


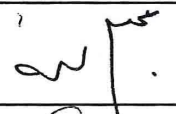

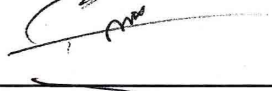
الله  
البر البر  
البر  
البر  
البر



تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

خانم محبوبه عموشاهی رشته علوم تشریح پایان نامه کارشناسی ارشد خود را با عنوان: «تاثیر انجماد شیشه ای و تکوین در محیط کشت بر روی پراکندگی میتوکندری، میزان ATP و تکوین جنین های موش در مراحل 2-PN و 4 سلولی و بلاستوسیست» در تاریخ ۱۳۹۰/۱۲/۸ ارائه کردند. بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیات داوران:

	(استاد راهنما)	دکترمژده صالح نیا
—	(استاد مشاور)	دکترداریوش داودی
	(استاد ناظر)	دکترمجتبی رضا زاده
	(استاد ناظر)	دکتر بهار موقر
	(نماینده تحصیلات تکمیلی)	دکتر منصوره موحدین

## آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

### دانشگاه تربیت مدرس

**مقدمه:** با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری 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 هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عنوان پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

**ماده ۱-** حق نشر و تکثیر پایان‌نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

**ماده ۲-** انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان‌نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

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

**ماده ۳-** انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آیین‌نامه- های مصوب انجام شود.

**ماده ۴-** ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها 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 معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

**ماده ۵-** این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب محبویه عموشاهی دانشجوی رشته علوم تشریح و ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۸ مقطع کارشناسی ارشد دانشکده علوم پزشکی متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم.»



امضا

تاریخ

## آئین نامه پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

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

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله) ی خود، مراتب را قبلاً به طور 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 پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته علوم تشریح است که در سال ۱۳۹۰ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار خانم دکتر مژده صالح نیا، مشاوره جناب آقای دکتر داریوش داوودی از آن دفاع شده است.

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

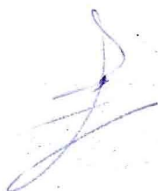
ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب مجبوره عموشاهی دانشجوی رشته علوم تشریح مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا





دانشگاه تربیت مدرس  
دانشکده علوم پزشکی

## پایان نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته علوم تشریح

## عنوان

تاثیر انجماد شیشه ای و تکوین در محیط کشت بر روی پراکندگی  
میتوکندری، میزان ATP و تکوین جنین های موش در مراحل 2-PN و  
4 سلولی و بلاستوسیست

## نگارش

محبوبه عموشاهی

## استاد راهنما

دکتر مژده صالح نیا

## استاد مشاور

دکتر داریوش داوودی

زمستان ۱۳۹۰

## تقدیم به :

به پدر و مادرم که تا ابد روح آغشته به عشق آنهاست

خواهران و برادرم که مهربانان امیدبخش زندگیم هستند

## تشکر و قدردانی

شکر و سپاس خداوندی که مهر بیکران است و حکمتش بی نهایت، با قدردانی از:

استاد گرانقدرم سرکار خانم دکتر مژده صالح نیا به خاطر تلاش های بی دریغشان در جهت هدیه کردن علم و دانش و به خاطر اینکه همواره از دلسوزی ها و راهنماییهای بی شائبه ایشان در جهت انجام این پایان نامه بهره مند بودم.

اساتید ارجمند و بزرگوار سرکار خانم دکتر منصوره موحدین، جناب آقای دکتر مجتبی رضازاده ولوجردی و جناب آقای دکتر تقی الطریحی که همواره در طول مدت تحصیل و تحقیقم با راهنماییهای ارزشمندشان مرا یاری نمودند.

استاد مشاورم جناب آقای دکتر داریوش داوودی که از همکاری و راهنماییهایشان بهره مند بودم.

استاد ارجمند گروه بیوشیمی جناب آقای دکتر حسینخانی که با همکاریها و راهنماییهای ارزشمندشان همواره مرا یاری نمودند.

