[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1525]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:31 IRST on Monday January 25th 2021

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و هفتم، شماره پنج، مرداد ۱۳۹۸
تاریخ دریافت:۱۳۹۷/۵/۱۵
تاریخ پذیرش:۱۳۹۷/۷/۲۱

جداسازی وکشت سلول‌های مشتق ازاندومتررحم انسان به عنوان مدل آزمایشگاهی انسانی در مطالعات لانه‌گزینی در آینده

فاطمه اکیاش[۱]، مهدیه جاویدپو[۲]، عباس‌افلاطونیان[۳]، بهروز افلاطونیان[۴*]

مقاله پژوهشی

مقدمه: بازسازی ماهیانه بافت اندومتر رحم انسانی، تحت تأثیر تغییرات هورمونی، تاییدکننده وجود جمعیتی از سلول‌ها در لایه قاعده‌ای اندومتر می‌باشند که رحم را جهت لانه‌گزینی مناسب، آماده می‌کنند. این جمعیت سلولی تحت عنوان سلول‌های بنیادی/ استرومایی شناخته شده‌اند. مطالعه حاضر با هدف جداسازی بافت اندومتر رحم انسان جهت کشت سلول‌های بنیادی/ استرومایی مزانشیمی در محیط آزمایشگاهی انجام پذیرفت.

روش بررسی: در این مطالعه، بخشی از بافت رحم، از بیوپسی یک بیمار که به مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری پژوهشکده علوم تولیدمثل یزد مراجعه کرده بودند، پس از کسب رضایت‌نامه جداسازی شده و به مرکز تحقیقات بیولوژی سلول‌های بنیادی انتقال یافت. تکه‌های بافت رحم پس از مجاورت با آنزیم، روز بعد شستشو داده شد و سلول‌های جداسازی شده کشت داده شدند.

نتایج: سلول‌های بافت اندومتر رحم انسانی بعد از قرارگیری در معرض آنزیم به‌صورت مکانیکی جداسازی شده و در شرایط آزمایشگاهی کشت داده شدند. سلول‌های حاصل از لحاظ مورفوفنوتیپی مورد بررسی قرار گرفتند که شباهت بسیار زیادی با سلول‌های بنیادی/ استرومایی مزانشیمی داشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج این کار، مطالعات قبلی جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی/ استرومایی مزانشیمی را تایید می‌کند. بافت اندومتر بخشی از رحم می‌باشد که منبع سلول‌های بنیادی/ استرومایی مزانشیمی با توانایی خود نوزایی و تمایز تحت تأثیر سیکل ماهیانه در طول زندگی طبیعی خانم‌ها است. در این راستا، از این سلول‌ها می‌توان در آینده به‌عنوان روشی نوین در پزشکی بازساختی و درمان بیماران نابارور، از جمله سقط مکرر و حل مشکلات رحم اجاره‌ای استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: سلول درمانی، سلول‌های بنیادی/ استرومایی مزانشیمی اندومتر، پزشکی بازساختی، رحم.

ارجاع: اکیاش فاطمه، جاویدپو مهدیه، افلاطونیان عباس، افلاطونیان بهروز. **جداسازی وکشت سلول‌های مشتق ازاندومتررحم انسان به عنوان مدل آزمایشگاهی انسانی در مطالعات لانه‌گزینی در آینده.** مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۸؛ ۲۷ (۵): ۹۰-۱۵۸۴.

۱- دانشجوی دکترای تخصصی بیولوژی تولیدمثل، مرکز تحقیقات بیولوژی سلول‌های بنیادی، پژوهشکده علوم تولیدمثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران.

۲- کارشناس بخش ناباروری، بیمارستان مادر یزد، یزد، ایران.

۳- استاد تمام گروه زنان زایمان و نازایی، مرکزتحقیقاتی درمانی ناباروری، پژوهشکده علوم تولیدمثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران.

۴- استادیارگروه علوم و فناوری های نوین پزشکی، مرکزتحقیقات بیولوژی سلول‌های بنیادی، پژوهشکده علوم تولیدمثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران.

