I

بسم الله الرحمن الرحیم
الحمد لله رب العالمین الرحمن الرحیم مالک یوم الدین
ایاک نعبد و ایاک نستعین اهدنا الصراط المستقیم
صراط الذین انعمت علیهم غیر المغضوب علیهم
و لا الضالین

دانشگاه تربیت معلم

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی گرایش سلولی- تکوینی، جانوری

تاثیر عصاره زعفران بر بلوغ و تکوین تخمک های نابالغ موش نژاد NMRI

استادان را هنما:

دکتر مهناز آذرنیا- دکتر حسین ایمانی

استاد مشاور:

دکتر عبدالحسین شاهوردی

پژوهشگر:

سمیه توانا

شهریور ماه ۸۹

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکـارات و نـوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به پژوهشـگاه رویان است.

دانشگاه تربیت معلم

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی گرایش سلولی-

تکوینی، جانوری، خانم سمیه توانا

تاثیر عصاره زعفران بر بلوغ و تکوین تخمک های نابالغ موش نژاد NMRI

در تاریخ..... توسط هیات داوران زیر بررسی و با درجه..... به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد/استادان راهنمای پایان نامه دکتر..... با مرتبه علمی..... امضا

۲- استاد/استادان مشاور پایان نامه دکتر..... با مرتبه علمی..... امضا

۳- استاد/استادان داور داخل گروه دکتر..... با مرتبه علمی..... امضا

۴- استاد/استادان داور خارج از گروه دکتر..... با مرتبه علمی..... امضا

امضای مدیر گروه

"و خداست تنها مالک زمین و آسمان‌ها، هر چه بخواهد می‌آفریند و به هر که بخواهد فرزند اناث و به هر که بخواهد فرزند ذکور عطا می‌کند. یا در یک رحم دو فرزند پسر و دختر قرار می‌دهد و هر که را خواهد عقیم گرداند (شوری آیات ٤٩-٥٠)".

چکیده

هدف تحقیق : جهت ارزیابی تاثیرات به کار گیری دوزهای مختلف عصاره آبی زعفران به صورت *in-vitro* و *in-vivo* و بررسی تاثیرات آن بر بلوغ تخمک، لقاح و تکوین جنینی.

روش تحقیق: تخمک های نابالغ از تخمدان موش‌های ماده ۸-۶ هفته ای نژاد NMRI جمع آوری شدند. تخمک‌ها در محیط کشت α-MEM همراه با با دوزهای مختلف عصاره آبی زعفران و همچنین ترکیبات اصلی آن یعنی کروسین و کروستین به طور جداگانه، به مدت ۱۸-۱۶ ساعت کشت داده شدند. بعد از آن تخمک های بالغ شده در مجاورت با اسپرم ها به مدت ۶-۴ ساعت در محیط T6 انکوبه شدند سپس میزان تسهیم جنین‌ها تا مرحله بلاستوسیست بررسی شد. همچنین اثر دوزهای مختلف عصاره آبی زعفران به صورت in-vivo بر میزان بلوغ تخمک، لقاح و تکوین جنین ها مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه تخمدان های تیمار شده با بهترین دوز عصاره زعفران تحت بررسی های هیستولوژیکی و ایمونوهیستوشیمی قرار گرفتند و با گروه کنترل مقایسه شدند.

نتایج: در بخش *in-vitro* میزان بلوغ، لقاح و تکوین به ترتیب در گروه های تیمار شده با ۴۰، ۱۰ و ۵ میکروگرم در میلی لیتر عصاره زعفران افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد($p<0.05$). با اضافه کردن 50µg/ml از کروسین و کروستین به طور جداگانه به محیط کشت بلوغ، افزایش معنی داری در میزان بلوغ، لقاح و تکوین جنینی مشاهده شد. همچنین در بخش *in-vivo* در گروه های تیمار شده با ۱۰۰ mg/kg بیشترین میزان لقاح و تکوین جنین در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. ($p<0.05$).

نتیجه‌گیری: عصاره آبی زعفران به عنوان یک آنتی اکسیدان گیاهی قوی، بلوغ تخمک، لقاح و تکوین جنینی را با توجه به دوز، در محیط کشت آزمایشگاهی افزایش می دهد و این افزایش در بلوغ تخمک، لقاح و تکوین جنین ها در موش های تیمار شده با عصاره آبی زعفران هم مشاهده شد.