دوست بسیار عزیز و یاور مهربانم خانم زهره نظم آرا که در تمام طول تحقیق مرا یاری نمودند.

همکلاسیهای مهربان و صمیمیم خانمها مرضیه زیلوچی، سمانه ادیب و پریسا جمال زایی و دوستان بسیار عزیزم شبنم عبدی، زهره مظاهری، نغمه احمدی، سها برویس، فاطمه فلاح، سمیه نیازی و سایر دوستانی که در این دوره تحصیلی همیشه پشتیبان من بودند.

کارمند مهربان گروه آقای محمدلو که همواره از کمکهای بی دریغشان بهره مند بودم.

کارشناسان محترم گروه آقایان پوربیرانوند، عربگری و خانم ابراهیمی و کلیه اساتید و دوستانی که مرا در انجام این تحقیق یاری نمودند.

## چکیده

با توجه به اهمیت میتوکندری در تکوین جنین مراحل قبل از لانه‌گزینی، هدف از این مطالعه بررسی تأثیر انجماد شیشه‌ای و تکوین در محیط کشت بر روی پراکندگی میتوکندری و میزان ATP جنین‌های موش در مراحل 2-PN، 4 سلولی و early blastocyst بود.

بدین منظور موش‌های ماده NMRI بالغ 6-7 هفته‌ای با استفاده از تزریق داخل صفاقی 10 IU واحد Pregnant Mar's Serum Gonadotrpین و Human Chorionic Gonadotrpین تحریک شده و در کنار موش‌های نر بالغ از همان نژاد قرار گرفتند و صبح روز بعد پلاک واژن آنها چک شد. سپس جنین‌های مراحل تکوینی مختلف از لوله فالوپ و شاخ رحمی موش‌های حامله جمع‌آوری شده و به روش کرایوتاپ با بکارگیری اتیلن‌گلیکول و دی‌متیل‌سولفوکساید منجمد شدند و تعدادی از جنین‌ها نیز به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. پس از تعیین درصد حیات جنین‌های منجمد شده تکوین آنها تا مرحله خروج از زونا در دو گروه کنترل و انجمادی بررسی شد. میزان ATP جنین‌ها با استفاده از واکنش لوسیفیرین-لوسیفراز اندازه‌گیری شد. جهت بررسی توزیع میتوکندری، جنین‌ها با محلول 1 میلی‌مول Mitotracker green رنگ‌آمیزی شدند و با میکروسکوپ فلوروسنت مورد بررسی قرار گرفتند.

میزان زنده ماندن جنین‌های انجمادی در مراحل 2-PN، 4 سلولی و early blastocyst به ترتیب 83/63٪، 87/52٪ و 89/27٪ بود. همچنین از نظر درصد خروج از زونا بین جنین‌های مراحل مختلف تکوینی در دو گروه انجمادی و کنترل تفاوتی دیده نشد. بین جنین‌های مراحل مختلف تکوینی در گروه کنترل و انجمادی و نیز جنین‌های حاصل از شرایط in vivo و in vitro از نظر میزان ATP تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. توزیع میتوکندری در جنین‌های 2-PN و 4 سلولی گروه‌های انجمادی و غیر انجمادی مشابه بود.

در مجموع به نظر می‌رسد روش انجماد شیشه‌ای با استفاده از کرایوتاپ و ضدیخ اتیلن‌گلیکول و دی‌متیل‌سولفوکساید تأثیری بر پتانسیل تکوینی، پراکندگی میتوکندری و میزان ATP جنین موش در مراحل مختلف تکوینی نداشت.

**کلمات کلیدی:** انجماد شیشه‌ای، میتوکندری، میزان ATP، جنین



## چکیده

با توجه به اهمیت میتوکندری در تکوین جنین مراحل قبل از لانه‌گزینی، هدف از این مطالعه بررسی تأثیر انجماد شیشه‌ای و تکوین در محیط کشت بر روی پراکندگی میتوکندری و میزان ATP جنین‌های موش در مراحل 2-PN، 4 سلولی و early blastocyst بود.

