

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

Nasrin Majidi Gharenaz<sup>1</sup>, Mansoureh Movahedin<sup>2\*</sup>, Zohreh Mazaheri<sup>3</sup>

- 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

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

نسرین مجیدی قره ناز<sup>۱</sup>، منصوره موحدین<sup>۲\*</sup>، زهره مظاهری<sup>۳</sup>

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: تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریحی

Email: movahed.m@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۴/۱۰/۱۶

دریافت مقاله: ۹۴/۰۸/۱۸

## چکیده

**هدف:** انجماد شیشه‌ای به عنوان 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 جنین‌ها 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 ۴۸ ساعت بعد ۷/۵ واحد بین‌المللی HCG تحریک تخمک‌گذاری و سپس در کنار موش نر قرار داده شدند. پس از بررسی پلاک واژنی، جنین‌های 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 *Bcl-2* و *Bax* و *ErbB4* تغییر یافت.

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

پژوهش‌های آسیب‌شناسی 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 قلوژی 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

## بررسی میزان تکوین و بیان ژن در جنین‌های انجماد مجدد

لانه‌گزینی یک فرآیند پیچیده و نیازمند برهم کنش مناسب بین تروفوکتوردم بلاستوسیست (*Blastocyst trophectoderm*) و اپی‌تلیوم رحم مادری است. *ErbB4* یک ژن درگیر در لانه‌گزینی است که در اثر برهم کنش با HB-EGF (Heparin-binding EGF-like growth factor) چسبندگی آغازین بلاستوسیست را به اپی‌تلیوم رحمی واسطه‌گری می‌کند [۱۷]. 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 ۶-۸ هفته استفاده شد. این حیوانات آزمایشگاهی از مؤسسه پاستور کرج تهیه شدند و به مدت ۱۰ روز در خانه حیوانات در دانشگاه تربیت مدرس در شرایط (۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و  $22 \pm 2$  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 ۷/۵ واحد بین‌المللی PMSG (*Pregnant Mar's Serum Gonadotropin*) (Intervet Inc) هلند) و به دنبال آن پس از ۴۸ ساعت با تزریق ۷/۵ واحد بین‌المللی HCG (*Human Chorionic Gonadotropin*) (Pregnil، هلند) تحریک تخمک‌گذاری صورت گرفت. موش‌های ماده بلافاصله پس از تزریق HCG برای جفت‌گیری به صورت یک به یک با موش‌های نر بالغ از همان نژاد با سن ۸-۱۰ هفته در یک قفس قرار گرفتند. برای اطمینان از وقوع جفت‌گیری، صبح روز بعد موش‌های ماده از نظر وجود پلاک واژن بررسی شدند. موش‌های دارای پلاک واژن به عنوان موش

را مجدداً منجمد نمود و بعداً مورد استفاده قرار داد. فراهم کردن فرصت برای انجماد مجدد جنین‌ها، بیماران را برای انتقال تعداد کمتر جنین‌ها به منظور جلوگیری از چندقلوایی تشویق می‌کند. همچنین می‌توان جنین‌های منجمد شده را برای بررسی بیماری‌های ژنتیکی ذوب نمود و سپس مجدداً منجمد نمود [۶]. انجماد مجدد جنین‌ها با روش انجماد آهسته در جنین‌های موشی، گاو و انسانی انجام شده است [۷-۹]. 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 [۱۰].

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 [۱۱-۱۳]. مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده رایج‌ترین فرم مرگ سلولی است که نقش مهمی را در تکوین و تمایز ارگان‌سیم‌های پر سلولی ایفا می‌کند [۱۴]. مطالعات نشان داده است که در میان پروتئین‌های ژن‌های 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 پروآپتوزی و آنتی‌آپتوزی طبقه‌بندی می‌شوند. پروتئین *Bcl-2* به وسیله تنظیم رها شدن سیتوکروم C از میتوکندری از القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده جلوگیری می‌کند و موجب بقای سلول می‌شود، [۱۵] در حالی که 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 [۱۶].

(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 به مدت 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 به مدت 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 گرم کردن 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 به مدت یک دقیقه در قطره محلول ساکارز یک مول باقی ماند و سپس به محلول ساکارز ۰/۵ مولار انتقال یافت و به مدت ۳ دقیقه در این محلول باقی ماند. سپس به محلول ساکارز ۰/۲۵ مولار انتقال یافت و به مدت 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 *Bax*، *Bcl-2* و *ErbB4* از RT-qPCR (Real time quantitative PCR) استفاده شد.