کلید واژه: عصاره آبی زعفران، بلوغ آزمایشگاهی، لقاح آزمایشگاهی، آنتی اکسیدان.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول ۱

مقدمه ۱

۱-۲- مروری بر تاریخچه روش های کمک باروری ۳

۱-۳- تاریخچه روش های کشت ۵

۱-۴- آناتومی تخمدان ۵

۱-۵- رشد و نمو تخمک ۶

۱-۵-۱- ساخت و تجمع ماکرومولکول ها در طی اووژنز ۷

۱-۶- تخمک های مرحله حباب زاینده ۸

۱-۶-۱- تقسیم بندی تخمک حباب زاینده براساس توزیع کروماتین ۹

۱-۷- اثر سلول های کومولوس بر روند بلوغ و تکوین تخمک ۹

۱-۸- روش های جدا سازی فولیکول ۱۰

۱-۹- بلوغ آزمایشگاهی ۱۱

۱-۱۰-کیفیت تخمک ۱۲

۱-۱۱- تنظیم بلوغ تخمک ۱۲

۱-۱۱-۱- بلوغ هسته ۱۳

۱-۱۱-۲- بلوغ سیتوپلاسم ۱۴

۱-۱۲- متابولیسم تخمک ۱۶

۱-۱۳- تخمک گذاری در موش ۱۶

۱-۱۴- تولید اسپرم و خصوصیات آن ۱۷

۱-۱۵- لقاح در موش ۱۹

۱-۱۶- لقاح آزمایشگاهی ۲۰

۱-۱۷- فعال شدن ژنوم جنینی ۲۱

۱-۱۸- تکوین جنین پیش از لانه گزینی ۲۲

۱-۱۸-۱- لقاح تا تشکیل مورولا ۲۲

۱-۱۸-۲- تشکیل مورولا ۲۳

۱-۱۸-۳- تشکیل بلاستوسیست ۲۳

۱-۱۸-۴- از پوسته در آمدن ۲۴

۱-۱۸-۵- لانه گزینی ۲۴
۱-۱۸-۶- فاکتورهای موثر در جنین پیش لانه گزینی ۲۵
۱-۱۹- بلاستوسیست موش ۲۶
۱-۲۰- مقایسه جنین موش و انسان ۲۷
۱-۲۱- محیط کشت برای جنین های مرحله قبل از لانه گزینی ۲۸
۱-۲۲- استرس اکسیداتیو و کمک باروری ۳۰
۱-۲۲-۱- تولید ROS در اووسیت و جنین ۳۱
۱-۲۲-۳- فاکتورهای خارجی القاء کننده تولید ROS ۳۲
۱-۲۳- آنتی اکسیدان ها ۳۴
۱-۲۳-۱-آنتی اکسیدان های گیاهی ۳۶
۱-۲۴- زعفران ۳۶
۱-۲۴-۱- ترکیب شیمیایی زعفران ۳۷
۱-۲۴-۲-کاربرد های دارویی زعفران در طب سنتی ۳۷
۱-۲۴-۳- پژوهش های فارماکولوژیک زعفران و مواد موثره آن ۳۸
۱-۲۴-۳-۱- اثر ضدتومور ۳۸
۱-۲۴-۳-۲- اثر آنتی اکسیدان ۳۹
۱-۲۴-۳-۳- اثر آنتی ژنوتوکسیک ۳۹
۱-۲۴-۳-۴- اثر تقویت کننده حافظه و یادگیری ۳۹
۱-۲۴-۳-۵- اثر حفاظت از سلول ها ۴۰
۱-۲۴-۳-۶- اثر ضد درد و ضد التهاب ۴۰
۱-۲۴-۳-۷- اثر ضد تشنج ۴۰
۱-۲۴-۳-۸- اثر کاهنده علایم محرومیت از اوپیوئید ۴۱
۱-۲۴-۳-۹- اثر ضد افسردگی ۴۱
۱-۲۴-۳-۱۰- اثرات قلبی-عروقی ۴۱
۱-۲۴-۳-۱۱- اثرات گوارشی ۴۲
۱-۲۴-۳-۱۲- اثر بر دستگاه ایمنی ۴۲
۱-۲۴-۳-۱۳- اثر بر چشم ۴۲
۱-۲۴-۴- ایمنی زعفران ۴۲
۱-۲۵- هدف، فرضیات و ضرورت اجرای طرح ۴۳
فصل دوم ۴۵
مواد و روش ها ۴۵

