بسم الله الرحمن الرحيم

پژوهشگاه رویان
مرکز تحقیقات علوم سلولی
مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل

دانشکده زیست‌شناسی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناس ارشد در رشته زیست‌شناسی تکوین

عنوان:

بررسی الگوی متیلاسیون DNAی ژن‌های تکوینی (*Pou5f1* (*Oct4*) و *Peg1* (*Mest*) در جنین‌های منجمد-ذوب‌شده‌ی موش

نگارش:

معصومه رجب‌پور نیکنام

استاد راهنما:

دکتر پوپک افتخاری یزدی

اساتید مشاور:

دکتر مهدی توتونچی

دکتر مریم شاه‌حسینی

تابستان ۸۹

به یاد داشته‌باشیم که اگر در آزمایشگاه‌های خود باامنیت به‌تحقیق مشغولیم، این آرامش را مدیون انسان‌های بزرگی هستیم که خالصانه از جان و مال وعمر خویش مایه‌گذاشتند تا ما به این آرامش برسیم. درود بر همه‌ی آن‌ها و بر دکتر سعید کاظمی آشتیانی.

یادشان گرامی باد.

این اثر را تقدیم می‌کنم به:

عزیز و بزرگواری که گرچه هست امّا چشمان من لیاقت دیدن وجود مقدس او را ندارند. روشنگری که با نور زیبای خود راه را روشن می‌کند و به‌زودی همه‌جا از نور او درخشان خواهدشد.

درود خداوند بر او باد.

عزیزانی که خوبی‌های وجودم را بعد از لطف پروردگار، مدیون بزرگواری و محبت آنان می‌دانم:

پدر عزیزم، معلم بزرگی که تحقیق، تدبیر در امور و درست زیستن را به‌من آموخت و

مادر عزیزم، فرشته‌ی مهربانی که محبت، ظرافت و دقت در کارها را به‌من هدیه داد.

خواهر عزیزم و همسر مهربانشان و خانواده‌ی گرم آن‌ها که در این مدت کریمانه از من حمایت کردند و با گرمی و محبت و نشاط خود، تحمل خستگی‌ها و شکست‌ها را برایم آسان ساختند.

خواهرانم وخانواده‌های آن‌ها که با محبت خود، آرامش خاطرم بودند.

و

تمامی کسانی که از کودکی تا به‌حال کمکم‌کردند تا ***خودم*** باشم.

با سپاس از

- پروردگار مهربانم، هم او که در لحظات ناتوانی، سرخوردگی، تنهایی و اضطراب، بهترین تکیه‌گاه و قوت‌قلب و درلحظات آرامش، خوشی و موفقیت، یاور و همدم خوب من بود وهست و این تحقیق نه کار من که تمامی‌اش لطفی بود از جانب او که همتایی ندارد.

- استاد راهنمای عزیزم خانم دکتر پوپک افتخاری یزدی به‌خاطر پشتیبانی بی‌نظیرشان و آرامشی که همیشه پس از صحبت با ایشان به‌من دست می‌داد وباعث می‌شد تا با نیروی بیشتری به ادامه‌ی کار بپردازم و با تشکر از این‌که به صحبت‌ها و نظراتم توجه‌کردند و مشکلات کار را از پیش پای من برداشتند.

- استاد مشاور صبورم آقای دکتر مهدی توتونچی که همیشه با صبر و حوصله پاسخگوی سؤالات من بودند و در تمام طول کار از راهنمای‌های خوب و به‌جای ایشان بهره‌مند شدم.

- استاد مشاور خوبم خانم دکتر شاه‌حسینی.

- همکاران خوبم در آزمایشگاه جنین‌شناسی به‌ویژه خانم دالمن، خانم حسنی، خانم طاهایی و ...

- آقای دکتر دانش‌زاده و کارکنان بخش حیوانخانه: آقای بهروزی، آقای توکل، آقای مصطفایی و آقای خیمه.

- همکاران عزیزم در آزمایشگاه مولکولی: خانم صمدیان، خانم شاهسونی و خانم مرادمند.

- همکاران خوبم در آزمایشگاه ژنتیک به‌ویژه خانم برجیان، خانم فاطمی، آقای امیری، خانم حبیبی و ...

- عزیزان زحمتکش بخش خدمات: آقای جهان‌بین، آقای گنجی، خانم عباسی، خانم میرزایی، آقای ستاری و...

- آقای لطفی‌پناه و آقای علیزاده در قسمت کتابخانه.

- بزرگوارانی که عنوانی در این طرح نداشتند امّا با کمک و راهنمایی مفیدشان همراهیم کردند:

  - آقای روح‌الله فتحی که برای من ارزش استاد را دارند، استاد پرنشاط و بزرگواری که افتخار می‌کنم مدتی تحت آموزش ایشان بودم.
  - آقای علی فرخی به‌خاطر تمام کمک‌های بی‌دریغشان.
  - خانم اعظم پیلتن که هرآن‌چه آموخته‌بودند خالصانه و بی‌دریغ در اختیارم گذاشتند و صبورانه به‌من آموزش دادند.

- دوستان خوبم به‌خاطر همدردی‌ها، محبت‌ها و قوت‌قلبشان.

- مسئولین محترم پژوهشگاه رویان و دانشگاه علم و فرهنگ به خاطر فراهم نمودن امکانات این مطالعه.

