

# اثرات ضدیخ‌های مختلف بر میزان شکست DNA در جنین‌های خوک تولید شده

## به روش *In vitro*

فرزاد رجایی (Ph.D.)<sup>۱</sup>، تاکشیج اتویی (Ph.D.)<sup>۲</sup>.

۱- استادیار، آزمایشگاه کشت سلولی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی قزوین، قزوین، ایران.  
۲- استاد، گروه تولیدمثل، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه یاماگوچی، یاماگوچی، ژاپن.

## چکیده

**زمینه و هدف:** تاکنون از ضدیخ‌های زیادی جهت انجماد جنین‌های مرحله قبل از لانه‌گزینی به منظور جلوگیری از تشکیل یخ داخل سلولی استفاده شده است، ولی با این وجود تعداد زیادی از جنینها پس از ذوب به دلایل مختلفی از جمله نوع ضدیخ مورد استفاده و به دنبال آن شکست DNA جنین، در اثر سمیت ضدیخ از بین می‌روند. اتیلن‌گلیکول، و ۱) پروپان‌دیول و گلیسرول ضدیخ‌های معمول می‌باشند که به طور وسیعی برای انجماد جنین حیوانات گوناگون و همچنین انسان استفاده می‌شود. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات ضدیخ‌های مختلف روی میزان شکست DNA بلاستوسیست‌های خوک به منظور تعیین ضدیخ مناسب برای انجماد جنین خوک بود.

**روش بررسی:** تعداد ۱۹۷ بلاستوسیست خوک به روش *In vitro* تولید شدند و به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم گردیدند. تعداد ۴۰ بلاستوسیست به‌عنوان گروه کنترل به مدت یک ساعت در محلول PBS بدون ضدیخ قرار گرفتند. بقیه بلاستوسیستها در سه گروه متفاوت در معرض ۳ نوع محلول ضدیخ با غلظت ۱۰٪ به مدت یک ساعت در یک روش ۳ مرحله‌ای در درجه حرارت اتاق قرار گرفتند. به‌طوریکه ۴۰ بلاستوسیست در معرض اتیلن‌گلیکول و ۴۰ بلاستوسیست در معرض ۱) پروپان‌دیول و ۴۰ بلاستوسیست در معرض گلیسرول قرار گرفتند. شواهد مورفولوژیک از زنده ماندن بلاستوسیستها پس از ۲۴ ساعت کشت مجدد در گروه‌های مختلف در محیط NCSU-37، براساس تشکیل مجدد حفره بلاستوسل به وسیله مشاهده استریومیکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰ برابر ارزیابی گردید. شاخص میزان شکست DNA در آنها پس از نشانه‌گذاری با تکنیک TUNEL و رنگ‌آمیزی زمینه‌ای با PI مشخص شد. داده‌ها با آنالیز واریانس و آزمون تعقیبی فیشر و با کمک نرم افزار Stutview مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

**نتایج:** قرار گرفتن بلاستوسیست‌های خوک در معرض ضدیخ‌های مختلف، منجر به افزایش تعداد هسته‌هایی با شکست DNA می‌شود. در ضمن، میزان شاخص شکست DNA در بلاستوسیست‌های دارای بلاستوسل نسبت به بلاستوسیست‌های فاقد بلاستوسل، بدون توجه به نوع ضدیخ کمتر بود.

**نتیجه‌گیری:** براساس نتایج این مطالعه در معرض ضدیخ قرار گرفتن بلاستوسیست‌های خوک، میزان شکست DNA را افزایش می‌دهد و در این میان اتیلن‌گلیکول کمترین میزان سمیت را دارد.

**کلید واژگان:** ضد یخ، سمیت سلولی، آپوپتوزیز، خوک، شکست DNA، بلاستوسیست.

**مسئول مکاتبه:** دکتر فرزاد رجایی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی قزوین، قزوین، ایران.  
پست الکترونیک: frajaei@qums.ac.ir

