بسم الله الرحمن الرحيم

١١٤٢٥٧ - ٢ - ١٢٢٠

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته علوم تشریح

عنوان

اثر سلنیوم بر میزان گونه‌های واکنش‌گر اکسیژنی حاصل از کشت فولیکول‌های پره‌آنترال تخمدان‌های انجماد شیشه‌ای شده موش با دو روش رایج و پوشش مستقیم

نگارش

علی عابدالهی

استاد راهنما

دکتر مژده صالح‌نیا

استاد مشاور

دکتر عبدالامیر علامه

مرکز اطلاعات مدارک علمی پزشکی
تهیه مدارک
۱۳۸۸/۴/۱

بهار ۱۳۸۸

۱۱۴۶۵۷

دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه : با عنایت به سیاست‌های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱ : حقوق مادی و معنوی پایان‌نامه‌ها / رساله‌های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره‌برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین‌نامه‌ها و دستورالعمل‌های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲ : انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه / رساله به‌صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی می‌باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مقاله باشند.

تبصره : در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی به‌صورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه / رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳ : انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان‌نامه / رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و براساس آیین‌نامه‌های مصوب انجام می‌شود.

ماده ٤ : ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه / رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ٥ : این دستورالعمل در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸٤/٤/۲٥ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم‌الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

۸۸/۱/۱۳

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی – پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل رساله دکتری نگارنده در رشته **علوم تشریح** است که در سال **۱۳۸۸** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **سرکار خانم دکتر مژده صالح‌نیا** ، مشاوره **جناب آقای دکتر عبدالامیر علامه** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ٤ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ٥ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ٤ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ٦ : اینجانب **علی عابد الهی** دانشجوی رشته **علوم تشریح** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

۸۸/۱۱/۲۳

تقدیم به :

مهربان خالقی که نور مطلق است و دریای بیکران نیکویی‌ها

استاد ارجمند سرکار خانم دکتر صالح‌نیا که با برخورداری از دید علمی و پژوهشی وسیع، از انجام هیچ کمکی در انجام این تحقیق دریغ نکردند.

دو بال پرطاقت برای پروازم

پدر و مادرم

همسر محترمم که سختی‌های بسیاری را در طول این دوره تحصیل تحمل کردند و چون دوستی لایق و مهربان همواره مشاور و مشوقم بودند.

گل زندگیم « آیسا » که نور دیدگانم می‌باشد.

برادران و خواهران خوبم و خانواده همسرم که وجود عزیزشان همواره در سختی‌ها و ناملایمات زندگی تکیه‌گاه من بوده است.

تشکر و قدردانی

زبان برای گفتن و قلم برای نوشتن کلامی را زیباتر از تشکر نمی‌شناسد که تشکر نهایت بندگی در برابر خالق و اوج تواضع در برابر مخلوق است. با خالصانه‌ترین مراتب تقدیر و تشکر از :

استاد ارجمند و عزیزم سرکار خانم دکتر مژده صالح‌نیا که برایم راهنمایی فرزانه و معلمی دلسوز بوده و همواره از رهنمودهای استادانه و حمایت‌های بی‌شائبه ایشان در مراحل مختلف انجام، تهیه و تنظیم این رساله بهره‌مند بودم.

استاد محترم جناب آقای دکتر عبدالامیر علامه که از مساعدت ایشان در امر مشاوره این رساله برخوردار بوده‌ام.

استاد گرانقدرم جناب آقای دکتر مجتبی رضازاده که در طول مدت زمان تحصیل و تحقیقم همیشه از راهنماییهای ایشان استفاده نمودم.

استاد بزرگوار جناب آقای دکتر تقی الطریحی که با راهنماییهای بی‌دریغ و مساعدت همیشگی‌شان مرا در طول تحصیل یاری نمودند.

استاد ارجمند سرکار خانم دکتر منصوره موحدین که با راهنماییهایشان مرا در اجرای بهینه این تحقیق و در طول تحصیل یاری نمودند.

همکلاسی‌های عزیز و دوست داشتنیم: آقایان و خانم‌ها: غلامرضا کاکا، عباس پیریایی، پیام محمد غریبانی، زهره ماکولاتی

دوستان و سروران محترم: آقایان و خانم‌ها: هادی حسن‌زاده، دکتر جعفر حسنی، دکتر سعید زواره، شهرام پوربیرانوند، سعیده ابراهیمی، محمدلو، مجید نقدی، فاطمه پیغمبری، فروزان آبسالان، محسن مسلم، زهره مظاهری، مؤمنه محمدی، اصغری، عبدالوهاب تقوی، فتحی، دکتر طاهره مازوچی، دکتر کامران حیدری، ابوالفضل دادخواه و داودئیان که مرا در طول تحقیق یاری نمودند.

