

Comparison of Survival and Developmental rates of Mouse Ovarian Follicles after Two and Three Dimensional Cultures

Shabnam Abdi¹, Mojdeh Salehnia^{2*}, Saman Hosseinkhani³

1- Ph.D. Candidate, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Associated Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: salehnm@modares.ac.ir

Received: 28/Apr/2013, Accepted: 12/Jul/2013

Abstract

Objective: In vitro ovarian follicle culture provides a tool to investigate folliculogenesis and may be used as an assisted reproductive technology (ART). This study aims to compare survival and development rates in mouse ovarian follicles after two and three dimensional in vitro cultures.

Methods: Preantral follicles were isolated from the ovaries of 14-day old female mice and cultured in α -MEM medium supplemented with 5% FBS for 12 days in a two dimensional and three dimensional culture with different concentrations of sodium alginate (0.25%, 0.5%, or 1%). The follicle diameter, survival and maturation rate during culture were analyzed and compared with one-way analysis of variance (ANOVA). $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results: The mean diameter of preantral follicles that capsulated with 0.5% alginate was significantly higher than other concentrations in each group on days 6 and 12 ($P < 0.001$). The percentages of follicles which released metaphase II (MII) oocytes in the two dimensional groups and in the three dimensional groups at 0.25%, 0.5% and 1% concentrations of sodium alginate were 29.03%, 33.33%, 44.18% and 35.89% respectively. The percentage of MII oocytes was significantly higher at the 0.5% concentration of sodium alginate ($P < 0.001$).

Conclusion: Follicles encapsulated in 0.5% sodium alginate in three dimensional culture displayed the highest survival development and maturation rate.

Keywords: Follicle, Three dimensional, Alginate

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 2, Summer 2013, Pages: 51-63

مقایسه میزان بقا و تکوین فولیکول‌های تخمدان موش پس از کشت دو بعدی و سه بعدی

شبنم عبدی^۱، مژده صالح نیا^{۲*}، سامان حسینخانی^۳

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

Email: salehnim@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۲/۰۲/۰۹

پذیرش مقاله: ۹۲/۰۴/۲۲

چکیده

هدف: کشت فولیکول‌های تخمدان در شرایط آزمایشگاهی روشی را برای بررسی فولیکولوژنز فراهم می‌کند و ممکن است در روش‌های کمک باروری استفاده شود. هدف از این مطالعه مقایسه میزان بقا و تکوین در فولیکول‌های تخمدان موش پس از کشت سه بعدی و دو بعدی در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها: فولیکول‌های پره آنترال از تخمدان‌های موش ماده ۱۴ روزه جدا شدند و در محیط کشت α -MEM حاوی ۵ درصد سرم جنین گاوی به مدت ۱۲ روز به روش دو بعدی و سه بعدی با غلظت‌های مختلف سدیم آلزینیت (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد) کشت داده شدند. در طول دوره کشت قطر فولیکول‌ها، میزان بقا و بلوغ با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل و مقایسه و $P < 0/05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج: میانگین قطر فولیکول‌هایی که با غلظت ۰/۵ درصد سدیم آلزینیت کپسوله شده بودند، در روز ششم و دوازدهم به طور معنی‌دار بیشتر از بقیه گروه‌ها بود ($P < 0/001$). درصد تشکیل تخمک متافاز دو در گروه کشت دو بعدی و در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد سدیم آلزینیت در کشت سه بعدی به ترتیب ۲۹/۰۳، ۳۳/۳۳، ۴۴/۱۸ و ۳۵/۸۹ درصد بود. درصد تخمک‌های متافاز دوم در فولیکول‌های کشت شده در غلظت ۰/۵ درصد سدیم آلزینیت بالاتر بود ($P < 0/001$). نتیجه‌گیری: فولیکول‌های کپسوله شده با غلظت ۰/۵ درصد سدیم آلزینیت در کشت سه بعدی بالاترین میزان بقا، تکوین و بلوغ را نشان دادند.

کلیدواژگان: فولیکول، سه بعدی، آلزینیت

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، صفحات: ۵۱-۶۳

مقدمه

امروزه رشد و تکوین فولیکول‌های جدا شده از تخمدان و بلوغ تخمک‌ها در شرایط آزمایشگاهی یکی از روش‌های جدید است که در تکنولوژی کمکی تولید مثل (Assisted Reproductive Technology) به کار گرفته می‌شود [۱، ۲]. علاوه بر این؛ کشت فولیکول‌ها در شرایط آزمایشگاهی برای مطالعه فرآیند تکوین فولیکول‌ها، مکانیسم فولیکولوژنز

جدید است که در تکنولوژی کمکی تولید مثل (Assisted Reproductive Technology) به کار گرفته می‌شود [۱، ۲]. علاوه بر این؛ کشت فولیکول‌ها در شرایط آزمایشگاهی برای مطالعه فرآیند تکوین فولیکول‌ها، مکانیسم فولیکولوژنز

بقای فولیکول در کشت دو بعدی و سه بعدی

تخمندان در گونه‌های مختلف صورت گرفته است و تولد زنده پس از کشت دو بعدی فولیکول پره آنترال (Preantral Follicle) موش در شرایط آزمایشگاهی گزارش شده است [۱۳-۱۵]، با این وجود درصد موفقیت آن پایین است. به همین دلیل در سال‌های اخیر محققین تلاش خود را در راستای افزایش نرخ تکوین فولیکول‌ها در سیستم‌های کشت سه بعدی متمرکز کرده‌اند.

در سیستم کشت سه بعدی (کروی) که اولین بار توسط اوزبرن و نیودو (Osborn & Nayudu) ارائه شد [۱۶]، ساختار کروی و ارتباط فیزیولوژیکی درون فولیکول‌ها به خوبی حفظ می‌شود. علاوه بر این؛ عوامل اتوکرین و پاراکرین تشریح شده از سلول‌های گرانولوزا در نزدیکی تخمک باقی می‌ماند و باعث تأثیرگذاری بیشتر این عوامل بر تکوین فولیکول‌ها می‌شود. سیستم‌های کشت سه بعدی به گونه‌ای طراحی شده‌است که از مهاجرت سلول‌های گرانولوزای اطراف تخمک و چسبیدن این سلول‌ها به کف ظرف کشت جلوگیری شود. به همین منظور بعضی محققین از روش‌های مختلفی مانند جابه‌جایی روزانه فولیکول‌ها، لوله‌های چرخان، قطره آویزان و کپسوله کردن با هیدروژل (Hydrogel) استفاده می‌کنند. در روش کپسوله کردن فولیکول‌ها در ماتریکس سه بعدی مشابه محیط تخمدان قرار می‌گیرند [۱۷-۱۹]. اما یکی از چالش‌های مهم در کپسوله کردن فولیکول‌های تخمدان انتخاب مواد زیستی مناسب است.

