

سلام الغزالي



دانشگاه پیام نور

دانشکده علوم پایه

مرکز تهران

پایان نامه

برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد

رشته علوم جانوری - گرایش تکوین

گروه زیست شناسی

تاثیر ملاتونین بر بلوغ و لقاح آزمایشگاهی تخمک های

نارس و میزان تکوین جنین های حاصله در موش

NMRI نژاد

زکیه عسگری نوحدانی

استاد راهنما : سرکار خانم دکتر مینا رضانی

استاد مشاور : جناب آقای دکتر محمد هادی بهادری

بهمن ۱۳۸۹

شماره
تاریخ
پیوست



جمهوری اسلامی ایران
سازمان علوم تحقیقات و فناوری

مجمع علوم پایه و کشاورزی

صور تجلسه دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

جلسه دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد زکيه عسگری نوحدانی

دانشجوی رشته زیست شناسی جانوری به شماره دانشجویی ۸۷۰۰۰۱۱۰۴

تحت عنوان " تاثیر ملاتونین بر بلوغ و لقاح آزمایشگاهی تخمکهای نارس و میزان تکوین جنینهای حاصله در موش نژاد NMRI "

جلسه دفاع با حضور داوران نامبرده ذیل در روز چهارشنبه مورخ ۸۹/۱۱/۲۷ ساعت ۱۶-۱۵ در محل

مجمع علوم پایه و کشاورزی برگزار شد. و پس از بررسی پایان نامه مذکور با نمره به عدد ۱۹.۹۹

به حروف و با درجه ارزشیابی مورد قبول واقع شد.

امضا	دانشگاه/موسسه	مرتبه دانشگاهی	نام و نام خانوادگی	هیات داوران
	دانشگاه آزاد	استاد ديار	مینا رضای	استاد راهنما
	دانشگاه آزاد	استاد	محمد هادی بهادری	استاد مشاور
	دانشگاه آزاد	استاد ديار	محمد نبیونی	استاد داور
	دانشگاه آزاد	استاد ديار	سایما نصری	نماینده علمی گروه

تهران، خیابان استاد
حاجت‌آلی، خیابان
فلاح پور، پلاک ۲۷
تلفن: ۸۸۸۰۰۲۵۲
تلفن: ۸۸۳۱۹۴۷۵
www.tpnu.ac.ir
science.agri@tpnu.ac.ir

تقدیم به آنان که به من آموختند
به آنانی که به منزله چشم و گوش من بودند
به آنانی که آینه تمام نمای صفات نیکوی الهی
بودند و هستند

به پدر فیلسوف و عالم و فرزانه ام
به مادر مهربان، صبور و عاشقم
و به همسرم

او که بعد از خدا بهترین
و استوارترین تکیه گاهم بوده است

ای خدای بزرگ، ای ایده ال غایی من، ای نهایت آرزوهای بشری،
عاجزانه در مقابلت به خاک می افتم و تو را سجده میکنم و ستایش می کنم
که فقط تو، آری فقط تو ای خدای بزرگ شایسته سپاس و ستایشی

*تشکر میکنم از تمامی اعضای خانواده ام آنانی که عطر مهربانی شان پایدار و
ستودنی است

*تشکر میکنم از تمامی اعضای خانواده همسرم بخصوص پدر و مادر مهربانش
و خواهر عزیزش که همیشه در پستی ها و بلندی های زندگی همراه و شریک غم
ها و شادی هایم بوده اند.

*تشکر میکنم از تمامی اساتیدم سرکار خانم دکتر رضانی ، جناب آقای دکتر
بهادری و سرکار خانم دکتر نصیری که افتخار شاگردی در محضرشان را داشتم. و
تشکر ویژه از استاد فرزانه ام جناب آقای دکتر بهادری به خاطر تمامی حمایت
هایش.

*تشکر میکنم از استاد داور محترم از دانشگاه تربیت معلم تهران جناب آقای
دکتر نبیونی

*تشکر میکنم از کادر محترم گروه آناتومی دانشکده علوم پزشکی گیلان علی
الخصوص از آقای دکتر نصیری که کمال همکاری را با اینجانب داشتند.

*و در آخر تشکر و سپاس فراوان از تمامی دوستان عزیزم که در سرانجام
رساندن این پروژه با من همکاری نمودند و مشوق و یاریگر بودند

چکیده:

هدف: این مطالعه جهت بررسی اثر ملاتونین بر بلوغ، لقاح تخمک ه، میزان کلیواژ و تکوین بلاستوسیت های موش در شرایط آزمایشگاهی طراحی شد.

