مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره ششم، شماره بیست و دو - بهار ۱۳۹۵

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی بیان نشان گرهای اختصاصی پرتوانی *Oct۴* و *Nanog* در بلاستوسیست های موش حاصل از لقاح آزمایشگاهی

غزاله زندی[۱]، مجتبی دشتی زاد*[۲]، گلناز اسعدی تهرانی[۱]، مهدی شمس آراء[۲]

۱. گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران
۲. گروه زیست فناوری دام، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: اگرچه امروزه IVF به عنوان یک تکنیک پرکاربرد در درمان ناباروری می باشد، اما مطابق مطالعه ها صورت گرفته، استرس ایجاد شده به واسطه ی تغییر های اسمزی، اکسیژن، دما و **pH** در شرایط خارج از رحم می تواند باعث تغییر های مورفولوژیکی، ژنتیکی و اپی ژنتیکی در جنین های برون تنی نسبت به حالت درون تنی گردد. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر IVF بر کیفیت جنین ها از طریق ارزیابی نرخ زنده مانی و رشد و هم چنین بررسی میزان بیان ژن هایOct۴ و Nanog موثر در پرتوانی توده سلولی داخلی بلاستوسیست می باشد.

مواد و روش ها: در این آزمایش بلاستوسیست های ۴/۵-۳/۵ روزه ی موش در دو گروه بررسی شدند. در گروه تیمار بلاستوسیست های برون تنی با گذشت ۱۰۰ ساعت از لقاح اسپرم و تخمک حاصل گشتند. بلاستوسیست های درون تنی تیمار نشده نیز به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. در هر دو گروه، نرخ زنده مانی و میزان خروج بلاستوسیست ها از زونا و هم چنین میزان بیان ژن Oct۴، و Nanog، توسط تکنیک Real-time PCR بررسی شدند.

یافته ها: اگرچه میزان خروج بلاستوسیست از زونا نسبت به کنترل دارای کاهش معنی داری بود (۱۰/۴۰± ۶۷/۷۳٪ در مقابل ۵/۸۰± ۸۶/۸۸٪) اما میزان زنده مانی در بلاستوسیست های برون تنی مانند گروه کنترل هم چنان ۱۰۰٪ باقی ماند. هم چنین بیان ژن های Nanog و Oct۴ در بلاستوسیست های برون تنی نسبت به گروه کنترل دارای افزایش بود.

بحث: این مطالعه نشان داد که لقاح آزمایشگاهی می تواند بر خروج بلاستوسیست از زونا و بیان ژن تغییر ایجاد کند.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج حاصل، لقاح آزمایشگاهی می تواند باعث تغییر بیان ژن و کیفیت در رویان گردد.

کلمات کلیدی : لقاح آزمایشگاهی، بلاستوسیست، Oct۴، Real Time PC ، Nanog

مقدمه

با تولد اولین نوزاد زنده ی پستاندار (خرگوش) به روش لقاح آزمایشگاهی در سال ۱۹۵۹ (۵) تا کنون این تکنیک به طور قابل توجهی پیشرفت داشته،

به طوری که پس از آن در سال ۱۹۶۸ برای نخستین بار جنین های موش حاصل از روش IVF متولد شدند (۳۲). هم چنین در انسان نیز اولین نوزاد حاصل از IVF با هم کاریPatrick Steptoe و Robert Edwardدر ۲۵ جولای ۱۹۸۷ متولد شد (۲۷, ۲۸). این پیشرفت ها باعث بروز تحولاتی شگرف در زمینه ی بیولوژی تولید مثل و درمان ناباروری گردیده است.

اما متاسفانه علیرغم این پیشرفت ها، آمار زوجین نابارور هم چنان رو به افزایش است و ضرورت تقویت و بهینه سازی دانش و فناوری های نوین علوم مرتبط را بیش از پیش نمایان می سازد. سالانه تعداد زیادی کودک با استفاده از تکنیک های کمک باروری[۱] مانند IVF و تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم[۲] متولد می شوند (۱۷). اگر چه این تکنیک ها پر کاربرد می باشند، اما تحقیقات جدید نشان داده اند که استفاده از این تکنیک ها دارای عوارضی مانند اختلال های مغزی، تاخیر در رشد و تکامل رویان ها، افزایش نقص در هنگام تولد و اختلال های اپی ژنتیکی مانند سندرم های آنجلمن[۳] و بکویت-

مسئول نویسنده: گروه زیست فناوری دام، تهران، ایران
پست الکترونیکیdashtizad@nigeb.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۲۳

1 Assisted Reproductive Technologies: ARTs
2 Intracytoplasmic Sperm Injection: ICSI
3 Angelman Syndrome

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-18]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.9.4]

ویدمن[4] نیز می باشد (۱, ۸, ۲۶, ۲۹).