کارشناسان گروه بیوشیمی: سرکار خانم اعتمادی‌کیا و سرکار خانم افشار نادری

کارشناسان مرکز بیوتکنولوژی کشاورزی کرج: جناب آقای دکتر داریوش داودی

کلیه اساتید و یا همکارانی که به انحاء مختلف مزاحم وقت عزیزشان شده‌ام ولی اسامی شریفشان از قلم افتاده است.

چکیده

تغییر شرایط فیزیکی و شیمیایی بافت تخمدانی و عملکردی آن در طی پروسه انجمادی و بلوغ آزمایشگاهی موجب اکسیداتیو استرس می‌شود. برای جلوگیری از تشکیل اکسیداتیو استرس، آنتی‌اکسیدان استفاده می‌شود و سلنیوم به‌عنوان بخش ضروری تعدادی از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شناخته شده است.

اندازه‌گیری گونه‌های واکنش‌گر اکسیژنی و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل ابزار مفید برای ارزیابی شرایط کشت است. تخمدان‌های موش NMARI ١٤-١٢ روزه پس از جمع‌آوری برای گروه‌های آزمایشی زیر بکار گرفته شدند:

آزمایش اول : مقایسه انجماد شیشه‌ای پوشش مستقیم با استفاده از غلظت‌های ٤ ، ٦ و ٨ مول با انجماد شیشه‌ای رایج و برای هر گروه تست سمیت مربوطه در نظر گرفته شد. پس از انجماد – ذوب درصد زنده ماندن فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده، مورفولوژی و فراساختاری تخمدان‌ها مطالعه شد.

آزمایش دوم : فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده در TCM199 در حضور غلظت‌های مختلف سدیم سلنیت (٠ ، ٥ ، ١٠ و ١٥ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و سرم آلبومین گاوی (٣ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و یا سرم جنین گاوی (٥ درصد) کشت شدند و سپس القاء تخمک‌گذاری با ١/٥ واحد بر میلی‌لیتر گنادوتروپین جفتی صورت پذیرفت. درصد زنده ماندن، قطر فولیکول‌ها و تشکیل آنتروم و همچنین قطر و تکوین تخمک‌ها و تکوین جنینی ارزیابی شد.

آزمایش سوم : میزان ROS تولید شده در فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان منجمد شده و نشده پس از ٠ ، ١٢ ، ٢٤، ٤٨ ، ٧٢ و ٩٦ ساعت کشت در حضور غلظت‌های مختلف سدیم سلنیت ارزیابی شد. همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل و میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز بررسی شد.

نتایج آزمایش اول نشان داد که میزان زنده ماندن و مورفولوژی طبیعی فولیکول‌های اولیه و پره‌آنترال حاصل از گروه انجمادی رایج بالاتر از گروه حاصل از پوشش مستقیم بود (P<0.001) و ساختار فولیکول‌ها در گروه انجمادی رایج مشابه گروه غیرانجمادی کاملاً حفظ شده بود، اما تعدادی علائم دژنراسیون در فولیکول‌های حاصل از گروه انجمادی پوشش مستقیم مشاهده شد.

نتایج آزمایش دوم نشان داد که میزان زنده ماندن فولیکول‌های کشت شده در حضور سرم جنین گاوی و غلظت‌های ٥ و ١٠ نانوگرم بر میلی‌لیتر سدیم سلنیت (به ترتیب ٨٨/٢٣ و ٩٠/٨٣ درصد) بالاتر از گروه‌های دیگر بود (به ترتیب P<0.05 و P<0.001).

میانگین قطر فولیکول‌ها (١٥/٥٨ ± ١٩٩/٨٤ میکرومتر) و درصد تخمک‌های متافاز دوم (٣٣/٠٨ درصد) در فولیکول‌های کشت شده در حضور سرم جنین گاوی و غلظت ١٠ نانوگرم بر میلی‌لیتر سدیم سلنیت بالاتر بود.

