بررسی تأثیر سوراخ کردن مصنوعی بلاستوسیست موش بر زنده‌مانی و میزان بیان ژن *Wnt3a*

سمانه قریب[۱]، مجتبی دشتی‌زاد[۲]*، فرح فرخی[۱]، مهدی شمس‌آرا[۲]

[۱] ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[۲] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه زیست فناوری دامی

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۶

چکیده

امروزه جهت افزایش میزان لانه‌گزینی و حاملگی پس از انتقال رویانهای حاصل از لقاح آزمایشگاهی، از تکنیکهای مختلف هچینگ کمکی از جمله سوراخ کردن مصنوعی بلاستوسیست استفاده می‌شود. در این مطالعه با سوراخ کردن مصنوعی بلاستوسیست با استفاده از ریز سوزنهای تزریق کننده، کیفیت بلاستوسیستهای موش با بررسی نرخ زنده‌مانی، خروج بلاستوسیست از زونا و میزان بیان ژن *Wnt3a* مورد ارزیابی قرار گرفت. بلاستوسیستها در دو گروه درون‌تنی و برون‌تنی مورد مطالعه قرار گرفتند. در هر گروه تعدادی از بلاستوسیستها با استفاده از ریز سوزنهای تزریق‌کننده به روش مکانیکی سوراخ شدند و تعدادی دیگر بدون هیچ تیماری به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. نرخ زنده‌مانی و قابلیت خروج بلاستوسیستها از زونا و همچنین میزان بیان ژن *Wnt3a* توسط تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی در هر گروه ارزیابی گردید. بر اساس نتایج به دست آمده در بلاستوسیستهای درون‌تنی و برون‌تنی گروه تیمار در مقایسه با کنترل میزان زنده‌مانی کاهش نیافت در مقابل میزان خروج بلاستوسیست از زونا افزایش معنی‌داری نشان داد. در گروه بلاستوسیستهای درون‌تنی میزان بیان ژن *Wnt3a* افزایش معنی‌دار و در گروه بلاستوسیستهای برون‌تنی کاهش معنی‌دار یافت.

سوراخ کردن مصنوعی بلاستوسیست می‌تواند یک روش مطمئن در هچینگ کمکی به کار رود.

واژه های کلیدی: هچینگ کمکی، سوراخ کردن مصنوعی، بلاستوسیت موش، ژن *Wnt3a*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۴۴۷۸۷۳۲۳، پست الکترونیکی:dashtizad@nigeb.ac.ir

مقدمه

پیش شرط یک لانه‌گزینی موفق، خروج رویان از زونا پلوسیدا یا همان لایه محاطی شفاف اطراف جنین می‌باشد (۳۰). در شرایط طبیعی اطراف تخمک با لایه‌ای از مولکولهای قندی پروتئینی پوشیده شده است که پس از ورود اولین اسپرم به تخمک با تغییر در ساختار به گونه‌ای عمل می‌نماید که مانع ورود اسپرمهای بعدی و پلی‌اسپرمی می‌گردد (۳ و ۱۷). این لایه علاوه بر محافظت تخمک و رویان، مانع از جدا شدن سلولهای رویانی از یکدیگر شده و به عنوان یکی از عوامل مؤثر در هدایت رویان به سمت رحم ایفاء نقش می‌نماید (۳ و ۲۵). زونا پلوسیدا در روز پنجم پس از لقاح، با رسیدن رویان در مرحله بلاستوسیست به حفره رحمی، به کمک آنزیمهای مترشحه از سلولهای تروفواکتودرمی رویان و دیواره رحم، نازک شده و با بالا رفتن فشار درونی رویان، از ناحیه‌ای پاره می‌شود تا امکان چسبیدن و نفوذ رویان به دیواره رحمی فراهم گردد. به این فرآیند پاره شدن و خروج رویان از زوناپلوسیدا، هچینگ گفته می‌شود، هر تغییری که بتواند در این خروج اختلال ایجاد نماید نرخ باروری را به طور جدی تحت تأثیر قرار خواهد داد (۱ و ۲۲).

Archive of SID

www.SID.ir

در دهه‌های اخیر، با توجه به افزایش میزان ناباروری در بین زوجین، نیاز به روشهای کمک باروری بیش از پیش احساس می‌شود. از شایع ترین روشهای ART، می‌توان به تولید رویان آزمایشگاهی اشاره نمود (۱۱). در مواردی که لقاح و کشت جنین در شرایط برون تنی به وقوع می‌پیوندد برخی استرسهای محیطی نظیر دما، pH و مجاورت با محیطهای کشت می‌توانند با تغییر در ساختار زونا موجب افزایش الاستیسیته (۲۳) و کاهش در نرخ خروج و لانه-گزینی رویان و در نهایت باروری گردد (۹و۱۰). کاهش ضخامت و یا ایجاد شکاف در لایه محاطی رویانهای برون-تنی، قبل از انتقال به رحم فرد گیرنده، می‌تواند روند خروج رویان از زونا و لانه‌گزینی را بهبود بخشد که این امر امروزه در آزمایشگاهها با استفاده از روشهای مکانیکی، شیمیایی (آنزیمی) و یا لیزر تحت عنوان هچینگ کمکی صورت می‌پذیرد (۲، ۶ و ۲۱).

