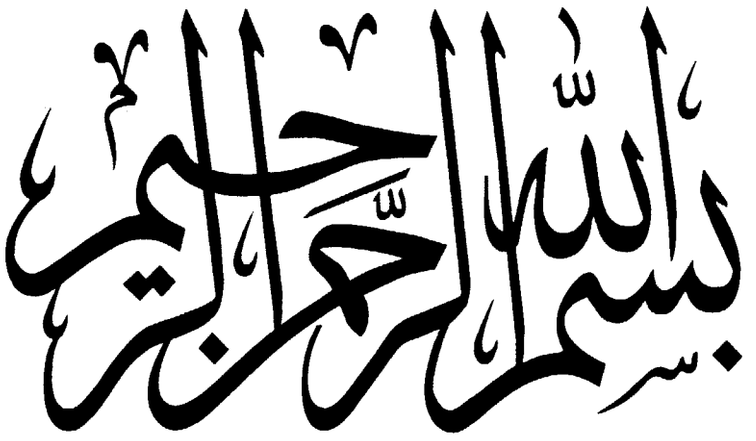


٣٥٨٩٨

۱۳۸۰ /۴/ 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 همزمان هم کشتی و محیط های کشت متوالی بر تکوین جنین های تک سلولی موش حاصل از انجماد شیشه ای

12666
۳۵۸۹۸

نگارش

بهار موقر

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 **بهار موقر**

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 تقی‌الطریحی (نماینده تحصیلات تکمیلی)

جناب آقای دکتر بهروز نیک‌نفس (استاد ناظر)

جناب آقای دکتر سعید رهبر (استاد ناظر)

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 - 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 جناب 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 **بهار موقر** دانشجوی رشته **علوم تشریح** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی: بهار موقر

تاریخ و امضا:

کلیه هزینه‌های مصرفی و غیرمصرفی این پایان‌نامه برمبنای قرارداد شماره ۲۹۸/پ مورخ ۷۹/۵/۵ از بودجه تحقیقاتی جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی ایران تامین گردیده است.

تقدیم به:

برترینهای زندگیم

پدر و مادر

و

یگانه برادرم

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.

مدیر عامل 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: مقدمه ۱

۱-۱- پیش گفتار ۲

۱-۲- فرضیات این تحقیق عبارتند از: ۵

۱-۳- اهداف این تحقیق شامل: ۵

فصل دوم: مروری بر مطالعات گذشته ۶

۲-۱- انجماد جنین و فوائد آن ۷

۲-۲- انواع روشهای انجمادی ۸

۲-۲-۱- انجماد آهسته یا کنترل شده ۸

۲-۲-۲- انجماد سریع / فوق سریع ۹

۲-۲-۳- انجماد شیشه‌ای ۱۰

۲-۳- عوامل تکنیکی موثر در انجماد شیشه‌ای ۱۲

۲-۳-۱- ترکیب مناسب محلول انجمادی ۱۲

۲-۳-۲- زمان تعادل وآبگیری مناسب ۱۲

۲-۳-۳- سرعت سرد کردن ۱۳

۲-۳-۳-۱- آسیب به زونا ۱۴

۲-۳-۴- سرعت گرم کردن جنینها ۱۶

۲-۴- پایه و اساس انجماد ۱۷

۲-۵- اجزا محلول انجمادی ۱۷

۲-۵-۱- ضدیخهای نفوذ ناپذیر ۱۷

عنوان | صفحه

۲-۵-۲- ضد یخهای نفوذ پذیر ۱۸
۲-۵-۳- ماکرومولکولها ۲۰
۲-۶- مرحله ذوب یا آبدهی ۲۱
۲-۶-۱- آسیبهای مرحله ذوب ۲۱
۲-۷- مزایای انجماد جنین تک سلولی ۲۲
۲-۸- سیستم کشت همزمان ۲۴
۲-۹- مکانیسم هم کشتی ۲۵
۲-۹-۱- دور کردن اجزاء سمی از محیط کشت ۲۵
۲-۹-۲- ترشح فاکتورهای محرک رشد جنین از تک لایه سلولی ۲۶
۲-۹-۳- تاثیر متقابل از طریق تماس سلولی ۲۸
۲-۱۰- سلولهایی که بطور معمول در سیستمهای هم کشتی بکار می‌روند ۲۹
۲-۱۰-۱- سلولهای اپی تلیال رحمی ۲۹
۲-۱۰-۲- سلولهای لوله رحمی ۳۰
۲-۱۰-۳- سلول Vero ۳۱
۲-۱۰-۳-۱- مزیتهای کاربردی سلولهای Vero ۳۳
۲-۱۱- اهمیت نوع محیط کشت در موفقیت سیستم‌های هم کشتی ۳۳
۲-۱۲- فوائد و مضرات هم کشتی ۳۴
۲-۱۲-۱- فوائد هم کشتی ۳۴
۲-۱۲-۲- مضرات هم کشتی ۳۵
۲-۱۳- محیطهای کشت متوالی ۳۷
۲-۱۴- انواع محیطهای کشت متوالی موجود ۳۷

