



تأثیر Dnmt1 بر اصلاح متیلاسیون و تغییرات بیان ژنی در طول انجماد شیشه‌ای تخمک موش با استفاده از تجزیه و تحلیل WGBS و RNA-seq

سمیرا جلالی پور^{۱*}

۱- کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم پزشکی آبادان، ایران. dr.samira.jalalipour761@gmail.com

خلاصه

درک تأثیرات مولکولی انجماد شیشه‌ای تخمک و فرآیند گرم کردن آن برای توسعه و بهینه‌سازی فناوری‌های حفظ باروری، به‌ویژه در زمینه پزشکی تولیدمثل، ضروری است. در این پژوهش، تخمک‌های بالغ در مرحله متافاز II (MII) از موش‌ها جمع‌آوری شده و پس از انجماد شیشه‌ای، با استفاده از توالی‌یابی بی‌سولفیت کل ژنوم تک‌سلولی (scWGBS) و توالی‌یابی RNA تک‌سلولی (scRNA-seq)، بررسی‌های عمیق مولکولی بر روی آن‌ها انجام شد. نتایج نشان داد که تخمک‌های منجمد شده در مقایسه با تخمک‌های تازه، کاهش معناداری در سطح متیلاسیون جهانی DNA و بیان ژن داشتند. از میان ژن‌های شناسایی‌شده، ۱۴۲۶ ژن با افزایش بیان و ۳۳۲۱ ژن با کاهش بیان مواجه بودند. ژن‌های با بیان افزایش‌یافته عمدتاً در مسیرهای یوبیکوئیتیناسیون هیستون غنی‌سازی شدند، در حالی که ژن‌های با بیان کاهش‌یافته به فرآیندهایی نظیر سازمان‌دهی میتوکندری و متابولیسم ATP مرتبط بودند. مناطق متیله‌شده متمایز (DMRs) عمدتاً در نواحی پروموتور، اینترون و اگزون ژن‌ها شناسایی شدند و طول این مناطق در تخمک‌های منجمد شده به‌طور معناداری کوتاه‌تر از تخمک‌های تازه بود. بررسی آنزیم‌های دخیل در متیلاسیون نشان داد که سطح بیان دمیلازهای DNA Tet1، Tet2 و Tet3 و متیل ترانسفرازها Dnmt3a و Dnmt3b تغییر معناداری نداشت، اما Dnmt1 و Kcnq1ot1، که نقش حیاتی در حفظ متیلاسیون DNA ایفا می‌کنند، به‌طور چشمگیری کاهش یافتند. تحلیل شبکه‌های تنظیم‌کننده ژنی (GRN) آشکار ساخت که این دو ژن نقش کلیدی در تنظیم متیلاسیون و بیان ژن‌های پایین‌دستی دارند. علاوه بر این، کاهش بیان ژن‌های مرتبط با کیفیت تخمک در تخمک‌های منجمد شیشه‌ای، نگرانی‌هایی را در زمینه کاهش توانایی رشد و باروری این تخمک‌ها مطرح می‌کند. این مطالعه برای اولین بار تأثیرات گسترده انجماد شیشه‌ای بر بیان ژن و الگوهای اپی‌ژنتیکی را در تخمک‌های موش آشکار می‌سازد و دیدگاه‌های ارزشمندی برای بهبود روش‌های انجماد و حفظ کیفیت تخمک ارائه می‌دهد. این نتایج می‌توانند به توسعه روش‌های جدید برای افزایش کارایی حفظ باروری و کاهش اثرات منفی انجماد کمک کنند.

کلمات کلیدی: انجماد تخمک، متیلاسیون DNA، بیان ژن، شبکه تنظیم ژن، توانایی رشد، پتانسیل لقاح



۱. مقدمه

انجماد تخمک (Oocyte Cryopreservation; OC) به‌عنوان یکی از دستاوردهای مهم فناوری کمک‌باروری (ART)، امکان حفظ باروری زنان را در شرایط مختلف فراهم کرده است. این روش برای زنانی که به دلیل عواملی همچون نارسایی زودرس تخمدان، بیماری‌های لگنی، جراحی، پرتودرمانی یا شیمی‌درمانی با کاهش باروری مواجه می‌شوند، روشی اثربخش محسوب می‌شود. علاوه بر این، تغییر در سبک زندگی و گرایش روزافزون زنان به تأخیر در فرزندآوری، تقاضا برای OC را به‌طور قابل‌توجهی افزایش داده است. با افزایش سن، کاهش طبیعی در تعداد فولیکول‌های تخمدانی و کیفیت تخمک‌ها رخ می‌دهد، که این امر اثر مستقیم بر کاهش باروری و افزایش نیاز به روش‌های حفظ باروری دارد (۱).

با پیشرفت فناوری‌های زیستی نظیر توالی‌یابی با توان عملیاتی بالا، پژوهش‌ها نشان داده‌اند که فرآیند انجماد شیشه‌ای (vitrification) علاوه بر حفظ ساختار سلولی تخمک، ممکن است منجر به تغییرات معناداری در بیان ژن و الگوهای اپی‌ژنتیکی شود. برای مثال، مطالعات نشان داده‌اند که سطح متیلاسیون DNA در نواحی پرموتر ژن‌های کلیدی مانند Sox2 و Oct4 در تخمک‌های منجمد شده، نسبت به تخمک‌های بالغ در شرایط *in vivo*، به‌طور معناداری کاهش یافته است. همچنین، کاهش متیلاسیون در ژن‌های چاپ‌شده‌ای مانند H19، Peg3 و Snrpn در بلاستوسیست‌های حاصل از تخمک‌های منجمد گزارش شده است. این تغییرات ممکن است بر کیفیت و توانایی رشد جنین تأثیر منفی بگذارند (۲).

متیلاسیون DNA به‌عنوان یکی از فرآیندهای کلیدی اپی‌ژنتیکی، نقش مهمی در تنظیم بیان ژن و حفظ الگوهای چاپ والدینی ایفا می‌کند. این الگوهای متیلاسیون که در طی رشد تخمک ایجاد می‌شوند، مشخصات ژنومی جنین‌های پیش از لانه‌گزینی را تعیین کرده و بر رشد زیگوت، جنین و حتی زندگی پس از تولد تأثیرگذارند. آنزیم‌های متیلاسیون، شامل DNMT3A و DNMT3B، مسئول ایجاد الگوهای متیلاسیون جدید (*de novo*) هستند، درحالی‌که DNMT1 وظیفه حفظ این الگوها در طی فرآیند تکثیر DNA را بر عهده دارد. این آنزیم‌ها از اهمیت زیادی در حفظ کیفیت و توان باروری تخمک‌ها برخوردارند (۳).

با این حال، شواهد محدودی درباره تأثیر انجماد شیشه‌ای بر بیان آنزیم‌های مرتبط با متیلاسیون DNA وجود دارد. برخی مطالعات نشان داده‌اند که فرآیند انجماد ممکن است باعث کاهش بیان این آنزیم‌ها شده و در نتیجه، به تغییر در سطح متیلاسیون و بیان ژن‌های حیاتی منجر شود. از سوی دیگر، مطالعات اندکی توانسته‌اند رابطه دقیق بین این تغییرات و کیفیت جنین‌های حاصل از تخمک‌های منجمد را تبیین کنند (۵).

در این مطالعه، با استفاده از توالی‌یابی بی‌سولفیت کل ژنوم تک‌سلولی (scWGBS) و توالی‌یابی RNA تک‌سلولی (scRNA-seq)، تأثیر انجماد شیشه‌ای بر متیلاسیون DNA و تغییرات بیان ژن در تخمک‌های موش بررسی شد. نتایج نشان داد که سطح متیلاسیون DNA و بیان ژن در تخمک‌های منجمد به‌طور معناداری کاهش یافته است. این کاهش با کاهش بیان ژن‌های کلیدی نظیر Dnmt1 و *kenq1ot1* مرتبط بود. همچنین، بیشتر ژن‌های مرتبط با توانایی رشد و لقاح تخمک‌ها در تخمک‌های منجمد کاهش معناداری را نشان دادند. این مطالعه با ارائه یک دیدگاه جامع از اثرات مولکولی انجماد شیشه‌ای، به شناخت بهتر تأثیرات این فناوری کمک کرده و زمینه‌ساز توسعه روش‌های بهینه‌تر برای حفظ کیفیت تخمک و بهبود کارایی ART خواهد بود (۴).



۲. مواد و روش‌ها

۱-۲. حیوانات

در این مطالعه، از موش‌های ماده از نژاد Institute of Cancer Research (ICR) در سنین ۶ تا ۸ هفته استفاده شد. این موش‌ها از SPF (Specific Pathogen Free) Beijing Biotechnology Co., Ltd. تهیه شده و در محیطی کنترل شده و عاری از پاتوژن‌های خاص نگهداری شدند. شرایط محیطی شامل چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته، دمای پایدار 23 ± 1 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 60 ± 5 درصد بود. موش‌ها به غذای استاندارد و آب آشامیدنی دسترسی نامحدود داشتند و در قفس‌های مناسب برای حفظ استانداردهای رفاه حیوانی جایگذاری شدند.

تمام آزمایش‌های مرتبط با حیوانات بر اساس دستورالعمل‌های اخلاقی و مقررات مؤسسه جانورشناسی آکادمی علوم چین طراحی و اجرا شد. پروتکل‌های پژوهش پیش از شروع، توسط کمیته اخلاق آزمایشگاهی حیوانات مورد بررسی و تأیید قرار گرفتند. در طول پژوهش، تمامی تلاش‌ها برای کاهش هرگونه ناراحتی یا استرس برای حیوانات به کار گرفته شد و اقدامات لازم برای رعایت استانداردهای رفاهی و اخلاقی حیوانات مطابق با اصول "R" ۳ (کاهش تعداد حیوانات، جایگزینی روش‌های غیر حیوانی و اصلاح روش‌ها برای کاهش آسیب به حیوانات) اجرا گردید.

این شرایط استاندارد و کنترل شده تضمین کرد که تمامی داده‌های جمع‌آوری شده از حیوانات، معتبر و بدون تأثیر عوامل محیطی یا پاتوژنی باشد و امکان بررسی دقیق اثرات موردنظر در این مطالعه فراهم گردد. (۶).

۲-۲. مجموعه تخمک

برای جمع‌آوری تخمک‌های بالغ در مرحله متافاز II (MII)، از موش‌های ماده نژاد Institute of Cancer Research (ICR) در سن ۶ تا ۸ هفته استفاده شد. این موش‌ها با تزریق داخل صفاقی ۱۰ واحد بین‌المللی گنادوتروپین سرم مادیان باردار (PMSG) تحریک تخمک‌گذاری شدند. پس از ۴۸ ساعت، تزریق داخل صفاقی ۱۰ واحد بین‌المللی گنادوتروپین جفتی انسانی (hCG) برای تحریک نهایی تخمک‌گذاری انجام شد. مجتمع تخمک-کومولوس (COC)، ۱۲ ساعت پس از تزریق hCG از لوله‌های تخمدانی جمع‌آوری شد.

برای جدا کردن تخمک‌ها از سلول‌های کومولوس، COC‌ها در محلول ۰.۲ درصد هیالورونیداز قرار داده شدند و به آرامی هضم شدند. تخمک‌های برهنه (denuded oocytes) با دقت به محیط کشت تجاری M2 (Sigma, M7167, Shanghai, China) منتقل شدند. برای تأیید بلوغ تخمک‌ها، آن‌ها تحت مشاهده میکروسکوپی قرار گرفتند. تخمک‌هایی که دارای جسم قطبی بودند، به‌عنوان تخمک‌های بالغ در مرحله MII شناسایی و تأیید شدند.

پس از جمع‌آوری، تخمک‌های MII به‌صورت تصادفی به دو گروه تقسیم شدند:

▪ گروه تازه: این تخمک‌ها بلافاصله برای انجام آزمایش‌های توالی‌یابی (RNA-seq) و متیلاسیون DNA مورد استفاده قرار گرفتند.

