Applied Biology, Volume 11, Issue 42, 2021

Research Article

Studying the effect of co-culture system of Mesenchymal Stem Cells on development of follicles in mice ovary in vitro[1]

Ali Mohammadeini | PhD. Student, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. mohammadeini.a@mail.um.ac.ir
Ahmad Ali Mohammadpour | Proffesor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran **(Corresponding Author)**. mohammadpoor@um.ac.ir
Abbas Parham | Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. parham@um.ac.ir

Abstract

Objective: Many researchers are trying to clarify necessary hormonal factors for structural distinguishability and functional activities of ovarian tissue by using cell culture and tissue culture techniques. Hence, in this study, we examined ovarian tissue culture on mesenchymal stem cells isolated from cultured adipose tissue.

Materials and methods: In this study, mesenchymal stem cells became isolated from adipose tissue of the mouse. After five days and monolayer formation of Mesenchymal stem cells, obtained ovarian was placed on the cultured Mesenchymal stem cells' monolayer for 7 days.

Results: The results of this study show that numbers of mature follicles for treat group compared to the control group were 61/1±2/2 and 38/1±1/9, respectively which had a significant increase compared to control group (P<0/05). This shows the efficiency of tissue culture in co-culture with Mesenchymal stem cells. The real-time PCR studies also confirmed the decrease in the BAX genes in treatment Groups to compare the control group (P<0/05). According to the results yielded regarding the number and quality of obtained follicles, it seems that this method is efficient and of high importance in producing mature follicles, and subsequently high quality oocytes and embryo.

Keywords: Tissue culture, Cell culture, Ovarian tissue, Mesenchymal stem cells, Mice.

1. **Received:** 2020/12/26 ; **Accepted:** 2021/06/21
**Copyright © the authors
http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

بیولوژی کاربردی، دوره ۱۱، شماره ۴۲، تابستان ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

بررسی اثر هم‌کشتی سلول‌های بنیادی بر بافت تخمدان موش سوری[1]

علی محمدعینی | دانشجوی دکتری، گروه بافت‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. Mohammadeini.a@mail.um.ac.ir
احمدعلی محمدپور | استاد، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران (**نویسنده مسئول**). mohammadpoor@um.ac.ir
عباس پرهام | دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. parham@um.ac.ir

چکیده

هدف: با استفاده از تکنیک‌های کشت سلول و کشت بافت، بسیاری از محققان برای روشن کردن عوامل هورمونی لازم برای تمایز ساختاری و فعالیت‌های عملکردی بافت تخمدان تلاش می‌کنند. لذا، مطالعه حاضر به بررسی کشت بافت تخمدان بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی پرداخته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی محوطه بطنی موش سوری جدا گردید. پس از پنج روز و تشکیل تک لایه‌ای از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تخمدان‌های گرفته شده به مدت هفت روز بر روی سلول‌های کشت شده مزانشیمی قرار گرفت. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Spss تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که تعداد فولیکول‌های بالغ گروه تیمار نسبت به گروه کنترل به ترتیب (۱/۹±۳۸/۹، ۲/۲±۶۱/۱) بوده است که در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است ($P<0/05$). این نتیجه نشان‌دهنده موثر بودن کشت بافت در هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد. همچنین در بررسی داده‌های مربوط به آزمایش RT-PCR مقدار ژن BAX کاهش چشمگیری در گروه مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل داشته است ($P<0.05$). با توجه به نتایج به دست آمده از تعداد و کیفیت فولیکول‌های بدست آمده به نظر می‌رسد این روش در تولید فولیکول‌های بالغ و متعاقب آن اووسیت‌های با کیفیت و تولید جنین کارآمد و دارای اهمیت فراوانی باشد.

کلیدواژه‌ها: کشت بافت، کشت سلول، بافت تخمدان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، موش سوری.

