Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol.14, No.4, Winter 2014, Pages 331-339

Effect of Different Concentrations of Melatonin on Live Births Resulting from the Transfer of Two-Cell Embryos of NMRI Mice

Saadati M[1*], Taheri M[2], Bahadori MH[3]

[1]Department of Anatomy, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
[2]Medical Education Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
[3]Molecular and Cellular Research Center, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
*Corresponding Author: Tel: +989375699609 Fax:+984532537019 E-mail: 90ana.saadati@gmail.com

Received: 7 Aug 2014 Accepted: 23 Oct 2014

ABSTRACT

Background & objectives: Infertility is a global problem affecting millions of men and women in developed and developing countries. In this regard, in-vitro fertilization (IVF) plays an important role in improving the quality of life in infertile patients. However, studies have shown that the implantation failure in IVF is the main challenge of this procedure. Melatonin can increase the survival rate of embryos and IVF success rate through eliminating free radicals and removing reactive oxygen species. So, this study is conducted to investigate the effects of different concentrations of melatonin on the rate of newborns of mice following transfer oftwo-cell embryos.

Methods: In this study, female mice with average age of six to eight weeks were superovulated by administering pregnant mares serum gonadotropin (PMSG) intraperitoneally (7.5 IU. ip), and followed after 48h by human chorionic gonadotropin (hCG) (7.5 IU. ip). Two-cell mouse embryos were obtained from female mice oviduct after 48 h. The embryos transferred bilaterally into pseudopregnant mice of the same strain through surgical procedure and 8-14 embryos were transferred to each tube. The study included 4 treatment groups and one control group (6 mice in each group). The treatment groups were exposed to subcutaneous injection of concentrations of 100 µm, 10 µm, 1 µm and 100 nm of melatonin. After the cesarean on 18th day of pregnancy, the percentage of live births was assessed. The outcomes of the live birth rate were assessed using the chi-square test and statistical analyses were carried out using SPSS version 16.0. Percentage of live birth was calculated and compared with the control group.

Results: A total of 701 two-cell mouse embryos were transferred into one control group and four experimental groups. The number and percentage of live births at concentrations of 100 µm and10 µm of melatonin and the control groups were 21 (15.55%), 13 (9.15%) and 9 (6.47%), respectively. No infant was born at the concentrations of 1 µM and 100 nM of melatonin. The highest rate of live births was obtained at the concentration of 100 µM and showed a significant difference with the control group ($p \leq 0.01$). There was no significant difference in live births at the concentration of 10 µm and control group.

Conclusion: The results of this study indicated that subcutaneous injection of melatonin improves the two-cell mouse embryo growth and post implantation development of mice.

Keywords: Melatonin; Live birth; 2-cell embryo; Mouse

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-05-17]

بررسی اثر غلظتهای متفاوت ملاتونین برروی میزان تولدهای زنده حاصل از انتقال جنین های دو سلولی موش سوری نژاد NMRI

مهدی سعادتی[1]، ماهدخت طاهری[2]، محمد هادی بهادری[3]*

[1]گروه علوم تشریحی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران [2]مرکز تحقیقات آموزش پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران [3]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

*نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۳۷۵۶۹۹۶۰۹ فاکس: ۰۴۵۳۲۵۳۷۰۱۹ پست الکترونیک: 90ana.saadati@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: ناباروری معضلی جهانی است و میلیون ها مرد و زن را در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه تحت تأثیر قرار داده است. در این راستا لقاح آزمایشگاهی ((In-vitro fertilization (IVF)) نقش حیاتی بازی می کند. مطالعات انجام شده در لقاح آزمایشگاهی نشان داده است که فقدان لانه گزینی دلیل اصلی نتایج ناموفق لقاح آزمایشگاهی می باشد. ملاتونین می تواند میزان زنده ماندن جنین و میزان موفقیت لقاح آزمایشگاهی را افزایش دهد و این کار را با حذف رادیکال های آزاد و از بین بردن گونه های فعال اکسیژن ((oxygen reactive species (ROS)) انجام می دهد. این مطالعه به منظور بررسی اثر غلظت های متفاوت ملاتونین برروی میزان نوزادان زنده متولد شده حاصل از انتقال جنین های دوسلولی موش سوری طراحی شد.