فاکتور های متعددی مانند گونه، کیفیت گامت ها، فرآیند لقاح و محیط کشت جنین می توانند کارایی IVF را تحت تاثیر قرار دهند. از میان فاکتور های فوق، مطالعه ها در مدل های حیوانی نشان داده اند که کشت در محیط آزمایشگاهی[5] استرس های بیش تری به گامت ها و جنین ها وارد می کنند (۱۱). برای کاهش استرس های وارد شده به هنگام کشت، محیط کشت رویان باید بتواند نیاز های متابولیکی رویان در مرحله ی پیش از لانه گزینی را تامین نماید. از میان محیط های ساخته شده، محیط تخصصی IVF که تقلیدی از محیط درون تنی[6] می باشد با نام HTF[7] در سال ۱۹۸۵ بر اساس ترکیبات شناخته شده ی لوله ی فالوپ انسانی توسط Quinn ساخته شد و لقاح آزمایشگاهی تخمک و اسپرم در موش با استفاده از آن به طور موفقیت آمیز انجام شد (۲۰). مطالعه ها بسیاری بر روی محیط های کشت تخمک و رویان توسط محققان صورت پذیرفته است، اما هم چنان سوالات بسیاری در ارتباط با تاثیر محیط کشت برون تنی[8] در تکامل و ظاهر جنین های متولد شده وجود دارد. اگرچه انعطاف پذیری بالای رویان های پستانداران باعث زنده مانی آن ها در شرایط برون تنی شده است، اما هم چنان رویان های برون تنی در برابر درون تنی دارای تفاوت هایی می باشند (۱۲). محیط In vitro نمی تواند به طور کامل تقلیدی از محیط In vivo باشد و ممکن است باعث تغییر های مورفولوژیکی و بیان ژن گردد (۹, ۲۴). مطالعه ها نشان داده اند که IVC رویان ها در مرحله ی پیش از لانه گزینی باعث تغییر هایی در الگوی کلی بیان ژنی این مرحله می گردد که اکثریت این ژن ها در تکوین، رشد و تکامل جنین نقش دارند که می توانند منجر به کاهش رشد، قابلیت لانه گزینی و در نهایت مرگ جنین گردند (۲۵). از جمله ژن های دخیل در تکوین رویان می توان به ژن های موثر در ایجاد و حفظ ویژگی پرتوانی سلول های بنیادی و تکامل اولیه ی رویان قبل از لانه گزینی مانند Oct۴[9] و Nanog[10] اشاره کرد که در توده ی سلولی داخلی بلاستوسیست[11] بیان می شوند و به عنوان نشان گر برای سلول های بنیادی جنینی در گذر از مرحله بلاستوسیست محسوب می گردند (۱۴). ژن Oct۴ که با عنوان POU۵f۱ نیز شناخته می شود، بیان آن در مرحله ی ۴ تا ۸ سلولی در همه ی بلاستومر های رویان آغاز شده و به ICM محدود می گردد. (۳, ۱۳, ۲۱). با توجه به اینکه تشکیل ICM به Oct۴ وابسته است، نقص در بیان ژن Oct۴ منجر به تولید بلاستوسیست هایی خواهد شد که ICM آن ها قدرت تمایز به سایر سلول ها مانند اپی بلاست و کیسه زرده را ندارد(۲۱, ۳۳). ژن Nanog نیز از مرحله ی ۸ سلولی در همه ی بلاستومر ها بیان می شود و در بلاستوسیست بیان آن به سلول های ICM و سپس به اپی بلاست محدود می شود و باعث تمایز سلول های اپی بلاست به جنین در اواخر بلاستوسیست می شود (۱۰, ۱۶, ۳۱).

رویان های دارای نقص در بیان ژن Nanog هرچند دارای بلاستوسیست با ICM نرمال می باشند اما به دلیل نقص در تمایز سلول های اپی بلاست و هم چنین بافت های مشتق شده از این سلول ها بعد از لانه گزینی از بین می روند (۶). بنابراین بررسی تغییر در الگوی بیان ژن ها را می توان به عنوان یک مارکر برای پیش بینی اثرات عوامل مختلف روی کیفیت و زنده مانی رویان ها در نظر گرفت. هدف از این طرح بررسی تاثیر IVF بر کیفیت بلاستوسیست های حاصل، از لحاظ مورفولوژیک با سنجش نرخ زنده مانی، بازگشت رویان ها به شکل طبیعی و نرخ خروج از زونا و نیز از طریق مولکولی با بررسی بیان فاکتورهای Oct۴ و Nanog به عنوان مارکرهای تخصصی پرتوانی می باشد.

