Original Article

The Effect of Re-vitrification on Developmental Rate and *Bax*, *Bcl-2*, and *ErbB4* Gene Expressions in Mouse Embryos

Nasrin Majidi Gharenaz[1], Mansoureh Movahedin[2*], Zohreh Mazaheri[3]

1- M.Sc., Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: Postal Code: 1411713116, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: movahed.m@modares.ac.ir

Received: 08/Nov/2015, Accepted: 05/Jan/2016

Abstract

Objective: Vitrification is a convenient, effective method for freezing and storing embryos. Under certain situations, such as an unsuitable endometrial environment, extra embryos can be re-vitrified for future use. There is inadequate data on the effects of re-vitrification on embryos, so we have evaluated the effects of re-vitrification on the development rate and expression of apoptotic and implantation genes.

Methods: Female NMRI mice, ages six-eight weeks were super-ovulated with 7.5 IU PMSG and 7.5 IU hCG. Females were mated with males from the same strain and inspected for the presence of vaginal plugs the following morning. Females with the presence of vaginal plugs were considered to be pregnant and killed 62 h post hCG injection. Eight-cell embryos were flushed from their oviducts and subsequently divided into three experimental groups: fresh, vitrified-warmed 8-cell embryos, and re-vitrified-warmed blastocyst embryos. RNA was extracted and we used real-time PCR to evaluate expressions of *Bax*, *Bcl-2*, and *ErbB4*. Data was analyzed by the chi-square and ANOVA tests.

Results: A significant difference existed in blastocyst formation rate, degeneration rate, and expressions of *Bax*, *Bcl-2*, and *ErbB4* in re-vitrified embryos compared to fresh embryos.

Conclusion: The vitrification and warming process did not affect the developmental rate and expressions of *Bax*, *Bcl-2*, and *ErbB4* in the eight-cell stage embryos. However, we observed a change in development rate and expression rates of *Bax*, *Bcl-2*, and *ErbB4* after re-vitrification in the early blastocyst stage.

Keywords: Re-vitrification, Apoptosis, Implantation, Blastocyst

Pathobiology Research, Vol. 18 (2015-2016), No. 4, Pages: 61-70

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-25]

مقاله اصیل

تأثیر انجماد شیشه‌ای مجدد بر میزان تکوین و بیان ژن‌های *Bax*، *Bcl-2* و *ErbB4* در جنین‌های موشی

نسرین مجیدی قره ناز[1]، منصوره موحدین[2*]، زهره مظاهری[3]

۱- کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲-استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳-استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریحی
Email: movahed.m@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۴/۰۸/۱۸ پذیرش مقاله: ۹۴/۱۰/۱۶

چکیده

هدف: انجماد شیشه‌ای به‌عنوان روش مناسب و مؤثری برای فریز و نگهداری جنین‌ها شناخته شده است. در برخی از شرایط مانند آماده نبودن آندومتر گیرنده می‌توان جنین‌های اضافی را مجدداً منجمد نمود تا بعداً مورد استفاده قرار گیرد. اطلاعات در مورد آثار انجماد مجدد روی جینین‌ها اندک است، بنابراین این مطالعه آثار انجماد مجدد را روی میزان تکوین و بیان ژن‌های مربوط به مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و لانه‌گزینی جنین‌های موش بررسی می‌کند.

مواد و روش‌ها: موش‌های ماده نژاد NMRI 6-8 هفته با استفاده از تزریق ۷/۵ واحد بین‌المللی PMSG و ٤٨ ساعت بعد ۷/۵ واحد بین‌المللی HCG تحریک تخمک‌گذاری و سپس در کنار موش نر قرار داده شدند. پس از بررسی پلاک واژنی، جنین های ۸ سلولی جمع‌آوری و به سه گروه شامل گروه کنترل (جنین‌های غیر انجمادی)، گروه آزمون یک (جنین‌های ۸ سلولی یک بار منجمد شده) و گروه آزمون دو (جنین‌های بلاستوسیست اولیه دو بار منجمد شده) تقسیم شدند. در پایان پس از استخراج RNA، بیان ژن‌های *Bcl-2*، *Bax* و *ErbB4* با روش Real time PCR ارزیابی شد. داده‌های حاصل با آزمون مجذور کای و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه ارزیابی شد.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان داد که میزان تشکیل بلاستوسیست ثانویه و تخریب و بیان ژن‌های مورد مطالعه در گروه انجماد مجدد نسبت به گروه غیر انجمادی تفاوت معنی‌داری داشت.

نتیجه‌گیری: فرآیند انجماد و گرم کردن در مرحله هشت سلولی تأثیری بر میزان تکوین و بیان ژن‌های مورد مطالعه نداشت اما پس از انجماد مجدد در مرحله بلاستوسیست اولیه، میزان تکوین و بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl-2* و *ErbB4* تغییر یافت.

