وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

دانشگاه دامغان

دانشکده زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد زیست شناسی (گرایش جنین و بافت شناسی)

بررسی نقش مهارکننده های میوز و لیپوئیک اسید بر توانائی تکوین تخمک‌های GV موش سوری در حضور و یا عدم حضور سلول های کومولوسی

توسط:

علی رهنمافلاورجانی

استاد راهنما:

دکتر سعید زواره

اسفند ماه ۱۳۹۰

به نام خدا

بررسی نقش مهارکننده های میوز و لیپوئیک اسید بر توانائی تکوین تخمک‌های GV موش سوری در حضور و یا عدم حضور سلول های کومولوسی

به وسیله‌ی:

علی رهنما فلاورجانی

پایان نامه‌ی:

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه به عنوان بخشی

از فعالیت های تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته‌ی:

زیست شناسی (گرایش بافت شناسی و جنین شناسی)

از دانشگاه دامغان

ارزیابی و تأیید شده توسط کمیته پایان نامه با درجه: **خیلی خوب**

دکتر سعید زواره، استادیار دامپزشکی دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (استاد راهنما)

دکتر مژده صالح نیا، استاد علوم تشریح دانشکده علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس (استاد داور)

دکتر محمد تقی قربانیان، استادیار علوم تشریح دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (استاد داور)

دکتر مریم حاجی قاسم کاشانی، استادیار علوم تشریح دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (نماینده تحصیلات تکمیلی)

اسفند ماه ۱۳۹۰

تقدیم به

پدر صبور و مادر مهربانم

به پاس همه زحمتها و دل نگرانیهایشان

و

اعظم و محبوبه عزیزم

همراه همیشگی لحظه های سخت و آسان زندگی ام

و همه آنهایی که دوستشان دارم.

سپاسگزاری

خدای مهربانم. پناه همیشگی من در لحضات تنهایی و سختی، به خاطر هر آن چه که به من دادی سپاسگزاریم.

با تشکر و سپاس فراوان از آقای دکتر سعید زواره، استاد مهربانم که در سایه مهر برادرانه اش سختی های کار آسان شد.

و سرکار خانم دکتر مژده صالح نیا و جناب آقای دکتر محمد تقی قربانیان کهسمت داوری پایان نامه را بر عهده داشتند، و سرکار خانم دکتر مریم حاجی قاسم کاشانی نماینده محترم تحصیلات تکمیلی.

از سرکار خانم حسین پور و به ویژه سرکار خانم دهقان به دلیل یاریها و راهنماییهای بی چشمداشت ایشان که بسیاری از سختیها را برایم آسانتر نمودند،

و همه دوستانم.

چکیده

بررسی نقش مهارکننده های میوز و لیپوئیک اسید بر توانائی تکوین تخمک‌های GV موش سوری در حضور و یا عدم حضور سلول های کومولوسی

به‌وسیله‌ی:

علی رهنما فلاورجانی

کارائی بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM)، با وجود تلاش‌های گسترده، همچنان پائین است. نظر به اینکه با کشت تخمک، تقسیم میوز به صورت خود به خودی از سر گرفته می شود، فرض بر آن شد که با جلوگیری از میوز پیش از بلوغ در شرایط آزمایشگاهی، تخمک توانائی تکوین بیشتری را کسب می کند. تخمک‌های ژرمینال وزیکول (GV) موش آماده شده با گنادوتروپین سرم مادیان آبستن (PMSG) جمع آوری و به دو گروه تخمک های همراه مجموعه کومولوسی (COC) و فاقد مجموعه کومولوسی (CDO) تقسیم شدند. تخمک‌های GV در محیط TCM199 ، ۱) فاقد مهارکننده میوز (کنترل)، ۲) تکمیل شده با۱۰ میکرومولار سیلوستامید، ۳) تکمیل شده با ۵۰ میکرومولار فورسکلین، ۴) مکمل با ترکیب فورسکلین – سیلوستامید، در حضور یا عدم حضور لیپوئیک اسید کشت داده شدند. تخمک‌های متافازII بدست آمده پس از ۴۸ ساعت کشت دو فازی با لقاح آزمایشگاهی (IVF) بارور و برای تشکیل جنین، دو روز کشت داده شدند. در گروه کنترل میزان بلوغ، لقاح و جنین دوسلولی در تخمک های COC نسبت به تخمک های CDO بیشتر بود (P<۰/۰۵). در کشت دو فازی با فورسکلین میزان بلوغ، لقاح و جنین دو سلولی در تخمک‌های COC و CDO نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌دار بیشتر بود. میزان لقاح و جنین دو سلولی در حضور سیلوستاامید در تخمک COC و در CDO نسبت به گروه کنترل مشابه خود به طور معنی‌دار بیشتر بود(P<۰/۰۵). درمان ترکیبی سیلوستامید- فورسکلین، میزان تخمک متافازII، لقاح و تشکیل جنین دو سلولی را در تخمک‌های COC و CDO در مقایسه با گروه کنترل مشابه خود به طور معنی‌دار افزایش داد(P<۰/۰۵). افزودن LA به محیط کشت بلوغ در حضور یا عدم حضور مهارکننده‌های میوز، بلوغ و صلاحیت تکوین تخمک‌های GV موش بهبود نمی دهد. هرچند حضور سلول‌های کومولوسی باعث بهبود صلاحیت تکوین تخمک‌های GV در گروه کنترل می‌شود ولی در گروه‌های درمانی اثری ندارد.

