

تأثیر کاهش حجم حفره بلاستوسل قبل از انجماد شیشه‌ای بر بقا و کیفیت جنین‌های برون‌تنی موش از طریق بررسی میزان بیان ژن *Fgf4*

روناک صحتی^۱، فرح فرخی^۲، مرتضی دلیری^۳، مجتبی دشتی‌زاد^{۴*}

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات نشان داده است هرچند نرخ لانه‌گزینی بلاستوسیست در مقایسه با مراحل قبل، بالاتر است، اما در مقابل، نرخ بقای رویان‌های ذوب‌شده در این مرحله نسبت به مراحل دیگر پایین‌تر بوده که می‌تواند ناشی از وجود حفره پر از مایع بلاستوسل و افزایش احتمال تشکیل کریستال‌های یخ باشد. همچنین وجود این مایع می‌تواند به‌عنوان مانعی در مقابل نفوذ مواد محافظ سرما به داخل جنین عمل کند. در این مطالعه با سوراخ کردن مصنوعی (Artificial Collapse, AC)، تأثیر کاهش حجم مایع حفره بلاستوسل، قبل از انجماد شیشه‌ای بر کیفیت رویان‌های ذوب‌شده برون‌تنی موش با بررسی نرخ بقا، خروج بلاستوسیست از زونا پلوسیدا و نیز میزان بیان ژن *Fgf4* بررسی شد.

روش بررسی: در این مطالعه، بلاستوسیست‌های برون‌تنی موش در سه گروه قرار گرفتند. گروه اول پس از کاهش حجم حفره بلاستوسل و گروه دوم بدون کاهش حجم حفره بلاستوسل، منجمد و ذوب شدند و بلاستوسیست‌های گروه سوم، بدون انجماد و هیچ تیمار دیگری به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. میزان بیان ژن *Fgf4* توسط تکنیک Real-time PCR ارزیابی گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی Duncan تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: AC قبل از انجماد شیشه‌ای، نرخ خروج بلاستوسیست از زونا پلوسیدا و نیز میزان بیان ژن *Fgf4* را در مقایسه با گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری افزایش داد ($p \leq 0/05$).

نتیجه‌گیری: طبق نتایج این مطالعه می‌توان AC قبل از انجماد شیشه‌ای را به‌عنوان یک روش کارآمد برای بهبود نرخ لانه‌گزینی در نظر گرفت.

کلیدواژه‌ها: سوراخ کردن مصنوعی؛ بلاستوسیست؛ ژن *Fgf4*؛ انجماد شیشه‌ای.

^۱دانشجوی کارشناس ارشد بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۲دانشیار بافت‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۳آستادیار ایمنی‌شناسی جنین، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

^۴آستادیار زیست‌شناسی تولیدمثل و سیتوژنتیک، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

مجتبی دشتی‌زاد، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

dashtizad@nigeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۲۵

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۲۴

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Sehati R, Farokhi F, Daliri M, dashtizad M. The effect of the reduction of volume of blastocoel cavity before vitrification on viability and quality of in vitro mouse blastocyst through assessment of *fgf4* gene expression. Qom Univ Med Sci J 2015;9(3):39-48. [Full Text in Persian]

مقدمه

در سالهای اخیر، به‌منظور بالابردن احتمال لانه‌گزینی و افزایش نرخ حاملگی موفق، ناشی از انتقال رویان‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی (In Vitro Fertilization, IVF)، توجه ویژه‌ای به بهینه‌سازی شرایط کشت رویان و انتقال در مرحله بلاستوسیت شده است. در سیکل‌های درمانی IVF، به‌طور معمول تعداد ۲-۳ عدد جنین ۴-۸ سلولی به رحم فرد گیرنده انتقال می‌یابد که نسبت به انتقال جنین در مرحله بلاستوسیت، نرخ حاملگی پایین‌تر است. بنابراین، می‌توان با استفاده از محیط‌های کشت متوالی و تکامل رویان تا مرحله بلاستوسیت در شرایط آزمایشگاهی، نسبت به انتقال رویان در این مرحله اقدام نمود. انتقال یک بلاستوسیت به دلیل پتانسیل رشد و تکوین بالاتری که رویان در این مرحله نسبت به مراحل اولیه تسهیم دارا می‌باشد، نه تنها باعث بهبود نرخ آبستنی می‌شود؛ بلکه با کاهش احتمال چندقلوایی در حفظ سلامتی مادر و نوزاد نیز نقش به‌سزایی ایفا می‌کند (۱-۳). مطالعات اخیر ثابت کرده است رویان‌هایی که تا رسیدن به مرحله بلاستوسیت قادر به حفظ توان زیستی خود نیستند، به احتمال زیاد دارای تعدادی کروموزوم غیرطبیعی می‌باشند. بنابراین، کشت رویان تا مرحله بلاستوسیت می‌تواند گزینشی برای از بین رفتن رویان‌های دارای اختلالات ژنتیکی و بقای رویان‌های سالم باشد (۴). از دیگر مزیت‌های انتقال رویان در مرحله بلاستوسیت می‌توان به هماهنگی بیشتر رویان در این مرحله با دیواره رحم اشاره کرد (۵-۷). یکی از عوامل محدودکننده انتقال بلاستوسیت، انجماد و نگهداری رویان در این مرحله به شمار می‌رود. با توجه به انتقال یک رویان به رحم، مازاد رویان‌ها باید برای استفاده در سیکل‌های درمانی بعدی و یا اهداء به دیگر زوج‌های نابارور، منجمد و محفوظ گردند. نگهداری رویان به دو روش انجماد آهسته و انجماد شیشه‌ای صورت می‌گیرد. روش اول بر پایه استفاده از غلظت‌های پایین مواد محافظ سرما و کاهش تدریجی دما استوار بوده که به‌دلیل احتمال بالای تشکیل کریستال‌های یخ و نرخ برودتی پایین، اغلب با کاهش نرخ بقای سلول‌ها بعد از ذوب همراه است. در روش دوم، به‌واسطه استفاده ترکیبی از مواد محافظ سرما در غلظت‌های بالا و تماس مستقیم رویان با کمترین حجم از محلول انجماد با ازت مایع، امکان

