مختلف است ( $t$ -test;  $P < 0.001$ ).

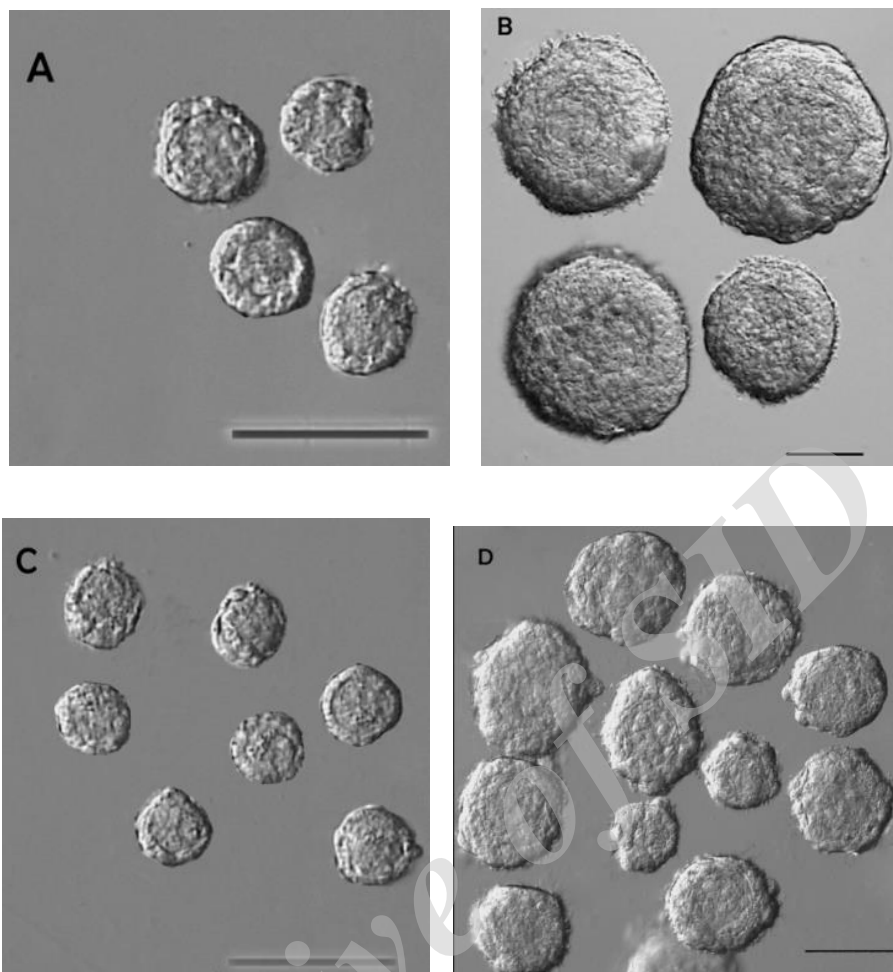
حروف بزرگ انگلیسی متفاوت، بیانگر تفاوت معنی دار بین گروه های مختلف است ( $t$ -test;  $P < 0.001$ ).



نمودار ۴-۶ افزایش اندازه فولیکول‌های جدا شده از بافت تخمدان تازه و یخ‌گشایی شده پس از ۱۰ روز کشت در ژل آلژینات ( $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ) حروف کوچک انگلیسی متفاوت، بیانگر تفاوت معنی دار در یک گروه بین روزهای مختلف است. حروف بزرگ انگلیسی متفاوت، بیانگر تفاوت معنی دار بین دو گروه در یک روز است (t-test;  $P < 0.001$ ).



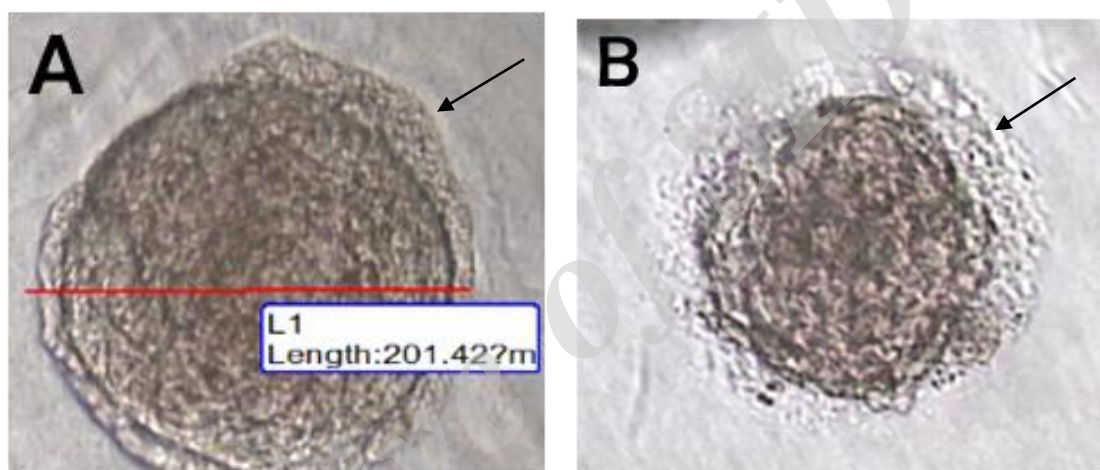
نمودار ۴-۷ زنده مانی فولیکول‌های جدا شده از بافت تخمدان تازه و یخ‌گشایی شده پس از ۱۰ روز کشت در ژل آلژینات ( $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ) حروف کوچک انگلیسی متفاوت، بیانگر تفاوت معنی دار در یک گروه بین روزهای مختلف است. حروف بزرگ انگلیسی متفاوت، بیانگر تفاوت معنی دار بین گروه‌ها در یک بازه زمانی است (t-test;  $P < 0.001$ ).



تصویر ۴-۶ مقایسه رشد فولیکول های تخمدانی جدا شده از بافت تخمدان تازه و یخ گشایی شده در حضور پلاسمای غنی از پلاکت. الف) فولیکول های پریموردیال جدا شده از کورتکس تخمدان تازه. ب) تکوین فولیکول های جدا شده از تخمدان تازه به مرحله پری آنترال پس از ۱۰ روز کشت. ج) فولیکول های پریموردیال جدا شده از کورتکس تخمدان یخ گشایی شده. د) تکوین فولیکول های جدا شده از تخمدان یخ گشایی شده به مرحله ثانویه با حفظ انسجام ساختاری پس از ۱۰ روز کشت. مقیاس = ۱۰۰ میکرون.

#### ۸-۴ کشت فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده در حضور Activin

فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده در هفته دوم در حضور activin با غلظت ۱۰۰ نانوگرم/میلی لیتر کشت داده شدند. در کشت فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده در هفته دوم در حضور activin و غلظت ۵۰ نانوگرم / میلی لیتر FSH مشاهده گردید که سلول های تکا بصورت گسسته در اطراف غشاء پایه شکل گرفتند. اما در کشت فولیکول ها در حضور activin و غلظت ۱۰۰ نانوگرم / میلی لیتر FSH مشاهده گردید که سلول های تکا بصورت یکپارچه در اطراف غشاء پایه شکل گرفتند.



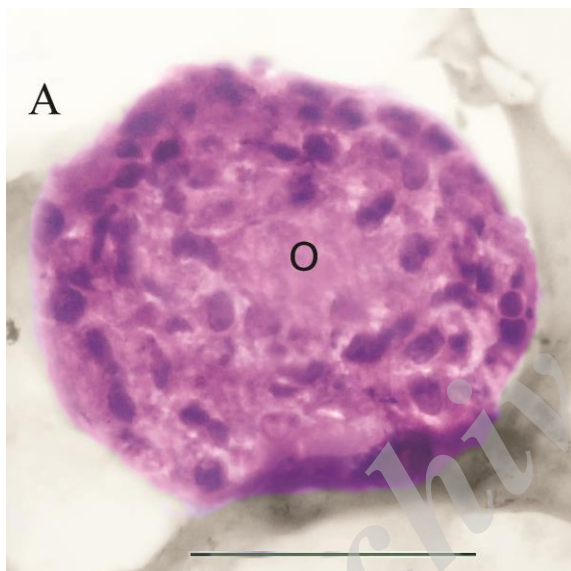
تصویر ۴-۷ رشد فولیکول های تخمدانی جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده در حضور Activin و FSH

A- فولیکول های رشد کرده در حضور activin و غلظت ۱۰۰ نانوگرم/میلی لیتر FSH.

B- فولیکول های رشد کرده در حضور activin و غلظت ۵۰ نانوگرم / میلی لیتر FSH

#### ۹-۴ بررسی بافتی فولیکول های جدا شده تخمدان انسانی

تصویر ۳-۴ نشاندهنده ساختار فولیکول های تکوین یافته به پری آنترال می باشد. فولیکول های طبیعی دارای غشاء پایه منظمی هستند که سلول های فولیکولی، زونا پلوسیدا و اووسیت کروی با سیتوپلاسم یکدست را می پوشاند. فولیکول های دژنره دارای سلول های گرانولوزا بهم ریخته هستند که درجات متفاوتی از تغییرات هسته ایی شامل karyorrhexis یا قطعه قطعه شدن هسته و karyolysis را نشان می دهند. بررسی های بافتی نشان داد که فولیکول های طبیعی (۴-۸ الف) و فولیکول های دژنره (۴-۸ ب) در تمام گروه ها مشاهده گردید.



