بنام خداوند جان و خرد

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

اثر انجماد شیشه‌ای رویان موش بر تغییرات هیستونی و بیان ژن آنزیم‌های تغییر دهنده‌ی هیستونی

رساله دکتری علوم دامی

الهام بنکدار

اساتید راهنما

دکتر محمدعلی ادریس

دکتر محمد حسین نصر اصفهانی

۱۳۹۳

کلیه حقوق مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این رساله بر طبق تفاهم‌نامه دانشگاه صنعتی اصفهان و پژوهشکده زیست فن‌آوری رویان اصفهان است.

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

رساله دکتری علوم دامی خانم الهام بنکدار

تحت عنوان

اثر انجماد شیشه‌ای رویان موش بر تغییرات هیستونی و بیان ژن آنزیم‌های تغییر دهنده هیستونی

در تاریخ ۱۳۹۳/۱۱/۲۶ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای رساله	دکتر محمدعلی ادریس
۲- استاد راهنمای رساله	دکتر محمد حسین نصر اصفهانی
۳- استاد مشاور رساله	دکتر حمیدرضارحمانی
۴- استاد داور	دکتر عباس پاکدل
۵- استاد داور	دکتر ابوالقاسم اسماعیلی
۶- استاد داور	دکتر کامران قائدی
سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر محمد مهدی مجیدی

تقدیم به:

همسفر زندگیم، **همسر مهربانم،**
به پاس قدردانی از قلبی آکنده از عشق و معرفت که محیطی سرشار از امنیت، آرامش و آسایش برایم فراهم آورده و در تمامی لحظات، رفیق راهم می‌باشد.

بهار جاویدان زندگیم، **بردیا،**
که گرمای دستان کوچکش امیدبخش زندگیمان می‌باشد.

تشکر و قدردانی

سپاس بیکران به درگاه پروردگاری می‌برم که هستی‌مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از درخت علم و معرفت را روزیمان ساخت.

از حامیان همیشگی زندگیم، پدر و مادر عزیزم که همواره بر کوتاهی و درشتی من قلم عفو کشیده و آرامش روحی و آسایش فکری را فراهم آورده تا در محیطی مطلوب به تحصیل بپردازم کمال سپاس را داشته و از خداوند متعال عمری قرین با عزت و سلامتی را برای ایشان خواستارم.

دستان پر از مهر و عشق همسرم را به گرمی می‌فشارم و به پاس همدلی‌ها و همراهی‌های عاشقانه‌اش او را می‌ستایم و سلامتی و موفقیت ایشان را از درگاه ایزد منان خواستارم.

از محضر اساتید فرهیخته جناب آقای دکتر ادریس و جناب آقای دکتر نصراصفهانی که در نهایت لطف و بزرگواری تمامی سعی و تلاش خود را در جهت اعتلای این رساله مبذول داشتند، کمال تشکر را دارم. هم‌چنین از مقام ارزشمند آقای دکتر رحمانی که مشاوره اینجانب را بر عهده داشتند سپاسگزارم. از آقایان دکتر عباس پاکدل، دکتر ابوالقاسم اسماعیلی و دکتر کامران قائدی که زحمت بازخوانی و داوری این پایان نامه را پذیرفتند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از جناب آقای دکتر باختری که در مراحل مختلف این مطالعه یاریگر اینجانب بودند، سپاسگزاری نموده و موفقیت و سلامتی ایشان را در تمامی مراحل زندگی آرزومندم. از دوستان عزیزم سرکار خانم‌ها دکتر زحمتکش، دکتر جعفرپور، دکتر عسگری، مهندس کیانی، مهندس روح‌اللهی، جناب آقای دکتر حسینی، آقای دکتر صادقی، آقای دکترقناعی و آقای مهندس تنهایی به سبب همکاری‌های صمیمانه‌ی ایشان در طول اجرای این پروژه قدردانی می‌نمایم. یاد و خاطره تمامی دوستان عزیزم در دوره کارشناسی، کارشناسی ارشد و دکترا در گروه علوم دامی و دیگر دوستان در پژوهشکده‌ی رویان اصفهان که ذکر نام یکایک ایشان در این مجال نمی‌گنجد را گرامی داشته و برای تمامی آن‌ها سعادت و سلامتی را آرزو دارم.