انجماد شیشه‌ای رویان‌ها بدون تشکیل کریستال یخ میسر می‌باشد. هرچند انجماد را می‌توان در تمامی مراحل مختلف تکوین رویان، از دو سلولی تا بلاستوسیت انجام داد، اما چالشی که در این زمینه وجود دارد کسب نرخ بالای بقا و افزایش احتمال موفقیت در لانه‌گزینی پس از ذوب و انتقال است. در این میان، رویان‌های منجمدشده در مراحل اولیه تسهیم دارای نرخ بقای بالاتری نسبت به بلاستوسیت هستند، ولی از طریق ویژگی‌های مورفولوژیکی، قابل پیش‌بینی در ادامه روند تکاملی نبوده و ریسک عدم موفقیت در حاملگی را بالا می‌برند و این امر ما را به سمت انجماد بلاستوسیت سوق می‌دهد. اما مشکل عمده‌ای که در مورد انجماد بلاستوسیت وجود دارد، وجود حفره پر از مایع بلاستوسل بوده که سرعت انتقال مواد محافظ سرما و دسترسی آنها را به سلول‌های داخلی محدود و پتانسیل تشکیل کریستال‌های یخ را افزایش می‌دهد. برای رفع این مشکل، باید از غلظت‌های بالاتر مواد محافظ سرما استفاده کرد و یا رویان را مدت زمان بیشتری در معرض این مواد قرار داد که هرکدام خود از عوامل آسیب‌زا برای رویان محسوب می‌شوند (۸). ژن *Fgf4* از مهم‌ترین ژن‌هایی است که طی روزهای ۳/۵ و ۴/۵ رویانی در توده سلولی داخلی بیان می‌شود و در تکثیر سلول‌های تروفوکتودرم و حفظ این لایه، همچنین در تمایز اندودرم اولیه نقش دارد (۹-۱۱). در این مطالعه، با انجام AC قبل از انجماد شیشه‌ای، حجم مایع حفره بلاستوسل کاهش و کیفیت رویان‌های ذوب‌شده از لحاظ مورفولوژیک با سنجش نرخ بقا (بازگشت رویان‌ها به شکل طبیعی) و نرخ بلاستوسیت‌های خارج‌شده از زونا پلوسیدا و از لحاظ مولکولی با بررسی میزان بیان ژن *Fgf4*، ارزیابی گردید.

روش بررسی

در این تحقیق از موش‌های سوری نژاد NMRI (موش‌های ماده با سن ۷-۸ هفته و موش‌های نر با سن ۱۰-۱۲ هفته) استفاده شد. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۱۸-۲۳ درجه سانتیگراد نگهداری شدند و محدودیتی از نظر دسترسی به آب و غذا نداشتند. جهت تحریک تخمک‌گذاری، در روز اول به میزان ۸ واحد بین‌المللی هورمون گنادوتروپین سرم مادیان آبتن (Intervet، A007A02، Folligon®) به‌صورت

داخل صفاقی به موش‌های ماده تزریق شد. پس از گذشت ۴۸-۴۶ ساعت، تزریق داخل صفاقی هورمون گنادوتروپین جفتی انسان (Darou Pakhsh، 111، Pregnyl®) جهت آزادسازی تخمک‌ها، به میزان ۷ واحد بین‌المللی صورت گرفت.

حداقل چهار ساعت قبل از استحصال تخمک، جهت جمع‌آوری و شست و شوی تخمک‌ها، محیط M2 به همراه سدیم پیروات (P4562, Sigma) و آلبومین سرم گاوی (10106GibcoBRL) در یک پتری دیش ۱۵×۶۰ میلی‌متری (Nunc, 150288, Denmark) گذاشته شد و پس از پوشاندن سطح آنها با روغن معدنی استریل (Sigma) M-5310، پتری دیش در انکوباتور (Memmert, Germany) با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد، رطوبت ۹۷٪ و دی‌اکسید کربن ۵٪ قرار گرفت. جهت جداسازی و ظرفیت‌پذیری اسپرم، از محیط TCM 199 {حاوی ۲/۲ گرم بر میلی‌لیتر سدیم بی‌کربنات، ۲۵ میلی‌مولار بافر هیپس (12340-030, GibcoBRL)} به همراه آلبومین سرم گاوی ۱۰٪ استفاده گردید. حدود ۱۵-۱۳ ساعت بعد از تزریق هورمون گنادوتروپین جفتی انسان به موش ماده، موش نر به روش جابجایی مهره‌های گردنی کشته و به پشت خوابانده شد و با ایجاد برش در پوست و لایه صفاقی، حفره شکمی نمایان شد. اسپرم‌ها از دم اپیدیدیم استخراج و به مدت یک ساعت در محیط ظرفیت‌پذیری اسپرم (درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد، رطوبت ۹۷٪ و دی‌اکسید کربن ۵٪) قرار گرفتند.

