



ارزیابی تکوین و بیان ژن‌های Bcl-2, Bax و ErbB4 پس از انجماد شیشه‌ای جنین‌های هشت سلولی و بلاستوسیست

نسرین مجیدی قره ناز، منصوره موحدین^{*}، زهره مظاهری

گروه علوم تشریحی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۶/۲۹

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۱/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: تکنیک انجماد شیشه‌ای یک روش مناسب برای نگه داری جنین می‌باشد. طی این فرآیند، ژن‌های دخیل در لانه گزینی و آپوپتوزی تغییر یافته و می‌تواند بر کیفیت جنین‌ها تأثیر گذارد؛ لذا در این مطالعه بیان ژن‌های Bcl-2, Bax به عنوان ژن‌های آپوپتوزی و ErbB4 به عنوان ژن لانه گزینی در جنین‌های منجمد و گرم شده موشی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: موش‌های ماده نژاد NMRI ۸-۶ هفته با استفاده از تزریق PMSG ۷/۵ IU و ۴۸ ساعت بعد HCG ۷/۵ IU تحریک تخمک گذاری و سپس در کنار موش نر قرار داده شدند. پس از بررسی پلاک واژنی، جنین‌های ۸ سلولی جمع آوری شده و به سه گروه شامل گروه کنترل (جنین‌های تازه)، گروه آزمون یک (جنین‌های ۸ سلولی منجمد شده) و گروه آزمون دو (جنین‌های بلاستوسیست منجمد شده) تقسیم شدند. در پایان پس از استخراج RNA، بیان ژن‌های Bcl-2, Bax و ErbB4 با تکنیک Real time PCR ارزیابی گردید. داده‌های حاصل با آزمون Chi-Square و ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان داد که میزان تشکیل بلاستوسیست ثانویه و دژنراسیون بین سه گروه مطالعه تفاوت معنی داری نداشت و میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl2 و ErbB4 بین سه گروه تفاوت معنی داری نداشت.

نتیجه‌گیری: فرآیند انجماد و گرم کردن در مرحله هشت سلولی و بلاستوسیست تأثیری نامطلوبی بر میزان تکوین جنین‌ها نداشته و در بیان ژن‌های Bax و Bcl2 و ErbB4 تأثیر منفی ندارد.

کلمات کلیدی: انجماد شیشه‌ای، بلاستوسیست، بیان ژن لانه گزینی

مقدمه

تحریک دارویی به منظور جمع آوری تخمک‌ها و قرار گرفتن مریض در معرض دارو، کاهش یابد و از حاملگی چند قلوپی جلوگیری شود. همچنین ذخیره کردن جنین‌ها از یک سیکل، اجازه می‌دهد که مریض حاملگی‌های خود را فاصله گذاری منطقی کند (۱، ۳ و ۴). با استفاده از این تکنیک می‌توان فرصت بارداری را برای بیمارانی که برای شیمی درمانی یا رادیو درمانی آماده می‌شوند را حفظ نمود (۵). از زمان اولین تلاش‌ها در این زمینه، جنین‌های بسیاری از پستانداران فریز شده است. از جمله این

استفاده از انجماد شیشه‌ای برای حفظ و نگه داری جنین‌های اضافی حاصل از لقاح آزمایشگاهی امری معمول می‌باشد (۱). انجماد شیشه‌ای در واقع سخت شدن و شیشه‌ای شدن یک محلول در اثر سرمای ناگهانی می‌باشد، که در طی آن کریستال یخ تشکیل نمی‌شود. تکنیک انجماد شیشه‌ای از نظر وقت و هزینه مقرون به صرفه بوده و نیازی به تجهیزات گران قیمت ندارد (۲). با استفاده از این تکنیک، می‌توان جنین‌های اضافی را که در یک سیکل تحریک تخمک گذاری و IVF^۱ به دست می‌آید را فریز نمود و در سیکل‌های دیگر به رحم انتقال داد تا تعداد سیکل‌های

¹ In Vitro Fertilization

* نویسنده مسئول: منصوره موحدین، گروه علوم تشریحی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۳۵۸۵ Email: movahed.m@modares.ac.ir

کنش بین این دو، لانه‌گزینی را در انسان و موش واسطه‌گری می‌کند (۱۹). با توجه به مطالب بالا، در این مطالعه سعی بر آن بوده است تا تکوین و بیان ژن‌های آپوپتوزی Bcl-2, Bax و لانه‌گزینی ErbB4 پس از انجماد شیشه‌ای جنین‌های هشت سلولی و بلاستوسیت مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

نگهداری حیوانات

در این مطالعه از موش سفید نژاد NMRI با سن ۸-۶ هفته استفاده شد. این حیوانات آزمایشگاهی از موسسه 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 ± 2 درجه سانتی‌گراد) نگه‌داری شدند. لازم به ذکر است که در حین انجام این مطالعه کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات بر اساس قانون حمایت از حیوانات که در سال ۲۰۰۶ در آمریکا به تصویب رسیده است مد نظر گرفته شد.