نتایج آزمایش سوم نشان داد که تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژنی در فولیکول‌های پره‌آنترال حاصل از تخمدان منجمد شده و نشده پس از ٢٤ ساعت کشت افزایش یافت و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل و فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز وابسته به سلنیوم کاهش یافت (P<0.005) ، در حالیکه در حضور سدیم سلنیت میزان گونه‌های واکنش‌گر اکسیژنی کاهش و فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز وابسته به سلنیوم و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل پس از ٩٦ ساعت کشت این فولیکول‌ها افزایش یافت و تفاوت معنی‌داری بین فولیکول‌های پره‌آنترال حاصل از تخمدان منجمد شده و نشده مشاهده نشد. میزان گونه‌های واکنش‌گر اکسیژنی در فولیکول‌های پره‌آنترال کشت شده ارتباط منفی با ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل و فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز داشت.

به‌طور کلی نتایج نشان داد که فولیکول‌های کشت شده در حضور سرم جنین گاوی و غلظت ١٠ نانوگرم بر میلی‌لیتر سدیم سلنیت، بلوغ و رشد بهتری داشتند و این اثرات با کاهش میزان گونه‌های واکنش‌گر اکسیژنی تولید شده و یا افزایش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل در طی کشت مداخله می‌شود.

کلید واژه‌ها : گلوتاتیون پراکسیداز ، فولیکول‌های پره‌آنترال ، گونه‌های واکنش‌گر اکسیژنی، ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل و انجماد شیشه‌ای

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. پیشگفتار ۲

۱-۲. کشت و بلوغ فولیکول‌های تخمدانی در شرایط کشت ٤

۱-۳. انجماد بافت تخمدانی ٦

۱-٤. رادیکال‌های آزاد ۸

۱-٤-۱. انواع رادیکال‌های آزاد ۹

۱-٤-۱-۱. گونه‌های واکنش‌گر اکسیژنی (ROS) ۹

۱-٤-۱-۲. گونه‌های واکنش‌گر نیتروژنی (RNS) ۱۰

۱-٤-۲. منابع رادیکال‌های آزاد ۱۱

۱-٤-۳. استرس اکسیداتیو (OS) ۱۲

۱-٤-٤. ROS و سیستم تولیدمثل ۱۲

۱-٤-٤-۱. ROS و فولیکول ۱۲

۱-٤-٤-۲. ROS و تخمک ۱۳

۱-٤-٤-۳. ROS و لقاح ۱۵

۱-٤-٤-٤. ROS و جسم زرد ۱٦

۱-٤-٤-۵. ROS و جنین ۱۷

۱-٤-٤-٦. ROS و اندومتریوم ۱۸

۱-٤-٤-۷. ROS و جفت ۱۹

۱-۵. دفاع آنتی‌اکسیدانی ۱۹

۱-۵-۱. انواع آنتی‌اکسیدان‌ها ۱۹

۱-۵-۲. گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) ۲۰

۱-۵-۲-۱. انواع GPx ۲۱

۱-۵-۲-۲. عملکرد GPx ۲۱

۱-۵-۳. سلنیوم ۲۳
۱-٦. اهداف تحقیق ۲۷
۱-۷. فرضیه‌ها ۲۷

فصل دوم: مواد و روشها ۲۸
۲-۱. تهیه و نگهداری موش ۲۹
۲-۲. نمونه برداری ۲۹
۲-۳. مراحل تحقیق ۳۰
۲-٤. مرحله اول ۳۰
۲-٤-۱. انجماد شیشه ای CV ۳۰
۲-٤-۱-۱. تهیه محلول انجمادی ۳۰
۲-٤-۱-۲. روش انجمادشیشه ای ۳۲
۲-٤-۲. انجماد شیشه‌ای DCV ۳۲
۲-٤-۲-۱. تهیه محلول‌های انجمادی و تست شیشه‌ای شدن محلول‌ها ۳۲
۲-٤-۲-۲. روش انجماد شیشه ای ۳۳
۲-٤-۳. ذوب تخمدان ۳٤
۲-٤-۳-۱. محلول‌های مورد نیاز ۳٤
۲-٤-۳-۲. روش کار ۳٤
۲-٤-٤. تست سمیت ۳٤
۲-٤-۵. ارزیابی فولیکول ۳۵
۲-٤-۵-۱. مطالعه مورفولوژیکی فولیکولها ۳۵
۲-٤-۵-۲. تعیین درصد زنده ماندن فولیکول‌ها ۳٦
۲-٤-۵-۳. بررسی فراساختار تخمدان‌ها ۳٦
۲-٤-۵-۳-۱. ثبوت ۳۷
۲-٤-۵-۳-۲. آبگیری ۳۷

