مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره سی و دو، شماره دهم، دی ۱۴۰۳
تاریخ دریافت:۱۴۰۳/۰۵/۲۲
تاریخ پذیرش:۱۴۰۳/۰۷/۲۹

جداسازی فولیکول‌های زنده از بافت تخمدان منجمد شده انسان

فرناز تاج‌بخش[۱،۲]، سمیه توانا[۲]، محمد کاظمی آشتیانی[۳]، نعمیه سادات ابطحی[۲]، لیلاسادات طاهائی[۲]، اشرف معینی[۴،۵،۶]، روح‌الله فتحی[۲*]

مقاله پژوهشی

مقدمه: انجماد بافت تخمدان بهترین روش حفظ باروری برای دختران نابالغ و زنان مبتلا به سرطان است. اما به دلیل احتمال برگشت سلول‌های بدخیم بعد از پیوند بافت، جداسازی فولیکول از بافت تخمدان منجمد - ذوب‌شده این افراد برای بلوغ آزمایشگاهی یا ساخت تخمدان مصنوعی مورد توجه است. هدف از این مطالعه، ارزیابی تأثیر رنگ حیاتی نوترال رد (Neutral red; NR) و آنزیم کلاژناز در جداسازی موفق فولیکول زنده از قطعات بافت تخمدان انسانی منجمد شده است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی- مداخله‌ای، دو گروه اصلی وجود دارد: گروه حاوی رنگ حیاتی NR و گروه بدون NR. قطعات خردشده (۰/۵×۰/۵میلی‌متر) از بافت تخمدان منجمد شیشه‌ای - ذوب‌شده ۱۰ فرد تراجنسی، برای هضم آنزیمی به دو فالکون حاوی HTCM و آنزیم کلاژناز(mg/ml ۱IA) منتقل شد. به یکی از فالکون‌ها NR اضافه شد. سپس فولیکول‌ها با روش مکانیکی جداسازی شدند. فولیکول‌های جداسازی‌شده از نظر ریخت‌شناسی و اندازه بررسی شدند. میزان زنده‌مانی و سلامت فولیکول‌ها با رنگ فلوئورسنت Calcein-AM و Ethidium homodimer-I ارزیابی شد. داده‌ها با روش t-test توسط نرم‌افزار GraphPad Prism مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: تعداد فولیکول‌های جداسازی‌شده با NR(۲۵/۰۲ ±۴۶/۵۰) بیشتر از زمانی است که از NR برای جداسازی استفاده نشد (۵/۵۸± ۶/۶) ($P < ۰/۰۰۰۱$). هم چنین با توجه به ارزیابی‌های ریخت‌شناسی، بیشتر فولیکول‌های جداسازی‌شده از قشر تخمدان افراد تراجنسی از نوع فولیکول‌های بدوی (۷۷/۴ درصد) و اولیه (۲۱/۱۲ درصد) بودند و تنها تعداد کمی فولیکول‌های ثانویه (۱/۴ درصد) در بافت تخمدان این افراد وجود داشت. رنگ‌آمیزی Live/dead زنده‌بودن فولیکول‌ها را بانمایش رنگ سبز تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج استفاده همزمان از کلاژناز IA و رنگ حیاتی Neutral red نقش مهمی در سهولت جداسازی فولیکول از بافت تخمدان متراکم انسان دارد.

واژه‌های کلیدی: جداسازی فولیکول انسانی، Neutral Red، انجماد، مهندسی بافت، رنگ‌آمیزی Live/dead

ارجاع: تاج‌بخش فرناز، توانا سمیه، کاظمی آشتیانی محمد، ابطحی نعمیه‌سادات، طاهائی لیلاسادات، معینی اشرف، فتحی روح‌الله. **جداسازی فولیکول‌های زنده از بافت تخمدان منجمد شده انسان.** مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۳؛ ۳۲ (۱۰): ۴۱-۸۳۳۰.

۱- دانشجوی دانشگاه علم و فرهنگ، دانشکده زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران.
۲- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولیدمثل جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه جنین‌شناسی، تهران، ایران.
۳- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه مهندسی سلول، تهران، ایران.
۴- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولیدمثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه اندوکرینولوژی و ناباروری زنان، تهران، ایران.
۵- دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه زنان و زایمان، تهران، ایران.
۶- بخش زنان و زایمان بیمارستان آرش، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۲۹۴۷۹۶۲۱ ، پست الکترونیکی: rfathi79@royaninstitute.org، صندوق پستی : ۱۶۶۵۶۵۹۹۱۱

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i10.17418]