روش کار

استحصال بلاستوسیست

در انجام این تحقیق از موش های نژاد NMRI[12] استفاده گردید. موش ها در شرایط دمایی C ° ۲۳-۱۸، رطوبت ۷۰-۴۰٪، شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دسترسی آزادانه به آب و غذای کافی نگه داری شدند. کلیه مراحل کار با حیوان مطابق دستورالعمل کمیته ی اخلاق و ایمنی زیستی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری صورت پذیرفت. تحریک تخمک گذاری[13] در موش های ماده دارای سن ۸-۷ هفته با تزریق IU[14] ۸ هورمون گونادوتروپین سرم مادیان حامله[15] (Folligon®, Intervert, A۰۰۷A۰۲) و ۴۸ ساعت بعد، IU۸ از هورمون گونادوتروپین جفت انسان[16] (Pregnyl®. ۱۱۱. Darou Pakhsh) به صورت داخل صفاقی[17] صورت پذیرفت. بلافاصله بعد از تزریق hCG، موش های نر با سن ۱۲- ۱۰ هفته و موش های ماده با نسبت ۱:۱ درون قفس ها قرار گرفتند. جفت گیری با تشکیل پلاک واژنی موش های ماده در صبح روز بعد، تایید گردید و روز ۰/۵ بارداری محسوب گشت. سه روز بعد، پس از آماده سازی محیط کشت

4 Beckwith-Wiedemann Syndrome
5 In vitro Culture: IVC
6 In vivo
7 Human Tubal Fluid: HTF
8 In vitro
9 Octamer-binding transcription factor 4: Oct4
10 Homeobox Transcription Factor: Nanog
11 Inner Cell Mass: ICM

12 National Medical Research Institute: NMRI
13 Superovulation
14 International Unit
15 Pregnant Mare's Serum Gonadotropin: PMSG
16 human Chorionic Gonadotropin: hCG
17 Intraperitoneal Injection: IP

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-18]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.9.4]

M۲[18] (۱۹) به همراه سدیم پیروات[19] (P-۴۵۶۲, Sigma) و آلبومین سرم گاوی[20] ۱۰۱۰۶,(GibcoBRL)، موش های باردار ۳/۵ روزه به روش جابه جایی مهره ی گردن کشته شدند. پس از جراحی و جداسازی لوله های رحمی، محیط با فشار به درون این لوله ها تزریق شد و بلاستوسیست ها از انتهای رحم خارج و جمع آوری شدند و تا انجام مراحل بعدی آزمایش درون قطره های محیط M۲ در زیر روغن استریل (M-۵۳۱۰, Sigma)، درون انکوباتور با شرایط CO_2 ۵٪، دمای ۳۷ °C و رطوبت ۹۷٪ نگه داری شدند. کلیه ی مراحل استحصال بلاستوسیست در دمای ۳۷ ºC انجام پذیرفت.

لقاح آزمایشگاهی

پس از تحریک تخمک گذاری در موش های ماده، بعد از گذشت ۱۲- ۱۱ ساعت از تزریق hCG و پیش از جراحی آن ها، موش های نر با سن ۱۲-۱۰ هفته به روش جا به جایی مهره ی گردنی کشته شدند. پس از استحصال توده ی اسپرم از اپیدیدیم انتهایی و لوله ی اسپرم بر، درون قطره هایTCM[21] ۱۹۹ شامل بیکربنات سدیم[22] و بافر هیپس[23] (۱۲۳۴۰-۰۳۰, GibcoBRL) به همراه ۱۰٪ آلبومین سرم گاوی در زیر روغن استریل قرار داده شدند و به مدت ۱۲۰-۶۰ دقیقه به منظور ظرفیت پذیری اسپرم درون انکوباتور با شرایط CO_2 ۵٪، دمای ۳۷ °C و رطوبت ۹۷٪ قرار گرفتند. موش های ماده نیز بعد از ۱۳ ساعت از تزریق hCG، به روش جابه جایی مهره ی گردنی کشته شدند. پس از جراحی و خارج کردن توده های تخمک-کومولوس[24] از ناحیه ی متورم آمپولای اویداکت، توده ها در قطره های محیط M۲ به همراه سدیم پیروات و آلبومین سرم گاوی در زیر روغن استریل شستشو و تا زمان لقاح، درون انکوباتور با شرایط CO_2 ۵٪، دمای ۳۷ C° و رطوبت ۹۷٪ نگه داری شدند.

پس از ظرفیت پذیر شدن اسپرم ها، COCs به همراه اسپرم های ظرفیت پذیرشده با غلظت 1×10^6 در حجم ۱ ml به درون قطره های حاوی محیط HTF (۲۰) به همراه سدیم پیروات، آلبومین سرم گاوی و گلوتاتیون[25] (۰۷۱M۱۸۰۴۷, Sigma) در زیر روغن استریل منتقل شدند و در انکوباتور با شرایط $5\%CO_2$، دمای ۳۷ C° و رطوبت ۹۷٪ قرار گرفتند. بعد از گذشت ۴ ساعت از زمان IVF، سلول های تخم لقاح یافته[26] برای ادامه ی روند تکامل به درون پتری دیش حاوی قطره هایKSOM[27] (۲) به همراه سدیم پیروات، آلبومین سرم گاوی، جنتامایسین[28] (G-۱۲۶۴, Sigma) و فاکتور رشد اپیدرمی[29] (E-۴۱۲۷, Sigma) شستشو داده شدند و به مدت ۹۶ ساعت تا رسیدن به مرحله ی بلاستوسیست درون انکوباتور با شرایط CO_2 ۵٪، دمای ۳۷°C و رطوبت ۹۷٪ نگه داری شدند.

