لیزر در پزشکی ۱۴۰۰/ دوره ۱۸ / شماره (۴) / صفحات ۵۵-۴۸.

مقاله مروری

ارزیابی کیفیت تخمک با استفاده از میکروسکوپ طیف‌سنج رامان

محمدحسن ناطق احمدی[۱]
امین صفایی[۲]
مجتبی کافی[۳*]
مهدی آذری[۴]
حمید نادگران[۵]

۱. دانشجوی دکتری فناوری‌های تولیدمثل در دامپزشکی، بخش تولیدمثل، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز
۲. دانشجوی دکتری فیزیک اپتیک و لیزر، بخش فیزیک، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز
۳. استاد بخش تولید مثل، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز
۴. استادیار بخش تولیدمثل، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز
۵. استاد بخش فیزیک، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز

نویسنده مسئول: مجتبی کافی

پست الکترونیک:
kafi@shirazu.ac.ir

شماره تماس: ۳۶۱۳۸۹۰۳-۰۷۱

چکیده

طی سال‌های گذشته، محققین علوم زیستی، پزشکی و دامپزشکی تمایل زیادی به استفاده از روش‌های غیرتهاجمی و غیرمخرب برای ارزیابی تخمک پیدا کرده‌اند. از میان روش‌های ارزیابی کیفیت تخمک، فناوری طیف‌سنجی رامان، افق‌های امیدوارکننده‌ای را برای رسیدن به این نیاز روزافزون به وجود آورده است. این فناوری با استفاده از اثر رامان، پس از تابانیدن اشعه لیزر به تخمک و جمع‌آوری بازتابش آن از ترکیب بیوشیمیایی و تغییرات اجزای سلولی تخمک، اطلاعات بسیار ارزشمند و منحصربه‌فردی را در مورد کیفیت تخمک در اختیار قرار می‌دهد. با استفاده از این فناوری، ارزیابی کیفی براساس تحلیل داده‌های کمی در اختیار جنین‌شناس قرار می‌گیرد. فناوری طیف‌سنجی رامان، به خوبی می‌تواند با استفاده از تجزیه و تحلیل قوی آماری با دقت بالایی به ارزیابی تفاوت‌های بیوشیمیایی تخمک‌ها با کیفیت متفاوت و یا در مراحل مختلف رشد بپردازد. در این میان چالش‌هایی از قبیل نوپابودن استفاده از این فناوری در ارزیابی کیفیت تخمک و روشن‌نبودن تمامی زوایای آن، از جمله اثرات پی‌آیند اشعه لیزر تابیده شده به سلول، وجود دارد. از طرفی افق‌های پیش‌رو در زمینه ارزیابی کیفیت تخمک با این روش، امیدوارکننده است. در نوشتار پیش‌رو، تلاش داریم که ضمن ارایه مبانی بیوفیزیکی فناوری طیف‌سنجی رامان به معرفی و کاربرد این فناوری در ارزیابی کیفیت تخمک گاو بپردازیم.

واژه‌های کلیدی: تخمک، طیف‌سنجی، اثر رامان، فناوری تولیدمثل، روش‌های غیرمخرب.

[Downloaded from icml.ir on 2026-11-03]