تصویر ۴-۸ بررسی بافتی فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده بعد از ۱۰ روز کشت.

الف- فولیکول پری آنترال سالم با سلول های گرانولوزا منظم در اطراف اووسیت

ب - فولیکول در حال دژنره شدن با علائمی از پیکنوز (فلش) و قطعه قطعه شدن هسته (سر فلش) سلول های گرانولوزا.

مقیاس = ۵۰ میکرون

## فصل پنجم

### بحث و نتیجه گیری

انجام تحقیقات بنیادی در مورد تخمدان انسان ضروری است اما بدلیل دسترسی محدود به بافت تخمدان و ناهمگونی ذاتی بین نمونه ها این تحقیقات مشکل است. علیرغم شباهت ساختاری بافت تخمدان سایر پریمات ها با انسان، در جداسازی فولیکول های پریموردیال انسانی با بکارگیری تکنیک مشابه نتایج متناقضی بدست آمد و احتمال می رود این تناقض بدلیل تفاوت در ترکیب ماتریکس خارج سلولی احاطه کننده فولیکول ها باشد [۱۸۳]. بعلاوه با توجه به ناهمگنی کیفیت بافت تخمدان بین افراد تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند سن فرد، نوع بیماری، درمان قبلی و همچنین متفاوت بودن رشد فولیکول بین افراد نابالغ و بالغ جای تعجب نیست که بکارگیری روش های استاندارد برای جداسازی و رشد فولیکول های پریموردیال از بافت تخمدان انسانی یک چالش بزرگ محسوب گردد [۳۴].

فولیکول های پریموردیال، فراوانترین فولیکول های تخمدانی در هر سنی هستند و بنابراین منبع مهمی در حفظ باروری خانم ها محسوب می شوند. علیرغم اهمیت آن ها، محدودیت هایی در جداسازی و رشد فولیکول های پریموردیال در شرایط *in vitro* وجود دارد [۱۱۷، ۱۳۵، ۱۸۳]. در این مطالعه برای اولین بار، کشت و تکوین فولیکول های پریموردیال و پرایمری جدا شده از بافت تخمدان تازه و یخ گشایی شده انسانی به مرحله پری آنترال در آلژینات ۱٪ در محیط های کشت مختلف انجام گرفت. در این تحقیق نشان داده شد که پلاسمای غنی از پلاکت باعث بهبود رشد، زنده مانی و تغییر الگوی رشد فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان می گردد. این نتایج نشان می دهد که با تغییر و بهینه سازی شرایط کشت، امکان افزایش کارایی رشد فولیکول های اولیه انسانی در محیط *in vitro* وجود دارد.

در تکوین فولیکول های تخمدانی، ارتباطات متابولیکی بین سلول های گرانولوزا و اووسیت بمنظور هماهنگی رشد و تمایز تخمک و سلول های سوماتیک نیز اهمیت دارد لذا انسجام ساختاری فولیکول برای رشد و بلوغ یعدی اووسیت سالم ضروری است و باید در طول کشت حفظ شود [۱۳، ۲۶]. بافت تخمدان، حمایت فیزیکی کافی برای حفظ انسجام ساختاری فولیکول را در طی مراحل اولیه رشد فراهم می کند. تحقیقات نشان داده که کشت بافت تخمدان روش مناسبی برای فعال سازی فولیکول های پریموردیال و تکوین آنها به مراحل بعدی می باشد اما بدلیل هتروژنی بین افراد و حتی بین نمونه های تخمدانی یک فرد، پیش بینی اینکه آیا یک قطعه بافتی حاوی فولیکول است کار مشکلی است بخصوص در افراد مسن تر که تعداد کل فولیکول های تخمدانی با افزایش سن کاهش می یابد [۱۴، ۱۵]. بنابراین کشت فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان در مقایسه با کشت بافت تخمدان روش کارآمدتری بنظر میرسد. کشت فولیکول ها در داخل بافت تخمدان، تبادلات مواد بین فولیکول و سلول های بینابینی را حفظ نموده و در مقابل کشت فولیکول های جدا شده از بافت، موجب انتشار سریع و راحت تر مواد می شود

در کشت فولیکول های جدا شده از تخمدان نیز بمنظور تامین انسجام ساختاری فولیکول جدا شده از بافت تخمدان، نیاز به محیط فیزیکی مستحکم می باشد [۲۵]. آلژینات با حفظ ارتباطات بین اووسیت و سلول های سوماتیک امکان رشد و تکوین فولیکول را فراهم نموده [۱۳، ۲۶] و همچنین اجازه انتشار پروتئین هایی مثل FSH را که برای تکوین فولیکولی ضروری هستند میدهد. در مطالعه حاضر به منظور کشت سه بعدی فولیکول های مذکور از هیدروژل آلژینات به عنوان داربست استفاده گردید. در مطالعه ایی بر روی پریمات نشان داده شد که غلظت ۰.۵٪ آلژینات باعث جدا

شدن سلول های گرانولوزا از تخمک در طی کشت فولیکول های پریموردیال شده لیکن غلظت های بالاتر آلژینات باعث حفظ انسجام ساختاری و رشد سلول های گرانولوزا گردید [ ۲۵]. از طرفی با بررسی میزان تراکم رشته های کلاژن در محل استقرار فولیکول های بدوی در قشر تخمدان با استفاده از رنگ آمیزی تری کروم (Trichrome) مشخص گردید که تراکم رشته های مذکور در ناحیه قشر تخمدان بسیار بیشتر از ناحیه میانی آن بوده و بدین ترتیب فولیکول های بدوی در حین تکامل، از قسمت های متراکم تر قشر تخمدان به قسمت های با تراکم کمتر میانی تخمدان انتقال می یابند. بنابراین به نظر می رسد که وجود آلژینات با غلظت های بیشتر جهت تحریک رشد فولیکول های بدوی لازم است. در مطالعه حاضر نیز از غلظت ۰.۱٪ آلژینات بمنظور کشت فولیکول های پریموردیال استفاده گردید.

برای جداسازی فولیکول های پریموردیال انسانی بدلیل اندازه کوچک آنها و بافت متراکم استرومای تخمدان انسان امکان جداسازی مکانیکی وجود ندارد و نیاز به جداسازی آنزیمی است. در مطالعات پیشین، روش های آنزیمی متفاوتی برای جداسازی فولیکول های پریموردیال انسانی صورت گرفته است [ ۱۲۶، ۱۲۷]. در مطالعه حاضر نیز برای جداسازی فولیکول های پریموردیال از هضم آنزیمی با استفاده از کلاژناز و DNase استفاده گردید و فولیکول هایی با سلول های گرانولوزای سالم جدا شدند. همان طور که در قسمت نتایج نیز اشاره گردید، ۱۰۰٪ فولیکول ها پس از جدا شدن از بافت تخمدان، زنده بوده و در اثر هضم آنزیمی دچار آسیب نشدند.

در این مطالعه درکشت فولیکول های پریموردیال جدا شده از بافت تخمدان در محیط حاوی FBS بدون هم کشتی سلول های تخمدانی تمام فولیکول ها درجاتی از دژنره شدن بخصوص دژنره شدن اووسیت را نشان دادند ولی در حضور سلول های تخمدانی میزان زنده مانی بین ۶۱-۵۹٪ گزارش شد. مطالعات دیگری نیز نشان داده اند که فولیکول های کوچک تخمدانی بمنظور شروع تکوین نیازمند سلول های استرومای اطراف هستند زیرا این سلول ها عوامل مختلفی تولید می کنند که در فعالسازی فولیکول، رشد و عروق زایی نقش دارند [ ۱۸۴]. در مطالعه ایی نشان داده شده که فولیکول های موش بدون حضور سلول های استروما شروع به از بین رفتن می کنند و بعد از ۱۰ روز کشت فقط ۳۰٪ زنده می مانند و حتی فولیکول هایی که زنده می مانند رشد نکرده لیکن اما در صورت هم کشتی با سلول های استروما میزان زنده مانی فولیکول ها تا ۷۵٪ افزایش یافته و افزایش اندازه فولیکول ها نیز بیشتر می گردید که احتمالاً بدلیل ترشح سیتوکین ها، فاکتورهای رشد مختلف و پروتئین های ماتریکس خارج سلولی ترشح شده توسط انواعی از سلول ها استروما از جمله سلول های گرانولوزا، نکا و ماکروفاژها می باشد [ ۳۰].

تخمین زده شده که برای تکوین فولیکول های پریموردیال به ثانویه در پرمات در شرایط *In vivo* تقریباً ۱۲۰ روز زمان لازم است [ ۳۸]. اما تحقیقات گروه های مختلف نشان داد که تکوین فولیکول در محیط *In vitro* تسریع می شود بطوریکه مطالعه Telfer و همکاران تکوین فولیکول های پری آنترال در قطعات کورتکس تخمدان انسانی را بدنبال تحریک با اکتیوین ۶ روز گزارش کرده اند [ ۱۶]. اما در مطالعه اخیر با کشت فولیکول های جدا شده بافت تخمدان یخ گشایی شده انسانی مدت زمان لازم برای تکوین فولیکول های پریموردیال به پری آنترال حدود ۱۰ روز می باشد.