۲-٤-٥-۳-۳. آغشتگی ۳۷
۲-٤-٥-۳-٤. قالب گیری ۳۸
۲-٤-٥-۳-٥. برش گیری ۳۸
۲-٤-٥-۳-٦. رنگ آمیزی ۳۹
۲-٤-٦. بررسی آماری ٤۰
۲-٥. مرحله دوم: کشت فولیکول و تعیین غلظت مناسب سلنیوم (SS) در محیط کشت حاوی BSA و یا FBS . ٤۱
۲-٥-۱. مواد و وسایل لازم جهت کشت فولیکول ٤۱
۲-٥-۲. جداسازی فولیکول‌ها از تخمدان ٤۲
۲-٥-۳. کشت فولیکول ٤۲
۲-٥-٤. اندازه‌گیری قطر فولیکول‌ها در روزهای دوم وچهارم کشت ٤۳
۲-٥-٥. ارزیابی تغییرات مورفولوژیک و ارزیابی میزان بقا فولیکول‌ها پس از طی دوره کشت ۱۲ روز ٤۳
۲-٥-٦. القاء تخمک‌گذاری ٤٤
۲-٥-۷. بررسی آماری ٤٤
۲-٦. مرحله سوم: بررسی میزان تولید ROS، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در کشت فولیکول‌ها ٤٤
۲-٦-۱. روش انجام کشت فولیکول‌ها ٤٥
۲-٦-۲. اندازه‌گیری میزان تولید ROS در کشت فولیکول‌ها ٤٥
۲-٦-۲-۱. محلول‌های مورد نیاز ٤٦
۲-٦-۲-۲. روش spectrofluorometery ٤٦
۲-٦-۲-۳. روش in situ با میکروسکوپ confocal ٤۷
۲-٦-۳. اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) فولیکول‌های کشت شده ٤۷
۲-٦-۳-۱. محلول‌های مورد نیاز ٤۸
۲-٦-۳-۲. روش کار ٤۹
۲-٦-٤. اندازه‌گیری میزان پروتئین ٤۹
۲-٦-٤-۱. محلول‌های مورد نیاز ٥۰

۲-٦-٥. ارزیابی فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز فولیکول‌های کشت شده ٥٠
۲-٦-٥-١. محلول‌های مورد نیاز ٥١
۲-٦-٥-٢. روش کار ٥٢
۲-٦-٥-٣. رسم منحنی استاندارد ٥٢
۲-٦-٥-٤. فعالیت آنزیم ٥٢
۲-٦-٦. مراحل لقاح ٥٣
۲-٦-٧. بررسی آماری ٥٣

فصل سوم: نتایج ٥٥
۳-١. نتایج مرحله اول ٥٦
۳-١-١. میزان بقاء فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان‌های منجمد شده ٥٦
۳-١-٢. میزان فولیکول‌های نرمال و طبیعی پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین -ائوزین ٥٧
۳-١-٣. مشاهدات میکروسکوپ نوری ٥٨
۳-١-٣-١. تخمدان های گروه کنترل و بدون انجماد ٥٨
۳-١-٣-٢. تخمدان های منجمد شده به روش Conventional Vitrification ٥٨
۳-١-٣-٣. تخمدان های منجمد شده به روش Direct Cover Vitrification ٥٨
۳-١-٣-٤. تخمدان های مورد تست سمیت قرار گرفته ٥٩
۳-١-٤. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی ٥٩
۳-١-٤-١. فراساختار تخمک ٥٩
۳-١-٤-١. فراساختار سلول‌های گرانولوزا ٦٠
۳-٢. نتایج مرحله دوم ٦١
۳-٢-١. مرفولوژی فولیکول‌ها در دوره کشت ٦١
۳-٢-٢. میزان رشد فولیکول‌های کشت شده در حضور غلظت‌های مختلف سدیم سلنیت ٦٢
۳-٢-٣. تکوین فولیکول‌های کشت شده در حضور مقادیر مختلف سدیم سلنیت ٦٣
۳-٢-٤. تغییرات قطر تخمک در طول کشت در گروه انجمادی و غیرانجمادی ٦٤