چکیده

مقدمه: امروزه انجمادشیشه‌ای به‌منظور حفظ جنین‌های‌اضافی درART ، در حال تبدیل‌شدن به‌یک روش رایج است، اما تأثیرات ژنتیکی این روش موردابهام است. هنوز مشخص‌نیست که جنین‌های ذوب‌شده‌ای که به‌لحاظ مورفولوژی طبیعی هستند، ازنظر ژنتیکی هم طبیعی باشند. ازآن‌جایی‌که متیلاسیونDNAی نواحی تنظیمی ژن می‌تواند بیان ژن را مهارسازد، دراین مطالعه اثر انجماد شیشه‌ای با کرایوتاپ بر متیلاسیون DNA و سطح بیان دو ژن تکوینی*Oct4* و *Mest* در بلاستوسیست‌های موش، موردبررسی‌قرارگرفته‌است.

روش‌ها: جنین‌های دوسلولی با روش فلاشینگ لوله‌ی‌رحم ازموش سوپراووله جمع‌آوری‌شده و به دو گروه کنترل و آزمون تقسیم‌شدند. جنین‌های دوسلولی گروه کنترل مستقیماً تا مرحله‌ی بلاستوسیست کشت‌داده‌شدند، درحالی‌که جنین‌های دوسلولی گروه آزمون ابتدا تا رسیدن به‌مرحله‌ی چهار تا هشت‌سلولی کشت‌شده و سپس با روش انجماد شیشه‌ای بااستفاده از کرایوتاپ، منجمد و پس از دو تا شش‌ماه ذوب‌شدند و تا رسیدن به‌مرحله‌ی بلاستوسیست کشت‌داده‌شدند. بلاستوسیست‌هایی که ازنظر مورفولوژی طبیعی بودند، انتخاب و DNA و RNAی آن‌ها استخراج‌شد. برای بررسی وضعیت متیلاسیون DNA و بیان کمّی این ژن‌ها به‌ترتیب، روش تعیین‌توالی بی‌سولفیت و Real-time RT-PCR مورداستفاده قرارگرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از آنالیز کمّی PCR نشان‌داد که سطح بیان هر دو ژن *Oct4* و *Mest* در گروه آزمون نسبت به گروه کنترل کاهش یافته‌است. همچنین بررسی متیلاسیون DNA نشان‌داد که وضعیت ایمپرینت ژن *Mest* در گروه آزمون نسبت به گروه کنترل از نظم یکسانی برخوردار نیست همچنین در این گروه یک دی‌نوکلئوتید CpG در ناحیه‌ی پروموتور *Oct4* به‌صورت هایپرمتیله دیده‌می‌شود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان‌داد که روش انجماد شیشه‌ای با کرایوتاپ اثری منفی بر سطح بیان ژن‌های *Oct4* و *Mest* در این جنین‌ها دارد و به‌نظرمی‌رسد که این روش انجمادی می‌تواند الگوی متیلاسیونDNAی ناحیه‌ی پروموتور این دو ژن را تغییردهد. احتمالاً کاهش سطح بیان ژن *Oct4* با هایپرمتیله‌شدن دی‌نوکلئوتید CpGی ذکرشده در این ژن مرتبط است.

کلید واژگان: انجماد شیشه‌ای، کرایوتاپ، بلاستوسیست، ژن *Oct4* ، ژن *Mest*.

فهرست شکل‌ها

شکل (۱-۱): کرایوتاپ ۱۱
شکل (۱-۲): واکنش متیلاسیون توسط DNA متیل‌ترانسفرازها (DNMTs) کاتالیزمی‌شود ۱٤
شکل(۱-۳): متیلاسیون *de novo* و حفاظتی DNAی ژنومی ۱۵
شکل (۱-٤): مکانیسم های پیشنهادی مهار رونویسی توسط متیلاسیون سیتوزین ۱۷
شکل(۱-۵): (A) برنامه‌ریزی مجدد متیلاسیون در لایه‌ی زاینده و جنین‌های پیش از لانه‌گزینی ۱۸
شکل (۱-٦): واکنش بی‌سولفیت ۲۵
شکل(۱-۷): تیمار سدیم بی‌سولفیت CpGها ۲٦
شکل (۱-۸): نقشه برش ناقل pTZ57R/T ۳۰
شکل(۱-۹): کلونینگ محصول PCR ۳۰
شکل(۱-۱۰): واکنش تعیین‌توالی سنگر ۳۱
شکل (۱-۱۱): یک الکتروفروگرام از یک واکنش تعیین‌توالی که خاتمه‌یافته ۳۳
شکل(۲-۱): تزریق داخل صفاقی به‌موش ۳٦
شکل(۲-۲): اجزای تشکیل‌دهنده‌ی پیپت دهانی ٤۱
شکل (۲-۳): کشتن موش به‌روش جابجایی مهره‌ی گردنی ٤۲
شکل(۲-٤): جداسازی لوله‌ی‌رحم ٤۲
شکل(۲-۵): جداسازی باتوجه به محل دقیق لوله‌ی‌رحم ٤۳
شکل(۲-٦): بلاستوسیست‌های طبیعی ٤۸
شکل (۲-۷): پلیت محیط‌کشت حاوی کلونی‌های آبی و سفید ٦۲
شکل (۲-۸): دستگاه تعیین‌توالی DNA ٦٤
شکل (۲-۹): نرم‌افزارBIQ Analyzer ٦۵
شکل (۳-۱): بررسی محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۸درصد ٦۹
شکل(۳-۲): بیان نسبی رونوشت‌های ژن‌های *Oct4* و *Mest* در جنین‌های منجمد-ذوب‌شده‌ی موش نسبت به گروه کنترل ۷۰
شکل(۳-۳): بررسی DNAی تیمارشده‌ی قطعات ژنی موردنظر برروی ژل آگارز ۱/۵درصد ۷۱
شکل (۳-٤): نتایج حاصل از Colony PCR قطعات ژنی موردنظر با استفاده از پرایمر عمومی M13 ..... ۷۲
شکل(۳-۵): وضعیت متیلاسیون ناحیه‌ی تنظیمی ژن *Mest* در بلاستوسیست‌های موش ۷٤
شکل(۳-٦): درصد متیلاسیون DNA کل دی‌نوکلئوتیدهای CpG موردبررسی در قطعه‌ی ژنی موردنظر ۷۵
شکل(۳-۷): وضعیت متیلاسیون ناحیه‌ی تنظیمی PR ژن *Oct4* در بلاستوسیست‌های موش ۷۷