روش کار: در این مطالعه، با تزریق ۷/۵ واحد هورمون گنادوتروپین سرم اسب باردار ((pregnant mares serum gonadotropin) (PMSG)) و سپس همین میزان هورمون گنادوتروپین جفتی انسانی (human (chorionic gonadotropin) (hCG)) ٤٨ ساعت بعد بصورت داخل صفاقی، تخمک گذاری در موش های ماده ی ۸-۶ هفته ای نژاد NMRI تحریک شد. ٤٨ ساعت بعد از آن جنین های دوسلولی از لوله های رحمی موش های ماده بدست آمد. جنین های دوسلولی به موش های سوری حامله ی کاذب از نژاد مشابه از طریق جراحی و به صورت دوطرفه انتقال داده شدند. به هر لوله ١٤-٨ جنین انتقال داده شد. مطالعه شامل ٤ گروه آزمایش و یک گروه کنترل (۶ موش در هر گروه) می باشد. گروه های آزمایش با تزریق زیرجلدی ملاتونین با غلظت های ۱۰۰ میکرومولار، ۱۰ میکرومولار، ۱ میکرومولار و ۱۰۰ نانومولار تیمار شدند. بعد از سزارین در روز ۱۸ بارداری، درصد تولدهای زنده مشخص شدند. نتایج با استفاده از آزمون آماری مجذور کای (chi-square test) ارزیابی شد و تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ver 16/0 انجام گرفت. درصد تولدهای زنده محاسبه و با گروه کنترل مقایسه شد.

یافته ها: ۷۰۱ جنین دوسلولی به یک گروه کنترل و ٤ گروه آزمایش موش سوری انتقال داده شدند. نتایج نشان داد که تعداد و درصد نوزادان متولد شده در غلظت های ۱۰۰ میکرومولار، ۱۰ میکرومولار ملاتونین و گروه کنترل به ترتیب ۲۱ (۱۵/۵۵٪)، ۱۳ (۹/۱۵٪) و ۹ (۶/٤۷٪) بود و در غلظت های ۱ میکرومولار و ۱۰۰ نانومولار، هیچ نوزاد زنده ای متولد نشد. بیشترین میزان تولد زنده در غلظت ۱۰۰ میکرومولار بدست آمد و تفاوت معنی داری با گروه کنترل نشان داد ($p \leq 0.0001$). میزان تولدهای زنده در غلظت ۱۰ میکرومولار و گروه کنترل تفاوت معناداری را نشان ندادند.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان می دهد که تزریق زیر جلدی ملاتونین روند رشد جنین دو سلولی موش و تکامل پس از جایگزینی موش سوری را بهبود می بخشد.

کلمات کلیدی: ملاتونین، جنین دوسلولی، تولد زنده، موش سوری

دریافت: ۹۳/۵/۱۶ **پذیرش:** ۹۳/۸/۱

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-05-17]

مقدمه

ناباروری را عدم وقوع بارداری پس از گذشت یک سال از تلاش برای بارداری می دانند [۱]. ناباروری مشکلی جهانی است که میلیون ها مرد و زن را در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه تحت تأثیر قرار داده است. پیشرفت های اخیر در زمینه ناباروری، می تواند به زوج های نابارور با استفاده از روش‌های کمک باروری (ART)[1] امکان داشتن فرزند را بدهد. با این حال امیدهای ایجاد شده با استفاده از این روش ها به دلیل نتایج کم در بارداری های ایجاد شده، محدود می باشد. بر اساس بررسی های انجام شده در سال ۲۰۰۳، تنها ۳۵٪ از فرایندهای انتقال بعد ازART منجر به تولد نوزاد زنده می‌شود. عوامل فیزیولوژیکی و محیطی بسیاری می توانند موفقیت ART را تحت تأثیر قرار دهند [۲].

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 می‌کنند. در کشورهای توسعه یافته ناباروری شیوع بیشتری دارد؛ که عمده ترین دلیل آن به تعویق انداختن سن ازدواج است. تمرکز عموم مردم بر میزان رشد مراقبت بهداشتی در بسیاری از کشور های توسعه یافته وجود دارد. در چنین وضعیتی، از دیدگاه سیستم سلامت ملی، درمان ناباروری یکی از مهمترین موضوعات قابل بحث درباره روش های کمک باروری است [۱].

امروزه تحقیقات در حیطه ی علل ناباروری اهمیت چشمگیری پیدا کرده است ودر این زمینه زیست شناسی تولید مثل روز به روز جذاب تر میشود [۳]. مطالعات نشان داده است که رادیکال های آزاد در غلظت های فیزیولوژیک، در سیگنال دهی درون سلولی نقش دارد، بطوری که در فرآیندهای طبیعی تکثیر، تمایز و مهاجرت سلولی درگیر می باشد [٤]. در مسیر تولیدمثل، رادیکال های آزاد یک نقش دوجانبه بازی می کنند و می توانند عملکردهای تولید مثلی متنوع را تنظیم کنند و یا منجر به بیماری شوند. رادیکال های آزاد بایستی توسط آنتی اکسیدان های بدن از میان برداشته شوند. یکی از آنتی اکسیدان های درگیر برای حفاظت بدن از رادیکال های آزاد هورمون ملاتونین می باشد [۵].