کلید واژگان: لقاح آزمایشگاهی، بلوغ آزمایشگاهی، سیلوستامید، فورسکلین، لیپوئیک اسید.

فهرست

فصل اول

مقدمه ۱

۱-۱ شکل گیری تخمک ۴

۱-۲ بلوغ تخمک ۶

۱-۲-۱ بلوغ هسته و سیتوپلاسم ۶

۱-۲-۲ فاکتور راه انداز فاز M (MPF) ۸

۱-۲-۳ پروتئین کیناز A (PKA) و پروتئین کیناز C (PKC) ۹

۱-۲-۴ MAPKs ۱۰

۱-۲-۵ استرول فعال کننده میوز(MAS) ۱۰

۱-۳ مکانیسمهای تنظیمی کنترل کننده توقف میوز ۱۱

۱-۳-۱ سلولهای فولیکولی ۱۱

۱-۳-۲ cAMP و توقف میوز ۱۲

۱-۳-۳ فسفودیاسترازها (PDE) ۱۴

۱-۳-۴ کلسیم ۱۵

۱-۴ مکانیسم LH در از سرگیری میوز ۱۶

۱-۵ بلوغ آزمایشگاهی (IVM) ۱۷

۱-۶ نقش استرس اکسیداتیو و آنتی اکسیدان ها بر تخمک وجنین ۱۹

۱-۷ لیپوئیک اسید ۲۰

۱-۸ اهداف ۲۳

۱-۹ فرضیه ها ۲۴

فصل ۲

۲-۱ تهیه و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی ۲۶

۲-۲ نمونه برداری ۲۶

۲-۳ مراحل تحقیق ۲۷

۲-۴-۱ مواد و وسایل لازم جهت بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای GV ۳۰

۲-۴-۲ ساخت محیط کشت استوک TCM199 ..... ۳۰

۲-۴-۳ ساختن محیط کشت بلوغ ۳۰

۲-۴-۴ بلوغ آزمایشگاهی یک مرحله ای ۳۰

۲-۴-۵ بلوغ آزمایشگاهی دو مرحله ای ۳۲

۲-۴-۶ بررسی بلوغ تخمکهایGV ۳۲

۲-۵ لقاح آزمایشگاهی (IVF) تخمک و کشت جنین ۳۳

۲-۵-۱ مواد لازم جهت ساخت محیط کشت T_6 ..... ۳۳

۲-۵-۲ ساخت محلول استوک BSA ۳۴

۲-۵-۳ تهیه اسپرم ۳۴

۲-۵-۴ لقاح آزمایشگاهی(IVF) ۳۵

۲-۶ آنالیزی آماری ۳۵

فصل ۳

۳-۱ میزان بلوغ تخمک های ژرمینال وزیکول(GV) همراه با سلول های کومولوسی (COC) و فاقد سلول های کومولوسی (CDO) در کشت یک مرحله ای و دو مرحله ای در حضور و یا عدم حضور لیپوئیک اسید. ۳۸

۳-۲ میزان لقاح تخمک های MII استحصال شده از تخمک های ژرمینال وزیکول(GV) همراه با سلول های کومولوسی (COC) و فاقد سلول های کومولوسی (CDO) در کشت یک مرحله ای و دو مرحله ای در حضور و یا عدم حضور لیپوئیک اسید. ۴۰

۳-۳ میزان تکوین جنین های دوسلولی استحصال شده از تخمک های ژرمینال وزیکول(GV) همراه با سلول های کومولوسی (COC) و فاقد سلول های کومولوسی (CDO) در کشت یک مرحله ای و دو مرحله ای در حضور و یا عدم حضور لیپوئیک اسید. ۴۳

فصل ۴

۴-۱ تاثیر حضور سلولهای کومولوسی بر بلوغ آزمایشگاهی و توانایی تکوین تخمک ژرمینال وزیکول (GV) ۵۵

۴-۲ تاثیر مهارکنندههای میوز بر میزان بلوغ و توانائی تکوین تخمک ژرمینال وزیکول در حضور و یا عدم حضور سلول های کومولوسی..... ۵۷

۴-۲-۱ تاثیر مهارکنندههای میوز بر میزان بلوغ و توانائی تکوین تخمک ژرمینال وزیکول در حضور سلولهای کومولوسی (COC) و مقایسه آنها با گروه کنترل:..... ۵۷

۴-۲-۲ تاثیر مهارکنندههای میوز بر میزان بلوغ و توانائی تکوین تخمک ژرمینال وزیکول فاقد سلولهای کومولوسی(CDO) و مقایسه آنها با گروه کنترل:..... ۶۲

۴-۳ بررسی تاثیر لیپوئیک اسید بر میزان بلوغ و توانائی تکوین تخمک ژرمینال وزیکول در حضور و یا عدم حضور مهار کننده های میوز ۶۳

