DOI: 10.22041/ijbme.2008.13455

Study and Characterization of the Mechanical Properties Alteration of the Mouse Ovum Zona Pellucida by Micropipette Aspiration Technique

M. Khalilian[1], M. Navidbakhsh[2★], M. Rezazadeh[3], M. Chizari[4], P. Eftekhari[5]

[1] PhD Candidate, Mechanical Engineering School, Iran University of Science & Technology, Tehran, Iran, mkhalilian@iust.ac.ir
[2] Assistant Professor, Mechanical Engineering School, Iran University of Science & Technology, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Embryology, Infertility and IVF Unit, Royan Institute,Tehran, Iran, mr_valojerdi@yahoo.com
[4] Assistant Professor, School of Mechanics, Aerospace and Civil Engineering, University of Manchester, UK, mahmoudchizari@yahoo.com
[5] Assistant Professor, Department of Embryology, Infertility and IVF Unit, Royan Institute,Tehran, Iran, peyazdi@yahoo.com

Abstract

Recently, considerable biomedical attention has centered on the mechanical properties of living tissues at the single cell level. Stiffness is an important parameter in determining the physical properties of living tissues. Indeed, stiffness changes of the ovum as a single cell pose a unique challenge in determining the sequence of fertilization. The ovum's extracellular layer has been reported to be altered following fertilization in a process described as zona reaction. In the present study, the Young's modulus of Zona Pellucida of the mouse ovum was evaluated using micropipette aspiration technique. By incorporating exact engineering principles into the cell mechanics and extract appropriate formula, the Young's modulus of metaphase-II (MII) and pronuclear (PN) was measured.The experimental results clearly demonstrated that the mouse Zona Pellucida hardened following fertilization. This study involves the contents of Reproductive Biology and Mechanics, and opens up a new trail of thought for evaluating the quality of mammalian oocytes and embryos.

Keywords: **Young's modulus; Micropipette aspiration; Living cells; Zona Pellucid; Fertilization**

* **Corresponding author**
Address: *Mahdi Navidbakhsh, Mechanical Engineering School, Iran University of Science & Technology,Hengam St., Resalat Sq., Tehran, Iran*
Tel: *+98 21 77240283*
Fax: *+98 21 77240488*
E-mail: *mnavid@iust.ac.ir*

DOI: 10.22041/ijbme.2008.13455

مطالعه و بررسي تغييرات رفتار مكانيكي لايه زوناي تخمك موش با استفاده از روش مكش با ميكروپيپت

مرتضي خليليان [۱]، مهدي نويدبخش [۲*]، مجتبي رضازاده [۳]، محمود چيذري [۴]، پويك افتخاري [۵]

[۱] دانشجوي دكتراي دانشكده مهندسي مكانيک، دانشگاه علم و صنعت ايران، تهران mkhalilian@iust.ac.ir

[۲] استاديار دانشكده مهندسي مكانيک، دانشگاه علم و صنعت ايران، تهران

[۳] استاديار گروه جنين شناسي، مركز تحقيقات علوم سلولي جهاد دانشگاهي، پژوهشكده رويان، تهران mr_valojerdi@yahoo.com

[۴] استاديار دانشكده مهندسي مكانيک، دانشگاه منچستر، انگلستان mahmoudchizari@yahoo.com

[۵] استاديار گروه جنين شناسي، مركز تحقيقات علوم سلولي جهاد دانشگاهي، پژوهشكده رويان، تهران peyazdi@yahoo.com

چكيده

به‌تازگي توجه چشمگيري به اندازه‌گيري خواص مكانيكي بافت‌هاي زنده و به طور خاص سلول واحد شده است. سفتي، پارامتر مهمي در تعيين خصوصيات فيزيكي بافت‌هاي زنده است. در حقيقت تغييرات سفتي تخمك به عنوان يك سلول واحد، بحث بي‌نظيري را در شناخت فرايند لقاح ارائه مي‌كند. گزارش‌هاي ارائه شده نشان مي‌دهند كه لايه زونا پلوسيدا، لايه محيطي تخمك، پس از عمل لقاح دچار تغييرات مي‌شود. در اين مطالعه خصوصيات بيوفيزيكي لايه زوناي تخمك موش قبل و بعد از لقاح به عنوان تغييرات رفتار مكانيكي سلول مورد بررسي قرار گرفته است. براي اين كار از طريق روش مكش با ميكروپيپت، سلول مورد آزمايش زير ميكروسكوپ معكوس به داخل ميكروپيپت كشيده و تغييرشكل حاصل اندازه‌گيري شده است.

با استفاده از قوانين حاكم بر مكانيك سلولي رابطه‌اي براي محاسبه ضريب كشساني لايه زوناي تخمك استخراج و تغيير در كشساني زونا در مرحله متافاز و پيش هسته به صورت كمي محاسبه شد. نتايج به‌دست آمده نشان داد فرايند لقاح و تغيير در خصوصيات بيوفيزيكي به طور مستقيم بر رفتار مكانيكي سلول مؤثر است. بنابراين با تعيين مشخصات مكانيكي سلول مي‌توان شرايط فيزيولوژيكي آن را مورد مطالعه قرار داد. در خصوص سلول جنسي موش، نتايج به طور واضح سفت شدن لايه زوناي تخمك را بعد از لقاح نشان مي‌دهد. روش و مدل ارائه شده در اين مطالعه مي‌تواند براي بررسي خصوصيات مكانيكي ديگر بيوغشاها و انواع ديگر سلول‌ها مورد استفاده قرار گيرد.

