

## بررسی اثر انجماد شیشه‌ای بر میزان بیان نشانگرهای اختصاصی پرتوانی، *Nanog* و *Oct4*

### در بلاستوسیستهای موش سوری

پریسا فتحعلی‌زاده<sup>۱</sup>، مجتبی دشتی‌زاد<sup>۲\*</sup>، گلناز اسعدی‌تهرانی<sup>۱</sup> و مرتضی دلیری جوپاری<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، گروه ژنتیک

<sup>۲</sup> تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۹ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۲۶

#### چکیده

از زمان اولین انجماد شیشه‌ای رویان موش در سال ۱۹۸۵، تلاش‌های قابل توجهی برای توسعه و بهبود این تکنیک صورت گرفته است اما همچنان انجماد با اعمال آسیب‌های جدی بیوشیمیایی و کروموزومی بر روی رویان می‌تواند باعث تغییراتی در الگوی بیان ژنهای دخیل در تکوین و عملکرد، کاهش لانه‌گزینی و نهایتاً مرگ رویان گردد. هدف از این مطالعه بررسی تأثیرات انجماد شیشه‌ای بر زنده‌مانی و رشد و بررسی بیان ژنهای تخصصی پرتوانی مؤثر در تکوین رویان از جمله ژنهای *Nanog* و *Oct4* در بلاستوسیستهای منجمد-ذوب شده موش بود. پس از تحریک تخمک‌گذاری موشهای ماده و استحصال بلاستوسیست، فرآیند انجماد با حضور دی‌متیل سولفوکسید ۱۵ درصد، اتیلن‌گلیکول ۱۵ درصد و ساکارز ۰/۵ مولار به عنوان مواد سرم‌محافظ در محیط‌های انجمادی انجام شد و بلاستوسیستها با قرارگیری روی *Cryotop*، به درون ازت مایع منتقل گشتند. فرآیند ذوب نیز با شست‌وشوی رویانها در محیط ذوب حاوی ساکارز ۱ مولار صورت پذیرفت. نهایتاً میزان زنده‌مانی، خروج بلاستوسیستها از زونا و نیز بیان ژنهای *Nanog* و *Oct4* به روش *real time-PCR* در بلاستوسیستهای منجمد-ذوب شده و شاهد ارزیابی شد. نرخ زنده‌مانی و خروج بلاستوسیستها از زونا در تیمار انجماد نسبت به بلاستوسیستهای منجمد نشده به طور معنی‌داری کاهش یافتند (۹۴/۴۳±۵/۸۱ درصد در مقابل ۱۰۰ درصد برای زنده‌مانی و ۵۷/۷۸±۱۱/۷۶ درصد در مقابل ۸۶/۸۸±۵/۸۰ درصد برای خروج بلاستوسیست از زونا). همچنین بیان ژنهای *Nanog* و *Oct4* افزایش یافت. با توجه به یافته‌های این آزمایش می‌توان گفت که انجماد شیشه‌ای بلاستوسیست موش سوری در مرحله بلاستوسیست می‌تواند باعث تغییر بیان ژن و کیفیت رویان گردد.

واژه‌های کلیدی: انجماد شیشه‌ای، بلاستوسیست موش، ژنهای *Nanog* و *Oct4*

\* نویسنده مسئول، ۰۹۱۲۳۲۱۱۰۵۸، پست الکترونیکی: [dastizad@nigeb.ac.ir](mailto:dastizad@nigeb.ac.ir)

#### مقدمه

آنها به منظور استفاده در دوره‌های درمانی بعدی (در صورت شکست) بیش از پیش اهمیت می‌یابد. این امر می‌تواند از طریق تکنیک انجماد میسر گردد که برای اولین بار در سال ۱۹۷۱ به لانه‌گزینی موفق، در رویان پستانداران (بلاستوسیست موش) منجر گردید (۳۶). از آن پس نیز انجماد گامت و رویان در گونه‌های مختلف پستانداران در زمینه‌هایی نظیر طب تولیدمثل، پرورش حیوانات، حفظ

با موفقیت لقاح آزمایشگاهی (*In vitro Fertilization*: IVF) و تولد اولین نوزاد زنده پستانداران، در سال ۱۹۵۹ (۳)، این روش به عنوان یکی از تکنیکهای کمک باروری معرفی گردید و امروزه در مراکز درمان ناباروری به صورت رایج مورد استفاده قرار می‌گیرد. از طرفی در مواردی که تعداد رویانهای تشکیل شده بیش از تعداد مورد نیاز جهت انتقال به رحم باشند، ضرورت حفظ و نگهداری

زمینه، کسب نرخ بالای بقا و افزایش احتمال موفقیت در لانه‌گزینی پس از ذوب و انتقال است. در این میان، رویانهای منجمد و ذوب شده در مراحل اولیه تسهیم (۴-۸ سلولی)، دارای نرخ بقای بالایی هستند ولی از طریق ویژگیهای مورفولوژیکی قابل پیش‌بینی در ادامه روند تکاملی نیستند و ریسک عدم موفقیت در حاملگی را بالا می‌برند. در مقابل، بلاستوسیت‌بهرترین مرحله برای انتقال رویان با پتانسیل تکوینی مناسب است. با این‌گزینه می‌توان تعداد رویانهای انتقال یافته و ریسک ابتلا به چند قلوزایی را کاهش داد (۳۷). همچنین با توجه به کوچک شدن اندازه بلاستومرها، کاهش میزان آب درون سلولی و افزایش نسبت سطح به حجم در طی فرآیند تسهیم، انتظار می‌رود نرخ زنده‌مانی رویانهای ذوب شده بلاستوسیت بیشتر از مراحل قبلی باشد.