۴-۴ نتیجه گیری کلی ۶۵

۴-۵ پیشنهادات..... ۶۶

مراجع ۶۷

فهرست نمودار و تصاویر

نمودار ۳-۱: میزان بلوغ تخمک‌های همراه سلوهای کومولوسی (COC) و فاقد سلول‌های کومولوسی (CDO) در عدم حضور لیپوئیک اسید.....۴۷
نمودار ۳-۲: میزان بلوغ تخمک‌های همراه سلوهای کومولوسی (COC) و فاقد سلول‌های کومولوسی (CDO) در حضور لیپوئیک اسید.....۴۷
نمودار ۳-۳: میزان بلوغ تخمک‌های فاقد سلول‌های کومولوسی (CDO) در حضور یا عدم حضور لیپوئیک اسید ۴۸
نمودار ۳-۴: میزان بلوغ تخمک‌های همراه سلوهای کومولوسی (COC) در حضور یا عدم حضور لیپوئیک اسید..... .....۴۸
نمودار ۳-۵: میزان لقاح تخمک‌های همراه سلوهای کومولوسی (COC) و فاقد سلول‌های کومولوسی (CDO) در عدم حضور لیپوئیک اسید.....۴۹
نمودار ۳-۶: میزان لقاح تخمک‌های همراه سلوهای کومولوسی (COC) و فاقد سلول‌های کومولوسی (CDO) در حضور لیپوئیک اسید.....۴۹
نمودار ۳-۷: میزان لقاح تخمک‌های همراه سلوهای کومولوسی (COC) در حضور یا عدم حضور لیپوئیک اسید.....۵۰
نموار ۳-۸: میزان لقاح تخمک‌های فاقد سلول‌های کومولوسی (CDO) در حضور یا عدم حضور لیپوئیک اسید.....۵۰
نمودار ۳-۹: میزان تشکیل جنین‌های دو سلولی از تخمک‌های همراه سلوهای کومولوسی (COC) و فاقد سلول‌های کومولوسی (CDO) در عدم حضور لیپوئیک اسید.....۵۱
نمودار ۳-۱۰: میزان تشکیل جنین‌های دو سلولی از تخمک‌های همراه سلوهای کومولوسی (COC) و فاقد سلول‌های کومولوسی (CDO) در حضور لیپوئیک اسید.....۵۱
نمودار ۳-۱۱: میزان تشکیل جنین‌های دو سلولی از تخمک‌های همراه سلوهای کومولوسی (COC) در حضور یا عدم حضور لیپوئیک اسید.....۵۲
نمودار ۳-۱۲: میزان تشکیل جنین‌های دو سلولی از تخمک‌های فاقد سلول‌های کومولوسی (CDO) در حضور یا عدم حضور لیپوئیک اسید.....۵۲
شکل ۳-۱ : مراحل مختلف تخمک ژرمینال وزیکول موش سوری و تکوین جنین.....۵۳

فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

مقدمه

امروزه تکنیک‌های کمک تولید مثلی (ART)[1] در درمان ناباروری و حفظ باروری خدمات شایانی را فراهم کرده‌اند. لقاح آزمایشگاهی(IVF)[2]، تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم(ICSI) [3]، بلوغ آزمایشگاهی تخمک(IVM)[4]، انجماد گامت[5]، انجماد تخمدان، انتقال جنین و غیره از جمله‌ی این تکنیک‌ها می‌باشند. علیرغم پیشرفت‌های فراوان در تکنیک‌های کمک تولید مثلی، موفقیت‌های به دست آمده در حد مطلوب نمی‌باشد. کیفیت پایین تخمک ها، تنها یکی از دلایل میزان پایین موفقیت بعد از لقاح آزمایشگاهی و یا تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم(ICSI) می‌باشد. بلوغ آزمایشگاهی تخمک[6] روشی قابل قبول به منظور درمان بعضی از ناباروری، از جمله تحریک پذیری بالای تخمدان و یا سندروم تخمدان پلی کیستیک می باشد، اما به دلیل موفقیت پایین کاربرد پزشکی آن با محدودیت مواجه شده است.

در گونه های مختلف پستانداران، از سرگیری میوز[7] تخمک‌های ژرمینال وزیکول (GV)[8] در شرایط آزمایشگاهی[9] به مرحله متافاز II امکان پذیرمی‌باشد. در شرایط بدن موجود زنده،

1 Assisted Reproductive Techniques
2 In Vitro Fertilization
3 Intra Cytoplasmic Sperm Injection
4 In Vitro Maturation
5 Gamete Preservation
6 In Vitro Maturation
7 Resumption
8 Germinal Vesicle
9 In Vitro

فولیکول های پیش از تخمک گذاری[1]، تخمک‌های نابالغ با چندین لایه از سلول های گرانولوزا، (کومولوس اووفروس) را در بر دارد. تخمک و سلول های گرانولوزای اطراف آن از طریق اتصالات با فاصله[2] یک واحد عملکردی به نام مجموعه تخمک– کومولوس[3] (COC) را تشکیل می دهند. قبل از تخمک گذاری، تحت تاثیر گنادوتروپین‌ها، بلوغ تخمک، شامل پیشرفت آن از پروفاز میوز I به متافاز میوزII (MII) و پخش شدن سلول های کومولوسی صورت می گیرد. اولین نشانه از سرگیری میوز تشکیل تخمک هایی با هسته شکسته شده[4] (GVBD) است که تقریبا ۲ ساعت بعد از تحریک گنادوتروپینی اتفاق می افتد. بعد از تقریبا ۱۰ ساعت اولین تقسیم میوز کامل و تخمک به مرحله متافاز II می رسد.