شکل(۳-۸): وضعیت متیلاسیون ناحیه‌ی تنظیمی PE ژن *Oct4* در بلاستوسیست‌های موش. ۷۸
شکل(۳-۹): وضعیت متیلاسیون ناحیه‌ی تنظیمی DE ژن *Oct4* در بلاستوسیست‌های موش..... ۷۹

فصل اوّل

مقدمه ومروری برمطالعات

مقدمه:حفظ انجمادی[1] جنین‌های اضافی به‌صورت روزمره در روش‌های کمک‌باروری انسان اجرا می‌شود. این روش، منبعی از جنین‌هایی را فراهم می‌سازد که می‌توانند برای استفاده در دوره‌های بعدی درمان، ذوب‌شوند. به‌طور متداول، توانایی زنده‌ماندن جنین‌های منجمدشده بر ارزیابی مورفولوژیکی آن‌ها استواراست که این ارزیابی، پیش‌بینی درستی درمورد سلامت جنین فراهم‌نمی‌کند. انجماد جنین منجر به‌کاهش قابل‌توجهی در پتانسیل لانه‌گزینی[2]، می‌گردد و اثر طولانی‌مدت آن نیز ناشناخته است(۱).

امروزه روش انجماد شیشه‌ای[3] به‌نسبت روش سردکردن آهسته[4]، بسیار موردتوجه است، زیرا ساده‌تر، ارزان‌تر و سریع‌تر از روش سردکردن آهسته به‌حساب می‌آید و از جنین‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از سرما، محافظت‌می‌کند(۲). روش کرایوتاپ[5] به‌عنوان یکی از روش‌های انجماد شیشه‌ای، ساده، سریع و به‌سهولت قابل‌یادگیری است وجهت انجماد تخمک‌ها و جنین‌های انسانی در تمام مراحل‌رشد، قابل‌استفاده‌است. دراین روش نه‌تنها حجم ماده‌ی محافظ انجمادی[6] همراه جنین بر روی کرایوتاپ کم‌است بلکه سرعت سردکردن نیز به‌دلیل تماس جنین با نیتروژن مایع افزایش‌یافته‌است(۳).

هر چند پس از این دستکاریِ جنین‌های تولیدشده در محیط آزمایشگاهی (انجماد شیشه‌ای)، آن‌ها از نظر ظاهری و مورفولوژیک، طبیعی به‌نظرمی‌رسند ولی درباره‌ی تکوین پس از لانه‌گزینی آن‌ها به‌طورطبیعی ضمانتی وجودندارد. در سال‌های اخیر گزارش‌های بسیاری درباره‌ی تأثیرات سوء انجماد بر تکوین پس از لانه‌گزینی جنین داده‌شده‌است. به‌علاوه در بیشتر جنین‌ها این تغییرات و نقایص مورفولوژیکی به‌نحوی است که باعث عدم تکوین یا عدم لانه‌گزینی جنین می‌شود. این احتمال وجوددارد که انجماد، یک‌سری از ژن‌های دخیل در تکوین طبیعی را دستخوش تغییرسازد و باعث

---

1. Cryopreservation
2. Implantation
3. Vitrification
4. Slow cooling
5. Cryotop
6. Cryoprotectant

کاهش یا افزایش بیان آن‌ها گردد که این تغییر بیان، در مراحل بعدی تکوین، منجر به‌توقف تکوین طبیعی جنین شود.

متیلاسیون DNA ازجمله تغییرات اپی‌ژنتیکی است که نقش مهمی در تنظیم بیان ژن دارد و برای تکوین طبیعی پستانداران ضروری است(٤, ٥).

متیلاسیون DNA به‌وسیله‌ی اضافه‌شدن یک گروه متیل به‌کربن شماره‌ی ٥ حلقه‌ی سیتوزین[1] در دی‌نوکلئوتیدهای CpG[2] صورت‌می‌گیرد. آنزیم‌های DNA متیل‌ترانسفراز[3] (Dnmt) در انتقال گروه متیل به CpGها دخیلند(٦).

حضور ٥-متیل سیتوزین در پروموتور[4] و دیگر نواحی تنظیمی ژن، اتصال عوامل رونویسی[5] و دیگر پروتئین‌ها را به DNA دستخوش تغییر می‌سازد که برای این امر، پروتئین‌های متصل‌شونده به DNAی‌متیله[6] وآنزیم‌های هیستون‌داستیلاز[7] را به‌خدمت‌می‌گیرد. طی این فرایندها، کروماتین نزدیک جایگاه آغاز رونویسی ژن، فشرده می‌شود. هر دو مکانیسم مطرح‌شده، رونویسی را مسدودکرده و منجر به خاموشی ژن[8] می‌گردند(٧).