کلیدواژگان: انجماد شیشه‌ای مجدد، مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، بیان ژن لانه‌گزینی، بلاستوسیست

پژوهش های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۴، صفحات: ۶۱-۷۰

مقدمه

در روش کمک باروری انجماد جنین‌ها پتانسیل یک چرخه لقاح آزمایشگاهی را از لحاظ اخلاقی، مالی و پزشکی افزایش می‌دهد. انجماد شیشه‌ای جنین‌ها دارای مزایای مختلفی از جمله کاهش خطر نشانگان تحریک تخمک‌گذاری، جلوگیری از چند قلوزایی و حفظ باروری برای بیماران تحت شیمی‌درمانی و پرتودرمانی است [۱، ۲]. نتایج مطالعات نشان دهنده بهبود پیامد بارداری بعد از انتقال جنین‌های منجمد-ذوب شده است [۳-۵]. در برخی از مواقع تعداد جنین‌های ذوب شده برای انتقال بیش از تعداد مورد نیاز است. برای جلوگیری از دور ریخته شدن جنین‌های اضافی، می‌توان آن‌ها

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-25]

را مجدداً منجمد نمود و بعداً مورد استفاده قرار داد. فراهم کردن فرصت برای انجماد مجدد جنین‌ها، بیماران را برای انتقال تعداد کمتر جنین‌ها به‌منظور جلوگیری از چند قلوزایی تشویق می‌کند. همچنین می‌توان جنین‌های منجمد شده را برای بررسی بیماری‌های ژنتیکی ذوب نمود و سپس مجدداً منجمد نمود [٦]. انجماد مجدد جنین‌ها با روش انجماد آهسته در جنین‌های موشی، گاوی و انسانی انجام شده است [٧-٩]. انجماد آهسته یک روش وقت‌گیر و نیازمند تجهیزات گران‌قیمت است؛ بنابراین روش انجماد شیشه‌ای مطرح شد. در این روش از ابتدا جنین‌ها در معرض غلظت بالایی از ضد یخ‌ها قرار می‌گیرد و سپس بلافاصله درون نیتروژن مایع قرار می‌گیرد که منجر به انجماد شیشه‌ای مایعات بدون تشکیل کریستال یخ می‌شود [١٠].

نتایج مطالعات نشان داده است که به کارگیری روش‌های انجمادی، با وجود نقش غیر قابل انکار در درمان افراد نابارور می‌تواند تأثیرات نامطلوبی بر فراساختار سلولی از جمله سازماندهی میکروتوبول‌ها و توزیع میتوکندری‌ها داشته باشد و حتی موجب راه‌اندازی پاسخ استرسی و فعال شدن آبشار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) شود [١١-١٣]. مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده رایج‌ترین فرم مرگ سلولی است که نقش مهمی را در تکوین و تمایز ارگانیسم‌های پر سلولی ایفا می‌کند [١٤]. مطالعات نشان داده است که در میان پروتئین‌های و ژن های مختلف درگیر در مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده اعضای خانواده *Bcl-2* نقش مهمی را در تنظیم فرآیند مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده ایفا می‌کند. اعضای این خانواده در دو گروه پروآپوپتوزی و آنتی‌آپوپتوزی طبقه‌بندی می‌شوند. پروتئین Bcl-2 به‌وسیله تنظیم رها شدن سیتوکروم C از میتوکندی از القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده جلوگیری می‌کند و موجب بقای سلول می‌شود، [١٥] در حالی‌که افزایش بیان *Bax* مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده را تسریع می‌کند. همچنین محققان نشان دادند که نسبت بیان *Bcl-2* به *Bax* تعیین‌کننده این هست که سلول کدام یک از مسیر بقا یا مرگ سلولی را در پیش گیرد [١٦].

لانه‌گزینی یک فرآیند پیچیده و نیازمند برهم کنش مناسب بین تروفواکتوردم بلاستوسیست (Blastocyst trophectoderm) و اپی‌تلیوم رحم مادری است. *ErbB4* یک ژن درگیر در لانه‌گزینی است که در اثر بر هم کنش با HB-EGF (Heparin-binding EGF-like growth factor) چسبندگی آغازین بلاستوسیست را به اپی‌تلیوم رحمی واسطه‌گری می‌کند [١٧]. اطلاعات در مورد آثار انجماد شیشه‌ای مجدد بر بیان این ژن‌ها اندک است، بنابراین در این مطالعه آثار انجماد مجدد بر میزان تکوین و بیان ژن‌های *Bax*، *ErbB4* و *Bcl-2* در جنین‌های موشی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

نگهداری حیوانات

در این مطالعه از موش سفید نژاد NMRI با سن ٦-٨ هفته استفاده شد. این حیوانات آزمایشگاهی از مؤسسه پاستور کرج تهیه شدند و به‌مدت ١٠ روز در خانه حیوانات در دانشگاه تربیت مدرس در شرایط (١٢ ساعت نور و ١٢ ساعت تاریکی و ٢±٢٢ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. لازم به ذکر است که اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی به تصویب کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس رسیده است.

