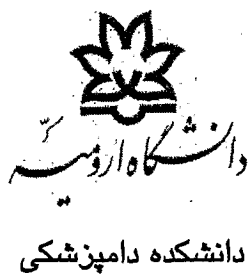


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



سال تحصیلی: ۱۳۸۸-۱۳۸۹

شماره پایان نامه: ۴۳-۱

پایان نامه:

جهت اخذ درجه دکتری تخصصی دامپزشکی در رشته

مامایی و بیماری های تولید مثل دام

عنوان:

انجماد شیشه ای و بلوغ آزمایشگاهی تخمک ژرمینال وزیکول

موش سوری در حضور پروژسترون

نگارنده:

سعید زواره

اساتید راهنما:

دکتر عادل صابری و نند استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

دکتر مرده صالح نیا استاد دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

۱۳۸۹ / ۴ / ۸

مجلس تصویب
شماره ۱۳۸۹ / ۴ / ۸

۱۳۸۸۸۰



دانشکده دامپزشکی

شماره پایان نامه: ۱-۴۳

سال تحصیلی: ۱۳۸۸-۱۳۸۹

پایان نامه:

جهت اخذ درجه دکتری تخصصی دامپزشکی در رشته
مامایی و بیماری های تولید مثل دام

عنوان:

انجماد شیشه ای و بلوغ آزمایشگاهی تخمک ژرمینال وزیکول
موش سوری در حضور پروژسترون

نگارنده:

سعید زواره

هیئت داوران:

- دکتر عادل صابری وند استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه (استاد راهنما)
دکتر مزده صالح نیا استاد دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس (استاد راهنما)
دکتر منصوره موحدین استاد دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس (داور خارجی)
دکتر فرهاد فرخی اردبیلی استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه (داور خارجی)
دکتر رجبعلی صدرخانلو استاد دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه (داور داخلی)
دکتر سید مرتضی علوی شوشتری دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه (داور داخلی)

تقدیم به :

پدرم،

گستره بیکرانه فداکاری

چکاد فروتن استواری

و

جان مایه نستوه زندگیم.

تقدیم به :

مادرم،

اکسیری از جنس صبر،

او که نگاهش برمشق باکی،

کلامش بایه بار آرامش

و

چشمانش ربتنگاه عشق است

تقدیم به :

خواهران عزیزم،

آنان که شماره تشویش‌هایم را به جانش خوانده اند



تقدیر و تشکر

با سپاس و تقدیر فراوان از :

استاد گرانقدر، جناب آقای دکتر عادل صابری وند که هدایت و راهنمایی این پایان‌نامه را قبول نموده و در انجام مراحل مختلف این تحقیق مرا صمیمانه یاری کرده‌اند.

با قدردانی و تشکر از :

استاد بزرگوار، سرکار خانم دکتر مژده صالح نیا که راهنمایی این پایان‌نامه را متقبل شده و در تدوین هر چه بهتر این پایان‌نامه از هیچ کوششی دریغ ننموده‌اند.

با تقدیر و تشکر از :

اساتید محترم، دکتر منصوره موحدین، دکتر فرهاد فرخی اردبیلی، دکتر سید مرتضی علوی شوشتری و دکتر رجبعلی صدرخانلو که زحمت داوری این پایان‌نامه را بر عهده گرفته و در تدوین آن از راهنمایی‌های ارزنده ایشان برخوردار بوده‌ام.

با سپاس و تشکر بیکران از اعضای هیئت
علمی ، کارشناسان و دانشجویان عزیز
گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی
دانشگاه تربیت مدرس که از هیچ کمکی در
راه پیشبرد این رساله دریغ ننموده و همواره یار
و یاورم بودند .

فهرست

V	چکیده فارسی.....
	فصل اول: مقدمه و ضرورت انجام طرح
۲ (۱-۱) مقدمه.....
۷ (۲-۱) ضرورت انجام طرح.....
۸ (۳-۱) اهداف تحقیق.....
۹ (۴-۱) فرضیه ها.....
	فصل دوم: مروری بر مطالعات انجام شده
۱۰ (۱-۲) شکل گیری تخمک ها.....
۱۱ (۲-۲) بلوغ تخمک.....
۱۶ (۳-۲) بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM).....
۱۷ (۱-۳-۲) تاریخچه روشهای کشت.....
۱۸ (۲-۳-۲) نقش محیط های کشت در بلوغ آزمایشگاهی تخمک.....
۱۸ (۳-۳-۲) محیط کشت در IVM.....
۱۹ (۴-۳-۲) هورمونهای گنادوتروپینی.....
۲۰ (۵-۳-۲) فاکتورهای رشد.....
۲۱ (۶-۳-۲) سرم.....
۲۲ (۴-۲) نقش استروئیدها در بلوغ تخمک.....
۲۴ (۱-۴-۲) مکانیسم اثر استروئیدها.....
۳۰ (۲-۴-۲) بررسی اثر استروئیدها و مدل های ژنتیکی موش.....
۳۱ (۵-۲) انجماد تخمک.....
۴۰ (۱-۵-۲) شرایط مختلف به تعادل رسیدن.....
۴۱ (۲-۵-۲) گرم کردن و رقیق سازی.....
۴۳ (۳-۵-۲) افزایش سرعت سرد کردن و گرم کردن با استفاده از روش حجم حداقل.....
۴۳ (۴-۵-۲) ارزیابی روش های حجم حداقل.....