روش: مجموعه تخمک-کومولوس از تخمدان موش های ماده نژاد NMRI، بعد از تزریق داخل صفاقی PMSG جمع آوری شد. تخمک ها در محیط بلوغ تامین شده با دوزهای مختلف ملاتونین (۱۰۰، ۱۰، ۱ میکرومولار و ۱۰۰، ۱۰ نانومولار) و گروه کنترل (بدون ملاتونین) کشت داده شدند و میزان بلوغ و لقاح آزمایشگاهی تخمک ها و تکوین جنین های حاصله مورد بررسی قرار گرفت. همچنین جنین های دو سلولی از اویداکت به دنبال تزریق داخل صفاقی PMSG و ۴۸ ساعت بعد، تزریق hCG جمع آوری شد. جنین ها در محیط T6 تیمار شده با دوزهای مختلف ملاتونین و محیط کنترل (بدون ملاتونین) کشت داده شدند. نتایج با میکروسکوپ معکوس ثبت و با روش chi-square و با کمک نرم افزار SPSS 13 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: غلظت های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار از ملاتونین میزان بلوغ و لقاح آزمایشگاهی تخمک ها را در مقایسه با گروه کنترل افزایش می دهد ($P < 0.01$). همچنین میزان کلیواژ و تکوین بلاستوسیت در گروه های تیمار شده با دوزهای ۱۰ و ۱۰۰ نانومولار افزایش می یابد ($P < 0.01$). نتایج نشان می دهد که میزان تسهیم جنین های موش در محیط ۱۰ و ۱۰۰ نانومولار از ملاتونین به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش می یابد ($P < 0.001$).

نتیجه گیری: ملاتونین به عنوان پاک کننده موثر ROS، بلوغ و لقاح تخمک و تکوین جنین های موش را بهبود می بخشد.

کلید واژه: ملاتونین، بلوغ آزمایشگاهی، لقاح آزمایشگاهی، تکوین، موش.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل اول: مقدمه
۲	۱-۱- ناباروری.....
۲	۱-۲- مروری بر روش های کمکی تولید مثل.....
۵	۱-۳- رشد و نمو تخمک.....
۷	۱-۳-۱- بلوغ تخمک قبل و بعد از تولد.....
۸	۱-۳-۲- اثر سلول های کومولوس بر روند بلوغ و تکوین تخمک.....
۸	۱-۴- تولید اسپرم و خصوصیات آن.....
۸	۱-۴-۱- استعداد یابی اسپرم.....
۹	۱-۵- لقاح.....
۱۰	۱-۶- بلوغ آزمایشگاهی.....
۱۰	۱-۶-۱- تنظیم بلوغ تخمک.....
۱۱	۱-۶-۱-۱- بلوغ هسته.....
۱۳	۱-۶-۱-۲- بلوغ سیتوپلاسم.....
۱۵	۱-۷- لقاح آزمایشگاهی (IVF).....
۱۶	۱-۷-۱- روش IVF.....

- ۱۷ ۱-۷-۲- مزایای IVF
- ۱۸ ۱-۷-۳- خطرات IVF
- ۱۸ ۱-۷-۳-۱- چندقلوزایی
- ۱۹ ۱-۷-۳-۲- نقایص تولد
- ۱۹ ۱-۷-۳-۳- خطرات سلامتی مادر
- ۲۰ ۱-۸-۸- تکوین جنین پیش از لانه گزینی
- ۲۰ ۱-۸-۱- لقاح تا تشکیل مورلا
- ۲۱ ۱-۸-۲- تشکیل مورلا
- ۲۲ ۱-۸-۳- تشکیل بلاستوسیست
- ۲۲ ۱-۸-۴- از پوسته درآمدن
- ۲۳ ۱-۸-۵- لانه گزینی
- ۲۴ ۱-۸-۶- فاکتورهای موثر در جنین قبل از لانه گزینی
- ۲۴ ۱-۹-۹- بلاستوسیست موش
- ۲۵ ۱-۱۰-۱- مقایسه جنین موش و انسان
- ۲۶ ۱-۱۱-۱- محیط کشت برای جنین های مرحله قبل از لانه گزینی
- ۲۸ ۱-۱۲-۱- ملاتونین چیست
- ۲۸ ۱-۱۲-۱- ساختمان شیمیایی ملاتونین

