بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد در رشته علوم تشریح

عنوان

مقایسه وقوع آپوپتوز، بقا و بلوغ در فولیکول‌های پره‌آنترال موش بعد از Slow freezing و Cryotop vitrification

نگارش

عبدالوهاب تقوی

استاد راهنما

دکتر مجتبی رضازاده ولوجردی

استاد مشاور

دکتر مهدی فروزنده مقدم

بهار ۱۳۸۸

دستورالعمل حق مالکیت مادي و معنوي در مورد نتایج پژوهشهاي علمي
دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست های 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 ، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه ها/ رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هر گونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

ماده۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشند.
تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه/ رساله نیز منتشر می شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین نامه های مصوب انجام می شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی حاصل از نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸٤/٤/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هر گونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

نام و نام خانوادگی . عبدالرضا [illegible]
تاریخ و امضاء ۱۳۸۸/۱۲/۵

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 فعالیتهای علمی ــ پژوهشی دانشگاه است .بنابراین به منظورآگاهی 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 قبلا 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 / ~~رساله دکتری نگارنده~~ دررشته ..... است که در سال ..... ۱۳۸۸ دردانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی ..... ، مشاوره ..... 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 قراردهد .

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 پرداختهای بهای خسارت ،دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه ووصول کند ،به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود ، ازطریق دادگاه ، معادل وجه مذکور در ماده ۴ رااز محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش ،تامین نماید .

ماده ۶: اینجانب ..... دانشجوی رشته ..... مقطع ..... تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده ، به آن ملتزم می شوم.

نام ونام خانوادگی

تاریخ و امضا

۱۳۸۹/۳/۵

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

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای عبدالوهاب تقوی 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:

دکتر مجتبی رضازاده (استاد راهنما)

دکتر مهدی فروزنده مقدم (استاد مشاور)

دکتر مژده صالح نیا (استاد ناظر)

دکتر سیدجواد مولا (استاد ناظر)

دکتر تقی طریحی (نماینده تحصیلات تکمیلی)

با سپاس از ایزد پاک که مرا نعمت حیات بخشید و شوق دانستن را در وجودم نهاد و همواره توجه و محبت او را به خود باور داشتم.

تقدیم به:

دو گوهر گرانبها پدر و مادر عزیزم آنها که تجلی از خودگذشتگی، مهر، عشق و امیدند

خواهران و برادرم او که مظهر صداقت و صمیمیت هستند

یار و همراهم در زندگی، مشوقم در تحصیل و امیدم در تلاش، فاطمه

با تشکر و قدر دانی از:

استاد دانشمند و گرانقدر آقای دکتر رضازاده ولوجردی که در تمام مراحل پایان‌نامه از راهنمایی-های خردمندانه ایشان بهره بردم و با وسعت نظر و احساس مسئولیت مرا راهنمایی کردند و از حمایت های خالصانه ایشان بهره‌مند شوم.

استاد مشاور آقای دکتر فروزنده‌مقدم که از همکاری‌ها و مشاوره‌های ارزنده ایشان بهره‌مند بودم.

اساتید محترم و بزرگوار گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس آقای دکتر تقی و خانم‌ها دکتر موحدین و دکتر صالح‌نیا که به هر نحو ممکن در انجام و اتمام این پایان‌نامه مرا یاری کردند و مرا مرهون لطف و محبت خویش قرار دادند.

کارشناسان محترم گروه آقای پوربیرانوند و خانم ابراهیمی

کارکنان محترم آزمایشگاه جنین‌شناسی رویان خانم‌ها دکتر افتخاری، کریمیان ، خانم حسنی، خانم دالمن، خانم دکتر ابراهیمی، برکتی و آقایان فتحی، علیپور، بهبهانیان و افشانی

همکلاسانم آقای پناهی و خانم ها صمیمی، شربت اوغلی و محمدی

کارکنان محترم آزمایشگاه ژنتیک رویان، خانم شاهسونی

کارکنان محترم مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دکتر دانش‌زاده و آقای بهروزی

چکیده

این پژوهش به منظور ارزیابی اثر انجماد شیشه‌ای کرایوتاپ و انجماد آهسته بر میزان بقا، بلوغ و بیان ژنهای آپوپتوز در فولیکول‌های پره‌آنترال جداشده از تخمدان موش انجام گرفت. مطالعه به روش تجربی بر روی موش های نابالغ ۱۲- ۱۴ روزه نژاد NMRI انجام شد. فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده به گروه‌های غیرانجمادی، انجماد شیشه‌ای و انجماد آهسته تقسیم شدند.