در شرایط آزمایشگاهی، بلوغ تخمک هایGV انسان با موفقیت کمتری همراه است .درصد پائین موفقیت لقاح آزمایشگاهی و میزان بالای پلی‌اسپرمی ممکن است به دلیل بلوغ ناقص تخمک در شرایط آزمایشگاهی باشد. با توجه به کوتاه بودن مدت زمان مورد نیاز برای بلوغ هسته در شرایط آزمایشگاهی، تخمک از لحاظ بلوغ سیتوپلاسمی در این بازه زمانی به صلاحیت کامل نمی رسد و احتمالا بهره پایین این روش به دلیل بلوغ زودرس هسته تخمک و عدم هماهنگی با بلوغ سیتوپلاسمی باشد. روش های مختلفی به منظور هماهنگی بلوغ هسته و سیتوپلاسم تخمک صورت گرفته است که می توان به مواردی چون استفاده از مهار کننده های میوز اشاره کرد. عواملی که به نوعی موجب افزایش سطح cAMP تخمک می شود می تواند به نوبه خود منجر به تعویق بلوغ هسته و هماهنگی نسبی بلوغ هسته و سیتوپلاسم گردد. استفاده از آدنیلات سیکلازها و یا فسفو دی استراز ها در محیط کشت تخمک گونه های مختلف جانوری و انسان گزارش شده است. در این میان نتایج ضد و نقیضی حاصل شده است که می تواند به سبب طراحی های مختلف آزمایش، گوناگونی در محیط های کشت مورد استفاده و یا تفاوت های بین گونه ای باشد.

فرایندهای تولید مثلی و تکوینی با تغییرات پویا در متابولیسم و مصرف انرژی همراه هستند، که در نتیجه‌ی آن نیز محصولات فرعی متابولیکی به میزان فوق العاده‌ای تولید می‌گردد. یکی از مهمترین این نوع محصولات، گونه‌های واکنشگر اکسیژن(ROS) [5] می‌باشد که در مقدار

1 Pre-Ovulatory
2 Gap Junction
3 Cumulus – Oocyte Complexs
4 Germinal Vesicle Break Down
5 Reactive Oxygen Species (ROS)

محدود موجب عملکرد فیزیولوژیکی طبیعی می‌شود در حالی که تولید بیش از حد آن موجب استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) می‌شود. در شرایط کشت آزمایشگاهی به سبب میزان بالای اکسیژن محیط تولید گونه های واکنشگر اکسیژنی و استرس اکسیداتیو بسیار محتمل می باشد. پس به منظور بهبود ظرفیت تکوینی فولیکول‌ها و تخمک‌های کشت شده در شرایط *in vitro* و متعاقب آن داشتن جنین‌های با کیفیت بالا، به نظر میرسد، استفاده از عواملی که غلظت ROS را در محیط کشت کاهش دهند ضروری می‌باشد، یکی از این عوامل آنتی اکسیدان‌ها می‌باشند که دلیل اصلی حضور بیشتر آنها در سلول برای اطمینان از حذف رادیکال‌های آزاد می‌باشد.

سؤالات تحقیق حاضر چنین خواهد بود

۱) آیا با افزایش طول مدت زمان کشت تخمک های GV با استفاده از مهارکننده فسفو دی استراز (PDE3) ، فعال کننده آدنیلات سیکلاز و یا توامان هردو، بهبودی در کیفیت بلوغ تخمک ها ایجاد می شود؟

۲) آیا حضور و یا عدم حضور سلول های کومولوسی همراه تخمک، تاثیری بر عملکرد مهارکننده فسفو دی استراز (PDE3) و فعال کننده آدنیلات سیکلاز بر توانائی تکوین تخمک دارد؟

۳) با توجه به افزایش مدت زمان کشت تخمک در حضور مهارکننده فسفو دی استراز (PDE3) و فعال کننده آدنیلات سیکلاز و احتمال ایجاد استرس اکسیداتیو، آیا استفاده از آنتی اکسیدانت در محیط کشت بلوغ تخمک می‌تواند در بهبود شرایط کشت مفید واقع شود؟

۱-۱ شکل گیری تخمک[1]

تخمک‌های اولیه[2] پستانداران، اولین تقسیم میوزی خود را در دوران جنینی شروع کرده اما تا زمان بلوغ آنرا کامل نمی‌کنند، و دومین تقسیم میوز نیز بعد از لقاح کامل می‌شود. نخستین تقسیم میوزی در تخمک‌های ابتدایی اهمیت بسزایی دارد. اگر این تقسیم به درستی انجام گیرد تخمک طبیعی (تخمک بالغ متافازII) شانس خوبی برای لقاح و پیمودن مسیر صحیح رشد و تکوین را خواهد داشت. اما نتیجه بروز اشتباه در مسیر نخستین تقسیم میوز ایجاد جنین ناقص است که قادر به کامل کردن مراحل رشد نیست.

