

Comparison of Morphology and Development of Follicles Derived from Cultured Mouse Ovarian Tissue in Three Methods: Hanging Drop, under Mineral Oil and Insert

Mahboobeh Amoushahi¹, Mojdeh Salehnia^{2*}, Seyed Javad Mola³

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- Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

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

Received: 13/Mar/2015, Accepted: 07/Oct/2015

Abstract

Objective: The present study compared the efficiency of three mouse ovarian tissue culture methods - hanging drop, under mineral oil, and on the insert with regards to improving in vitro ovarian follicular development.

Methods: Ovaries from 7-day-old old female NMRI mice sacrificed by cervical dislocation were collected and cultured in α -MEM medium supplemented with 5% fetal bovine serum for 7 days in 3 groups (hanging drop, under mineral oil and on the insert). We evaluated and compared the morphology and surface area of the ovaries and percentage of normal follicles in all groups. After the 7-day culture, the ovaries cultured on the insert showed better growth compared to the other groups. Their preantral follicles were isolated and cultured for 12 days. We assessed the follicular diameter, survival and maturation rate of these oocytes at the end of the last culture period.

Results: The percentages of normal follicles in cultured ovaries were $73.85 \pm 2.49\%$ (insert), $51.63 \pm 3.93\%$ (hanging drop), and $40.52 \pm 5.86\%$ (mineral oil) after the 7-day culture. The percentage of preantral follicles significantly increased from 2.1 ± 0.44 to 24.5 ± 2.4 in the group cultured on insert ($P < 0.05$), however there was no significant difference in the other groups ($P > 0.05$). There were significantly increased surface areas of the ovarian tissues after the 7-day culture in all groups ($P < 0.05$). Ovaries cultured on the insert had a diameter of isolated follicles after 12 days of culture of $410 \pm 7.07 \mu\text{m}$ and the MII rate was 30.26%.

Conclusion: The ovarian growth and morphology were well preserved in tissues cultured on the insert compared to the other culture methods.

Keywords: Ovarian culture, Insert, Hanging drop, Isolated follicles

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 18 (2015-2016), No.3, Pages: 59-73

مقایسه ریخت‌شناسی و تکوین فولیکول‌های حاصل از کشت بافت تخمدان موش در سه روش قطرات معلق، زیر روغن و روی صفحه کشت سه بعدی

محبوبه عموشاهی^۱، مژده صالح نیا^{۲*}، سید جواد مولی^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- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

Email: salehnm@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۴/۰۷/۱۵

دریافت مقاله: ۹۳/۱۲/۲۳

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه مقایسه کارایی سه روش کشت بافت تخمدان شامل کشت در قطرات معلق، زیر روغن و روی صفحه کشت سه بعدی در راستای بهبود رشد آزمایشگاهی فولیکول‌های تخمدانی بود.

مواد و روش‌ها: تخمدان‌ها از موش‌های سوری نژاد NMRI ماده هفت روزه قطع نخاع گردنی شده، جمع‌آوری و در محیط α -MEM حاوی ۵ درصد سرم جنین گاوی به مدت ۷ روز و در سه گروه شامل قطرات معلق، زیر روغن و روی صفحه کشت سه بعدی کشت شدند. ریخت‌شناسی و مساحت تخمدان و درصد فولیکول‌های طبیعی در سه گروه ارزیابی و مقایسه شد. به‌علت رشد بهتر تخمدان‌ها در گروه کشت روی صفحه کشت سه بعدی نسبت به بقیه گروه‌ها، فولیکول‌های پره آنترال آن‌ها جدا و به مدت ۱۲ روز کشت شدند. سپس در پایان دوره کشت اخیر، میانگین قطر فولیکول، نرخ بقا و بلوغ تخمک‌های حاصل از آن‌ها در طول کشت ارزیابی شد.

نتایج: درصد فولیکول‌های طبیعی پس از ۷ روز کشت در گروه کشت قطرات معلق، زیر روغن و روی صفحه کشت سه بعدی، به ترتیب $۵۱/۶۳ \pm ۳/۹۳$ ، $۴۰/۵۲ \pm ۵/۸۶$ و $۷۳/۸۵ \pm ۲/۴۹$ بود. درصد فولیکول‌های پره آنترال در گروه کشت روی صفحه کشت سه بعدی از $۲/۱ \pm ۰/۴۴$ قبل از کشت به $۲۴/۵ \pm ۲/۴$ پس از کشت افزایش معنی‌داری یافت ($P < ۰/۰۵$) ولی در دو گروه دیگر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. سطح تخمدان‌ها در همه گروه‌ها پس از ۷ روز کشت به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < ۰/۰۵$). در گروه تخمدان‌های کشت شده روی صفحه کشت سه بعدی، میانگین قطر فولیکول‌های جدا شده پس از ۱۲ روز کشت $۴۱۰ \pm ۷/۰۷$ و میزان تخمک متافاز دو $۳۰/۲۶$ درصد بود.

نتیجه‌گیری: کشت روی صفحه کشت سه بعدی هم از حیث رشد تخمدان و هم از حیث ریخت‌شناسی، ساختار و درصد فولیکول‌های پره آنترال در مقایسه با دو گروه دیگر مناسب‌تر بود.

کلیدواژگان: کشت تخمدان، صفحه کشت سه بعدی، قطرات معلق، فولیکول جدا شده

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۴، صفحات: ۵۹-۷۳

مقدمه

می‌شود [۱، ۲]؛ به گونه‌ای که از دو دهه اخیر روش‌های کشت فراوانی برای رشد و بلوغ فولیکول و تخمک در شرایط آزمایشگاهی طراحی شده است [۳-۵]. به‌طور کلی ترکیبی از

رشد فولیکول‌های جدا شده از بافت تخمدان و به دنبال آن بلوغ تخمک‌های به‌دست آمده در شرایط آزمایشگاهی یکی از روش‌هایی است که امروزه در روش‌های کمک باروری استفاده

کشت تخمدان موش

بافت تخمدان معرفی شده است که شامل روش کشت دوبعدی و سه بعدی است. در مطالعات فراوانی از روش کشت دوبعدی برای کشت فولیکول‌ها استفاده شده است که در این روش فولیکول‌های پره آنترال در قطرات کوچک محیط کشت در زیر روغن کشت می‌شوند. اپپیگ (Eppig) و شرودر (Schroeder) توانستند با این روش کشت در گونه موش به تولد زنده دست یابند [۱۷، ۲۲، ۲۳]. با وجود موفقیت‌های به‌دست آمده با روش کشت دو بعدی، مشاهده شده است که این روش کشت برای فولیکول‌های انسان، گوسفند و گاو نامناسب است [۲۴]. نقصی که در این روش کشت وجود دارد این است که فولیکول ساختار کروی خود را از دست می‌دهد و سلول‌های گرانولوزا به کف ظرف کشت می‌چسبند. این مشکل منجر به از بین رفتن اتصالات باز بین سلول‌های گرانولوزا و تخمک می‌شود و پارگی غشا پایه اطراف فولیکول منجر به دور شدن سلول‌های گرانولوزا از اطراف تخمک می‌شود [۲۵، ۲۶]. روش کشت سه بعدی که اولین بار توسط اوزبورن (Osborn) و نایودو (Nayudu) مطرح شد تا حدودی این مشکل را برطرف نموده است [۱۹]. این روش کشت می‌تواند محیط کشت *in vivo* را تقلید کند و مانع از بین رفتن ارتباطات بین سلول‌های گرانولوزا و تخمک شود. در این روش کشت، ریخت‌شناسی (Morphology) کروی فولیکول، ارتباط متقابل سلول با سلول و سلول با ماتریکس خارج سلولی به خوبی حفظ شده و باعث می‌شود که فولیکول بتواند روند بلوغ را به‌طور موفقیت‌آمیزی طی کند [۲۷، ۲۸]. در مطالعات گذشته از روش‌های مختلفی برای کشت سه بعدی فولیکول استفاده شده است که لوله‌های چرخان، کپسوله کردن با هیدروژل و قطرات معلق مثال‌هایی از این قبیل هستند [۲۹-۳۲]. کشت در قطرات معلق نیز نوعی روش کشت سه بعدی محسوب می‌شود که ساختار کروی فولیکول را حفظ می‌کند و میزان بقای فولیکول‌ها در این روش کشت مشابه با روش کپسوله کردن با هیدروژل گزارش شده است؛ اما نرخ بلوغ تخمک در این روش تنها ۱۰ درصد گزارش شده است [۳۳] که بسیار کمتر از روش کپسوله کردن است [۲۹، ۳۱].