میزان بقا در فولیکول‌های گروه‌های غیرانجمادی، انجماد شیشه‌ای و انجماد آهسته بترتیب ۱۰۰٪، ۲/۳۵±۹۷/۵۶٪ و ۲/۴۷±۴۹/۶۸٪ بود آنالیز آماری حاکی از عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های غیرانجمادی و انجماد شیشه‌ای بود. در صورتیکه گروه انجماد آهسته تفاوت معنی دار با این گروه‌ها داشت (P=0.00). ارزیابی بلوغ در روز چهارده کشت نشان داد میزان بلوغ در گروه غیر انجمادی ۳/۹۲± ۸۲/۴۵٪ ، گروه انجماد شیشه‌ای ۲/۹۱ ±۷۱/۵۱ ٪ و در گروه انجماد آهسته ۱/۴۳± ۳۰/۱٪ بود. آنالیز آماری حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار بین هر سه گروه بود(P=0.00). ارزیابی بیان ژنهای Bax، Bcl2، p53، Fas و Survivin در فولیکول‌های پره‌آنترال غیر انجمادی، انجماد شیشه‌ای و انجماد آهسته نشان داد بیان Bcl2 در گروه انجماد آهسته بطور معنی‌داری نسبت به گروه انجماد شیشه‌ای و غیرانجمادی کاهش یافته ولی دو گروه انجماد شیشه‌ای و غیرانجمادی تفاوت معنی‌داری نداشتند. میزان بیان ژنهای Bax و P53 در گروه انجماد آهسته بطور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های غیرانجمادی و انجماد شیشه‌ای بوده ولی بیان این ژنها در این دو گروه تفاوت معنی دار نداشت. ژن Fas فقط در گروه انجماد آهسته بیان شده است. بیان Survivin در سه گروه اختلاف معنی‌داری نداشت. نسبت بیان نیمه کمی رونوشت Bax به Bcl2 در گروه انجماد آهسته بطور معنی داری بیشتر از گروه های انجماد شیشه‌ای و غیر انجمادی بود. اما تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های انجماد شیشه‌ای و غیر انجمادی مشاهده نشد (P<0.05).

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت انجماد شیشه‌ای کرایوتاپ نسبت به انجماد آهسته روش مناسب‌تری برای انجماد فولیکول‌های پره‌آنترال می‌باشد. همچنین انجماد آهسته نسبت به انجماد شیشه‌ای بطور معنی‌داری بیان ژنهای آغازگر آپوپتوز را افزایش می‌دهد.