شکل‌گیری تخمک طی هفت مرحله صورت می‌گیرد: ۱) ایجاد سلول‌های زاینده اولیه[3] ۲) مهاجرت سلول‌های زاینده اولیه به محل گنادهای فرضی آینده ۳) شکل‌گیری گنادها توسط سلول‌های زاینده اولیه ۴) تمایز سلول‌های زاینده اولیه به اووگونیا[4] ۵) تکثیر اووگونیا ۶) شروع میوز ۷) توقف در مرحله دیپلوتن پروفاز میوز I .

تخمک‌ها، سلول‌های اپی‌بلاست[5] غیر متعهدی هستند که طی گاسترولاسیون[6] از طریق بخش پشتی شکاف اولیه[7] مهاجرت کرده و تبدیل به سلول‌های زاینده اولیه می‌شوند[۱]. سلول‌های زاینده اولیه وارد آندودرم کیسه زرده شده، تکثیر یافته و از طریق کیسه زرده و آندودرم روده پسین[8] موجود در انتهای دمی جنین از طریق مزانتر پشتی خود را به ستیغ‌های تناسلی[9] واقع در بخش‌های شکمی مزوانفروزها[10] می‌رسانند[۲]. سلول‌های زاینده اولیه پس از ورود به ستیغ تناسلی بسته به ماهیت کروموزوم‌های جنسی به اووگونیا یا اسپرماتوگونیا[11] تمایز پیدا می کنند[۳].

نتیجه تقسیمات میوز سلول‌های زاینده اولیه در تخمدان، ایجاد گروه‌هایی از اووگونیا است که توسط پل‌های سیتوپلاسمی به یکدیگر متصل می‌باشند. سلول‌های اووگونی به همراه سلول‌های سوماتیک (منشاء مزونفروز) احاطه کننده آنها طناب های قشری[12] را ایجاد می‌کنند.

1 Oocytes
2 Primary Oocyte
3 Primordial Germ Cells (Pgcs)
4 Oogonia
5 Epiblast Cells
6 Gastrulation
7 Primitive Streak
8 Hindgut
9 Genital Ridge
10 Mesonephrosa
11 Spermatogonia
12 Cortical Cords

در بسیاری از گونه‌ها، طناب‌های قشری در مرحله بعدی رشد با برجستگی‌های سطح اپیتلیوم متصل می‌شوند[۴]. درون طناب‌ها، اووگونیا به دنبال مضاعف شدن DNA وارد تقسیم میوز شده و به تخمک تبدیل می‌گردند. تخمک، مراحل لیپوتن، زیگوتن وپاکی‌تن پروفاز میوز I را قبل از متوقف شدن در دیپلوتن طی می‌کند. در جنین انسان، هزار اووگونی یا بیشتر، از ماه دوم تا هفتم حاملگی سریعاً تقسیم می‌شوند تا حدود ۷ میلیون سلول زایا را تشکیل دهند. با این وجود بعد از ماه هفتم تکوین جنینی، تعداد سلول‌های زایا با شیب تندی کاهش می‌یابد. اکثر اووگونی‌ها طی این دوره می‌میرند، در حالی که اووگونی‌های باقی مانده وارد اولین تقسیم میوزی می‌شوند[۱].

طی مراحل اولیه میوز، تخمک‌ها بسیار آسیب پذیر هستند که منجر به دژنراسیون بسیاری از آنها می‌شود. طی پروفاز میوز I ، سطح نسخه برداری تا سطح پاکی‌تن اولیه کاهش یافته و در مرحله دیپلوتن مجددا افزایش می‌یابد[۳]. تخمک‌ها مرحله دیپلوتن از اووگونیا بزرگتر بوده، دارای تعداد زیادی ارگانل‌های سیتوپلاسمی می‌باشند و فرایند نوترکیبی[1] ژنتیکی DNA مادری و پدری در آنها اتفاق می‌افتد[۵]. این مرحله تا زمان رسیدن فولیکول به مرحله آترتیک یا فولیکول کاملاً رشد یافته ادامه می‌یابد. در آغاز بلوغ، گروهای تخمک به طور دوره‌ای میوز را از سر می‌گیرند. بنابراین در انسان، اولین مرحله میوز در جنین آغاز شده و تا حدود ۱۲ سال بعد پیامی برای از سر گیری میوز دریافت نمی‌شود. در حقیقت برخی از تخمک ها حدود ۵۰ سال در پروفاز میوز باقی می‌مانند. از میان میلیون‌ها اووسیت اولیه که در زمان تولد وجود دارد تنها حدود ۴۰۰ عدد آنها طی دوره زندگی یک زن، بالغ می‌شوند[۱].