## زمینه و هدف

تعداد سلولها و میزان آپوتوزیز نشانه‌های مفیدی از سلامت و تکامل جنین می‌باشند. مرگ سلولی حتی در طول تکامل اولیه جنینی در محیط‌های *In vivo* و *In vitro* (IVM، IVF و IVC) اتفاق می‌افتد (۱). در بلاستوسیت‌های سالم، بعضی از سلولها ناشی از محرک‌های مختلف مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی<sup>۴</sup> را طی کرده که منجر به تنظیم تعداد سلولها یا حذف سلول‌های آسیب‌دیده در طول تکامل جنین می‌شود (۲). علی‌رغم اثرات مفید آپوتوزیز، در صورتی که تعداد و نسبت سلول‌هایی که وارد آپوتوزیز می‌گردند افزایش یابد، اثرات مخرب و مضری بر تکامل و لانه‌گزینی جنین دارد (۳). عوامل استرس‌زای محیطی نظیر افزایش pH داخل سلولی، سمیت محلولها و غلظت‌های سمی  $Ca^{2+}$  ممکن است منجر به آپوتوزیز در بلاستومرها گردد (۴). مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی که آپوتوزیز نامیده می‌شود (۵)، شکلی از مرگ سلولی است که توسط دو شاخص اصلی از نکروز مشخص می‌شود. شاخص اول، ویژگی‌های مورفولوژی نظیر کاهش حجم سلول، متراکم شدن کروماتین، فراگمنته شدن هسته‌ای و در نهایت تشکیل اجسام آپوتوزی است و شاخص دیگر، شکست و قطعه‌قطعه شدن DNA می‌باشد که DNA بوسیله یک اندونوکئاز وابسته به یون کلسیم و منیزیم به قطعات اولیگونوکئوزومی قطعه‌قطعه می‌شود. امروزه از روشی بنام TUNEL<sup>۵</sup> برای رنگ‌آمیزی سلول‌های آپوتوزی (میزان شکست DNA) به طور رایج استفاده می‌شود. در این روش انتهای قطعات DNA شکسته شده بوسیله آنزیم دی‌اکسی ترانسفراز انتهایی (TDT)<sup>۶</sup> با نوکلئوتیدهای جدید تغییر

داده شده (فلوئورسین-dUTP) نشاندار می‌شوند و بنابراین انتهای شکسته شده قطعات DNA دو زنجیره‌ای، مستقل از زنجیره قالب نشان‌دار شده و در زیر میکروسکوپ فلوئورسانس قابل رویت می‌شود (۶،۷). در این روش حتی سلول‌های مراحل اولیه آپوتوزیز نشان‌دار می‌شوند (۵). این تکنیک در اندازه‌گیری کمی مرگ سلولی در جنین، که دارای تعداد سلول‌های معدودی بوده و بنابراین مقادیر کمی DNA دارد بسیار مفید است (۷،۸). تاکنون به منظور جلوگیری از تشکیل یخ داخل سلولی از ضدیخ‌های فراوانی جهت انجماد جنین‌های مرحله قبل از لانه‌گزینی استفاده شده است؛ ولی با این وجود تعداد زیادی از جنینها پس از ذوب به دلایل مختلفی از جمله نوع ضد یخ مورد استفاده و به دنبال آن شکست DNA جنین در اثر سمیت ضدیخ از بین می‌روند. اتیلن گلیکول (EG)، و ۱،۲ پروپاندیول (PD) و گلیسرول (GLY) به طور وسیعی برای انجماد جنین در حیوانات گوناگون و همچنین انسان استفاده می‌شوند (۹). مرگ بلاستومرها بعد از انجماد، به دلیل تشکیل یخ در حین انجماد و ذوب پس از آن، تورم اسمزی و سمیت شیمیایی ضدیخ می‌باشد (۱۰،۱۱). اخیراً نشان داده شده است که تعداد سلول‌های آپوتوزی جنین‌های منجمد شده پس از ذوب در مقایسه با جنین‌های منجمد نشده بیشتر است (۱۲،۱۳). با این وجود اطلاعات کمی در مورد اثرات ضدیخها بر مرگ سلولی بلاستومرها در جنین وجود دارد. براساس مطالعات قبلی، شکست DNA در طی پدیده انجماد مورد بررسی قرار گرفته است؛ ولی اینکه شکست DNA به دلیل عوامل بروندی می‌باشد یا عامل ضدیخ، هنوز مورد بحث می‌باشد.

هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی اثرات ضد یخ‌های متفاوت بر روی میزان شکست DNA بلاستوسیتها به دنبال قرار گرفتن در معرض ضدیخ‌های مختلف به منظور تعیین ضدیخ مناسب برای انجماد جنین و

- 1- In Vitro Maturation
- 2- In Vitro Fertilization
- 3- In Vitro Culture
- 4- Apoptosis
- 5- TDT- Mediated Dutp-biotin Nick End Labeling
- 6- Terminal Deoxy Transferase

مشخص کردن مکانیسم‌های آسیب به جنین قبل از انجماد بود. به دلیل محدودیت‌های موجود در استفاده از جنین انسان و به دلیل شباهت زیاد مراحل تکاملی جنین انسان با جنین خوک، در این مطالعه از جنین خوک استفاده شد.