با توجه به تهاجمی بودن این روش تنها موارد ضخامت زونای بالای ۱۷ میکرومتر، رویانهای کمتر از ۵ سلول در روز سوم و فراگمنتیشن بالای ۲۰ درصد، کاندیدای مناسبی برای انجام هچینگ کمکی می‌باشند. همچنین به بیماران بالای ۳۸ سال و دارای سابقه چندین شکست در انتقال رویان، استفاده از این روش توصیه می‌شود (۸ و ۲۲).

امروزه پروتکل رایج در بسیاری از آزمایشگاهها انتقال دو تا سه رویان ۴ تا ۸ سلولی به ازاء هر دوره درمانی می‌باشد. دلیل این امر انتقال و برگشت سریع تر رویانهای برون‌تنی به شرایط درون‌تنی، آسان و ایمن‌تر بودن روش هچینگ کمکی در این مرحله با توجه به وجود فاصله کافی بین بلاستومرها و زونا و نیز شانس بقای بالاتر رویانها بعد از انجماد می‌باشد (۴، ۲۴ و ۲۸). اما مطالعات نشان داده‌اند بلاستوسیست به دلیل بالا بودن تعداد سلولها از قدرت ترمیم بیشتری برخوردار است. همچنین با توجه به افزایش در نسبت سطح به حجم سلولها، امکان تبادل مواد سرما محافظ با آب درون سلولی افزایش می‌یابد و پتانسیل رویان برای بقاء و مقاومت در برابر شوکهای دمایی بهبود می‌یابد (۱۴ و ۱۵). بنابراین انتقال رویان در مرحله بلاستوسیست علاوه بر بالا بردن شانس حاملگی، خطر ابتلاء به سندرم تحریک بیش از حد تخمدان را نیز کاهش می‌دهد (۱۳) و از جمله درمانهای پیشنهاد شده در باب شکست مکرر در لانه‌گزینی مطرح می‌باشد. اما در بلاستوسیست به واسطه چسبیده بودن سلولهای لایه تروفواکتودرم به لایه زونا، هچینگ کمکی ریسک آسیب به سلولهای رویان را افزایش می‌دهد. همچنین حفره بلاستوسل مملو از مایع درون بلاستوسیست با افزایش احتمال تشکیل کریستال یخ حین انجماد، باعث کاهش نرخ زنده‌مانی، در رویانهای یخ‌گشایی شده می‌گردد. علاوه بر این، حضور حفره مملو از مایع می‌تواند به عنوان یک سد، مانع از رسیدن مواد سرما محافظ به سلولهای درونی رویان گردد و باعث آسیب سلولهای درونی به واسطه مواجه با شوک سرمایی گردد (۲۰)

تا کنون روشهای مختلفی برای کاهش حجم مایع درون حفره بلاستوسل معرفی شده‌اند که از جمله آنها می‌توان به ایجاد سوراخ در بلاستوسیست با استفاد از یک سوزن بسیار نازک شیشه‌ای اشاره کرد، علاوه بر استفاده از ریز سوزن شیشه‌ای، روشهای دیگری همچون استفاده از سوزن با درجه ۲۹، پیپت شیشه‌ای (۸)، لیزر (۱۹) و غلظت بالای ساکارز (۱۱) نیز برای کاهش مایع حفره بلاستوسل مورد بررسی قرار گرفته است. با ایجاد سوراخ در بلاستوسیست با استفاد از یک سوزن بسیار نازک شیشه‌ای می توان ضمن کاهش حجم مایع بلاستوسل، امکان دسترسی سلولهای درونی رویان را به مواد سرما محافظ در غلظتهای معمول تسهیل نمود و هم با تحریک سلولهای تروفواکتودرم باعث فعال شدن مسیر ترشح آنزیم لایزین گردد که خود می‌تواند با تسهیل در خروج رویان از زونا به عنوان هچینگ کمکی عمل نماید (۴، ۱۰، ۱۲ و ۱۳).