۱- مقـدمه

روشن است که کیفیت تخمک، یکی از عوامل کلیدی در رشد جنین از طریق ایجاد، فعال‌سازی و کنترل ژنوم جنینی و همچنین پشتیبانی از فرآیندهای اساسی مانند هموستازی سلولی، سوخت‌وساز و پیشرفت چرخه سلولی دراوایل دوره جنینی پس از لقاح است (۱و۲). شایستگی زیستی تخمک، از ملزومات لقاح موفق، تبدیل زیگوت به بلاستوسیست و پس از آن لانه‌گزینی در رحم است. نرخ تولید بلاستوسیست در آزمایشگاه پایین‌تر از شرایط طبیعی داخل رحمی است (۳). افزون بر این، ارزیابی کیفیت تخمک موضوع مهمی است که سبب افزایش دانش ما در فیزیو - پاتولوژی تخمک می‌گردد. شناسایی شاخص‌های پیش‌بینی‌کننده کیفیت تخمک، یکی از موضوعات اصلی مورد نیاز جنین‌شناسی کاربردی برای بهبود عملکرد فناوری‌های کمکی تولیدمثل چه در پزشکی و چه در دامپزشکی هستند (۱). امروزه، با مشاهده ویژگی‌های ریخت‌شناسی به ارزیابی کیفیت تخمک می‌پردازند. انتخاب تخمک مناسب، بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی شامل تخمین تعداد و فشردگی لایه‌های کومولوس دور تخمک، شفافیت و یکنواختی اووپلاسم، وجود و یکپارچگی گویچه قطبی در زیر میکروسکوپ استریو انجام می‌گیرد (۲۳، ٤). با این وجود، ارزیابی تخمک براساس ریخت‌شناسی می‌تواند تا حد زیادی سلیقه‌ای باشد و گاهی اوقات بازتاب‌دهنده قابلیت رشد حقیقی تخمک نیست (۱). همچنین از روش‌های رنگ‌آمیزی بی‌خطر تخمک‌ها مانند کرسیل بلو درخشان نیز برای ارزیابی تخمک‌ها استفاده شده است. اثر احتمالی مخرب رنگ‌آمیزی در آینده رشد جنین عاملی برای کم‌بهره‌گرفتن از روش‌های رنگ‌آمیزی است. بنابراین برای ارزیابی و بیان روشن‌تر تغییرات تخمک‌ها و همچنین برای ایجاد شاخص‌های مطمئن‌تر، به روش‌های جدیدتری در ارزیابی تخمک پستانداران نیاز است (۵). در میان این روش‌ها، طیف‌سنجی رامان از طریق تابانیدن اشعه لیزر به تخمک راه امیدوارکننده‌ای را برای ارزیابی غیرمخرب سلول‌ها ایجاد کرده است. در این روش، با استفاده از اثر رامان، پس از تابانیدن اشعه لیزر به تخمک و جمع‌آوری بازتابش آن از ترکیب بیوشیمیایی و اجزای سلولی تخمک، اطلاعات بسیار ارزشمندی در مورد خصوصیات منحصربه‌فرد هر تخمک به دست می‌آید. در این نوشتار، ابتدا به بیان مختصر روش‌های موجود برای ارزیابی کیفیت تخمک می‌پردازیم. سپس به ارایه مبانی بیوفیزیکی فناوری طیف‌سنجی رامان و در انتها به نحوه ارزیابی کیفیت تخمک با استفاده از این فناوری می‌پردازیم.

۲- روش‌های ارزیابی کیفیت تخمک

به‌طورکلی برای ارزیابی روند رشد و ارزیابی کیفیت تخمک، از روش‌های مستقیم و غیرمستقیم استفاده می‌شود. در روش‌های مستقیم اقدام به مشاهده تخمک و ارزیابی ساختارهای میکروسکوپی آن می‌شود. درحالی‌که در روش‌های غیرمستقیم، ارزیابی کیفیت تخمک‌ها عموما براساس بررسی اثر آنها روی محیط کشت پیرامونی انجام می‌گیرد. برای ارزیابی کیفیت تخمک‌های زنده باید از روش‌هایی که دارای حساسیت لازم، تکرارپذیر و غیرتهاجمی باشند، استفاده کرد (٦).

برخی روش‌های مستقیم شامل میکروسکوپ استریوی معمولی، میکروسکوپ اینورت، میکروسکوپ قطبیده، میکروسکوپ نسل هارمونیک، میکروسکوپ‌های الکترونی، کانفوکال و فلورسانس هستند. پراستفاده‌ترین روش مستقیم که توسط جنین‌شناسان استفاده می‌شود میکروسکوپ استریوی معمولی و یا گاهی میکروسکوپ اینورت است که می‌توانند سریع، غیرمخرب و با دقت قابل قبول، ولی درعین‌حال سلیقه‌ای، ساختارهای تخمک را نمایان سازند (٢٤). همچنین، سیستم‌های جدید تصویربرداری غیرتهاجمی و غیرمخرب که بتوانند امکان بررسی ساختارهای درون‌سلولی تخمک را به صورت زنده فراهم آورند، نیز ابداع شده‌اند. میکروسکوپ‌های قطبیده به ابزاری تشخیصی برای ارزیابی پویایی ساختار اسپیندل‌ها و زوناپلوسیدا تبدیل شده‌است. میکروسکوپ‌های نسل هارمونیک برای شناسایی و ارزیابی ساختارهای مختلف تخمک شامل دوک‌های اسپیندل، زوناپلوسیدا، گویچه‌های قطبی، غشاهای سلولی و اندامک‌ها به‌کار گرفته شده‌اند.

روش‌های غیرمستقیم شامل روش متابولومیک یا پروفایل‌کردن

[Downloaded from icml.ir on 2026-11-03]

متابولیت‌ها است که با استفاده از نمونه‌گیری از محیط کشت پیرامونی تخمک‌ها می‌توانند به بررسی کیفیت و اندازه‌گیری برخی ترکیب‌های شیمیایی موثر در رشد تخمک بپردازند. ارزیابی‌های متابولومیک بر زنده‌مانی تخمک تأثیر منفی ندارد (۷). روش‌های غیرمستقیم، امکان بررسی چگونگی پخش اندامک‌های سیتوپلاسمی یا اجزای هسته‌ای و همچنین نظارت بر فرآیندهای بیوشیمیایی سلول را فراهم نمی‌کنند.

