

## اثر گنادوتروپین جفتی انسان

### بر تکوین فولیکول‌های تخمدانی موش نژاد Balb/c

جواد بهارآرا<sup>۱</sup>، نزهت موسوی فر<sup>۲</sup>، محسن جلالی<sup>۲</sup>، فرزانه عدل<sup>۳</sup>

#### چکیده

**زمینه و هدف:** در مطالعات تولید مثل و ناباروری و نیز مطالعات ژنتیکی، روش تحریک تخمدانی کنترل شده با استفاده از گنادوتروپین‌ها، از اهمیت خاصی برخوردار است. در پژوهش حاضر اثر هورمون گنادوتروپین جفتی انسان (hCG) بر تکوین فولیکول‌های تخمدانی موش نژاد Balb/c بررسی شد.

**روش تحقیق:** در این پژوهش تجربی، ۳۰ سر موش ماده باکره ۲۱ روزه نژاد Balb/c انتخاب و به سه گروه شاهد، شاهد آزمایشگاهی (تزریق ۰/۱ میلی‌لیتر سالی‌ن نرمال) و تجربی (تزریق ۰/۱ میلی‌لیتر هورمون گنادوتروپین جفتی انسان  $\Delta IU/ml$ ) تقسیم شدند. موش‌ها ۱۸ ساعت پس از تزریق توسط کلروفورم کشته شدند و تخمدان‌های آنها خارج و بررسی‌های اولیه ریخت‌شناسی و ثبت وزن و اندازه انجام شد؛ سپس به کمک مطالعات میکروسکوپی نوری تعداد فولیکول‌های اولیه، ثانویه، در حال رشد و نیز فولیکول‌های آنترال اولیه هر نمونه بررسی و مقایسه شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری ANOVA و Kolmogorov-Smirnov در سطح معنی‌داری  $P < 0/05$  تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** تفاوت معنی‌داری بین سه گروه از نظر اندازه تخمدان، تعداد متوسط فولیکول‌های اولیه و ثانویه مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ). تزریق hCG باعث افزایش معنی‌داری در وزن تخمدان‌ها و تعداد متوسط فولیکول‌های در حال رشد و فولیکول‌های آنترال اولیه در مقایسه با گروه شاهد و شاهد آزمایشگاهی شد ( $P = 0/001$ ).

**نتیجه‌گیری:** بر اساس یافته‌های این مطالعه، اثر هورمون گنادوتروپین جفتی انسان بر روی افزایش میزان رشد فولیکول‌های تخمدان، در مراحل انتهایی بیشتر می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** گنادوتروپین جفتی انسان، تخمدان، موش Balb/c، تکوین فولیکولی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۸۹؛ ۱۷(۴): ۲۷۴-۲۸۰

دریافت: ۱۳۸۸/۰۵/۲۷ اصلاح نهایی: ۱۳۸۹/۰۷/۱۳ پذیرش: ۱۳۸۹/۰۸/۰۴

<sup>۱</sup> نویسنده مسؤول؛ استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، ایران

آدرس: مشهد- قاسم آباد- امامیه ۴۲- حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد

تلفن: ۰۵۱۱-۶۲۲۳۱۲۷-۰۵۱۱-۶۲۲۸۳۱۰-۰۵۱۱-۶۲۲۸۳۱۰ پست الکترونیکی: baharara@yahoo.com

<sup>۲</sup> استادیار مرکز تحقیقاتی ناباروری منتصریه، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

<sup>۳</sup> کارشناس ارشد سلولی تکوینی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد

## مقدمه

در مطالعات تولید مثل و ناباروری و تولید نمونه‌های جدید ژنتیکی، تحریک تخمدانی و افزایش تعداد تخمک‌های قابل دسترس توسط گنادوتروپین‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است. موش نمونه آزمایشگاهی مناسبی برای این گونه پژوهش‌ها می‌باشد. فولیکول‌های تخمدانی، رشد و نمو خود را به عنوان ساختارهای اولیه‌ای که حاوی یک اووسیت متوقف‌شده در مرحله دیپلوتن اولین تقسیم میوز می‌باشند، در پاسخ به یک سری از علائم آغاز می‌نمایند (۱). هنگامی که فولیکول‌ها رشد خود را آغاز می‌کنند، سلول‌های گرانولوزه مکعبی شده و شاخص‌های تکثیر سلولی را نشان می‌دهند (۲). طبق گزارشات علمی منتشرشده برخی عوامل از جمله هورمون‌های FSH<sup>۱</sup>، GDF<sup>۲</sup> و  $\beta$ FGF<sup>۳</sup>، رشد فولیکول‌های اولیه را تحریک می‌کنند و برخی دیگر از هورمون‌ها انتقال فولیکول اولیه به ثانویه را تحریک می‌کنند؛ اغلب این گزارشات در مورد جوندگان ارائه شده است (۳). عامل رشد اپیدرمی، رشد فولیکول‌های پری‌آنترال و تبدیل آن به فولیکول آنترال اولیه را افزایش می‌دهد (۴). گنادوتروپین جفتی انسان (hCG)<sup>۴</sup> یک عضو از خانواده هورمون‌ها است که تزریق آن برای القای اوولاسیون در درمان ناباروری کاربرد دارد (۵). اثرات گنادوتروپین‌ها بر بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌های نابالغ انسانی در مطالعات زیادی بررسی شده است (۷،۶). مطالعه Chian و همکاران نشان داده است که در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، تزریق گنادوتروپین جفتی باعث افزایش بلوغ اووسیت‌ها در طی ۴۸ ساعت اول کشت می‌شود (۸). مطالعه بر روی اووسیت‌های سگ نشان داد که وجود گنادوتروپین جفتی انسان در محیط کشت، سبب افزایش تعداد تخمک‌های بالغ می‌شود (۹)؛ همچنین افزودن گنادوتروپین جفتی انسان به محیط کشت سبب افزایش قابل ملاحظه اووسیت‌های بالغ انسان می‌شود

(۱۰). سایر مطالعات بر روی اووسیت‌های موش خرما و خوک نشان داده است که کاربرد گنادوتروپین جفتی، سبب افزایش میزان بلوغ اووسیت‌ها می‌شود (۱۱،۱۲). نتایج سایر مطالعات نیز بیانگر اثرات مفید گنادوتروپین جفتی انسان در القای فولیکول‌زایی و تخمک‌گذاری در بیماران دارای سندرم تخمدان پلی‌کیستیک است (۱۳،۱۴).

با توجه به اهمیت گنادوتروپین جفتی انسان در تحریک تخمدان در مطالعات باروری و ژنتیک و افزایش تعداد تخمک‌های مورد نیاز، و با توجه به کمبود مطالعات علمی در شرایط درون‌تنی<sup>۵</sup> در مورد گنادوتروپین‌ها به علت موانع قانونی و اخلاقی، در پژوهش حاضر اثر گنادوتروپین جفتی انسان با غلظت ۵ IU/ml بر فولیکول‌های تخمدانی موش‌های نابالغ Balb/c بررسی شد.

## روش تحقیق

این تحقیق از نوع تجربی آزمایشگاهی به مدت ۱۲ ماه در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد و مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری منتصریه دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شد. برای بررسی اثرات گنادوتروپین جفتی انسان بر فولیکول‌های تخمدانی، از موش‌های ماده باکره ۲۱ روزه نژاد Balb/c با وزن تقریبی ۱۲-۱۵ گرم استفاده شد. موش‌های مورد مطالعه از مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی مشهد تهیه شد؛ از موش‌ها در اتاق نگهداری حیوانات با دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتیگراد و دوره ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شد. در تمام مدت نگهداری، حیوانات به آب و غذا دسترسی داشتند؛ غذای آنها از شرکت جوانه خراسان به صورت آماده تهیه و از آب تصفیه‌شده استفاده می‌کردند. برای انجام مطالعه، تعداد ۳۰ سر موش ماده باکره به صورت تصادفی در سه گروه مساوی مطابق ذیل تقسیم شدند:

