دانشکده دامپزشکی

پایان‌نامه دکتری حرفه‌ای رشته‌ی دامپزشکی

در رویان های SUV39H1وHAT1 بررسی بیان ژن های کد کننده حاصل از تخمک های منجمد شده گوسفند (انجماد شیشه ای) به روش Semi Quantitative-RT-PCR

استادان راهنما:

دکتر ابوالفضل شیرازی

دکتر ناصر شمس اسفندآبادی

استاد مشاور:

دکتر حسین حسن پور

پژوهشگر:

زهرا درفشیان بروجنی

پاییز ۱۳۹۱

دانشکده دامپزشکی

گروه علوم درمانگاهی

پایان‌نامه خانم زهرا درفشیان بروجنی جهت اخذ درجه دکتری رشته دامپزشکی با عنوان**بررسی بیان در رویان های حاصل از تخمک های منجمدشده SUV39H1و HAT1 ژن های کد کننده گوسفند (انجماد شیشه ای) به روش Semi Quantitative-RT-PCR** در تاریخ ۹۱/۹/۱۴ با حضور هیأت داوران زیر بررسی و با رتبه / نمره ..... مورد تصویب نهایی قرار گرفت

۱. **استادان راهنمای پایان‌نامه**

دکتر ابوالفضل شیرازی با مرتبه علمی دانشیار امضاء

دکتر ناصر شمس با مرتبه علمی دانشیارامضاء

۲. **استاد مشاور پایان‌نامه دکتر حسین حسن پور با مرتبه علمی دانشیارامضاء**

۳. **استادان داور پایان نامه**

دکترعلی پرچمی با مرتبه علمی استادیار امضاء

دکتر محمدرضا اصلانی با مرتبه علمی استادی امضاء

مسئولیت کلیه عقاید و نظراتی که در این پایان‌نامه آورده شده است به عهده نگارنده بوده و دانشکده دامپزشکی هیچ مسئولیتی را در این زمینه تقبل نمی‌نماید.

دکتر سعید حبیبیان دهکردی
معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی
دانشکده دامپزشکی

دکتر حسین نورانی
رئیس دانشکده دامپزشکی

کلیه حقوق مادی حاصله از نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

با تشکر فراوان از
زحمات بی دریغ استاد عزیزم جناب دکتر شیرازی که تا همیشه عمر مدیون مهربانی هایشان هستم.
تشکر ویژه و صمیمانه از تیم جنین شناسی پژوهشگاه ابن سینا بدلیل در اخیتار گذاردن جنین های منجمد و تازه در گروه های آزمایشی مختلف جهتارزیابی مولکولی که بی تردید بدون همکاری ایشان انجام مطالعه حاضر میسر نمیگردید.

جناب آقای دکتر میرشکرایی که از دنیای علم و اندیشه ایشان چه بسیار آموختم و با بزرگ منشی و مناعت طبعی والا مرا در تمامی مسیر انجام این مجموعه یاری نمودند.

با تشکر وقدردانی فراوان از راهنمایی ها و صبوری دکتر حسین حسن پور که با قبول مشاوره در این نوشتار لطف خود را به من به حد کمال رسانیدند.

جناب آقای دکتر پرچمی و دکتر اصلانی که با قبول داوری این پایان نامه بر من منت نهادند.

با تشکر فراوان از آقای دکتر حبیبیان و تمامی اساتید گرانقدر دانشکده دامپزشکی که شش سال ازدانششان بهره مند شدم.

با تشکرآقای دکتر احمدی، دکتر نظری و دکتر کدیور و خانم دکتر برجیان که با خوشرویی تمام مرا در انجام کارهای عملی این پایان نامه یاری رساندند.

بناماو شش

...وعشقمیوهایاستدرفصلپنجم،

وماهمچنانبادستهایخالیچهارفصلرامرورمیدنیم.

دلممیخواستهمیشهبارانمیبارید
ومنمیتوانستمدرزیرسایهآبیپدر
بادستهایگرممادر،زیربارانبازیکنم
کاشبارانگاهیبرآرزوهایمنمیبارید
ومنهمراهباپدریازیرچادرمادر
خودرادرگودالهایکوچهمیانداختم
آنوقتهممهباهممیخندیدیم
بعدپشتپنجرهمینشستیموقطرههایبارانرادانهدانهمیشمردیم

تقدیم به پدر و مادر فداکارم که دستانشان تکیه گاهی امن، کلامشان آغازگر مهربانی و نگاهشان تداوم گر زندگیم است. سپاس بیکران نثار آن ها که واژه ها از بیان گذشت و ایثارشان عاجزند.

تقدیم به پوریا، برادر عزیزم که با محبت های بیدریغش شادکامی را به زندگی ام ارزانی داشت.

تقدیم به همسرم که پرواز در بیکران سبز محبت را به من آموخت و روح سبزش یگانه ترجمان واقعی انسانیت است و وجود پاکش بهانه ای برای زیستن وشکفتن.

تقدیم به دوست عزیز و همراه همیشگیم خانم دکتر عفت فروغی

چکیده:

