بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از
پایان‌نامه کارشناسی ارشد

خانم مژده پاژخ رشته **علوم تشریح** پایان‌نامه **کارشناسی ارشد** خود را با عنوان « **ارزیابی رشد فولیکول ها پس از کشت تخمدان موش در محیط حاوی عامل رشدی تمایزی-۹B (GDF-9B) به وسیله شاخص آنتی ژن تکثیر هسته سلولی (PCNA)** » در تاریخ **۱۳۹۱/۱۱/۲۹** ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکترمژده صالح نیا	(استاد راهنما)	
دکترمجتبی رضا زاده	(استاد ناظر)	
دکتر پوپک افتخار یزدی	(استاد ناظر)	
دکتر منصوره موحدین	(استاد ناظر ونماینده تحصیلات تکمیلی)	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی
دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می‌باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می‌باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته‌ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **مژده پاژخ** دانشجوی **رشته علوم تشریحی** ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۹ مقطع کارشناسی ارشد دانشکده علوم پزشکی متعهد می‌شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته‌های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می‌دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ ۹۱/۱۱/۲۹

آیین نامهٔ چاپ پایان نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی – پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به دفتر «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحهٔ سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته **علوم تشریح** است که در سال **۱۳۹۱** در دانشکدهٔ **علوم پزشکی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **سرکار خانم دکتر مژده صالح نیا** از آن دفاع شده است».

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیهٔ کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادهٔ ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶: اینجانب **مژده پاژخ** دانشجوی رشته **علوم تشریح** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی: مژده پاژخ

تاریخ و امضاء: ۹۱/۱۲/۲۹

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته علوم تشریح

عنوان

ارزیابی رشد فولیکول‌ها پس از کشت تخمدان موش در محیط حاوی عامل رشدی تمایزی- ۹B (GDF-9B) به‌وسیله‌ی شاخص آنتی ژن تکثیر هسته سلولی (PCNA)

نگارش

مژده پاژخ

استاد راهنما

دکتر مژده صالح‌نیا

زمستان ۱۳۹۱

تقدیم به:

پدر بزرگوارم که مشوق اصلی ام در گام نهادن در راه علم بود.

مادر مهربانم، اسوه صبر و امید زندگیم.

و به همه کسانی که مرا در انجام این پایان نامه کمک کردند.

تشکر و قدردانی

سپاس و قدردانی از استاد راهنمای ارجمندم **سرکار خانم دکتر مژده صالح نیا** که به پاس زحمات بی دریغ و راهنمایی‌های مشفقانه و تعالیم مفیدشان، که همواره روشنگر راهم بوده مرا در تهیه این پایان نامه یاری دادند و در طول دوران تحصیلم از حسن خلق، صداقت، تفکر در کارها و فروتنی ایشان بهره گرفتم.

تقدیر و تشکر خالصانه از کلیه اساتید بزرگوارم **سرکار خانم دکتر منصوره موحدین، جناب آقای دکتر مجتبی رضازاده ولوجردی، جناب آقای دکتر تقی طریحی** که در دوران تحصیل افتخار شاگردی ایشان را داشتم.

با سپاس از همراهان خوب و دوستان بسیار عزیزم، خانم سعیده ابراهیمی، آقای شهرام پوربیرانوند، وحید عربگری، آقای محمدلو و کلیه دانشجویان گروه علوم تشریح.

چکیده:

مقدمه: عامل رشدی تمایزی- ۹B (GDF-9B) یک فاکتور رشد پروتئینی مشتق از تخمک است که در تکوین فولیکول های تخمدان ضروری است، این فاکتور عمدتا بواسطه رسپتور خود بر سطح سلول‌های گرانولوزا اثر خود را اعمال می‌کند. اثر GDF-9B بر فولیکول‌های مراحل مختلف تکوینی بویژه فولیکول‌های بدوی و اولیه نا مشخص است.

هدف از این مطالعه بررسی اثر GDF-9B بر رشد فولیکول‌های مراحل مختلف تکوینی، بیان ژن شاخص آنتی ژن تکثیر هسته سلولی (PCNA) و تولید هورمون‌های استرادیول و پروژسترون توسط تخمدان‌های کشت شده بود.

