

## اثرات انجماد شیشه‌ای بر میزان آپوتوز در بلاستوسیست موش

فرزاد رجایی<sup>۱</sup> (Ph.D.)، جعفر سلیمانی راد<sup>۲</sup> (Ph.D.)، بهروز نیک نفس<sup>۳</sup> (Ph.D.)، معرفت غفاری<sup>۴</sup> (M.D., Ph.D.)، عبدالرسول صفائیان<sup>۵</sup> (M.Sc.)

- ۱- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی قزوین، قزوین، ایران.
- ۲- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز، تبریز، ایران.
- ۳- استادیار، آزمایشگاه بافت‌شناسی و بیولوژی سلولی، مرکز تحقیقات علوم کاربردی دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز، تبریز، ایران.
- ۴- استادیار، گروه غدد تولیدمثل و جنین‌شناسی، پژوهشکده ابن‌سینا، تهران، ایران.
- ۵- مربی، گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز، تبریز، ایران.

### چکیده

**مقدمه:** در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های زیادی در انجماد شیشه‌ای (Vitrification) برای نگهداری جنین صورت گرفته است؛ ولی تاکنون، روش قابل اعتمادی در انجماد شیشه‌ای که بتواند میزان بالایی از زنده ماندن جنین را نشان دهد، ارائه نشده است. زیرا مکانیسم آسیب‌های جنین به دنبال انجماد شیشه‌ای به طور دقیق مشخص نشده است. مطالعه حاضر به منظور بررسی تاثیر انجماد شیشه‌ای بر روی میزان آپوتوز در جنین در مرحله بلاستوسیست صورت گرفته است.

**مواد و روشها:** بدین منظور ۹۵ عدد بلاستوسیست موش از نژاد Swiss Albino به طریق فلاش کردن شاخ رحم به دست آمد و به طور تصادفی به دو گروه تجربی (۴۲) و کنترل (۵۲) تقسیم شدند. در گروه کنترل بلاستوسیست‌ها پس از دریافت در محیط M16 به مدت دو ساعت کشت داده شدند و ایندکس آپوتوز در آنها پس از نشانه‌گذاری با تکنیک TUNEL و رنگ‌آمیزی زمینه‌ای با PI مشخص شد. در گروه تجربی بلاستوسیست‌ها پس از دریافت بلافاصله به طریق انجماد شیشه‌ای با محلول EFS40 منجمد شدند و در تانک حاوی نیتروژن مایع به مدت یک ماه نگهداری شدند پس از طی مدت مذکور نی‌های حاوی بلاستوسیست‌ها زوب گردیدند و پس از ۲ ساعت کشت در محیط M16 میزان ایندکس آپوتوز در این گروه پس از رنگ‌آمیزی با تکنیک TUNEL مشخص گردید.

**نتایج:** مقایسه نتایج نشان داد که میانگین تعداد بلاستومرها در بلاستوسیست‌های گروه منجمد شده موش (۴۴/۹۱±۲/۴۷) نسبت به گروه کنترل (۵۰/۲۳±۲/۹)، اختلاف معنی‌داری ندارد ( $P=0/176$ ). در حالیکه میانگین تعداد بلاستومرهای آپوتوتیک در بلاستوسیست‌های گروه منجمد شده موش (۴/۰۸±۰/۲۸) نسبت به گروه کنترل (۴/۹۳±۰/۲۲) اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P=0/02$ ) و میانگین میزان ایندکس آپوتوز بر حسب درصد در گروه فریز شده (۱۱/۸۷±۰/۶۳) به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل (۹/۱۲±۰/۶۷) بیشتر بود ( $P=0/004$ ).

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که انجماد شیشه‌ای باعث افزایش میزان آپوتوز در بلاستومرهای بلاستوسیست موش می‌شود.

**کل واژگان:** ناباروری، انجماد شیشه‌ای، آپوتوز، بلاستوسیست موش، و TUNEL.

**آدرس مکاتبه:** فرزاد رجایی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی قزوین، بلوار شهید باهنر، قزوین، ایران.