۲-۱- تاریخ و محل انجام تحقیق ۴۶
۲-۲- حیوانات مورد آزمایش و نگهداری آنها ۴۶
۲-۳- طرح کلی کار ۴۶
۲-۳-۱- در بخش in-vitro : ۴۶
۲-۳-۲- در بخش in-vivo : ۴۷
۲-۴- تهیه عصاره آبی زعفران ۴۸
۲-۵- تهیه محیط کشت ها و قطره گذاری ۴۸
۲-۵-۱- تهیه 100 ml محیط کشت α-MEM جهت تشریح تخمدان و بلوغ تخمک ۴۸
۲-۵-۲- تهیه محلول α- MEM حاوی هورمون ها ۴۹
۲-۵-۳- تهیه محلول MEMα حاوی عصاره زعفران ۴۹
۲-۵-۴- تهیه محلول MEMα حاوی کروسین ۴۹
۲-۵-۵- تهیه محلول MEMα حاوی کروستین ۴۹
۲-۵-۶- ساخت ۱۰۰ml محیط کشت T6 ..... ۵۰
۲-۵-۷- ساخت BSA (Bovine Serum Albumine) ۵۰
۲-۵-۷-۱-BSA ۱۵ میلی گرم: ۵۰
۲-۵-۷-۲-BSA ۴ میلی گرم: ۵۱
۲-۶- تست کردن و شست و شوی روغن مینرال ۵۱
۲-۶-۱- ساخت محلول شست و شوی روغن مینرال (محلول M199) ۵۱
۲-۷- انتقال(handling) اووسیت و جنین: ۵۲
۲-۸- تهیه محیط کشت قطره ای ۵۲
۲-۹- قطره گذاری ۵۳
۲-۹-۱- قطره گذاری برای تشریح تخمدان ۵۳
۲-۹-۲- قطره گذاری برای ظرفیت یابی اسپرم ۵۴
۲-۹-۳- قطره گذاری برای IVF (*In Vitro* Fertilization) ۵۴
۲-۹-۴- قطره گذاری برای تکوین جنین ۵۴
۲-۱۰- آماده سازی پیپت برای جابجا کردن تخمک ۵۴
۲-۱۱- روش جابجا کردن تخمک با استفاده از پیپت دهانی ۵۵
۲-۱۲- باز کردن حفره شکمی و مکان یابی اندام های تناسلی ۵۵
۲-۱۳-جمع آوری تخمک ۵۷
۲-۱۵- لقاح آزمایشگاهی ۶۰
۲-۱۵-۲- تکنیک لقاح آزمایشگاهی ۶۰

۲-۱۵-۳- نحوه بررسی تخمک های تلقیح شده و تکوین جنینی ۶۱
۲-۱۶-القا تخمک گذاری ۶۲
۲-۱۶-۱- توضیحی در مورد القا تخمک گذاری ۶۲
۲-۱۶-۱-۱- اثر سن و وزن ۶۳
۲-۱۶-۱-۲- دوز و زمان تزریق گنادوتروپین ۶۳
۲-۱۷- هورمون PMSG ۶۴
۲-۱۸- هورمون hCG ۶۴
۲-۱۹- روش القا تخمک گذاری ۶۴
۲-۲۰- تزریق داخل صفاقی ۶۴
۲-۲۱- آزمایشات بررسی اثر تزریق صفاقی عصاره بر عملکرد تخمدان ۶۵
۲-۲۱-۱- تیمار موش های ماده با دوزهای مختلف عصاره با تحریک هورمونی ۶۵
۲-۲۱-۲- تیمار موش های ماده با دوزهای مختلف عصاره بدون تحریک هورمونی ۶۶
۲-۲۲- شمارش سلولهای بلاستوسیست ۶۶
۲-۲۲-۱- رنگ آمیزی افتراقی ۶۷
۲-۲۲-۲- ساخت محلول PI ۶۷
۲-۲۲-۳- ساخت محلول بیس بنزآمید(Hoechst) ۶۸
۲-۲۳- مطالعات میکروسکوپی و بافت شناسی ۶۸
۲-۲۳-۱- نمونه برداری ۶۸
۲-۲۳-۲- بافت شناسی ۶۸
۲-۲۳-۳- مراحل تهیه مقاطع بافتی ۶۸
۲-۲۴- مشاهده و بررسی فولیکول ها ۷۰
۲-۲۵- روش رنگ آمیزی تانل (TUNEL) ۷۳
۲-۲۵-۱- ساخت رنگ TUNEL ۷۳
۲-۲۶- آنالیز آماری ۷۴
فصل سوم ۷۵
نتایج ۷۵
۳-۱- بررسی میزان بلوغ تخمک های تیمار شده با دوز های مختلف عصاره زعفران ۷۶
۳-۲-بررسی میزان لقاح تخمک های MII در گروههای مختلف تیمار شده با عصاره زعفران ۷۷
۳-۳- بررسی میزان تکوین جنین در گروههای مختلف تیمار شده با عصاره زعفران ۷۹
۳-۴- بررسی میزان بلوغ تخمک های تیمار شده با دوز های مختلف کروسین ۸۰
۳-۵- بررسی میزان لقاح تخمک های MII در گروههای مختلف تیمار شده با کروسین ۸۲