مواد و روش‌ها: تخمدان‌های بدست آمده از موش‌های چهارده روزه به مدت هفت روز کشت شدند. گروه‌ها شامل تخمدان‌های چهارده روزه کشت شده در محیط پایه و تخمدان‌های چهارده روزه کشت شده در محیط پایه غنی شده با GDF-9B بودند. در پایان دوره، از تخمدان‌های کشت شده جهت شمارش فولیکول‌های مراحل مختلف تکوینی برش‌های بافتی تهیه گردید. سطح ترشح هورمون‌های استرادیول و پروژسترون در تخمدان‌های کشت شده در روزهای دوم و هفتم مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس بیان ژن PCNA در تخمدان‌های کشت شده توسط Real time-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که درصد فولیکول‌های آنترال، سایز تخمدان‌های کشت شده، سایز فولیکول‌های آنترال، تولید استرادیول و پروژسترون و بیان ژن PCNA در تخمدان‌های چهارده روزه کشت شده در محیط پایه غنی شده با GDF-9B افزایش قابل توجهی را نسبت به گروه چهارده روزه کشت شده در محیط پایه نشان می‌دهد ($P\leq ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری و بحث: در مجموع تحقیق حاضر نشان داد GDF-9B باعث تحریک رشد فولیکول‌های پره آنترال به فولیکول‌های آنترال می‌گردد و به نظر می‌رسد این ترکیب بعنوان یک فاکتور تکثیری و بلوغی بوده که باعث افزایش بیان ژن PCNA و افزایش تولید هورمون‌ها در محیط کشت تخمدان‌های چهارده روزه کشت شده شد.

واژگان‌کلیدی: عامل رشدی تمایزی- ۹B، کشت تخمدان، موش، شاخص آنتی ژن تکثیر هسته سلولی.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. طبقه‌بندی مورفولوژیکی فولیکول‌ها در تخمدان موش ۲

۱-۱-۱. فولیکول‌های بدوی ۲

۱-۱-۲. فولیکول‌های اولیه ۲

۱-۱-۳. فولیکول‌های ثانویه ۳

۱-۱-۴. فولیکول‌های آنترال اولیه ۳

۱-۲. تکوین فولیکول‌ها در شرایط in-vitro ۳

۱-۲-۱. کشت تخمدان ۳

۱-۲-۲. کشت فولیکول‌های ایزوله ۵

۱-۳. فاکتورهای موثر در تکوین فولیکول ۵

۱-۳-۱. Kit/Kit ligand ۶

۱-۳-۲. Epidermal Growth Factor Family ۷

۱-۳-۳. Activin ۷

۱-۳-۴. basic Fibroblast Growth Factor ۷

۱-۳-۵. Insulin-like Growth Factor ۸

۱-۳-۶. Anti-Mulerian Hormone ۸

۱-۳-۷. Growth Differentiation Factor-9 ..... ۸

۱-۳-۸. Bone morphogenetic Factor-7 ..... ۱۰

۱-۳-۹. Bone morphogenetic Factor-6 ..... ۱۰

۱-۳-۱۰. Bone morphogenetic Factor-15 یا Growth & differentiation factor-9B ۱۱

۱-۴. شاخص‌های تکثیر سلولی: ۱۴

۱-۴-۱. آنتی ژن Ki-67 ..... ۱۴

۱-۴-۲. پروتئین Minichromosome maintenance complex compartment 2 ..... ۱۵
۱-۴-۳. پروتئین Melanoma inhibitory activity protein ۱۵
۱-۴-۱. Cellular apoptosis susceptibility protein ۱۶
۱-۴-۵. Proliferating cell nuclear antigen ۱۶
۱-۴-۵-۱. ارزیابی رشد فولیکولی به وسیله PCNA ۱۸
۱-۵. سوالات تحقیق ۱۹
۱-۶. فرضیه تحقیق حاضر ۲۰