یکی از هیدروژل‌هایی که به‌طور وسیعی در مهندسی بافتی کاربرد دارد آلژینیت (Alginate) است. آلژینیت نوعی پلیمری طبیعی است که توسط جلبک قهوه‌ای تولید می‌شود و از پلیمرهای اسید گلوکورونیک (a-L-Guluronic acid) و اسید مانورونیک (b-D-Mannuronic acid) تشکیل شده است و پس از پیوند در حضور کلسیم، هیدروژل آلژینیت را بدون نیاز به مواد شیمیایی، نور یا دما تشکیل می‌دهد [۲۰-۲۲]. مطالعات مختلف نشان داده است که کشت فولیکول پره آنترال با هیدروژل آلژینیت می‌تواند تخمک‌هایی با قابلیت لقاح تولید

(Folliculogenesis) و بررسی آثار سمی ترکیبات و داروها روی رشد فولیکول‌ها کاربرد دارد.

سیستم‌های کشت مختلفی با توجه به اندازه فولیکول‌های جدا شده از تخمدان و براساس اهداف مطالعه معرفی شده است تا بتوانند درجات مختلفی از تکوین فولیکول و سلول‌های سوماتیک (Somatic Cells) همراه آن را حفظ کرده و رشد دهند [۳-۵]. به‌طور کلی برحسب ریخت‌شناسی (Morphology) کشت، روش‌های کشت فولیکول‌های جدا شده را می‌توان به صورت زیر تقسیم کرد: سیستم کشت دو بعدی (غیر کروی)، در این سیستم ساختمان کروی فولیکول‌ها حفظ نمی‌شود و فولیکول‌ها به کف ظرف کشت می‌چسبند و ساختار پشته‌ای تشکیل می‌دهند و دیگری سیستم کشت سه بعدی (کروی) که در این سیستم کشت ساختار کروی فولیکول حفظ می‌شود [۶-۸].

فولیکولوژنز در تخمدان شامل فرآیندهای تکوینی است که توسط عوامل اندوکرینی (Endocrine)، پاراکرینی (Paracrine) و اتوکرینی (Autocrine) و ارتباطات بین سلول با سلول یا سلول با ماتریکس تنظیم و حفظ می‌شود [۹، ۱۰]. محققین مختلفی به بررسی سیستم کشت دو بعدی فولیکول‌ها پرداخته‌اند [۱۱، ۱۲]. هدف از سیستم کشت دو بعدی حمایت از رشد تخمک است، به‌طوری که دریافت مواد مغذی، هورمون‌ها و گازها در این ساختار به آسانی صورت می‌گیرد به همین دلیل میزان حیات تخمک افزایش می‌یابد. اما در سیستم کشت دو بعدی سلول‌های گرانولوزا (Granulosa Cells) غشای پایه خود را پاره می‌کنند و از تخمک فاصله می‌گیرند، در نتیجه اتصالات بین سلول با سلول و سلول با ماتریکس از بین می‌رود و در تبادل مواد متابولیکی اختلال ایجاد می‌شود و منجر به رشد و تمایز ناهماهنگ سلول‌های گرانولوزا و تخمک می‌شود. علاوه بر این؛ کشت دو بعدی برای فولیکول‌های تخمدان گونه‌های بزرگ‌تر مانند گاو و انسان نامناسب است و مانع از تکوین فولیکول می‌شود، زیرا حفظ ارتباط بین تخمک و سلول‌های فولیکولی در این شرایط مشکل و سخت است. تاکنون مطالعات متعددی در زمینه کشت دو بعدی فولیکول‌های

کند [۲۳-۲۵].

(α -Minimal Essential Medium) (Gibco، آمریکا) حاوی ۵ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) (Gibco، آمریکا) قرار داده شد. به کمک سوزن سرنگ انسولین بافت‌های اضافی اطراف تخمدان برداشته شد و تخمدان‌ها پس از شستشو در محیط کشت تا زمان جداسازی فولیکول‌ها در انکوباتور نگهداری و در زمان‌های مختلف بررسی شدند.

جداسازی فولیکول‌های پره آنترال

در این تحقیق برای جداسازی فولیکول‌ها از روش مکانیکی که ساختمان فولیکول‌ها دست نخورده باقی می‌ماند استفاده شد. با کمک نوک سوزن ۲۹G متصل به سرنگ انسولین ۱ میلی‌لیتری در زیر بزرگنمایی ۲۵ استرومیومیکروسکوپ (Olympus، ژاپن) عمل جداسازی فولیکول‌ها انجام گرفت. پس از جداسازی، فولیکول‌هایی که دارای تخمک مرکزی با ۲-۳ لایه سلول گرانولوزا و سلول‌های تکا (Theca Cells) در اطراف با قطر ۱۵۰ میکرومتر انتخاب شدند. فولیکول‌های جدا شده پس از شستشو در محیط کشت برای کپسوله کردن با ژل هیدروژل سدیم آلژینیت با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد و کشت دو بعدی آماده شدند.

کشت سه بعدی فولیکول پره آنترال

برای آماده‌سازی هیدروژل آلژینیت در ابتدا سدیم آلژینیت (Sigma، آمریکا) با غلظت ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد با PBS (Phosphate Buffer Saline) ترکیب شد و سپس برای از بین بردن ناخالصی‌های آلژینیت با ۰/۵ گرم زغال فعال شده به ازای هر گرم از پودر سدیم آلژینیت مخلوط شد و پس از فیلتر شدن با فیلتر میلی‌پور ۰/۲۲ میکرومتر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال نگهداری شد.