---

۱. **پژوهش حاضر مستخرج از:** طرح پژوهشی تحت عنوان «**بررسی تاثیر سیستم هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و فاکتور رشد شبه انسولینی-۱ بر روی تکوین فولیکول‌های تخمدان موش سوری**»، مصوب در دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد به شماره ۴۷۲۵۷ می‌باشد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۰۶ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۰/۰۳/۳۱

۱. مقدمه

زنده نگاه داشتن و رشد دادن بافت زنده بیرون از بدن موجود را کشت می‌گویند. کشت اندام به معنی جداسازی و رشد دادن اندام در شرایط آزمایشگاهی است، به طوری که ارتباط آناتومیکی و عملکردی آن در محیط کشت نیز حفظ گردد و اندام جدا شده دقیقاً شبیه اندامی می‌باشد که در محیط طبیعی[1] است (۲).

عبارت سلول‌های بنیادی اولین بار توسط متخصصین بافت‌شناسی بکار گرفته شد و مدتهای زیادی است که از این عبارت به منظور معرفی دسته‌ای از سلول‌ها با ویژگی‌ها و توانمندی‌های خاص استفاده می‌شود. اخیراً این متخصصین توصیه کرده‌اند که عبارت سلول‌های احیاء کننده و یا سلول‌های جبرانی، جایگزین سلول‌های بنیادی گردد. از بین سلول‌های بنیادی که تا به امروز مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد خود و نیز دارا بودن قابلیت انتقال ژن و اطلاعات ژنتیکی به نسل بعد، از توجه خاصی برخوردار بوده و به عنوان کاندیدای مناسبی جهت مطالعات و دستکاری‌های ژنتیکی، تنظیم روند بیان ژن و انتقال ژن‌های مطلوب به نسل بعد مطرح می‌باشند (۱).

سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، غلظت بالایی از عامل رشد اپیدرمی[2]، عامل رشد اندوتلیال عروقی[3]، عامل رشد تغییردهنده بتا[4]، عامل رشد شبه انسولینی[5] را بیان می‌کنند (۳).

با استفاده از تکنیک‌های کشت اندام، بسیاری از محققان برای روشن کردن عوامل هورمونی لازم برای تمایز ساختاری و فعالیت‌های عملکردی بافت تخمدان تلاش می‌کنند. در بسیاری از تحقیقات، تکنیک‌هایی را جهت کشت اندام تخمدان یا فولیکول جدا شده در شرایط آزمایشگاهی[6] به‌کار برده‌اند. همچنین به منظور درک توالی تشکیل فولیکول‌ها و شرایط هورمونی، فعال شدن فولیکول‌های غیر فعال، رشد و نمو فولیکول و ترشح آنها، کل بافت تخمدان جنین و یا نوزاد جوندگان را در سیستم‌های کشت اندام انکوبه کرده‌اند (۲).

---

1. In vivo
2. Epidermal growth factor
3. Vascular endothelial growth factor
4. Transforming growth factor beta
5. Insulin-like growth factor
6. In vitro

در تحقیق حاضر تاثیر سلول‌های مزانشیمی جدا شده از بافت چربی بر روی رشد فولیکول‌های تخمدان موش سوری مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند به محققین در مطالعات تولیدمثل و ناباروری کمک موثری نماید.

۲. مواد و روش کار

در این تحقیق تجربی، از ۴۰ سر موش نژاد NMRI با سن تقریبی ۴ تا ۶ هفته استفاده شد که با روش جابه‌جای مهره‌های گردنی کشته و سپس با استفاده از الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شدند. سپس بافت چربی از ناحیه پشت کشاله ران و محوطه شکمی موش‌ها جدا شده و در محلول استریل فسفات بافر سالین[1] شستشو گردید. سپس، تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار کلاس II، بافت چربی با اسکالپل به قطعات چند میلی‌متری بریده شد و بافت همبند و عروق خونی از آن جدا گردید. جهت تجزیه بافت چربی، آنزیم کلاژناز نوع IA (Sigma) به میزان ۱/۵ میلی‌گرم به ازای هر گرم بافت چربی استفاده شد. پس از اضافه شدن مقدار مناسب آنزیم، نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شدند. پس از اطمینان از تجزیه کامل بافت، هم حجم محلول آنزیم بکار رفته محیط کشت DMEM[2] (Gibco) حاوی FBS[3] 10% (Sigma) و Penicillin/Streptomycin (Gibco) 1% جهت خنثی کردن فعالیت آنزیم به سوسپانسیون سلولی اضافه گردید. در ادامه کار سوسپانسیون در لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتری به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰rpm سانتریفوژ شده و مایع رویی همراه با سلول‌های چربی یا آدیپوسیت تخلیه گردید. به رسوب سلولی حاصله ۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM + %10FBS افزوده شد و جهت تجزیه گلبول‌های قرمز موجود در رسوب سلولی، محلول بافر لیزکننده دارای کلرید آمونیم (Merck)، بیکربنات پتاسیم (Merck) و EDTA (Merck) استفاده گردید. پس از ۱۰ دقیقه هم حجم بافر لیزکننده، ۵ میلی‌لیتر مدیوم DMEM + %10 FBS اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰rpm انجام شد و پس از فیلتر کردن با فیلتر دارای منافذ با قطر ۲۰۰ میکرومتر، مجدداً با همان شرایط سلول‌ها سانتریفیوژ گردید. در مرحله پایانی، سلول‌ها در فلاسک

