١٤٤٦٣٠

دانشگاه تربیت معلم

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی گرایش

سلولی-تکوینی، جانوری

بررسی تاثیر فاکتورهای رشد فیبروبلاست، هپاتوسیت و اپیدرمی بر از سرکیری میوز، بلوغ آزمایشگاهی تخمک های نارس موش، تکوین جنین های حاصله از آن و تکوین تخمک ها و جنین های ذوب شده

استاد رهنما:

دکتر مهناز آذرنیا

استاد مشاور:

دکتر محمد هادی بهادری

پژوهشگر:

فاطمه قاسمیان

۱۱ بهمن ۱۳۸۸

۱۴۴۶۳۰

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و

نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه

متعلق به دانشگاه تربیت معلم تهران است.

پروردگارا، شکر و سپاس تو را به خاطر تقدیر نیکوی تو

تشکر می کنم از **پدر و مادر** عزیزم که در این روزگاران سرد پناهی جز آنها نمی بینم، آنهایی که عطرشان پایدار و مهرشان ستودنی است.

تشکر می کنم از برادر و خواهران عزیزم و همسران محترمشان که در تمام دوران تحصیل و زندگیم همراه و شریک خواسته ها، شادی ها و آرزوهایم بوده اند.

تشکر می کنم از استاد فرزانه و عزیزم سرکار خانم دکتر مهناز آذرنیا که افتخار شاگردی ایشان را داشتم و توانستم از راهنمایی ها و محبت های بی دریغ ایشان بهره مند گردم.

سپاس از استاد ارجمند و فرزانه ام جناب آقای دکتر محمد هادی بهادری که مرا با آموزه هایشان آشنا کردند. ایشان نه تنها به من یاد دادند بلکه با تعالیمشان به من زندگي دادند. از تفکر متعالي گفتند و من متفکر شدم، از ایمان واقعي گفتند و من ذره اي از آن پر شدم ، استاد من شدند و من شاگردشان شدم. گفتند هر آنچه را که باید بدانم و من شنیدم آنچه را که باید مي شنیدم. سپاس از شما به خاطر همه چیز.

آموخته ام که تنها چیزی که هر شخص میخواهد فقط دستی است برای گرفتن دست او و قلبی برای فهمیدنش. از این رو جا دارد که از تمامی دوستانم که همواره یار و همراه من بوده اند تشکر و قدردانی نمایم.

تشکر می کنم از استاد فرزانه و ارجمند جناب آقای دکتر کاظم پریور که زحمت داوری پایان نامه را به عنوان داور خارجی بر عهده داشته اند.

تشکر می کنم از استاد محترم و ارجمند جناب آقای دکتر محمد نبیونی که زحمت داوری پایان نامه را به عنوان داور داخلی بر عهده داشته اند.

تشکر می کنم از اساتید گرانقدر گروه زیست شناسی جناب آقای دکتر محمد نبیونی و خانم دکتر هما محسنی کوچصفهانی که افتخار شاگردی ایشان را در دوره کارشناسی ارشد داشتم.

تشکر می کنم از مدیر گروه محترم زیست شناسی سرکار خانم دکتر شهربانو عریان که افتخار شاگردی ایشان را در دوره کارشناسی ارشد داشتم.

تشکر می کنم از کادر محترم گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان که کمال همکاری را با من در به ثمر رساندن این تحقیق داشتند.

و در پایان سپاس فراوان از تمامی دوستان عزیزی که در سرانجام رساندن این پروژه با من همکاری نمودند و در تمام مراحل انجام کار مشوق و یاریگر من بوده اند.

تقدیم به

مادر عزیزم

که در چشمانش نور زندگانی جاریست

و

پدر مهربان

که وجودش برایم تکیه گاهی محکم است

چکیده

هدف تحقیق : جهت بررسی اینکه همراه کردن فاکتور رشد فیبروبلاست-۴، هپاتوسیت یا اپیدرمی به محیط کشت مخصوص بلوغ و متعاقبا محیط تکوین آیا هیچ تاثیری بر بلوغ تخمک، لقاح و تکوین جنین ها بدون/با انجماد از طریق انجماد شیشه ای دارد.

