وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

دانشگاه دامغان

دانشکده زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد بافت شناسی و جنین شناسی

بررسی سلول های بنیادی تخمدان موش بالغ طی چرخه استروس

توسط:

نرگس باقری‌پور

اساتید راهنما:

دکتر سعید زواره

دکتر سید حسن پایلاخی

اساتید مشاور:

دکتر محمد تقی قربانیان

دکتر سید رضا محبی

شهریور ۱۳۹۳

به نام خدا

بررسی سلول های بنیادی تخمدان موش بالغ طی چرخه استروس

توسط:

نرگس باقری‌پور

پایان نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه به عنوان بخشی

از فعالیت‌های تحصیلی لازم برای اخذ درجه‌ی کارشناسی ارشد

در رشته‌ی:

زیست‌شناسی (بافت شناسی و جنین شناسی)

از دانشگاه دامغان

ارزیابی و تایید شده توسط کمیته پایان نامه با درجه: عالی

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

دکتر سید حسن پای‌لاخی، استادیار ژنتیک مولکولی دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (استاد راهنما)

دکتر محمدتقی قربانیان، استادیار علوم تشریح دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (استاد مشاور)

دکتر سید رضا محبی، استادیار ویروس شناسی دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (استاد مشاور)

دکتر آرزو رضایی، استادیار بیوشیمی دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (استاد داور)

دکتر مریم حاجی قاسم کاشانی، استادیار علوم تشریح دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (استاد داور)

دکتر کتانه ابراری استادیار فیزیولوژی جانوری دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (نماینده تحصیلات تکمیلی)

شهریور ماه ۱۳۹۳

تقدیم به

روان پاک پدر بزرگم

روانشاد **حاج پنجعلی مردی**

که راه زندگی، علم و دانش را بر روی من باز کرد

و روان پاک تمام کسانی که در راه اعتلا علم قدم برداشتند.

الهی تورا سپاس می گویم که در فرصت یک باره دنیا مسیر علم را برای من زیبا و انرژی بخش قرار دادی و مرا مدد کن تا دانش نه نردبانی باشد برای فزونی غرور، نه حلقه ای برای اسارت، بلکه گامی بلند برای تجلیل از تو و متعالی ساختن زندگی خود و دیگران.

پدرم، مادرم و هادی عزیزم در حضور خالق خود شما را سپاس می گویم که نقطه عطف حرکتم در طوفان پر تلاطم زندگی ام بودید و با ترنم محبتان، به من شوق حرکت بخشیدید به امید آنکه گامی هرچند کوچک در راه نجات بشریت بردارم. مادر عزیزتر از جانم جای دارد که تورا باز سپاس گویم به پاس اینکه شیره جانت را در کامم چکاندی و در ناامیدی ها نازم را کشیدی و لبریزم کردی از شوق، اکنون حاصل دستان خسته ات رمز موفقیتم شد، به خودم تبریک می گویم که تورا دارم و دنیا با همه بزرگیش مثل تو را ندارد.

از اقوام عزیزم به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودشان که در این سردترین روزگاران، بهترین پشتیبان من است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید نهایت تشکر را دارم و امیدوارم قدرشناس لطفشان باشم.

جناب آقای دکتر سعید زواره خلق نیکویتان دوران پژوهش را برایم هموار ساخت و الطاف بامعانی شما به من چگونه اندیشیدن را آموخت که همواره در مسیر شکوفایی شروع زندگی علمی من مشوق و راهگشای آینده ام است و نمی دانم شما را دوست خطاب کنم یا آموزگار زیرا هر دو نعمت را به یکسان بر من ارزانی داشتید.

خداوند را سپاس می گویم که افتخار شاگردی و دوستی در کنار دو انسان بزرگوار، دکتر آرزو رضایی و دکتر مریم حاجی قاسم کاشانی را به من عطا نمود اساتیدی که با توجه ویژه خود به من، با انسانیت آشنایم کردند.

از دکتر مژده صالح نیا، دکتر سید حسن پالاخی، دکتر سید رضا محبی و دکتر محمد تقی قربانیان و همچنین خانم ها را دا دهقان، لیلی حسین پور، مهسا نفری و آقایان مجید صدرالهی و ابوطالب کوشا کمال سپاس گذاری را دارم که با صبر و تحمل و راهنمایی هایشان در به سرانجام رساندن این پایان نامه یاری ام نمودند.

دوستان عزیزم، سحر حاتمی، مرضیه داودی، ناهید رازقی، مریم آذری، مریم محل دشتیان، مریم رمضانی، رضا اسد زاده، مانذانا امام دوست، شیما خسروی، بهناز عارف زاده، مهدیه رمضانی، نرجس هاشمی، مریم قاسم زاده، ملیحه سعیدی، سمیرا دولت آبادی، مریم بذرگر، الهام رحمتی، نازپری میرزایی، فرشته محمدپور، ملیحه نخعی، مینا قاطمی، زهرا حسینی کیا و اسرار عابدینی حضور پر مهرتان و یادتان در این دوره پژوهش قوت قلب و تجربه لحظات زیبا برای من بود که از خاطرم نخواهد رفت و بهترین ها را برایتان آرزومندم.