1. Phosphate buffered saline
2. Dullbecco’s modified eagle’s medium
3. Fetal bovine serum

۲۵ سانتی‌متر مربع در محیط کشت DMEM + %10FBS + %1penicillin/Streptomycin در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد، CO2 ۵% و رطوبت نسبی کشت داده شد (۱۹).

پس از گذشت چند ساعت، سلول‌های تک هسته‌ای شروع به چسبیدن به کف فلاسک کردند. با تعویض مدیوم بعد از ۲۴ساعت، سلول‌های اضافی تخلیه گردید. بدین ترتیب کشت اولیه سلول‌های جدا شده آغاز شد. پس از ۵-۴ روز، سلول‌ها تکثیر یافته و سطح فلاسک را اشغال نمودند. پس از تکثیر سلول‌ها در کشت اولیه و اشغال حداقل۶۰% کف فلاسک[1] پس از ۵-۴ روز، سلول‌ها به چند چاهک انتقال یافتند.

سلول‌های حاصل بعد از تریپسینه و سانتریفیوژ کردن در اپندورف ریخته و با PBS شسته شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. آنتی‌بادی‌های اولیه CD90 کونژوگه با PE[2] (۵۰ میلی‌لیتر فیکواریترین) و کونژوگه CD31 با FITC[3] (فلورسنس ایزوتیوسیانات) اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال قرار گرفت و برای کنترل منفی از آنتی‌بادی‌های PE-IgG2a, FITC- IgG2b استفاده گردید. در مرحله بعد سلول‌ها پس از شستشو با PBS به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. سپس به سلول‌های بافر فیکس‌کننده فرمالین ۱ درصد اضافه شد و با دستگاه فلوسیتومتری (Beckton Dickinson ,Germany) آنالیز شدند (۲۰).

تعداد۴۰ جفت تخمدان از ۴۰ سر موش سوری جنس ماده ۵ هفته‌ای جدا و پس از جدا کردن چربی از آنها و ۲ بار شستشو در محلول نمکی بالانس شده هنکس[4] (HBSS)، یکی از تخمدان‌ها به ظروف مخصوص کشت اندام منتقل و یکی دیگر جهت بررسی نمونه کنترل در محلول بوئن فیکس شد. در فاز بین محیط کشت مایع حاوی (DMEM، ۱۰% FBS، ۳ mg/ml BSA، ۱% پنی سیلسن- استرپتو مایسین) و هوا ، درون انکوباتور CO2 دار ۵% و ۹۵% هوا در دمای ۳۷±۰/۱ درجه سانتیگراد به مدت ۶ روز انکوبه شد. محیط کشت در هر روز یک‌بار تعویض گردید.

1. Confluent
2. Phicoerythrin
3. Fluorescein isothiocyanate
4. Hank’s balanced salt solution

ارزیابی میکروسکوپی و شمارش فولیکول‌های سالم و آسیب دیده تخمدان، تحت رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین و بررسی ژن‌های BAX و GAPDH به روش RT-PCR انجام شد (جدول ۱).