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که کاهش حجم مایع

Archive of SID

www.SID.ir

بلاستوسل قبل از انجماد شیشه‌ای می‌تواند نرخ زنده مانی رویانهای ذوب شده را بهبود بخشد ولی این مایع در تغذیه، جا به جایی و جهت دهی بلاستومرها در حین تکامل و لایه‌زایی، نقش دارد. در طی تکامل رویان، سلولهای ICM در بلاستوسیست توانایی تبدیل به هر سه لایه زاینده جنینی (اکتودرم، مزودرم و آندودرم) را دارا می‌باشند. سلولهای ترفواکتودرم نیز که در معرض مستقیم فشار ناشی از پارگی بلاستوسیست می باشند نقش اساسی در لانه‌گزینی رویان ایفاء می‌نماید. بنابراین هر گونه تغییر در میزان بیان ژنهای تأثیرگذار در تکوین رویان می‌تواند در کیفیت بلاستوسیست و در نهایت توان لانه‌گزینی رویان تأثیرگذار باشد. از میان این ژنها می‌توان به ژنهای خانواده *Wnt* اشاره کرد که از مراحل اولیه رشد رویان بیان می‌شوند و به ICM و سپس به اپی‌بلاست و بعد از گاسترولاسیون به رده سلولی زاینده محدود می‌گردند و نقش عمده‌ای در رشد و تکامل جنین ایفاء می‌نمایند. بنابراین، نقص در بیان آنها منجر به تولید بلاستوسیستهایی خواهد شد که ICM آنها قدرت تمایز به سایر سلولها را ندارد و حتی در صورت لانه‌گزینی نیز در مراحل اولیه تکامل جنینی از بین می‌روند (۱۶).

با توجه به نقش مایع بلاستوسل آیا خروج مایع و نیز آسیب و استرس اعمال شده به رویان در حین سوراخ کردن مصنوعی می‌تواند با تأثیر بر بیان ژنهای دخیل در تکوین بلاستوسیست و پرتوانی توده سلولی داخلی برتوسعه و عملکرد جنین تأثیر گذار باشد؟ جهت پاسخ به این پرسش در این تحقیق کیفیت بلاستوسیستهای درون‌تنی و برون‌تنی موش را پس از سوراخ کردن مصنوعی از لحاظ مورفولوژیک با سنجش نرخ زنده‌مانی، بازگشت رویانها به شکل طبیعی و خروج از زونا و نیز از طریق روشهای مولکولی با بررسی میزان بیان ژن *Wnt3a*، ارزیابی گردید.

مواد و روشها

در این تحقیق از موشهای سوری، نژاد NMRI (موشهای ماده با سن ۸-۷ هفته و موشهای نر با سن ۱۲-۱۰ هفته) استفاده شد. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۳-۱۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و محدودیتی از نظر دسترسی به آب و غذا نداشتند.

تولید بلاستوسیست برون‌تنی:تحریک تخمک‌گذاری: جهت تحریک تخمک‌گذاری، در روز اول به میزان ۸ واحد بین‌المللی هورمون‌گنادوتروپین سرم مادیان آبستن (Folligon®, A007A02, Intervet) به صورت داخل صفاقی به موشهای ماده تزریق شد. پس از گذشت ۴۸-۴۶ ساعت، تزریق داخل صفاقی هورمون گنادوتروپین جفتی انسان (Pregnyl®, 111, Darou Pakhsh) جهت آزادسازی تخمکها، به میزان ۸ IU صورت پذیرفت.

استحصال تخمک: حداقل چهار ساعت قبل از استحصال، جهت جمع‌آوری و شست و شوی تخمکها محیط M2 به همراه سدیم پیرووات (P4562,Sigma) و آلبومین سرم گاوی (10106, GibcoBRL) در یک پتری دیش ۱۵×۶۰ میلی‌متری (150288, Nunc, Denmark) گذاشته و سطح آنها با روغن معدنی استریل (M-5310, Sigma) پوشانده شد و پتری دیش در انکوباتور (Memmert, Germany) با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۹۷ درصد و CO_2 به میزان ۵ درصد قرار گرفت. حدود ۱۶-۱۴ ساعت بعد از تزریق hCG، موش ماده نیز به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شد و پس از نمایان شدن حفرهٔ شکمی، اویداکتها با قیچی از رحم و تخمدانها جدا و به قطرهٔ M2 منتقل شدند. در زیر استرئومیکروسکوپ (smz1000, Nikon, Japan) ناحیهٔ آمپولای توسط یک سوزن پاره شد و توده‌های تخمک-کومولوس آزاد گشتند. این توده‌ها بعد از شستشو در قطره‌های M2، درون انکوباتور با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۹۷ درصد و CO_2 به میزان ۵ درصد نگهداری گردیدند.