تحریک تخمک‌گذاری و جمع‌آوری جنین

با تزریق داخل صفاقی ۷/۵ واحد بین‌المللی PMSG^۲ (Intervert, Belgium) و به دنبال آن پس از ۴۸ ساعت با تزریق ۷/۵ واحد بین‌المللی HCG^۳ (Pregnyl, Iran) تحریک تخمک‌گذاری صورت گرفت. موش‌های ماده بلافاصله پس از تزریق HCG جهت جفت‌گیری به صورت یک به یک با موش‌های نر بالغ از همان نژاد با سن ۸-۱۰ هفته در یک قفس قرار گرفتند. جهت اطمینان از وقوع جفت‌گیری، صبح روز بعد موش‌های ماده را نظر وجود پلاک واژن بررسی شدند. موش‌های دارای پلاک واژن به عنوان موش حامله انتخاب شدند. جهت به دست آوردن جنین ۸-۵ سلولی از موش‌های ماده حامله با گذشت ۶۲-۶۰ ساعت پس از تزریق HCG موش‌ها قطع نخاع شدند و لوله‌های رحمی آن‌ها خارج گردید (۵). لوله‌ها بلافاصله در قطره‌های محیط HTF با HEPES (Genocell, Iran) حاوی ۱۰٪ سرم آلبومین انسانی^۴ (Biotest, Germany) قرار داده شد و سپس با تزریق مقداری از همین محیط به داخل لوله‌های رحمی توسط یک سرنگ انسولین ۱cc، با سر سرنگ مخصوص جنین‌های ۵-۸ سلولی از لوله خارج شدند. جنین‌های هشت سلولی به دست آمده به طور تصادفی به

موارد می‌توان به جنین‌های موش اشاره داشت که در مراحل مختلف تکوینی قابل فریز کردن هستند (۶).

نتایج نشان می‌دهد که به کارگیری روش‌های انجمادی علی‌رغم نقش غیر قابل انکار آن‌ها در درمان افراد نابارور، به دلیل اثرات ضد یخ و تغییرات شدید برودتی و حرارتی می‌تواند تاثیرات نامطلوبی بر فراساختار سلول داشته باشد (۷ و ۸).

در بعضی موارد سرعت بالای سرد کردن و غلظت بالای ضد یخ‌ها، سازماندهی کروموزوم‌ها و میکروتوبول‌های تخمک‌های موش را تغییر می‌دهد. دایمتیل سولفوکسید، باعث اختلال در شبکه اکتین در تخمک‌های موش می‌شود که منجر به تاخیر در تکوین جنین می‌گردد (۹، ۱۰ و ۱۱). همچنین انجماد شیشه‌ای می‌تواند توانایی زنده ماندن جنین‌ها را کاهش داده و منجر به آسیب‌های فیزیکی و شیمیایی گردد و موجب راه اندازی پاسخ استرسی و فعال شدن آپشار آپوپتوزی شود (۱۲، ۱۳ و ۱۴). در طول تکوین جنین‌های موش، ژن‌های ضد آپوپتوزی و آپوپتوزی مختلفی بیان می‌شود (۱۵).

آپوپتوز یک شکل از مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است. واژه مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده برای توضیح حوادث پشت سرهم و هماهنگی به کار می‌رود که منجر به مرگ سلول طی مراحل تکوینی می‌شود (۱۶).

اعضای خانواده Bcl-2 در تنظیم آپوپتوز نقش دارند. Bcl-2 یک ژن ضد آپوپتوزی می‌باشد که بقای سلول را پیش می‌برد در حالی که Bax یک ژن پروآپوپتوزی بوده که منجر به پیشبرد مرگ سلولی می‌گردد (۱۷). در این مطالعه اثرات انجماد شیشه‌ای بر بیان این دو ژن مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین ژن ErbB4 یک ژن درگیر در لانه‌گزینی نیز بررسی شده است. مطالعات نشان داده است که برهم کنش بین ErbB4 در تروفواکتودرم و HB-EGF در اپیتلیوم رحم، چسبندگی آغازین را واسطه‌گری می‌کند (۱۸).

بلاستوسیت‌های قبل از لانه‌گزینی در موش، ErbB4 را بیان می‌کنند. گیرنده محصول این ژن، HB-EGF می‌باشد. در انسان و موش HB-EGF، تکثیر سلولی جنینی و خروج بلاستوسیت از زونا پلوسیدا و رشد تروفوبلاست را تحریک می‌کند (۱۸) و برهم

^۴ Human serum albumin

^۲ Pregnant Mar's Serum Gonadotropin

^۳ Human Chorionic Gonadotropin



ماند و سپس به محلول ساکارز ۰/۵ مول انتقال یافت و به مدت ۳ دقیقه در این محلول باقی ماند. سپس به محلول ساکارز ۰/۲۵ مول 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.