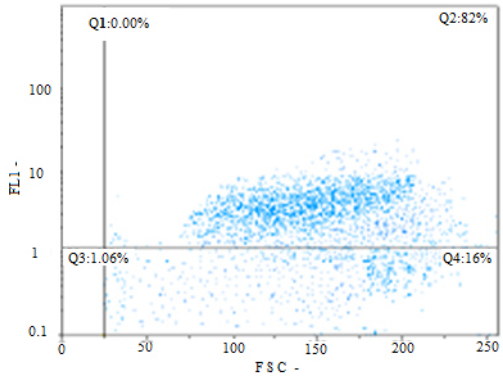
جدول شماره۱- توالی پرایمر، ترتیب و درجه ذوب

ژن	پرایمر	طول زنجیره	درجه حرارت	تعداد توالی
BAX	F: 5’ TTCACAGGTTGGCATTAGG 3’ R: 5’ TCAGCCCATCTTCTTCCAG 3’	123	57	XM_011250780.2
GAPDH	F: 5’ AAGGTCATCCCAGAGCTGAA 3’ R: 5’ CTGCTTCACCACCTTCTTGA 3’	222	58	XM_017321385.1

برای پردازش داده‌ها از نرم‌افزار SPSS و از آزمون Tجفت شده برای مقایسهٔ میانگین داده‌ها استفاده شد و$P<0/05$ معنی‌دار تلقی گردید.

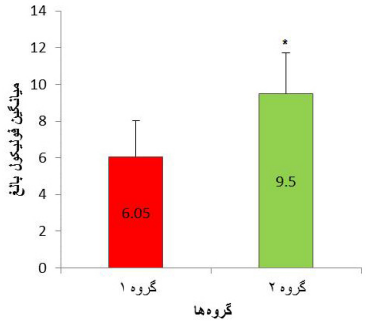
۳. نتایج

جهت اثبات ماهیت مزانشیمی بودن این سلول‌ها، علاوه بر خاصیت چسبندگی آنها به ظرف کشت، یکی دیگر از راه‌های شناسایی آنها، استفاده از مارکر سطحی می‌باشد که بعد از پاساژ اول و جدا شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی از سایر سلول‌ها، به روش فلوسیتومتری بررسی شد. در این بررسی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از چربی با مارکر CD90 بررسی شدند. نتایج در مورد مارکرCD90 بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی این مارکر را به میزان ۸۲ درصد بیان کردند (شکل۱).

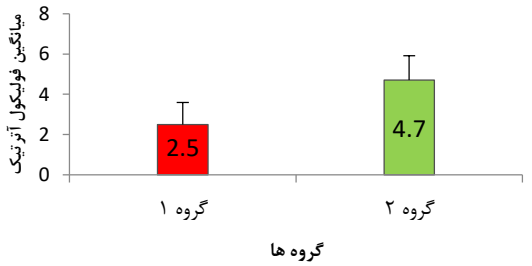


شکل شماره ۱- سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی که مارکر سطحی CD90 را ۸۲ درصد بیان می‌کنند.

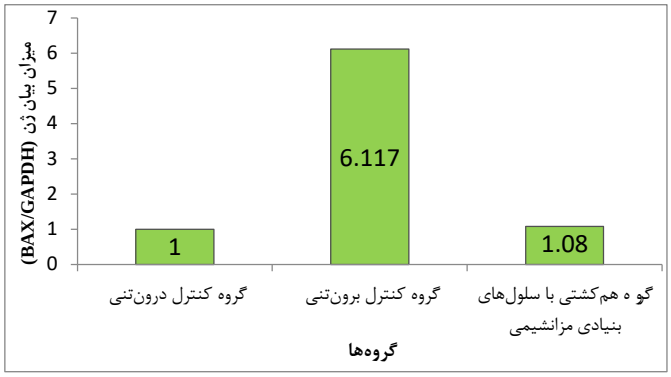
طبق نتایج بدست آمده، در مقایسهٔ میانگین تعداد فولیکول‌های اولیه و ثانویه در گروه کنترل و هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p<0.05$)، ولی مقایسه میانگین تعداد فولیکول‌های بالغ در گروه تحت تیمار با سلول‌های بنیادی مزانشیمی نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P<0.0$) (نمودار۱). در بررسی فولیکول‌های اترتیک بین گروه کنترل و تحت تیمار با سلول‌های بنیادی نیز افزایش قابل ملاحظه‌ای در گروه تیمار مشاهد گردید (نمودار۲). افزایش تعداد فولیکول‌های بالغ، حاکی از کارآمد بودن محیط کشت نسبت به تکوین فولیکول‌های ثانویه بوده است. همچنین آنالیز مربوط به بررسی بیان ژن BAX در گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد که میزان بیان این ژن در گروه مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل درون و برون تنی حاکی از کاهش محسوس آن در گروه تیمار می‌باشد که نشان‌دهنده کاهش آپوپتوز در این گروه است (نمودار۳). اَشکال ۲ و ۳ انواع فولیکول‌های تخمدانی را در مقاطع بافت‌شناسی نشان می‌دهند.