بدین منظور موشهای ماده NMRI بالغ 6-7 هفته‌ای با استفاده از تزریق داخل صفاقی IU 10 واحد Pregnant Mar's Serum Gonadotrpین و Human Chorionic Gonadotrpین تحریک شده و در کنار موشهای نر بالغ از همان نژاد قرار گرفتند و صبح روز بعد پلاک واژن آنها چک شد. سپس جنینهای مراحل تکوینی مختلف از لوله فالوپ و شاخ رحمی موشهای حامله جمع‌آوری شده و به روش کرایوتاپ با بکارگیری اتیلن‌گلیکول و دی‌متیل‌سولفوکساید منجمد شدند و تعدادی از جنینها نیز به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. پس از تعیین درصد حیات جنینهای منجمد شده تکوین آنها تا مرحله خروج از زونا در دو گروه کنترل و انجمادی بررسی شد. میزان ATP جنینها با استفاده از واکنش لوسیفیرین-لوسیفراز اندازه‌گیری شد. جهت بررسی توزیع میتوکندری، جنینها با محلول 2 میکرو مول Mitotracker green رنگ‌آمیزی شدند و با میکروسکوپ فلوروسنت مورد بررسی قرار گرفتند.

میزان زنده ماندن جنینهای انجمادی در مراحل 2-PN، 4 سلولی و early blastocyst به ترتیب 83/63٪، 87/52٪ و 89/27٪ بود. همچنین از نظر درصد خروج از زونا بین جنینهای مراحل مختلف تکوینی در دو گروه انجمادی و کنترل تفاوتی دیده نشد. بین جنینهای مراحل مختلف تکوینی در گروه کنترل و انجمادی و نیز جنینهای حاصل از شرایط in vivo و in vitro از نظر میزان ATP تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. توزیع میتوکندری در جنینهای 2-PN و 4 سلولی گروههای انجمادی و غیر انجمادی مشابه بود.

در مجموع به نظر می‌رسد روش انجماد شیشه‌ای با استفاده از کرایوتاپ و ضدیخ اتیلن‌گلیکول و دی‌متیل‌سولفوکساید تأثیری بر پتانسیل تکوینی، پراکندگی میتوکندری و میزان ATP جنین موش در مراحل مختلف تکوینی نداشته باشد.

**کلمات کلیدی:** انجماد شیشه‌ای، میتوکندری، میزان ATP، جنین

## فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته.....	۱
۱-۱. مقدمه.....	۲
۲-۱. انجماد شیشه‌ای.....	۴
۳-۱. انجماد شیشه‌ای جنین و پیشرفتهای نوین در آن.....	۴
۱-۳-۱. بهبود روش انجماد شیشه‌ای با محلولهای ضد یخ مختلف.....	۴
۲-۳-۱. بهبود روش انجماد شیشه‌ای و تغییرات دمایی و زمانهای تعادل مختلف.....	۸
۳-۳-۱. بهبود روش انجماد شیشه‌ای با سیستم های مختلف Carrier.....	۹
۴-۳-۱. انجماد جنین در مراحل مختلف تکوین جنینی.....	۱۶
۴-۱. میتوکندری در جنین مراحل قبل از لانه گزینی.....	۲۱
۱-۴-۱. ساختمان میتوکندری جنین.....	۲۱
۲-۴-۱. عملکرد میتوکندری جنین.....	۲۳
۳-۴-۱. تفاوت‌های تولید ATP در مراحل مختلف تکوین جنین.....	۲۴
۴-۴-۱. تعداد میتوکندری و استقرار آن در جنین مراحل مختلف تکوینی.....	۲۸
۵-۴-۱. تأثیر انجماد بر میتوکندری.....	۳۱
۶-۴-۱. تأثیر کشت جنین بر میتوکندری آن.....	۳۴
۵-۱. اهداف.....	۳۷
۶-۱. فرضیه ها/ پیش فرض ها.....	۳۷
فصل دوم: مواد و روش‌ها.....	۳۹
۱-۲. تهیه جنین.....	۴۰
۱-۱-۲. محیط کشت.....	۴۰