۳-۶- بررسی میزان تکوین جنین در گروههای مختلف تیمار شده با کروسین ۸۳
۳-۷- بررسی میزان بلوغ تخمک های تیمار شده با دوز های مختلف کروستین ۸۵
۳-۸- بررسی میزان لقاح تخمک های MII در گروههای مختلف تیمار شده با کروستین ۸۶
۳-۹- بررسی میزان تکوین جنین در گروههای مختلف تیمار شده با کروستین ۸۸
۳-۱۰- بررسی میزان بلوغ، لقاح و تکوین آزمایشگاهی تخمک موش های تیمار شده با دوز های مختلف عصاره زعفران ۸۹
۳-۱۰-۱- بررسی میزان بلوغ آزمایشگاهی تخمک موش های تحت تیمار دوز های مختلف عصاره آبی زعفران ۹۰
۳-۱۰-۲- بررسی میزان لقاح تخمک های MII در گروههای مختلف تزریقی با عصاره زعفران .. ۹۰
۳-۱۰-۳- بررسی میزان تکوین جنین در گروههای مختلف تیمار شده با عصاره زعفران ۹۱
۳-۱۱- بررسی میزان بلوغ، لقاح و تکوین تخمک های بالغ شده در شرایط *in vivo* به دنبال تزریق زعفران ۹۳
۳-۱۱-۱- بررسی میزان تخمک هایی که در شرایط in-vivo تحت تاثیر دوزهای مختلف عصاره زعفران به مرحله MII رسیده اند ۹۳
۳-۱۱-۲- بررسی میزان لقاح تخمک های MII در گروههای مختلف عصاره زعفران ۹۴
۳-۱۱-۳- بررسی میزان تکوین جنین در گروههای مختلف تیمار شده با عصاره زعفران ۹۴
۳-۱۲- بررسی تعداد سلول های بلاستوسیست ۹۶
۳-۱۳- بررسی های بافت شناسی ۹۷
۳-۱۳-۱- شمارش فولیکول ها ۹۷
فصل چهارم ۹۹
بحث ۹۹
۴-۱- تاثیر عصاره زعفران و مواد موثر آن یعنی کروسین و کروستین در محیط کشت بر بلوغ ، لقاح و تکوین تخمک های نابالغ موش ۱۰۰
۴-۲- بلوغ، لقاح و تکوین آزمایشگاهی تخمک های بالغ شده در شرایط *in vivo* به دنبال تزریق زعفران ۱۰۴
۴-۳- بررسی اثر عصاره بر تعداد فولیکول های بدوی، اولیه، در حال رشد، گراآف و آترتیک ۱۰۶
۴-۴- نتیجه گیری ۱۰۷
فصل پنجم ۱۰۹
منابع ۱۰۹

فصل اول

مقدمه

مقدمه

فرزنددار شدن یکی از رویدادهائی است که نقش عمده ای در زندگی هر فرد ایفا می کند . عدم موفقیت دراین مهم به منزله ناباروری بوده و از مسائل آزاردهنده ای است که زوجها با آن دست به گریبانند. ماحصل تمامی تلاشها و مطالعاتی که در زمینه تولیدمثل صورت می گیرد، توسعه روشهای تشخیصی و درمانی جدیدی است که می تواند در جهت حل مشکل ازدواج های ناموفق گام برداشته و امید فرزنددارشدن را به تمامی زوجهای نا بارور نوید دهد. از مواردی که مطالعات زیادی در مورد شناخت علل علل و درمان آن صورت گرفته است می توان به عارضه تخمدان های پلی کیستیک اشاره نمود. سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS)[1] شایعترین علت عدم تخمک گذاری در زنان می باشد. درروشهای رایج فعلی برای درمان این افراد از تحریک تخمک گذاری به وسیله کلومیفن سیترات و گونادوتروپین ها استفاده می شود. با توجه به تحریک پذیری شدید تخمدان های این افراد نسبت به گنادوتروپین های تزریقی[2]، استفاده از این دارو خطراتی را برای فرد به دنبال خواهد داشت. از جمله می توان به خطر بروز سندرم تحریک بیش از حد تخمدان (OHSS)[3] و آسیت اشاره نمود که حتی می تواند منجر به مرگ شود. ترومبوز، نارسایی های قلبی و کلیوی، چند قلوزایی و زایمان زودرس، از جمله خطراتی است که در استفاده از روش های فعلی وجود دارد .

روش درمانی جدیدی برای حل این مشکل پیشنهاد شده است. یکی از این روش ها بالغ سازی تخمک در شرایط آزمایشگاهی یا IVM[4] است استفاده از این روش برای بیمار و پزشک آسانتر بوده و با دورهٔ درمانی کوتاهتر وکاهش قابل توجه هزینه ها همراه است و بیماران بیشتری به آن دسترسی خواهند داشت. بدین طریق عوارض ذکر شده بطور کامل برطرف می شود. علی رغم سالها تلاش در جهت بهبود روش های کمک باروری در انسان، میزان پایین بلوغ آزمایشگاهی تخمک ها، لقاح آزمایشگاهی، کیفیت پایین جنین و در نهایت میزان پایین لانه گزینی به عنوان مسائل حل نشده در این زمینه باقی مانده است. یکی از فاکتورهای مرتبط با میزان موفقیت پایین در روش کمک باروری، شرایط کشت با مطلوبیت کم است که در آن لقاح و رشد اولیه جنینی اتفاق می افتد. همچنین مسائلی مانند: عدم بلوغ هسته ای و سیتوپلاسمی تخمک، قطعه قطعه شدن جنین، رشد نامنظم جنین، متوقف شدن تسهیم در جنین، کاهش در تعداد کل سلول ها و کند شدن سرعت تسهیم سلولی(cleavage) در بلاستوسیست های رشد یافته در شرایط آزمایشگاهی بیان کننده شرایط کم مطلوب کشت می باشد. لذا بهبود شرایط کشت بسیار مهم بوده و باعث بهتر شدن کیفیت جنین های حاصل از محیط