واژه‌هاي كليدي: ضريب كشساني؛ مكش با ميكروپيپت؛ سلول زنده؛ زونا پلوسيدا؛ لقاح

* عهده‌دار مكاتبات

نشاني: تهران، ميدان رسالت، خيابان هنگام، خيابان دانشگاه، دانشگاه علم و صنعت ايران، دانشكده مكانيك، آزمايشگاه تحقيقاتي بيومكانيك

تلفن: ۷۷۲۴۰۲۸۳، **دورنگار:** ۷۷۲۴۰۴۸۸، **پيام نگار:** mnavid@iust.ac.ir

۱- مقدمه

به‌كارگيري اصول مهندسي نظير ترموويسكوالاستيسيتي[1] و ترموديناميك[2] در علوم زيستي مي‌تواند درک بسياري از عملكردهاي بيولوژيكي، فعاليت‌هاي فيزيولوژيكي و حتي پديده‌هاي پاتولوژيكي مطرح در مكانيك سلول‌ها و بافت‌هاي نرم را آسان كند. تعدادي از عملكردهاي سلولي به‌شدت متأثر از مشخصات مكانيكي غشاهاي بسيار نازك سلولي است. براي مثال، لقاح تخمك به تغييرات مكانيكي بسياري در پوسته آن منجر مي‌شود بدين صورت كه بلافاصله پس از ورود اسپرم به داخل تخمك، آبشاري از كلسيم سلول را فرا مي‌گيرد و در نتيجه پوسته گليكوپروتئيني زونا پلوسيداي[3] تخمك براي جلوگيري از وارد شدن اسپرم‌هاي بعدي سفت مي‌شود [۱-۳]. تعيين مشخصات مكانيكي سلول واحد و تشريح با اطلاعات بيوشيميايي موجود يك پيوند جالب بين مهندسي و علوم زيستي است. دستكاري سلول زنده يك فرايند رايج در زمينه بيولوژي سلولي است و نقش مهمي در زيست پزشكي دارد.

يكي از روش‌هاي كمكي توليد مثل براي درمان فاكتور ناباروري مردانه روش تلقيح آزمايشگاهي[4] (IVF) است كه شامل ايجاد شرايط نزديكي سلول اسپرم به سلول تخمك در شرايط آزمايشگاهي است. در اين روش پوسته تخمك به عنوان مانع اصلي تركيب اسپرم و تخمك عمل مي‌كند. بنابراين در مواردي كه اسپرم توانايي تماس و نفوذ به داخل تخمك را ندارد نرخ‌هاي لقاح پايين‌تري نتيجه مي‌شود. در اين شرايط يك روش مناسب و جايگزين، روش تزريق مستقيم اسپرم به داخل سيتوپلاسم تخمك[5] (ICSI) است. به هرحال روش تزريق مستقيم با خطرات وارد شدن آسيب مكانيكي به تخمك همراه است كه در نتيجه بر نرخ لقاح و قابليت زيست تخمك تاثير مي‌گذارد. همان طور كه گزارش شده است زونا پلوسيداي تخمك بعد از لقاح طي فرايندي كه به نام واكنش زونا[6]، دچار تغييرات مي‌شود [۴]. طي واكنش زونا، افزايش مقـاومت در برابر تجزيه به‌وسيله عـامل‌هاي بيوشيميايي مختلف براي بسياري از گـونه‌ها ثبت شده است [۵، ۶]. بنابراين پديده مذكور، سفت شدن نام گرفته است [۷]. به هرحال، اگرچه اصطلاح سفت شدن بيانگر يك تغيير مكانيكي است، سفت شدن فيزيكي زونا به دليل نبود روش‌هاي اندازه‌گيري مناسب بسيار ناشناخته است و فقط چند مورد بررسي خواص مكانيكي زونا گزارش شده است. تلاش اوليه در مورد اندازه‌گيري سفتي لايه زونا به وسيله دروبنس[7] و همكارانش در سال ۱۹۸۸ با ارائه سيستم مكش مويرگي اجرا شد و تغيير شكل‌پذيري به صورت تغييرشكل لايه زونا نسبت به هر واحد تغيير فشار اعمالي بررسي شد [۸]. تلاش بعدي به وسيله سان[8] و همكارانش در سال ۲۰۰۳ به كمك پيشرفت‌هاي اخير در زمينه فناوري سيستم‌هاي ميكرو الكترو مكانيكي انجام شد [۹].

سـان و همكارانـش با ارائه حسگر[9] دومحوره نيرو، نيروي وارد بر سلول‌ها را اندازه گرفته و نتيجه گرفتند كه زوناي جنين موش حدود ۲/۴ برابر سفت‌تر از زوناي تخمك آن است. روش ديگري كه براي اندازه‌گيري كشساني زوناي تخمك و جنين موش در سال ۲۰۰۶ به وسيله ميورایاما[10] و همكارانش به كار گرفته شد ارائه ريزحسگر[11] بسيار حساس لمسي بود.

در اين مطالعه كشساني[12] زونا در مرحله متافاز و پيش هسته اندازه‌گيري و در خصوص سفت شدن مكانيكي بحث شد. به عنوان نتيجه، نرخ سفت‌شدگي تقريباً مشابهي در اين بررسي با وجود تفاوت در تئوري روش مورد استفاده با روش سان و همكارانش، حدود ۲/۷ برابر به‌دست آمد [۱۰،۱۱].