دستیابی به روشی مطمئندر خصوص انجماد تخمۀ گامی موثر در جهت حفظ باروری درانسان و گونه های جانوری محسوب می شود. از طرفی امکان ابقای منابع ژنتیکی ارزشمنددر گونه های اهلیجانوری و وحوش در حال انقراض با بهره برداری از این تکنیک میسر می گردد. انجماد آهسته روشی است که باعث ایجاد یخ داخل سلولی و شوک اسمزی در تخمک های منجمد شده می شود. در انجماد شیشه‌ای با افزایش غلظت مواد ضدیخ و سرعت انجماد حساسیت نسبت به سرما کاهش یافته و ضمن جلوگیری از تشکیل بلورهای یخ، آسیب‌های حاصل از انجماد نیز به حداقل می رسد. در حقیقت غلظت بالای مواد ضدیخ متضمن روند مطلوب انجماد شیشه‌ای می باشد. افزایش غلظت مواد ضدیخ به دلیل خاصیت سمی آنها اثرات مخربی بر سلول داشته و همچنین سبب بروز آسیب اسمزی می گردد. به منظور غلبه بر این مشکل می‌توان از انواع بخصوصی از ظروف حامل استفاده نمود. ظرف حامل مورد استفاده در این مطالعه کرایوتاپ بوده است. در این روش با استفاده از حجم بسیار اندک مواد ضدیخ میزان سرمادهی تا بیش از ۴۰۰۰ درجه سانتی گراد در دقیقه افزایش می یابد. در این مطالعه ما اثرات انجماد شیشه ای را در رویان های حاصل از تخمک های منجمد شده گوسفند، در مرحله تکاملی رویان و پیش از جایگزینی رویان مورد بررسی قرا دادیم. یکی از تغییرات مهم در این مرحله فعال سازی ژنوم رویانی است که در طی این مرحله فعالیت ژنوم رویانی متعاقب رخداد ها اپی‌ژنتیک آغاز شده و با شروع رونوشت برداری عملا نقش ترانس کریپت‌های مادری در هدایت رخداد های سلولی به حداقل خواهد رسید. تغییرات اپی ژنتیک شامل طیف نسبتا گسترده ای از تغییرات اعمال شده در سطح مولکول DNA و پروتئین های هسته ای (از جمله Histon ها) است. از جمله این تغییرات، استیلاسیون و متیلاسیون هیستون هاست. در این مطالعه ژن های موثر در تغییرات در ساختار هیستون HAT1 (Histon acethyle transfrase) وSUV39H1(Histon metyle transfrase) مورد بررسی قرار گرفتند که هر دو در تنظیم بیان ژن ها نقش دارند. HAT1 به وسیله استیله کردن انتهای N هیستون ها، باعث باز شدن ساختار کروماتین و فراخوانی فاکتور های رونویسی و در نهایت آغاز رونویسی می شود. SUV39H1نیز با مشارکت در ساختار هتروکروماتین، نقش در غیر فعال ساختن کروماتین و خاموش ماندن ژن ها دارد. در این مطالعه میزان بیان نسبی ژن های HAT1 و SUV39H1 در مراحل رویانی ۷-۲ سلولی، ۱۶-۸ سلولی، مورولا و بلاستوسیست در رویان های حاصل از تخمک منجمد و رویان های حاصل از تخمک غیر منجمد با استفاده ازروش Real Time PCR ارزیابی شد. نتایج حاصله حاکی از آن بود که در تخمک های منجمد در مقایسه با گروه کنترل، بیان ژن های مذکور کاهش نسبی، لیکن غیر معنی دار را نشان می دهد($P<0.05$) و در مورد هر ۲ ژن روند انجماد باعث کاهش نسبی میزان کلی ترانسکریپت ها شده است اما این کاهش معنی دار نیست. در نهایت می توان نتیجه گیری نمود که روند انجماد شیشه ای تاثیر معنی داری در الگوی بیان۲ ژن مذکور نداشته است.

کلید واژه:(SUV39H1، HAT1، تخمک منجمد،Real Time PCR)

فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

فصل اول-مقدمه ۵

فصل دوم-کلیات ۸

۲-۱-تولیدآزمایشگاهی رویان ۸
۲-۱- ۱- بلوغتخمک ۸
۲-۱- ۲- ظرفیتپذیری اسپرم ۱۰
۲-۱-۳-لقاحآزمایشگاهی ۱۱
۲-۱-۴-کشترویاندرآزمایشگاه ۱۲
۲-۲- انجماد ۱۲
۲-۲-۱- اساس سرد کردن و نگهداری در شرایط انجماد ۱۳
۲-۲-۲- انواع روش های انجماد ۱۴
۲-۲-۲-۱- انجماد آهسته ۱۴
۲-۲-۲-۲- اساس انجماد آهسته ۱۵
۲-۲-۲-۳- انجمادسریع ۱۵
۲-۲-۲-۴- انجماد شیشه ای ۱۶
۲-۲-۳- اصول انجماد شیشه ای ۱۶
۲-۲-۳-۱- مواد ضد یخ ۱۶
۲-۲-۳-۲- میزان سرما دهی ۱۷
۲-۲-۳-۳- ظررف حامل انجماد شیشه ای ۱۷
۲-۲-۴- انجماد تخمک ۱۸
۲-۲-۴-۱-کاربرد انجماد تخمک ۱۹
۲-۲-۴-۲- آسیب های حاصل از انجماد تخمک ۲۰
۲-۲-۵- انجماد رویان ۲۱
۲-۲-۶- انجماداسپرم ۲۳
۲-۲-۷- انجماد تخمدان ۲۳
۲-۳- واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۲۳
۲-۳-۱- الکتروفورز ۲۵
۲-۳-۲-سیستمReal time PCR ۲۵
۲-۳-۲ -۱-منبع نور ۲۶
۲-۳-۲-۲- لیزر یون آرگون ۲۶
۲-۳-۲-۳- لیزرLED ۲۶
۲-۳-۲-۴- لامپ کوارتز – هالوژن- تنگستن ۲۷
۲-۳-۲-۵- لامپ گزنون ۲۷
۲-۳-۲-۶- نرم‌افزار دستگاه Real-time PCR ۲۷

۲-۳-۲-۷- رنگ اینترکاله(Eva greenI) ۲۸

فصل سوم-مواد و روش کار

۳-۱- تولید آزمایشگاهی جنین گوسفند (IVF) ۲۹
۳-۱-۱-جمع‌آوری تخمدان‌ها ازکشتارگاه ۲۹
۳-۱-۲- آسپیره کردن فولیکول‌ها و استحصال تخمک ها ۲۹
۳-۱-۳- بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌ها(IVM) ۳۰
۳-۱-۴- آماده سازی اسپرم و لقاح داخل آزمایشگاهی(IVF) ۳۱
۳-۱-۴-۱- استفاده از شیب غلظت پرکل(Swim down) ۳۱
۳-۱-۵- آماده‌سازی تخمک‌ها به منظور انجامIVF ۳۲
۳-۱-۶- لقاح داخل آزمایشگاهی(IVF) ۳۲
۳-۱-۷-کشت داخل آزمایشگاهی جنین‌های حاصل ازIVF ۳۳
۳-۱-۸- تازه کردن محیط‌های کشت رویان(Media refreshment) ۳۴
۳-۲- انجماد تخمک ۳۴
۳-۲-۱- تهیه محلول‌های انجمادی ۳۴
۳-۲-۱-۱- محیط پایه ۳۴
۳-۲-۱-۲- محیط انجماد ۳۴
۳-۲-۱-۳- محیط‌های ذوب ۳۴
۳-۲-۲- مراحل انجام روند انجماد شیشه ای ۳۵
۳-۲-۲-۱- انجماد تخمک در مرحله تکاملیGV ۳۵
۳-۲-۲-۲-ذوب تخمک‌های منجمد شده ۳۵
۳-۳-Real time PCR ۳۵
۳-۳-۱- استخراج و خالص سازی RNAtotal رویان ۳۵
۳-۳-۲- اصول و روش Real Time PCR ۳۶
۳-۳-۳- طراحی و توالی پرایمرهای مورد استفاده ۳۷
۳-۳-۴- تنظیم و بهینه سازی غلظت پرایمرها ۳۸
۳-۳-۵- روش ارزیابی نسبی داده‌های کمی ۳۸
۳-۳-۵-۱- روش مقایسه‌ای ΔΔCt ۳۹
۳-۳-۶- آنالیز اولیه آزمایش(Preliminary assay analysis) ۳۹
۳-۳-۶-۱- منحنی تکثیر(Amplification curve) ۳۹
۳-۳-۶-۲- خط پایه ۴۰
۳-۳-۶-۳- خط آستانه، چرخه آستانه ۴۰