اما در کنار این مزیتها، نرخ بقای بلاستوسیت پس از ذوب پایین است. از دلایل آن می‌توان به حفره مملو از مایع بلاستوسل اشاره کرد که سرعت انتقال مواد ضد یخ و مولکولهای آب را کاهش و در نتیجه پتانسیل تشکیل کریستالهای یخ را افزایش می‌دهد. برای رفع این مشکل باید از غلظتهای بالاتر CPAs استفاده نمود و یا رویان را مدت زمان بیشتری در معرض این مواد قرار داد، که هر دو خود از عوامل آسیب‌زا محسوب می‌شوند (۱).

روشهای انجماد، علی‌رغم نقش غیرقابل انکارشان در درمان افراد نابارور، به دلیل اثرات CPAs و تغییرات شدید برودتی و حرارتی می‌توانند تأثیرهای نامطلوبی بر ساختار سلول داشته و منجر به آسیب سلولی به طرق مختلف گردد. به عبارتی انجماد با اعمال آسیبهای جدی بیوشیمیایی و کروموزومی بر روی رویان می‌تواند با تغییر در الگوی بیان ژنی، موجب کاهش رشد و قایب لانه‌گزینی و نهایتاً مرگ رویان گردد (۷). به نظر می‌رسد انجماد با اثر بر بیان ژنهای دخیل در تکوین، توسعه و عملکرد رویان از جمله ژنهای پرتوانی توده داخلی بلاستوسیت می‌تواند بر

تغییرات ژنتیکی، به تعویق انداختن انتقال رویان در بیمارانی که در معرض خطر بالایی از سندرم تحریک بیش از حد تخمدان هستند، حفظ باروری بیمارانی که در حال آماده شدن برای شیمی‌درمانی و یا پرتو درمانی هستند و نیز برای داوطلبین اهداء گامت و رویان به کار گرفته شده است (۲۱). در طی فرآیند انجماد به دلیل حضور آب درون سلولی و تشکیل کریستالهای یخ، استفاده از مواد سرما محافظ (Cryoprotective Agents: CPAs) الزامی است. اما از سوی دیگر نشان داده شده است که غلظت بالای این CPAs می‌تواند اثر سمی برای سلول به همراه داشته باشد (۱۸). در دهه اخیر پیشرفتهای زیادی در علم زیست‌شناسی انجماد برای حفظ سلامت گامت و رویان انسانی و حیوانی به روشهای انجماد آهسته و انجماد شیشه‌ای صورت پذیرفته است. در روش انجماد آهسته از غلظتهای پایین CPAs با نرخ برودتی به میزان ۰/۱ تا ۰/۳ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به منظور جلوگیری از تشکیل کریستالهای یخ استفاده می‌شود. اما غلظت پایین CPAs و نرخ برودتی کم از طرفی و افزایش زمانی که رویان در معرض محدوده دمایی خطرناک انجماد و ذوب (۱۵ تا ۶- درجه سانتی‌گراد) قرار می‌گیرد از طرفی دیگر، باعث تشکیل کریستالهای یخ داخل و خارج سلولی و در نهایت آسیب به ساختار رویان می‌گردد (۱۲ و ۲۳). لذا امروزه بتدریج این تکنیک جای خود را به انجماد شیشه‌ای داده است که اولین بار در سال ۱۹۳۷ توسط Luyet و همکارانش مطرح گردید (۱۹). در این تکنیک به دلیل غلظت بالای CPAs، امکان غوطه‌وری مستقیم رویان به داخل ازت مایع مقدور می‌باشد. نتیجه این امر افزایش چشمگیر در نرخ برودتی به میزان ۲۰،۰۰۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه و تبدیل یکباره محیط اطراف آن به یخ فاقد کریستال است (۲). پس از اولین انجماد موفق رویان پستانداران در سال ۱۹۸۵ (۲۸)، این نوع انجماد تاکنون هم در مورد تخمک و هم در مورد رویان با موفقیت صورت گرفته است. اما چالش همیشگی در این

جفت‌گیری با تشکیل پلاک واژنی موش‌های ماده در صبح روز بعد، تأیید گردید. موش‌های باردار سه و نیم روزه، به روش جابه‌جایی مهره گردن کشته شدند. بعد از جراحی و جداسازی لوله‌های رحمی، با فشار تزریق محیط کشت Modified Krebs-Ringer solution with HEPES ) M2 (buffer: M2 medium) (۲۷) به همراه سدیم پیرووات (Sodium Pyruvate) (P-4562, Sigma) و آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin: ) (BSA) (10106, GibcoBRL) به این لوله‌ها، بلاستوسیتها از انتهای رحم خارج شده و جمع‌آوری گردیدند. تمامی مراحل استحصال بلاستوسیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت.

**انجماد شیشه‌ای:** تمام فرآیندهای انجماد و ذوب جنین مطابق روش کار معرفی شده توسط Kuwayama و Vajta با مختصر تغییراتی صورت پذیرفت (۱۴). محلولهای متعادل‌سازی، انجماد، ذوب و رقیق‌سازی با استفاده از محیط کشت TCM199 (Gibco, 22340-020) همراه با ۲۰٪ سرم جنین گاو (Gibco, 10270) به عنوان محیط پایه آماده گشتند. فرآیند انجماد در دمای اتاق (۲۷-۲۲) درجه سانتی‌گراد انجام شد. رویانها در محیط متعادل‌سازی حاوی ۷/۵ درصد دی‌متیل سولفوکساید (D-2650, Sigma) و ۷/۵ درصد اتیلن‌گلیکول (Sigma, 324558) محلول در محیط پایه برای ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. پس از آن رویانها به مدت یک دقیقه در قطرات کوچکی از محیط انجماد شامل ۱۵ درصد DMSO، ۱۵ درصد EG و ساکارز ۰/۵ مولار (S-9378, Sigma) محلول در محیط پایه شست و شو داده شدند. در نهایت بلاستوسیتها (۵-۸ عدد) با کمترین حجم ممکن از محیط انجماد روی کرایوتاپ (Kitazato, 81115-81111) به عنوان حامل انجماد قرار داده شدند.

