بسم الله الرحمن الرحیم

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و
نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه رازی است.

علوم دانشکده

گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی گرایش تکوینی

عنوان پایان نامه :

فعال سازی پارتنوژنتیک در تخمک موش با استفاده از اعمال فشار هیدروستاتیک

اساتید راهنما:

دکتر مهری آزاد بخت

دکتر علی امینی

نگارش:

مطهره مرتضوی

شهریور ماه 1389

علوم دانشکده

گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی

گرایش تکوینی

مطهره مرتضوی

تحت عنوان:

فعال سازی پارتنوژنتیک در تخمک موش با استفاده از اعمال فشار هیدروستاتیک

در تاریخ 89/6/28 توسط هیات داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسیده است.

1- استاد راهنما 1 دکتر مهری آزاد بخت با مرتبه علمی استادیار امضاء

2- استاد راهنما 2 دکتر علی امینی با مرتبه علمی دانشیار امضاء

3- استاد داور داخلی دکتر پریا پرتو با مرتبه علمی استادیار امضاء

4- استاد داور خارجی دکتر رستم قربانی با مرتبه علمی دانشیار امضاء

چکیده:
پارتنوژنز به فرآیندی گفته می‌شود که طی آن نوزاد به وسیله‌ی جنس ماده و بدون دخالت ماده‌ی ژنتیکی جنس نر و کاهش کروموزومی میوزی تولید می‌شود. جنین‌های حاصل از پارتنوژنز دارای کروموزوم‌های مادری هستند و هر عاملی که بتواند موجب از سرگیری میوز و بلوغ تخمک شود، می‌تواند به عامل القاء کننده‌ی پارتنوژنز محسوب شود.
فشار هیدروستاتیک به عنوان یک عامل فیزیکی مؤثر در سیستم تولید مثلی عمل می‌کند. تحریک مکانیکی ساختار محتوای تخم را تغییر داده و منجر به بروز تغییر در ساختار و محتویات مولکولی تخمک می‌شودو می‌تواند مسیر تحریک دریچه‌های مکانیکی را فعال کند. به این ترتیب که موجب فعال شدن و باز و بسته شدن کانال‌های یونی حساس به کشش می‌شود. این مسیر سبب تغییر یونی درون تخمک و فعال‌سازی آن می‌شود. فشار هیدرستاتیک نیز به عنوان یک عامل مکانیکی می‌تواند سبب تغییر در ساختار غشای تخمک و غلظت یون‌های سیتوپلاسمی شود. در این مطالعه، فعال سازی پارتنوژنتیک در تخمک موش با استفاده از اعمال فشار هیدروستاتیک بررسی شد.
در مرحله‌ی اول، فولیکول‌های نابالغ از تخمدان موش نابالغ نژاد NMRI با سن 12 روزه جدا و در محیط کشت به مدت 12 روز کشت داده شد. در روزهای 1، 3، 6، 9 و 12 مورفولوژی فولیکول و تخمک بررسی شد. پس از پایان دوره کشت، فولیکول‌ها به محیط کشت حاوی 7/5 واحد هورمون HCG منتقل و به دو گروه کنترل و آزمایش تقسیم شدند. فولیکول‌های گروه آزمایش تحت اعمال 25 میلیمتر جیوه فشار هیدروستاتیک به مدت زمان 30 دقیقه قرار گرفتند.
در مرحله‌ی دوم، موش‌های ماده بالغ با تزریق 10 واحد بین المللی هورمون PMSG و پس از 51-48 ساعت تزریق 10 واحد بین المللی هورمون HCG، تحریک تخمک‌گذاری شدند. پس از گذشت 18- 15 ساعت از تزریق HCG، تخمک‌های متافاز II از اویداکت جدا شده، به محیط کشت حاوی 7/5 واحد هورمون HCG منتقل و به دو گروه کنترل وآزمایش تقسیم شدند. در گروه آزمایش، 25 میلیمتر جیوه فشار هیدروستاتیک به مدت زمان‌های 30، 20 و 10 دقیقه اعمال شد.
نتایج حاصل نشان داد که فشار هیدروستاتیک می‌تواند به عنوان عامل القاء کننده‌ی بلوغ و پارتنوژنز در تخمک به شمار رود.
کلمات کلیدی: فعال سازی پارتنوژنتیک، فشار هیدروستاتیک، موش