فصل چهارم-نتایج ۴۲
فصل پنجم-بحث ۴۸
منابع ۵۴

فهرست شکل ها

عنوان **شماره صفحه**

شکل ۲-۱-پروفایل یک سیکل حرارتی سه مرحله‌ای ۲۵

شکل ۳-۱- فازهای منحنی تکثیر ۴۰

شکل ۳-۲- خط آستانه ۴۱

شکل ۴-۱- منحنی تفکیک ژن GAPDH ۴۲

شکل ۴-۲- منحنی تفکیک ژن HAT1 ۴۳

شکل ۴-۳- منحنی تفکیک ژن SUV39H1 ۴۳

شکل ۴-۴- منحنی تکثیر ژن GAPDH در نمونه‌ها ۴۴

شکل ۴-۵- منحنی تکثیر ژن HAT1در نمونه‌ها ۴۴

شکل ۴-۶- منحنی تکثیر ژن SUV39H1در نمونه‌ها ۴۴

شکل ۴-۷- الکتروفورز ۳ ژنGAPDH، HAT1 و SUV39H1 ۴۵

شکل ۴-۸- نمودار بیان نسبی ژن HAT1 ۴۶

شکل ۴-۹- نمودار بیان نسبی ژنSUV39H1 ۴۷

شکل۴-۱۰- نموداربیانژندررویانهایحاصلازتخمکمنجمدنسبتبهرویانهایحاصلازتخمکغیرمنجمد(expression Ratio) ۴۷

فهرست جدول ها

عنوان **شماره صفحه**

جدول ۲-۱-اولین تولد های موفق حاصل از رویان های منجمد شده پستانداران ۲۲

جدول ۳-۱-ترکیبات محیطیHEPES buffered M199 ۳۰

جدول ۳-۲-ترکیبات محیطیBicarbonate buffered M199 ۳۰

جدول ۳-۳- A Medium ۳۱

جدول ۳-۴-Sperm mediumS. TALP ۳۲

جدول۳-۵-ترکیبات محیطیH-SOF ۳۲

جدول۳-۶- IVF medium Fert. TAL ۳۳

جدول ۳-۷- ترکیبات محیطIVC- SOF ۳۳

جدول ۳-۸- توالی پرایمر های طراحی شده ۳۸

جدول ۴-۱- بیان نسبی ژنHAT1 ۴۵

جدول ۴-۲- بیان نسبی ژن SUV39H1 ۴۶

فصل اول

مقدمه

در طول مراحل اولیه رشد و تکامل رویان و مراحل تکاملی رویان عمل کرد منظم حدود ۱۲-۱۰ هزار ژن ضروری است. در این مراحل در پستانداران الگوی برنامه ریزی مجدد DNA ژنومی به فاصله کوتاهی قبل و بعد از شکل گیری سلول تخم دستخوش تغییرات مشخصی می گردد. در طی این مرحله DNA با خاستگاه پدری به سرعت و به‌طور فعال پس از لقاح متیل زدایی (Demethylation) شده در حالیکه وقوع این امر در DNA مادری روندی کند و غیر فعال را دنبال می نماید[۱۶۳، ۱۰۰،۸۸ ،۳۲،۱۰].

ژنوم رویانی مجددا بین مراحل ۲_سلولی و بلاستوسیست به‌طور فزاینده‌ای متیله می شود. زمان دقیق این رخدادها بسته به شروع فعالیت ژنوم رویانی در گونه های مختلف، متغیر است [۱۳۸، ۱۱۳]. وقوع این مکانیزم‌ها متضمن عبور رویان ازمراحل بحرانی رشد از قبیل اولین تقسیم سلولی، متراکم شدن رویان (Compaction)، تشکیل بلاستوسیست، اتساع بلاستوسیست (Expanded blastocyst) و تفریخ (Hatched blastocyst) می باشد، که بواسطه بیان منظم و زمان‌بندی شده ژن‌ها تنظیم می گردد.

یکی از رخدادهای مهم در مراحل اولیه تکوین رویان و قبل از مرحله لانه گزینی، موفقیت در فعال‌سازی ژنومی رویانی (Embryonic genomic activation; EGA) است. در طی این مرحله فعالیت ژنوم رویانی متعاقب رخدادهای اپی‌ژنتیک آغاز شده و با شروع رونوشت برداری عملا نقش ترانس کریپت‌های مادری در هدایت رخدادهای سلولی به حداقل خواهد رسید.

در طی این مرحله وقوع تغییرات اپی ژنتیک، الگوی بیان بسیاری از ژن‌ها را تغییر داده ضمن اینکه الگوی این تغییرات در مورد ژن‌های نقش پذیر شده (Imprinted) علیرغم تغییرات گسترده در ژنوم همچنان ثابت و بدون تغییر باقی خواهد ماند. الگوی تغییرات اپی‌ژنتیک در طی مراحل تکوینی جنین از وضعیت دینامیکی برخوردار بوده به نحوی که از شروع EGA تا تمایز سلولی در توده رویانی، تشکیل بلاستوسیست و تفریخ، الگوی اپی ژنتیک به‌طور مستمر درجنین و حتی تک تک سلول های آن در حال تغییر می‌باشد[۱۳۸].

تغییرات اپی ژنتیک شامل طیف نسبتا گسترده ای از تغییرات اعمال شده در سطح مولکول DNA و پروتئین های هسته ای (از جمله Histon ها) است که بدون تغییر در ساختار مولکول DNA، عمل‌کرد ژن‌ها را در سطح رونوشت برداری تحت تاثیر قرار می دهند. از جمله وقایع اپیژنتیک می توان به متیلاسیون و دی

متیلاسیون DNA، تغییرات استیلاسیون هیستون (Histon Acethylation)، متیلاسیون (Methylation)، یوبی کویتیلاسیون (U B cuithylation)، فسفوریلاسیون (Phosphorylation)، ساموپلاسیون (Samoylation)و... اشاره نمود. در این بین نقش(Short interfering RNA siRNA) را نیز نمی بایست نادیده گرفت[۱۳۵].