باردار انتخاب شدند. برای به دست 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)-) (Geneocellideal) (1-piperazineethanesulfonic acid Human serum) (۱۰ درصد سرم آلبومین انسانی) (Biotest, آلمان) قرار داده شد و سپس با تزریق مقدار از همین محیط به داخل لوله‌های رحمی توسط یک سرنگ انسولین ۱ سی سی، با سر سرنگ مخصوص جنین‌های هشت سلولی از لوله خارج شدند.

### گروه‌های مطالعه

جنین‌های هشت سلولی به دست آمده به طور 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 به مدت ۳ روز تا مرحله بلاستوسیست ثانویه کشت داده شدند. در گروه آزمون یک، جنین‌ها در مرحله هشت سلولی منجمد و گرم شد و سپس به مدت ۳ روز تا مرحله بلاستوسیست ثانویه کشت داده شدند. در گروه آزمون دو، جنین‌ها در مرحله هشت سلولی منجمد و گرم شده و سپس به مدت ۳۰-۳۶ ساعت کشت داده شد و مجدداً در مرحله بلاستوسیست اولیه منجمد و گرم شدند و به مدت یک روز کشت داده شدند تا به مرحله بلاستوسیست ثانویه برسند. ملاک انتخاب جنین‌های زنده تعداد بلاستومرهای (Blastomere) مرده بود، به طوری که جنین‌های با بیش از ۵۰ درصد بلاستومر مرده از مطالعه حذف شد.

### روش انجماد شیشه‌ای جنین‌ها

به منظور انجام انجماد شیشه‌ای جنین‌ها، از روش کوویاما

## بررسی میزان تکوین و بیان ژن در جنین‌های انجماد مجدد

توالی آغازگرهای (Primers) پیشرو و معکوس اختصاصی برای ژن‌های مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 طراحی شد. GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) به عنوان ژن مرجع و توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ ارائه 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  $2^{-\Delta\Delta CT}$  محاسبه شد.

ابتدا جنین‌های تکوین یافته در هر سه گروه جمع‌آوری شد، سپس RNA کل جنین‌ها (۱۵۰ جنین) با استفاده از کیت DNase (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 (Thermo Scientific) Fermentas (آمریکا) انجام شد. cDNA ساخته شده، با روش RT-PCR تکثیر و بررسی شد [۱۸]. هر واکنش PCR با استفاده از مخلوط اصلی PCR master mix) و سایر گرین (SYBR Green) در دستگاه (ABI Step One، Applied Biosystems، آمریکا) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

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

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

گرفته شد. داده‌های به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (Mean  $\pm$  SD) حاصل از سه تکرار ارائه شده است.

## نتایج

### میزان تکوین به بلاستوسیست ثانویه

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

## بررسی‌های آماری نتایج

تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از شمارش بلاستوسیست‌ها و میزان تکوین آن‌ها با استفاده از آزمون آزمون مجذور کای (Chi-square) برای ارزیابی میزان بقای بلاستوسیست‌های منجمد و گرم شده در گروه‌های آزمایشی مختلف انجام گرفت. برای ارزیابی داده‌های حاصل از RT-PCR، 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  $P \leq 0.05$  در نظر

۷/۵ درصد بود که تفاوت مشاهده شده از نظر آماری معنی دار نبود. زمانی که جنین‌ها 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 انجماد تفاوت معنی داری نداشت؛ اما نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی دار بود. این نتایج نشان می‌دهد که انجماد مجدد جنین‌ها باعث افزایش معنی دار در میزان تخریب جنین‌ها می‌شود (جدول ۲).