فهرست مطالب

عنوان.....صفحه

فصل اول : مقدمه

1- مقدمه.....2
1-1- مفهوم پارتنوژنز.....2
1-1-1- تاریخچه ی پارتنوژنز مصنوعی.....2
1-1-2- مهمترین کاربردهای پارتنوژنزمصنوعی.....4
1-2- ساختار فولیکول.....5
1-2-1- تخمک.....5
1-2-2- سلول های گرانولوزا.....6
1-2-3- لایه ی تکا.....7
1-2-4- غشای پایه.....7
1-2-5- زوناپلوسیدا.....7
1-2-6- آنتروم.....8
1-2-7- مایع فولیکولی.....8
1-3-مراحل تکوین فولیکول.....9
1-3-1- فولیکول آغازین.....9
1-3-2- فولیکول اولیه.....10
1-3-3- فولیکول ثانویه.....10
1-3-4- فولیکول ثالث.....11
1-4- بلوغ تخمک.....11
1-5- القاء تخمک گذاری در محیط کشت.....13
1-6- تغییرات تخمک در حین لقاح با اسپرم و یا فعال سازی پارتنوژنتیک.....14
1-6-1- اگزوسیتوز گرانول های قشری.....14
1-6-2- از سرگیری میوز و انجام تقسیمات سلولی در تخمک هنگام فعال سازی پارتنوژنز.....15
1-6-2-1- مکانیسم عمل فاکتور سایتوستاتیک.....16
1-6-3- مکانیسم مولکولی فعال شدن متابولیسم سلول جنسی.....17
1-7- مکانیسم افزایش کلسیم داخل سلولی تخمک پس از فعال سازی پارتنوژنتیک.....20
1-7-1- سیگنال های مکرر کلسیم ناشی از فعال سازی پارتنوژنتیک.....21
1-8- تنظیم کننده های نوسان های کلسیم سیتوپلاسمی.....21
1-8-1- میزان فاکتورهای اسپرم.....21
1-8-2- نفوذ کلسیم.....22
1-8-3- چرخه ی سلولی.....22
1-8-4- بلوغ تخمک.....23
1-8-5- پر شدن منابع کلسیم.....23

1-9- ویژگی های هیستوشیمیایی و مورفولوژیکی جنین های حاصل از پارتنوژنز 24
1-9-1- تعداد سلول ها و کروموزوم ها 24
1-9-2- گرانول های قشری 25
1-9-3- ویژگی های فراساختاری 26
1-9-4- میزان محتویات سیتوپلاسمی 27
1-9-5- فعالیت های متابولیسمی 27
1-10- عوامل القاگر پارتنوژنز مصنوعی 29
1-10-1- مکانیسم عمل برخی از القاگرهای مهم پارتنوژنز مصنوعی 29
1-10-1-1- محلول‌های حاوی کلسیم و یونوفور کلسیم 29
1-10-1-2- استوروسپورین، سیکلوهگزامید و 6 – دی متیل آمینوپورین 29
1-10-1-3- اتانول 30
1-11- فشار هیدروستاتیک در سیستم های زیستی 30
1-11-1- تاثیر فشار در اندام های تولید مثلی ماده 31
1-11-2- تغییرات فشار در مایع فولیکولی داخل فولیکول 32
1-11-3- اثر فشار بر فعال کردن تخم 33
1-12- فرضیات تحقیق 35

فصل دوم: مواد و روش‌ها

2- مواد و روشها 37
2-1- مواد مورد نیاز 37
2-1-1- محیط کشت (MEM-A) 37
2-1-2-**آنتی بیوتیک پنیسیلین- استرپتومایسین (PEN / STREP)** 37
2-1-3- سرم جنین گاوی (FBS) 38
2-1-4- هورمون نوترکیب تحریک کننده فولیکول(GONAL-F) 38
2-1-5- هورمون PMSG 38
2-1-6- هورمونHCG 39
2-1-7- سرم آلبومین گاویBSA 39
2-1-8- فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) 39
2-1-9- محیط کشت(T6) 40
2-1-10- روغن معدنی 41
2-2- وسایل اولیه ی مورد نیاز 41
2-3- تجهیزات بنیادی 41
2-4- تقسیم بندی مراحل تحقیق 41
2-5- مرحله ی اول: اثر فشار هیدروستاتیک بر تخمک های حاصل از فولیکول های رشد یافته در محیط کشت آزمایشگاه 43

2-5-1- حیوان آزمایشگاهی 43
2-5-2- جداسازی تخمدان 43
2-5-3- جدا سازی فولیکول های نابالغ 43
2-5-4- انتخاب فولیکول های نابالغ با کیفیت بالا 44
2-5-5- کشت فولیکول های نابالغ 44
2-5-6- القاء تخمک گذاری در محیط بلوغ 45
2-5-7- سیستم اعمال فشار هیدروستاتیک 45
2-5-8- بررسی مورفولوژی فولیکول ها طی دوره کشت 46
2-5-9- بررسی میزان بلوغ و القاء پارتنوژنز در تخمک در فواصل زمانی مختلف 46
2-5- 10- روش های آماری 47
2-6- مرحله ی دوم : اثر فشار هیدروستاتیک بر القاء پارتنوژنز در تخمک های MII حاصل از تحریک تخمک گذاری در موش ماده ی آزمایشگاهی 47
2-6-1- حیوان آزمایشگاهی 47
2-6-2- تحریک تخمک گذاری در موش های ماده 47
2-6-3- تشریح موش های ماده 47
2-6-4- تقسیم بندی تخمک های MII برای گروه های مورد مطالعه و اعمال فشار هیدروستاتیک 48
2-6-5- بررسی میزان القاء پارتنوژنز در تخمک های MII 48
2-6- 6- روش های آماری 48