بيشتر روش‌هاي مكانيكي بر اعمال تحريك مكانيكي خارجي و اندازه‌گيري تغييرشكل سلول مطابق با خواص مكانيكي آنها تكيه دارند. روش‌هاي آزمايشگاهي زيادي براي بررسي كمي و كيفي مكانيك سلولي ارائه شده است كه يكي از روش‌هاي مستقيم كمي، روش مكش با ميكروپيپت[13] است. هدف از مطالعه حاضر، ايجاد يك مدل مكانيكي براي مكش سلول جنسي به داخل ميكروپيپت و بررسي خواص مكانيكي لايه زوناي تخمك قبل و بعد از لقاح است.

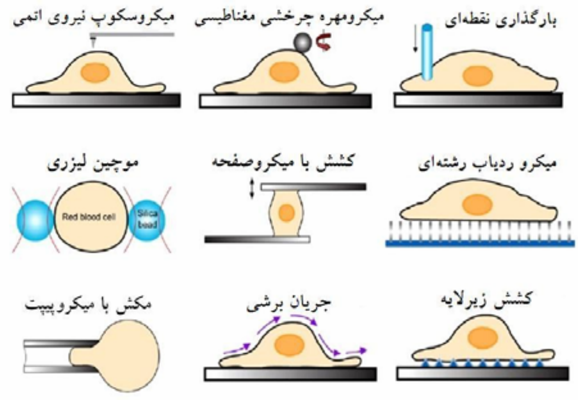
[1] Thermo viscoelasticity
[2] Thermodynamic
[3] Zona Pellucida
[4] **I**n **v**itro **F**ertilization
[5] **I**ntra**C**ytoplasmic **S**perm **I**njection
[6] Zona reaction
[7] Drobnis
[8] Sun
[9] Sensor
[10] Murayama
[11] Micro Sensor
[12] Elastisity
[13] Micropipette Aspiration

۲- روش‌هاي آزمايشگاهي بـراي بررسـي سـلول زنده

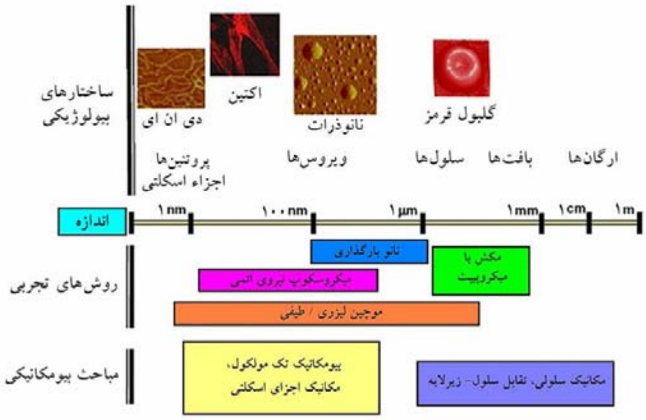
مطالعه بيومكانيكي سلول‌هاي زنده و مولكول‌هاي زيستي به دلايل مختلف حائز اهميت است. خواص بيومكانيكي سلول‌ها و مولكول‌هاي زيستي مي‌تواند به صورت بالقوه نشان‌دهندة ميزان كارايي آنها باشد كه اين امر مي‌تواند در تشخيص‌هاي باليني و حتي تعيين راهكارهاي مفيد براي معالجه و درمان بيماري‌ها مفيد باشد [۱۲، ۱۳]. در اصل مكانيك سلولي به دنبال بررسي ارتباط بين ساختار- خواص- عملكرد سلول‌هاي زنده و مولكول‌هاي زيستي براي فهم عملكرد فيزيولوژيكي آنها و همچنين برقراري ارتباط احتمالي آنها با بيماري‌هاست.

با پيشرفتهاي اخير در زمينة بيولوژي مولكولي و سلولي، بيوفيزيك و نانوتكنولوژي، تعداد زياد روش و تجهيزات جديد براي شناسايي خصوصيات مكانيكي و ساختاري موجودات بيولوژيكي در مقياس ميكرو تا ابعاد پيكو[۱۴] توسعه داده شده است. اين روش‌ها نه تنها به ما امكان انجام كاوش‌هاي مكانيكي مستقيم و بررسي سلول‌هاي واحد و مولكول‌هاي زيستي را مي‌دهند بلكه امكان انجام آزمايش‌ها در شرايط فيزيولوژيك داخل بدن را نيز فراهم مي‌سازند. به سبب وجود روش‌هاي متعدد، انتخاب مناسب روش و تجهيزات تجربي براي استفاده بستگي به نوع، اندازه و خواص مكانيكي ساختارهاي بيولوژيكي و اتفاقات بيومكانيكي و بيوفيزيكي مورد نظر دارد [۱۴، ۱۵]. بنابراين لازم است بتوانيم آزمون بيومكانيكي مناسبي را انجام داده و همچنين پاسخ‌هاي فيزيكي، بيولوژيكي و بيوشيميايي را كه در نمونه اتفاق مي‌افتد بررسي كنيم.

تنوعي از روش‌ها براي بررسي محيط مكانيكي سلول‌هاي زنده واحد و بيومولكول‌هاي واحد وجود دارد. شكل ۱، بعضي از روش‌هاي آزمايشگاهي كه براي انجام آزمايش‌هاي بيومكانيكي روي سلول واحد به‌كار مي‌رود را نشان مي‌دهد. در شكل۲ محدوده طولي روش هاي تجربي مختلف از جمله روش مكش با ميكروپيپت، روش موردنظر در اين بررسي را نشان مي‌دهد.