واژگان کلیدی: انجماد شیشه‌ای، انجماد آهسته، فولیکول پره‌آنترال، موش

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده ۱

۱-۱ مقدمه ۲

۱-۲ انجماد ۴

۱-۲-۱ انجماد آهسته ۴

۱-۲-۲ انجماد شیشه ای ۵

۱-۲-۲-۱ اساس فیزیکی انجماد شیشه ای ۶

۱-۲-۲-۲.متغیرهای اساسی در انجماد شیشه‌ای ۷

۱-۲-۲-۲-۱سرعت سرد کردن نمونه ۷

۱-۲-۲-۲-۲ سرعت گرم کردن نمونه ۷

۱-۲-۲-۲-۳ نوع و غلظت ضدیخ ۸

۱-۲-۲-۳ محلول‌های انجماد شیشه‌ای ۸

۱-۲-۲-۳-۱ محلول‌های بافری ۸

۱-۲-۲-۳-۲ ضدیخ‌ها ۹

۱-۲-۲-۳-۳ دی‌ساکاریدها ۹

۱-۲-۲-۴ حجم محلول انجماد ۱۰

۱-۲-۳ انجماد آهسته و تاثیر آن بر میزان بقا و بلوغ فولیکول ۱۰

۱-۲-۴ انجماد شیشه‌ای و تاثیر آن بر میزان بقا و بلوغ فولیکول ۱۲

۱-۳ انجماد و مرگ سلولی ۱۴

۱-۳-۱ مرگ سلولی برنامه ریزی شده ۱۴

۱-۳-۲ آپوپتوزیس ۱۵

۱-۳-۳ سیگنال های مولکولی سرکوب‌گر یا آغازگر مرگ سلولی ۱۶

۱-۳-۳-۱ پروتئین های خانواده Bcl-2 ..... ۱۶

۱-۳-۳-۱-۱ Bcl-2 وآپوپتوز در تخمدان ۱۷

۱-۳-۳-۱-۲ تنظیم واکنش متقابل پروتئین‌های خانواده Bcl-2 ..... ۱۷

۱-۳-۳-۲ فاکتور نکروز تومور ۱۷

۱-۳-۳-۲-۱ خانواده TNF و آپوپتوز در تخمدان ۱۸

۱-۳-۳-۳ P53 مهارکننده تومور ۱۸

۱-۳-۴ آبشار کاسپازی ۱۸

۱-۳-۵ مهار کننده های آپوپتوز ۱۹

۱-۳-۶ انجماد واثر آن بر آپوپتوز در فولیکول ۱۹

۱-۴ اهداف تحقیق ۲۳

۱-۵ سوالات تحقیق ۲۳

۱-۶ فرضیات تحقیق ۲۳
فصل دوم: مواد و روشها ۲۵
۲-۱ نمونه گیری از موش ۲۶
۲-۲ جداسازی فولیکول ها از تخمدان ۲۶
۲-۳ اندازه گیری قطر فولیکول ۲۷
۲-۴ انجماد شیشه ای و ذوب فولیکول ۲۷
۲-۴-۱ تهیه محلول انجمادی ۲۷
۲-۴-۲ انجماد شیشه ای فولیکول ۲۹
۲-۴-۳ ذوب فولیکول ۲۹
۲-۵ انجماد آهسته و ذوب فولیکول ۳۱
۲-۵-۱ تهیه محلول انجمادی ۳۱
۲-۵-۲ انجماد آهسته ۳۱
۲-۵-۳ ذوب فولیکول ۳۲
۲-۶ تعیین درصد زنده ماندن فولیکولها ۳۴
۲-۷ کشت فولیکول ۳۴
۲-۷-۱ نحوه ساخت محیط کشت ۳۴
۲-۷-۲ ارزیابی مورفولوژیک و میزان بقا در مدت کشت ۳۵
۲-۸ ارزیابی بلوغ در فولیکول های کشت شده ۳۵
۲-۹ بررسی بیان ژنهای وابسته به آپوپتوز به روش RT-PCR نیمه کمی ۳۶
۲-۹-۱ گروههای مورد مطالعه ۳۶
۲-۹-۲ استخراج RNA ۳۶
۲-۹-۲-۱ روش استخراج RNA ۳۷
۲-۹-۲-۲ بررسی RNA استخراج شده ۳۸
۲-۹-۳ نسخه برداری معکوس ۳۸
۲-۹-۳-۱ مراحل نسخه برداری معکوس ۳۸
۲-۹-۴ واکنش PCR ۴۰
۲-۹-۴-۱ آماده سازی پرایمرها ۴۰
۲-۹-۴-۲ روش انجام PCR ۴۱
۲-۹-۵ ژل الکتروفورز محصول PCR ۴۲
۲-۹-۵-۱ روش تهیه ژل آگارز ۴۲
۲-۹-۵-۲ الکتروفورز DNA ۴۲
۲-۹-۵-۳ رنگ آمیزی ژل ۴۳
۲-۹-۶ بررسی نیمه کمی بیان رونوشت های ژن ۴۳
۲-۱۰ بررسی‌های آماری ۴۳