* (نویسنده مسئول)؛ تلفن:۰۹۱۳۳۵۱۳۲۶۸، پست الکترونیکی:b.aflatoonian@ssu.ac.ir، کد پستی :۸۹۱۶۸۷۷۳۹۱.

[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1525]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:31 IRST on Monday January 25th 2021

مقدمه

فرضیه بازسازی اندومتر در هر سیکل قاعدگی از طریق فعالیت سلول‌های بنیادی مقیم در بافت رحم اولین بار براساس مطالعات هارت من و همکارانش در سال ۱۹۴۴ بر روی میمون صورت گرفت که بازسازی رحم را پس ازجدا کردن اندومتر از رحم گزارش کردند (۱). جهت تایید این فرضیه مطالعات دیگری توسط پادیکولا و همکارانش (۲,۳) انجام شد که وجود سلول‌های بنیادی را در اندومتر گزارش کردند. این محققین عنوان کردند، لایه قاعده‌ای در حقیقت لایه زاینده‌ای برای فعالیت و تکثیر سلول‌های اپی‌تلیال است که در دوره بعد از ریزش باقی مانده و توانایی ساخت مجدد لایه عملکردی را دارد. این مطالعات نیز بر روی میمون انجام گرفته که سیکل قاعدگی آن مشابه انسان است و در حقیقت این مطالعات پایه‌ای شد جهت سوق دادن بررسی‌ها بسمت وجود جمعیت سلول‌های بنیادی در بافت اندومتر انسانی و اینکه لایه قاعده‌ای در اندومتر انسانی نیز می‌تواند منبعی برای حضور این سلول‌ها باشد. مطالعه کلینیکی که توسط ترسرا و همکارانش در سال ۱۹۹۹ بر روی خانم‌هایی که تحت جراحی، اندومتر آنها به‌طورکامل برداشته شده بود، انجام گرفت، حاکی از آن بود که لایه عملکردی توانست خود را بازسازی کند (۴).

اگر چه گزارشاتی مبنی بر حضور سلول‌های بنیادی در رحم وجود دارد اما مکان و منشا این سلول‌ها هنوز ناشناخته باقی مانده است. با وجود این ابهامات، احتمالاتی از منشا این سلول-ها عنوان شده است:

۱- این امکان وجود دارد که سلول‌های حاضر، بقایای سلول‌های بنیادی اپی‌تلیالی و مزانشیمی دوران جنینی باشند که در اندومتر باقی‌مانده و در دوران بزرگسالی به تکثیر خود ادامه می‌دهند (۵).

۲- احتمال دیگر را می‌توان از سلول‌های بنیادی با منبع خونی مانند مغز استخوان در نظر گرفت که اندومتر را، هم در دوران قاعدگی و هم بروز آسیب حمایت می‌کند (۶).

۳- ترکیبی از دو مورد فوق نیز می‌تواند امکان‌پذیر باشد (۷).

هم‌چنین شناسایی سلول‌های بنیادی در اندومتر از یک سو به‌دلیل جمعیت کوچک این سلول‌ها در اندومتر و از سوی دیگر به‌دلیل قطعی نبودن مارکرهای سطحی اختصاصی امری دشوار است. از این رو برای تشخیص این جمعیت سلولی می‌توان از خواص عملکردی آن‌ها، مانند: توانایی تشکیل کلونی، پتانسیل تکثیر سلول‌ها و ظرفیت آنها برای تمایز به یک یا چندین رده سلولی استفاده کرد (۸). مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۸، سلول‌های مزانشیمی را از خون قاعدگی جداسازی نموده و کشت داده است. این گروه ظاهر دوکی شکل سلول‌ها را به عنوان الگویی برای سلول‌های مزانشیمی تایید نموده است (۹). البته این را باید در نظر داشت که اینگونه ارزیابی‌ها تنها دلالت بر وجود سلول‌ها دارد ولی نمی‌تواند شاهدی بر جایگاه مشخص آنها باشد. از این رو در این مطالعه، با توجه به نقش سلول‌های بنیادی در بازسازی اندومتر و پیشرفت تحقیقات در این زمینه، سلول‌های مشتق از بافت اندومتر رحم انسان بعد از جداسازی، درفلاسک محتوی محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی (DMEM/10%FBS) به‌منظور تکثیر برای انجام مطالعات بعدی،کشت و پاساژ داده شدند.