احتمالا مراحل اولیه جنین زایی[2] منحصراً بوسیله اطلاعات مادری[3] موجود در تخمک کنترل می‌شود. بنابراین، ژنوم جنینی در مراحل اولیه برنامه تکوینی تقریبا نقش چندانی ندارد و عملاً بی تاثیر است، در حالیکه کیفیت اطلاعات مادری نقش مهمی در این بازه زمانی دارد.

پس از لقاح، سیتوپلاسم تخمک[4] به سیتوپلاسم جنینی تبدیل می‌شود، در صورتیکه سهم اسپرماتوزا در این فرایند خیلی کم می‌باشد. به همین دلیل، کیفیت تخمک یک فاکتور کلیدی در تعیین کیفیت مراحل اولیه تکوین جنینی است[۶].

1 Recombination
2 Embryogenesis
3 Maternal
4 Ooplasm

۱-۲ بلوغ تخمک

بلوغ تخمک پستانداران یک فرایند بسیار پیچیده است که شامل از سرگیری میوز و تغییرات سیتوپلاسمی از جمله مهاجرت ارگانل‌ها و تغییرات مولکولی می‌باشد. سیگنال‌های تنظیمی فرایندهای مولکولی دخیل در رشد و بلوغ تخمک، طی یک ارتباط دو طرفه پیشرفته بین گامت و سلول‌های سوماتیک اطراف فولیکول در پاسخ به سطوح در گردش خون گنادوتروپین ها و بر اساس برنامه تکوینی تخمک هماهنگ می‌شوند. کسب توانائی تکوینی تخمک شامل سنتز و ذخیره تعداد زیادی مولکول ها طی رشد تخمک است که به دنبال برنامه ریزی مجدد، مصرف به موقع این پیام‌های ذخیره شده طی بلوغ نهایی، لقاح و مراحل اولیه شکل‌گیری جنین صورت می‌گیرد. به طور کلی، بلوغ تخمک را می‌توان به دو بخش بلوغ هسته و بلوغ سیتوپلاسم تقسیم کرد، اگر این دو هماهنگ با هم نباشند باعث از دست رفتن صلاحیت تخمک می‌شود.

۱-۲-۱ بلوغ هسته و سیتوپلاسم

بلوغ هسته تخمک شامل تغییراتی است که در طی از سرگیری نخستین تقسیم میوز بعد از بلوغ به وقوع می‌انجامد و حاصل آن ایجاد محتوای کروموزومی هاپلوئید از وضعیت دیپلوئید قبلی است. تخمک‌های متوقف شده در پروفاز میوز I دارای یک هسته تحت عنوان ژرمینال وزیکول (GV)[1] می‌باشند. فروپاشی پوشش هسته تخمک‌ها (GVBD)[2] نتیجه ادامه تقسیم میوز است. متراکم شدن کروماتین همزمان با جفت شدن کروموزوم‌های هومولوگ روی دوک‌های تقسیم (متافازI) به وقوع می‌انجامد. طی مراحل آنافاز و تلوفاز کروموزوم‌های هومولوگ شروع به جدا شدن کرده و جدایی در مراحل متافاز II همزمان با ظهور اولین جسم قطبی کامل می‌شود. تقسیم میوز با انجام باروری موفقیت آمیز و ظهور دومین جسم قطبی به اتمام می‌رسد.

بلوغ سیتوپلاسمی با ایجاد تغییرات در سیتوپلاسم تخمک برای ایجاد باروری و رشد کامل جنین قبل از لانه‌گزینی ضروری است. این مراحل شامل تولید و حضور فاکتورهای اختصاصی، تغییر وضعیت ارگانل‌های سیتوپلاسمی و تغییرات بعد از نسخه‌برداری mRNA های تجمع یافته طی اووژنزیس می‌باشد. برخی جوانب بلوغ سیتوپلاسمی مشخص شده است،

1 Germinal Vesicle (GV)
2 Germinal Vesicle Breakdown (GVBD)

در حالی که بسیاری از آنها مولکولی و نا شناخته می‌باشند. کیفیت و تکمیل نهایی بلوغ سیتوپلاسمی تخمک در توانایی رشد جنین قبل از لانه‌گزینی تجلی می‌یابد.

در فولیکول‌های غالب[1]، تخمک‌ها در مرحله دیپلوتن پروفاز میوز I باقی مانده که قابل مقایسه با فاز G2 سلول‌های میتوتیک می‌باشند. در بدن، از سرگیری میوز تحت تاثیر موج LH[2] قبل از تخمک‌گذاری در تخمک‌های کاملاً رشد یافته فولیکول‌های غالب اتفاق می‌افتد. قبل و در زمان افزایش LH، تخمک توسط سلول‌های کومولوسی متراکم[3] احاطه شده است. از داخلی‌ترین سلول‌های کومولوسی تعدادی برجستگی، زوناپلاسیدا[4] را سوراخ کرده و در انتها با اوولما[5] اتصالات فاصله‌دار[6] را ایجاد می‌کنند. اندکی بعد از موج LH این اتصالات پاره می‌شوند. در فاصله زمانی بین موج LH و تخمک‌گذاری تغییراتی در هسته و سیتوپلاسم تحت عنوان بلوغ تخمک اتفاق می‌افتد. بلوغ هسته در گاو و گوسفند حدود ۲۴ ساعت ، در خوک ۴۸ ساعت و در اسب ۳۶ ساعت به طول می‌انجامد[۷]. تخمک‌ها در مرحله متافازII تا زمان باروری باقی مانده، در آن زمان تحریک ایجاد شده توسط اسپرم منجر به کامل شدن چرخه میوز و شروع رشد جنین می‌شود.