▪ گروه انجماد: (n=117) این تخمک‌ها برای انجام فرآیندهای انجماد شیشه‌ای (vitrification) در آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

این روش جمع‌آوری دقیق، با استفاده از محرک‌های هورمونی استاندارد و محیط‌های کشت مناسب، تضمین کرد که تخمک‌ها با کیفیت مطلوب و بدون آسیب برای انجام آزمایش‌های دقیق مولکولی آماده شوند. توزیع تصادفی تخمک‌ها به گروه‌ها نیز به کاهش احتمال سوگیری در نتایج کمک کرد و امکان مقایسه دقیق بین تخمک‌های تازه و منجمد را فراهم ساخت. (۷).



۳-۲. انجماد و ذوب تخمک

برای فرآیند انجماد شیشه‌ای تخمک‌ها، از یک سیستم خنک‌کننده تجاری حاوی دو نوع محیط انجماد، شامل ES (Equilibration Solution) و VS (Vitrification Solution) استفاده شد. این محلول‌ها از محصول Vitrolife RapidVit™ Oocyte (Vitrolife, 10121, Guangzhou, China) تهیه گردیدند. پیش از شروع فرآیند انجماد، مقدار ۱ میلی‌لیتر از هر محلول به چاهک‌های جداگانه یک ظرف کشت چهارچاهی Vitrolife منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم شد. تخمک‌های برهنه (Denuded Oocytes) ابتدا به محیط ES منتقل شده و به مدت ۱۰ دقیقه در این محیط انکوبه شدند. سپس، این تخمک‌ها با حداقل حجم ممکن، به محیط VS منتقل شدند تا از رقیق شدن آن‌ها جلوگیری شود. انتقال به VS با استفاده از یک میکروپیپت از پیش آماده‌شده با این محیط انجام گرفت. پس از انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در VS، تخمک‌ها به سرعت به یک میله انجماد انتقال داده شده و بلافاصله در نیتروژن مایع فرو برده شدند. تخمک‌ها به مدت ۳۰ روز در نیتروژن مایع نگهداری شدند (۸).

برای فرآیند ذوب تخمک‌ها، از یک سیستم مایع ذوب تجاری شامل چهار نوع محلول ذوب (WS2, WS1, DS, TE) استفاده شد که این محلول‌ها از محصول Vitrolife RapidWarm™ Oocyte (Vitrolife, 10122, Guangzhou, China) تهیه گردیدند. پیش از شروع ذوب، مقدار ۱ میلی‌لیتر از هر محلول در چاهک‌های جداگانه یک صفحه چندچاهی توزیع و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم شدند. تمامی مراحل کار با تخمک‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و روی سطح گرم انجام شد.

سیستم انجماد Vitrolife Rapid-i حاوی تخمک‌های منجمد، از نیتروژن مایع خارج و تخمک‌ها جمع‌آوری شدند. تخمک‌های منجمد به ترتیب به محلول‌های زیر منتقل شدند:

TE به مدت ۱ دقیقه

DS به مدت ۳ دقیقه

WS1 به مدت ۵ دقیقه

در نهایت، تخمک‌ها به محیط WS2 منتقل شده و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس، این تخمک‌ها به محلول تعادل منتقل شده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 در انکوباتور قرار گرفتند. محلول تعادل شامل محیط TCM-199 (Thermo Fisher, 12350039, Shanghai, China) به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS; Thermo Fisher, 30044333, Shanghai, China) بود.

در پایان، تخمک‌های زنده پس از انجماد و ذوب برای تحلیل‌های توالی‌یابی (RNA-seq) و متیلاسیون DNA جمع‌آوری شدند. هر دو گروه تازه و منجمد شامل سه تکرار بیولوژیکی بودند که هر تکرار حاوی ده تخمک بود. این طراحی آزمایشی امکان مقایسه دقیق بین گروه‌ها را فراهم کرد و از صحت و تکرارپذیری نتایج اطمینان حاصل نمود (۹).

۴-۲. ساخت کتابخانه تک‌سلولی RNA-seq، توالی‌یابی و پردازش داده‌های خام

فرآیند ساخت کتابخانه RNA-seq تک‌سلولی و توالی‌یابی توسط شرکت Annoroad Gene Technologies Co., Ltd. (Beijing, China) انجام شد. تخمک‌های تازه و تخمک‌های منجمد و ذوب‌شده به لوله‌های حاوی محلول لیز و بازدارنده ریبونوکلاز منتقل شدند تا از تخریب RNA جلوگیری شود. برای تهیه کتابخانه، از پروتکل Smart-Seq2 استفاده شد که یکی از روش‌های پیشرفته در تک‌سلولی RNA-seq است. مراحل ساخت کتابخانه:



۲-۴-۱. تبدیل RNA به cDNA

- از یک پرایمر Oligo-dT برای آغاز فرآیند رونویسی معکوس استفاده شد. این پرایمر، RNA پلی‌آدنیل را هدف قرار داده و cDNA رشته اول را سنتز کرد.
- پس از آن، واکنش تقویت با PCR برای غنی‌سازی cDNA انجام شد.
- محصولات cDNA با استفاده از ذرات مغناطیسی (magbeads) خالص‌سازی شدند تا ناخالصی‌ها حذف شوند.

۲-۴-۲. کنترل کیفیت و بررسی تولید cDNA

- برای ارزیابی کیفیت و کمیت cDNA تولید شده، از دستگاه‌های Qubit® 3.0 Fluorometer و Agilent 2100 Bioanalyzer استفاده شد.
- طول محصولات cDNA مورد انتظار حدود ۱-۲ کیلوباز (kb) بود که با نتایج حاصل از این دستگاه‌ها تأیید شد.

۲-۴-۳. برش تصادفی cDNA

- cDNA تولید شده به صورت تصادفی با استفاده از امواج اولتراسونیک برای آماده‌سازی کتابخانه توالی‌یابی Illumina برش داده شد.

۲-۴-۴. آماده‌سازی کتابخانه

- پس از برش، کتابخانه‌های cDNA با استفاده از پروتکل استاندارد Illumina تهیه شدند.
- کیفیت کتابخانه‌ها با دستگاه‌های PerkinElmer LabChip® GX Touch و StepOnePlus™ Real-Time PCR System بررسی شد.

۲-۴-۵. توالی‌یابی

- کتابخانه‌های واجد شرایط برای توالی‌یابی جفت‌پایه (Paired-End; PE) با طول ۱۵۰ جفت‌باز (PE150) روی پلتفرم Illumina HiSeq بارگذاری شدند.

۲-۴-۶. پردازش داده‌های خام

- در مجموع، تعداد خوانش‌های خام تولید شده ۴۲/۱ میلیون بود که پس از فرآیند کنترل کیفی، ۴۰/۸ میلیون خوانش تمیز به دست آمد. برای حذف خطاها و بهبود کیفیت داده‌ها، مراحل زیر انجام شد:
- حذف توالی‌های آلوده و مکان‌های محدود:
- اگر طول خوانش‌ها پس از حذف توالی‌های آلوده کمتر از ۳۰ جفت‌باز بود، آن‌ها حذف شدند.
- حذف خوانش‌های حاوی آداپتورها:
- هر خوانش حاوی توالی آداپتور حذف گردید.
- حذف خوانش‌های با کیفیت پایین:
- خوانش‌هایی که بیش از ۵۰ درصد بازهای آن‌ها کیفیت کمتر از Q19 داشتند، حذف شدند.
- حذف خوانش‌های حاوی نسبت بالای N:
- در خوانش‌های زوجی، اگر نسبت بازهای N در یک انتها بیش از ۵ درصد بود، کل خوانش حذف شد.
- هم‌ترازی با ژنوم مرجع



خوانش‌های تمیز با استفاده از نرم‌افزار HISAT2 به ژنوم مرجع موش (mm9 assembly) هم‌تراز شدند. برای شمارش خوانش‌های به‌طور منحصربه‌فرد هم‌تراز شده، از ابزار HTSeq-count استفاده شد. این فرآیند دقیق و استاندارد برای تولید کتابخانه و پردازش داده‌ها، کیفیت بالای خوانش‌ها را تضمین کرد و امکان تحلیل‌های دقیق RNA-seq را فراهم آورد. استفاده از مراحل کنترل کیفیت چندگانه و ابزارهای پیشرفته، داده‌های قابل اعتمادی ارائه داد که برای تحلیل‌های بعدی بیان ژن و شناسایی تغییرات ناشی از انجماد تخمک ضروری بودند (۱۰).

۲-۵. ساخت کتابخانه متیلاسیون DNA، توالی‌یابی و پردازش داده‌های خام

برای شناسایی متیلاسیون DNA، از توالی‌یابی بی‌سولفیت کل ژنوم تک‌سلولی (scWGBS) استفاده شد. این روش امکان بررسی تغییرات دقیق متیلاسیون DNA را در سطح تک‌سلولی فراهم می‌کند. تخمک‌های تازه و منجمد-ذوب شده برای این آزمایش استفاده شدند. مراحل ساخت کتابخانه:

۲-۵-۱. آماده‌سازی DNA

تخمک‌های تازه و منجمد-ذوب شده با استفاده از محلول لیز برای جداسازی DNA پردازش شدند. در این مرحله، سیتوزین‌های غیرمتیله در DNA به بی‌سولفیت تبدیل شدند. این فرآیند امکان تمایز بین سیتوزین‌های متیله و غیرمتیله را در مراحل بعدی فراهم می‌کند.

۲-۵-۲. سنتز و تکثیر DNA

پس از تبدیل بی‌سولفیت، سنتز و تکثیر PCR برای ایجاد رشته‌های اول و دوم DNA انجام شد. این فرآیند به‌منظور تکمیل و تولید کتابخانه‌های DNA دورشته‌ای تک‌سلولی انجام گرفت.

۲-۵-۳. خالص‌سازی و ارزیابی کیفیت کتابخانه

کتابخانه‌های تولیدشده با استفاده از ذرات مغناطیسی خالص‌سازی شدند. ارزیابی کیفیت و کمیت کتابخانه‌ها با دستگاه‌های Agilent Bioanalyzer و StepOnePlus™ Real-Time PCR System انجام شد تا از صحت و کارآمدی کتابخانه‌ها اطمینان حاصل شود.

۲-۵-۴. توالی‌یابی

کتابخانه‌های خالص‌شده برای توالی‌یابی جفت‌پایه (Paired-End) با طول ۱۲۵ جفت‌باز (PE125) روی پلتفرم Illumina HiSeq 2500 بارگذاری شدند.

۲-۵-۵. پردازش داده‌های خام

▪ فیلتر کردن داده‌های خام
داده‌های توالی‌یابی خام با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic (v0.36) پردازش شدند. مراحل زیر برای حذف نویز و افزایش کیفیت داده‌ها انجام گرفت:

حذف توالی‌های حاوی آدپتور با استفاده از پارامتر ILLUMINACLIP:Adapter.fa:2:30:10
حذف پایه‌های با کیفیت پایین در خوانش‌ها با استفاده از روش پنجره کشویی و پارامتر SLIDINGWINDOW:4:15



حذف پایه‌های با کیفیت کمتر از Q3 یا دارای N در هر دو انتهای خوانش‌ها با استفاده از پارامتر LEADING:3

TRAILING:3

حذف خوانش‌هایی با طول کمتر از ۳۶ نوکلئوتید با پارامتر MINLEN:36

این مراحل منجر به تولید مجموعه‌ای از داده‌های تمیز و با کیفیت بالا شد.

▪ هم‌ترازی با ژنوم مرجع

داده‌های تمیز با استفاده از نرم‌افزار Bismark (v0.16.3) به ژنوم مرجع موش (mm9 assembly) هم‌تراز شدند. برای ایجاد قابلیت شناسایی متیلاسیون، توالی‌های DNA و ژنوم مرجع به ترتیب تحت تبدیل‌های G-to-A و C-to-T قرار گرفتند. سپس خوانش‌های تبدیل‌شده با نسخه تبدیل‌شده ژنوم مرجع هم‌تراز شدند و بهترین نتیجه از چهار مقایسه موازی انتخاب گردید.