فصل سوم: نتایج ٤٤
۳-۱ مقایسه میزان بقا در فولیکول های غیر انجمادی و انجمادی ۴۵
۳-۲ مورفولوژی فولیکول ها در طول کشت..... ۴۵
۳-۳ مقایسه میزان بلوغ در فولیکول های غیر انجمادی و انجمادی ۴۶
۳-۴ مقایسه بیان نیمه کمی ژنهای مرتبط با آپوپتوز در فولیکولهای پره آنترال کشت داده شده..... ۴۶
۳-۴-۱ بیان نیمه کمی رونوشتBcl-2 ..... ۴۶
۳-۴-۲ بیان نیمه کمی رونوشت Bax..... ۴۷
۳-۴-۳ بیان نیمه کمی رونوشت p53..... ۴۷
۳-۴-۴ بیان نیمه کمی رونوشتFas..... ۴۷
۳-۴-۵ بیان نیمه کمی رونوشت Survivin. ۴۷
۳-۴-۶ نسبت بیان نیمه کمی رونوشت Bax به Bcl-2..... ۴۸
فصل چهارم: بحث،نتیجه گیری و پیشنهادها. ۵۶
۴-۱ اثر انجماد شیشه ای و انجماد آهسته بر میزان بقا ، رشد و بلوغ..... ۵۷
۴-۲ اثرانجماد شیشه ای و انجماد آهسته بر بیان ژن‌های وابسته به آپوپتوز در فولیکول‌های کشت داده شده و مقایسه آن با فولیکول های غیر انجمادی..... ۶۰
۴-۲-۱ بیان ژن Bcl-2 و Bax وp53 ..... ۶۰
۴-۲-۲ بیان نیمه کمی ژن Fas..... ۶۲
۴-۲-۳ بیان ژن Survivin..... ۶۲
۴-۳ نتیجه گیری نهایی..... ۶۴
۴-۴ پیشنهادات..... ۶۴
فهرست منابع..... ٦٥
چکیده انگلیسی ۷۱

فهرست نمودارها

نمودار۳-۱. میزان زنده ماندن فولیکول های پره آنترال جدا شده بعداز انجماد شیشه ای،انجماد آهسته و غیرانجمادی.....۵۲

نمودار۳-۲. میزان بلوغ فولیکول های پره آنترال جدا شده بعداز انجماد شیشه ای،انجماد آهسته و غیرانجمادی ۵۳

نمودار۳-۳. بیان نیمه‌کمی ژن P53, Fas, Bax, survivin, Bcl2 در فولیکول های پره آنترال جدا شده بعداز انجماد شیشه ای،انجماد آهسته و غیرانجمادی ۵۴

نمودار۳-۴. نسبت بیان نیمه‌کمی ژن Bax به Bcl-2 فولیکول های پره آنترال جدا شده بعداز انجماد شیشه ای،انجماد آهسته و غیرانجمادی.....۵۵

فهرست شکل ها

شکل ۲-۱. مراحل بارگیری فولیکول توسط کرایوتاپ..... ۳۰
شکل ۲-۲. مراحل بارگیری فولیکول توسط نی انجمادی..... ۳۳
شکل ۳-۱. فولیکول پره‌آنترال زنده و مرده..... ۴۹
شکل ۳-۲. مراحل رشد فولیکول پره‌آنترال در محیط کشت..... ۵۰
شکل ۳-۳. عکس ژل الکتروفورز RNA استخراج شده..... ۵۱

فصل اول

مقدمه

و

مروری بر مطالعات

۱-۱ مقدمه

کرایوبیولوژی[1] علم مطالعه اثر دماهای پایین بر موجودات زنده است. تاریخچه آن به اواخر قرن هفدهم میلادی باز می‌گردد، زمانی که Power نوعی کرم پهن کوچک را منجمد کرد و متوجه شد که کرم‌ها پس از ذوب همچنان زنده و فعال باقی می‌مانند. وی تئوری خود را اینگونه ارائه نمود که دماهای پایین بر خلاف دماهای بالا برای موجودات زنده کشنده نیستند[۱]. از آن پس محققان زیادی به بررسی اثر دماهای پایین بر موجودات زنده پرداختند که منجر به شکل‌گیری شاخه جدیدی در علم بیولوژی با عنوان کرایوبیولوژی گردید.