شكل ۱- روش‌هاي تجربي براي آزمون‌هاي مكانيكي در سلول واحد



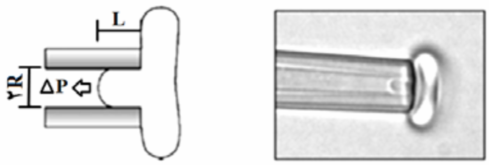
شكل ۲- محدوده كاربرد روش‌هاي تجربي براي آزمون‌هاي مكانيكي

۲-۱- روش مكش با ميكروپيپت

روش مكش با ميكروپيپت روشي ساده براي مشخص كردن خواص مكانيكي سلول‌هاي زنده است. در اين روش از يك فشار مكشي براي مكش تمام يا قسمتي از سلول واحد به داخل ميكروپيپت با قطر در حدود نصف قطر سلول استفاده شده است و از ويدئوي ميكروسكوپي براي ثبت تغييرات ظاهري سلول بهره گرفته مي‌شود. با مشاهده رفتار وارد شدن سلول بداخل ميكروپيپت و با اندازه‌گيري تغيير طول مكيده شده به داخل ميكروپيپت در اثر فشار مكشي مي‌توان خواص مكانيكي سلول را اندازه‌گيري كرد. در شكل ۳ چگونگي كشيدن يك گلبول قرمز به داخل ميكروپيپت به قطر ۱µm نشان داده شده است.

[۱۴] Pico

الف ب



شكل ۳- الف) تصويري از مكش يک گلبول قرمز خون؛ ب) طرحي از مشخصات روش مكش با ميكروپيپت

روش مكش ميكروپيپت منحصربه‌فرد است از اين جهت كه مي‌تواند به طور واضح رفتار يک سلول به صورت قطره سيال با تنش قشري ثابت را نشان دهد. براي بررسي اين رفتار موقعي كه سلول به داخل ميكروپيپت مكيده مي‌شود درست در لحظه‌اي كه $\frac{L_p}{R_p}=1$ مي‌شود، يعني نقطه‌اي كه سلول يک برآمدگي نيم‌كره‌اي در داخل ميكروپيپت پيدا مي‌كند، مي‌تـوان تنش قشري را به طور مستقيم از قانون لاپلاس[14] به دست آورد:

$$\Delta P = 2T_c\left(\frac{1}{R_p}-\frac{1}{R_c}\right) \quad \text{When}\left(\Delta P = \Delta P_c \quad \frac{L_p}{R_p}=1\right)$$

كه درآن T_C تنش قشري، R_C شعاع سلول بيرون پيپت و ΔP_C فشار بحراني است. به خاطر فشارهاي مكش كم نسبت به فشار اسمزي در محلول نمک ايزوتونيک[15]، سلول با حجم ثابت تغييرشكل خواهد داد [۱۶] .

افزايش بيشتر فشار مكش، بالاتر از مقدار بحراني باعث خواهد شد شعاع سلول بيرون پيپت كاهش يابد و در صورت كاهش فشار مكش، شعاع سلول بيرون پيپت افزايش يابد. ارضا كردن معادلة بالا براي يک سلول در حالت تعادل، غير ممكن خواهد بود، بنابراين اگر سلول نرم باشد به‌سرعت به داخل پيپت جاري خواهد شد اما وقتي سلولي كه به صورت جامد رفتار مي‌كند به داخل ميكروپيپت مكيده مي‌شود، وقتي كه طول مكش از مقدار شعاع پيپت زيادتر مي‌شود؛ سلول‌ها به طور كامل به داخل پيپت جاري نمي‌شوند و طول مكش به‌طور خطي با افزايش فشار مكش افزايش مي‌يابد، نتايج تجربي براي سلول‌هاي كندروسيت[16] و انـدوتليال[17] مبين اين وضعيت است [۱۷، ۱۸] .

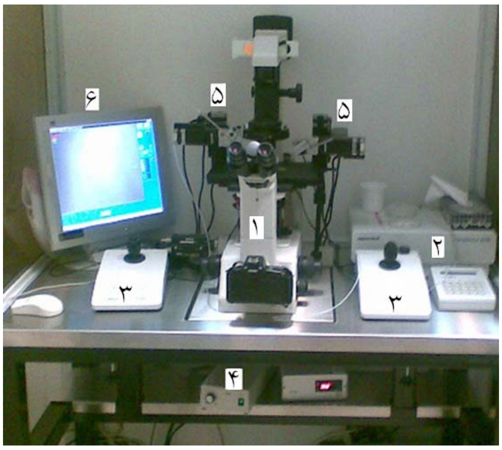
۳- مـحاسبـه ضـريب كشـساني لايــه زونــاي تخمك با روش مكش با ميكروپيپت

اساس كار روش هاي مورد استفاده براي اندازه‌گيري خواص مكانيكي نمونه‌هاي بيولوژيكي مانند سلول‌هاي زنده، بر اعمال نيرو يا تنش مشخص بر سطح نمونه و اندازه‌گيري ميزان تغييرشكل آن استوار است. در مقايسه با روش‌هاي ديگر، روش مكش با ميكروپيپت يك روش بسيار ساده براي تعيين خواص مكانيكي سلول‌هاي منفرد معلق و يا چسبنده از جمله ضريب كشساني (يا مدول يانگ[18]) و گرانروي[19] است. روش مكش با ميكروپيپت كه به وسيله ايونس و يونگ[20] در سال ۱۹۸۹ ارائه شد [۱۹، ۲۰] . تاكنون به طور گسترده‌اي به عنوان روش ميكرومنيپولاتور[21] مناسب براي تعيين ضريب كشساني سلول‌هاي مختلف استفاده شده است. در اين مطالعه از اين روش براي ارزيابي كشساني لايه زوناي سلول جنسي با سـاخـتار متفاوت از سلول‌هاي زنده‌اي كه تاكنون بررسي شده‌اند، استفاده مي‌شود.