استحصال اسپرم: جهت جداسازی و ظرفیت‌پذیری اسپرم، از محیط TCM 199 حاوی ۲/۲ گرم بر میلی لیتر سدیم

Archive of SID

www.SID.ir

بی‌کربنات، ۲۵ میلی‌مولار بافرهپیس (12340-030, GibcoBRL) به همراه ۱۰ درصد آلبومین سرم گاوی استفاده گردید. حدود ۱۵-۱۳ ساعت بعد از تزریق hCG به موش ماده، موش نر به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته و به پشت خوابانده شد و با ایجاد برش در پوست و لایه صفاقی، حفره شکمی نمایان گردید. اسپرمها از دم اپیدیدیم استخراج و به مدت یک ساعت در محیط ظرفیت‌پذیری اسپرم در درجه حرارت ۳۷ درجه، رطوبت ۹۷ درصد و CO_2 به میزان ۵ درصد قرار گرفتند.

لقاح آزمایشگاهی: برای انجام لقاح آزمایشگاهی از محیط HTF به همراه ۵/۳۳ میلی‌مولار سدیم پیرووات و ۳۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر آلبومین سرم گاوی و گلوتاتیون (071M1804V, Sigma) استفاده شد. در پتری دیش ۱۰×۳۵ میلی متری (153066, Nunc, Denmark) قطره-هایی با حجم تقریبی ۵۰ ماکرولیتر از محیط HTF گذاشته و سطح آنها با روغن معدنی استریل پوشانده شد و حداقل چهار ساعت قبل از شروع لقاح در انکوباتور قرار گرفت.

در هر قطرهٔ HTF، ده الی پانزده عدد COCs که از لحاظ ظاهری طبیعی بودند قرار داده شد و ۳-۴ ماکرولیتر اسپرم با غلظت یک میلیون در حجم یک میلی‌لیتر به هر قطره اضافه گردید و به مدت چهار ساعت درون انکوباتور با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۹۷ درصد و CO_2 به میزان ۵ درصد نگهداری گردیدند.

کشت رویان: جهت کشت رویان از محیط KSOM (J.D, 1993) حاوی سدیم پیرووات، ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی، ۵۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر جنتامایسین (Bio-West, L0011-010) و ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمی (E4127, Sigma) استفاده شد. چهار قطره با حجم تقریبی ۲۵۰ ماکرولیتر از محیط KSOM درون پتری دیش ۱۵×۶۰ میلی‌متری گذاشته و سطح آنها با روغن معدنی استریل پوشانده شد. همچنین ۴۰۰ ماکرولیتر از محیط KSOM در هر چاهک از پلیت چهار حفره‌ای (176740, Nunc,Denmark) ریخته و سطح آن با همین حجم از روغن معدنی استریل پوشانده گردید. تخمکهای لقاح یافته پس از شست‌وشو به دیش چهارخانه‌ی حاوی KSOM منتقل و به مدت ۷۲ ساعت درون انکوباتور با درجه حرارت ۳۷ درجه ورطوبت ۹۵ درصد و CO_2 به میزان ۵ درصد قرار گرفتند.

استحصال بلاستوسیست درون‌تنی: تزریق هورمونهای PMSG و hCG مشابه گروه قبل صورت گرفت. بلافاصله پس از تزریق هورمون hCG یک موش ماده با یک موش نر جهت جفت‌گیری در یک قفس قرار گرفتند، صبح روز بعد، پلاک واژنی بررسی شد و موشهای پلاک مثبت به عنوان روز نیم بارداری به مدت سه روز جهت استحصال بلاستوسیست نگهداری شدند. موشهای سه و نیم روزه به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند. لوله‌های رحمی موشها جدا و با تزریق محیط M2 به لوله‌های رحمی، بلاستوسیستها جمع‌آوری و در قطره‌های مختلف M2 و KSOM شست‌وشو داده شدند و به پلیت چهار خانه حاوی KSOM منتقل شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه، CO2 ۵ درصد و رطوبت ۹۷ درصد قرار گرفتند.

سوراخ کردن مصنوعی بلاستوسیست: برای سوراخ کردن بلاستوسیستهای درون‌تنی و برون‌تنی از میکروسکوپ معکوس (Nikon eclipe Ti-U, Japan) که مجهز به یک سیستم میکرومنیپولیتور (Narishige, 10291, Japan) و صفحه گرم‌کننده (Nikon TI-SR, Japan) می‌باشد، استفاده گردید. بلاستوسیستها درون قطره‌های M2 با حجم ۴ ماکرولیتر قرار گرفتند. سپس بلاستوسیستها در زیر میکروسکوپ و با استفاده از سوزنهای تزریق و نگهدارنده نصب شده بر روی دستگاه، به گونه‌ای مهار گردید که سلولهای ICM در راستای حرکت ورود و خروج سوزن به درون رویان نباشند. سوزن تزریق به آرامی از بین سلولهای تروفواکتودرم وارد رویان گردید (تا نزدیکی سوزن نگهدارنده). بعد از چند ثانیه سوزن به آرامی در

Archive of SID

www.SID.ir

حالی که رویان همچنان توسط فشار منفی سوزن نگهدارنده ثابت مانده است، بیرون کشیده شد. این مراحل برای تمامی بلاستوسیستها بر روی صفحه گرم در دمای ۳۷ درجه صورت پذیرفت. در این مطالعه تعداد ۱۳۶ بلاستوسیست درون‌تنی و ۱۲۴ بلاستوسیست برون‌تنی توسط سوزن دستگاه ریزدستکاری سوراخ گشتند و مایع بلاستوسل آنها خارج شد و سپس به محیط KSOM انتقال یافتند. حدود ۳ و ۱۲ ساعت بعد بلاستوسیستها از نظر کیفیت بررسی گشتند.