۴۷ ۲-۵-۵) روش های مختلف انجماد شیشه ای تخمک
۴۷ ۲-۵-۵-۱) نی انجمادی
۴۷ ۲-۵-۵-۲) گرید مسی میکروسکوپ الکترونی
۴۸ ۲-۵-۵-۳) نی کشیده شده باز (O.P.S)
۴۸ ۲-۵-۵-۴) کرایولوپ
۴۹ ۲-۵-۵-۵) انجماد شیشه ای سطح جامد
۴۹ ۲-۵-۵-۶) سیستم نیم نی
۴۹ ۲-۵-۵-۷) نی کشیده شده بسته (C.P.S)
۵۰ ۲-۵-۵-۸) کرایوتاپ
۵۰ ۲-۵-۵-۹) کرایوتیپ
۵۰ ۲-۵-۵-۶) انجماد شیشه ای تعداد زیادی تخمک
۵۱ ۲-۵-۷) افزایش سرعت سرد کردن با استفاده از اسلاش نیتروژن مایع
۵۲ ۲-۵-۸) پیشگیری از آلودگی به واسطه نیترون مایع
	فصل سوم: مواد و روش کار
۵۵ ۳-۱) مدل حیوانی
۵۵ ۳-۲) تهیه تخمک های ژرمینال وزیکول
۵۶ ۳-۳) اثر غلظت های مختلف پروژسترون و آنتاگونیست پروژسترون بر توانائی تکوین تخمک های GV
۵۷ ۳-۳-۱) بلوغ آزمایشگاهی تخمک های ژرمینال وزیکول
۵۹ ۳-۳-۲) افزودن پروژسترون به محیط کشت بلوغ آزمایشگاهی تخمک های GV
۵۹ ۳-۳-۳) بررسی بلوغ تخمک های GV
۵۹ ۳-۳-۴) تلقیح آزمایشگاهی (IVF) تخمک و کشت جنین تا مرحله بلاستوسیست
۶۱ ۳-۴) مقایسه روش های مختلف انجماد شیشه ای بر توانائی تکوین تخمک GV
۶۲ ۳-۴-۱) تهیه محلول های مورد نیاز
۶۲ ۳-۴-۱-۱) تهیه محیط PBI
۶۳ ۳-۴-۱-۲) ساخت محلول فایکول- ساکارز (FS)
۶۳ ۳-۴-۱-۳) اضافه کردن اتیلن گلیکول

۶۴ (۴-۱-۴-۳) محلول های ذوب
۶۴ (۲-۴-۳) مرحله اول: آزمایش سمیت
۶۴ (۱-۲-۴-۳) طراحی آزمایش
۶۵ (۲-۲-۴-۳) آب گیری
۶۵ (۳-۲-۴-۳) مراحل آبدهی
۶۶ (۳-۴-۳) مرحله دوم: انجماد شیشه ای تخمک با استفاده از نی انجمادی
۶۶ (۱-۳-۴-۳) طراحی آزمایش
۶۷ (۲-۳-۴-۳) مراحل انجماد شیشه ای
۶۷ (۳-۳-۴-۳) آب گیری
۶۸ (۴-۳-۴-۳) پر کردن نی های انجمادی
۶۹ (۵-۳-۴-۳) مراحل ذوب
۶۹ (۵-۳-۴-۳) بررسی میزان بقاء
۶۹ (۶-۳-۴-۳) بلوغ آزمایشگاهی، لقاح آزمایشگاهی و کشت جنین
۷۰ (۴-۴-۳) مرحله سوم: انجماد شیشه ای تخمک GV با روش کرایوتاپ و مقایسه آن با روش نی انجمادی
۷۰ (۱-۴-۴-۳) انجماد شیشه ای GV و زیکول با روش کرایوتاپ
۷۳ (۲-۴-۴-۳) ذوب تخمک های GV با روش کرایوتاپ
۷۳ (۳-۴-۴-۳) بررسی میزان بقاء
۷۴ (۴-۴-۴-۳) بلوغ آزمایشگاهی تخمک های GV، لقاح آزمایشگاهی و کشت جنین
۷۴ (۵-۴-۴-۳) رنگ آمیزی بلاستوسیت و شمارش سلول
۷۴ (۵-۳) آنالیز آماری
فصل چهارم: نتایج	
۷۶ (۱-۴) بررسی نتایج حاصل از بررسی اثر پروژسترون بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک
۷۶ (۱-۱-۴) ارزیابی میزان بلوغ تخمک های GV در حضور غلظت های مختلف پروژسترون
۷۸ (۲-۱-۴) ارزیابی بلوغ تخمک های GV در حضور آنتاگونیست پروژسترون
۷۸ (۳-۱-۴) نتایج آزمایش برگشت پذیری اثر مهاری پروژسترون
۷۹ (۴-۱-۴) میزان لقاح و تکوین تخمک های GV در حضور پروژسترون در محیط کشت بلوغ