چکیده

بررسی سلول های بنیادی تخمدان موش بالغ طی چرخه استروس

به‌وسیله:
نرگس باقری‌پور

فاکتور رونویسی OCT4 و SOX2 تنظیم کننده بیان تعدادی از ژن‌های تکوین می‌باشندکه برای حفظ پرتوانی سلول‌های بنیادی ضروری هستند. OCT4 و SOX2 در گامت‌های ماده در طی فولیکوژنز بیان می‌شوند اما نقش آنها مبهم باقی مانده است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی بیان ژن OCT4 و SOX2 در بافت تخمدان موش طی مراحل مختلف چرخه استروس در سطوح RNA و پروتئین بود. موش‌های سوری باکره بالغ بر اساس نوع سلول مشاهده شده در اسمیر واژن به عنوان پرواستروس، استروس، متاستروس و دی‌استروس در نظر گرفته شدند. Real time PCR از DNA مکمل mRNA استخراج شده از بافت تخمدان و رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی نشانگرهای پرتوانی OCT4 و SOX2 بر روی برش‌های پارافینی تخمدان انجام شد. نتایج نشان داد که نشانگر پرتوانی OCT4 و SOX2 در سطح پروتئین و RNA در تمام مراحل چرخه استروس در تخمدان بیان می شود. همچنین میزان بیان ژن OCT4 در فاز پرواستروس نسبت به سایر فازها به طور قابل توجهی بالاتر بود. نتایج ایمنوهیستوشیمی حضور پروتئین‌های OCT4 و SOX2 در سیتوپلاسم اووسیت، سلول‌های گرانولوزا، سلول‌های لوتئینی جسم زرد و سلول‌های استروما را نشان داد. . نتایج مطالعه حاضر بیان کننده نقش دوگانه OCT4 و SOX2 در سلول‌های بنیادی و سلول‌های سوماتیک تخمدان موش بالغ است.

واژگان کلیدی: سلول های بنیادی تخمدان، OCT4، SOX2 و چرخه استروس موش

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱
۱-۱ نئواووژنز در مقابل اصل غالب بیولوژی تولید مثل پستانداران ماده ٤
۱-۲ تاریخچه نئواووژنز ٦
۱-۳ مغز استخوان منبع احتمالی سلولهای بنیادی در تخمدان ۱۰
۱-۴ سلولهای زایا بدوی منبع احتمالی سلولهای بنیادی در تخمدان ۱٤
۱-۴-۱ تکوین سلولهای زایا بدوی ۱٤
۱-۴-۲ سلولهای زایا بدوی بهترین انتخاب برای منبع احتمالی سلولهای بنیادی تخمدان ۱٦
۱-۵ سلولهای بنیادی شبه رویانی بسیار کوچک منبع احتمالی سلولهای بنیادی در تخمدان ۱۸
۱-۵-۱ سلولهای بنیادی شبه رویانی بسیار کوچک ۱۸
۱-۵-۱-۱ پرتوان بودن سلولهای بنیادی شبه رویانی بسیار کوچک ۱۹
۱-۵-۱-۲ کاهش وابسته به سن در ذخایر سلولهای بنیادی شبه رویانی بسیار کوچک ۱۹
۱-۵-۲ سلولهای بنیادی شبه رویانی بسیار کوچک در گناد پستانداران ۲۱
۱-۵-۲-۱ سلولهای بنیادی شبه رویانی بسیار کوچک در بافت بیضه بالغ ۲۱
۱-۵-۲-۲ سلولهای بنیادی شبه رویانی بسیار کوچک در بافت تخمدان بالغ ۲۲
۱-۵-۳ تاثیر سن بر سلولهای بنیادی شبه رویانی بسیار کوچک در گناد پستانداران ۲٤
۱-۵-۴ کاربرد سلولهای بنیادی شبه رویانی بسیار کوچک در احیا پزشکی ۲۵
۱-۶ تونیکاآلبوژینه منبع احتمالی سلولهای بنیادی در تخمدان ۲٦
۱-۶-۱ مکانیسم تشکیل فولیکولهای بدوی در دوره جنینی ۲٦
۱-۶-۲ مکانیسم تشکیل فولیکولهای بدوی در دوره تولیدمثلی برتر ۳۲
۱-۶-۳ چرا با وجود سلولهای بنیادی تخمدان، یائسگی صورت میگیرد؟ ۳٦
۱-۷ فولیکوژنز ۳۷
۱-۸ گنادوتروپینها ٤۱
۱-۹ نشانگرهای پرتوانی OCT4 و SOX2 ..... ٤۳
۱-۹-۱ OCT4 ..... ٤۳
۱-۹-۲ جایگاه OCT4 در تخمدان بالغ ٤۵
۱-۹-۳ SOX2 ..... ٤۹
۱-۱۰ بیان مسئاله و اهداف: ۵۱
فصل دوم: مواد و روش‌ها ۵۲
۲-۲ تهیه و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی ۵۳
۲-۲ روش انجام تحقیق و مراحل اجراء ۵۳
۲-۳ تعیین و انتخاب مراحل چرخه استروس براساس اسمیر واژن ۵۳
۲-۴ بررسی میزان بیان ژنهای OCT4 و SOX2 با استفاده از تکنیک Real time RT-PCR ۵۷
۲-۴-۱ استخراج RNA ٦۰
۲-۴-۲ الکتروفورز RNA روی ژل آگارز ٦۲
۲-۴-۳ سنتز cDNA ٦٤

۲-۴-۴ واکنش Real time PCR ٦٥
۲-۴-۵ ارزیابی کیفیت و صحت واکنش PCR ٦٦
۲-۴-۶ آنالیز آماری ٦٦
۲-۵ بررسی بیان پروتئین OCT4 و SOX2 با استفاده از تکنیک ایمنوهیستوشیمی ٦٧
۲-۵-۱ مراحل تهیه مقاطع بافتی از تخمدان موش بالغ ٦٨
۲-۵-۲ مراحل رنگآمیزی هماتوکسیلین و ائوزین از برشهای تخمدان ٧٠
۲-۵-۳ مراحل انجام ایمنوهیستوشیمی ٧١
۲-۶ روش تهیه مواد آزمایشگاهی مورد نیاز ٧٤
روش تهیه رنگ متیلن بلو دو درصد ٧٤
روش تهیه بافر الکتروفورز (TBE) ٧٤
روش تهیه EDTA (۰/۵ M) ٧٤
روش تهیه ژل آگارز ۱/۵ درصد ٧٥
روش تهیه سالین بافر فسفات ٧٥
روش تهیه چسب گلیسرول فسفات ٧٥
روش تهیه پارافرمالدئید ۴ درصد (Merck) ٧٦
روش تهیه رنگ هماتوکسیلین هریس ٧٦
روش تهیه رنگ ائوزین ٧٦
روش تهیه چسب آلبومین ٧٧
روش تهیه چسب پلیالایزین ٧٧
روش تهیه اسید الکل ٧٧
روش رقیق کردن DAPI ٧٧
روش تهیه محلول بافر سیترات ٧٨
روش تهیه محلول TBS ٧٨
روش تهیه سرم بز ۱۰ درصد ٧٨
فصل سوم: نتایج ٧٩
۳-۱ مشاهدات چرخه استروس در فازهای مختلف ٨٠
۳-۲ بررسی میزان بیان ژنهای OCT4 و SOX2 با استفاده از تکنیک Real time PCR ٨٢
۳-۲-۱ استخراج RNA ٨٢
۳-۲-۲ نتایج حاصل از Real time PCR ٨٢
۳-۲-۳-۱ آنالیز دادههای Real time PCR ٨٨
۳-۳ بررسی بیان پروتئین OCT4 و SOX2 با استفاده از تکنیک ایمنوهیستوشیمی ٨٩
۳-۳-۱ بررسی مورفولوژیک ٨٩
۳-۳-۲ بررسی ایمنوهیستوشیمی ٩٠
فصل چهارم: بحث و نتیجهگیری ٩٣
۴-۱ مقدمه ٩٤
۴-۲ بررسی علت افزایش بیان mRNA ژن OCT4 در فاز پرواستروس ٩٥
۴-۳ بیان mRNA ژن SOX2 در تخمدان موش بالغ ٩٨
۴-۴ بررسی بیان پروتئین OCT4 و SOX2 در بافت تخمدان موش بالغ ٩٨
۴-۵ نتیجه گیری نهایی ١٠٠
۴-۶ پیشنهادات ١٠٠
فصل پنجم: منابع ١٠١