برای کپسوله کردن فولیکول‌های پره آنترال در ابتدا فولیکول‌های پره آنترال جدا شده از تخمدان به طور جداگانه به قطره ۵ میکرولیتری سدیم آلژینیت با غلظت‌های مختلف منتقل شدند و سپس برای ایجاد پیوندهای کلسیم و تشکیل هیدروژل،

خواص فیزیکی هیدروژل یکی از مهم‌ترین عواملی است که می‌تواند بر فرآیندهای مانند پرولیفراسیون سلولی (Cell Proliferation) و تولید عوامل رشد و ماتریکس خارج سلولی تأثیر بگذارد. در نتیجه غلظت‌های استفاده شده برای هیدروژل آلژینیت باید به گونه‌ای باشد که اجازه تبادل مواد غذایی، هورمون‌ها و اتساع فولیکول را بدهد. در همین زمینه برای تعیین بهترین غلظت هیدروژل آلژینیت برای کشت فولیکول مطالعات متفاوتی در گونه‌های پستانداران انجام شده است. به عنوان مثال ایکسیو (Xu) در سال ۲۰۰۶ طی مطالعه‌ای فولیکول‌های پره آنترال موش را با غلظت ۰/۲۵ درصد هیدروژل آلژینیت کشت داد و نتیجه گرفت این غلظت تأثیر مثبتی بر حیات و قدرت بلوغی و باروری تخمک دارد [۲۶]. در مطالعه دیگر ارین (Erin) و همکاران در سال ۲۰۰۷ از غلظت‌های ۳، ۱/۵ و ۰/۷ درصد هیدروژل آلژینیت برای کشت فولیکول استفاده کردند. آن‌ها دریافتند که میزان حیات، میزان تشکیل حفره آنترال و درصد تخمک‌های بالغ در غلظت ۰/۷ درصد بیشتر از سایر غلظت‌ها است [۲۱]. با توجه به نتایج مختلفی که تاکنون ارائه شده است، در این تحقیق علاوه بر مقایسه کشت دو بعدی و سه بعدی کشت فولیکول‌ها، اثر غلظت‌های مختلف سدیم آلژینیت را بر رشد، تکوین و قابلیت بلوغ فولیکول‌های پره آنترال جدا شده از تخمدان موش نابالغ در محیط کشت بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه تخمدان‌ها

در این تحقیق از موش‌های نابالغ سوری ماده نژاد NMRI (National Medical Research Institute) با سن ۱۲ تا ۱۴ روز که تخمدان آن‌ها اغلب حاوی فولیکول‌های پره آنترال بود، استفاده شد. موش‌های فوق به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی قطع نخاع شدند. با ایجاد شکاف طولی در ناحیه شکم تخمدان‌های آن‌ها از بدن خارج و در محیط کشت α -MEM

محیط کشت

در هر دو روش از کشت فولیکول‌ها از محیط کشت α -MEM تکمیل شده با ۱ درصد ITS (Insulin- Transferin- Selenite) (Gibco، آمریکا)، ۱۰۰ واحد بین‌المللی / میلی‌لیتر (IU/ml) پنی‌سیلین (Penicillin) (Gibco، آمریکا)، ۱۰۰ میکروگرم / میلی‌لیتر استرپتومایسین (Streptomycin) (Gibco، آمریکا)، ۱۰۰ rFSH mIU/ml (recombinant Follicle Stimulating Hormone) (Serono، سوئیس)، ۵ درصد سرم FBS و ۱۰ نانوگرم / میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمی (recombinant Epidermal Growth Factor: rEGF) (Sigma، آلمان) استفاده شد. مدت مصرف محیط کشت مزبور در شرایط ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد یخچال تا یک هفته بود. فولیکول‌ها به مدت ۱۲ روز در داخل انکوباتور مرطوب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند و نیمی از محیط کشت یک روز در میان با محیط تازه تعویض شد.

اندازه‌گیری قطر فولیکول‌ها

قطر فولیکول‌ها در کشت دو بعدی تا روز چهارم ارزیابی شد، زیرا از این روز به بعد به علت جدا شدن سلول‌های تکا و گرانولوزا و به وجود آمدن حالت نامنظم در فولیکول‌های تحت کشت، امکان اندازه‌گیری یکسان میسر نبود. اما در کشت سه بعدی به دلیل این‌که فولیکول‌ها، شکل کروی را حفظ می‌کنند بررسی در روزهای دوم، ششم و دوازدهم انجام شد. قطر فولیکول‌ها توسط میکرومتر چشمی از پیش کالیبره شده با بزرگنمایی ۱۰۰ میکروسکوپ و با محاسبه میانگین دو قطر عمود بر هم برحسب میکرومتر تعیین شد.

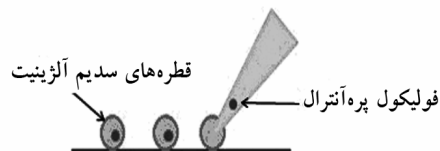
ارزیابی تغییرات ریخت‌شناختی و ارزیابی میزان

بقای فولیکول‌ها

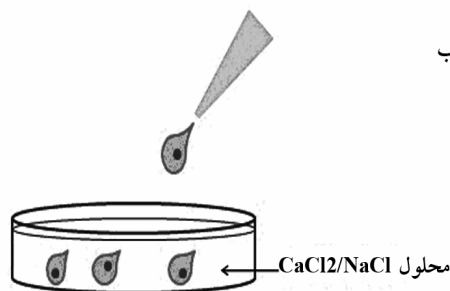
میزان بقای فولیکول‌ها یک روز در میان در حین کشت زیر میکروسکوپ معکوس (Olympus IX، ژاپن) در همه گروه‌ها

هیدروژل، قطره‌های حاوی فولیکول با استفاده از سر میکروپیپت به حمام کلسیم که ترکیبی از ۱۴۰ میلی‌مول $CaCl_2$ (Merck، آلمان) و ۵۰ میلی‌مول $NaCl$ (Merck، آلمان) بود منتقل شدند و پس از ۲ دقیقه قطره‌های هیدروژل آلژینیت از حمام کلسیمی جمع‌آوری و در محیط کشت شستشو داده شد. سپس فولیکول‌های کپسوله شده توسط میکروسکوپ ارزیابی شدند و فقط فولیکول‌هایی که در مرکز هیدروژل قرار داشتند برای کشت انتخاب شدند. سپس هر فولیکول کپسوله شده به درون قطره‌های ۴۰ میکرولیتری از محیط کشت در زیر روغن در پلیت‌های ۹۶ خانه برای کشت منتقل شدند (شکل ۱).

الف



ب



شکل ۱ روش کپسوله کردن فولیکول‌ها با هیدروژل سدیم آلژینیت؛ (الف) طریقه گذاشتن فولیکول‌های پره‌آنترال با استفاده از سر سمپلر در قطره‌های سدیم آلژینیت، (ب) رهاسازی قطره‌های سدیم آلژینیت حاوی فولیکول‌ها در محلول کلسیم

کشت دو بعدی فولیکول‌ها

فولیکول‌های پره‌آنترال بلافاصله پس از جدا شدن از بافت تخمدان به طور جداگانه در داخل چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ خانه در قطره‌های ۴۰ میکرولیتری از محیط کشت در زیر روغن منتقل شدند.