پست الکترونیکی: farzadraj@yahoo.co.uk

## مقدمه

در سال‌های اخیر پیشرفت‌های زیادی در علم کرایوبیولوژی<sup>۱</sup> برای حفظ جنین‌های حیوانی و انسانی به روش‌های انجماد آهسته و شیشه‌ای صورت گرفته است. در پروتکل‌های انجماد آهسته، از غلظت‌های پائین مواد ضد یخ<sup>۲</sup> استفاده می‌شود که با برودتی با سرعت ۰/۱ تا ۰/۳ درجه سانتیگراد در دقیقه همراه است ولی با توجه به کاهش میزان تکامل جنین پس از انجماد آهسته به دلیل تشکیل کریستال‌های یخ داخل و خارج سلولی و همچنین به دلیل نیاز به دستگاه انجماد و صرف وقت جهت این روش انجماد، امروزه تمایل زیادی به استفاده از انجماد شیشه‌ای در حفظ جنین‌های حیوانی و انسانی وجود دارد که اولین بار در سال ۱۹۳۷ توسط Luyet مطرح شد (۱) و در آن به علت استفاده از غلظت بالای ضد یخ و کوتاهی زمان آگیری، آب به سرعت از سلول خارج شده و محیط اطراف سلول به یکباره تبدیل به یخ شیشه‌ای (یخ فاقد کریستال) می‌شود. ضمناً استفاده از انجماد شیشه‌ای قادر به انجماد جنین از گونه‌هایی بوده است که قبلاً انجماد جنین‌های آنها میسر نبوده است (مثل خوک) (۲). با این حال تاکنون یک روش پایدار از انجماد شیشه‌ای پایه‌گذاری نشده است که بتواند میزان بالایی از زنده ماندن جنین را نشان دهد. زیرا تاکنون دقیقاً مکانیسم‌های آسیب جنین به دنبال انجماد شیشه‌ای مشخص نشده است (۳). برای تعیین شرایط مناسب برای انجماد جنین ضروری است که مکانیسم‌های آسیب جنین در هر روش تعیین شود. جنین‌ها در معرض انواع متفاوت از آسیب‌ها در طول انجماد هستند. مهمترین آنها، آسیب‌های ناشی از تشکیل یخ داخل سلولی و محلول‌های غلیظ ضد یخ است (۴، ۱). در انجماد آهسته جنین‌ها، یخ داخل و خارج سلولی عاملی مهم در

ایجاد آسیب می‌باشد (۵). در صورتی که در انجماد شیشه‌ای سمیت شیمیایی ضد یخ با غلظت بالا مانع مهمی است (۶). نتایج نشان می‌دهد که به‌کارگیری روش‌های انجماد، علی‌رغم نقش غیرقابل انکار آنها در درمان افراد نابارور، به دلیل اثرات ضد یخ و تغییرات شدید برودتی و حرارتی می‌تواند تأثیرات نامطلوبی بر فراساختمان سلول داشته و باعث آسیب سلولی به طرق مختلف شود (۳). از طرف دیگر مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده که از نظر مورفولوژیکی آپوپتوز نامیده می‌شود (۷)، پدیده‌ای است که در تکامل رویانی با حذف سلول‌های ناخواسته نقش مهمی را ایفا می‌نماید و این پدیده تحت تأثیر عوامل مختلف می‌تواند دچار تغییر گردد (۸). آپوپتوز یک شکل از مرگ سلولی است که توسط دو شاخص اصلی مشخص می‌شود. شاخص اول شامل ویژگی‌های مورفولوژیکی نظیر کاهش حجم سلول، متراکم شدن کروماتین، قطعه‌قطعه شدن<sup>۳</sup> هسته‌ای و در نهایت تشکیل اجسام آپوپتوتیک است و شاخص دیگر، شکسته شدن<sup>۴</sup> DNA بوسیله یک اندونوکلیاز وابسته به یون کلسیم و منیزیم به قطعات اولیگونوکلوئوزومی است که امروزه از روشی به نام TUNEL<sup>۵</sup> برای رنگ‌آمیزی سلول‌های آپوپتوتیک به طور رایج استفاده می‌شود که در این روش انتهای قطعات DNA تولید شده بوسیله آنزیم دی‌اکسی ترانسفراز انتهایی (TdT)<sup>۶</sup> با نوکلئوتیدهای جدید تغییر داده شده (فلوئورسین-dUTP) جایگزین می‌شوند و بنابراین انتهای شکسته‌شده از قطعات DNA دو زنجیره‌ای، مستقل از زنجیره قالب نشان‌دار شده و سپس در زیر میکروسکوپ فلوئوروسنت قابل رویت می‌شود (۹، ۱۰). در این روش حتی سلول‌های مراحل اولیه آپوپتوز نشان‌دار می‌شوند (۷). ثابت شده است که این تکنیک در اندازه‌گیری کمی مرگ سلولی در جنین

3- Fragmentation

4- Cleavage

5 - TdT- mediated dUTP- biotin nick end labeling

6 - Terminal Deoxynucleotidyl Transferase

1- Cryobiology

2- Cryoprotectant

موش و انسان، که در آن تعداد سلول‌ها کم می‌باشد و بنابراین مقادیر کمی از DNA وجود دارد بسیار مفید است (۱۰-۱۲). لذا در مطالعه حاضر نیز از این روش برای بررسی سلول‌های آپوپتوتیک در بلاستوسیت‌ها استفاده شده است. هدف از مطالعه حاضر این بود که اثرات نامطلوب انجماد به طریق شیشه‌ای شدن را بر روی میزان آپوپتوز در بلاستوسیست‌های موش بررسی نموده و به این ترتیب با شناخت مکانیسم‌های دخیل در آسیب سلولی ناشی از انجماد، در جهت بهبود روش‌های انجماد قدمی برداشته شود.