برای استحصال تخمک حدود ۱۶-۱۴ ساعت بعد از تزریق هورمون گنادوتروپین جفتی انسان، موش ماده نیز به روش جابجایی مهره‌های گردنی کشته شد و پس از نمایان شدن حفره شکمی و آشکار شدن رحم، اویداکت‌ها و تخمدان‌ها؛ اویداکت‌ها با قیچی از رحم و تخمدان‌ها جدا و به قطره M2 منتقل شدند. در زیر استرنومیکروسکوپ (smz1000, Nikon, Japan) ناحیه آمپولای آنها به وسیله یک سوزن پاره و توده‌های تخمک-کومولوس آزاد شدند. این توده‌ها بعد از شست و شو در قطره‌های M2، درون انکوباتور (با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد، رطوبت ۹۷٪ و دی‌اکسید کربن ۵٪) نگهداری شدند. برای انجام لقاح آزمایشگاهی از محیط HTF به همراه ۵/۳۳ میلی‌مولار سدیم پیروات و ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلبومین سرم

گاوی و گلو تاتیون (071M1804V, Sigma) استفاده شد. در پتری دیش ۱۰×۳۵ میلی‌متری (Nunc, Denmark, 153066) قطره‌هایی با حجم تقریبی ۵۰ ماکرولیتر از محیط HTF گذاشته شد و پس از پوشاندن سطح آنها با روغن معدنی استریل، حداقل ۴ ساعت قبل از شروع لقاح در انکوباتور قرار گرفتند. در هر قطره HTF، ۱۵-۱۰ عدد تخمک به همراه کومولوس که از لحاظ ظاهری طبیعی بودند قرار داده شد و اسپرم با غلظت یک میلیون در حجم یک میلی‌لیتر به هر قطره اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت درون انکوباتور (با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد، رطوبت ۹۷٪ و دی‌اکسید کربن ۵٪) نگهداری شدند. جهت کشت رویان از محیط KSOM {حاوی ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سدیم پیروات، ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی، جنتامایسین (Bio-West, L0011-010) و ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمی (E4127, Sigma)} استفاده شد. چهار قطره با حجم تقریبی ۲۵۰ ماکرولیتر از محیط KSOM، درون پتری دیش ۱۵×۶۰ میلی‌متری گذاشته شد، سپس سطح آنها با روغن معدنی استریل پوشانده شد. در ادامه، پس از ریختن ۴۰۰ ماکرولیتر از محیط KSOM در هر چاهک از پلیت چهار حفره‌ای (176740, Nunc, Denmark)، سطح آنها با همین حجم از روغن معدنی استریل پوشانده شد. تخمک‌های لقاح‌یافته پس از شست و شو به دیش چهارخانه حاوی KSOM منتقل و به مدت ۷۲ ساعت درون انکوباتور (با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد و رطوبت ۹۵٪ و دی‌اکسید کربن ۵٪) قرار گرفتند.

برای سوراخ کردن بلاستوسیست از دستگاه میکرومنیپولاتور (Narishige, 10291, Japan) که مجهز به یک میکروسکوپ معکوس (Nikon eclipse Ti-U, Japan) و صفحه گرم‌کننده (Nikon TI-SR, Japan) می‌باشد، استفاده گردید. در یک پتری دیش ۱۰×۳۵ با حجم ۴ ماکرولیتر، محیط M2 گذاشته شد و بعد از پوشاندن سطح آن با روغن معدنی استریل، حداقل چهار ساعت قبل از شروع کار در انکوباتور قرار گرفت. بلاستوسیست‌های رشدیافته به‌طور جداگانه توسط پیپت پاستور درون هریک از قطره‌های M2 قرار گرفتند. سپس بلاستوسیست در زیر میکروسکوپ و با استفاده از سوزن‌های تزریق و نگهدارنده نصب‌شده بر روی دستگاه، به گونه‌ای مهار گردید که

سلول‌های توده داخلی در راستای حرکت ورود و خروج سوزن به درون رویان نباشند. سپس سوزن تزریق به آرامی از بین سلول‌های تروفوکتودرم وارد رویان شد (تا نزدیکی سوزن نگهدارنده). بعد از چند ثانیه، سوزن به آرامی درحالی که رویان همچنان به وسیله فشار منفی سوزن نگهدارنده ثابت مانده بود، بیرون کشیده شد. این مراحل برای تمامی بلاستوسیس‌ها بر روی صفحه گرم در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انجام شد.

جهت انجام انجماد شیشه‌ای از محیط TCM199 و ۲۰٪ سرم رویان گاوی به عنوان محیط پایه برای شست و شو استفاده شد و برای متعادل‌سازی از محیط پایه به همراه ۷/۵٪ دی‌متیل سولفوکساید (D-2650, Sigma) و ۷/۵٪ اتیلن گلیکول (324558, Sigma) استفاده گردید، محلول انجماد شامل محیط پایه به همراه ۱۵٪ دی‌متیل سولفوکساید و ۱۵٪ اتیلن گلیکول و ساکارز (S-9387, Sigma) ۰/۵ مولار بود. بلاستوسیس‌ها روی کرایوتاپ (81111-81115, Kitazato) با کمترین حجم محیط انجماد، بارگیری و درون ازل فرو برده شدند. برای ذوب رویان‌ها از محیط پایه به همراه ساکارز یک مولار به عنوان محیط اصلی ذوب رویان، از محیط پایه به همراه ساکارز ۰/۵ مولار به عنوان محیط رقیق‌سازی و صرفاً از محیط پایه به عنوان محیط شست و شو استفاده گردید. تمام محلول‌های انجماد و ذوب یک ساعت قبل از شروع کار در دمای اتاق قرار گرفتند.