کرایوتاپ به سرعت درون ظرف حاوی ازت مایع فرو برده شد و پس از گذشت چند ثانیه، سرپوش پلاستیکی روی

کیفیت رویان اثرگذار باشد. از مهم‌ترین ژنهای مؤثر در ایجاد و حفظ ویژگی پرتوانی سلولهای بنیادی و تکامل اولیه رویان قبل از لانه‌گزینی، می‌توان به ژنهای تخصصی پرتوانی از جمله *Oct4* و *Nanog* اشاره کرد که در توده سلولی داخلی بلاستوسیت (Inner Cell Mass) بیان می‌گردند (۲۲). نقص و یا عدم بیان ژن *Oct4* منجر به تولید بلاستوسیت‌هایی خواهد شد که ICM آنها قدرت تمایز به سایر سلول‌ها مانند اپی‌بلاست و کیسه زرده را ندارد و در مراحل اولیه تکامل رویانی و پیش از لانه‌گزینی از بین خواهند رفت (۱۴). همچنین بلاستوسیت‌های موش فاقد هر دو ال *Nanog*، ICM و تروفوکتودرم (Trophectoderm: TE) نرمال خواهند داشت اما این رویانها بعد از لانه‌گزینی به دلیل نقص در اپی‌بلاست از بین می‌روند (۳۰).

در این تحقیق کیفیت بلاستوسیت‌های ذوب شده از لحاظ مورفولوژیک با سنجش نرخ زنده‌مانی، بازگشت رویانها به شکل طبیعی و نرخ خروج از زونا و نیز از طریق روشهای مولکولی با بررسی بیان فاکتورهای *Oct4* و *Nanog* به عنوان نشانگرهای تخصصی پرتوانی، ارزیابی گردید.

## مواد و روشها

**استحصال بلاستوسیت:** در این مطالعه از موش‌های ماده نژاد NMRI با سن ۸-۷ هفته استفاده گردید. تمامی مراحل کار با موش طبق دستورالعمل کمیته اخلاق و ایمنی زیستی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری صورت پذیرفت. تخمک‌گذاری موش‌های ماده با تزریق IU (International Unit) ۸ هورمون PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin, A007A02, Folligon®) در روز اول و ۴۷ ساعت پس از آن ۸ IU (Intervet) هورمون hCG (Human Chorionic Gonadotropin) (Pregnyl®, 111, DarouPakhsh) به صورت داخل صفاقی انجام شد. پس از آن، موش‌های ماده با موش نر (۱۰-۱۲ هفته) از همان نژاد درون یک قفس قرار داده شدند و

مواد سرما محافظ) با استفاده از کیت RNAasy Plus Micro Kit® (74034, Qiagen) صورت پذیرفت. برای واکنش رونویسی معکوس، RNA استخراج شده هر گروه به همراه توالی شش‌تایی تصادفی (J208, Bioneer) به ترکیب واکنش در کیت (K-2101, Bioneer) اضافه شد. محلول واکنش در ۱۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳ دقیقه و متعاقباً در ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای یک ساعت انکوبه شد.

**طراحی پرایمر:** پرایمرهای رفت و برگشت ژنهای *Oct4*، *Nanog* و  $\beta 2m$  (Beta-2-Microglobulin) با استفاده از برنامه‌های Gene Runner و Primer BLAST مطابق جدول ۱ طراحی و تأیید گشتند. در طراحی پرایمر سعی بر آن شد که فاکتورهایی نظیر طول پرایمر، طول قطعه حاصل از تکثیر، درصد بازهای آلی سیتوزین و گوانین و نیز وجود توالیهای تکراری، پالیندرومی و انتهای سنجاق سری مورد توجه قرار گیرد.

آن قرار گرفت. در نهایت، کرایوتا‌پهای حاوی بلاستوسیست، به مخزن اصلی ازت مایع منتقل گشتند. پس از نگهداری رویانها در حدود یک ماه، فرآیند ذوب انجام شد. برای این کار کرایوتا‌پ به سرعت از ازت مایع خارج و برای مدت یک دقیقه به محلول ذوب شامل محلول یک مولار ساکارز از محیط پایه (۳۷ درجه سانتی‌گراد) انتقال و سپس برای ۳ دقیقه به محیط رقیق‌سازی حاوی ساکارز ۰/۵ مولار شست و شو داده شدند. در پایان پس از شست و شوی بلاستوسیستها در محیط پایه به مدت ۱۰ دقیقه، رویانها در محیط کشت KSOM (Synthetic oviductal medium, enriched with potassium: KSOM medium, enriched with potassium: KSOM medium) (۱۵) بهمراه سدیم پیروات، آلبومین سرم گاوی، فاکتور رشد اپیدرمی (E-4127, Sigma) و جنتامایسین (L0011-010, Bio- West) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد  $CO_2$  و رطوبت ۹۵ درصد نگه داشته شدند.

**استخراج RNA و ساخت cDNA:** استخراج RNA از بلاستوسیستهای تمامی تیمارها (شاهد، انجماد و سمیت

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای طراحی شده برای ژنهای *Oct4*، *Nanog* و  $\beta 2m$

| ژن           | پرایمر       | توالی ۳' به ۵'          | طول توالی (nt) | دمای Tm (Melting Temperature) (°C) | طول محصول حاصل از تکثیر (nt) |
|--------------|--------------|-------------------------|----------------|------------------------------------|------------------------------|
| <i>Oct4</i>  | پرایمر رفت   | AGCATTGAGAACCGTGTGAGG   | ۲۱             | ۵۹/۸                               | ۱۲۰                          |
|              | پرایمر برگشت | TCGAACCACATCCTTCTCTAGC  | ۲۲             | ۶۰/۳                               |                              |
| <i>Nanog</i> | پرایمر رفت   | GCCTCCAGCAGATGCAAGAA    | ۲۰             | ۵۹/۴                               | ۱۵۴                          |
|              | پرایمر برگشت | GGTGCTGAGCCCTTCTGAAT    | ۲۰             | ۵۹/۴                               |                              |
| $\beta 2m$   | پرایمر رفت   | CCTGGTCTTTCTGGTGCTTGT   | ۲۱             | ۵۹/۸                               | ۱۱۸                          |
|              | پرایمر برگشت | GCAGTTCAGTATGTTTCGGCTTC | ۲۲             | ۶۰/۳                               |                              |