بین‌المللی / میلی لیتر hCG (human Chorionic Gonadotropin) (Organon، آمریکا)، ۱۰ نانوگرم / میلی لیتر EGF (Epidermal Growth Factor) منتقل شدند. به طوری که ۱۸ ساعت بعد، تخمک‌های بالغ متافاز دو جمع‌آوری و شمارش شدند. در پایان این مرحله تعداد و درصد تکوین تخمک بررسی و ثبت شد.

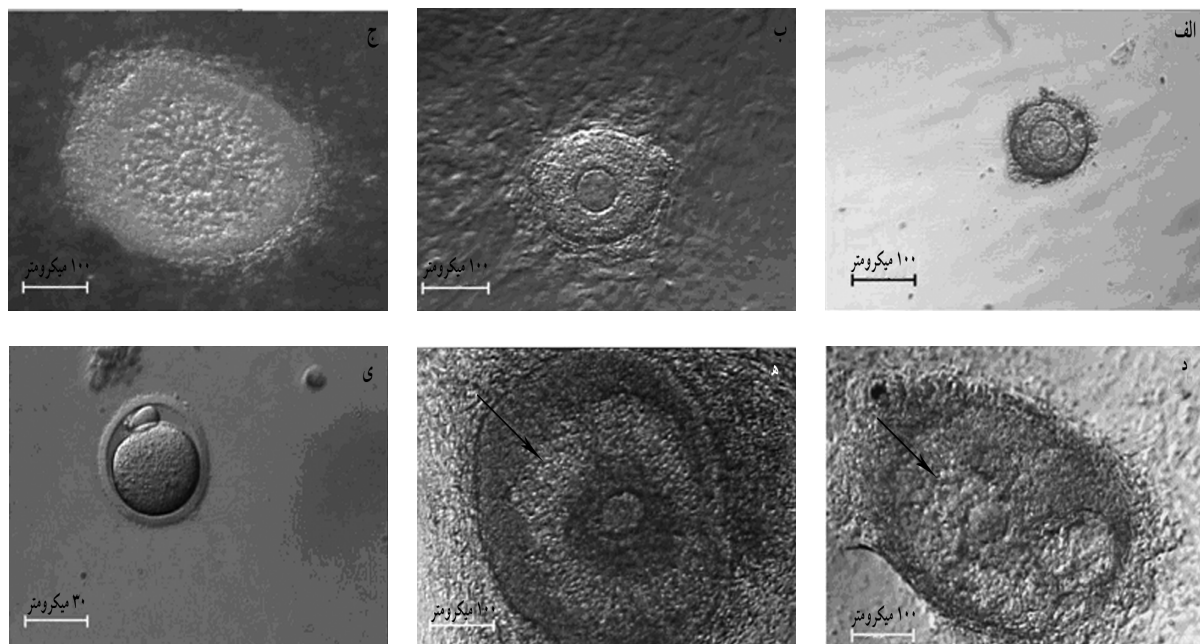
بررسی و محاسبه شد. در طول کشت آزاد شدن زودرس تخمک، تیره رنگ شدن سلول‌های فولیکول و توقف رشد به عنوان فولیکول دژنره در نظر گرفته شد. همچنین در پایان روز دهم کشت تشکیل حفره آنتروم (Antrum) در فولیکول‌ها ارزیابی و درصد آن نسبت به فولیکول‌های زنده محاسبه و مقایسه شد.

بررسی آماری

تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام گرفت. تغییرات قطر فولیکول، میزان بقا، دژنراسیون، تشکیل آنتروم و تخمک‌های MII به دست آمده با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way Analysis of Variance: ANOVA) در بین گروه‌ها سنجیده شد. از نظر آماری در آزمون‌های فوق $P < 0/05$ معنی‌دار محسوب شد.

الفای تخمک‌گذاری

در روز دوازدهم در سیستم کشت سه بعدی ابتدا فولیکول‌ها با اضافه کردن ۵ میلی‌گرم EGTA (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid) (Merck، آلمان) به محیط کشت به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباتور از هیدروژل خارج شدند. سپس برای الفای تخمک‌گذاری فولیکول‌ها در هر دو سیستم کشت دو بعدی و سه بعدی به محیط حاوی ۱/۵ واحد



شکل ۲ ساختار بافتی فولیکول‌های پره آنترال جدا شده از تخمدان موش در طول کشت دو بعدی؛ فولیکول پره آنترال با تخمک گرد و مرکزی و دو لایه سلول‌های گرانولوزا با غشای پایه سالم (فلش) در روز اول کشت (الف)، فولیکول‌ها در روز دوم کشت (ب) و در روز چهارم کشت (پ) ساختار کروی خود را از دست می‌دهند و سلول‌های گرانولوزا پس از تکثیر و پاره کردن غشای پایه به سمت اطراف فولیکول گسترش پیدا می‌کند و سلول‌های تک‌لایه‌ای در زیر فولیکول ایجاد می‌کنند و فولیکول به کف ظرف می‌چسبند. حفره آنترال (فلش قرمز) در روز هشتم (ج) و دوازدهم (د) دیده می‌شود و پس از ۱۸ ساعت مجاورت با hCG از فولیکول کشت شده تخمک بالغ (ه) رها می‌شود.