۳-۱- تجهيزات سيستم مكش با ميكروپيپت

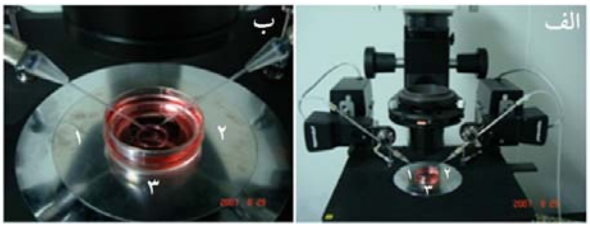
سيستم آزمايشگاهي مكش در شكل ۴ نشان داده شده است، اين سيستم شامل يک ميكروسكوپ معكوس[22]، يک ميكرومنيپولاتور با سه درجه آزادي[23] براي موقعيت‌دهي پيپت، يک ميكروسيستم توليد كننده مكش و تزريق[24] براي ايجاد فشار منفي قابل كنترل و يك كامپيوتر براي نمايش و ردیابی تصاوير جابجايي سلول روي صفحه نمايشگر و ثبت مقادير هندسي است. پـيپـت‌هاي شيشه‌اي مكش و تزريق در داخل پتري‌ديش[25] از دو طرف با دو نگه‌دارنده براي مهار و دسـتكاري سلول كنترل مي‌شوند (شكل ۵). ميكروپيـپـت‌هاي شيـشـه‌اي از نوع پـيـپت‌هاي بـروسيـلـيـكـات[26] با قطر بيروني ۱mm به وسيله يک دستگاه كشش[27] آماده مي‌شوند (شكل۶). همه اجزاي سيستم روي يك ميز ضد لرزه براي كمينه كردن ارتعاشات قرار مي‌گيرند.

[15] Isotonic
[16] Chondrocyte
[17] Endothelial
[18] Yang Module
[19] Viscosity
[20] Evans and Yeung
[21] Micro Manipulator
[22] Nikon, Eclipse, TE 300
[23] PatchMan 5173
[24] Micro injector: Transjector5246
[25] Petri dish
[26] GC 100T-10
[27] P-97, Sutter



شكل ۴- تصويري از تجهيزات سيستم مكش با ميكروپيپت

۱. ميكروسكوپ معكوس؛ ۲. سيستم مكش و تزريق؛
۳. ميكرومنيپولاتور براي كنترل كانال مكش و تزريق؛
۴. منبع تغذيه؛ ۵. نگه‌دارنده پيپت‌هاي مكش و تزريق؛
۶. صفحه نمايش كامپيوتر براي مشاهده و اخذ مقادير جابجايي



شكل ۵- الف) تصويري از تجهيزات سيستم تزريق؛ ب) پيپت تزريق و پيپت مكش از دو طرف در داخل ظرف نگه‌داري سلول

شكل ۶- الف) تصويري از دستگاه كشش ميكروپيپت؛ ب) اجزاي محفظه حرارت، ۱. نگهدارنده ۲. محفظه و المان حرارتي؛
ج) نگهداري پيپت حين حرارت‌دهي؛ د) تهيه و ساخت دو پيپت بعد از كشش

۳-۲- تحريك تخمك‌گذاري و گرفتن تخمك و جنين

موش‌هاي ماده ۶ تا ۸ هفته‌اي نژاد NMRI[۲۸] از مؤسسه پاستور تهيه شدند. با تزريق داخل صفاقي ۷/۵ واحد بين‌المللي هورمون PMSG[۲۹] و هورمون HCG[۳۰] با فاصله ۴۸ ساعت، تحريك تخمك‌گذاري انجام شد.

تعدادي از موشهاي ماده تحريك شده ۱۲ تا ۱۴ ساعت پس از تزريق HCG، براي خارج كردن تخمك به روش قطع نخاع گردني كشته شدند و لوله‌هاي رحمي آنها جدا شد و سپس به محيط كشت انتقال يافت. سپس ديواره لوله فالوپ[۳۱] هر يک در زير استريوميكروسكوپ[۳۲] به‌وسيله نوك سوزن ظريف پاره شد و تخمكها به روش فلاش[۳۳] از لوله خارج و به محلول T۶ حاوي ۱۰% آلبومين سرم گاوي[۳۴] (BSA) منتقل گرديدند.

براي به‌دست آوردن سلول‌هاي جنيني، بلافاصله بعد از تزريق HCG، تعدادي موش ماده نيز براي جفت‌گيري با موش نر جدا شدند و صبح روز بعد وجود پلاك واژني نشان دهنده روز اول بارداري بود. ۴۴ تا ۴۸ ساعت پس از تزريق HCG موشهاي باردار به روش قطع نخاع گردني كشته شدند و جنين‌هاي دوسلولي موش به روش مشابه با خارج كردن تخمك، موش از لوله‌هاي رحمي خارج شدند. تخمك‌ها و جنين‌هايي كه از لحاظ ظاهر، نرمال تشخيص داده شدند در محلول اول محيط كشت به همراه ۱۰% آلبومين سرم انساني نوتركيب[۳۵] (RHA) قرار داده شدند.