---

[1].Polycystic ovary syndrome
[2].Exogenous gonadotropin
[3].Ovarian Hyper stimulation Syndrome
[4].In Vitro Maturation

کشت شده و به دنبال آن از ادامه حیات جنین ها پشتیبانی کرده و در نتیجه میزان لانه گزینی و حاملگی افزایش پیدا می کند.

۱-۲- مروری بر تاریخچه روش های کمک باروری[1]

درمان طبی ناباروری یک موضوع بحث انگیز در حوزه مراقبت های بهداشتی است که در مورد ثمربخش بودن این درمان، آسیب دیدن ژنوم مادری و چندقلوزایی و هزینه های متعاقب آن شبهاتی وجود دارد (Navarro, 2008). تقریبا در مورد ۱۰٪ از زوج هایی که در سن باروری هستند، ناباروری مشاهده شده است. بنابراین می توان استنباط کرد که بیش از ۸۰ میلیون زوج در سراسر جهان ناباروری را تجربه می کنند. در کشورهای توسعه یافته ناباروری شیوع بیشتری دارد؛ که عمده ترین دلیل آن به تعویق انداختن سن ازدواج است. تمرکز عمومی بر میزان رشد مراقبت بهداشتی در بسیاری از کشور های توسعه یافته وجود دارد. در چنین وضعیتی، از نقطه نظر سیستم سلامت ملی، درمان ناباروری یکی از مهمترین موضوعات قابل بحث درباره روش های کمک باروری است (Navarro, 2008).امروزه مطالعات در زمینه علل ناباروری؛ به خصوص به علت پیشرفت روش های جدید؛ اهمیت بسیار پیدا کرده است و زیست شناسی تولید مثل روز به روز جذاب تر می شود. روش های تحریک تخمک گذاری، لقاح خارج رحمی، تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم[2] و سایر روش ها، نوید بخش درمان زوج های نابارور می باشد و درمان ناباروری که تا چندی قبل محدود به خرافات و کارهای غیر علمی می گردید، به یکی از زمینه های شگفت انگیز و پویای علم زیست شناسی تبدیل شده است. توسعه روش های کمک باروری به سال ۱۹۷۸ بر می گردد; زمانی که اولین نوزاد انسان از طریق لقاح آزمایشگاهی[3] متولد شد و توسط Steptoe و Edwards گزارش گردید(Steptoe, 1978).امکان کشت تخمک در اواخر قرن ۱۹ فراهم شد، اما شروع آن در سال ۱۹۳۰ بود، زمانی که مطالعه بر مدل های حیوانی آغاز شد. این مطالعات بر پایه مطالعات تحقیقاتی– آزمایشی صورت گرفت و در نهایت در زمینه لقاح انسان توسعه یافت(Eduardo P, 2004).

خوشبختانه معرفی روش های جدید باروری لقاح خارج رحمی و روش های دیگر، توانایی پزشکان را در درمان ناباروری بالا برده است. روش لقاح آزمایشگاهی پس از سالها، تحقیق و بررسی بر روی حیوانات آزمایشگاهی، بالاخره در سال ۱۹۷۸ میلادی توانست به تولد نوزادی درانگلستان بیانجامد. پروفسور Patrick Steptoe و همکارش پروفسور Edwards توانستند در سال ۱۹۸۰ اولین حاملگی موفقیت آمیز با این روش را با تولد یک نوزاد گزارش کنند (خوانساری، ۱۳۷٤ و شین جان، ۱۳٦٥). در اولین سالها لقاح آزمایشگاهی توانست موفق ترین روش درمان ناباروری زنان معرفی شود، اما در مقایسه با درمان ناباروری مردان از موفقیت کمتری برخوردار بود. در این روش تعداد معینی اسپرم متحرک و فعال نیاز است تا بتوانند

---

[1].Assisted reproductive technique: ART
[2].Intra-cytoplasmic sperm injection:ICSI
[3].In vitro fertilization: IVF