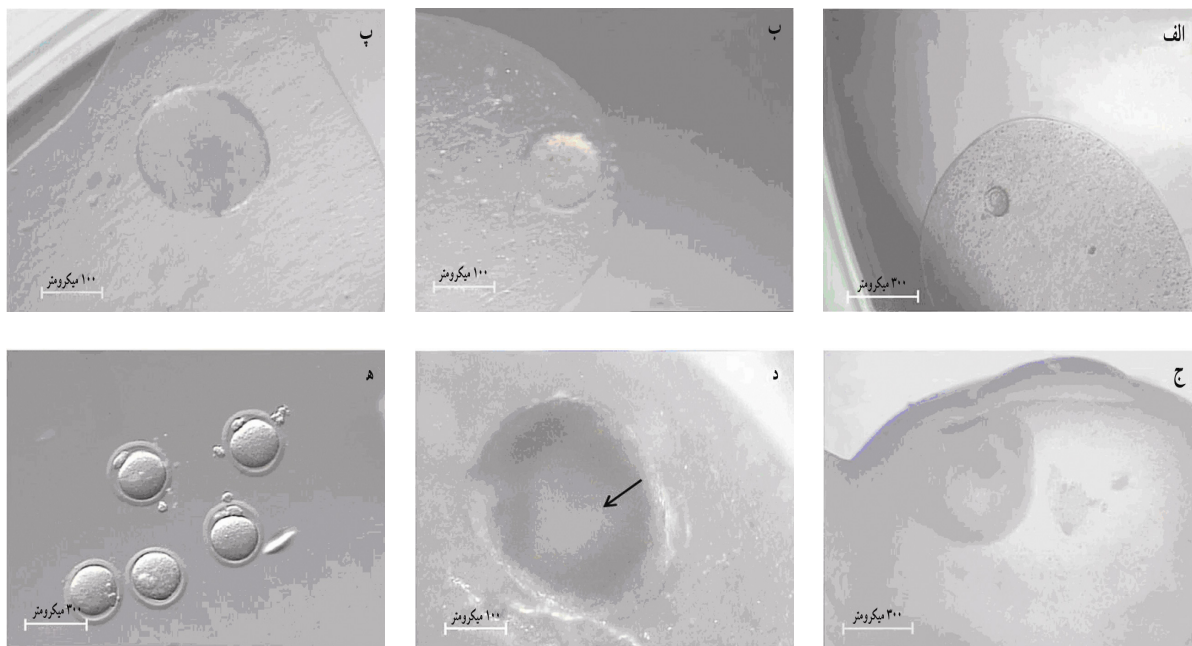
نتایج

ساختار بافتی فولیکول‌ها در طول دوره کشت

در روز دوم کشت دو بعدی فولیکول‌ها در اثر رشد و تکثیر سلول‌های تکا و گرانولوزا و با چسبیدن این سلول‌ها به کف ظرف کشت بی‌حرکت شدند (شکل ۲ الف و ب). از روز چهارم به بعد سلول‌های گرانولوزا با پاره کردن غشای پایه، به سمت اطراف فولیکول گسترش پیدا کردند و پهن شدند و به فولیکول شکل نامنظمی دادند (شکل ۲ ج). از روز ششم الی هشتم کشت در اطراف تخمک حفرات آنتروم پدیدار شد و در روز دوازدهم حفره آنترال به حداکثر رشد خود رسید که به وضوح در تصویر مشاهده

بقای فولیکول در کشت دو بعدی و سه بعدی

می‌شود (شکل ۲ د-ج). اما در سیستم کشت سه بعدی از روز اول کشت فولیکول‌ها کپسوله شده ساختار کروی خود را حفظ کردند و در داخل محیط کشت شناور بودند (شکل ۳ الف-ب). در طول دوره کشت در نتیجه پرولیفراسیون و تکوین سلول‌های گرانولوزا و تکا، تخمک مرکزی به راحتی قابل مشاهده نبود و اندازه فولیکول افزایش یافت (شکل ۳ پ) و در روز دوازدهم مشابه کشت دو بعدی حفره آنترال تشکیل شد که به صورت فضایی خالی در تصویر دیده می‌شود که مشابه حفرات آنتروم در فولیکول‌های تکوین یافته در شرایط درونی بدن (In vivo) بود (شکل ۳ ج-د). در غلظت‌های مختلف سدیم آلزینیت تفاوت خاصی در ریخت‌شناسی فولیکول‌ها مشاهده نشد.

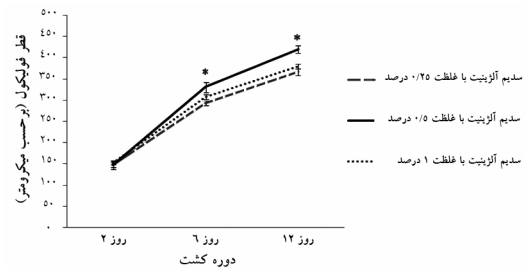


شکل ۳ ریخت‌شناسی فولیکول‌های پره آنترال جدا شده از تخمدان موش در طول کشت سه بعدی؛ فولیکول پره آنترال کپسوله شده با هیدروژل سدیم آلزینیت (الف)، روز دوم (ب) و چهارم کشت (ج) فولیکول در مرحله آنترال در روز آخر کشت (پ) فولیکول ساختار کروی خود را حفظ کرده و با رشد و تکثیر سلول‌های فولیکولاری سایز فولیکول افزایش می‌یابد. فولیکول در مرحله آنترال (د) در روز آخر کشت و فولیکول آنترال با بزرگنمایی بیشتر (حفره آنترال با فلش قرمز رنگ نشان داده شده است) و تخمک‌های بالغ (ه) پس از ۱۸ ساعت اضافه کردن hCG در تصویر دیده می‌شود.

میزان رشد فولیکول‌های کشت شده

مقایسه قطر فولیکول‌های پره آنترال کپسوله شده با

غلظت‌های مختلف سدیم آلزینیت در روز دوم و ششم و دوازدهم در شکل ۴ آورده شده است. در طول کشت دو بعدی و سه بعدی قطر فولیکول‌ها افزایش یافت.



شکل ۴ تغییرات قطر فولیکول (میکرومتر) در فولیکول‌های کپسوله شده با غلظت‌های مختلف سدیم آلزینیت طی کشت؛ * اختلاف معنی‌دار بین کشت سه بعدی با غلظت ۰/۵ درصد سدیم آلزینیت و سایر گروه‌های مورد مطالعه وجود داشت (P<۰/۰۰۱).

همچنان که نتایج نشان می‌دهد، قطر متوسط فولیکول‌های جدا شده از تخمدان‌ها در روز دوم کشت در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و

۱ درصد سدیم آلزینیت عبارت بود از $12/67 \pm 149/53$ ، $15/70 \pm 148/54$ ، $14/90 \pm 153$ میکرومتر و در روز ششم کشت، به ترتیب $17/97 \pm 293$ ، $18/72 \pm 330$ ، $15/58 \pm 307$ و در روز دوازدهم به ترتیب $19/77 \pm 367/18$ ، $20/51 \pm 419/07$ و 2 ± 379 میکرومتر؛ به طوری که افزایش قطر به طور معنی‌داری در غلظت ۰/۵ درصد سدیم آلزینیت در روز ششم و دوازدهم کشت بالاتر از سایر غلظت‌ها بود (P<۰/۰۰۱). قطر فولیکول‌های کشت دو بعدی در روز دوم $192/31 \pm 19/8$ میکرومتر بود و این مقدار در روز چهارم به ترتیب $60/15 \pm 344/31$ میکرومتر بود. قطر فولیکول‌های کشت دو بعدی و سه بعدی با یکدیگر قابل مقایسه نبود.