روش تحقیق: تخمک های نابالغ از تخمدان موش‌های ماده نژاد NMRI به‌دنبال تزریق داخل صفاقی 5IU PMSG و جنین ها به دنبال تزریق داخل صفاقی 5IU hCG ، ۴۸ ساعت بعد از تزریق 5IU PMSG از اویداکت به‌دست آورده شد. تخمک‌ها در محیط کشت Tissue culture medium-199 (TCM-199) همراه با با دوزهای مختلف فاکتورهای رشد کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت در مجاورت با اسپرم‌ها به مدت ۶-۴ ساعت در محیط T6 انکوبه شدند. میزان کلیواژ جنین‌ها نیز در محیط T6 توام با دوزهای مختلف فاکتورهای رشد تا مرحله بلاستوسیست بررسی شد. همچنین انجماد شیشه ای با استفاده از اتیلن گلیکول و دی متیل سولفوکسید انجام شد و اثر فاکتور های رشد بر میزان بلوغ تخمک و تکوین جنین مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: میزان بلوغ، لقاح و تکوین در گروه‌های تیمار شده با bFGF-4, HGF 20ng/ml و EGF افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. همچنین گروه های تیمار شده با 20ng/ml فاکتور رشد فیبروبلاست و هپاتوسیت میزان بلوغ تخمک و تکوین جنین را بعد از ذوب شدن نسبت به گروه کنترل افزایش می دهد ($p<0.05$).

نتیجه‌گیری: فاکتورهای رشد فیبروبلاست، هپاتوسیت و اپیدرمی اگزوژن، بلوغ تخمک ها و تکوین جنین ها را افزایش می دهد و این افزایش در رشد تخمک و جنین ها به دنبال ذوب شدن از انجماد شیشه ای هم مشاهده شد.