در ژنوم پستانداران نسبتی از ژن‌ها بسته به این‌که از پدر یا مادر به‌ارث می‌رسند، تنها از یکی از دو آلل بیان‌می‌شوند. ژن‌هایی که دارای چنین حالتی مختص مبداء والدی هستند، به‌عنوان ژن‌های ایمپرینت[9] شناخته‌می‌شوند که این مکانیسم اپی‌ژنتیکی، ایمپرینت ژنومی[10] نام‌دارد(٨). ژن‌های ایمپرینت در کنترل رشد جنین نقش‌هایی کلیدی بازی‌می‌کنند و ایمپرینت تغییریافته می‌تواند باعث نقایصی در رشد گردد(٩). ژن *Peg1/Mest* یک ژن ایمپرینت است که بیان پدری دارد. این ژن به‌میزان بالایی در بافت‌های جفت انسان از جمله سیتوتروفوبلاست پرزدار[11] و اندوتلیوم رگ‌دار[12] بیان‌می‌شود(٨).

عامل رونویسی Oct4 در تکوین جنین نقش مهمی دارد(١٠). این ژن به‌دلیل نفوذش روی هر دو تنظیم‌کننده‌های رونویسی و پس از رونویسی، قادر است به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم بر بسیاری

---

[1] .Cytosine
[2] .CpG dinucleotide
[3] .DNA methyltransferase
[4] .Promoter
[5] .Transcription factors
[6] .Methyl-DNA-binding proteins
[7] .Histone deacetylase
[8] .Gene silecing
[9] . Imprinted genes
[10] .Genomic imprinting
[11]. Villous cytotrophoblast
[12] .Vascular endothelium

ازفرایندهای ضروری در مدت برنامه‌ی تکوین اولیّه تأثیربگذارد، این فرایندها عبارتند از: بازآرایی[1] کروماتین، تنظیم اپی‌ژنتیکی، آپوپتوز، تنظیم چرخه‌ی سلولی و سیگنالینگ(۱۱).

با توجه به نقش متیلاسیون DNA در تنظیم بیان ژن *Oct4* (۱۲-۱٤) و ایمپرینت ژنومی(٤) و تأثیراسترس محیطی از قبیل کشت در محیط آزمایشگاهی[2] بر متیلاسیون ژن های ایمپرینت در جنین های پیش از لانه گزینی[3] (۱۵)، برآن شدیم تا اثر انجماد شیشه‌ای با کرایوتاپ را بر الگوی متیلاسیون DNA این ژن های دخیل در تکوین بررسی نماییم.

با توجه به‌توضیحات داده‌شده ، اهداف این تحقیق عبارتند از:

۱- مقایسه‌ی میزان بیان ژن‌های *Oct4* و *Mest* در سطح mRNA در جنین‌های منجمدشده به‌روش انجمادشیشه‌ای با کرایوتاپ، و جنین‌های طبیعی موش.

۲- بررسی الگوی متیلاسیون DNAی نواحی تنظیمی ژن‌های*Oct4* و *Mest* در جنین‌های منجمدشده به‌روش انجمادشیشه‌ای با کرایوتاپ وجنین‌های طبیعی موش.

۳- بررسی ارتباط بین متیلاسیون DNA ی نواحی تنظیمی ژن‌های*Oct4* و *Mest* با سطح بیان این ژن‌ها.

لازم به‌ذکر است که تاکنون مطالعه‌ای در زمینه‌ی بررسی الگوی متیلاسیون ژن‌های تکوینی در جنین‌های منجمدشده‌ی موش صورت‌نگرفته و هدف از انجام این طرح این است که نشان‌دهیم آیا انجماد، تأثیری بر الگوی متیلاسیون DNAی ژن‌های تکوینی در موش دارد؟ به‌علاوه با انجام این تحقیق، حقایقی در راستای فرایندهای ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی تکوین جنین روشن خواهدشد.

---

[1]. Remodeling
[2]. *In vitro*
[3]. Preimplantation embryos

۱-۱ حفظ انجمادی

از دهه‌ی ۱۹۷۰، حفظ انجمادی جنین‌ها، ابزارسودمندی برای جنین‌شناسی بوده‌است که بخشی اساسی و ضروری در تکنولوژی‌های تولیدمثل می‌باشد. حفظ انجمادی به‌معنای ذخیره‌ی مواد زیست‌شناختی (بیولوژیک) در زیر نقطه‌ی انجماد آب است، به‌گونه‌ای که این مواد متلاشی‌نشوند(۲). این ابزار جهت ذخیره‌ی طولانی‌مدت جنین‌های باارزش آزمایشگاهی، جنین‌های چهارپایان و گونه‌های درمعرض‌خطر و نیز جنین‌های انسانی مورداستفاده قرارمی‌گیرد(١٦).

شش مرحله برای حفظ انجمادی وجود دارد:

۱- مواجه شدن با مواد محافظ انجمادی

۲- سرد کردن تا دماهای زیر صفر درجه‌ی سانتی‌گراد

۳- ذخیره در نیتروژن مایع[1]

٤- ذوب مجدد (گرم کردن)

۵- حذف مواد انجمادی

٦- بازگشت به محیط‌کشت(۱۷) .