روش‌هایی که امکان ارزیابی آنتی‌ژن‌ها یا محل قرارگرفتن پروتئین‌ها را با استفاده از اتصال آنتی‌بادی‌های اختصاصی فراهم می‌کنند و یا از روش‌های ایمونوهیستوشیمی، بیان ژن و پروفایل‌کردن پروتئین استفاده می‌کنند، برای تخمک مخرب هستند و در حالت زنده بودن تخمک به‌صورت هم‌زمان نمی‌توان از آنها استفاده کرد. از جمله این روش‌ها می‌توان انواع میکروسکوپ‌های الکترونی، کانفوکال و فلورسانس و همچنین برخی فناوری‌های اومیک (پروتئومیک، ترانسکریپتومیک) را نام برد. بااین‌حال، این روش‌ها نیاز به دست‌کاری و پردازش شدید تخمک (تثبیت سلولی، پروتکل‌های برچسب‌گذاری تهاجمی و رنگ‌آمیزی) دارند که منجر به تخریب آن می‌شوند (۸). بنابراین ابداع و به کارگیری روش‌های بی‌خطر جدید با حداقل تهاجم و همچنین پربهره از نظر تولید یافته‌های علمی، برای ارزیابی تخمک مورد نیاز بوده است (۹). روش‌های طیف‌سنجی نوری مدرن می‌توانند گزینه ایده‌آلی برای ارزیابی تخمک زنده به شمار آیند. فناوری‌های پیشرفته لیزر، مانند طیف‌سنجی رامان و زیرمجموعه‌های آن شامل طیف‌سنجی و میکروسکوپی فلورسانس، انتقال انرژی رزونانس فلورسانس و طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه، امکان مطالعه ساختارهایی مانند اندامک‌ها، فرآیندهای بیوشیمیایی ساختاری و مولکولی درون تخمک‌های زنده را بدون ایجاد تخریب و مداخله در سلامت آنها فراهم می‌آورند (۹).

۳- مبانی بیوفیزیکی طیف‌سنجی رامان

امروزه روش‌های آزمایشگاهی مختلفی به‌منظور تعیین ویژگی‌های مواد و همچنین تشخیص فازهای شیمیایی آنها ابداع شده‌اند که در مطالعه بافت‌های زیستی، دارای اهمیت زیادی هستند. از انواع این روش‌ها می‌توان به طیف‌سنجی پرتو ایکس، میکروسکوپ نیروی اتمی، طیف‌سنجی تشدید مغناطیسی هسته‌ای، میکروسکوپ الکترونی روبشی، میکروسکوپ الکترونی عبوری، طیف‌سنجی مادون قرمز و طیف‌سنجی رامان کانفوکال اشاره نمود (۱۰ و ۲۱). در این بین، فناوری طیف‌سنجی رامان به دلیل دارابودن درون‌مایه غیرمخرب و غیرتهاجمی، بسیار بیشتر از سایر روش‌ها در مطالعات مربوط به آنالیز سلولی مورد توجه قرار گرفته است. به‌طوری‌که از این فناوری اغلب برای ویژه‌گی‌یابی فازهای شیمیایی مواد به‌ویژه نمونه‌ها و بافت‌های زیستی و رصد تغییرات فیزیکی وشیمیایی آنها استفاده می‌شود (۱۱).

از توصیف طیف‌سنجی رامان که اولین بار با استفاده از اثرات ارتعاشی این روش بر روی مایعات با منشأ آلی انجام شد، بیش از ۹۰ سال می‌گذرد. در سال ۱۹۳۰ میلادی، رامان هندی مفتخر به کسب جایزه نوبل برای این کشف مهم شد (۱). در روش طیف‌سنجی رامان از یک لیزر به عنوان منبع نور بهره گرفته شده و با به‌کارگیری تجهیزات و عناصر نوری مناسب، نور لیزر بر روی ناحیه مشخصی از نمونه، کانونی شده و درنهایت، فوتون‌های پراکنده شده از نمونه مورد مطالعه قرار می‌گیرند. در واقع، فوتون‌های پراکنده‌شده از نمونه که دارای انرژی بیشتر و یا کمتر از انرژی فوتون‌های فرودی هستند، حاوی اطلاعات طیفی در زمینه ترازهای انرژی ارتعاشی مواد موجود در ناحیه مورد بررسی می‌باشند (۲۲). به‌طوری‌که هر نوع ماده دارای سیگنال طیفی مشخص، منحصربه‌فرد و متفاوت از سایر مواد است. عموما در نمونه‌های بیولوژیکی، اطلاعات مربوط به ترازهای انرژی ارتعاشی مواد در ناحیه رامان شیفت $٤٠٠\mathrm{cm}^{-1}$ تا $١٨٠٠\mathrm{cm}^{-1}$ قرار دارند (۱۲). با توسعه فناوری طیف‌سنجی رامان و هماهنگ‌کردن این روش با میکروسکوپ‌های نوری کانفوکال، ثبت تصاویر دوبعدی و سه‌بعدی برمبنای طیف رامان جمع‌آوری‌شده از نقاط مختلف نمونه، قابلیت مطالعه توزیع مواد با خصوصیات طیفی متفاوت، درون‌مایه نمونه تحت بررسی را امکان‌پذیر کرده است.