بررسی‌های مولکولی جنین‌ها با روش Real time PCR

برای بررسی میزان بیان ژن‌های Bcl2, Bax و ErbB4 از Real time quantitative PCR (RT-qPCR) استفاده گردید. جنین‌های تکوین یافته در هر سه گروه جمع آوری گردیدند و تعداد یکسانی از جنین‌ها برای استخراج RNA در نظر گرفته شد. به این ترتیب در ابتدا RNA کل جنین‌ها با استفاده از کیت Qiagen, Germany) استخراج شد و پس از تیمار با آنزیم DNase (Sigma, Germany)، با استفاده از آنزیم کپی برداری معکوس^۵ به cDNA تبدیل شد. ساخت cDNA براساس کیت Fermentas (Thermo scientific, USA) انجام گردید. cDNA ساخته شده، با روش Real time -PCR^۶ تکثیر و مورد بررسی قرار گرفت. هر واکنش PCR با استفاده از SYBR Green و master mix (Applied Biosystems) دستگاه ABI Step One (Applied Biosystems, Sequence Detection Systems, Foster City, CA) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت.

توالی پرایمرهای پیش رو و معکوس اختصاصی برای ژن‌های مورد بررسی با استفاده از نرم افزار Oligo7 طراحی گردید. GAPDH به عنوان ژن مرجع و توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول شماره ۱ ارائه شده است. ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. صحت هر منحنی تکثیر (Amplification) توسط منحنی Melting و با استفاده از دمای اختصاصی Melt که برای محصول هر ژن اختصاصی می‌باشد، تایید گردید. میزان بیان هر ژن هدف نسبت به ژن رفرنس با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید.

سه گروه کنترل، آزمون یک و آزمون دو تقسیم شدند. در گروه کنترل ۸۰ عدد جنین در قطره‌های کشت HTF حاوی ۱۰٪ سرم آلبومین انسانی به مدت ۳ روز تا مرحله بلاستوسیست ثانویه کشت داده شدند. در گروه آزمون یک، همین تعداد جنین، در مرحله هشت سلولی منجمد و گرم شده و سپس به مدت ۳ روز تا مرحله بلاستوسیست ثانویه کشت داده شدند. در نهایت در گروه آزمون دو، ۸۰ عدد جنین به مدت ۳۰-۳۶ ساعت تا مرحله بلاستوسیست اولیه کشت داده شدند. ۷۶ عدد جنین زنده در مرحله بلاستوسیست اولیه منجمد و گرم شده و سپس تا مرحله بلاستوسیست ثانویه کشت داده شدند. ملاک انتخاب جنین‌های زنده تعداد بلاستومرهای مرده بود، به طوری که جنین‌های با بیش از ۵۰٪ بلاستومر مرده از مطالعه حذف گردید.

تکنیک انجماد شیشه‌ای جنین‌های هشت سلولی و بلاستوسیست

به منظور انجام انجماد شیشه‌ای جنین‌ها، از روش Kuwayama با استفاده از کرایولاک (Biotech USA) استفاده گردید (۱). در مرحله انجماد شیشه‌ای، جنین‌ها به محلول تعادل منتقل شده و به مدت ۱۵-۵ دقیقه در محلول تعادل باقی ماندند. محلول تعادل حاوی ۷/۵٪ اتیلن گلیکول (Sigma, Germany) و ۷/۵٪ دی متیل سولفوکسید (Sigma, Germany) حل شده در HTF دارای ۱۰٪ آلبومین انسانی می‌باشد. سپس جنین‌ها به محلول انجمادی منتقل شده و به مدت یک دقیقه در آن باقی ماندند. محلول انجمادی حاوی ۱۵٪ اتیلن گلیکول و ۱۵٪ دی متیل سولفوکسید و ۰/۵ مول بر لیتر ساکارز (Sigma, Germany) حل شده در HTF دارای ۱۰٪ آلبومین انسانی بود. در نهایت جنین‌ها بر روی کرایولاک منتقل شده و بلافاصله وارد نیتروژن مایع شدند.

تکنیک گرم کردن جنین‌های هشت سلولی و بلاستوسیست

پس از گذشت دو ساعت از انجماد شیشه‌ای، جنین‌ها در طی ۳ مرحله گرم شدند. پس از خارج کردن کرایولاک از نیتروژن مایع، بلافاصله در محلول ساکارز یک مول (۳۷°C) فرو برده شد. جنین‌ها به مدت یک دقیقه در قطره محلول ساکارز یک مول باقی

^۶ Polymerase Chain Reaction

^۵ Reverse Transcription

بررسی‌های آماری نتایج

تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از شمارش کنترل (۹۲/۵٪) تفاوت معنی داری نداشت ($P > 0.05$). نتایج این بلاستوسیت‌ها به ترتیب ۸۸/۸٪ و ۸۷/۵٪ بود که نسبت به گروه