۸۰	۲-۴) نتایج مقایسه روش های مختلف انجماد شیشه ای بر توانائی تکوین تخمک COC و CDO
۸۰	۱-۲-۴) ارزیابی نتایج آزمایش سمیت.....
۸۱	۲-۲-۴) ارزیابی میزان بقاء و توانائی تکوین تخمک پس از انجماد شیشه ای با نی انجمادی.....
۸۲	۱-۲-۲-۴) ارزیابی میزان بقاء و بلوغ پس از انجماد شیشه ای با روش نی انجمادی.....
۸۲	۲-۲-۲-۴) ارزیابی میزان لقاح و تکوین جنین پس از انجماد شیشه ای با روش نی انجمادی.....
۸۳	۳-۲-۴) نتایج مقایسه دو روش انجماد شیشه ای کرایوتا پ و نی انجمادی بر توانائی تکوین تخمک GV.
۸۳	۱-۳-۲-۴) ارزیابی میزان بقاء و بلوغ پس از انجماد شیشه ای با روش کرایوآپ.....
۸۴	۲-۳-۲-۴) ارزیابی میزان لقاح و تکوین جنین پس از انجماد شیشه ای با روش نی انجمادی.....
۸۵	۳-۳-۲-۴) ارزیابی تعداد کل سلول های بلاستوسیست

فصل پنجم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات

۸۷	۱-۵) اثر حضور و یا عدم حضور سلول های کومولوسی بر بلوغ آزمایشگاهی و توانائی تکوین تخمک (GV)..
۸۹	۲-۵) اثر غلظت های مختلف پروژسترون بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک GV.....
۹۶	۳-۵) اثر پروژسترون با غلظت مشابه مایع فولیکولی بر توانائی تکوین تخمک GV تا مرحله بلاستوسیست
	۴-۵) مقایسه زمان های مختلف آبیگری پیش از انجماد شیشه ای بر توانائی تکوین تخمک GV در حضور و یا عدم حضور سلول های کومولوسی.....
۹۷	۵-۵) مقایسه میزان بقاء و توانائی تکوین تخمک های GV در حضور و یا عدم حضور سلول های کومولوسی پس از انجماد شیشه ای با دو روش کرایوتا پ و نی انجمادی.....
۱۰۵	۶-۵) نتیجه گیری نهایی.....
۱۱۰	۷-۵) پیشنهادات

فصل ششم: منابع

۱۱۱	۱-۶) منابع.....
۱۳۳	ضمایم.....
۱۵۰	چکیده.....

چکیده

امروزه، انجماد و بلوغ آزمایشگاهی تخمک نابالغ مرحله ژرمینال وزیکول جزء مکمل بیولوژی تولید مثل و درمان ناباروری شده است. انجماد تخمک نابالغ می تواند منابع وسیع تخمک را برای مطالعه مکانیسم بلوغ تخمک و بیوتکنولوژی حیوانات فراهم کند. به هر حال تخمک پستانداران همچنان به صورت یکی از سخت ترین نوع سلول ها که با موفقیت منجمد شده اند باقی مانده است.

مواد و روش کار: تخمک های GV از موش هائی که با PMSG تحریک شده بودند جدا شدند و به گروه های تخمک های همراه سلول های کومولوسی (COC) و تخمک های فاقد سلول های کومولوسی (CDO) تقسیم شدند و برای دو گروه اصلی آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

آزمایش اول، بررسی اثر پروژسترون بر بلوغ آزمایشگاهی و توانائی تکوین تخمک ژرمینال وزیکول موش سوری:

تخمک های GV در محیط کشت TCM199 حاوی غلظت های مختلف پروژسترون (۰، ۱۰، ۳۸، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) و ۲۵ میکرومولار آنتاگونیست پروژسترون (Mifepristone) کشت داده شدند. سپس تعداد تخمک های GV، GVBD و متافاز II شمارش شدند. میزان لقاح آزمایشگاهی و توانائی تکوین تخمک های متافاز II مورد ارزیابی قرار گرفت.