سه ژن *Oct4*، *Nanog* و  $\beta 2m$  با استفاده از کیت (25344, Intron) حاوی رنگ SYBR Green I از طریق روش مقایسه‌ای CT واکنش real time-PCR در دستگاه

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (Real time-PCR): پس از راه‌اندازی تکثیر و اطمینان از مواد و شرایط با انجام روش PCR (Polymerase Chain Reaction)، بیان

دارای ICM بزرگ با تعداد سلولهای زیاد و نیز فاقد نشانی از شکل غیر نرمال، آسیب غشایی، آسیب اتصالات سلولی و تکه‌تکه شدن یا انحطاط سیتوپلاسم بودند، از لحاظ مورفولوژیکی طبیعی تلقی شدند. نرخ زنده‌مانی بلاستوسیسیتها با بررسی احیای حفره بلاستوسل در ۳ ساعت پس از انجام تیمارها ارزیابی گردید. برای رسیدن به اطلاعات بیشتری از زنده‌مانی بلاستوسیسیت‌های احیاء نشده در این مدت، این رویانها در درون انکوباتور با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۷ درصد و  $CO_2$  به میزان ۵ درصد کشت داده شدند و ۱۲ ساعت بعد مجدداً مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بر اساس نتایج به دست آمده در جدول ۲، نرخ زنده‌مانی و خروج بلاستوسیسیتها از زونا پس از انجام انجماد نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافتند ( $94/43 \pm 5/81$ ) درصد در مقابل ۱۰۰ درصد برای نرخ زنده‌مانی و  $57/78 \pm 11/76$  درصد در مقابل  $86/88 \pm 5/80$  درصد برای نرخ خروج بلاستوسیسیت از زونا). این میزان در تیمار سمیت به ترتیب  $94/97 \pm 1/69$  درصد و  $61/35 \pm 11/9$  درصد بود که هر دو با کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد روبرو گردیدند. اما نکته قابل توجه اینکه، با وجود کمتر بودن نرخ زنده‌مانی و خروج بلاستوسیسیتها از زونا در رویانهای منجمد- ذوب شده نسبت به تیمار سمیت، این اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد.

ترموسیکلر (Applied Bio Systems StepOne, USA) ارزیابی گردید. تعداد ۴۰ سیکل تکثیر در دمای Annealing ۵۵ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. این واکنش برای هر یک از تیمارها با ۳ بار تکرار انجام شد.

**طراحی آزمایشات:** بلاستوسیسیت‌های استحصال شده با کیفیت مناسب از لحاظ ظاهر انتخاب و به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند. در گروه اول، فرآیند انجماد شیشه-ای و ذوب روی بلاستوسیسیتها انجام گردید. در گروه دوم، به منظور بررسی میزان سمیت CPAs، بلاستوسیسیتها در معرض محیطهای انجماد و ذوب بدون غوطه‌وری در ازت مایع قرار گرفتند.

سپس بلاستوسیسیت‌های تیمار شده در هر دو گروه از لحاظ نرخ زنده‌مانی، خروج بلاستوسیسیت از زونا و میزان بیان ژنهای اختصاصی پرتوانی، *Oct4* و *Nanog* با یکدیگر و گروه شاهد (گروه سوم) مقایسه گردیدند.

**تجزیه و تحلیل داده‌ها:** با استفاده از تست One-Way ANOVA و به دنبال آن تست Duncan، آنالیز داده‌های سلولی و مولکولی صورت پذیرفت و تفاوتها در  $P < 0/05$  معنی‌دار در نظر گرفته شدند. برای این منظور از نرم‌افزار آماری SPSS, ver. 16.0 استفاده گردید.

## نتایج

**بخش سلولی:** در مجموع تعداد ۷۴۰ عدد بلاستوسیسیت موش مورد بررسی قرار گرفت. در این میان رویانهایی که

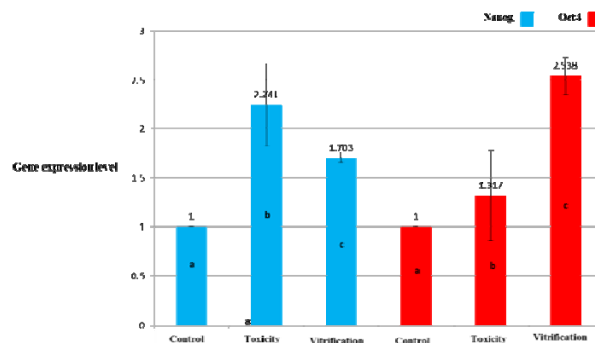
جدول ۲- اثر انجماد شیشه‌ای و سمیت مواد سرم‌محافظ بر کیفیت بلاستوسیسیت‌های درون‌تنی موش

| گروه آزمایشی        | تعداد بلاستوسیسیت | نرخ زنده‌مانی (%)  | میزان خروج بلاستوسیسیت از زونا (%) |
|---------------------|-------------------|--------------------|------------------------------------|
| شاهد                | ۲۲۰               | $100^a$            | $86/88 \pm 5/80^a$                 |
| انجماد شیشه‌ای      | ۱۹۸               | $94/43 \pm 5/81^b$ | $57/78 \pm 11/76^b$                |
| سمیت مواد سرم‌محافظ | ۲۲۰               | $94/97 \pm 1/69^b$ | $61/35 \pm 11/9^b$                 |

داده‌ها از ترکیب نمونه‌های ۵ تکرار بدست آمدند. a و b در هر ستون نسبت به هم تفاوت معنی‌دار دارند ( $P < 0/05$  در تست ANOVA و Duncan)