▪ تحلیل اطلاعات متیلاسیون

تنها خوانش‌هایی که به‌طور منحصربه‌فرد به ژنوم هم‌تراز شدند، برای تحلیل‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. پس از تأیید کیفیت هم‌ترازی، این داده‌ها برای استخراج اطلاعات مربوط به متیلاسیون سیتوزین و انجام تحلیل‌های پایین‌دستی متیلاسیون DNA استفاده شدند. این روش جامع و دقیق برای تولید کتابخانه و تحلیل داده‌های متیلاسیون DNA امکان بررسی تغییرات اپی‌ژنتیکی ناشی از انجماد شیشه‌ای تخمک‌ها را فراهم کرد. مراحل کنترل کیفی چندگانه و استفاده از نرم‌افزارهای پیشرفته مانند Trimmomatic و Bismark تضمین کرد که داده‌های نهایی از دقت و اعتبار بالایی برای تحلیل‌های عمیق برخوردار باشند. این داده‌ها مبنای محکمی برای درک تأثیر انجماد شیشه‌ای بر متیلاسیون DNA و تنظیم ژنی فراهم آورد.

۲-۶. تجزیه و تحلیل همبستگی متیلاسیون DNA

به منظور ارزیابی تکرارپذیری نمونه‌های بیولوژیکی و بررسی تفاوت‌های متیلاسیون DNA بین گروه‌های مطالعه، از روش پنجره کشویی (Sliding Window) با اندازه ۲ کیلوباز (kb) استفاده شد. این روش به‌طور گسترده‌ای برای تحلیل تغییرات متیلاسیون در مناطق ژنومی و تعیین پایداری داده‌ها در نمونه‌های تکراری به کار می‌رود.

۲-۶-۱. روش کار

▪ محاسبه سطح متیلاسیون

"سطح متیلاسیون" برای هر پنجره با استفاده از نسبت تعداد سیتوزین‌های متیله به کل تعداد سایت‌های سیتوزین در آن پنجره محاسبه شد. این نسبت نشان‌دهنده شدت متیلاسیون در هر ناحیه خاص از ژنوم است.

▪ محاسبه همبستگی بین نمونه‌ها

برای ارزیابی همبستگی متیلاسیون DNA بین نمونه‌های بیولوژیکی (تکرارهای گروه تازه و منجمد)، از ضریب همبستگی پیرسون (PCC) استفاده شد. این ضریب معیاری از میزان مشابهت الگوهای متیلاسیون بین نمونه‌ها ارائه می‌دهد و دقت و تکرارپذیری آزمایش‌ها را نشان می‌دهد.

▪ تحلیل پنجره کشویی

کل ژنوم به پنجره‌هایی با اندازه ۲ کیلوباز تقسیم شد و سطح متیلاسیون در هر پنجره محاسبه گردید.



نتایج متیلاسیون در هر پنجره با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون بین گروه‌های مختلف مقایسه شد تا نواحی با تفاوت‌های معنادار مشخص شوند.

▪ نتایج و تفسیر

- داده‌ها نشان دادند که تکرارپذیری نمونه‌های بیولوژیکی بالا بوده و همبستگی بین نمونه‌های تکراری از هر گروه (تازه و منجمد) قوی است ($PCC > 0.9$).

- در مقایسه بین گروه‌ها، تفاوت‌های قابل توجهی در سطح متیلاسیون DNA در نواحی خاص ژنومی مشاهده شد. نواحی دارای تفاوت‌های معنادار شامل پروموتورها، اگزونها، اینترون‌ها و مناطق میان‌ژنی بودند.

- کاهش متیلاسیون در گروه تخمک‌های منجمد به‌ویژه در مناطق پروموتور و اینترون‌ها مشاهده شد، در حالی که سطح متیلاسیون در اگزونها و UTRها تغییر معناداری نداشت.

▪ اهمیت این تحلیل

- استفاده از پنجره کشویی ۲ کیلوباز امکان بررسی دقیق و مقایسه الگوهای متیلاسیون را در کل ژنوم فراهم کرد. این رویکرد برای شناسایی تغییرات منطقه‌ای در متیلاسیون DNA بین گروه‌های آزمایشی بسیار کارآمد است.

- تحلیل همبستگی پیرسون اطلاعات ارزشمندی در مورد تکرارپذیری و کیفیت داده‌های متیلاسیون DNA ارائه داد و اطمینان از صحت داده‌های تولید شده را تضمین کرد.

تحلیل همبستگی و استفاده از پنجره کشویی نشان داد که فرآیند انجماد شیشه‌ای منجر به تغییرات معناداری در الگوهای متیلاسیون DNA در نواحی خاص ژنومی می‌شود. این تغییرات ممکن است بر تنظیم بیان ژن‌ها و فرآیندهای سلولی مرتبط تأثیرگذار باشند و نیاز به بررسی‌های بیشتر برای ارزیابی اثرات عملکردی آن‌ها را برجسته می‌کنند.

۲-۷. سطوح متیلاسیون کل ژنوم و ناحیه عملکردی

به منظور بررسی جامع وضعیت متیلاسیون DNA در نمونه‌های مختلف و تحلیل تفاوت‌های متیلاسیون بین گروه‌ها، تحلیل سطوح متیلاسیون در کل ژنوم و نواحی عملکردی خاص انجام شد. این تحلیل با استفاده از داده‌های بی‌سولفیت توالی‌یابی (scWGBS) انجام گرفت و الگوهای متیلاسیون در سطح ژنومی و مناطق خاص ارزیابی شدند.

▪ محاسبه سطوح متیلاسیون کل ژنوم

▪ محاسبه سطوح متیلاسیون کلی

سطح کلی متیلاسیون برای هر نمونه با استفاده از نسبت تعداد سیتوزین‌های متیله به کل سایت‌های CpG در ژنوم محاسبه شد. این شاخص، دیدگاهی کلی از سطح متیلاسیون ژنوم ارائه داد.

برای تحلیل دقیق‌تر، ژنوم به پنجره‌هایی با اندازه ۲ کیلوباز (kb) تقسیم شد و سطح متیلاسیون در هر پنجره محاسبه گردید. این روش، امکان شناسایی الگوهای متیلاسیون موضعی را فراهم کرد.

نمایش گرافیکی: برای مقایسه تفاوت‌های سطح کلی متیلاسیون بین گروه‌ها، نمودارهای ویولن (Violin Plot) ترسیم شد. این نمودارها علاوه بر نمایش توزیع داده‌ها، امکان مشاهده تغییرات در الگوهای متیلاسیون را به صورت مقایسه‌ای فراهم کردند.

▪ تحلیل نواحی عملکردی ژنوم

محاسبه متیلاسیون در نواحی خاص: سطح متیلاسیون در نواحی عملکردی شامل پروموتورها، ناحیه ترجمه‌نشده (UTR)، توالی‌های کدکننده (CDS)، اینترون‌ها، و مناطق بین‌ژنی به صورت جداگانه محاسبه شد.

این تحلیل با هدف درک تأثیر انجماد شیشه‌ای بر متیلاسیون DNA در مناطق عملکردی مختلف انجام گرفت.



نمایش داده‌ها: برای نمایش تغییرات متیلاسیون در این نواحی، نمودارهای جعبه‌ای (Box Plot) ترسیم شدند. این نمودارها امکان مشاهده پراکندگی، میانه و محدوده داده‌ها را در هر ناحیه عملکردی فراهم کردند.

نتایج و تفسیر:

سطوح کلی متیلاسیون: تفاوت‌های معناداری در سطوح کلی متیلاسیون بین تخمک‌های تازه و منجمد مشاهده شد. سطح متیلاسیون کلی در تخمک‌های منجمد به‌طور قابل توجهی پایین‌تر از تخمک‌های تازه بود.

نمودارهای ویولن نشان دادند که توزیع متیلاسیون در گروه منجمد گسترده‌تر و ناهمگن‌تر بود، در حالی که گروه تازه الگوهای متیلاسیون یکنواخت‌تری داشت.

ناحیه‌های عملکردی: کاهش سطح متیلاسیون در نواحی پروموتور و اینترون‌ها در گروه منجمد به‌طور معناداری بیشتر بود. این کاهش می‌تواند تأثیر مستقیمی بر تنظیم بیان ژن داشته باشد.

در مقابل، سطح متیلاسیون در توالی‌های کدکننده (CDS) و ناحیه ترجمه‌نشده (UTR) تغییر معناداری نشان نداد. در نواحی بین‌ژنی، سطح متیلاسیون در گروه منجمد به‌طور کلی کمتر بود، که ممکن است به تغییرات ساختاری و تنظیمات کروماتینی مربوط باشد.

اهمیت تحلیل: این تحلیل نشان داد که انجماد شیشه‌ای می‌تواند به تغییرات معناداری در سطح متیلاسیون کل ژنوم و به‌ویژه در نواحی پروموتور و اینترون‌ها منجر شود. این تغییرات ممکن است تأثیرات عمده‌ای بر تنظیم ژن‌ها و فرآیندهای زیستی مرتبط با کیفیت تخمک و باروری داشته باشند.

استفاده از نمودارهای ویولن و جعبه‌ای امکان تجسم دقیق و مقایسه‌ای تغییرات متیلاسیون را فراهم کرد و به شناسایی مناطق حساس به انجماد کمک نمود.

این یافته‌ها نشان می‌دهند که انجماد شیشه‌ای تأثیرات گسترده‌ای بر متیلاسیون DNA در نواحی کلیدی ژنوم دارد. تحلیل دقیق این تغییرات می‌تواند به درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی آسیب ناشی از انجماد و بهینه‌سازی روش‌های حفظ باروری کمک کند.

۲-۸. شناسایی مناطق متیله متفاوت (DMRs) و ژن‌های با بیان متفاوت (DEGs)

به‌منظور شناسایی مناطق متیله متفاوت (Differentially Methylated Regions; DMRs) و ژن‌های با بیان متفاوت (Differentially Expressed Genes; DEGs) بین گروه‌های تازه و منجمد، از روش‌های محاسباتی پیشرفته و ابزارهای تخصصی استفاده شد.

۲-۸-۱. شناسایی مناطق متیله متفاوت (DMRs)

▪ ابزار تحلیل

برای شناسایی DMRها از نرم‌افزار Dispersion Shrinkage for Sequencing data (DSS) استفاده شد. DSS به دلیل دقت بالا در شناسایی تغییرات متیلاسیون DNA در داده‌های توالی‌یابی بی‌سولفیت، به‌طور گسترده‌ای در تحلیل‌های مرتبط با متیلاسیون استفاده می‌شود.

▪ معیارهای شناسایی DMRها

- مناطق ژنومی که دارای مقادیر $p\text{-value} < 0.05$ و تفاوت میانگین سطح متیلاسیون بین گروه‌ها بیشتر یا مساوی 0.2 بودند، به‌عنوان DMR در نظر گرفته شدند.

- علاوه بر این، تنها مناطقی که شامل حداقل ۳ سایت CpG بودند، به‌عنوان DMRهای نهایی حفظ شدند.



▪ اهمیت تحلیل DMRها

شناسایی DMRها امکان درک تغییرات اپی‌ژنتیکی بین تخمک‌های تازه و منجمد را فراهم می‌کند. این تغییرات می‌توانند بر تنظیم ژن و عملکرد تخمک تأثیرگذار باشند.

۲-۸-۲. شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت (DEGs)

▪ ابزار تحلیل

تجزیه و تحلیل بیان افتراقی ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار DESeq2 انجام شد. این ابزار به دلیل قابلیت اصلاح خطای چندگانه و محاسبه دقیق تغییرات بیان ژن در داده‌های RNA-seq، انتخاب شد.

▪ معیارهای شناسایی DEGs

- ژن‌هایی که دارای مقادیر $[\log_2 \text{Fold Change (log}_2\text{FC)}] \geq 1$ یا ≤ -1 و $p\text{-value} < 0.05$ تنظیم شده بودند، به‌عنوان DEGs در نظر گرفته شدند.