کلید واژه: فاکتورهای رشد، بلوغ آزمایشگاهی، لقاح آزمایشگاهی، انجماد شیشه ای

فهرست

عنوان صفحه

فصل اول:مقدمه

۱-۱- مروری بر روش های کمک باروری ۲

۱-۲- رشد ونمو تخمک ۴

۱-۲-۱- ساخت و تجمع ماکرومولکول ها در طی اووژنز ۵

۱-۳- تخمک های مرحله حباب زاینده ۶

۱-۳-۱- تقسیم بندی تخمک های مرحله حباب زاینده بر اساس توزیع کروماتین ۷

۱-۴- اثر سلول های کومولوس بر روند بلوغ و تکوین تخمک ۷

۱-۵- تولید اسپرم و خصوصیات آن ۸

۱-۶- بلوغ آزمایشگاهی (IVM) ۱۰

۱-۶-۱- تنظیم بلوغ تخمک ۱۱

۱-۶-۱-۱- بلوغ هسته ۱۱

۱-۶-۱-۲- بلوغ سیتوپلاسم ۱۲

۱-۷- لقاح آزمایشگاهی (IVF) ۱۴

۱-۷-۱- فعال شدن ژنوم جنینی ۱۵

۱-۷-۲- مزایای IVF ۱۶

۱-۷-۳- خطرات IVF ۱۷

۱-۷-۳-۱- چندقلوزایی ۱۷

۱-۷-۳-۲- نقایص زمان تولد ۱۷

۱-۷-۳-۳- خطرات سلامتی مادر ۱۸

۱-۸- تکوین جنین پیش از لانه گزینی ۱۹

۱-۸-۱- لقاح تا تشکیل مورلا ۱۹

۱-۸-۲- تشکیل مورلا ۲۰

۱-۸-۳- تشکیل بلاستوسیست ۲۰

۱-۸-۴- از پوسته درآمدن ۲۱

۱-۸-۵- لانه گزینی ۲۱
۱-۸-۶- فاکتورهای موثر در جنین قبل از لانه گزینی ۲۲
۱-۹- بلاستوسیست موش ۲۳
۱-۱۰- مقایسه جنین موش و انسان ۲۴
۱-۱۱- محیط کشت **برای جنین های مرحله قبل از لانه گزینی** ۲۵
۱-۱۲- فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) ۲۶
۱-۱۲-۱- خصوصیات پروتئینی EGF ۲۶
۱-۱۲-۲- منبع فاکتور رشد اپیدرمی ۲۷
۱-۱۲-۳- ساختار ژنی ۲۷
۱-۱۲-۴- رسپتورها ۲۸
۱-۱۲-۵- القای سیگنال ۲۸
۱-۱۲-۶- فعالیت بیولوژیکی ۲۸
۱-۱۳- فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) ۲۹
۱-۱۴- فاکتور رشد هپاتوسیت (HGF) ۳۰
۱-۱۵- تاریخچه انجماد تخمک وجنین در پستانداران ۳۱
۱-۱۶- کاربردهای کلینیکی انجماد ۳۲
۱-۱۷- اصول انجماد ۳۳
۱-۱۷-۱- آب گیری و انجماد ۳۳
۱-۱۷-۲-ذوب کردن و آبدهی ۳۴
۱-۱۸- روش های انجماد ۳۴
۱-۱۸-۱- انجمادآهسته ۳۴
۱-۱۸-۲- انجمادشیشه ای ۳۵
۱-۱۹- معرفی مواد CPAs ۳۶
۱-۱۹-۱- DMSO و گلیسرول ۳۶
۱-۱۹-۲- اتیلن گلیکول ۳۷
۱-۲۰- کرایوتاپ ۳۷
۱-۲۱-هدف، فرضیات و ضرورت اجرای طرح ۳۸