### روش بررسی

تعداد ۱۹۷ بلاستوسیست خوک به روش In vitro تولید شدند و به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم گردیدند. جمع‌آوری اووسیتها و بلوغ در محیط کشت: تخمدان‌های خوک پس از تهیه از کشتارگاهی در شهر کیتاکیوشو ژاپن، بلافاصله در داخل سرم فیزیولوژی با درجه حرارت  $35^{\circ}\text{C}$  به آزمایشگاه منتقل گردید. اووسیتها بوسیله یک سرنگ  $10\text{ ml}$  با سرسوزن  $18$  از فولیکول‌های با قطر  $3-6\text{ mm}$  آسپیره شده و در محلول تغییر یافته PBS<sup>۱</sup> (Nihonzenyaku, Japan) حاوی  $100\text{ IU/ml}$  پنی‌سیلین G (Sigma, Germany) و  $0.1\text{ mg/ml}$  استرپتومایسین سولفات (Sigma, Germany) قرار گرفت. تنها از اووسیت‌های با اوپلاسم یکنواخت و سلول‌های کومولوس متراکم در این تحقیق استفاده شد. برای بلوغ اووسیتها از روش Kikuchi و همکاران (۱۴) استفاده گردید. به طور خلاصه در حدود  $50$  کمپلکس اووسیت-کومولوس به مدت  $22-20$  ساعت در  $500\text{ }\mu\text{l}$  از محیط کشت بلوغ  $37-37$  NCSU<sup>۲</sup> حاوی  $10\%$  مایع فولیکولی خوک (V/V) و  $0.6\text{ mM}$  سیستئین (Sigma, Germany)  $1\text{ mM}$   $\beta\text{-dbcAMP}$  (Sigma, USA)  $50\text{ }\mu\text{m}$  - مرکاپتواتانل (Wako, Japan)  $10\text{ IU/ml}$  گنادوتروپین کوریونی اسب یا eCG<sup>۴</sup> (Teikokuzoki, Japan)  $10\text{ IU/ml}$  گنادوترو-پین کوریونی انسانی یا hCG<sup>۵</sup> (Teikokuzoki, Japan) و

**IVF و کشت جنین:** IVF براساس روش Kikuchi و همکاران (۱۴) با کمی تغییر انجام شد. اسپرم‌های تهیه شده از خوک که براساس روش Yuge و همکاران (۱۵) منجمد شده بود، ذوب و به مدت  $15$  دقیقه در محیط کشت TCM-199 حاوی املاح (Gibco, Earle's, NY, USA) با  $\text{pH}=7.8$  انکوبه شد. سپس  $10\text{ }\mu\text{l}$  از اسپرم‌های فوق به  $90\text{ }\mu\text{l}$  از محیط کشت لقاح حاوی  $90\text{ mM}$  کلرید سدیم،  $12\text{ mM}$  کلرید پتاسیم،  $25\text{ mM}$  بیکربنات سدیم،  $0.5\text{ mM}$  سولفات سدیم،  $0.5\text{ mM}$  سولفات منیزیم،  $0.5\text{ mM}$  فسفات دی‌هیدروسدیم،  $10\text{ mM}$  لاکتات سدیم،  $3\text{ mg/ml}$  آلبومین سرم گاوی،  $0.5\text{ mM}$  کافئین و  $50\text{ mg/ml}$  جنتامایسین (تمام مواد از شرکت Sigma آلمان تهیه شده است). قرار گرفتند. غلظت نهایی اسپرم در حدود  $1 \times 10^6 /\text{ml}$  تنظیم شد. اووسیتها همراه با اسپرمها به مدت  $5$  ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. سپس سلول‌های کومولوس و اسپرم‌های متصل به اووسیت‌های لقاح یافته به صورت مکانیکی با چند بار پیچ کردن جدا و تخمک‌های لقاح یافته به محیط کشت انتقال داده شدند. زایگوت‌های فرضی در محیط کشت NCSU-37 حاوی  $4\text{ mg/ml}$  BSA،  $0.17\text{ mM}$  پیروات سدیم (Sigma, Germany)،  $2.7\text{ mM}$  لاکتات سدیم و  $50\text{ }\mu\text{g/ml}$  جنتامایسین کشت داده شدند.  $72$  ساعت پس از لقاح، تمام جنین‌های تقسیم یافته<sup>۶</sup> به محیط کشت تازه NCSU-37 حاوی  $4\text{ mg/ml}$  BSA،  $0.55\text{ mM}$  D-گلوکز (Sigma, Germany) و  $50\text{ }\mu\text{g/ml}$  جنتامایسین منتقل شدند. جنین‌های تقسیم شده به مدت  $4$  روز تا مرحله بلاستوسیست کشت داده