## مواد و روشها

**حیوانات و دریافت جنین:** ابتدا موش‌های سوری ماده از نژاد Swiss Albino که سن آنها ۶ تا ۸ هفته بودند از مرکز نگهداری حیوانات دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز خریداری و سپس به مدت یک هفته در حیوانخانه در درجه حرارت  $25^{\circ}C$  و در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. سپس به هر یک از موش‌ها به مقدار  $10IU$  PMSG<sup>۱</sup> (Folligon, Holand) و حدود ۴۸ ساعت بعد  $10IU$  hCG<sup>۲</sup> (Oregone, Holland) به طریق داخل صفاقی تزریق شد. سپس موش‌های ماده در مجاورت موش‌های نر به مدت یک شب قرار داده شدند و صبح روز بعد تشکیل پلاک واژینال بررسی گردید و موش‌های پلاک مثبت به عنوان موش‌های حامله تلقی شده و در حدود ۹۸ ساعت پس از تزریق hCG موش‌های حامله به روش جابجایی مهره‌های گردنی نخاعی شده و پس از باز کردن شکم بلاستوسیست‌ها با استفاده از محیط کشت PB1<sup>۳</sup> که براساس پروتکل Whittingham در سال ۱۹۷۱ (۱۳) تهیه شده بود به طریق فلاش کردن از شاخ رحم جمع‌آوری شدند.

TUNEL میزان ایندکس آپوپتوز آنها بررسی شدند. **انجماد شیشه‌ای و نوب‌بلاستوسیست‌ها:** بلاستوسیست‌ها پس از دریافت و انکوباسیون در محلول PB1، با روش دو مرحله‌ای که قبلاً توسط Zhu و همکاران در سال ۱۹۹۳ ارائه گردیده بود (۱۵) به مدت ۵ دقیقه در محلول اتیلن‌گلیکول ۱۰٪ (Merck, Germany) قرار داده شده و سپس به مدت ۳۰ ثانیه در محلول EFS40 که عبارت است از محلول PB1، حاوی ۴۰٪ اتیلن‌گلیکول (V/V) و ۱۸٪ فایکل با وزن مولکولی ۷۰۰۰۰ دالتون (Pharmacia, Sweden) و  $M/3$  ساکارز (Wako, Japan) منتقل و سپس در نی‌های  $ml/25$  (Aigle, France) فرانسوی بارگیری شدند و انتهای نی‌ها با پنس داغ بسته شد و پس از آن نی‌ها در بخار نیتروژن به مدت سه دقیقه قرار گرفته و سپس در نیتروژن مایع غوطه‌ور گردید و پس از یک ماه نی‌ها از تانک بیرون آورده شد. پس از قرار دادن به مدت ۱۵ ثانیه در هوا و قرار دادن در آب  $25^{\circ}C$  به مدت ۸ ثانیه، با دستمال کاغذی نی‌ها خشک گردید و سپس با بریدن انتهای بسته شده نی با چیچی استریل، محتویات نی به صورت flushing تخلیه شد. سپس جنین‌ها به محلول

1- Pregnant Mare Serum Gonadotropine  
2- Human Chorionic Gonadotropine  
3 - Modified Phosphate-Buffered Saline

4- Apoptosis Index  
5- Sealing

در محلول PBS/PVA با فشار کم لامل در یک قطره از ۲۰  $\mu$ l از محلول Antibleaching (Oregon, USA) بر روی لام مونتاژ گردید و پس از مهر و موم کردن لبه‌های لام با لاک ناخن، لام‌ها در زیر میکروسکوپ فلئوروسنت (Olympus, Japan) مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌های آماری: نسبت سلول‌های آپوپتوتیک با شمارش سلول‌های TUNEL مثبت به کل هسته‌های بلاستوسیت (هسته‌های PI مثبت) در همان بلاستوسیت بر حسب درصد بعنوان ایندکس آپوپتوز محاسبه گردید و مقایسه میانگین ایندکس آپوپتوزی بر حسب درصد در گروه‌ها با آزمون T و در سطح معنی داری ۰/۰۵ انجام گردید.