در نهایت، رویان‌های ذوب‌شده به محیط KSOM انتقال داده شدند و پس از ۱۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. درصد بقا، از طریق اتساع مجدد رویان‌ها و نرخ خروج بلاستوسیس‌ها از زونا پلوسیدا با بررسی به وسیله استرئومیکروسکوپ مشخص گردید. برای استخراج RNA تام از بلاستوسیس‌ها، از کیت استخراج RNA (RNeasy Plus Micro Kit® 74034, Qiagen) استفاده شد و طبق پروتکل نوشته‌شده در کیت، RNA استخراج شد. میزان غلظت RNA استخراج‌شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific, America) به روش اسپکتروفتومتری سنجیده شد. نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ معیاری برای بررسی عدم وجود آلودگی پروتئین در نظر گرفته شد. برای سنتز cDNA از کیت AccuPower RocketScript RT PreMix (Bioneer) استفاده گردید. واکنش مطابق با دستورالعمل موجود در کیت و با استفاده از پرایمرهای تصادفی تهیه گردید و واکنش سنتز cDNA در دستگاه ترموسایکلر (Peqlab, Germany) در شرایط دمایی ۱۵ درجه سانتیگراد برای ۳ دقیقه، ۵۰ درجه سانتیگراد برای ۶۰ دقیقه و ۹۵ درجه سانتیگراد برای مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. توالی پرایمرهای رفت و برگشت ژن *Fgf4* و ژن بتا دو میکروگلوبین ($\beta 2M$) توسط برنامه Oligo5 طراحی و اختصاصی‌بودن آن به وسیله Primer-BLAST مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول شماره ۱). ژن $\beta 2M$ به عنوان ژن کنترل داخلی (Housekeeping) در نظر گرفته شد.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای رفت و برگشت ژن *Fgf4* و $\beta 2M$

ژن	پرایمر	توالی ۵' به ۳'	طول توالی (جفت باز)	دمای اتصال (درجه سانتیگراد)	طول محصول (جفت باز)
<i>Fgf4</i>	رفت	CGCAGACACGAGGGACAGT	۱۹	۵۷	۱۳۸
	برگشت	TCGTCCGTAAAGAAAGGCACAC	۲۱	۵۷	
$\beta 2M$	رفت	CCTGGTCTTTCTGGTGCTTGT	۲۱	۵۷	۱۱۸
	برگشت	GCAGTTCAGTATGTTCCGGCTTC	۲۲	۵۷	

مرحله واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه، مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. همچنین مرحله واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه لحاظ گردید. در پایان، محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند.

PCR کیفی در حجم نهایی ۱۵ ماکرولیتر، با استفاده از کیت شرکت Ampliqon انجام شد. به منظور تهیه واکنش، ۷/۵ ماکرولیتر از مخلوط اصلی ۲x (2x Master Mix)، ۴ پیکومول از هر آغازگر و ۱ ماکرولیتر cDNA با یکدیگر ترکیب شدند و حجم نهایی با آب تنظیم شد. واکنش PCR کیفی در دستگاه ترموسایکلر (Peqlab, Germany) در ۳۲ چرخه حرارتی شامل:

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون‌های واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی Duncan تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از الکتروفورز ژن *Fgf4* در شکل نشان داده شده است. در ردیف ۱ وزن مولکولی DNA، در ردیف ۲ محصول PCR ژن *Fgf4* به طول ۱۳۸ جفت باز و در ردیف ۳ محصول PCR ژن $\beta 2M$ به طول ۱۱۸ جفت باز نمایش داده شده است.

ژل در ظرف حاوی اتیدیوم بروماید به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و پس از شستشو در آب، در دستگاه Transilluminator تحت اثر اشعه UV باندها، مشاهده گردید. اندازه‌گیری کمی میزان تکثیر cDNA در دستگاه ABI (Applied Bio Systems) انجام گرفت. ترکیبات مورد نیاز این واکنش با حجم کلی ۱۵ ماکرولیتر تهیه شد که شامل ۷/۵ ماکرولیتر از مخلوط Syber green ۲x، ۴ پیکومول از هر آغازگر، ۳ ماکرولیتر cDNA و ۰/۳ ماکرولیتر رنگ ROX بود. میزان بیان ژن *Fgf4* براساس ژن $\beta 2M$ به عنوان ژن کنترل داخلی نرمال شده و تغییرات بیان به روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید.



شکل: الکتروفورز PCR ژن‌های *Fgf4* و $\beta 2M$ بر روی ژل آگارز ۱٪

نرخ بقای رویان در گروه AC در مقایسه با گروه انجماد، تغییر معنی‌داری نداشت، در حالی که میزان خروج از زونا پلوسیدا در این گروه نسبت به گروه انجماد، به طور معنی‌داری افزایش نشان داد (جدول شماره ۲).

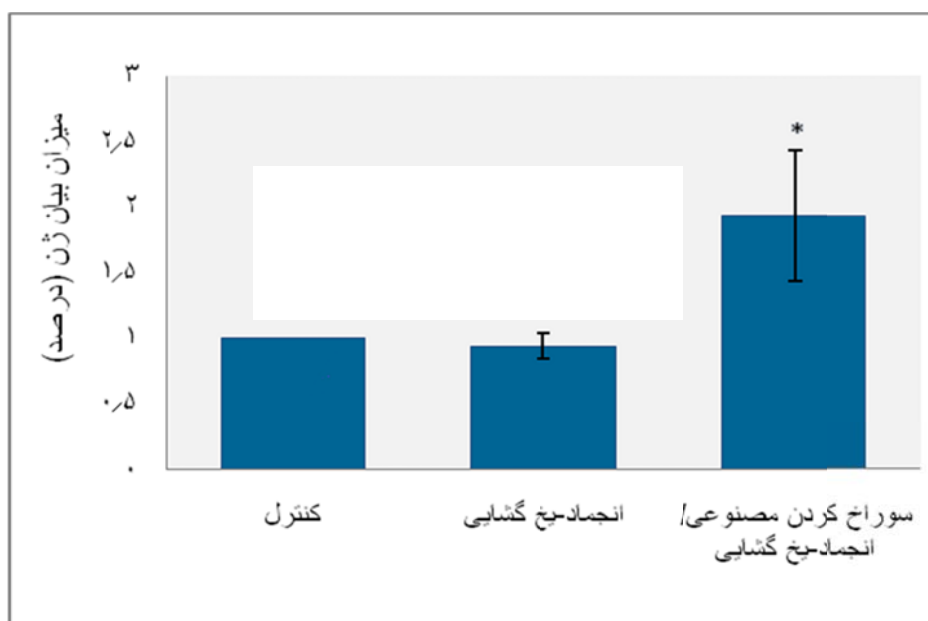
جدول شماره ۲: درصد تأثیر سوراخ کردن مصنوعی بلاستوسیت قبل از انجماد شیشه‌ای بر کیفیت بلاستوسیت‌های برون‌تنی موش بعد از ذوب رویان