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۲۱
۲-۱. تهیه بافت تخمدان ۲۲
۲-۲. گروه‌های مورد مطالعه ۲۲
۲-۳. مواد و وسایل لازم جهت کشت تخمدان ۲۳
۲-۳-۱. محیط کشت ۲۳
۲-۳-۲. روش انجام کار ۲۳
۲-۴. انتخاب دوز مناسب GDF-9B ۲۴
۲-۵. اندازه‌گیری مساحت قطعات بافتی کشت شده ۲۴
۲-۶. بررسی هیستولوژیکی با میکروسکوپ نوری ۲۵
۲-۷. بررسی مولکولی ۲۵
۲-۷-۱. استخراج RNA کل از بافت ۲۵
۲-۷-۲. مواد و وسایل لازم ۲۶
۲-۷-۳. مراحل کار ۲۷
۲-۷-۴. بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده ۲۸
۲-۷-۴. UV اسپکتروفتومتری ۲۸
۲-۷-۵. واکنش رونویسی معکوس (RT) ۲۹
۲-۷-۵-۱. مواد و وسایل لازم ۲۹

۲-۷-۵-۲. مراحل کار ۳۰
۲-۸. طراحی پرایمر ۳۰
۲-۸-۱. آماده‌سازی پرایمرها ۳۱
۲-۹. واکنش PCR ۳۱
۲-۹-۱. گرادیان دمایی ۳۲
۲-۹-۲. الکتروفورز محصول PCR ۳۲
۲-۹-۳. مواد و وسایل لازم ۳۳
۲-۹-۴. مراحل کار ۳۴
۲-۱۰. واکنش Real time-PCR ۳۵
۲-۱۰-۱. روش کار ۳۵
۲-۱۰-۲. تحلیل نتایج Real time-PCR ۳۶
۲-۱۱. آنالیز آماری ۳۶

فصل سوم: نتایج و یافته‌ها ۳۷

۳-۱. نتایج مطالعه Pilot ۳۸
۳-۱-۱. تغییرات رشد فولیکول‌های مراحل مختلف تکوینی در تخمدان‌های چهارده روزه کشت شده در حضور غلظت‌های مختلف GDF-9B در مطالعه مقدماتی ۳۸
۳-۲. گروهای مورد مطالعه ۳۹
۳-۲-۱. مورفولوژی تخمدان‌های چهارده روزه کشت شده ۴۰
۳-۲-۲. تغییرات رشد فولیکول‌های بدوی در تخمدان‌های چهارده روزه کشت شده ۴۰
۳-۲-۳. تغییرات رشد فولیکول‌های اولیه در تخمدان‌های چهارده روزه کشت شده ۴۰
۳-۲-۳. تغییرات رشد فولیکول‌های پره آنترال در تخمدان‌های چهارده روزه کشت شده ۴۱
۳-۲-۴. تغییرات رشد فولیکول‌های آنترال در تخمدان‌های چهارده روزه کشت شده ۴۲
۳-۳. تغییرات سطح تخمدان و فولیکول‌های آنترال در تخمدان‌های چهارده روزه کشت شده ۴۳
۳-۳-۱. تغییرات سطح تخمدان در تخمدان‌های چهارده روزه کشت شده ۴۳

۳-۳-۲. تغییرات سطح فولیکول‌های آنترال در تخمدان‌های چهارده روزه کشت شده ۴۴
۳-۴. تولید استرادیول و پروژسترون در تخمدان‌های کشت شده ۴۴
۳-۴-۱. تولید استرادیول در تخمدان‌های کشت شده ۴۵
۳-۴-۲. تولید پروژسترون در تخمدان‌های کشت شده ۴۵
۳-۵. نتایج مطالعات مولکولی ۴۶
۳-۵-۱. مقایسه میزان بیان ژن PCNA در تخمدان‌های کشت شده ۴۶

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۵۷
۴-۱. اثر GDF-9B بر رشد فولیکول‌های تخمدانی ۵۸
۴-۲. اثر GDF-9B بر بیان ژن PCNA ۶۱
۴-۳. اثر GDF-9B بر تولید استرادیول و پروژسترون ۶۳
۴-۴. نتیجه‌گیری ۶۵
۴-۵. پیشنهادها ۶۵

فهرست منابع و مآخذ ۶۶
چکیده انگلیسی ۷۶

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول (۲-۱) ویژگی پرایمرهای اختصاصی به کار رفته..... ۳۱