فصل سوم : نتایج

3- نتایج 50
3-1- مرحله ی اول 50
3-1-1- رشد فولیکول های نابالغ در محیط کشت 50
3-1-2- اثر فشار هیدروستاتیک بر القاء پارتنوژنز در تخمک های حاصل از فولیکول های رشد یافته در محیط کشت آزمایشگاه، 24 و 48 ساعت پس از اعمال فشار هیدروستاتیک 53
3-2- مرحله ی دوم: 57
3-2-1- نتایج حاصل از اعمال فشارهیدروستاتیک بر تخمک هایMII در گروه اول، 24 و 48 ساعت پس از اعمال فشارهیدروستاتیک 58
3-2-2- نتایج حاصل از اعمال فشار هیدروستاتیک بر تخمک های MII گروه دوم، 24، 48 و 72 ساعت پس از کشت 59
3-2-3- نتایج حاصل از اعمال فشار هیدروستاتیک بر تخمک های MII گروه سوم، 24 و 48 ساعت پس از اعمال فشار هیدروستاتیک 60

فصل چهارم : بحث و نتیجه گیری

4- بحث و نتیجه گیری 68
4-1- بحث 68
4-2- نتیجه گیری و پیشنهادات 75
منابع..... 76

فهرست اشکال

شکل 1- 1- ساختارشماتیک فولیکول بالغ 5
شکل 1- 2- ساختار شماتیک تخمک 6
شکل1- 3- مراحل تکوین فولیکول..... 9
شکل 1-4- مقطع تخمدان 10
شکل 1-5- تصویر شماتیک بلوغ تخمک..... 13
شکل 1-6- مکانیسم مولکولی فعال شدن متابولیسم سلول جنسی..... 17
شکل 2-1- چگونگی اندازه گیری قطر فولیکول و تخمک 44
شکل 2-2- سیستم اعمال فشار هیدرواستاتیک..... 46
شکل 3-1- مورفولوژی فولیکول و تخمک طی دوره کشت 63
شکل 3-2-مورفولوژی فولیکول های با کیفیت بالا و با کیفیت پایین در روز اول و دوازدهم دوره کشت 64
شکل 3-3- مراحل بلوغ و القاء پارتنوژنز درتخمک 65
شکل 3-4-مراحل تکوین جنین پارتنوژنتیک حاصل از القاء پارتنوژنز در تخمک متافاز II 66

فهرست جداول

جدول 3-1- 1- اندازه‌ی قطر فولیکول و تخمک برحسب میکرومتر طی دوره‌ی کشت..... 52
جدول 3-1-2- اثر فشار هیدروستاتیک بر بلوغ و القاء پارتنوژنز در تخمک‌های حاصل از فولیکول-های رشد یافته درمحیط کشت آزمایشگاه 24 و 48 ساعت پس از اعمال فشار هیدروستاتیک 55
جدول 3-2-1- اثر فشار هیدروستاتیک بر تخمک‌های MII، 24، 48 و 72 ساعت پس از اعمال فشار هیدروستاتیک 61

فهرست نمودارها

نمودار 3-1- 1- تغییر در اندازه‌ی قطر فولیکول و تخمک طی دوره‌ی کشت 52
نمودار 3-1-2- اثر فشار هیدروستاتیک بر بلوغ و القاء پارتنوژنز در تخمک‌های حاصل از فولیکول-های رشد داده شده در محیط کشت آزمایشگاه 24 و 48 ساعت پس از اعمال فشار هیدروستاتیک 56
نمودار 3-2-1- اثر فشار هیدروستاتیک بر تخمک‌های MII ، 24، 48 و 72 ساعت پس از اعمال فشار هیدروستاتیک..62

فصل اول:

مقدمه

1- مقدمه

1-1- مفهوم پارتنوژنز

پارتنوژنز از یک کلمه‌ی یونانی به معنای بکرزایی مشتق شده است و به فرآیندی گفته می‌شودکه طی آن نوزاد به وسیله‌ی جنس ماده و بدون دخالت ماده‌ی ژنتیکی جنس نر وکاهش کروموزومی میوزی تولید می شود. این روش تولید مثلی در بین حشرات، خزندگان و دوزیستان به طور طبیعی انجام می‌شود. پارتنوژنز را می‌توان به طور مصنوعی در تخمک‌های پستانداران فعال کرد (Lampert; 2008). در طی پارتنوژنز، تخم بدون نفوذ اسپرم فعال می‌شود (Niimura; 1997).

1-1-1- تاریخچه‌ی پارتنوژنز مصنوعی

اولین بار تحریک پارتنوژنز مصنوعی در محیط آزمایشگاه، توسطLoeb در سال 1899 انجام شد. او تخمک های توتیای دریایی و قورباغه را با خراش جزئی توسط سوزن یا تغییر در غلظت نمک محیط اطراف آنها تحریک کرد (Lampert; 2008) .