گروه‌ها	نرخ بقا (درصد)	نرخ خروج از زونا (درصد)
کنترل	۱۰۰ ^a	۶۷/۷۳±۱۰/۴ ^a
انجماد - ذوب	۹۵/۵۴±۵/۱۲ ^a	۴۴/۴۰±۱۰/۶۵ ^b
سوراخ کردن مصنوعی - انجماد - ذوب	۹۱/۷۶±۲/۶۸ ^a	۵۸/۷۰±۶/۵۵ ^a

داده‌ها حاصل ۵ تکرار می‌باشد و در هر ستون حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌داری هستند ($P \leq 0.05$).

با گروه انجماد، افزایش معنی‌داری نشان داد (نمودار).

بیان ژن *Fgf4* در گروه انجماد نسبت به گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری نداشت، درحالی‌که این میزان در گروه AC در مقایسه



نمودار: درصد بیان ژن *Fgf4* (داده‌ها حاصل از مجموع ۳ تکرار Real time-PCR است) میزان آن در گروه AC در مقایسه با گروه انجماد، دارای افزایش معنی‌داری می‌باشد ($p \leq 0.05$).

بحث

باشد (۱۳). Mukaida و همکاران، بهبود قابل‌توجهی را در بلاستوسیت‌های انسانی AC شده در مقایسه با گروه کنترل مشاهده کردند (۱۴). Vanderzwalmen و همکاران نیز (سال ۲۰۰۲) نتایج مشابهی را با استفاده از سوراخ کردن بلاستوسیت انسانی به‌وسیله ریزسوزن‌ها قبل از انجماد گزارش کردند (۱۵). در تحقیقی که بر روی رویان‌های برون‌تنی موش انجام گرفت، میزان بقای رویان‌های AC شده نسبت به گروه انجماد کاهش نشان داد، هرچند این کاهش معنی‌دار نبود، ولی می‌تواند ناشی از سختی زونا پلوسیدا در رویان‌های برون‌تنی به‌علت شرایطی که محیط کشت به آنها اعمال می‌کند و استرس‌های ناشی از قرار گرفتن در محیط آزمایشگاه باشد که در آن صورت اعمال فشار ریزسوزن‌ها بر زونا پلوسیدا جهت سوراخ کردن آن بیشتر شده و سلول‌های بیشتری در معرض آسیب قرار خواهند گرفت و در نتیجه تعداد رویان‌های زنده کاهش خواهد یافت. در مطالعه حاضر نرخ بیرون‌آمدن بلاستوسیت از زونا پلوسیدا در رویان‌های گروه AC (برابر $2/4 \pm 58/70\%$) ارزیابی شد که در مقایسه با گروه انجماد (برابر $3/2 \pm 44/40\%$)، افزایش معنی‌داری داشت. از دلایل کاهش میزان خروج بلاستوسیت از زونا پلوسیدا در گروه انجماد نسبت

انجماد و ذوب بلاستوسیت باعث کاهش نرخ بقای رویان‌ها می‌شود. علت این امر را می‌توان به ایجاد کریستال‌های یخ داخل و خارج سلولی نسبت داد. گرچه با انجماد شیشه‌ای تا حد زیادی از تشکیل این کریستال‌ها جلوگیری می‌شود، اما استفاده از غلظت‌های بالاتر مواد محافظ سرما، و یا قرار دادن رویان در مدت زمان بیشتر در معرض این مواد سمی، آسیب زیادی بر رویان وارد خواهد کرد که خود می‌تواند باعث کاهش نرخ بقای جنین شود (۸). مطالعه Kelly و همکاران بر روی رویان‌هایی که تحت فرآیند انجماد و ذوب قرار گرفته بودند در مقایسه با رویان‌های منجمد نشده، نشانگر اثرات زیانبار انجماد بر سلول‌های توده داخلی و افزایش تعداد سلول‌های تروفوکتودرم بود. همچنین در طی فرآیند انجماد و ذوب، میزان نکروز و آپوپتوز در سلول‌های رویان افزایش می‌یابد که این امر منجر به کاهش تعداد سلول‌ها و مرگ سلولی در سلول‌های توده داخلی بلاستوسیت می‌شود (۱۲). افزایش نرخ بقا در رویان‌های AC شده می‌تواند به‌علت ایجاد سوراخ در زونا پلوسیدا و ورود سریع‌تر مواد محافظ سرما به داخل رویان و کاهش مدت زمان قرارگیری جنین در این مواد