استخراج RNA تام از بلاستوسیت: برای استخراج RNA تام از بلاستوسیستها از کیت استخراج RNeasy Plus Micro Kit® (74034, Qiagen) استفاده شد و طبق پروتوکل نوشته شده در کیت، RNA استخراج گردید. میزان غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific, America) به روش جدول ۱). ژن *β2M* به عنوان ژن کنترل داخلی اسپکتروفتومتری سنجیده شد. نسبت جذب A۲۶۰/A۲۸۰ معیاری برای بررسی عدم وجود آلودگی پروتئین در نظر گرفته شد.

سنتز رشته اول DNA مکمل: برای سنتز cDNA از کیت (Bioneer) AccuPower RocketScript RT PreMix استفاده گردید. واکنش مطابق با دستورالعمل موجود در کیت با استفاده از پرایمرهای تصادفی تهیه شد و واکنش سنتز cDNA در دستگاه ترموسایکلر (Peqlab, Germany) در شرایط دمایی ۱۵ درجه سانتی گراد برای ۳ دقیقه، ۵۰ درجه برای ۶۰ دقیقه و ۹۵ درجه برای مدت ۵ دقیقه انجام گردید.

طراحی پرایمر: توالی پرایمرهای رفت و برگشت ژن *Wnt3*و *β2M* توسط برنامه Oligo5 طراحی شد و اختصاصی بودن آن توسط Primer-BLAST مورد ارزیابی قرار گرفت (Housekeeping) در نظر گرفته شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای رفت و برگشت ژنهای *Wnt3* و *β2M*

ژن	پرایمر	توالی '۳ به '۵	طول توالی (bp)	دمای اتصال (°C)	طول محصول (bp)
Wnt3	رفت	GCTCTGCCATGAACCGTC ACA	۲۱	۶۱/۸	۱۲۱
	برگشت	GACCACCAGCAGGTCTTC ACT	۲۱	۶۱/۸	
β2M	رفت	CCTGGTCTTTCTGGTGCTT GT	۲۱	۵۷	۱۱۸
	برگشت	GCAGTTCAGTATGTTCGGC TTC	۲۲	۵۷	

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کیفی: این واکنش در حجم نهایی ۱۵ ماکرولیتر با استفاده از کیت شرکت Ampliqon انجام شد. به منظور تهیه واکنش ۷/۵ ماکرولیتر از مخلوط اصلی ۲x (2x Master Mix)، ۴ پیکومول از هر آغازگر و ۱ ماکرولیتر cDNA با یکدیگر ترکیب شدند و حجم نهایی با آب تنظیم شد. واکنش PCR کیفی در دستگاه ترموسایکلر (Peqlab, Germany) در ۳۲ چرخه حرارتی شامل مرحله واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. همچنین مرحله واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه لحاظ گردید. در پایان محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند. ژل در ظرف حاوی اتیدیوم بروماید به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و پس از شستشو در آب، در دستگاه Transilluminator تحت اثر اشعه UV باندها مشاهده شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی: بیان دو ژن

Archive of SID

www.SID.ir

Wnt3a و *β2m* با استفاده از کیت (25344, Intron) حاوی رنگ SYBR Green I از طریق روش مقایسه‌ای CT واکنش real time- PCR در دستگاه ترموسیکلر (Applied Bio Systems StepOne, USA) ارزیابی گردید. تعداد ۴۰ سیکل تکثیر در دمای Annealing ۵۵ درجه سانتی گراد صورت پذیرفت. این واکنش برای هر یک از تیمارها با ۳ بار تکرار انجام شد.

طراحی آزمایش: بلاستوسیستها در دو گروه درون‌تنی و برون‌تنی مورد بررسی قرار گرفتند. در هر گروه رویانها به طور تصادفی به دو بخش تقسیم شدند. گروهی با استفاده از دستگاه ریزدستکاری به روش مکانیکی سوراخ شدند و مابقی بدون هیچ تیماری به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. نرخ زنده‌مانی، قابلیت خروج بلاستوسیستها از زونا و میزان بیان ژن *Wnt3a* در هر گروه ارزیابی گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: با استفاده از تست One-Way ANOVAو به دنبال آن تست Duncan، آنالیز داده‌های سلولی و مولکولی صورت پذیرفت و تفاوتها در P<۰/۰۵ معنی‌دار درنظر گرفته شدند. برای این منظور از نرم‌افزار آماری SPSS, ver. 16.0 استفاده گردید.