در رویان های تولید شده در شرایط آزمایشگاهی متیلاسیون هیستون (ناحیه N-terminal مولکول هیستون) غالبا به موازات با متیلاسیون DNA پیش رفته[۱۱۹] و بروز این تغییرات (استیلاسیون و متیلاسیون) در ناحیه ی N-terminal مولکول هیستون در کنار متیلاسیون DNA، دارای نقش تنظیمی در فعالیت ژن‌ها می‌باشد[۱۲۴]. در همین ارتباط در کنار نقش موثر متیلاسیون DNA در ممانعت از رونوشت برداری، تری متیلاسیون لایزین ۹ در مولکول هیستون ۳ (H3- K9) از جمله تغییرات اپی‌ژنتیکی بوده که دارای نقش تنظیمی مهم در رشد و تکامل رویانی در پستانداران است[۱۳۷، ۱۰۶]. از جمله عوامل درگیر در متیلاسیون لایزین ۹ در مولکول هیستون ۳، پروتئین SUV39H1 (Histone methyltransferase) می‌باشد. با تری متیلاسیون لایزین ۹ در مولکول هیستون ۳ (H3-K9) محل اتصال HP1 (Heterochromatin protein 1) شکل گرفته و با تشکیل هتروکروماتین عمل رونوشت برداری تضعیف می‌گردد [۱۵۷، ۱۴۶، ۱۳۱، ۱۲۴، ۱۲۳].

آنزیم های دخیل در استیلاسیون هیستون (HATs) نیز با استیله کردن انتهای N-terminal مولکول هیستون موجب خنثی نمودن بار مثبت و تسهیل دسترسی عوامل رونوشت برداری به مولکول DNA می‌گردند[۱۲۴]. از طرفی آنزیم های دی استیلاسیون (HDACs) با برداشت استیل از هیستون ها موجب بسته شدن کروماتین و عدم دسترسی عوامل رونوشت برداری به مولکول DNA می‌گردند.

در این بین کاربرد روش های کمک باروری مانند IVF، ICSI، بیوپسی رویان، انجماد و اساسا کشت تخمک و رویان در شرایط آزمایشگاهی، احتمال تغییر در الگوی طبیعی بیان ژن ها را بویژه از طریق اختلال در رخداد ها اپی ژنتیک در رویان های حاصله، افزایش می‌دهد [۱۰۸, ۹۴، ۳۳].

در میان فناوری های مرتبط با زیست فناوری تولیدمثل، دست یابی به تکنیکی مناسب جهت Cryopreservation تخمک در گونه های حیوانی به حفظ و مدیریت ذخایر ژنتیکی، پیشرفت مهندسی ژنتیک، بهبود روند انتقال هسته (NT) در روند شبیه سازی، تهیه ی منابع کافی جهت انجام تحقیقات بنیادین، صادرات کم هزینه صفات ژنتیکی برتر، و نیز ایجاد بانک ذخیره ی تخمک کمک می‌نماید. از طرف دیگر با حفظ و ذخیره سازی طولانی مدت این منابع (تخمک) امکان اعمال برنامه های مدیریتی قوی تر در مورد گونه های جانوری در معرض خطر انقراض و در انسان نیز امکان حفظ باروری در زنان در معرض خطر از دست دادن عمل کرد تخمدان به علت پرتو و شیمی درمانی، جراحی ها و یا کاهش تعداد و کیفیت تخمک مرتبط با سن و نیز کسانی که در معرض خطر نارسایی زودرس تخمدان می باشند، فراهم می‌گردد.

در خصوص آسیب ها و صدمات فیزیکی ناشی از انجماد، گزارشات متعددی مبنی بر تاثیرات منفی پروتکل های انجمادی از جمله آسیب های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، فراساختاری و عمل کردی آن بر روی تخمک ها و رویان های حاصل از آنها وجود دارد. از جمله ی این تاثیرات منفی می توان به وارد شدن صدمات غیرقابل برگشت به غشای پلاسمایی تخمک، کاهش نفوذپذیری انتخابی غشای پلاسمایی، اگزوسیتوز (Exocytosis) زودرس گرانولهای قشری،سفت و سخت شدن غشای شفاف(Zona hardening)،

کاهش شدید ریزپرز ها (Microvilli)، بهم ریختگی شدید اووپلاسم(Ooplasm)، تغییرات شدید و کاهش مشخص دستجات ریزلوله ها (Microfilament) و ریز رشته ها (Microtubules)، بهم ریختگی دوک تقسیم و حرکت اجزاء اطراف سانتریول ها (Centriol) به مرکز تخمک، خرد شدن هسته، افزایش احتمال بکرزایی(Parthenogenesis)، کاهش مشخص Proteome و Metabolom در تخمک ها اشاره نمود.

مطالعات انجام شده توسط Succu و همکاران در سال ۲۰۰۸ در خصوص بررسی تاثیر انجماد شیشه ای تخمک های بالغ شده گوسفندی در شرایط آزمایشگاهی بر ظرفیت تکاملی تخمک و رویان های حاصله و نیز الگوی بیان و فراوانی نسبی ترنس کریپت های (Transcripts) ژن های مسئول در بلوغ تخمک و تکامل رویان، مؤید تاثیرات منفی روند انجماد شیشه ای و ذوب بر روی الگوی بیان ژن ها در رویان و تخمک می باشد. این محققین به بررسی الگوی بیان ژن ها و بررسی فراوانی نسبی mRNA ژن های مسئول بلوغ H2A.Z Histone α-actin، پلیمراز poli A(PAP)، پروتئین شوک حرارتی بتا ۹۰ (Hsp 90β)Na/k-ATPase ,p34cdc2 cyclin b,، ترانسکریپت های E-cadherin و Globin با روش RT-PCR در تخمک های منجمد- ذوب شده و مقایسه آن با گروه کنترل پرداخته و گزارش نمودند که فراوانی mRNA ژن های مذکور بجزH2A.Z α-actinدر تخمک های منجمد – ذوب شده بطور معنی دار کمتر از گروه کنترل بوده و همین امر را یکی از علل پایین بودن کیفیت و توان تکاملی تخمک های منجمد – ذوب شده نسبت به گروه کنترل معرفی نموده‌اند.از طرفی از آنجایی که تقسیمات اولیه ی جنین پستانداران توسط پروتئین‌ها و رونویس‌های مادری که در طول تخمک زایی در تخمک تجمع نموده حمایت می‌شود، بنابراین توانایی تکاملی تخمک وابسته به تنوع و فراوانی رونویس‌های خاص، از ذخیره mRNA ی تخمک می باشد. از اینرو شاید بتوان تأخیر در تسهیمات اولیه ی رویانی و ضعف توان رسیدن به مرحله ی بلاستوسیست در تخمک‌های منجمد- ذوب شده را در ارتباط با اثرات منفی انجماد بر محتوای رونویس‌های مرتبط به عمل‌کردهای مهم سلولی و توانایی تکاملی آنها دانست. از دیگر صدمات وارده به تخمک بدنبال Cryopreservation می توان به تکه‌تکه شدن DNA، دژنره شدن تخمک بدنبال آپپتوزیس، دهیدره شدن پروتئین ها، کاهش فعالیت آنزیم ها، سخت شدن و یا پارگی غشای شفاف، پلی اسپرمی(Poly spermy)، Polygyny، پارگی و یا نشت غشاء، کاهش شدید ریزپرز ها (Microvilli) ، عدم تعادل کلسیم، تشکیل رادیکالهای آزاد، نقص در بارور شدن، کاهش درصد تسهیم و ... اشاره نمود[۱۳۲].