- این معیارها اطمینان حاصل کردند که تنها تغییرات معنادار و قوی در بیان ژن‌ها گزارش شوند.

▪ تحلیل بیان ژن

DEGs شناسایی شده به مسیرهای زیستی خاص و فرآیندهای سلولی مهم اختصاص داده شدند. برای تحلیل مسیرها، از ابزارهایی نظیر KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) و Gene Ontology (GO) استفاده شد.

۳-۸-۲. نتایج و تفسیر

▪ DMRs

- تعداد قابل توجهی از DMRها در نواحی پروموتور و اینترون‌ها شناسایی شدند. این تغییرات احتمالاً بر تنظیم رونویسی و بیان ژن‌ها تأثیرگذارند.

- در نواحی کدکننده (CDS) و UTRها، تغییرات متیلاسیون محدودتر بودند، اما همچنان به تغییرات در تنظیم ترجمه مربوط می‌شدند.

▪ DEGs

- ژن‌های با بیان متفاوت شامل گروهی از ژن‌های مرتبط با متابولیسم انرژی، تنظیم چرخه سلولی و کیفیت تخمک بودند.

- تحلیل مسیرهای KEGG نشان داد که بسیاری از DEGs در مسیرهای زیستی مرتبط با استرس اکسیداتیو، یوبیکوئیتیناسیون و عملکرد میتوکندری شرکت دارند.

۴-۸-۲. اهمیت تحلیل

▪ این تحلیل نشان داد که تغییرات در متیلاسیون DNA و بیان ژن‌ها می‌تواند نقش کلیدی در کاهش کیفیت تخمک‌های منجمد ایفا کند.

▪ شناسایی دقیق DMRها و DEGs، اطلاعات ارزشمندی برای درک اثرات مولکولی انجماد شیشه‌ای و توسعه راهکارهای بهینه برای کاهش آسیب‌های مرتبط فراهم می‌کند.

با استفاده از ابزارهای DSS و DESeq2، مناطق ژنومی و ژن‌های تحت تأثیر انجماد شیشه‌ای با دقت شناسایی شدند. این یافته‌ها پایه‌ای قوی برای تحقیقات بیشتر در زمینه اثرات اپی‌ژنتیکی و مولکولی این فرآیند ارائه می‌دهند.



۹-۲. تجزیه و تحلیل همبستگی بیان ژن و کاهش ابعاد UMAP

برای تحلیل همبستگی و کاهش ابعاد داده‌های RNA-seq تخمک‌ها، رویکردهای زیر به کار گرفته شد:

۱-۹-۲. محاسبه همبستگی بیان ژن

■ نرمال‌سازی داده‌ها

مقادیر خام تعداد خوانش‌ها با استفاده از تبدیل لگاریتمی \log_2 به صورت غیرخطی نرمال‌سازی شدند. این روش نوسانات داده‌ها را کاهش داده و مقایسه‌پذیری را افزایش می‌دهد.

■ محاسبه ضریب همبستگی پیرسون (PCC)

- برای تعیین همبستگی بین دو گروه تخمک (تازه و منجمد)، ضریب PCC محاسبه شد. این ضریب، معیاری از میزان شباهت الگوهای بیان ژن بین دو گروه ارائه می‌دهد.

- نتایج به صورت نقشه حرارتی (Heatmap) نمایش داده شدند که تغییرات بیان ژن را بین دو گروه تخمک برجسته می‌کرد.

۲-۹-۲. تحلیل کاهش ابعاد با UMAP

■ ابزار و روش

- برای تحلیل کاهش ابعاد، از تابع "reduce_dimension" از بسته Monocle3 در محیط برنامه R استفاده شد.

- برای تجسم داده‌ها، تابع "plot_cells" به کار گرفته شد که نمایشی دوبعدی از داده‌های RNA-seq ارائه می‌دهد.

■ مزیت UMAP

- UMAP با حفظ روابط محلی بین داده‌ها، نمونه‌ها را بر اساس شباهت‌های ژنتیکی به صورت گروه‌های مجزا (Cluster) نمایش می‌دهد.

- این روش به شناسایی تفاوت‌های ساختاری و گروه‌بندی طبیعی تخمک‌های تازه و منجمد کمک کرد.

۳-۹-۲. نتایج و تفسیر

■ نقشه حرارتی

- ضریب همبستگی بیان ژن در نمونه‌های یک گروه (تازه یا منجمد) بالا بود، که نشان‌دهنده تکرارپذیری خوب داده‌ها در هر گروه است.

- در مقابل، همبستگی بیان ژن بین گروه‌های تازه و منجمد پایین‌تر بود، که نشان‌دهنده تغییرات قابل توجه در بیان ژن به دلیل فرآیند انجماد شیشه‌ای است.

■ تحلیل UMAP

- داده‌ها به صورت خوشه‌های جداگانه بر اساس گروه (تازه و منجمد) نمایش داده شدند. تخمک‌های تازه و منجمد در فضاهای جداگانه قرار گرفتند، که نشان‌دهنده تفاوت‌های ساختاری عمده در الگوهای بیان ژن است.

■ اهمیت تحلیل

- این تحلیل نشان داد که فرآیند انجماد شیشه‌ای منجر به تغییرات معنادار در بیان ژن می‌شود که می‌تواند بر عملکرد تخمک تأثیرگذار باشد.



- استفاده از نقشه حرارتی و کاهش ابعاد با UMAP، شفافیت بیشتری در تفسیر داده‌ها و مقایسه گروه‌های مختلف ارائه داد.

تحلیل همبستگی و کاهش ابعاد UMAP نه تنها تغییرات بیان ژن ناشی از انجماد را تأیید کرد، بلکه الگوهای ژنتیکی منحصر به فرد هر گروه را مشخص نمود. این یافته‌ها اطلاعات مهمی برای درک مکانیسم‌های مولکولی انجماد و اثرات آن بر کیفیت تخمک ارائه می‌دهند

۱۰-۲. تحلیل غنی‌سازی آنتولوژی ژن (GO) و دانشنامه کیوتو ژن‌ها و ژنوم‌ها (KEGG)

برای شناسایی مسیرهای زیستی مرتبط و تفسیر بیولوژیکی داده‌ها، از تحلیل‌های غنی‌سازی مسیر با استفاده از ابزار ClusterProfiler در محیط R بهره گرفته شد. این تحلیل شامل آنتولوژی ژن (Gene Ontology; GO) و دانشنامه کیوتو ژن‌ها و ژنوم‌ها (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; KEGG) بود.

۱-۱۰-۲. روش تحلیل

▪ ابزار و توابع مورد استفاده

- برای تحلیل غنی‌سازی مسیرها، از توابع "enrichGO" و "enrichKEGG" موجود در بسته ClusterProfiler استفاده شد.

- تمامی پارامترها در حالت پیش فرض تنظیم شدند و فقط موارد با مقدار $p < 0.05$ به عنوان مسیرهای غنی شده معنادار در نظر گرفته شدند.

▪ داده‌های ورودی برای تحلیل غنی‌سازی

- ژن‌های با بیان متفاوت (DEGs) شناسایی شده بین تخمک‌های تازه و منجمد به عنوان ورودی اصلی برای تحلیل‌های GO و KEGG مورد استفاده قرار گرفتند.

علاوه بر این:

- ژن‌های با بیان پایین تنظیم شده مرتبط با مناطق هیپرمتیله (Hyper-Down) و

- ژن‌های با بیان بالا تنظیم شده مرتبط با مناطق هیپومتیله (Hypo-Up) نیز به عنوان داده‌های ورودی برای تحلیل غنی‌سازی GO استفاده شدند.

- ژن‌های پایین دستی مرتبط با Dnmt1 برای تحلیل‌های غنی‌سازی KEGG و GO مورد استفاده قرار گرفتند.

▪ تحلیل آنتولوژی ژن (GO)

- اصطلاحات غنی شده GO در سه دسته اصلی طبقه‌بندی شدند:

فرآیندهای زیستی (Biological Processes; BP): شامل مسیرهایی مرتبط با تنظیم چرخه سلولی، متابولیسم انرژی، و استرس اکسیداتیو.

اجزای سلولی (Cellular Components; CC): شامل اجزای مرتبط با میتوکندری، کروماتین و کمپلکس‌های پروتئینی.

عملکردهای مولکولی (Molecular Functions; MF): شامل مسیرهای مرتبط با فعالیت آنزیمی و تنظیم DNA

▪ تحلیل دانشنامه کیوتو ژن‌ها و ژنوم‌ها (KEGG):

- مسیرهای زیستی غنی شده KEGG شامل مسیرهایی مرتبط با:



تنظیم متابولیسم ATP
تنظیم چرخه سلولی
یوبیکوئیتیناسیون پروتئین
عملکردهای میتوکندری و استرس سلولی

- این تحلیل‌ها به‌ویژه بر ژن‌های پایین‌دستی مرتبط با Dnmt1 متمرکز بودند.

۲-۱۰-۲. نتایج و تفسیر

▪ نتایج تحلیل GO:

- در دسته فرآیندهای زیستی (BP)، فرآیندهای مرتبط با تنظیم چرخه سلولی، متابولیسم انرژی و تنظیم بیان ژن بیشترین غنی‌سازی را نشان دادند.
- در دسته اجزای سلولی (CC)، میتوکندری و کروماتین به‌عنوان اجزای سلولی مهم تحت تأثیر انجماد شیشه‌ای شناسایی شدند.
- در دسته عملکردهای مولکولی (MF)، تنظیم متیلاسیون DNA و فعالیت‌های آنزیمی مرتبط با متیلاسیون برجسته شدند.

▪ نتایج تحلیل KEGG

- مسیرهای زیستی مرتبط با تنظیم متیلاسیون DNA، استرس اکسیداتیو، یوبیکوئیتیناسیون و عملکردهای میتوکندری بیشترین غنی‌سازی را نشان دادند.
- تحلیل ژن‌های پایین‌دستی مرتبط با Dnmt1 نقش این ژن را در تنظیم متیلاسیون DNA و تأثیر آن بر مسیرهای زیستی مهم نشان داد.

۲-۱۰-۳. اهمیت تحلیل

این تحلیل‌ها نشان داد که انجماد شیشه‌ای تخمک‌ها منجر به تغییرات معناداری در مسیرهای زیستی کلیدی می‌شود. شناسایی مسیرهای غنی‌شده، اطلاعات ارزشمندی برای درک اثرات مولکولی این فرآیند و توسعه استراتژی‌هایی برای کاهش آسیب ناشی از انجماد ارائه می‌دهد. به‌ویژه، نقش Dnmt1 در تغییرات متیلاسیون و تنظیم مسیرهای زیستی مرتبط برجسته شد. تحلیل‌های غنی‌سازی GO و KEGG نشان دادند که انجماد شیشه‌ای باعث تغییرات گسترده‌ای در مسیرهای مرتبط با تنظیم اپی‌ژنتیک، متابولیسم انرژی و پاسخ به استرس سلولی می‌شود. این یافته‌ها می‌توانند به بهبود فناوری‌های انجماد تخمک و حفظ کیفیت آن‌ها کمک کنند.

۲-۱۱. تجزیه و تحلیل شبکه تنظیم ژن مرتبط با فاکتور رونویسی* (GRN)

به منظور شناسایی شبکه‌های تنظیم ژنی (Gene Regulatory Networks; GRNs) مرتبط با فاکتورهای رونویسی (Transcription Factors; TFs)، از بسته SCENIC در محیط برنامه R استفاده شد. این الگوریتم پیشرفته قابلیت بازسازی GRN‌ها و شناسایی حالت‌های سلولی پایدار را از داده‌های تک‌سلولی RNA-seq فراهم می‌کند.