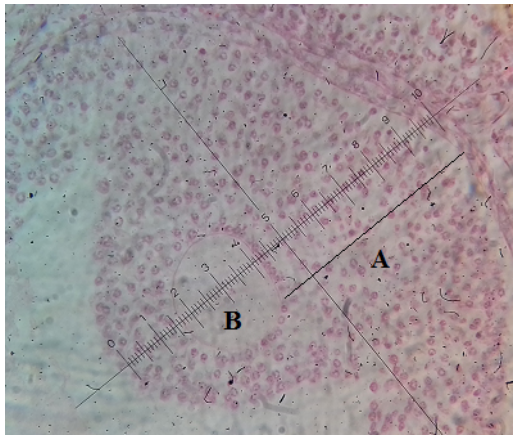
نمودار شماره ۱- مقایسه میانگین فولیکول‌های بالغ در گروه ۱ (کنترل) و گروه ۲ (تیمار با سلول‌های بنیادی مزانشیمی)



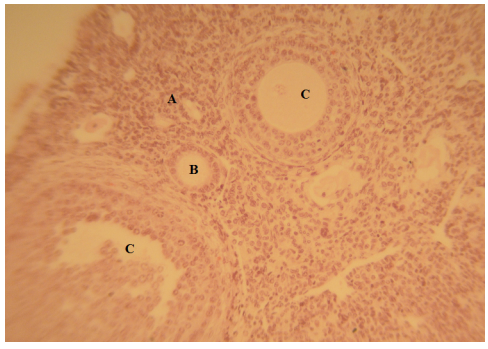
نمودار شماره ۲- مقایسه میانگین فولیکول‌های اترتیک در گروه ۱ (کنترل) و گروه ۲ (تیمار با سلول‌های بنیادی مزانشیمی)



نمودار شماره ۳- مقایسه بررسی میزان بیان ژن BAX در گروه‌های کنترل و هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی



شکل شماره ۲- کومولوس اووفروس در فولیکول بالغ به همراه لایه گرانولوزا (بزرگنمایی ۲۰۰X با رنگ‌آمیزی H&E)
A: لایه گرانولوزا. B : اووسیت به همراه توده کومولوس



شکل شماره ۳- فولیکول اولیه، ثانویه و گراف در کنار یکدیگر (بزرگنمایی ۵۰X با رنگ‌آمیزی H&E)
A: فولیکول اولیه. B: فولیکول ثانویه. C: فولیکول بالغ

٤. نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر اثر هم‌کشتی بافت تخمدان با سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت و محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت که در این راستا جهت ارتقای سیستم‌های کشتی و کشت بهتر بافت و اندام‌های مختلف بدن تلاش‌های بسیاری صورت گرفته است. همچنین استفاده از تکنیک‌های مختلف جهت کشت موفق بافت تخمدان برای بیش از ۶۰ سال مورد بررسی قرار گرفته است (۵). مطالعات بر روی بافت تخمدان موش، همستر، گاو و انسان انجام شده و موفق به ۵۰ روز انکوبه تخمدان بدون نشانه‌هایی از نکروز شده‌اند (۶). اکثر سیستم‌های کشت، قرار دادن بافت تخمدان بر روی یک محافظ فیزیکی در چاهک‌های محیط کشت[1]، ظرف، یا شیشه ساعت، با حداقل غوطه‌وری در آن است، و دسترسی به مقدار کافی از محیط کشت زیر محافظ امکان‌پذیر است. شرایط انکوباسیون ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO2 می‌باشد، هرچند مطالعات مختلف بهینه‌سازی شرایط کشت را گزارش کرده‌اند (۷).