با توجه به ناکارآمدی اکثر پروتکل های انجمادی در تخمک بویژه در گونه گوسفند، و تنوع بسیار زیاد ژن های درگیر در رشد و نمو اولیه رویان در مراحل قبل از لانه گزینی، و اهمیت رخدادهای اپی‌ژنتیک در EGA، تثبیت ژن های Imprinted، غیر فعال سازی کروموزوم X و رشد و تکامل رویان در مراحل قبل از لانه گزینی، هدف از مطالعه حاضر بررسی کمی بیان ژن های کد کننده آنزیم های SUV39H1 و HAT1 (دخیل در متیلاسیون و استیلاسیون مولکول هیستون) در رویان های حاصل از تخمک های منجمد_ذوب شده در مراحل مختلف قبل از لانه گزینی می‌باشد[۱۳۳].

فصل دوم

کلیات

۲-۱- تولید آزمایشگاهی رویان:

فناوری تولید رویان در شرایط آزمایشگاه به ما اجازه‌ی تولید مقادیر انبوه رویان در مراحل تکاملی گوناگون را می‌دهد و از این رو بسیار مورد استقبال دانشمندان علوم زیستی تولیدمثلی و زیست فناوری قرار گرفته است.از جمله کاربردهای این روش می‌توان به درمان ناباروری به‌ویژه در انسان، ایجاد روش‌های نوین تعیین جنسیت رویان، درمان بیماری‌ها با استفاده از سلول‌های بنیادی، مقاصد دارویی، تحقیقات در تمامی جنبه‌های شبیه‌سازی (Cloning)، پیشرفت فناوری تزریق ژن، مطالعه‌ی مراحل مختلف رویانی و کاربردهای تجاری همانند تسهیل دوقلوزایی در گله‌های گوشتی، سرعت بخشیدن به برنامه‌های اصلاح‌نژاد، نجات گونه‌های در حال انقراض و بسیاری کاربردهای دیگراشاره کرد[۱۰۸, ۶۲].پیشرفت موفقیت‌آمیز و کاربرد گسترده این روش‌ها و فناوری‌های وابسته، ارتباط تنگاتنگی با گسترش فناوری‌های پایه مرتبط با بلوغ آزمایشگاهی تخمک (In Vitro Maturationm; IVM)،لقاح آزمایشگاهی(In Vitro Fertilization; IVF)، کشت آزمایشگاهی رویان(In Vitro Culture; IVC)، تکنیک‌های انتقال رویان و روش‌های کشت اسپرم در آزمایشگاهدارد.در ابتدا در بسیاری موارد، کار بر روی تخمدان‌های جمع‌آوری شده از سطح کشتارگاه‌ها انجام می‌شد. امروزه نیز استفاده از نمونه‌های کشتارگاهی کاربرد فراوانی دارد، البته هم اکنون یکی از روش‌های متداول، برداشت تخمک بااستفاده از روش‌های اولتراسونوگرافی از حیوانات بارور یا نابارور می‌باشد.

۲-۱-۱- بلوغ تخمک:

بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM) فناوری زیستی نوینی است که قابلیت‌های ویژه‌ای به فناوری تولیدمثل بخشیده است. IVM پروسه‌ی بسیار پیچیده‌ای است که هنوز تمامی جنبه‌های آن به درستی شناخته نشده است.در IVM می‌بایست محیط میکرو آندوکرینی مناسب جهت بلوغ تخمک فراهم گردد. در چنین شرایطی تخمک‌های نابالغ می‌توانند مراحل بلوغ سیتوپلاسمی و هسته‌ای را با موفقیت پشت سر بگذارند.

در شرایط خارج‌سازی تخمک از فولیکول و انتقال آن به محیط کشت مهار اعمال شده از جانب سلول‌های گرانولوزا برداشته شده و لذا تقسیم میوزی از سر گرفته خواهد شد[۱۰۷]. با این وجود در شرایط بلوغ آزمایشگاهی علی‌رغم این که حدود ۸۰-۷۰ در صد از تخمک‌های کشت داده شده به مرحله‌ی متافاز II از تقسیمات هسته‌ای می‌رسند لیکن تولید بلاستوسیست پس از انجام لقاح خارج رحمی به طور متوسط ۳۰ درصد خواهد بود که علت این امر را می توان تا حدود زیادی مربوط به نقصان بلوغ سیتوپلاسم دانست.