۱-۱-۱ روش‌های حفظ انجمادی جنین‌ها

براساس سرعت و میزان سردکردن ، این روش‌ها عبارتند از:

۱- سردکردن آهسته

۲- انجماد شیشه‌ای

۱-۱-۱-۱ سردکردن آهسته

اساس این روش بر آبگیری، استوار است. این روش اجازه‌می‌دهد که محلول‌ها بین قسمت‌های داخلی و خارجی سلول، بدون ایجاد اثرات اسموتیک جدی، مبادله‌شوند(۱۸). حساسیت نسبت به سرما در جنین، بستگی به‌مرحله‌ی رشد جنینی و شرایط کشتی دارد که جنین در آن رشدمی‌کند(۱۹). به‌علاوه موفقیت در سردکردن آهسته بستگی به‌دستیابی به بهترین تعادل، بین میزان خروج آب از سلول و تبدیل آن به یخ در خارج از سلول دارد. تعادل، توسط غلظت پایین مواد انجمادی (موادشیمیایی هستند که از تجمع مولکول‌های آب با یکدیگر برای تشکیل فرم یخ جلوگیری می‌کنند و برای آبگیری آب داخل سلولی ضروری می‌باشند(۱۷)) و میزان سرمای آهسته، قابل‌دستیابی است و

[1]. Liquid nitrogen

اجازه‌می‌دهد که آبگیری در طول سردکردن اتفاق‌افتد. در این روش، آبگیری جنین‌ها، معمولاً به‌وسیله‌ی قراردادن جنین در محلول محتوی ۱۰ تا ۱۱ درصد محافظ انجمادی نافذ، قابل‌دستیابی است. سپس دما، کاهش یافته و رشد کریستال‌های یخ به وسیله‌ی seeding آغاز می‌شود. seeding، تغییر از حالت آب به یخ را القاء می‌کند. وقتی کریستال یخ رشدمی‌کند، آب به فرم جامد تبدیل‌می‌شود و همچنین افزایش غلظت محلول خارج سلولی، منجر به خروج آب از سلول می‌شود(۲۰).

برای اولین‌مرتبه، جنین‌های موش بااستفاده از روش سردکردن آهسته در سال ۱۹۷۲ منجمدشدند(۲۱). ویلموت[1] و روسون[2] در سال ۱۹۷۳ برای اولین‌بار با استفاده از این تکنولوژی به‌طور موفقیت‌آمیزی جنین‌های گاوی را منجمد کردند که به دنبال گرم‌کردن و انتقال جنین، به تولد زنده منجرگردید. در حوزه‌ی انجماد جنین‌های انسانی، اولین تولد زنده از جنین‌های منجمدشده تا سال ۱۹۸۳ گزارش نشده‌بود(۲۲). چراکه جنین‌های تولیدشده در آزمایشگاه، نسبت به آسیب‌های ناشی از سرما بسیار حساس‌تر از جنین‌های تولیدشده در بدن می‌باشند(۲۳).

۲-۱-۱-۱ انجماد شیشه‌ای

انجماد شیشه‌ای که اولین‌بار توسط رال [3] و فاهی[4]، در سال ۱۹۸۵ مطرح شد، روشی است ارزان‌قیمت که به‌طوروسیع برای حفظ انجمادی جنین‌های پستانداران، مورد استفاده قرارمی‌گیرد(۲٤). در این فرایند، سلول‌ها به جسم جامد بی‌شکل فاقد ساختار کریستالی، شبیه شیشه منجمدمی‌شوند که با ترکیبی از مواد محافظ انجمادی و سرمای بسیار زیاد امکان‌پذیر است (۳)، در این فرایند، تشکیل یخ داخل و خارج سلول با شکلی شبیه شیشه جایگزین‌می‌شود. در دماهایی که به اندازه‌ی کافی پایین هستند (۱۳۰- درجه‌ی سانتی‌گراد) محلول‌ها بسیار چسبنده[5]شده و بدون تشکیل شکل یخ، جامد می‌شوند. بنابراین آبگیری و افزایش چسبندگی[6]، به‌وسیله‌ی سردکردن سریع رخ می‌دهد(۱۷). چون در این روش از کریستالیزه‌شدن یخ جلوگیری‌می‌شود، خطر صدمه به جنین‌های پستانداران طی حفظ‌انجمادی را به‌حداقل می‌رساند(۲٤). انجماد شیشه‌ای می‌تواند برای جنین‌ها در تمام مراحل پیش از لانه‌گزینی، کاربرد داشته‌باشد. هر چند هنوز نامشخص است که کدام مرحله‌ی تکوین جنین، قادر

[1].Wilmut
[2]. Rowson
[3]. Rall
[4]. Fahy
[5]. Viscose
[6]. Viscosity

به‌تحمل فرایند انجمادشیشه‌ای خواهدبود و بعد از ذوب، بالاترین درجه‌ی حیات را نشان‌خواهدداد(۲٤).