۳-۳- مدل مكانيكي و اندازه‌گيري ضريب كشساني

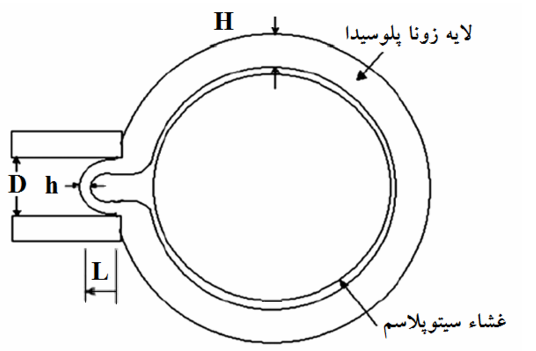
براي بررسي خصوصيات ويسكوالاستيك[۳۶] سلول‌ها با توجه به پاسخ تجربي آنها به فشار بحراني، فشاري كه در آن طول تورفتگي سلول داخل ميكروپيپت با شعاع ميكروپيپت يكسان مي‌شود ($L_p/R_p=1$)، از مدل‌هاي پيوسته مناسب استفاده مي‌شود. براي سلول‌هاي سيال‌مانند كه فشار مكش بيشتر از فشار بحراني باعث حركت كامل سلول به داخل پيپت

[28] Institute Research Medical National
[29] Pregnant Mare's Serum Gonadotropin
[30] Human Corionic Gonadotropin
[31] Falope
[32] Stereomicroscope
[33] Flash Method
[34] Bovine Serum Albumin
[35] Recombinant Human Albumin; Vitrolife, Sweden
[36] Viscoelastic

مي‌شود، از مدل پيوسته غشاء كشسان محتوي سيال و براي سلول‌هاي جامدمانند كه افزايش فشار بيشتر از فشار بحراني باعث حركت به طول مشخصي در داخل ميكروپيپت مي‌شود از مدل پيوسته جامد الاستيك همگن استفاده مي‌شود [۲۱]. با وجود اين استفاده از مدلهاي متداول براي تعيين خواص مكانيكي سلول جنسي بخاطر ساختار لايه‌اي آن امكان‌پذير نيست و تخمين سفتي نمونه را دچار خطا مي‌كند.

هدف مطالعه حاضر، ارائه و بررسي مدل مكانيكي مناسب براي چنين ساختارهاي لايه‌اي است. رفتار مكانيكي لايه زونا شبيه جامد كشسان است و مي‌تواند به صورت پوسته كشسان همسانگرد در نظر گرفته شود.

ضخامت لايه زونا پلوسيداي تخمك موش حدود ۱۰ μm است. با اينكه اندازه سلول‌ها متفاوت است اما هر سلول كروي‌شكل بوده و ضخامت زوناي آن تا حدودي ثابت است. در اين مطالعه با توجه به ساختار خاص سلول جنسي از مدل پوسته كروي كشسان حاوي سيال غيرقابل تراكم براي محاسبه ضريب كشساني لايه زوناي آن استفاده مي‌شود (شكل ۷). فرض مي‌شود ضخامت پوسته سلول كم است و در نتيجه مي توان از تئوري جداره نازك، پوسته سلول را با صفحه مياني پوسته جايگزين كرد و از مقاومت خمشي آن صرفنظر كرد. با در نظر گرفتن $\alpha = \frac{H}{h} - 1$ به عنوان افزايش سطح مياني لايه زونا و k ضريب تراكم‌پذيري سطح مياني، در نتيجه تنش صفحه مياني زونا $T = k\alpha$ مي‌شود.



شكل ۷- تغييرات هندسي لايه زوناي تخمك حين مكش به درون ميكروپيپت. H: ضخامت اوليه لايه زونا پلوسيدا بيرون پيپت؛ h: ضخامت لايه زونا پلوسيدا در داخل پيپت؛ D: قطر داخلي پيپت

با درنظر گرفتن مدل پوسته كروي كشسان حاوي سيال غيرقابل تراكم براي محاسبه اختلاف فشار با استفاده از رابطه لاپلاس داريم:

$$\Delta P = \frac{2k\alpha}{r} \qquad (۱)$$

با بازنويسي معادله بالا داريم:

$$\frac{4k(H-h)}{h(D-h)} = \Delta P \qquad (۲)$$

رابطه k ضريب تراكم‌پذيري سطح مياني و E مدول كشساني آن از روابط فيزيكي زير استخراج مي‌شود:

$$\begin{aligned} \varepsilon_x &= \frac{1}{E}[\sigma_x - \nu(\sigma_y + \sigma_z)] \\ \varepsilon_y &= \frac{1}{E}[\sigma_y - \nu(\sigma_z + \sigma_x)] \\ \varepsilon_z &= \frac{1}{E}[\sigma_z - \nu(\sigma_x + \sigma_y)] \end{aligned} \qquad (۳)$$

در اين معادلات ν=۰/۵ و محور Z در جهت شعاعي لايه زونا در نظر گرفته مي‌شوند. شرايط مرزي:

$$\sigma_z = 0, \varepsilon_x = \varepsilon_y, \sigma_x = \sigma_y. \qquad (۴)$$

بنابراين كرنش محوري از رابطه ۵ به‌دست مي‌آيد:

$$\alpha = \frac{1}{E}(1-\nu)\sigma_x = \frac{\sigma_x}{2E} \qquad (۵)$$

با جايگذاري در معادله تغيير مساحت سطح:

$$\alpha = \varepsilon_x + \varepsilon_y + \varepsilon_x\varepsilon_y = \frac{\sigma_x}{E} + \frac{\sigma_x^2}{4E^2} \qquad (۶)$$