۴۱	.....انجماد شیشه‌ای.....۱-۲-۲
۴۱	.....ابزار مورد نیاز.....۱-۱-۲-۲
۴۱	.....محلولهای مورد نیاز.....۲-۱-۲-۲
۴۱	.....محلول تعادل.....۱-۲-۱-۲-۲
۴۲	.....محلول انجمادی.....۲-۲-۱-۲-۲
۴۲	.....تهیه محلولهای ذوب.....۳-۲-۱-۲-۲
۴۳	.....تست سمیت.....۳-۲
۴۳	.....روش انجماد شیشه‌ای.....۴-۲
۴۵	.....مراحل اصلی تحقیق.....۵-۲
۴۵	.....بررسی تکوین جنینها.....۱-۵-۲
۴۶	.....روش اندازه‌گیری میزان ATP.....۲-۵-۲
۴۶	.....وسایل مورد نیاز برای اندازه‌گیری میزان ATP.....۱-۲-۵-۲
۴۷	.....اجزاء محلول کمپلکس بدون ATP.....۲-۲-۵-۲
۴۷	.....روش کار.....۳-۲-۵-۲
۴۷	.....تعیین منحنی استاندارد.....۱-۳-۲-۵-۲
۴۸	.....آماده سازی جنینها برای اندازه‌گیری ATP.....۲-۳-۲-۵-۲
۴۸	.....اندازه‌گیری میزان ATP جنینها.....۳-۳-۲-۵-۲
۴۹	.....رنگ‌آمیزی میتوکندری.....۳-۵-۲
۴۹	.....ساخت محلول Mitotracker green.....۱-۳-۵-۲
۵۰	.....آماده‌سازی سلول برای رنگ‌آمیزی با Mitotracker green.....۲-۳-۵-۲
۵۰	.....آنالیز آماری.....۶-۲
۵۱	.....فصل سوم: نتایج و یافته‌ها.....

- ۱-۳. ارزیابی نتایج آزمایش سمیت..... ۵۲
- ۲-۳. ارزیابی میزان بقا جنینها پس از انجماد شیشه‌ای و ذوب..... ۵۲
- ۳-۳. ارزیابی میزان تکوین جنین‌های موش در مراحل تکوینی مختلف در محیط‌های کشت مختلف..... ۵۳
- ۴-۳. ارزیابی میزان تکوین جنینهای 2-PN در دو گروه کنترل و انجماد شیشه‌ای..... ۵۳
- ۵-۳. ارزیابی میزان تکوین جنینهای ۴ سلولی در گروه کنترل و انجماد شیشه‌ای..... ۵۴
- ۶-۳. ارزیابی میزان تکوین جنینهای early blastocyst در دو گروه کنترل و انجماد شیشه‌ای..... ۵۴
- ۷-۳. مقایسه میزان تشکیل بلاستوسیست در جنینهای مراحل 2-PN و ۴ سلولی در گروه کنترل..... ۵۴
- ۸-۳. مقایسه میزان خروج از زونا در جنین‌های مراحل مختلف تکوینی در گروه کنترل..... ۵۵
- ۹-۳. مقایسه میزان تشکیل بلاستوسیست در جنینهای مراحل 2-PN و ۴ سلولی در گروه انجمادی..... ۵۵
- ۱۰-۳. مقایسه میزان خروج از زونا در جنین‌های مراحل مختلف تکوینی در گروه انجمادی..... ۵۵
- ۱۱-۳. ارزیابی میزان ATP در جنین‌های مراحل مختلف تکوینی..... ۵۶
- ۱-۱۱-۳. ارزیابی میزان ATP در جنینهای مرحله 2-PN در گروه کنترل و انجمادی..... ۵۶
- ۲-۱۱-۳. ارزیابی میزان ATP در جنین‌های مرحله ۴ سلولی در بخش *in vivo* در گروه کنترل و انجمادی..... ۵۶
- ۳-۱۱-۳. ارزیابی میزان ATP در جنین‌های مرحله ۴ سلولی در بخش *in vitro* در گروه کنترل و انجمادی..... ۵۶
- ۴-۱۱-۳. مقایسه میزان ATP جنین‌های ۴ سلولی *in vivo* و *in vitro* در گروه کنترل..... ۵۷
- ۵-۱۱-۳. مقایسه میزان ATP جنین‌های ۴ سلولی *in vivo* و *in vitro* در گروه انجمادی..... ۵۷
- ۶-۱۱-۳. ارزیابی میزان ATP در جنین‌های مرحله early blastocyst در بخش *in vivo* در گروه کنترل و انجمادی..... ۵۷
- ۷-۱۱-۳. ارزیابی میزان ATP در جنین‌های مرحله early blastocyst کشت شده از مرحله 2-PN (*in vitro*) در گروه کنترل و انجمادی..... ۵۸