جدول ۱: توالی پرایمرهای پیش رو و معکوس اختصاصی برای ژن‌های مورد مطالعه

Gene	Primer sequence	Length	Code number	Tm
GAPDH	FOR: 5'-GACTTCAACAGCAACTCCCAC-3' REV: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	125	NM_001289726.1	80
Bax	FOR: 5'-CGGCGAATTGGAGATGAAGTGA-3' REV: 5'-GCAAAGTAGAAGAGGGCAA-3'	161	XM_006540584.1	83.5
Bcl2	FOR: 5'-ACCGTCGTGACTTCGCGAGAG-3' REV: 5'-GGTGTGCAGATGCCGGTTCA-3'	239	NM_009741.1	84
ErbB4	FOR: 5'-TACGAGCCTGCCCAAGTTC-3' REV: 5'-GTGCCGATTCCATCACATCCT-3'	103	XM_006536907.1	76.5

قسمت بیانگر آن بود که روش مورد استفاده برای انجماد جنین‌های مرحله ۸ سلولی و بلاستوسیت مناسب بود (شکل ۱). میزان دژنراسیون‌های آزمون یک (انجماد در مرحله هشت سلولی) و آزمون دو (انجماد در مرحله بلاستوسیت) و کنترل (غیر انجمادی) به ترتیب ۱۱/۲٪، ۱۲/۵٪ و ۷/۵٪ بود که تفاوت مشاهده شده بین گروه‌ها از نظر آماری معنی دار نبود (جدول ۲). میزان بیان ژن Bax در گروه‌های آزمون یک و دو (یک بار انجمادی) نسبت به گروه کنترل (جنین‌های تازه) تفاوت معنی داری نداشت ($P > 0.05$)؛ لذا می‌توان گفت که انجماد شیشه‌ای در هر دو مرحله ۸ سلولی و بلاستوسیت منجر به تغییر معنی دار در بیان ژن پروآپتوزی Bax (الفا کننده آپوپتوز) نشد.

میزان بیان ژن Bcl-2 در گروه‌های آزمون یک و دو (یک بار انجمادی) نسبت به گروه کنترل (جنین‌های تازه) تفاوت معنی

بلاستوسیت‌ها و میزان تکوین آن‌ها با استفاده از آزمون Chi-square جهت ارزیابی میزان بقا بلاستوسیت‌های منجمد و گرم شده در گروه‌های آزمایشی مختلف انجام گرفت. جهت ارزیابی داده‌های حاصل از RT-qPCR، از آزمون ANOVA و آزمون تکمیلی Tukey استفاده گردید. آنالیز آماری با نرم افزار SPSS (version 16.0, Chicago, IL, USA) انجام گرفت و معنی داری در سطح $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SD) حاصل از ۳ نمونه آزمایش مختلف با ۲۵ جنین در هر نمونه آزمایش ارائه شده است.

نتایج

میزان کلی تشکیل بلاستوسیت در گروه‌های آزمون یک (انجماد در مرحله هشت سلولی) و آزمون دو (انجماد در مرحله



شکل ۱: جنین‌های ۸ سلولی منجمد نشده (A)، منجمد و گرم شده (B) و بلاستوسیت منجمد و گرم شده (C).



در هر دو مرحله ۸ سلولی و بلاستوسیسیت منجر به تغییر معنی دار در بیان ژن لانه گزینی ErbB4 نشد.

بحث و نتیجه گیری

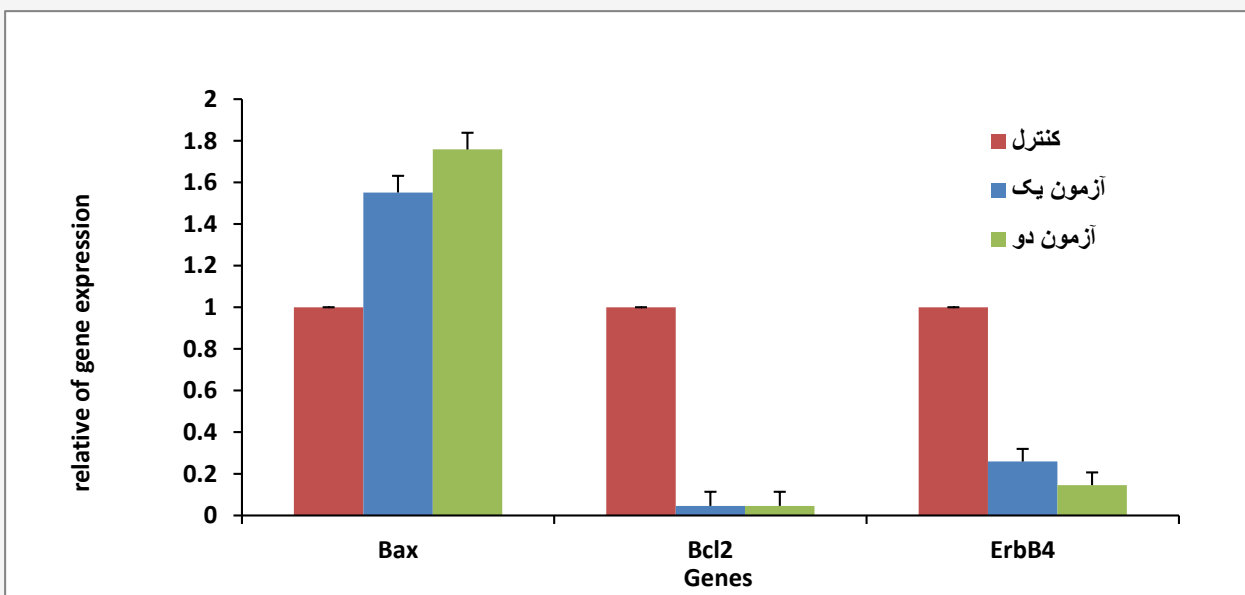
جنین‌های موش را می‌توان به طور موثر در مراحل مختلف تکوینی منجمد نمود. برخی از محققین مراحل مختلف تکوین جنینی را در انجماد شیشه‌ای بی تاثیر دانسته‌اند و قید می‌کنند