همچنین، اولین بار پینکوس در سال 1939نشان داد که می‌توان تخمک‌های پستانداران را از طریق تحریکات دمایی و شیمیایی به سمت انجام پارتنوژنز فعال کرد (Pincus; 1939, Pincus; 1939). وی، جنین‌های حاصل از پارتنوژنز را با استفاده از گرم کردن، به سمت تکوین نوزادان پارتنوژنز پیشبرد، اما پس از پینکوس، درهیچ کدام از مطالعات مشابه دیگر، جنین‌های پارتنوژنتیک خرگوش به نوزاد پارتنوژنتیک تبدیل نشدند و فقط تا مرحله‌ی بلاستوسیست، تکوین پیداکردند (Chang; 1954, Thibault; 1949).

در سال 1970، روش‌های متفاوتی برای فعال‌سازی تخمک موش شناخته شد. از جمله‌ی این روش ها، تیمار با پالس‌های الکتریکی (Tharkowski et al; 1970)، تیمار با داروی بیهوشی و بی حس‌کننده (Kaufman; 1975)، استفاده از هیالورونیداز (Iles et al; 1975) و گرم کردن (Balakier et al; 1976) را می‌توان نام برد.

کافمن و همکارانش در سال 1974، جنین‌های پارتنوژنتیک موش را که در محیط آزمایشگاه ایجاد شده بودند به اویداکت موش باردار کاذب[1]انتقال دادند. از بین جنین‌هایی که مورولا یا بلاستوسیست طبیعی بودند، 90% آنهاپس از انتقال دادن به اویداکت، واکنش دسیدوایی شدن را القاء کردند (Kaufman et al; 1974).

کافمن و همکارانش در سال 1977، همچنین، تکوین برخی از بلاستوسیست‌های پارتنوژنتیک دیپلوئید موش آزمایشگاهی را که القای پارتنوژنز در آنها، توسط محلول دارای کلسیم و بدون منیزیم صورت گرفته بود، تا مرحله‌ی جوانه‌ی زوائد جلویی، پیش بردند (Kaufman et al; 1977).

پلاکت و همکارانش در سال 1984، پارتنوژنز را در انسان انجام دادند که از میان 800 تخمک انسانی تحریک شده 12 تخمک از طریق پارتنوژنز فعال شدند و 4 تخمک فعال تا مرحله‌ی تسهیم پیش رفتند (Plachot et al; 1984).

وینسنت و همکارانش در سال 1992،نشان دادند که پیشرفت سیکل سلولی تخمک تحریک شده‌ی موش به سمت اینترفاز و القاء پارتنوژنز در آنها وابسته به سطح کلسیم داخل سلولی است. آن ها تخمک‌های متوقف شده در متافازII را در معرض کلسیم یونوفور A23187 قرار دادند. یونوفور A23187، می‌تواند سبب القاء پارتنوژنز در تخمک متافازII شود. بخش عمده‌ی این تخمک‌ها به سمت آنافاز پیش رفته و دومین جسم قطبی خود را آزاد کردند. اگزوسیتوز گرانول‌های قشری نیز در این تخمک‌های فعال شده صورت گرفت (Vincnet et al; 1992).

سانو همکارانش در سال 1997، از استوروسپورین برای فعال‌سازی پارتنوژنتیک تخمک های متافازII موش استفاده کردند. استوروسپورین به عنوان مهار کننده‌ی پروتئین کیناز عمل می‌کند و سبب پیشبرد سیکل سلولی تخمک متافازII می‌شود. در این تحقیق، فعال‌سازی تخمک موش با استفاده از استوروسپورین متأثر از سن تخمک و مستقل از کلسیم بود. تخمک فعال شده نیز تشکیل پیش هسته را انجام داد اما اگزوسیتوز گرانول‌های قشری و آزادسازی جسم قطبی صورت نگرفت (Sun et al; 1997).

وانگ و همکارانش در سال 1998،تخمک‌های خوک را با استفاده ازکلسیم یونوفور A23287 به سمت القاء پارتنوژنز پیش بردند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که کلسیم یونوفور A23187 افزایش یون‌های کلسیم داخل سلولی تخمک، اگزوسیتوز گرانول‌های قشری، فعال‌سازی هسته و واکنش زونا را القاء می‌کند. علاوه بر این، میزان نفوذپذیری غشای پلاسمایی تخمک خوک نسبت به اسپرم توسط کلسیم یونوفورA23187 تنظیم می‌شود (Wang et al; 1998).

دینیز و همکارانش در سال 2000،تخمک‌های فریز شده‌ی گاوی را در معرض کلسیم یونوفور A23187 قرار داده و القاء پارتنوژنز را در آنها انجام دادند. 8% تخمک‌هایی که با سلول‌های کومولوس فریز شده بودند، پس از القاء پارتنوژنز در آنها، 8% از آنها به مرحله‌ی بلاستوسیست رسیدند(Dinnyes et al; 2000).

