بررسی اثر فاکتور رشد اپیدرمال بر تکوین جنین‌های 16-8 سولوی موش و بیان زن

نیما فرمان‌پور، دکتر منصوره موحدی، دکتر سید جواد مولی
1- کارشناس ارشد زنانه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علم و تحقیقات
mansoure@modares.ac.ir
2- دانشیار گروه علوم تغذیه و تغییرات بدنی، دانشگاه تربیت مدرس (مؤلف مستند)
3- دانشیار گروه زنانه، دانشگاه علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده
زمینه و هدف: انجام جنین‌های انسانی یک تغییرات در دمای و سطح بسیاری از موارد مطلق و جنین‌های این جنین‌های منجمد شده به میزان زایدی به میزان کم می‌کند. فاکتور رشد (EGF) و رستره آن در تکوین جنین و مراحل لانه‌گری می‌باشد.

هدف از این مطالعه تعبیر تأثیر فاکتور رشد اپیدرمال در تکوین قلب از لانه‌گری و بیان رستره آن در جنین موش منجمد شده با استفاده از میکروسکوپی و بروز مشاهده می‌باشد.

روش بررسی: جنین‌های 16-8 سولوی زن 67 ساعت پس از تزریق HCG به میزان آماده و به 4 گروه در گروه شاهد و دو گروه آزمون (تفاوت شدن) قرار گرفت. جنین‌های گروه شاهد و 2 گروه از جمع آوری شده شدند. جنین‌های گروه آزمون 1 و 2 با تهیه شدن MEM-α + EGF (10 ng/ml) و MEM-α محیط- محیط یا 2 میکروبی شده شدند. جنین‌های شاهد و پس از دو باره برداشت در محیط میکروبی شده شدند. تکوین جنین‌ها توسط روزهای ثبت شد. نتایج توسط آزمون 2×2 بررسی شد.

رشت و آمار: جنین‌های فاکتور رشدی میکروبی به روش RT-PCR در جنین‌های خارج شده و با در حال خروج از زونا صورت گرفت. به دنبال واکنش PCR با استفاده از پراپرهای Nested صورت پذیرفت تا دقیق و حساسیت کار آفرازین یابد.

نتایج گیری: افزودن EGF با غلظت 10 ng/ml به یک محیط به میکروسکوپی تکوین جنین‌های محیط- محیط منجمد و غیر منجمد ندارد.

انجام باعث ایجاد ورود و در بین زن گروه فاکتور رشد از 69 ساعت شده شد. نتایج تکوین جنین‌های منجمد شده، نتیجه گرفت.

کلید واژگان: جنین قبل از لانه‌گری، تکوین جنین، فاکتور رشد اپیدرمال، بیان زن.

وصول مقاله: 04/09/1288
اصلاح نهایی: 1398/06/20
پذیرش مقاله: 1398/06/18
1. Epithelial Growth Factor

2. Candidate Genes

3. Human Chorionic Gonadotropin
قرار گرفتن و موشعهای حامله جدا شدند. 22 ساعت پس از تزریق HCG موشعهای حامله قطع نخاع شدند و لوله‌های رحمی آنها خارج شدند. لوله‌ها بلافاصله در فلزات میحت کشی‌های سرم قرار داده شدند و با تزریق مقداری میحت کشی به درون لوله‌های رحمی جنین‌های 8-16 سلولی خارج شده و جمع آوری شدند. مجموع جنین‌های مورد استفاده در این بررسی 34 عدد بود که از آن تعداد 36 عدد در دو گروه انجامزی و 20 عدد در گروه‌های شاهد (غير انجامزی) قرار گرفتند. جنین‌های نامبردی بصورت اتفاقی به 4 گروه تقسیم شدند: جنین‌های گروه شاهد به مدت 96 ساعت در میحت کشی MEM-α کشت داده شدند. جنین‌های گروه EGF گروه شاهد 2 به مدت 96 ساعت در میحت کشی MEM-α کشت داده شدند. جنین‌های گروه آزمون 1 و 2 بلافصل پس از جمع آوری به روش انجامزی شیوه‌ای منجمد شده و پس از ذوب به مدت 96 ساعت به ترتیب MEM-α + EGF و MEM-α در دو میحت کشت داده شدند.