به طور طبیعی اطراف تخمک را احاطه نموده و یک اسپرم به داخل آن نفوذکند و لقاح صورت گیرد. از آن جایی که اکثر مردان نابارور دچار نقص یا نواقصی در پارامترهای اسپرمی می باشند ، لقاح آزمایشگاهی معمولا نمی تواند جوابگوی این دسته از بیماران باشد. سپس روش های پیشرفته تری نظیر"انتقال گامت به داخل لوله رحمی " (GIFT)[1] ویا " انتقال تخم به داخل لوله رحمی "(ZIFT)[2] ابداع شد. این روش ها در درمان ناباروری مردان موثر واقع نشد. در این راستا پژوهشگران به دنبال ارتقای روش لقاح آزمایشگاهی شدند تا بدین وسیله از روش درمان جامعی برای زوج های نابارور پیشنهاد کنند(افلاطونیان، ۱۳۷۲ و اقصی، ۱۳۷۰).

در چند سال اخیر شیوه های متعددی در روش های کمک باروری به وجود آمد تا اسپرم بتواند از سد حفاظتی اطراف تخمک عبور کند. مهم ترین و ضخیم ترین لایه حفاظتی اطراف تخمک پرده شفاف یا زونا پلاسیدا می باشد که از جنس گلیکوپروتئین است. ازآن جایی که عدم توانایی اسپرم در عبور از پرده شفاف و رسیدن به سیتوپلاسم تخمک باعث ناباروری می شود، روشی به نام"شکافتن جزئی زونا "[3]به کار گرفته شد. شکافتن جزئی زونا را می توان به عنوان اولین گام در توسعه و تکامل روش میکرواینجکشن یاد نمود. در این روش با قرار دادن تعدادی اسپرم در اطراف زونای سوراخ شده و عبور اسپرم از روزنه ایجاد شده، اسپرم به داخل تخمک نفوذ می کند. اگرچه با این روش حاملگی و تولد گزارش شده است، ولی تعدادی از مراکز پیشرفته از همان اوایل این روش را ممنوع اعلام کردند، چرا که در این روش تضمینی وجود ندارد که اسپرماتوزوییید از روزنه عبور کند و دیگر این که ورود بیش از یک اسپرم به داخل تخمک می تواند باعث توقف رشد و تکامل تخمک شود.روش دیگری توسط متخصصان مرکز ناباروری ناتینگهام انگلستان ابداع گردید که به " اضافه نمودن اسپرم زیر لایه زونا" (SUZI)[4]معروف می باشد. در این روش که با استفاده از میکرواینجکشن صورت می گیرد، تعدادی اسپرم شسته شده به وسیله پیپت ظریف به فضای داخل زونا ریخته می شود، موفقیت این روش بیشتر از روش شکافتن بخشی از زونا بود و در بعضی از مراکز توانستند با این روش زوجین نابارور را به طور موفقیت آمیزی درمان کنند. از نقایص این روش، پلی اسپرمی یا ورود بیش از یک اسپرم به داخل تخمک است (اقصی،۱۳۷۰).

در اواخر سال ۱۹۹۲ موفق ترین روش، میکرواینجکشن معرفی شد. این روش که تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم نام دارد، توسط دکتر Palermo در کشور بلژیک راه اندازی شد. موفقیت این روش با گزارش مربوط به تولد یک نوزاد در ژورنال Lancet منعکس شد(Palermo G, 1992).نتایج حاصله از ٦٠ سیکل درمانی SUZI و ICSI از مرکز ناباروری بروکسل نشان داد که روش ICSI به مراتب موفق تر از روش SUZI بود (اقصی،۱۳۷۰). با پیشرفت روش های کمک باروری و هم چنین افزایش آمار ناباروری به دلیل

---

[1].Gamet Intrafallopian Transfer
[2].Zygote Intrafallopian Transfer
[3].Partial Zona Dissection
[4].Subzonal insemination

تغییر شیوه زندگی ، بالا رفتن سن ازدواج، تمایل به حاملگی در سنین بالاتر، عوامل عفونی و شیمیایی، اشعه و شیمی درمانی، مسائل ژنتیکی، یائسگی زودرس و هم چنین به دلیل هزینه های بالای ART و... نیاز به ذخیره و نگه داری گامت ها و جنین به عنوان یک خدمت اساسی در حفظ قدرت باروری و درمان ناباروری محسوب شد. بدین منظور طی چند دهه گذشته، ART از روش لقاح و بلوغ آزمایشگاهی[1] و انجماد[2] بهره زیادی برده است (Duncoog Y, 2007).

