بسم الله الرحمن الرحیم

۲۵۸۹۹

۱۳۸۰ /۶/ ۲۸

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه مدارک

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم تشریح

عنوان موضوع

تاثیر هم کشتی بر تکوین جنین های ۸ سلولی موش حاصل از انجماد شیشه ای

۱۲۶۶۵
۳۵۸۹۹

نگارش
مینا قانعی

استاد راهنما
دکتر مجتبی رضازاده

استاد مشاور
دکتر منصوره موحدین

بهار ۱۳۸۰

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای **مینا قانعی**

رشته: **علوم تشریح** گرایش:

تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

جناب آقای دکتر مجتبی رضازاده (استاد راهنما)

سرکار خانم دکتر منصوره موحدین (استاد مشاور)

جناب آقای دکتر بهروز نیک‌نفس (نماینده تحصیلات تکمیلی)

جناب آقای دکتر کاظمی‌آشتیانی (استاد ناظر)

سرکار خانم دکتر مژده صالح‌نیا (استاد ناظر)

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه مدارک

بسمه تعالی

آیین نامه چاپ پایان‌نامه(رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

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

ماده۱: در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه(رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده۲: 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 **۱۳۸۰** در دانشکده **پزشکی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر **مجتبی رضازاده** و مشاوره سرکار خانم دکتر **منصوره موحدین** از آن دفاع شده است».

ماده۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های نشریات دانشگاه تعداد یک درصد شمارگان کتاب(در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده۴: در صورت عدم رعایت ماده۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

ماده۵: 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 ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده۶: اینجانب **مینا قانعی** دانشجوی رشته **علوم تشریح** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی: مینا قانعی

تاریخ و امضا:

کلیه هزینه‌های مصرفی و غیرمصرفی این پایان‌نامه برمبنای قرارداد شماره ۲۹۷/پ مورخ ۷۹/۵/۵ از بودجه تحقیقاتی جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی ایران تامین گردیده است.

تقدیم به:

برترینهای زندگیم

پدر و مادر

تقدیر و تشکر

با تشکر فراوان از استاد فاضل و گرانقدر جناب آقای دکتر مجتبی رضازاده ولوجردی که از راهنمایی‌های ایشان در همهٔ مراحل انجام پایان‌نامه بهره بردم

و با سپاس بیکران از استاد مشاور بزرگوار سرکار خانم دکتر منصوره موحدین که از ارشادات ایشان استفاده وافر بردم.

و همچنین تشکر و قدردانی از:

جناب آقای دکتر تقی الطریحی مدیر محترم گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

جناب آقای بیرانوند کارشناس گروه و جناب آقای محمدلو.

مدیرعامل محترم پژوهشکده رویان آقای دکتر سعید کاظمی

جناب آقای حسین بهاروند مسئول محترم آزمایشگاه تحقیقات پژوهشکده رویان که نهایت همکاری را در مراحل مختلف اجرای پایان‌نامه داشتند.

و کلیه کارکنان صدیق پژوهشکده رویان که در طول اجرای پایان‌نامه نهایت هماهنگی و همکاری را داشتند.

مسئولین محترم و کارکنان جهاد دانشگاهی علوم پزشکی ایران، بخصوص حوزه معاونت پژوهشی جناب آقای شاهوردی معاون محترم پژوهشی، جناب آقای باغستانی مشاور آمار و سرکار خانم تیموری که تایپ پایان‌نامه را در کمال دقت انجام دادند.

و کارکنان محترم معاونت آموزشی و پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و همهٔ بزرگوارانی که به نحوی در انجام پایان‌نامه مرا یاری کردند.