۲-۱-۱ مواد محافظ انجمادی

مواد محافظ انجمادی، مواد شیمیایی هستند که از تجمع مولکول‌های آب با یکدیگر برای تشکیل شکل یخ، جلوگیری می‌کنند و می‌توانند آب را بدون تشکیل کریستال، شبیه شیشه سازند(۱۷). این مواد برای آبگیری آب داخل‌سلولی ضروری هستند به‌علاوه، نقطه‌ی انجماد پایین آن‌ها، زمان بیشتری برای آبگیری ایجاد می‌کند (۲۵)، زیرا ارگان‌ها حتی در صورت وجود مقدار بسیار کم شکل یخ نیز آسیب می‌بینند. این مسأله به‌خاطر اهمیت ارتباطات سلولی می‌باشد که می‌بایستی به‌منظور عملکرد مناسب حفظ‌شوند (۱٦). لازمه‌ی یک محافظ انجمادی، بالابودن قدرت نفوذ و سمیّت پایین آن است(۲٦). تلاش دانشمندان بر روی کاهش سمیّت مواد محافظ انجمادی متمرکزشده‌است زیرا در انجمادشیشه‌ای، اثرات شیمیایی و سمیّت مواد محافظ انجمادی عامل منفی اصلی است(۲۷). انتخاب مواد محافظ انجمادی بایستی با دقت صورت گیرد، ابتدا ازنظر سمیّت و سپس ازنظر قدرت نفوذ. این مواد در غلظت بالا سمّی هستند، ولی سمیّت آن‌ها در دماهای پایین و با کاهش زمان تماس جنین با آن کاهش می‌یابد(۲۵).

انواع مواد محافظ انجمادی که امروزه به‌کار می‌روند، عبارتند از:

اتیلن‌گلیکول، پروپیلن‌گلیکول، پلی‌وینیل‌الکل، پلی‌وینیل‌پیرولیدون، ترهالوز، پروپاندیول، دی‌متیل‌سولفوکساید، فیکول، گلیسرول، گلوکز.

۳-۱-۱ عوامل مؤثر در میزان موفقیت انجماد

مهم‌ترین عوامل دخیل در موفقیت انجماد جنین عبارتند از:

- مرحله‌ی تکامل جنینی: به‌عنوان یک عامل مهم در میزان حیات پس از انجماد اهمیت دارد. مایاک[1] و همکارانش (۲۸) در سال ۱۹۹۳ نشان دادند که استفاده از مراحل پیشرفته‌ی تکامل باعث‌می‌شود که نسبت بالایی از جنین‌های منجمدشده، به بلاستوسیست‌های ثانویه تکوین‌یابند.
- زمان تعادل و آبگیری: این عامل با توجه به‌نوع ضدیخ مورداستفاده و میزان نفوذپذیری آن، متغیر است.

[1]. Miyake

- سرعت انجماد: عاملی بسیار حائز اهمیت است. مطالعه‌ای در این زمینه نشان‌داد که با سرعت انجماد آهسته، درصد پیشرفت جنین‌ها برای تسهیم، بالاتر بوده‌است(۲۹). به‌طورکلی در سرعت‌های پایین، آب داخل‌سلولی فرصت کافی برای خروج از سلول را دارد و محیط اطراف، یخ نمی‌زند و سلول به‌تدریج دهیدراته می‌شود اما اگر محیط به‌سرعت سرد شود آب داخل‌سلولی فرصت خروج از سلول را پیدا نمی‌کند و یخ می‌زند. البته چون سرعت انجماد سریع است، بلورهای یخ تشکیل‌شده، کوچک خواهندبود. داده‌های اخیر نشان‌می‌دهند که سرعت انجمادی سریع نسبت به‌سرعت انجمادی آهسته، ارجحیت دارد(۳۰).

٤-۱-۱ انجماد شیشه‌ای و روش‌های آن

هدف از انجماد شیشه‌ای، حفظ حیوانات درمعرض انقراض و کلون‌کردن حیواناتی با صرفه‌ی اقتصادی بالا همچنین روشی برای فائق‌آمدن به‌مشکلات نازایی و ناباروری است(۳۱). روش‌های مختلف انجماد شیشه‌ای عبارتند از:

۱- روش OPS
۲- روش EMG
۳- روش GMP
٤- روش SSV
٥- روش Cryoloop
٦- روش Cryotop .

۱-٤-۱-۱ روش OPS [1]

در سال ۱۹۸۰ نی‌های پلاستیکی جهت انجماد شیشه‌ای و ذخیره‌ی جنین‌ها به‌کاربرده‌شد(۲٦). دراین‌روش، جنین‌ها در اثر خاصیت موئی انتهایی یک نی که قبلاً تا نصف قطر و ضخامت دیواره توسط گرما باریک شده‌است، در نی پرمی‌شوند(۳۲). کاهش قطر داخلی، از حجم ستون مایع کاسته(۳۳) و منجرمی‌شود که میزان محلول انجمادی که همراه جنین وارد نی می‌شود بسیار کم (۲-۱ میکرولیتر) باشد(۳۲). از طرفی تماس نزدیک بین جنین و نیتروژن مایع، سرعت انجماد را افزایش‌می‌دهد(۲٦). ولی مشکل این‌روش این است که شناورکردن نی در نیتروژن مایع، نیاز به

[1] .Open Pulled Straw

درپوش دارد و از طرفی امکان شکست زوناپلوسیدا وجوددارد که در جنین‌های منجمد-ذوب‌شده یک پدیده‌ی شایع است(۳٤).

۲-٤-۱-۱ روش EMG [1]

در روش EMG، انجماد شیشه‌ای با استفاده از گرید میکروسکوپ الکترونی انجام‌می‌شود(۳۵). این روش، انتقال دما را به‌جنین تسریع‌کرده و تعادل کوتاه‌مدت در این روش، به جلوگیری از آسیب اسموتیک ناشی از غلظت بالای مواد محافظ انجمادی کمک می‌کند، در نتیجه میزان بقاء بعد از ذوب را افزایش می‌دهد. مزیت دیگر این روش این است که سریع بوده و در مقایسه با انجماد آهسته، احتیاج کمتری به وسایل دارد(۳٦). از طرفی میزان بقاء، اتساع مجدد و شکوفایی بیشتری نسبت به انجماد شیشه‌ای با نی گزارش‌شده‌است(۳۵). عیب این روش، آسیب مکانیکی‌ای است که ممکن است به جنین‌ها در اثر چسبیدن به گرید وارد شود. که به‌علت نیاز به سلامت مورفولوژیک جنین‌ها پس از انجماد، قابل چشم‌پوشی نیست(۳٦).