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱- طرح کلی کار ۴۰

۲-۲- وسایل و مواد مورد نیاز

۲-۲-۱- وسایل مورد نیاز ۴۱

۲-۲-۲- مواد مورد نیاز ۴۲

۲-۳- تهیه محیط کشت TCM ۴۲

۲-۴- تهیه محیط کشت T6 ..... ۴۳

۲-۵- تهیه محیط کشت قطره ای ۴۳

۲-۶- آماده سازی فاکتورهای رشد و هورمون ها برای استفاده ۴۴

۲-۶-۱- فاکتور رشد فیبروبلاست ۴۴

۲-۶-۲- فاکتور رشد اپیدرمی ۴۵

۲-۶-۳- فاکتور رشد هپاتوسیت ۴۵

۲-۶-۴- هورمون PMSG ۴۵

۲-۶-۵- هورمون hCG ۴۵

۲-۷- آماده سازی پیپت دهانی برای جابجا کردن تخمک ۴۶

۲-۸- روش جابجا کردن تخمک با استفاده از پیپت دهان ۴۶

۲-۹- القا تخمک گذاری ۴۷

۲-۹-۱- عوامل موثر در القای تخمک گذاری ۴۷

۲-۹-۲- روش القا تخمک گذاری ۴۸

۲-۱۰- باز کردن حفره شکمی و مکان یابی اندام های تناسلی ۴۹

۲-۱۱- جمع آوری تخمک ۵۰

۲-۱۲- برهنه کردن تخمک ۵۱

۲-۱۳- نحوه بررسی تخمکهای حباب زاینده ۵۲

۲-۱۴- لقاح آزمایشگاهی ۵۲

۲-۱۴-۱- مراحل نمونه گیری اسپرم از اپیدیدیم ۵۲

۲-۱۴-۲- تکنیک لقاح آزمایشگاهی ۵۳

۲-۱۴-۳- نحوه بررسی تخمک های تلقیح شده ۵۳

۲-۱۴-۴- نحوه کشت جنین ها پس از IVF ۵۴

۲-۱۵- جمع آوری جنین ۵۵

۲-۱۶- جدا کردن تخمک های مطلوب جهت انجماد ۵۶

۲-۱۷- جدا کردن جنین های مطلوب جهت انجماد ۵۶

۲-۱۸- انجماد شیشه ای ۵۷

۲-۱۸-۱- تهیه محلول های انجماد شیشه ای..... ۵۷
۲-۱۸-۲- روش انجماد شیشه ای..... ۵۸
۲-۱۸-۲-۱ – انجماد تخمک..... ۵۸
۲-۱۸-۲-۲- انجماد جنین..... ۵۹
۲-۱۸-۳- ذوب کردن
۲-۱۸-۳-۱- تهیه مواد لازم برای ذوب کردن جنین های منجمد شده..... ۵۹
۲-۱۸-۳-۲- ذوب کردن تخمک های منجمد شده..... ۶۰
۲- ۱۸-۳- ۳- ذوب کردن جنین های منجمد شده..... ۶۱
۲- ۱۹- ویژگی های تخمک و جنین های زنده مانده..... ۶۱
۲- ۲۰- آنالیز آماری..... ۶۱

فصل سوم: نتایج

۳-۱- میزان بلوغ تخمک های حباب زاینده در گروههای تیمار شده با دوز های مختلف فاکتور رشد فیبروبلاست و مقایسه آن با گروه کنترل..... ۶۳
۳-۲- میزان لقاح تخمک های MII در گروههای مختلف تیمار شده با فاکتور رشد فیبروبلاست و مقایسه آن با گروه کنترل..... ۶۴
۳-۳- میزان تکوین تخمک های تلقیح شده در گروههای مختلف تیمار شده با فاکتور رشد فیبروبلاست و مقایسه آن با گروه کنترل..... ۶۵
۳-۴- میزان تکوین جنین های دو پیش هسته ای بلوغ یافته در شرایط in-vivo ، در گروههای مختلف تیمار شده با فاکتور رشد فیبروبلاست و مقایسه آن با گروه کنترل.. ..... ۶۶
۳-۵- میزان بلوغ تخمک های حباب زاینده در گروههای تیمار شده با دوز های مختلف فاکتور رشد هپاتوسیت و مقایسه آن با گروه کنترل..... ۶۷
۳-۶- میزان لقاح تخمک های MII در گروههای مختلف تیمار شده با فاکتور رشد هپاتوسیت و مقایسه آن با گروه کنترل..... ۶۹
۳-۷- میزان تکوین تخمک های تلقیح شده در گروههای مختلف تیمار شده با فاکتور رشد هپاتوسیت و مقایسه
آن با گروه کنترل..... ۷۰
۳-۸- میزان تکوین جنین های دو پیش هسته ای بلوغ یافته در شرایط in- vivo، در گروههای مختلف تیمار شده با فاکتور رشد هپاتوسیت و مقایسه آن با گروه کنترل..... ۷۱
۳-۹- میزان بلوغ تخمک های حباب زاینده در گروههای تیمار شده با دوز های مختلف فاکتور رشد اپیدرمی و مقایسه آن با گروه کنترل..... ۷۲
۳-۱۰- میزان لقاح تخمک های MII در گروههای مختلف تیمار شده با فاکتور رشد اپیدرمی ۷۴

و مقایسه آن با گروه کنترل.....

۳-۱۱- میزان تکوینن تخمک های تلقیح شده در گروههای مختلف تیمار شده با فاکتور رشد اپیدرمی و مقایسه آن با گروه کنترل..... ۷۵

۳-۱۲- میزان تکوین جنین های دو پیش هسته ای بلوغ یافته در شرایط in-vivo، در گروههای مختلف تیمار شده با فاکتور رشد اپیدرمی و مقایسه آن با گروه کنترل..... ۷۵

۳-۱۳- انجماد شیشه ای..... ۷۷

۳-۱۳- ۱- انجماد شیشه ای تخمک ها..... ۷۷

۳-۱۴- انجماد شیشه ای جنین ها..... ۷۸

فصل چهارم: بحث

۴-۱-۱- بررسی اثر فاکتور رشد فیبروبلاست بر بلوغ، لقاح وتکوین آزمایشگاهی تخمک های مرحله ی حباب زاینده..... ۸۶