مقدمه

آمار ابتلا به سرطان در سال‌های اخیر افزایش یافته است (۱). تقریباً از هر ۳۰۰ خانمی که به اواسط سن چهل سالگی می‌رسند یک نفر به سرطان مبتلا می‌شود (۳, ۲). هرچند روش‌های درمان سرطان اثر مثبتی در میزان زنده‌مانی بیماران و افزایش طول عمر آن‌ها دارد، اما روش‌هایی مانند شیمی‌درمانی و پرتودرمانی می‌توانند به مشکلاتی مثل نارسایی زودرس تخمدان (POF; Premature ovarian failure) و ناباروری منجر شوند (۶-۴). انجماد بافت تخمدان، یکی از روش‌های امیدبخش برای دختران زیر سن بلوغ و افرادی است که زمان کافی برای تحریک بافت تخمدان و انجماد تخمک و جنین ندارند (۹-۷). از طرفی انجماد بافت تخمدان، علاوه بر کمک به حفظ باروری در افراد مبتلا به سرطان، در مواردی مثل افزایش سن و عدم ازدواج، به تأخیر انداختن فرزندآوری به‌دلیل موضوعات اقتصادی و همچنین حفظ عملکرد هورمونی بعد از یائسگی کاربرد دارد (۱۱, ۱۰). در بیماری‌هایی مثل لوسمی که پیوند مجدد بافت تخمدان انجمادی با احتمال وجود سلول‌های بدخیم و بازگشت بیماری همراه است، پیوند مجدد بافت پیشنهاد نمی‌شود (۱۳, ۱۲). با این‌حال، فولیکول‌های تخمدان به‌وسیله لایه‌ای از غشای پایه احاطه شده‌اند که به‌صورت یک سد فیزیکی از فولیکول در برابر سلول‌های بدخیم بافت تخمدان حفاظت می‌کند (۱۴). بر همین اساس، جداسازی فولیکول‌ها از بافت تخمدان، قرار دادن آنها در یک داربست مهندسی‌شده به عنوان تخمدان مصنوعی و پیوند آن به فرد بهبودیافته می‌تواند روشی ایمن و جایگزین برای این گروه از افراد باشد (۱۶, ۱۵). در سال‌های اخیر تولید تخمدان مصنوعی قابل پیوند مورد توجه قرارگرفته است (۱۸, ۱۷). اولین مرحله در فرآیند ساخت تخمدان مصنوعی جداسازی فولیکول‌های باکیفیت و سالم و تا حد امکان با تعداد بالا است (۲۰, ۱۹, ۱۳). با توجه به افزایش آمار سرطان در ایران (۲۱)، بهینه‌سازی و انجام درست روش جداسازی فولیکول از بافت‌های ذخیره‌شده بیماران ضروری و اجتناب‌ناپذیر است. تاکنون، آنزیم‌های مختلفی برای جداسازی فولیکول از بافت مرکز یا قشر تخمدان انسانی استفاده شده است که می‌توان به آنزیم کلاژناز I (۲۲)، لیبراز بلندزیم۳ (Liberase blendzyme 3) (۲۴-۲۲)، لیبراز DH (۲۵, ۱۳)، لیبراز TM (Liberase Thermolysin Medium) به همراه کلاژناز IV (۲۶-۲۸) وآنزیم تجزیه‌کننده تومور (Tumor Dissociation Enzyme; TDE) (۱۵) اشاره کرد. اولین جداسازی موفق فولیکول‌های بدوی (Primordial) تخمدان انسانی توسط اوکتی و همکاران در سال ۱۹۹۷ انجام شد. در این مطالعه از آنزیم کلاژناز IA همراه با روش مکانیکی برای جداسازی فولیکول‌های بدوی استفاده شد (۲۹). با توجه به دسترسی راحت‌تر به آنزیم کلاژناز IA در ایران و البته قیمت مناسب‌تر آن نسبت به انواع لیبراز، بررسی اثر این آنزیم در جداسازی موفق فولیکول‌های انسانی دور از انتظار نیست. از سوی دیگر، رنگ قرمز خنثی (Neutral Red; NR) نوعی رنگ حیاتی است که در لیزوزوم سلولی جمع شده و رنگ قرمز تیره‌ای ایجاد می‌کند (۳۰). این رنگ به شناسایی و جداسازی هر چه بهتر فولیکول‌های زنده و سالم از بافت متراکم تخمدان انسان کمک می‌کند (۳۱, ۲۷). هدف ما در این مطالعه استفاده از ترکیب آنزیم کلاژناز IA به همراه رنگ حیاتی NR به منظور جداسازی فولیکول‌های زنده از بافت قشر تخمدان انسانی منجمد شده است. این کار به منظور شناسایی راحت‌تر و سریع‌تر فولیکول‌های سالم و زنده در بافت تخمدان و افزایش تعداد فولیکول‌های جداسازی‌شده در بازه زمانی یک ساعت انجام می‌شود. همچنین، قصد داریم تا سلامت فولیکول‌های جداسازی‌شده با آنزیم کلاژناز IA را مورد ارزیابی قرار دهیم.

روش بررسی

گرفتن نمونه تخمدان و کسب رضایت از بیمار: نمونه تخمدان با کسب رضایت از ۱۰ بیمار تراجنسی س که تحت عمل تغییر جنسیت قرار گرفتند از بیمارستان آرش (تهران، ایران) تهیه شد و درون فالکون حاوی سرم فیزیولوژی در فلاکس حاوی یخ به آزمایشگاه بانک تخمدان انسانی (Ovarian tissue bank; OTB) پژوهشگاه رویان (تهران، ایران) منتقل شد. تمام بافت‌های تخمدان مورد استفاده در این تحقیق بعد از منجمد شدن با روش انجماد شیشه‌ای

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i10.17418]

CC BY-NC 4.0

(Vitrification) در تانک ازت تحقیقات در بانک تخمدان انسانی پژوهشگاه رویان نگهداری شد.

آماده‌سازی بافت تخمدان انسانی: آماده‌سازی نمونه‌های تخمدان با توجه به روش انجام‌شده در بانک تخمدان انسانی در پژوهشگاه رویان انجام شد (۳۲). به‌طور خلاصه، نمونه‌های تخمدان با محیط HTCM (Medium 199 + HEPES، Thermo Fisher Scientific، Belgium) به همراه ۲۰ درصد آلبومین سرم انسانی یا HSA (Human serum albumin، Biotest pharma GmbH، Germany) شستشو و به ظرف کشت حاوی همین محیط که روی یخ قرار داشت منتقل شد. در مرحله بعد، تخمدان با استفاده از تیغ جراحی (شماره ۱۱) از وسط باز شد، به‌طوری که دو سطح مرکزی تخمدان رو به بالا قرار گرفت و یک ساختار پروانه‌ای شکل ایجاد شد. سپس، با استفاده از همان تیغ، برش‌های کوچک، کم‌عمق و در جهات مختلف به بخش مرکزی تخمدان وارد و با استفاده از قیچی سرکج بخش مرکزی تخمدان به آرامی بریده و جدا شد تا تنها بخش قشر تخمدان با ضخامت حداکثر ۱ میلی‌متر باقی بماند. در گام بعدی، با قرار دادن یک کاغذ شطرنجی با مربع‌هایی به ابعاد ۵×۵ میلی‌متر در زیر ظرف کشت حاوی تخمدان، بافت قشر تخمدان به قطعات کوچک‌تر ۵×۱۰ میلی‌متری برش خورد. بسته به اندازه تخمدان تعداد قطعات آماده شده متغیر و بین ۱۲ تا ۳۲ قطعه (میانگین تعداد قطعات ۶/۰۲ ± ۱۸/۴۰) را شامل شد (شکل ۱ و شکل ۲ الف و ت).

انجماد بافت تخمدان انسانی: انجماد بافت تخمدان بر اساس دستورالعمل راه‌اندازی‌شده در بانک تخمدان انسانی پژوهشگاه رویان انجام شد (۳۲). برای نمونه‌های تحقیقاتی، از انجماد شیشه‌ای (Vitrification) دو مرحله‌ای استفاده شد. به‌طوری که، هر قطعه ۵×۱۰ میلی‌متری نمونه تخمدان به مدت ۱۵ دقیقه در محیط تعادلی حاوی HTCM، دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) (dimethyl sulfoxide؛ Sigma-Aldrich، UK) ، اتیلن‌گلیکول (Ethylene Glycol؛ Sigma-Aldrich، UK) (هر کدام ۷/۵ درصد) به همراه ۲۰ درصد آلبومین سرم انسانی (HAS; Human Serum Albumin) درون ظرف حاوی یخ روی دستگاه تکان‌دهنده (Shaker) (STM.1300. با سرعت ۱۲۵ rpm) قرار گرفت. سپس هر نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در محیط تعادلی حاوی ۱۵ درصد HTCM، ۱۵ درصد DMSO، ۱۵ درصد EG، ۰/۲۵ مولار سوکروز به همراه ۲۰ درصد HSA بر روی دستگاه تکان‌دهنده با سرعت ۱۲۵ rpm و دمای ۴ °C شستشو داده شد. در مرحله بعد، محیط اضافی هر نمونه با گاز تمیز گرفته شد و نمونه به ظرف حاوی نیتروژن منتقل شد. بعد از انجماد سریع هر قطعه بافت تخمدان، نمونه به یک کرایوویال حاوی نیتروژن مایع منتقل شد و با بارگذاری در میله‌های مخصوص حمل نمونه در تانک ازت نگهداری شد.