6- Cleavaged

1- Modified Phosphate-Buffered Saline  
2- North Carolina State University  
3- Dibutyl cyclic AMP  
4- Equine chorionic gonadotropin  
5- Human chorionic gonadotropin

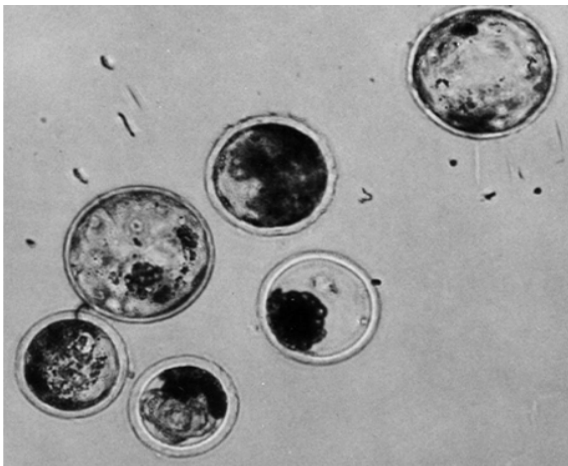
گردید. به منظور بررسی آپوپتوزیز تمام بلاستوسیست‌های دارا یا فاقد حفره بلاستوسل بعد از ارزیابی مورفولوژیک با تکنیک TUNEL مورد بررسی قرار گرفتند.

**رنگ آمیزی TUNEL و PI:** رنگ‌میزی TUNEL و PI<sup>۱</sup> برای بررسی شکست DNA در بلاستوسیست‌ها انجام شد (۲۲). بدین ترتیب که ابتدا بلاستوسیست‌ها، پس از شستشو با محلول دالیکو بافر فسفات حاوی ۰/۳٪ پلی‌وینیل الکل (۳ mg/ml) (PBS/PVA) در محلول پارافرمالدئید ۳٪ (Wako, Japan) در PBS در طول شب در درجه حرارت ۴°C فیکس شدند. به منظور افزایش نفوذپذیری پرده شفاف بعد از شستشو بلاستوسیست‌ها با PBS/PVA، به مدت ۴۰ دقیقه در محلول ۰/۱٪ تریتون X-۱۰۰ (Sigma, Germany) قرار داده شدند. پس از شستشوی مجدد با PBS/PVA براساس دستورالعمل شرکت سازنده در محلول TUNEL (Boehringer, Mannheim, Wako, Japan) به مدت یک ساعت در حرارت ۳۷°C آنکوبه گردیدند. برای نمونه کنترل منفی و به منظور اطمینان از عدم نشانه‌گذاری بدون آنزیم، تعدادی بلاستوسیست فقط در محلول فلوروسنت و برای نمونه کنترل مثبت، تعدادی از بلاستوسیست‌ها قبل از آنکوباسیون در محلول TUNEL، به مدت یک ساعت در ۵۰ μg/ml محلول DNase I (Sigma, Germany) آنکوبه شدند. به منظور نشانه‌گذاری همه هسته‌ها پس از آنکوبه کردن بلاستوسیست‌ها به مدت یک ساعت در محلول ۵۰ mg/ml RNase A (Sigma, Germany) بلاستوسیست‌ها با ۵۰ μg/ml PI (Sigma, Germany) به مدت ۲۰ دقیقه، رنگ‌آمیزی زمینه‌ای گردید. پس از شستشو در محلول PBS/PVA بلاستوسیست‌ها با فشار کم لامل در یک قطره ۲۰ میکرولیتری محلول antibleaching

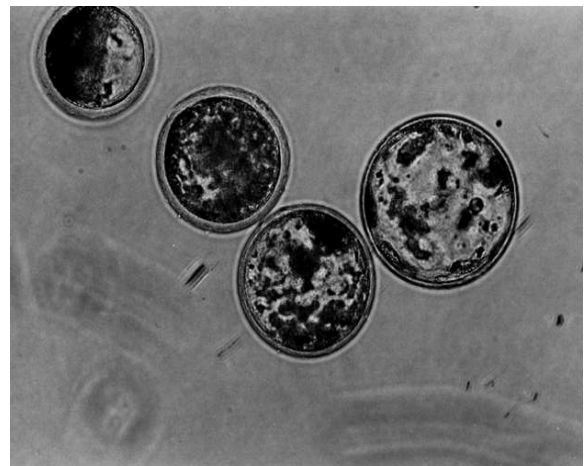
شدند. بلاستوسیست‌های با مورفولوژی طبیعی در روز ۶-۷ پس از لقاح انتخاب شدند، به منظور اجتناب از سوگیری در نمونه‌برداری، جنین‌های با اندازه مساوی انتخاب و به طور تصادفی در گروه‌های مورد مطالعه قرار گرفتند.