۸-۱۱-۳. ارزیابی میزان ATP در جنین‌های مرحله early blastocyst در بخش in vitro (کشت شده از	
مرحله ۴ سلولی) در گروه کنترل و انجمادی.....	۵۸
۹-۱۱-۳. مقایسه میزان ATP جنین‌های early blastocyst در بخش in vivo و invitro (کشت شده از	
مرحله 2-PN و ۴ سلولی) در گروه کنترل.....	۵۸
۱۰-۱۱-۳. مقایسه میزان ATP جنین‌های early blastocyst در بخش in vivo و in vitro (کشت شده	
از مرحله 2-PN و ۴ سلولی) در گروه انجمادی.....	۵۹
۱۲-۳. ارزیابی توزیع میتوکندری جنین‌های مرحله 2-PN در گروه کنترل و انجمادی.....	۵۹
۱۳-۳. ارزیابی توزیع میتوکندری جنین‌های مرحله ۴ سلولی در گروه کنترل و انجمادی.....	۵۹
<b>فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات.....</b>	<b>۷۰</b>
۱-۴. بحث.....	۷۱
۲-۴. نتیجه گیری.....	۷۹
۳-۴. پیشنهادات.....	۷۹
<b>فهرست منابع.....</b>	<b>۸۰</b>
<b>چکیده انگلیسی.....</b>	<b>۱۰۵</b>

## فهرست جداول

- جدول ۱-۳. میزان زنده ماندن جنینهای موش در مراحل مختلف تکوینی پس از انجام تست سمیت ... ۶۰
- جدول ۲-۳. میزان زنده ماندن جنینهای موش در مراحل مختلف تکوینی پس از انجماد شیشه‌ای و ذوب ..... ۶۰
- جدول ۳-۳. میزان تکوین جنینهای موش در مراحل تکوینی مختلف در محیطهای کشت مختلف (pilot study) ..... ۶۱
- جدول ۴-۳. میزان تکوین جنینهای موش در مرحله 2-PN در گروههای کنترل و انجمادی تا ۱۲۰ ساعت ..... ۶۲
- جدول ۵-۳. میزان تکوین جنینهای موش در مرحله ۴ سلولی در گروههای کنترل و انجمادی تا ۷۲ ساعت ..... ۶۳
- جدول ۶-۳. میزان تکوین جنینهای موش در مرحله early Blastocyst در گروههای کنترل و انجمادی تا ۲۴ ساعت ..... ۶۴
- جدول ۷-۳. میزان ATP در مراحل مختلف تکوینی 2-PN، ۴ سلولی و early blastocyst در دو بخش in vitro و in vivo در گروه کنترل و انجمادی ..... ۶۵