دانش کرایوبیولوژی در مطالعات تولید مثلی کاربرد فراوانی دارد و جهت ذخیره مواد ژنتیکی در گونه‌های نادر حیوانات، حیوانات ترنس‌ژن، ذخیره جنین، تخمک‌بالغ، بافت تخمدان و فولیکول پره‌آنترال مورد استفاده قرار گرفته است [۲-۵]. از این بین امروزه انجماد فولیکول‌های پره‌آنترال مورد توجه قرار گرفته است، زیرا برخلاف تخمک MII که خطر آنیوپلوییدی و سخت شدن زونا و عدم نفوذ اسپرم وجود دارد، انجماد فولیکول پره‌آنترال به علت ساختار فیزیولوژیکی و مرحله تکوینی فاقد این مشکلات می‌باشد. این تکنولوژی می‌تواند برای حفظ قدرت باروری زنان جوان مبتلا به سرطان که احتیاج به رادیوتراپی یا شیمی‌درمانی دارند استفاده شود. به همین علت این تکنیک امروزه توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است[۶-۹] .

[1] Cryobiology

اولین تلاش برای انجماد فولیکول پره‌آنترال در سال ۱۹۹۰ توسط Correl و همکاران انجام گرفت [۱۰]. آنها فولیکول را با روش انجماد آهسته منجمد کردند که با نتایج موفقیت‌آمیزی همراه نبود.

نوعی دیگر از روش انجماد، انجماد سریع (غوطه‌ور ساختن در نیتروژن مایع) است که در آن گذر از دماهای مضر برای سلول به سرعت صورت می‌گیرد و با توجه به سهولت، کم‌هزینه بودن و کاهش صدمات وارده به سلول امروزه توجه خاصی بدان مبذول شده است [۱]. انجماد شیشه‌ای[1] نوعی انجماد سریع است که در آن از غلظت بالای ضدیخ در زمان انجماد استفاده می‌شود. در انجماد شیشه‌ای از محلولهای vitrifing یا glass forming استفاده می‌شود که بدون تشکیل کریستالهای یخ، محیط مورد نظر را منجمد می‌کنند [۱]. متغیر های فراوانی در انجماد شیشه‌ای وجود دارد که از آنها می‌توان به حامل‌های مختلف اشاره کرد. ، Lin و همکاران در سال ۲۰۰۸ با استفاده از metal cube فولیکول های پره‌آنترال موش را به روش انجماد شیشه‌ای منجمد کردند[۱۱] و به میزان بلوغ ۵۵٪ دست پیدا کردند که بطور معنی‌داری کمتر از گروه غیرانجمادی بود. نوع دیگری از حامل که برای انجماد شیشه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد، کرایوتاپ[2] می‌باشد. با توجه به نتایج خوبی که از انجماد سلول‌های مختلف با استفاده از کرایوتاپ حاصل شده است به نظر می‌آید این روش در انجماد شیشه ای فولیکول پره‌آنترال کارآمد باشد، لذا در مطالعه حاضر بعد از این روش برای انجماد شیشه‌ای فولیکول پره‌آنترال استفاده شد. بعد از انجماد برای دستیابی به تخمک آماده لقاح، فولیکول ها باید در آزمایشگاه مراحل رشد را طی کنند. در طی این فرایند تعدادی از فولیکول ها دچار آپوپتوز می شوند. در فرایند آپوپتوز تعادل بین بیان ژن های مسئول بقا و مرگ ضروری می باشد. به نظر می رسد که انجماد بر میزان بیان این ژن ها و در نهایت وقوع آپوپتوز اثرگذار باشد. لذا در تحقیق حاضر بعد انجماد فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده با روش‌های انجماد آهسته و انجماد شیشه‌ای میزان بقا، بلوغ و بیان ژنهای Bcl2، Bax، P53، Fas و survivin بررسی شده است.

[1] Vitrification
[2] Cryotop

۱-۲ انجماد

انجماد به معنای تشکیل کریستال یخ با پی آمد جداشدن آب از مواد محلول است، که از مشکلات عمده آن می‌توان تشکیل کریستال یخ داخل سلول و غلظت‌های بالای مواد محلول را نام برد. بنابراین کاهش سرعت سرد کردن جهت برقرار شدن تعادلی ظریف بین فاکتورهایی که منجر به آسیب می شوند، ضروری می باشد. عمده این آسیب‌ها توسط کریستال یخ ایجاد می شود، اما می‌تواند توسط سرما، فشار اسموتیک، شکست بلاستومرها و زوناپلاسیدا و تغییرات اسکلت سلولی نیز ایجاد شود. با توجه به تحقیقات انجام شده انجماد با روش‌هایی چون انجماد آهسته[1] و انجماد شیشه‌ای انجام می‌شود[۱] .