تحریک تخمک‌گذاری و جمع‌آوری جنین

با تزریق داخل صفاقی ٧/٥ واحد بین المللی PMSG (Pregnant Mar´s Serum Gonadotropin) (IntervetInc، هلند) و به دنبال آن پس از ٤٨ ساعت با تزریق ٧/٥ واحد بین المللی HCG (Human Chorionic Gonadotropin) (Pregnil، هلند) تحریک تخمک‌گذاری صورت گرفت. موش‌های ماده بلافاصله پس از تزریق HCG برای جفت‌گیری به‌صورت یک به یک با موش‌های نر بالغ از همان نژاد با سن ٨-١٠ هفته در یک قفس قرار گرفتند. برای اطمینان از وقوع جفت‌گیری، صبح روز بعد موش‌های ماده ار نظر وجود پلاک واژن بررسی شدند. موش های دارای پلاک واژن به عنوان موش

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-25]

باردار انتخاب شدند. برای به‌دست آوردن جنین ۸ سلولی از موش‌های ماده باردار با گذشت ۶۰-۶۲ ساعت پس از تزریق HCG موش‌ها قطع نخاع شدند و لوله‌های رحمی آن‌ها خارج شد [۱۸]. لوله‌ها بلافاصله در قطره‌های محیط HTF (Human Tubal Fluid) با HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Geneocellideal، ایران) حاوی ۱۰ درصد سرم آلبومین انسانی (Human serum albumin) (Biotest، آلمان) قرار داده شد و سپس با تزریق مقداری از همین محیط به داخل لوله‌های رحمی‌توسط یک سرنگ انسولین ۱ سی سی، با سر سرنگ مخصوص جنین‌های هشت سلولی از لوله خارج شدند.

گروه‌های مطالعه

جنین‌های هشت سلولی به‌دست آمده به‌طور تصادفی به سه گروه کنترل، آزمون یک و آزمون دو تقسیم شدند.

در گروه کنترل، جنین‌های هشت سلولی در قطره‌های کشت HTF حاوی ۱۰ درصد سرم آلبومین انسانی به‌مدت ۳ روز تا مرحله بلاستوسیست ثانویه کشت داده شدند.

در گروه آزمون یک، جنین‌ها در مرحله هشت سلولی منجمد و گرم شد و سپس به‌مدت ۳ روز تا مرحله بلاستوسیست ثانویه کشت داده شدند.

در گروه آزمون دو، جنین‌ها در مرحله هشت سلولی منجمد و گرم شده و سپس به‌مدت مدت ۳۰-۳۶ ساعت کشت داده شد و مجدداً در مرحله بلاستوسیست اولیه منجمد و گرم شدند و به‌مدت یک روز کشت داده شدند تا به مرحله بلاستوسیست ثانویه برسند.

ملاک انتخاب جنین‌های زنده تعداد بلاستومرهای (Blastomere) مرده بود، به‌طوری که جنین‌های با بیش از ۵۰ درصد بلاستومر مرده از مطالعه حذف شد.

روش انجماد شیشه‌ای جنین‌ها

به‌منظور انجام انجماد شیشه‌ای جنین‌ها، ازروش کوواياما (Kuwayama) و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از کرایولاک (Cryo Lock) (Biotech، آمریکا) استفاده شد [۱۹]. در مرحله انجماد شیشه‌ای، جنین‌ها به محلول تعادل منتقل شد و به‌مدت ۸ دقیقه (جنین‌های هشت سلولی) و ۱۵ دقیقه (جنین‌های بلاستوسیست) در محلول تعادل باقی ماندند. محلول تعادل حاوی ۷/۵ درصد اتیلن گلیکول (Ethylene glycol) (Sigma، آلمان) و ۷/۵ درصد دی متیل سولفوکسید (Dimethyl sulfoxide: DMSO) (Sigma، آلمان) حل شده در HTF دارای ۱۰ درصد آلبومین انسانی است. سپس جنین‌ها به محلول انجمادی منتقل شد و به‌مدت یک دقیقه در آن باقی ماندند. محلول انجمادی حاوی ۱۵ درصد اتیلن گلیکول و ۱۵ درصد DMSO و ۰/۵ مول بر لیتر ساکارز (Sigma، آلمان) حل شده در HTF دارای ۱۰ درصد آلبومین انسانی بود. در نهایت جنین‌ها روی کرایولاک منتقل و بلافاصله وارد نیتروژن مایع شدند.