نتایج

بخش سلولی: براساس نتایج به دست آمده در جدول ۲ میزان زنده‌مانی بلاستوسیتهای درون‌تنی در گروه تیمار در مقایسه با کنترل، تفاوت معنی‌داری نداشت (۱/۸۴ ± ۹۸/۹۳ در مقابل ۱۰۰ درصد) اما میزان خروج از زونا افزایش معنی‌داری نشان داد (۱/۷۲ ± ۸۳/۴۶ در مقابل ۰/۰۱ ± ۷۰/۶ درصد). در مورد بلاستوسیست‌های برون‌تنی (جدول ۳)، با استفاده از تکنیک سوراخ کردن مصنوعی، در کنار میزان زنده‌مانی بالا (۰/۹۱± ۹۷٪)، افزایش معنی‌داری نیز در میزان خروج از زونا بدست آمد (۳/۵۳^{b} ± ۷۵/۸ در مقابل ۱۰/۴^{a}± ۶۳/۴).

جدول ۲- اثر سوراخ نمودن مصنوعی حفره بلاستوسل بر کیفیت بلاستوسیستهای درون‌تنی موش

گروه مورد آزمایش	تعداد بلاستوسیست	درصد زنده‌مانی	درصد خروج بلاستوسیست از زونا
کنترل	۱۹۸	٪۱۰۰ ^{a}	٪۷۰/۶ ± ۰/۰۱ ^{a}
AC	۱۳۶	۹۸/۹۳ ± ۱/۸۴ ^{a}	۸۳/۴۶ ± ۱/۷۲ ^{b}

داده‌ها از ترکیب نمونه‌های ۵ تکرار به دست آمدند. در هر ستون a و b نسبت به هم دارای تفاوت معناداری هستند (P < ۰/۰۵ در تست ANOVA و Duncan).

جدول ۳- اثر سوراخ نمودن مصنوعی حفره بلاستوسل بر کیفیت بلاستوسیستهای برون‌تنی موش

گروه‌های آزمایشی	تعداد بلاستوسیست	میزان زنده‌مانی (٪)	میزان خروج بلاستوسیست از زونا (٪)
کنترل	۱۷۹	٪۱۰۰^{a}	٪۶۳/۴ ± ۱۰/۴^{a}
AC	۱۲۴	۹۷ ±۰/۹۱ ^{a}	۷۵/۸ ± ۳/۵۳ ^{b}

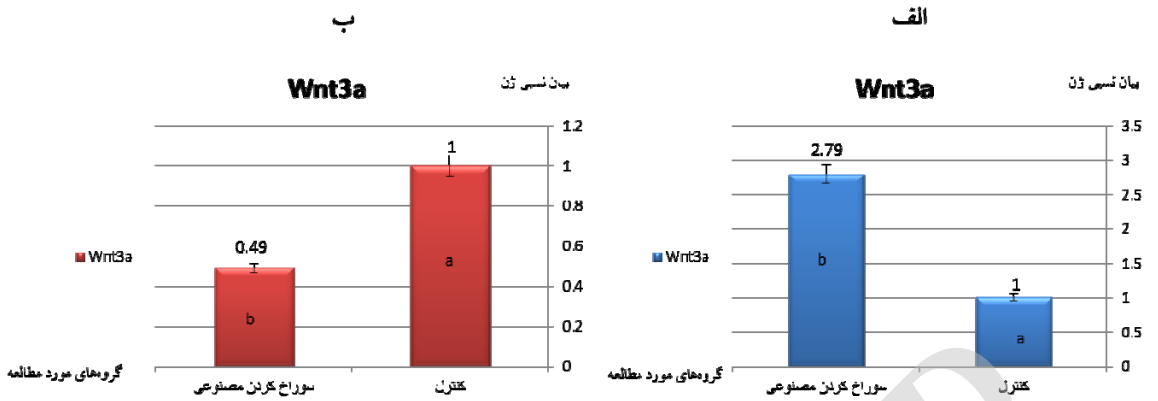
داده‌ها از ترکیب نمونه‌های ۵ تکرار به دست آمدند. در هر ستون a و b نسبت به هم دارای تفاوت معناداری هستند (P < ۰/۰۵ در تست ANOVA و Duncan).