فناوری‌های به‌کار گرفته شده برای رشد فولیکول در محیط کشت (In Vitro Growth) و بلوغ تخمک حاصل از آن (In Vitro Maturation) برای کمک به بیماران جوانی که قبل از شیمی‌درمانی و پرتودرمانی (Radiotherapy) که باعث تخریب کامل یا جزئی از ذخیره فولیکولی آن‌ها می‌شود، می‌تواند استفاده شود [۶]. از طرف دیگر؛ روش‌های کشت فولیکولی می‌تواند به‌عنوان ابزاری برای بررسی زیست‌شناسی و مکانیسم اووژنز (Oogenesis) و فولیکولوژنیز (Folliculogenesis) در حیوانات و انسان استفاده شود. فولیکول‌های بدوی جمعیت بزرگی از فولیکول‌های تخمدان را تشکیل می‌دهند و بهبود روش‌های کشت که منجر به فعال شدن و از سرگیری رشد این فولیکول‌ها شود، می‌تواند نقش مهمی در تولید تخمک‌های بالغ و پیشرفت در فناوری تولیدمثل داشته باشد [۷]. رشد فولیکول‌های بدوی که منبع بزرگ و بالقوه‌ای برای تولید تخمک بالغ هستند و برای اهداف بالینی استفاده می‌شوند [۸، ۹]، نیازمند مجموعه‌ای از رویدادها در زمانی نسبتاً طولانی به ویژه در گونه‌های بزرگ‌تر است؛ به طوری که یک فولیکول برای رسیدن به مرحله قبل از تخمک‌گذاری به یک دوره کشت نسبتاً طولانی نیاز دارد [۱۰، ۱۱]. تلاش‌های زیادی در زمینه کشت فولیکول بدوی صورت گرفته است ولی نتایج مطالعات نشان می‌دهد که جداسازی فولیکول‌های بدوی از بافت تخمدان مشکل است [۱۲، ۱۳]. کشت بافت تخمدان نوزاد موش اولین بار توسط بلاندو (Blandau) و همکارانش مطرح شد [۱۴]، سپس یک روش کشت دو مرحله‌ای طراحی شد که در مرحله اول تخمدان‌ها کشت شد و در مرحله دوم برای دستیابی به تخمک، فولیکول‌های پره آنترال جدا و کشت شدند [۱۵]. روش‌های مختلفی برای کشت فولیکول‌های پره آنترال (Preantral) طراحی شده است [۱۶-۱۸]. در میان روش‌های کشت فولیکول‌های پره آنترال، آن‌هایی موفق‌تر بوده‌است که فولیکول‌های پره آنترال با اندازه بزرگ و کمی قبل از تشکیل آنتروم (Antrum) را کشت داده‌اند [۱۹-۲۱]. به‌طور کلی دو روش برای کشت فولیکول‌های پره آنترال جدا شده از

[۳۴]. همچنین این روش برای کشت فولیکول‌های انسانی که نیاز به زمان طولانی‌تری برای کشت دارند، ممکن است نامناسب باشد [۲۵]. این روش‌های کشت یاد شده اعم از کشت دوبعدی (قطرات محیط کشت زیر روغن) و کشت در قطرات معلق (کشت سه بعدی) تنها برای کشت فولیکول به کار رفته است و تاکنون مطالعه‌ای در خصوص کشت بافت تخمدان، با استفاده از این دو روش کشت گزارش نشده است.

در بیش از یک دهه اخیر، روش‌های متفاوتی برای کشت موفقیت‌آمیز بافت تخمدان در گونه‌های مختلف از قبیل رت، همستر، گاو و انسان مطالعه شده است. محققان طی سال‌های اخیر توانسته‌اند بافت تخمدان را برای بیش از ۵۰ روز به‌طور موفقیت‌آمیز کشت دهند بدون اینکه علائمی از نکروز (Necrosis) مشاهده کنند [۱۴، ۳۵]. در مطالعاتی که روی گونه‌های بزرگ‌تر صورت گرفته است، بافت تخمدان برای کشت به قطعات ۱ میلی‌متر مکعبی تقسیم شده است. در این مطالعات بافت تخمدان برای حمایت فیزیکی حین کشت در چاهک، پتری دیش یا شیشه ساعت قرار گرفت به گونه‌ای که ب روی محیط کشت شناور شد و دسترسی کافی به محیط کشت وجود داشت [۳۶-۳۸]. بافت تخمدان برای کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ انکوبه می‌شود ولی مطالعات کمی نیز در زمینه بهبود شرایط کشت بافت تخمدان صورت گرفته است. فاینستات (Fainstat) تأثیرات سطوح مختلف اکسیژن را بر کشت بافت تخمدان و تکوین فولیکولی ارزیابی کرد و مشاهده کرد که اکسیژن ناکافی موجب نکروز بخش مرکزی بافت می‌شود در حالی که اکسیژن بیش از حد نیز موجب مهار تقسیم میتوز و آسیب به بخش محیطی بافت شده است. سطح اکسیژن مطلوب برای کشت بافت تخمدان بین ۲۰-۹۵ درصد گزارش شده است [۳۹].

اولین تلاش‌های موفقیت‌آمیز کشت تخمدان در شرایط آزمایشگاهی توسط مارتینوویچ (Martinovitch) در سال ۱۹۳۷ صورت گرفت [۳۵]. در این مطالعه بافت تخمدان کامل جنینی موش صحرایی داخل شیشه ساعت کشت شد و رشد و

تمایز سلول‌های زایا ارزیابی شد. این روش کشت توانست یکپارچگی بافت را حفظ کند و منجر به رشد و تکوین فولیکول‌های کوچک در بافت تخمدان شود. این سیستم کشت، محیطی شبیه *in vivo* برای بافت تخمدان فراهم آورد و ارتباط بین سلول‌های استروما-تکا -گرانولوزا (Stroma-Theca-Granulosa) و تخمک را توانست به خوبی حفظ کند. برای حمایت فیزیکی بافت تخمدان حین کشت از انواع ژل‌ها، مش استیل (Steel mesh)، غشای مصنوعی یا فیلتر و لخته خون استفاده شده است. امروزه بافت تخمدان برای حمایت فیزیکی در حین کشت روی صفحه کشت سه بعدی (Insert) قرار می‌گیرد و بافت با سطح نازکی از محیط کشت پوشیده می‌شود [۴۰]. با وجود تلاش‌های زیادی که در راستای کشت دو مرحله‌ای بافت تخمدان صورت گرفته است، مطالعات اخیر نشان داده است که هنوز میزان موفقیت کم است و تولد زنده کمی تاکنون گزارش شده و نیاز به مطالعه بیشتر در این خصوص است [۳، ۴، ۴۱، ۴۲]. بنابراین در مطالعه حاضر برای دستیابی به روشی راحت‌تر و در عین حال کارآمد و به صرفه برای کشت، بافت تخمدان موش، به سه روش شامل کشت سه بعدی در قطرات معلق، کشت روی صفحه کشت سه بعدی و کشت دو بعدی در قطرات زیر روغن کشت شد و نتایج آن با یکدیگر مقایسه شد.