3- انجامزی شیوه‌ای به روش OOPS پس از ۲۴ ساعت استفاده شده در این روش ۴۰ بود که توسط kasai و همکارانش شرح داده شده بود (۱۴) ترکیب این پدیده به قرار زیر بود:
MEM-α.Ficol 30% (Sigma), Sucrose 0.5 mol (Sigma), Ethylene glycol 40%(v/v)
در این روش ۲ فرآیند مخصوص انجامزی بر روی یک صفحه داغ حراست دیده و کشیده شد به طریقی که قطر خارجی و داخلی به حدوداً به نصف قطر اولیه آن رسید (۱۵) سپس نی در باریک‌هایی قسمت توسط یک فیچی نیز بردیده شده به ناحیه که در دیواره نی ترک و شکاف

1. Open Pulled Strrow

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کرمان/ دوره یازدهم/ بهار 1385
4- بررسی بیان زن به کمک RT-PCR1
پس از تزریق HCG (در انتهای 96 ساعت کش جنین) جنین‌های خارج شده و با در حال خروج از زونا جهت بررسی بیان زن گیرنده EGF جدایی و این جنین‌ها تا زمان بررسی های مولکولی با کمترین حجم محیط کشت (11) درون میکروتیوب و در فریزر 70 درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

برای مشاهده جنین در مرحله مورولا این بافر به قرار زیر بود (16):

NP40 (50%), Tris (PH 8 10mmol/L),
Nacl (10 mmol/L), Mgcl (3 mmol/L)

تیوب بالافصله بر روی بخش قرار گرفت. طول زمان لیز سلولی کمتر از 2 دقیقه بود که تمام طول این مدت تیوب بر روی بخش قرار داشت. بالافصله پس از این زمان واکنش شروع شد. در مواردی که RT واکنش لیز سلولی انجام نشد تیوب حاوی جنین‌های لیز شده با گلوتلور شدن ستیم در ازت مایع منجمد شده و بالافصله در فریزر 70-گرار داده شد.

واکنشRT به ازای هر 5 میکروتیوب محلول حاوی سلول‌های لیز شده 15 میکروتیوب از محلول زیر به تیوب اضافه شد.

DTT 50mM, Tris-Hcl PH:8.5 RT, Oligo(dt) [MWG-250mM,
3, 2 میکروتیوب برای 4
1 میکروتیوب مخلوط آنزیم MULV و 5/1 دنیوی Biotech] آنزیم MULV به تیوب حاوی عصاره سلول انزیم شد. تیوب کش می‌کشند تا نمایش آنزیم RT بود سپس تیوب مذکور به مدت 1 ساعت در دما 42 درجه قرار داده شد و در

1 Revers Transcription- Polymerase Chain Reaction
مرحله بعد به منظور پایان واکنش به مدت 5 دقیقه تا دمای 95 درجه حرارت داده شد. مراحل فوق در دستگاه ترمال سایکل (Technie) انجام شد. پس از پایان واکنش تیوب‌ها برای مدت 20 دقیقه اسپین شدند. رسوب حاوی بقایای لیز سولو و محلول سریز به آرامی جدا شده و هر 20 میکرولیتر از آن به یک توب استریل جداگانه منتقل شد تا جهت واکنش PCR مورد استفاده قرار گیرد.

واکنش PCR با افزودن محلول زیر به تیوب حاوی 20 میکرولیتر DNA حجم توب به 30 میکرولیتر رسید:
- Tris-Hcl 10mmol/L
- dNTP(10mM)
- میکرولیتر بافر PH:8.3
- میکرولیتر Taq polymerase (5u/µl)

زن河北 در تمام سلول‌های بادی می‌باشد بنابراین انظار می‌روید که mRNA RNA در تمام سلول‌ها وجود داشته باشد. توالی پرایمرها بکار رفته جهت تکثیر این mRNA بطور زیر بدست آمده:

B2m-F: 5' TGA CCG GCT TGT ATG CTA TC 3'
B2m-R: 5' CAC ATG TCT CGA TCC CAG TAG 3'

با کمک این جفت پرایمر نیز یک واکنش PCR محصول و این واکنش محصول واکنش RT صورت گرفت. قطعه قابل تکثیر با این پرایمرها طولی معادل 316 جفت باز داشت. در سه جفت پرایمر ذکر شده به گونه‌ای طراحی شده بودند که در مراحل PCR و سایر خصوصیات مشابه بودند و بنابراین شرایط PCR در تمام واکنش‌ها یکسان بود.