فهرست تصاویر و جداول

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱: نظریه دوره تولیدمثلی برتر ۵
شکل ۱-۲: مسیر پیام رسانی فاکتورهای رشد انسولین ۲۰
شکل ۱- ۳: ایمنوهیستوشیمی ۵- متیل سیتوزین در مقاطع بافتی بیضه و اسمیر پوشش سطحی تخمدان زنان قبل از یائسه ۲۳
شکل ۱-۴: تکوین تخمدان در مراحل اولیه رشد جنین..... ۲۷
شکل ۱-۵: مشارکت سلول‌های ایمنی در فرآیند اووژنز در تخمدان جنین انسان..... ۲۹
شکل ۱-۶: تقسیم متقارن و تغییر شکل سلول‌های زایا ثانویه در تخمدان جنین انسان ۳۰
شکل ۱-۷: تخمدان جنین انسان ۳۱
شکل ۱- ۸: تشکیل سلول‌های گرانولوزا جدید از سلول‌های بنیادی تخمدان در دوره تولیدمثلی برتر در تخمدان انسان بالغ ۳۳
شکل ۱-۹: مشارکت سلول‌های ایمنی در فرآیند نئواووژنز در تخمدان انسان بالغ ۳۵
شکل ۱-۱۰: تخمدان انسان بالغ ۳۵
شکل ۱-۱۱: فولیکول در مراحل مختلف رشد ۳۹
شکل ۱-۱۲: پیکربندی کروماتین در اووسیت‌های SN و NSN پس از رنگ آمیزی با Hoechst 33342 ..... ۴۱
شکل۱-۱۳: ساختارهای ژنی OCT4B, OCT4A و OCT4B1 ..... ۴۳
شکل ۲-۱: نحوه صحیح مهار کردن موش سوری برای تهیه اسمیر واژن ۵۴
شکل ۲-۲: جمع‌آوری ترشحات واژن موش سوری ۵۵
شکل ۲-۳: پیپتاژ کردن مایع واژن بر روی لام شیشه‌ای ۵۵
شکل ۲-۴: رنگ آمیزی مایع واژن روی لام با متیلن بلو دو درصد ۵۶
شکل ۲-۵: نمودار فرضی تکثیر در Q-PCR ۵۸
شکل ۲- ۶: دستگاه میکروتوم روتاری ۶۹
شکل ۳-۱: سیتولوژی اسمیر واژن طی چهار مرحله چرخه استروس طبیعی در موش سوری ۸۱
شکل ۳-۲: ژل آگارز RNA های انتخاب شده در گروه‌های مختلف برای سنتز Cdna ۸۲
شکل ۳-۳: منحنی تکثیر واکنش Real time PCR ژن ACTIN ۸۳
شکل ۳-۴: منحنی ذوب واکنش Real time PCR ژن ACTIN ۸۳
شکل ۳-۵: منحنی تکثیر واکنش Real time PCR ژن OCT4 .....۸۴
شکل ۳-۶: منحنی ذوب واکنش Real timePCR ژن OCT4 ..... ۸۴
شکل ۳-۷: منحنی تکثیر واکنش Real time PCR ژن SOX2 .....۸۵
شکل ۳-۸: منحنی ذوب واکنش Real time PCR ژن SOX2 .....۸۵
شکل ۳-۹: ژل آگاروز محصول Real time PCR ۸۷
شکل ۳-۱۰: ژل آگاروز محصول Real time PCR ژن SOX2 .....۸۷
شکل ۳-۱۱: نمودار میزان بیان ژن OCT4 در گروه‌های پرواستروس، استروس، مت‌استروس و دی‌استروس ..۸۸
شکل ۳-۱۲: مقاطع میکروسکوپ نوری و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین از تخمدان موش سوری ۸۹
شکل ۳-۱۳: بیان پروتئین OCT4 و SOX2 در سلول‌های ترشح کننده هورمون ۹۱

شکل ۳-۱۴: روند بیان پروتئین OCT4 و SOX2 در فولیکول‌های در حال رشد ۹۳
جدول ۲- ۱: ساخت .Master Mix cDNA ۶۴
جدول ۲-۲: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای واکنش Real time PCR ۶۶
جدول ۳-۱: داده‌های چرخه نرمال آستانه (CT) ژن‌های ACTIN, OCT4, SOX2 ..... ۸۶

فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

تخمدان، غده درون‌ریز پیچیده‌ای است که مسئول تولید هورمون‌های مختلف و اووسیت بالغ برای تولید مثل می‌باشد [۱]. استروما بدنه تخمدان را تشکیل می‌دهد و شامل سلول‌های مختلف از فیبروبلاست تا سلول‌های ترشح کننده هورمون است. از جمله سلول‌های ترشح کننده هورمون در استروما می‌توان به سلول‌های بینابینی و سلول‌های هیلوس اشاره کرد. در بیشتر گونه پستانداران، سلول‌های بینابینی به صورت طناب‌های سلولی قرار دارند و استروژن ترشح می‌کنند و به دلیل ظاهر اپی‌تلیالی و فعالیت ترشحی، غده بینابینی نامیده می‌شوند. در جوندگان، فولیکول‌ها توسط توده‌هایی از این سلول‌ها احاطه می‌شوند اما در انسان گسترده نیستند. سلول‌های هیلوس به صورت گروه‌های کوچک در ناحیه هیلوس تخمدان قرار دارند و شبیه سلول‌های لایدیگ بیضه هستند. از خصوصیات فراساختاری آنها ترشح استروئیدهاست و پیشنهاد شده است که این سلول‌ها آندروژن ترشح می کنند [۲]. ناحیه مرکزی تخمدان را مدولا و ناحیه محیطی آن را کورتکس می‌نامند. مدولا شامل عروق خونی، عروق لنفی و اعصاب است و کورتکس جایگاه فولیکول‌های تخمدان و جسم زرد می‌باشد [۳]. تخمدان توسط بافت پوششی به‌نام پوشش سطحی تخمدان[۱] یا اپی‌تلیوم ژرمینال[۲] احاطه شده است. بافت همبند زیر پوشش سطحی تخمدان متراکم شده و تونیکاآلبوژینه[۳] را ایجاد می‌کند. این دو ناحیه از طریق فیبرهای کلاژن به‌هم متصل می‌باشند [۴]. پوشش سطحی تخمدان یک لایه غیر متعهد از سلول‌ها با تمایز نسبتا کم می‌باشند که برخلاف بسیاری از بافت‌های پوششی طبیعی، شامل مارکرهای اپی‌تلیالی و مزانشیمی است [۵]. این لایه فقط در مناطق خاصی از تخمدان عملکردی وجود دارد اما در تخمدان پلی‌کیستیک و تخمدان افراد یائسه، کل سطح تخمدان را می‌پوشاند [۵]. نکته قابل توجه در مورد تونیکاآلبوژینه، عدم حضور آن تا پایان دوران جنینی است و حتی پس از تولد به صورت یک لایه کامل نخواهد بود و فقط شامل مجموعه‌ای از سلول‌های بافت همبند سست می‌باشد [۶, ۷].

عملکرد تخمدان منجر به ایجاد چرخه تولیدمثلی می‌شود. چرخه تولیدمثلی درانسان چرخه قاعدگی[۴] خوانده می‌شود و شامل دو فاز فولیکولار[۵] و لوتئال[۶] است که توسط مرحله تخمک‌گذاری از هم تفکیک می‌شوند. فاز فولیکولار قبل از تخمک‌گذاری اتفاق می‌افتد و به علت رشد سریع فولیکول‌های آنترال در این دوره، هورمون غالب تولید شده توسط تخمدان استرادیول خواهد بود. فاز لوتئال بعد از تخمک‌گذاری صورت می‌گیرد و به علت حضور و عملکرد جسم زرد در این دوره، هورمون غالب تولید شده توسط تخمدان پروژسترون است.

[1] Ovarian surface epithelium
[2] Germinal epithelium
[3] Tunica albuginea
[4] Menstrual cycle
[5] Follicular phase
[6] Luteal phase

چرخه تولیدمثلی در موش چرخه استروس[1] نامیده می‌شود و شامل چهار مرحله به نام پرواستروس[2]، استروس[3]، متاستروس[4] و دی‌استروس[5] می‌باشد. پرواستروس و استروس مراحل آنابولیکی هستند که در طی آن، رشد فعال بخش‌های مختلف دستگاه تناسلی اتفاق می‌افتد. در مرحله پرواستروس به علت افزایش رشد فولیکول‌ها، غلظت استرادیل به سرعت افزایش می‌یابد. تخمک‌گذاری در مرحله استروس صورت می‌گیرد و به علت آترزی عظیم فولیکول‌ها قبل از تخمک گذاری، با افت استرادیول همراه است. متاستروس مرحله کاتابولیک است که با تغییرات تخریبی در دستگاه تناسلی مشخص می‌شود. در این دوره که با تشکیل جسم زرد همراه است میزان استرادیول کاهش می‌یابد و میزان پروژسترون شروع به افزایش می‌نماید. در مرحله دی‌استروس، جسم زرد کامل بوده و تولید پروژسترون در این دوره بالا است. حال اگر جفت‌گیری و لقاح صورت گیرد غلظت بالا پروژسترون حفظ می‌شود. در غیر این صورت با افت غلظت پروژسترون همراه خواهد بود. همچنین این مرحله یک دوره غیر فعال با رشد آهسته فولیکول محسوب می‌شود که در اواخر آن میزان استرادیول شروع به افزایش می‌نماید [۸-۱۱]. گزارشات متعددی در رابطه با زمان تخمک‌گذاری و ارتباط آن با مرحله استروس ارائه شده است. پیشنهاد شد که تخمک‌گذاری در شروع استروس یا نزدیک به شروع آن و یا در پایان استروس یا نزدیک به پایان آن اتفاق می‌افتد [۸]. از طرف دیگر فولیکول‌هایی که می‌خواهند در این مرحله تخمک‌گذاری کنند توسط اندازه بزرگتر خود در مرحله پرواستروس قابل تشخیص هستند [۸]. Nakamura و همکارانش نشان دادند که تعداد این فولیکول‌ها در اواخر دی‌استروس به طور متوسط هشت عدد در هر تخمدان می‌باشد. این تعداد به هفت عدد در پرواستروس و چهار عدد در استروس کاهش می‌یابد [۸]. بنابراین تمام فولیکول‌هایی که رشد سریع قبل از تخمک‌گذاری را شروع کردند به مرحله تخمک‌گذاری نمی‌رسند و قسمت اعظم آنها قبل از شروع این مرحله تحلیل می‌روند.