سیستم‌های کشت کل تخمدان یا قطعه‌ای از تخمدان، کاربردهای زیادی ازجمله تعیین قابلیت سنتزاستروئید در بافت کشت داده شده را دارند. این نوع آزمایشات در گونه‌های مختلف منجر به درک بهتری از زمان رشد و نمو و قابلیت آنزیمی تخمدان و پاسخ سلول‌های تکا و گرانولوزا به گونادوتروپین‌ها از زمان رشد جنین تا زمان بلوغ و بزرگسالی می‌گردد (۸). نظارت بر رشد و نمو فولیکول یا تغییر در تولید استروئیدها و شناسایی زمان بیان گیرنده‌های FSH و LH در طول رشد و نمو تخمدان در سیستم کشت بافت مورد بررسی قرار گرفته‌اند. همچنین اثرات FSH، LH، و تستوسترون بر استروئیدوژنز در رت مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که محرک تولید پروژسترون و استرادیول، حمایت‌کننده حضور گیرنده گنادوتروپین‌ها می‌باشند (۱۰-۸) .

سلول‌های بنیادی مزانشیمی بالغ دارای پتانسیل رشد و تمایز به کندروسیت‌ها هستند. همچنین مطالعات قبلی به روشنی نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث مهار پاسخ ایمنی سلولی می‌شوند. بنابراین، آنها به عنوان کاندیدهای ایده‌آلی برای هم‌کشتی به حساب می‌آیند (۱۳-۱۱).

در مطالعه حاضر نیز با توجه به نتایج بدست آمده مشخص گردید که هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی به میزان قابل توجهی اندازه سلول‌های تکا و تعداد فولیکول‌های گراف را افزایش

1. Culture wells

داده است ($P<0.05$) .

مطالعات در داخل بدن و در شرایط آزمایشگاهی اثرات سلول‌های بنیادی را برای القای رشد فولیکول آنترال و تخمک‌گذاری در قطعات تخمدان کشت داده شده موش مشخص کرد.

طغرایی و همکاران (۲۰۱۱)، گزارش کردند که تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بافت‌های تخمدان سرطانی شده در شرایط درون تنی، سبب افزایش تعداد تخمک بالغ، پیشرفت میوز و القای تخمک‌گذاری می شود. نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر نیز پتانسیل مذکور را تایید می‌نماید (۱۴).

تخمدان انسان دارای گیرنده‌های انسولین است که نقش این پپتید را در تنظیم تخمدان نشان می‌دهد. مطالعات برون‌تنی نشان داده‌اند که انسولین می‌تواند به طور مستقیم سبب تحریک تولید آندروژن توسط استرومای تخمدان شود (۱۸-۱۵). علاوه بر این، یک سیستم کشت تخمدان خوب که می‌تواند شرایط تخمدان را تقلید کند، جهت مطالعه اووژنز و فولیکولوژنز نقش محوری و اساسی دارد و عرضه نامحدودی را برای استفاده پزشکی از اووسیت ارائه می‌کند. از حدود ۲۰ سال گذشته، اووژنز موش با استفاده از تکنولوژی کشت آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفته است. تخمک‌های اولیه در فولیکول‌های پریموردیال تخمدان موش تازه متولد شده قادر به وارد شدن به دومین تقسیم میوز و بلوغ کامل میوزی در شرایط برون‌تنی می‌باشند. اخیراً اووژنز موش در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از کشت در شرایط برون‌تنی، در چندین آزمایشگاه مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۱-۱۹).