تنش محوري به‌دست مي‌آيد:

$$\sigma_x = 2E(\sqrt{1+\alpha} - 1) = 2E(\sqrt{\frac{H}{h}} - 1) \qquad (۷)$$

تنش كششي در صفحه مياني زونا:

$$F = h\sigma_x = k\alpha \qquad (۸)$$

ضريب تراكم‌پذيري صفحه مياني زونا:

$$k = \frac{2hE(\sqrt{Hh} - h)}{H - h} \qquad (۹)$$

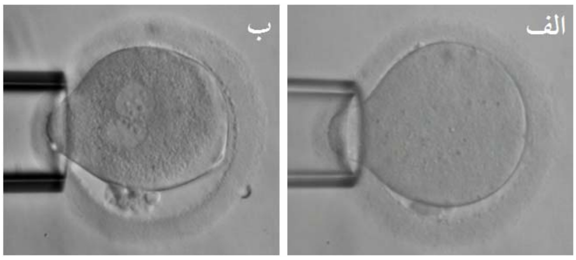
با جايگذاري رابطه ضريب تراكم‌پذيري در معادله اختلاف فشار ΔP، رابطه ضريب كشساني به صورت زير به دست مي‌آيد:

$$E = \frac{(D-h)\Delta P}{8(\sqrt{Hh} - h)} \qquad (۱۰)$$

۴- نتايج تجربي

در مطالعه حاضر با ميكروپيپت‌هايي با قطر ۳۰-۴۰µm حدود ۳ برابر ضخامت لايه زونا، (Dp=۳H)، به وسيله ميكرومنيپولاتور كه حركت پيپت را كنترل مي‌كند به هر تخمك و جنين مستقر در داخل ظرف شيشه‌اي، نزديك شده و مهار مي‌شوند (شكل ۸).

با قرار گرفتن سلول در دهانه پيپت، ديواره سلول براي رسيدن به حالت نيمكره در داخل پيپت و كاهش ضخامت لايه زونا داخل پيپت حدود يك‌سوم ضخامت اوليه، $(h=\frac{H}{3})$، مكش انجام مي‌شود. مقدار فشار مكشي اعمالي، ضخامت و جابجايي متناسب ثبت مي‌شوند (جدول ۱).



شكل ۸- الف) مكش تخمك بالغ قبل از لقاح؛
ب) مكش جنين ۲ هسته‌اي روز بعد از لقاح

جدول ۱- نمونه جدول مقادير آزمايشگاهي براي ۵ تخمك موش و جنين مربوطه بعد از ۲۴ساعت

نمونه		D_{cell} (µm)	H (µm)	D_p (µm)	ΔP (KPa)	h (µm)	L (µm)	α (%)	E (KPa)
تخمك (MII)	۱	۸۶/۸	۷/۴۷	۳۴/۷	۱/۴	۳/۳۵	۳۸/۴	۱۲۲/۹	۳/۲۴
	۲	۹۴/۸	۷/۶۷	۳۴/۷	۱/۴	۲/۱	۳۷/۵	۲۶۵/۲	۲/۹۱
	۳	۹۶/۹	۷/۱۵	۳۴/۷	۱/۴	۳/۲۶	۳۲/۳	۱۱۰/۳	۳/۵۱
	۴	۱۰۰/۳	۷/۲۲	۳۴/۷	۱/۴	۳/۲	۳۵/۴	۱۲۵/۶	۳/۴۳
	۵	۱۰۲/۷	۷/۳۹	۳۴/۷	۱/۴	۳/۱	۳۱/۳	۱۳۸/۷	۳/۲۷
جنين (PN)	۱	۹۶/۵	۷/۶۱	۳۸/۴	۳	۲/۷۴	۱۹/۸۷	۱۸۱/۸	۶/۷۴
	۲	۱۰۴/۸	۸/۰۴	۳۸/۴	۳	۲/۶۵	۱۷/۹۹	۱۹۱/۹	۶/۸۵
	۳	۹۷/۹	۶/۶۶	۳۸/۴	۳	۲/۸۱	۲۰/۴۳	۱۴۳/۰۶	۸/۶۳
	۴	۹۲/۴	۷/۹۲	۳۸/۴	۳	۳/۰۵	۲۲/۵۶	۱۶۳/۳	۷/۰۲
	۵	۸۸/۶	۷/۵۵	۳۸/۴	۳	۲/۱۳	۲۱/۳۴	۲۵۴/۴	۷/۱۵

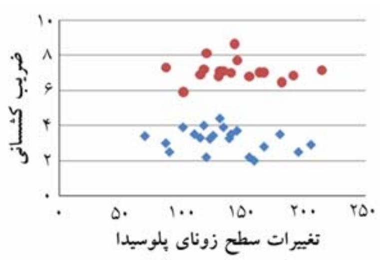
۵- بحث و نتيجه‌گيري

تغيير كشساني ديواره تخمك پستانداران بحث بي‌نظيري را در شناسايي فرايند لقاح به وجود آورده است. در مطالعه حاضر به منظور تعيين سفتي مكانيكي لايه زوناي تخمك موش قبل و بعد از لقاح با روش مكش با ميكروپيپت، تغييرات هندسي حين اعمال فشار به منظور محاسبه مدول با رابطه تحليلي ارائه شده محاسبه شد. مدول كشساني براي قبل و بعد از لقاح به‌ترتيب مقادير (n=۲۲) ۱/۹۷ ± ۱۶/۳ و (n=۱۸) ۲/۳۴ ± ۷/۲۷ به‌دست آمد. با توجه به نتايج حاصل افزايش ضريب بـه‌اندازه ۲/۳ برابر، هـم مرتـبه با گزارش‌هاي قبلي، تأييد كننده فرايند سفت شدن زونا بعد از لقاح است(جـدول۲).

در شكل۹ به صورت مقايسه‌اي ميزان افزايش سطح و افزايش مدول در مطالعات انجام شده، نشان داده شده است.