روش گرم‌کردن جنین‌ها

پس از گذشت دو ساعت از انجماد شیشه‌ای، جنین‌ها طی ۳ مرحله گرم شدند. پس از خارج کردن کرایولاک از نیتروژن مایع، بلافاصله در محلول ساکارز یک مول (۳۷ درجه سانتی‌گراد) فرو برده شد. جنین‌ها به‌مدت یک دقیقه در قطره محلول ساکارز یک مول باقی ماند و سپس به محلول ساکارز ۰/۵ مولار انتقال یافت و به‌مدت ۳ دقیقه در این محلول باقی ماند. سپس به محلول ساکارز ۰/۲۵ مولار انتقال یافت و به‌مدت ۳ دقیقه در این محلول باقی ماند. در نهایت جنین‌ها از محلول ساکارز ۰/۲۵ مول خارج شدند و در ۶ تا ۷ قطره که از قبل انکوبه شده بودند، شسته و در محیط کشت HTF بدون HEPES در انکوباتور قرار گرفتند.

بررسی مولکولی جنین‌ها با روش RT-PCR

برای بررسی میزان بیان ژن‌های *Bcl-2*، *Bax* و *ErbB4* از RT-qPCR (Real time quantitative PCR) استفاده شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-25]

ابتدا جنین‌های تکوین یافته در هر سه گروه جمع‌آوری شد، سپس RNA کل جنین‌ها (۱۵۰ جنین) با استفاده از کیازول (Qiagen، آلمان) استخراج شد و پس از تیمار با آنزیم DNase (Sigma، آلمان)، با استفاده از آنزیم کپی‌برداری معکوس (Reverse Transcription) به cDNA تبدیل شد. ساخت cDNA براساس کیت Fermentas (Thermo Scientific، آمریکا) انجام شد.

cDNA ساخته شده، با روش RT-PCR تکثیر و بررسی شد [۱۸]. هر واکنش PCR با استفاده از مخلوط اصلی PCR (PCR master mix) و سایبر گرین (SYBR Green) در دستگاه ABI Step One (Applied Biosystems، آمریکا) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

توالی آغازگرهای (Primers) پیشرو و معکوس اختصاصی برای ژن های مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 طراحی شد. GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) به‌عنوان ژن مرجع و توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ ارایه شده است. ۴۰ چرخه برای هر چرخه RT-PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شد. درستی هر منحنی تکثیر (Amplification) توسط منحنی ذوب (Melting) و با استفاده از دمای اختصاصی ذوب که برای محصول هر ژن اختصاصی است، تأیید شد. میزان بیان هر ژن هدف نسبت به ژن مرجع با استفاده از فرمول $^{-\Delta\Delta CT}$ ۲ محاسبه شد.

جدول ۱ توالی آغازگرهای پیشرو و معکوس اختصاصی برای ژن‌های مورد مطالعه

ژن	توالی آغازگر	طول (جفت باز)	شماره دستیابی	دما (درجه سانتی‌گراد)
GAPDH	پیشرو: 5´-GACTTCAACAGCAACTCCCAC-3´ معکوس: 5´- TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3´	۱۲۵	NM_001289726.1	۸۰
Bax	پیشرو: 5´- CGGCGAATTGGAGATGAACTG-3´ معکوس: 5´-GCAAAGTAGAAGAGGGCAA-3´	۱۶۱	XM_006540584.1	۸۳/۵
Bcl-2	پیشرو: 5´- ACCGTCGTGACTTCGCAGAG -3´ معکوس: 5´- GGTGTGCAGATGCCGGTTCA -3´	۲۳۹	NM_009741.1	۸۴
ErbB4	پیشرو: 5´-TACGAGCCTGCCCAAGTTC- 3´ معکوس: 5´- GTGCCGATTCCATCACATCCT- 3´	۱۰۳	XM_006536907.1	۷۴/۵

بررسی‌های آماری نتایج

تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از شمارش بلاستوسیست‌ها و میزان تکوین آن‌ها با استفاده از آزمون مجذور کای (Chi-square) برای ارزیابی میزان بقای بلاستوسیست های منجمد و گرم شده در گروه‌های آزمایشی مختلف انجام گرفت. برای ارزیابی داده‌های حاصل از RT-qPCR، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-way Analysis of Variance: ANOVA) و آزمون تکمیلی توکی (Tukey) استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) انجام گرفت و معنی‌داری در سطح $P\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. داده‌های به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SD) حاصل از سه تکرار ارایه شده است.