ازجمله مباحث بحث بر انگیز در تخمدان بالغ می‌توان به وقوع نئواووژنز، مشارکت هورمون محرک فولیکولی[6] در مراحل اولیه رشد فولیکول و حضور OCT4[7] در سلول‌های سوماتیک تخمدان برای کسب صلاحیت از سرگیری میوز و رشد مناسب اووسیت اشاره کرد که در این فصل به شرح هر یک پرداخته می‌شود.

[1] Estrous cycle
[2] Proestros
[3] Estrous
[4] Metestrous
[5] Diestrous
[6] Follicle-stimulating hormone (FSH)
[7] Octamer-binding transcription 4

۱-۱ نئواووژنز در مقابل اصل غالب بیولوژی تولید مثل پستانداران ماده

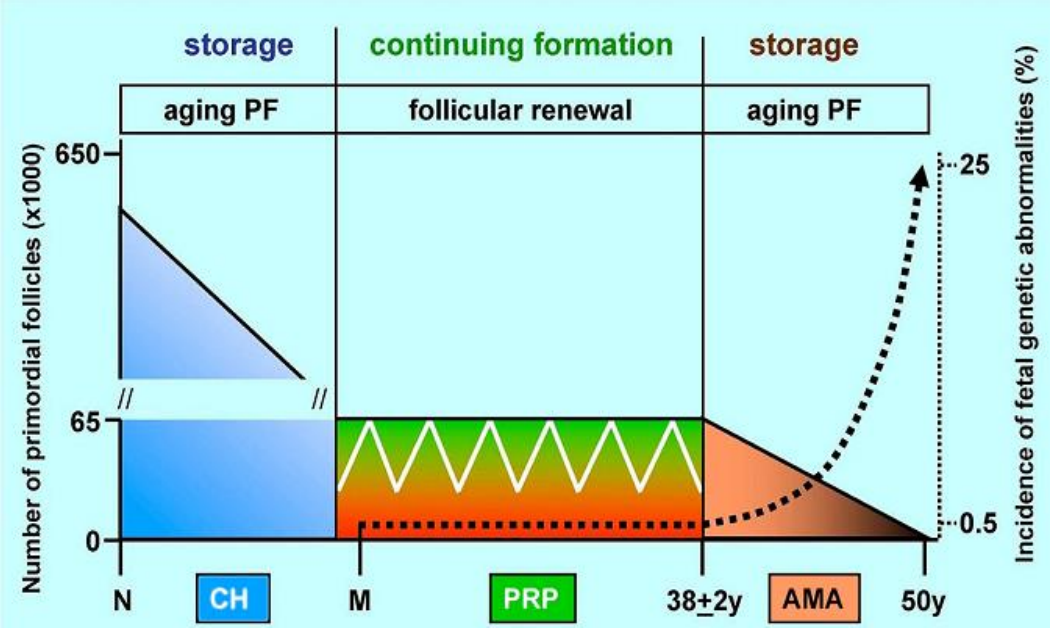
تا چند دهه اخیر، اصل غالب در بیولوژی تولیدمثل پستانداران ماده از جمله انسان تئوری ذخیره[1] بود که مطرح می‌کند پستانداران ماده با یک تعداد محدود و غیر قابل تجدید اووسیت متولد می‌شوند و اووسیت‌ها با توقف در پروفاز I و احاطه شدن توسط یک لایه سلول گرانولوزا، ساختاری تحت عنوان فولیکول بدوی را ایجاد می‌کنند [۱۲, ۱۳]. فولیکول های بدوی در سه موج تحت تاثیر آپوپتوز قرار می‌گیرند. موج اول قبل از تولد اتفاق می‌افتد و باعث می‌شود با وجود حداکثر ۶ تا ۷ میلیون فولیکول، تنها یک میلیون از آنها در تخمدان نوزاد تازه متولد شده وجود داشته باشد. موج دوم از زمان تولد تا بلوغ اتفاق می‌افتد و ذخایر تخمدان به ۴۰۰ فولیکول کاهش می‌یابد. موج سوم بعد از بلوغ در هر سیکل قاعدگی به صورت تدریجی صورت می‌گیرد و منجر به تخلیه کامل ذخایر فولیکول‌های جنینی و وقوع یائسگی می‌شود [۱۳]. اما با توجه به پایین بودن ذخایر فولیکول‌های جنینی و سرعت بالا آپوپتوز در آنها این سوال مطرح می‌شود که آیا این تعداد فولیکول برای حفظ اووسیت بارور در کل دوره تولیدمثلی ماده کافی است؟

مشاهده شواهد نئواووژنز، منجر به چالش کشیدن اصل غالب بیولوژی تولیدمثل پستانداران ماده و ارائه نظریه تداوم ساخت[2] گردید که مطرح می‌کند اووسیت در کل حیات فرد به طور مداوم تشکیل می‌شود [۱۲]. آترزی فولیکول با سرعت بالا صورت می‌گیرد اما وقوع همزمان نئواووژنز باعث می‌شود آپوپتوز فاکتور اصلی تخلیه ذخایر تخمدان محسوب نشود. در غیر این‌صورت، با وجود سرعت بالا آپوپتوز، دوره تولیدمثلی پستانداران ماده بسیار کوتاه می‌گردید [۱۲].