یکی از راه‌های حذف کریستال یخ استفاده از پروتکل‌های انجماد شیشه‌ای است، این روش انجماد به عنوان جایگزینی برای روش انجماد آهسته بوده ودر سال ۱۹۸۵ برای اولین بار توسط Rall و همکاران ارائه گردید، این محققین توانستند جنین موش را با استفاده از محلول انجماد شیشه‌ای و بدون تشکیل کریستال یخ در دمای ۱۹۶- درجه سانتیگراد منجمد کنند [۱].

۱-۲-۱ انجماد آهسته

در روش انجماد آهسته با افزودن غلظت‌های پایین ضدیخ به محلول اطراف سلول، آب درون سلول خارج شده و در نتیجه درون سلول تغلیظ می‌گردد. خروج آب از سلول در مرحله سرد کردن ادامه می-یابد. با سرد کردن محلول بلورهای یخ در خارج سلول تشکیل می‌گردد و به این ترتیب از تشکیل بلور یخ داخل سلولی جلوگیری به عمل می‌آید. سرعت سرد کردن محلول باید چنان باشد که مولکول‌های آب خارج شده از سلول به هسته‌های یخ پیوسته و سبب رشد بلورهای یخ خارج سلولی گردند و بین سرعت خروج مولکول‌های آب از سلول و سرعت رشد بلورهای یخ خارج سلولی تعادل برقرار باشد[۱۲].

[1] Slow freezing

Cortvridt و همکاران در سال ۱۹۹٦ فولیکول های پره آنترال جدا شده از تخمدان موش را به روش انجماد آهسته منجمد کردند سپس آنها را پس از ذوب کشت داده و از لحاظ تکوین مورد بررسی قرار دادند[۱۳].

با وجود این که روش انجماد آهسته با میزان بقای کمی همراه است اما برای انجماد تخمک و جنین گونه‌های مختلف کاربرد دارد. با این وجود گران بودن این روش بدلیل نیاز به تجهیزات خاص و وقت-گیر بودن کاربرد آن را مشکل ساخته، لذا محققین تلاش می‌کنند روش های ساده و سریعتری را ابداع کنند.

۱-۲-۲ انجماد شیشه‌ای

Luyet در سال ۱۹۳۷ تشکیل بلورهای یخ هنگام انجماد سیستم‌های بیولوژیک را فرایندی نامطلوب دانست و اظهار داشت تا حد امکان باید از تشکیل بلورهای یخ هنگام انجماد جلوگیری شود. وی سرد کردن بسیار سریع سلول‌های زنده را برای تشکیل جامد شیشه ای[1] به جای بلورهای یخ مورد توجه قرار داد[۱٤]. به این ترتیب انجماد شیشه‌ای در سیستم‌های بیولوژیک به عنوان یک ایده مطرح شد. انجماد شیشه‌ای نیازمند سرعت‌های بالای سرد کردن و گرم کردن سلول‌ها، همچنین محافظت از سلول‌ها در برابر سمیت مواد بکار رفته بود. در آن زمان روش اجرای آن به روشنی مشخص نبود و موفقیت چندانی نیز بدست نیامد لذا توجه محققان زیادی به روش های انجماد آهسته معطوف گردید. با گذشت زمان و انجام تحقیقات بیشتر موفقیت هایی با روش انجماد شیشه‌ای کسب شد بطوری که امروزه بصورت فراگیر برای انجماد سلول و بافت مورد استفاده قرار می گیرد[۱].