**قرار دادن جنینها در معرض ضدیخ:** به منظور بررسی آسیب وارده به بلاستوسیست در طی قرارگرفتن جنینها در معرض ضدیخ، بلاستوسیست‌ها در محلول‌های ۱۰٪ ضدیخ اتیلن گلیکول (Wako, Japan)، ۱ و ۲ پروپاندیول (Wako, Japan) و گلیسرول (Wako, Japan) در یک روش ۳ مرحله‌ای در درجه حرارت اتاق (۲۵-۲۳°C) قرار گرفتند. به طوریکه در ابتدا به مدت ۵ دقیقه در محلول ضدیخ ۳/۳٪ و سپس به مدت ۵ دقیقه در محلول ضدیخ ۶/۶٪ و در نهایت به مدت ۱ ساعت در محلول ضدیخ ۱۰٪ در درجه حرارت اتاق و در تاریکی قرار گرفتند. حلال مورد استفاده برای همه ضدیخها، PBS (Gibco, NY, USA) بود که به آن ۰/۳٪ BSA اضافه شد. بعد از قرار گرفتن بلاستوسیست‌ها در غلظت نهایی از هر نوع ضدیخ، ضدیخها مجدداً در یک روش ۳ مرحله‌ای از بلاستوسیست‌ها خارج شدند. برای اینکار در ابتدا به مدت ۵ دقیقه در محلول ضدیخ ۶/۶٪ و سپس به مدت ۵ دقیقه در محلول ضدیخ ۳/۳٪ و در نهایت در محلول PBS بدون ضدیخ در درجه حرارت اتاق قرار گرفتند. در زمانی که بلاستوسیست‌های گروه تجربی در معرض محلول‌های افزایشی، تعادلی و کاهش‌ی ضدیخ قرار می‌گرفتند، بلاستوسیست‌های گروه کنترل فقط در محلول PBS قرار گرفتند. بعد از خارج شدن ضدیخ، جنینها در محیط کشت NCSU-37 حاوی ۴ mg/ml BSA، ۵/۵۵ mM-D-گلوکز و ۵۰ μg/ml جنتامایسین تحت روغن معدنی به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت کشت، شواهد مورفولوژی زنده ماندن بلاستوسیست‌ها، براساس تشکیل حفره بلاستوسل توسط استریومیکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰× ارزیابی

1- Propidium Iodide



شکل ۲- بلاستوسیت‌های خوک از گروه تجربی که در آن بعضی از بلاستوسیت‌ها چروکیده بودند و پس از ۲۴ ساعت کشت نتوانستند مجدداً حفره بلاستوسل اولیه خود را پیدا کنند (بزرگنمایی  $\times 200$ ).



شکل ۱- بلاستوسیت‌های خوک از گروه کنترل که در آن همه بلاستوسیت‌ها دارای پرده شفاف سالم و دست نخورده بوده و بلاستومرها کاملاً فضای داخل پرده شفاف را اشغال کرده‌اند (بزرگنمایی  $\times 200$ ).

### نتایج

براساس یافته‌های این مطالعه بلاستوسیت‌های خوک از گروه کنترل دارای پرده شفاف سالم و دست نخورده بوده و بلاستومرها کاملاً فضای داخل پرده شفاف را اشغال کرده‌اند (شکل ۱) در حالیکه در گروه تجربی، بعضی از بلاستوسیت‌ها چروکیده بوده و پس از ۲۴ ساعت کشت نتوانستند مجدداً حفره بلاستوسل اولیه خود را پیدا کنند (شکل ۲). تعداد ۱۹۷ بلاستوسیت در روز ۶ و ۷ بعد از IVF به منظور ارزیابی میزان شاخص شکست DNA جنین‌های خوک در معرض ضدیخ‌های مختلف قرار گرفتند. همانطوریکه در جدول ۱ دیده می‌شود، وقتی هسته‌های با DNA دارای شکست و