ذوب بافت تخمدان انسانی: ذوب بافت تخمدان با توجه به روش انجام شده در بانک تخمدان انسانی پژوهشگاه رویان انجام شد (۳۲). برای هر بار جداسازی فولیکول انسانی، دو قطعه بافت تخمدان انسانی از تانک ازت خارج شد و به مدت ۳۰ ثانیه روی میز کار آزمایشگاه قرار گرفت تا گاز نیروژون داخل کرایوویال خارج شده و تا حدودی با محیط هم دما شود. سپس نمونه‌های تخمدان از کرایوویال بیرون آورده شد و به ترتیب به مدت ۵ دقیقه در هرکدام از محیط‌های ذوب حاوی HTCM و ۲۰ درصد HSA به همراه مقادیر کاهشی سوکروز (۱، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵) قرار گرفت. در نهایت، نمونه به محیط‌های بازیابی W۵ و W۶ حاوی HTCM و ۲۰ درصد HSA منتقل شد و به مدت ۱۰ دقیقه در هر محیط در انکوباتور (دمای ۳۷°C، رطوبت ۹۵ درصد، CO_2 ۵/۵٪، Binder GmbH، Germany) قرار گرفت.

جداسازی فولیکول‌های تخمدان انسانی: روش کلی جداسازی فولیکول‌های تخمدان انسانی براساس مقالات مشابه این کار (۲۲, ۲۸) و با پروتکل‌های مربوط به بانک تخمدان انسانی (۳۲) انجام شد. بافت تخمدان ذوب‌شده با استفاده از دستگاه خردکن (McIlwain Tissue Chopper، McIlwain Tissue Chopper، Guildford، UK) به قطعات کوچکتر به ابعاد ۰/۵×۰/۵ میلی‌متر خرد و به ظروف فالکون ۱۵ میلی‌لیتری حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط HTCM، ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آنزیم کلاژناز I (Sigma-Aldrich، USA) و ۵۰

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i10.17418]

CC BY-NC 4.0

میکروگرم بر میلی‌لیتر Neutral Red (Sigma-Aldrich، USA) منتقل شد و به مدت ۶۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۳۷°C قرار گرفت. هر ۲۰ دقیقه یک‌بار محیط حاوی نمونه به آرامی پیپتاژ شد تا هضم آنزیمی به خوبی صورت گیرد. سپس برای توقف فعالیت هضم آنزیمی میزان برابر با محیط آنزیمی، محیط HTCM حاوی ۲۰ درصد HSA سرد به نمونه اضافه شد. بعد از انتقال محیط حاوی نمونه به ظرف کشت و قرار دادن ظرف روی صفحه گرم با دمای ۳۷°C، شناسایی فولیکول‌ها در زیر استریومیکروسکوپ (Nikon SMZ.800، Japan) انجام شد و با استفاده از سوزن انسولین فرآیند جداسازی مکانیکی فولیکول‌ها از بافت تخمدان کامل شد. فولیکول‌های جداسازی‌شده با استفاده از پیپت پاستور ۱۳۰ میکرومتری به قطره‌های تازه‌ای از محیط HTCM و سرم ۲۰ درصد گرم در ظرف کشت دیگر منتقل شدند.

بررسی زنده‌مانی فولیکول‌های جداسازی‌شده: بررسی زنده‌مانی فولیکول‌های انسانی با توجه به روش به کار رفته در مقاله دولمانز و همکاران انجام شد (۲۳). برای بررسی زنده‌مانی فولیکول‌های انسانی جداسازی شده، از محیط آنزیمی بدون رنگ حیاتی استفاده شد تا ارزیابی سلامت آن‌ها با استفاده از دو رنگ فلوئورسنت Calcein AM (Invitrogen، USA) و Ethidium homodimer I (Invitrogen، USA) انجام شود. بعد از جداسازی ، فولیکول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در قطره‌های حاصل از ۱۰۰ میکرولیتر PBS حاوی ۲ میکرومولار Calcein AM (Invitrogen, Carlsbad, USA) و ۵ میکرومولار Ethidium homodimer I (Invitrogen, Carlsbad, USA) و در محیط انکباتور (دمای ۳۷°C، رطوبت ۹۵ درصد، ۵/۵ CO_2) قرار گرفتند. سپس با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنت (Olympus BX51, Japan) بررسی و عکس‌برداری از فولیکول‌ها انجام شد. در این روش رنگ‌آمیزی فولیکول‌ها براساس نمایش رنگ سبز یا قرمز به ۴ گروه تقسیم می‌شوند: گروه ۱: فولیکول‌های زنده شامل سلول‌های گرانولوزا و تخمک سالم؛ گروه ۲: فولیکول‌هایی که کمتر از ۱۰ درصد از سلول‌های گرانولوزای آنها آسیب دیده بودند؛ گروه ۳: فولیکول‌هایی که بیشتر از ۱۰ درصد از سلول‌های گرانولوزای آنها آسیب دیده بودند و گروه ۴: فولیکول‌های مرده با بیش از ۵۰ درصد سلول‌های گرانولوزای آسیب‌دیده یا مرده (۳۱).

تجزیه و تحلیل آماری

بررسی آماری با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism (version 8, Graph Pad Software, San Diego, CA) انجام شد. سپس نرمال بودن داده‌ها با روش Shapiro-Wilk بررسی و سپس به منظور مقایسه آماری بین دو گروه از روش t-test استفاده شد. تمام داده‌ها براساس میانگین و انحراف از معیار تعریف (mean ± standard deviation) شدند. در تمام آنالیزها $P \leq ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

انجماد و ذوب فولیکول‌های جداسازی شده: روش انجماد و ذوب بافت تخمدان انسانی به‌صورت شماتیک در شکل ۱ نمایش داده شده است. نمونه‌های تخمدان انسانی بعد از انتقال به آزمایشگاه و جداسازی بخش مرکزی آنها به قطعات کوچک ۵×۱۰ میلی‌متری تقسیم شدند (شکل ۲-الف و ت) و با استفاده از محیط‌های انجمادی فرآیند انجماد شیشه‌ای روی آن‌ها انجام گرفت. به طور متوسط از هر نمونه تخمدان ۶/۰۲ ± ۱۸/۴۰ قطعه حاصل شد (جدول ۱).