## فهرست شکل ها

شکل ۳-۱. جنین موش در مرحله 2-PN گروه کنترل رنگ آمیزی شده با Mitotracker Green ..... ۶۶

شکل ۳-۲. جنین موش در مرحله 2-PN انجمادی رنگ آمیزی شده با Mitotracker Green ..... ۶۷

شکل ۳-۳. جنین موش در مرحله ۴ سلولی گروه کنترل رنگ آمیزی شده با Mitotracker Green ..... ۶۸

شکل ۳-۴. جنین موش در مرحله ۴ سلولی انجمادی رنگ آمیزی شده با Mitotracker Green ..... ۶۹

# فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات  
گذشته



## ۱-۱. مقدمه

انجماد شیشه‌ای یکی از روشهای مناسب در ART<sup>۱</sup> برای نگهداری طولانی مدت جنینها است. از مزایای این تکنیک این است که در این روش می‌توان جنینها را طی چند مرحله و در موقعیتهای مناسب به رحم مادر انتقال داد. همچنین از این روش می‌توان برای حفظ قدرت باروری افراد تحت شیمی درمانی و رادیوتراپی نیز استفاده کرد.

در طول دهه گذشته از روشهای مختلف انجماد جنین استفاده شده است. دو تکنیک شایعی که برای انجماد جنین استفاده شده است شامل: انجماد آهسته و انجماد شیشه‌ای است [۱].

روش انجماد آهسته برای اولین بار توسط Whithingham و همکارانش در سال ۱۹۷۲ مطرح شد [۲]. در روش انجماد آهسته یک فریزر کنترل شده به کار برده می‌شود که باعث کاهش تدریجی دما تا کمتر از ۳۰ - درجه سانتیگراد می‌شود. در این روش چون از غلظت پایین محلول ضدیخ استفاده می‌شود آسیب توکسیک و اسمتیک کمتری ایجاد می‌کند ولی غلظت پایین محلول ضدیخ برای جلوگیری از تشکیل کریستال یخ ناکافی است که منجر به آسیب سلولی و نرخ زنده ماندن پایین و نهایتاً کاهش نرخ حاملگی می‌شود. علاوه بر آن روش انجماد آهسته نیاز به زمان طولانی و ماشینهای فریز برنامه‌ریزی شده گران‌قیمت دارد. بنابراین برای دست یافتن به روشی سریعتر و با صرفه‌تر روش انجماد شیشه‌ای مطرح شد [۳].

روش انجماد شیشه‌ای، انجماد محلول در دمای پایین بدون تشکیل کریستال یخ است و با سرعت فوق سریع و غلظت بالای محلول ضدیخ انجام می‌شود [۴].

زمان مورد نیاز برای انجماد شیشه‌ای ۱۰ بار کمتر از انجماد آهسته است [۱].

---

<sup>۱</sup> . Assisted Reproductive Technology

تکنیک انجماد شیشه‌ای به این دلیل که بسیار ساده است و منجر به نرخ زنده ماندن بالا در جنین می‌شود به عنوان یک استراتژی مؤثر به طور وسیع به کار برده شده است و اخیراً پیشرفتهای وسیعی در آن صورت گرفته است [۵-۱۹].

ولی با وجود پیشرفتهای وسیعی که در زمینه بهبود تکنیک انجماد شیشه‌ای جنین صورت گرفته است مطالعات زیادی در گونه‌های مختلف نشان داده‌اند که انجماد شیشه‌ای باعث تغییرات ساختاری و بیوشیمیایی در عملکرد ارگانهای سلولی می‌شود که منجر به کاهش کیفیت و تکوین جنین می‌شود [۲۰-۲۶].