نتایج

میزان تکوین به بلاستوسیست ثانویه

میزان تکوین به بلاستوسیست ثانویه در گروه‌های آزمون یک (انجماد در مرحله هشت سلولی) ۸۸/۸ درصد بود که نسبت به گروه کنترل (غیر انجمادی) ۹۲/۵ درصد تفاوت معنی‌داری نداشت. این میزان درگروه آزمون دو (انجماد مجدد در مرحله بلاستوسیست اولیه) ۸۱/۷ درصد بود که نسبت به گروه یک بار

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-25]

انجمادی تفاوت مشاهده شده معنی‌دار نبود؛ اما نسبت به گروه غیر انجمادی تفاوت معنی‌داری بود (P<(۰/۰۵) (جدول ۲). این نتایج نشان می‌دهد که انجماد مجدد جنین‌ها باعث کاهش معنی‌داری در میزان تکوین جنین‌ها تا مرحله بلاستوسیست ثانویه می‌شود.

میزان تخریب جنین

میزان تخریب‌ها در گروه‌های آزمون یک (انجماد در مرحله هشت سلولی) و کنترل (غیر انجمادی) به‌ترتیب ۱۱/۲ درصد و ۷/۵ درصد بود که تفاوت مشاهده شده از نظر آماری معنی‌دار نبود. زمانی‌که جنین ها برای بار دوم در مرحله بلاستوسیست اولیه منجمد و گرم شدند، میزان تخریب جنین‌ها به ۱۸/۳ درصد افزایش یافت. این میزان تخریب در گروه انجماد مجدد، نسبت به گروه یک بار انجمادی تفاوت معنی‌داری نداشت؛ اما نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌دار بود. این نتایج نشان می‌دهد که انجماد مجدد جنین‌ها باعث افزایش معنی‌دار در میزان تخریب جینن‌ها می‌شود (جدول ۲).

جدول ۲ میزان کلی تشکیل بلاستوسیست و تخریب جنین‌ها

گروه‌های مطالعه	میزان تشکیل بلاستوسیست ثانویه(درصد)	میزان کلی تخریب (درصد)
کنترل (جنین‌های ۸ سلولی منجمد نشده)	۹۲/۵	۷/۵
آزمون یک (جنین‌های ۸ سلولی منجمد شده)	۸۸/۸	۱۱/۲
آزمون دو (جنین‌های بلاستوسیست دو بارمنجمد شده)	۸۱/۷*	۱۸/۳*

*: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل وجود دارد (P< ۰/۰۵)

شکل ۱ جنین‌های ۸ سلولی غیر منجمد (الف)، جنین‌های ۸ سلولی بعد از انجماد و گرم کردن (ب) و جنین‌های بلاستوسیست بعد از انجماد مجدد (ج)، بزرگنمایی ۲۰۰×

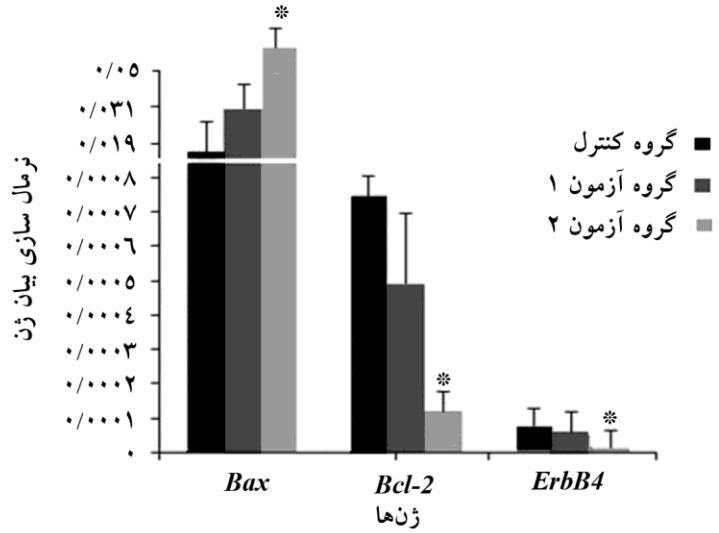
میزان بیان ژن‌های مربوط به مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و لانه‌گزینی

همان‌گونه که در شکل ۱ دیده می‌شود، میزان بیان ژن *Bax* به‌عنوان یک ژن پروآپوپتوزی، در گروه انجماد مجدد تفاوت معنی‌داری با گروه یک بار انجماد نداشت، در حالی‌که نسبت به گروه غیر انجمادی به‌طور معنی‌داری بالاتر بود (P <۰/۰۵).