* Transcription factor (TF)



۲-۱۱-۱. روش تحلیل

▪ بازسازی GRNها

SCENIC ابتدا ماژول‌های ژنی هم‌اظهار (Co-Expressed Gene Modules) را شناسایی کرد. این ماژول‌ها شامل ژن‌هایی هستند که الگوهای بیان مشابهی دارند و احتمالاً تحت کنترل مشترک قرار دارند. سپس، از تحلیل Cis-Regulatory Motif Analysis برای شناسایی موتیف‌های تنظیم‌کننده استفاده شد. این فرآیند به‌طور دقیق ژن‌هایی که تحت کنترل TFها هستند را شناسایی کرد. بخشی از ماژول‌های ژنی که موتیف‌های تنظیم‌کننده مرتبط داشتند، به‌عنوان Regulons تعریف شدند. این Regulons نمایانگر شبکه‌های تنظیمی ژنی مرتبط با TFها هستند. اندازه‌گیری اهمیت تنظیمات:

در مرحله بعد، SCENIC برای هر Regulaon، میزان غنی‌سازی را با محاسبه مساحت زیر منحنی (Area Under Curve; AUC) در رتبه‌بندی ژن‌ها برای یک منطقه خاص ارزیابی کرد. این ارزیابی امکان شناسایی تنظیمات کلیدی در حالت‌های سلولی مختلف را فراهم کرد. آستانه انتخاب تنظیمات قابل توجه: $Z\text{-Score} > 0.9$ $Importance\ Value > 10$ برای انتخاب ماژول‌های تنظیمی مهم، معیارهای زیر به‌عنوان آستانه تعریف شدند: $Z\text{-Score} > 0.9$ $Importance\ Value > 10$ ماژول‌هایی که این آستانه‌ها را برآورده کردند، به‌عنوان تنظیمات معنادار شناسایی شدند.

۲-۱۱-۲. نتایج و تفسیر

▪ Regulons شناسایی شده

شبکه‌های تنظیمی ژنی شناسایی شده شامل TFها و ژن‌های هدف آنها بودند که تغییرات معناداری در بیان ژن بین تخمک‌های تازه و منجمد نشان دادند. این شبکه‌ها نقش کلیدی در تنظیم فرآیندهایی نظیر متابولیسم انرژی، تنظیم چرخه سلولی و حفظ پایداری اپی‌ژنتیک داشتند.

▪ اهمیت GRNها

GRNهای مرتبط با TFهای کلیدی مانند Dnmt1 و kcnq1ot1 نقش برجسته‌ای در تنظیم تغییرات متیلاسیون و بیان ژن داشتند. این تنظیمات، به‌ویژه در ژن‌های مرتبط با کیفیت و توانایی باروری تخمک‌ها، تغییرات قابل توجهی نشان دادند. اهمیت تحلیل: این تحلیل نشان داد که فرآیند انجماد شیشه‌ای تخمک‌ها می‌تواند به تغییرات عمده در GRNها منجر شود و تنظیمات ژنی مرتبط با TFهای کلیدی را مختل کند. شناسایی شبکه‌های تنظیمی مرتبط، اطلاعات ارزشمندی برای درک مکانیسم‌های مولکولی انجماد و اثرات آن بر کیفیت تخمک ارائه می‌دهد.



نتیجه‌گیری

استفاده از SCENIC برای بازسازی GRNها و شناسایی تنظیمات مرتبط با TFها، تصویری جامع از تغییرات تنظیم ژنی ناشی از انجماد شیشه‌ای ارائه داد. این تحلیل‌ها مسیرهای بالقوه‌ای را برای بهبود کیفیت تخمک‌های منجمد و توسعه فناوری‌های پیشرفته در حفظ باروری نشان دادند.

۲-۱۲. تجزیه و تحلیل آماری و تجسم داده‌ها

برای تحلیل داده‌ها و ارائه تصویری جامع از نتایج، از روش‌های آماری معتبر و ابزارهای تجسم داده‌ها در محیط R (نسخه ۳.۶.۳) و R/Bioconductor استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری:

محاسبه همبستگی: ضریب همبستگی پیرسون (PCC) برای ارزیابی ارتباط بین بیان ژن‌ها با استفاده از تابع "cor" در R محاسبه شد.

پارامترهای پیش‌فرض تابع "cor" استفاده شد تا همبستگی بین ژن‌ها به صورت دقیق و استاندارد تخمین زده شود. آزمون t مستقل: برای مقایسه میانگین‌های دو گروه (مانند تخمک‌های تازه و منجمد)، از آزمون t مستقل (Student's t-test) استفاده شد.

این تحلیل با استفاده از تابع "t.test" در R و با پارامترهای پیش‌فرض انجام شد.

تجسم داده‌ها:

نقشه حرارتی (Heatmap): برای نمایش الگوهای همبستگی بین ژن‌ها و تفاوت‌های بیان ژنی در گروه‌های مختلف، نقشه‌های حرارتی با استفاده از بسته Pheatmap در R تولید شدند.

این نقشه‌ها به طور واضح مناطق با بیان بالا و پایین را در تخمک‌های تازه و منجمد نشان دادند.

نقشه ون (Venn Diagram): برای نمایش اشتراکات و تفاوت‌های ژن‌ها بین گروه‌های مختلف، نقشه‌های ون با استفاده از بسته VennDiagram در R تولید شدند.

نمودارهای چگالی، جعبه‌ای و حباب:

بسته ggplot2 برای تولید نمودارهای گرافیکی با کیفیت بالا به کار رفت:

نمودارهای چگالی: برای نمایش توزیع بیان ژن‌ها و تغییرات متیلاسیون.

نمودارهای جعبه‌ای (Box Plot): برای مقایسه داده‌ها در گروه‌های مختلف و نمایش پراکندگی و میانه داده‌ها.

نمودارهای حباب (Bubble Plot): برای تجسم مسیرهای زیستی غنی شده و تأثیر نسبی آن‌ها.

اهمیت تحلیل: استفاده از روش‌های آماری استاندارد مانند PCC و t-test تضمین‌کننده دقت و صحت تحلیل داده‌ها بود.

ابزارهای تجسم داده‌ها مانند Heatmap و Bubble Plot کمک کردند تا نتایج به طور بصری قابل‌فهم‌تر و ارتباطات بین متغیرها روشن‌تر شوند.

تجسم داده‌ها با ابزارهای پیشرفته نظیر ggplot2 و Pheatmap، امکان بررسی دقیق‌تر و شناسایی الگوهای مهم را فراهم کرد. این رویکرد جامع در تجزیه و تحلیل آماری و تجسم داده‌ها، اطلاعات کلیدی درباره تغییرات مولکولی ناشی از انجماد شیشه‌ای ارائه داد و به درک بهتر اثرات آن بر بیان ژن و متیلاسیون DNA کمک کرد. استفاده از ابزارهای پیشرفته، اطمینان از دقت و وضوح نتایج را تضمین کرد.



۳. نتایج

۳-۱. متیلاسیون جهانی و تفاوت‌های رونویسی بین تخمک‌های منجمد شده و تازه مشاهده شد.

برای ارزیابی تأثیر انجماد شیشه‌ای بر متیلاسیون DNA و بیان ژن در تخمک‌ها، ضریب همبستگی پیرسون (PCC) بین تخمک‌های تازه و منجمد شده محاسبه شد. این محاسبات بر اساس سطوح متیلاسیون (کسری از سیتوزین‌های متیله) و مقادیر بیان ژن (تعداد خوانش‌های نرمال شده) انجام گرفت (شکل ۱- A و ۱- B).

۳-۱-۱. نتایج

■ همبستگی درون گروه

– مقدار PCC برای متیلاسیون بین تخمک‌های یکسان در گروه مشابه، مقدار بالایی ($PCC > 0.85$) نشان داد.

– بیان ژن نیز همبستگی بالایی بین تخمک‌های مشابه داشت ($PCC > 0.9$).

– این نتایج نشان‌دهنده یکنواختی بالا در تخمک‌های تازه یا منجمد درون یک گروه بود.

■ همبستگی بین گروهی

– بین تخمک‌های تازه و منجمد، تفاوت‌های واضحی در همبستگی مشاهده شد:

* متیلاسیون DNA: مقدار $PCC < 0.4$ نشان‌دهنده کاهش همبستگی متیلاسیون بین دو گروه بود.

* بیان ژن: مقدار $PCC < 0.9$ نشان‌دهنده تفاوت‌های مشخص در الگوهای بیان ژن بین دو گروه بود.

– نتایج حاصل از خوشه‌بندی سلولی بر اساس بیان ژن نیز تفاوت‌های آشکار بین تخمک‌های تازه و منجمد و شباهت

زیاد در تخمک‌های تحت تیمار مشابه را تأیید کرد (شکل ۱- C).

۳-۱-۲. مقایسه سطوح متیلاسیون و بیان ژن

■ سطح متیلاسیون جهانی و بیان ژن: تخمک‌های منجمد به‌طور قابل توجهی سطح پایین‌تری از متیلاسیون جهانی و

بیان ژن را نسبت به تخمک‌های تازه نشان دادند ($p < 0.001$) (شکل ۱- D و ۱- E).

■ ناحیه‌های ژنومی خاص:

– تفاوت معنی‌داری در سطح متیلاسیون DNA در نواحی اگزون‌ها و ناحیه‌های 5' UTR و ۳' بین دو گروه مشاهده

نشد.

– در مقابل، سطح متیلاسیون در نواحی بین‌ژنی، اینترون‌ها و پروموتورها در تخمک‌های منجمد به‌طور معناداری کمتر

از تخمک‌های تازه بود ($p < 0.001$) (شکل ۱- F).

این یافته‌ها نشان داد که انجماد شیشه‌ای تأثیر قابل توجهی بر متیلاسیون DNA و بیان ژن در تخمک‌ها دارد. کاهش

متیلاسیون در نواحی بین‌ژنی، اینترون‌ها و پروموتورها ممکن است بر تنظیم بیان ژن و فرآیندهای زیستی مهم تأثیرگذار

باشد. به‌طور کلی، این تغییرات ممکن است منجر به کاهش کیفیت تخمک‌های منجمد شده و تأثیرات منفی بر توانایی

باروری آن‌ها شود.

۳-۲. چشم‌انداز خاص متیلاسیون DNA و الگوهای بیان ژن بین تخمک‌های منجمد شده و تازه

برای بررسی عمیق‌تر اثرات انجماد شیشه‌ای بر متیلاسیون DNA و بیان ژن در تخمک‌ها، از تحلیل‌های دقیق

بیوانفورماتیکی استفاده شد.



۳-۲-۱. تحلیل متیلاسیون افتراقی (DMRs)

▪ شناسایی DMR ها: برای شناسایی مناطق متیلاسیون افتراقی (DMRs)، از نرم‌افزار DSS استفاده شد. این مناطق به عناصر ژنی مختلف شامل جزایر CpG (CGIs)، اگزون‌ها، اینترون‌ها، پروموتورها و UTR های ۵' و ۳' تخصیص داده شدند.

▪ ویژگی‌های DMR ها: تحلیل‌ها نشان داد که طول مناطق هیپرمتیله (در تخمک‌های منجمد در مقایسه با تخمک‌های تازه) کوتاه‌تر از مناطق هیپومتیله بود.

تعداد مناطق هیپرمتیله نیز کمتر از مناطق هیپومتیله در هر ناحیه ژنی بود (شکل ۲- A و B). این نتایج نشان داد که فرآیند انجماد شیشه‌ای باعث حذف بسیاری از مناطق متیلاسیون وسیع‌تر شده و تعداد محدودی از مناطق متیلاسیون باریک‌تر را بازسازی کرده است.

۳-۲-۲. تحلیل بیان افتراقی ژن‌ها (DEGs)

▪ ۳-۲-۲. شناسایی DEGs

– ژن‌های با بیان متفاوت (DEGs) بین تخمک‌های منجمد و تازه با استفاده از نرم‌افزار DESeq2 شناسایی شدند.