جدول ۱ تکوین فولیکول‌های کشت شده به مدت ۱۲ روز در گروه‌های مختلف مطالعه

گروه	کشت دو بعدی	کشت سه بعدی	کشت سه بعدی	کشت سه بعدی
غلظت سدیم آلزینیت	۰ درصد	۰/۲۵ درصد	۰/۵ درصد	۱ درصد
تعداد فولیکول	۸۸	۹۵	۹۹	۱۰۱
زنده	SD $70/45 \pm 3/8$	SD $78/94 \pm 3/04$	SD $86/86 \pm 2/7$ **	SD $77/22 \pm 2/7$
تعداد	۶۲	۷۵	۸۶	۷۸
دژنره	SD $29/54 \pm 2/7$ *	SD $21/05 \pm 2/5$	SD $13/13 \pm 2/8$ **	SD $22/77 \pm 3/5$
تعداد	۲۶	۲۰	۱۳	۲۳
تشکیل آنتروم	SD $61/29 \pm 2/7$	SD $65/33 \pm 4/1$	SD $75/58 \pm 2/1$ **	SD $62/82 \pm 1/2$
تعداد	۳۸	۴۹	۶۵	۴۹
تخمک GV	SD $33/87 \pm 3/20$	SD $34/66 \pm 4/6$	SD $27/9 \pm 4/8$	SD $28/20 \pm 3/9$
تعداد	۲۱	۲۶	۲۴	۲۲
تخمک متافاز اول	SD $37/09 \pm 4/4$	SD $32 \pm 2/1$	SD $27/9 \pm 3/20$ **	SD $35/89 \pm 5/3$
تعداد	۲۳	۲۴	۲۴	۲۸
تخمک متافاز دوم	SD $29/03 \pm 2/5$	SD $33/33 \pm 1/9$	SD $44/18 \pm 4/9$ **	SD $35/89 \pm 4/8$
تعداد	۱۸	۲۵	۳۸	۲۸

- تکرار آزمایش‌ها حداقل ۵ بار در هر گروه

* اختلاف معنی‌داری بین کشت دو بعدی و سایر گروه‌های مورد مطالعه وجود داشت (P<۰/۰۰۱).

** اختلاف معنی‌داری بین کشت سه بعدی با غلظت ۰/۵ درصد سدیم آلزینیت و سایر گروه‌های مورد مطالعه وجود داشت (P<۰/۰۰۱).

Germinal Vesicle Stage :GV

بعدی پس از دوازده روز کشت در جدول ۱ بیان شده است. درصد زنده ماندن فولیکول‌های کشت شده دو بعدی و سه بعدی در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد سدیم آلزینیت به ترتیب $70/45$ ، $78/94$ ، $86/86$ و $77/22$ درصد بود. اختلاف معنی‌داری

تکوین فولیکول‌های کشت شده

میزان زنده ماندن، تشکیل آنتروم و بلوغ تخمک‌های حاصل از فولیکول‌های کشت داده شده در سیستم کشت دو بعدی و سه

بقای فولیکول در کشت دو بعدی و سه بعدی

دو بعدی مشاهده می‌شود. در طول دوره کشت دو بعدی فولیکول‌های پره آنترال تخمدانی، سلول‌های گرانولوزا به اطراف تخمک پراکنده می‌شوند و از تخمک فاصله می‌گیرند، در نتیجه آثار تحریکی و بازخوردی بین تخمک و سلول گرانولوزا کاهش می‌یابد. این ارتباطات نقش به‌سزایی در انتقال پیام‌های (Signals) دو طرفه (پاراکراین) یا داخلی (اتوکراین) دارد [27]. در مطالعه‌ای اولیا (Ola) و همکارانش در سال 2008 میزان بقای فولیکول‌های جدا شده از تخمدان موش را 48 درصد و میزان تشکیل حفره آنترال را 38 درصد گزارش کردند [28]. حیدری و همکاران در سال 2008 میزان بقای فولیکول‌های پره آنترال را در کشت دو بعدی 68 درصد گزارش کردند [29].

اما مطالعات اندکی در مورد خواص مکانیکی هیدروژل سدیم آلژینیت در کشت سه بعدی و اثر آن در تکوین و بلوغ فولیکول‌ها صورت گرفته است. در مطالعه حاضر میزان زنده ماندن فولیکول کپسوله شده طی دوره کشت حدود 80 درصد گزارش شد و در غلظت‌های مختلف سدیم آلژینیت تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و درصد زنده ماندن فولیکول‌ها طی دوره کشت بالاتر از نتایج ارائه شده توسط دیگر محققین با به‌کارگیری سیستم‌های کشت سه بعدی بوده است. جین (Jin) و همکاران در سال 2010 فولیکول‌های موش را با استفاده از فیبرین آلژینیت به مدت 12 روز کشت دادند و میزان حیات فولیکول‌ها را 70 درصد ارائه کردند [25]. این نتایج نشان می‌دهد که کپسوله کردن فولیکول‌ها با سدیم آلژینیت آسیبی به فولیکول وارد نکرده است و دکپسوله کردن فولیکول‌ها نیز صدماتی را به فولیکول‌ها وارد نمی‌کند و احتمالاً کپسوله کردن فولیکول‌ها باعث حفظ ساختار اتصالات بین سلول‌ها و غشای پایه سلول‌های گرانولوزا می‌شود و از مرگ فولیکول‌ها جلوگیری می‌کند.

در تحقیق حاضر ارزیابی قطر فولیکول نشان داد که طی تکوین در محیط آزمایشگاه اندازه و قطر فولیکول‌ها در همه گروه‌ها افزایش می‌یابد اما فولیکول‌هایی که با غلظت 0/5 درصد سدیم آلژینیت کپسوله شده بودند افزایش سایز بیشتری نسبت به گروه‌های دیگر در روزهای ششم و دوازدهم داشتند

در درصد زنده ماندن فولیکول‌های کشت شده در سیستم کشت دو بعدی نسبت به هر سه غلظت سدیم آلژینیت در سیستم کشت سه بعدی وجود داشت ($P < 0/001$)، اما تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف سدیم آلژینیت با هم مشاهده نشد.

درصد تشکیل آنتروم در گروه کشت دو بعدی و غلظت‌های 0/25، 0/5 و 1 درصد سدیم آلژینیت در سیستم کشت سه بعدی به ترتیب 41/29، 65/33 درصد، 75/58 درصد و 62/82 درصد بود و بالاترین درصد تشکیل حفره آنترال در غلظت 0/5 درصد سدیم آلژینیت مشاهده شد.