فهرست مندرجات

عنوان صفحه

فصل اول ـ مقدمه ۲

۱-۱- پیشگفتار ۲

۱-۲- فرضیه‌ها ۴

۱-۳- اهداف ۴

فصل دوم ـ مروری بر مطالعات انجام شده ۶

۲-۱- اصول انجماد شیشه‌ای ۷

۲-۱-۱- محلول‌های انجماد شیشه‌ای ۷

۲-۱-۱-۱- انواع ضدیخ‌های مورد استفاده ۷

۲-۱-۲- تأثیرات برودت ۸

۲-۱-۳- تأثیرات زیانبار یخ خارج سلولی ۹۰

۲-۱-۴- تشکیل یخ داخل سلولی ۹

۲-۱-۵- زمان تعادل و آبگیری جنین‌ها ۱۰

۲-۱-۶- سرعت ذوب و آبدهی جنین‌ها ۱۱

۲-۱-۶-۱- تورم اسمزی ۱۱

۲-۱-۷- اثرات زیانبار شکست زونا پلوسیدا ۱۲

۲-۱-۸- انواع روشهای انجمادی ۱۳

۲-۱-۸-۱- روشهای مختلف انجماد شیشه‌ای ۱۶

۲-۱-۹- عوامل مؤثر در میزان موفقیت انجماد ۱۷

۲-۱-۱۰- تأثیر انجماد در مراحل مختلف تکوین جنین ۱۸

۲-۲- عملکرد سیستم هم کشتی ۲۰

۲-۲-۱- اهمیت نوع محیط استفاده شده در هم کشتی ۲۱

۲-۲-۱-۱- محیط کشت MEMa ۲۱

۲-۲-۲- محیط کشت متوالی ۲۲

عنوان صفحه

۲-۳- انواع سلولهای استفاده شده در هم کشتی ۲۳
۲-۴- پدیده ایست تکوینی ۲۵
۲-۵- اثرات هم کشتی با سلولهای Vero بر تکامل جنینی ۲۶
۲-۶- مزایا و معایب هم کشتی ۲۸

فصل سوم ـ مواد و روشها ۳۰
۳-۱ تحریک تخمک گذاری ۳۰
۳-۲ تهیه و کشت جنین ۸ سلولی ۳۰
۳-۳ ارزیابی جنین‌ها ۳۱
۳-۴- آزمون آماری ۳۱
۳-۵- انجماد جنین ۳۱
۳-۵-۱- تهیه محلولهای انجمادی ۳۲
۳-۵-۲- مواد لازم برای انجماد شیشه‌ای ۳۲
۳-۵-۳- روش انجماد شیشه‌ای ۳۳
۳-۶- هم کشتی ۳۵
۳-۶-۱- مراحل کشت و تهیه تک لایه سلولهای Vero ۳۵
۳-۶-۲- انجماد و ذوب سلولهای Vero ۳۵
۳-۷- تهیه محیط کشت Minimum Essential medium Alpha (MEMa) ... ۳۶
۳-۹-۱- ترکیبات محیط کشت MEMa ۳۷
۳-۸- محیط کشت R۲ ..... ۳۸
۳-۸-۱- تهیه محیط کشت R۲ و ترکیبات آن ۳۸

فصل چهارم: نتایج ۴۴
۴-۱- مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد شده (آزمون ۱) و منجمد نشده (کنترل ۱) با استفاده از محیط کشت MEMa ۴۳

عنوان صفحه

۴-۲- مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد نشده در محیط کشت MEMa (کنترل ۱) و هم کشتی MEMa+Vero (کنترل ۲) ۴۳
۴-۳- مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد شده در محیط کشت MEMa (آزمون ۱) و هم کشتی MEMa+Vero (آزمون ۲) ۴۴
۴-۴- مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد شده (آزمون ۲) و جنین‌های منجمد نشده (کنترل ۲) در محیط هم کشتی MEMa+Vero ۴۶
۴-۵- مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد شده (آزمون ۳) و منجمد نشده (کنترل ۳) با استفاده از محیط کشت R۲ ..... ۴۸
۴-۶- مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد نشده در محیط R۲ (کنترل ۳) و جنین‌های منجمد نشده در محیط R۲+Vero (کنترل ۴) ۵۱
۴-۷- مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد شده در محیط کشت R۲ (آزمون ۳) و هم کشتی R۲+Vero (آزمون ۴) ۵۲
۴-۸- مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد شده (آزمون ۴) و منجمد نشده (کنترل ۴) با استفاده از محیط هم کشتی R۲+Vero ۵۴
۴-۹- مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد شده در محیط کشت MEMa (آزمون ۱) و محیط کشت R۲ (آزمون ۳) ۵۶
۴-۱۰- مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد شده در دو محیط هم‌کشتی MEMa+Vero (آزمون ۲) و R۲+Vero (آزمون ۴) ۵۷
۴-۱۱- مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد نشده در دو محیط کشت MEMAa (کنترل ۱) و محیط کشت R۲ (کنترل ۳) ۵۹
۴-۱۲- مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد نشده در دو محیط هم کشتی MEMa+Vero (کنترل ۲) و R۲+Vero (کنترل ۴) ۶۰