بلوغ سیتوپلاسم نیازمند بدست آوردن ویژگی‌هایی جهت جلوگیری از پلی اسپرمی در زمان باروری، باز شدن محتویات اسپرم جهت شکل‌گیری پیش هسته نر و شامل گسترش ارگانل‌های سلولی، مهاجرت میتوکندری به محل نزدیک هسته و تجمع گرانول‌ها در طول اوولما می‌باشد. مهار ترشح LH و یا غیر فعال شدن گیرنده‌های LH منجر به جلوگیری از بلوغ تخمک و نقص در تخمک‌گذاری می‌شود[۸]. پاسخ فولیکول‌ها به موج LH به صورت تولید استروژن توسط سلول‌های گرانولوزا، تولید هیالورانون[7] توسط سلول‌های کومولوسی و قطع ارتباط اتصالات فاصله‌دار ما بین تخمک و سلول‌های کومولوسی می باشد[۳]. پارگی اتصالات فاصله‌دار[8] به معنی ناپدید شدن ارتباط دو طرفه کاملا هماهنگ بین تخمک و سلول‌های سوماتیک اطراف می‌باشد. علی رغم وجود تفاوت‌های بین گونه‌ای، مسیر مولکولی اصلی حاکم بر فرایند بلوغ تخمک در پاسخ به موج LH در بر گیرنده مسیرهای تنظیمی متعدد از

1 Dominant Follicle
2 Luteinizing Hormone
3 Compact Cumulus
4 Zona Placida
5 Oolema
6 Gap Junctions
7 Hyaluronan
8 Gap Junction

جمله تغییر فسفوریلاسیون پروتئین، آدنوزین مونوفسفات حلقوی[1](cAMP) و سطوح کلسیم می‌باشد. آبشار پیچیده‌ای از حوادث فسفوریلاسیون و دفسفوریلاسیون در تنظیم از سر گیری میوز موثر بوده و نقش پروتئین(MPF) [2] در شروع بلوغ تخمک در هنگام پیشروی یا همزمان با GVBD به اثبات رسیده است[۹].

۱-۲-۲ فاکتور راه انداز فاز M (MPF)

از سرگیری میوز تخمک، بازتابی از فعالیت فاکتور راه انداز فاز M (MPF)[3] می‌باشد، این فاکتور یک هترودایمر شامل، p34cdc2 Kinase، سرین تیروزین کیناز[4](زیر واحد کاتالیتیک) ، و سیکلین B[5] (یک زیر واحد تنظیم کننده) می باشد. در آزمایش‌هایی که Crozet و همکارانش بر روی بز انجام دادند، مشاهده شد که نقص بیان p34cdc2 Kinase ، احتمالاً عامل محدود کننده‌ای برای بدست آوردن توانائی از سر گیری میوز و شکل گیری GVBD می‌باشد[۱۰]. همچنین آزمایش بر روی تخمک‌های گاو نشان می‌دهد که سیکلینB در شروع فعال سازی p34 به عنوان یک بخش مهم است و پروتئین (p34) نشان عاملی محدود کننده برای از سرگیری میوز می‌باشد[۱۱].

MPF قادر به فسفوریلاسیون پروتئین‌های شرکت کننده در پوشش هسته و پروتئین‌های مسئول تراکم کروماتین و سازمان‌دهی اسکلت سلولی می‌باشد. در بسیاری از گونه ها، تخمک کاملا رشد یافته دارای محلی برای ذخیره پیش ساز Cyclin B – cdc2 Kinase می‌باشد که به شکل غیر فعال تحت عنوان Pre – MPF شناخته می شود[۱۲]. فعال سازی MPF به دلیل فسفوریلاسیون تیروزین ۱۴ و تیروزین ۱۵ از زیرواحد p34cdc2 است، که در نتیجه آن، تخمک وارد فاز متافازI می‌شود. آخرین مرحله فسفوریلاسیون تحت کنترل ژن weel و cdc25 فسفاتاز[6] می‌باشد. در این فرایند به جزء این عوامل، حمایت اتوکاتالیتیک[7] MPF نیز اعمال اثر می‌کند[۱۳]. دفسفوریلاسیون و فعال شدن cdc2 Kinase نیازمند cdc25 phosphatase بوده که اخیرا مشخص شده این فسفاتازها در از سرگیری میوز طی بلوغ تخمک

1 Cyclic Adenosine Monophoshate
2 Maturation Promoting Factor
3 M-Phase Promoting Factor(MPF)
4 Serine-Threoninekinase
5 Cyclin B
6 Phosphatase
7 Autocatalytic

در موش نقش مهمی ایفا می‌کند. تخمک موش فاقد cdc25 به خاطر توقف دائمی میوز در اثر عدم توانایی فعال کردن MPF نابارور بوده و نمی‌تواند وارد مرحله GVBD شود[۱۴].