۳-۳. نتایج مرحله سوم ٦٤
۳-۳-۱. میزان ROS تولید شده در فولیکول‌های پره‌آنترال کشت شده ٦٥
۳-۳-۱-۱. نتایج اندازه‌گیری کمی ROS با اسپکتروفلورمتری ٦٥
۳-۳-۱-۲. نتایج بررسی کیفی ROS با میکروسکوپ لیزری Confocal ٦٧
۳-۳-۲. غلظت آنتی‌اکسیدان کل (TAC) در فولیکول‌های پره‌آنترال کشت شده ٦٩
۳-۳-۳. نتایج میزان پروتئین فولیکول‌های پره‌آنترال کشت شده ٧١
۳-۳-٤-۱. میزان فعالیت ویژه گلوتاتیون پراکسیداز وابسته به سلنیوم در فولیکول‌های پره‌آنترال کشت شده ٧٢
۳-۳-٤-۲. فعالیت ویژه آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز مستقل از سلنیومی ٧٤
۳-۳-۳-۲. تکوین جنین‌های حاصله از فولیکول‌های پره‌آنترال تا مرحله بلاستوسیست خارج شده از زونا ٧٦
۳-۳-۳-٤. نتایج شمارش سلولی بلاستوسیست‌های حاصل از کشت فولیکول‌های پره‌آنترال ٧٧

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ٩٩
٤-۱. مقایسه تخمدان‌های منجمد شده با دو روش انجماد شیشه‌ای CV و DCV ١٠٠
٤-۲. اثر سدیم سلنیت بر رشد و بلوغ فولیکول‌های پره‌آنترال کشت شده در حضور FBS و یا BSA ١٠٣
٤-۳. اثر سدیم سلنیت بر میزان ROS تولید شده در فولیکول‌های پره‌آنترال کشت شده در گروه کنترل و انجمادی ١٠٧
٤-٤. ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل (TAC) فولیکول‌های پره‌آنترال کشت شده ١٠٩
٤-٥. فعالیت ویژه گلوتاتیون پراکسیداز در حضور غلظت‌های مختلف سدیم سلنیت ١١١
٤-٦. تأثیر سدیم سلنیت در محیط کشت فولیکول‌های پره‌آنترال بر تکوین جنین‌های حاصله ١١٥
٤-٧. نتیجه‌گیری نهایی ١١٧
٤-٨ پیشنهادها ١١٨

فهرست منابع ١١٩
چکیده انگلیسی ١٣٥

فهرست جداول

جدول ۲-۱ . مراحل آب گیری طی انجماد شیشه ای DCV ۳۳

جدول ۲-۲. گروه‌های مورد مطالعه در مرحله دوم مطالعه ٤۳

جدول ۲-۳. نحوه تهیه محلول‌های استاندارد یون آهن ٤۹

جدول ۳-۱. میزان فولیکول های پره آنترال زنده حاصل از تخمدان های منجمدشده و نشده و گروه تست سمیت پس از رنگ آمیزی با تریپان بلو ۷۸

جدول ۳-۲. میزان فولیکول های با مورفولوژی طبیعی تخمدان های منجمدشده و نشده و گروه تست سمیت پس از رنگ آمیزی H&E ۷۹

جدول ۳-۳. قطر فولیکول های پره آنترال (µm) کشت شده در محیط کشت حاویFBS و یا BSA در حضور غلظت های مختلف سدیم سلنیت (ng/ml) ۸۰

جدول ۳-٤. تکوین فولیکول‌های پره آنترال کشت شده در محیط کشت حاوی FBS و یا BSA در حضور غلظت های مختلف سدیم سلنیت (ng/ml) ۸۲

جدول ۳-۵. قطر تخمک (µm) فولیکول های پره آنترال کشت شده در محیط کشت حاوی FBS و BSA در حضور غلظت های مختلف سدیم سلنیت (ng/ml) ۸۱

جدول۳-٦. میزان ROS تولید شده (µM H2O2) در فولیکول های پره آنترال کشت شده حاصل از تخمدان انجمادی و غیر انجمادی در حضور غلظت های مختلف سدیم سلنیت ۸۳

جدول۳-۷. ظرفیت آنتی اکسیدان کل (µmol/µl) در فولیکول های پره آنترال کشت شده حاصل از تخمدان انجمادی و غیر انجمادی در حضور غلظت های مختلف سدیم سلنیت ۸٤