میزان بیان ژن *Bcl-2* به‌عنوان یک ژن آنتی‌آپوپتوزی تفاوت معنی‌داری را بین جنین‌های یک بار انجماد و انجماد مجدد نشان نداد؛ در حالی‌که این میزان در جنین‌های انجماد مجدد نسبت به جنین‌های غیر انجمادی پایین‌تر بود. به‌عنوان نتیجه می‌توان گفت که میزان بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl-2* بین دو گروه انجماد مجدد (آزمون۲) و یک بار انجمادی (آزمون ۱) مشابه بود.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-25]

میزان بیان ژن *ErbB4* به‌عنوان یک ژن لانه‌گزینی بین دو گروه انجماد مجدد و یک بار انجماد مشابه بود، در حالی‌که این میزان در گروه انجماد مجدد نسبت به گروه غیر انجمادی به طور معنی‌داری پایین‌تر بود (P <۰/۰۵) (شکل ۱ و ۲).



شکل ۲ الگوی بیان نسبی ژن‌های مربوط به مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و لانه‌گزینی در گروه‌های مورد مطالعه نتایج به‌دست آمده در هر ژن با استفاده از ژن مرجع نرمالیزه و با گروه کنترل کالیبره شده است. اعداد به‌صورت میانگین ± انحراف معیار و از ۳ تکرار به‌دست آمده است. گروه کنترل) جنین‌های ۸ سلولی غیر منجمد، گروه آزمون ۱) جنین‌های ۸ سلولی منجمد و گرم شده، گروه آزمون ۲) جنین‌های بلاستوسیست اولیه دو بار منجمد و گرم شده. *: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل وجود دارد

بحث

نتایج مطالعهٔ حاضر نشان داد که انجماد شیشه‌ای جنین‌ها منجر به تغییر معنی‌داری در میزان تکوین آن‌ها به بلاستوسیست ثانویه نمی‌شود، در حالی‌که انجماد جنین‌ها برای بار دوم، منجر به کاهش میزان تکوین آن‌ها به بلاستوسیست ثانویه می‌شود. برخی از محققین گزارش نمودند که انجماد شیشه‌ای مجدد تأثیری بر میزان بقا و تکوین جنین‌ها ندارد [۱، ۲۰] شیهان و همکاران (۲۰۰۶) جنین‌های موش را ابتدا در مرحله یک سلولی منجمد و پس از گرم کردن، مجدداً در مراحل ۲ سلولی، ۸ سلولی و بلاستوسیست منجمد نمودند. نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد که تکوین به مرحله ۸ سلولی در روز سوم و بلاستوسیست در روز پنجم تحت تأثیر انجماد مجدد قرار نگرفت. گرچه بیشترین میزان خروج از زونا (Zona) در گروه کنترل (غیر انجمادی) مشاهده شد [۱]. تفاوت مطالعه آن‌ها با مطالعه حاضر افزودن آسکوربات (Ascorbate) به‌عنوان آنتی‌اکسیدان ها به محیط کشت است. افزودن آنتی‌اکسیدان به محیط کشت می‌تواند رادیکال‌های آزاد از محیط کشت بزداید و تأثیر خوبی بر میزان تکوین و تمایز سلولی داشته باشد زیرا رادیکال های آزاد دارای پتانسیل آسیب به DNA و فسفولیپید غشای جنین است [۲۱، ۲۲]. در مطالعهٔ دیگری که توسط فتحی و همکاران (۲۰۰۴) انجام شد، جنین‌های ٤ سلولی موش پس از انجماد شیشه‌ای و ۲ ساعت کشت مجدداً در همان مرحله تکوینی منجمد شد [۲۰]. کشت جنین‌ها در محیط کشت تا مرحله تکوینی بالاتر احتمالاً دلیلی بر تفاوت نتایج بین مطالعه حاضر و فتحی خواهد بود. در تأیید مطالعه حاضر، کروجی و همکاران (۲۰۰٤) نیز نشان دادند که میزان جنین‌های

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-25]