آزمایش دوم، مقایسه روش های مختلف انجماد شیشه ای تخمک ژرمینال وزیکول موش سوری:

میزان بقاء و توانائی تکوین تخمک های GV پس از آزمایشات زیر مورد ارزیابی قرار گرفت. (۱) پس از قرار گرفتن در معرض محلول تعادل سازی (EGFS₂₀) برای مدت (۰، ۳ یا ۵ دقیقه) و محلول انجماد شیشه ای (EGFS₄₀) برای مدت (۱، ۳ یا ۵ دقیقه) بدون غوطه ور شدن در نیتروژن مایع به عنوان آزمایش سمیت. (۲) پس از انجماد شیشه ای با استفاده از نی انجمادی به دنبال قرار گرفتن در معرض محلول تعادل سازی برای مدت (۰، ۳ یا ۵ دقیقه) و محلول انجماد شیشه ای برای مدت (۱ یا ۳ دقیقه). (۳) پس از انجماد شیشه ای با استفاده از کریوتاپ به دنبال قرار گرفتن در معرض محلول تعادل سازی برای مدت ۵ دقیقه و محلول انجماد شیشه ای برای مدت ۱ دقیقه.

نتایج: نتایج آزمایش اول نشان داد که میزان بلوغ در گروه کنترل بین تخمک های COC (۸۵٪) و تخمک های CDO (۶۸٪) تفاوت معنی داری داشت. میزان بلوغ در گروه تخمک های کشت شده در TCM199 حاوی ۱۰، ۳۸، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار به ترتیب در گروه تخمک های COC: ۸۳٪، ۴۸٪، ۱۴٪ و ۰٪ و در گروه تخمک های CDO: ۶۵٪، ۵۳٪، ۲۰٪ و ۰٪ بود. میزان بلوغ در هر دو گروه تخمک های COC و CDO در مقایسه با گروه کنترل مربوط به خودشان به طور معنی داری کمتر بود ($P < 0.05$) به استثناء غلظت ۱۰ میکرومولار که تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشت. میزان لقاح و تشکیل بلاستوسیست در گروه کنترل تخمک های COC (به ترتیب ۸۳٪ و ۳۵٪) در مقایسه با گروه کنترل تخمک های CDO (به ترتیب ۵۱٪ و ۵٪) به طور معنی داری بیشتر بود ($P < 0.05$). میزان لقاح و تشکیل بلاستوسیست در گروه تخمک های COC در حضور ۱۰ میکرومولار (به ترتیب ۸۱٪ و ۳۶٪) و ۳۸ میکرومولار (به ترتیب ۸۵٪ و ۳۰٪) و در گروه تخمک های CDO (به ترتیب ۵۲٪ و ۴٪ برای ۱۰ میکرومولار و ۵۶٪ و ۴٪ برای ۳۸ میکرومولار) مشابه گروه کنترل مرتبط با خودشان بود.

نتایج آزمایش دوم نشان داد که در گروه آزمایش سمیت، میزان بقاء و بلوغ تخمک هائی که برای مدت ۵ دقیقه در معرض محلول انجمادی قرار گرفته بودند به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل کمتر بود ($P < 0.05$). در گروه انجماد شیشه ای تخمک ها با استفاده از نی انجمادی میزان بقاء حدفاصل بین ۵۶/۹٪ تا ۸۵/۴٪ برای گروه تخمک های COC و ۴۴٪ تا ۸۴/۵٪ برای تخمک های CDO و میزان بلوغ در هر دو گروه به ترتیب حدفاصل ۳۵/۳٪ تا ۵۶/۸٪ و ۲۵/۸٪ تا ۲۵/۶٪ بود که در

مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کمتر بود ($P < 0.05$). میزان بقاء، بلوغ، لقاح و تکوین تخمک ها پس از انجماد شیشه ای با استفاده از کرایوتاپ در هر دو گروه تخمک های همراه COC و CDO در مقایسه با تخمک هائی که با استفاده از نی انجمادی منجمد شده بودند به طور معنی داری بیشتر بود ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: به طور کلی نتایج نشان داد که اضافه کردن پروژسترون به محیط کشت بلوغ تخمک موش نمی تواند میزان بلوغ تخمک GV و توانائی تکوین آنرا بهبود بخشد. همچنین حضور سلول های کومولوسی اطراف تخمک توانائی تکوین تخمک GV را در گروه کنترل بهبود بخشید اما تاثیری بر تخمک های منجمد شده نداشت. انجماد شیشه ای تخمک با استفاده از کرایوتاپ در مقایسه با نی انجمادی بسیار موثرتر می باشد. اما در مقایسه با گروه کنترل هیچیک از دو تکنیک انجماد شیشه ای میزان تشکیل بلاستوسیست را بهبود نبخشد.