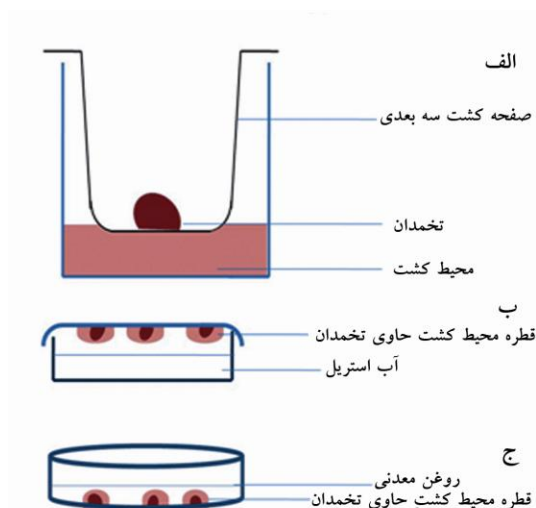
مواد و روش‌ها

طراحی تحقیق

به منظور مقایسه سه روش کشت مختلف، تخمدان موش‌های نابالغ سوری نژاد (NMRI) (National Medical Research Institute) در سه گروه کشت با صفحه کشت سه بعدی، قطرات معلق و کشت دوبعدی مرسوم زیر روغن (۱۰ تخمدان در هر گروه) کشت و با هم مقایسه شدند. کلیه مواد مصرفی از شرکت Sigma-Aldrich (آلمان) تهیه شده است، به جز مواردی که بدان اشاره می‌شود.

کشت تخمدان موش

سه بعدی قرار داده شدند. در هر چاهک از پلیت در زیر صفحه کشت سه بعدی به میزان ۴۰۰ میکرولیتر محیط کشت α -MEM پایه اضافه شد به گونه‌ای که تخمدان‌ها روی صفحه کشت سه بعدی توسط لایه نازکی از محیط کشت پوشانده شدند. نمای این نوع کشت در شکل ۱-الف آورده شده است [۴۲].



شکل ۱ تصویر شماتیک کشت بافت تخمدان. الف) کشت روی صفحه کشت سه بعدی، ب) کشت در قطرات معلق و ج) کشت در قطرات زیر روغن

گروه دوم (کشت در قطرات معلق)

تخمدان‌ها به شکل انفرادی در هر قطره ۳۰ میکرولیتری از محیط کشت α -MEM پایه روی در پتری دیش ۶ سانتی‌متری به صورت معکوس کشت شدند و برای تأمین رطوبت لازم، درون پلیت آب استریل اضافه شد. نمای این نوع کشت در شکل ۱-ب آورده شده است. در این روش قطرات محیط کشت، به دلیل کشش سطحی، معکوس باقی ماندند و تخمدان‌ها نیز در محل تبادل گاز/ محیط قرار گرفتند.

گروه سوم (کشت دو بعدی مرسوم زیر روغن)

تخمدان‌ها به تعداد ۱ عدد در هر قطره ۳۰ میکرولیتری از

تهیه تخمدان

۱- موش‌های ماده سوری و نابالغ نژاد NMRI با سن ۱ هفته (۲۰ سر موش) در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی، دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۴۴ درصد نگهداری شدند. پس از قطع نخاع موش‌ها به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی، با رعایت اصول اخلاقی مصوب دانشگاه تربیت مدرس (۵۲/۱۶۳۷ د)، تخمدان‌های آن‌ها جدا شد و در محیط کشت α -MEM (alpha- Minimum Essential Medium) محتوی ۵ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) قرار داده شدند. تخمدان‌ها پس از برداشتن بافت‌های اضافی اطرافشان با استفاده از سرنگ انسولین، در محیط کشت شستشو شدند و به صورت تصادفی در ۳ گروه آزمایشی قرار گرفتند (۳۰ تخمدان). ۵ تخمدان نیز به عنوان گروه کشت نشده ارزیابی بافت شناسی شد.

محیط کشت

در هر سه روش از محیط کشت α -MEM تکمیل شده با ۱ درصد ITS (Insulin- Transferin- selenit) (Gibco، آمریکا)، ۱۰۰ واحد بین المللی/ میلی‌لیتر (IU/ml) پنی سیلین (Gibco، آمریکا)، ۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر استرپتومایسین (Gibco، آمریکا)، ۱۰۰ میلی‌یونیت/ میلی‌لیتر rFSH (Stimulating Hormone) (recombinant Follicle، Serono، سوئیس) و ۵ درصد سرم FBS استفاده شد. تخمدان‌ها در هر سه روش به مدت ۷ روز در شرایط انکوباتور مرطوب با ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. به صورت یک روز در میان نیمی از محیط کشت آن‌ها با محیط کشت تازه تعویض شد و میزان بقا، رشد و بلوغ تخمدان‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس بررسی شد.

گروه اول (کشت بر روی صفحه کشت سه بعدی)

تخمدان‌ها در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه روی صفحه کشت

محیط کشت قرار داده شدند و برای جلوگیری از تغییر pH و دما توسط روغن معدنی پوشانده شدند (شکل ۱-ج).

بررسی بافت شناسی تخمدان‌ها کشت شده

تخمدان‌ها در انتهای دوره ۷ روزه کشت در هر سه گروه آزمایشی برای بررسی بافت شناسی برداشته شدند. پس از مرحله ثبوت با استفاده از محلول بوئن به ترتیب مراحل آب‌گیری توسط الکل، شفاف‌سازی با گزلیل، آغستگی با پارافین به ترتیب صورت گرفت. سپس قالب‌گیری و برش‌گیری به روش سریال با ضخامت ۵ میکرومتر از هر نمونه تخمدان (۵ عدد در هر گروه) انجام شد. رنگ‌آمیزی با استفاده از هماتوکسیلین و ائوزین (Hematoxylin and Eosin) صورت گرفت. برش‌های رنگ‌آمیزی شده با استفاده از میکروسکوپ نوری ارزیابی شد. در این مطالعه فولیکول‌های بدوی، اولیه و پره آنترال به ترتیب با یک لایه سلول‌های گرانولوزای سنگفرشی، یک لایه سلول‌های گرانولوزای مکعبی و بیش از یک لایه سلول‌های گرانولوزای مکعبی مشخص شدند. فولیکول‌های با تخمک یکدست و سالم و سلول‌های گرانولوزای منظم، تحت عنوان فولیکول طبیعی شمارش شدند. برای پیشگیری از شمارش مجدد فولیکول‌ها تنها فولیکول‌های با هستک مشخص در تخمک شمارش شدند.