در مطالعه حاضر تکوین فولیکول های پریموردیال به مرحله پری آنترال با اندازه ۱۷۵ میکرون و ۲۰۴ میکرون بعد از ۱۰ و ۲۰ روز کشت و زنده مانی ۹۱٪ مشاهده گردید. در مطالعات اولیه بر کشت فولیکول های پریموردیال انسانی نتایج نشان داد که علیرغم اینکه کشت بافت منجر به زنده مانی تعداد بیشتری از فولیکول ها می شود اما کشت

فولیکول های پریموردیال فقط باعث زنده مانی فولیکول ها بمدت ۲۴ ساعت می شود [ ۱۴۸، ۱۴۹]. در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۴ Laronda و همکاران نشان دادند که کشت سه روزه فولیکول های پریموردیال انسانی محصور شده در آلژینات منجر به جدائی کامل سلول های گرانولوزا و اووسیت گردید. بدلیل اینکه ارتباط بین سلول های گرانولوزا و اووسیت در فولیکول های پریموردیال و پرایمری حداقل است ممکن است هضم آنزیمی باعث آسیب به سلول های گرانولوزا و غشاء شده و انسجام ساختاری فولیکول از بین رود و این جدایی بدلیل هضم آنزیمی نامناسب می تواند بر تکوین متعاقب فولیکول موثر باشد [ ۱۸۳]. بنابر این رشد و زنده مانی فولیکول های پریموردیال و پرایمری بدلیل تاثیر هضم آنزیمی بر ساختار فولیکول چالش بزرگی است. در تحقیق بعمل آمده توسط Wang و همکاران کشت فولیکول های اولیه جدا شده از بافت تخمدان تازه انسانی در محیط کشت سه بعدی در حضور فاکتور رشد فیبروبلاستی bFGF بمدت ۸ روز باعث تکوین فولیکول های پری آنترال به اندازه ۱۳۳,۳ میکرون و زنده مانی ۷۷,۲٪ گردید که میزان رشد و زنده مانی در مقایسه با مطالعه حاضر کمتر بود که می تواند به دلیل استفاده از فقط یک فاکتور رشد bFGF و عدم تاثیر هم کشتی فولیکول ها و سلول های تخمدانی باشد [ ۱۵۱].

در این تحقیق کشت فولیکول های پریموردیال جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده منجر به افزایش اندازه فولیکول ها به ۹۳ میکرون و ۱۱۰ میکرون بعد از ۷ و ۱۰ روز کشت شد و زنده مانی فولیکول ها بعد از ۱۰ روز کشت ۸۱٪ گزارش گردید. در مطالعه حاضر به این موضوع پی برده شد که فولیکول های پریموردیال جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده نیز توانایی تکوین به مراحل پیشرفته تر را بدون حمایت بافت تخمدان در حضور فاکتورهای رشد دارا می باشند. تکوین فولیکول های پری آنترال کوچک شده جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده بمدت یک هفته در آلژینات توسط پرفسور Amorim و همکاران و افزایش اندازه از ۴۵ میکرون به ۷۰ میکرون تأییدی بر این ادعا است. البته سرعت رشد در مقایسه با مطالعه حاضر کمتر بود که می تواند بدلیل عدم استفاده از فاکتورهای رشد مناسب و عدم تاثیر پاراکرین در شرایط کشت آنها باشد [ ۱۸].

تکوین فولیکول های تخمدانی، فرایند تکوینی پیچیده ایی است که توسط فاکتورهای اندوکراین، پاراکرین و اتوکراین مختلفی تنظیم می شود و با توجه به پیچیدگی و ویژگی های خاص مراحل مختلف فولیکولی، بمنظور حصول اووسیت کاملاً بالغ و شایسته از نظر تکاملی، محیط کشت متفاوتی با فاکتورهای رشد مختلف در هر مرحله فولیکولی لازم است. از جمله فاکتورهای رشد مورد نیاز برای رشد فولیکول های پریموردیال، GDF9 است. در مطالعاتی نقش GDF9 در فعالسازی فولیکول های پریموردیال و انتقال از پریموردیال به پرایمری [ ۲۷] و در پیشبرد تکوین فولیکولی به مرحله فولیکول ثانویه نشان داده شده است (28). GDF9 در محیط کشت فولیکول های پریموردیال علاوه بر افزایش زنده مانی باعث افزایش تکثیر سلول های گرانولوزا و افزایش ترشح استروژن و پروژسترون در این سلول ها می گردد [ ۲۹]. مطالعات زیادی بیانگر تاثیر مثبت پلاسمای غنی از پلاکت بر روی رشد و تمایز سلول های مختلف از جمله سلول های فیبروبلاست، ماهیچه ای، غضروف و استخوان و همچنین جایگزینی آن بجای سرم جنین گاوی در کشت سلول های مختلف می باشد [ ۳۲، ۱۶۷]. در مطالعه ایی نشان داده شده است که لیز پلاکتی در پیوند فولیکول های تخمدان موش باعث بهبود زنده مانی فولیکول ها می شود اما اثر قابل ملاحظه ایی در میزان رشد فولیکولی ندارد. این تفاوت می تواند بدلیل کاهش میزان فاکتورهای رشد در طی ۱۴ روز پیوند باشد که با گذشت زمان از غلظت فاکتورهای رشد کاسته می شود [ ۱۷۰]. در تحقیق دیگری، تیمار بافت یخ گشایی شده تخمدان انسانی با پلاسمای غنی از پلاکت و سپس پیوند آن به خود شخص منجر به تولد زنده گردید و نشاندهنده اثر فاکتورهای رشد پلاکتی بر تسریع عروق



زایی بافت پیوند شده می باشد (169). اما پلاسمای غنی از پلاکت تاکنون برای کشت فولیکول های جدا شده تخمدانی مورد استفاده قرار نگرفته و در این مطالعه بمنظور بهبود رشد و کیفیت فولیکول های کشت داده شده مورد بررسی قرار گرفت.

در مطالعه حاضر ۱۰٪ پلاسمای غنی از پلاکت باعث افزایش رشد فولیکول ها در هر دو گروه فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه و یخ گشایی شده گردید. در این مطالعه اندازه فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه و یخ گشایی شده بعد از ۱۰ روز کشت در گروه تیمار شده با ۱۰٪ پلاسمای غنی از پلاکت بترتیب ۱۷۶ و ۱۱۰ میکرون گزارش شد در حالی که در گروه کنترل ۱۰۴ و ۷۰ میکرون گزارش گردید. در کشت طولانی مدت تر در فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه فقط در گروه تیمار شده با ۱۰٪ فاکتورهای رشد پلاکتی، اختلاف افزایش اندازه فولیکول ها بین روز ۱۰ و ۲۰ معنی دار بود. در مطالعه ایی مشخص شد که استفاده از فاکتور رشد bFGF در تکوین فولیکول های انسانی جدا شده از بافت تخمدان تازه باعث افزایش اندازه فولیکول ها به ۱۳۳ میکرون گردید در صورتی که در گروه کنترل این افزایش اندازه تا ۹۰ میکرون بود.

در مطالعه حاضر ۱۰٪ پلاسمای غنی از پلاکت همچنین باعث افزایش میزان زنده مانی فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه و یخ گشایی شده گردید. بطوری که میزان زنده مانی فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه و یخ گشایی شده بترتیب ۹۱٪ و ۸۱٪ در حضور فاکتورهای رشد پلاکتی و ۸۱٪ و ۵۴٪ در عدم حضور فاکتورهای رشد پلاکتی مشاهده شد. با تحلیل و بررسی این نتیجه حاصل شد که فاکتورهای رشد برای تکوین اولیه و زنده مانی فولیکول های تخمدانی ضروری هستند و افزودن ۱۰٪ پلاسمای غنی از پلاکت باید مورد توجه قرار گیرد. این افزایش اندازه احتمالاً بدلیل وجود فاکتورهای رشد مختلفی است که می توانند مراحل اولیه تکوین فولیکولی را حمایت کنند. گزارش Wang و همکاران نیز تائیدی بر افزایش میزان زنده مانی فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه انسانی در حضور فاکتور رشد می باشد بطوریکه افزودن فاکتور رشد به محیط کشت باعث افزایش زنده مانی فولیکول ها از ۱۶٪ به ۷۷٪ شد.

یکی از یافته ها در این پژوهش موثرتر بودن تیمار ۱۰٪ PRP نسبت به استفاده از FBS، HSA، یا ترکیب PRP+FBS بر رشد و زنده مانی فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه و یخ گشایی شده بود. اثرات مثبت PRP نسبت به FBS و HSA بدلیل غنی بودن PRP از فاکتورهای رشد است. با توجه به اثرات مثبت کمتر PRP+FBS نسبت به PRP می توان گفت که در گروه اول میزان فاکتورهای رشدی نصف میزان فاکتورهای رشدی گروه دوم است بنابراین اثرات مثبت تر ۱۰٪ PRP در مقایسه با ترکیب ۵٪ PRP و ۵٪ FBS قابل توجیه است.