(Oregon, USA) بر روی لام قرار گرفت و لامها در زیر میکروسکوپ فلوروسنت مورد بررسی قرار گرفتند. روشهای آماری: نسبت هسته‌های آپوپتوزی با شمارش سلول‌های TUNEL مثبت به کل هسته‌های بلاستوسیت-سیست (هسته‌های PI مثبت) در همان بلاستوسیت به عنوان شاخص میزان شکست DNA محاسبه گردید. با توجه به محدودیت داده‌های خام حاصل، ابتدا از تبدیل Arcsine استفاده نموده و تمامی آنالیزها بر روی داده‌های تبدیل شده صورت گرفت. داده‌ها با آنالیز واریانس و آزمون تعقیبی فیشر با استفاده از برنامه Statview مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تفاوت‌های در سطح ۰/۰۵ و کمتر از آن معنی‌دار تلقی گردید.

جدول ۱- میزان شکست DNA در جنین‌های خوک پس از یک ساعت قرار گیری در ضدیخ و ۲۴ ساعت کشت

شاخص هسته‌های با شکست DNA		تعداد کل بلاستومرها (Mean±SEM)	تعداد جنینها	میزان شکست DNA	نوع ضدیخ
فاقد بلاستوسل	دارای بلاستوسل				
۳۸±۲ <sup>a</sup>	۱۹/۹±۱ <sup>a</sup>	۳۴/۴±۱/۲	۵۲		اتلین گلیکول (EG)
۳۸/۵±۲ <sup>a</sup>	۲۱/۸±۱/۲ <sup>a</sup>	۳۶/۴±۱/۳	۵۴		پروپاندیول (PD)
۳۱±۲/۱ <sup>b</sup>	۲۰/۶±۱/۵ <sup>a</sup>	۳۶/۴±۱/۵	۵۱		گلسیرول (GLY)
۲۲/۱±۱/۷ <sup>c</sup>	۱۱/۶±۰/۴ <sup>b</sup>	۳۸/۶±۲	۴۰		کنترل

<sup>a-c</sup>: مقادیر با حروف مختلف در یک ستون بطور معنی داری متفاوت هستند ( $p < 0.05$ )

تعداد کل بلاستومرها در بلاستوسیستها بعد از قرار گرفتن در ضد یخ‌های مختلف و ۲۴ ساعت کشت متعاقب آن با تکنیک TUNEL مورد بررسی قرار گرفتند، تفاوت معنی‌داری در تعداد کل بلاستومرها در بلاستوسیستها در بین گروه‌های مختلف مشاهده نشد ( $34/4 \pm 1/2$ )، ولی بدون توجه به نوع ضد یخ، شاخص شکست DNA در بلاستوسیست‌هایی که در معرض ضد یخ‌های مختلف قرار گرفته بودند، به طور معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) از بلاستوسیست‌های گروه کنترل بیشتر بود. در ضمن، میزان شاخص شکست DNA در بلاستوسیست‌هایی که دارای مورفولوژی طبیعی بودند - یعنی پس از ۲۴ ساعت کشت توانستند مجدداً حفره بلاستوسل اولیه خود را ایجاد کنند - نسبت به بلاستوسیست‌های فاقد بلاستوسل و چروکیده، بدون توجه به نوع ضد یخ کمتر بود (جدول ۱).

### بحث

آپوپتوزیز یک مکانیسم مرگ سلولی آندوژن است که برای تکامل طبیعی و هموستاز بافتی لازم و ضروری است؛ ولی عمدتاً در طی کشت جنین در خارج از رحم به دلیل شرایط نامناسب اتفاق می‌افتد (۱۶، ۱۷). روند آپوپتوزیز در پاسخ به انواع متفاوتی از محرک‌های غیرفیزیولوژیک نظیر حرارت، سموم، استرس‌های اکسیداتیو و پرتوهای آسیب رسان نیز فعال می‌شود (۱۸، ۱۹). فشار اسموتیک نیز ممکن است به صورت هیدراتاسیون و دهیدراتاسیون، در طول مواجهه جنین با مواد ضد یخ باعث آسیب به جنین شوند (۲۰-۲۲). لذا در مطالعه حاضر به منظور کاهش فشار اسمزی، جنینها در طی ۳ مرحله با افزایش غلظت ضد یخها در درجه حرارت اتاق در معرض این مواد قرار گرفتند؛ ولی با این وجود میزان زنده ماندن بلاستوسیست‌های خوک کاهش یافت. میزان شاخص هسته‌های با شکست DNA در بلاستوسیست‌هایی که در معرض ضد یخ‌های مختلف