۱-۳- تاریخچه روش های کشت

تا کنون روش های مختلفی برای بلوغ ازمایشگاهی تخمک و کشت فولیکول به وسیله محققین مطرح گردیده است. یکی از این روش ها، بلوغ آزمایشگاهی (IVM) تخمک فولیکول های رسیده است که در این مرحله بطور طبیعی هسته تخمک ها در مرحله حباب زاینده[3] یا GV بوده و تخمک ها پس از ۴۸-۲۴ ساعت ضمن از سر گیری تقسیم میوز تا منافاز II و دستیابی به قابلیت باروری پیش می روند.روش دیگر بلوغ ازمایشگاهی تخمک فولیکول های پری آنترال[4] است که در این مرحله تخمک ها با کوچکترین اندازه و هسته هایی در مرحله GV بدون دریافت گنادوتروپین قبل از شروع مراحل تکوین در داخل تخمدان مشاهده می شوند.تخمک ها برای رشد در آزمایشگاه به مراقبت بیشتر ، مواد افزودنی بیشتر و فراهم نمودن شرایط مشابه به تخمدان نیاز دارند.

روش های کشت بر اساس مراحل مختلف تکوین تخمک و فولیکول پیچیده تر می گردد زیرا ماهیت محیط کشت در مراحل مختلف تکوین با یکدیگر تفاوت اساسی دارند .برای مثال می توان به کشت فولیکول های پری آنترال موش به همراه تخمک نابالغ بر روی غشاء کلاژنی اشاره کرد (Eppig, 1989). فولیکول ها در این روش به مرحله فولیکول گراف می رسند (Boland, 1993; Cortvrindt *et al.*, 1996; Cortvrindt, 1996a; Eppig, 1996; Eppig, 1989; Nayudu, 1992; Smitz, 1998).با افزودن LH به محیط کشت زمینه تخمک گذاری فراهم می گردد(Cortvrindt, 1996b).

۱-٤- آناتومی تخمدان

تخمدان های موش سوری زوج و کوچک بوده و به رنگ صورتی در قسمت قدامی کلیه ها قرار دارند و به وسیله رباطی به عضلات ناحیه کمری متصل هستند. شکل آنها بیضی و سطح آنها به علت وجود فولیکولها، برجسته بنظر می رسد و در جانور نابالغ سطح تخمدان حالت صاف دارد. در زمان بلوغ جانور لکه های روشنی در سطح تخمدان مشاهده می شود که همان اجسام زرد هستند. در جوندگان جسم سفید وجود ندارد. عروق

---

[1].In vitro maturation
[2].Vitrification
[3].Germinal vesicle
[4].Preantral follicle

تخمدانی شامل سرخرگ تخمدانی است که از آئورت منشعب شده و با شاخه باریکی از سرخرگ رحمی به تخمدان می رسد.

از راه ناف تخمدان شاخه های عروقی متعددی به داخل تخمدان به خصوص بخش مرکزی ارسال می شود . سیاهرگ تخمدانی که همراه سرخرگ مشاهده می شود، از طریق ناف تخمدان از آن خارج می شود. سیاهرگ تخمدانی چپ وارد سیاهرگ کلیوی چپ و سیاهرگ تخمدانی راست مستقیماً وارد بزرگ سیاهرگ تحتانی می شود. اعصاب تخمدانی از شبکه هیپوگاستریک منشاء می گیرند که همراه با عروق از طریق ناف تخمدان وارد بخش مرکزی تخمدان شده و آن را عصب دهی می نمایند.

در برش تخمدان یک قسمت خارجی به نام قشر[۱] و یک قسمت داخلی به نام مغز[۲]، که بافت همبند مزوواریوم در ناحیه ناف با آن در آمیخته شده است، می توان تشخیص داد. بین دو قسمت تخمدان حد مشخصی وجود ندارد. مغز (medulla) تخمدان شامل یک بافت همبند فیبروالاستیک سست محتوی عروق خونی بزرگ متعدد، عروق لنفاوی و اعصاب می باشد و استرومای آن دارای رشته های پراکنده عضله صاف است. قشر (cortex) از یک استرومای پر سلولی محتوی فولیکولهای تخمدان تشکیل شده است. استروما دارای شبکه هایی از الیاف رتیکولر و سلولهای دوکی شکلی است که هم مشخصات فیبروبلاست و هم مشخصات سلولهای عضلانی صاف را دارا هستند.

این سلول های استرومایی در رشد غلاف های داخلی و خارجی فولیکول تخمدانی شرکت می کنند. بافت الاستیک پراکنده بوده و فقط در جدار عروق خونی وجود دارد. فولیکولها را می توان در مراحل متفاوت رشد و نمو مشاهده کرد و نمای کورتکس بستگی به سن موجود و مرحله سیکل تخمدان دارد. بدین معنی که قبل از بلوغ فقط فولیکولهای ابتدائی یا اولیه[۳] مشاهده می شوند. مرحله تکامل جنسی با حضور فولیکولهای در حال رشد[۴] و محصولات نهایی آنها همانند جسم زرد[۵] و فولیکول آترتیک (فولیکول در حال دژنره شدن یا فولیکول در حال تحلیل) مشخص می گردد و در پایان سیکل جنسی فولیکولها ناپدید و کورتکس به بافت همبند رشته ای نازک تبدیل می شود(Sadler, 2000).