در تصویربرداری رامان که یک روش تصویربرداری اپتیکی

[Downloaded from icml.ir on 2026-11-03]

غیرخطی محسوب می‌شود، امکان تجزیه و تحلیل سلولی فراهم شده است، به طوری که بدون نیاز به برچسب‌گذاری و یا رنگ‌کردن می‌توان به صورت کاملا غیرمخرب و غیرتهاجمی، تصاویر مناسبی از سلول و ریزساختارهای آن را ثبت نمود. این تصاویر صرفاً براساس تفاوت طیف مواد موجود در سلول حاصل می‌شود. در بیشتر موارد می‌توان توزیع یک‌گونه مولکولی موجود در سلول را به‌صورت مستقیم مشاهده نمود. باید توجه شود که این امکان زمانی فراهم می‌گردد که مولکول هدف، دارای سیگنال‌های رامان مشخصی باشد که ازلحاظ طیفی با محیط کلی پروتئین / لیپید درون سلول هم‌پوشانی قابل توجهی نداشته باشد (۱۳). البته لازم به ذکر است که از طریق به کار بردن فناوری‌های تقویت سیگنال رامان نظیر SERS، این امکان نیز فراهم شده است که توزیع یک گونه مولکولی درون سلول، حتی در مواردی که تفاوت‌های بسیار جزئی در نواحی هم‌پوشانی طیف‌ها وجود داشته باشد نیز قابل آشکارسازی باشد. همچنین تصویربرداری رامان این امکان را فراهم می‌کند که بتوان تغییرات‌فیزیکی و شیمیایی که درون سلول اتفاق می‌افتد را دنبال کرد. در واقع با بهره‌گیری از فناوری تصویربرداری رامان می‌توان موادی که طی سوخت‌وساز سلولی به محیط سلول اضافه و یا از آن کاسته می‌شوند و همچنین متفاوت از اجزای اصلی سلول می‌باشند را شناسایی و رصد نمود (۱٤). امروزه استفاده از میکروسکوپ طیف‌سنج رامان (RMS) در علوم پزشکی و دامپزشکی به‌عنوان ابزاری قدرتمند و غیرتهاجمی برای بررسی سلول‌ها و بافت‌ها به حساب می‌آید. با استفاده از این روش، شناسایی و کمیت‌سنجی همزمان مولکول‌های داخل سلولی (پروتئین‌ها، چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای نوکلئیک) و کنترل تغییرات آنها طی فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک در سلول‌های تثبیت‌شده و زنده بدون نیاز به برچسب‌گذاری خارجی یا رنگ‌آمیزی آسان می‌شود (۱۳).

۴- بررسی معماری ماکرومولکولی تخمک

رشد و بلوغ تخمک به‌منظور کسب شایستگی زیستی برای لقاح و تولید جنین، شامل تغییرات پیچیده مولکولی و ریخت‌شناسی در اجزای هسته، اندامک‌ها، سیتوپلاسم تخمک و همچنین سلول‌های سوماتیک اطراف آن است. تصویربرداری RMS، توانایی بررسی تغییرات ایجادشده در محتوا و توزیع اجزای مولکولی تخمک با دقت بالا طی فرآیند رشد و مراحل مختلف بلوغ را به ما می‌دهد. بدین‌منظور، نقشه‌های تک متغیره طیف‌سنجی رامان، برای تعیین محتوا و عملکرد بسیاری از اجزای سلولی از جمله نواحی حاوی پروتئین بالا در باند ۱۰۰۲cm-1، تجمع چربی در باند cm-۱٤۳۷۱ و فعالیت میتوکندریایی در باند ۱٦۰۲ cm-1 نمایش داده می‌شود که تفاوت در نحوه توزیع این ماکرومولکول‌های زیستی در تخمک بالغ و نابالغ را به خوبی قابل تفسیر می‌کند (۱).