۴-۱-۲- بررسی اثر فاکتور رشد هپاتوسیت بر بلوغ، لقاح و تکوین آزمایشگاهی تخمک های مرحله ی حباب زاینده..... ۸۸

۴-۱-۳- بررسی اثر فاکتور رشد اپیدرمی بر بلوغ، لقاح و تکوین آزمایشگاهی تخمک های مرحله ی حباب زاینده ۸۹

۴-۲- تکوین آزمایشگاهی جنین های بالغ شده در شرایطIn-vivo ۹۱

۴-۲-۱- بررسی اثر فاکتورهای رشد فیبروبلاست، هپاتوسیت و اپیدرمی بر تکوین آزمایشگاهی جنین های دو پیش هسته ای..... ۹۳

۴-۳- اثرات انجماد شیشه ای بر تخمک وجنین..... ۹۴

۴-۴- نتیجه گیری..... ۹۶

۴-۵ -پیشنهادات..... ۹۷

فصل پنجم: منابع

5-۱- منابع فارسی..... ۹۹

۵-۲- منابع انگلیسی..... ۱۰۰

فصل اول

مقدمه

۱-۱- 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 (Jose et al, 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 (Jose et al, 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 and Edwards, 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, 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، ۱۳۷۴ و شین جان، ۱۳۶۵). 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 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 "

---

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

(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[3] 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 " [4]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)[5]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 et al, 1992). نتایج حاصله از ۶۰ 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 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[6] و انجماد[7]بهره زیادی برده

---

[1]. Gamet Intrafallopian Transfer
[2]. Zygote Intrafallopian Transfer
[3]. Zona pellucida
[4]. Partial Zona Dissection
[5]. Subzonal insemination
[6]. In vitro maturation
[7]. Cryopreservation

است (Duncoog et al, 2007). اسپرم اولین سلولی بود که به طور موفقیت آمیز در شرایط انجماد نگه داری شد (Pegg, 2002). به نظر می رسد که متوقف سازی زمان در مورد گامت ها قابل تامل می باشد، اما انجماد جنین ها در بسیاری از کشورها از نظر جنبه های اخلاقی و منطقی ممنوع شده است. علی رغم این موقعیت های بحث انگیز، نیاز به انجماد موثر تخمک ها و جنین ها برای هر دو جنبه تئوری و عملی بسیار مهم است. به هر حال علی رغم تلاش های گسترده، پیشرفت کمی دیده شده است. مسائل عمده ای چون، فقدان نتایج ثابت (Steptoe 1978)، تفاوت های موجود در میزان بقا و تکوین بعد از ذوب کردن تخمک و جنین ما بین گونه ها، در مراحل و کیفیت تکوین وجود دارد (Eduardo 2004). بنابراین انجماد تخمک و جنین نیاز به تحقیقات بیشتری داشته تا بتوان با استفاده از انجماد موفق تخمک و جنین در زمینه کلینیکی بهره های زیادی از آن برد.

۱- ۲- رشد و نمو تخمک

در پستانداران، اووژنز در دوره جنینی و با تشکیل سلولهای زاینده اولیه[1] 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 and Anderson, 2002). سلولهای زاینده یا پیش سازهای تخمک متحرک بوده و در پاسخ به تحریکات شیمیایی 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(Tam and Snow, 1981; Wylie et al, 1985). 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[2] 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 et al, 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