۳-٤-۱-۱ روش GMP [2]

از دیگر روش‌های انجماد شیشه‌ای، GMP است که در این روش، از یک میکروپیپت شیشه‌ای به جای نی استفاده‌می‌شود(۳۷) که میزان انتقال سرما و گرما را افزایش‌داده و نهایتاً منجر به کاهش آسیب به جنین می‌شود. در این روش نیاز به درپوش نیست. همچنین قطر داخلی کم آن منجرمی‌شود که هنگام پرکردن میکروپیپت شیشه‌ای، ماده محافظ انجمادی همراه جنین کاهش‌یابد(۳۸). عیب این روش این‌است که ساخت این وسیله و پرکردن آن با جنین دشوار است(۳۷, ۳۸).

٤-٤-۱-۱ روش SSV [3]

در این روش، از یک مکعب فولادی پوشیده‌شده توسط فویل آلومینیومی استفاده‌می‌شود. در این روش نیز میزان سرما افزایش‌می‌یابد. از طرفی، در این روش قراردادن جنین‌ها بر روی مکعب‌فولادی، دشوار بوده و امکان از دست‌دادن جنین‌ها وجوددارد(۳۹).

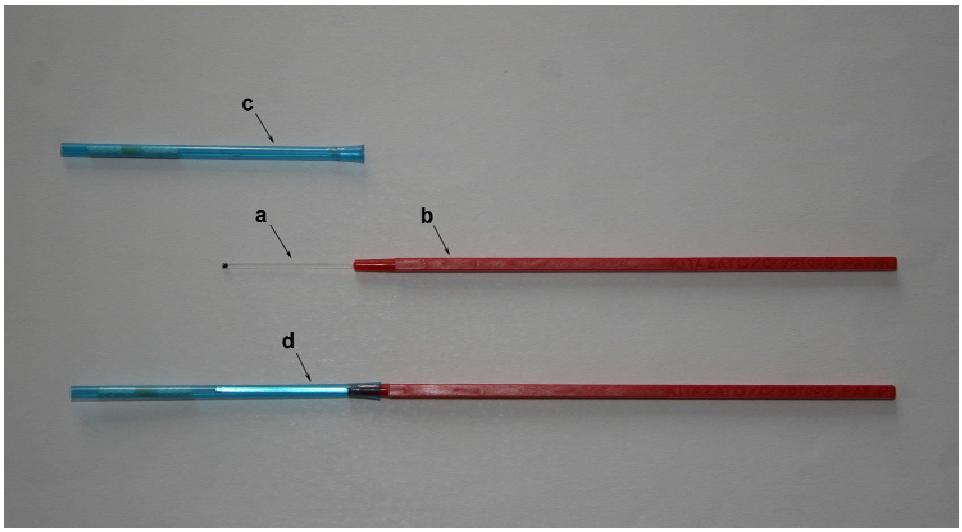
[1] .Electron microscope grids
[2] .Glass micro pipette
[3] .Solid surface vitrification

۵-٤-۱-۱ روش Cryoloop

روش کرایولوپ، عبارتست از حفظ انجمادی با استفاده از یک حلقه‌ی نایلونی باریک جهت ذخیره‌ی یک لایه ماده‌ی محافظ انجمادی حاوی جنین که مستقیماً وارد نیتروژن مایع می‌شود(٤٠) . این روش برای اولین‌بار برای انجماد محلول‌های پروتئینی و سپس برای حفظ انجمادی بلاستوسیست‌های انسانی و میمون به‌کاربرده‌شد. حجم کم مواد محافظ انجمادی همراه جنین بر روی کرایولوپ و نیز تماس نیتروژن مایع، منجر به افزایش بسیار زیاد میزان سرما می‌شود. از مزیت‌های دیگر این روش این است که به‌لحاظ داشتن درپوش، امکان آلودگی جنین‌ها کاهش می‌یابد(٤١). نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که روش انجماد شیشه‌ای با کرایولوپ، نتایج خوبی برای تولید جنین خواهدداشت.

٦-٤-۱-۱ روش Cryotop

این روش یکی از روش‌های انجماد شیشه‌ای است که با کمترین حجم ماده‌ی محافظ انجمادی انجام‌می‌شود(٤٢, ٤٣). در این روش از یک کرایوتاپ تجاری استفاده‌می‌شود. کرایوتاپ، یک نوار باریک با عرض ۰/٤ میلی‌متر، طول ۲۰ میلی‌متر و ضخامت ۰/۱ میلی‌متر است که به یک دسته‌ی پلاستیکی محکم متصل‌شده‌است. به‌لحاظ محافظت از این نوار باریک در نیتروژن مایع، از یک درپوش برای پوشاندن آن استفاده‌می‌شود. در این روش علاوه بر حجم کم ماده‌ی محافظ انجمادی که به‌همراه جنین برروی کرایوتاپ قرارمی‌گیرد، سرعت سرما نیز در اثر تماس جنین با ازت ($-۱۹٦\ ^{\circ}C$) افزایش‌می‌یابد. این روش ساده، سریع، قابل‌اعتماد و به‌سهولت قابل‌یادگیری است و جهت انجماد اووسیت‌ها و جنین‌های انسانی در تمام فازهای رشد قابل‌استفاده است(۳). این روش انجمادشیشه‌ای بلاستوسیست‌های انسانی به ۵۳ درصد حاملگی و ٤۵ درصد تولد زنده منجرشده‌است(٤٢). میزان بقاء به‌لحاظ مورفولوژی بعد از انجماد شیشه‌ای اووسیت‌های انسانی MII، میزان ایجاد بلاستوسیست و حاملگی ایجادشده پس از انتقال آن‌ها به‌ترتیب ۹۵، ۵۰ و ٤۱ درصد گزارش شده‌است(٤٤). همچنین اولین تولد زنده حاصل از اووسیت‌های منجمد-ذوب‌شده به‌روش کرایوتاپ در آمریکا گزارش شده‌است(٤۵) (شکل(۱-۱)).