روش بررسی

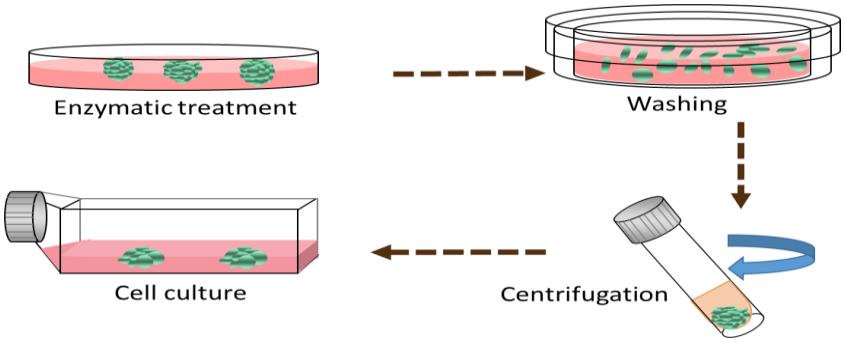
در این مطالعه از یک بیمار مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک بعد از دریافت رضایت‌نامه، بافت اندومتر گرفته شد. بعد از دریافت بافت، مراحل جداسازی و کشت سلول‌ها به شرح زیر انجام پذیرفت.

آماده سازی بافت و جداسازی سلول‌ها

همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، ابتدا نمونه بافتی دورن محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی (DMEM/10%FBS) به همراه ۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک و ضدقارچ جمع‌آوری شد. سپس بلافاصله به مرکز تحقیقات بیولوژی سلول‌های بنیادی، جهت جداسازی سلول‌ها انتقال داده شد. جهت جداسازی آنزیمی و مکانیکی اندومتر از میومتر، بافت به مدت یک شبانه‌روز در آنزیم کلاژناز نوع ۱ قرار گرفت. بعد از این مدت زمان، بافت را به‌وسیله سرنگ انسولین چندین مرحله آسپیره کرده، تا به‌طور کامل سلول‌ها جدا شوند.

[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1525]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:31 IRST on Monday January 25th 2021

محلول به‌دست آمده، به دورن لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری استریل ریخته شد و به سانتریفیوژ یخچال‌دار به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه منتقل گردید. پس از اتمام سانتریفیوژ، محلول رویی رسوب سلولی دور ریخته شد، رسوب سلولی جدا شده به همراه محیط کشت تازه در فلاسک، کشت داده شد. فلاسک محتوی سلول‌ها برای کشت به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حاوی ۵ درصد CO_2 منتقل شد.



شکل ۱: شکل شماتیک از نحوه جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی/ استرومایی مزانشیمی مشتق شده از بافت اندومتر رحم انسان.

کشت سلول‌های بنیادی/ استرومایی مشتق از بافت اندومتر رحم انسان

با توجه به میزان پرشدگی کف فلاسک، سلول‌ها به‌منظور جداشدن از کف فلاسک به‌مدت ۳ دقیقه در معرض آنزیم Trypsin-EDTA قرار گرفته شدند. بعد از این مدت زمان، جهت خنثی‌سازی اثر آنزیم، محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی (DMEM/10%FBS) به سلول‌ها اضافه شد و درون لوله آزمایش استریل ریخته و به سانتریفیوژ یخچال‌دار به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه انتقال داده شد. بعد از این مدت زمان محیط رویی دور ریخته شد و به رسوب سلولی یک میلی‌لیتر محیط افزوده و درنهایت به فلاسکی که از قبل درون آن دو میلی‌لیتر محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی (DMEM/10%FBS) ریخته شده بود، اضافه شد و به درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انتقال داده شد.