### نتایج

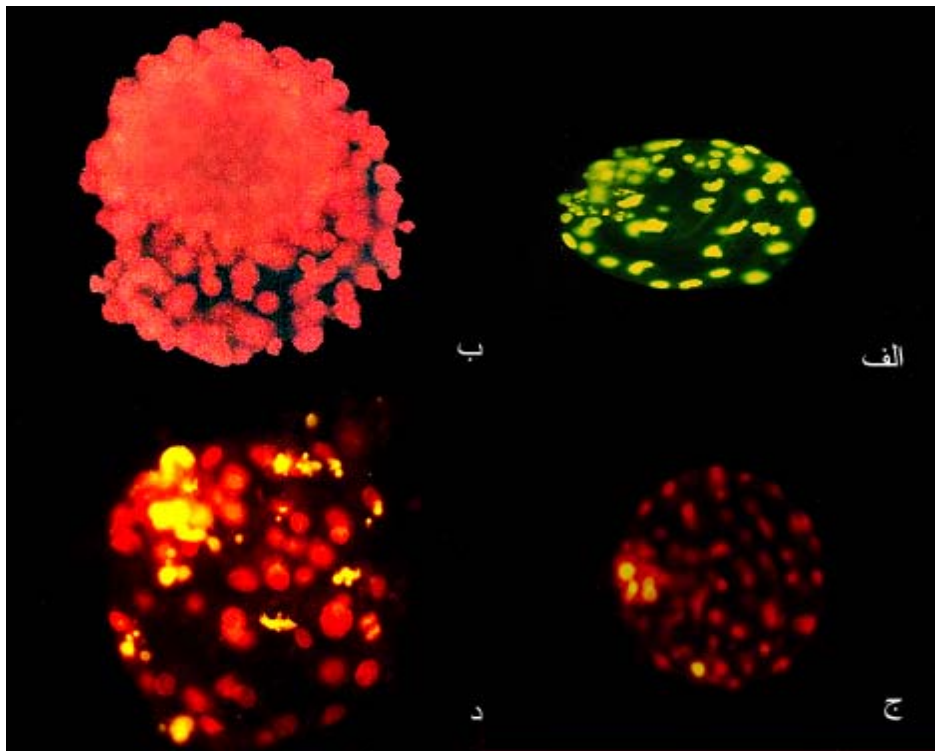
همان طوری که در شکل شماره ۱- الف دیده می‌شود تمام بلاستومرهای جنین‌های کنترل مثبت با تکنیک TUNEL نشانه‌گذاری شدند و حتی قطعات هسته (DNA Fragmentation) در بعضی از هسته‌ها به صورت قطعات کوچک زرد رنگی به خوبی قابل مشاهده هستند و هیچ یک از بلاستومرهای جنین‌های کنترل منفی با تکنیک TUNEL نشانه‌گذاری نشدند و فقط با رنگ آمیزی زمینه‌ای (PI) به رنگ قرمز رنگ آمیزی شدند (شکل شماره ۱- ب). شکل شماره ۱- ج، بلاستوسیتی از گروه کنترل را پس از رنگ آمیزی با تکنیک TUNEL نشان می‌دهد، به طوری که در شکل مشاهده می‌شود تعداد چهار سلول آپوپتوتیک با رنگ سبز مایل به زرد از بقیه سلولها که رنگ PI را گرفته‌اند بخوبی قابل تشخیص می‌باشند.

در بلاستوسیت‌های گروه تجربی که پس از انجماد ذوب برای آپوپتوز رنگ آمیزی شدند، سلول‌های آپوپتوتیک با تکنیک TUNEL بخوبی نشان‌دار شدند و کاملاً از سلول‌های غیرآپوپتوتیک که با رنگ آمیزی

تازه سوکروز ۰/۵ مولار به مدت پنج دقیقه قرار داده شد. پس از انتقال و انکوباسیون جنین‌ها در محلول PB1 به منظور به تعادل رسیدن، به محلول کشت M16 منتقل گردیده و پس از دو ساعت کشت میزان ایندکس آپوپتوز بررسی گردید.