قرار گرفتند و به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند، بدون توجه به نوع ضد یخ به طور معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) بیشتر از بلاستوسیست‌های گروه کنترل بود. در مطالعه دیگری که توسط نگارنده و همکاران انجام شد، اثرات انجماد شیشه‌ای، بر میزان آپوپتوزیز در بلاستوسیست موش مورد مطالعه قرار گرفت و به طور مشابهی نشان داده شد که بلاستوسیست‌های موش که به طریق شستشوی شاخ رحم به وسیله محیط کشت به دست آمده بودند پس از انجماد شیشه‌ای و ذوب، میزان شکست DNA در آنها ( $4/08 \pm 0/28$ ) نسبت به گروه کنترل ( $4/93 \pm 0/22$ ) به طور معنی‌داری بیشتر بود (۱۳). تفاوت در میانگین شاخص آپوپتوزیز در تجربه قبلی نسبت به تجربه حاضر می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع حیوان مورد تجربه، تفاوت در مدت زمان قرار گرفتن در ماده ضد یخ (۳۰ دقیقه در مقابل ۵ دقیقه) و بالاخره کیفیت بلاستوسیست باشد که در تجربه حاضر 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 روی جنین و فقدان ترشحات پاراکرینی مترشحه از لوله‌های رحمی، پایین‌تر از کیفیت بلاستوسیست‌های تولید شده به روش *In vivo* بوده و بنابراین میزان شاخص آپوپتوزیز در بلاستوسیست‌های تولید شده به روش *In vitro* بیشتر می‌باشد (۲۳). میزان شاخص هسته‌های با شکست DNA در گروه EG نسبت به گروه‌های دیگر کمتر بود و این نشان می‌دهد که EG کمترین میزان سمیت را بر روی جنینها دارد. به طور مشابهی Kasai و همکاران پس از قرار دادن جنین‌های مرحله مورولای موش در محلول‌های ۳۰٪ ضد یخ در PBS (v/v)، و بررسی میزان زنده ماندن جنینها با ارزیابی پتانسیل تکامل آنها به بلاستوسیست در محیط کشت، نشان دادند که EG کمترین میزان سمیت را دارد و GLY و PD از نظر

مرتبط باشد.

### نتیجه گیری

یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که قرار گرفتن بلاستوسیست‌های خوک در معرض ضدیخ‌های مختلف، منجر به افزایش تعداد هسته‌های با شکست DNA می‌شود. در ضمن شاخص هسته‌های با شکست DNA در ارتباط با مورفولوژی جنینها بعد از کشت به صورت In vitro بود.

مطالعه حاضر نشان داد که مرگ سلولی از نوع آپوپتوز می‌تواند به عنوان یکی از مکانیسم‌های مرگ بلاستومرها در بلاستوسیست پس از مواجهه با ضدیخ مطرح باشد و باعث کاهش میزان زنده ماندن جنین، لانه‌گزینی و تولد نوزاد زنده شود. به نظر می‌رسد ادامه تحقیقات در جهت پیدا کردن مکانیسم‌های آسیب به جنین، می‌تواند موجب موفقیت‌هایی در انجماد در ART، نه تنها در زمینه حیوانی بلکه در انسان گردد.

### تشکر و قدردانی

از آقای پروفسور سوزوکی استاد گروه تولیدمثل دانشگاه یاماگوچی ژاپن که جهت انجام این طرح نهایت همکاری را داشتند و از اداره بازرسی گوشت شهر کیتاکیوشو ژاپن بخاطر در اختیار گذاشتن تخمدان‌های خوک تقدیر و تشکر می‌شود.

میزان سمیت بعد از آن قرار می‌گیرند؛ اگرچه محققین فوق ارتباط بین ضدیخ و شکست DNA را نشان ندادند (۲۴). با این حال، تفاوت معنی‌داری در شاخص هسته‌های با شکست DNA در بین بلاستوسیست‌های در معرض ضدیخ‌های مختلف وجود ندارد.

یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که مواجهه جنین‌های خوک با ضدیخ‌های مختلف، منجر به مسمومیت شیمیایی جنین‌های خوک شده و تعداد هسته‌های با شکست DNA را بدون توجه به نوع ضدیخ افزایش می‌دهد. در ضمن مطالعه حاضر نشان داد که شاخص هسته‌های با شکست DNA در ارتباط با مورفولوژی جنینها بعد از کشت به صورت In vitro می‌باشد؛ به طوری که اکثر سلول‌های با هسته دارای شکست DNA در بلاستوسیست‌هایی بود که پس از مواجهه با ضدیخ و کشت مجدد نتوانستند حفره بلاستوسل اولیه خود را پیدا کنند و یا به عبارت دیگر میزان شکست DNA در جنین‌های فاقد بلاستوسل که در این مطالعه به عنوان جنین‌های مرده تلقی شدند نسبت به جنین‌های دارای بلاستوسل بیشتر است. Jurisicova معتقد است وقتی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی به یک آستانه معینی برسد که برای تکامل و تکوین جنین مضر باشد منجر به مرگ جنین‌های آسیب دیده می‌شود (۱۹). بنابراین نتایج نشان می‌دهد پس از ۲۴ ساعت در میزان آسیب به DNA در جنینها که تشکیل مجدد بلاستوسیست‌های با حفره بلاستوسل