شمارش فولیکول‌های مراحل تکوینی مختلف علاوه بر ۳ گروه تخمدان کشت شده، در تخمدان‌های کشت نشده ۷ روزه (۱۰ عدد تخمدان) نیز به عنوان گروه کنترل صورت گرفت.

بررسی سطح تخمدان

تصویر تخمدان‌ها در همه گروه‌های مورد مطالعه (در هر گروه ۵ عدد) با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Olympus، ژاپن) و دوربین دیجیتالی DP11 تهیه شد. همه تصاویر با استفاده از نرم‌افزار Digimizer ۴/۳/۵ (MedCalc Software bvba) ارزیابی و سطح تخمدان‌ها بر حسب میلی‌متر مربع (mm^2) محاسبه شد. پس از ارزیابی تخمدان‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس

به صورت یک روز در میان، بررسی بافت‌شناسی به کمک میکروسکوپ نوری انجام شد و تخمدان‌هایی که در قطرات معلق و قطرات مرسوم زیر روغن کشت شده بودند سیاه شدند و تعداد زیادی فولیکول‌های آن‌ها تخریب شدند؛ بنابراین این دو روش کنار گذاشته شد و تنها فولیکول‌های تخمدان‌های کشت شده روی اینسرت جداسازی و وارد مرحله بعدی کشت شدند.

جداسازی فولیکول‌های پره آنترال از تخمدان‌های

کشت شده روی صفحه کشت سه بعدی

جداسازی فولیکول‌ها به روش مکانیکی و با استفاده از نوک سوزن ۲۹ G متصل به سرنگ انسولین ۱ میلی‌متری در زیر بزرگنمایی ۲۵ استریومیکروسکوپ (Olympus، ژاپن) صورت گرفت. سپس فولیکول‌های با قطر ۱۵۰ میکرومتر و تخمک مرکزی با ۲-۳ لایه سلول گرانولوزا و تکا برای کشت سه بعدی توسط هیدروژل آلژینیت سدیم، انتخاب شدند.

کشت سه بعدی فولیکول پره آنترال حاصل از

کشت تخمدان روی صفحه کشت سه بعدی

برای تهیه هیدروژل آلژینیت، سدیم آلژینیت با غلظت ۰/۵ درصد با آب مقطر مخلوط شد، سپس برای از بین بردن ناخالصی‌ها ۰/۵ گرم زغال فعال به آن اضافه شد. این ترکیب توسط فیلتر میلی‌پور ۲۲/۰ میکرومتر فیلتر شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال نگهداری شد.

به منظور کپسوله کردن فولیکول‌های پره آنترال، فولیکول‌های جدا شده از تخمدان به صورت مجزا در قطرات ۵ میکرولیتری سدیم آلژینیت آماده شده قرار گرفت. سپس این قطرات به مخلوط ۱۴۰ میلی‌مول CaCl_2 (Merck، آلمان) و ۵۰ میلی‌مول NaCl (Merck، آلمان) منتقل شد. قطرات هیدروژل محتوی فولیکول‌های پره آنترال پس از گذشت ۲ دقیقه از حمام کلسیم خارج و توسط محیط کشت شسته شد. سپس به قطرات ۴۰ میکرولیتری محیط کشت در زیر روغن معدنی منتقل شدند. این

کشت تخمدان موش

gonadotropin) (Organon, آمریکا) منتقل شدند. سپس ۱۸ ساعت بعد، تخمک‌های بالغ متافاز II جمع‌آوری و شمارش شدند. درصد تکوین تخمک در انتهای این مرحله محاسبه شد.

بررسی آماری

تجزیه و تحلیل نتایج کسب شده به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ صورت گرفت. تغییرات سطح تخمدان و تعداد فولیکول‌ها در بین گروه‌های مورد مطالعه با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way Analysis of Variance: ANOVA) محاسبه شد. از نظر آماری در آزمون‌های فوق $P < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

ریخت‌شناسی تخمدان

تصویر فاز کتراست بافت تخمدان در روزهای مختلف کشت روی صفحه کشت سه بعدی، قطرات معلق و کشت دو بعدی مرسوم زیر روغن به‌ترتیب در شکل ۲ نشان داده شده است. در این تصویر مشاهده می‌شود که بافت تخمدان در کشت با قطرات معلق و کشت دوبعدی مرسوم زیر روغن تیره شده و فولیکول‌ها به سختی مشاهده می‌شوند، ولی در کشت روی صفحه کشت سه بعدی فولیکول‌ها رشد کرده و به راحتی قابل مشاهده هستند.

ریخت‌شناسی بافت تخمدان قبل از کشت (شکل ۳ الف-ج) با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین بررسی شد و با ریخت‌شناسی تخمدان پس از ۷ روز کشت در هر ۳ گروه (شکل ۳ د-ل) مقایسه شد. شکل ۲ د-و نشان می‌دهد که در روش کشت با استفاده از صفحه کشت سه بعدی ساختار بافتی تخمدان به خوبی حفظ شده و تنها بخش مرکزی آن دژنره شده است، ولی در شکل ۳ ز-ل مربوط به کشت تخمدان با روش قطرات معلق و کشت دو بعدی مرسوم زیر روغن، بخش عمده‌ای از بافت تخمدان تخریب شده است و جداشدن سلول‌های گرانولوزا از تخمک، هسته‌های قطعه قطعه و تیره مشاهده می‌شود.

فولیکول‌ها به مدت ۱۲ روز در شرایط انکوباتور مرطوب با ۵ درصد CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. به‌صورت یک روز در میان نیمی از محیط کشت آن‌ها با محیط کشت تازه تعویض شد و وضعیت حیاتی، رشد و تکوین فولیکول‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس بررسی شد.

اندازه‌گیری قطر فولیکول‌های حاصل از کشت

تخمدان روی صفحه کشت سه بعدی

قطر فولیکول‌ها با استفاده از میکرومتر چشمی از پیش‌کالیبره شده، در روزهای دوم، ششم و دوازدهم با محاسبه میانگین دو قطر عمود بر هم بر حسب میکرومتر ارزیابی شد (۵ عدد).