رنگ آمیزی TUNEL و PI رنگ آمیزی TUNEL و PI<sup>۱</sup> برای بررسی فراگمته شدن DNA در بلاستوسیت‌ها طبق روش Brison و همکاران در سال ۱۹۹۷ (۱۶) انجام شد. به طوریکه در ابتدا بلاستوسیت‌ها، پس از شستشو با محلول دالکو بافر فسفات (DPBS, Gibco) حاوی ۰/۳٪ پلی‌وینیل الکل (PBS/PVA) (۳mg/ml) در محلول پارافرمالدئید ۳٪ (wako, Japan) در PBS به مدت یک شب در درجه حرارت ۴°C ثابت شد. سپس بعد از شستشو با PBS/PVA، به مدت ۴۰ دقیقه در محلول ۰/۱٪ درصد تریتون X-۱۰۰ (Sigma, Germany) به منظور افزایش نفوذپذیری زونا پلوسیدا قرار داده شد. بلاستوسیت‌ها پس از شستشو با PBS/PVA در محلول TUNEL (Wako, Japan) براساس دستورالعمل شرکت سازنده به مدت یک ساعت در حرارت ۳۷°C انکوبه گردید. برای کنترل منفی تعدادی بلاستوسیت فقط در محلول فلئوروسنت به منظور اطمینان از عدم نشانه گذاری بدون آنزیم انکوبه گردید و برای کنترل مثبت، تعدادی از بلاستوسیت‌ها قبل از آنکوباسیون در محلول TUNEL، در ۵۰  $\mu$ g/ml محلول DNase I (Sigma, Germany) به مدت یک ساعت انکوبه گردید. پس از انکوباسیون بلاستوسیت‌ها در ۵۰  $\mu$ g/ml از محلول RNase A (Sigma, Germany) به مدت یک ساعت، بلاستوسیت‌ها با ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محلول PI (Sigma, Germany) به مدت ۲۰ دقیقه، به منظور نشانه‌گذاری همه هسته‌ها رنگ آمیزی زمینه‌ای گردید. سپس بلاستوسیت‌ها پس از شستشو

1- Propidium Iodide



شکل ۱- نمای بلاستوسیت موش در زیر میکروسکوپ فلورسنت با بزرگ‌نمایی ۳۲۰ برابر: الف- گروه کنترل مثبت، پس از انکوبه شدن با DNase، تمام هسته‌ها با روش TUNEL به رنگ روشن نشانه‌گذاری شدند. ب- گروه کنترل منفی، در فقدان TDT، هیچکدام از سلولها با TUNEL نشانه‌گذاری نشدند ولی همه سلولها با PI رنگ شدند. ج- گروه کنترل، سلولهای آپوپتوتیک (رنگ روشن) به خوبی از سلولهای غیر آپوپتوتیک (کمرنگ) با روش TUNEL مشخص شده‌اند. د- گروه تجربی، تعداد زیادی سلولهای آپوپتوتیک به رنگ روشن و شفاف دیده می‌شوند و کاملاً از سلولهای غیر آپوپتوتیک (کمرنگ) مشخص هستند.

بود در حالیکه این میانگین در بلاستوسیت‌های گروه منجمد شده در حدود  $4/93 \pm 1/42$  بود و اختلاف میانگین بین دو گروه معنی‌دار بود ( $p=0/02$ ).

میانگین میزان ایندکس آپوپتوز در بلاستوسیت‌های منجمد شده که پس از ذوب به مدت دو ساعت کشت داده شدند در حدود  $11/87 \pm 4/11$  بود. در صورتیکه میانگین میزان ایندکس آپوپتوز در گروه کنترل (بلاستوسیت‌های منجمد نشده) در حدود  $9/12 \pm 4/83$  بود و تفاوت بین آنها معنی‌دار بود ( $P=0/004$ ).

### بحث

هدف از مطالعه حاضر، بررسی میزان آپوپتوز در بلاستوسیت‌ها پس از انجماد، ذوب و کشت با مشاهده

PI به رنگ قرمز دیده می‌شوند، قابل تشخیص هستند. همانطور که در شکل شماره ۱- د مشاهده می‌شود، فقط تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در مقایسه با بلاستوسیت‌های گروه کنترل زیادتر می‌باشند.

همانطوری که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، نتایج نشان داد میانگین تعداد بلاستومرها در بلاستوسیت‌های گروه کنترل موش  $50/23 \pm 20/9$  بود در حالیکه میانگین تعداد بلاستومرها در بلاستوسیت‌های گروه منجمد شده  $44/91 \pm 16/2$  بود و اختلاف میانگین تعداد بلاستومرها در گروه‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ( $P=0/176$ ).

میانگین تعداد بلاستومرهای آپوپتوتیک در بلاستوسیت‌های گروه کنترل در حدود  $4/08 \pm 2/04$

جدول ۱- مقایسه میانگین تعداد بلاستومرها، سلول‌های آپوتوتیک و میزان ایندکس آپوتوز در بلاستوسیت‌های موش در گروه کنترل و گروه تجربی

میزان ایندکس آپوتوز (M±SD)	تعداد سلول‌های آپوتوتیک (M±SD)	تعداد بلاستومرها (M±SD)	متغیر	گروهها
۹/۱۲±۴/۸۳	۴/۰۸±۲/۰۴	۵۰/۲۳±۲۰/۹		کنترل (n=۵۲)
۱۱/۸۷±۴/۱۱	۴/۹۳±۱/۴۲	۴۴/۹۱±۱۶/۲		گروه تجربی (n=۴۳)
۰/۰۰۴	۰/۰۲۳	۰/۱۷۶		P-Value