۵- شناخت بیومارکرهای تعیین‌کننده کیفیت تخمک

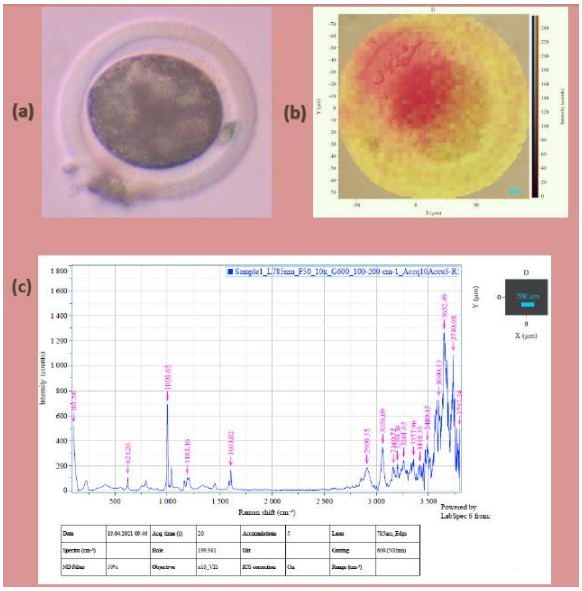
شایستگی تخمک برای لقاح و در ادامه آن، رسیدن به مرحله بلاستوسیست می‌تواند تحت تأثیر عواملی مانند سن‌دهنده تخمک، وضعیت تغذیه‌ای، شرایط کشت آزمایشگاهی و رژیم‌های هورمونی قرار گیرد. تخمک‌هایی که در داخل بدن رشد و تکوین می‌یابند به نسبت سلول‌های رشدیافته در شرایط کشت آزمایشگاهی، شایستگی بالاتری برای رسیدن به مرحله بلاستوسیست از خود نشان می‌دهند. مطالعات مختلفی که با استفاده از RMS انجام شده است نشان می‌دهد که طیف‌سنجی رامان، امکان تجزیه و تحلیل اثر عوامل مختلف را بر شناسایی مولکول‌های کلیدی مؤثر بر رشد تخمک فراهم می‌کند (۱۵). از اثر انگشت RMS، بر پایه گروه‌های مختلف مولکولی و به کمک آنالیزهای آماری PCA و CVA، یک پروفایل طیفی ایجاد می‌شود که منجر به تمایز طیفی واضحی در میان تخمک‌های مورد بررسی می‌شود. پژوهشگران با تعیین مولکول‌های موثر در رشد تخمک، به تعیین شاخص‌های استاندارد تخمک شایسته پرداخته‌اند. محتوای پروتئینی و چربی سلولی به تنهایی و همچنین نسبت محتوای پروتئینی به چربی سلولی (نسبت قله‌های رامان ۱٦۰۵به۱٤٤۷ برحسب cm-1) همراه با ریخت‌شناسی سلولی، به‌عنوان پارامترهایی سودمند برای ارزیابی کیفی تخمک مورد استفاده قرار گرفته‌اند. برای مثال، تخمک‌های با کیفیت خوب درمقایسه با تخمک‌های کم‌کیفیت، دارای محتوای پروتئینی و چربی بالاتری هستند. همچنین، ارزیابی تغییرات بیوشیمیایی در تخمک‌های زنده با

[Downloaded from icml.ir on 2026-11-03]

استفاده از یک سیستم RMS مجهز به انکوباتور CO2 دار به‌خوبی امکان‌پذیر شده است (١٦). برای مثال، تغییر در میزان اسیدفسفریک (١٠٤٦cm-1) و جایگاه‌های فسفریله‌شدن روی پروتئین‌ها (cm-١٠٨٠١ و ٩٨٠) به‌عنوان شاخص رشد مناسب‌تر بلوغ تخمک و همچنین تغییر در میزان چربی‌ها در فرآیند بلوغ تخمک، ازجمله شاخص‌های دیگر برای سنجش کیفیت تخمک می‌باشند. همچنین تغییر در ساختار ثانویه پروتئین‌ها (شامل تغییر در ساختار مارپیچ پروتئین در قله طیف‌سنجی ١٦٥٩cm-1) و تغییر در الگوی تجمع چربی‌های درون‌زاد تخمک (١٤٥٠cm-1) شاخص‌های مناسبی در تعیین کیفیت تخمک‌های زنده نابالغ، بالغ و پیر هستند (١٧).