۱-۲-۳ پروتئین کیناز A (PKA)[1] و پروتئین کیناز C (PKC)

عملکرد های پروتئین کیناز A (PKA)[2] و پروتئین کیناز C (PKC) بر روی بلوغ تخمک موازی هم هستند و تعیین نتیجه میوز کاملاً وابسته به تحریک هر یک می‌باشد[۱۵]. PKA_1، در تخمک وجود دارد و سبب مهار میوز می‌شود اما PKA_2، در سلول‌هایی کومولوسی موجود است و باعث از سرگیری میوز می‌شود. بنابراین cAMP دارای اثرات متضادی بر بلوغ تخمک است، درنتیجه میزان و مدت جریان cAMP تعیین کننده وضعیت (حالت) میوز است. فعال سازی PKC در قسمت سوماتیک اثر مهاری برخی کینازها داخل تخمک را مهار کرده و دارای اثر مثبت بر روی از سرگیری میوز می‌باشد. در پستانداران PKA دارای ۴ زیر واحد تنظیمی (RIα, RIβ, RIIα, RIIβ) می‌باشد. در گذشته پیشنهاد می‌شد که RI از PKA به عنوان یک فرم غالب در تخمک‌های موش نقش دارد و RII در سلول‌های گرانولوزا اعمال اثر می-کند[۱۶]. اما اخیراً وجود زیر واحد RII در تخمک‌های موش صحرایی به اثبات رسیده است[۱۷]. مشاهده شده که زیر واحدهای تنظیم کننده می‌توانند به ۴ مولکول cAMP متصل شوند، و درنتیجه باعث رها سازی مونومرهای C شده که بعد از طی مراحل پایانی، سبب مهار بلوغ زودرس تخمک گردد[۱۸]. بعلاوه بر طبق مدارکی که از طریق بررسی تخمک‌های موش صحرایی بدست آمده نقش‌هایی برای c-kit در توقف میوز پیشنهاد شده است. لیگاند kit (در سلول‌های گرانولوزا) می‌توانند عملکردی همانند یک ماده مهارکننده میوز داشته باشد[۱۹]. در سلول‌های گرانولوزا LH باعث افزایش اولیه cAMP شده و از طریق فسفولیپاز C و اینوزیتول تری فسفات (لیگاند آزاد کننده کلسیم) سبب آزاد سازی ذخایر کلسیم داخل سلولی می‌شود که در نتیجه این کلسیم باعث تحریک پروتئین کیناز C (PKC) می‌شود[۲۰]. بنابراین می‌توان گفت که LH به نوعی باعث فعال سازی MPF می‌شود[۲۱و۲۲].

1 Protein Kinase A
2 Protein Kinase A

۱-۲-۴ MAPKs

(MAPKs)[1]، کیناز دیگری است که در بلوغ تخمک نقش مهمی دارد. بر خلاف MPF، زمان فعال شدن MAPK طی بلوغ تخمک در گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد. به عنوان مثال در تخمک‌های حیوانات اهلی بزرگ MAPK همزمان یا بعد از GVBD فعال شده در حالی که در تخمک‌های موش قبل از GVBD فعال می‌شود[۲۳, ۲۴]. MAPK هدف‌های مولکولی زیادی دارد که در پروتئین‌های اسکلت سلولی هسته یا سیتوپلاسم قرار گرفته‌اند. طی بلوغ تخمک، فعالیت MAPK جهت حفظMPF ، شکل گیری دوک تقسیم و حفظ توقف در متافازII لازم می‌باشد[۲۵]. در تخمک وزغ MAPK و MPF به واسطه کاهش cAMP/ PKA القاء شده توسط پروژسترون، فعال می‌شوند[۲۶].

۱-۲-۵ استرول فعال کننده میوز[2](MAS)

Byskov و همکارانش یک گروه از استرول فعال کننده میوز (MAS) را درون مایع فولیکولی کشف کردند، که در مسیر بیوسنتز کلسترول و lanosterol نقش دارد[۲۷]. یکی از این استرول‌ها که از مایع فولیکولی انسان جدا شده است FF-MAS[3] معرفی شد. مشاهده شده است که این استرول از سرگیری میوز تخمک‌های موش احاطه شده در کومولوس را در زمانی که به طور مصنوعی بوسیله هیپوگزانتین، [4] IBMX و مهار کننده PDE3 متوقف شده‌اند را القاء می‌کند[۲۸]. بعلاوه FF-MAS تنظیم کننده گنادوتروپین و به ویژه LH در شرایط *in vivo* است[۲۹]. بنابراین به نظر می رسد FF-MAS القاء کننده فعالیت MAP کیناز در تخمک‌های موش می‌باشد[۳۰].

1 Mitogen – Activated Protein Kinase
2 Meiosis Activating Sterols (MAS)
3 (4,4-Dimethyl-5α-Cholesta-8.14,24-Trien-3β-Ol)
4 Isobutylmethylxantine