برای ایجاد انطباق بین تئوری ذخیره (فقدان بازسازی فولیکول) و تئوری تداوم ساخت (حضور بازسازی فولیکول) نظریه دوره تولیدمثلی برتر[3] پیشنهاد گردید [۱۲]. بر اساس این نظریه، پس از پایان تشکیل فولیکول بدوی در دوره جنینی تا شروع یائسگی، در دو دوره تئوری ذخیره و در یک دوره تئوری تداوم ساخت حضور دارد. از پایان تشکیل فولیکول بدوی در دوران جنینی تا بلوغ (قبل از شروع قاعدگی) اولین دوره تئوری ذخیره برقرار است که فقط آترزی فولیکول صورت می‌گیرد و منجر به کاهش چشمگیر در ذخایر فولیکول‌های بدوی جنینی می‌شود. از شروع بلوغ تا اواخر دوره تولیدمثلی برتر (سن ۲± ۳۸) تئوری تداوم ساخت برقرار است که در کنار آترزی فولیکول بازسازی فولیکول نیز صورت می‌گیرد و منجر به حفظ اووسیت بارور در کل دوره تولیدمثلی برتر می‌شود. از اواخر دوره تولیدمثلی برتر تا شروع یائسگی دومین دوره تئوری ذخیره برقرار است. در این دوره آترزی فولیکول‌های بدوی دوره تولیدمثلی برتر صورت می‌گیرد اما سرعت پایین آپوپتوز در آنها باعث حفظ عملکرد تخمدان

[1] Storage theory
[2] Continued formation theory
[3] The prime reproductive period doctrine

برای ۱۰ تا ۱۲ سال پس از پایان بازسازی فولیکول می‌شود. قابل ذکر است که ذخیره طولانی اووسیت در این دوره باعث تجمع اختلالات ژنتیکی در آنها می‌شود و با افزایش سن مادر، تعداد جنین‌های تریزومی و دیگر اختلالات ژنتیکی افزایش می‌یابد (شکل ۱-۱)[۱۲].



شکل ۱-۱: نظریه دوره تولیدمثلی برتر. خط نقطه چین بیانگر افزایش جنین‌های تریزومی است که این میزان پس از پایان بازسازی فولیکول در دوره تولیدمثلی برتر افزایش نمایی می‌یابد. خط سفید، نوسان در تعداد فولیکول بدوی را نشان می‌دهد که علت آن، آترزی و بازسازی چرخه‌ای فولیکول‌های بدوی در دوره تولیدمثلی است [۱۲]. (PF [۱]: فولیکول بدوی، N [۲]: نوزاد، CH [۳]: کودک، M [۴]: قاعدگی، AMA [۵]: افزایش سن مادر)

[1] Primordial follicle
[2] Neonate
[3] Childhood
[4] Menarche
[5] Advanced maternal age

۱-۲ تاریخچه نئواووژنز

همان‌طور که مطرح شد تا چند دهه اخیر، اصل غالب در بیولوژی تولیدمثل پستانداران ماده، تئوری ذخیره بود. بااین‌حال، در طی ۱۵۰ سال گذشته تاکنون، وقوع نئواووژنز در پستانداران بالغ مورد بحث بوده است.

Waldeyer در سال ۱۸۷۰ در نشریه خود بیان کرد که اووسیت جدید در پستانداران بالغ ایجاد نمی‌شود و فقط در طی یک دوره کوتاه از زندگی، اووسیت از پوشش سطحی تخمدان به‌وجود می‌آید [۱۳].

Kingerg در سال ۱۹۱۷ فرضیه او را رد کرد و مفهوم نئواووژنز را برای اولین بار مطرح نمود و بیان کرد تمام اووسیت‌های ایجاد شده در دوران جنینی، تحلیل می‌روند و توسط اووسیت‌های منشا گرفته از پوشش سطحی تخمدان بالغ جایگزین می‌شوند [۱۴].

Allen در سال ۱۹۲۳ از این فرضیه حمایت کرد و با ادعای وجود شواهد برای تجدید اووسیت از پوشش سطحی تخمدان موش، اصل غالب بیولوژی تولید مثل پستانداران ماده را به چالش کشید و پیشنهاد کرد بر اثر تکثیر چرخه‌ای پوشش سطحی تخمدان و تقسیم میوز در آن، اووسیت جدید به‌وجود می‌آید [۱۵].

Zuckerman و همکارانش در سال ۱۹۵۱ با شمارش اووسیت در تخمدان موش نشان دادند که تعداد اووسیت‌ها در سراسر زندگی پس از تولد نه تنها افزایش نمی‌یابد بلکه در حال کاهش هستند [۱۶].

Peters و همکارانش در سال ۱۹۶۲ نشان دادند که فاز سنتز قبل از میوز، فقط در دوره قبل از تولد در تخمدان دیده می‌شود [۱۷].

به‌این‌ترتیب، بحث در مورد وقوع نئواووژنز در تخمدان پستانداران بالغ، تقریبا توسط مطالعات Zuckerman و Peters و همکارانشان به پایان رسید و اصول پایه بیولوژی تولیدمثل پستانداران ماده مجددا غالب گردید. نظریه Zuckerman تا ۵۰ سال بدون چالش حفظ شد و علت آن نبود شواهد لازم برای نقض این نظریه بود. اما در مطالعات جدیدتر، شواهدی ارائه شد که اعتبار این اصل را به چالش کشید.

مطالعات اولیه توسط Duke در سال ۱۹۶۷ و David در سال ۱۹۷۴ صورت گرفت. آن‌ها در تخمدان برخی پریمات[1]های بالغ، سلول‌های زایا در مرحله فعال میتوز را مشاهده کردند که می‌تواند توجیحی برای جبران اووسیت‌های تحلیل رفته باشد [۱۸-۲۰].

مطالعه بعدی توسط Bukovsky و همکارانش در سال ۱۹۹۵ صورت گرفت. آن‌ها مدارکی ارائه دادند که بیانگر وجود سلول‌های بنیادی زایا[2] در پوشش سطحی تخمدان افراد بالغ همانند پوشش سطحی تخمدان موش است و قادر به تولید اووسیت بارور و سلول‌های گرانولوزا

[1] Primates
[2] Germ stem cells

می‌باشند اما تئوری نئواووژنز در سال ۲۰۰۴ با مطالعات Johnson و همکارانش در موش بالغ و Bukovsky و همکارانش در انسان بالغ به اوج خود رسید [۲۱].