به جنین‌های منجمد نشده، می‌توان به کمبود انرژی بلاستوسیت پس از ذوب برای بازگشت به حالت اولیه اشاره کرد. پمپ سدیم - پتاسیم ATPase موجود در غشای سیتوپلاسمی، مسئول گسترش حفره بلاستوسل بوده که بیش از ۶۰٪ از کل ATP تولید شده در طول تکامل بلاستوسیت را مصرف می‌کند. پس از انجماد و ذوب، بازگشت رویان به حالت اولیه نیازمند صرف انرژی است. همین امر می‌تواند توجیهی برای تأخیر در بازگشت مجدد رویان به حالت اولیه و در نتیجه کاهش خروج از زونا پلوسیدا و لانه‌گزینی در بلاستوسیت‌هایی که تحت فرآیند انجماد و ذوب قرار گرفتند باشد. در تحقیق حاضر، میزان خروج از زونا پلوسیدا در گروه AC به میزان $58/70 \pm 2/4$ بود که در مقایسه با گروه انجماد، به‌طور معنی‌داری افزایش داشت که نشان می‌دهد میزان خروج از زونا پلوسیدا به‌وسیله AC می‌تواند بهبود یابد. در مطالعات گذشته مشخص گردید گرچه کشت رویان در محیط آزمایشگاه، نرخ بقا و رشد بلاستوسیت‌ها را کاهش می‌دهد، ولی فرآیند انجماد نیز تأثیر به‌سزایی در این امر دارد (۱۷، ۱۶). در شرایط درون‌تنی، بلاستوسیت‌های موش در اواخر روز چهارم رویانی و در زمان لانه‌گزینی، به کمک آنزیم‌های مترشح از رویان و دیواره رحم، با هضم قسمتی از زونا پلوسیدا، از این لایه خارج می‌شوند تا امکان چسبیدن رویان و نفوذ آن به دیواره رحم فراهم آید (۱۸). اطلاعات حاکی از آن است که در شرایط برون‌تنی به محض اینکه تعداد کافی از سلول‌های رویانی برای غلبه بر مقاومت در برابر زونا پلوسیدا وجود داشته باشد، خروج بلاستوسیت از این لایه آغاز می‌شود. بدون شک انجام این فرآیند در آزمایشگاه نیازمند مشارکت فعال تروفواکتودرم است. مطالعات مورفولوژیکی نشان می‌دهند خروج بلاستوسیت از زونا پلوسیدا در شرایط آزمایشگاهی با نفوذ تروفواکتودرم به داخل زونا پلوسیدا در یک محل مشخص آغاز می‌شود. با گسترش بلاستوسیت در شرایط آزمایشگاهی، زونا پلوسیدا نازک می‌شود که علت آن فشار ناشی از گسترش بلاستوسیت و لیز شدن زونا پلوسیدا به‌وسیله لایزین تروفواکتودرمال است. فرآیند خروج بلاستوسیت‌های برون‌تنی از زونا پلوسیدا، با ایجاد سوراخ‌های متعدد در غشا آن انجام می‌شود. این فرآیند متفاوت با خروج بلاستوسیت از زونا پلوسیدا در رحم است.

لایزین رحمی در فرآیند خروج بلاستوسیت از زونا پلوسیدا در شرایط درون‌تنی در موش نقش دارد. داده‌ها نشان می‌دهند در موش تفاوت‌های اساسی بین خروج بلاستوسیت از زونا پلوسیدا در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی وجود دارد. خروج از زونا پلوسیدا در شرایط برون‌تنی نسبت به درون‌تنی، کمی با تأخیر رخ می‌دهد؛ زیرا در شرایط آزمایشگاهی آنزیم پروماتاز لایزین رحمی وجود ندارد. همچنین لقاح و کشت در آزمایشگاه با تغییر در الاستیسته زونا پلوسیدا باعث افزایش مقاومت آن و کاهش توانایی خروج بلاستوسیت از این لایه می‌شود. عوامل دیگری که در شرایط برون‌تنی مانع نازک شدن زونا پلوسیدا به‌صورت طبیعی و ایجاد شکاف طبیعی توسط آنزیم‌ها می‌شوند عبارتند از: سطح بالای هورمون محرک فولیکولی در خون مادر، ضخیم شدن و یا سخت شدن زونا پلوسیدا به‌علت شرایطی که محیط کشت به آن اعمال می‌کند (۲۰، ۱۹). همچنین فرآیند انجماد و ذوب رویان نیز باعث افزایش ضخامت زونا پلوسیدا و در نتیجه کاهش میزان بیرون آمدن رویان از این لایه و متعاقب آن کاهش لانه‌گزینی خواهد شد. از طرفی، با طولانی شدن زمان کشت رویان برای رسیدن به مرحله بلاستوسیت، از ضخامت زونا پلوسیدا کاسته می‌شود، ولی سختی آن افزایش می‌یابد. با توجه به این موارد پس از انجماد و ذوب بلاستوسیت، زونا پلوسیدای سختی خواهیم داشت که می‌توان انتظار داشت میزان بیرون آمدن رویان از این لایه کم باشد. امروزه، برای کمک به خروج رویان از زونا پلوسیدا از روش هچینگ کمکی (AH: Assisted Hatching) استفاده می‌شود که با این روش شکافی در ناحیه خاصی از زونا پلوسیدا ایجاد می‌گردد (۲۱). Pribenszky و همکاران (سال ۲۰۰۳) با مطالعه بر روی بلاستوسیت‌های بدون زونا پلوسیدای موش، اختلافی در نرخ بقای رویان‌های منجمد نشده و رویان‌هایی که منجمد و ذوب شده بودند، نیافتند و به این نتیجه رسیدند که وجود زونا پلوسیدای سالم و دست‌نخورده می‌تواند به‌عنوان یک عامل منفی در انجماد شیشه‌ای رویان باشد (۲۲). Zech و همکاران نیز (سال ۲۰۰۵) در مطالعه خود با مقایسه بلاستوسیت‌های ذوب‌شده‌ای که AH شده بودند با رویان‌های دارای زونا پلوسیدای سالم، اظهار داشتند رویان‌های AH شده، نرخ لانه‌گزینی و حاملگی بالاتری دارند (۲۱).