عنوان | صفحه

۲-۱۵- شواهد تائید کننده مزایای محیطهای کشت متوالی ۳۹

فصل سوم: مواد و روشها ۴۱

۳-۱- تهیه جنین ۴۲

۳-۲- پاساژ سلول Vero ۴۳

۳-۳- انتقال جنین به محیط‌های هم کشتی ۴۵

۳-۴- انجماد سلول Vero ۴۶

۳-۵- ذوب سلول Vero ۴۶

۳-۶- انجماد جنین ۴۷

۳-۶-۱- ابزارهای مورد نیاز ۴۷

۳-۶-۲- محلولهای مورد نیاز جهت انجماد ۴۷

۳-۶-۲-۱- محیط کشت PBI به عنوان محیط کشت پایه جهت تهیه محلولهای انجماد و ذوب ۴۷

۳-۶-۲-۲- محلول ساکارز ۴۸

۳-۶-۲-۳- EFS40 یا محلول انجمادی ۴۸

۳-۷- روش انجماد ۴۸

۳-۸- روش ذوب ۵۰

فصل چهارم: نتایج ۵۶

۴-۱- مقایسه میزان و سرعت تکوین جنین‌های تک سلولی منجمد نشده در دو محیط MEMα (کنترل ۱) و MEMα+Vero (کنترل ۲) ۵۷

۴-۲- مقایسه سرعت و میزان تکوین جنینهای منجمد نشده وارد شده به محیط کشت MEMα

عنوان | صفحه

(کنترل ۱) با جنینهای منجمد شده وارد شده به این محیط (آزمون ۱) ۵۹

۴-۳- مقایسه سرعت و میزان تکوین جنینهای تک سلولی منجمد شده وارد شده به محیط MEMα (آزمون ۱) و جنینهای منجمد شده در محیط MEMα+Vero (آزمون ۲) ۶۰

۴-۴- مقایسه سرعت و میزان تکوین جنینهای منجمد نشده وارد شده به محیط MEMα+Vero (کنترل ۲) با جنینهای منجمد شده وارد شده، محیط MEMα+Vero (آزمون ۲)..... ۶۲

۴-۵- مقایسه سرعت و میزان تکوین جنینهای تک سلولی منجمد نشده وارد شده به محیط کشت R1,R2(کنترل ۳) و جنینهای منجمد نشده وارد شده به محیط کشت (R1,R2)+Vero (کنترل ۴) ۶۴

۴-۶- مقایسه سرعت و میزان تکوین جنینهای منجمد نشده تک سلولی در محیط کشت (R1,R2)+Vero (کنترل ۴) و جنینهای منجمد شده در همین محیط کشت (آزمون ۴)... ۶۵

۴-۷- مقایسه میزان تکوین و سرعت تکوین در جنینهای تک سلولی منجمد نشده در محیط‌های کشت متوالی R1,R2 (کنترل ۳) و جنینهای منجمد شده وارد شده به محیط‌های کشت متوالی R1,R2 (آزمون ۳)..... ۶۷

۴-۸- مقایسه سرعت و میزان تکوین جنینهای منجمد شده وارد شده در محیط (R1,R2) (آزمون۳) و جنینهای منجمد شده وارد شده به محیط کشت (R1,R2)+Vero (آزمون ۴). ۶۹

۴-۹- مقایسه سرعت و میزان تکوین جنین‌های تک سلولی منجمد شده در محیط کشت R1,(R2+Vero) (آزمون ۵) و جنینهای منجمد شده در محیط (R1,R2)+Vero (آزمون ۴)... ۷۱

۴-۱۰- مقایسه سرعت و میزان تکوین جنینهای منجمد شده در محیط R1،(R2+Vero) (آزمون۵) و جنینهای منجمد شده در محیط R1,R2 (آزمون ۳)..... ۷۳