ملاتونین (N–استیل ۵ متوکسی تریپتامین) مهمترین هورمون غده ی اپی فیز است. گزارشات نشان داده اند که هیپوتالاموس و هیپوفیز قدامی درتنظیم تولید مثل بوسیله ی ملاتونین نقش حیاتی بازی می کنند [۶]. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که ملاتونین یک حذف کننده مستقیم رادیکال های آزاد است. میزان بالای چربی دوستی ملاتونین، انتقال سریع آن را به سایر اندام‌ها و مایعات امکان پذیر کرده است و ملاتونین به راحتی از غشاءِ سلول ها عبور می‌کند. مقادیر بالایی از ملاتونین در مایع فولیکولی انسان یافت شده است [۷]. استفاده از ملاتونین به عنوان یک آنتی اکسیدان، فرصت هایی را برای مدیریت بیماریهایی مانند سرطان، اختلالات ایمونولوژیک، بیماری آلزایمر، دیابتها و عفونت های ویروسی فراهم میکند [۸].

با توجه به مطالعات متعدد، هنگام اضافه شدن ملاتونین در مرحله ی دوسلولی، میزان تکوین جنین های دو سلولی موش بهبود می یابد و در محیط کشت اثرات وابسته به غلظت ملاتونین بر روی تکوین جنین نشان داده شده است. بنابراین ملاتونین می تواند در مراحل خاصی از تشکیل جنین برای تحریک تشکیل بلاستوسیست در متابولیسم شرکت کند و میزان تکوین جنین های دوسلولی به بلاستوسیست و لانه گزینی جنین را به طور چشمگیری افزایش دهد [۹].

[1] Assisted Reproductive Technology

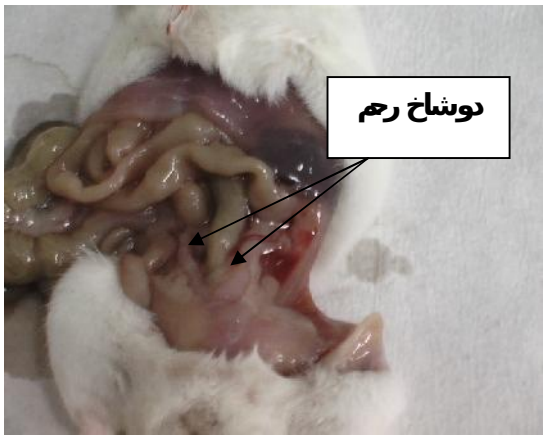
[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-05-17]

مطالعات نشان داداه اند که تیمار با ملاتونین شیوه ای موثر برای افزایش میزان باروری است [۱۰]. مطالعات انجام شده نشان داده است که فقدان لانه گزینی دلیل اصلی نتایج ناموفق لقاح آزمایشگاهی می باشد [۱۱]. دیده شده است که ملاتونین می تواند میزان زنده ماندن جنین و میزان موفقیت لقاح آزمایشگاهی را افزایش دهد [۱۲]. بالاترین دوز ملاتونین برای جنین واقعا مضر می باشد. سمیت ملاتونین می تواند باعث آسیب سلولی شود و کاهش میزان تشکیل بلاستوسیست مشاهده شده است [۱۳]. با توجه به مطالعات زیاد درباره ی فعالیت آنتی گنادوتروپیک ایندول های پینه آل، درباره ی اثر آن بر روی میزان حاملگی و تکوین جنین مطالعات کمی صورت گرفته است. یک تحقیق توسط چان[1] و همکارانش برای آزمایش اثر ملاتونین بر روی حاملگی و توسعه ی جنین پس از لانه گزینی در موشها انجام شده و نتایج نشان میدهد که ملاتونین در محیط in vivo اثر زیان آور روی نمو جنینی نداشته است [۱٤]. هدف از این مطالعه بررسی اثر غلظت های متفاوت ملاتونین برروی میزان نوزادان زنده متولد شده حاصل از انتقال جنین های دوسلولی موش سوری نژاد NMRI بود.

روش کار

در این مطالعه مواد مصرفی hCG (با شماره‌ی کاتالوگ C1063-1VL) و PMSG (با شماره‌ی کاتالوگ ۷۷۳۰۰-01.0) خریداری شدند و از موش سوری نژاد NMRI تهیه شده از مرکز تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی (کرج) استفاده شد. ابتدا موش های تهیه شده به مدت ۲ هفته در شرایط استاندارد دما، رطوبت، تغذیه و نور (۱۲ ساعت روشنایی-۱۲ ساعت تاریکی) در حیوان خانه‌ی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان نگهداری شدند تا با شرایط محیط سازگار شوند.