روش واکنش

به مدت 24 دقیقه به درجه 94 درجه حرارت داده شد. مدت 2 دقیقه و 35 ثانیه با شرایط میان‌رژیومیسون در میان درجه حرارت 95 درجه سلسیوس، 30 ثانیه آنیلینگ در دمای 55 درجه سلسیوس، و واکنش به مدت 60 ثانیه در دمای 72 درجه سلسیوس.

مرحله واکنش دومی به مدت 10 دقیقه در دمای 72 درجه سلسیوس انجام شد.

دو جفت پرایمر اختصاصی برای زن EGFR-1F 45 درجه حرارت داده شد و یک جفت برای زن Nested صورت جفت شده و یک جفت برای انجام PCR در نظر گرفته شد و واکنش محصول تکثیر با پرایمرها X45 جفت باز بود که این محصول سپس در یک راندوم PCR با کمک جفت پرایمر خارجی بصورت تکثیر شد قطعه nested حاصل از تکثیر با پرایمرها داخلي (محصول

iathe

نموندهای 1و 2 به ترتیب نشان دهنده میزان کلی تشکیل پلاستوسکت، میزان خروج از زونا و دزنرایسون در طی 95 ساعت کشتن جنين می‌باشد.
الف: میزان کلی تشکیل پلاستوسیست در گروه‌های مورد مطالعه:

نمونه‌ای از شناس ده‌ها این موضوع است که میزان تشکیل پلاستوسیست در طی 96 ساعت کشت در گروه‌های شاهد 01 (به ترتیب 64/7 و 65/1) بیشتر از گروه‌های آزمون 01 (به ترتیب 55/2 و 5/3) می‌باشد. اما مقایسه میزان تشکیل پلاستوسیست بین گروه‌های شاهد 01 و آزمون 2 (به ترتیب 64/7 و 65/1) با گروه شاهد 01 (به ترتیب 64/7 و 65/1)

نمودار 1: میزان کلی تشکیل پلاستوسیست پس از 96 ساعت

ا: اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد 2 (p<0.05)  
ب: میزان کلی خروج از زونا در گروه‌های مورد مطالعه: مقایسه سونهای موجود در نمونه‌ای از شناس ده‌های این موضوع است که میزان کلی خروج از زونا در گروه‌های

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کرمان/ دوره پانزدهم/ بهار 1385
نمونه‌های میزان کلی خروج از زونا پس از ۹۶ ساعت

ج: میزان کلی دندراسیون در گروه‌های مورد مطالعه: مقایسه میزان دندراسیون بین گروه شاهد ۱ با شاهد ۲ (۱۷/۶٪ در مقابل ۳/۸٪) و همینطور گروه آزمون ۱ در مقابل آزمون ۲ (۲۸/۶٪ در مقابل ۴۶/۸٪) اختلاف معنی‌داری را نشان داد. اما میزان دندراسیون گروه شاهد ۱ با آزمون ۱ (به ترتیب ۱۷/۶٪ و ۲۴/۶٪) و شاهد ۲ با آزمون ۲ (به ترتیب ۳۳/۱٪ و ۴۴/۵٪) اختلاف واضح نداشت.

از این نتایج مشاهده می‌شود تأثیر نیز تأثیر قابل توجه انجام گروه دندراسیون نیز در MEM-α و میزان دندراسیون بین گروه شاهد ۱ با شاهد ۲ (۱۷/۶٪ در مقابل ۳/۸٪) و همینطور گروه آزمون ۱ در مقابل آزمون ۲ (۲۸/۶٪ در مقابل ۴۶/۸٪) اختلاف معنی‌داری را نشان داد اما میزان دندراسیون گروه شاهد ۱ با آزمون ۱ (به ترتیب ۱۷/۶٪ و ۲۴/۶٪) و شاهد ۲ با آزمون ۲ (به ترتیب ۳۳/۱٪ و ۴۴/۵٪) اختلاف واضح نداشت.

نمودار ۲: میزان کلی خروج از زونا پس از ۹۶ ساعت

این نتایج نشان می‌دهد که میزان دندراسیون در گروه‌های مختلف مختلف است.