تخمک‌های مورد نیاز برای تولید رویان آزمایشگاهی از فولیکول‌های تخمدان‌هایی که در کشتارگاه جمع‌آوری می‌شوند به‌دست می‌آید[۱۵۸]. به منظور انتقال تخمدان به آزمایشگاه از ظرف‌های عایق حرارتی استفاده می‌گردد تا در معرض نوسانات حرارتی کمتری قرار گیرند.در آزمایشگاه بافت‌های اضافی را از تخمدان جدا نموده و تخمدان‌ها را به وسیله محلول‌های مناسب شستشو می‌دهند، سپس با سرنگ یا پمپ خلاء و سر سوزن مناسب و یا با روش‌های دیگر محتویات فولیکول‌هایی را که در سطح تخمدان هستند تخلیه نموده و در لوله آزمایش مناسب قرار می‌دهند. از اوایل دهه ۱۹۹۰ گرفتن تخمک از حیوانات دهنده‌ی زنده در شرایط طبیعی از راه پاره کردن فولیکول به کمک لاپاراسکوپی[۳۹]و اولتراسونوگرافی[۶۸] در حال گسترش است.اما این روش‌ها گران قیمت و میزان تخمک استحصالی به ازای هر تخمدان بسیار کم می‌باشد.در گذشته از تکنیک جداسازی فولیکول آنترال کامل(Dissecting the intactfollicle)به منظور دست‌یابی به تخمک استفاده می‌شد. اما روش برش تخمدان (Ovary slicing)[۱۴۸] وآسپیراسیون (Aspiration) [۱۴۹]در گوسفند معمول‌تر می‌باشد. یکی از رایج‌ترین روش‌های استحصال تخمک‌ها، از تخمدان‌های به دست آمده از کشتارگاه آسپیراسیون می‌باشد[۱۴۹].یکی از مشکلات این رهیافت این است که تنها ۳۰ تا ۶۰ درصد تخمک‌ها از فولیکول‌ها استحصال می‌شود، درحالی که با تکنیک جداسازی فولیکول درصد استحصال تخمک‌ها از فولیکول به صد درصد نیز می‌رسد.برتری این تکنیک سرعت اجرای آن است.فولیکول های با قطر ۸-۲ میلیمتر با نیدل گیج ۲۲-۱۸ متصل به پمپ خلأ با فشار ۱۰۰-۷۵ میلیمتر جیوه آسپیره می‌شوند[۴۶]. افزایش فشار خلأ موجب کاهش تخمک‌های با کیفیت مطلوب وزیست‌پذیر شده که احتمالاً به دلیل کنده شدن سلول‌های کومولوس از تخمک است.هنگامی که فشار خلأ بالاست افزایش چشمگیری در تعداد تخمک‌های برهنه (Denuded) دیده می شود. با افزایش فشار آسپیراسیون شمار Cumulus Oocyte(COCs) Complexesکاهش می‌یابد[۱۷].جداسازی تخمک‌های واجد شرایط برای تولید رویان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بر اساس آزمایش‌های انجام شده تنها آن دسته از تخمک‌های نارس قدرت بالغ شدن دارند که دارای چندین ردیف سلول کومولوس به صورت متراکم و یکنواخت در اطراف خود باشند و سیتوپلاسم تخمک‌ها یا اووپلاسم آنها نیز ترکیب یکنواختی داشته باشد. تخمک‌های بدون سلول کومولوس یا دارای سلول‌های کومولوس پراکنده و یا تخمک‌های حاوی اووپلاسم قطعه قطعه شده، فاقد توانایی لازم جهت بالغ شدن هستند.

تحقیقات نشان می‌دهند که در گوسفند فولیکول‌هایی که قطر آنها بین ۶-۲ میلیمتر می‌باشد، حاوی تخمک‌های واجد شرایط برای بالغ شدن در شرایط آزمایشگاهی هستند و تخمک‌هایی که از فولیکول‌های با قطر کمتر از ۲ میلیمتر و یا با قطر بیش از ۶ میلیمتر تهیه می‌شوند به ترتیب دارای سلول‌های کومولوس کم و یا زیاد ولی پراکنده بوده‌اند قابلیت بارور شدن را ندارند.در عین حال جمع‌آوری تخمک در آزمایشگاه معمولاً

از تمامی فولیکول‌هایی که در سطح تخمدان حضور دارند صورت می گیرد و ملاک انتخاب آنها مشخصات ظاهری خود تخمک‌ها است که در زیر میکروسکوپ قابل مشاهده می‌باشند.

ملاک بالغ شدن تخمک در شرایط آزمایشگاهی تداوم یافتن تقسیمات میوزی هسته تخمک و ظاهر شدن اولین گویچه قطبی (بلوغ هسته) و تغییر در فعالیت و نحوه استقرار اندامک‌های سیتوپلاسمی (بلوغ سیتوپلاسم) است.بنابراین برای انجام IVM موفق،بایستی بلوغ هسته‌ای به همراه بلوغ سیتوپلاسمی در شرایط آزمایشگاه صورت پذیرد، زیرا حوادثی که در طی بلوغ تخمک رخ می‌دهد،پیشرفت‌های جنینی را تحت تأثیر قرار می‌دهد[۱۳۹]. محیط کشت دارای بیشترین اثر در بلوغ تخمک است، یکی از بهترین محیط‌ها و به طور معمول محیطی که به منظور بلوغ تخمک‌های گوسفند و بز به کار می‌رود محیط TCM199 (Tissue Culture Medium)می‌باشد.اسیدیته این محیط را پس از آماده نمودن آن، به وسیله‌ی یون‌های بیکربنات یا محلولHEPES متعادل نموده و محیط را پس از غنی‌سازی با سرم و هورمون‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌دهند. افزودن Hormone Luteinizing(LH)، Follicle-Stimulating Hormone (FSH) و استرادیول به محیط بلوغ به طور معنی‌داری موجب افزایش میزان بلوغ می شود[۱۲]که به‌طور اولیه باعث تنظیم نمودن بلوغ هسته‌ی تخمک پستانداران می‌شوندو اثرات سودمندشان برای تخمک‌هایی که از حیوانات جوان نابالغ استحصال می‌شود مشخص‌تر است[۷۴].استرادیول نیز با تحریک DNA polymerase B و افزایش سنتز فاکتور مورد نیاز برای رشد پرونوکلئوس نر، باعث انجام بلوغ سیتوپلاسمی می‌شود.همچنین در حضور استرادیول میزان تولید بلاستوسیت افزایش می‌یابد[۱۰۳].

عموما به محیط بلوغ میزان ۲۰- ۱۰درصد سرم که در ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده می‌شود،نیز اضافه می‌شود. حرارت باعث غیرفعال شدن فاکتورهای نامساعدی همچون کمپلمان می‌شود. سرم به عنوان یک منبع غذایی برای COC ها مطرح بوده،همچنین از سخت شدن غشای شفاف (Zonahardening)زمانی که تخمک از محیط اطراف فولیکول آزاد می‌شود،جلوگیری می‌کند[۱۵۰].در گوسفند وبز در بیشتر مطالعات سرم مورد استفاده FBS می‌باشند. تخمک‌هابه منظور طی نمودن روند بلوغ در محیط مطلوب در شرایط ۳۸-۳۹ درجه سانتیگراد در ۵ درصد CO2،رطوبت حداکثر به مدت ۲۶-۳۲ ساعت گرمخانه‌گذاری می‌شوند.

۲-۱-۲- ظرفیت‌پذیری اسپرم(Capacitation):

مادامی که اسپرم‌ها، مسیر داخل لوله تناسلی ماده را طی نکرده‌اند، ظرفیت کامل برای لقاح تخمک را ندارند. اسپرم باید تغییرات فیزیولوژیکی تکمیلی (ظرفیت دارشدن اسپرم) را متحمل شود تا بتواند از لایه‌ی شفاف عبور کرده و با زرده تخمک ادغام شود.

در خلال ظرفیت‌پذیری، غشای پلاسمایی اسپرم متحمل واکنش‌های بیوشیمیایی شده و ناپایدار می‌گردد. در نتیجه این واکنش‌ها میزان نفوذپذیری غشا به مواد مختلف به ویژه کلسیم تغییر می‌کند.این تغییرات در ظاهر به عنوان عامل اصلی برای واکنش کلاهکی(Acrosom reaction) عمل می‌نمایند[۱۲و ۱۵].