جدول ۲- مقدار مدول كشساني ثبت شده با روش هاي مختلف

نمونه	روش	داده	افزايش ضريب	مرجع
تخمك	ابزار مكش مويرگي	$L_p/\Delta P$=۴/۱	۱/۸	دروبنس و همكاران (۱۹۹۸)
جنين		$L_p/\Delta P$=۲/۳		
تخمك	ميكروسيستم مكش و تزريق	E=۱۷/۹ kPa	۲/۴	سان و همكاران (۲۰۰۳)
جنين		E=۴۲/۲ kPa		
تخمك	حسگر لمسي ميكروسكوپي(MTS)	E=۷/۱ kPa	۳/۱	ميورايياما و همكاران (۲۰۰۶)
جنين		E=۲۲/۳ kPa		
تخمك	حسگر لمسي ميكروسكوپي (MTS)	E=۸/۲۶ kPa	۲/۷	ميورايياما و همكاران (۲۰۰۷)
جنين		E=۲۲/۳ kPa		
تخمك	مكش با ميكروپيپت	E=۳/۱۶ kPa	۲/۳	مطالعه حاضر
جنين		E=۷/۲۷ kPa		



شكل ۹- نمودار نقطه‌اي ضريب نسبت به تغييرات سطح زونا

سپاسگزاري

اين مطالعه بر مبناي قرارداد شماره ۸۷/۳۷٤۰۱پ منعقد شده با پژوهشكده رويان اجرا شده است؛ بنابراين از همكاري مسئولان پژوهشي و تكنسين‌هاي آزمايشگاه جنين‌شناسي پژوهشكده رويان در انجام مراحل مختلف اين پژوهش، تشكر و قدرداني مي‌شود.

مراجع

[1] Kania G., The structure properties and function of the zona pellucida of mammalian ovums; Medycyna Weterynaryjna 1999; vol. 55; 5:295–299.

[2] Schroeder A.C., Schultz R.M., Kopf G.S., Taylor F.R., Becker R.B., and Eppig J.J., Fetuin inhibits zona pellucida hardening and conversion of Zp2 to Zp2f during spontaneous mouse oocyte maturation in vitro in the absence of serum, Biol. Reproduction 1990; vol. 43, 5:891–897.

[3] Demeestere I., Barlow P., and Leroy F., Hardening of zona pellucida of mouse oocytes and embryos in vivo and in vitro, Int. J. Fertil. Womens Med. 1997; vol. 42, 3:219–222.

[4] Braden A.W., Austin C.R., The reaction of the zona pellucida to sperm penetration, Australian J. Biol. Sci. 1954; 7:391-409.

[5] Hatanaka Y. Nagagai T., Tobita T., Changes in the properties and composition of zona pellucida of pigs during fertilization in vitro, J. Reprod Fertil 1992; 95:431-40.

[6] Iwamoto K., Ikeda K., Yonezawa N., Disulfide formation in bovine zona pellucida glycoproteins during fertilization, J. Reprod Fertil 1999; 117:395-402.

[7] Schmell E.D., Gulyas B.J., Egg surface changes during fertilization, J.F. Hartmann, New York 1983; 356-413.

[8] Drobnis E.Z., Andrew J.B., Katz D.F., Biophysical properties of the zona pellucida measured by capillary suction: Is zona hardening a mechanical phenomenon?, J. Exp. Zool 1988; 245:206-19.

[9] Sun Y., Wan K. T., Roberts K. P., Bishof C., Mechanical Property Characterization of Mouse Zona Pellucida, IEEE Transactions on Nanobioscience 2003; 2:279-286.

[10] Murayama Y., Constantinio C.E., Omata S., Fabrication of micro tactile sensore for measurement of micro-scale elasticity, Sens Actuators 2004; 109:202-7.

[11] Murayama Y., Constantinio C.E., Omata S., Mechanical property Characterization of mouse zona pellucida, IEEE UFFC 2005; 52:434-8.

[12] Lim, C.T. Single cell mechanics study of the human disease malaria, J. Biomech. Sci. & Engrg. 2006; 1:82–92.

[13] Suresh, S., et al., Connections between single-cell biomechanics and human disease states: gastrointestinal cancer and malaria, Acta Biomater 2005; 1:15–30.

[14] Van Vliet K.J., Bao G., Suresh S., The biomechanics toolbox:experimental approaches to living cells and biomolecules, Acta Mater 2003; 51:5881–905.

[15] Lim, C.T., et al., Experimental techniques for single cell and single molecule biomechanics, Mat. Sci. Eng. 2006; 26: 1278–1288.

[16] Hochmuth, R.M., Micropipette aspiration of living cells, J. Biomech. 2000; 33:15–22.

[17] Sato, M., Levesque, M.J., Nerem, R.M., Micropipette aspiration of cultured bovine aortic endothelial cells exposed to shear stress, Arteriosclerosis 1987; 7:276-286.

[18] Jones, W.R., Ting-Beall, H.P., Lee, G.M, Kelley, S.S., Hochmuth, R. M., Guilak, F.,. Alterations in the Young's modules and volumetric properties of chondrocytes isolate from normal and osteoarthritic human cartilage, J. Biomech. 1999; 32:119–127.

[19] Evans, E.A., New membrane concept applied to the analysis of fluid shear and micropipette-deformed red blood cells, Biophysical Journal 1973; 13:941-954.

[20] Evans, E., Ritchie, K., Merkel, R., Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces., Biophysical Journal 1995; 68:2580-2587.

[21] Lim, C.T., et al., Mechanical models for living cells - a review, J. Biomech. 2006; 39:195–216.