۶- آماده‌سازی دستگاه طیف سنج رامان، انجام آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری

معمولاً برای طیف‌سنجی تخمک از طول موج‌های ٥٣٢ و ٧٨٥ نانومتر، عدسی شیئی با بزرگنمایی ٤٠، توان لیزر ٣٠ میلی وات در نقطه مورد نظر نمونه و مدت زمان بین ١٥ ثانیه تا ٢ دقیقه در معرض اشعه، استفاده می‌شود (٢و٣). همچنین معمولاً به‌منظور پوشش‌دادن کامل تغییرات مولکول‌های تأثیرگذار، طیف‌گیری در دامنه بین ٣٠٠ تا cm-١٣٨٠٠ انجام می‌شود. به‌صورت چشمی تفاوت ظاهری در ویژگی طیف‌های به دست آمده از قبیل شکل، ارتفاع، دامنه و مهندسی قله‌های طیفی را به راحتی نمی‌توان تشخیص داد (٣). به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از طیف‌سنجی رامان، از روش تجزیه و تحلیل چندمتغیره میانگین‌شده مانند تجزیه و تحلیل مؤلفه PCA و تجزیه و تحلیل متغیر متعارف CVA استفاده می‌شود (٢). معمولاً از ٤ تا ٥ نقطه از هر تخمک، طیف سنجی می‌شود و با استفاده از میانگین‌های طیف رامان، داده‌های طیفی بزرگی براساس ناهمگنی طیف‌ها به‌دست می‌آید. به‌منظور تجزیه و تحلیل واریانس داده‌های طیف‌ها، یک میانگین از طیف‌های حاصل از نقاط مختلف تابش گرفته‌شده و سپس برای هر تخمک یک خطای استاندارد محاسبه می‌شود و داده‌ها با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس مورد تحلیل قرار می‌گیرند (٥). شکل شماره ١، معماری مولکولی یک تخمک بالغ را با استفاده از میکروسکوپ طیف‌سنج رامان که در بخشی از پژوهش‌های ما (آزمایشگاه IVF بخش تولیدمثل، دانشکده دامپزشکی و آزمایشگاه مرکزی ارم، دانشگاه شیراز) انجام‌شد را نشان می‌دهد.



شکل (١): (a) تصویری از تخمک گاو نژاد هلشتاین که در شرایط آزمایشگاهی بالغ شده است را با بزرگنمایی ١٠ در فاصله ١٠ میکرومتری و درحالت صفحه افقی میکروسکوپ کانفوکال طیف‌سنج رامان نشان می‌دهد. (b) نقشه حرارتی تجمع چربی در تخمک را نشان می‌دهد که قسمت‌های زرد رنگ برحسب شدت رنگ، نشان‌دهنده تجمع بیشتر چربی و قسمت قرمز رنگ، ناحیه خالی از تجمع چربی‌ها است. (c) نشان‌دهنده نتایج خوشه‌بندی طیفی رده‌های با اهمیت سلولی تخمک شامل: اسیدهای نوکلئیک، چربی‌ها، پروتئین‌ها و فعالیت میتوکندریایی است. (انجام گرفته در آزمایشگاه IVF بخش تولیدمثل، دانشکده دامپزشکی و آزمایشگاه مرکزی ارم، دانشگاه شیراز).

۷- محدودیت‌ها

برخی از مشکلات فنی، استفاده کاربردی از این فناوری را محدود می‌کند (١). اثر پراکندگی رامان (Raman Scattering Effect) بسیار ضعیف است، که این نکته سبب اتلاف مدت زمانی طولانی برای تصویربرداری از تخمک می‌شود. افزون‌براین، سیگنال‌های رامان ممکن است توسط فلورسانس بازتابیده از نمونه‌ها و حتی از ظرف حاوی تخمک (شیشه، کوارتز و دیگر موارد) دستخوش تغییر شوند. نکته دیگر آن است که هنوز اثرات بعدی تابش لیزر (طول موج لیزر و میزان تابش آن) بر روی رشد تخمک در مراحل بعد و

[Downloaded from icml.ir on 2026-11-03]

همچنین شناخت سنجه‌های موثر در ارزیابی بهتر تخمک‌های پرتو دیده به‌طور کامل برآورد نشده است (۱۸).

تشخیص مناسب و تفسیر یافته‌های طیف‌سنجی رامان نیاز به دانش تخصصی کافی به‌ویژه برای پردازش سیگنال‌ها، تصاویر و همچنین تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش‌های تک و چند متغیره (مانند تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی و خوشه سلسله مراتبی) دارد (۱۹). به‌هرحال و بتدریج، با توسعه و پیشرفت روش میکروسکوپی منسجم ضدپراکندگی رامان که قدرت تشخیص پاسخ‌های ارتعاشی را افزایش می‌دهد، به‌طور قابل ملاحظه‌ای مدت زمان تصویربرداری از نمونه‌ها کاهش خواهد یافت و یافته‌های ارتعاشی و طیفی در توان پایین‌تر لیزر به دست خواهد آمد (۱).