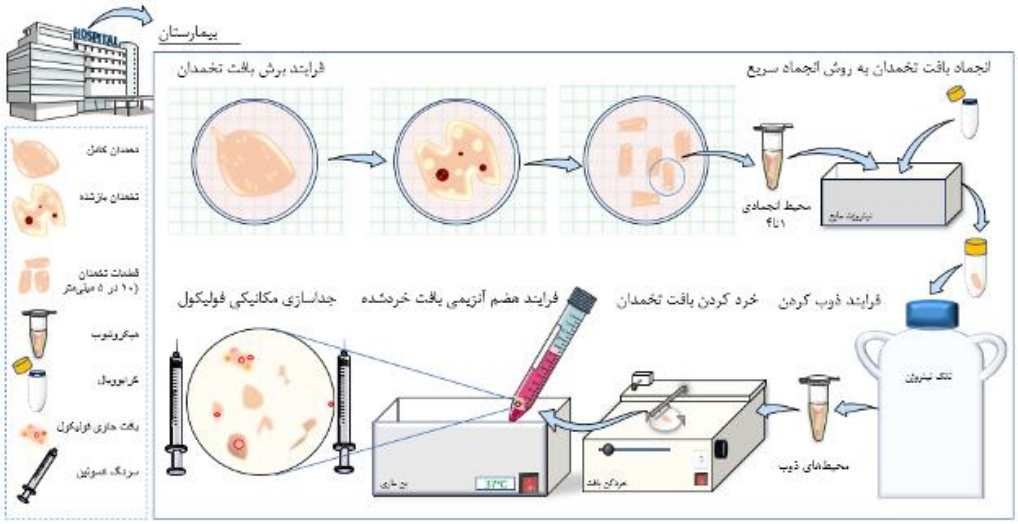
جداسازی فولیکول‌های انسانی: تفاوت جداسازی فولیکول با استفاده از رنگ حیاتی Neutral Red یا بدون آن در شکل ۲-ب و ث نشان داده شده است. همانطور که شکل مشخص است، رنگ حیاتی با ایجاد رنگ قرمز در فولیکول‌ها به تشخیص بهتر آنها کمک می‌کند (شکل۲-ث)، اما در نبود NR (شکل ۲-ب) تشخیص فولیکول‌های شفاف درون بافت سخت بوده و زمان و دقت بیشتری نیاز دارد. نتایج آماری مربوط به فولیکول‌های جداسازی شده طی ۱ ساعت نیز این موضوع را تأیید می‌کند (شکل ۳). با توجه به نمودار، استفاده از رنگ حیاتی کمک شایانی به سهولت جداسازی فولیکول (میانگین تعداد فولیکول ۲۵/۰۲ ± ۴۶/۵۰) می‌کند و تعداد فولیکول‌های جداسازی‌شده را افزایش می‌دهد (P<۰/۰۰۰۱). از

CC BY-NC 4.0

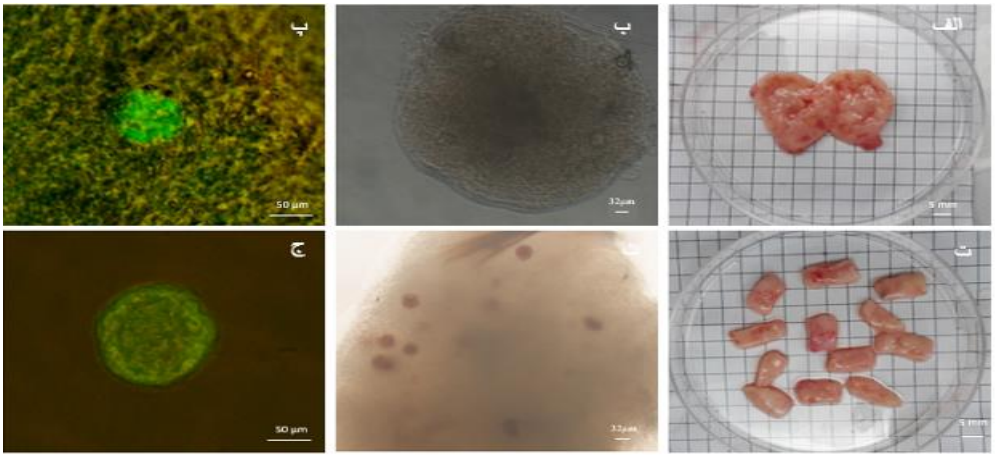
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-24]
[DOI: 10.18502/ssu.v32i10.17418]

آنجایی‌که جداسازی فولیکول‌های از قشر بافت تخمدان انجام شد، بیشتر فولیکول‌های جداسازی‌شده از نوع فولیکول‌های بدوی (۷۳/۵ درصد) بودند. فولیکول‌های اولیه (۲۴/۵ درصد) و ثانویه (۲ درصد) سهم کمتری از فولیکول‌ها را به خود اختصاص دادند (جدول ۲).

بررسی زنده‌مانی فولیکول‌های جداسازی‌شده: در مجموع ۵ فولیکول با رنگ فلوئورسنت Calcein AM در ترکیب با Ethidium homodimer I رنگ‌آمیزی و توسط میکروسکوپ فلوئورسنت بررسی شد. نتایج این بررسی در شکل ۲-پ و ج آورده شده است. در این بررسی تمام فولیکول‌ها سالم و به رنگ سبز (گروه ۱) بودند و فولیکول آسیب‌دیده‌ای مشاهده نشد.



شکل ۱: تصویر شماتیک از فرایند انجماد- ذوب و جداسازی فولیکول‌های تخمدان انسانی



شکل ۲: تخمدان انسانی و فولیکول‌های جداسازی شده از آن.

الف و ت) تخمدان انسان و قطعات حاصل از آن. ب و ث) فولیکول‌های جداسازی شده بدون استفاده از رنگ حیاتی نوترال رد یا همراه با آن. در شکل ب شناسایی همه فولیکول‌ها کار چندان آسانی نیست. اما در شکل ث فولیکول‌های به راحتی با دریافت رنگ قرمز قابل شناسایی و ردیابی هستند. پ و ج) ارزیابی زنده‌مانی فولیکول‌های جداسازی شده با استفاده از رنگ فلوئورسنت Calcein-AM و Ethidium homodimer-I.