فصل پنجم: بحث ۸۴
۵-۱- بحث ۷۶
۵-۲- نتیجه گیری ۸۲
۵-۳- پیشنهادات ۸۳

فهرست جداول

جدول الف ـ تعداد کل جنینهای منجمد نشده و منجمد شده و میزان زنده مانده آنها ۶۲
جدول شماره ۴ـ۱: مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد شده (آزمون ۱) و منجمد نشده (کنترل ۱) با استفاده از محیط کشت MEMα ۶۳
جدول شماره ۴ـ۲: مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد نشده در محیط کشت MEMα(کنترل ۱)و هم کشتی MEMα+Vero(کنترل ۲) ۶۴
جدول شماره ۴ـ۳: مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد شده در محیط کشت MEMα (آزمون ۱) و هم کشتی MEMα+Vero (آزمون ۲) ۶۵
جدول شماره ۴ـ۴: مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد شده (آزمون ۲) و جنین‌های منجمد نشده (کنترل ۲) در محیط هم کشتی MEMα+Vero ۶۶
جدول شماره ۴ـ۵: مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد شده (آزمون۳) و منجمد نشده (کنترل۳) با استفاده از محیط کشت $R_۲$ ۶۷
جدول شماره ۴ـ۶: مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد نشده در محیط کشت $R_۲$ (کنترل۳) و هم کشتی Vero+$R_۲$(کنترل ۴) ۶۸
جدول شماره ۴ـ۷: مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد شده در محیط کشت $R_۲$ (آزمون ۳) و هم کشتی Vero+$R_۲$(آزمون۴) ۶۹
جدول شماره ۴ـ۸: مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد شده (آزمون۴) و جنین‌های منجمد نشده (کنترل۴) در محیط هم کشتی Vero+$R_۲$ ۷۰
جدول شماره ۴ـ۹: مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد شده در محیط کشت MEMα (آزمون۱) و محیط کشت $R_۲$ (آزمون۳) ۷۱
جدول شماره ۴ـ۱۰: مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد شده در دو محیط هم کشتی MEMα+Vero (آزمون۲) و Vero+$R_۲$ (آزمون ۴) ۷۲
جدول شماره ۴ـ۱۱: مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد نشده در دو محیط کشت MEMα (کنترل۱) و محیط کشت $R_۲$ (کنترل ۳) ۷۳
جدول شماره ۴ـ۱۲: مقایسه میزان تکوین جنین‌های منجمد نشده در دو محیط هم کشتی MEMα+Vero (کنترل۲) و محیط هم کشتی Vero+$R_۲$ (کنترل ۴) ۷۴