در مرحله ی اول تزریق داخل صفاقی هورمون PMSG و ٤۸ ساعت بعد از آن تزریق داخل صفاقی هورمون HCG به اندازه ی ۷-۵ واحد بین المللی انجام شد. پس از تحریک تخمک گذاری، هر موش ماده با موش نر از نژاد مشابه در یک قفس قرار گرفت. موش های ماده با واژینال پلاک مثبت صبح روز بعد (روز اول حاملگی) به عنوان اهدا کننده های جنین انتخاب شدند و ٤۸ ساعت بعد، موش ها در غیاب ماده ی بیهوشی برای جلوگیری از اثرات جانبی ماده ی بیهوشی، با جابجایی مهره ی گردنی کشته شدند [۱۵]. لوله های موش های دهنده یکی یکی جدا شدند و در یک محیط کشت برای تغذیه و بقای جنین ها (محلول T6) قرار گرفتند. جنین های دوسلولی از لوله های رحم موش ها بدست آمد (شکل ۱) و به قطره های T6 انتقال داده شدند و درانکوباتور با دی اکسید کربن ۵٪ و رطوبت ۱۰۰٪ و درجه حرارت ۳۷ درجه ی سانتی گراد قرار داده شدند.



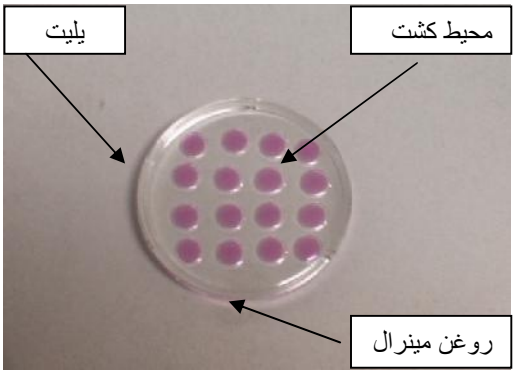
شکل ۱. تصویری از رحم دوشاخی در موش سوری را نمایش می دهد

مرحله ی دوم آماده سازی پیپت دهانی برای جابجا کردن جنین دو سلولی می باشد. قطر پیپت پاستور برای جابجایی جنین دو سلولی خیلی بزرگ است. بنابراین بایستی قبل از استفاده، سر آن به اندازه کمی

[1] Chan

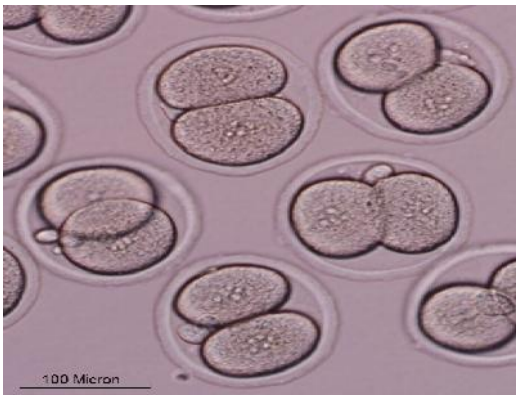
[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-05-17]

بزرگتر از قطر جنین دو سلولی نازک گردد. برای این منظور، در حالی که با دو دست دو طرف ظرف پیپت گرفته شده بود، قسمت باریک پیپت پاستور روی شعله گذاشته شد تا نرم شود، سپس پیپت به سرعت از شعله بیرون آورده شد و دو دست به دو طرف کشیده شد تا دو قسمت از هم جدا گردد، سپس با سر جدا شده ی پیپت، سر دیگر آن به آرامی شکسته شد، به گونه ای که قطر دهانه پیپت از قطرجنین دو سلولی کمی بزرگتر باشد. سپس پیپت زیر میکروسکوپ بررسی شد تا لبه آن دندانه دار نباشد، تا هنگام استفاده از آن به جنین آسیب وارد نکند. منافذ فیلتر تعبیه شده در پیپت دهانی بعد از مدتی استفاده مسدود می شد که در این صورت فیلتر آن تعویض می گردید. در مرحله ی سوم با استفاده از یک میکروپیپت قطرات ۱۰۰ میکرولیتری به طور منظم در ظرف کشت گذاشته شد(شکل ۲).



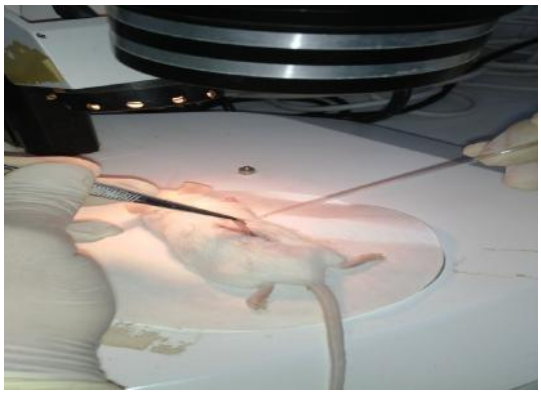
شکل ۲. قطره گذاری محیط کشت پوشیده شده با روغن مینرال در ظرف کشت

بلافاصله بعد از قرار دادن قطره ها روی ظرف کشت، با استفاده از یک پیپت ۵ میلی لیتری، روی قطره‌ها روغن مینرال ریخته شد تا pH و اسمولاریته محیط به هم نخورد. قبل از استفاده از محیط، حداقل به مدت ۱۶-۱۲ ساعت ظرف درون انکوباتور قرار داده شد تا دما و میزان گاز آن با دما و گاز انکوباتور موازنه گردد. بعد از گرفتن جنین های دو سلولی (شکل ۳)، با استفاده از پیپت دهانی جنین ها درون محیط زیر روغن گذاشته شدند. توجه می شد که هنگام کشت، مدت در معرض گیری ظرف کشت در دمای اتاق و خارج از انکوباتور به حداقل برسد [۱۶].