الهام بنکدار

زمستان ۱۳۹۳

چکیده

در عالم طبیعت هنگامی که لقاح صورت می‌گیرد،گامت نر و گامت ماده، طی دو فرآیند شکل‌گیری مجدد هسته‌ای و برنامه-ریزی مجدد هسته‌ای به وضعیت کاملاً تمایز نیافته و همه‌توان بر می‌گردند. طی فرآیند برنامه‌ریزی مجدد هسته‌ای، تغییرات پیچیده اپی‌ژنتیکی در ژنوم رویان، چه در سطح DNA و چه در سطح هیستون‌ها رخ می‌دهد که اثر بسیار مهمی بر روی تکوین یک موجود دارد. از آن‌جایی‌که در پستانداران عوامل محیطی طی اوایل تکوین نقش تعیین کننده‌ای را در تنظیم اپی‌ژنتیکی بر عهده دارند، از این‌رو در این رساله به بررسی اثر روش‌های کمک تولید مثلی بر میزان زنده‌مانی و توانایی نمو و هم‌چنین ارزیابی چند نشانگر اپی‌ژنتیکی هیستونی در مرحله‌ی پیش از لانه‌گزینی و بیان ژن آنزیم‌های درگیر در این تغییرات و نیز بیان ژن نشانگرهای پرتوان *Sox2*، *Pou5f1* و*Nanog* در دو مرحله‌ی پیش از لانه‌گزینی و پس از آن پرداخته شد. هم‌چنین به منظور بررسی اثر روش‌های کمک تولیدمثلی بر روی میزان توانایی نمو جنین، میزان جایگاه جذب و جایگاه لانه‌گزینی و هم‌چنین وزن جفت و جنین در روز ۹/۵ جنینی مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله‌ی پیش از لانه‌گزینی چهار گروه تیماری شامل گروه-های C (کنترل)، S (تحریک تخمک‌ریزی)، SI (تحریک تخمک‌ریزی + کشت در شرایط برون‌تنی) و SVI (تحریک تخمک-ریزی + انجماد شیشه‌ای + کشت در شرایط برون‌تنی) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که میزان تشکیل بلاستوسیست و شکوفایی بلاستوسیست در گروه SVI به‌میزان معنی‌داری پائین‌تر از گروه SI می‌باشد ($P<۰/۰۵$). آنالیز نیمه کمی نشانگرهای اپی‌ژنتیکی در تروفکتودرم نشان داد که گروه C پائین‌ترین شدت نور فلورسنت هسته‌ای را برای این سه نشانگر دارا می‌باشد و این تفاوت تنها برای استیله شدن H۳K۹ معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). برای استیله شدن H۴K۱۲ میزان شدت نور فلورسنت در گروه SVI به‌میزان معنی‌داری بالاتر از گروه‌های S وC بود که این تفاوت را می‌توان به تنش حاصل شده از مواد محافظ انجمادی و سرمای وارد شده به این سلول‌ها نسبت داد. بررسی این نشانگرها در توده‌ی درونی سلولی نشان داد که گروه S برای استیله شدن H۳K۹ نسبت به گروه‌های C و SI و برای تری متیله شدن H۳K۴ نسبت به گروه SI وSVI به‌میزان معنی‌داری بالاتر بود ($P<۰/۰۵$). این نتیجه را می‌توان این گونه توضیح داد که تخمک‌های به‌دست آمده از موش‌های تحریک تخمک‌ریزی شده ممکن است به اندازه تخمک‌های حاصله از موش‌هایی که سیکل طبیعی داشتند، توانا نباشند. برپایه این فرض انتظار می‌رود که بلاستوسیست‌های به‌دست آمده از گروه‌های SI و SVI میزان بالایی از استیله شدن H۳K۹ و تری متیله شدن H۳K۴ را داشته باشند اما در عمل چنین نبود. این تفاوت‌ها می‌تواند به این دلیل باشد که تخمک های نامناسب به‌دست آمده از تحریک تخمک‌ریزی ممکن است در گروه‌های SI و SVI تحت کشت در شرایط برون‌تنی و انجماد شیشه‌ای به مرحله بلاستوسیست نرسیده باشند و در نتیجه بلاستوسیست‌هایی که از تخمک های با شایستگی بالا حاصل شده‌اند در این گروه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. بنابراین میزان این تغییرات اپی‌ژنتیکی در دو گروه SI و SVI شبیه به گروه C است. بررسی نتایج حاصل از بیان ژن‌ها در این مطالعه نشان داد که دستکاری‌های موجود در روش‌های کمک تولید مثلی القاء کننده‌ی الگوی بیانی غیر طبیعی ژن‌ها در این مرحله می‌باشند. از آن‌جایی‌که در تمام ژن‌های بررسی شده در رویان در مرحله‌ی بلاستوسیست تفاوت معنی‌داری در میزان بیان ژن بین گروه‌های تیماری SI و SVI دیده نشد، می‌توان گفت که انجماد شیشه‌ای رویان دو سلولی موش اثرخاصی بر میزان بیان ژن آنزیم‌های درگیر در تغییرات اپی‌ژنتیکی و هم‌چنین بیان ژن نشانگرهای پرتوان بررسی شده در مرحله‌ی پیش از لانه-گزینی، در مقایسه با کشت در شرایط برون‌تنی ندارد. به‌منظور بررسی‌های پس از لانه‌گزینی علاوه بر داشتن دو گروه C و S، گروه‌های CT، ST، SIT و SVIT هم که در آن‌ها عمل انتقال رویان علاوه بر دستکاری‌های دیگر صورت گرفته بود مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج نشان داد که با افزایش دستکاری‌ها، درصد جایگاه جذب افزایش و وزن جنین کاهش می‌یابد. کاهش وزن جنین در گروه تیماری S که تنها تیمار تحریک تخمک‌ریزی بر روی آن‌ها صورت گرفته بود نسبت به گروه C معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). داده‌های به‌دست آمده از بیان ژن‌ها در جنین ۹/۵ روزه نشان داد که میزان بیان بیشتر ژن‌ها در گروه تیماری S، با گروه‌های دیگر متفاوت است. دلیل این تفاوت را می‌توان این‌گونه توضیح داد که تحریک تخمک‌ریزی باعث آزادسازی تخمک‌های غیرطبیعی گردد. این اتفاق از طریق وادار کردن تخمک‌ها برای تکوین خیلی سریع و یا آزاد شدن تخمک‌هایی که از قبل برای پس روی کردن انتخاب شده‌اند، صورت می‌گیرد. بنابراین نشانگرهای اپی‌ژنتیکی در این گروه‌ها دستخوش تغییر شده والگوی بیان ژن‌ها نیز غیر طبیعی می‌شود. هم‌چنین تزریق اگزوژنوسی هورمون‌ها می‌تواند باعث شود که میزان استرادیول سرم خون نسبت به گروه کنترل که چرخه‌ی تخمک‌ریزی طبیعی دارد افزایش یافته و شرایط متفاوتی در محیط رحم حاصل شود واثر منفی بر وضعیت بیان ژن‌ها بگذارد.