درصد تخمک‌ها در مرحله متافاز دو در گروه کشت دو بعدی و غلظت‌های 0/25، 0/5 و 1 درصد سدیم آلژینیت در سیستم کشت سه بعدی به ترتیب 29/03، 33/33، 44/18 و 35/89 درصد بود. به طوری که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در میزان تشکیل تخمک‌های متافاز دوم در غلظت 0/5 درصد سدیم آلژینیت نسبت به سایر غلظت‌ها مشاهده شد ($P < 0/001$). درصد تخمک‌های بالغ در کشت دو بعدی به طور معنی‌دار پایین‌تر از بقیه گروه‌ها بود ($P < 0/001$).

بحث

در مطالعه حاضر برای اولین بار دو روش کشت فولیکول‌های جدا شده از تخمدان به روش کشت دو بعدی و سه بعدی با غلظت‌های مختلف سدیم آلژینیت با توجه به درصد رشد، بلوغ فولیکول‌ها با یکدیگر مقایسه شد. نتایج این مطالعه نشان داد که فولیکول‌های پره آنترال کپسوله شده با سدیم آلژینیت به خصوص با غلظت 0/5 درصد در سیستم کشت سه بعدی بالاترین درصد میزان بقا و تکوین را در مقایسه با کشت دو بعدی و دیگر غلظت‌های سدیم آلژینیت دارند. درصد پایین میزان بقا و بلوغ فولیکول در کشت دو بعدی را می‌توان این گونه توجیه کرد که رشد فولیکول‌ها وابسته به تغییرات ریخت‌شناختی سلول‌های سوماتیک و گرانولوزا است و هر نوع اختلال در ریخت‌شناسی سلول‌های فولیکولی باعث تأخیر رشد و تکوین فولیکول‌های پره آنترال می‌شود؛ مشابه آنچه که در سیستم کشت

($P < 0/001$). در طول کشت به دلیل رشد تخمک و تکثیر و تمایز سلول‌های گرانولوزا که به صورت شعاعی از مرکز فولیکول شروع می‌شود قطر فولیکول‌ها افزایش می‌یابد.

همچنین فولیکول‌های پره آنترال که با غلظت ۰/۵ درصد با سدیم آلزینیت کپسوله شده‌اند درصد بالایی از تکوین را از طریق افزایش نسبت تخمک متافاز دوم (MII ۴۴ درصد) و میزان تشکیل حفره آنتروم نشان دادند. درباره این نتایج می‌توان با توجه به خواص فیزیکی هیدروژل و تبادل ترکیبات محیط از طریق هیدروژل بحث کرد. خواص مکانیکی هیدروژل به چندین عامل مانند حجم پلیمر و پیوندهای آن وابسته است. هنگامی که غلظت هیدروژل آلزینیت کم می‌شود پیوندهای بین پلیمرهای درون هیدروژل آلزینیت نیز کاهش می‌یابد [۳۰، ۳۱]. در نتیجه هیدروژل به راحتی تغییر شکل می‌دهد و اجازه افزایش قطر و اتساع فولیکول در حین رشد تخمک، پرولیفراسیون سلول‌های گرانولوزا و تکا و تشکیل حفره آنترال را می‌دهد، مشابه آنچه در تخمدان صورت می‌گیرد؛ اما در غلظت‌های بیشتر هیدروژل به فولیکول فشار مکانیکی زیاد وارد می‌شود و باعث القای مرگ سلولی و کاهش میزان تکثیر و تمایز سلول‌های فولیکولی می‌شود.

علاوه بر این؛ هیدروژل سدیم آلزینیت ساختاری مشبک در اطراف فولیکول می‌سازد و از این طریق اجازه انتشار هورمون‌ها و پروتئین‌های اساسی برای تکوین فولیکول را می‌دهد [۳۲، ۳۳]، در نتیجه در غلظت‌های پایین هیدروژل میانگین سایز سوراخ‌های هیدروژل افزایش می‌یابد و از این طریق بر تبادل مواد و ماکرومولکول‌های ضروری برای رشد و بلوغ فولیکول اثر می‌گذارد و سرعت انتقال مواد و عوامل را افزایش می‌دهد. نتایج بررسی حاضر مشابه نتایج ارین در سال ۲۰۰۷ بود؛ آن‌ها طی تحقیقی فولیکول‌های پره آنترال در

غلظت‌های ۳، ۱/۵ و ۰/۷۵ درصد سدیم آلزینیت کشت دادند و به این نتیجه رسیدند که این غلظت ۰/۷۵ باعث افزایش میزان بقا و تکوین تخمک می‌شود [۲۱].

اما برخلاف نتایج بررسی حاضر، مین (Min) و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که کشت فولیکول‌های موش با غلظت ۱/۵ درصد اجازه رشد طبیعی و تکوین فولیکول را می‌دهد. نتایج متفاوت این مطالعه شاید به دلیل کشت فولیکول‌های بزرگ‌تر و کشت کوتاه مدت بوده است [۲۳].

هورنیک (Hornick) در سال ۲۰۱۲ نشان داد که درصد زنده ماندن فولیکول‌ها در فولیکول‌های پره آنترال میمون کپسوله شده با غلظت ۲ درصد سدیم آلزینیت در مقایسه با آن‌هایی که با غلظت ۰/۵ درصد کپسوله شدند بسیار بالاتر بود [۳۴]. این نتایج متفاوت به دلیل نوع گونه مورد مطالعه است زیرا در موش بافت تخمدان نرم‌تر است ولی در میمون و نمونه‌های انسانی تخمدان فیبری‌تر و سفت‌تر است و باید از غلظت بالایی استفاده کرد که مشابه تخمدان در بافت زنده (In vivo) باشد و متناسب با نوع گونه نیز غلظت مورد استفاده برای کشت فولیکول متفاوت است. بنابراین بنا به دلایل ذکر شده، در مطالعه حاضر فولیکول‌های کپسوله شده با غلظت ۰/۵ درصد سدیم آلزینیت تکثیر سلول‌های گرانولوزا را افزایش داد و موجب افزایش بیشتر رشد و بلوغ فولیکول‌ها در مقایسه با سایر غلظت‌های سدیم آلزینیت و کشت دو بعدی شد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پایان نامه دکتری تخصصی گروه علوم تشریح است که با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع

[1] Ksiazkiewicz LK. Recent achievements in in vitro culture and preservation of ovarian follicles

in mammals. *Reprod Biol* 2006; 6(1): 3-16.