جدول (۳-۱) تغیرات رشد فولیکول‌های مراحل مختلف تکوینی در حضور غلظت‌های مختلف GDF-9B در مطالعه مقدماتی (Mean±SE). ۴۷

جدول (۳-۲) تغیرات رشد فولیکول‌های مراحل مختلف تکوینی در مطالعه اصلی (Mean±SE)..... ۴۸

جدول (۳-۳) تغیرات سطح (میکرومتر مربع) تخمدان‌های کشت شده (Mean±SE). ۴۹

جدول (۳-۴) تغیرات سطح (میکرومتر مربع) فولیکول های آنترال در تخمدان های کشت شده (Mean±SE). ۵۰

جدول (۳-۵) میانگین تغییرات استرادیول در محیط کشت تخمدان‌های کشت شده (Mean±SE)... ۵۱

جدول (۳-۶) میانگین تغییرات پروژسترون در محیط کشت تخمدان‌های کشت شده (Mean±SE). ۵۲

جدول (۳-۷) میزان بیان ژن PCNA در تخمدان‌های کشت شده و کنترل کشت نشده (Mean±SE). ۵۲

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل (۳-۱) مورفولوژی تخمدان‌های کشت شده و دست نخورده موش با رنگ آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین..... ۵۳

شکل (۳-۲) تصاویر میکروسکوپ Invert از تخمدان‌های کشت شده..... ۵۴

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار (۳-۱) منحنی Melt ژن PCNA پس از Real Time RT-PCR..... ۵۵

نمودار (۳-۲) منحنی Melt ژن GAPDH پس از Real Time RT-PCR ۵۵

نمودار (۳-۳) منحنی Amplification curve ژن PCNA پس از Real Time RT-PCR ۵۶

نمودار (۳-۴) منحنی Amplification curve ژن GAPDH پس از Real Time RT-PCR ۵۶

فصل اول

مقدمه و مروری
برمطالعات گذشته

۱-۱. طبقه‌بندی مورفولوژیکی فولیکول‌ها در تخمدان موش

فولیکول‌های تخمدانی واحد ساختاری و عملکردی تخمدان پستانداران هستند. اجزای فولیکول‌ها شامل تخمک، سلول‌های گرانولوزای اطراف آن، غشای پایه و سلول‌های تکا هستند.

۱-۱-۱. فولیکول‌های بدوی[1]

این فولیکول‌ها دارای یک تخمک هستند که توسط یک لایه نسبی یا کامل سلولهای گرانولوزای سنگفرشی احاطه شده است. تشکیل این فولیکول‌ها در جوندگان طی چند روز اول بعد از تولد صورت می‌گیرد در حالی که در حیوانات اهلی و پریمات‌ها تشکیل فولیکول‌های بدوی در زمان جنینی صورت می‌گیرد. تخمک اولیه در زمان جنینی از تقسیمات میتوزی اووگونی بوجود می‌آید سپس وارد میوز شده و در مرحله دیپلوتن اولین تقسیم میوزی متوقف میشود. در این مرحله هسته تخمک ژرمینال وزیکول نامیده می‌شود[۱].

۱-۱-۲. فولیکول‌های اولیه[2]

با یک لایه از سلول‌های گرانولوزای مکعبی مشخص می‌شود. گاهی فولیکول‌ها حالتی بینابینی را نشان می‌دهند. در این فولیکول‌ها سلول‌های گرانولوزا توسط غشای پایه احاطه شده اند. تشکیل لایه زونا پلوسیدا طی تبدیل فولیکول‌های بدوی به اولیه صورت می‌گیرد. سلول‌های گرانولوزای این فولیکول‌ها به دو صورت مکعبی و سنگفرشی دیده می‌شود. در صورتی که سلول‌های مکعبی غالب باشند به نوع

1- Primordial follicles
2- Primary follicles

اولیه تعلق می‌گیرند. در بسیاری از مطالعات طبقه‌بندی فولیکول‌های تخمدان موش بر اساسا طبقه‌بندی Pedersen&peters صورت گرفت که بر تعداد سلول‌های گرانولوزا تاکید دارد[۲].