استفاده از رنگ فلئورسنت مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده نمودند که وقتی قطعات تخمدان با استفاده از نی یا صفحه مشبک<sup>۱</sup> میکروسکوپ الکترونی مستقیماً در نیتروژن مایع غوطه‌ور می‌شوند (انجماد شیشه‌ای خیلی سریع) تفاوت قابل ملاحظه‌ای در میزان سلول‌های آپوتوتیک نسبت به گروه کنترل دیده نشد و در مقابل وقتی که نمونه‌ها مشابه مطالعه حاضر ابتدا در بخار نیتروژن مایع ( $-120^{\circ}C$ ) قرار گرفته و سپس در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند (انجماد شیشه‌ای با سرعت کمتر) تعداد سلول‌های آپوتوتیک به طور قابل ملاحظه‌ای بعد از ذوب نسبت به گروه کنترل بیشتر بود (۲۰).

در تحقیقی دیگر که در آن برش‌هایی به اندازه ۲mm از کورتکس تخمدان به طریق انجماد آهسته منجمد شدند نشان داد که اگرچه درصد فولیکول‌های با مورفولوژی طبیعی، در گروه منجمد شده، در مقایسه با گروه کنترل، به طور قابل ملاحظه‌ای کمتر بود ولی نتایج با تکنیک TUNEL نشان داد که درصد فولیکول‌های TUNEL مثبت در قطعات فریز شده نسبت به گروه کنترل، تفاوت قابل ملاحظه‌ای نداشتند (۲۱) و این نتایج با نتایج تحقیق حاضر همسو نمی‌باشد و علت تفاوت نتایج را می‌توان در تفاوت در پروتکل انجمادی و مرحله تکاملی سلول‌ها توضیح داد، به طوری که در مطالعه اخیر از پروتکل‌های انجماد آهسته استفاده شده در حالیکه در

قطعه قطعه شدن DNA در هسته بلاستومرها با تکنیک TUNEL بود. اگر چه مطالعات اندکی، در مورد اثرات انجماد و آنهم بر روی تخمدان انجام شده است، ولی هیچگونه مطالعه‌ای در مورد اثرات انجماد شیشه‌ای بر میزان آپوتوز در بلاستوسیت موش و حتی گونه‌های دیگر انجام نشده است. در مطالعه حاضر، همان طوری که در نتایج دیده می‌شود، میزان ایندکس آپوتوز در بلاستوسیت‌های منجمد شده که پس از ذوب به مدت ۲ ساعت کشت داده شدند نسبت به بلاستوسیت‌های منجمد نشده به طور معنی‌داری بیشتر بود (۱۱/۹ در مقابل ۹/۲ و  $p=0/005$ ). به طور مشابهی، در مطالعه‌ای، Yuge و همکاران نشان دادند که سرد کردن تخمدان خوک در درجه حرارت پایین تر از  $25^{\circ}C$  باعث کاهش میزان تکامل اووسیت‌های آسپیره شده به بلاستوسیت پس از IVF و کشت متعاقب آن می‌شود (۱۷)؛ اگرچه نوع آسیب و ارتباط آن با آپوتوزیس، در این مطالعه مشخص نشد. توسط تعداد دیگری از محققین گزارش شده است که بعضی از فولیکول‌ها در انسان در طول انجماد آهسته و ذوب دچار آسیب می‌شوند (۱۸)؛ به نظر می‌رسد قسمت اعظم فولیکول‌های بدوی از نظر مورفولوژیکی بعد از انجماد و ذوب طبیعی باشند (۱۹). در مطالعه دیگری که توسط Rahimi و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام گردید. محققین اثر پروتکل‌های متفاوت انجماد شیشه‌ای را بر تعداد سلول‌های آپوتوتیک در بافت تخمدان انسانی با

1- Grid

روی جنین و فقدان ترشحات پاراکرینی مترشحه از لوله‌های رحمی، پایین‌تر از کیفیت بلاستوسیست‌های تولید شده به روش *In vivo* می‌باشد و بنابراین میزان ایندکس آپوتوز در بلاستوسیست‌های تولید شده به روش *In vitro* بیشتر می‌باشد (۸،۱۶).