کلید واژه ها: تخمک ژرمینال وزیکول، سلول های کومولوسی، پروژسترون، انجماد شیشه ای، نی انجمادی، کرایوتاپ

فصل اول

Introduction

مقدمه

بلوغ تخمک^۱ در خارج از بدن (IVM)^۲ بخشی از تکنیک های تولید مثل کمکی (ART) می باشد. بلوغ تخمک شامل دو قسمت بلوغ هسته^۳ و بلوغ سیتوپلاسم^۴ می باشد. از سرگیری میوز و خروج اولین جسم قطبی^۵ را به عنوان بلوغ هسته و تغییرات ارگانل های سیتوپلاسمی جهت کسب توانائی تکوین و حمایت از لقاح و رشد جنین را به عنوان بلوغ سیتوپلاسمی در نظر می گیرند. عدم تکمیل بلوغ سیتوپلاسمی تخمک در طی مراحل رشد، از مشکلاتی است که بر سر راه موفقیت IVM وجود دارد. بیشتر محققین علت را نامناسب بودن شرایط کشت می دانند. یکی از این عوامل محیط های کشت سلولی است که نتوانسته شرایط لازم و کافی برای رشد تخمک را فراهم آورند، بنابراین تغییر در محیط های کشت با اضافه کردن مکمل های گوناگون از جمله مکمل های هورمونی و بررسی اثر آن بر تکوین جنین یکی از اولویت های تحقیقاتی در IVM می باشد.

بلوغ تخمک به واسطه فاکتور های بسیاری از جمله فاکتور های رشد^۶، سیتوکین ها^۷، گنادوتروپین ها^۸ و هورمون های استروئیدی کنترل می شود (Xia et al, 1994; Byskov et al, 1997; Tsafiriri et al, 2005). در فولیکول های پیش تخمک گذاری^۹ پستانداران، سرژ LH ابتدا ترشح هر دو هورمون استروژن و آندروژن را تحریک می کند. ۶ ساعت پس از سرژ LH غلظت استروژن کاهش میابد که با کاهش در غلظت آندروژن و افزایش غلظت پروژسترون همراه می باشد. ۱۸ ساعت بعد از سرژ LH تقریباً ۹۰٪ محتوی استروئیدی داخل فولیکولی پروژسترون می باشد (Dieleman et al, 1983; Osborn and Moor, 1983). تغییرات غلظت استروئیدهای داخل فولیکولی در موجود زنده^{۱۰} بیان کننده این موضوع می باشد که

^۱Oocyte maturation

^۲In vitro maturation

^۳Nuclear maturation

^۴Cytoplasmic maturation

^۵Polar body

^۶Growth factors

^۷Cytokines

^۸Gonadotropin

^۹Preovulatory

^{۱۰}In vivo

بلوغ کامل تخمک محاط شده توسط فولیکول نیازمند تعامل دقیق ما بین غلظت استروئیدهای داخل فولیکولی می باشد. این فرضیه با یافته هائی که نشان می داد تغییر در پروفایل استروئیدی فولیکول به واسطه مهار استروئیدوزن منجر به ناهنجاری ها تکوینی و بیوشیمیائی می شود، تائید می گردد (Moor et al, 1980).

پروژسترون مایع فولیکولی در عملکرد نرمال تخمدانی دخیل می باشد. پروژسترون در تخمک گذاری^۱، لوتئینه شدن^۲، لقاح و حفظ آبستنی نقش حیاتی و مهمی دارد (Armstrong et al, 1991; Hibbert et al, 1996). مایع فولیکولی فولیکول های پیش از تخمک گذاری^۳ با غلظت بالا و غیر معمول پروژسترون مشخص می شود که به سه برابر آنچیزی می رسد که در گردش خون وجود دارد (Silva and Knight, 2000). غلظت پروژسترون در مایع فولیکولی فولیکول های پیش از تخمک گذاری ۳۸ میکرومولار تخمین زده شده است (Tyler and Smith, 1980) در حالیکه Andersen و Byskove (۲۰۰۲)، ۱۰ میکرومولار را به عنوان غلظت پروژسترون در مایع فولیکولی فولیکول های پیش از تخمک گذاری در نظر گرفته اند. اگرچه مشخص شده است که در حیوان زنده، تخمک برای کسب توانائی تکوین و بلوغ نیازمند محیط استروئیدی اختصاصی می باشد، اما اطلاعات کمی در ارتباط با اثر استروئیدها به خصوص پروژسترون بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک موجود می باشد. مطالعات انجام شده در ارتباط با اثر پروژسترون بر توانائی تکوین تخمک پستانداران در محیط آزمایشگاه منجر به نتایج ضد و نقیضی شد. به عنوان مثال در انسان و میمون بلوغ و توانائی تکوین تخمک با نسبت بالای پروژسترون به استروژن مرتبط بود (Basuray et al, 1988; Morang et al, 1990; Ryan et al, 1999). همچنین Ryan و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند که حضور استرادیول در محیط کشت بلوغ تخمک اثرات مضرى بر توانائی تکوین تخمک دارد، اما اضافه کردن پروژسترون آنرا بهبود می بخشد. در حالیکه Silva و Knight (۲۰۰۰)، نشان دادند که حضور پروژسترون در محیط کشت بلوغ تخمک گاو، میزان بلوغ و تسهیم را متاثر نمی کند اما اثرات مضرى بر تشکیل بلاستوسیست دارد، در حالیکه در میمون مشخص شده است که حضور پروژستون و استرادیول در محیط کشت بلوغ تخمک می تواند توانائی تکوین تخمک را بهبود بخشد (Zheng et al,