فصل پنجم: بحث ۸۶

۵-۱- بحث..... ۸۷

عنوان	صفحه

۵-۲- نتیجه گیری ۹۶

۵-۳- پیشنهادات ۹۷

فهرست منابع ۹۸

چکیده انگلیسی ۱۱۳

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول الف - آمار جنینهای منجمد شده و منجمد نشده آزمونها ۷۵

جدول شماره ۴-۱- مقایسه سرعت و میزان تکوین جنینهای تک سلولی منجمد نشده موش در محیط‌های کشت MEMα و MEMα + Vero ۷۶

جدول شماره ۴-۲- مقایسه سرعت و میزان تکوین جنینهای تک سلولی منجمد شده و منجمد نشده موش در محیط کشت MEMα ۷۷

جدول شماره ۴-۳- مقایسه سرعت و میزان تکوین جنینهای تک سلولی منجمد شده در محیط‌های کشت MEMα+Vero+MEMα ۷۸

جدول شماره ۴-۴- مقایسه سرعت و میزان تکوین جنینهای تک سلولی منجمد نشده و منجمد شده موش در محیط کشت MEMα+Vero ۷۹

جدول شماره ۴-۵- مقایسه سرعت و میزان تکوین جنینهای تک سلولی منجمد نشده در محیط‌های کشت R1-R2 و Vero+(R1-R2) ۸۰

جدول شماره ۴-۶- مقایسه سرعت و میزان تکوین جنینهای تک سلولی منجمد نشده و منجمد شده در محیط کشت Vero + (R1-R2) ۸۱

جدول شماره ۴-۷- مقایسه سرعت و میزان تکوین جنینهای تک سلولی منجمد نشده و منجمد شده در محیط کشت R1-R2 ..... ۸۲

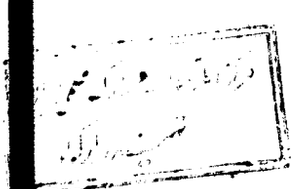
جدول شماره ۴-۸- مقایسه سرعت و میزان تکوین جنینهای تک سلولی منجمد شده در محیط‌های کشت R1-R2 و Vero + (R1-R2) ۸۳

جدول شماره ۴-۹- مقایسه سرعت و میزان تکوین جنینهای تک سلولی منجمد شده در محیط‌های کشت R1-R2 و Vero + (R1-R2) ۸۴

جدول شماره ۴-۱۰- مقایسه سرعت و میزان تکوین جنینهای تک سلولی منجمد شده در محیط‌های کشت Vero+(R1-R2) و R1-(R2+ Vero) ۸۵

فصل اول

مقدمه



۱ـ مقدمه

۱ـ۱ـ پیش گفتار

نگهداری دراز مدت جنین خارج از بدن مادر مدتهاست که موضوع تحقیق بسیاری از دانشمندان می‌باشد. لذا انجماد جنین با استفاده از روشهای گوناگون به عنوان راه حلی مناسب و عملی در دستیابی به این هدف، مطرح گردیده است.

از مزایای انجماد و نگهداری جنین اینست که می‌توان جنینها را نه به یک باره، بلکه طی چند مرحله و در موقعیت‌های مناسب، به رحم مادر منتقل نمود. در نتیجه احتمال بارداری افزایش می‌یابد. همچنین از تحریک بیش از حد تخمدانها برای تخمک گذاری جلوگیری می‌شود[۱].

برای نخستین بار Whittingham در سال ۱۹۷۲ [۲] با روش انجماد آهسته موفق به منجمد کردن جنینهای موش شد و توانست پس از انتقال این جنینها، نوزاد زنده بدست آورد.

به دلیل نیاز به یافتن روشی کم هزینه‌تر و سریعتر، روشهای انجمادی سریع و فوق سریع مطرح شد اما به علت بالا نبودن درصد موفقیت این روشها، روش انجماد شیشه‌ای پایه گذاری گردید که عبارتست از انجماد جنین، به گونه‌ای که از تشکیل کریستال یخ در داخل و خارج سلول جلوگیری شود.

در ابتدا موفقیت این روش چندان چشمگیر نبود ولی به مرور با بهبود تکنیکهای انجمادی و تغییر در محلول‌های ذوب و انجماد، درصد جنینهای زنده بدست آمده از طریق روش انجماد شیشه‌ای افزایش یافت [۱]. روش انجماد شیشه‌ای را برای نخستین بار Rall و Fahy [۳] مطرح نمودند.

این محققان معتقد بودند که انجماد شیشه‌ای به علت بالا بودن سرعت انجماد سبب