چکیده

از زمانی که نگهداری جنین به عنوان یک روش روتین مطرح شده، بهبود تکنیک‌ها و تحقیق برای سادگی روش انجمادی به منظور افزایش میزان حیات جنین‌ها یک امر ضروری به نظر می‌رسد. برای رفع اثرات مخرب ناشی از انجماد، استفاده از سیستم هم کشتی گامی در جهت بهبود تکوین جنینهای حاصل از انجماد بوده است. هدف از این پژوهش انتخاب محیط مناسب جهت کشت جنین‌های ۸ سلولی موش به روش انجماد شیشه‌ای و نیز بررسی کارایی سلولهای Veroدر بهبود میزان تکامل جنین‌های منجمد شده می‌باشد.پس از تحریک تخمک گذاری جنین‌های موش و تهیه جنین‌های ۸ سلولی به روش فلاشینگ، آنها به دو گروه آزمون و کنترل تقسیم شدند. جنین‌های گروه آزمون با استفاده از اتیلن گلیکول ۴۰٪ به روش انجماد شیشه‌ای منجمد شده و پس از ذوب در محلول ۰/۵مولار ساکارز، میزان تکوین آنها به مدت ۱۲۰ ساعت در محیط‌های کشت مختلف بررسی شد.با توجه به درصد بالای جنین‌های مرحله خروج از زونا که در محیط MEMαکشت داده شدند و نیز معنی دار نبودن تفاوت با گروه کنترل می‌توان نتیجه گرفت که محیط MEMα باعث بهبود تکوین جنین‌ها شده و محیط مناسبی برای کشت جنین‌های ۸ سلولی پس از انجماد شیشه‌ای می‌باشد. همین مراحل آزمایشی در محیط متوالی R۲ انجام شده و پس از مقایسه با گروه کنترل، پائین بودن درصد جنین‌های مرحله خروج از زونا در گروه انجمادی و نیز معنی دار بودن اختلاف بین همه مراحل جنینی می‌توان دریافت که R۲ محیط مناسبی برای کشت جنین‌های ۸ سلولی پس از انجماد نمی‌باشد. برای بررسی تأثیر هم کشتی، نتایج حاصل از کشت جنین‌ها در محیط MEMα+Vero نتایج نشان دهنده آن بود که هم کشتی با سلولهای Vero تأثیری در افزایش بهبود تکوین جنین‌های منجمد شده در محیط MEMα نداشت. در حالیکه نتایج بدست آمده در هیچ کدام از مراحل به جز مرحله خروج از زونا در محیط هم کشتی R۲+Vero معنی دار نبوده و با توجه به این داده‌ها، هم کشتی با سلولهای Vero در محیط R۲ بر خلاف MEMα باعث بهبود در میزان تکامل جنین‌های منجمد شده می باشد.در مقایسه‌ای که بین دو نوع محیط MEMα و R۲ انجام شد، با توجه به درصد بالای جنین‌های مرحله خروج از زونا در محیط MEMα و معنی دار بودن تفاوت این مرحله از تکاملی با جنین‌های کشت داده شده در محیط R۲ می‌توان دریافت که محیط MEMα نسبت به محیط R۲ برتری داشته و باعث بهبود تکوین جنین‌های حاصل از انجماد می‌باشد. همچنین برای بررسی تأثیر هم کشتی، علیرغم درصد بالای مرحله خروج از زونا در هر دو گروه هم کشتی و معنی دار بودن تفاوت میزان جنین‌های مرحله خروج از زونا و میزان دژنراسیون در ساعات پایانی کشت می‌توان نتیجه گرفت که محیط هم کشتی MEMα+Vero در بهبود تکوین جنین‌ها مؤثرتر بوده و استفاده از آن در کشت جنین‌های حاصل از انجماد ارجحیت دارد.در مجموع از نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان دریافت که هم کشتی باعث بهبود رشد و افزایش تکوین جنین‌های حاصل از انجماد شده،میزان دژنراسیون را کاهش و بر اثرات مخرب ناشی از انجماد فائق می‌آید.

کلمات کلیدی: انجماد شیشه‌ای، هم کشتی، جنین ۸ سلولی موش

فصل اول

مقدمه

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران

۱ـ مقدمه

۱ـ۱ـ پیشگفتار

بیش از پنجاه سال از زمانی که دانش زیست‌شناسی انجمادی[1] توانست روش قابل قبولی را برای انجماد سلولها عرضه کند می‌گذرد[۱]. در زمینه انجماد، همه کوشش‌ها در جهت بهبود میزان حیات و ساده‌تر کردن روش انجمادی بوده است [۳،۲].