¹ Ovulation

² Luteinization

³ Follicular fluid of Pre-ovulatory follicles

2003). با توجه به اهمیت وجود محیط استروئیدی اختصاصی جهت کسب توانائی تکوین تخمک در موجود زنده و اینکه اطلاعات کمی در ارتباط با اثر استروئیدها خصوصا پروژسترون بر بلوغ و لقاح آزمایشگاهی تخمک وجود دارد و اطلاعات موجود نیز ضد و نقیض می باشد بنابراین به نظر می رسد بررسی های بیشتر ضروری باشد.

انجماد^۱ تخمک^۲، زیگوت^۳ و جنین^۴ در مراحل اولیه تسهیم^۵ و بلاستوسیست قسمت اصلی و تکمیلی تکنیک های کمکی تولید مثلی (ART)^۶ است و یکی از اهداف بلند مدت محققین می باشد. گرچه انجماد رویان کار نسبتا موفق بوده است و به صورت یک روش استاندارد درآمده است، اما انجماد موفقیت آمیز تخمک پستانداران بسیار مشکل تر بوده و نتایج ضعیفی را در بر داشته است. پیشرفت در انجماد و ذخیره سازی تخمک علاوه بر کمک به درمان ناباروری در انسان در علوم دامپزشکی، مدیریت بهتر گله های حیوانات اهلی را ممکن می سازد و این امکان را فراهم می کند که تخمک حیوانات با ارزش ژنتیکی بالا را به منظور حفظ ژنوم آنها، منجمد و ذخیره کرد. انجماد تخمک نسبت به رویان این برتری را دارد که در انتخاب اسپرم برای بارور کردن آن آزادی عمل بیشتری وجود دارد. همچنین با انجماد تخمک می توان از انقراض گونه های در معرض خطر جلوگیری کرد. اگرچه تلاش های بسیاری برای انجماد تخمک انجام شده است، اما نتایج به دست آمده به دلیل میزان کم بقاء^۷، لقاح^۸ و تکوین جنین^۹ رضایت بخش نبوده و بسیار متناقض می باشد.

امروزه دو روش متفاوت انجماد آهسته^{۱۰} و انجماد شیشه ای^{۱۱} جهت انجماد تخمک پستانداران مورد استفاده قرار می گیرد (Bernard and Fuller, 1996; Kuleshova et al, 1999). انجماد آهسته به طور

¹ Cryopreservation

² Oocyte

³ Zygote

⁴ Embryo

⁵ Cleavage

⁶ Assisted Reproduction Techniques

⁷ Survival rate

⁸ Fertilization rate

⁹ Developmental rate

¹⁰ Slow freezing

¹¹ Vitrification

موفقیت آمیزی برای هر دوی تخمک GV¹ و متافاز II² مورد استفاده قرار گرفته شده است (Eroglu et al, 1998). انجماد آهسته مشتمل بر تشکیل کریستال یخ با پی آمد جدا شدن آب از مواد محلول می باشد. تشکیل کریستال یخ داخل سلول و غلظت های بالای مواد محلول به عنوان مشکلات عمده انجماد آهسته مطرح هستند. بنابراین کاهش سرعت سرد کردن جهت برقرار شدن تعادلی ظریف بین فاکتورهایی که منجر به آسیب سلول می شوند، ضروری می باشد. عمده این آسیب ها توسط تشکیل کریستال یخ، جراحات سرما³ و جراحات اسموتیک⁴ ایجاد می شود، همچنین شکاف زوناپلاسیدا⁵ و تغییرات اسکلت سلولی تخمک نیز پی آمدهای انجماد آهسته می باشند (Liebermann et al, 2002 a).

یکی از راه های دوری جستن از تشکیل کریستال یخ استفاده از پرتکل های انجماد شیشه ای است، این روش انجماد به عنوان جایگزینی برای روش های انجماد آهسته مطرح می باشد. انجماد شیشه ای به عنوان تکنیک سرد کردن فوق سریع براساس تماس مستقیم بین محلول انجماد شیشه ای و نیتروژن مایع مطرح می باشد. پرتکل های انجماد شیشه ای بسیار ساده است و این امکان را فراهم می کند که سلول و یا بافت مستقیما داخل ضد یخ⁶ قرار گیرند و سپس بلافاصله در نیتروژن مایع غوطه ور شود (Liebermann et al, 2002). از نظر فیزیکی انجماد شیشه ای انجماد محلول در دمای بسیار پایین نه با ایجاد کریستال یخ در حین سرد کردن بلکه با افزایش بی نهایت در ویسکوزیته محلول می باشد، با افزایش هرچه بیشتر ویسکوزیته، نمونه دیگر مایع نیست بلکه بیشتر خصوصیات جامدات را دارد. به هر حال انجماد شیشه ای نتیجه ای از سرد کردن سریع نمونه همراه با غلظت بالای ضد یخ است (Fahy et al, 1984; Rall, 1987).