در این مطالعه الگوی رشد فولیکول های تخمدانی در محیط های کشت مختلف متفاوت بود بطوریکه فاکتورهای رشد پلاکتی باعث افزایش میزان فولیکول های با "رشد - سریع" گردید. مشاهدات حاکی از آن است که قدرت تکوین فولیکول های تخمدانی بستگی به فاکتورهای رشد موجود در محیط دارد بطوریکه با افزایش فاکتورهای رشد توسط PRP، قدرت تکوین فولیکول ها نیز افزایش یافته و تعداد فولیکول های با "رشد-سریع" افزایش می یابند در حالی که در گروه کنترل تعداد فولیکول های با "رشد - آهسته" بیشتر است. از طرفی بین گروه کنترل و گروه تیمار شده با FBS تفاوت معنی داری از لحاظ میزان توزیع فولیکول ها وجود ندارد و این نشان می دهد که میزان فاکتورهای رشد در محیط کشت باید بحدی برسد تا باعث تفاوت در الگوی رشد فولیکول های تخمدانی شود. این یافته ها با یافته های مطالعه Jing و همکاران هم خوانی دارد که نشان میدهد الگوی رشد فولیکول های ثانویه پرمات بر اساس تغییرات

محیط کشت تغییر می یابد بطوریکه میزان فولیکول های با "رشد - سریع" در محیط کشت حاوی میزان FSH و ۵٪ اکسیژن در صورت عدم وجود فتوئین افزایش می یابد در حالیکه در محیط حاوی فتوئین اصلا فولیکول های با رشد سریع وجود ندارند [۱۸۵].

در این تحقیق میزان رشد و زنده مانی فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه در مقایسه با فولیکول های جدا شده از بافت یخ گشایی شده در مدت زمان یکسان بیشتر بود. همچنین تعداد فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه تقریباً دو برابر تعداد فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده بود. نتایج این تحقیق نشان می دهد که گرچه امکان تکوین فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده وجود دارد اما انجام بافت تخمدان بر تکوین بعدی فولیکول های تخمدانی اثر می گذارد و باعث تاخیر در رشد و کاهش زنده مانی می گردد. علیرغم افزایش اندازه فولیکول ها در گروه جدا شده از بافت تخمدان تازه بعد از گذشت ۱۰ روز در فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده بعد از گذشت ۱۰ روز افزایش قابل ملاحظه ایی در رشد فولیکول ها ملاحظه نشد که دلیل آن می تواند اثرات انجام بافت تخمدان بر تکوین فولیکول های تخمدانی باشد. نتایج تحقیق Ting و همکاران نیز نشان داد که افزایش اندازه فولیکول های ثانویه جدا شده از بافت تخمدان تازه پرمات در مقایسه با فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده دوبرابر بود. بعلاوه سرعت تکوین فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه سریعتر از فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده بود بطوریکه اندازه فولیکول ها در گروه اول به ۱۲۱۱ میکرون در مقایسه با ۵۱۲ میکرون بترتیب بعد از ۴ و ۱۰ هفته کشت رسید. در حقیقت رشد فولیکول ها در گروه یخ گشایی شده در مقایسه با گروه تازه با تاخیر همراه بود بطوریکه فولیکول های جدا شده از بافت یخ گشایی شده حتی بعد از ۱۰ هفته کشت هرگز به اندازه فولیکول های جدا شده از بافت تازه نرسیدند [۳۰].

در مطالعه Telfer و همکاران، رشد فولیکول های پری آنترال گاوی با استفاده از Activin و FSH مشخص گردید که فولیکول های کشت شده در حضور Activin و غلظت ۵۰ نانوگرم/میلی لیتر FSH از سرعت رشد بالاتر و اووسیت سالمی در مقایسه با گروه Activin و غلظت ۱۰۰ نانوگرم/میلی لیتر FSH برخوردارند. اما برعکس مطالعه ما نشان داد که در کشت فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده در هفته دوم در حضور Activin و غلظت ۵۰ نانوگرم / میلی لیتر FSH سلول های تکا بصورت گسسته در اطراف غشاء پایه شکل گرفتند و استفاده از غلظت ۱۰۰ نانوگرم / میلی لیتر FSH باعث تشکیل سلول های تکا بصورت یکپارچه در اطراف غشاء پایه شد. نتایج این مطالعه حاکی از این است که کاهش گنادوتروپین باعث عدم تشکیل سلول های تکا یکپارچه در اطراف فولیکول می گردد و احتمال می رود که علیرغم نیاز به کاهش غلظت FSH در حضور اکتیوین در کشت فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه بدلیل تاثیر انجام بر رشد و تکوین فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده نیاز به غلظت بالاتر FSH می باشد.

تکوین فولیکول های پریموردیال و پرایمری به مرحله پری آنترال در حضور فاکتورهای رشد پلاکتی، روش موثری برای تامین منابع احتمالی مهم اووسیت های بالغ برای حفظ باروری است. در مطالعه ایی توسط Xiao و همکاران امکان دستیابی به اووسیت های متافاز II شایسته از لحاظ تکاملی با روش کشت دو مرحله ای فولیکول های پری آنترال وجود دارد. در این کشت دو مرحله ای ابتدا فولیکول ها از مرحله پری آنترال به آنترال در آلزینات ۵،۰٪ کشت داده می شوند سپس از آلزینات جدا شده و در پلیت های با قدرت اتصال کم بمدت ۴۰ روز کشت داده می شوند [۱۸۶].

نتایج مطالعه حاضر می تواند تکمیل کننده مطالعه Xiao و همکاران باشد بطوریکه اووسیت های شایسته تکاملی از کشت فولیکول های پریموردیال حاصل شوند.

در روش تخمدان مصنوعی یا پیوند فولیکول های تخمدانی نیز نشان داده شده است که فولیکول های پریموردیال و پرایمری نسبت به فولیکول های ثانویه از قدرت تکوین کمتری برخوردار هستند و میزان بازیابی (Recovery rate) آن ها بطور معنی داری کمتر از بازیابی فولیکول های ثانویه می باشد. با توجه به بالاتر بودن میزان بازیابی فولیکول های ثانویه، این فولیکول ها برای پیوند مناسب تر از فولیکول های پریموردیال و پرایمری می باشند و به نظر می رسد فولیکول های پریموردیال و پرایمری به جداسازی و پیوند حساس تر می باشند [ ۱۸۷]. لذا با استفاده از مطالعه حاضر می توان مرحله اول که شامل کشت و تکوین فولیکول های پریموردیال و پرایمری است را در محیط آزمایشگاه انجام داد و سپس فولیکول های ثانویه حاصل را پیوند زد یا حتی می توان بمنظور افزایش کارایی عروق زایی و تکوین فولیکول ها، فولیکول های محصور در داربست آلژینات را قبل از پیوند با فاکتورهای رشد پلاکتی تیمار نمود. بعلاوه براساس مطالعات قبلی در Macaque و انسان که نشان میدهد از اووسیت های استحصال شده از فولیکول های آنترال کوچک امکان تولید بلاستوسیست و تولد زنده وجود دارد، نیازی به کشت فولیکول ها تا مرحله قبل از تخمک گذاری نیز نمی باشد [ ۱۸۸، ۱۸۹].

#### نتیجه گیری:

در تکوین فولیکول های پریموردیال انسانی عوامل مختلفی از جمله اندازه اولیه فولیکول، نوع فولیکول (حاصل از بافت تخمدان تازه یا یخ گشایی شده) و محیط کشت نقش مهمی دارد. رشد و تکوین فولیکول های انسانی در مراحل اولیه نیازمند فاکتورهای رشد می باشد. تیمار محیط کشت با فاکتورهای رشد پلاکتی در طی کشت فولیکول های پریموردیال انسانی جدا شده از بافت تخمدان می تواند منبع مناسبی از فاکتورهای رشدی را فراهم کند که می توانند حمایت کننده بهتری برای رشد و زنده مانی فولیکول های پریموردیال به مرحله پری آنترال باشند. تلفیق کشت فولیکول های پریموردیال و پرایمری با استراتژی کشت برای تکوین فولیکول ها پری آنترال به مرحله آنترال، امیدبخش حفظ باروری در بیماران سرطانی است.

### پیشنهادات:

- با توجه به حصول تعداد بیشتر فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه در مقایسه با بافت تخمدان یخ گشایی شده در جایی که محدودیت هایی در استفاده از پیوند بافت تخمدانی وجود دارد، بهتر است بجای انجماد بافت تخمدان و سپس جدا سازی فولیکول های تخمدانی نسبت به جداسازی فولیکول های تخمدانی از بافت تازه و سپس انجماد فولیکول های جدا شده اقدام نمود.
- بمنظور آسیب کمتر به فولیکول و حفظ بهتر ساختار و انسجام فولیکول های پریموردیال می توان از آنزیم هایی نظیر لیبراز بجای کلاژتاز استفاده نمود.
- بدلیل زیاد بودن افزایش اندازه در فولیکول های انسانی بهتر است از غلظت کمتر آلژینات (۰,۵٪) در هفته دوم کشت فولیکول های پریموردیال و پرایمری استفاده شود یا در طول مدت کشت بمنظور فراهم کردن فضای لازم برای رشد فولیکول های انسانی، از داربست تجزیه شونده فیبرین آلژینات استفاده شود.
- به منظور بررسی تاثیر محیط کشت بر قدرت تکوین فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان تازه بهتر است فولیکول های پریموردیال و پرایمری جدا شده از بافت تخمدان تازه بصورت محصور شده در ژل بهمراه سلولهای تخمدانی به موش پیوند زده شوند و تکوین آن ها بمدت ۲-۳ هفته در شرایط *In vivo* دنبال گردد.
- به منظور بررسی تاثیر قریز بر قدرت تکوین فولیکول های جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی شده بهتر است فولیکول های پریموردیال و پرایمری جدا شده از بافت تخمدان یخ گشایی بصورت محصور شده در ژل بهمراه سلولهای تخمدانی به موش پیوند زده شوند و تکوین آن ها بمدت ۲-۳ هفته در شرایط *In vivo* دنبال گردد.
- بمنظور بررسی تاثیر فاکتورهای رشد تولید شده از فولیکول آنترال بر رشد و زنده مانی فولیکول های پریموردیال و پرایمری بهتر است فولیکول های پریموردیال و پرایمری جدا شده از بافت تخمدان در حضور فولیکول های آنترال کشت داده شوند.