– معیارهای شناسایی DEGs:
|Log2 Fold Change (log2FC)| > 1
Adjusted p-value < 0.05

▪ ۳-۲-۳. الگوی بیان ژن‌ها

تخمک‌های منجمد تعداد کمتری از ژن‌های با بیان بالا تنظیم شده (n = 1426) نسبت به ژن‌های با بیان پایین تنظیم شده (n = 3321) داشتند (شکل ۲- C و جدول تکمیلی ۱-S).

▪ غنی‌سازی عملکردی: DEGs

– ژن‌های با بیان بالا در تخمک‌های منجمد به‌طور عمده در فرآیندهای بیولوژیکی زیر غنی‌سازی شدند:

* مونوبیوکیوتیناسیون هیستون H2A

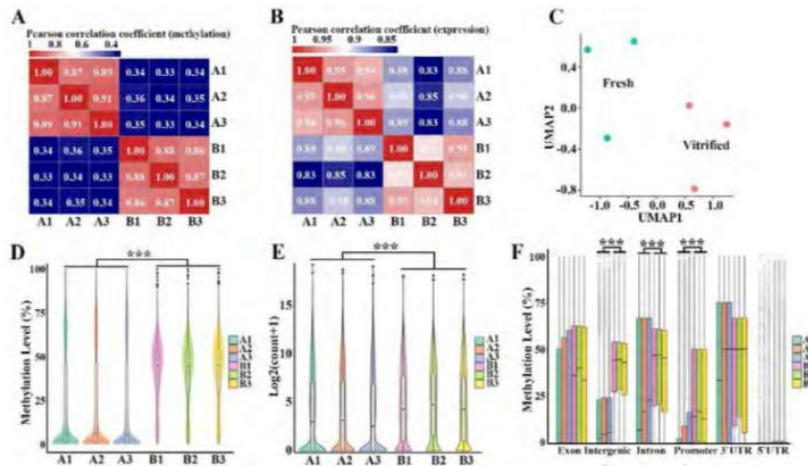
* پلی‌یوبیوکیوتیناسیون

* سازمان‌دهی شبکه لوله‌ای شبکه آندوپلاسمی

* انتقال وزیکول با واسطه سیناپس‌ها

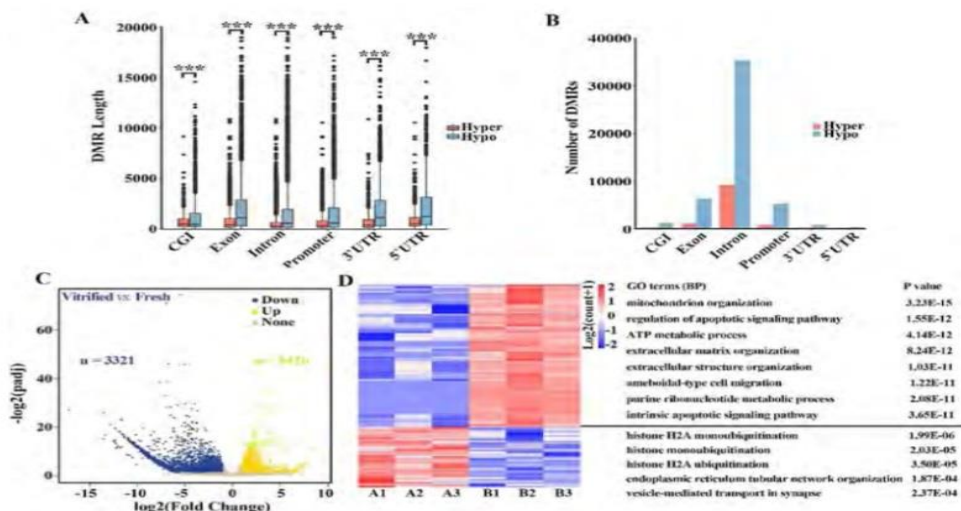
– ژن‌های با بیان پایین در تخمک‌های منجمد بیشتر مرتبط با فرآیندهای ضروری زیستی و تنظیم انرژی بودند.

این تحلیل‌ها نشان داد که انجماد شیشه‌ای به کاهش گسترده متیلاسیون در بسیاری از مناطق ژنی منجر می‌شود، اما فقط تعداد محدودی از این مناطق به‌طور جزئی بازسازی می‌شوند. تفاوت‌های قابل توجه در بیان ژن‌ها بین تخمک‌های تازه و منجمد نیز برجسته شد، که به کاهش کیفیت تخمک‌های منجمد اشاره دارد. تغییرات در متیلاسیون DNA و بیان ژن به‌طور مستقیم در مسیرهای بیولوژیکی کلیدی، از جمله تنظیم ساختار کروماتین و فعالیت‌های میتوکندری، تأثیرگذار هستند. این یافته‌ها اطلاعات مهمی برای بهبود کیفیت تخمک‌های منجمد و فناوری‌های مرتبط ارائه می‌دهند.



شکل ۱- سطح کلی متیلاسیون و بیان ژن در تخمک‌های منجمد شده و تازه

A-B- همبستگی پیرسون (PCC) بین سطوح متیلاسیون و سطوح بیان ژن در تخمک‌های منجمد (A1, A2, A3) و تخمک‌های تازه (B1, B2, B3). این تحلیل نشان‌دهنده یکنواختی بالا در گروه‌های مشابه و تفاوت‌های معنادار بین تخمک‌های تازه و منجمد است. C- تحلیل کاهش ابعاد با استفاده از تقریب منیفولد یکنواخت و طرح‌ریزی (UMAP) برای بیان ژن. در این تحلیل، انواع سلول‌های مختلف با رنگ‌های متفاوت مشخص شده‌اند که تفاوت‌های ساختاری و گروه‌بندی طبیعی تخمک‌های تازه و منجمد را برجسته می‌کند. D-E- نمودارهای Violin Plot که تفاوت‌های معنادار در سطوح متیلاسیون و بیان ژن را بین تخمک‌های تازه و منجمد نشان می‌دهند. این نمودارها کاهش چشمگیر در متیلاسیون و بیان ژن در تخمک‌های منجمد را برجسته می‌کنند. F- سطح متیلاسیون در نواحی مختلف ژنومی شامل پروموتورها، اگزونها، اینترون‌ها، و مناطق بین‌ژنی. این تحلیل کاهش معنادار متیلاسیون در پروموتورها، اینترون‌ها، و مناطق بین‌ژنی تخمک‌های منجمد نسبت به تخمک‌های تازه را نشان می‌دهد.



شکل ۲- مناطق متیلاسیون دیفرانسیل (DMRs) و ژن‌های با بیان متفاوت (DEGs) بین تخمک‌های منجمد شده و تازه

A-B- طول و تعداد DMRها در هر عنصر ژنومی به‌طور معناداری بین تخمک‌های منجمد شده و تازه متفاوت بود:
• هایپرمتیله: مناطقی که سطح متیلاسیون در تخمک‌های منجمد شده به‌طور معناداری بالاتر از تخمک‌های تازه بود.



• هیپومتیله: مناطقی که سطح متیلاسیون در تخمک‌های منجمد شده به‌طور معناداری کمتر از تخمک‌های تازه بود.
C- نمودار Volcano Plot نشان‌دهنده ژن‌های با بیان متفاوت (DEGs) بین تخمک‌های منجمد شده و تازه:

• $|\text{Log}_2 \text{Fold Change}| > 1$ و $p\text{-value} < 0.05$ به‌عنوان معیار شناسایی DEGs.
در تخمک‌های منجمد:

• تعداد ۱۴۲۶ ژن با بیان بالا تنظیم شده (Upregulated DEGs)

• تعداد ۳۳۲۱ ژن با بیان پایین تنظیم شده (Downregulated DEGs) در مقایسه با تخمک‌های تازه.

D- الگوهای بیان و اصطلاحات مرتبط با DEGs با استفاده از تحلیل غنی‌سازی آنتولوژی ژن (GO) در دسته فرآیندهای زیستی (BP) تخمک‌های منجمد نشان‌دهنده تغییرات معنادار در فرآیندهای زیستی نظیر یوبیکوئیتیناسیون هیستون H2A، سازماندهی شبکه آندوپلاسمی، و انتقال با واسطه وزیکول بودند.

این تحلیل تفاوت‌های عمده در متیلاسیون DNA و بیان ژن بین تخمک‌های تازه و منجمد را برجسته کرده و اثرات انجماد شیشه‌ای بر فرآیندهای زیستی کلیدی تخمک‌ها را نشان می‌دهد.

نتایج تحلیل نشان داد که ژن‌های با بیان متفاوت (DEGs) در تخمک‌های تازه، عمدتاً در فرآیندهای متابولیک و زیستی زیر غنی‌سازی شدند (شکل ۲-D):

- سازماندهی میتوکندری
- تنظیم مسیرهای سیگنال‌دهی آپوپتوز
- فرآیندهای متابولیک مرتبط با ATP
- سازماندهی ماتریکس خارج سلولی
- سازماندهی ساختار خارج سلولی

این نتایج نشان می‌دهند که فرآیندهای متابولیک در تخمک‌های تازه به‌وضوح فعال‌تر از تخمک‌های منجمد هستند. در مقابل، در تخمک‌های منجمد، تغییرات قابل توجهی در ساختار کروماتین و ساختار اسکلت سلولی مشاهده شد. این تغییرات ممکن است بر کیفیت و توانایی باروری تخمک‌های منجمد تأثیر منفی بگذارند.

۳-۳. بیان ژن مرتبط با فرآیند متیلاسیون در تخمک‌های منجمد و تازه

متیلاسیون DNA می‌تواند اتصال فاکتورهای رونویسی و عناصر تنظیمی مانند CTCF را مهار کرده و در نتیجه بیان ژن را تحت تأثیر قرار دهد. برای بررسی تغییرات ناشی از انجماد شیشه‌ای در متیلاسیون DNA و بیان ژن، تحلیل‌های مشترکی از DMRs و ژن‌های با بیان متفاوت (DEGs) انجام شد.

۳-۳-۱. تغییرات متیلاسیون و بیان ژن

▪ توزیع DMR ها و DEG ها در ژنوم

– نمودار Manhattan Plot نشان داد که تغییرات متیلاسیون و بیان ژن در سراسر ژنوم تخمک موش (به استثنای

کروموزوم Y) گسترده است (شکل ۳-A).

– در مجموع 1285 DMR شناسایی شد:

* بیشتر DMR ها در نواحی بین‌ژنی قرار داشتند.

* تنها 97 DMR در پروموتورها یا Gene Bodies یافت شد.



▪ ارتباط DMR ها با بیان ژن

از ۹۷ DMR مرتبط با مناطق ژنی، ۸ ژن با نام‌های Efna5، G16Rik2310069، NO3Rik1700030، Metti4، Naf1، AUO18091، Popdc3، و Ethel به‌طور قابل‌توجهی در تخمک‌های منجمد تنظیم شدند. این ژن‌ها در فرآیندهای زیستی نظیر چسبندگی سلول-سلول با واسطه اینتگرین، تنظیم غلظت کلسیم پیش‌سیناپسی، و محلی‌سازی لیپوپروتئین نقش داشتند (شکل ۳-B).

▪ هیپرمتیلاسیون و هیپومتیلاسیون CGI ها

– 19 ژن مرتبط با هیپرمتیلاسیون CGI شامل Nxp4، Plekh3، Sema4C، Rfx8، Tns2، Itga5، Phf10، C2، Foxp4، Lzts2، Adamts14، Unc119b، Hsd11b2، Ctxn1، Map1s، Eef2kmt، O07Rik1810030، Marcks11، و Fbx115 بودند.

– این ژن‌ها در فرآیندهای زیستی نظیر پاسخ سلولی به گنادوتروپین و هورمون محرک فولیکول نقش داشتند و به‌طور قابل‌توجهی در تخمک‌های تازه تنظیم شدند (شکل ۳-C).

▪ ویژگی CGI های متیله

اگرچه CGI های هیپرمتیله جهانی باریک‌تر از CGI های هیپومتیله بودند (شکل ۲-A). هیچ تفاوت معناداری در متیلاسیون پروموتور یا Gene Body مشاهده نشد ($p\text{-value} > 0.05$) (شکل ۳-D).