**بخش مولکولی:** مطابق نتایج به دست آمده در نمودار ۱، در گروه انجمادی به ترتیب افزایش ۱/۷۰۳ و ۲/۵۳۸ برابری بیان در ژنهای *Nanog* و *Oct4* مشاهده می‌گردد و

نمودار ۱- تغییر بیان ژن *Nanog* و *Oct4* پس از انجماد شیشه‌ای و اثرکرد مواد سرم‌محافظ در بلاستوسیت موش



داده‌ها حاصل از ۳ تکرار real time-PCR می‌باشند. a, b و c نسبت به هم تفاوت معنی‌دار دارند ( $P < 0.05$  در تست ANOVA و Duncan)

۹۴/۴۳ ± درصد در مقابل ۱۰۰ درصد) و خروج بلاستوسیت از زونا (به ترتیب  $11/76 \pm 57/78$  درصد در مقابل  $5/80 \pm 86/88$  درصد) در بلاستوسیت‌های منجمد و ذوب شده می‌باشند. همچنین در آزمایش دیگری که توسط Mukaida در سال ۲۰۰۶ صورت گرفت، نرخ زنده‌مانی بلاستوسیت‌های رشد یافته (۸۶ درصد) و در حال خروج از زونا (۸۲ درصد) پس از انجماد شیشه‌ای به طور معنی‌داری کمتر از مراحل قبل (۹۷ درصد) گزارش گردید (۲۴). در طی روند تکامل رویان در این تحقیق پیش از لانه‌گزینی هرچه به مراحل انتهایی نزدیک‌تر می‌شویم، انتظار می‌رود با توجه به افزایش در تعداد و نسبت سطح به حجم بلاستومرها، انجماد با موفقیت بیشتری صورت پذیرد. این روند تا مرحله ۸ سلولی مشاهده می‌شود اما در مرولا به علت تغییر در ساختار اتصالی و تراکم بلاستومرها، امکان تبادل CPAs با درون سلول کاهش می‌یابد. در این حالت میزان آب درون سلولی به میزان بالایی باقی مانده و در نتیجه کاهش نرخ زنده‌مانی رویان بعد از ذوب رخ خواهد داد.

در انجماد بلاستوسیت نیز به علت افزایش در تعداد و نسبت سطح به حجم سلولها، انتظار به تبادل آسان‌تر CPAs

## بحث

نتایج اولیه حاصل از انتقال رویان در مراحل مختلف تکامل رویانی، بعد از فرآیند انجماد و ذوب بیانگر نرخ پایین-تر حاملگی در انتقال رویان مرحله‌ی بلاستوسیت نسبت به مراحل قبلی می‌باشد که به نوعی با نتایج به دست آمده در این مطالعه همسو است. در سال ۱۹۹۶، Vanderzwalmen و همکارانش نرخ موفقیت حاملگی را از انتقال بلاستوسیت‌های رشد یافته منجمد و ذوب شده، ۸ درصد و در مراحل مرولا و بلاستوسیت اولیه به ترتیب ۲۹ و ۲۵ درصد گزارش نمودند (۳۳). این مقادیر در سال‌های بعد بواسطه بهینه شدن تکنیک انجماد، افزایش یافت به گونه‌ای که در سال ۲۰۰۲ همین محقق میزان حاملگی ناشی از انتقال رویان ذوب شده بلاستوسیت را ۱۴ درصد گزارش نمود. این در حالی است که همچنان این میزان کمتر از بلاستوسیت اولیه (۲۷ درصد) و مرولا (۲۸ درصد) می‌باشد (۳۲). علاوه بر نرخ زنده‌مانی، میزان خروج از زونا نیز در بلاستوسیت‌های منجمد و ذوب شده کاهش چشمگیری می‌یابد که می‌تواند منجر به کاهش در میزان حاملگی گردد. نتایج حاصل از این طرح نیز نشان دهنده کاهش معنی‌داری در نرخ زنده‌مانی (به ترتیب ۵/۸۱

برای کسب بهترین نرخ انجماد، علاوه بر نوع و غلظت مناسب CPAs، روش انجماد و حامل مناسب نیز از اهمیت بالایی برخوردار است. مطابق گزارشات موجود، انجماد شیشه‌ای به عنوان یک روش کارآمد برای نگهداری رویان شناخته می‌شود. برای نمونه، در سال ۲۰۰۵ گزارشی از مقایسه دو تکنیک انجماد آهسته و شیشه‌ای توسط Kuwayama منتشر شد. در این تحقیق نرخ زنده‌مانی بلاستوسیت‌های انسانی منجمد و ذوب شده در دو تکنیک انجماد آهسته و شیشه‌ای، به ترتیب ۸۴ و ۹۰ درصد بود که این، کارایی بهتر انجماد شیشه‌ای نسبت به آهسته را نشان می‌دهد.

در طراحی و ساخت حامل‌های انجماد نیز همواره شرایطی مورد توجه قرار می‌گیرد که امکان تماس مستقیم رویان با کمترین حجم محلول انجماد با منبع سرما فراهم گردد. از جمله این حامل‌ها می‌توان به Hemi-Open Pulled Straw، Electron Microscopy Grids، CryoLoop و Cryotop اشاره نمود (۲۶ و ۳۴). در مقایسه‌ای که بین حامل‌های مختلف صورت گرفت، نرخ زنده‌مانی بالایی از بلاستوسیت در گونه‌های مختلف پس از انجماد شیشه‌ای با استفاده از Cryotop مشاهده گردید (۱۳). بنابراین به نظر می‌رسد که Cryotop از حامل‌های سیستم باز می‌تواند یک حامل مناسب برای فرآیند انجماد شیشه‌ای بلاستوسیت باشد (۱۱).