داری نداشت ($P > 0.05$)؛ لذا می‌توان گفت که انجماد شیشه‌ای در هر دو مرحله ۸ سلولی و بلاستوسیسیت منجر به تغییر معنی دار در بیان ژن آنتی آپوپتوزی Bcl2 نشد.

میزان بیان ژن ErbB4 در گروه‌های آزمون یک و دو (یک بار انجمادی) نسبت به گروه کنترل (جنین‌های تازه) تفاوت معنی داری نداشت ($P > 0.05$)؛ لذا می‌توان گفت که انجماد شیشه‌ای

جدول ۲: میزان کلی تشکیل بلاستوسیسیت و دژنراسیون

گروه	میزان کلی تشکیل بلاستوسیسیت	میزان کلی دژنراسیون
(جنین‌های ۸ سلولی منجمد نشده) کنترل	۹۲/۵	۷/۵
آزمون یک (جنین‌های ۸ سلولی منجمد شده)	۸۸/۸	۱۱/۲
آزمون دو (جنین‌های بلاستوسیسیت منجمد شده)	۸۷/۵	۱۲/۵



نمودار ۱: الگوی بیان نسبی ژن‌های آپوپتوزی و لانه گزینی 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 (SD) و از ۳ تکرار به دست آمده است. گروه کنترل: جنین‌های ۸ سلولی منجمد نشده، گروه آزمون ۱: جنین‌های ۸ سلولی منجمد شده، گروه آزمون ۲: جنین‌های بلاستوسیسیت منجمد شده

که تفاوت معنی داری بین درصد زنده ماندن جنین‌های مراحل مختلف پس از گرم کردن وجود ندارد (۲۰). اما عده‌ای دیگر مرحله تکوینی خاصی را برای انجماد شیشه‌ای توصیه می‌کنند (۶، ۲۱ و ۲۲).

با توجه به اختلاف نظر در مورد مرحله تکوینی جنین در انجماد شیشه‌ای، در مطالعه حاضر اثر انجماد شیشه‌ای در دو مرحله (هشت سلولی و بلاستوسیست) با یکدیگر مقایسه شد.

بر طبق نتایج مطالعه حاضر، میزان کلی تشکیل بلاستوسیست بین دو گروه آزمون یک و آزمون دو تفاوت معنی داری نداشت؛ لذا براساس این مطالعه، می‌توان انجماد شیشه‌ای را در هر کدام از مراحل ۸ سلولی یا بلاستوسیست انجام داد. در مطالعه حاضر از کرایو لاک به منظور انجام انجماد شیشه‌ای استفاده گردید، که منجر به میزان بالایی از تکوین جنین‌ها شد و لذا این روش، روشی کارآمد و موثر می‌باشد. در مطالعات مختلفی اثر انجماد شیشه‌ای با روش‌های مختلف بر مرحله تکوینی جنین ارزیابی شده است. نتایج مطالعات Zang در سال ۲۰۰۹ نیز نشان داد که جنین‌های منجمد شده در مرحله ۲، ۴ و ۸ سلولی بعد از گرم کردن ظاهری طبیعی داشتند. میزان بقای جنین‌های منجمد شده در مراحل مختلف بعد از گرم کردن ۹۶/۷٪ بود و تفاوت معنی داری در میان مراحل ۲، ۴ و ۸ سلولی وجود نداشت. اما میزان تشکیل بلاستوسیست و خروج از زونا در مرحله ۸ سلولی نسبت به مرحله ۲ و ۴ سلولی بالاتر بود. تفاوت مشاهده شده در میزان تشکیل بلاستوسیست در دو مطالعه را می‌توان به نوع روش مورد استفاده و مرحله تکوینی جنین برای انجماد شیشه‌ای نسبت داد (۶). Dahi و همکاران در سال ۲۰۰۹ جنین‌های موش را در مراحل پیش هسته، ۲ سلولی و مورولا با روش انجماد شیشه‌ای قطره‌ای منجمد کردند. نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد که میزان تکوین در جنین‌های منجمد شده در مرحله جنین‌های پیش هسته و دو سلولی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری پایین‌تر بود. در حالی که در مرحله مورولا تفاوت معنی داری بین دو گروه انجمادی و کنترل وجود نداشت علت تفاوت را می‌توان به روش مورد استفاده برای انجماد شیشه‌ای و غلظت ضد یخ‌ها نسبت داد به طوری که در مطالعه Dahi از روش انجماد شیشه‌ای قطره‌ای استفاده گردید در حالی که در مطالعه حاضر انجماد شیشه‌ای