۱-۵- رشد و نمو تخمک

در پستانداران، اووژنز در دوره جنینی و با تشکیل سلولهای زاینده اولیه[۶] آغاز شده و سال ها بعد در دوره بلوغ جنسی نیز ادامه می یابد. در موش سلول های زاینده بدوی، منشا گامت ها، در روز ۷ تکوین ایجاد می شوند (Wylie C, 2002). سلولهای زاینده یا پیش سازهای تخمک متحرک بوده و در پاسخ به تحریکات شیمیایی

---

[1].Cortex
[2] .Medula
[3] .primitive or primary follicles
[4] .Growing follicles
[5] .Corpus luteum
[6] .Primordial germ cell

از محل تشکیل اولیه خود در اپی بلاست جنینی به ستیغ تناسلی مهاجرت می کنند. این سلول ها بعد از رسیدن به تخمدان در حال تشکیل، تحرک خود را از دست داده و اووگونی خوانده می شوند. تعداد این سلول ها به دلیل انجام تعداد زیادی تقسیم میتوز افزایش می یابد و در نهایت بعد از انجام آخرین دور همانند سازی DNA وارد تقسیم میتوز شده که اووگونی نامیده می شوند. در موش سلول های زاینده بدوی نیز در طول مهاجرتشان تکثیر می شوند و تعداد ۱۰-۱۰۰ سلول زاینده بدوی تقریبا در روز ۷-۸ به بیشتر از ۲۰۰۰۰ عدد افزایش می یابند که در روز ۱۴ تکوین به ستیغ تناسلی می رسند(Wylie, 1986; Tam, 1981) . هم زمان با شروع میوز، اووگونی هایی که در ناحیه مرکزی تخمدان قرار دارند پل های بین سلولی را از دست داده و بوسیله یک لایه سلول سنگفرشی پیش گرانولوزا در بر گرفته می شوند. این گروه سلولی، فولیکول بدوی[1] نام دارند. سپس تخمک ها مراحل لپتوتن، زیگوتن و پاکی تن از پروفاز اول میوز را پشت سر گذاشته و در مرحله دیپلوتن متوقف می شوند. تخمک ها در مرحله دیپلوتن از اووگونی ها بزرگتر بوده و دارای اندامک های سیتوپلاسمی بیشتری می باشند و در این مرحله اووسیت اولیه خوانده می شود (Picton H, 1998).با بلوغ جنسی تعدادی از فولیکول ها وارد مرحله رشد می شوند. مرحله رشد در تخمک پستانداران طولانی بوده و بستگی به گونه جاندار دارد و حدود ۲۰ روز طول می کشد. در انسان هنگام بلوغ، مخزنی از فولیکول های در حال رشد در تخمدان به وجود می آید که به طور مداوم با پشتیبانی فولیکول های بدوی که تبدیل به فولیکول های در حال رشد خواهند شد، تامین می شود. لازم به ذکر است که در هر چرخه تخمدانی ۵ تا ۲۰ عدد از این فولیکول ها رشد کرده ولی فقط یکی از آنها آزاد می شود (بهادری،۱۳۸۸). در طی این مدت حجم تخمک حدود ۲۰۰ تا ۳۰۰ برابر افزایش می یابد. همراه با افزایش حجم سلول، تخمک آب، یونها، لیپیدها، پروتئین ها و مقدار زیادی mRNA را در خود ذخیره می کند، علاوه بر این سنتز پروتئین ها نیز به مقدار قابل توجهی افزایش می یابد. زمانی که تخمک به رشد کامل رسید، شایستگی این را پیدا می کند که حباب زاینده یا ژرمینال وزیکول[2] را شکسته و میوز را مجدداً آغاز کند(Picton H, 1998).

۱-۵-۱- ساخت و تجمع ماکرومولکول ها در طی اووژنز

فولیکول های بدوی معمولاً و به اشتباه به عنوان سلول های خاموش[3] شناخته می شوند. اما در حقیقت سطوح بالایی از فعالیت سنتزی در تخمک های کوچک وجود دارد. این فعالیت به واسطه وجود یک یا تعداد بیشتری هستک، فعالیت RNA پلی مرازی و جذب آمینواسیدها و ریبونوکلئوزیدها نشان داده شده است (Schultz, 1978). میزان متفاوتی از نسخه برداری در طی مراحل مختلف اووژنز گزارش شده است (Liu H, 2002). اووگونی ها در طی مراحل اولیه میتوز، با شدت نسبتاًزیادی نسخه برداری را انجام می دهند اما با شروع میوز I و در طی مراحل لپتوتن و زیگوتن کاهش یافته و در مراحل پاکی تن به میزان غیرقابل تشخیص می رسد و سپس

---

[1] .Primordial follicle
[2] .Germinal vesicle
[3].Quiescent