یکی از دغدغه‌های اصلی انجماد، تولید رویان‌هایی با کیفیت خوب و بدون کاهش قابلیت رشد بعد از ذوب است. اما استرس ایجاد شده به واسطه شوک دمایی و تشکیل کریستال‌های یخ باعث تغییرات جدی کروموزومی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی در رویان می‌گردد. این تغییرات می‌تواند باعث ایجاد پلی‌پلوئیدی، اختلالات اپی-ژنتیکی و نیز تغییر در الگوی بیان ژنی قبل از لانه‌گزینی گردند که اکثریت این ژنها در رشد و تکوین جنین نقش دارند (۲۹).

و در نتیجه افزایش شانس زنده‌مانی رویان‌های ذوب شده می‌رود (۱۶)؛ اما بر خلاف انتظار، کاهش معنی‌دار کیفیت رویان در این مرحله مشاهده می‌گردد. دلیل این امر را می‌توان در تغییر ساختار همراه با تشکیل و گسترش حفره بلاستوسل مملو از مایع تا حجم تقریبی دو سوم کل رویان جست‌وجو نمود (۳۲). حضور حفره مملو از مایع می‌تواند از یک سو به عنوان یک سد، مانع دسترسی CPAs به سلول‌های درونی رویان گردد و از سوی دیگر، احتمال تشکیل کریستال‌های یخ را در حین فرآیند انجماد و ذوب افزایش بخشد. برای غلبه بر این مشکل می‌بایست غلظت CPAs و یا زمان مجاورسازی با نمونه را افزایش داد که هر دو روش منجر به بالا رفتن غلظت CPAs از آستانه تحمل سمیت سلول می‌گردند و متعاقباً مرگ رویان را به دنبال خواهند داشت.

راهکاری که برای کاهش میزان سمیت CPAs پیشنهاد گردید، ترکیب چند ماده سرما محافظ است به طوری که با وجود غلظت بالای مجموع مواد سرما محافظ، غلظت هر کدام به تنهایی زیر آستانه سمیت سلولی باشد (۱). به طور مثال در برخی از روش کارهای انجماد شیشه‌ای، از ترکیب EG و DMSO استفاده شده است که نتیجه آن، رسیدن به غلظت مناسب از CPAs برای ممانعت از تشکیل کریستال‌های یخ و در عین حال، کاهش سمیت هر کدام از مواد سرما محافظ بود که نوع و غلظت CPAs بسته به گونه و مراحل مختلف رویانی می‌تواند متفاوت باشد (۲۵). در تحقیق حاضر نیز از ترکیب EG، DMSO و سوکروز به عنوان CPAs استفاده گردید که در سال ۲۰۰۵ توسط Kuwayama و Vajta معرفی شد. به منظور ارزیابی سمیت ترکیب و غلظت CPAs استفاده شده، مطالعه جداگانه‌ای از نرخ زنده‌مانی و خروج بلاستوسیت از زونا در تیمار سمیت نسبت به گروه انجماد صورت پذیرفت که تفاوت معنی‌داری در نتایج مشاهده نگردید (به ترتیب  $1/69 \pm$  و  $94/97$  درصد در مقابل  $5/81 \pm$  و  $94/43$  درصد و  $11/9 \pm$  و  $61/35$  درصد در مقابل  $11/76 \pm$  و  $57/78$  درصد).

به گفته *Gao*، الگوی بیانی سه ژن *Oct4*، *Nanog* و *Sox2* در بلاستوسیست خوک مستقیماً در ارتباط با متیلاسیون نمی‌باشد (۸) و این احتمال وجود دارد که سطح بیان این ژنها توسط اصلاحات هیستونی تنظیم گردند (۵ و ۳۵). تفاوت در نتایج تحقیقات فوق می‌تواند به دلیل نوع گونه (خوک در مقابل موش)، اندازه ناحیه پروموتور و تفاوت در مرحله رویانی باشد (۳۹). همچنین تحقیقی به منظور بررسی پروفایل ژنی رویانهای ۸ سلولی منجمد شده موش توسط Stergiou در سال ۲۰۰۴ صورت گرفت که در آن، افزایش بیان در گروههای ژنی آپویتوز، ژنهای مربوط به استرس و متابولیسم مشاهده گردید. به گزارش این محقق، این افزایش بیان می‌تواند به منظور سنتز مولکولهای مقاوم به سرما برای جبران کاهش دما در انجماد باشد (۳۱). در سال ۱۹۸۷، *Hanyside* کاهش تعداد کل سلولهای بلاستوسیست (۱۱۵ در مقابل ۱۲۶/۵) و رده *ICM* و همچنین کاهش در نسبت سلولهای *ICM* به *TE* را پس از انجماد ۸ سلولی موش مشاهده کرد. ایشان و برخی محققین دیگر دلایل احتمالی این کاهش را آپویتوز سلولهای *ICM* (۱۰)، تسهیم با تأخیر و اختصاصیت نا-بجای سلولهای *ICM* و *TE* (۲۱) دانستند. در جهت رد این نظریه، *Ray* در سال ۱۹۹۵ بیان کرد که تسهیم با تأخیر نمی‌تواند تنها دلیل کاهش تعداد سلولهای *ICM* و نسبت *ICM* به *TE* باشد زیرا در نهایت، تسهیم با اندکی تأخیر رخ داده و تأثیری بر تعداد سلولها نخواهد داشت. اما انجماد می‌تواند با تأثیر بر جای گیری نادرست بلاستومرها در جایگاه صحیح خود، باعث اختصاصیت نابجای سلولهای *ICM* و *TE* و یا تأخیر در آن گردد (۴).