استخراج RNA و ساخت cDNA

استخراج RNA توسط کیت (۷۴۰۳۴, RNeasy® Plus Qiagen) Micro Kit و پروتکل کیت برای هر تیمار صورت گرفت. برای ساخت رشته ی اول cDNA نیز مطابق بروتکل کیت، RNAی استخراج شده با غلظتng/ml ۴، توالی شش نوکلئوتیدی تصادفی[30] (J۲۰۸, Bioneer) و آب عاری از آنزیم های تجزیه کننده ی RNA[31] به درون ترکیبات کیت (K-۲۱۰۱, Bioneer) افزوده شد. مخلوط واکنش به ترتیب ۳، ۶۰ و ۵ دقیقه درون دستگاه PCR با دماهای ۱۵°C، ۵۰°C و ۹۵°C قرار گرفت.

طراحی پرایمر

به منظور بررسی میزان تغییر های بیان ژن ها پرایمر های اختصاصی رفت[32] و برگشت[33] ژن ها توسط برنامه های Gene Runner و Primer BLAST طراحی و تهیه شدند. در طراحی پرایمر سعی بر آن شد که فاکتور هایی نظیر طول پرایمر، طول قطعه ی حاصل از تکثیر، درصد باز های آلی سیتوزین و گوانین و نیز وجود توالی های تکراری، پالیندرومی و انتهای سنجاق سری[34] مورد توجه قرار گیرد. ژن ها، شماره ی دسترسی آن ها در بانک ژن، توالی پرایمر ها و طول محصولات PCR آن ها در جدول ۱ آمده است.

ژن	توالی[34] به ۵'	دمای Tm[1] (°C)	طول محصول (nt)	شماره دسترسی ژن در بانک ژن[2]
Oct۴	F:AGCATTGAGAACCGTGTGAGG	۵۹/۸	۱۲۰	۰۱۳۶۳۳_NM
	R:TCGAACCACATCCTTCTCTAGC	۶۰/۳		
Nanog	F:GCCTCCAGCAGATGCAAGAA	۵۹/۴	۱۵۴	۰۲۸۰۱۶_NM
	R:GGTGCTGAGCCCTTCTGAAT	۵۹/۴		
β۲m	F:CCTGGTCTTTCTGGTGCTTGT	۵۹/۸	۱۱۸	۰۰۹۷۳۵_NM
	R:GCAGTTCAGTATGTTCGGCTTC	۶۰/۳		

جدول۱. مشخصات پرایمر های طراحی شده برای ژن های Oct۴، Nanog و β۲m

18 Modified Krebs-Ringer solution with HEPES buffer: M2 medium
19 Sodium Pyruvate
20 Bovine Serum Albumin: BSA
21 Tissue Culture Medium 199: TCM 199
22 Sodium Bicarbonate
23 4-(2-Hydroxy Ethyl) Piperazine-1-Ethane Sulfonic acid: HEPES
24 Cumulus Oocyte Complexes: COCs
25 Reduced Glutathione: GSH
26 Presumptive Zygotes
27 Synthetic Oviductal Medium, Enriched with Potassium: KSOM
28 Gentamicine
29 Epidermal Growth Factor : EGF
30 Random Hexamers: RH
31 RNase Free Water
32 Forward Primer : F
33 Reverse Primer : R
34 Hairpin loop

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-18]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.9.4]

واکنش زنجیره ای پلیمراز در زمان واقعی[35] پس از اطمینان از مواد و شرایط با انجام روش PCR[36]، بیان دو ژن Oct۴ و Nanog توسط واکنش real time-PCR با استفاده از دستگاه ترموسیکلر (Applied Bio System StepOne Plus, USA) و کیت (Intron ,۲۵۳۴۴) حاوی رنگ SYBR Green I از طریق روش مقایسه ای CT ارزیابی شد. بیان ژن ها نیز با ژن خانه داری β۲m) microglobulin ۲ beta)نرمال شد. این واکنش مطابق جدول۲ برای هر یک از تیمار ها ۳ بار تکرار شد. منحنی استاندارد نیز به منظور نشان دادن کارایی واکنش PCR با استفاده از سریال رقتی برای ژن ها رسم شد. منحنی ذوب نیز به منظور تایید اختصاصیت محصولات برای هر واکنش رسم شد. به این ترتیب که بعد از قرار گرفتن مخلوط واکنش در ۹۵ °C به مدت ۲ دقیقه، ۴۰ سیکل تکثیر با شرایط ۹۵ °C برای ۱۵ s به منظور مرحله ی واسرشتگی و ۶۰s با دمای ۵۵ °C برای مرحله اتصال انجام پذیرفت.