منبع: مجله علمی دانشکده علوم پزشکی کرمانشاه/ دوره پانزدهم/ بهار ۱۳۹۵
نمودار ۳: میزان کلی دوزرسیون پس از ۹۶ ساعت

نتایج مولکولی:

انتشار شده از کیفیت موس به عنوان نمونه کنترل RNA
مثبت استفاده شد. الکتروروز محصول با PCR
برای افرادی که با نشان دهنده جنسیت G2m
زنده و وجود یک باند در ناحیه ۳۱۵ جفت بازی در کل، نمونه‌ها بیش از یک باند
می‌تواند الکتروروز محصول را از
برای افرادی که با نشان دهنده حضور یک
EGFR-1R و EGFR-1F توسط افرادی که با
باند در ناحیه ۴۵۴ جفت بازی در مورد نمونه کیفیت پدید اما
در مورد نمونه‌های جنسیت همجنس باندی در این

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره پانزدهم/ بهار 1385
بحث

در این مطالعه تأثیر فاکتور رشد اپیدرمال بر تکوین قبل از لاله گوزنی چنین های منجمد شده مورد بررسی قرار گرفت. هدف اصلی ما مطالعه اثر افزودن بی وحی کشت چنین های منجمد پس از ذوب و و بررسی تأثیر آن بر بهبود تکوین یا چنین های بود. نتایج حاصل چنین نشان می‌دادند که تأثیر چندانی بر میزان تشكل بلاستوسیست و خروج از زونا در چنین های منجمد شده و همکارانش (1) نیز به چنین نتایجی دست یافته بودند، آنها اعلام کرده که افزودن EGF به محیط کشت چنین های 8 سولوی تأثیری بر میزان تشكل بلاستوسیست ندارد. آنها نتیجه‌گیری کردند که چنین های 8 سولوی به تهیهی توانایی تکوین و رشد بد به مرحله بلاستوسیستی را داده. شواهدی دال بر ساخته شدن پری فاکتورهای رشد اندوآناتومیک توسط چنین وجود نشان دارد (27). استفاده از روشهای gene knock out می‌تواند که کمک بدهد یک فاکتور رشد به تهیه‌ای تأثیر

چندانی بر رشد و بقاء چنین ندارد (18). هدف مهم این تحقیق بررسی این موضوع بود که آیا بررسی انجماد می‌تواند یا چنین زنی را تحت تأثیر قرار دهد؟ نتیجه‌ی نشان دادن که بررسی mRNA مریبط به ژن EGFR در چنین های منجمد و غیر منجمد وجود دارند. و همکارانش (20) بیان زن تئوری لیک نسبت به EGFR و TGF-α را در فولکولهای بافت تنویژده انسان، قبل و بعد از انجماد مورد بررسی قرار دادند (19) و نتیجه‌ی داننده که انجماد، واکنش ایمنولوژیک نسبت به EGFR و TGF-α، و همکارانش (20) بیان زن تئوری لیک نسبت به EGFR و TGF-α را در چنین های منجمد انسانی TSC2 را در چنین های منجمد انسانی مورد بررسی قرار دادند. و نتیجه‌گیری کردند که انجماد الگوی ترمیمی این زن را در طی تکوین قبل از لاله گوزنی تئوری لیک می‌دهد. سنجه‌کمی میزان بیان TSC2 بالاچاله پس از ذوب و پس از یک روز کشت چنین های نشان داد که بالاچاله پس از ذوب، میزان بیان زن کاهش یافته اما یک روز کشت چنین به چنین این کاهش می‌شود.

در مطالعه‌ی عاطر RT-PCR پس از پایان دوره کشت تصویر 3: الکتروفورز محسوب PCR بر روی ذل آغاز

مجلا علمی دانشگاه علوم پزشکی کردنک / دوره پایان‌های بهار 1385
نتیجه گیری
در مجموع، نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که افزودن (10 ng/ml) EGF به یک محفظ کشت پیچیده (MEM-α) هیچگونه تأثیر محکمی بر تكوین جنین های منجمد شده و غیر منجمد ندارد. انجام بیان ژن EGF را 96 ساعت پس از ذوب مماینات نمی‌نماید اما به نظر می‌رسد که افزودن EGF به محفظ کشت جنین بیان EGF را در بالاستومه‌های موش افزایش می‌دهد.

References