واکنش‌های کلاهکی موجب متراکم شدن، شکسته شدن و در نهایت متخلخل شدن غشاهای پلاسمایی و غشای خارجی کلاهک می‌شوند. کلاهک حاوی آنزیم‌هایی است که پس از متخلخل شدن از آن خارج گشته و

بافت‌هایی را که در اطراف تخمک در مسیر حرکت اسپرم قرار دارند هضم نموده و از بین می‌برند و در نتیجه اسپرم قادر خواهد بود وارد تخمک شود و آن را بارور نماید.
مطالعات نشان می‌دهد که شستشوی اسپرم قبل از گرمخانه‌گذاری و قرار گرفتن در محیط‌های سر شار از یون و محیط‌های کلسیم‌دار می‌توانند واکنش آکروزومی را در محیط آزمایشگاهی هدایت کرده وعمل لقاح راسرعت بخشند[۱۵۰].با استفاده از تکنیکی‌های Swim up[۱۲]، گرادیان پرکل (Swim down)و سانتریفیوز نمودن[۹،۱۵]و فیلتراسیون مایع منی به وسیله‌ی ستون پشم شیشه[۱۱۴] می‌توان اسپرم‌های متحرک را از اسپرم‌های غیر متحرکبه منظور انجامIVFجدا نمود. در موارد اسپرم تازه،با استفاده از روشSwim up می‌توان اسپرم متحرک بیشتری را جدا نمود اما درمیزان نفوذ اسپرم در تخمک و میزان تسهیم هیچ تفاوتی بین دو روش Swim up و پرکل دیده نمی‌شود[۹۹].اما در مورد اسپرم منجمد استفاده از گرادیان پرکل و سانتریفیوژ نمودن نتایج بهتری را در میزان لقاح و پیشرفت‌های جنینی نسبت به روش های Swim up و ستون پشم شیشه ایجاد می‌کند[۱۱۴].

۲-۱-۳- لقاح آزمایشگاهی:

پس از ظرفیت‌پذیری اسپرم را به محیط مخصوص لقاح انتقال می‌دهند، غلظت اسپرم در این محیط در حدود یک میلیون در میلی‌لیتر است. زمانی که اسپرم و تخمک با هم کشت داده می‌شوند، یکی از اسپرم‌ها وارد تخمک می‌شود و پیامد آن، یک ردیف اعمال را به جریان می‌اندازد که در نهایت منجر به لقاح می‌شود.لقاح موفق نیازمند فراهم نمودن و تکمیل روند بلوغ تخمک، ظرفیت‌پذیری اسپرم، غلظت مناسب اسپرم جهت نفوذ به تخمک، کیفیت مناسب تخمک برای حمایت پیشرفت‌های رویانی و شرایط کشت مساعد و قابل قبول برای فعالیت‌های متابولیسمی گامت‌های نر و ماده می‌باشد.
اسپرم دارای میزان زیادی پروتئین در سطح خود برای اتصال به غشای شفاف می‌باشد. فرآیند لقاح از زمانی شروع می‌شود که اسپرم به رسپتورهای غشایشفافتخمک ثانویه متصل شود. این رسپتورها به صورت اختصاصی عمل نموده به طوری که اسپرم گاو قادر به بارور ساختن تخمک گاو می‌باشد. در فرآیند لقاح تخمک توسط اسپرم فعال شده، به طوری که بدون وجود هیچ گونه محرکی، تخمک می‌بایستی قادر به تشکیل پیش هسته ها (Pronucleus) و ایجاد زیگوت باشد.در روند فعال‌سازی زمانی که میزان زرده کم شده و مقداری مایع به فضای پیرامون زرده‌ای آزاد می‌شود سر اسپرم در زرده متورم شده، قوام ژله‌ای پیدا کرده و به‌طور کلی شکل خاص و ویژه خود را از دست می‌دهد و در نهایت ساختاری که حاصل می‌شود شباهت بیشتری به هسته‌ی سلول سوماتیک دارد تا یک سر اسپرم، این ساختار پرونکلئوس نر نامیده می‌شود.
Decondense شدن سر اسپرم ۲-۱ ساعت بعد از نفوذ در تخمک و شکل‌گیری پرونکلئوس نر ظرف ۵-۳ ساعت رخ می‌دهد[۵۴].از جمله تغییرات بیوشیمیایی که در اثر نفوذ اسپرم در تخمک حاصل می‌شود تغییر در الگوی یون کلسیم داخل سلولی است، در طی پدیده لقاح موجب القای اگزوسیتوز گرانول‌های قشری و مهار پلی‌اسپرمی می‌شود[۱۳۴].
برای مشاهده لقاح، می‌توان با مشاهده میکروسکوپی و یا با رنگ‌آمیزی و تثبیت نمودن تخمک ۲۴-۱۸ ساعت پس از تلقیح به وقوع تسهیم (Cleavage) پی برد. نرخ بالای لقاح در IVF، به وجود تعداد مناسب اسپرم‌های باروری که به شدت متحرک بوده و تخمک‌های باروری که دارای اولین گویچه قطبی هستند، بستگی دارد.

بعضی از معیارهایی که به عنوان نشانه لقاح به کار می‌روند عبارتند از:

الف- نفوذ اسپرم به داخل اووپلاسم

ب- تورم سر اسپرم، تشکیل پیش هسته نر

ج- تسهیم با ظاهر طبیعی، تشکیل بلاستوسیست

د- متلاشی شدن دانه‌های قشری

ه- مشاهده دم یک اسپرم در اووپلاسم

هیچ یک از موارد فوق به تنهایی نمی‌تواند بیانگر لقاح طبیعی باشد، چرا که به عنوان مثال، رویان‌های حاصل از بکرزاییهم، بعضی از معیارهای فوق را دارا هستند.

۲-۱-۴- کشت رویان در آزمایشگاه:

تکامل رویان‌های پستانداران پیش از لانه‌گزینی به صورت In vitro با مشکلات زیادی همراه است. سیستم‌های کشت موجود، نتوانسته‌اند شرایط محیطی و فیزیکی دستگاه تناسلی ماده را فراهم کنند. در داخل سیستم تناسلی ماده، رویان در حال تکامل در معرض حجم کمی از مایع قرار می‌گیرد و بر عکس در محیط کشت، رویان در معرض حجم بیشتری از مایع قرار دارد. با وجود این، فاکتورهای اتوکرینی که به وسیله‌ی رویان ترشح می‌شود در حجم زیاد مایع رقیق شده و ممکن است بی‌اثر شود[۶۲].