جنین‌ها بر اساس روش Kuwayama با استفاده از کرایولاک انجام گردید (۲۳). در مطالعه دیگری که توسط Sanches – Osorio و همکاران انجام شد، جنین‌های ۲-۴ سلولی، مورولا و بلاستوسیست خوک با روش superfine OPS منجمد شدند. نتایج به دست آمده برخلاف مطالعه حاضر نشان داد که انجماد شیشه‌ای با روش مذکور منجر به کاهش معنی داری در میزان بقا و تکوین در جنین‌های ۲-۴ سلولی در مقایسه با جنین‌های مورولا و بلاستوسیست گردید. تفاوت مشاهده شده مطالعه Sanches – Osorio و همکاران با نتایج مطالعه حاضر را شاید بتوان به دلیل استفاده از دو روش انجمادی متفاوت و دو گونه مختلف ذکر کرد (۲۴). جنین‌های مورولا و بلاستوسیست اولیه نیز توسط Sun و همکاران منجمد شدند و مشخص گردید که میزان تکوین در مورولا بلاستوسیست اولیه منجمد شده مشابه با گروه کنترل بود (۲۰). انجماد جنین‌های انسانی در مرحله بلاستوسیست نیز منجر به زنده ماندن تعداد زیادی از جنین‌ها گردید که در مطالعه Cohen و همکاران به آن پرداخته شد (۲۵). در حالی که Miyak و همکاران گزارش کردند که با استفاده از روش انجماد شیشه‌ای میزان حیات بلاستوسیست‌ها به دلیل وسیع شدن حفره بلاستوسل کاهش می‌یابد (۲۱). مغایرت نتایج گزارش شده را می‌توان به روش‌های گوناگون استفاده شده برای انجماد شیشه‌ای، میزان غلظت ضد یخ مورد استفاده و نوع گونه نسبت داد.

در ادامه مطالعه الگوی بیان ژن‌های Bcl-2، Bax و Erbb4 در جنین‌های منجمد شده بررسی گردید. در میان ژن‌های درگیر در آپوپتوز، ژن‌های اعضای خانواده Bcl-2 نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز دارند. Bcl-2 یک ژن ضد آپوپتوز می‌باشد که بقای سلول را پیش می‌برد در حالی که Bax یک ژن پروآپوپتوزی بوده که منجر به پیشبرد مرگ سلولی می‌گردد. آپوپتوز یک مکانیسم دژنره شدن اووسیت و قطعه قطعه شدن جنین‌ها می‌باشد؛ لذا کاهش پتانسیل تکوینی جنین‌ها مرتبط با آپوپتوز می‌باشد. در مطالعه حاضر میزان بیان ژن پروآپوپتوزی Bax و آنتی آپوپتوزی Bcl-2 در گروه‌های انجمادی نسبت به گروه غیرانجمادی تفاوت معنی داری نشان نداد. از طرفی میزان تکوین جنین‌ها در گروه‌های انجمادی تفاوت معنی داری با جنین‌های گروه کنترل نداشت. مطالعات گوناگونی در مورد اثر انجماد شیشه‌ای با



البته قابل ذکر است که ErbB4 تنها فاکتور دخیل در لانه گزینی نمی‌باشد. به خصوص در انسان سیستم L-selectin و تروفونین‌ها و اینتگرین‌ها نیز در لانه گزینی دخیل می‌باشد؛ لذا با بررسی یک ژن نمی‌توان به طور کامل در مورد میزان لانه گزینی نتیجه‌گیری کرد.