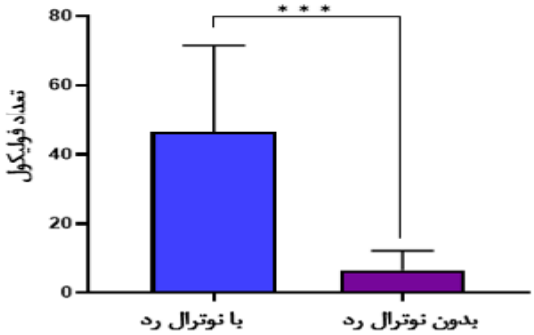
CC BY-NC 4.0

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-24]
[DOI: 10.18502/ssu.v32i10.17418]

جدول ۱: تعداد قطعات جداسازی شده از هر نمونه تخمدان افراد تراجنسی

نمونه تخمدان	بیمار ۱	بیمار ۲	بیمار ۳	بیمار ۴	بیمار ۵	بیمار ۶	بیمار ۷	بیمار ۸	بیمار ۹	بیمار ۱۰
تعداد قطعات حاصل از برش بافت* و **	۳۲	۲۴	۱۳	۱۲	۱۵	۲۰	۱۷	۱۴	۱۷	۲۰

* اندازه هر قطعه تخمدان ۵ × ۱۰ میلی‌متر ** میانگین تعداد قطعات حاصل از تخمدان به همراه انحراف از معیار: ۶/۰۲ ± ۱۸/۴۰



شکل ۳: بررسی آماری فولیکول‌های جداسازی شده انسانی با استفاده از رنگ حیاتی نوترال رد (۲۵/۰۲ ± ۴۶/۵۰) یا بدون آن (۵/۵۸ ± ۶/۶).

*** p <0/0001.

جدول۲: *تعداد فولیکول‌های جداسازی‌شده از بافت منجمد شیشه‌ای-ذوب شده تخمدان انسانی

	**نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳	نمونه ۴	نمونه ۵	نمونه ۶	نمونه ۷	نمونه ۸	نمونه ۹	نمونه ۱۰
فولیکول بدوی	۱۰	۱۲	۱۷	۱۶	۱۸	۱۰	۱۸	۱۶	۱۷	۱۳
فولیکول اولیه	۱۰	۸	۳	۳	۲	۹	۲	۴	۳	۵
فولیکول ثانویه	۰	۰	۰	۱	۰	۱	۰	۰	۰	۲

*در این جدول حداکثر تعداد فولیکول‌های جداسازی شده ۲۰ عدد در هر تکرار در نظر گرفته شده است.

**هر نمونه معادل ۲ قطعه از بافت تخمدان یک بیمار است.

بحث

مطالعه ما نشان داد که استفاده از آنزیم کلاژناز IA می‌تواند به عنوان یک آنزیم مؤثر، در کنار روش مکانیکی، به جداسازی فولیکول‌ها از بافت متراکم تخمدان انسانی کمک کند. از طرف دیگر، استفاده از Neutral Red به عنوان یک رنگ حیاتی به تشخیص سریع‌تر فولیکول‌های زنده و سالم کمک شایانی می‌کند. بنابراین، با استفاده از این رنگ، علاوه بر افزایش سرعت در تشخیص فولیکول‌ها درون بافت تخمدان و تأیید سلامت آنها، می‌توان در یک بازه زمانی کمتر، تعداد فولیکول‌های بیشتری برای اهداف مهندسی بافت یا کشت فولیکول جداسازی کرد. به طوری که با استفاده از رنگ حیاتی NR در یک بازه زمانی استاندارد (۴۵ تا ۶۰ دقیقه) میانگین ۲۵ ± ۴۶/۵۰ را جداسازی شد، در حالی‌که بدون استفاده از این رنگ با گذشت حدود دو ساعت از فرایند جداسازی میانگین حدود ۵/۵۸ ± ۶/۶ فولیکول جداسازی گردید. انجماد قطعات بافت تخمدان یکی از روش‌های رایج کمک به دختران نابالغ مبتلا به سرطان و زنانی است که نمی‌توانند شیمی‌درمانی یا پرتودرمانی‌شان را به تعویق بیندازند (۳۳, ۱۱, ۹). اما از آنجایی‌که پیوند مجدد این بافت با احتمال بازگشت بدخیمی همراه است (۱۲)، جداسازی فولیکول‌ها با اهداف کشت آزمایشگاهی (۳۵, ۳۴) یا ساخت تخمدان مصنوعی و پیوند

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i10.17418]

CC BY-NC 4.0

(۳۶, ۱۶-۱۸) می‌تواند آینده بهتری برای این گروه از بیماران به همراه داشته باشد. از طرفی، بافت تخمدان انسانی، برخلاف تخمدان جوندگان، یک بافت متراکم و فیبروز است (۳۸, ۳۷, ۳۱). بنابراین استفاده از روش آنزیمی در کنار روش مکانیکی برای جداسازی بهتر فولیکول‌ها لازم است (۳۹-۴۱). در مطالعات گذشته از آنزیم‌های متفاوتی برای جداسازی فولیکولهای تخمدان استفاده شده است. به‌طوری که، دولمانز و همکاران از آنزیم Liberase blendzyme 3 برای جداسازی فولیکول‌های انسانی استفاده کردند و بعد از قرار دادن فولیکول‌های حاصل از جداسازی در هیدروژل حاصل از لخته پلاسمایی آن را برای مدت ۷ روز (۲۴) و ۵ ماه (۲۲) به مدل موشی پیوند زدند. همچنین در سال‌های بعد استفاده از انواع لیبراز به جای آنزیم کلاژناز، به دلیل خلوص بیشتر و آسیب سلولی کمتر توجه بیشتری را به خود جلب کرد. به‌طوری که از لیبراز DH (۲۵, ۱۳)، لیبراز TM به همراه کلاژناز IV (۲۶,۲۸) برای جداسازی فولیکول استفاده شد. از طرفی در جدیدترین مطالعه آنزیم Tumor Dissociation Enzyme (TDE) برای جداسازی فولیکول پیشنهاد شد (۳۱). با این حال، خانواده آنزیم کلاژناز اولین آنزیمی بود که برای جداسازی فولیکول‌های موشی (۴۲, ۳۹) و انسانی (۴۴, ۴۳, ۴۱, ۲۹) استفاده شد. هرچند Dolmans در مطالعه خود با مقایسه دو آنزیم لیبراز و کلاژنار IA نشان داد که استفاده از لیبراز برای حفظ سلامت فولیکول‌ها مناسب‌تر است (۲۳). هم‌چنین به نظر می‌رسد که آنزیم کلاژناز به دلیل داشتن اندوتوکسین و تفاوت در محتوای تولیدی احتمال آسیب به سلول یا فولیکول را دارد (۱۹)، اما Mouloungui و همکاران با مقایسه سه آنزیم Collagenase NB6، Liberase DH و Collagenase IA تفاوتی در سلامت و زنده‌مانی فولیکول‌های جداسازی‌شده انسانی مشاهده نکردند (۴۵). از آنجایی که دسترسی به آنزیم کلاژناز IA در ایران راحت‌تر و قیمت آن به مراتب مناسب‌تر است، بررسی اثر آن در فولیکول‌های جداسازی‌شده تخمدان اهمیت زیادی دارد. در همین راستا، مطالعه ما نشان داد که همچنان می‌توان از کلاژناز I برای جداسازی خوب و مؤثر فولیکول‌های تخمدان استفاده کرد. به‌طوری که، چه با استفاده از رنگ حیاتی و چه در زمان بررسی زنده‌مانی فولیکول‌ها با استفاده از Calcein Am و Ethidium homodimer I فولیکول‌ها همچنان سالم بودند و با گذشت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه از زمان ارزیابی به تدریج آسیب فولیکولی حاصل شد. علاوه بر اینکه استفاده از رنگ حیاتی نوترال رد می‌تواند به فرایند جداسازی فولیکول‌های سالم سرعت بیشتری ببخشد. استفاده از نوترال رد یک روش کارآمد برای شناسایی بهتر فولیکول‌های زنده و سالم و جداسازی آنها است (۳۱, ۳۰, ۲۷). هرچند نتایج آزمایش مطلوب بود، اما پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده و در صورت امکان آنزیم کلاژناز IA با یکی از اعضای خانواده لیبراز از جمله لیبراز DH یا لیبراز TM مقایسه شود و نتایج حاصل از آن گزارش شوند. تا در کارهای بالینی بهترین نوع آنزیم مورد استفاده قرار گیرد. یکی دیگر از محدودیت‌های موجود در این مطالعه استفاده از بافت تخمدان افراد تراجنسی است (۴۷, ۴۶). درمان هورمونی ممکن است در تعداد و کیفیت فولیکول‌های موجود اثربگذارد. در مطالعات مشابه از بافت تخمدان افرادی استفاده شد که به دلیل بیماری‌های زنانه تحت عمل لاپاروسکوپی قرار گرفته بودند (۴۸, ۲۸, ۱۳). در صورتی‌که بتوان روش جداسازی فولیکول را در نمونه‌هایی غیر از افراد تراجنسی انجام داد. احتمال پیدا کردن فولیکول‌های با تعداد و سلامت بیشتر افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری

با توجه به آمار بالای ابتلا به سرطان در ایران و لزوم انجام بافت بافت تخمدان با هدف حفظ باروری در افراد مبتلا به سرطان اهمیت تحقیق در حوزه دانش به روز دنیا از جمله کشت فولیکول‌های تخمدان انسانی یا ساخت تخمدان مصنوعی به شدت احساس می‌شود. در همین راستا، جداسازی درست و دقیق فولیکول‌های انسانی از بافت منجمدشده تخمدان حائز اهمیت است. مطالعه حاضر سلامت فولیکول‌های جداسازی‌شده توسط آنزیم کلاژناز IA را تأیید کرد. در نتیجه می‌توان در مطالعات بعدی از آنزیم کلاژناز IA برای جداسازی موفق فولیکول‌های زنده انسانی استفاده کرد. همچنین استفاده از

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i10.17418]

CC BY-NC 4.0

رنگ حیاتی Neutral Red به تشخیص و جداسازی سریع‌تر فولیکول‌های سالم کمک شایانی می‌نماید.

سپاس‌گزاری

این طرح حاصل از پایان‌نامه است و با شماره کد ۹۹۰۰۰۱۴۲ در پژوهشگاه رویان به ثبت رسیده است. لازم است تا مراتب تشکر و قدردانی را از این نهاد، همراهان عزیزمان در پژوهشگاه رویان، همکاران محترم بیمارستان آرش و همه عزیزانی که در انجام این طرح یاریمان کردند داشته باشیم.

حامی مالی: این مطالعه با حمایت ستاد توسعه علوم و فناوری‌های سلول‌های بنیادی ریاست جمهوری به شماره قرارداد ۵۴۲۱۶ انجام شد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

تمام نمونه‌های بندناف و تخمدان انسانی با توجه به مجوز کمیته اخلاق در پژوهشگاه رویان (IR.ACECR.ROYAN.REC.1400.023) پس از اخذ رضایت‌نامه و امضای آگاهانه از بیماران تهیه شده است.

مشارکت نویسندگان

دکتر روح‌الله فتحی در ارائه ایده، دکتر روح‌الله فتحی، دکتر سمیه توانا، دکتر محمد کاظمی آشتیانی و فرناز تاج‌بخش در طراحی مطالعه، فرناز تاج‌بخش و دکتر اشرف معینی، نعیمه‌سادات ابطحی، لیلاسادات طاهائی در جمع‌آوری داده‌ها، دکتر روح‌الله فتحی و فرناز تاج‌بخش در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

References:

1- Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. ***Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries***. CA Cancer J Clin 2024; 74(3): 229-63.

2- Akahori T, Woods DC, Tilly Jljcmirh. ***Female Fertility Preservation Through Stem Cell-Based Ovarian Tissue Reconstitution in Vitro and Ovarian Regeneration in Vivo***. Clin Med Insights Reprod Health 2019; 13: 1179558119848007.

3- Dalmartello M, La Vecchia C, Bertuccio P, Boffetta P, Levi F, Negri E, et al. ***European Cancer Mortality Predictions for the Year 2022 with Focus on Ovarian Cancer.*** 2022; 33(3): 330-9.

4- Fisch B, Abir RJR. ***Female Fertility Preservation: Past, Present and Future***. Reproduction 2018; 156(1): F11-F27.

5- Turan V, Oktay KJEoods. ***Sexual and Fertility Adverse Effects Associated with Chemotherapy Treatment in Women***. Expert Opin Drug Saf 2014; 13(6): 775-83.

6- Gupta TC, Kaur S. Secondary Infertility After Cancer Treatment. Complications of Cancer Therapy: Best Practices in Prevention and Management: Springer; 2024; 273-83.

7- Dhonnabháin BN, Elfaki N, Fraser K, Petrie A, Jones BP, Saso S, et al. ***A Comparison of Fertility Preservation Outcomes in Patients Who Froze Oocytes, Embryos, Or Ovarian Tissue for Medically Indicated Circumstances: A Systematic Review and Meta-Analysis***. Fertil Steril 2022; 117(6): 1266-76.

8- Donnez J, Dolmans M-M. ***Fertility Preservation in Women***. N Engl J Med 2017; 377(17): 1657-65.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i10.17418]

CC BY-NC 4.0

9- Haering C, Coyne K, Daunov K, Anim S, Christianson MS, Flyckt RJ. ***Ovarian Tissue Cryopreservation for Fertility Preservation in Patients with Hemoglobin Disorders: A Comprehensive Review.*** J Clin Med 2024; 13(13): 3631.