۳-۲. الگوهای بیان آنزیم‌های مرتبط با متیلاسیون DNA

▪ تفاوت در بیان آنزیم‌ها

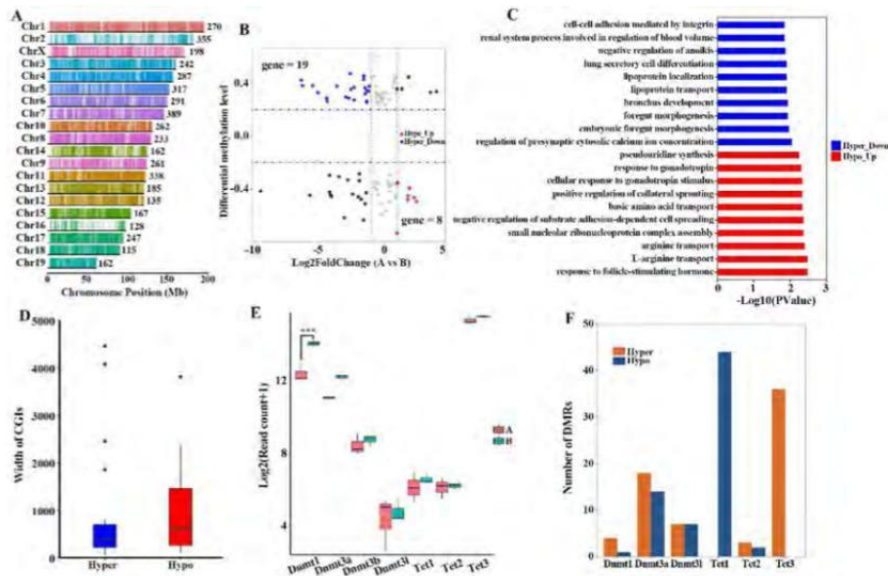
سطح بیان دمیلازهای DNA Tet1، Tet2، Tet3 و متیل ترانسفرازها (Dnmt3b)، (Dnmt3a) تفاوت معناداری بین تخمک‌های منجمد و تازه نداشت (شکل ۳-E و F).
– ژن Tet3 در هر دو گروه تخمک سطح بیان بالایی داشت.

▪ نقش کلیدی Dnmt1:

– ژن Dnmt1، که مسئول حفظ متیلاسیون DNA و کاتالیز متیلاسیون de novo است، به‌طور قابل‌توجهی در تخمک‌های منجمد کاهش یافت.
– تعداد DMR های هیپرمتیله مرتبط با Dnmt1 بیشتر از DMR های هیپومتیله بود.

▪ ارتباط محدود متیلاسیون و بیان ژن

▪ تحلیل‌ها نشان داد که به‌جز Dnmt1، ارتباط کمی بین تغییرات متیلاسیون DNA و بیان ژن‌های دیگر وجود داشت. انجماد شیشه‌ای منجر به تغییرات گسترده در متیلاسیون DNA و بیان ژن می‌شود. کاهش بیان Dnmt1 و تغییرات متیلاسیون مرتبط با آن ممکن است نقش مهمی در اثرات منفی انجماد بر کیفیت تخمک داشته باشد. این یافته‌ها اهمیت حفظ پایداری متیلاسیون و تنظیم ژن‌ها در فرآیند انجماد را برجسته می‌کند.



شکل ۳- تجزیه و تحلیل مشترک متیلاسیون DNA و بیان ژن

- A- نمودار Manhattan Plot توزیع DMRها و تعداد DEGها را در هر کروموزوم نشان می‌دهد. عدد پشت هر کروموزوم نمایانگر تعداد DEGها در آن کروموزوم است.
- B- نمودار پراکندگی مقایسه متیلاسیون DNA و بیان ژن را نشان می‌دهد.
- هر نقطه نمایانگر موقعیتی در نواحی CGI، پروموتور یا Gene Body است.
 - DMRهای هیپرمتیله مرتبط با ژن‌های با بیان پایین (Hyper-down) با رنگ آبی و DMRهای هیپومتیله مرتبط با ژن‌های با بیان بالا (Hypo-up) با رنگ قرمز مشخص شده‌اند.
- C- تحلیل غنی‌سازی آنتولوژی ژن: (GO)
- ژن‌های Hyper-down و Hypo-up به ترتیب در فرآیندهای زیستی مختلف غنی‌سازی شده‌اند.
- D- عرض DMRهایی که در CGI، نواحی پروموتور و Gene Body قرار دارند. تفاوت‌های معناداری در گستره DMRهای هیپرمتیله و هیپومتیله مشاهده شد.
- E- بیان ژن‌هایی که آنزیم‌های مرتبط با متیلاسیون DNA را کد می‌کنند:
- تفاوت معناداری در بیان این ژن‌ها بین تخمک‌های منجمد و تازه وجود نداشت.
- F- تعداد DMRها در نواحی پروموتور و Gene Body ژن‌هایی که آنزیم‌های مرتبط با متیلاسیون DNA را کد می‌کنند.

۴-۳. تخمک‌های منجمد شده نقص GRN را در حفظ متیلاسیون DNA نشان می‌دهند

مطالعات قبلی نشان داد که کاهش بیان Dnmt1 در تخمک‌های منجمد با کاهش سطح کلی متیلاسیون DNA در این تخمک‌ها مرتبط است. برای بررسی دقیق‌تر دلایل کاهش متیلاسیون DNA، الگوهای بیان ژن‌های مرتبط با حفظ متیلاسیون DNA مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که علاوه بر Dnmt1، بیان *knq1ot1* نیز در تخمک‌های منجمد کاهش یافته است.



۳-۴-۱. بازسازی شبکه تنظیم ژن (GRN)

▪ تحلیل SCENIC

- برای شناسایی GRN های مرتبط با Dnmt1 و kcnq1ot1 از تحلیل SCENIC استفاده شد.
- نتایج نشان داد که GRN های مرتبط با این دو ژن در مجموع ۶۸۳ ژن را شامل می‌شوند.
- شبکه اصلی شامل ۲۱ ژن کلیدی بود، از جمله: Dnmt1, kcnq1ot1, smad1, sox5, Jazf1, Rfc2, Phf8, Nfkb2, Zbtb8b, Vezf1, Aff4, Rest, Arid5b, Cux1, Bptf, Dhx36, Rfxank, Crtc2, Atf4, Xrcc4 و Mterf1b (شکل ۴-۴).

▪ اهداف پایین‌دستی ژن‌ها

- Dnmt1 دارای ۵۳۱ ژن هدف پایین‌دستی بود.
- kcnq1ot1 نیز با ۵۱ ژن هدف پایین‌دستی مرتبط بود.

▪ تحلیل عملکردی GRN

- تحلیل غنی‌سازی GO:
- شبکه تنظیمی درگیر فرآیندهای بیولوژیکی متعددی بود، از جمله:

* تعیین الگو

- * تنظیم اتصال رونویسی با الگوی DNA
- * تنظیم مثبت چسبندگی سلولی
- * تنظیم منفی اتصال (شکل ۴-۴).

- تحلیل غنی‌سازی KEGG

- مسیرهای غنی‌شده KEGG شامل موارد زیر بودند:
- * سیگنالینگ تنظیم‌کننده پرتوانی سلول‌های بنیادی
- * مسیر سیگنال‌دهی MAPK
- * رونویسی پایه
- * مسیر سیگنال‌دهی Ras و سایر مسیرهای کلیدی (شکل ۴-۴).

▪ تحلیل DMR های ژن‌ها

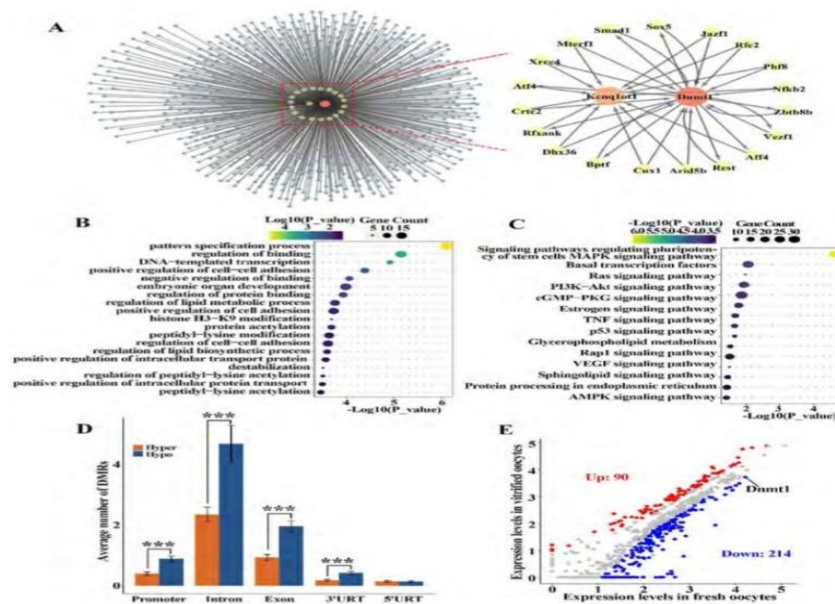
- تعداد DMR های موجود در پروموتورها، اگزونها، اینترون‌ها و نواحی 3' UTR این ژن‌ها بررسی شد.
- نتایج نشان داد که نواحی هیپومتیلاسیون در این مناطق به‌طور معناداری کمتر از نواحی هیپرمتیلاسیون بودند (p-value < 0.001) (شکل ۴-۴).

▪ تفاوت‌های بیان ژنی

- تعداد ژن‌های تنظیم شده:
- از میان ۶۸۳ ژن موجود در GRN های مرتبط با TGF β ، تعداد ۳۰۴ ژن به‌طور متفاوت بین تخمک‌های منجمد و تازه بیان شدند.
- جهت تغییر بیان

* ۲۱۴ ژن از جمله Dnmt1 در تخمک‌های منجمد با بیان پایین تنظیم شدند.
* ۹۰ ژن در تخمک‌های منجمد با بیان بالا تنظیم شدند (شکل ۴-ع).

این یافته‌ها نشان داد که کاهش بیان Dnmt1 و kcnq1ot1 و اختلال در GRN های مرتبط با آن‌ها، می‌تواند عامل کلیدی در کاهش متیلاسیون DNA در تخمک‌های منجمد باشد. این تغییرات نه تنها بر فرآیندهای اپی‌ژنتیکی بلکه بر تنظیم مسیرهای بیولوژیکی کلیدی تأثیر گذاشته و کیفیت تخمک‌های منجمد را کاهش می‌دهد.



شکل ۴- GRN معیوب مربوط به حفظ متیلاسیون DNA در تخمک‌های منجمد شده

A- تجزیه و تحلیل SCENIC شبکه تنظیم ژن (GRN) مرتبط با Dnmt1 و kcnq1ot1 را نشان داد. این شبکه شامل ژن‌های کلیدی است که در تنظیم متیلاسیون DNA و بیان ژن نقش دارند.

B-C تحلیل غنی‌سازی مسیرهای زیستی:

- GO: نشان‌دهنده فرآیندهای زیستی مرتبط با تعیین الگو، تنظیم اتصال رونویسی و چسبندگی سلولی.
- KEGG: شامل مسیرهای کلیدی مانند تنظیم پرتوانی سلول‌های بنیادی، سیگنال‌دهی MAPK، و مسیرهای مرتبط با رونویسی پایه.

• داده‌ها به صورت میانگین (Mean ± SEM) ارائه شده‌اند.

• مقدار $p < 0.001$ به عنوان آماری معنادار در نظر گرفته شده و با *** (سه ستاره) نشان داده شده است.

E- الگوهای بیان ژن‌ها در GRN مرتبط با Dnmt1 و kcnq1ot1 نشان‌دهنده تفاوت‌های معنادار در بیان ژن‌ها بین تخمک‌های تازه و منجمد است، که ممکن است به اختلال در حفظ متیلاسیون DNA و کاهش کیفیت تخمک‌های منجمد منجر شود.