[1] Vitreous solid

۱-۲-۲-۱ اساس فیزیکی انجماد شیشه‌ای

سرد کردن آب خالص تا دمای زیر صفر درجه سانتیگراد منجر به تشکیل هسته‌های یخ میکروسکوپی به عنوان اولین و کوچکترین جزء بلورهای یخ در نتیجه بهم پیوستن مولکول‌های منفرد آب می‌شود. بالاترین و پایین‌ترین دما برای تشکیل هسته‌های یخ در آب خالص ۰ و ٤٠- درجه سانتیگراد است. ولی بطور معمول این هسته‌ها در دمای ۵- و ۱۵- درجه سانتیگراد به طور خودبخود یا در اثر عوامل القاکننده تشکیل می‌گردد. پس از تشکیل هسته‌های یخ مولکول‌های آب به راحتی به سطح یخ‌زده اتصال می‌یابند و به این ترتیب هسته اولیه بزرگتر شده و بلورهای یخ میکروسکوپی ایجاد می‌شود، ادامه این روند منجر به تشکیل بلورهای یخ ماکروسکوپی خواهد شد[۱۵]. بر اساس قوانین فیزیکی –شیمیایی افزودن مواد حل‌شونده به آب خالص سبب کاهش دمای مورد نیاز برای تشکیل یا ذوب بلورهای یخ می‌شود و هیچگونه محدودیتی برای کاهش دما پس از افزودن چنین موادی وجود ندارد. به همین سبب در محلول‌های بسیار غلیظ ممکن است هرگز بلور یخ به وجود نیاید و به جای آن جامد شیشه‌ای تشکیل گردد. امکان قرارگیری مولکول‌های مواد حل‌شونده بین بلورهای یخ به علت شکل و آرایش مولکول بلورها بسیار اندک است ولی مولکول‌های این مواد می‌توانند در کنار همدیگر تجمع یابند و از این طریق بلورهای یخ را تحت فشار ناشی از تجمع خود قرار دهند. بنابراین تشکیل و رشد بلورهای یخ می‌تواند تحت تاثیر موادی مانند ضدیخ‌ها و مهارکننده‌های تشکیل یخ قرار گیرد[١٦و١٧].

در انجماد شیشه‌ای به دلیل استفاده از محلول‌های بسیار غلیظ ضدیخ آب درون سلول پیش از مرحله سرد کردن خارج می‌گردد و هیچ گونه بلور یخ داخل سلولی تشکیل نمی‌شود. سرد کردن سریع محلول سبب افزایش چسبندگی آن و تشکیل جامد شیشه‌ای می گردد، در نتیجه در خارج سلول نیز بلور یخ تشکیل نمی‌شود. به همین دلیل انجماد شیشه‌ای را انجماد بدون تشکیل بلور یخ می‌دانند[۱۸].

۱-۲-۲-۲ متغیرهای اساسی در انجماد شیشه‌ای

۱-۲-۲-۲-۱ سرعت سرد کردن نمونه

دو عامل مهم برای کسب موفقیت در انجماد شیشه‌ای عبارتند از سرعت سرد کردن محلول و نوع و غلظت ترکیباتی که به عنوان ضدیخ مورد استفاده قرار می‌گیرند. در انجماد شیشه‌ای سرد کردن سریع نمونه و استفاده از غلظت‌های بالای ضدیخ برای جلوگیری از تشکیل بلورهای یخ با محدودیت و مشکلاتی همراه است. در این میان برقراری تعادل بین بیشترین سرعت ممکن برای سرد کردن نمونه و کمترین غلظت ضدیخ به طوری که سلول‌ها آسیب نبینند و جامد شیشه‌ای نیز تشکیل شود بسیار مهم است. بهترین سرعت سرد کردن، سرعتی است که منجر به خروج مولکول‌های آب بیشتری از سلول شود و مناسب‌ترین غلظت ضدیخ نیز غلظتی است که مانع تشکیل بلورهای یخ داخل سلولی گردد. از روش-های افزایش سرعت انجماد غوطه‌ور ساختن یکباره بافت در ازت مایع می‌باشد. محققین نشان داده‌اند که با استفاده از روش مذکور سرعت انجماد به بیش از ۳۰۰۰ درجه سانتی گراد در دقیقه افزایش می-یابد[۱۲].

۱-۲-۲-۲-۲سرعت گرم کردن نمونه

یکی از عوامل مهم در انجماد سرعت گرم کردن نمونه است. سرعت گرم کردن مانند سرعت سرد کردن می‌تواند بقای سلول را تحت تاثیر قرار دهد. آنچه مسلم است اینکه سرعت گرم کردن سلول وابسته به سرعت سرد کردن آن در هنگام انجماد است. چنانچه هنگام سرد کردن سلول کریستال‌های یخ داخل سلولی بسیار کوچک تشکیل شود، هنگام گرم کردن بهم پیوستن کریستال‌های کوچک یخ موجب بروز تغییراتی در سلول می‌شود که می‌تواند آسیب‌های زیادی به سلول وارد کند[۲].