در حال خروج یا خارج شده از زونا در دو گروه کنترل و منجمد–ذوب شده بعد از ۹۶ ساعت کشت تفاوت معنی‌دار نداشت. اگر چه ۲۴ ساعت آغازین تفاوت معنی‌دار بود و دلیل آن را حذف آثار منفی ناشی از انجماد طی کشت اعلام نمودند [۲۳]. گایر (Gayar) و همکاران گزارش نمودند که میزان تکوین جنین‌ها پس از یک و دو بار انجماد شیشه‌ای تفاوت معنی‌داری را با جنین‌های تازه نشان نداد در حالی‌که انجماد برای بار سوم توسط تعداد کثیری از جنین‌ها تحمل نشد [۲۴]. این مطلب نشان می‌دهد که جنین‌ها طی انجمادهای پی در پی استرس‌هایی را متحمل می‌شوند. به‌نظر می‌رسد که قرار گرفتن مجدد جنین‌ها در معرض غلظت بالایی از ضد یخ‌ها دارای تأثیراتی سو بر میزان تکوین آن‌ها است. نتایج مطالعات نشان داده است که ضد یخ‌هایی مانند DMSO می‌توند موجب اختلال در سازماندهی میکروتوبول‌ها و نحوهٔ توزیع میتوکندری‌ها در جنین گونه‌های مختلف از جمله انسان و موش شود [۲۵، ۲۶]. مختل شدن میتوکندری‌ها نفوذپذیری سلول‌ها را به یون کلسیم افزایش داد و منجر به افزایش کلسیم داخل سلولی و فعال شدن آنزیم‌های هیدرولیزی و اختلال تولید انرژی و در نهایت مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده می‌شود [۲۷]. آپوپتوز یک مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است که توسط ژن‌های خانواده Bcl-2 کنترل می‌شود [۱۴]. بنابراین در این مطالعه بیان دو ژن از این خانواده شامل *Bax* به‌عنوان پروآپوپتوزی و *Bcl-2* به‌عنوان آنتی‌آپوپتوزی بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن‌های مربوط به مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده بعد از یک بار انجماد شیشه‌ای تفاوت معنی‌داری با جنین‌های تازه ندارد، در حالی‌که انجماد شیشه‌ای مجدد جنین‌ها منجر به تغییر معنی‌داری می‌شود. با توجه به این‌که میزان تکوین جنین‌ها نیز پس از انجماد به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد، می‌توان گفت که ارتباط قوی بین کاهش میزان تکوین و تغییر بیان ژن‌های مربوط به مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده وجود دارد. به‌طوری‌که دالهی (Dalhi) و همکاران (۲۰۰۷) نیز گزارش نمودند که میزان بقا و تکوین پایین جنین‌های زیگوت و ۲ سلولی منجمد و ذوب شده را می‌توان به وجود مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در جنین‌ها نسبت داد. نتایج آن‌ها نشان داد که ارتباط بسیار قوی بین پتانسیل بقا و تغییر فعالیت رونویسی Bax، p53 و Bcl-2 وجود دارد [۲۸]. همچنین در ادامه مطالعه میزان بیان ژن *ErbB4* به‌عنوان ژن لانه‌گزینی نیز بررسی شد. در فرآیند لانه‌گزینی بر هم کنش میان ErbB4 و HB-EGF چسبندگی آغازین بلاستوسیست را به اپی‌تلیوم مجرای رحمی واسطه‌گری می‌کند [۱۷]. نتایج مطالعه نشان داد که میزان بیان این ژن به‌طور معنی‌داری در جنین‌های انجماد مجدد کاهش می‌یابد که می‌تواند در میزان لانه‌گزینی تأثیرگذار باشد. اما توجه به این نکته ضروریست که لانه‌گزینی یک فرآیند پیچیده و نیازمند بر هم کنش بسیاری از عوامل دیگر است. بنابراین بررسی تغییر سایر عوامل دخیل در لانه‌گزینی در اثر انجماد شیشه‌ای مجدد برای تعیین اثر آن در میزان لانه‌گزینی لازم و ضروری است.

نتایج مطالعات حاضر نشان داد که انجماد شیشه‌ای جنین‌ها منجر به تغییر در بیان ژن‌های مربوط به مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده *Bax* و *Bcl-2* و ژن لانه‌گزینی *ErbB4* می‌شود. همچنین میزان تکوین جنین‌ها به بلاستوسیست ثانویه نیز تحت تأثیر انجماد مجدد قرار می‌گیرد.

با این حال ژن‌های مورد استفاده در این مطالعه تنها ژن‌های درگیر در مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و لانه‌گزینی نیست و لازم است که مطالعه روی ژن‌های دیگر مرتبط با فرآیند مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و لانه‌گزینی در موش و نیز سایر گونه‌ها مورد مطالعه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته علوم تشریح دانشکده علوم پزشکی است و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-25]

منابع

[1] Sheehan CB, Lane M, Gardner DK. The CryoLoop facilitates re-vitrification of embryos at four successive stages of development without impairing embryo growth. Hum Reprod 2006; 21(11): 2978-84.

[2] Elnahas A, Alcolak E, Marar EA, Elnahas T, Elnahas K, Palapelas V, Diedrich K, Al-Hasani S. Vitrification of human oocytes and different development stages of embryos: An overview Middle East Fertility Society Journal 2010; 15(1): 2-9.

[3] Aytoz A, Van den Abbeel E, Bonduelle M, Camus M, Joris H, Van Steirteghem A, Devroey P. Obstetric outcome of pregnancies after the transfer of cryopreserved and fresh embryos obtained by conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1999; 14(10): 2619-24.