10-Khattak H, Gallos I, Coomarasamy A, Topping AJBo. ***Why are Women Considering Ovarian Tissue Cryopreservation to Preserve Reproductive and Hormonal Ovarian Function? A Qualitative Study Protocol***. BMJ Open2022; 12(4): e051288

11-Rajabi Z, Aliakbari F, Yazdekhasti H, infertility. ***Female Fertility Preservation, Clinical And Experimental Options***. J Reprod Infertil 2018; 19(3): 125-32.

12-Dolmans M-M, Marinescu C, Saussoy P, Van Langendonckt A, Amorim C, Donnez JJB. ***The Journal of the American Society of Hematology. Reimplantation of Cryopreserved Ovarian Tissue from Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia Is Potentially Unsafe***. Blood 2010; 116(16): 2908-14.

13-Chiti MC, Dolmans M-M, Hobeika M, Cernogoraz A, Donnez J, Amorim CA. ***A Modified and Tailored Human Follicle Isolation Procedure Improves Follicle Recovery and Survival***. J Ovarian Res 2017; 10(1): 1-9.

14-Irving-Rodgers HF, Rodgers RJ, Editors. ***Extracellular Matrix of the Developing Ovarian Follicle.*** Seminars In Reproductive Medicine; 2006. New York: Thieme Medical Publishers; 2003.P. 415-24.

15-Chen J, Isachenko E, Wang W, Du X, Wang M, Rahimi G, et al. ***Optimization of Follicle Isolation for Bioengineering of Human Artificial Ovary***. Biopreserv Biobank 2022; 20(6): 529-39.

16-Shen J, Li W, Tan J, Xia C, Wang J, Zhou XJ. ***Fertility Preservation Through Natural And Artificial Ovaries: A Review***. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 2024; 40(5): 1469-85.

17-Amorim CA, Shikanov AJFo. ***The Artificial Ovary: Current Status and Future Perspectives***. Future Oncol 2016; 12(19): 2323-32.

18-Salama M, Woodruff TKJAoegS. ***From Bench to Bedside: Current Developments and Future Possibilities of Artificial Human Ovary to Restore Fertility***. Acta Obstet Gynecol Scand 2019; 98(5): 659-64.

19-Lierman S, Tilleman K, Cornelissen M, De Vos WH, Weyers S, T'Sjoen G, et al. ***Follicles of Various Maturation Stages React Differently to Enzymatic Isolation: A Comparison of Different Isolation Protocols***. Reprod Biomed Online 2015; 30(2): 181-90

20-Tajbakhsh F, Tavana S, Ashtiani MK, Amorim CA, Fathi RJH, histopathology. ***Optimal Human Ovarian Follicle Isolation: A Review Focused on Enzymatic Digestion.*** Histol Histopathol 2024; 39(12): 1547-55.

21-Faramarzi S, Kiani B, Faramarzi S, Firouraghi N. ***Cancer Patterns in Iran: A Gender-Specific Spatial Modelling of Cancer Incidence during 2014–2017***. BMC Cancer 2024; 24(1): 191.

22-Dolmans MM, Yuan WY, Camboni A, Torre A, Van Langendonckt A, Martinez-Madrid B, et al. ***Development of Antral Follicles after Xenografting of Isolated Small Human Preantral Follicles***. Reprod Biomed Online 2008; 16(5): 705-11.

23-Dolmans M-M, Michaux N, Camboni A, Martinez-Madrid B, Van Langendonckt A, Annarita Nottola S, et al. ***Evaluation of Liberase, A Purified Enzyme Blend,***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i10.17418]

CC BY-NC 4.0

for the Isolation of Human Primordial and Primary Ovarian Follicles. Hum Reprod 2006; 21(2): 413-20.

24-Dolmans M-M, Martinez-Madrid B, Gadisseux E, Guiot Y, Yuan WY, Torre A, et al. ***Short-Term Transplantation of Isolated Human Ovarian Follicles and Cortical Tissue into Nude Mice***. Reproduction 2007; 134(2): 253-62.

25-Soares M, Saussoy P, Maskens M, Reul H, Amorim CA, Donnez J, et al. ***Eliminating Malignant Cells From Cryopreserved Ovarian Tissue is Possible in Leukaemia Patients*** Br J Haematol 2017; 178(2): 231-39.

26-Yin H, Kristensen S, Jiang H, Rasmussen A, Andersen CYJHR. ***Survival and Growth of Isolated Pre-Antral Follicles from Human Ovarian Medulla Tissue during Long-Term 3D Culture***. Hum Reprod 2016; 31(7): 1531-9.

27-Kristensen SG, Rasmussen A, Byskov AG, Andersen CYJHr. ***Isolation Of Pre-Antral Follicles From Human Ovarian Medulla Tissue***. Hum Reprod 2011; 26(1): 157-66.

28-Pors S, Ramløse M, Nikiforov D, Lundsgaard K, Cheng J, Andersen CY, et al. ***Initial Steps in Reconstruction of the Human Ovary: Survival of Pre-Antral Stage Follicles in a Decellularized Human Ovarian Scaffold.*** Hum Reprod 2019; 34(8): 1523-35.

29-Oktay K, Nugent D, Newton H, Salha O, Chatterjee P, Gosden RGJF, et al. ***Isolation and Characterization of Primordial Follicles from Fresh and Cryopreserved Human Ovarian Tissue.*** Fertil Steril 1997; 67(3): 481-6.

30-Nemes Z, Dietz R, Lüth J, Gomba S, Hackenthal E, Gross FJE. ***The Pharmacological Relevance of Vital Staining with Neutral Red***. Experientia 1979; 35(11): 1475-6.

31-Chen J, Isachenko E, Wang W, Du X, Wang M, Rahimi G, et al. ***Bioengineering of Human Artificial Ovary from Cryopreserved Tissue: Optimization of the Follicles Enzymatic Isolation***. 2021.

32-Abtahi NS, Ebrahimi B, Fathi R, Khodaverdi S, Kashi AM, Valojerdi MR, et al. ***An Introduction to the Royan Human Ovarian Tissue Bank***. Int J Fertil Steril 2016; 10(2): 261-3.

33-Fathi R, Valojerdi MR, Ebrahimi B, Eivazkhani F, Akbarpour M, Tahaei LS, et al***. Fertility Preservation in Cancer Patients: In Vivo and in Vitro Options***. Cell J 2017; 19(2): 173.

34-Shikanov A, Smith RM, Xu M, Woodruff TK, Shea LDJB. ***Hydrogel Network Design Using Multifunctional Macromers to Coordinate Tissue Maturation in Ovarian Follicle Culture***. Biomaterials 2011; 32(10): 2524-31.

35-Hassani F, Ebrahimi B, Moini A, Ghiaseddin A, Bazrafkan M, Hassanzadeh G, et al. ***Chitosan Hydrogel Supports Integrity of Ovarian Follicles During in Vitro Culture: A Preliminary of a Novel Biomaterial for Three Dimensional Culture of Ovarian Follicles***. Cell J 2020; 21(4): 479.