[1]. Pseudopregnant

لاگوتینا و همکارانش در سال 2004، جنین‌های پارتنوژنتیک و اندروژنتیک ایجاد کردند. جنین‌های آندروژنتیک را از تزریق اسپرم درون سیتوپلاسمی[1](ICSI) یا لقاح آزمایشگاهی تخمک های بی‌هسته شده به وجود آوردند. جنین‌های پارتنوژنتیک حاصل از القا توسط یونومایسین به همراه سیکلوهگزامید3% و جنین‌های پارتنوژنتیک حاصل از القا توسط 6- دی متیل آمینوپورین14/5% بلاستوسیست را تشکیل دادند. اما تعداد کمی از جنین‌های آندروژنتیک (1/8%) قادر به تشکیل بلاستوسیست بودند (Lagutina et al; 2004).

روازووا و همکارانش در سال 2008، رده‌های سلول‌های بنیادی هموزایگوسHLA[2]را از توده‌ی سلولی داخلی[3]بلاستوسیست جنین پارتنوژنتیک استخراج کردند (Revazova et al; 2008).

دو و همکارانش در سال 2008، اثر فشار هیدروستاتیک را بر افزایش قدرت پیشبرد مراحل تکوینی تخمک های بالغ و فریز شده‌ی خوک بررسی کردند. در این تحقیق، تحت فشار هیدروستاتیک، تخمک های خوک تا مرحله‌ی بلاستوسیست پیش رفتند (Du et al; 2008).

تاکنون فعال‌سازی پارتنوژنتیک تخمک‌ها در پستانداران مختلفی مثل موش، خوک، بز، گاو، میمون‌ها و انسان انجام شده است.

1-1-2- مهمترین کاربردهای پارتنوژنزمصنوعی

یک‌کی از مهم‌ترین کاربردهای القاء پارتنوژنز مصنوعی، به دست آوردن رده‌های سلول‌های بنیادی جنینی است.

مهمترین مشکلی که بر سر راه پیوند ارگان و بافت‌های آلوژنیک وجود دارد، پس زدن بافت پیوند زده شده توسط سیستم ایمنی میزبان می‌باشد. هرچند جنین‌های حاصل از پارتنوژنز پستانداران به طور معمول نمی-توانند به یک موجود کامل و زنده تکوین یابند، اما چنین جنین‌هایی می‌توانند به عنوان منبعی از سلول‌های بنیادی جنینی با شباهت ژنومی - از لحاظ هسته و میتوکندری - با ژنوم فرد دهنده‌ی اووسیت به کار روند(Revazova et al; 2008).

با درستکاری‌های ژنتیکی جنین‌های حاصل از پارتنوژنز نیز، می‌توان رده‌های سلول‌های بنیادی مورد نظر را استخراج نمود. روازووا در سال 2008، رده‌ی سلول‌های بنیادی هموزیگوس HLA را از بلاستوسیست‌های پارتنوژنتیک انسانی استخراج کرد (Revazova et al; 2008).

از دیگر کاربردهای پارتنوژنز مصنوعی می‌توان به کلون‌کردن حیوانات به ویژه حیوانات مزرعه[1] اشاره کرد.. یکی از عواملی که تأثیر فراوانی بر راندمان فناوری انتقال هسته‌ای سلول‌های سوماتیک[2](SCNT) دارد،

---

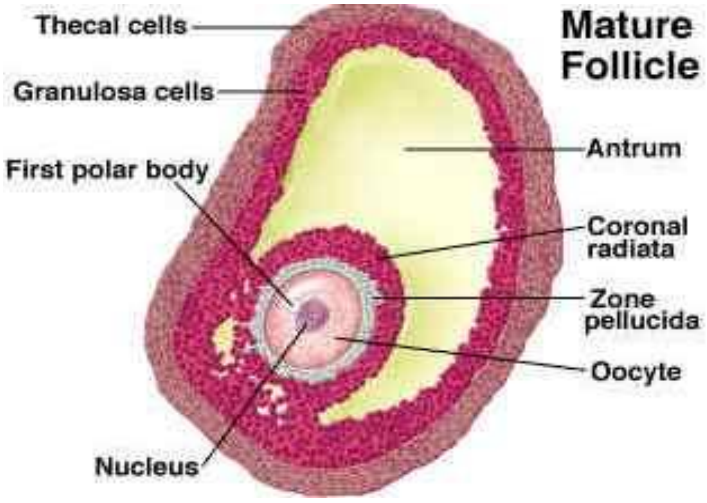
[1]. Intracytoplasmic sperm injection
[2]. Human Leukocyte Antigen
[3]. Inner cell mass (ICM)

فعال‌سازی تخمک است. طی روند SCNT، هسته‌ی دیپلوئید سوماتیک جایگزین ژنتیکی سلول اسپرم و نیز تخمک می‌شود. بنابراین به منظور شبیه سازی روند فعال‌سازی طبیعی ناشی از لقاح اسپرم و تخمک و شروع روند تکوین جنینی، باید فعال‌سازی مصنوعی انجام پذیرد (Knott et al; 2002).