ارزیابی میزان بقا فولیکول‌های حاصل از کشت

تخمدان با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو

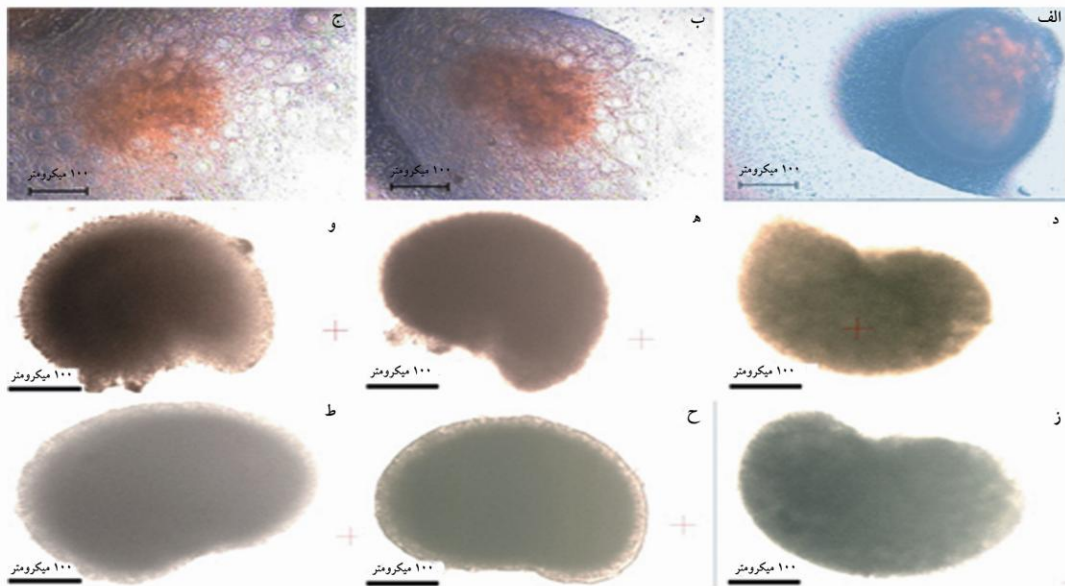
میزان بقا فولیکول‌های پره آنترال جدا شده از تخمدان‌های کشت شده روی صفحه کشت سه بعدی (تعداد ۵۶ عدد) با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو (Trypan blue) (۰/۴ درصد) (Sigma، آلمان) ارزیابی شد. فولیکول‌های آسیب دیده رنگ شدند و فولیکول‌های سالم رنگ نگرفتند.

ارزیابی تکوین و بقا فولیکول‌ها در طول کشت

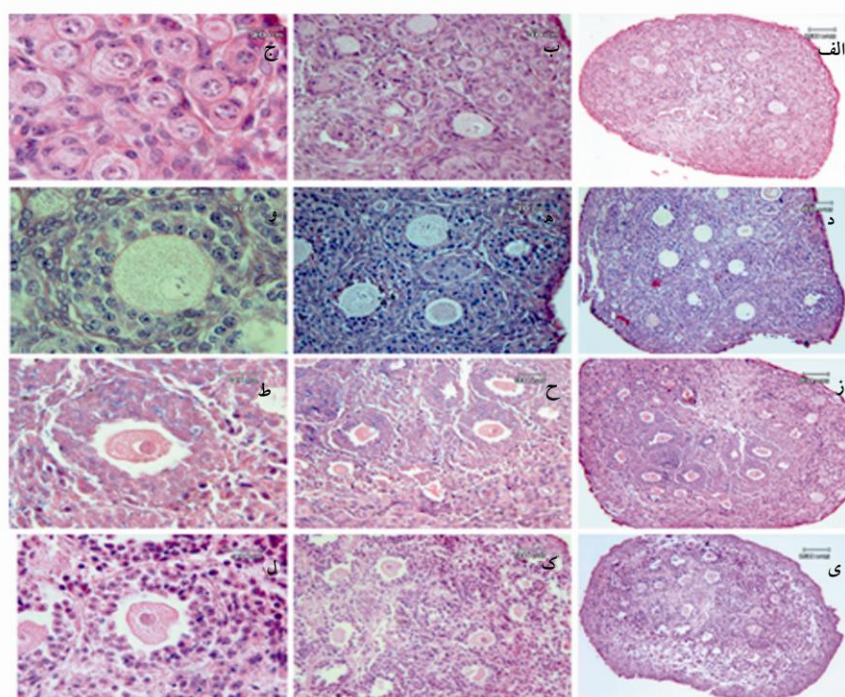
میزان بقای فولیکول‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس به‌صورت یک روز در میان در طول ۱۲ روز کشت ارزیابی شد. تیره رنگ شدن فولیکول، آزاد شدن زودرس تخمک و توقف رشد به‌عنوان فولیکول تخریب شده در نظر گرفته شد. تشکیل حفره آنتروم در روز دهم کشت بررسی شد و درصد آن نسبت به فولیکول‌های زنده محاسبه شد.

القای تخمک گذاری

به‌منظور القای تخمک گذاری، فولیکول‌ها به محیط کشت حاوی ۱/۵ واحد بین‌المللی/میلی‌لیتر hCG (human chorionic



شکل ۲ تصویر تخمدان موش در روزهای صفر، چهارم و ششم کشت با استفاده از میکروسکوپ معکوس در گروه کشت روی صفحه کشت سه بعدی (الف-ج)، کشت در قطرات معلق (د-و) و زیر روغن (ز-ط).



شکل ۳ رنگ آمیزی هماتوکسیلین و انوزین بافت تخمدان موش نابالغ. الف) بافت تخمدان تازه موش نابالغ که محتوی درصد زیادی فولیکول بدوی و درصد کمی فولیکول اولیه و فولیکول پره آنترال است. ب) و ج) بزرگنمایی بالاتر بافت تخمدان تازه موش نابالغ. د) بافت تخمدان کشت شده موش نابالغ پس از ۷ روز کشت روی صفحه کشت سه بعدی که محتوی درصد بیشتری از فولیکول‌های پره آنترال است. ه، و) بزرگنمایی بالاتر بافت تخمدان کشت شده موش نابالغ روی صفحه کشت سه بعدی. ز) بافت تخمدان کشت شده موش نابالغ پس از ۷ روز کشت با روش قطرات معلق که محتوی درصد زیادی فولیکول دژنره است. ح و ط) بزرگنمایی بالاتر بافت تخمدان کشت شده موش نابالغ با روش قطرات معلق. ی) بافت تخمدان کشت شده موش نابالغ پس از ۷ روز کشت با روش کشت در قطرات زیر روغن که محتوی درصد زیادی فولیکول تخریب شده است. ک و ل) بزرگنمایی بالاتر بافت تخمدان کشت شده موش نابالغ با روش کشت در قطرات زیر روغن

کشت تخمدان موش

($P < 0.001$) ولی درصد فولیکول‌های پره آنترال در روش‌های کشت با قطرات معلق ($0.75 \pm 2/19$) و کشت دو بعدی مرسوم زیر روغن ($0.50 \pm 1/21$) افزایش معنی‌داری با قبل از کشت نداشت ($P > 0.05$). میان درصد فولیکول‌های پره آنترال در گروه‌های کشت در قطرات معلق و کشت دو بعدی مرسوم پس از ۷ روز کشت در مقایسه با یکدیگر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$)، همچنین درصد فولیکول‌های اولیه در دو گروه نیز (به ترتیب $0.59 \pm 2/07$ و $0.35 \pm 1/20$) تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند، در حالی که درصد هر دو فولیکول پره آنترال و اولیه در دو گروه کشت در قطرات معلق و کشت دو بعدی مرسوم تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه کشت روی صفحه کشت سه بعدی داشت ($P < 0.05$).

در پایان این مرحله با توجه به ریخت‌شناسی بافت و نتایج حاصل از شمارش فولیکول در هر ۳ گروه، به علت رشد مناسب‌تر و حفظ ساختار بافتی در گروه کشت روی صفحه کشت سه بعدی تنها فولیکول‌های تخمدان‌های کشت شده با این روش، جداسازی، کشت و ارزیابی شدند.