۱۰ اصطلاح GO مرتبط با کیفیت تخمک، شامل فرآیندهایی نظیر رشد تخمک، بلوغ تخمک، تخمک‌گذاری و سایر

فرآیندهای مرتبط با کیفیت تخمک شناسایی شد.

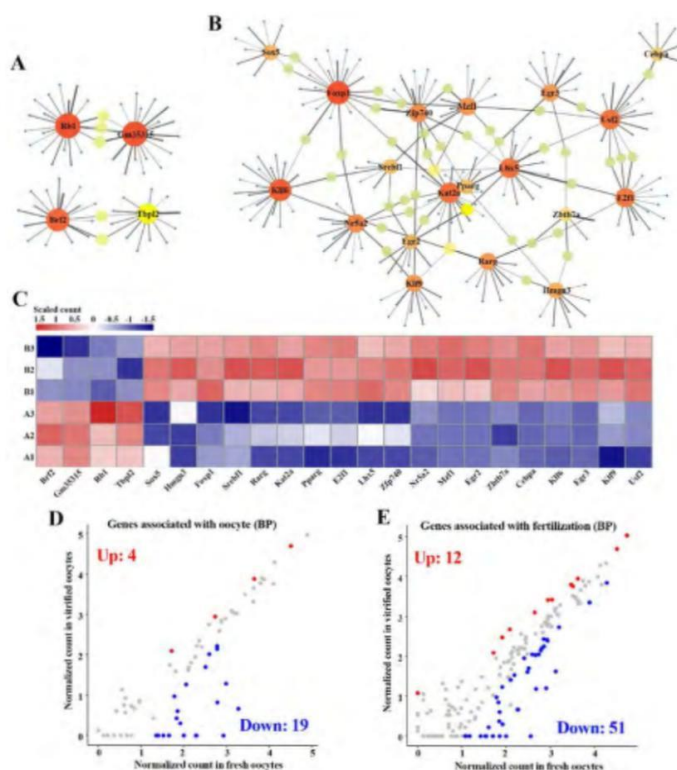
بیشتر ژن‌های با بیان متفاوت DEGs، با $|\log_2FC| > 1$ و $p < 0.05$ در تخمک‌های منجمد تغییر بیان داشتند

(شکل ۵-ع).

این نتایج نشان می‌دهد که انجماد شیشه‌ای می‌تواند بر فرآیندهای کلیدی مرتبط با رشد و بلوغ تخمک تأثیر منفی بگذارد و ممکن است به‌طور قابل توجهی توانایی رشد و پتانسیل لقاح تخمک‌ها را کاهش دهد.

۴. بحث

انجماد شیشه‌ای به‌طور قابل توجهی کارایی حفظ تخمک را بهبود بخشیده و به‌عنوان یک فناوری مؤثر برای حفاظت از باروری زنانی که در معرض خطر از دست دادن باروری به دلایل پزشکی یا افزایش سن هستند، شناخته می‌شود. با این حال، مطالعات متعددی گزارش کرده‌اند که فرآیند انجماد می‌تواند پتانسیل رشد جنینی تخمک‌های پستانداران را کاهش دهد، به‌ویژه در سال‌های اخیر که تحقیقات بیشتری در این زمینه انجام شده است.



شکل ۵- ارزیابی پتانسیل نمو و لقاح تخمک‌های منجمد شده

A-B- مهم‌ترین شبکه‌های تنظیم ژن (GRN) مرتبط با فاکتورهای رونویسی (TFs) در تخمک‌های منجمد و تازه نمایش داده شده است. رابطه بین TF ها و اهداف آن‌ها با معیارهای $Z\text{-score} > 0.9$ و $\text{Importance} > 10$ حفظ شده است.

C- الگوی بیان متفاوت فاکتورهای رونویسی هسته (Core TFs) بین تخمک‌های منجمد و تازه نمایش داده شده است.

D- بیان متفاوت ژن‌ها در ۱۰ اصطلاح GO مرتبط با کیفیت تخمک، شامل فرآیندهایی نظیر رشد تخمک، بلوغ تخمک، و تخمک‌گذاری.

E- بیان متفاوت ژن‌ها در ۱۰ اصطلاح GO مرتبط با لقاح، که نشان‌دهنده تغییرات معنادار در توانایی لقاح تخمک‌های منجمد است.

این نتایج تأثیرات انجماد شیشه‌ای بر کیفیت و توانایی لقاح تخمک‌ها را برجسته می‌کند.



۴-۱. اثرات انجماد بر تخمک‌ها و مکانیسم‌های مولکولی مرتبط

انجماد شیشه‌ای یکی از فناوری‌های مؤثر برای حفظ تخمک‌ها و حفاظت از باروری زنان در معرض خطر از دست دادن باروری به دلایل پزشکی یا مرتبط با سن است. با این حال، مطالعات نشان داده‌اند که متغیرهای ناپهینه در فرآیند انجماد، از جمله نوع و غلظت عوامل انجماد، دمای هسته، سرعت سرد شدن و ذوب، می‌توانند منجر به آسیب سلولی شوند. این عوامل می‌توانند موجب سمیت انجماد، تشکیل کریستال‌های یخ درون سلولی، قطعه‌قطعه شدن DNA، ناپایداری mRNA، تجمع رادیکال‌های آزاد، و عدم تعادل یونی شوند.

این ناهنجاری‌ها، سنتز و حفظ رونوشت‌ها را مختل کرده و به‌ویژه بیان آنزیم‌های اصلاح‌کننده اپی‌ژنتیک را تحت تأثیر قرار می‌دهند. در نتیجه، مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی مرتبط با پیشرفت میوز، لقاح، و رشد جنین دچار اختلال می‌شوند.

تغییرات بیان ژن ناشی از انجماد

مطالعات نشان داده‌اند که انجماد شیشه‌ای می‌تواند بر کنترل اپی‌ژنتیک و بیان ژن تأثیر بگذارد. به‌عنوان مثال، مونزو و همکاران اثرات منفی انجماد شیشه‌ای بر بیان ژن در تخمک‌های MII انسانی را گزارش کرده‌اند. در گونه‌های گاو و خوک نیز انجماد الگوهای بیان ژن را تغییر داده و فرآیندهایی مانند تنظیم رونویسی، تمایز سلولی، میتوز، اسکلت سلولی اکتین، و مسیر آپوپتوز را تحت تأثیر قرار داده است. با این حال، برخی مطالعات مانند گانو و همکاران تفاوت معناداری در بیان ژن بین تخمک‌های منجمد و تازه در موش‌ها گزارش نکرده‌اند.

در مطالعه ما، روی تخمک‌های تازه و منجمد انجام شد. نتایج نشان داد که سطح بیان ژن جهانی در تخمک‌های منجمد به‌طور قابل توجهی کمتر از تخمک‌های تازه بود ($p < 0.001$). همچنین، تخمک‌های منجمد شامل ۱۴۲۶ DEG تنظیم‌شده بالا و ۳۳۲۱ DEG تنظیم‌شده پایین در مقایسه با تخمک‌های تازه بودند.

تأثیر بر مسیرهای زیستی و میتوکندری

ژن‌های تنظیم‌شده در تخمک‌های منجمد عمدتاً در فرآیندهای زیستی مرتبط با ساختار کروماتین و اسکلت سلولی نقش داشتند، مانند:

▪ یوبیکوئیتیناسیون هیستون H2A

▪ سازماندهی شبکه آندوپلاسمی

این فرآیندها در تنظیم رونویسی، ترمیم DNA، و خاموشی ژنی حیاتی هستند. کاهش کیفیت میتوکندری نیز مشاهده شد؛ عواملی مانند اندازه، عملکرد، و تعداد میتوکندری در تخمک‌های بالغ به‌شدت تحت تأثیر انجماد قرار گرفتند. شبکه میتوکندری به نوسانات دما حساس است و آسیب‌های مرتبط می‌توانند بر توانایی لقاح و رشد جنین تأثیر منفی بگذارند.

۴-۲. تغییرات متیلاسیون DNA

مطالعات نشان داده‌اند که انجماد شیشه‌ای ممکن است متیلاسیون DNA را در تخمک‌های پستانداران تغییر داده و منجر به رشد غیرطبیعی جنین شود. نتایج ما نشان داد که متیلاسیون جهانی DNA در تخمک‌های منجمد نسبت به تخمک‌های تازه کاهش یافت و ۱۲۸۵ DMR شناسایی شد:

▪ بیشتر DMR ها در نواحی بین‌ژنی قرار داشتند.

▪ تنها ۹۷ DMR در نواحی پروموتور یا Gene Body مشاهده شد.

تحلیل بیان ژن‌های مرتبط با متیلاسیون نشان داد که بیان DNMT1 در تخمک‌های منجمد به‌طور قابل توجهی کاهش یافت. DNMT1 نقش مهمی در حفظ متیلاسیون DNA و کیفیت تخمک ایفا می‌کند. کاهش بیان آن می‌تواند منجر به متیلاسیون غیرطبیعی DNA و کیفیت پایین جنین شود.

۵. نتیجه‌گیری

مطالعه ما اثرات جهانی انجماد شیشه‌ای را بر متیلاسیون DNA و بیان ژن در تخمک‌ها نشان داد. همچنین تغییرات در فرآیندهای زیستی مرتبط شناسایی شد. نتایج نشان داد که انجماد شیشه‌ای می‌تواند به توانایی رشد و پتانسیل لقاح تخمک‌ها آسیب برساند. تحلیل GRN نشان داد که تعاملات ژنتیکی در تخمک‌های تازه پیچیده‌تر و نزدیک‌تر هستند. این تحقیق بینش‌های جدیدی در مورد اثرات انجماد شیشه‌ای بر تخمک‌ها ارائه کرده و پایه نظری برای بهبود روش‌های انجماد تخمک فراهم می‌کند.

۶. مراجع

1. Argyle, C. E., Harper, J. C. and Davies, M. C. (2016), "Oocyte cryopreservation: Where are we now?" *Human Reproduction Update*, **22**(4), pp 440–449.
2. Barberet, J., Barry, F., Choux, C., Karoui, S., Simonot, R., et al. (2020), "What impact does oocyte vitrification have on epigenetics and gene expression?" *Clinical Epigenetics*, **12**(1), p 121.
3. Bourc'his, D., Xu, G. L., Lin, C. S., Bollman, B. and Bestor, T. H. (2001), "Dnmt3L and the establishment of genomic imprints," *Science*, **294**(5551), pp 2536–2539.
4. Chatterjee, A., Saha, D., Niemann, H., Gryshkov, B. and Hofmann, N. (2017), "Effects of cryopreservation on the epigenetic profile of cells," *Cryobiology*, **74**, pp 1–7.
5. Lei, T., Guo, N., Tan, M. H. and Li, Y. F. (2014), "Effect of mouse oocyte vitrification on mitochondrial membrane distribution," *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, **34**(1), pp 99–102.
6. Liu, L., Hammoud, S., Hammoud, A., Peterson, C. M., & Carrell, D. T. (2011). Differential methylation of pluripotency gene promoters in in vitro matured and vitrified, in vivo-matured mouse oocytes. *Fertility and Sterility*, **95**(6), pp 2094–2099.
7. Monzo, C., Haouzi, D., Roman, K., Assou, S., Dechaud, H. and Hamama, A. (2012), "Vitrification differentially modifies the gene expression profile of human metaphase II oocytes," *Human Reproduction*, **27**(8), pp 2160–2168.
8. Smallwood, S. A., Tomizawa, S., Krueger, F., Ruf, N., Carli, N. and Segonds-Pichon, A. (2011), "Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos," *Nature Genetics*, **43**(8), pp 811–814.
9. Wang, L., Feng, Z. and Zhang, X. W. (2010), "DEGseq: An R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data," *Bioinformatics*, **26**(1), pp 136–138.
10. Zhao, W. H., Zhao, S. J., Wang, H. Y. and Wang, N. (2016), "Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes," *Journal of Pineal Research*, **60**(2), pp 132–141.