تعداد چرخه	زمان (S)	دما (°C)	مرحله	
۱	۱۲۰	۹۵	Holding Stage	
۴۰	۱۰ ۳۰	۹۵ ۵۵	Cycling Stage	Denaturation Annealing
۱	۱۵ ۶۰ ۱۵	۹۵ ۵۵ ۹۵	Melt Curve Stage	Denaturation Annealing Denaturation

جدول ۲: چرخه های حرارتی واکنش زنجیره ای پلیمراز در زمان واقعی

طراحی آزمایشات

در این آزمایش بلاستوسیست های ۴/۵-۳/۵ روزه ی موش با کیفیت مناسب از لحاظ ظاهر انتخاب و در دو گروه بررسی شدند. در گروه تیمار بلاستوسیست های برون تنی با گذشت ۱۰۰ ساعت از لقاح اسپرم و تخمک حاصل گشتند. گروه کنترل نیز شامل بلاستوسیست های درون تنی تیمار نشده می باشد. به منظور بررسی تاثیر IVF فاکتور هایی مانند نرخ زنده مانی، خروج بلاستوسیست از زونا و میزان بیان ژن های اختصاصی پرتوانی Oct۴ و Nanog در گروه تیمار با گروه کنترل مقایسه گردیدند.

تجزیه و تحلیل داده ها

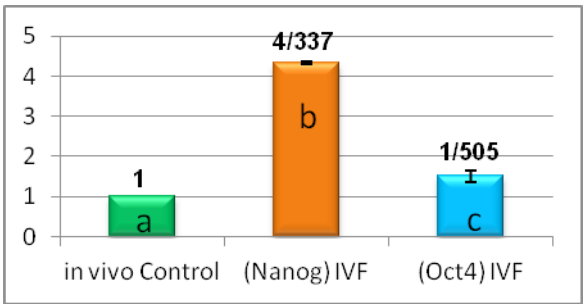
داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-۱۶ و آزمون آماری One-Way ANOVA و به دنبال آن تست دقیق Duncan تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی داری کم تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

این آزمایش به طور مجموع بر روی ۴۴۰ بلاستوسیست موش صورت پذیرفت. در این میان رویان هایی که دارای ICM بزرگ با تعداد سلول های زیاد و دارای ظاهری طبیعی و بدون هرگونه آسیب غشایی، آسیب اتصالات سلولی و تکه تکه شدن یا انحطاط سیتوپلاسم بودند، از لحاظ مورفولوژیکی طبیعی تلقی شدند. نرخ زنده مانی بلاستوسیست ها با بررسی احیای حفره ی بلاستوسل در ۳ ساعت پس از انجام تیمار ها ارزیابی گردید. برای رسیدن به اطلاعات بیش تری از زنده مانی بلاستوسیست های احیا نشده در این مدت، این رویان ها درون انکوباتور با شرایط CO_2 ۵٪، دمای ۳۷ C° و رطوبت ۹۷٪ نگه داری شدند و ۱۲ ساعت بعد دوباره مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده در این آزمایش (جدول ۳)، اگرچه میزان خروج بلاستوسیست از زونا نسبت به کنترل دارای کاهش معنی داری بود (۱۰/۴۰± ۶۷/۷۳٪ در مقابل ۵/۸۰ ± ۸۶/۸۸٪)، اما میزان زنده مانی در بلاستوسیست های حاصل از لقاح آزمایشگاهی مانند گروه کنترل هم چنان ۱۰۰٪ باقی ماند. هم چنین بیان ژن های Nanog و Oct۴ مطابق نمودار ۱ در بلاستوسیست های In vitro نسبت به گروه کنترل In vivo دارای افزایش ۴/۳۳۷ و ۱/۵۰۵ برابری بودند.

گروه مورد آزمایش	تعداد بلاستوسیست ها	میزان زنده مانی (٪)	میزان خروج بلاستوسیست از زونا (٪)
کنترل	۲۲۰	۱۰۰٪ [a]	۸۶/۸۸ ± ۵/۸۰٪ [a]
بلاستوسیست های حاصل از لقاح آزمایشگاهی	۲۲۰	۱۰۰٪ [a]	۶۷/۷۳ ±۱۰/۴۰٪ [b]

جدول ۳: اثر لقاح آزمایشگاهی بر کیفیت بلاستوسیست ها داده ها از ترکیب نمونه های ۵ تکرار به دست آمدند. a و b در هر ستون نسبت به هم تفاوت معنی دار دارند (P/۰۵>۰ در تست ANOVA و Duncan)



نمودار ۱ : اثر لقاح آزمایشگاهی بر میزان تغییر بیان ژن های Nanog و Oct۴ نسبت به گروه کنترل داده ها حاصل از ۳ تکرار real time- PCR می باشند. a ، b و c نسبت به هم تفاوت معنی دار دارند (P/۰۵>۰ در تست ANOVA وDuncan).