[2] Buratini J, Price CA. Follicular somatic cell

- factors and follicle development. *Reprod Fertil Dev* 2011; 23(1): 32-9.
- [3] Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 2003; 78(3-4): 135-63.
- [4] Barboni B, Russo V, Cecconi S, Curini V, Colosimo A, Garofalo ML, Capacchietti G, Di Giacinto O, Mattioli M. In vitro grown sheep preantral follicles yield oocytes with normal nuclear-epigenetic maturation. *PLoS One* 2011; 6(11): e27550.
- [5] Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* 2001; 121(1): 51-75.
- [6] Smits JE, Cortvrindt RG. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction* 2002; 123(2): 185-202.
- [7] Nayudu PL, Fehrenbach A, Kiesel P, Vitt UA, Pancharatna K, Osborn S. Progress toward understanding follicle development in vitro: appearances are not deceiving. *Arch Med Res* 2001; 32(6): 587-94.
- [8] Hovatta O. Mature eggs from primordial follicles in vitro a challenge in the near future. *Duodecim* 2012; 128(8): 889-94.
- [9] Smits J, Cortvrindt R. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction* 2002; 123(2): 185-202.
- [10] Roy SK, Wang C, Mukherjee A, Chakraborty P. In vitro culture of fetal ovaries: a model to study factors regulating early follicular development. *Methods Mol Biol* 2012; 825: 151-71.
- [11] Cortvrindt R, Smits J, Van Steirteghem AC. In-vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. *Hum Reprod* 1996; 11(12): 2656-66.
- [12] Cain L, Chatterjee S, Collins TJ. In vitro folliculogenesis of rat preantral follicles. *Endocrinology* 1995; 136(8): 3369-77.
- [13] Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol Reprod* 2000; 62(5): 1322-8.
- [14] Wang X, Catt S, Pangestu M, Temple-Smith P. Successful in vitro culture of pre-antral follicles derived from vitrified murine ovarian tissue: oocyte maturation, fertilization, and live births. *Reproduction* 2011; 141(2): 183-91.
- [15] Liu J, Van der Elst J, Van den Broecke R, Dhont M. Live offspring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. *Biol Reprod* 2001; 64(1): 171-8.
- [16] Nayudu PL, Osborn SM. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. *J Reprod Fertil* 1992; 95(2): 349-62.
- [17] Pangas SA, Saudye H, Shea LD, Woodruff TK. Novel approach for the three-dimensional culture of granulosa cell-oocyte complexes. *Tissue Eng* 2003; 9(5): 1013-21.
- [18] Kreeger PK, Fernandes NN, Woodruff TK, Shea LD. Regulation of mouse follicle development by follicle-stimulating hormone in a three-dimensional in vitro culture system is dependent on follicle stage and dose. *Biol*

- Reprod 2005; 73(5): 942-50.
- [19] Xu M, West E, Shea LD, Woodruff TK. Identification of a stage-specific permissive in vitro culture environment for follicle growth and oocyte development. *Biol Reprod* 2006; 75(6): 916-23.
- [20] Xu M, Banc A, Woodruff TK, Shea LD. Secondary follicle growth and oocyte maturation by culture in alginate hydrogel following cryopreservation of the ovary or individual follicles. *Biotechnol Bioeng* 2009; 103(2): 378-86.
- [21] West ER, Xu M, Woodruff TK, Shea LD. Physical properties of alginate hydrogels and their effects on in vitro follicle development. *Biomaterials* 2007; 28(30): 4439-48.
- [22] Kreeger PK, Deck JW, Woodruff TK, Shea LD. The in vitro regulation of ovarian follicle development using alginate-extracellular matrix gels. *Biomaterials* 2006; 27(5): 714-23.
- [23] Xu M, Kreeger PK, Shea LD, Woodruff TK. Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring. *Tissue Eng* 2006; 12(10): 2739-46.
- [24] Gomes JE, Correia SC, Gouveia-Oliveira A, Cidadão AJ, Plancha CE. Three-dimensional environments preserve extracellular matrix compartments of ovarian follicles and increase FSH-dependent growth. *Mol Reprod Dev* 1999; 54(2): 163-72.
- [25] Jin SY, Lei L, Shikanov A, Shea LD, Woodruff TK. A novel two-step strategy for in vitro culture of early-stage ovarian follicles in the mouse. *Fertil Steril* 2010; 93(8): 2633-9.
- [26] Xu M, West E, Shea LD, Woodruff TK. Identification of a stage-specific permissive in vitro culture environment for follicle growth and oocyte development. *Biol Reprod* 2006; 75(6): 916-23.
- [27] West ER, Shea LD, Woodruff TK. Engineering the follicle microenvironment. *Semin Reprod Med* 2007; 25(4): 287-99.
- [28] Ola SI, Ai JS, Liu JH, Wang Q, Wang ZB, Chen DY, Sun QY. Effects of gonadotrophins, growth hormone, and activin A on enzymatically isolated follicle growth, oocyte chromatin organization, and steroid secretion. *Mol Reprod Dev* 2008; 75(1): 89-96.
- [29] Haidari K, Salehnia M, Rezazadeh Valojerdi M. The effect of leukemia inhibitory factor and coculture on the in vitro maturation and ultrastructure of vitrified and nonvitrified isolated mouse preantral follicles. *Fertil Steril* 2008; 90(6): 2389-97.
- [30] Bryant SJ, Chowdhury TT, Lee DA, Bader DL, Anseth KS. Crosslinking density influences chondrocyte metabolism in dynamically loaded photocrosslinked poly (ethylene glycol) hydrogels. *Ann Biomed Eng* 2004; 32(3): 407-17.
- [31] Bryant SJ, Anseth KS. Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly (ethylene glycol) hydrogels. *J Biomed Mater Res* 2002; 59(1): 63-72.
- [32] Kong HJ, Smith MK, Mooney DJ. Designing alginate hydrogels to maintain viability of immobilized cells. *Biomaterials* 2003; 24(22): 4023-9.
- [33] Swartz MA, Tschumperlin DJ, Kamm RD, Drazen JM. Mechanical stress is communicated between different cell types to elicit matrix

بقای فولیکول در کشت دو بعدی و سه بعدی

remodeling. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;
98(11): 6180-5.

[34] Hornick JE, Duncan FE, Shea LD, Woodruff TK.

Isolated primate primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow in vitro. Hum Reprod 2012; 27(6): 1801-10.