انجماد شیشه‌ای، روش جایگزین موثری جهت انجماد جنین در مراحل مختلف تکوین می‌باشد. مزیت منحصر به فرد انجماد شیشه‌ای، حذف آسیب‌های مکانیکی ایجاد شده به وسیله شکل‌گیری کریستال‌های یخ خارج سلولی و داخل سلولی و کاهش آسیب سرما با کاهش مدت زمان در معرض می‌باشد. لازم به ذکر است که استفاده از کرایولاک تأثیری نامطلوبی بر میزان تکوین جنین‌ها و بیان ژن‌های آپوپتوزی Bax و Bcl2 و ژن لانه گزینی ErbB4 ندارد؛ لذا روش مورد استفاده روش مناسبی بوده است. با این حال ژن‌های مورد استفاده در این مطالعه تنها ژن‌های درگیر در آپوپتوز و لانه گزینی نبوده و لازم است که مطالعه بر روی ژن‌های دیگر مرتبط با فرایند آپوپتوز و لانه گزینی 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. محققین بر خود لازم می‌دانند تا از زحمات جناب آقای شهرام پوربیرانوند به دلیل مساعدت در بخش مولکولی تشکر نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

روش‌های مختلف انجمادی بر میزان آپوپتوز صورت گرفته است از جمله می‌توان به مطالعه رجایی و همکاران در مورد اثر انجماد شیشه‌ای بر میزان آپوپتوز در بلاستوسیست موش اشاره کرد. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان آپوپتوز در بلاستوسیست‌های منجمد شده که پس از گرم کردن به مدت ۲ ساعت کشت داده شده بودند، نسبت به بلاستوسیست‌های منجمد نشده، به طور معنی داری بیشتر بود (۸). این نتایج بر خلاف مطالعه حاضر می‌باشد که انجماد شیشه‌ای با روش Kuwayama با استفاده از کرایولاک منجر به تغییر در بیان ژن‌های آپوپتوزی نمی‌گردد. این اختلاف در نتایج می‌تواند به دلیل تفاوت در روش انجمادی باشد. رجایی و همکاران جنین‌های بلاستوسیست را با استفاده از روش ارائه شده توسط Zhu منجمد کردند، در حالی که در مطالعه حاضر از روش Kuwayama با استفاده از کرایولاک استفاده گردید. همچنین میزان بیان ژن لانه گزینی ErbB4 در گروه‌های انجمادی نسبت به گروه غیر انجمادی تفاوت معنی داری نشان نداد. بررسی مطالعات گوناگون نشان داد که ErbB4 یک ژن مهم درگیر در لانه گزینی موش و انسان می‌باشد (۲۶ و ۲۷)؛ لذا بررسی بیان ژن مذکور در موش قابل تعمیم به موارد انسانی نیز می‌باشد. از آن جایی که فرایند انجماد می‌تواند بر محتوای مولکولی جنین‌ها تأثیر گذارد و میزان بیان ژن‌ها را تحت تأثیر قرار دهد و نظر به این که تاکنون مطالعه مشخصی در زمینه بررسی مولکولی ژن ErbB4 پس از انجماد شیشه‌ای انجام نگرفته است، در این مطالعه این ژن مورد بررسی قرار گرفت. مطابق با نتایج حاصله، میزان بیان ژن ErbB4 در جنین‌های منجمد شده در مرحله هشت سلولی و بلاستوسیست تفاوت معنی داری با جنین‌های غیر منجمد نداشت؛ لذا می‌توان گفت که انجماد شیشه‌ای با روش کرایولاک اثر سوئی بر بیان ژن لانه گزینی ErbB4 ندارد.

References

1. 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.
2. Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker MJ. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? Reprod Biomed Online. 2003; 7 (6): 623-33.



3. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*. 1983;305:707-9.
4. Cohen J, DeVane GW, Elsner CW, Fehilly CB, Kort HI, Massey JB, et al. Cryopreservation of zygotes and early cleaved human embryos. *Fertil Steril*. 1988;49:283-9.
5. Shin MR, Choi HW, Kim MK, Lee SH, Lee H-S, 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.
6. Zhang J, Cui J, Ling X, Li X, Peng Y, Guo X, et al. Vitrification of mouse embryos at 2-cell, 4-cell and 8-cell stages by cryotop method. *J Assist Reprod Genet*. 2009; 26 (11-12): 621-8.
7. Kasai M, Ito K, Edashige K. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. *Hum Reprod*. 2002; 17 (7): 1863-74.
8. Rajayi F, Soleymanirad J, Niknafs B, Ghafari M. The effect of vitrification on apoptosis in mouse blastocyst. *J Infertility*. 2004; 5(1) : 14-22 [Article in Persian]
9. Trounson A, preservation of human eggs and embryos. *Fertile stril*. 1986;46(1):1-12
10. Eroglu A, Toth TL, Toner M. Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryotop reservation of metaphase 2 mouse oocytes. *Fertility and sterility*. 1997; 96(5): 944-958
11. Mozdarani H, ZareiMoradi SH. Effect of vitrification on Survival and Chromosomal Abnormalities of Frozen-Thawed 8-Cell Mouse Embryos. *JRUMS*. 2005;4 (12). [Article in Persian]
12. Sonna LA, Fujita J, Gaffin SL, Lilly CM. Invited review: effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J Appl Physiol*. 2002; 92 (4): 1725-42.
13. Overström EW. In vitro assessment of embryo viability. *Theriogenology*. 1996; 45 (1): 3-16.
14. Bagusi A, Lonergan E, Overstrom M. Vitrification of bovine embryos: incidence of necrosis and apoptosis. *Theriogenology*. 2000; 55(4): 162-3.
15. Exley GE, Tang C, McElhinny AS, Warner CM. Expression of caspase and BCL-2 apoptotic family members in mouse preimplantation embryos. *Biol Reprod*. 1999; 61 (1): 231-9.
16. Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol*. 1964; 10 (4): 643-9.
17. Yang MY, Rajamahendran R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Anim Reprod Sci*. 2002;70:159–69.
18. Paria B, Das S, Andrews G, Dey S. Expression of the epidermal growth factor receptor gene is regulated in mouse blastocysts during delayed implantation. *Proc Natl Acad Sci*. 1993; 90 (1): 55-9.
19. Chobotova K, Spyropoulou I, Carver J, Manek S, Heath JK, Gullick WJ, et al. Heparin-binding epidermal growth factor and its receptor ErbB4 mediate implantation of the human blastocyst. *Mech Dev*. 2002; 119 (2): 137-44.
20. Sun X, Li Z, Yi Y, Chen J, Leno GH, Engelhardt JF. Efficient term development of vitrified ferret embryos using a novel pipette chamber technique. *Biol Reprod*. 2008; 79 (5): 832-40.
21. Miyake T, Kasai M, Zhu S, Sakurai T, Machida T. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Theriogenology*. 1993; 40 (1): 121-34.
22. Van der Auwera I, Cornillie F, Ongkowidjojo R, Pijnenborg R, Koninckx PR. Cryopreservation of pronucleate mouse ova: slow versus ultrarapid freezing. *Hum Reprod*. 1990; 5 (5): 619-21.
23. Dhali A, Anchamparuthy V, Butler S, Pearson R, Mullarky I, Gwazdauskas F. Gene expression and development of mouse zygotes following droplet vitrification. *Theriogenology*. 2007; 68(9): 1292-8.
24. Sanchez-Osorio J, Cuello C, Gil M, Almiñana C, Parrilla I, Caballero I, et al. Factors affecting the success rate of porcine embryo vitrification by the Open Pulled Straw method. *Anim Reprod Sci*. 2008; 108 (3): 334-44.
25. Cohen J, Simons RS, Fehilly CB, Edwards RG. Factors affecting survival and implantation if cryopreserved human embryos. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. 1986; 3 (1): 46-52.
26. Yoo HJ, Barlow DH, Mardon HJ. Temporal and spatial regulation of expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the human endometrium: a possible role in blastocyst implantation. *Dev Genet*. 1997; 21 (1): 102-8.
27. Wang J, Mayernik L, Schultz JF, Armant DR. Acceleration of trophoblast differentiation by heparin-binding EGF-like growth factor is dependent on the stage-specific activation of calcium influx by ErbB receptors in developing mouse blastocysts. *Development*. 2000; 127 (1): 33-44.



Original Article

Evaluating the Development and the Expression of Bax, Bcl-2, and ErbB4 Genes following Vitrification of Eight Cell and Blastocyst Embryos

Majidi Gharenaz N, Movahedin M*, Mazaheri Z

Anatomical Sciences Department, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Received: 15 Apr 2014

Accepted: 20 Sep 2014

Abstract

Background & Objective: In recent years, more attention has been devoted to herbal medicines. Up to now, many compounds with therapeutic effects has been extracted from the herbs. The aim of this study is to evaluate the antioxidant and the antimicrobial effect of *Rumex Alveollatus* L. and to partially identify the effective compounds in this plant.

Materials & Methods: Extraction was performed by using maceration method for dried flower sample. Then, the antimicrobial effect of aqueous and ethanolic extracts on eight bacterial sp. and two fungi were tested using disc diffusion method. The antioxidant effect was also determined through ferric reducing potency and phosphomolybdenum followed by total phenol determination. Finally, partial detection of bioactive compounds was conducted using chemical and calorimetric methods.

Results: The results showed that ethanolic extract had the most antimicrobial effect; while aqueous extract weakly affected bacterial and fungal strains. Antioxidant experiments also revealed that ethanol extract had more antioxidant effects than aqueous extract. The most content of total phenolic compounds was found in ethanol extract. The results of the plant chemical determination showed the presence of flavonoids, alkaloids, anthraquinones, tannins, glycosides, and reducing sugars.

Conclusion: Considering that few reports about the therapeutic effect of *Rumex alveollatus* L. has been published, this study could be considered as a valuable report about the important role of this plant on preventing infections and neutralizing oxidant agents.

Keywords: *Rumex alveollatus* L, Antioxidant effect, Antimicrobial effect, Aqueous extract, Ethanol extract

* **Corresponding author:** Mansoureh Movahedin, Anatomical Sciences Department, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Tel: +9821 82884502
Email: movahed.m@modares.ac.ir