۸- افق‌های پیش رو

امکان‌سنجی RMS برای شناسایی موقعیت مکانی اجزای زیستی تخمک از جمله نقشه کل محتوای پروتئینی، لیپیدی و فسفولیپیدی اووپلاسم، این توان را ایجاد خواهد کرد که تغییرات توزیع مولکولی در مرحله قبل از بلوغ، بلوغ و جنین‌های مراحل اولیه به خوبی از یکدیگر تفکیک شوند (۱۹). همچنین با افزایش سرعت عملکرد در ادغام طیف‌های تولیدشده به‌منظور رسم نقشه‌های تک‌متغیره از پخش و تجمع ماکرومولکول‌های مهم (مانند فنیل‌آلانین که نشان‌دهنده محتوای لیپوپروتئینی است)، الگوی پراکندگی لیپیدها در ناحیه هسته تخمک و الگوی پخش میتوکندری‌ها در اووپلاسم، توان تفکیک تخمک‌های نابالغ از بالغ را به شدت بالا خواهد برد (۱). به علاوه اخیرا امکان تصویربرداری سه‌بعدی برای تولید تصاویر با وضوح بالا از تخمک‌های زنده بدون نیاز به نشانگرهای فلورسانس یا دیگر نشانگرها ایجاد شده است، در حالی‌که این نوع تصاویر پیش از این تنها با استفاده از تخمک‌های تثبیت‌شده تولید می‌شد. بدین ترتیب اثر مخرب و مزاحم احتمالی تثبیت شیمیایی تخمک از بین خواهد رفت (۲۰).

۹- نتیجه‌گیری

در نوشتار حاضر، تلاش شد که فناوری غیرتهاجمی طیف‌سنجی رامان برای ارزیابی کیفیت تخمک معرفی گردد. با وجودی‌که مدت زمان زیادی در استفاده از فناوری طیف‌سنجی رامان برای ارزیابی کیفیت تخمک در مراکز پژوهشی تولیدمثل نمی‌گذرد، اما سادگی روش، غیرتهاجمی و غیرمخرب‌بودن و نتایج قابل توجه آن، راهی امیدبخش را برای جنین‌شناسان علوم زیستی، پزشکی و دامپزشکی باز کرده است. اگرچه برخی پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که تعداد قابل‌ملاحظه‌ای از تخمک‌ها و جنین‌ها که در معرض اشعه لیزر دستگاه رامان قرار گرفته‌اند از زنده‌مانی خوبی برخوردار بوده اند، اما هنوز تحقیقات زیادی بر روی اثر اشعه لیزر بر آنها باید انجام گیرد تا اعتماد جنین‌شناسان بالینی را در استفاده بیشتر از این فناوری جلب کند. قدرت انطباق بالای دستگاه طیف‌سنجی رامان برای ایجاد تغییرات فنی در پردازش اشعه لیزر بستر وسیعی را برای ادامه تحقیقات آینده در این زمینه فراهم می‌آورد. انتظار می‌رود که این روش جایگاه مناسبی در ارزیابی کیفیت تخمک و جنین اولیه و همچنین در بهبود عملکرد فرایند لقاح داخل آزمایشگاهی بر پایه یافته‌های مولکولی در آینده نزدیک پیدا کند.

[Downloaded from icml.ir on 2026-11-03]

References:

1- Bogliolo, L., Leoni, G.G. and Ledda, S., 2020. Raman spectroscopy-based approach to study the female gamete. *Theriogenology*, *150*, pp.268-275.

2- Jimenez, L.E., Roldán-Olarte, M. and Álvarez, R.M.S., 2019. Raman microscopy analysis of the biochemical changes in the cytoplasm of bovine oocytes induced by an in vitro maturation process: Interference of the zona pellucida. ChemistrySelect, 4(13), pp.3706-3716.

3- Li, X.X., Cao, P.H., Han, W.X., Xu, Y.K., Wu, H., Yu, X.L., Chen, J.Y., Zhang, F. and Li, Y.H., 2018. Non-invasive metabolomic profiling of culture media of ICSI-and IVF-derived early developmental cattle embryos via Raman spectroscopy. Animal reproduction science, 196, pp.99-110.

4- Coticchio, G., Sereni, E., Serrao, L., Mazzone, S., Iadarola, I. and Borini, A., 2004. What criteria for the definition of oocyte quality?. Annals of the New York Academy of Sciences, 1034(1), pp.132-144.

5- Ishigaki, M., Hoshino, Y. and Ozaki, Y., 2019. Phosphoric acid and phosphorylation levels are potential biomarkers indicating developmental competence of matured oocytes. Analyst, 144(5), pp.1527-1534.

6- Rusciano, G., De Canditiis, C., Zito, G., Rubessa, M., Roca, M.S., Carotenuto, R., Sasso, A. and Gasparrini, B., 2017. Raman-microscopy investigation of vitrification-induced structural damages in mature bovine oocytes. PloS one, 12(5), p.e0177677.

7- Singh, R. and Sinclair, K.D., 2007. Metabolomics: approaches to assessing oocyte and embryo quality. Theriogenology, 68, pp.S56-S62.