واژه‌های کلیدی: تغییرات اپی‌ژنتیکی هیستونی، تحریک تخمک‌ریزی، انجماد شیشه‌ای، بیان ژن، بلاستوسیست، جفت و جنین ۹/۵ روزه

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فهرست مطالب ..... هشت
فهرست اشکال ..... یازده
فهرست جداول ..... سیزده
چکیده ۱
فصل اول: مقدمه
۱-۱- مقدمه ۲
فصل دوم: بررسی منابع
۲-۱- مقدمه ۶
۲-۲- حفاظت انجمادی ۸
۲-۲-۱- حفاظت انجمادی تخمک ۸
۲-۲-۲- حفاظت انجمادی رویان ۹
۲-۳- روش‌های حفاظت انجمادی رویان ۹
۲-۳-۱- سرد کردن آهسته ۱۰
۲-۳-۲- انجماد شیشه‌ای ۱۰
۲-۴- اپی‌ژنتیک ۱۴
۲-۵- تغییرات اپی‌ژنتیکی DNA (متیله شدن DNA) ۱۶
۲-۶- تغییرات اپی‌ژنتیکی هیستون‌ها ۱۸
۲-۶-۱- استیله شدن هیستون‌ها ۱۹
۲-۶-۲- متیله شدن هیستون‌ها ۲۲
۲-۷- موقعیت ژنومیکی تغییرات هیستونی ۲۵
۲-۷-۱- یوکروماتین ۲۵
۲-۷-۲- هتروکروماتین ۲۵
۲-۸- نحوه‌ی عمل تغییرات هیستونی ۲۶
۲-۸-۱- ایجاد تغییر ساختاری به‌صورت مستقیم در کروماتین ۲۶
۲-۸-۲- تنظیم باندشدن فاکتورهای کروماتینی ۲۷
۲-۹- تداخل در تغییرات هیستونی ۲۷
۲-۱۰- ارتباط بین متیله شدن DNA و تغییرات هیستونی ۲۸
۲-۱۱- برنامه‌ریزی مجدد تغییرات اپی‌ژنتیکی هیستونی ۲۹
۲-۱۲- تنظیم تصمیمات سرنوشت ساز اولیه سلولی توسط تغییرات هیستونی ۳۳

۲-۱۳- روش‌های کمک تولیدمثلی و نابجایی تغییرات اپی‌ژنتیکی ۳۴
فصل سوم: مواد و روش‌ها
۳-۱- مکان اجرای آزمایش ۳۸
۳-۲- لوازم، مواد شیمیایی و محیط‌ها ۳۸
۳-۳- حیوان و سویه مورد استفاده و شرایط نگهداری ۴۰
۳-۴- طراحی آزمایش ۴۱
۳-۴-۱- تحریک تخمک‌ریزی ۴۴
۳-۴-۲- آمیزش ۴۴
۳-۴-۳- استحصال رویان دو سلولی ۴۵
۳-۴-۴- انجماد شیشه‌ای و یخ‌گشایی ۴۶
۳-۴-۵- کشت رویان تا مرحله بلاستوسیست ۴۸
۳-۴-۶- استحصال بلاستوسیست ۴۸
۳-۴-۷- ایجاد نر وازکتومی شده ۴۹
۳-۴-۸- آماده سازی ماده‌های حامل ۴۹
۳-۴-۹- انتقال بلاستوسیست به موش‌های حامل ۵۰
۳-۴-۱۰- استحصال جنین ۹/۵ روزه ۵۱
۳-۵- شاخص‌های اندازه‌گیری شده ۵۲
۳-۵-۱- رنگ‌آمیزی وکمی کردن نتایج حاصل از آن ۵۳
۳-۵-۲- استخراج RNA ۵۴
۳-۵-۳- سنتز cDNA ۵۶
۳-۵-۴- بیان ژن ۵۶
۳-۶- تجزیه آماری ۵۹
فصل چهارم: نتایج و بحث
۴-۱- اثر انجماد شیشه‌ای در مرحله‌ی دو سلولی بر میزان زنده‌مانی و توانایی نمو رویان ۶۰
۴-۲- ارزیابی نشانگرهای اپی‌ژنتیکی ۶۳
۴-۲-۱- استیله شدن H۳K۹ ..... ۶۳
۴-۲-۲- استیله شدن H۴K۱۲ ..... ۶۳
۴-۲-۳- تری‌متیله شدن H۳K۴ ..... ۶۴
۴-۳- میزان جایگاه جذب و جایگاه لانه‌گزینی در روز ۹/۵ جنینی ۶۹
۴-۴- وزن جفت و جنین در روز ۹/۵ جنینی ۷۱
۴-۵- بررسی کیفیت cDNA، آغازگرها و ارزیابی کارایی تکثیر ۷۳