---

[1]. Primordial germ cell: PGC
[2]. Primordial follicle

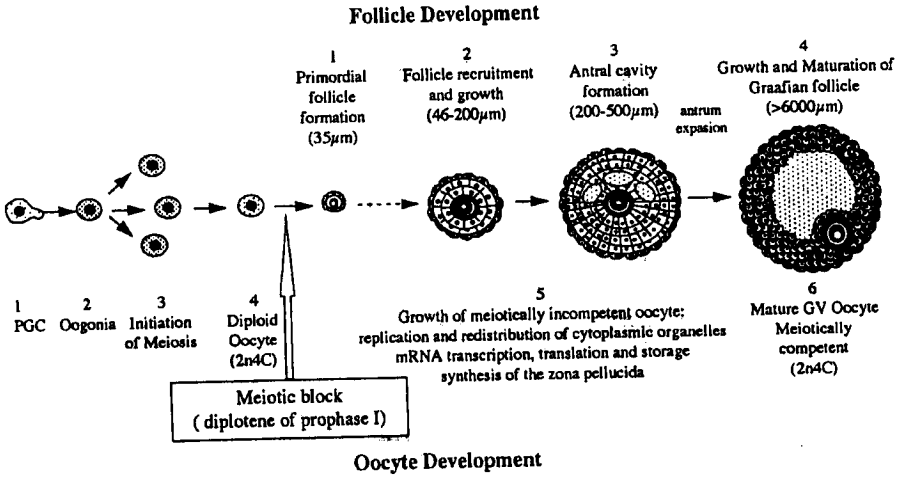
فولیکول های بدوی که تبدیل به فولیکول های در حال رشد خواهند شد، تامین می شود. لازم به ذکر است که در هر چرخه تخمدانی ۵ تا ۲۰ عدد از این فولیکول ها رشد کرده ولی فقط یکی از آنها آزاد می شود (بهادری،۱۳۸۸). در طی این مدت حجم تخمک حدود ۲۰۰ تا ۳۰۰ برابر افزایش می یابد. همراه با افزایش حجم سلول، تخمک آب، یونها، 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[1] را شکسته و میوز را مجدداً آغاز کند(Picton et al, 1998).

۱-۲-۱- ساخت و تجمع ماکرومولکول ها در طی اووژنز

فولیکول های بدوی معمولاً و به اشتباه به عنوان سلول های خاموش[2] 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 and Aoki, 2002). اووگونی ها در طی مراحل اولیه میتوز، با شدت نسبتاً زیادی 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 در مرحله دیپلوتن افزایش می یابد. میزان نسخه برداری مجدداً با ایجاد ارتباط سلول های گرانولوزا با تخمک کاهش می یابد (شکل ۱-۱). با شروع مجدد میوز که با شکستن حباب زاینده مشخص می گردد، نسخه برداری متوقف شده و ذخیره برنامه های مادری کامل می شود (Picton et al, 1998).

---

[1]. Germinal vesicle
[2]. Quiescent



شکل۱-۱ : مراحل اووژنز و تشکیل فولیکول از زمان نمو سلول های زاینده بدوی (PGC) تا ایجاد تخمک در، مرحله حباب زاینده در پستانداران. همانطور که در شکل مشاهده می شود دوره میوزI طولانی می باشد که تحت عنوان توقف میوزی مشخص شده است (اقتباس از Picton et al, ۱۹۹۸).

حدس زده می شود که ساخت و جذب ماکرومولکول ها با دوهدف انجام می شود. هدف اول استفاده از این مواد جهت رشد و بلوغ تخمک می باشد و هدف دوم ذخیره اطلاعات و مواد موردنیاز برای حمایت و پشتیبانی نمو بعد از لقاح تا زمان فعال شدن ژنوم جنینی است (Yu et al, 2003). باتوجه به ویژگی های خاصی که در نمو تخمک وجود دارد، مانند دوره طولانی مدت میوز I و توقف نسخه برداری از ژن ها در میوز II، باید مکانیسم های مختلفی در تخمک جهت ذخیره سازی این مولکولها وجود داشته باشد تا در زمان مناسب از آنها استفاده نماید. این مکانیسم ها شامل پلی آدنیلاسیون و دآدنیلاسیون انتخابی، ترجمه و تحلیل RNA های مادری ذخیره شده می باشد که تخمک مطابق با نیازهای خود برای بیان ژن ها از آنها استفاده می کند (Gandolfi,2001).