از طرف دیگر،فعال‌سازی پارتنوژنتیک تخمک، می‌تواند روشی را در جهت مطالعه‌ی عوامل فعال‌کننده‌ی تخمک و مکانیسم‌های فعال شدن تخمک ایجاد کند که این به نوبه‌ی خود به شناخت عوامل ناباروری و درمان آنها کمک می‌کند.

1-2- ساختار فولیکول

هر فولیکول در تخمدان شامل یک تخمک نابالغ و سلولهای اطراف آن است. این ساختار طی فولیکولوژنز رشد کرده و تخمک دارای توانایی لازم برای لقاح طی تخمک گذاری از آن آزاد می‌شود. فولیکول بالغ در تخمدان شامل بخش های زیر است (شکل 1-1) :



شکل 1- 1- ساختارشماتیک فولیکول بالغ

faculty.southwest.tn.edu

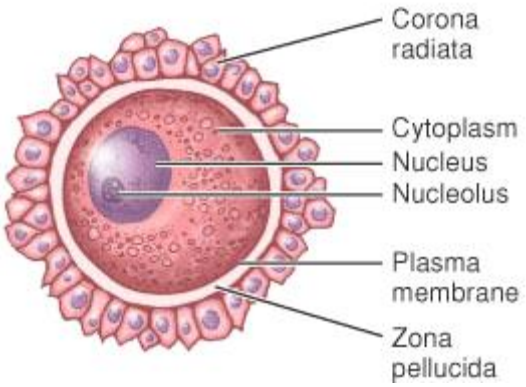
1-2-1- تخمک[3]

گامتوسیت[4] یا سلول زاینده آغازین طی تقسیم میتوز به اووگونیا[5]تبدیل می‌شود. پس از توقف تقسیم میتوز و شروع تقسیم میوز اووگونیا، تخمک نامیده می‌شود که در مرحله پروفاز میوز اول متوقف می‌شود. هسته

---

1. Farm animal
2. Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT)
3. Oocyte
4. Gametocyte
5. Oogonia

تخمک را در این مرحله ژرمینال وزیکول[1](GV) می‌نامند که در زمان بلوغ و تخمک‌گذاری تقسیم میوز Iدر آن کامل شده و به تخمک متافازII[2](MII) تبدیل می‌شود (شکل1- 2)(Gilbert; 2008).



شکل 1- 2- ساختار شماتیک تخمک

akamai.net

1-2-2- سلول‌های گرانولوزا[3]

سلول‌های گرانولوزا سلول‌های اپیتلیالی هستند که از سلول‌های مزوتلیومی استرومای تخمدان منشأ گرفته وتوسط اتصالات محکم[4] به یکدیگر متصل شده‌اند.ارتباط متابولیکی این سلول‌ها از طریق اتصالات باز[5] می باشد.این سلول‌ها یک لایه مسطح در فولیکول‌های آغازین و چند لایه سلول را در فولیکول‌های بالغ در اطراف تخمک به وجود می‌آورند. عملکرد اصلی این سلول‌ها تولید استروئید و فاکتورهای رشد طی تکوین تخمک است. در فولیکول‌های بالغ این سلول‌ها به سلول‌های گرانولوزای دیواره‌ای[6]و سلول‌های گرانولوزای گرانولوزای توده‌ای[7]متمایز می شوند. سلول‌های گرانولوزای توده‌ای اطراف تخمک را فراگرفته و بعد از تخمک‌گذاری نیز با آن ارتباط دارند (Hardy et al; 2000).

1. Germinal Vesicle (GV)
2. Metaphase II (MII)
3. Granulose Cells
4. Tight Junctions
5. Gap Junctions
6. Mural Granulose Cell
7. CumulusGranulose Cell

1-2-3- لایه‌ی تکا[1]

لایه‌ی تکا بافت همبند متراکمی است که اطراف فولیکول‌های تخمدان را فراگرفته و در مراحل تشکیل فولیکول آنترال[2] دو لایه شده و تکای داخلی وتکای خارجی را به وجود می‌آورد.

تکای خارجی[3]: خارجی‌ترین لایه‌ی فولیکول است که از سلول‌های فیبروبلاستی و رشته‌های کلاژن ساخته شده است و بافت همبند اطراف فولیکول را تشکیل می‌دهد.

تکای داخلی[4]: شبیه لایه‌ی تکای خارجی است. در این لایه تعداد سلول‌های فیبروبلاستی بیشتر و رشته‌های کلاژن کمتر است. این لایه همچنین دارای سلول‌های شبیه سلول‌های ماهیچه‌ی صاف و سلول‌های ترشحی می‌باشد ورگهای خونی نیز در آن گسترش یافته است(Espey & Richards; 2006).

1-2-4- غشای پایه[5]

غشای پایه، لایه‌ای از ماتریکس خارج سلولی است که بین لایه‌ی تکا و سلول‌های گرانولوزای دیواره‌ای قرار گرفته است. این غشا توسط سلول‌های فولیکولی اولیه ترشح می‌شود و دارای کلاژن نوع IV می باشد (Hardy et al; 2000).