### محدودیت ها :

- در این مطالعه علیرغم پیگیری های مداوم بدلیل عدم همکاری های لازم سازمان های مربوطه، دسترسی به نمونه های انسانی بسیار مشکل بود و محدود بودن تعداد نمونه های ارسالی باعث عدم انجام بررسی های تکمیلی در این زمینه شد.

1. Meiorow D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update*, 2001; 7:534–543.
2. Stroud JS, Mutch D, Rader J, *et al.* Effects of cancer treatment on ovarian function. *Fertil Steril*, 2009; 92:417–427.
3. Donnez J, Dolmans MM. Ovarian tissue freezing: current status. *Fertility, IVF and reproductive genetics*, 2015; 27:222-230.
4. Stern CJ, Toledo MG, Gook DA, *et al.* Fertility preservation in female oncology patients. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics Gynaecology*, 2006; 46:15–23.
5. Azim AA, Costantini-Ferrando M, Oktay K. Safety of fertility preservation by ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins in patients with breast cancer: a prospective controlled study. *Journal of Clinical Oncology*, 2008; 26:2630–2635.
6. Oktay K. Further evidence on the safety and success of ovarian stimulation with letrozole and tamoxifen in breast cancer patients undergoing in vitro fertilization to cryopreserve their embryos for fertility preservation. *Journal of Clinical Oncology*, 2005; 23:3858–3859.
7. Cohen CB. Ethical issues regarding fertility preservation in adolescents and children. *Pediatric Blood Cancer*, 2009; 53:249–253.
8. Gong D, Liu YL, Zheng Z, *et al.* An overview on ethical issues about sperm donation. *Asian Journal of Andrology*, 2009; 11:645–652.
9. Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A, *et al.* Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertility & Sterility*, 2013; 99:1503–1513.
10. Dolmans MM, Marinescu C, Saussoy P, *et al.* Reimplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with acute lymphoblastic leukemia is potentially unsafe. *Blood*, 2010; 116:2908–2914.
11. Dolmans MM, Donnez J, Camboni A, *et al.* IVF outcome in patients with orthotopically transplanted ovarian tissue. *Human Reproduction*, 2009; 24:2778–2787.
12. Nottola SA, Camboni A, Van Langendonck A, *et al.* Cryopreservation and xenotransplantation of human ovarian tissue: an ultrastructural study. *Fertility & Sterility*, 2008; 90:23–32.
13. West ER, Xu M, Woodruff TK, *et al.* Physical properties of alginate hydrogels and their effects on in vitro follicle development. *Biomaterials*, 2007; 28:4439-4448.
14. Faddy MJ, Gosden RG. A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. *Hum Reprod*, 1996; 11:1484–1486.
15. Schmidt KLT, Byskov AG, Andersen, *et al.* Density and distribution of primordial follicles in single pieces of cortex from 21 patients and in individual pieces of cortex from three entire human ovaries. *Hum Reprod*, 2003; 18:1158–1164.
16. Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, *et al.* A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Human Reproduction*, 2008; 23:1151–1158.

17. Abir R, Franks S, Mobberley MA, *et al.* Mechanical isolation and in vitro growth of preantral and small antral human follicles. *Fertility & Sterility*, 1997; 68:682–688.
18. Amorim CA, Langendonck AV, David A, *et al.* Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in vitro culture in a calcium alginate matrix. *Reproductive Biology and Fertility*, 2009; 24:92–99.
19. Kristensen SG, Rasmussen A, Byskov AG, *et al.* Isolation of pre-antral follicles from human ovarian medulla tissue. *Human Reproduction*, 2011; 26:157–166.
20. Rice S, Ojha K, Mason H. Human ovarian biopsies as a viable source of pre-antral follicles. *Human Reproduction*, 2008; 23:600–605.
21. Arunakumari G, Shanmugasundaram N, Rao VH. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*, 2010; 74:884–894.
22. Saraiva MVA, Brito IR, Chaves RN. FSH and LH enhance the development of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Animal Reproduction*, 2012; 9:71–79.
23. Sun J, Li X. Growth and antrum formation of bovine primary follicles in long-term culture in vitro. *Reproductive biology*, 2013; 221–228.
24. Xu J, Lawson MS, Yeoman RR. Fibrin promotes development and function of macaque primary follicles during encapsulated three-dimensional culture. *Human Reproduction*, 2013; 1–14.
25. Hornick JE, Duncan FE, Shea LD, *et al.* Isolated primate primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow in vitro. *Human Reproduction*, 2012; 27:1801–1810.
26. Kreeger PK, Deck JW, Woodruff TK, *et al.* The in vitro regulation of ovarian follicle development using alginate-extracellular matrix gels. *Biomaterials*, 2006; 27:714–723.
27. Paulini F, Melo EO. The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reproduction in Domestic Animals*, 2011; 62:354–361.
28. Hreinsson JG, Scott J, Rasmussen C, *et al.* Growth Differentiation Factor-9 Promotes the Growth, Development, and Survival of Human Ovarian Follicles in Organ Culture. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002; 87:316–321.
29. Vitt UA, Hayashi M, Klein C, *et al.* Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod*, 2000; 62:370–377.
30. Tingen CM, Kiesewetter SE, Jozefik J, *et al.* A macrophage and theca cell-enriched stromal cell population influences growth and survival of immature murine follicles in vitro. *Reproduction*, 2011; 141:809–820.
31. Hornick JE, Duncan FE, Shea LD, *et al.* Multiple follicle culture supports primary follicle growth through paracrine-acting signals. *Reproduction*, 2013; 145:19–32.
32. Rauch C, Feifel E, Amann EM, *et al.* Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. *ALTEX*, 2011; 28:305–316.
33. Palma GA, Argañaraz ME, Barrera AD, *et al.* Biology and biotechnology of follicle development. *The Scientific World Journal*, 2012; 1–14.

34. Anderson RA, McLaughlin M, Wallace WHB, *et al.* The immature human ovary shows loss of abnormal follicles and increasing follicle developmental competence through childhood and adolescence. *Human Reproduction*, 2014; 29:97–106.
35. Fortune JE. The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, 2003; 78:135–163.
36. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 2000; 21: 200– 214.
37. Zeleznik AJ. The physiology of follicle selection: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2004; 2:1-7.
38. Gougeon A: Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Human Reproduction*, 1986; 1:81-87.
39. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Human Reproduction Update*, 2011; 1–19.
40. Findlay JK, Kerr JB, Britt K, *et al.* Ovarian physiology: follicle development, oocyte and hormone relationship. *Anim Reprod*, 2009; 6:16-19.
41. Baerwald AR. Human antral folliculogenesis: what we have learned from the bovine and equine models. *Animal Reproduction*, 2009; 6:20-29.
42. Erickson GF, Shimasaki S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertility & Sterility*, 2001; 76:943-949.
43. Young JM, McNeilly AS. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*, 2010; 140:489–504.
44. Kim JY. Control of ovarian primordial follicle activation. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 2012; 39:10-14.
45. Field S, Dasgupta T, Cummings M, *et al.* Cytokines in Ovarian Folliculogenesis, Oocyte Maturation and Luteinisation. *Molecular Reproduction & Development*, 2014; 81:284–314
46. Livesey EA, Brook CG. Gonadal dysfunction after treatment of intracranial tumours. *Arch Dis Childhood*, 1988; 63:495–500.
47. Wallace WH, Shalet SM, Hendry JH, *et al.* Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood: the radiosensitivity of the human oocyte. *Br J Radiol*, 1989; 62:995–998.
48. Wallace WH, Thomson AB, Saran F, *et al.* Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005; 62:738–744.
49. Chemaitilly W, Mertens AC, Mitby P, *et al.* Acute ovarian failure in the childhood cancer survivor study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006; 91:1723–1728.
50. Andrieu JM, Ochoa-Molina ME. Menstrual cycle, pregnancies and offspring before and after MOPP therapy for Hodgkin's disease. *Cancer*, 1983; 52:435–438.
51. Meirow D, Lewis H, Nugent D, *et al.* Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. *Hum Reprod*, 1999; 14:1903–1907.
52. Oktem O, Oktay K. A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve. *Cancer Res*, 2007; 67:10159–10162.