جدول۳-۸. میزان پروتئین (mg/ml) در فولیکول های پره آنترال کشت شده حاصل از تخمدان انجمادی و غیر انجمادی در حضور غلظت های مختلف سدیم سلنیت ۸۵

جدول۳-۹. میزان فعالیت ویژه گلوتاتیون پراکسیداز وابسته به سلنیوم (µmol/min/mg protein) در فولیکول‌های پره آنترال کشت شده حاصل از تخمدان انجمادی و غیر انجمادی در حضور غلظت های مختلف سدیم سلنیت ۸٦

جـدول۳-۱۰. میـزان فعالیـت ویـژه گلوتـاتیون پراکـسیداز مـستقل از سـلنیوم (µmol/min/mg protein) در فولیکول‌های پره آنترال کشت شده حاصل از تخمـدان انجمـادی و غیـر انجمـادی در حـضور غلظـت هـای مختلف سدیم سلنیت ۸۷

جدول ۳-۱۱. میزان باروری و تکوین جنین‌های حاصل از کشت فولیکول‌هـای ایزولـه شـده در گـروه هـای مختلف پس از ۱۲۰ ساعت کشت ۸۸

فهرست شکل‌ها

شکل ۳-۱. رنگ آمیزی فولیکول پره آنترال با تریپان بلو. ۸۹

شکل ۳-۲. مورفولوژی فولیکول های پره آنترال تخمدان های غیرانجمادی، انجماد شیشه ای و گروه تست سمیت با رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین ۹۰

شکل ۳-۳. مقاطع نیمه نازک از فولیکول های پره آنترال در تخمدان منجمد شده به روش DCV ۹۱

شکل ۳-٤. الکترومیکروگراف تخمک موجود در فولیکول پره آنترال بافت تخمدان منجمد شده و نشده موش ۹۲

شکل ۳-۵. الکترومیکروگراف ازسلول های گرانولوزای فولیکول پره آنترال بافت تخمدان منجمد شده و نشده موش. ۹۳

شکل ۳-٦. مورفولوژی فولیکول‌های پره آنترال کشت شده در محیط کشت TCM 199 حاوی FBS و سدیم سلنیت ۹٤

شکل ۳-۷. تصاویر میکروسکوپ confocal از فولیکول های پره آنترال حاصل از تخمدان منجمد شده و نشده در حضور H_2O_2 (کنترل مثبت). ۹۵

شکل ۳-۸. تصاویر میکروسکوپ confocal از فولیکول های پره آنترال کشت شده حاصل از تخمدان منجمد نشده (کنترل) و شده در غیاب سدیم سلنیت. ۹٦

شکل ۳-۹. تصاویر میکروسکوپ confocal از فولیکول های پره آنترال کشت شده حاصل از تخمدان منجمد نشده (کنترل) در حضور غلظت های مختلف سدیم سلنیت. ۹۷

شکل ۳-۱۰. تصاویر میکروسکوپ confocal از فولیکول های پره آنترال کشت شده حاصل از تخمدان منجمد شده در حضور غلظت های مختلف سدیم سلنیت. ۹۸

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات انجام

۱-۱. پیشگفتار

فاکتورهای اندوکرینی و پاراکرینی مختلف در فرایند رشد فولیکول و بلوغ تخمک درگیرند. سیستم‌های کشت فولیکولی در in vitro اجازه تشخیص این فاکتورها و شناخت مکانیسم‌های عملکردی آنها را می‌دهد [۸-۱].

توسعه سیستم‌های کشت فولیکولی نه تنها نقش مهمی در تحقیقات فیزیولوژیک تخمدانی دارد بلکه کاربردهای بالینی نیز دارد. بنابراین کشت فولیکولی می‌تواند منجر به تولید تخمک‌های بالغ و بالقوه شده که توانایی باروری داشته و از آن جنین‌های زنده حاصل شود. علاوه بر این کشت فولیکولی می‌تواند باعث حفظ قدرت باروری زنان جوان مبتلا به سرطان و یا افراد مبتلا به نقص تخمدانی زودرس شود. در چنین مواردی شاید مؤثرترین روش درمانی، انجماد- ذوب بافت تخمدانی و تکوین فولیکولی در in vitro است [٤].