[4] Belva F, Henriet S, Van den Abbeel E, Camus M, Devroey P, Van der Elst J, Liebaers I, Haentjens P, Bonduelle M. Neonatal outcome of 937 children born after transfer of cryopreserved embryos obtained by ICSI and IVF and comparison with outcome data of fresh ICSI and IVF cycles. Hum Reprod 2008; 23(10): 2227-38.

[5] Pelkonen S, Koivunen R, Gissler M, Nuojua-Huttunen S, Suikkari AM, Hydén-Granskog C, Martikainen H, Tiitinen A, Hartikainen AL. Perinatal outcome of children born after frozen and fresh embryo transfer: the Finnish cohort study 1995-2006. Hum Reprod 2010; 25(4): 914-23.

[6] Matsumoto H, Jiang JY, Tanaka T, Sasada H, Sato E. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. Cryobiology 2001; 42(2): 139-44.

[7] Vitale NJ, Myers MW, Denniston RS, Leibo SP, Godke RA. In-vitro development of refrozen mouse embryos. Hum Reprod 1997; 12(2): 310-6.

[8] Farhat M, Zentner B, Lossos F, Bdolah Y, Holtzer H, Hurwitz A. Successful pregnancy following replacement of embryos previously refrozen at blastocyst stage: case report. Hum Reprod 2001; 16(2): 337-9.

[9] Smith LK, Roots EH, Dorsett MJ. Live birth of a normal healthy baby after a frozen embryo transfer with blastocysts that were frozen and thawed twice. Fertil Steril 2005; 83(1): 198-200.

[10] Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. Anim Reprod Sci 2000; 60-61: 357-64.

[11] Wu C, Rui R, Dai J, Zhang C, Ju S, Xie B, Lu X, Zheng X. Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes. Mol Reprod Dev 2006; 73(11): 1454-62.

[12] Mozdarani H, Moradi SZ. Effect of vitrification on viability and chromosome abnormalities in 8-cell mouse embryos at various storage durations. Biol Res 2007; 40(3): 299-306.

[13] Park SY, Kim EY, Cui XS, Tae JC, Lee WD, Kim NH, Park SP, Lim JH. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. Zygote 2006; 14(2): 125-31.

[14] Spanos S, Rice S, Karagiannis P, Taylor D,

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-25]

Becker DL, Winston RM, Hardy K. Caspase activity and expression of cell death genes during development of human preimplantation embryos. Reproduction 2002; 124(3): 353-63.

[15] Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. Science 1997; 275(5303): 1129-32.

[16] Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell 1993; 74(4): 609-19.

[17] Paria BC, Das SK, Andrews GK, Dey SK. Expression of the epidermal growth factor receptor gene is regulated in mouse blastocysts during delayed implantation. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90(1): 55-9.

[18] Shin MR, Choi HW, Kim MK, Lee SH, Lee HS, Lim CK. In vitro development and gene expression of frozen-thawed 8-cell stage mouse embryos following slow freezing or vitrification. Clin Exp Reprod Med 2011; 38(4): 203-9.

[19] Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. Reprod Biomed Online 2005; 11(5): 608-14.

[20] Fathi R, Valojerdi MR, Yazdi PE, Ebrahimi B, Alipour H, Hassani F. Development of 4-cell mouse embryos after re-vitrification. Cryobiology 2012; 64(1): 23-6.

[21] Lane M, Maybach JM, Gardner DK. Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. Hum Reprod 2002; 17(10): 2686-93.

[22] Meister A. On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione. Biochem Pharmacol 1992; 44(10): 1905-15.

[23] Koruji S M, Movahedin M, Rezazadeh Valojerdi M. Assessment of epidermal growth factor (EGF) effects on development of vitrified mouse morulae to the blastocyst stage. IBJ 2004; 8(2) :77-82.

[24] El-Gayar M, Gauly M, Holtz W. In vitro and in vivo survival of mouse blastocysts after repeated vitrification with the open pulled straw (OPS) method. Cryo Letters 2010; 31(6): 454-9.

[25] Sathananthan AH, Trounson A, Freemann L, Brady T. The effects of cooling human oocytes. Hum Reprod 1988; 3(8): 968-77.

[26] Vincent C, Pickering SJ, Johnson MH, Quick SJ. Dimethylsulphoxide affects the organisation of microfilaments in the mouse oocyte. Mol Reprod Dev 1990; 26(3): 227-35.

[27] Liu L, Hammar K, Smith PJ, Inoue S, Keefe DL. Mitochondrial modulation of calcium signaling at the initiation of development. Cell Calcium 2001; 30(6): 423-33.

[28] Dhali A, Anchamparuthy VM, Butler SP, Pearson RE, Mullarky IK, Gwazdauskas FC. Gene expression and development of mouse zygotes following droplet vitrification. Theriogenology 2007; 68(9): 1292-8.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-25]