53. Nicosia S, Matus-Ridley M, Meadows AT. Gonadal effect of cancer therapy in girls. *Cancer*, 1985; 55:2364–2372.
54. Durlinger ALL, Kramer P, Karels B, *et al.* Control of primordial follicle recruitment by anti-mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*, 1999;140:5789–5796.
55. Schover LR. Rates of postcancer parenthood. *J Clin Oncol*, 2009; 27:321–322.
56. Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, *et al.* Monitoring the ovaries after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue: endocrine studies, in vitro fertilization cycles, and live birth. *Fertil Steril*, 2007; 87: 7–15.
57. Blumenfeld Z, von Wolf M. GnRH-analogues and oral contraceptives for fertility preservation in women during chemotherapy. *Human Reproduction Update*, 2008; 14:543–552.
58. Elgindy EA. Gonadotrophin suppression to prevent chemotherapy-induced ovarian damage: a randomized controlled trial. *Obstet. Gynecol*, 2013; 121:78–86.
59. Demeestere I, Brice P, Peccatori FA, *et al.* Gonadotropin-releasing hormone agonist for the prevention of chemotherapy-induced ovarian failure in patients with lymphoma: 1-year follow-up of a prospective randomized trial. *Journal of Clinical Oncology*, 2013; 31:903–909.
60. Loren AW, Mangu PB, Beck LN, *et al.* Fertility preservation for patients with cancer: American society of clinical oncology clinical practice guideline update. *Journal of Clinical Oncology*, 2013; 31:2500–2510.
61. Hadar H, Loven D, Herskovitz P, *et al.* An evaluation of lateral and medial transposition of the ovaries out of radiation fields. *Cancer*, 1994; 74:774–779.
62. Bisharah M, Tulandi T. Laparoscopic preservation of ovarian function: an underused procedure. *American Journal of Obstetric Gynecology*, 2003; 188:367–370.
63. Barahmeh S, Almasri M, Badran O. Ovarian transposition before pelvic irradiation: Indications and functional outcome *Journal of Obstetric Gynecology Research*, 2013; 39:1533–1537.
64. Bedoschi G, Oktay K. Current approach to fertility preservation by embryo cryopreservation. *Fertility & Sterility*, 2013; 99:1496–1502.
65. Roque M, Lattes K, Serra S, *et al.* Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertility & Sterility*, 2013; 9:156–162.
66. Noyes N, Knopman J, Labella P, *et al.* Oocyte cryopreservation outcomes including pre-cryopreservation and post-thaw meiotic spindle evaluation following slow cooling and vitrification of human oocytes. *Fertility & Sterility*, 2010; 94:2078–2082.
67. Cobo A, Garcia-Velasco JA, Domingo J, *et al.* Is vitrification of oocytes useful for fertility preservation for age-related fertility decline and in cancer patients? *Fertility & Sterility*, 2013; 99:1485–1495.
68. Nagy ZP, Chang CC, Shapiro DB, *et al.* The efficacy and safety of human oocyte vitrification. *Seminars in Reproductive Medicine*, 2009; 27:450–455.
69. Noyes N, Porcu E, Borini A. Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. *Reproductive Biomedicine Online*, 2009; 18:769–776.
70. Cobo A, Meseguer M, Remohí J, *et al.* Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Human Reproduction*, 2010; 25: 2239–2246.
71. Chung K, Donnez J, Ginsburg E, *et al.* Emergency IVF versus ovarian tissue cryopreservation: decision making in fertility preservation for female cancer patients. *Fertility & Sterility*, 2013; 99:1534–1542.



72. Prasath EB, Chan ML, Wong WH, *et al.* First pregnancy and live birth resulting from cryopreserved embryos obtained from in vitro matured oocytes after oophorectomy in an ovarian cancer patient. *Human Reproduction*, 2014; 29:276-278.
73. Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, *et al.* Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Human Reproduction Update*, 2006; 12:519–535.
74. Amorim CA, Curaba M, Van Langendonck A, *et al.* Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reproductive Biomedicine Online*, 2011; 23:160–186.
75. Herraiz S, Novella-Maestre E, Rodríguez B, *et al.* Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices. *Fertility & Sterility*, 2014; 101:775–784.
76. Keros V, Xella S, Hultenby K, *et al.* Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Human Reproduction*, 2009; 24:1670–1683.
77. Sanfilippo S, Canis M, Smits J. Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2015; 13:1-7.
78. Pegg, DE. The role of vitrification techniques of cryopreservation in reproductive medicine. *Hum Fertil*, 2005; 8: 231–239.
79. Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod. Biomed. Online*, 2006; 12:779–796.
80. Anchordoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, *et al.* Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*, 1987; 24: 324–331.
81. Isachenko V, Isachenko E, Kreienberg R, *et al.* Human ovarian tissue cryopreservation: quality of follicles as a criteria of effectiveness. *Reprod Biomed Online*, 2010; 20:441–442.
82. Zhang JM, Li LX, Liu XL, *et al.* Sucrose affecting successful transplantation of vitrified-thawed mouse ovarian tissues. *J Assist Reprod Genet*, 2009; 26:137–142.
83. Xiao Z1, Wang Y, Li L *et al.* Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation. *Fertil Steril*, 2010; 94:2323-2328.
84. Talevi R, Barbato V, Mollo V, *et al.* Replacement of sodium with choline in slow-cooling media improves human ovarian tissue cryopreservation. *Reprod Biomed Online*, 2013; 27:381-389.
85. Brito DC, Brito AB, Scalercio SR, *et al.* Vitamin E-analog Trolox prevents endoplasmic reticulum stress in frozen-thawed ovarian tissue of capuchin monkey (*Sapajus apella*). *Cell Tissue Res*, 2014; 355:471-480.
86. Fabbri R, Sapone A, Paolini M, *et al.* Effects of N-acetylcysteine on human ovarian tissue preservation undergoing cryopreservation procedure. *Histol Histopathol*, 2015; 30:725-735.
87. Isachenko V, Todorov P, Isachenko E, *et al.* Long-Time Cooling before Cryopreservation Decreased Translocation of Phosphatidylserine (Ptd-L-Ser) in Human Ovarian Tissue. *PLoS One*, 2015; 10:e0129108.
88. Vanacker J, Luyckx V, Amorim C, *et al.* Should we isolate human preantral follicles before or after cryopreservation of ovarian tissue? *Fertil Steril*, 2013; 99:1363-1368.

89. Camboni A, Van Langendonck J, Donnez J, *et al.* Alginate beads as a tool to handle, cryopreserve and culture isolated human primordial/primary follicles. *Cryobiology*, 2013; 67:64–69.
90. De Vos M, Smitz J, Woodruff TK. Fertility preservation in women with cancer. *Lancet*, 2014; 384:1302–1310.
91. Tan SJ, Lee LJ, Tzeng CR, *et al.* Targeted antiapoptosis activity for ovarian protection against chemotherapy-induced ovarian gonadotoxicity. *Reproductive Biomedicine Online*, 2014; 29:612–620.
92. Li F, Turan V, Lierman S, *et al.* Sphingosine-1-phosphate prevents chemotherapy-induced human primordial follicle death. *Human Reproduction*, 2014; 29:107–113.
93. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, *et al.* Live birth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, 2004; 364:1405–1410.
94. Donnez J, Squifflet J, Van Eyck AS, *et al.* Restoration of ovarian function in orthotopically transplanted cryopreserved ovarian tissue: a pilot experience. *Reproductive Biomedicine Online*, 2008; 16:694–704.
95. Donnez J, Dolmans MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *J Assist Reprod Gene*, 2015; 32:1167–1170.
96. Demeestere I, Simon P, Dedeken L, *et al.* Live birth after autograft of ovarian tissue cryopreserved during childhood. *Human Reproduction*, 2015; 1–3.
97. Imbert R, Moffa F, Tsepelidis S, *et al.* Safety and usefulness of cryopreservation of ovarian tissue to preserve fertility: a 12-year retrospective analysis. *Human Reproduction*, 2014; 29:1931–1940.
98. Stern CJ, Gook D, Hale LG, *et al.* First reported clinical pregnancy following heterotopic grafting of cryopreserved ovarian tissue in a woman after a bilateral oophorectomy. *Human Reproduction*. 2013; 28:2996–2999.
99. Dolmans MM, Yuan WY, Camboni A, *et al.* Development of antral follicles after xenografting of isolated small human preantral follicles. *Reproductive Biomedicine Online*, 2008; 16:705–711.
100. Labied S, Delforge Y, Munaut C, *et al.* Isoform 111 of vascular endothelial growth factor (VEGF111) improves angiogenesis of ovarian tissue xenotransplantation. *Transplantation*, 2013; 95:426–433.
101. David A, Van Langendonck A, Gilliaux S, *et al.* Effect of cryopreservation and transplantation on the expression of kit ligand and anti-Müllerian hormone in human ovarian tissue. *Human Reproduction*, 2012; 27:1088–1095.
102. Luyckx V, Durant JF, Camboni A, *et al.* Is transplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with advanced-stage breast cancer safe? A pilot study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2013; 30:1289–1299.
103. Luyckx VE, Dolmans MM, Vanacker J. A new step toward the artificial ovary: survival and proliferation of isolated murine follicles after autologous transplantation in a fibrin scaffold. *Fertility & Sterility*, 2014; 10:1149–1156.
104. Fang Li, Volkan Turan, Sylvie Lierman, *et al.* Sphingosine-1-phosphate prevents chemotherapy-induced human primordial follicle death. *Human Reproduction*, 2014; 29:107–113.