ملاحظات اخلاقی

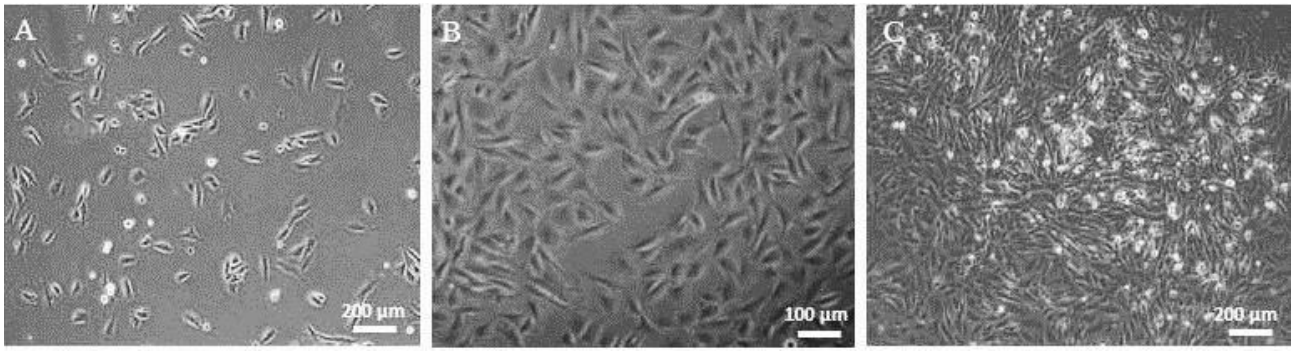
پروپوزال این تحقیق توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی تایید شده است (کد اخلاق IR.SSU.REC.1396.186).

نتایج

بررسی مورفوفنوتیپ سلول‌های مشتق شده از بافت اندومتر رحم انسان

سلول‌های جداسازی شده از بافت اندومتر انسان در محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی (DMEM/10%FBS) کشت داده شده‌اند. تصاویر سلول‌های بنیادی/ استرومایی مزانشیمی اندومتر رحم انسانی در شماره پاساژهای مختلف و روزهای کشت متفاوت به‌وسیله میکروسکوپ اینورت گرفته شده است. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، سلول‌های مشتق شده از بافت اندومتر رحم انسانی در شرایط کشت، در آزمایشگاه ظاهری کشیده و دوکی شکل مشابه سلول‌های فیبروبلاستی دارند، که از ویژگی‌های مورفوفنوتیپی سلول‌های بنیادی/ استرومایی مزانشیمی می‌باشد.

[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1525]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:31 IRST on Monday January 25th 2021



شکل۲: کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی/ استرومایی مزانشیمی به‌دست آمده از بافت اندومتر رحم انسان.

A) سلول‌های کشت داده شده بعد از جداسازی، پاساژ صفر، سه روز بعد از کشت سلول

B) ، B) پاساژ شماره۴، سه روز بعد از کشت سلول، C) پاساژ شماره ۶، چهار روز بعد از کشت سلول.