- گروه شاهد: از موش‌های این گروه در اتاق پرورش

<sup>۱</sup> Follicle Stimulating Hormone  
<sup>۲</sup> Growth differentiation factor  
<sup>۳</sup> Fibroblastic Growth Factor  
<sup>۴</sup> Human Chorionic Gonadotropin

## یافته‌ها

مقایسه میانگین وزن و اندازه تخمدان و نیز میانگین تعداد فولیکول‌های اولیه، ثانویه، در حال رشد و نیز فولیکول‌های آنترال اولیه تخمدانی موش‌های گروه شاهد با شاهد آزمایشگاهی تفاوت معنی‌داری نشان نداد ( $P > 0.05$ ). مقایسه اندازه تخمدان، تعداد فولیکول اولیه و ثانویه بین گروه تجربی و گروه شاهد نیز تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ( $P > 0.05$ ). متوسط وزن تخمدان‌ها، میانگین تعداد فولیکول‌های در حال رشد و فولیکول‌های آنترال اولیه در نمونه‌های گروه تجربی نسبت به گروه شاهد آزمایشگاهی افزایش معنی‌داری نشان داد ( $P = 0.001$  برای هر کدام) (جدول ۱).

## بحث

در طی رشد و نمو فولیکول‌ها در پستانداران، عوامل رشد و گنادوتروپین‌ها به همراه گیرنده‌های آنها ایجاد می‌شوند (۱۶). مشخص شده است که در سلول‌های کومولوس فولیکولی، متابولیسم گلوکز تحت تأثیر گنادوتروپین‌ها افزایش یافته، در نهایت منجر به رشد فولیکول‌های پری آنترال و آنترال می‌گردد (۱۷)؛ همچنین گنادوتروپین جفتی انسان، سبب افزایش نفوذپذیری رگ‌های تخمدان و انتقال مواد ضروری برای گسترش کومولوس و رشد فولیکول می‌گردد که این موضوع سبب رشد فولیکول‌ها و افزایش فولیکول‌های در حال رشد می‌شود (۱۸)؛ همچنین گنادوتروپین جفتی انسان سبب افزایش اکسیداسیون گلوکز در طی بلوغ آزمایشگاهی تخمک گاو شده، ظرفیت‌های رشد و نمو آن را افزایش می‌دهد (۱۹). مطالعات قبلی نشان داده است که هورمون محرکه فولیکولی نوترکیب (rFSH)<sup>۴</sup> و هورمون HMG<sup>۵</sup> تأثیری بر مراحل اولیه رشد و نمو فولیکول‌های تخمدانی موش ندارد؛ در حالی که HMG بر مراحل انتهایی تکوین فولیکول‌ها مؤثر بوده، میزان تخمک‌گذاری را افزایش می‌دهد

حیوانات و در شرایط طبیعی نگهداری شد.

- گروه شاهد آزمایشگاهی (Sham-Exposed): به موش‌های این گروه ۰/۱ میلی‌لیتر محلول نرمال سالین ۹٪ تزریق شد.

- گروه تجربی: به موش‌های این گروه ۰/۱ میلی‌لیتر هورمون hCG (۵ IU/ml)<sup>۱</sup> تزریق گردید (۱۱، ۱۵).