شکل ۳. شکل بالا جنین های دوسلولی بدست آمده از لوله های رحم موش های ماده ی ۸-۶ هفته ای نژاد NMRI را نشان می دهد.

در مرحله ی چهارم موش های گیرنده ی حامله ی کاذب با ترکیب کتامین (100mg/kg ip) و زایلزین (16mg/kg ip) بیهوش شدند. شاخ های رحم به واسطه ی جراحی از پشت موش، بیرون آورده شد. با کمک یک استرئومیکروسکوپ، با نوک سرنگ انسولین یک سوراخ در بالای شاخ رحمی در نزدیکی محل تقاطع رحمی - لوله ای ایجاد شد و پس از برداشتن سرنگ انسولین، نوک پیپت دهانی حاوی جنین‌های دوسلولی در سوراخ ایجاد شده قرار گرفت و ۱۴-۸ جنین دوسلولی به همراه چندین میکرولیتر محیط انتقال به هر لوله انتقال داده شد (شکل ٤) [۱۷].



شکل ٤. شکل بالا انتقال جنین های دوسلولی به موش حامله ی کاذب را در زیر استرئو میکروسکوپ نمایش می دهد.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-05-17]

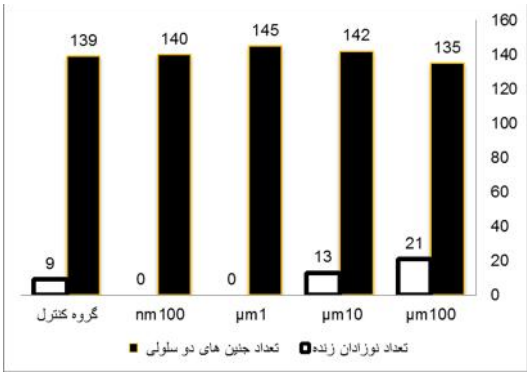
قبل از انتقال جنین، موش های نر واژکتومی بدست آمد و پس از ۲ هفته، دوره ی بهبودی خود را بدست آورد. گیرنده های بالقوه در سن ۱۶-۱۲ هفتگی با جفت گیری آنها با موش های نر واژکتومی شده (با عقیمی اثبات شده) حامله ی کاذب شدند [۱۸]. روز جفت گیری به عنوان روز اول حاملگی کاذب مشخص شد و با دیدن واژینال پلاک تأیید شد.

انتقال جنین دو طرفه در بین گونه ی موش های سوری نژاد NMRI انجام شد. در زیر میکروسکوپ استرئو، پس از اطمینان از اینکه هیچ جنینی در پیپت باقی نمانده است، لوله ی رحمی در حفره ی شکمی قرار داده شد و محل جراحی با نخ بخیه ی ۵-۰ بسته شد و موشهای گیرنده ی جنین در حیوان خانه نگهداری شدند و در روز ۱۸ پس از انتقال جنین، سزارین شده و میزان نوزادان زنده ی متولد شده محاسبه گردید. در گروه تیمار به منظور بررسی اثر ملاتونین بر تکوین جنین های دوسلولی، موش های حامله با ٤ دوز مختلف از ملاتونین (۱۰۰ میکرومولار، ۱۰ میکرومولار، ۱ میکرومولار و ۱۰۰ نانومولار) تیمار شدند. گروه کنترل هیچ ملاتونینی دریافت نکرد.

برای بررسی تأثیر غلظت های متفاوت ملاتونین بر روی میزان نوزادان زنده متولد شده حاصل از انتقال جنین های دو سلولی موش سوری، تعداد جنین ها در مراحل مختلف ثبت شد و با استفاده از روش مجذور کای و با کمک نرم افزار SPSS.Ver.16 مقایسه و تجزیه و تحلیل انجام گرفت و $P<۰/۰۵$ معنی دار تلقی شد.