- ۲۹ ۲-۱۲-۱- نقش هورمون ملاتونین در بدن.....
- ۳۰ ۳-۱۲-۱- فاکتورهای موثر در میزان غلظت ملاتونین در بدن.....
- ۳۰ ۴-۱۲-۱- نیم رخ ترشح ۲۴ ساعته هورمون ملاتونین.....
- ۳۱ ۵-۱۲-۱- اثر ملاتونین در کاهش چسبندگی پس از عمل جراحی شاخ رحم.....
- ۳۲ ۶-۱۲-۱- اثر ملاتونین بر دستگاه تناسلی ماده.....
- ۳۵ ۷-۱۲-۱- اثر محافظتی ملاتونین بر پارامترهای اسپرم سازی و دستگاه تولید مثل نر.....
- ۴۱ ۱۳-۱- هدف، فرضیات و ضرورت انجام طرح.....

فصل دوم: مواد و روش ها

- ۴۳ ۱-۲- طرح کلی کار.....
- ۴۳ ۲-۲- وسایل و مواد مورد نیاز.....
- ۴۳ ۱-۲-۲- وسایل مورد نیاز.....
- ۴۴ ۲-۲-۲- مواد مورد نیاز.....
- ۴۵ ۳-۲- تهیه محیط کشت TCM.....
- ۴۵ ۴-۲- تهیه محیط کشت T6.....
- ۴۶ ۵-۲- تهیه محیط کشت قطره ای.....
- ۴۷ ۶-۲- آماده سازی ملاتونین و هورمون ها برای استفاده.....

- ۴۷ ۱-۶-۲- ملاتونین
- ۴۷ ۲-۶-۲- هورمون PMSG
- ۴۸ ۳-۶-۲- هومون hCG
- ۴۸ ۷-۲- آماده سازی پیپت دهانی برای جابجا کردن تخمک
- ۴۹ ۸-۲- روش جابجا کردن تخمک با استفاده از پیپت دهانی
- ۴۹ ۹-۲- القا تخمک گذاری
- ۴۹ ۱-۹-۲- عوامل موثر در القا تخمک گذاری
- ۴۹ ۹-۲-۱-۱- اثر سن و وزن
- ۵۰ ۹-۲-۱-۲- دوز و زمان تزریق گنادوتروپین
- ۵۰ ۹-۲-۲- روش القا تخمک گذاری
- ۵۱ ۱۰-۲- تزریق داخل صفاقی
- ۵۱ ۱۱-۲- باز کردن حفره شکمی و مکان یابی اندام های تناسلی
- ۵۳ ۱۲-۲- جمع آوری تخمک
- ۵۴ ۱۳-۲- برهنه کردن تخمک
- ۵۵ ۱۴-۲- نحوه بررسی تخمکهای حباب زاینده
- ۵۵ ۱۵-۲- لقاح آزمایشگاهی
- ۵۵ ۱-۱۵-۲- مراحل نمونه گیری اسپرم از ایدیدیم

- ۵۶ ۲-۱۵-۲- تکنیک لقاح آزمایشگاهی
- ۵۷ ۲-۱۵-۳- نحوه بررسی تخمک های تلقیح شده
- ۵۷ ۲-۱۵-۴- نحوه کشت جنین پس از IVF
- ۵۸ ۲-۱۶- جمع آوری جنین
- ۵۹ ۲-۱۷- ویژگی های تخمک و جنین های زنده مانده
- ۶۰ ۲-۱۸- آنالیز آماری

فصل سوم: نتایج

- ۳-۱- میزان بلوغ تخمک های حباب زاینده در گروههای تیمار شده با دوز های مختلف ملاتونین و مقایسه آن با گروه کنترل..... ۶۲
- ۳-۲- میزان لقاح تخمک های MII و تکوین جنین های موش در گروههای مختلف تیمار شده با ملاتونین و مقایسه آن با گروه کنترل..... ۶۴
- ۳-۳- میزان تکوین جنین های دو پیش هسته ای در شرایط *in vivo* در گروههای مختلف تیمار شده با ملاتونین و مقایسه آن با گروه کنترل..... ۶۶

فصل چهارم: بحث

- ۴-۱- بررسی بلوغ و لقاح تخمک های حباب زاینده در شرایط کشت..... ۷۴
- ۴-۱-۱- بررسی اثر ملاتونین بر بلوغ، لقاح و تکوین آزمایشگاهی تخمک های مرحله ی