موش‌های تیمار شده و همچنین موش‌های گروه شاهد و شاهد آزمایشگاهی، ۱۸ ساعت پس از تزریق توسط کلروفرم کشته شدند. پس از تشریح، تخمدان‌های موش‌ها خارج و به ظرف محتوی سرم فیزیولوژی منتقل گردید. پس از حذف چربی‌های اضافی اطراف تخمدان، ابعاد آنها توسط استرئومیکروسکوپ مدرج<sup>۲</sup> و وزن آنها توسط ترازوی دیجیتالی<sup>۳</sup> اندازه‌گیری و ثبت شد؛ سپس برای انجام مطالعات بافت‌شناسی با استفاده از میکروسکوپ نوری، تخمدان‌ها تثبیت و پس از آب‌گیری و قالب‌گیری، برش‌های متوالی ۶ میکرونی تهیه و به روش هماتوکسیلین ائوزین هاریس رنگ‌آمیزی و لام‌های دائمی تهیه گردید. تعداد فولیکول‌های اولیه، ثانویه، در حال رشد و نیز فولیکول‌های آنترال اولیه در مقاطع سهمی میانی بررسی و شمارش گردید. برای جلوگیری از هرگونه اشتباه در شمارش، ابتدا یک فولیکول انتخاب و سایر فولیکول‌ها در جهت عقربه‌های ساعت شمارش شدند. تمام مراحل فوق برای نمونه‌های شاهد و شاهد آزمایشگاهی نیز انجام شد. داده‌های کمی حاصل با استفاده از آزمون ANOVA و همچنین به منظور بررسی میانگین تعداد انواع فولیکول‌ها با پس‌آزمون Kolmogorov-Smirnov در سطح معنی‌داری  $P < 0.05$  به کمک نرم‌افزار آماری SPSS تجزیه و تحلیل گردید.

مجریان در تمام مراحل انجام پژوهش، نظیر نگهداری حیوان، بیهوش نمودن و تشریح حیوان متعهد به رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی بودند.

<sup>۱</sup> ساخت شرکت Holland, Organon

<sup>۲</sup> ساخت شرکت صا ایران، ایران

<sup>۳</sup> ساخت شرکت Sartorius, Germany

<sup>۴</sup> recombinant Follicle Stimulating Hormone  
<sup>۵</sup> Human Menopausal Hormone

فولیکول‌های در حال رشد می‌گردد (۲۳)؛ همچنین یافته‌های حاصل از تحقیق Klotchkov و همکاران بر روی خزهای ماده، بیانگر این مطلب است که استفاده از گنادوتروپین جفتی انسان سبب افزایش تعداد فولیکول‌های بالغ پیش از دوره استروس و در دوره استروس می‌شود و باروری در این جانور وابسته به پاسخ فولیکولی به تحریک توسط گنادوتروپین جفتی انسان می‌باشد (۲۴).

### نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این مطالعه، می‌توان اذعان داشت که گنادوتروپین جفتی انسان عاملی مؤثر در مراحل انتهایی تکوین فولیکول‌های تخمدانی موش است و سبب افزایش میزان فولیکول‌های در حال رشد و آنترال اولیه و همچنین افزایش وزن تخمدان در موش ماده نژاد Balb/c می‌شود.

### تقدیر و تشکر

از همکاران محترم آزمایشگاه تحقیقاتی تکوین جانوری گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد و نیز همکاران محترم مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری منتصریه دانشگاه علوم پزشکی مشهد تشکر و قدردانی می‌شود.

جدول ۱- مقایسه آماری میانگین وزن و اندازه تخمدان و تعداد فولیکول‌های اولیه، ثانویه، در حال رشد و آنترال اولیه در گروه‌های شاهد، شاهد آزمایشگاهی و تجربی