یکی از عوامل تأثیرگذار در انجماد شیشه‌ای مرحله تکوینی جنین است [۲۷]. مقایسه بین جنینهای مراحل ابتدایی تکوینی با جنینهایی که در مراحل بالاتر تکوینی هستند نشان دهنده این است که با پیشرفت مراحل تکوینی جنین مقاومت در برابر انجماد افزایش می‌یابد [۲۷]. در طول تکوین جنین قبل از لانه‌گزینی اتفاقات ویژه‌ای از قبیل تشکیل پیش هسته، پیوستگی دو گامت، فعالیت ژنوم، تقسیم سلولی، تراکم توده سلولی و تشکیل بلاستوسل روی می‌دهد که این رویدادها در سلول به افزایش انرژی نیاز دارند. اگر جنین قادر به تولید انرژی کافی نباشد ممکن است آنومالی اتفاق بیفتد [۲۸]. بنابراین تکوین جنین به میزان زیادی در ارتباط با عملکرد میتوکندری است به علت اینکه میتوکندری ارگانلی است که انرژی مورد نیاز برای سلول را فراهم می‌کند [۲۹]. موقعیت میتوکندری اهمیت کلیدی در تکوین جنین دارد [۳۰]. میتوکندری در شکل‌گیری جنین نقش محوری دارد و توزیع متناسب میتوکندری برای عملکرد ویژه سلول بسیار مهم است [۳۱].

پروسه انجماد شیشه‌ای احتمالاً می‌تواند باعث تغییر در توزیع و عملکرد میتوکندری شود که این تغییر در توزیع و عملکرد میتوکندری بعد از انجماد جنین ممکن است پتانسیل تکوینی آن را کاهش دهد [۳۱].

شرایطی که جنینها در آن تکوین می‌یابند می‌تواند متابولیسم و توانایی تکوین آنها را تغییر دهد [۳۲]. بنابراین علاوه بر انجماد، شرایط کشت نیز ممکن است بر روی تکوین جنینی تأثیرگذار باشد. ارزیابی دقیقتر فراساختار سلولی روشن می‌کند که میتوکندری نسبت به شرایط کشت بسیار آسیب

پذیر است حتی توزیع میتوکندری می تواند تحت تأثیر شرایط کشت قرار گیرد و به تبع آن میزان تولید ATP را در مراحل مختلف تکوینی تغییر دهد [۳۳]. بنابراین در این تحقیق سعی بر این شد که اثر انجماد شیشه‌ای و کشت بر روی توزیع میتوکندری و میزان تولید ATP در مراحل مختلف تکوینی جنین موش مورد بررسی قرار گیرد.

## ۱-۲. انجماد شیشه‌ای

انجماد شیشه‌ای موفقیت‌آمیز نیازمند عواملی است که شامل: سرعت سرد کردن بالا، غلظت بالای محلول ضدیخ و کاهش حجم محلول انجمادی است. کاهش حجم محلول انجمادی نه تنها باعث افزایش سرعت سرد و گرم کردن می‌شود بلکه شانس تشکیل کریستال یخ را نیز کاهش می‌دهد [۳]. استفاده از غلظت بالای محلول ضدیخ برای کاهش آب داخل سلولی و آگیری نسبی ضرورت دارد بنابراین محلول غلیظ ضدیخ از تشکیل کریستال یخ جلوگیری می‌کند. بین سرعت سرد کردن و غلظت محلول ضدیخ رابطه وجود دارد به این ترتیب که با افزایش سرعت سرد کردن می‌توان از غلظت پایین‌تر محلول ضدیخ استفاده کرد. محلولهای ضدیخ دارای سیتوتوکسیسیتی بالایی هستند اما به حفاظت از سلول در برابر آسیبهای شوک سرمایی کمک می‌کنند [۱].