یافته ها

در این مطالعه ۷۰۱ جنین دو سلولی سالم با مورفولوژی مناسب از لوله های رحمی موش جدا و به طور تصادفی به گروه کنترل و ٤ گروه آزمایش (گروه ۱، گروه ۲، گروه ۳ و گروه ٤) اختصاص داده شد. جنین ها برای انتقال، از گونه ی دهنده ی مشابه جدا شدند. گیرنده ها، در تعداد جنین هایی که دریافت می کردند متفاوت بودند. با توجه به اینکه آزمایشات در روزهای متفاوت کار شده جنین های بدست آمده متفاوت بوده و بر اساس تعداد جنین های موجود، انتقال انجام و گروه ها نزدیک هم انتخاب شدند. در گیرنده هایی که دوزهای ۱۰۰ میکرومولار و ۱۰ میکرومولار را دریافت کردند درصد نوزادان متولد شده افزایش نشان داد. بیشترین میزان تولد زنده در دوز ۱۰۰ میکرومولار بدست آمد وتفاوت معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P \leq ۰/۰۰۰۱$). گیرنده هایی که دوز ۱۰ میکرومولار را دریافت کردند تفاوت معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان ندادند. نتایج نشان داد که تعداد و درصد نوزادان متولد شده در دوزهای ۱۰۰ میکرومولار، ۱۰ میکرومولار و گروه کنترل به ترتیب ۲۱ (۱۵/۵۵٪)، ۱۳ (۹/۱۵٪) و ۹ (۶/٤۷) بود و در غلظت های ۱۰۰ نانومولار و ۱ میکرومولار با انتقال جنین های دو سلولی هیچ نوزاد زنده ای متولد نشد و این غلظت ها هیچ اثر تقویتی بر تکوین جنین های دوسلولی و افزایش تولدهای زنده نداشت (نمودار ۱) (شکل ٤).



نمودار ۱. بیشترین میزان تولد زنده در غلظت ۱۰۰ میکرومولار بدست آمد و تفاوت معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد ($p\leq ۰/۰۰۰۱$)

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تزریق زیرجلدی هورمون ملاتونین میزان لانه گزینی و میزان تولدهای زنده را پس از انتقال جنین دو سلولی

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-05-17]

افزایش می دهد. عسگری و همکاران گزارش کردند که هورمون ملاتونین میزان موفقیت لانه گزینی را افزایش می دهد [۹]. نتایج بدست آمده نشان می دهد که با انتقال جنین در مرحله ی بلاستوسیست لانه گزینی بیشتری نسبت به انتقال جنین دو سلولی اتفاق می افتد و با مطالعه ی ما قابل مقایسه است. در مطالعه ی ما، تزریق ملاتونین در مرحله ی دو سلولی صورت گرفت. بنابراین، پس از انتقال جنین های دو سلولی، تکوین جنین در محیط زنده ارزیابی شده است. معمولاً تکوین جنین موش در شرایط آزمایشگاهی در مرحله‌ی دو سلولی متوقف می شود. اطلاعات موجود نشان می دهد که ملاتونین ایست تکوین دوسلولی را کاهش می دهد و میزان بلاستولاسیون را افزایش می دهد. بر اساس مطالعات انجام شده، مشخص شده که ملاتونین در محیط کشت میزان شکافت[1] جنین های گاو را افزایش می دهد [۱۳]. نتایج ما اثرات وابسته به غلظت ملاتونین بر روی تکوین جنین در محیط زنده (in-vivo) را نشان می دهد. بنابراین ممکن است ملاتونین در مراحل خاصی از تشکیل جنین در متابولیسم شرکت کند تا روند تکوین و تشکیل بلاستوسیست را تحریک کند. تولید زیاد گونه های فعال اکسیژن می تواند در توقف تکوین جنین دو سلولی در موش درگیر باشد [۱۹]. گزارش داده شده است که ملاتونین یک پاک کننده ی موثر گونه های فعال اکسیژن (ROS) می باشد [۲۰].

در مطالعه ی ما، ملاتونین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار، میزان لانه گزینی و میزان تولدهای زنده را پس از انتقال جنین دو سلولی افزایش داد و تفاوت معنی داری ($P < ۰/۰۰۰۱$) را نسبت به گروه کنترل نشان داد و غلظت ۱۰ میکرومولار ملاتونین، تکوین جنین های دو سلولی را به طور جزئی افزایش داد و میزان تولدهای زنده ی بدست آمده در این غلظت تفاوت معنی داری با گروه کنترل نشان نداد. در مطالعه ای دیگر با اضافه کردن غلظت ۱۰ میکرومولار ملاتونین به محیط کشت، از ۱۰۸ جنین دو سلولی موجود در محیط کشت، بالای ۵۰٪ آنها به مرحله ی شروع لانه گزینی رسیدند [۹]. مقایسه ی نتایج بدست آمده در این مطالعه با مطالعات مشابه، اثرات چشمگیر ملاتونین را بر تکوین جنین در غلظت های پایین، در محیط کشت نشان می دهد.