35 Real time-PCR
36 Polymerase Chain Reaction: PCR

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-18]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.9.4]

بحث

نتایج به دست آمده از مطالعه ها مختلف همانند مطالعه ی صورت گرفته بر روی رویان های درون و برون تنی نشان می دهند که در ظاهر، تکامل و الگوی بیان ژنی این رویان ها تفاوت هایی وجود دارد که این نیز می تواند به دلیل تفاوت در شرایط محیطی، شرایط اسمزی، دما و pH در شرایط خارج از رحم باشد که به عنوان استرس و شوک برای رویان ها عمل کرده (۱۵). در مقایسه ی گروه های In vitro و In vivo همان طور که در نتایج مشاهده شد میزان خروج بلاستوسیست از زونا در گروه In vitro نسبت به کنترل In vivo کاهش معنی داری یافته است (۱۰/۴۰± ۶۷/۷۳٪ در مقابل ۵/۸۰ ± ۸۶/۸۸٪). این کاهش می تواند به این دلیل باشد که لقاح و کشت در شرایط آزمایشگاهی موجب تغییر در الاستیسیته و افزایش مقاومت زونا می شود و در نتیجه باعث کاهش توانایی بلاستوسیست در خروج از زونا و میزان حاملگی می گردد. بر اساس مقالات استرس های ناشی از لقاح آزمایشگاهی باعث می شود رویان های حاصل از IVF دارای توده ی سلولی کم تر، تغییر در نسبت سلول های ICM به TE، تغییر در بیان ژن و متابویسم سلولی باشند (۴). این تغییر های می توانند باعث کاهش نسبی کیفیت جنین های حاصل از IVF گردد. بنابراین انتظار بر کاهش بیان ژن می باشد. طبق نظریه ی Riniudo در سال ۲۰۰۴، کشت رویان در محیط In vitro تا مراحل پیش از لانه گزینی می تواند الگوی کلی بیان ژن را تغییر دهد (۲۳). هم سو با مطالعه ی حاضر مبنی بر تغییر الگوی بیان ژن ها در جنین های حاصل از IVF نسبت به گروه کنترل، Gnanaratnam و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۷ بیان کردند که جنین های حاصل از لقاح آزمایشگاهی نسبت به گروه کنترل دارای افزایش تغییر های ۲-۴ برابری در الگوی بیان ژن ها می باشند(۱۱).

هم چنین در سال ۲۰۰۶ Corcoran با بررسی ۳۸۴ ژن اعلام داشت که الگوی کلی بیان ژن ها در جنین های گاوی گروه In vitro در مقابل In vivo نیز دارای تغییر های بسیار بود(۷). طبق نتایج حاصل از تحقیق ما، تغییر ایجاد شده در الگوی بیان ژن با افزایش بیان همراه می باشد که بر خلاف انتظار است. این تغییر می تواند به دلیل فرآیند لقاح آزمایشگاهی و یا کشت بعد از لقاح باشد.

به منظور بررسی دقیق تر نقش لقاح و یا کشت بعد از لقاح در تغییر الگوی بیان ژن مطالعه ای توسط Giritharan و همکارانش در سال ۲۰۰۷ انجام شد (۱۱). به طوری که کیفیت رویان ها از لحاظ ظاهر و تغییر در میزان بیان ژنی در بلاستوسیست های با منشا متفاوت صورت گرفت. در این طرح برای اولین بار مقایسه ای بین بلاستوسیست های حاصل از لقاح و کشت برون تنی (IVF) و بلاستوسیست های حاصل از لقاح درون تنی و کشت برون تنی (IVC) با بلاستوسیست هایی که تمامی مراحل را درون بدن بوده اند (In vivo) صورت پذیرفت. نتایج بیانگر تفاوت های قابل توجهی بین رویان های IVF با In vivo بود.

بارز ترین تفاوت در کاهش تعداد کلی سلول ها و به خصوص سلول های TE و افزایش سایز هسته ی سول های ICM در گروه IVF نسبت به In vivo بود. در مورد افزایش سایز هسته در رویان های IVF بدلیل اینکه در این مطالعه فقط هسته رنگ آمیزی شده بود نمی توان اطلاعات دقیقی از نسبت سایز هسته به سیتوپلاسم به دست آورد. چون به نظر می رسد نسبت سایز هسته به سیتوپلاسم در مقایسه با هسته و سیتوپلاسم به تنهایی نقش مهمتری در تغییر میزان بیان ژن ها دارد. تنها بررسی های فراساختاری می تواند به روشن شدن این موضوع کمک کند.