بخش مولکولی: نتایج حاصل از نمودار ۱ نشان می‌دهد که میزان بیان ژن *Wnt3a* در بلاستوسیستهای درون تنی موش حاصل از فرآیند سوراخ کردن مصنوعی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار و در بلاستوسیستهای برون‌تنی موش کاهش معنی‌دار داشته است. همچنین نتایج حاصل نشان می‌دهد میزان بیان ژن *Wnt3a* در بلاستوسیستهای برون‌تنی موش حاصل از فرآیند سوراخ کردن مصنوعی نسبت به بلاستوسیستهای درون‌تنی موش، کاهش معنی‌دار

Archive of SID

www.SID.ir

پیدا کرده است.



نمودار ۱- اثر سوراخ کردن مصنوعی در الف: بلاستوسیستهای درون‌تنی موش بر میزان بیان ژن *Wnt3a* نسبت به گروه کنترل ب: بلاستوسیستهای برون‌تنی موش بر میزان بیان ژن *Wnt3a* نسبت به گروه کنترل

داده‌ها حاصل از ۳ تکرار real time- PCR می‌باشند. a و b نسبت به هم تفاوت معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵ در تست ANOVA و Duncan).

بحث

طبق نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر میزان زنده‌مانی بلاستوسیستهای سوراخ شده نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت (۱/۸۴ ± ۹۸/۹۳ در مقابل ۱۰۰ درصد برای بلاستوسیتهای درون‌تنی و۰/۹۱± ۹۷ در مقابل ۱۰۰ درصد برای بلاستوسیتهای برون‌تنی). بنابراین می‌توان به این نتیجه رسید که عمل مکانیکی سوراخ کردن مصنوعی بلاستوسیست به خودی خود نمی‌تواند اثر منفی قابل توجهی روی کیفیت و زنده‌مانی بلاستوسیستها بگذارد. بنابراین می‌توان از آن به عنوان یک روش مطمئن جهت کمک به خارج کردن جنین از زونا پلوسیدای ضخیم یاد کرد.

میزان تأثیرگذاری و بهبود نرخ خروج از زونا با کمک روش سوراخ کردن مصنوعی حفره بلاستوسیست، ارتباط مستقیمی با توانایی و مهارت کاربر در حین استفاده از این تکنیک نیز دارد. انتخاب سوزن مناسب و ظریف، موقعیت مناسب بلاستوسیست نسبت به سوزن نگهدارنده و تزریق و اعمال فشار کافی می‌تواند به عنوان نکات کلیدی بیان گردند. توجه به عدم برخورد سوزن به سلولهای توده داخلی رویان و عبور آن از بین سلولهای تروفواکتودرم نیز می‌تواند از تأثیر تهاجمی این روش بکاهد (۱۹). علاوه بر استفاده از ریز سوزن شیشه‌ای، روشهای دیگری همچون استفاده از سوزن با درجه ۲۹، پیپت شیشه‌ای (۸)، لیزر (۱۹) و غلظت بالای ساکارز (۱۱) نیز برای کاهش مایع حفره بلاستوسل مورد بررسی قرار گرفته است. در روش استفاده از غلظتهای بالای ساکارز، نه تنها حجم حفره بلاستوسل کاهش می‌یابد بلکه تک‌تک سلولهای رویان نیز در معرض کاهش آب درون سلولی قرار می‌گیرند که می‌تواند اثرات مخرب پنهانی در آینده تکوین رویان داشته باشد. بنابراین مطالعات بیشتری جهت بهینه کردن غلظت ساکارز مورد استفاده، مدت زمان تماس رویان با آن و همچنین اثرات این روش بر روی سلامت رویان مورد نیاز است (۲۷). استفاده از پیپتهای شیشه‌ای نیز با توجه به تفاوت در اندازه و قطر بلاستوسیستها و نیاز به تعویض مکرر پیپتهایی با قطر مختلف، تا حدودی زمان‌بر است و موجب تأخیر در روند کار می‌گردد (۵).

در سال ۲۰۰۶ Mukaida و همکارانش دو روش ریز سوزن شیشه‌ای و لیزر را برای کاهش مایع حفره بلاستوسل قبل از انجماد شیشه‌ای مورد مطالعه قرار دادند. مقایسه این دو

Archive of SID
www.SID.ir

روش، هیچ تفاوت معنا داری در میزان زنده‌مانی بلاستوسیستها پس از ذوب و نتایج کلینیکی حاصل از انتقال آنها نشان نداد (۱۹). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ توسط Yong و همکارانش انجام شد نیز سوراخ کردن مصنوعی حفره بلاستوسل به صورت مستقل به عنوان تکنیک کمکی خروج از زونا مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه از روش لیزر و سوزن با درجه ۲۹ استفاده شد. نتایج این محقق افزایش در میزان بارداری پس از استفاده از هر دو روش لیزر و سوزن را نسبت به گروه کنترل نشان داد (۱۰). لازم به ذکر است که استفاده از روش لیزر علی-رغم ایجاد سهولت و تسریع در روند کار، به علت گران بودن تجهیزات، زیاد رایج نمی‌باشد.