با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه با تزریق غلظت های ۱ میکرومولار و ۱۰۰ نانومولار ملاتونین، پس از انتقال جنین هیچ نوزاد زنده ای متولد نشد. در واقع می توان گفت که این غلظت ها هیچ اثر مثبتی بر تکوین جنین های دوسلولی و لانه گزینی جنین ها و افزایش تولدهای زنده نداشت. و یا می توان گفت که جنین های دوسلولی انتقال داده شده، پس از تیمار با غلظت های ۱ میکرومولار و ۱۰۰ نانومولار ملاتونین، در یکی از مراحل دوسلولی تا بلاستوسیست و بلاستوسیست های در حال لانه گزینی، مرده و جذب شده اند. گرچه ملاتونین تکوین جنین های دوسلولی را بهبود می بخشد اما در این مطالعه فقط غلظت ۱۰۰ میکرومولار اثر چشمگیری بر تکوین جنین های دوسلولی و تولدهای زنده داشته است. تزریق زیر جلدی هورمون ملاتونین در دوزهای بالا (۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) میتواند آثار منفی بر نقش های مذکور داشته باشد که از جمله آثار منفی آن در محیط زنده (in vivo) افزایش آبنورمالیتی در کیسه ی زرده ی، در محور بدن جنین، پلاکودهای چشمی و گوشی، دستگاه تنفسی، جوانه های اندام و لوله ی عصبی کرانیال مشاهده می گردد [۱٤]. در مطالعه ی حاضر، که انتقال جنین های دو سلولی از طریق جراحی انجام شد تولدهای مرده ی بسیار کمی را شاهد بودیم اما به خاطر اینکه محاسبه ی تولدهای مرده از اهداف ما نبوده در این تحقیق آورده نشده است. با توجه به مطالعات انجام شده، اصولاً میزان تولدهای زنده پس

[1] Cleavage

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-05-17]

از انتقال جنین در موش سوری پایین می باشد [۲۱]. میزان تولدهای زنده ی پایین پس از انتقال جنین های دوسلولی، به نقش های رادیکال های آزاد و گونه های فعال اکسیژن، که در این مرحله از تکوین جنین (مرحله ی دو سلولی) بسیار زیاد می باشند، بر می گردد [۱۹]. با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه، انتقال جنین های دو سلولی به موش های سوری نژاد NMRI از همان نژاد امکان پذیر می باشد. مشکلات موجود در بدست آوردن موش های دهنده و گیرنده‌ی کافی و عملکرد تولید مثلی ضعیف در میزان موفقیت تأثیر دارد. مطالعات نشان داده است که با افزایش تعداد جنین های انتقال داده شده، میزان حاملگی بهبود می یابد. تأثیر انتقال جنین برای افزایش تولدهای زنده، می‌تواند با انتقال تعداد زیادی جنین به هر دو لوله ی رحمی به جای یک لوله رحمی بهبود یابد [۲۲]. با توجه به مطالعات در زمینه ی انتقال جنین به موش های سوری، بهترین نتایج حاصل از انتقال جنین، به دنبال انتقال جنین به موش های نژاد NMRI از همان نژاد به دست آمده است. درگونه ی NMRI حتی با انتقال جنین های کمتر و تعداد نمونه ی کم تر در هر گروه، موفقیت بیشتر و تولدهای زنده بیشتری حاصل شده است [۱۷]. در برخی از مطالعات اشاره شده که پس از انتقال جنین های دو سلولی به موش سوری، کمتر از یک درصد جنین های دوسلولی به نوزاد تکامل یافتند [۲۳]. تأثیر غلظت های پایین هورمون ملاتونین (در گروه های ۳ و ٤) در مقایسه با گروه کنترل بر روی تکوین و میزان بقاءِ جنین های دوسلولی می تواند مربوط به عمل بسیاری از عوامل تنظیم کننده موجود در محیط زنده یا *in vivo* (شامل تأثیر منفی دوزهای پایین ملاتونین) باشد که در این مطالعه لحاظ نشده اند. به هر حال تأثیر تحریکی عوامل منفرد بر روی تکوین جنین برای یافتن راهبردهای عملی در روش های کمک باروری باید بیشتر مورد مطالعه قرار گیرد تا استفاده از آن ها برای کاربردهای بالینی امکانپذیر شود.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق زیرجلدی هورمون ملاتونین روند رشد جنین دو سلولی موش و تکامل پس از لانه گزینی موش سوری را بهبود می بخشد. در واقع ملاتونین، میزان زنده ماندن جنین و میزان موفقیت لقاح آزمایشگاهی را افزایش می دهد که در مراکز درمان ناباروری می تواند اثر به سزایی در نتایج موفق لقاح آزمایشگاهی داشته باشد. نتایج بررسی حاضر تأثیر مثبت و آنتی اکسیدانی ملاتونین را بر تکوین جنین‌های دوسلولی موش سوری و افزایش میزان نوزادان متولد شده نشان می دهد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از پایان نامه ی کارشناسی ارشد دانشکده ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان به شماره ثبت ۱۰۵ بود. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری مسئولین دانشکده پزشکی و کارکنان آزمایشگاه جنین شناسی و حیوان خانه‌ی دانشکده‌ی پزشکی به منظور مساعدت در پیش‌برد تحقیق، تقدیر و تشکر نمایند.