1-2-5- زوناپلوسیدا[6]

زونا پلوسیدا یا ناحیه‌ی شفاف، لایه‌ی گلیکوپروتئینی است که غشای پلاسمایی تخمک را می‌پوشاند و حاصل ترشح سلول‌های فولیکولی و تخمک می‌باشد.این غشا دارای سه نوع گلیکوپروتئینZPII, ZPI ZPIII,است که در لقاح، اتصال اسپرم، واکنش آکروزومی و بقای تخمک نقش دارند.در انسان 5 روز پس از لقاح زوناپلوسیدا پاره شده و بلاستوسیست از آن خارج می‌شود. در حیوانات غیر پستاندار ناحیه‌ی شفاف، لایه‌ی زرده‌ای نامیده می‌شود، که در جلوگیری از جفت گیری بین گونه‌های مختلف به ویژه گونه‌های با لقاح خارجی دارای اهمیت است (Vanden Hurk & Zhao; 2005).

---

1. Theca Layer
2. Antral Follicle
3. Theca Externa
4. Theca Enterna
5. Basal Membrane
6. Zona Pellucida

1-2-6- آنتروم[1]

آنتروم حفره‌ای است که در فولیکول‌های بالغ و قبل از تخمک‌گذاری دیده می‌شود. این حفره در اثر کنار رفتن سلول‌های گرانولوزا، تجمع ترشحات سلول‌های گرانولوزا و سیستم مویرگی اطراف فولیکول ایجاد می شود و از مایع پر شده است(Clarke et al; 2006).

1-2-7- مایع فولیکولی[2]

در طی تکوین فولیکول آنتروم، از مایع فولیکولی پر می‌شود. این مایع، محیط بیوشیمیائی قبل ازتخمک-گذاری را برای تخمک فراهم می‌کند و بخش بدون رگ در تخمدان پستانداران به شمار می‌آید و توسط دیواره‌ی فولیکولی که سد خونی فولیکول را می سازد از استرومای اطراف فولیکول و سیستم رگی جدامی-شود(Leroy et) al; 2004). فشار داخل مایع فولیکولی طی تخمک‌گذاری تحت اثر القای گنادوتروپین‌ها وهورمون گنادوتروپین جفت انسانی[3](HCG) درمراحل ابتدایی، میانی و انتهایی تخمک‌گذاری افزایش می-یابد(Matousek et al; 2001). مایع فولیکولی حاوی گلوکز، هیدروکسی بوتیرات،کلسترول، پتاسیم،کلراید، لاکتات،اوره پروتئازها و فاکتورهای رشد است (Leroy et al; 2004).

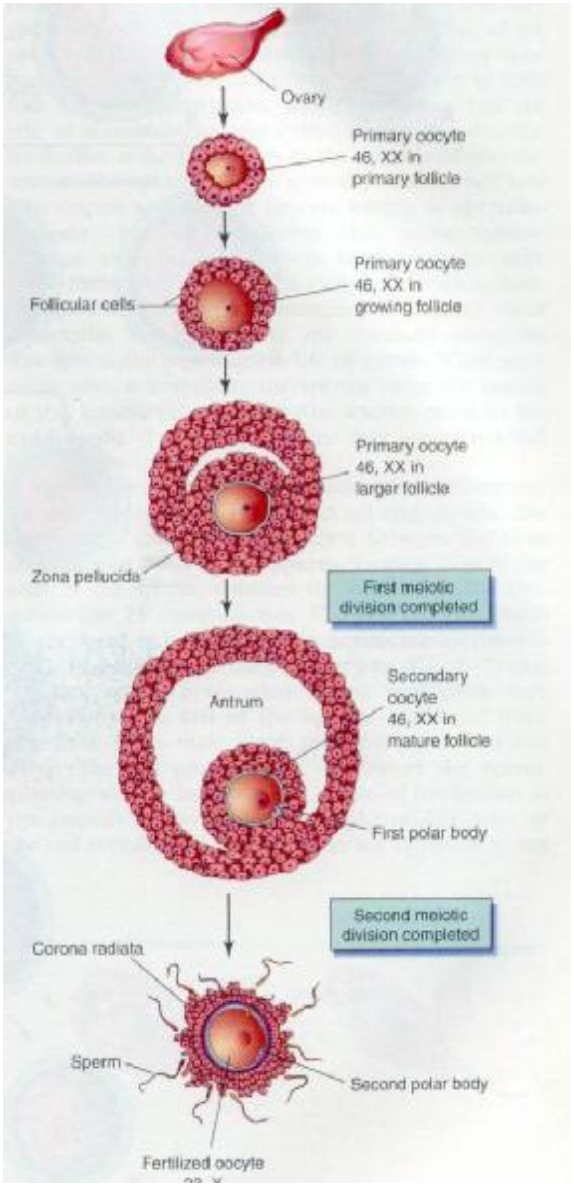
[1] Antrum
[2] Follicular Fluid(FF)
[3] Human Chorionic Gonadotropin (HCG)

1-3- مراحل تکوین فولیکول

فولیکول‌های در حال رشد تا رسیدن به مرحله‌ی بلوغ از چند مرحله عبور می‌کنند که هر کدام ویژگی‌های ساختاری خاص خود را دارد. هنگام بلوغ در هر دوره جنسی فولیکول‌های آغازین طی فرایندی به نام فولیکولوژنز[1] بالغ شده و تخمک، طی تخمک گذاری[2] از تخمدان آزاد می‌شود. (شکل1-3)(Vanden Hurk& Zhao; 2005).