انجماد شیشه ای موفق وابسته به سه فاکتور سرعت سرد کردن⁷ و گرم کردن⁸، غلظت بالای مواد ضد یخ (ویسکوزیته نمونه) و حجم نمونه می باشد. غلظت بالای مواد ضد یخ یک محدودیت بیولوژیک است که

¹ Germinal vesicle
² Metaphase II (MII)
³ Chilling injuries
⁴ Osmotic injuries
⁵ Zona fracture
⁶ Cryoprotectant
⁷ Cooling rate
⁸ Warming rate

منجر به جراحات اسموتیک و سمیت^۱ غیرقابل قبولی می شود (Libermann et al, 2002 a). به منظور ممانعت از جراحات توکسیک و اسموتیک، استفاده از ضد یخی با سمیت کم و نفوذپذیری بالا ضروری می باشد. بنابراین اولین قدم انتخاب محلول ضد یخ مناسب با حداقل سمیت می باشد. با این دیدگاه، به نظر می رسد که اتیلن گلیکول با سمیت کم و نفوذپذیری بالا کاندیدای خوبی برای انجماد شیشه ای باشد (Kasai et al, 1992; Ali and Shelton, 1993a; Zho et al, 1993; Emiliani et al, 2000).

محلول EGFS^۲ (اتیلن گلیکول، فایکول و ساکارز) به عنوان محلول انجماد شیشه ای با پایه اتیلن گلیکول توسط Kasai و همکاران در سال ۱۹۹۰ معرفی شد. علاوه بر اتیلن گلیکول، فایکول و ساکارز به عنوان ضد یخ غیرقابل نفوذ در این محلول به کار گرفته شده است. به نظر می رسد فایکول با حلالیت بالا، سمیت و ویسکوزیته کم می تواند منجر به تشکیل یک پوشش محافظ اطراف تخمک و جنین شود و تشکیل حالت شیشه ای را تثبیت کند (Kasai et al, 1990). تا به امروز کارایی محلول EGFS برای انجماد جنین پستانداران به خصوص مراحل آخر تکوین جنین تأیید شده است (Kasai et al, 1992; Mukaida et al, 2003). در ارتباط با انجماد شیشه ای تخمک مطالب کمی از کارایی EGFS در میزان بقاء و توانایی تکوین تخمک به دنبال انجماد شیشه ای وجود دارد و به نظر می رسد بررسی بیشتر ضروری باشد.

اثرات تخریبی مواد ضد یخ وابسته به سه فاکتور می باشد: غلظت محلول، دمای محلول و طول مدت زمانی که سلول در آن قرار می گیرد. ضد یخ منجر به دهیدراتاسیون سلول می شود که در محدود کردن تشکیل یخ داخل سلولی در طول انجماد موثر می باشد (Papis et al, 2000; Libermann et al, 2002 a). اثرات سمی مواد ضد یخ وابسته به زمان می باشد. نسبت بالای حجم به سطح تخمک منجر به کاهش روند دهیدراتاسیون می شود، در نتیجه تخمک باید برای مدت طولانی تری در معرض ضد یخ قرار گیرد که به نظر می رسد منجر به میزان بقاء کم به دلیل اثرات سمی می شود (Otoi et al, 1998). از این رو به نظر می رسد باید یک زمان دقیقی برای قرار دادن تخمک در معرض ضد یخ تعیین شود.

¹ Toxicity injuries

² Ethylene glycol, Ficoll and Sucrose

فاکتور دیگری که انجماد شیشه ای را تسهیل می کند افزایش سرعت سرد کردن می باشد. کاهش حجم نمونه هنگام انتقال به نیتروژن مایع منجر به تسریع سرعت سرد کردن می شود، به منظور رسیدن به این هدف استفاده از حامل های^۱ اختصاصی باید مورد توجه قرار گیرد. با افزایش سرعت سرد کردن انجماد شیشه ای تسهیل می شود و با افزایش سرعت گرم کردن از تشکیل مجدد کریستال یخ جلوگیری می شود. روش های حداقل حجم^۲ مواد ضد یخ از جمله OPS (Chen et al, 2000)، Micro Drop (Papis et al, 2000)، Cryleaf (Chian et al, 2005) و Cryotop (Kwuayama et al, 2005 a) سرعت سرد کردن را با تماس مستقیم نمونه با نیتروژن مایع افزایش می دهد. به عنوان مثال در روش Cryotop سرعت سرد و گرم شدن به ترتیب به ۲۳۰۰۰ و ۴۲۱۰۰ درجه سانتی گراد در دقیقه می رسد (Kwuayama et al, 2005). علیرغم نتایج خوب اما احتمال آلودگی های بیولوژیکی در این روش ها وجود دارد و به این دلیل تعدادی از محققین استفاده از نی های بسته^۳ انجمادی را به عوض سیستم های باز ترجیح می دهند (Eun et al, 2002; Park et al, 2003).