۱-۱-۳. فولیکول‌های ثانویه[1]

فولیکول‌ها در صورتی که بیشتر از یک لایه سلول گرانولوزا را نشان دهند و فاقد آنتروم باشند بعنوان فولیکول ثانویه در نظر گرفته می‌شوند. در این مرحله سلول‌های استرومایی تخمدان لایه تکای داخلی را بوجود می‌آورند. تکثیر سلول‌های گرانولوزا در این مرحله وابسته به FSH است.

۱-۱-۴. فولیکول‌های آنترال اولیه[2]

این فولیکول‌ها دارای یک یا دو ناحیه کوچک از تجمع مایع فولیکولی هستند. در حالی که فولیکول‌های آنترال دارای یک حفره آنتروم بزرگ می‌باشند. فولیکول‌های پیش تخمک‌گذاری حلقه‌ای از سلول‌های کمولوسی اطراف تخمک دارند. بلوغ هسته‌ای تخمک اولیه طی دو مرحله صورت می‌گیرد ابتدا تخمک اولیه میوز را از سر گرفته و در متافاز تقسیم دوم میوزی متوقف می‌شود در این مرحله تخمک ثانویه تشکیل می‌گردد. تخمک ثانویه در زمان تخمک‌گذاری در صورتی که در معرض اسپرم قرار گیرد دومین تقسیم میوز را کامل کرده تخمک بالغ را بوجود می‌آورد. همزمان با بلوغ هسته‌ای، غشای پلاسمایی و سیتو پلاسم تخمک نیز جهت لقاح و تکوین جنین تغییراتی نشان می‌دهند. بلوغ سیتوپلاسمی تخمک اغلب بصورت قطبیت و نحوه توزیع اندامک‌ها بخصوص گرانول‌های قشری توصیف می‌شود[۳].

۱-۲. تکوین فولیکول‌ها در شرایط in-vitro

بر اساس اهداف مختلف مطالعه سیستم‌های کشتی مختلفی معرفی شده اند.

۱-۲-۱. کشت تخمدان

کشت کامل تخمدان اولین بار در سال ۱۹۳۸ توسط Martinovitch به کار برده شد[۴].

1- Secondary follicle
2- Early antral follicle

کشت تخمدان(کشت عضو) جهت تخمدان‌های بدست آمده از جنین یا نوزاد جوندگان به کار می‌رود. این تخمدان‌ها به اندازه‌ای کوچک هستند که می‌توان آن‌ها را بطور کامل در محیط کشت قرار داد. این روش برای مطالعه توالی تشکیل فولیکول و نیازهای هورمونی مربوط به آن مورد استفاده قرار می‌گیرد. از دیگر کابردهای کشت عضو مطالعه فاکتورهایی است که ورود فولیکول‌های بدوی را به منبع در حال رشد تحت اثر قرار می‌دهند[۵].

تکوین فولیکول‌های تخمدانی با تشکیل فولیکول‌های بدوی آغاز می‌شود. فرایند تشکیل فولیکول‌های بدوی و فاکتورهای موثر بر آن بوسیله کشت تخمدان بدست آمده از جنین بررسی می‌شود[۶].

Yu و همکاران در سال ۱۹۹۹تخمدان‌های بدست آمده از جنین هامستر را به مدت ۱۶روز کشت دادند. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر دوزهای مختلف انسولین در وقایع اولیه تکوین فولیکولی بود[۷].

در مطالعه گونه‌های بزرگتر، کشت تخمدان با مشکل مواجه می‌شود. جهت رفع این مشکل قطعات کوچکی از قشر تخمدان در ابعاد یک میلی متر مکعب در کشت استفاده می‌شود. این روش برای مطالعه فعال‌سازی و رشد فولیکول‌های فعال شده در گاو، میمون و انسان به کار گرفته می‌شود[۸].

مزیت کشت تخمدان نسبت به فولیکول‌های جداسازی شده حفظ ساختمان فولیکول بصورت دست نخورده است. رفتار فولیکول‌ها در تخمدان کامل نسبت به فولیکول‌های ایزوله متفاوت است. ارتباطات متقابل جمعیت‌های فولیکولی و انواع سلول‌ها در کشت تخمدان قابل ارزیابی است. با این حال نفوذ مواد غذایی و گازها اندازه تخمدان‌های قابل کشت را محدود می‌کند. برش تخمدان‌های بزرگتر به قطعات کوچکتر می‌تواند این مشکل را برطرف سازد اگرچه ممکن است طی برش بافت دچار صدمه شود یا فولیکول‌های بزرگتر از دست بروند[۹].