۷۶ حساب زاینده

۸۰ ۲-۴- تکوین آزمایشگاهی جنین های بالغ شده در شرایط **In-vivo**

۸۱ ۱-۲-۴- بررسی اثر ملاتونین بر تکوین آزمایشگاهی جنین های دو سلولی

۸۲ ۳-۴- نتیجه گیری

۸۳ ۴-۴- پیشنهادات

فصل پنجم:

۸۵ ۱-۵- منابع فارسی

۸۶ ۲-۵- منابع انگلیسی

فهرست اشکال:

- شکل ۱-۱: مراحل اووژنز و تشکیل فولیکول از زمان نمو سلول های زاینده اولیه (PGC) تا ایجاد تخمک بالغ در مرحله GV در پستانداران..... ۶
- شکل ۲-۱: بلاستوسیت در حال از پوسته در آمدن..... ۲۳
- شکل ۳-۱: تصویری شماتیک از جنین در طی هفته اول (E0-E5) که در داخل آندومتر لانه گزینی کرده است..... ۲۴
- شکل ۴-۱- ساختار شماتیک بلاستوسیت موش..... ۲۵
- شکل ۱-۲: قطره گذاری محیط کشت پوشیده شده با روغن مینرال در پلیت..... ۴۷
- شکل ۲-۲: روش کشتن موش به صورت جابجایی مهره های گردن..... ۵۲
- شکل ۳-۲: آماده کردن موش جهت پیدا کردن اندام های تناسلی..... ۵۲
- شکل ۴-۲: تصویری از رحم دوشاخه در موش..... ۵۳
- شکل ۵-۲: توده سلول های کومولوس گرفته شده از تخمدان موش..... ۵۵
- شکل ۱-۳- تخمک های موش در مرحل ژرمینال وزیکول به همراه سلولهای گرانولوزا..... ۶۹
- شکل ۳-۳- تخمک های موش در مرحل ژرمینال وزیکول با و بدون سلولهای گرانولوزا..... ۶۹
- شکل ۳-۳- تخمک های موش در مرحل ژرمینال وزیکول (GV) به همراه سلولهای گرانولوزا.. ۶۹
- شکل ۴-۳- تصویر تخمک متافاز یک (MI)..... ۷۰
- شکل ۵-۳- تصویر یک تخمک MII که در مجاورت با اسپرم قرار گرفته است..... ۷۰
- شکل ۶-۳: جنین موش در مرحله دوپیش هسته ای (2PN)..... ۷۱

شکل ۳-۷- تصویر چند جنین دو سلولی..... ۷۱

شکل ۳-۸- تصویر جنین در مرحله بلاستوسیست..... ۷۲

شکل ۳-۹- تصویر جنین در مرحله خروج از زونلا..... ۷۲

فهرست جداول:

- جدول ۱-۳- مقایسه میزان بلوغ آزمایشگاهی تخمک های نابالغ موش مابین گروه کنترل و گروه های تیمار شده بادوزهای مختلف ملاتونین..... ۶۳
- جدول ۲-۳- مقایسه میزان بلوغ، لقاح و تکوین آزمایشگاهی تخمک های نابالغ موش مابین گروه کنترل و گروه های تیمار شده بادوزهای مختلف ملاتونین..... ۶۵
- جدول ۳-۳- تاثیر ملاتونین در دوزهای مختلف بر میزان تکوین جنین های موش بعد از کشت در محیط T6..... ۶۷

فهرست نمودار:

- نمودار ۱-۳: بررسی تاثیر ملاتونین بر میزان بلوغ تخمک های موش ۶۴
- نمودار ۲-۳: بررسی تاثیر ملاتونین بر میزان تکوین جنین های دوپیش هسته ای موش حاصل از لقاح
آزمایشگاهی..... ۶۶
- نمودار ۳-۳: تاثیر ملاتونین بر تکوین جنین های دو سلولی موش در شرایط آزمایشگاهی..... ۶۸

فصل اول

مقدمه

۱ ۴ - ناباروری

ناباروری (ناتوانی در ایجاد یا حفظ آبستنی) در معنای واقعی کلمه، یک بیماری نیست. ترجیحا ناباروری را عدم وقوع حاملگی پس از گذشت یکسال از تلاش برای حاملگی در طی مقاربت های مکرر می دانند. ناباروری ممکن است به علت عدم موفقیت در تولید تخمک بالغ، وجود تعداد قلیل اسپرم یا وجود اسپرم معیوب، انسداد فیزیکی مجاری تناسلی نر یا ماده و یا ناسازگاری بین اسپرم و محیط اطراف تخمک یا مجرای تناسلی باشد. 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).