در نهایت این گونه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در پی اختصاصیت نابجای سلولهای *ICM* و *TE* و نیز آپویتوز سلولهای *ICM* و به موجب آن تغییر در تعداد بلاستومرها، رده‌زایی بلاستوسیست به طور صحیح انجام نشده و از این طریق میزان بیان ژنهای بیان شونده در هر رده سلولی دچار تغییر می‌گردد. از جهتی دیگر، متیلاسیون پروموتور ژنها و

بنابراین علاوه بر بررسیهای سلولی تأثیرات انجماد بلاستوسیست به واسطه تشکیل کریستال یخ و سمیت مواد سرما محافظ مورد استفاده، ارزیابی مولکولی نیز می‌تواند به درک بهتر اثرات این تکنیک کمک نماید. با توجه به تغییرات ناگهانی شرایط محیطی و حرارتی در طی انجماد که می‌تواند به عنوان یک شوک بر رویان اثرگذار باشد، کاهش بیان ژنهای فعال و مؤثر در رشد و تکامل در این مرحله انتظار می‌رود اما بر خلاف آن، افزایش بیان ژنها در نتایج این تحقیق حاصل شده است.

در تحقیقات مختلف نشان داده شده است که کاهش در تعداد سلولهای *ICM* در رویان گاو (۹)، آسیب به *DNA* در بلاستوسیست موش (۱۷) و قطعه قطعه شدن *DNA* در هسته بلاستوسیست خوک (۶) می‌تواند از عوارض انجماد رویان باشد (۳۹). در رابطه با تغییر بیان ژن نیز، *Sudano* و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که انجماد شیشه‌ای رویان، بیان ژنهای درگیر در آپویتوز، شوک حرارتی، تمایز سلولها و تشکیل جفت را تغییر می‌دهد که این امر می‌تواند بر قابلیت زنده‌مانی پس از انجماد تأثیرگذار باشد. موافق با نتایج به دست آمده در این تحقیق از جهت افزایش بیان ژن در رویانهای منجمد و ذوب شده، *XUE-Ming Zhao* و همکارانش در ۲۰۱۲ به کاهش سطح متیلاسیون پروموتور ژنهای پرتوانی بلاستوسیست از جمله ژنهای *Oct4* (از ۸۵ درصد به ۶۲/۵ درصد) و *Nanog* (از ۷۷/۵ درصد به ۵۵ درصد) در بلاستوسیستهای منجمد و ذوب شده موش اشاره نمودند و نتیجه این کاهش متیلاسیون را افزایش معنی‌دار بیان ژنهای *Oct4* و *Nanog* بیان کردند (۳۹). در سال ۲۰۱۱، *Milroy* نیز در تحقیق خود کاهش سطح متیلاسیون پروموتور ژنهای *Oct4* و *Sox2* (۲۰) موشی را گزارش نمود؛ اما نتایج آزمایشات وی افزایش بیان در ژن *Sox2* را نشان نداد. همچنین در این آزمایش بر خلاف نظر *XUE-Ming Zhao*، تفاوت معنی‌داری در متیلاسیون پروموتور ژن *Nanog* در زایگوت‌های منجمد و ذوب شده موش مشاهده نگردید.



این تحقیق در قالب طرح پژوهشی به شناسه ۴۴۴ و با حمایت مالی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست-فناوری صورت پذیرفته است. نگارندگان، مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری صمیمانه آقایان دکتر مهدی شمس‌آرا، دکتر هادی حجاریان، احسان هاشمی و دکتر آیدین رحیم طایفه اعلام می‌نماید.

اصلاحات هیستونی نیز می‌تواند بیان ژنها را تحت تأثیر قرار دهند. بنابراین مطالعات بیشتری برای بررسی عوامل فوق جهت درک بهتر علل و چگونگی تغییرات بیان ژن پس از فرآیند منجمد و ذوب نیاز است.

### تشکر و قدردانی

### منابع

- 1- Ali, J. and J.N. Shelton, *Successful vitrification of day-6 sheep embryos*. Journal of Reproduction and Fertility, 1993. 99(1): p. 65-70.
- 2- Arav, A., et al., *New trends in gamete's cryopreservation*. Molecular and cellular endocrinology, 2002. 187(1): p. 77-81.
- 3- Chang, M.C., *Fertilization of Rabbit Ova in vitro*. Nature, 1959. 184(4684): p. 466-467.
- 4- Chatzimeletiou, K., et al., *Cytoskeletal analysis of human blastocysts by confocal laser scanning microscopy following vitrification*. Human Reproduction, 2012. 27(1): p. 106-113.
- 5- Fauque, P., et al., *Assisted reproductive technology affects developmental kinetics, H19 imprinting control region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos*. BMC developmental biology, 2007. 7(1): p. 116.
- 6- Fabian, D., et al., *Ultrastructure and cell death of in vivo derived and vitrified porcine blastocysts*. Molecular reproduction and development, 2005. 70(2): 155-165.
- 7- Fathi, R., M.R. Valojerdi, and P.E. Yazdi, *Investigating the Effect of Laser Assisted Hatching on the Development and Quality of Vitrified-Warmed 4-Cell Stage Mouse Embryos*. Yakhteh Medical Journal, 2008. 10(2): p. 121-128.
- 8- Gao, Y., et al., *Epigenetic regulation of gene expression in porcine epiblast, hypoblast, trophoblast and epiblast-derived neural progenitor cells*. Epigenetics, 2011. 6(9): p. 1149-1161.
- 9- Gomez, E., et al., *Vitrification of bovine blastocysts produced in vitro inflicts selective damage to the inner cell mass*. Reproduction in domestic animals, 2009. 44(2): p. 194-199.
- 10- Handyside, A.H. and S. Hunter, *Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation*. Roux's archives of developmental biology, 1986. 195(8): p. 519-526.
- 11- Hiroshi, I., H. Shinichi, and Y. Masanori, *In vitro and in vivo viability of human blastocysts collapsed by laser pulse or osmotic shock prior to vitrification*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2011. 28(4): p. 355-361.
- 12- Kasai, M., *Vitrification: Refined Strategy for the Cryopreservation of Mammalian Embryos*. Journal of Mammalian Ova Research, 1997. 14(1): p. 17-28.
- 13- Kuwayama, M., et al., *Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination*. Reproductive BioMedicine Online, 2005. 11(5): p. 608-614.
- 14- Kuwayama, M., et al., *Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes*. Reproductive BioMedicine Online, 2005. 11(3): p. 300-308.
- 15- Lawitts, J.A. and J.D. Biggers, *Culture of preimplantation embryos*. Methods in enzymology, 1992. 225: p. 153-164.
- 16- Leibo, S., *Cryobiology: preservation of mammalian embryos*, in *Genetic engineering of animals* 1986, Springer. p. 251-272.
- 17- Li, L., et al., *Comparison of DNA apoptosis in mouse and human blastocysts after vitrification and slow freezing*. Molecular reproduction and development, 2012. 79(3): p. 229-236.
- 18- Loutradi, K.E., et al., *Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing:*