Johnson و همکارانش در سال ۲۰۰۴ با استفاده از MVH[1] مارکر رده زاینده و BrdU[2] مارکر تکثیر سلولی، حضور سلول‌های بنیادی زایا را در داخل یا نزدیک پوشش سطحی تخمدان موش بالغ گزارش کردند. اما در ادامه مطالعات خود مشاهده کردند که تعداد این سلول‌ها به شدت در حال کاهش است (از ۶۳ سلول در تخمدان ۳۰ روزه به ۶ سلول در تخمدان ۴۰ روزه رسید) و این نظریه را برای آن‌ها بعید ساخت که این سلول‌ها بتوانند بیانگر سلول‌های بنیادی زایا بالغ باشند [۲۲]. مطالعات انجام شده دیگر از همان گروه در سال ۲۰۰۵، احتمال یک منبع خارج گنادی یعنی مغز استخوان را برای سلول‌های بنیادی زایا پیشنهاد کرد [۲۳]. مطالعات گروه‌های دیگر نشان داد که سلول‌های مغز استخوان نمی‌توانند منشا اووسیت بالغ باشند [۲۴]اما برای وقوع نئواووژنز، حداقل پس از آسیب تخمدان بسیار مهم است [۲۵].

Bukovsky و همکارانش در سال ۲۰۰۴ با استفاده از مشاهدات مورفولوژی و ایمنوهیستولوژی مدعی شدند که سلول‌های بنیادی پوشش سطحی تخمدان از پیش‌ساز مزانشیمی موجود در تونیکاآلبوژینه[3] تمایز می‌یابند و منشا سلول‌های زایا می‌باشتد [۲۶]. این گروه در سال ۲۰۰۵ با کشت سلول‌های پوشش سطحی تخمدان انسان بالغ گزارش کردند که سلول‌های شبه اووسیت و سلول‌های شبه گرانولوزا در کشت این سلول‌ها تشکیل می‌شود [۷].

Virant-Klum و همکارانش در سال ۲۰۰۸ نتایجی مشابه این گروه را مشاهده کردند. آن‌ها سلول‌های بنیادی گرد و کوچک (قطر ۴-۲ µM) و بیان کننده OCT4[4], SOX2[5] و NANOG از پوشش سطحی تخمدان زنان یائسه جدا کردند و ۲۰ روز پس از کشت، سلول‌های شبه اووسیت بیان‌کننده ژن‌های VASA و زوناپلوسیدا[6] و همچنین سلول‌هایی با توانایی تمایز به سلول‌های گرانولوزا مشاهده کردند [۲۷].

شواهد بیشتر درباره حضور سلول‌هایی با توانایی تولید اووسیت در پوشش سطحی تخمدان موش بالغ توسط Zou و همکارانش در سال ۲۰۰۹ ارائه شد. آن‌ها سلول‌های بزرگ و در حال تکثیر که پروتئین VASA بیان می‌کنند را از تخمدان موش تازه متولد شده و بالغ جدا کردند و توانستند این سلول‌ها را برای چندین ماه در شرایط آزمایشگاه حفظ کنند. سپس این سلول‌ها را به تخمدان‌های نابارور شده در طی شیمی‌درمانی، پیوند زدند و شاهد تولید اووسیت با قابلیت باروری بودند [۲۸].

---

[1] Mouse VASA homolog
[2] Bromodeoxyuridine
[3] Tunica albuginea
[4] Octamer-binding transcription factor 4
[5] Sex determining region Y
[6] Zona pellucida

مطالعات Pacchiarotti و همکارانش بیشتر تصدیق کننده وجود سلول‌های بنیادی زایا در تخمدان است. این گروه توانستند در پوشش سطحی تخمدان موش‌های تراریخته (بیان GFP [1] تحت کنترل پروموتور OCT4) سلول‌های بنیادی زایا را با استفاده از اندازه کوچک و بیان ژن‌های OCT4-GFP، MVH، C-KIT، SSEA1[2] شناسایی کنند. سپس از طریق تکنیک FACS[3] سلول‌های بنیادی را از تخمدان جدا کرده و کشت دادند. آن‌ها با استفاده از مارکر OCT4، C-KIT، NANOG، GFR-α1 [4] و GCNA1[5] حضور سلول‌های بنیادی زایا را در محیط کشت نشان دادند. تشکیل ساختار شبه جنینی با سه لایه زاینده (لایه مزودرم با بیان BMP4[6] و تروپونین[7]، لایه اکتودرم با بیان SOX-1، Ncam[8]، NESTIN و لایه آندودرم با بیان FOXA2[9] و GATA-4 شناسایی شد) و سلول‌های شبه اووسیت در این محیط کشت بیانگر شواهد بیشتر برای حضور سلول‌های بنیادی زایا در تخمدان می‌باشند [۲۹].

Lee و همکارانش در سال ۲۰۰۷ موفق نشدند مارکر SCP3[10]را که برای عملکرد میوز ضروری است در تخمدان فرد بالغ مشاهده کنند. آن‌ها نتیجه گرفتند که نئواووژنز در افراد بالغ صورت نمی‌گیرد [۲۵]. در مقابل، Bukovsky و همکارانش در سال ۲۰۰۸ با استفاده از آنتی‌بادی Anti-SCP3 نشان دادند که SCP3 در تخمدان غیر فعال و تخمدان افراد مسن و در اکثر زمان‌های چرخه تولید مثلی تخمدان عملکردی بیان نمی‌شود و فقط در دوره لوتئال چرخه تولیدمثلی تخمدان انسان و موش در برخی از نقاط تونیکاآلبوژینه و پوشش سطحی تخمدان و همچنین در هسته اووسیت فولیکول‌های بدوی بیان می‌شود [۳۰]. این مشاهدات نشان می‌دهد که در دوره بلوغ آماده شدن برای فعالیت میوز در سطح پیش‌ساز سلول‌های بنیادی زایا (سلول‌های مزانشیم در تونیکاآلبوژینه) و پوشش سطحی تخمدان آغاز می‌شود و فعالیت پروفاز میوز I ادامه می‌یابد تا اینکه در اووسیت فولیکول‌های بدوی تازه تشکیل شده خاتمه می‌یابد.