## ۱-۳. انجماد شیشه‌ای جنین و پیشرفتهای نوین آن

### ۱-۳-۱. بهبود روش انجماد شیشه‌ای با محلولهای ضدیخ مختلف

Ali and Shelton تحقیقات گسترده‌ای در زمینه ترکیبات مختلف محلولهای ضدیخ انجام داده‌اند. آنها محلولی با پایه اتیلن گلیکول حاوی ۵/۵ mol/L اتیلن گلیکول و ۱ mol/L ساکارز را با توکسیسیتی کمتر توصیه کردند. این محلول انجمادی برای انجماد همه مراحل قبل از لانه‌گزینی جنینهای موش و جنینهای ۶ روزه میش استفاده شد و کاهش معناداری در زنده ماندن جنینها در *in vivo* و *in vitro* مشاهده نشد [۳۴-۳۶]. مزیت اتیلن گلیکول به عنوان محلول انجمادی، توکسیسیتی پایین و نفوذ سریع آن به سلول است. برخی از محققان برای کاهش توکسیسیتی حاصل از استفاده از

یک محلول ضد یخ واحد و کاهش غلظت آن از ترکیبی از محلولهای ضد یخ استفاده کرده‌اند پس برای رسیدن به این مقصود به محلول اتیلن گلیکول محلولهای ضد یخ نفوذپذیر دیگر مثل دی‌متیل سولفوکساید<sup>۱</sup> و یا پروپاندیول<sup>۲</sup> اضافه نموده‌اند. همچنین محلول ضد یخ نفوذناپذیر می‌تواند آگیری و انجماد را تسهیل کند و در ترکیب با محلولهای ضد یخ نفوذپذیر غلظت مورد نیاز آنها را کاهش دهد. این استراتژی باعث می‌شود توکسیستی محلول انجمادی کاهش بیشتری پیدا کند [۱].

ساکارز استانداردترین جزء نفوذناپذیر محلول انجمادی است. البته محققان دیگر، از ماکرومولکول‌های دیگر از قبیل فایکول نیز استفاده کرده‌اند که یک پوشش محافظتی دور جنین تشکیل می‌دهد.

استراتژی مهم دیگری که برای کاهش اثرات توکسیک محلول انجمادی استفاده شده است به تعادل رسیدن مرحله به مرحله توسط محلولهای ضد یخ است. بنابراین روشی دو مرحله‌ای به طور وسیع استفاده شده است. محلول تعادل محتوی ۵۰٪ - ۲۰٪ غلظت محلول ضد یخ نفوذپذیر محلول انجمادی است. غلظت پایین‌تر محلول ضد یخ نفوذپذیر در محلول تعادل نسبت به محلول انجمادی توکسیستی کمتری دارد. جنین در محلول تعادل ابتدا چروک می‌خورد و به تدریج مجدداً باز شده و از حالت چروکیده خارج می‌شود تا به حجم ابتدایی برسد. این مشاهدات نشان دهنده ورود محلول ضد یخ نفوذپذیر به جنین است که انجماد داخل سلولی را در مراحل بعدی تسهیل می‌کند. این مرحله زمان مورد نیاز برای روبرو شدن جنین با محلول انجمادی که بسیار توکسیک‌تر است، را کاهش می‌دهد. در انجماد یک مرحله‌ای، احتمال نفوذ ناکافی محلول ضد یخ وجود دارد که ممکن است باعث تشکیل یخ داخل سلولی در طول پروسه سرد و گرم کردن شود [۳۴-۳۶]. توسعه روشهای مختلف انجماد شیشه‌ای مشکل کاهش غلظت محلول ضد یخ مورد نیاز برای انجماد را تا حدی حل کرده است. شایعترین محلولهای انجمادی استفاده شده اتیلن گلیکول و دی‌متیل سولفوکساید است. محلول انجمادی دیگری که استفاده شده اتیلن گلیکول ۴۰٪ است که منجر به افزایش میزان باروری شده است. این محلول انجمادی مزیت حذف دی‌متیل سولفوکساید را دارد که توکسیک‌تر از اتیلن گلیکول

---

<sup>۱</sup> . DMSO

<sup>۲</sup> . PROH