۴-۶- اثر دستکاری‌های مربوط به روش‌های کمک تولید مثلی بر میزان بیان ژن آنزیم‌های مربوط به تری‌متیله شدن H۳K۴، استیله شدن H۴K۱۲ و استیله شدن H۳K۹ در بلاستوسیست ۷۵
۴-۶-۱- بیان ژن *Ash1l* و *Mll1* ۷۵
۴-۶-۲- بیان ژن *Kat5* ۷۵
۴-۶-۳- بیان ژن *Kat2a* ۷۶
۴-۷- اثر دستکاری‌های مربوط به روش‌های کمک تولید مثلی بر میزان بیان ژن آنزیم‌های مربوط به تری‌متیله شدن H۳K۴، استیله شدن H۴K۱۲ و استیله شدن H۳K۹ در بافت جنین و جفت ۹/۵ روزه ۷۷
۴-۷-۱- بیان ژن *Ash1l* و *Mll1* ۷۷
۴-۷-۲- بیان ژن *Kat5* ۷۷
۴-۷-۳- بیان ژن *Kat2a* ۷۷
۴-۸- اثر دستکاری‌های مربوط به روش‌های کمک تولید مثلی بر میزان بیان ژن نشانگرهای پرتوان در بلاستوسیست ۸۰
۴-۹- اثر دستکاری‌های مربوط به روش‌های کمک تولید مثلی بر بیان ژن نشانگرهای پرتوان در بافت جنین و جفت ۹/۵ روزه ۸۰
۴-۹-۱- بیان ژن *Pou5f1* ۸۰
۴-۹-۲- بیان ژن *Nanog* ۸۱
۴-۹-۳- بیان ژن *Sox2* ۸۱
فصل پنجم: نتیجه‌گیری و پیشنهادها
۵-۱- نتیجه‌گیری کلی ۸۸
۵-۲- پیشنهادها ۹۰
منابع ۹۲

فهرست اشکال

شکل | صفحه

شکل ۲-۱- تغییرات اپی‌ژنتیکی در سطح هیستون و DNA ۱۵
شکل ۲-۲- برنامه‌ریزی مجدد تغییرات اپی‌ژنتیکی در یک چرخه‌ی زندگی ۱۶
شکل ۲-۳- انواعی از تغییرات اپی‌ژنتیکی در هیستون‌ها ۱۹
شکل ۲-۴- نحوه‌ی عمل هیستون استیل ترانسفراز ها ۲۰
شکل۲-۵- متیله شدن هیستون‌ها ۲۳
شکل ۲-۶- تداخل در تغییرات هیستونی ۲۸
شکل ۲-۷- ارتباط بین متیله شدن DNA و تغییرات هیستونی ۲۹
شکل ۳-۱- شمایی از طرح آزمایش ۴۲
شکل۳-۲- محل تزریق گنادوتروپین جهت انجام تحریک تخمک‌ریزی ۴۴
شکل ۳-۳- مشاهده واژینال پلاگ در روز ۰/۵ ..... ۴۵
شکل ۳-۴- نحوه‌ی نخاعی کردن موش ۴۶
شکل ۳-۵- رویان موش در مرحله‌ی دو سلولی ۴۶
شکل ۳-۶- نحوه انجماد شیشه‌ای و یخ‌گشایی ۴۷
شکل ۳-۷- رویان موش در مرحله‌ی بلاستوسیست ۴۹
شکل ۳-۸- نحوه‌ی وازکتومی نمودن موش ۴۹
شکل ۳-۹- نحوه انتقال بلاستوسیست به موش حامل ۵۱
شکل ۳-۱۰- مراحل استحصال جنین ۹/۵ روزه ۵۲
شکل ۴-۱- تغییرات در استیله شدن H۳K۹ ..... ۶۵
شکل ۴-۲- تغییرات در استیله شدن H۴K۱۲ ..... ۶۶
شکل ۴-۳- تغییرات درتری‌متیله شدن H۳K۴ ..... ۶۷
شکل ۴-۴- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز گرادیان دمایی ۷۳
شکل ۴-۵- بررسی کارایی تکثیر و منحنی ذوب ۷۴
شکل۴-۶- آنالیز بیان ژن آنزیم‌های تغییر دهنده‌ی هیستونی (*Ash1l*، *Mll1*، *Kat5* و *Kat2a*) در بلاستوسیست ۷۸
شکل۴-۷- آنالیز بیان ژن آنزیم‌های تری متیله کننده‌ی H۳K۴ (*Ash1l*، *Mll1*)در بافت جفت وجنین۹/۵ روزه ۷۸
شکل۴-۸- آنالیز بیان ژن آنزیم استیله کننده‌ی H۴K۱۲ (*Kat5*) در بافت جفت وجنین۹/۵ روزه ۷۹
شکل۴-۹- آنالیز بیان ژن آنزیم استیله کننده‌ی H۳K۹ (*Kat2a*) در بافت جفت وجنین۹/۵ روزه ۷۹
شکل ۴-۱۰- آنالیز بیان ژن نشانگرهای پرتوان (*Pou5f1*، *Nanog* و *Sox2*) در بلاستوسیست ۸۲
شکل ۴-۱۱- آنالیز بیان ژن *Pou5f1* در بافت جفت وجنین۹/۵ روزه ۸۲

شکل ۴-۱۲- آنالیز بیان ژن *Nanog* در بافت جفت وجنین۹/۵ روزه.....۸۳
شکل ۴-۱۳- آنالیز بیان ژن *Sox2* در بافت جفت وجنین۹/۵ روزه ۸۳