مرحله میوزی تخمک می تواند میزان بقاء بعد از انجماد شیشه ای را متاثر کند (Parks and Ruffing 1992). تخمک های متافاز II محتوی دوک های میکروتوبولی^۴ آسیب پذیر و حساس نسبت به دماهای کم می باشند که منجر به گسیختگی کروماتیدها^۵ و افزایش آنیوپلوئیدی^۶ و پلی پلوئیدی^۷ بعد از انجماد می شود. درحالیکه تخمک GV دوک های میوزی ندارد و چنین مشکلی که همراه با تخمک متافاز II می باشد را شامل نمی شود (Rho et al, 2002; Chen et al, 2003; Tharasanit et al, 2006). از جهت دیگر پایداری تخمک متافاز II نسبت به تخمک GV بهتر است (Agca et al, 1998; Hong et al, 1999).

مقوله دیگری که باید پیش از انجماد تخمک GV در نظر گرفته شود، حضور و یا عدم حضور سلول های کومولوس^۸ می باشد. محققین بسیاری ضرورت حضور سلول های کومولوسی و حفظ ارتباطات آن با

¹ Carrier

² Minimum volume methods

³ Sealed straw

⁴ Microtubular spindles

⁵ Chromatid disjunction

⁶ Aneuploidy

⁷ Polyploidy

⁸ Cumulus cells

تخمک در اکتساب توانائی تکوین¹ تخمک را تأیید کرده اند (Tanger et al, 2002; Ge et al, 2008a,b). تعدادی از محققین تأثیر مثبت حضور سلول های کومولوسی را پیش از انجماد به عنوان یک محافظ در برابر اثرات مضر مواد ضدیخ و انجماد نشان داده اند (Imoedemhe and Sigue, 1992; Im et al, 1997). در مقابل عده ای نشان دادند که حضور سلول های کومولوسی پیش از انجماد اثرات منفی بر میزان بقاء تخمک دارد (Gook et al, 1993). همچنین مشخص شده است که حضور سلول های کومولوسی پیش از انجماد تخمک GV گوسفند میزان بقاء و بلوغ تخمک را به طور معنی داری کاهش می دهد (Bogliolo et al, 2007). در گزارش های دیگری حضور یا عدم حضور سلول های کومولوسی نتوانست به طور معنی داری میزان بقاء تخمک ها را بعد از انجماد متاثر کند (Fabbri et al, 2001; Chian et al, 2005). بنابراین توجه بیشتر به اثرات حضور یا عدم حضور سلول های کومولوسی بر توانائی تکوین تخمک ها بعد از انجماد شیشه ای با توجه به نتایج ضد و نقیض منطقی به نظر می رسد.

۱-۲) ضرورت انجام طرح:

اگرچه در حیوان زنده، افزایش تدریجی در میزان پروژسترون همزمان با GVBD اتفاق می افتد، اما هیچ مدرکی دال بر دخالت پروژسترون در از سرگیری میوز وجود ندارد. همچنین با توجه به ضد و نقیض بودن نتایج حاصل از بررسی نقش پروژسترون در محیط کشت بلوغ بر از سرگیری میوز و توانائی تکوین تخمک ژرمینال و زیکول مدل های مختلف حیوانی در محیط آزمایشگاه و اهمیت شرایط محیط کشت بلوغ در آزمایشگاه در اکتساب توانائی تکوین توسط تخمک ژرمینال و زیکول به نظر می رسد که بررسی بیشتر در ارتباط با نقش پروژسترون در محیط کشت بلوغ بر از سرگیری میوز به منظور بهینه کردن شرایط محیط کشت در حضور و یا عدم حضور سلول های کومولوسی ضروری باشد. علاوه براین با توجه به اهمیت، و نقش مکمل انجماد شیشه ای تخمک ژرمینال و زیکول در تکنیک های کمکی تولید مثل (ART) و وجود متغیرهای متنوع در این تکنیک که هر کدام به نوعی در نتایج حاصله تأثیر گذار هستند و مانع از معرفی یک پروتکل بهینه انجماد تخمک ژرمینال و زیکول تا به امروز شده اند، لذا تحقیق بیشتر در این ارتباط نیز ضروری به نظر می رسد.

¹ Developmental Competence