مطالعات مشابه دیگری که توسط Karder و همکاران (سال ۲۰۰۹) انجام شد، حاکی از آن بود که AH می‌تواند نرخ آسیب رسیدن به ژنوم جنین حین عمل انجماد و ذوب را نیز کاهش دهد (۲۳). با توجه به مطالعات انجام‌شده، ایجاد شکاف در زونا پلوسیدا باعث افزایش نرخ لانه‌گزینی رویان خواهد شد. در مطالعه حاضر با استفاده از روش AC، شکافی در زونا پلوسیدا ایجاد شد. بنابراین، می‌توان افزایش نرخ خروج از زونا پلوسیدا در رویان‌های AC شده را در مقایسه با رویان‌هایی که AC نشده‌اند با این موضوع توجیه کرد. در بررسی‌های مولکولی انجام‌شده در این تحقیق، بیان ژن *Fgf4* در گروه انجماد نسبت به گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری نداشت. درحالی‌که این میزان در گروه AC در مقایسه با گروه انجماد، افزایش معنی‌داری نشان داد. رویان در مرحله بلاستوسیست شامل دو رده سلولی، سلول‌های توده داخلی که منشأ رویان هستند و سلول‌های تروفواکتودرم که جفت را تشکیل می‌دهند می‌باشد. تمایز هر کدام از سلول‌های اولیه رویانی به این دو رده، تحت کنترل ژن‌ها بوده و در هر کدام از این رده‌های سلولی نیز ژن‌های متفاوتی بیان می‌شود. مطالعات، بیانگر نقش تنظیمی *Fgf4* بر ژن‌های اختصاصی لایه‌های تروفواکتودرم (*Fgfr2*, *Cdx2* and *Eomes*)، توده سلولی داخلی (*Oct4*) و اندودرم اولیه (*Hnf4*) است (۲۵-۲۴). Giritharan و همکاران (سال ۲۰۰۷) برای بررسی نقش لقاح خارج رحمی در تغییر الگوی بیان ژن، مطالعاتی انجام دادند که با مقایسه بین بلاستوسیست‌های برون‌تنی و درون‌تنی، تفاوت عمده‌ای در کاهش تعداد سلول‌ها و افزایش سایز هسته سلول‌های توده داخلی در گروه برون‌تنی نسبت به گروه درون‌تنی مشاهده کردند (۲۴). Camargo و همکاران نشان دادند رویان‌های تولیدشده در شرایط برون‌تنی، نرخ سلول‌های توده داخلی کمتری نسبت به سلول‌های تروفواکتودرم دارند که به‌طور معمول لقاح خارجی با کاهش تعداد سلول‌های

توده داخلی همراه بوده و این امر را می‌توان به اعمال استرس‌های ناشی از تغییرات شرایط محیطی، اسمزی و تغییر pH محیط در شرایط خارج از رحم نسبت داد که در نتیجه با تغییر نسبت سلول‌های توده داخلی نسبت به تروفواکتودرم و تغییر در بیان ژن مواجه خواهیم بود (۲۵). تاکنون گزارشی مبنی بر بررسی مولکولی تأثیر AC بر میزان بیان ژن‌ها در بلاستوسیست ثبت نشده و تنها به مطالعات سلولی اکتفا شده است. بررسی‌های مولکولی انجام‌شده به موازات مطالعات سلولی، اطلاعات دقیقی در اختیار ما قرار می‌دهد. در این آزمایش بیان ژن *Fgf4*، افزایش معنی‌داری را در گروه AC نشان داد که علت این افزایش را می‌توان پاسخی به از بین رفتن بلاستومرهای آسیب‌دیده برای ثابت نگهداشتن سطح بیان ژن دانست. با توجه به نقش کلیدی *Fgf4* در رشد و تکثیر سلول‌های تروفواکتودرم، هرگونه تغییر در میزان بیان این ژن ممکن است عوارض غیرطبیعی روی سلول‌های رویانی داشته باشد. تخصیص تعیین‌شده و مشخص بلاستوسیست به سلول‌های توده داخلی یا تروفواکتودرم در روند تکاملی رویان بسیار مهم است و حداقل تعداد معینی از سلول‌های توده داخلی برای به‌وجودآمدن حاملگی موفق مورد نیاز است و اختصاص یافتن بیش از حد سلول‌ها به تروفواکتودرم، به حاملگی غیرطبیعی می‌انجامد که این خود می‌تواند عاملی منفی محسوب گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد کاهش حجم حفره بلاستوسل قبل از انجماد شیشه‌ای می‌تواند به‌عنوان روشی کارآمد جهت افزایش بهره‌وری انجماد بلاستوسیست و درپی آن بالابردن احتمال لانه‌گزینی به‌ازای انتقال بلاستوسیست واحد در مجموعه تکنیک‌های درمان ناباروری معرفی گردد.

References:

1. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil Steril* 2000;74(2):282-7.
2. Guerif F, Bidault R, Gasnier O, Couet M, Gervereau O, Lansac J, et al. Efficacy of blastocyst transfer after implantation failure. *Reprod Biomed Online* 2004;9(6):630-6.
3. Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998;69(1):84-8.
4. Kolibianakis EM, Zikopoulos K, Verpoest W, Camus M, Joris H, Van Steirteghem AC, et al. Should we advise patients undergoing IVF to start a cycle leading to a day 3 or a day 5 transfer? *Hum Reprod* 2004;19(11):2550-4.
5. Nijs M, Geerts L, van Roosendaal E, Segal-Bertin G, Vanderzwalmen P, Schoysman R. Prevention of multiple pregnancies in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1993;59(6):1245-50.
6. Rall WF, Wood MJ. High in vitro and in vivo survival of day 3 mouse embryos vitrified or frozen in a non-toxic solution of glycerol and albumin. *J Reprod Fertil* 1994;101(3):681-8.
7. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Nuhoglu A. Progression of excess embryos to the blastocyst stage predicts pregnancy and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod* 1998;13(9):2564-7.
8. Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol Reprod* 2000;62(3):564-70.
9. Niswander L, Tickle C, Vogel A, Booth I, Martin GR. FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs out growth and patterning of the limb. *Cell* 1993;75(3):579-87.
10. Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, Nagy A, Rossant J. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 1998;282(5396):2072-5.
11. Duncan SA, Manova K, Chen WS, Hoodless P, Weinstein DC, Bachvarova RF, et al. Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut, and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst. *Nati Acad Sci* 1994;91(16):7598-602.
12. Kelley LA, Gardner SP, Sutcliffe MJ. An automated approach for clustering an ensemble of NMR-derived protein structures into conformationally related subfamilies. *Protein Eng* 1996;9(11):1063.
13. Kader AA, Choi A, Orief Y, Agarwal A. Factors affecting the outcome of human blastocyst vitrification. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:99.
14. Mukaida T, Oka C, Goto T, Takahashi K. Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. *Hum Reprod* 2006;21(12):3246-52.
15. Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche CH, Standaert V, van Roosendaal E, Vandervorst M, et al. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: Effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Hum Reprod* 2002;17(3):744-51.
16. Villamil PR, Lozano D, Oviedo JM, Ongaratto FL, Bó GA. Developmental rates of in vivo and in vitro produced bovine embryos cryopreserved in ethylene glycol based solutions by slow freezing or solid surface vitrification. *Anim Reprod* 2012;9(2):86-92.
17. Houghton F, Humpherson P, Hawkhead J, Hall C, Leese H. Na⁺, K⁺, ATPase activity in the human and bovine preimplantation embryo. *Develop Biol* 2003;263(2):360-6.

18. Andersen AN, Goossens V, Gianaroli L, Felberbaum R, de Mouzon J, Nygren KG. Assisted reproductive technology in Europe, 2003. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2007;22(6):1513-25.
19. Filho ES, Noble J, Wells D. A review on automatic analysis of human embryo microscope images. *Open Biomed Eng JI* 2010;4:170-7.
20. Das S, Blake D, Farquhar C, Seif MM. Assisted hatching on assisted conception (IVF and ICSI). *Cochrane Database Syst Rev* 2009;2(2):1894.
21. Zech NH, Lejeune B, Zech H, Vanderzwalmen P. Vitriification of hatching and hatched human blastocysts: effect of an opening in the zona pellucida before vitrification. *Reprod Biomed Online* 2005;11(3):355-61.
22. Pribenszky C, Cseh S, Abonyi-Toth Z, Solti L. Survival of rapidly frozen hatched mouse blastocysts. *Zygote* 2003;11(4):361-6.
23. Kader A, Agarwal A, Abdelrazik H, Sharma RK, Ahmady A, Falcone T. Evaluation of post-thaw DNA integrity of mouse blastocysts after ultrarapid and slow freezing. *Fertil Steril* 2009;91(5 Suppl):2087-94.
24. Giritharan G, Talbi S, Donjacour A, Di Sebastiano F, Dobson AT, Rinaudo PF. Effect of in vitro fertilization on gene expression and development of mouse preimplantation embryos. *Reproduction* 2007;134(1):63-72.
25. Camargo LSA, Viana JHM, Sá WF, Ferreira AM, Ramos AA, Vale Filho VR. Factors influencing in vitro embryo production. *Anim Reprod* 2006;3(1):19-28.

The Effect of the Reduction of Volume of Blastocoel Cavity before Vitrification on Viability and Quality of In Vitro Mouse Blastocyst through Assessment of Fgf4 Gene Expression

Ronak Sehati¹; Farah Farokhi²; Morteza Daliri³; Mojtaba Dashtizad^{4*}

¹Master of Sciences in Histology & Embryology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran.

²Associate Professor of Histology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran.

³Assistant Professor of Embryo Immunology, National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology, Tehran, Iran.

⁴Assistant Professor of Reproductive Biology & Cytogenetics, National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology, Tehran, Iran.

***Corresponding Author:**
Mojtaba Dashtizad,
National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology, Tehran, Iran.

Email:
dashtizad@nigeb.ac.ir

Received: 16 Nov, 2014

Accepted: 14 Jan, 2015

Abstract

Background and Objectives: Although studies have shown that viability rate of transferred blastocysts in comparison to embryos in previous stages is higher, the viability rate of warmed blastocysts was lower than embryos in other stages. This can be attributed to the present of fluid filled blastocoel cavity and potential risk of ice crystal formation. Moreover, the fluid can serve as an isolator against penetration of cryoprotectant agents (CPAs) to the embryos. In the present study by applying artificial collapse (AC) on blastocysts, we aimed to evaluate the effect of reduced volume of blastocoel fluid prior to vitrification on the quality of warmed in vitro mice embryos. In this regards, quantity of *Fgf4* gene expression, viability and hatching rates were considered.

Methods: Mouse blastocysts divided into 3 groups including: A) Vitrified-thawed blastocysts after artificial collapse, B) Vitrified-thawed blastocysts, C) Fresh blastocysts as a control group. The survival and hatching rate of embryos were evaluated by SPSS and one way ANOVA with post hoc Duncan test and the expression of *Fgf4* gene was assessed by Real Time PCR technique in comparison to control group.

Results: Artificial collapse improved the rate of zona pellucida hatching showed a significant increase ($p < 0.05$). Moreover, the level of *Fgf4* gene expression in the AC group increased significantly ($p < 0.05$) in comparison to the control group.

Conclusion: It can be concluded that artificial collapse of blastocyst could be effective way to improve the implantation rate.

Keywords: Artificial Collapse; Blastocyst; *Fgf4* gene; Vitrification.