فهرست جداول

جدول **صفحه**

جدول ۳-۱- اجزای تشکیل دهنده محیط‌های کشت G1 و G2 و محیط M2 ..... ۳۹
جدول ۳-۲- اجزای تشکیل دهنده‌ی جیره ۴۰
جدول ۳-۳- اجزای تشکیل دهنده‌ی محلول‌های پایه، تعادل، انجماد و یخ‌گشایی ۴۷
جدول ۳-۴ مشخصات آنتی‌بادی‌ها ۵۴
جدول ۳-۵- اسامی و مشخصات آغازگرهای مورد استفاده ۵۷
جدول۳-۶- مواد مورد نیاز برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و Real time RT-PCR ۵۸
جدول ۴-۱- توانایی نمو رویان در گروه‌های تیماری SI و SVI ۶۱
جدول ۴-۲- اثر روش‌های کمک تولید مثلی بر جایگاه‌های جذب و لانه‌گزینی در روز ۹/۵ جنینی ۷۰
جدول ۴-۳- اثر روش‌های کمک تولید مثلی بر وزن جفت وجنین در روز ۹/۵ جنینی ۷۲

فصل اول

مقدمه

بهبود ژنتیکی حیوانات مزرعه‌ای در سال‌های اخیر به میزان چشمگیری مورد توجه محققین قرار گرفته است. بخش مربوط به چهارپایان اهلی یکی از بخش‌های صنعتی در حال رشد می‌باشد که منبع اصلی درآمد دامداران هر کشور را تشکیل می‌دهد و گاوهای شیری و نشخوارکنندگان کوچک بخش بزرگی از اقتصاد در حال رشد بیشتر کشورها را از لحاظ تولید شیر، گوشت و پشم به خود اختصاص می‌دهند. برای پیشرفت موفقیت آمیز این بخش، دامدار باید برنامه‌ای در جهت تولید بیشینه داشته باشد و شکست در بخش تولید مثل ضرر اقتصادی بزرگی در این صنعت می‌باشد. پائین آمدن راندمان مطلوب بارداری در حیوانات مزرعه‌ای به دلیل فحل نشدن، ناباروری و تشخیص ضعیف در سیکل فحل است. در راستای پیشبرد این صنعت بزرگ، کاربرد روش‌های کمک تولید مثلی[1] امری مهم می‌باشد. برخی روش‌های کمک تولید مثلی از جمله تلقیح مصنوعی[2]، حفاظت انجمادی[3] گامت و رویان، همزمان سازی فحلی[4]، تحریک تخمک‌ریزی[5]، انتقال رویان[6] و لقاح برون تنی[7] که راهکارهایی با پتانسیل بالا در جهت بهبود تولید مثل می‌باشند، استفاده شده است [۲۲۹]. این روش‌ها باعث کوتاه نمودن فاصله نسل، افزایش تعداد فرزندان حاصل از حیوانات برتر ژنتیکی، حفاظت

1- Assisted Reproductive Technology (ART)
2- Artificial Insemination
3-Cryopreservation
4- Heat synchronization
5- Superovulation
6- Embryo transfer
7- *In vitro* fertilization

از منابع ژنتیکی حیوانات نابارور و یا حیوانات با قدرت باروری پائین و هم‌چنین کنترل بیماری‌ها و کاهش هزینه‌های تولید می‌شوند [۱۵۴].

از طرفی مدارک بسیار زیادی مبنی براین اصل وجود داردکه روش‌های کمک تولید مثلی مشکلاتی را نیز برای جنین حاصل می‌نماید و باعث ایجاد تغییر در فنوتیپ می‌شود [۱۳۶]. این تغییرات درفنوتیپ نه تنها در گاو، بلکه در گوسفندها [۲۳۷] و موش‌هایی [۵۲] که با این روش‌ها تولید شده‌اند، نیز دیده شده است. برای مثال سندرم بزرگ جثگی فرزندان[1]، در بره‌ها و گوساله‌های متولد شده از روش‌های انتقال هسته و لقاح در شرایط برون تنی حاصل می‌شود. این حیوانات نه تنها بیش از حد بزرگ هستند، ریه در آن‌ها به تکامل نرسیده و بنابراین مشکلات تنفسی دارند. کلیه‌ها نیز دچار مشکل می‌باشند و در برخی از آن‌ها مرگ ناگهانی قبل از زایمان دیده می‌شود [۲۵۶]. از آن‌جایی‌که در پستانداران عوامل محیطی طی اوایل تکوین نقش تعیین کننده‌ای را در تنظیم اپی‌ژنتیکی[2] بر عهده دارند، ایجاد این‌گونه تغییرات را می‌توان به تأثیر این روش‌ها بر روی اپی‌ژنتیک نسبت داد. اپی‌ژنتیک، فعالیت ژن را بدون تغییر در رمزهای ژنتیکی تنظیم می‌کند [۱۸۶]. زمانی که لقاح طبیعی صورت می‌گیرد، دو سلول کاملاً تخصص یافته و تمایز یافته، گامت نر و گامت ماده، در طی دو فرآیند شکل‌گیری مجدد هسته‌ای[3] و برنامه‌ریزی مجدد هسته‌ای[4] به وضعیت کاملاً تمایز نیافته[5] و همه‌توان[6] بر می‌گردند. در طی فرآیند برنامه‌ریزی مجدد هسته‌ای، تغییرات دینامیک و پیچیده اپی‌ژنتیکی در ژنوم جنین، چه در سطح DNA و چه در سطح هیستون‌ها رخ می‌دهد [۴۴].