## References

- 1- Hardy K. Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol Hum Reprod.*1997;3:919-925.
- 2- Jurisicova A., Rogers I., Fasciani A., Casper R.F., Varmuza S. Effect of maternal age and conditions of fertilization on programmed cell death during murine preimplantation embryo development. *Mol Hum Reprod.*1998;4:139-145.
- 3- Levy R.R., Cordonier H., Czyba J.C., Guerin J.F. Apoptosis in preimplantation mammalian embryo and genetics. *Ital J Anat Embryol.*2001;106:101-108.
- 4- Hochachka P.W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science.*1986;231:234-241.
- 5- Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A. Identifica-

- tion of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992;119(3):493-501.
- 6- Yamadori I., Yoshino T., Kondo E., Cao L., Akagi T., Matsuo Y., Minowada J. Comparison of two methods of staining apoptotic cells of leukemia cell lines. Terminal deoxynucleotidyl transferase and DNA polymerase I reactions. *J Histochem Cytochem.* 1998; 46(1):85-90.
- 7- 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.
- 8- Pampfer S., Vanderheyden I., McCracken J.E., Vesela J., De 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.
- 9- Emiliani S., Van den Bergh M., Vannin A.S., Biramane J., Englert Y. Comparison of ethylene glycol, 1, 2- propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Hum Reprod.* 2000;15(4):905-10.
- 10- Fahning M.L., Garcia M.A. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology.* 1992; 29:1-18.
- 11- Friedler S., Giudice L.C., Lamb E.J. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril.* 1988;49:743-64.
- 12- Marquez-Alvarado Y.C., Galina C.S., Castilla B., Leon H., Moreno-Mendoza N. Evidence of damage in cryopreserved and fresh bovine embryos using the Tunel technique. *Reprod Domest Anim.* 2004;39(3): 141-5.
- ۱۳- رجایی فرزاد، سلیمانی‌راد جعفر، نیک‌نفس بهروز، غفاری معرفت. اثرات انجماد شیشه‌ای بر میزان آپوپتوز در مرحله بلاستوسیست. فصلنامه پزشکی باروری و ناباروری، شماره اول، سال پنجم، زمستان ۱۳۸۲، صفحات: ۲۲-۱۴.
- 14- Kikuchi K., Kashiwazaki N., Noguchi J., Shimada A., Takahashi R., et al. Developmental competence after transfer to recipients of porcine oocytes Matured, fertilized, and cultured in vitro. *Biol Reprod.* 1999;60: 336-40.
- 15- Yuge M., Otoi T., Nii M., Murakami M., Karja N.W., et al. 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;47(2):102-8.
- 16- Wyllie A.H., Kerr J.F., Currie A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980;68:251-306.
- 17- Leese H.J., Donnay I., Thompson J.G. Human assisted conception: a cautionary tale. Lessons from domestic animals. *Hum Reprod.* 1998;4(Suppl):184-202.
- 18- Wyllie A.H. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull.* 1997;53:451-465.
- 19- Jurisicova A., Varmuza S., Casper R.F. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod.* 1996;2:93-98.
- 20- Men H., Monson R.L., Parrish J.J., Rutledge J.J. Detection of DNA damage in bovine metaphase II oocytes resulting from cryopreservation. *Mol Reprod Dev.* 2003;64:245-250.
- 21- Oda K., Gibbons W.E., Leibo S.P. Osmotic shock of fertilized mouse ova. *J Reprod Fertil.* 1992;95:737-747.
- 22- Pedro P.B., Zhu S.E., Makino N., Sakurai T., Edashige K., Kasai M. Effects of hypotonic stress on the survival of mouse oocytes and embryos at various stages. *Cryobiology.* 1997;35:150-158.
- 23- Brison D.R., Schultz R.M. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod.* 1997;56:1088-1096.
- 24- Kasai M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim Reprod Sci.* 1996; 42:67-75.