شکل (۱-۱): کرایوتاپ. a) نوار باریک که نمونه‌ها در پشت مربع سیاه رنگ آن قرارمی‌گیرند. b) دسته‌ی پلاستیکی c) درپوش d) کرایوتاپ با درپوش محافظ بر روی آن.

۱-۱-۵ اثرات سوء انجماد بر تکوین پس از لانه‌گزینی

ساتکلیف[1] و همکارانش در سال ۱۹۹۵ نشان‌دادند که انتقال جنین‌های انسانی منجمد-ذوب‌شده به‌رحم مادران باعث ایجاد زایمان زودرس و تولد نوزادانی باوزن کم‌تر از حاملگی‌های طبیعی می‌شود(٤٦). همچنین دولیوست[2] و همکارانش در سال ۱۹۹۵ نشان دادند، انتقال جنین‌های منجمد-ذوب‌شده به‌موش باعث تولد نوزادانی می‌شود که در دوران بلوغ وزن بیشتری دارند و یا در ناحیه‌ی استخوان ماندیبل آن‌ها تغییرات اندکی نسبت به‌گروه کنترل مشاهده‌می‌شود(٤٧).

۱-۲ اپی‌ژنتیک[3]

اپی[4] از ریشه‌ی یونانی و به معنای "فرا" است و علم اپی‌ژنتیک به مطالعه‌ی تغییرات ارثی قابل‌برگشت در عملکرد و بیان ژن‌ها، بدون تغییر در توالی نوکلئوتیدی آن‌ها می‌پردازد(٤٨, ٤٩). مکانیسم‌های

[1]. Sutcliffe
[2]. Dulioust
[3]. Epigenetic
[4]. Epi

اپی‌ژنتیکی شامل متیلاسیون DNA، تغییرات در سطح هیستون‌ها و تنظیمات وابسته به RNAهای غیررمزگذار[1] می‌شود که به‌عنوان عوامل اصلی کنترل بیان ژن در طی رشد ونمو سلول مطرح هستند(۵۰). پدیده‌هایی مانند ایمپرینت ژنومی، غیرفعال‌شدن کروموزوم X [2]و نیز الگوی بیان دسته‌های ژنی که در فرایند تکوین مراحل اولیه‌ی جنینی بسیار حائزاهمیت هستند، به‌طور قابل‌توجهی با مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی مرتبط است(۵۰).

۱-۲-۱ تغییرات هیستونی[3]

هیستون‌ها به‌عنوان واحدهای تشکیل‌دهنده‌ی ساختار نوکلئوزوم[4]، نقش بسیار مهمی در شکل‌گیری ساختار کروماتین دارند و تغییرات اعمال‌شده روی آن‌ها می‌تواند باعث برهم‌خوردن آرایش کروماتین شود(۵۰). پروتئین‌های هیستونی به‌ویژه در ناحیه‌ی دم خود، در معرض تغییرات پس از ترجمه[5] قرارمی‌گیرند که در مجموع «تغییرات هیستونی» نامیده‌می‌شوند. این تغییرات شامل استیله[6] و متیله‌شدن[7] اسیدآمینه‌های لیزین (K) و آرژینین(R)، فسفریله‌شدن[8]سرین(S) و ترئونین(T) و نهایتاً یوبی‌کوییتینه [9]و ساموییله‌شدن[10] لیزین است(۵۰).

آنچه امروز به‌عنوان مکانیسم اصلی تأثیر انواع تغییرات ساختار کروماتین مطرح می‌شود عبارت از شناسایی این تغییرات توسط پروتئین‌های خاص، برقراری میان‌کنش‌های پروتئین-پروتئین[11] و فراخوان آنزیم‌ها و پروتئین‌های عملکردی به‌نواحی تغییریافته‌ی کروماتین است.

در مبحث تأثیر تغییرات هیستونی بر ساختار و عملکرد کروماتین، اصطلاحی به نام «کدهیستونی[12]» مطرح‌می‌شود(۵۱) که به‌معنی تلفیق چندین تغییر مختلف و وجود ارتباط متقابل بین آن‌ها در بروز یک عملکرد بیولوژیکی خاص است. به‌عنوان مثال فسفریله‌شدن سرین شماره‌ی ۱۰ در هیستون H3 (H3-S10ph) به‌همراه استیله‌شدن همین هیستون در لیزین شماره‌ی ۱۲ (H3-K12ac) و نیز

---

1. Noncoding RNAs
2. X inactivation
3. Histone modification
4. Nucleosome
5. Post translated modification
6. Acethylation
7. Methylation
8. Phosphorylation
9. Ubiquitination
10. Sumoylation
11. Protein-protein interaction
12. Histon code