بحث

توانایی بافت رحم در بازسازی ماهیانه خود به‌منظور ایجاد محیطی مناسب برای لانه‌گزینی جنین، تأیید کننده وجود سلول‌های بنیادی/ استرومایی با توانایی خود نوزایی و تمایز می‌باشد (۱۱، ۱۰). براساس گزارشی که در سال ۲۰۰۶ به‌وسیله جامعه بین‌المللی سلول درمانی منتشر گردید، ۴ ویژگی اختصاصی برای سلول‌های مزانشیمی عنوان کردند، که بدین شرح می‌باشد، ۱) تحت شرایط استاندارد کشت، این سلول‌ها توانایی چسبیدن به کف فلاسک و سطوح پلاستیکی را دارا هستند، ۲) مارکرها سطحی از جمله، CD73, CD90, CD105 را بیان می‌کنند، ۳) عدم بیان مارکرهای هماتوپویتیک و MHCII، ۴) توانایی تمایز به بافت‌های چربی، غضروف و استخوان (۱۲). سلول‌های مزانشیمی را می‌توان از منابع بافتی مختلفی از جمله: مغز استخوان، چربی، بند ناف، جفت، مایع آمونیوتیک و اندومتر جداسازی کرد (۱۳). از این رو، در این مطالعه، سلول‌های بنیادی/ استرومایی مزانشیمی از بافت اندومتر رحم انسان، جداسازی و کشت داده شدند. مورفولوژی سلول‌های به‌دست آمده، دوکی شکل و مشابه سلول‌های بنیادی/ استرومایی مزانشیمی می‌باشند. مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ توسط فیاضی و همکارانش انجام پذیرفت، نشان دادند که سلول‌های مزانشیمی جداسازی شده و کشت داده شده از بافت اندومتر انسان ظاهری دوکی شکل با هسته گرد دارند (۱۴) که مشابه سلول‌های کشت داده شده در مطالعه حاضر هستند. در مطالعه‌ای دیگر که در سال ۲۰۱۷ به چاپ رسید، ظاهر دوکی شکل مشابه سلول‌های فیبروبلاست را در سلول‌های مزانشیمی به‌دست آمده از بافت اندومتر رحم انسانی را تأیید کردند (۱۵). اخیرا نیز مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۸ به چاپ رسید که عنوان کردند، خون قاعدگی می‌تواند به عنوان منبع مناسبی برای به‌دست آوری سلول‌های مزانشیمی در نظر گرفته شود. هم‌چنین این مطالعه ظاهر دوکی شکل و همگن سلول‌های به‌دست آمده را به‌عنوان تاییدی بر مشخصه مزانشیمی سلول‌ها گزارش نمود (۹).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، سلول‌های بنیادی/ استرومایی مزانشیمی اندومتر جداسازی، کشت و تکثیر شدند. با توجه به توانایی سلول‌های مزانشیمی در تمایز به بافت‌های مختلف مزودرمی از جمله: غضروف، استخوان و چربی از این سلول‌ها می‌توان در سلول‌درمانی و پزشکی بازساختی در آینده‌ای نزدیک استفاده نمود. با توجه به مطالعات گزارش شده، بافت اندومتر نیز می‌تواند منبعی برای به‌دست‌آوری این سلول‌ها جهت درمان به بیماران ناباروری که از نعمت فرزندآوری محروم هستند، باشد.

[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1525]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:31 IRST on Monday January 25th 2021

سپاس‌گزاری

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی تصویب شده در دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی می‌باشد. بودجه انجام این مطالعه توسط پژوهشکده علوم تولید مثل یزد و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد تامین گردیده است. بدین وسیله از تمام افرادی که در انجام این پروژه همکاری نمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

References:

1- Hartman CG. ***Regeneration of the Monkey Uterus after Surgical Removal of the Endometrium and Accidental Endometriosis.*** West J Surg Obstet Gynecol 1944; 52: 87–102.

2- Padykula HA, Coles LG, McCracken JA, King NWJr, Longcope C, Kaiserman-Abramof IR. ***A Zonal Pattern of Cell Proliferation and Differentiation in the Rhesus Endometrium Duringthe Estrogen Surge.*** Biol Reprod 1984; 31(5): 1103–18.

3- Padykula HA, Coles LG, Okulicz WC, Rapaport SI, McCracken JA, King NW Jr, et al. ***The Basalis of the Primate Endometrium: A Bifunctional Germinal Germinal Compartment.*** Biol Reprod 1989; 40(3): 681–90.

4- Tresserra F, Grases P, Ubeda A, Pascual MA, Grases PJ, Labastida R. ***Morphological Changes in Hysterectomies after Endometrial Ablation.*** Hum Reprod 1999; 14(6): 1473–7.

5- Gargett CE. ***Uterine Stem Cells: What Is the Evidence?*** Hum Reprod Update 2007; 13(1): 87–101.

6- Sasson IE, Taylor HS. ***Stem Cells and the Pathogenesis of Endometriosis.*** Ann N Y Acad Sci 2008; 1127: 106–15.

7- Cervelló I, Mirantes C, Santamaria X, Dolcet X, Matias- Guiu X, Simón C. ***Stem Cells in Human Endometrium and Endometrial Carcinoma.*** Int J Gynecol Pathol 2011; 30(4): 317–27.

8- Chan RW, Schwab KE, Gargett CE. ***Clonogenicity of Human Endometrial Epithelial and Stromal Cells***. Biol Reprod 2004; 70(6): 1738–50.