بنابراین هر دو فرایند کشت فولیکولی و انجماد تخمدان قبل از اینکه کاربردهای بالینی داشته باشند نیاز به بهبود شرایط دارند. در این زمینه تلاش‌های زیادی صورت پذیرفته تا با تغییرات در نوع و غلظت ضدیخ بکار گرفته شده در تکنیک‌های انجماد و ذوب و وسایل انجمادی باعث بهبود شرایط شوند.

از طرفی فرایندهای تکوینی و تولیدمثل همراه با تغییرات پویا در متابولیسم و مصرف انرژی بوده که متعاقب آن موجب تولید رادیکال‌های آزاد (ROS)[1] از جمله رادیکال‌های سوپراکسید، هیدروژن پروکسید و رادیکال هیدروکسیل می‌شود. هر چند که مقدار محدود ROS به‌عنوان مولکول‌های

[1] Reactive oxygen species

سیگنالی در فرایندهای تولیدمثلی نظیر فولیکول‌زایی، تخمک‌گذاری، بلوغ تخمک، اتصال اسپرم با تخمک و رشد نقش دارد اما تولید بیش از حد آن منجر به اکسیداتیو استرس و صدمات جبران ناپذیر در سلول می‌گردد علاوه بر این در شرایط in vitro و فرایندهای انجماد و ذوب میزان ROS افزایش می‌یابد [۹ و ۱۰ و ۱۱] . به همین علت افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به محیط کشت اجتناب ناپذیر بوده و بیشتر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی دارای سلنیوم در جایگاه فعال خود بوده و سلنیوم نقش مهمی در بیان این آنزیم‌ها دارد که موجب فعال شدن این آنزیم‌ها و حذف اکسیداتیو استرس از محیط کشت می‌شود [۱۴-۱۲].

بنابراین اندازه‌گیری میزان ROS تولید شده در فولیکول‌های پره‌آنترال کشت شده و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل این فولیکول‌ها شاخص مهم در نشان‌دادن شرایط کشت آنها است. همچنین اندازه‌گیری میزان فعالیت ویژه گلوتاتیون پراکسیداز نشان‌دهنده آن است که آیا سلنیوم توانسته است موجب بیان این آنزیم‌ها و متعاقب آن جاروب رادیکال‌های آزاد گردد.

بنابراین در این تحقیق برای اولین‌بار به اندازه‌گیری میزان ROS و میزان فعالیت ویژه آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در فولیکول‌های پره‌آنترال کشت شده پرداخته شده و از آزمون FRAP [1] برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل فولیکول‌های پره‌آنترال کشت شده استفاده شد و نیز به مقایسه دو روش انجماد شیشه‌ای پوشش مستقیم و رایج (Conventional و Direct cover) پرداخته شد.

بنابراین سؤالات اصلی تحقیق چنین خواهد بود:

۱- آیا میزان زنده‌ماندن فولیکول‌ها وحفظ ساختار بافتی پس از انجماد شیشه‌ای Direct cover و Conventional نسبت به گروه شاهد تفاوت دارد.

۲- آیا استفاده از سدیم سلنیت در غلظت‌های مختلف در محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی (FBS) و یا آلبومین سرم گاوی (BSA) تغییراتی را در رشد و بلوغ فولیکول‌های پره‌آنترال حاصل از تخمدان‌های تازه و منجمد شده ایجاد خواهد کرد و در کدام غلظت بهترین شرایط بلوغ خواهد بود.

[1] Ferric Reducing / Antioxidant Power

۳- آیا افزودن سدیم سلنیت باعث تغییر در میزان ROS تولید شده، ظرفیت کل آنتی‌اکسیدان و میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز فولیکول‌های پره‌آنترال کشت شده حاصل از تخمدان‌های انجمادی و غیرانجمادی می‌شود.

٤- آیا افزودن سدیم سلنیت موجب تکوین بهتر فولیکول‌های پره آنترال حاصل از تخمدان‌های انجمادی و غیرانجماد می‌شود.

۱-۲. کشت و بلوغ فولیکول‌های تخمدانی در شرایط کشت

فولیکول‌ها واحد عملکردی و ساختمانی تخمدان پستانداران هستند که شامل تخمک، سلول‌های گرانولوزای اطراف، غشاء پایه و سلول‌های تکای مجاور غشاء پایه می‌باشند [۱۵].