۱-۳- تخمک های مرحله حباب زاینده

در بیشتر پستانداران از جمله انسان تقسیم میوز در زمان زندگی داخل رحمی شروع شده و درمرحله دیپلوتن پروفاز اولین تقسیم میوز متوقف می گردد. در پستانداران در طی فاز فولیکولی تعدادی فولیکول شروع به رشد نموده و فقط یکی از آنها تبدیل به تخمک بالغ می شود و بقیه قبل از تخمک گذاری دچار آترزی شده و از بین می روند. در طی فاز فولیکولوژنز، فولیکول‌ها بزرگ شده وتشکیل حفره‌ای بنام آنتروم می دهند، تخمک‌های نابالغی که در آنتروم فولیکول‌ها قرار دارند در پروفاز اولین تقسیم میوزی متوقف می شوند، در این مرحله تخمک‌ها دارای یک هسته بزرگ ومشخص بوده و حباب زاینده (GV) نامیده می شوند (Agca et al, 1998). مشخصه تخمک های مرحله حباب وجود کروموزمهای طویل شده درداخل غشای هسته،

عدم تشکیل دوک، آزاد نشدن گرانول‌های قشری است. هم چنین تخمک های مرحله GV داری سلول های کومولوس متراکم می باشند.

۱-۳-۱- تقسیم بندی تخمک حباب زاینده براساس توزیع کروماتین

در طی اووژنز[1] بیان ژن، تولید و تجمع RNAs مادری برای تکوین اولیه جنین ضروری بوده و بایستی به طور فعال صورت گیرد. مدارک زیادی ارتباط بین تنظیم بیان و آرایش کروماتین ها را در یوکاریوت ها نشان می دهند (Fenselfeld, 1992). تغییرات در ساختار کروماتین تخمک و آرایش فضایی کروماتین در سراسر اووژنز یک مشخصه خوب از وضعیت متابولیکی سلول های زاینده[2] محسوب می شود(Sorensen, 1976). تخمک های GV به دست آمده از فولیکول آنترال تخمدان موش بر اساس توزیع کروماتین به دو دسته بزرگ تقسیم می شوند (Zuccotti et al, 1995). گروه اول به SN[3] معروف است، که با کروماتین نسبتا متراکم به صورت حلقه ای دراطراف هستک تخمک GV قرارگرفتند. گروه دوم به NSN[4] معروف است، زیرا کروماتین در داخل هسته تخمک GV پراکنده است. درانسان مشخصه تخمک SN-like وجود کروماتین بسیار متراکم بدون سنتز RNA میباشد، وسنتز RNA در تخمک NSN-like انسان اتفاق می افتد (Parvenov et al, 1986). مطالعات انجام شده نشان می دهد که تخمک مرحله GV در وضعیت SN نسبت به NSN بیشتر به سمت تخمک گذاری می روند (Sorensen et al, 1976). Wickramasinghe و همکارانش گزارش نمودند که تشکیل حلقه ای از کروماتین در اطراف هستک (SN oocytes)، جهت ایجاد GVBD[5] ضروری می باشد (Wickramasinghe et al, 1991).

۱-٤- اثر سلول های کومولوس بر روند بلوغ و تکوین تخمک

سلول های کومولوس با حفظ تخمک در میوز در طی بلوغ، تحریک شروع میوز و تقویت بلوغ سیتوپلاسم نقش مهمی دارند. این اعمال به اتصال شکافدار[6] و توانایی متابولیکی آن نسبت داده می شود(Tanghe et al, 2002). تماس فیزیکی بین تخمک و سلول های کومولوس برای انتقال مواد مغذی و فاکتورهای لازم جهت تکوین تخمک ها ضروری می باشند. سلول های کومولوس جدا شده از تخمک، فاکتور پاراکرین ترشح می کنند که باعث از سرگیری تقسیم میوز در تخمک بدون کومولوس[7] می شود. سلول های کومولوس به علت انتقال تعداد زیادی فاکتور های شناخته شده و شناخته نشده برای بلوغ هسته و سیتوپلاسم تخمک ضروری می باشند(Nagai, 2001). بنابراین سلول های کومولوس نقش مهمی در تنظیم فرایند میوز تخمک دارند. در