نتایج محققین نشان می‌دهد که استفاده از ضدیخ‌های مختلف به تنهایی یا طی فرآیند انجماد، هرکدام می‌تواند تأثیرات زیادی را بر فرا ساختمان سلول داشته باشد (۲۳) و از حساس‌ترین ساختار، نسبت به تغییرات شدید برودتی و حرارتی و یا غلظت‌های مختلف ضدیخ، می‌توان اسکلت سلول، میتوکندری و قشر شفاف را نام برد (۲۳) و از آنجایی که بسیاری از فعالیت‌های مهم سلول از جمله جابجایی کروموزوم‌ها طی تقسیم وستیونکیز وابسته به عناصر اسکلت سلول می‌باشند، هرگونه آشفتگی در آن، می‌تواند تأثیر زیادی بر تکوین و تکامل تخمک و جنین داشته باشد (۲۴). حتی نشان داده شده است که انجماد ممکن است باعث سختی قشر شفاف به دلیل تغییر ماهیت بیوشیمیایی آن شود (۲۵،۲۶). یافته‌های دیگری نیز نشان می‌دهد که انجماد سبب اختلال فعالیت پمپ‌های تنظیم‌کننده pH موجود در غشاء سلولی طی ۶-۴ ساعت اولیه پس از ذوب می‌شود و اختلال فعالیت این پمپ‌ها سبب اختلال PH درون سلولی و در نتیجه کم شدن توانایی حیات سلول‌ها می‌گردد (۲۵) و لذا می‌توان گفت که در تجربه حاضر قطعه‌قطعه شدن زیاد DNA در بلاستوسیست‌های منجمد شده می‌تواند هم به دلیل اثر سمیت شیمیایی ضدیخ و هم به دلیل تغییرات شدید حرارتی و برودتی باشد که احتمالاً بر روی بروز ژن‌های مسئول قطعه‌قطعه شدن DNA در جنین مثل Bax و Bcl<sub>2</sub> تأثیر می‌گذارد (۲۷). نتایج بررسی حاضر نشان داد که انجماد شیشه‌ای باعث افزایش میزان آپوتوزیس در بلاستوسیست‌های موش می‌شود. بنابراین نتایج فوق ارتباطی را ما بین کاهش زنده ماندن

مطالعه حاضر با روش انجماد شیشه‌ای، سلول‌ها منجمد شدند و از آنجایی که در روش انجماد شیشه‌ای، از غلظت‌های بالای ضد یخ استفاده می‌شود (اتیلن گلیکول ۴۰٪) که می‌تواند تأثیرات سوء بر سلول داشته باشد، لذا تفاوت نتایج حاضر با نتایج مطالعات قبلی که با روش انجماد آهسته با استفاده از اتیلن گلیکول ۱۰٪ صورت گرفته، امری واضح و بدیهی بنظر می‌رسد. در ضمن در مطالعه اخیر، اوسیت‌ها در مراحل مختلف تکاملی در تخمدان مورد مطالعه قرار گرفتند؛ در حالیکه در مطالعه حاضر، جنین‌های مرحله بلاستوسیست مورد مطالعه قرار گرفتند و بر اساس گزارش محققین، میزان حساسیت اوسیت و جنین نسبت به انجماد متفاوت است (۲۲).

در تجربه قبلی که اثر ضد یخ‌های مختلف را بر میزان آپوتوزیس در بلاستوسیست‌های خوک در دانشگاه یاماگوچی ژاپن مورد مطالعه قرار دادیم، نشان دادیم وقتی که بلاستوسیست‌های خوک تولیدشده به روش *In vitro* (IVM، IVF<sup>۲</sup> و IVC<sup>۳</sup>) در معرض مواد ضد یخ مختلف مثل اتیلن گلیکول، گلیسرول و او ۲ پروپاندیول به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند، میزان فراگمنته شدن DNA در آنها (۱۹/۹) در مورد اتیلن گلیکول) نسبت به گروه کنترل (۱۱/۶) به طور معنی‌داری بیشتر بود (مقاله چاپ نشده). تفاوت در میانگین ایندکس آپوتوز در تجربه قبلی نسبت به تجربه حاضر می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع جنین تحت تجربه، تفاوت در مدت زمان در معرض قرار گرفتن در ماده ضد یخ (۳۰ دقیقه در مقابل ۵ دقیقه) و بالاخره کیفیت بلاستوسیست باشد که در تجربه قبلی بلاستوسیست به روش *In vitro* تولید شده و براساس گزارش محققین، کیفیت بلاستوسیست‌های تولید شده به روش *In vitro* به دلیل اثرات زیانبار محیط کشت بر

1- In vitro Maturation  
2- In Vitro Fertilization  
3- In Vitro Culture

بهداشتی، درمانی تبریز برای تامین هزینه انجام این مطالعه و آقایان دکتر مسگری، مهندس دادپور که به ترتیب در استفاده از امکانات حیوانخانه مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه و تهیه عکس‌های میکروسکوپی نهایت همکاری را داشتند، تقدیر و تشکر می‌نمایم.