فولیکولوژنزیس فرآیند پویا بوده که گروهی از فولیکول‌ها در مراحل مختلف تکوینی برای ادامه رشد و بلوغ انتخاب می‌شوند و در نهایت منجر به بلوغ تخمک و باروری می‌شوند [١٦] و شامل سه مرحله رشد، تشکیل فولیکول‌های آنترال و بلوغ تخمک می‌باشد. تشخیص و تمایز فاکتورهای پیشبرنده رشد فولیکولی، تکوین و یا القاء آترزی یکی از اهداف اصلی برنامه تحقیقاتی فولیکولوژنزیس را تشکیل می‌دهد و انتخاب مرحله‌ای از رشد فولیکول که بتواند در in vitro تکوین یافته و بالغ شود اهمیت فراوانی دارد [۱۷] و مدل‌های جوندگان بیشترین کاربرد را در مطالعه تکوین in vitro فولیکول‌ها دارند و در حال حاضر موش تنها گونه‌ای است که فرآیند کشت کامل in vitro از مرحله بدوی تا تولد زنده حاصل شده است [۱۸]. فولیکول‌های بدوی به علت زمان طولانی کشت و مشکل بودن جداسازی آنها کمتر در کشت in vitro استفاده می‌شوند [۱۸]. البته Liu و همکارانش در سال ۲۰۰۰ از روش دو مرحله‌ای برای فولیکول‌های بدوی استفاده کردند که در مرحله اول تخمدان موش تازه متولد شده که فقط حاوی فولیکول‌های بدوی است در زیر کپسول کلیه کشت داده شدند و در مرحله دوم فولیکول‌هایی که به مرحله پره‌آنترال رسیده بودند را جدا کرده و کشت نمودند [۱۹].

امروزه بیشتر در کشت in vitro از فولیکول‌های پره‌آنترال حساس به گنادوتروپین‌ها استفاده می‌کنند که اگر گنادوتروپین‌ها در محیط کشت اضافه شوند رشد فولیکولی بهتری را نشان می‌دهند. همچنین حداقل آترزی و آپوپتوز سلول‌های گرانولوزا در فولیکول‌های پره‌آنترال در in vivo اتفاق می‌افتد [۲ و ۲۰].

سیستم‌های کشت مختلفی در in vitro برای فولیکول‌های پره‌آنترال توسعه یافته است که به تولید تخمک‌های صلاحیت‌دار و جنین زنده منتهی شده است و همه این سیستم‌های کشت مرحله جداسازی فولیکول‌های پره‌آنترال را از تخمدان دارند [۲۳-۲۱].

فاکتورهای پاراکرینی و اندوکرینی مختلف به محیط کشت فولیکول‌ها اضافه می‌شوند که اثرات مختلفی در ارتباط با سیستم کشت و گونه‌های مختلف دارند. فولیکول‌های تخمدان موش عمدتاً در محیط کشت حاوی سرم کشت می‌شوند که سرم به‌عنوان منبع پروتئینی برای پشتیبانی رشد فولیکول‌ها در in vitro استفاده می‌شود. تشخیص فاکتورهای رشد و پروتئین‌های حامل در سرم و ضرورت آن برای تکوین فولیکولی هنوز هم مهمترین مسائل در کشت in vitro است.

حضور غلظت بالای سرم در کشت فولیکول‌های پره‌آنترال شرایط ناکافی برای مطالعات فیزیولوژیکی در in vitro ایجاد می‌کنند بعلاوه سرم پروتئین‌های شناخته شده و ناشناخته متعددی را فراهم می‌کند که می‌تواند با افزودنی‌های دیگر واکنش دهد از طرف دیگر حذف سرم از محیط کشت فولیکولی آپوپتوز را در فولیکول‌ها القاء می‌کند [۳ و ۲٤].

Mitchels و همکارانش در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که فولیکول‌های پره‌آنترال که در محیط کشت حاوی سرم کشت شده بودند در مقایسه با آنهایی که در محیط کشت حاوی آلبومین سرم انسانی (HAS)[1] کشت شده بودند، تفاوت معنی‌داری را مشاهده کردند و در محیط کشت حاوی سرم درصد زنده ماندن فولیکول‌ها بسیار بالاتر بود [۳ و ۲٤].

فاکتورهای دیگر که به محیط کشت اضافه می‌شوند شامل گنادوتروپین‌ها، فاکتورهای رشد (IGF و EGF)، انسولین ترانسفرین و سلنیوم است [۸-۵] . گنادوتروپین‌ها (FSH و LH) تولید استرادیول و

[1] Human Albomin Serum