- a systematic review and meta-analysis*. Fertility and sterility, 2008. 90(1): p. 186-193.
- 19- Luyet, B.J., *The vitrification of organic colloids and of protoplasm*. Biodynamica, 1937. 1(29): p. 1-14.
- 20- Milroy, C., et al., *Differential methylation of pluripotency gene promoters in in vitro matured and vitrified, in vivo-matured mouse oocytes*. Fertility and sterility, 2011. 95(6): p. 2094-2099.
- 21- Mi Ra, S., et al., *In vitro development and gene expression of frozen-thawed 8-cell stage mouse embryos following slow freezing or vitrification*. Clinical and Experimental Reproductive Medicine, 2011. 38(4).
- 22- Mitsui, K., et al., *The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells*. Cell, 2003. 113(5): p. 631-642.
- 23- Mukaida, T. and C. Oka, *Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts*. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, 2012. 26(6): p. 789-803.
- 24- Mukaida, T., et al., *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*. Human Reproduction, 2006. 21(12): 3246-3252.
- 25- Mukaida, T., et al., *Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique*. Fertility and sterility, 2001. 76(3): p. 618-620.
- 26- Mukaida, T., et al., *Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles\**. Human Reproduction, 2003. 18(2): p. 384-391.
- 27- Quinn, P., C. Barros, and D.G. Whittingham, *Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa*. Journal of Reproduction and Fertility, 1982. 66(1): p. 161-168.
- 28- Rall, W.F. and G.M. Fahy, *Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 (deg)C by vitrification*. Nature, 1985. 313(6003): p. 573-575.
- 29- Saragusty, J. and A. Arav, *Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification*. Reproduction, 2011. 141(1): p. 1-19.
- 30- Silva, J., et al., *Nanog is the gateway to the pluripotent ground state*. Cell, 2009. 138(4): p. 722-737.
- 31- Stergiou, L. and M. Hengartner, *Death and more: DNA damage response pathways in the nematode C. elegans*. Cell Death & Differentiation, 2004. 11(1): p. 21-28.
- 32- Vanderzwalmen, P., et al., *Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification*. Human Reproduction, 2002. 17(3): p. 744-751.
- 33- Vanderzwalmen, P., et al., *Two essential steps for a successful intracytoplasmic sperm injection: injection of immobilized spermatozoa after rupture of the oolema*. Human Reproduction, 11(3): 540-547.
- 34- Vanderzwalmen, P., et al., *Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing*. Human Reproduction, 2003. 18(7): p. 1504-1511.
- 35- Wang, Z., L. Xu, and F. He, *Embryo vitrification affects the methylation of the H19/Igf2 differentially methylated domain and the expression of H19 and Igf2*. Fertility and sterility, 2010. 93(8): p. 2729-2733.
- 36- Whittingham, D., *Survival of mouse embryos after freezing and thawing*. 1971.
- 37- Yamanaka, Y., et al., *Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst*. Developmental Dynamics, 2006. 235(9): p. 2301-2314.
- 38- Yamanaka, Y., et al., *Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst*. Dev Dyn, 2006. 235(9): p. 2301-14.
- 39- Zhao, X.M., et al., *Effect of vitrification on promoter methylation and the expression of pluripotency and differentiation genes in mouse blastocysts*. Molecular reproduction and development, 2012. 79(7): p. 445-450.

## The effect of vitrification on pluripotency specific genes, *Oct4* and *Nanog* in mouse blastocysts

Fathalizadeh P.<sup>1</sup>, Dashtizad M.<sup>2</sup>, Asaadi Tehrani G.<sup>1</sup> and Daliri Joupari M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Genetics Dept., Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, I.R. of Iran

<sup>2</sup> National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

### Abstract

From the first vitrification of *mouse* embryos in 1985, considerable efforts have been made to develop and improve cryopreservation techniques, but still biochemical and fetal chromosomal abnormalities caused by vitrification can cause changes in the pattern of genes expression involved in embryonic development and function, reduced implantation and fetal death. The purpose of this study was to investigate the effects of vitrification on survival and the expression of pluripotency specific genes like *Oct4* and *Nanog* in the vitrified-warmed *mouse* blastocysts. Harvested blastocysts from superovulated female mice were vitrified in the presence of dimethyl sulfoxide 15%, ethylene glycol 15% and sucrose 0.5 M as cryoprotectants and vitrified in liquid nitrogen after loading on Cryotop. Thawing process was performed by immersing the blastocysts in thawing solution prepared using sucrose 1 M. Survival and hatching rates were evaluated and also the *Oct4* and *Nanog* genes expression in vitrified- thawed and fresh blastocysts (control group) were assessed by real time-PCR method. Survival and hatching rates decreased significantly in vitrified blastocysts compared with control group ( $94.43 \pm 5.81\%$  vs. 100% for survival and  $57.78 \pm 11.76\%$  vs.  $86.88 \pm 5.80\%$  for hatching). Also increased expression of *Nanog* and *Oct4* genes were observed in vitrified- warmed blastocysts. Considering the results of this study, it can be said that vitrification of *mouse* embryo at the blastocyst stage can change gene expression and quality of the embryo.

**Key words:** Vitrification, *Mouse* blastocyst, *Oct4* and *Nanog* genes