گروه‌ها	متغیرها	اندازه تخمدان (میلیمتر)	وزن تخمدان (گرم)	تعداد فولیکول اولیه	تعداد فولیکول ثانویه	تعداد فولیکول در حال رشد	تعداد فولیکول آنترال اولیه
شاهد		۳/۴۰۵±۱/۴۲	۰/۰۰۶۴±۰/۰۰۱	۱/۸۵±۰/۲۸	۱/۷±۰/۲۳	۶/۸±۰/۶۳	۱/۴±۰/۱۱
شاهد آزمایشگاهی		۳/۶۶۵±۰/۱۳۵	۰/۰۰۴۷±۰/۰۰۰۳۶	۲/۴۵±۰/۱۷۰	۲/۳±۰/۲۰۶	۵/۸۶±۰/۱۷۲	۲±۰/۱۷۸
تیمار HCG		۳/۸۶±۰/۱۴۸۷	۰/۰۰۷۲±۰/۰۰۰۴۴	۳/۵۵±۰/۲۲۳	۳/۳۵±۰/۱۳۳	۷/۳۵±۰/۲۸۴	۵/۶۵±۰/۲۰۹
سطح معنی‌داری		۰/۳۳۸	۰/۰۰۱	۰/۰۸۲	۰/۰۸۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

### منابع:

- 1- Thomas FH, Walters KA, Tefler EE. How to make a good oocyte: an update on in-vitro models to study follicle regulation. Hum Reprod Update. 2003; 9(6): 541-55.
- 2- Wandji SA, Srsen V, Nathanielsz PW, Eppig JJ, Fortune JE. Initiation of growth of baboon primordial follicles in vitro. Hum Reprod. 1997; 12(9): 1993-2001.

- 3- Fortune JE. The early stage of follicular development: activation of primordial follicles and growth preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 2003; 78(3-4): 135-63.
- 4- Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol.* 1991; 124: 43-101.
- 5- Stenman UH, Tiitinen A, Alftan H, Valmu L. The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG. *Hum Reprod Update.* 2006; 12(6): 769-84.
- 6- Baharara J, Moosavifar N, Jalali M, Adl F. The effect of HCG on in vitro maturation of human immature oocytes and rate of 8 cell embryos mediated by ICSI. *Armaghan Danesh.* 2008; 12(4): 55-63. [Persian]
- 7- Baharara J, Moosavifar N, Jalali M, Maghani M. Effect of human menopause gonadotropin and recombinant follicle stimulating hormones on in vitro maturation of human immature oocytes and rate of eight cell embryos mediated by intracytoplasmic sperm injection. *Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility.* 2008; 11(3): 43-50. [Persian]
- 8- Chian RC, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod.* 2000; 15(1): 165-70.
- 9- De los Reyes M, de Lange J, Miranda P, Palominos J, Barros C. Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology.* 2005; 64(1): 1-11.
- 10- Yang SH, Son WY, Yoon SH, Ko Y, Lim JH. Correlation between in vitro maturation and expression of LH receptor in cumulus cells of the oocytes collected from PCOS patients in HCG-primed IVM cycles. *Hum Reprod.* 2005; 20(8): 2097-103.
- 11- Li Z, Jiang Q, Rezaei Sabet M, Zhang Y, Ritchie TC, Engelhardt JF. Conditions for in vitro maturation and artificial activation of ferret oocytes. *Biol Reprod.* 2002; 66(5): 1380-86.
- 12- Lechniak D, Szczepankiewicz D, Kauss D, Szulc J, Szydłowski M. IVM media, oocyte diameter and donor genotype at RYR1 locus in relation to the incidence of porcine diploid oocytes after maturation in vitro. *Theriogenology.* 2005; 64(1): 202-12.
- 13- Gomes MK, Vieira CS, Moura MD, Manetta LA, Leite SP, Reis RM, et al. Controlled ovarian stimulation with exclusive FSH followed by stimulation with hCG alone, FSH alone or hMG. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007; 130(1): 99-106.
- 14- Branigan EF, Estes A. Use of micro-dose human chorionic gonadotropin (hCG) after clomiphene citrate (CC) to complete folliculogenesis in previous CC-resistant an ovulation. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 192(6): 1890-94.
- 15- Eppig JJ. Regulation of cumulus oophorus expansion by gonadotropins in vivo and in vitro. *Biol Reprod.* 1980; 23(3): 545-52.
- 16- McNatty KP, Heath DA, Lundy T, Fidler AE, Quirke L, O'Connell A, et al. Control of early ovarian follicular development. *J Reprod Fertil Suppl.* 1999; 54: 3-16.
- 17- Sutton ML, Cetica PD, Beconi MT, Kind KL, Gilchrist RB, Thompson JG. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction.* 2003; 126(1): 27-34.
- 18- Nagyova E, Camaioni A, Prochazka R, Salustri A. Covalent transfer of heavy chains of inter-alpha-trypsin inhibitor family proteins to hyaluronan in in vivo and in vitro expanded porcine oocyte-cumulus complexes. *Biol Reprod.* 2004; 71(6): 1838-43.
- 19- Brackett BJ, Zuelke KA. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology.* 1993; 39(1): 43-64.
- 20- Baharara J, Moosavifar N, Jalali M, Moghani Lankarani M. Effects of HMG & R-FSH on development of ovarian follicles of female Balb/c mouse. *Feyz.* 2008; 12(1): 1-8. [Persian]
- 21- Rose UM, Hanssen RG, Kloosterboer HJ. Development and characterization of an in vitro ovulation model using mouse ovarian follicles. *Biol Reprod.* 1999; 61(2): 503-11.