درصد فولیکول‌های طبیعی

درصد فولیکول‌های طبیعی در مراحل مختلف تکوینی در تخمدان‌های کشت شده و کشت نشده (کنترل) در جدول ۱ آمده است. از میان ۱۸۴۰ فولیکول شمارش شده در گروه کشت روی صفحه کشت سه بعدی $73/85$ درصد از فولیکول‌ها طبیعی بودند، این در حالی است که در دو گروه کشت در قطرات معلق و کشت دو بعدی مرسوم به ترتیب از میان ۱۸۳۰ و ۱۷۰۵ فولیکول شمارش شده، $51/63$ درصد و $31/76$ درصد از فولیکول‌ها سالم بودند و از این نظر تفاوت معنی‌داری بین گروه کشت روی صفحه کشت سه بعدی با گروه‌های کشت در قطرات معلق و کشت دو بعدی مرسوم دیده می‌شود ($P < 0.05$). تخمدان‌های موش قبل از شروع کشت محتوی درصد زیادی فولیکول بدوی ($92/58 \pm 1/81$) و درصد کمی فولیکول اولیه ($5/27 \pm 1/45$) و فولیکول پره آنترال ($2/1 \pm 0/44$) بود. پس از ۷ روز کشت به طور معنی‌داری درصد فولیکول‌های بدوی کاهش ($65/52 \pm 2/60$) یافت و تعداد فولیکول‌های اولیه ($9/96 \pm 1/08$) و پره آنترال ($24/5 \pm 2/4$) افزایش یافت

جدول ۱ درصد فولیکول‌های طبیعی در سه گروه کشت شده در مقایسه با گروه کشت نشده

گروه	تعداد فولیکول بدوی (Mean ± SE)	تعداد فولیکول اولیه (Mean ± SE)	تعداد فولیکول پره آنترال (Mean ± SE)
تخمدان کشت نشده	$92/58 \pm 1/81$ ۳۰۲۷	$5/27 \pm 0/65$ ۱۷۴	$2/1 \pm 0/19$ ۷۰
کشت شده با صفحه کشت سه بعدی	$65/52 \pm 1/16$ ۸۹۰	$9/96 \pm 0/48$ ۱۳۶	$24/50 \pm 1/07$ ۳۳۳
کشت شده در قطرات معلق	$94/31 \pm 2/74$ ۹۱۱	$2/07 \pm 0/59$ ۲۱	$2/19 \pm 0/75$ ۲۱
کشت در قطرات زیر روغن	$97/50 \pm 1/14$ ۸۹۱	$1/20 \pm 0/35$ ۹	$1/21 \pm 0/50$ ۷

※: اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) با قبل از کشت

▲: اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) با گروه کشت شده در قطرات معلق

■: اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) با گروه کشت دو بعدی مرسوم زیر روغن

سطح تخمدان‌های کشت شده

سطح تخمدان‌های کشت شده با ۳ روش کشت روی صفحه کشت سه بعدی، قطرات معلق و کشت دو بعدی مرسوم زیر روغن به ترتیب از $567/97 \pm 53476/44$ ، $1411/25 \pm 54330/8$ و $6029/91 \pm 1404/22$ میلی‌متر مربع در روز ۷ کشت به طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۲) ($P < 0.001$).

$6029/91 \pm 1404/22$ میلی‌متر مربع در روز ۷ کشت به طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۲) ($P < 0.001$).

جدول ۲ سطح بافت تخمدان در سه گروه کشت شده در مقایسه با گروه کشت نشده

گروه	روز صفر Mean±SE	روز سوم Mean±SE	روز پنجم Mean±SE	روز هفتم Mean±SE
کشت شده با صفحه کشت سه بعدی	۵۳۴۷۶/۴ ± ۵۶۸/۹۷	۲۰۲۰۹۱ ± ۲۳۵۹/۴۵	۱۶۹۵۰۲/۲۰ ± ۶۰۲۹۱/۶	۱۶۹۵۰۲/۲۰ ± ۶۰۲۹۱/۹۱
کشت شده در قطرات معلق	۵۴۳۳۰/۸ ± ۱۴۱۱/۲۵	۶۱۷۹۴/۲ ± ۱۳۴۳/۸۸	۸۲۳۷۶/۴ ± ۲۷۳۲ [▲]	۱۰۳۵۳۹ ± ۲۸۸۲/۸۲ ^{▲■}
کشت در قطرات زیر روغن	۵۴۷۸۱ ± ۱۴۰۴/۲۲	۵۹۴۰۵/۶ ± ۱۱۲۴/۲۶	۷۹۸۷۶/۲ ± ۱۸۳۷/۱۶ [▲]	۸۶۶۳۱/۸ ± ۷۵۲/۸۷ [▲]

▲: با گروه کشت شده با صفحه کشت سه بعدی اختلاف معنی داری داشت.

■: با گروه کشت شده در قطرات زیر روغن اختلاف معنی داری داشت.

میزان بقای فولیکول‌های جداسازی شده و کشت

روی صفحه کشت سه بعدی

میزان بقای فولیکول‌های پره آنترال حاصل از کشت تخمدان روی صفحه کشت سه بعدی در ابتدای کشت و قبل از کپسوله کردن با آلژینیت (Alginate)، پس از رنگ‌آمیزی با استفاده از تریپان بلو، ۸۰/۳۵ درصد بود.

تغییرات قطر فولیکول‌های کشت شده روی

صفحه کشت سه بعدی طی کشت

قطر فولیکول‌های کپسوله شده با آلژینیت سدیم از ۱/۰۱ ± ۱۴/۸/۴ میکرومتر در روز صفر تا ۷/۰۷ ± ۴۱۰ میکرومتر در روز دوازدهم افزایش معنی داری یافت.

تکوین فولیکول‌های کپسوله شده در سدیم

آلژینیت حاصل از تخمدان‌های کشت شده

روی صفحه کشت سه بعدی

میزان بقا، تشکیل آنتروم و بلوغ تخمک‌های حاصل از فولیکول‌های کشت شده ارزیابی شد. درصد زنده ماندن و تشکیل آنتروم فولیکول‌های کشت شده و تخمک‌های متافاز دو حاصل از کشت فولیکول‌های پره آنترال در انتهای کشت به ترتیب ۷۴/۵۰، ۵۹/۲۱ و ۳۰/۲۶ بود.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که درصد فولیکول‌های طبیعی در تخمدان‌های کشت شده روی صفحه کشت سه بعدی در مقایسه با دو گروه دیگر به‌طور معنی‌داری بالاتر بود و تخمدان‌ها ریخت‌شناسی بهتری نیز نشان دادند.

درصد پایین فولیکول‌های طبیعی پس از کشت با استفاده از روش قطره زیر روغن ممکن است به دلیل انتشار ضعیف اکسیژن باشد. در روش کشت با قطره، بافت تخمدان در کف پلیت قرار می‌گیرد و فاصله کف پلیت با سطح آن که محل تبادل محیط کشت با اکسیژن است زیاد است، بنابراین انتشار اکسیژن به آرامی صورت می‌گیرد به گونه‌ای که تخمین زده می‌شود که اکسیژن موجود در اطراف فولیکول، ۵۰ درصد اکسیژن نسبت به سطح محیط کشت باشد. از طرف دیگر، در این روش مشکل انتشار ناکافی اکسیژن توسط سد روغنی نیز تشدید می‌شود، بنابراین کاهش اکسیژن رشد را به تأخیر می‌اندازد [۴۳]. پوشش روغن تبادل گاز را کاهش می‌دهد و استفاده از مسیر گلیکولیز (Glycolysis) را افزایش داده که در مسیر گلیکولیز تعداد مولکول ATP کمتری در مقایسه با فسفریلاسیون اکسیداتیو تولید می‌شود [۴۴]. همچنین لایه روغن که روی قطرات را می‌پوشاند به دلیل جذب انواع ویژه‌ای از اجزا تشکیل‌دهنده محیط کشت، ممکن است ترکیب آن را تغییر دهد [۲۲، ۴۵].