۵. تقدیر و تشکر

از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به منظور فراهم نمودن شرایط لازم جهت اجرای این پروژه و کارشناس آزمایشگاه بافت‌شناسی آقای پورادیبی تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Lanza R & Atala A. *Essential of Stem Cell Biology*.Third Edition, Elsevier Academic Press, 2014.
2. Eppig, JJ & O'Brien, MJ. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology of Reproduction*.1996; 54(1): 197-207.
3. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H & Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006; 24: 1294-301.
4. Babu, N & Nair NB. Follicular atresia in Amblypharyngodon Chakaiensis. *Z. mikrosk. - anat. Forsch*. 1983; 97: 499-504.
5. Martinovitch P. The development in vitro of the mammalian gonad. Ovary and ovogenesis. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. *Biological Sciences*. 1938; 125 (839): 232-249.
6. Hennet, ML & Combelles C. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *The International journal of developmental biology*. 2012; 56(3): 819-831.
7. Blandau RJ, Warrick E & RE. Rumery: In vitro cultivation of fetal mouse ovaries. *Fert Steril*.1965; 16: 705-715.
8. Klawitter M & et al. Curcuma DMSO extracts and curcumin exhibit an anti-inflammatory and anti-catabolic effect on human intervertebral disc cells, possibly by influencing TLR2 expression and JNK activity. *Journal of Inflammation*. 2012; 9: 29.
9. Terada N, Kuroda H, Namiki M, Kitamura Y & Matsumoto K. Augmentation of aromatase activity by FSH in ovaries of fetal and neonatal mice in organ culture. *J Steroid Biochem*.1984; 20: 741-745.
10. Neal P & Baker TG. Response of mouse ovaries in vivo and in organ culture to pregnant mare's serum gonadotrophin and human chorionic gonadotrophin. I Examination of critical time intervals. *J Reprod Fertil*. 1973; 33: 399-410.
11. Neal P & Baker TG. Response of mouse ovaries in vivo and in organ culture to pregnant mare's serum gonadotrophin and human chorionic gonadotrophin. II: Effect of different doses of hormones. *J Reprod Fertil*. 1974; 37: 399-404.
12. Funkenstein B, Nimrod A & Lindner HR. The development of steroidogenic capability and responsiveness to gonadotrophins in cultured neonatal rat ovaries. *Endocrinology*. 1980; 106: 98-106.
13. Henrotiny AL & et al. Mobasher, Biological actions of curcumin on articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2010; 18, 141-149.
14. Raphael L & et al. Mesenchymal cell interaction with ovarian cancer cells induces a background dependent pro-metastatic transcriptomic profile. *Journal of Translational Medicine*. 2014; 12: 59.
15. Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell*

Res. 2005; 305: 33-41.
16. Toghraie FS & et al. Treatment of osteoarthritis with infrapatellar fat pad derived mesenchymal stem cells in Rabbit. Knee. 2011; 18: 71-5.
17. Voge J & et al. Effect of insulin-like growth factors (IGF), FSH, and leptin on IGF-binding-protein mRNA expression in bovine granulosa and theca cells: quantitative detection by real-time PCR. *Peptides*. 2004; 25(12): 2195-2203.
18. Nestler JE. Insulin regulation of human ovarian androgens. *Human reproduction*. 1997; 12 (suppl 1): 53-62.
19. Jin SY, & et al. A novel two-step strategy for in vitro culture of early-stage ovarian follicles in the mouse. *Fertility and sterility*. 2010; 93(8): 2633-2639.
20. Silva J, & et al. Control of oestradiol secretion and of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid accumulation by FSH involves different intracellular pathways in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. *Reproduction*. 2006; 132(6): 909-917.
21. Acevedo N & Ding J. Insulin signaling in mouse oocytes. *Biology of Reproduction*. 2007; **77**(5): 872-879.

استناد به این مقاله

محمدعینی، علی؛ محمدپور، احمدعلی، پرهام، عباس (۱۴۰۰). بررسی اثر هم‌کشتی سلول‌های بنیادی بر بافت تخمدان موش سوری. *بیولوژی کاربردی*، دوره ۱۱(۴۲)، ص ۳۵-۴۶.