Eppig و همکاران در سال ۱۹۹۶پس از کشت تخمدان‌های نوزاد موش به صورت کشت عضو به مدت هشت روز، فولیکول‌های رشد یافته را جداسازی و به مدت دو هفته کشت دادند[۱۰].

Jin و همکاران در سال ۲۰۰۹ از یک سیستم کشت دو مرحله‌ای استفاده کردند. ابتدا تخمدان‌های موش‌های یک هفته به مدت چهار روز کشت داده شدند سپس فولیکول‌های ثانویه از تخمدان‌های کشت شده جداسازی و کشت شدند[۱۱].

۱-۲-۲. کشت فولیکول‌های ایزوله

روش دیگر کشت فولیکول‌های ایزوله است که به روش آنزیمی یا مکانیکی جداسازی شده انـد. مزیـت این روش نسبت به کشت تخمدان ارزیابی فولیکول‌هـا بطـور جداگانـه اسـت. در ایـن روش مـی‌تـوان نیازهای فولیکول‌ها در هر مرحله را ارزیابی کرد. با این حال ممکن است طـی جداسـازی فولیکـول‌هـا قابلیت حیات و تمامیت فولیکول‌ها صدمه یابد. کشت فولیکول‌های بدوی و پره آنترال جداسازی شـده در موش موفقیت آمیز بوده و به تولید تخمک بالغ و تولد زنده منجر شده است[۱۲].

امروزه بیشتر در کشت *in-vitro* از فولیکول‌های پره آنترال حساس به گنادوتروپین استفاده می‌کنند که اگر گنادوتروپین‌ها به در محیط کشت اضافه شوند رشد فولیکولی بهتری را نشـان دهنـد. بعـلاوه حـداقل آترزی و آپوپتوز سلول‌های گرانولوزا در فولیکول‌های پره آنترال در *in-vivo* اتفاق می‌افتد[۱۳-۱۴].

۱-۳. فاکتورهای موثر در تکوین فولیکول

تکوین فولیکول می‌تواند به سه مرحله مستقل از گنادوتروپین، پاسخ دهنده به گنادوتروپین و وابسته بـه گنادوتروپین تقسیم شود. گروهی از فاکتورهای موضـعی مشـتق از تخمـک و سـلولهای سـوماتیک یـک آبشار تکوینی داخل فولیکول تشکیل می‌دهند. همچنان که فولیکول رشد می‌کند بطور پـیش رونـده بـه گنـادوتروپین‌هـای هیپـوفیزی پاسـخ بیشـتری مـی‌دهـد. در ایـن مرحلـه فاکتورهـای موضـعی عمـل گنادوتروپین‌ها را تنظیم می‌کنند بطوری که سرنوشت هـر فولیکـول بـه وجـود تعـادل بـین فاکتورهـای موضعی و گنادوتروپین‌ها وابسته است. از مرحله‌ای که فولیکول‌های بدوی شروع بـه رشـد مـی‌کننـد تـا مرحله انتهایی رشد فولیکول‌های پره آنترال مستقل از گنادوتروپین‌ها است و توسط فاکتورهای موضـعی کنترل می‌شود. از مرحله آنترال کوچک تا آنترال بزرگ، مرحله وابسته به گنادوتروپین‌هـا اسـت و بـدون یک غلظت معین از گنادوتروپین‌های هیپوفیزی امکان پـذیر نیسـت. بـین ایـن دو مرحلـه فولیکـول بـه گنادوتروپین‌ها پاسخ می‌دهد اما برای رشد و تکوین نیازی به آن ندارد. مرحله مستقل از گنادوتروپین بـه دلیل مشکلاتی که در جداسازی فولیکول‌های ریز وجود دارد، کمتر بررسی شده است[۱۵].

FSH نقش اصلی در ر شد و تمایز فولیکول‌ها دارد و به تنهـایی بـدون وجـود LH مـی‌توانـد رشـد