در سال ۲۰۰۱ Crosier و همکارانش ابعاد و اندازه‌های بلاستوسیست های گاوی با دو منشا درون و برون تنی را از لحاظ فراساختاری مورد ارزیابی قرار دادند و دریافتند که نسبت هسته به سیتوپلاسم در رویان های IVF کم تر از گروه In vivo می باشد که این امر را مرتبط با کاهش کیفیت رویان های حاصل از IVF نسبت به In vivo دانستند (۷). در مقابل Petzoldt و همکارش با حذف یا افزودن سیتوپلاسم و دست کاری حجم آن و تغییر در نسبت هسته به سیتوپلاسم در رویان های موش و بررسی بیان ژن های اختصاصی مراحل تکاملی، به این نتیجه رسیدند که فعالیت ژن ها مستقل از این نسبت می باشد (۱۸). تفاوت های ظاهری مشاهده شده در رویان های درون و برون تنی نشان می دهند که بعضی از فرآیند های اساسی نیز بر اثر شرایط کشت در رویان های حاصل از IVF تغییر کرده اند. فرآیندهایی هم چون تکثیر سلولی، مرگ برنامه ریزی شده و اختصاصیت سلول ها به ICM و TE دچار تغییر شده اند (۱۱).

در همین راستا Trounson و Bongso در ۱۹۹۶ بیان کردند که اتصالات سلول- سلول در بلاستوسیست های حاصل از IVF نسبت به حالت درون تنی کم تر می باشد. این اتصالات مربوط به جایگیری و فشردگی صحیح بلاستومرها می باشد. با کاهش این اتصالات، بلاستومرها یا با تاخیر در جای خود قرار می گیرند و یا اصلا به درستی جایگیری نمی کنند و در نتیجه به سرنوشت نهایی خود نمی رسند و رده زایی به درستی صورت نمی گیرد (۳۰). در جهت رد این نظریه Ray در سال ۱۹۹۵ بیان کرد که اگر تنها دلیل کاهش تعداد سلول ها، تسهیم با تاخیر باشد، نسبت ICM به TE ثابت می ماند در حالی که این طور نیست (۲۲).

بنابراین علاوه بر تسهیم با تاخیر، اختصاصیت نابجای سلول ها به ICM و TE و در نهایت رده زایی نادرست نیز در کاهش سلول ها موثر می باشد. در نهایت با توجه به مطالعه ها صورت گرفته این گونه می توان نتیجه گیری کرد که در پی تسهیم با تاخیر، اختصاصیت

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.9.4]

نا بجای سلول های ICM و TE و به موجب آن تغییر در تعداد بلاستومر ها، رده زایی صحیح بلاستوسیست انجام نشده و از این طریق میزان بیان ژن های بیان شونده در هر رده ی سلولی دچار تغییر می گردد. هم چنین کاهش تعداد سلول های ICM و TE و افزایش اندازه ی هسته ی سلول های ICM در رویان های حاصل از IVF نسبت به In vivo می تواند با تفاوت در الگوی بیان ژن ها مرتبط باشد.

نتیجه گیری

با توجه به این که مطالعه ای مبنی بر دلایل قطعی افزایش یا کاهش بیان ژن در جنین های حاصل از IVF صورت نپذیرفته است بنابراین مطالعه ها بیش تری جهت درک بهتر علل و چگونگی تغییر های بیان ژن در رویان های حاصل از لقاح آزمایشگاهی نیاز می باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق در قالب طرح پژوهشی به شناسه ی ۴۴۴ و با حمایت مالی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری صورت پذیرفته است. نگارندگان، مراتب تشکر و قدردانی خود را از هم کاری صمیمانه ی آقایان دکتر مرتضی دلیری،دکتر هادی حجاریان، احسان هاشمی، دکتر آیدین رحیم طایفه و خانم دکتر خدیجه عنصری اعلام می نمایند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.9.4]

منابع

1.Anthony S., Buitendijk S., Dorrepaal C., Lindner K., Braat D. and Den Ouden A. Congenital malformations in 4224 children conceived after ivf, Hum Reprod, 2002; 17, 2089-2095.

2.Biggers J. A. L. a. J. D. Culture of preimplantation embryos, Methods Enzymol, 1993; 225. 153-164

3.Boiani M., Eckardt S., Schöler H. R. and McLaughlin K. J. Oct4 distribution and level in mouse clones: Consequences for pluripotency, Genes & Development, 2002; 16, 1209-1219.

4.Camargo L., Viana J., Sá W., Ferreira A., Ramos A. and Vale Filho V. Factors influencing in vitro embryo production, Animal reproduction, 2006; 3, 19-28.

5.Chang M. C. Fertilization of rabbit ova in vitro, Nature, 1959; 466-467.

6.Cockburn K. and Rossant J. Making the blastocyst: Lessons from the mouse, The Journal of Clinical Investigation, 2010: 120, 995-1003.

7.Corcoran D., Fair T., Park S., Rizos D., Patel O., Smith G., Coussens P., Ireland J., Boland M. and Evans A. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos, Reproduction, 2006: 131, 651-660.

8.Crosier A. E., Farin P. W., Dykstra M. J., Alexander J. E. and Farin C. E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro, Biol Reprod, 2001: 64, 1375-1385.