انجمادی تفاوت مشاهده شده معنی دار نبود؛ اما نسبت به گروه غیر انجمادی تفاوت معنی داری بود ( $P < 0/05$ ) (جدول ۲). این نتایج نشان می‌دهد که انجماد مجدد جنین‌ها باعث کاهش معنی داری 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) به ترتیب ۱۱/۲ درصد و

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 بار منجمد شده)	۸۱/۷*	۱۸/۳*

\*: تفاوت معنی دار با گروه کنترل وجود دارد ( $P < 0/05$ )



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  $\times 200$

### میزان بیان ژن‌های مربوط به مرگ سلولی

#### برنامه‌ریزی شده و لانه‌گزینی

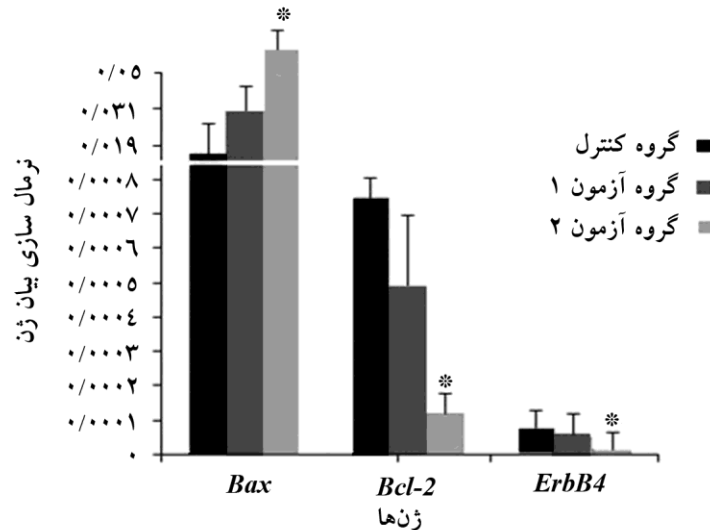
همان‌گونه که در شکل ۱ دیده می‌شود، میزان بیان ژن *Bax* به عنوان یک ژن پروآپتوزی، در گروه انجماد مجدد تفاوت معنی داری با گروه یک بار انجماد نداشت، در حالی که نسبت به گروه غیر انجمادی به طور معنی داری بالاتر بود ( $P < 0/05$ ).

میزان بیان ژن *Bcl-2* به عنوان یک ژن آنتی آپتوزی تفاوت معنی داری را بین جنین‌های یک بار انجماد و انجماد مجدد نشان نداد؛ در حالی که این میزان در جنین‌های انجماد مجدد نسبت به جنین‌های غیر انجمادی پایین تر بود. به عنوان نتیجه می‌توان گفت که میزان بیان ژن‌های *Bcl-2* و *Bax* بین دو گروه انجماد مجدد (آزمون ۲) و یک بار انجمادی (آزمون ۱) مشابه بود.

## بررسی میزان تکوین و بیان ژن در جنین‌های انجماد مجدد

میزان در گروه انجماد مجدد نسبت به گروه غیر انجمادی به طور معنی داری پایین تر بود ( $P < 0/05$ ) (شکل ۱ و ۲).

میزان بیان ژن *ErbB4* به عنوان یک ژن لانه‌گزینی بین دو گروه انجماد مجدد و یک بار انجماد مشابه بود، در حالی که این



شکل ۲ الگوی بیان نسبی ژن‌های مربوط به مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و لانه‌گزینی در گروه‌های مورد مطالعه نتایج به دست آمده در هر ژن با استفاده از ژن مرجع نرمالیزه و با گروه کنترل کالیبره شده است. اعداد به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار و از ۳ تکرار به دست 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 معنی دار با گروه کنترل وجود دارد

## بحث

کنترل (غیر انجمادی) مشاهده شد [۱]. تفاوت مطالعه آن‌ها با مطالعه حاضر افزودن آسکوربات (Ascorbate) به عنوان آنتی‌اکسیدان‌ها 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 رادیکال‌های آزاد دارای پتانسیل آسیب به DNA و فسفولپید غشای جنین است [۲۱، ۲۲]. در مطالعه دیگری که توسط فتحی و همکاران (۲۰۰۴) انجام شد، جنین‌های ۴ 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 (۲۰۰۴) نیز نشان دادند که میزان جنین‌های

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که انجماد شیشه‌ای جنین‌ها منجر به تغییر معنی داری در میزان تکوین آن‌ها به بلاستوسیست ثانویه نمی‌شود، در حالی که 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

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 حالی که 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. به نظر می‌رسد که قرار گرفتن مجدد جنین‌ها در معرض غلظت بالای 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 نحوه 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 حالی که انجماد شیشه‌ای مجدد جنین‌ها منجر به تغییر معنی‌داری می‌شود. با توجه به این که 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.



- [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] Aytöz 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, Henriët 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, Nuojuu-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,

- 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.