9- Kovina MV, Krasheninnikov ME, Dyuzheva TG, Danilevsky MI, Klabukov ID, Balyasin MV, et al. ***Human Endometrial Stem Cells: High-Yield Isolation and Characterization.*** Cytotherapy 2018; 20(3): 361-374.

10- Akyash F, Sadeghian-Nodoushan F, Aflatoonian B. ***Isolation, Culture and Characterization of Human Endometrial Mesenchymal Stem/ Stromal Cells (EnMSCs): A Mini Review.*** Austin J In Vitro Fertili 2016; 3(1): 1025.

11- Akyash F, Aflatoonian A, Rezazadeh Valojerdi M, Sadeghian Nodoushan F, Aflatoonian R, Aflatoonian B. **Ps-2:** ***In Vitro Isolation, Culture and Identification of Human Endometrial Mesenchymal Stem/Stromal Cells (EnMSCs).*** Cell Journal (Yakhteh) 2015; 17(Suppl 1): 22.

12- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. ***Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular***

[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1525]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:31 IRST on Monday January 25th 2021

Therapy position statement. Cytotherapy 2006; 8(4): 315–7.

13- Akyash F, Javidpou M, Nodoushan FS, Aflatoonian B. ***Human Embryonic Stem Cells Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells and their Use in Regenerative Medicine.*** J Stem Cell Res Ther 2016; 1(7): 272-4.

14- Fayazi M, Salehnia M, Ziaei S. ***Characteristics of Human Endometrial Stem Cells in Tissue and Isolated Cultured Cells: An Immunohistochemical Aspect***. Iran Biomed J 2106; 20(2): 109-16.

15- Cheng Y, Li L, Wang D, Guo Q, He Y, Liang T, *et al.****Characteristics Of Human Endometrium - Derived Mesenchymal Stem Cells and their Tropism to Endometriosis.*** Stem Cells Int 2017; 2017: 4794827.

[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1525]

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:31 IRST on Monday January 25th 2021

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 27| NO 5 | Aug 2019

Received: 6 Aug 2018
Accepted: 13 Oct 2018

Isolation and culture of human endometrial derived cells as an *in vitro* model for future implantation studies

Fatemeh Akyash[1], Mahdieh Javidpou[2], Abbas Aflatoonian[3], Behrouz Aflatoonian[*4]

Original Article

Introduction: Monthly regeneration of endometrium after cyclical mensturation confirmed the ability of specific population of the cells that presence in the basalis layer and undergone consecutive hormonal changes that could prepared the endometrial layer for probable implantation. These cells, known as, stem cell. The aim of this study was the isolation and culture of human endometrial derived mesenchymal stem/stromal cells (EnMSCs).

Methods: .In this study, human endometrial tissues were collected after fully-informed patient consent, which attended the Research and Clinical Center for Infertility. After washing and enzymatic treatment, EnMSCs were isolated and cultured *in vitro*.

Results: Cells from endometrium were successfully isolated using enzymatically treatment and mechanically dissociation, then cultured and expanded for several passages for further characterization and evaluations. Endometrium derived cells were morphologically similar to mesenchymal stem/stromal cells (MSCs).

Conclusion: The results of the present study confirm previous reports *in vitro* studies for the isolation and culture of human EnMSCs. Endometrial tissue is a part of uterus with available source of MSCs with self-renewal and differentiation capacity that undergoes a cyclical regeneration every month in normal women's life span. In this regard, human EnMSCs could be used for future novel therapeutic methods in regenerative medicine for treatment of uterine-factor infertile patients, which can lead to recurrent pregnancy loss (RPL) and finally resolve of surrogacy problems.

Keywords: Cell Therapy, Endometrial Mesenchymal Stem/ Stromal Cells, Regenerative Medicine, Uterus.

Citation: Akyash F, Javidpou M, Aflatoonian A, Aflatoonian B**. Isolation and culture of human endometrial derived cells as an *in vitro* model for future implantation studies.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2019; 27(5): 1584-90.

[1]Stem Cell Biology Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

[2]IVF Unit, Madar Hospital, Yazd, Iran.

[3]Research and Clinical Center for Infertility, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

[4]Stem Cell Biology Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

***Corresponding author: Tel:** 09133513268, **email:** b.aflatoonian@ssu.ac.ir.