جنین بدنبال انجماد و افزایش میزان آپوپتوزیس در بلاستومرها نشان می‌دهد. بنابراین هر عاملی که از رشد و تکامل نرمال سلول‌ها جلوگیری کند، زمینه را برای بروز آپوپتوز در آنها فراهم می‌نماید.

### تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات

## References

- 1- Kasai M. Cryopreservation of mammalian embryos. *Mol Biotechnol.*1997;7(2):173-9.
- 2- Dobrinsky J.R., Pursel V.G., Long C.R., Johnson L.A. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol Reprod.*2000;62(3):564-70.
- 3- 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.
- 4- Kasai M., Zhu S.E., Pedro P.B., Nakamura K., Sakurai T., Edashige K. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. *Cryobiology.*1996;33(4):459-64.
- 5- Whittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science.*1972;178:411-414.
- 6- Rall W.F., Fahy G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature.*1985;313(6003):573-5.
- 7- Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.*1992;119(3):493-501.
- 8- Hardy K. Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol Hum Reprod.*1997;3:919-92.
- 9- Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.*1992;119(3):493-501.
- 10- Yamadori I., Yoshino T., Kondo E., Cao L., Akagi T., Matsuo Y., Minowada J. Comparison of two methods of staining apoptotic cells of transferase and DNA polymerase I reactions. *J leukemia cell lines. Terminal deoxynucleotidyl Histochem Cytochem.*1998;46(1):85-90.
- 11- Neuber E., Luetjens C.M., Chan A.W., Schatten G.P. Analysis of DNA fragmentation of in vitro cultured bovine blastocysts using TUNEL. *Theriogenology.*2002;57(9):2193-202.0
- 12- Pampfer S., Vanderheyden I., McCracken J.E., Vesela J., Hertogh R. Increased cell death in rat blastocysts exposed to maternal diabetes in utero and to high glucose or tumor necrosis factor-alpha in vitro. *Development.*1997;124(23):4827-36.
- 13- Whittingham D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature.*1971.10;233(5315):125-6.
- 14- Edashige K., Asano A., An T.Z., Kasai M. Restoration of resistance to osmotic swelling of vitrified mouse embryos by short-term culture. *Cryobiology.*1999;38(4):273-80.
- 15- Zhu S.E., Kasai M., Otake H., Sakurai T., Machida T. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *J Reprod Fertil.*1993;98(1):139-45.
- 16- Brison DR, Schultz RM. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod* 1997;56:1088-1096.
- 17- Yuge M, Otoi T, Nii M, Murakami M, Karja NW, Rajaei F, Agung B, wongsrikeao P, Murakami M, Suzuki T. Effects of cooling ovaries before oocyte aspiration on meiotic competence of porcine oocytes and of exposing in vitro matured oocytes to ambient temperature on in vitro fertilization and development of the oocytes. *Cryobiology.*2003 Oct;47(2):102-8.
- 18- Munne s, alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril.*1995;64(2):382-91.



- 19- Hovatta O. Cryopreservation and culture of human primordial and primary ovarian follicles. *Mol Cell Endocrinol.*2000;169(1-2):95-7.
- 20-Rahimi G., Isachenko E., Sauer H., Isachenko V., Wartenberg M., Hescheler J., Mallmann P. Nawroth F Effect of different vitrification protocols for human ovarian tissue on reactive oxygen species and apoptosis. *Reprod Fertil Dev.*2003;15(6):343-9.
- 21- Demirei B, Salle B, Frappart L, Franck M, Guerin JF, Lornage J. Morphological alterations and DNA fragmentation in oocytes from primordial and primary follicles after freezing-thawing of ovarian cortex in sheep. *Fertil Steril.* 2003;77(3):595-600.
- 22- Niemann H., Lucas- Hahn A., Stoffregen C. Cryopreservation of bovine oocytes and embryos following microsurgical operations. *Mol Reprod Dev.*1993;36(2):232-5.
- 23- Bernard A., Fuller B.J. Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives. *Hum Reprod Update.*1996;2(3): 193-207.
- 24- Kola I., Kirby C., Shaw J., Davey A., Trounson A. Vitrification of mouse oocytes results in aneuploid zygotes and malformed fetuses. *Teratology.*1988;38(5):467-74.
- 25- Vincent C, Johnson MH. Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. *Oxf Rev Reprod Biol.*1992; 14:73-100.
- 26- Lane M., Lyons E.A., Bavister B.D. Cryopreservation reduces the ability of hamster 2-cell embryos to regulate intracellular pH. *Hum Reprod* 2000;15(2):389-94.
- 27- Yang M.Y., 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(3-4):159-69.