حفاظت انجمادی رویان[7] از جمله روش‌هایی می‌باشد که از دهه‌ی ۱۹۷۰ به وفور مورد استفاده قرار می‌گیرد. حفاظت انجمادی به معنای ذخیره مواد بیولوژیک در زیر نقطه انجماد آب است، به گونه‌ای که این مواد متلاشی نشوند [۱۵۳]. این روش به‌منظور ذخیره‌ی طولانی مدت رویان‌های با ارزش آزمایشگاهی، رویان‌های چهارپایان و گونه‌های در معرض خطر و نیز رویان‌های انسانی استفاده می‌شود و امکان تبادل آنها را بین مناطق دوردست فراهم می‌کند [۱۱۷]. جهت حفاظت انجمادی رویان، بر اساس سرعت و میزان سرد کردن، دو روش اصلی وجود دارد: سرد کردن آهسته[8] و انجماد شیشه‌ای[9]. هر کدام از این روش‌ها با توجه به شرایطی که بایستی به منظور دستیابی به بهترین نتیجه برای بقاء رویان مورد توجه قرار گیرند دنبال می‌شوند [۹۴]. انجماد شیشه‌ای اشاره به تکنولوژی نوظهوری از حفاظت انجمادی در رویان‌شناسی دارد، که فرایند سرد کردن مواد بیولوژیک با بکارگیری مواد محافظ انجمادی می‌باشد که در این فرایند، سلول‌ها به جسم جامد بی‌شکل، فاقد ساختار کریستالی و شبیه شیشه منجمد می‌شوند که با ترکیبی از مواد محافظ انجمادی و سرمای بسیار زیاد امکان پذیر است [۱۴۱]. ترکیبات مواد محافظ انجمادی می‌تواند باعث تغییرات اسموتیک گردد و

1- Large Offspring Syndrome (LOS)
2- Epigenetic
3- Nuclear remodeling
4- Nuclear reprogramming
5- Undifferentiated
6- Totipotent
7- Embryo Cryopreservation
8- Conventional slow cooling
9- Vitrification

هم‌چنین سمی بودن مواد محافظ انجمادی می‌تواند باعث آسیب رسیدن به رویان شود. از طرفی سرد نمودن و یخ‌گشایی[1] رویان نیز می‌تواند یک فاکتور ایجاد کننده‌ی شوک محسوب گردد و به آن آسیب وارد نماید. بنابراین انجماد و یخ‌گشایی رویان ممکن است اثرات نامطلوبی روی تغییرات اپی‌ژنتیکی رویان در مراحل مختلف پیش از لانه‌گزینی و پس از آن داشته باشد.

در سال‌های اخیر در مطالعات گوناگونی به بررسی اثرات روش‌های کمک تولیدمثلی بر روی تغییرات اپی‌ژنتیکی در سطح DNA و در زمینه‌ی ژن‌های ایمپرینت صورت گرفته و ناهنجاری‌های ایجاد شده از این طریق مورد بررسی قرار گرفته است. از طرفی مطالعات اندکی در زمینه بررسی اثردستکاری‌های آزمایشگاهی بر روی تغییرات اپی‌ژنتیکی هیستونی در سطح تخمک و نه در سطح رویان ارائه شده است. با توجه به این‌که تغییرات اپی‌ژنتیکی در سطح هیستون بر میزان بیان ژن‌ها اثر دارد و از آن‌جایی‌که تغییرات اپی‌ژنتیکی در سطح هیستون با بیان ژن‌ها ارتباط دارند و هم‌چنین تغییر در سطح هیستون می‌تواند منجر به ایجاد تغییر در سطح DNA شود و ناهنجاری‌های متعددی در جنین حاصل نمایند، هدف از این مطالعه بررسی اثر انجماد شیشه‌ای رویان دوسلولی، تحریک تخمک‌ریزی، کشت آزمایشگاهی و انتقال رویان بر روی چند نشانگر اپی‌ژنتیکی هیستونی شامل استیله شدن H۳K۹، H۴K۱۲ و تری متیله شدن H۳K۴ در مرحله‌ی بلاستوسیست، بیان ژن آنزیم‌های *Kat2a* (آنزیم استیله کننده‌ی H۳K۹)، *Kat5* (آنزیم استیله کننده‌ی H۴K۱۲) و *Mll1* و *Ash1* (آنزیم‌های تری متیله کننده‌ی H۳K۴) و بیان ژن چندین نشانگر پرتوان هم‌چون *Pou5f1*، *Sox2*، *Nanog* در دو مرحله‌ی بلاستوسیست وجفت و جنین ۹/۵ روزه می‌باشد.

1- Thawing (warming)

فصل دوم
بررسی منابع

۲-۱- مقدمه

چهار بخش اساسی در زمینه‌ی روش‌های کمک تولید مثلی وجود دارد که عبارتند از: ۱) تلقیح مصنوعی و حفاظت انجمادی گامت و رویان، ۲) تحریک تخمک‌ریزی و انتقال رویان، ۳) روش های لقاح در شرایط برون تنی و ۴) در برگیرنده‌ی فرایندهایی است که هنوز در مراحل آزمایشی و تحقیق می‌باشند و شامل همسانه سازی[1] با انتقال هسته‌ی سلول‌های رویانی یا سوماتیک[2]، انتقال ژن[3] و بیولوژی سلول‌های بنیادی[4] می‌باشد. تمامی این روش‌ها به عنوان راهکارهای موفق تجاری بوده و افزایش دهنده‌ی تولید، کاهش فاصله‌ی نسل، کنترل کننده بیماری‌ها و کاهش دهنده‌ی هزینه‌های تولید می‌باشند [۱۸].

اولین انتقال رویان موفق در سال ۱۸۹۰ در خرگوش انجام شد [۲۰]. از آن سال تا دهه‌ی ۱۹۲۰ چندین تحقیق در زمینه‌ی انتقال رویان خرگوش انجام شد ولی تا آن زمان گزارش موفقیت آمیزی در زمینه‌ی انتقال رویان پستانداران شنیده نشد. پس از آن توجه محققین به این امر متمرکز گردید و در دهه‌ی ۱۹۳۰ و ۱۹۴۰ تحقیقاتی بر روی انتقال رویان گوسفند انجام گرفت [۲۱]. سپس در سال ۱۹۴۹ گزارشی از اولین انتقال رویان موفق در چهارپایان ارائه شد [۲۲۰].