[1] Green fluorescent protein
[2] Stage-specific embryonic antigen-1
[3] Fluoresent-assisted cell sorting
[4] GDNF family receptor alpha 1
[5] Germ cell nuclear antigen 1
[6] Bone morphogenic protein-4
[7] Troponin
[8] Neural cell adhesion molecule
[9] Forkhead box protein A2
[10] Synaptonemal complex protein-3

پس از مطرح شدن مجدد نظریه نئواووژنز، سوالات متعددی ایجاد شد که پاسخ‌گویی دقیق به آن‌ها مستلزم بررسی بیشتر در زمینه وقوع نئواووژنز است. از جمله این سوالات می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- آیا تولید اووسیت جدید از سلول‌های بنیادی تخمدان در پستانداران بالغ، به عنوان بخشی از سیکل طبیعی تخمدان محسوب می‌شود [۳۱]؟
- آیا سلول‌های بنیادی در شرایط طبیعی فیزیولوژیک در تخمدان، خاموش هستند و فقط در پاسخ به آسیب‌های اووتوکسیک به ذخیره‌سازی اووسیت کمک می‌کنند؟ اگر اینگونه است آیا می‌توان نئواووژنز را تحریک کرد و از آن برای عملکردی کردن تخمدان‌هایی با آسیب‌های پاتولوژیک و فیزیولوژیک استفاده نمود [۳۲]؟
- آیا پتانسیل رشد سلول‌های بنیادی تخمدان در بدن پستانداران بالغ مهار شده است و فرآیند کشت سلول پتانسیل رشد آن‌ها را تغییر داده و منجر به تولید سلول‌های شبه اووسیت و ساختارهای شبه جنینی می‌شود [۳۳]؟

اما مهترین سوال مطرح شده، منبع احتمالی سلول‌های بنیادی تخمدان است. هرچند شواهد حاکی از وجود سلول‌های بنیادی تخمدان در پوشش سطحی تخمدان است اما بر روی منبع احتمالی آن‌ها اختلاف نظر وجود دارد. چهار منبع برای این سلول‌ها پیشنهاد شده است که شامل مغز استخوان، سلول‌های زایا بدوی[1]، سلول‌های بنیادی شبه رویانی بسیار کوچک[2]و تونیکاآلبوژینه می باشد که در ادامه به توضیح هر یک پرداخته خواهد شد.

[1] Primordial germ cells
[2] Very small embryonic like stem cells

۱-۳ مغز استخوان منبع احتمالی سلول‌های بنیادی در تخمدان

Johnson و همکارانش با انتشار دو مقاله بحث‌برانگیز در سال ۲۰۰۴ و ۲۰۰۵ مدعی شدند که نئواووژنز در تخمدان موش بالغ اتفاق می‌افتد و منشا آن پوشش سطحی تخمدان یا مغز استخوان است. این مطالعات نظریه طولانی مدت تولیدمثل اینکه پستانداران با تعداد محدودی اووسیت متولد می‌شوند و با گذشت سن تعداد آنها کاهش می‌یابد به چالش انداخت. آن‌ها نتایج خود را در مورد تجدید فولیکول از سلول‌های بنیادی در تخمدان موش پس از تولد، از سه نوع مشاهده خود به‌دست آوردند: ناهماهنگی در از دست دادن فولیکول آترزی در دوره پس از تولد، شناسایی سلول‌های بنیادی تخمدان تکثیر یافته با توانایی میوز، وقوع نئواووژنز در آزمایشات پیوند مغز استخوان در موش بالغ [۱۳].

این گروه در مطالعات مورفولوژیک خود مشاهده کردند که سرعت آترزی فولیکول در تخمدان موش بسیار بالا است اما در دوره تولیدمثلی تعداد کافی و معین فولیکول در تخمدان وجود دارد. بنابراین، مطرح کردند که با وجود آترزی بالا فولیکول، باید فرآیند نئواووژنز در دوره تولیدمثلی صورت گیرد تا تعداد کافی و سالم فولیکول در این دوره را توجیه کند. سپس با استفاده از MVH مارکر رده زاینده و BrdU مارکر تکثیر سلولی حضور سلول‌های بنیادی زایا را در داخل یا نزدیک پوشش سطحی تخمدان موش بالغ گزارش کردند. به‌این‌ترتیب، در سال ۲۰۰۴ این نظریه را مطرح کردند که نئواووژنز در تخمدان موش بالغ اتفاق می‌افتد و فولیکول‌های جدید از سلول‌های بنیادی زایا موجود در پوشش سطحی تخمدان منشا می‌گیرد [۲۲]. آن‌ها در ادامه مطالعات خود مشاهده کردند که تعداد این سلول‌ها به شدت در حال کاهش است، از ۶۳ سلول در تخمدان ۳۰ روزه به ۶ سلول در تخمدان ۴۰ روزه رسید. این نظریه را برای آن‌ها بعید ساخت که این سلول‌ها بتواند بیانگر سلول‌های بنیادی زایا بالغ باشند. برای تایید نتایج خود از دوکسوروبیسین[1] استفاده کردند. این دارو سلول‌های زایا را تا ۲۴ ساعت پس از درمان تخریب می‌کند اما آن‌ها ۳۶ ساعت پس از درمان با دوکسوروبیسین شاهد تجدید خودبه‌خودی فولیکول‌های نابالغ در تخمدان موش بودند. به‌این‌ترتیب مطرح کردند که پوشش سطحی تخمدان نمی‌تواند منشا اووسیت جدید باشد [۲۳].

این گروه یک‌سال بعد نظریه خود را اینگونه اصلاح کردند که نئواووژنز در تخمدان موش بالغ اتفاق می‌افتد اما منشا اووسیت جدید مغز استخوان است و پیش‌ساز اووسیت از طریق گردش خون به تخمدان عرضه می‌شود. آن‌ها دو ماه پس از شیمی‌درمانی با سیکلوفسفامید[2] و بوسولفان[3] در موش ماده بالغ، شاهد تخلیه تخمدان و ناباروری در آن‌ها بودند. به دنبال آن مشاهده کردند موش‌هایی که یک هفته پس از شیمی‌درمانی، پیوند مغز استخوان دریافت کرده‌اند در مقایسه با موش‌هایی که پیوند را دریافت نکردند تولید مجدد فولیکول را دو ماه پس

[1] Doxorubicin
[2] Cyclophosphamide
[3] Busulfan