9.DeBaun M. R., Niemitz E. L. and Feinberg A. P. Association of in vitro fertilization with beckwith-wiedemann syndrome and epigenetic alterations of lit1 and h19, The American Journal of Human Genetics, 2003: 72, 156-160.

10.Farin P. W., Piedrahita J. A. and Farin C. E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos, Theriogenology, 2006; 65, 178-191.

11.Fujii T., Sakurai N., Osaki T., Iwagami G., Hirayama H., Minamihashi A., Hashizume T. and Sawai K. Changes in the expression patterns of the genes involved in the segregation and function of inner cell mass and trophectoderm lineages during porcine preimplantation development, The Journal of Reproduction and Development, 2013; 59,151-158

12.Giritharan G., Talbi S., Donjacour A., Di Sebastiano F., Dobson A. T. and Rinaudo P. F. Effect of in vitro fertilization on gene expression and development of mouse preimplantation embryos, Reproduction, 2007; 134, 63-72.

13.Lane M. Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress in vitro, Theriogenology, 2001; 55, 225-236.

14.Le Bin G. C., Muñoz-Descalzo S., Kurowski A., Leitch H., Lou X., Mansfield W., Etienne-Dumeau C., Grabole N., Mulas C. and Niwa H. Oct4 is required for lineage priming in the developing inner cell mass of the mouse blastocyst, Development, 2014; 141, 1001-1010.

15.Liu W., Stein P., Cheng X., Yang W., Shao N., Morrisey E., Schultz R. and You J. Brd4 regulates nanog expression in mouse embryonic stem cells and preimplantation embryos, Cell Death Differ, 2014; 21, 1950-1960.

16.Lonergan P., Fair T., Corcoran D. and Evans A. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in ivf-derived embryos, Theriogenology, 2006; 65,137- 152

17.Miyanari Y. and Torres-Padilla M.-E. Control of ground-state pluripotency by allelic regulation of

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.9.4]

nanog, Nature, 2012; 483, 470-473.
18.Olivennes F., Fanchin R., Ledee N., Righini C., Kadoch I. and Frydman R. Perinatal outcome and developmental studies on children born after ivf, Hum Reprod Update, 2002; 8, 117-128.
19.Petzoldt U. and Muggleton-Harris A. The effect of the nucleocytoplasmic ratio on protein synthesis and expression of a stage-specific antigen in early cleaving mouse embryos, Development, 1987; 99, 481-491.
20.Quinn P., Barros C. and Whittingham D. G. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa, J Reprod Fertil, 1982; 66, 161-168.
21.Quinn P., Warnes G. M., Kerin J. F. and Kirby C. Culture factors affecting the success rate of in vitro fertilization and embryo transfera, Ann N Y Acad Sci, 1985; 442, 195-204.
22.Rajabpour-Niknam M., Totonchi M., Shahhosseini M., Farrokhi A., Alipour H. and Eftekhari-Yazdi P. Quantitative expression of developmental genes, pou5f1 (oct4) and mest (peg1), in vitrified mouse embryos, Iranian Journal of Reproductive Medicine, 2013; 11, 733.
23.Ray P., Conaghan J., Winston R. and Handyside A. Increased number of cells and metabolic activity in male human preimplantation embryos following in vitro fertilization, J Reprod Fertil, 1995; 104, 165-171.
24.Rinaudo P. and Schultz R. M. Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos, Reproduction, 2004; 128, 301-311
25.Rinaudo P. F., Giritharan G., Talbi S., Dobson A. T. and Schultz R. M. Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos, Fertil Steril, 2006; 86, 1265. e1261-1265. e1236.
26.Saragusty J. and Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification, Reproduction, 2011; 141, 1-19.
27.Schieve L. A., Meikle S. F., Ferre C., Peterson H. B., Jeng G. and Wilcox L. S. Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology, N Engl J Med, 2002; 346, 731-737.
28.Shin M. R., Choi H. W., Kim M. K., Lee S. H., Lee H.-S. and Lim C. K. 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, 203-209.
29.Steptoe P. C. and Edwards R. G. Birth after the reimplantation of a human embryo, The Lancet, 1978; 312, 366.
30.Strömberg B., Dahlquist G., Ericson A., Finnström O., Köster M. and Stjernqvist K. Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilisation: A population-based study, The Lancet, 2002; 359, 461-465.
31.Trounson A. and Bongso A. 3 fertilization and development in humans, Curr Top Dev Biol, 1996; 32, 59-101.
32.Wang Y., Smedberg J. L., Cai K. Q., Capo-Chichi D. C. and Xu X. X. Ectopic expression of gata6 bypasses requirement for grb2 in primitive endoderm formation, Dev Dyn, 2011; 240, 566-576.
33.Whittingham D. G. Fertilization of mouse eggs in vitro, Nature, 1968; 220, 592-593.
34.Yamanaka Y., Ralston A., Stephenson R. O. and Rossant J. Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst, Dev Dyn, 2006; 235, 2301-2314.
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-18]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.9.4]