روش کشت با قطره معلق تا حدی مشکل انتشار اکسیژن را حل نموده است به دلیل اینکه در این روش، بافت در محل

کشت تخمدان موش

برطرف کرده است [۴۲، ۴۹، ۵۰]. در این روش کشت، تخمدان‌ها روی غشایی نازک و روی محیط کشت با حجم حدود ۴۰۰ میکرولیتر شناور می‌شوند، بنابراین تخمدان‌ها به مواد غذایی بیشتری در مقایسه با دو روش کشت دیگر دسترسی پیدا می‌کنند و از طرف دیگر در تماس نزدیک‌تری با اکسیژن هستند که همه این موارد منجر به رشد بیشتر تخمدان‌ها می‌شود.

مشابه با نتایج مطالعه حاضر، جین (Jin) و همکاران طی مطالعه‌ای تخمدان‌های موش ۸ روزه را با استفاده از صفحه کشت سه بعدی کشت دادند و گزارش دادند که درصد فولیکول‌های ثانویه پس از ۴ روز کشت به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، همچنین میزان تکوین تخمک‌های متافاز دو حاصل از جداسازی و کشت فولیکول‌های پره آنترال ۸۸ درصد بود [۴۲].

در مطالعه‌ای عبدی و همکاران تخمک‌های موش نابالغ را با استفاده از صفحه کشت سه بعدی کشت دادند و گزارش نمودند که فولیکول‌های پره آنترال پس از ۶ روز کشت به‌طور معنی‌داری افزایش یافتند و پس از جداسازی و کشت فولیکول‌های پره آنترال قطر آن‌ها از روز صفر تا روز ۱۲ به‌طور معنی‌داری افزایش یافت [۵۲].

به‌نظر می‌رسد کشت تخمدان روی صفحه کشت سه بعدی با به حداقل رساندن فاصله بافت با محل تبادل محیط کشت و اکسیژن و به دنبال آن افزایش دسترسی به اکسیژن، همچنین شناور شدن روی حجم زیادی از محیط کشت و کسب مواد غذایی کافی می‌تواند شرایط فیزیولوژیکی *in vivo* را به‌طور چشمگیری (در مقایسه با دو روش دیگر) تقلید کند. کشت روی صفحه کشت سه بعدی هم از حیث رشد تخمدان، ریخت‌شناسی و ساختار فولیکول‌ها در مقایسه با دو گروه دیگر مناسب‌تر بود.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر بخشی از رساله دکترای تخصصی رشته علوم تشریحی مصوب دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی

تبادل محیط کشت با اکسیژن قرار می‌گیرد و کمترین فاصله را با اکسیژن محیط کسب می‌کند [۴۶]. کشت با قطره معلق با کاهش نسبت سطح به حجم باعث کاهش تبخیر محیط کشت می‌شود، همچنین یک محیط کشت سه بعدی کوچک برای رشد بافت فراهم می‌کند که هم ساده و هم به صرفه است؛ اما تاکنون بافت تخمدان در قطرات معلق و زیر روغن کشت نشده است و مطالعات انجام شده در این زمینه مربوط به فولیکول یا تخمک است [۴۷-۵۰]. در اغلب مطالعات فولیکول‌های کشت شده در روش کشت دو بعدی نرخ تکوین پایینی داشته است که ممکن است به دلیل از بین رفتن ساختار کروی فولیکول و ارتباط بین تخمک با سلول‌های گرانولوزا باشد [۲۸، ۴۷]. یکی دیگر از دلایلی که ممکن است منجر به کاهش نرخ تکوین شود، چسبیدن فولیکول به کف پلیت و افزایش فاصله آن از محل تبادل اکسیژن با محیط کشت است. این رویداد در کشت بافت تخمدان به دلیل افزایش چگالی و اندازه آن در مقایسه با فولیکول اهمیت بیشتری پیدا می‌کند و باعث می‌شود اکسیژن کمتری به بافت برسد. مطالعات انجام شده روی فولیکول نشان داده که کشت فولیکول در قطرات معلق در مقایسه با کشت دو بعدی نتایج بهتری داشته است و فولیکول‌ها تکوین بیشتری داشته‌اند [۴۶، ۵۱].

عدم موفقیت مطالعه حاضر در روش قطره معلق که معمولاً برای فولیکول به‌کار گرفته شده است، ممکن است به دلیل بزرگ بودن اندازه بافت تخمدان در مقایسه با فولیکول باشد. گرچه تخمدان موش نوزاد اندازه کوچکی دارد اما با این حال فولیکول به دلیل این که قطر کمتری دارد و مرکز آن اکسیژن بیشتری دریافت می‌کند، بنابراین رشد مناسب‌تری نشان می‌دهد [۴۶].

تخمدان‌ها در کشت با قطرات معلق مانند کشت زیر روغن، در قطرات با حجم ۳۰ میکرولیتر کشت می‌شوند. این حجم کم محیط کشت ممکن است باعث کاهش دستیابی تخمدان‌ها به مواد غذایی کافی شود [۴۸]. کشت تخمدان روی صفحه کشت سه بعدی که محققین مختلف برای تخمدان‌های گونه‌های رت، موش و انسان انجام داده‌اند، این مشکل را

منابع

- [1] Winkler-Crepaz K, Nederegger V, Ayuandari S, Rosenfellner D, Zervomanolakis I, Hofer S, Wildt L, Ziehr SC. Novel dynamic culture system to support initiation of primordial follicle growth in prepubertal mouse ovaries. *Fertil Steril* 2014; 102(3): 864-70.
- [2] Laronda MM, Duncan FE, Hornick JE, Xu M, Pahnke JE, Whelan KA, Shea LD, Woodruff TK. Alginate encapsulation supports the growth and differentiation of human primordial follicles within ovarian cortical tissue. *J Assist Reprod Genet* 2014; 31(8): 1013-28.
- [3] Eppig JJ, O'Brien MJ, Pendola FL, Watanabe S. Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown in vitro: follicle-stimulating hormone and insulin. *Biol Reprod* 1998; 59(6): 1445-53.
- [4] 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. *Biol Reprod* 2003; 68(5): 1682-6.
- [5] Sauerbrun-Cutler MT, Vega M, Keltz M, McGovern PG. In vitro maturation and its role in clinical assisted reproductive technology. *Obstet Gynecol Surv* 2015; 70(1): 45-57.
- [6] Agung B, Piao Y, Fuchimoto D, Senbon S, Onishi A, Otoi T, Nagai T. Effects of oxygen tension and follicle cells on maturation and fertilization of porcine oocytes during in vitro culture in follicular fluid. *Theriogenology* 2010; 73(7): 893-9.
- [7] Palmerini MG, Nottola SA, Leoni GG, Succu S, Borshi X, Berlinguer F, Naitana S, Bekmukhambetov Y, Macchiarelli G. In vitro maturation is slowed in prepubertal lamb oocytes: ultrastructural evidences. *Reprod Biol Endocrinol* 2014; 12: 115.
- [8] Gosden RG. Restitution of fertility in sterilized mice by transferring primordial ovarian follicles. *Hum Reprod* 1990; 5(5): 499-504.
- [9] Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, Sugishita Y, Tamura M, Hashimoto S, Morimoto Y, Kawamura K. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod* 2015; 30(3): 608-15.
- [10] Matos MH, Bruno JB, Rocha RM, Lima-Verde IB, Santos KD, Saraiva MV, Silva JR, Martins FS, Chaves RN, Bão SN, Figueiredo JR. In vitro development of primordial follicles after long-term culture of goat ovarian tissue. *Res Vet Sci* 2011; 90(3): 404-11.
- [11] Araújo VR, Gastal MO, Figueiredo JR, Gastal EL. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2014; 12: 78.
- [12] Hovatta O, Wright C, Krausz T, Hardy K, Winston RM. Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation. *Hum Reprod* 1999; 14(10): 2519-24.