1- Cloning
2- Embryo or somatic cells
3- Gene transfer
4- Stem cell biology

تلاش‌های اولیه برای لقاح در شرایط برون تنی در پستانداران به دهه‌ی ۱۹۳۰ بر می‌گردد که با موفقیت بر روی خرگوش انجام گرفت [۲۹]. در این سیستم فرد ماده تحریک تخمک‌ریزی می‌شود و تخمک‌های مشتق از آن درست قبل از تخمک‌گذاری از فولیکول‌های تخمدانی تحریک شده دریافت می‌شوند و پس از لقاح، تکوین رویانی اولیه در آزمایشگاه انجام می‌شود و چندین رویان برای ادامه‌ی تکوین به دهنده ی آماده شده منتقل می‌شود. سپس اولین لقاح در شرایط برون‌تنی بر روی تخمک‌های گاو در سال ۱۹۷۷ توسط ایریتانی[1] گزارش گردید [۸۶]. با پیشرفت و تکامل روش‌های مربوط به تولید رویان آزمایشگاهی، تولید این رویان‌ها از تخمک‌های نابالغ گاو برای اهداف تحقیقاتی و اقتصادی به صورت یک روش معمول درآمد [۱۰۰]. روش تزریق اسپرم به داخل سیتوپلاسم[2] نیز در جهت بهبود لقاح در حیوانات استفاده می‌شود [۲۵۰]. اولین آزمایش این روش درپستانداران درهمستر در سال ۱۹۷۶ انجام شد [۲۱۹]. پس از آن این تکنولوژی به صورت موفق در حیوانات آزمایشگاهی و هم‌چنین در زمینه اصلاح نژادی در چهارپایان مورد استفاده قرار گرفت. این روش از سال۱۹۹۲ نیز در جهت بهبود باروری در انسان به کار گرفته شد [۱۶۸].

چندی نگذشت که مشخص شد بهره‌برداری مناسب از رویان‌ها با منابع ژنتیکی با ارزش تنها در سایه‌ی پیشرفت روش‌هایی مؤثر در جهت ذخیره رویان‌ها در دمای پائین میسر می‌باشد. پیشرفت تکنولوژی‌های انجماد رویان انقلابی را در زمینه‌ی اصلاح دام حاصل نمود. این روش باعث انتقال جهانی منابع ژنتیکی، حفاظت جرم پلاسم[3] مادری، افزایش شدت انتخاب داخل گله، تولید و تزاید لاین‌های اصلاحی و نجات منابع ژنتیکی می‌شود و همان‌گونه که انجماد سیمن در جهت آسان نمودن تلقیح مصنوعی عملی موفق و اقتصادی می‌باشد، حفاظت انجمادی رویان نیز باعث استفاده‌ی وسیع از حیوانات با شایستگی ژنتیکی بالا شده است [۱۸]. برای مثال درفوریه سال ۲۰۰۱، بیماری تب برفکی[4] درمیان دام‌های انگلیس شایع شد. تنها چند هفته بعد این بیماری در سرتاسر انگلیس گسترش یافت و چندین گزارش از این بیماری در هلند، فرانسه و جمهوری ایرلند ارائه شد. تلاش‌ها درجهت کنترل و ریشه‌کن نمودن این بیماری منجربه کشتار بیش از چهار میلیون رأس دام در انگلیس شد و این عمل باعث از بین رفتن غیر عمدی منابع جرم پلاسم در سرتاسر جهان شد. با وجود اسپرم انجماد یافته و یا رویان‌هایی که به صورت تجاری از انتقال رویان حاصل می‌شدند، منابع جرم پلاسم به صورت مطمئن برای تشکیل گله از بسیاری از گونه‌های دامی وجود نداشت ولی اگر رویان‌ها به‌صورت انجماد یافته حفاظت شده بودند از دست رفتن جرم پلاسم از طریق شیوع بیماری با انتقال رویان‌های حفاظت شده جبران می‌شد [۴۶].

در راستای استفاده از این روش‌ها در انسان نیز باید ذکر نمود که بیش از سه دهه پیش روش‌های کمک تولید مثلی به عنوان ابزاری شد تا زوج‌هایی که توانایی داشتن فرزند را ندارند بتوانند با این روش‌ها صاحب فرزند شوند. تولد لوئیس بران در سال ۱۹۷۸ از طریق استفاده از روش لقاح آزمایشگاهی سرآغازی برای غلبه

1- Iritani
2- Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)
3- Germ plasm
4- Foot and Mouth Disease (FMD)

بر مشکل ناباروری بود [۴۳]. پس از آن، لقاح آزمایشگاهی با استفاده از روش تحریک تخمک‌ریزی به-وسیله‌ی گونادوتروپین‌ها در جهت به دست آمدن تعداد تخمک‌های بیشتر بهینه شد. هم‌چنین فراسنجه‌های کشت رویان بهبود یافت [۱۳۶] و تزریق اسپرم به داخل سیتوپلاسم، لقاح اسپرم در شرایط برون تنی و استفاده از رویان‌هایی که حفاظت انجمادی یافته بودند رایج شد [۲۶۰].