---

1. Oogenesis
2. Germ cell
3. Surrounded nucleolus
4. Non-surrounded nucleolus
5. Germinal vesicle break-down
6. Gap junction
7. Denuded oocytes

طول رشد و تکمیل میوز تخمک (قبل از شروع میوز) سلول های کومولوس مسئول توقف هسته تخمک مرحله حباب زاینده با افزایش سطح cAMP داخل سلولی و انتقال علائم مهار کننده از طریق اتصال شکافدار به تخمک می باشند (Downs, 2001; Tanghe et al, 2002). شروع میوز درارتباط با عملکرد سلول های کومولوس می باشد. شواهدی وجود دارد که سلول های کومولوس فاکتور مهارکننده میوز ترشح می کنند (Downs, 2001). بنابراین قطع علائم متوقف کننده میوز در اثر جدایی سلول های کومولوس یا مسدود شدن اتصال شکافدار بین سلول های کومولوس و تخمک باعث شروع میوز در تخمک حباب زاینده می شوند. اثر سلول های کومولوس بر بلوغ تخمک ها در مراحل اولیه تکوین در گونه های مختلف، موش (Cross and Brinster, 1970)، موش صحرایی (Vanderhyden and Armstrong, 1989)، گاو[1] (Fukui, 1990) و انسان (Kennedy and Doanahue, 1969) بسیار مفید گزارش شده است. به طور کلی پذیرفته شده است که ارتباط بین سلول کومولوس و تخمک نه تنها برای بلوغ تخمک حباب زاینده به مرحله متافازII ، بلکه برای رشد ونمو سیتوپلاسم تخمک که باعث تکوین جنین بعد از لقاح می شود مهم می باشد(Ka et al, 1997).

۱-۵- تولید اسپرم و خصوصیات آن

سلولهای جنسی نر (اسپرم) بسیار اختصاصی هستند و از نظر کروموزومی هاپلوئید می باشند (Dunbar and Rand, 1991)، زیرا آنها در اثر تقسیم میوز ایجاد شده اند. فرایند تشکیل اسپرم از اسپرماتوگونی، اسپرماتوژنز نام دارد که در انسان ۶۵ روز و در موش ۳۴/۵ روز طول می کشد (Fimia et al, 2001). تکامل سلولهای PGC در جنس مذکر تا مرحله اسپرماتید را اسپرماتوژنز می نامند. این پروسه شامل اسپرماتوسیتوژنز و اسپرمیوژنز میباشد.

اسپرماتوسیتوژنز: پس از ورود سلولهای PGC به گوناد جنس مذکر، این سلولها همراه با سلولهای سرتولی یا پشتیبان که از سطح قشری گوناد منشاء گرفته اند لوله های توپری را بنام لوله های سمینیفر اولیه ایجاد میکنند، که تا زمان بلوغ بدون تغییر مانده و در زمان بلوغ تحت تاثیر هورمونهای گنادوتروپیک و جنسی، PGCها به اسپرماتوگونی تمایز میابد و اسپرماتوگونیها تغییرات تکاملی خود را آغاز میکنند که به دو نوع A و B تقسیم می شوند. اسپرماتوگونی نوع A از طریق میتوز تکثیر یافته تا ذخیره ای مداوم برای سلولهای اصلی باشند و اسپرماتوگونی نوع B اسپرماتوسیت اولیه را می سازد.

بطور معمول برخی از سلولهای نوع A از جمعیت سلول های اصلی جدا شده و با تقسیمات پی در پی اسپرماتوگونیهای نوع A1،A2،A3 و A4 و بالاخره اسپرماتوگونی نوع B را می سازد. از میتوز این سلولها، اسپرماتوسیت اولیه بوجود می آید که پس از یک پروفاز طولانی ۲۲ روزه (درموش تقریبا ۱۳ روز است) بطور

[1]. Bovine