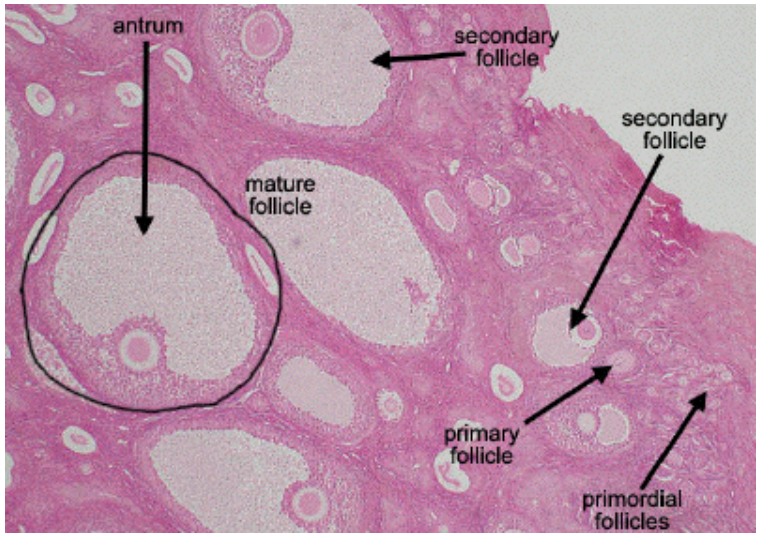
1-3-1- فولیکول آغازین[3]

حدود ماه پنجم از تکوین جنین، در قشر تخمدان انسان حدود 7 میلیون فولیکول با قطر50-30 میکرومتروجود دارد.هر یک از فولیکول ها شامل یک تخمک نابالغ، یک لایه سلول مزوتلیومی سنگفرشی که تخمک را در بر می‌گیرد و غشای پایه که حاصل ترشح سلول‌های فولیکولی است، می‌باشد. فعالیت بیولوژیکی این فولیکول کم است، هسته شفاف تخمک آن خارج از مرکز قرار دارد و اغلب اندامک‌های تخمک در مرکز سلول تجمع یافته‌اند. هسته‌ی تخمک در پروفاز میوز اول متوقف شده و ژرمینال وزیکول نامیده می‌شود (شکل 1-5) (Vanden Hurk & Zhao; 2005).



شکل1- 3- مراحل تکوین فولیکول
www.ncbi.nlm.nih.govbookshelf

[1] Folliculogenesis
[2] Ovulation
[3] Primordial Follicle



شکل 1-4- مقطع تخمدان

www.ncbi.nlm.nih.govbookshelf

1-3-2- فولیکول اولیه[1]

ایجاد فولیکول اولیه اولین تغییر مورفولوژیکی است که در بلوغ فولیکول روی می‌دهد. به طوری که سلول های پهن اطراف تخمک مکعبی شده و سیتوپلاسم آنها دانه دار به نظر می‌رسد، به همین دلیل سلول‌های گرانولوزا نامیده می‌شوند. قطر فولیکول حدود100 میکرومتر است. در این مرحله زوناپلوسیدا قابل مشاهده و سلول‌های پارانشیمی تخمدان که فولیکول در حال رشد را می‌پوشانند، تکای اطراف فولیکول را تشکیل می دهند (شکل 1-5)(Vanden Hurk & Zhao., 2005)

1-3-3- فولیکول ثانویه[2]

در این مرحله چندین لایه سلول گرانولوزا اطراف تخمک را می‌پوشاند، قطر فولیکول به حدود 200-180 میکرومتر می‌رسد، تعداد سلول‌ها افزایش یافته و قطر تخمک حدود 60-40 میکرومتر است. در مراحل انتهایی تکوین این فولیکول، سلول‌های اپیتلیالی تخمدان تمایز یافته و با سیستم رگی ارتباط برقرار می‌کنند. این سلول‌ها تکای داخلی را تشکیل می‌دهند. فولیکول ثانویه‌ای که دارای تکای داخلی است فولیکول پره-آنترال[3] نیز نامیده می‌شود(شکل 1-5). هسته‌ی تخمک موجود در فولیکول ثانویه در مرحله پروفاز میوز اول متوقف شده است(Vanden Hurk & Zhao; 2005).

[1]. Primary follicle
[2]. Secondary follicle
[3]. Preantral follicle