۲-۲- حفاظت انجمادی

حفاظت انجمادی رویان از دهه‌ی ۱۹۷۰ به‌عنوان ابزاری مفید در زمینه‌ی رویان شناسی مطرح بوده و بخشی اساسی و ضروری در تکنولوژی‌های تولید مثل می‌باشد. حفاظت انجمادی به معنای ذخیره مواد بیولوژیک در زیر نقطه انجماد آب است، به گونه‌ای که این مواد متلاشی نشوند [۱۵۴]. این روش به‌منظور ذخیره طولانی مدت رویان‌های با ارزش آزمایشگاهی، رویان های چهارپایان و گونه‌های در معرض خطر و نیز رویان‌های انسانی استفاده می‌شود. از طرفی در مواقع مرگ غیرمنتظره یک گونه یا گونه‌های در معرض انقراض و تأسیس بانک ژنتیکی جهت حفظ ژنوم ماده می‌تواند انجماد تخمک[1]مورد استفاده قرار گیرد [۳۰].

۲-۲-۱- حفاظت انجمادی تخمک

انجماد تخمک به منظور حفظ قدرت باروری خانم‌هایی که به دنبال سرطان‌های بدخیم یا خوش خیم در معرض خطر از دست دادن تخمدان می‌باشند، می‌تواند مفید باشد [۳۰]. هم‌چنین از طریق جدا کردن محل آسپیراسیون از محل لقاح آزمایشگاهی (با کاهش احتمال انتقال آلودگی و عدم نیاز به تخمدان و آسپیراسیون همزمان با لقاح آزمایشگاهی) می‌تواند منجر به تسهیل تکنولوژی‌های تولید مثل و انتقال هسته شود [۲۴۶]. مطالعات انجام شده برروی مدل‌های حیوانی علاوه بر مدل‌های انسانی نشان داده است که سرد کردن تا دماهای زیر صفر درجه و بکارگیری مواد محافظ انجمادی[2] در طی فرایند انجماد منجر به دپلیمریزه شدن میکروتوبول‌ها و نیز پراکنش کروموزوم‌ها می‌شوند. هم‌چنین عدم جدا شدن کروماتیدهای خواهری در موقع لقاح منجر به افزایش رویان‌های آنیوپلوییدی[3] ناشی از تخمک‌های انجمادی می‌شود. تأثیر حفاظت انجمادی بر روی چند مشخصه‌ی ویژهٔ تخمک مثل اگزوسیتوز گرانول‌های قشری نابالغ که بر روی میزان لقاح طبیعی و تکامل رویان مؤثر می‌باشد، منجر به افزایش فعال سازی تخمک‌ها از طریق پارتنوژنیک[4] شده است. اگزوسیتوز گرانول‌های قشری نابالغ، منجر به سختی زودرس منطقه شفاف[5] می‌شود که خود منجر به میزان پائین لقاح و افزایش پلی‌پلوییدی[6] خواهد شد. میزان پائین لقاح و افزایش پلی‌پلوییدی مرتبط با سختی زودرس منطقه شفاف توسط تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم مرتفع شده است [۲۴، ۱۶۸].

1- Oocytes cryopreservation
2- Cryoprotectants
3- Aneuploid
4- Parthenogenic
5- Premature zona hardening
6- Polyploidy

اولین حفاظت انجمادی تخمک موفقیت آمیز در سال ۱۹۵۸ توسط شرمن[1] و همکاران در موش گزارش شد [۱۹۶]. در سال ۱۹۷۷ ویتینگهام[2]، رویان‌های موش در مرحله مورولا[3] که از تخمک‌های انجمادیافته-یخ گشایی شده حاصل شده بودند را انتقال داد و از آن‌ها نوزادان زنده متولد شد [۲۳۶]. در آزمایشی که توسط سو[4] و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی تخمک‌های انجماد شیشه‌ای یافته صورت گرفت، نشان داده شد که میزان زنده‌مانی در این تخمک‌ها در مقایسه با تخمک‌های گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت. در رویان-های حاصل از این تخمک‌ها دیده شد که میزان تسهیم و میزان رسیدن به مرحله بلاستوسیست نسبت به رویان‌های حاصل از تخمک‌های گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت [۲۰۵].

۲-۲-۲- حفاظت انجمادی رویان

از دهه‌ی ۱۹۷۰ انجماد رویان، به صورت روشی موفقیت آمیز گزارش شده است [۹۷]. هدف از حفاظت انجمادی رویان ذخیره طولانی مدت و میزان بقاء بالای رویان‌ها به دنبال یخ‌گشایی، ایجادآبستنی‌های موفق و تولدهای زنده به دنبال انتقال می‌باشد. حفاظت انجمادی رویان‌ها، جزئی ضروری در روش‌های کمک تولید مثلی می‌باشد که جهت ذخیره رویان‌های آزمایشگاهی باارزش، نگهداری و حفظ رویان‌های گونه‌های در معرض خطر (بلاهای طبیعی، پیشامدهای ژنتیکی و بیماری‌های عفونی) بکار می‌رود و امکان تبادل آنها را بین مناطق دوردست فراهم می‌کند [۱۱۷].

۲-۳- روش‌های حفاظت انجمادی رویان

جهت حفاظت انجمادی رویان، بر اساس سرعت و میزان سرد کردن، دو روش اصلی وجود دارد: ۱- سرد کردن آهسته و ۲- انجماد شیشه ای. هر کدام از این روش‌ها با توجه به شرایطی که بایستی به منظور دستیابی به بهترین نتیجه برای بقاء رویان مورد توجه قرار گیرند دنبال می‌شوند [۹۴].

1- Sherman
2- Whittingham
3- Morula
4- Suo