به منظور درمان زنان جهت بلوغ تخمک و تخمک گذاری روش های درمانی متعددی وجود دارد. استفاده از گنادوتروپین های اگزورژن یا داروهای ضد استروژنی در زنان، موجب تحریک تخمدان ها می شود. برای ناباروری مردان، ممکن است اسپرم را به داخل تخمک و یا در مجرای تناسلی مونث در مجاور تخمک تزریق کنند. علاوه بر این، روش های کمک باروری ART^۱ دیگری نیز وجود دارند. در این روش های طبی بلدستکاری تخمک در خارج از بدن زن، موجب افزایش احتمال لقاح میشوند. متداولترین این روشها لقاح آزمایشگاهی است (گیلبرت، ۱۳۸۸).

۱ ۴ - مروری بر روش های کمکی تولید مثل:

امروزه مطالعات ناباروری اهمیت بسیار پیدا کرده است. به خصوص به دلیل شکوفایی تکنولوژی های جدید، زیست شناسی تولید مثل روز به روز جذاب تر می شود. روش های القا تخمک گذاری، لقاح خارج رحمی، میکرواینجکشن^۲ و سایر روش ها، نوید بخش زوج های نابارور می باشد و ناباروری که تا چندی قبل محدود به خرافات و کارهای غیر علمی می گردید، به صورت یکی از زمینه های شگفت انگیز و پویای علم زیست شناسی درآمده است. به طوری که ناباروری در علمی

^۱- Assisted Reproductive Technologies

^۲- microinjection

چون فیزیولوژی، داروسازی، ایمنی شناسی، ژنتیک و پزشکی مورد توجه قرار گرفته است (اسکات، ۱۳۸۱).

معمولا ناباروری را به دو گروه اولیه و ثانویه تقسیم می کنند. در ناباروری اولیه حاملگی رخ نداده است، حال آنکه در ناباروری ثانویه حاملگی چه به صورت موفقیت آمیز و چه به صورت غیر موفقیت آمیز در گذشته رخ داده است.

تا چند سال اخیر درمان ناباروری در مردان بر خلاف ناباروری زنان، مایوس کننده بوده است. از آنجایی که بسیاری از مردان از فقدان یک فاکتور مردانه نامشخص رنج می برند، درمان این بیماری بسیار پیچیده و مشکل ساز بوده است. تا مدت ها این بیماران با داروهای سنتی نظیر استروژن ها، گنادوتروپین ها، آندروژن ها و یا آنتی بیوتیک ها درمان می شدند. هر چند که مطالعات پراکنده حاکی از آنند که این درمان ها معمولا موفقیت آمیز نبوده اند (اسپروف، ۱۳۸۵). تکنیک لقاح آزمایشگاهی^۱: IVF پس از سالها، تحقیق و بررسی بر روی حیوانات آزمایشگاهی، بالاخره در سال ۱۹۷۸ میلادی توانست به تولد نوزادی در انگلستان بیانجامد. پروفیسور Patrick Steptoe و همکارش پروفیسور Robert Edwards توانستند در سال ۱۹۸۰ اولین حاملگی موفقیت آمیز با این روش را با تولد یک نوزاد انسان گزارش کنند. روش های کمکی تولید مثل شامل دستکاری اسپرم یا تخمک یا دستکاری هردو به منظور درمان ناباروری می باشد (خوانساری، ۱۳۷۴ و شین جان، ۱۳۶۵).

در اولین سالها IVF 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 قابل مشخصی اسپرم متحرک و فعال نیاز است تا بتوانند به طور طبیعی اطراف تخمک را احاطه نموده و یک اسپرم به داخل آن نفوذ کنند و لقاح صورت گیرد. از آن جایی که اکثر مردان نابارور دچار نقص یا نواقصی در پارامترهای اسپرمی می باشند، IVF معمولا نمی تواند جوابگوی این دسته از بیماران باشد. سپس تکنیک های پیشرفته تری نظیر "انتقال گامت به داخل لوله رحمی" (GIFT^۲) و یا "انتقال تخم به داخل لوله رحمی" (ZIFT^۳) ابداع شد. این روش ها در درمان ناباروری مردان موثر واقع نشد (افلاطونیان، ۱۳۷۲ و اقصی، ۱۳۷۰). بنابراین پژوهشگران به دنبال ارتقاء تکنیک IVF بودند.

^۱- In-vitro fertilization

^۲- Gamet Intrafallopian Transfer

^۳- Zygote Intrafallopian Transfar