اولین آبستنی حاصل از جنین‌های ذوب و انتقال یافته در سال ۱۹۸۳ توسط Trounson و همکارانش [۴] در ملبورن استرالیا گزارش شد. با قابلیت انتقال تعداد بیشتر جنین، میزان آبستنی افزایش یافته و سیکل‌های انتقال اضافی بدون تکرار تحریک تخمدانی در نظر گرفته می‌شود. در لقاح آزمایشگاهی انسانی بدلیل موقعیت‌های کلینیکی خاص، نگهداری جنین یا تخمک در شرایط سرما ضروری می‌باشد. چندقلویی یکی از بزرگترین مشکلات در زمینه انتقال جنین حاصل از IVF[2] می‌باشد. در واقع مشکلات زمان انتقال جنین‌ها از طریق کانال سرویکال[3] و یا هر موقعیت دیگری که باعث تأخیر در امر انتقال شود نیاز به نگهداری جنین را در شرایط سرما ضروری می‌سازد [۵]. از زمانی که نگهداری جنین به عنوان یک روش روتین مطرح شد، بهبود تکنیک‌ها و تحقیق برای سادگی روش انجمادی یک امر ضروری به نظر می‌رسد. علاوه بر آن، از آنجایی که انجماد جنین‌های گاو به دلایل علمی و اقتصادی از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد، تحقیقات زیادی در زمینه انجماد صورت گرفته است. یکی از روشهای انجمادی فرایند یخ زدگی آهسته می‌باشد که برای اولین بار توسط Whittingham و همکارانش [۶] برای جنین‌های موش در مرحله پیش لانه گزینی بکار رفته و سپس برای جنین‌های گاو حاصل از IVF عملی شد. تقریباً

1- cryobiology

2- In vitro fertilization

3- cervical

مدت دو دهه است که ایجاد ژنهای جدید و تکنولوژی انتقال ژن، منبع ایجاد نژادهای جدید موش بوده و در حقیقت ابزار با ارزشی در زمینه تحقیقات شده است. برای حمایت از این رده‌ها و نیز سودمند بودن آنها برای جامعه علمی، انجماد روشی است که باعث نگهداری آنها در کوچکترین فضای ممکن شده است. این امر موجب صرفه جویی در زمان، انرژی و هزینه‌ها می‌شود. انجماد جنین موش یک ابزار عالی برای نگهداری خیلی از رده‌های موش می‌باشد که در غیر این صورت بدلیل مشکلات موجود در زمینه باروری، نابود می‌شدند. با افزایش توجه به تحقیقات پایه و تکنیک‌های مورد استفاده در مراحل اولیه جنینی، همچون انتقال هسته و تزریق ژن، موفقیت تکنیک‌های انجماد سریع این جنین‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. دومین روش انجمادی، انجماد شیشه‌ای می‌باشد. در حقیقت از زمانی که Rall و Fahy [۸،۷] برای اولین بار موفقیت انجماد شیشه‌ای جنین های هشت سلولی را گزارش کردند، یک محلول انجمادی جهانی[۱] را که بتواند در همه مراحل تکوین جنینی و نیز در بین گونه‌های وسیعی از جانوران مؤثر باشد، پایه ریزی کردند. در سالهای اخیر سیستم هم کشتی به منظور بهبود در میزان آبستنی در شرایط IVF نیز مورد توجه واقع شده است. این تکنیک شامل کشت جنین‌ها بر روی تک لایه‌ای از سلولهای سوماتیک به مدت ۶-۳ روز قبل از انتقال به رحم مادر می‌باشد. اثرات هم کشتی وابسته به گونه و یا بافت خاصی نیست. در حال حاضر روش هم کشتی یکی از بهترین روشها برای بدست آوردن جنین قبل از مرحله لانه گزینی می‌باشد.

ارزیابی کارایی حقیقی هم کشتی بدلیل دخیل بودن حداقل سه پارامتر متغیر، با مشکلاتی روبرو می‌باشد. این سه پارامتر عبارتند از: نوع تک لایه، لقاح در شرایط آزمایشگاهی و مدت زمان هم‌کشتی. انواع سلولهایی که برای تهیه تک لایه مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل سلولهای اپی‌تلیومی رحم یا لوله رحم حیوانی و انسانی، سلولهای کومولوس یا گرانولوزای انسانی و سلولهای Vero که یک رده سلولی از سلولهای اپی تلیال کلیه میمون است، می‌باشند. انواع مختلفی از بیماران، از جمله کسانی که پیش آگهی ضعیفی از آبستنی داشته‌اند، افرادی که دارای سطح بالایی از FSH[۲] بوده‌اند و یا اینکه تخمکهای تولید شده آنها از کیفیت پائینی برخوردار بوده و یا دارای جنین هایی بوده‌اند که از لحاظ مرفولوژیکی دچار مشکل بوده‌اند، وارد برنامه

1- Vitrified solution international

2- Folicle stimulating Hormone