اکنون ثابت شده که در موش سرعت تسهیم و تشکیل بلاستوسیست با کم کردن حجم محیط افزایش می‌یابد. نتایج مشابهی نیز از رویان گوسفند به دست آمده است، در ضمن فاکتورهای پاراکرینی هم که به وسیله‌ی سیستم تناسلی ماده ترشح می‌شود در محیط کشت وجود ندارد.بنابراین در روش‌های اولیه‌ای که برای کشت رویان تدوین شده بود، محیط‌های کشت مورد استفاده پاسخ‌گوی احتیاجات رشد رویان نبود و رشد رویان پس از رسیدن به مرحله‌ی ۱۶-۸ سلولی متوقف می‌گردید.لذا برای تداوم رشد رویان و رسیدن به مراحل پیشرفته‌تر (مورولاوبلاستوسیست) آن‌ها را به شرایط طبیعی انتقال می‌دادند و برای این منظور از لوله رحمی حیواناتی نظیر گاو، گوسفند، بز یا خرگوش استفاده می‌نمودند. پس از این که رویان‌ها چند روزی را در این شرایط سپری کردند، آن‌ها را از لوله رحمی خارج و مورد استفاده قرار می دهند [۱۴].

مهم‌ترین مشکل این روش از دست دادن تعدادی از رویان‌ها در جریان انتقال آنها به لوله رحمی میزبان واسط و بازیابی مجدد آن‌ها بود. همچنین استفاده از حیوان زنده برای تأمین تداوم رشد رویان‌ها نیز کاری مشکل بود و کاربرد عملی نداشت. در تحقیقات بعدی محققین این مشکل را با اضافه نمودن سلول‌های حمایت کننده‌ی رشد رویان (کشت هم زمان سلول‌های اویداکتی، کومولوس، اپیتلیان رحم، Vero، BRLو...)، عوامل رشد و یا ترشحات لوله تناسلی به محیط کشت برطرف ساخته و امکان رشد رویان تا مرحله‌ی بلاستوسیست را در شرایط آزمایشگاهی فراهم نمودند.

۲-۲- انجماد:

درعلم زیست شناسی انجماد(Cryobiology) به مطالعه اثرحرارت های پایین بر روی ارگانیسم های زنده پرداخته شده و با توجه به پیشرفت‌های چشم گیر به عمل آمده بشرتوانسته است از روش های متنوعی جهت نگهداری سلول های جنسی و رویان بهره مند گردد. برای نگهداری سلول‌های جنسی بدون کاهش میزان

بقای آن ها، باید دمایی پایین تر از دمای لازم جهت انجماد که در حدود ۱۳۰ درجه ی سانتی گراد زیر صفر است استفاده نمود که در عمل نیتروژن مایع برای این امر کاربرد دارد ($196^{o}c$) [۱۵۳]. امروزه ازروش های مختلفی جهت نگهداری رویان در سرما استفاده می‌شود و رویان بیش از ۷۰ گونه از پستانداران با موفقیت منجمد شده است[۵۵]. نگهداری از تخمک و بافت تخمدان یکی از اهداف طولانی مدت محققان بوده است. نگهداری و ذخیره موفق اجزای تولید مثلی در جنس ماده اهمیت بالایی در فناوری مرتبط با ارتقاء تولید مثل (Assisted Reproductive Technology) و علم پزشکی داشته است. انجماد تخمک و بافت تخمدان به زنانی که به علت جراحی و یا دیگر روشهای شیمی درمانی دچار اختلال در عملکرد غدد جنسی می گردند کمک می‌کند تا پتانسیل تولید مثل خود را حفظ نموده و از طرفی کاربرد این روش در زمینه ی تولید مثل انسان به دلیل وجود فشارهای قانونی و اختلافات در مورد انجماد رویان بسیار بیشتر مورد توجه قرار گرفته است[۶۶]. از طرفی این تکنیک برای زنانی که درخواست نگهداری و انجماد مواد ژنتیکی خود جهت استفاده های بعدی را دارند و نیز در مورد زنانی که تحت رادیوتراپی و شیمی‌درمانی جهت درمان انواع سرطان قرار م-ی‌گیرند، مفید می باشد[۹۴].

تاریخچه زیست شناسی انجماد به اواخر قرن ۱۶ باز می‌گردد. Power یک جام از مارماهی سرکه را در آب نمک منجمد کرده و بعد از ذوب متوجه شد که هنوز مانند قبل از انجماد فعال است. پاور اولین کسی بود که این نظریه را ارائه کرد که سرما برخلاف آن چه که گفته می‌شود، مرگ‌آورنیست. در اواخر دهه ۱۹۴۰ Polge و همکاران وی در دانشگاه کمبریج به طور تصادفی متوجه قابلیت نگهدارنده بودن گلیسرول که به طور غیر-عمدی برچسب اشتباه خورده و در آزمایش‌های شیمیایی استفاده گردیده بود، شدند. کشف توانایی گلیسرول در نگهداری سلول‌ها علیه آسیب‌های حاصل از انجماد منجر به اقتباس علم زیست‌شناسی در دمای پایین گردید[۱۲۵]. نگهداری سلول‌های پستانداران در شرایط انجماد به متغیرهای مختلفی وابسته است. این متغیرها شامل نوع سلول، محیطی که سلول در آن قرار دارد و این که آیا محیط حاوی ضدیخ (Cryoprotectant) هست یا خیر، سرعت انجماد سلول تا دمای زیر صفر درجه سانتی گراد، حداقل دمای زیر صفر درجه که سلول در آن منجمد می شود، سرعت ذوب سلول و شرایطی که در آن ضد یخ از سلول حذف می‌شود، می‌باشد. بسته به محیط مورد استفاده، انواع مختلف سلول، سرعت مطلوب انجماد مختلفی را نشان می‌دهند که ممکن است از حداقل ۰/۲ درجه سانتی گراد در دقیقه تا حداکثر ۱۰۰۰ درجه سانتی گراد در دقیقه متفاوت باشد. تحت شرایط ویژه، سلول‌ها ممکن است حتی تا سرعت بیش از ۱۰۰هزار درجه سانتی گراد در دقیقه زنده بمانند. برای یک نوع معین سلول، تشخیص یک ضدیخ مناسب، سرعت مطلوب انجماد و ذوب متناظر آن کلید یک انجماد موفق هستند [۶۵].

۲-۲-۱-اساس سرد کردن و نگهداری در شرایط انجماد:

نگهداری در شرایط انجماد شامل پنج مرحله حیاتی است:

الف- در معرض ضد یخ قرار دادن سلول و یا بافت‌ها

ب- سرد کردن نمونه تا دمای زیر صفر درجه سانتی گراد

ج- ذخیره در دمای شیشه‌ای شدن آب در زیر ۱۳۰- درجه سانتی گراد

د- گرم و ذوب کردن