105. Soleimani R, Heytens E, Oktay K. Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. *PLoS One*, 2011a; 6:e19475.
106. Lee J, Kim EJ, Kong HS, *et al.* A combination of simvastatin and methylprednisolone improves the quality of vitrified-warmed ovarian tissue after autotransplantation. *Hum Reprod*, 2015; 30:2627-2638.
107. Hormozi M, Talebi S, Zarnani AH, *et al.* 5'-(N-ethylcarboxamido) adenosine improves angiogenesis in transplanted human ovarian tissue. *Fertil Steril*, 2011; 95:1-5.
108. Kawamura K, Cheng Y, Suzukia N, *et al.* Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *PNAS*, 2013; 110:17474-17479.
109. Jadoul P, Donnez J, Dolmans MM, *et al.* Laparoscopic ovariectomy for whole human ovary cryopreservation: technical aspects. *Fertility & Sterility*, 2007; 87:971-975.
110. Nichols-Burns SM, Lotz L, Schneider H, *et al.* Preliminary observations on whole-ovary xenotransplantation as an experimental model for fertility preservation. *Reproductive Biomedicine Online*, 2014; 29:621-626.
111. Campbell BK, Hernandez-Medrano J, Onions V, *et al.* of ovarian function and natural fertility following the cryopreservation and autotransplantation of whole adult sheep ovaries. *Human Reproduction*, 2014; 29:1749-1763.
112. Dittrich R, Lotz L, Fehm T, *et al.* Xenotransplantation of cryopreserved human ovarian tissue--a systematic review of MII oocyte maturation and discussion of it as a realistic option for restoring fertility after cancer treatment. *Fertility & Sterility*, 2015; 103:1557-1565.
113. Telfer EE, McLaughlin M. In vitro development of ovarian follicles. *Seminars of Reproductive Medicine*, 2011; 29:15-23.
114. Eppig JJ, O'Brien MJ. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology Reproduction*, 1996; 54:197-207.
115. Fabbri R, Pasquinelli G, Montanaro L, *et al.* Healthy Early Preantral Follicle Can Be Obtained in a Culture of Frozen-Thawed Human Ovarian Tissue of 32 Weeks. *Ultrastructural Pathology*, 2007; 31:257-262.
116. Hreinsson JG1, Scott JE, Rasmussen C, *et al.* Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002; 87:316-321.
117. Hovatta O, Silye R, Abir R, *et al.* Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Hum Reprod*, 1997; 12: 1032-1036.
118. Lerer-Serfaty G, Samara N, Fisch B, *et al.* Attempted application of bioengineered/biosynthetic supporting matrices with phosphatidylinositol-trisphosphate enhancing substances to organ culture of human primordial follicles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2013; 30:1279-1288.
119. Garor R, Abir R, Erman A, *et al.* Effects of basic fibroblast growth factor on in vitro development of human ovarian primordial follicles. *Fertility & Sterility*, 2009; 91:
120. Kedem A, Fisch B, Garor R, *et al.* Growth Differentiating Factor 9 (GDF9) and Bone Morphogenetic Protein 15 both Activate Development of Human Primordial

- Follicles in Vitro, with Seemingly More Beneficial Effects of GDF9 . *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 2011; 96:1246–1254.
121. Scott JE, Zhang P, Hovatta O, *et al.* Benefits of 8-bromo-guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-br-cGMP) in human ovarian cortical tissue culture. *Reproductive BioMedicine Online*, 2004; 8:319-324.
  122. Kedem A, Hourvitz A, Fisch B, *et al.* Alginate scaffold for organ culture of cryopreserved-thawed human ovarian cortical follicles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2011; 28:761-769.
  123. Li j, Kawamura K , Chenga Y, *et al.* Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *PNAS*, 2010; 107:10281-10284.
  124. McLaughlin M, Kinnell HL, Anderson RA, *et al.* Inhibition of phosphatase and tensin homologue (PTEN) in human ovary in vitro results in increased activation of primordial follicles but compromises development of growing follicles. *Molecular Human Reproduction*, 2014; 20: 736–744.
  125. Yang Y, Chen J, Wu H. The Increased Expression of Connexin and VEGF in Mouse Ovarian Tissue Vitrification by Follicle Stimulating Hormone. *BioMedicine Research International*, 2015; 1-1
  126. Dolmans MM, Michaux N, Camboni A, *et al.* Evaluation of Liberase, a purified enzyme blend, for the isolation of human primordial and primary ovarian follicles. *Human Reproduction*, 2006; 21:413–420.
  127. Vanacker J, Camboni A, Dath C, *et al.* Enzymatic isolation of human primordial and primary ovarian follicles with Liberase DH: protocol for application in a clinical setting. *Fertility & Sterility*, 2011; 96:379–383.
  128. Su YQ, Sugiura K, Eppig JJ: Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Seminars of Reproductive Medicine*, 2009; 27:32-42.
  129. Eppig JJ, Pendola FL, Wigglesworth K, *et al.* Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport. *Biology Reproduction*, 2005; 73:351-357.
  130. Desai N, Alex A, AbdelHafez F, *et al.* Three-dimensional in vitro follicle growth : overview of culture models, biomaterials, design parameters and future directions. *Reproduction Biology Endocrinology*, 2010; 8:
  131. O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biology Reproduction*, 2003; 68:1682–1686
  132. Roy SK, Treacy BJ. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertility & Sterility*, 1993; 59:783–790.
  133. Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, *et al.* Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biology Reproduction*, 2000; 62:1322–1328.
  134. Ksiazkiewicz LK. Recent achievements in in vitro culture and preservation of ovarian follicles in mammals. *Reproduction Biology*, 2006; 6:3–16.
  135. Abir R, Fisch B, Nitke S, *et al.* Morphological study of fully and partially isolated early human follicles. *Fertility & Sterility*, 2001; 75:141–146.
  136. Bissell MJ, Rizki A, Mian IS: Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Current Opinion in Cell Biology*, 2003; 15:753-762.

137. Hwa AJ, Fry RC, Sivaraman A, *et al*: Rat liver sinusoidal endothelial cells survive without exogenous VEGF in 3D perfused co-cultures with hepatocytes. *FASEB Journal*, 2007; 21:2564-2579.
138. Griffith LG, Swartz MA: Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006; 7:211-224.
139. Xu M, Banc A, Woodruff TK, *et al*. Secondary follicle growth and oocyte maturation by culture in alginate hydrogel following cryopreservation of the ovary or individual follicles. *Biotechnology Bioengineering*, 2009; 103:378-386.
140. Shikanov A, Xu M, Woodruff TK, *et al*. Interpenetrating fibrin-alginate matrices for in vitro ovarian follicle development. *Biomaterials*, 2009; 30:5476-5485.
141. Erickson GF, Shimasaki S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil Steril*, 2001; 76:943-949.
142. Heise MK, Koepsel R, McGee EA, *et al*. Dynamic Oxygen Enhances Oocyte Maturation in Long-Term Follicle Culture. *Tissue Engineering Part C*, 2009.
143. Xu M, West E, Shea LD, *et al*: Identification of a stage-specific permissive in vitro culture environment for follicle growth and oocyte development. *Biology Reproduction*, 2006; 75:916-923.
144. Mousset-Simeon N, Jouannet P, Le Cointre L, *et al*. Comparison of three in vitro culture systems for maturation of early preantral mouse ovarian follicles. *Zygote*, 2005; 13:167-175.
145. Roy SK, Greenwald GS. Methods of separation and in-vitro culture of preantral follicles from mammalian ovaries. *Human Reproduction Update*, 1996; 2:236-245.
146. Telfer E. The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. *Theriogenology*, 1996; 45:101-110.
147. Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Seminars of Cancer Biology*, 2005; 15:378-386.
148. Hovatta O, Wright C, Krausz T, *et al*. Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation. *Human Reproduction*, 1999; 14:2519-2524.
149. Abir R, Roizman P, Fisch B, *et al*. Pilot study of isolated early human follicles cultured in collagen gels for 24h. *Human Reproduction*, 1999; 14:1299–1301.
150. Xu M, Barrett SL, West-Farrell E, *et al*. In vitro grown human ovarian follicles from cancer patients support oocyte growth. *Human Reproduction*, 2009; 24:2531–2540.
151. Wang TR, Yan LY, Yan J. Basic fibroblast growth factor promotes the development of human ovarian early follicles during growth in vitro. *Human Reproduction*, 2014; 1–9.
152. Tagler D, Tu T, Smith RM, *et al*. Embryonic fibroblasts enable the culture of primary ovarian follicles within alginate hydrogels. *Tissue Engineering Part A*, 2012; 18:1229-1238.
153. Ramesh HS, Gupta PS, Nandi.S. Co-culture of Buffalo Large Preantral Follicles with Ovarian Somatic Cells. *Advances in Biological Research*, 2007; 1:29-33
154. Duarte AB, Chaves RN, Araújo VR. Follicular interactions affect the in vitro development of isolated goat preantral follicles. *Zygote*, 2010; 19:215-227.
155. Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, *et al*. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, 2001; 121:647–653.