8- Jasensky, J. and Swain, J.E., 2013. Peering beneath the surface: novel imaging techniques to noninvasively select gametes and embryos for ART. Biology of reproduction, 89(4), pp.105-1.

9- Perevedentseva, E., Krivokharchenko, A., Karmenyan, A.V., Chang, H.H. and Cheng, C.L., 2019. Raman spectroscopy on live mouse early embryo while it continues to develop into blastocyst in vitro. Scientific reports, 9(1), pp.1-12.

10- Todt, M., Rammerstorfer, F.G., Hartmann, M.A., Paris, O. and Fischer, F.D., 2011. Shell-models for multi-layer carbon nano-particles. In Shell-like Structures (pp. 585-602). Springer, Berlin, Heidelberg.

11- van Manen, H.J., Kraan, Y.M., Roos, D. and Otto, C., 2005. Single-cell Raman and fluorescence microscopy reveal the association of lipid bodies with phagosomes in leukocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(29), pp.10159-10164.

12- Uzunbajakava, N., Lenferink, A., Kraan, Y., Volokhina, E., Vrensen, G., Greve, J. and Otto, C., 2003. Nonresonant confocal Raman imaging of DNA and protein distribution in apoptotic cells. Biophysical journal, 84(6), pp.3968-3981.

13- Matthäus, C. and Boydston-White, S., 2006. Miljkovi; Milo; Romeo, M.; Diem, M. Appl. Spectrosc, 60(1).

14- Farahavar, G., Abolmaali, S.S., Nejatollahi, F., Safaie, A., Javanmardi, S., Zadeh, H.K., Yousefi, R., Nadgaran, H., Mohammadi-Samani, S., Tamaddon, A.M. and Ahadian, S., 2021. Single-chain antibody-decorated Au nanocages@ liposomal layer nanoprobes for targeted SERS imaging and remote-controlled photothermal therapy of melanoma cancer cells. Materials Science and Engineering: C, 124, p.112086.

15- Choi, W.J., Banerjee, J., Falcone, T., Bena, J., Agarwal, A. and Sharma, R.K., 2007. Oxidative stress and tumor necrosis factor-α-induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure. Fertility and sterility, 88(4), pp.1220-1231.

16- Winterhalder, M.J. and Zumbusch, A., 2014.

[Downloaded from icml.ir on 2026-11-03]

Nonlinear optical microscopy with vibrational contrast. Journal of microscopy, 255(1), pp.1-6.

17- Matthäus, C., Bird, B., Miljković, M., Chernenko, T., Romeo, M. and Diem, M., 2008. Infrared and Raman microscopy in cell biology. Methods in cell biology, 89, pp.275-308.

18- Davidson, B., Spears, N., Murray, A. and Elfick, A., 2012. The changing biochemical composition and organisation of the murine oocyte and early embryo as revealed by Raman spectroscopic mapping. Journal of Raman Spectroscopy, 43(1), pp.24-31.

19- Iussig, B., Maggiulli, R., Fabozzi, G., Bertelle, S., Vaiarelli, A., Cimadomo, D., Ubaldi, F.M. and Rienzi, L., 2019. A brief history of oocyte cryopreservation: arguments and facts. Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica, 98(5), pp.550-558.

20- Heraud, P., Marzec, K.M., Zhang, Q.H., Yuen, W.S., Carroll, J. and Wood, B.R., 2017. Label-free in vivo Raman microspectroscopic imaging of the macromolecular architecture of oocytes. Scientific reports, 7(1), pp.1-10.

21- Nadgaran, H. and Pourmand, R., 2013. Ultra-sensitive optical biosensor based on whispering gallery modes: the effect of buffer solutions refractive index on their sensitivity and performance. Journal of biomedical physics & engineering, 3(2), p.57.

22- Nadgaran, H. and Kazempourfard, M.S., 2021. Ultrashort pulsed laser amplifier: simultaneous optimization of thermally induced diffraction loss and energy transfer upconversion. Laser Physics, 31(7), p.075001.

23- Azari, M., Kafi, M., Ebrahimi, B., Fatehi, R., & Jamalzadeh, M. 2017. Oocyte maturation, embryo development and gene expression following two different methods of bovine cumulus-oocyte complexes vitrification. Veterinary research communications, 41(1), 49-56.

24- Kafi, M., Azari, M., Chashnigir, O., Gharibzadeh, S., Aghabozorgi, Z., Asaadi, A., & Divar, M. R. 2017. Inherent inferior quality of follicular fluid in repeat breeder heifers as evidenced by low rates of in vitro production of bovine embryos. Theriogenology, 102, 29-34.

[Downloaded from icml.ir on 2026-11-03]