36-Chiti MC, Dolmans M-M, Orellana R, Soares M, Paulini F, Donnez J, et al***. Influence of follicle stage on artificial ovary outcome using fibrin as a matrix.*** Hum Reprod 2016; 31(2): 427-35.

37-Stocco C, Baumgarten SC, Armouti M, Fierro MA, Winston NJ, Scoccia B, et al. ***Genome-Wide Interactions between FSH and Insulin-Like Growth Factors in the Regulation of Human Granulosa Cell Differentiation.*** Hum Reprod 2017; 32(4): 905-14.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i10.17418]

CC BY-NC 4.0

38-Ahn JI, Kim GA, Kwon HS, Ahn JY, Hubbell JA, Song YS, et al. ***Culture of Preantral Follicles in Poly (Ethylene) Glycol- Based, Three- Dimensional Hydrogel: A Relationship between Swelling Ratio and Follicular Developments***. J Tissue Eng Regen Med 2015; 9(3): 319-23.

39-Telfer E, Torrance C, Gosden RJR. ***Morphological Study of Cultured Preantral Ovarian Follicles of Mice after Transplantation Under the Kidney Capsule***. Reprod Fertil 1990; 89(2): 565-71.

40-Gosden RJHR. ***Restitution of Fertility in Sterilized Mice by Transferring Primordial Ovarian Follicles***. Hum Reprod 1990; 5(2): 117-22.

41-Figueiredo JR, Hulshof S, Van den Hurk R, Ectors F, Fontes R, Nusgens B, et al. ***Development of a Combined New Mechanical and Enzymatic Method for the Isolation of Intact Preantral Follicles from Fetal, Calf and Adult Bovine Ovaries.*** Theriogenology 1993; 40(4): 789-99.

42-Xu M, Kreeger PK, Shea LD, Woodruff TK. ***Tissue-Engineered Follicles Produce Live, Fertile Offspring***. Tissue Eng 2006; 12(10): 2739-46.

43-Abir R, Roizman P, Fisch B, Nitke S, Okon E , Orvieto R, et al. ***Pilot Study of Isolated Early Human Follicles Cultured in Collagen Gels for 24 Hours.*** Hum Reprod 1999; 14(5): 1299-301.

44-Abir R, Fisch B, Nitke S, Okon E, Raz A, Rafael ZBJF, et al. ***Morphological Study of Fully and Partially Isolated Early Human Follicles***. Fertil Steril 2001; 75(1): 141-6.

45-Mouloungui E, Zver T, Roux C, Amiot CJ. ***A Protocol to Isolate and Qualify Purified Human Preantral Follicles in Cases of Acute Leukemia, for Future Clinical Applications***. J Ovarian Res 2018; 11(1): 1-15.

46-Ikeda K, Baba T, Noguchi H, Nagasawa K, Endo T, Kiya T, et al. ***Excessive Androgen Exposure in Female-To-Male Transsexual Persons of Reproductive Age Induces Hyperplasia of The Ovarian Cortex and Stroma but Not Polycystic Ovary Morphology.*** Hum Reprod 2013; 28(2): 453-61.

47-Pirtea P, Ayoubi JM, Desmedt S, T'Sjoen GJF, sterility***. Ovarian, Breast, and Metabolic Changes Induced by Androgen Treatment in Transgender Men***. Fertil Steril 2021; 116(4): 936-42.

48-Paulini F, Vilela JM, Chiti MC, Donnez J, Jadoul P, Dolmans M-M, et al. ***Survival and Growth of Human Preantral Follicles after Cryopreservation of Ovarian Tissue, Follicle Isolation and Short-Term Xenografting.*** Reprod Biomed Online 2016; 33(3): 425-32.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-24]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i10.17418]

CC BY-NC 4.0

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 32| NO 10 | Jan 2025

Received: 12 Aug 2024
Accepted: 20 Oct 2024

Isolation of viable follicles from cryopreserved human ovarian tissue

Farnaz Tajbakhsh[1,2], Somayeh Tavana[2], Mohammad Kazemi Ashtiani[3], Naeimeh Sadat Abtahi[2], Leila Sadat Tahaei[2], Ashraf Moini[4,5,6], Rouhollah Fathi[*2]

Original Article

Introduction: Ovarian tissue freezing is the most effective method to maintain fertility for immature girls and women diagnosed with cancer. Nonetheless, because of the chance that malignant cells might reappearing following tissue transplantation, it is crucial to isolate the follicles from the frozen-thawed ovarian tissue of these individuals and employ them in the process of in vitro maturation process or artificial ovarian framework. This study aimed to assess the application of neutral red (NR) vital dye alongside collagenase IA for effectively isolating viable follicles from the vitrified human ovarian tissue samples.

Methods: Two categories existed: the category with NR and the group without NR. Chopped (0.5×0.5 mm) strips of vitrified-warmed ovarian tissue from 10 transsexual individuals were placed into two falcon tubes with HTCM and Collagenase IA (1mg/ml). Neutral red (NR) was introduced to one of the falcons. Follicles were then isolated mechanically. The morphology, size, and viability of the follicles were assessed. The condition of the follicles was evaluated using fluorescent staining methods involving Calcein-AM and Ethidium homodimer-I. The t-test method was used to evaluate the data.

Results: The number of isolated follicles with Neutral Red (46.50±25/02) exceeded those without NR (6.6±5.58; $P < 0/0001$). Additionally, according to the morphological studies, a majority of the isolated follicles from the transsexual ovarian cortex were primordial (77.4%), and primary (21.12%) follicles, with only a small number of secondary follicles (1.4%) identified in these tissues. Live/dead staining verified the viability of isolated follicles by displaying a green hue.

Conclusion: The finding indicates that combining collagenase I with the vital dye Neutral red significantly facilitates the of follicles from dense human ovarian tissue.

Keywords: human follicle isolation, Neutral Red, cryopreservation, tissue engineering, live/dead staining.

Citation: Tajbakhsh F, Tavana S, Kazemi Ashtiani M, Abtahi N.S, Tahaei L.S, Moini Ashraf, Fathi R. **Isolation of viable follicles from cryopreserved human ovarian tissue.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2025; 32(10): 8330-41.

[1]Department of Developmental Biology, University of Science and Culture, Tehran, Iran.
[2]Department of Embryology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.
[3]Department of Cell Engineering, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.
[4]Department of Endocrinology and Female Infertility, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.
[5]Breast Disease Research Center (BDRC), Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran.
[6]Department of Gynecology and Obstetrics, Arash Women's Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
***Corresponding author: Tel:** 09129479621**, email:** rfathi79@royaninstitute.org

CC BY-NC 4.0

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-24]
[DOI: 10.18502/ssu.v32i10.17418]