156. Wang Y, Rippstein PU, Tsang BK. Role and gonadotrophic regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein expression during rat ovarian follicular development *in vitro*. *Biology Reproduction*, 2003; 68:610–619.
157. Saraiva MV, Celestino JJ, Araújo VR, *et al.* Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Zygote*, 2011; 19: 205-214.
158. Wu J, Nayudu PL, Kiesel PS, *et al.* Luteinizing hormone has a stage-limited effect on preantral follicle development *in vitro*. *Biology Reproduction*, 2000; 63:320-327.
159. Ola SI, Ai J, Liu J, *et al.* Effects of gonadotrophins, growth hormone, and activin A on enzymatically isolated follicle growth, oocyte chromatin organization, and steroid secretion. *Molecular Reproduction and Development*, 2008; 75:89-96.
160. Xu M, West-Farrell ER, Stouffer RL, *et al.* Encapsulated three-dimensional culture supports development of nonhuman primate secondary follicles. *Biology Reproduction*, 2009; 81:587-594.
161. Carabatsos MJ, Elvin J, Matzuk MM, *et al.* Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9 deficient mice. *Developmental Biology*, 1998; 204:573–584.
162. Solovyeva EV, Hayashi M, Margi K, *et al.* Growth differentiation factor-9 stimulates rat theca-interstitial cell androgen biosynthesis. *Biology of Reproduction*, 2000; 63:1214–1218.
163. Matos MH, Lima-Verde IB, Luque MC, *et al.* Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote*, 2007; 15:173–182.
164. Combelles CMH, Carabatsos MJ, Kumar TR, *et al.* Hormonal control of somatic cell oocyte interactions during ovarian follicle development. *Molecular Reproduction and Development*, 2004; 69:347–355.
165. Guzel Y, Sahin GN, Sekeroglu M. Recombinant activin A enhances the growth and survival of isolated preantral follicles cultured three-dimensionally in extracellular basement matrix protein (matrigel) under serum-free conditions. *Gynecology Endocrinology*, 2014; 30:388–391.
166. McLaughlin M, Bromfield JJ, Albertini DF, *et al.* Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. *Molecular Human Reproduction*, 2010; 16:644-53.
167. Anitua E, Andia I, Ardanza B, *et al.* Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thrombosis Haemostasis*, 2004; 92:1–12.
168. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, *et al.* Platelet-Rich Plasma: From Basic Science to Clinical Applications. *American Journal of Sports Medicine*, 2009; 37:2259–2263.
169. Callejo J, Salvador C, Gonzalez-Nudez S, *et al.* Live birth in a woman without ovaries after autograft of frozen-thawed ovarian tissue combined with growth factors. *Journal of Ovarian Research*, 2013; 6:1-6.
170. Rajabzadeh AR, Eimani H, Mohseni Koochesfahani H. Morphological study of isolated ovarian preantral follicles using fibrin gel plus platelet lysate after subcutaneous transplantation. *Cell Journal Yakhteh*, 2015; 17:145-152.

171. Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Gadisseux E. Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice. *Reproduction*, 2007; 134:253–262.
172. Vanacker J, Luyckx V, Dolmans MM. Transplantation of an alginateematrigel matrix containing isolated ovarian cells: First step in developing a biodegradable scaffold to transplant isolated preantral follicles and ovarian cells. *Biomaterials xxx*, 2012; 1-7.
173. Kniazeva E, Hardy AN, Boukaidi SA, *et al.* Primordial Follicle Transplantation within Designer Biomaterial Grafts Produce Live Births in a Mouse Infertility Model. *Sci Rep*, 2015; 5:17709.
174. Laronda MM, Jakus AE, Whelan KA, *et al.* Initiation of puberty in mice following decellularized ovary transplant. *Biomaterials*, 2015; 50:20-29.
175. Chiti MC, Dolmans MM, Orellana R, *et al.* Influence of follicle stage on artificial ovary outcome using fibrin as a matrix. *Human Reproduction*, 2015; 1–9.
176. Soares M, Sahrari K, Chiti MC, *et al.* The best source of isolated stromal cells for the artificial ovary: Medulla or cortex, cryopreserved or fresh? *Human Reproduction*, 2015; 30:
177. Soares M, Sahrari K, Amorim CA, *et al.* Evaluation of a human ovarian follicle isolation technique to obtain disease-free follicle suspensions before safely grafting to cancer patients. *Fertil Steril*, 2015;104:672-680.
178. Amorim CA, Dolmans MM, David A, *et al.* Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. *Fertil Steril*, 2012; 98: 1291-1298.
179. Kazemnejad S, Khanmohammadi M, Mobini S, *et al.* Comparative repair capacity of knee osteochondral defects using regenerated silk fiber scaffolds and fibrin glue with/without autologous chondrocytes during 36 weeks in rabbit model. *Cell Tissue Res*, 2016; 364:559-572.
180. Xie X, Wang Y, Zhao C, *et al.* Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration. *Biomaterial*, 2012; 33:7008–7018.
181. Sanfilippo S, Canis M, Ouchchane L, *et al.* Viability assessment of fresh and frozen/thawed isolated human follicles: reliability of two methods (Trypan blue and Calcein AM/ethidium homodimer-1). *J Assist Reprod Genet*, 2011; 28:1151-1156.
182. Lunardi FO, Chaves RN, de Lima LF, *et al.* Vitrified sheep isolated secondary follicles are able to grow and form antrum after a short period of in vitro culture. *Cell Tissue Res*, 2015; 362:241-251.
183. Laronda MM, Duncan FE, Hornick JE, *et al.* Alginate encapsulation supports the growth and differentiation of human primordial follicles within ovarian cortical tissue. *J Assist Reprod Genet*, 2014; 31:1013-1028.
184. Parrott JA, Skinner MK. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. *Mol Reprod Dev*, 2000; 55:55-64.
185. Xu J, Lawson MS, Yeoman RR, *et al.* Secondary follicle growth and oocyte maturation during encapsulated three-dimensional culture in rhesus monkeys: effects of gonadotrophins, oxygen and fetuin. *Hum Reprod*, 2011; 26:1061-1072.
186. Xiao S, Zhang J, Romero MM, *et al.* In vitro follicle growth supports human oocyte meiotic maturation. *Sci Rep*, 2015; 5:1-5.

187. Chiti MC, Dolmans MM, Orellana R, *et al.* Influence of follicle stage on artificial ovary outcome using fibrin as a matrix. *Human Reproduction*, 2015; 1–9.
188. Guzman L, Ortega-Hrepich C, Albuz FK, *et al.* Developmental capacity of in vitro-matured human oocytes retrieved from polycystic ovary syndrome ovaries containing no follicles larger than 6 mm. *Fertility and sterility*, 2012; 98: 503–507.
189. Peluffo MC, Barrett SL, Stouffer RL, *et al.* Cumulus-oocyte complexes from small antral follicles during the early follicular phase of menstrual cycles in rhesus monkeys yield oocytes that reinitiate meiosis and fertilize in vitro. *Biology of reproduction*, 2010; 83:525–532.

Archive of SID



## **ABSTRACT:**

### **Objective:**

The aim of this study was the invitro development of primordial and primary follicles by mimicing in vivo condition for example three dimensional culture and co culture with ovarian cells in the presence of growth factors.

### **Materials and methods:**

Using the scalpel, the ovarian medulla was removed and the cortex was cut into small cubes ( $1 \times 1 \times 1$  mm) by McIlwain Tissue Chopper. Ovaries were washed by 70% alcohol and PBS containing 10% FBS + penicillin and streptomycin . Using the scalpel, the ovarian medulla was removed and the cortex was cut into small cubes ( $1 \times 1 \times 1$  mm) by McIlwain Tissue Chopper. Small human pre-antral follicles and ovarian somatic cells were isolated by ovarian tissue enzymatic digestion including collagenase IA and DNase at  $37^{\circ}\text{C}$  for 50-60 min with gentle agitation. The isolated follicles and ovarian cells were separately embedded in an alginate matrix by  $\text{CaCl}_2$  0.1M and cultured as group in  $\alpha$ -MEM medium supplemented with FSH, ITS, acid ascorbic, and GDF9 in 4 different group including FBS, PRP, FBS+PRP and HSA in the presence of ovarian cells encapsulated in alginate gel.

### **Results:**

The results showed that the growth and viability of isolated follicles from fresh samples were more than follicles isolated from vitrified-warmed ovarian tissues. It was shown that media supplementation with PRP could better support the growth, survival, and growth pattern of human isolated follicles compared to FBS, PRP + FBS and HSA. Although the initial size of follicle were similar, the growth rate of follicles were different even in similar culture condition as they divided into small-growing follicle and fast-growing follicle.

### **Conclusion:**

Media supplementation with PRP during human follicular culture can provide a favorable source of growth factors which can better support the viability and growth of primordial and primary follicles to preantral stage.

### **Keywords:**

ovarian tissue cryopreservation, 3D follicle culture, growth factors, platelet rich plasma



**Name of Research Institute: Avicenna Institute**

**Three dimensional culture of human ovarian cortical follicles with the aim of fertility preservation in cancerous patients**

**Code: 900103-011**

**33-2228**

**Research group: Embryology**

**Principal Investigator (BY):**

**Dr Mohammad Mehdi Akhondi**

**Dr Abolfazl Shirazi**

**Date: Mar 2016**