- [13] Abir R, Fisch B, Nitke S, Okon E, Raz A, Ben Rafael Z. Morphological study of fully and partially isolated early human follicles. *Fertil Steril* 2001; 75(1): 141-6.
- [14] Blandau R, Warrick E, Rumery RE. In vitro cultivation of fetal mouse ovaries. *Fertil Steril* 1965; 16(6): 705-15.
- [15] Eppig JJ, O'Brien MJ. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 1996; 54(1): 197-207.
- [16] Eppig JJ. Mouse oocyte development in vitro with various culture systems. *Dev Biol* 1977; 60(2): 371-88.
- [17] Eppig JJ, Schroeder AC. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1989; 41(2): 268-76.
- [18] Eppig JJ, Wigglesworth K, O'Brien MJ. Comparison of embryonic developmental competence of mouse oocytes grown with and without serum. *Mol Reprod Dev* 1992; 32(1): 33-40.
- [19] 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.
- [20] Roy SK, Greenwald GS. Hormonal requirements for the growth and differentiation of hamster preantral follicles in long-term culture. *J Reprod Fertil* 1989; 87(1): 103-14.
- [21] Roy SK, Treacy BJ. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertil Steril* 1993; 59(4): 783-90.
- [22] 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.
- [23] Cain L, Chatterjee S, Collins TJ. In vitro folliculogenesis of rat preantral follicles. *Endocrinology* 1995; 136(8): 3369-77.
- [24] West ER, Shea LD, Woodruff TK. Engineering the follicle microenvironment. *Semin Reprod Med* 2007; 25(4): 287-99.
- [25] Desai N, Alex A, AbdelHafez F, Calabro A, Goldfarb J, Fleischman A, Falcone T. Three-dimensional in vitro follicle growth: overview of culture models, biomaterials, design parameters and future directions. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 8: 119.
- [26] Camboni A, Van Langendonck A, Donnez J, Vanacker J, Dolmans MM, Amorim CA. Alginate beads as a tool to handle, cryopreserve and culture isolated human primordial/primary follicles. *Cryobiology* 2013; 67(1): 64-9.
- [27] Araújo VR, Gastal MO, Wischral A, Figueiredo JR, Gastal EL. In vitro development of bovine secondary follicles in two- and three-dimensional culture systems using vascular endothelial growth factor, insulin-like growth factor-1, and growth hormone. *Theriogenology* 2014; 82(9): 1246-53.
- [28] Brito IR, Lima IM, Xu M, Shea LD, Woodruff TK, Figueiredo JR. Three-dimensional systems for in vitro follicular culture: overview of alginate-based matrices. *Reprod Fertil Dev* 2014; 26(7): 915-30.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] Xu J, Lawson MS, Yeoman RR, Molskness TA, Ting AY, Stouffer RL, Zelinski MB. Fibrin promotes development and function of macaque primary follicles during encapsulated three-dimensional culture. *Hum Reprod* 2013; 28(8): 2187-200.
- [33] Nation A, Selwood L. The production of mature oocytes from adult ovaries following primary follicle culture in a marsupial. *Reproduction* 2009; 138(2): 247-55.
- [34] Mousset-Simeón N, Jouannet P, Le Cointre L, Coussieu C, Poirot C. Comparison of three in vitro culture systems for maturation of early preantral mouse ovarian follicles. *Zygote* 2005; 13(2): 167-75.
- [35] Martinovitch PN. Development in vitro of the mammalian gonad. *Nature* 1937; 139: 413.
- [36] Laskey JW, Berman E, Ferrell JM. The use of cultured ovarian fragments to assess toxicant alterations in steroidogenesis in the Sprague-Dawley rat. *Reprod Toxicol* 1995; 9(2): 131-41.
- [37] Wandji SA, Srsen V, Voss AK, Eppig JJ, Fortune JE. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod* 1996; 55(5): 942-8.
- [38] Wandji SA, Srsen V, Nathanielsz PW, Eppig JJ, Fortune JE. Initiation of growth of baboon primordial follicles in vitro. *Hum Reprod* 1997; 12(9): 1993-2001.
- [39] Fainstat T. Organ culture of postnatal rat ovaries in chemically defined medium. *Fertil Steril* 1968; 19(3): 317-38.
- [40] Fujihara M, Comizzoli P, Wildt DE, Songsasen N. Cat and dog primordial follicles enclosed in ovarian cortex sustain viability after in vitro culture on agarose gel in a protein-free medium. *Reprod Domest Anim* 2012; 47 Suppl 6: 102-8.
- [41] Eppig JJ, Hosoe M, O'Brien MJ, Pendola FM, Requena A, Watanabe S. Conditions that affect acquisition of developmental competence by mouse oocytes in vitro: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163(1-2): 109-16.
- [42] 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.
- [43] Spier RE, Griffiths B. An examination of the data and concepts germane to the oxygenation of cultured animal cells. *Dev Biol Stand* 1983; 55: 81-92.
- [44] Boland NI, Humpherson PG, Leese HJ, Gosden RG. The effect of glucose metabolism on murine follicle development and steroidogenesis in vitro. *Hum Reprod* 1994; 9(4): 617-23.
- [45] Miller KF, Pursel VG. Absorption of compounds

- in medium by the oil covering microdrop cultures. *Gamete Res* 1987; 17(1): 57-61.
- [46] Wycherley G, Downey D, Kane MT, Hynes AC. A novel follicle culture system markedly increases follicle volume, cell number and oestradiol secretion. *Reproduction* 2004; 127(6): 669-77.
- [47] Smitz JE, Cortvrindt RG. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction* 2002; 123(2): 185-202.
- [48] Adam AA, Takahashi Y, Katagiri S, Nagano M. In vitro culture of mouse preantral follicles using membrane inserts and developmental competence of in vitro ovulated oocytes. *J Reprod Dev* 2004; 50(5): 579-86.
- [49] Devine PJ, Sipes IG, Skinner MK, Hoyer PB. Characterization of a rat in vitro ovarian culture system to study the ovarian toxicant 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 184(2): 107-15.
- [50] Morimoto Y, Oku Y, Sonoda M, Haruki A, Ito K, Hashimoto S, Fukuda A. High oxygen atmosphere improves human follicle development in organ cultures of ovarian cortical tissues in vitro. *Hum Reprod* 2007; 22(12): 3170-7.
- [51] Xu M, Kreeger PK, Shea LD, Woodruff TK. Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring. *Tissue Eng* 2006; 12(10): 2739-46.
- [52] Abdi S, Salehnia M1, Hosseinkhani S. Steroid production and follicular development of neonatal mouse ovary during in vitro culture. *Int J Fertil Steril* 2013; 7(3): 181-6.