References

1- Jose LN, Jose AC, Luis M, Elisa H, Juan F. Coverage and current practice patterns regarding assisted reproduction technique. Obstetrics Gynecol. 2008 May; 138: 3-9.
2- Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. Effect of vitrification and betamercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. Fertil Steril. 2010 May; 93: 2602–2607.
3- Quinin p, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human bal fluid. Fertil Steril. 1985 Oct; 44; 493-8.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-05-17]

4- Piantadosi CA. Carbon monoxide, reactive oxygen signaling, and oxidative stress. Free Radic Biol Med. 2008 Sep; 45(5): 562-569.
5- Berra B, Rizzo AM. Melatonin: circadian rhythm regulator, chronobiotic, antioxidant and beyond. Clin Dermatol. 2009 Mar-Apr; 27(2): 202-209.
6- Diaz Lopez B, Diaz Rodriguez E, Urquijo C, Fernandez Alvarez C. Melatonin influences on the neuroendocrine-reproductive axis. Ann N Y Acad Sci. 2005 Dec; 1057(1): 337-64.
7- Ronnberg L, Kauppila A, Leppaluoto J, Martikainen H, Vakkuri O. Circadianand seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. J Clin Endocrinol Metab. 1990 Aug; 71: 492-496.
8- Pappolla MA, Chyan YJ, Poeggeler B, Frangione B, Wilsone G, Ghiso J, et al. An assessment of the antioxidant and the antimyloidogenic properties of melatonin Implications for Alzheimer's disease. J Neural transm. 2000 Feb; 107(2): 203-31.
9- Asgari Z, Ghasemian F, Ramezani M, Bahadori MH. The Effect of Melatonin on the developmental potential and implantation rate of mouse embryos.
Cell J. 2012 Fall; 14(3): 203-208.
10- Luther JS, Redmer DA, Reynolds LP, Choi JT, Pnt D, Navanukraw C, et al. Ovarian follicular development and oocyte quality in anestrous ewes treated with melatonin, a Controlled Internal Drug Disease(CIDR) device and follicul estimalating hormone. Theriogenology. 2005 May; 63(8): 2136-46.
11- Salamonsen LA[1], Nie G, Findlay JK. Newly identified endometrial genes of importance for implantation. J Reprod Immunol. 2002 Jan; 53: 215–225.
12- Valasi F, Tsiligianni T, Papanikolaou T, Dimitriadis I, Vainas E, Samartzi, F. Melatonin improves the developmental competence of sheep oocytes. Reprod Domest Anim. 2006 Jul; 41: 341.
13- Rodriguez-Osorio N, Kim IJ, Wang H, Kaya A, Memili E. Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos in vitro. J Pineal Res. 2007 Oct; 43: 283-8.
14- Chan WY, Ng TB..Changes induced by pineal indoles in post-implantation mouse embryos. Gen Pharmacol. 1995 Sep; 26 (5): 1113-1118.
15- Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. Lab Anim. 1996 Oct; 30: 293–316.
16- Anddras N, Marina G, Kristina V, Richard B. Manipulation the mouse embryo, third edition. USA. 2003; 150-152.
17- Rose C, Schwegler H, Hanke J, Yilmazer-Hanke DM.. Pregnancy rates, prenatal and postnatal survival of offspring, and litter sizes after reciprocal embryo transfer in DBA/2JHd,C3H/HeNCrl and NMRI mice. Theriogenology. 2012 Jun; 77: 1883–1893 .
18- Wiebold JL, Anderson GB. The effect of recipient age on the success of embryo transfer in mice. Lab Anim Sci. 1986 Apr; 36: 161–3.
19- Nasr-Esfahani MH, Aitkan JR, Johnson MH. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryo development in vitro and in vivo. Development. 1990 Jun; 109: 501-7.
20- Ishizuka B, Kuribayashi Y, Murai K, Amemiya A, Itoh MT. The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice . J Pineal Res. 2000 Jan; 28(1): 48-51.
21- Cui L, Zhang Z, Sun F, Duan X, Wang M, Di K, et al. Transcervical embryo transfer in mice. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2014 May; 53(3): 228-31.
22- Rülicke T, Haenggli A, Rappold K, Moehrlen U, Stallmach T. No transuterine migration of fertilised ova after unilateral embryotransfer in mice. Reprod Fertil Dev. 2006 Nov; 18: 885–91.
23- Green M[1], Bass S, Spear B.A device for the simple and rapid transcervical transfer of mouse embryos eliminates the need for surgery and potential post-operative complications. BioTechniques. 2009 Nov; 47: 919-924.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-05-17]