- 22- Svensson EC, Markström E, Andersson M, Billig H. Progesterone receptor-mediated inhibition of apoptosis in granulosa cells isolated from rats treated with human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod.* 2000; 63(5): 1457-64.
- 23- Borman SM, Chaffin CL, Schwinof KM, Stouffer RL, Zelinski-Wooten MB. Progesterone promotes oocyte maturation, but not ovulation, in nonhuman primate follicles without a gonadotropin surge. *Biol Reprod.* 2004; 71(1): 366-73.
- 24- Klotchkov DV, Eryuchenkov PA. Effects of hCG on folliculogenesis and fecundity in mink (*Mustela vison* Schreb). *Theriogenology.* 2003; 60(9): 1583-93.

## The effects of Human Chorionic Gonadotropin (hCG) on development of ovarian follicles of Balb/c race mouse

**J. Baharara<sup>1</sup>, N. Mosavifar<sup>2</sup>, M. Jalali<sup>2</sup>, F. Adl<sup>3</sup>**

**Background and Aim:** Controlled ovarian stimulation (COS) using gonadotropin is an important technique in the infertility and genetics research. The effect of hCG on development of ovarian follicles of Balb/c race mouse was studied in this investigation.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 30 virgin female Balb/c mice (21 days) were selected and divided into three groups of control, sham exposed (0.1cc Normal saline) and experimental group (0.1cc hCG 5IU/ml). The Mice were scarified 18 hours later by chloroform injection, and their ovaries were removed for morphometric and histological studies and the weight and size were recorded. The number of primary, secondary, growing and early antral follicles were determined and compared for each sample by light microscopy. The data were analyzed by means of SPSS software using ANOVA and Kolmogorov-Smirnov tests at the significant level of  $P < 0.05$ .

**Results:** There was no significant difference in the size of ovary, the average number of primary and secondary follicle among the 3 groups of mice ( $P > 0.05$ ). The administration of hCG caused a significant increase in ovarian weight and the average number of growing and early antral follicles compared with control and sham exposed groups ( $P = 0.001$ ).

**Conclusion:** The results of this study indicate that the effect of hCG hormone on ovarian follicles growth rate, is higher in end-stages of development.

**Key Words:** Human chorionic gonadotropin (hCG), ovary, Balb/c mouse, follicular development

*Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2011; 17(4):274-280*

*Received: 18.08.2009 Last Revised: 05.10.2010 Accepted: 26.10.2010*

<sup>1</sup>Corresponding Author; Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran  
baharara@yahoo.com

<sup>2</sup> Assistant Professor, Montaserieh IVF Research Center, Mashhad University of Medical Science Mashhad, Iran

<sup>3</sup> MSc of Cell & Developmental Biology, Department of Biology, Islamic Azad University Mashhad Branch, Mashhad, Iran