بنابراین در این میان روش ریز سوزن شیشه‌ای که در این مطالعه نیز مورد استفاده قرار گرفته است به نظر مطلوب و کارآمد می‌آید. استفاده از تکنیک سوراخ کردن مصنوعی می‌تواند نتایج کلینیکی را نیز بهبود بخشد. علاوه بر خروج مایع بلاستوسل توسط این تکنیک و تأثیر مثبت آن در کاهش کریستال یخ درون بلاستوسیست، Zech و همکارانش گزارش کردند که ارتباط مستقیمی بین شکاف در زونا قبل از انجماد با میزان خروج از زونا، لانه‌گزینی و حاملگی وجود دارد (۲۹). اگرچه توضیح این ارتباط کمی مشکل است، اما به نظر می‌رسد، افزایش در میزان ورود برخی مواد سرما محافظ، یکی از دلایل بهبود نتایج کلینیکی باشد. محلولهایی که برای انجماد رویان استفاده می‌شوند، شامل مواد سرما محافظ نفوذ پذیر و نفوذ ناپذیر است. مواد سرما محافظ نفوذ ناپذیر مانند ساکارز، موجب چگال‌تر شدن محیط اطراف بلاستوسیست و جلوگیری از تشکیل کریستال یخ در آن ناحیه می‌شوند. مواد سرما محافظ نفوذ پذیر نیز به راحتی از زونا عبور و از محیط داخل بلاستوسیست محافظت می‌کنند. در این میان به نظر می-رسد، در بلاستوسیستهایی با زونای دست نخورده، انتشار ساکارز به فضای دور زرده‌ای کافی نباشد. به این ترتیب سلولهای تروفواکتودرم، کاملاً توسط محیط چگال و حاوی مواد سرما محافظ احاطه نمی‌شوند و حالت ایده‌آل انجماد فراهم نمی‌گردد. بنابراین احتمالاً شکاف در زونا موجب تسریع در این انتشار و محافظت از سلولهای تروفواکتودرم می‌شود. همچنین از آنجایی که در مراحل انتهایی گسترش بلاستوسیست، بعضی از سلولهای تروفواکتودرم کاملاً به زونا نزدیک شده و با آن اتصال برقرار می‌کنند، هنگامی که در محلولهای انجمادی قرار می‌گیرند، آب گیری به صورت یکنواخت و کامل صورت نمی‌پذیرد. در نتیجه شکاف در زونا، از شکل‌گیری این اتصال جلوگیری می‌کند و موجب می‌شود آب گیری به صورت کامل انجام شود(۲۹).

فرضیه دیگری که در مورد اثر سوراخ کردن مصنوعی در بهبود نتایج کلینیکی وجود دارد، نقش پمپ NA^+/K^+ ATP ase در ایجاد حفره بلاستوسل است. از آنجایی که حدود ۶۰ درصد از کل ATP تولید شده در طول رشد بلاستوسیست را این پمپ ATP ase مورد استفاده قرار می‌دهد، بازگشت مجدد بلاستوسیست به حالت اول پس از ذوب، مستلزم مصرف بالای مجدد این مقدار انرژی می-باشد که می‌تواند توجیهی برای کندتر بودن روند برگشت و نیز کاهش در میزان خروج از زونا و لانه‌گزینی رویان به حساب آید. بنابراین ایجاد حفره در دیواره زونا قبل از انجماد، می‌تواند نوعی هچینگ کمکی به حساب آید و ضمن تسریع در بازگشت مجدد رویان به حالت اول، با حفظ انرژی بیشتر، شرایط را برای لانه‌گزینی بهبود بخشد (۱۱). افزایش درصد خروج از زونا در گروه سوراخ کردن مصنوعی نسبت به گروه کنترل (۱/۷۲ ± ۸۳/۴۶ در مقابل ۰/۰۱ ± ۷۰/۶ درصد برای بلاستوسیتهای درون‌تنی و $۷۵/۸ \pm ۳/۵۳^b$ در مقابل $۶۳/۴ \pm ۱۰/۴^a$ برای بلاستوسیتهای برون‌تنی) را می‌توان ناشی از تحریک ترشح آنزیم لایزین در اثر سوراخ کردن مصنوعی بلاستوسیست دانست. در حالت طبیعی هنگام رسیدن بلاستوسیست به رحم، بلاستوسیست می‌بایست از زونا خارج شود تا بتواند به دیواره رحم بچسبد. افزایش حجم مایع بلاستوسل و ترشح نوعی پروتئاز شبه تریپسینی به نام لایزین توسط سلولهای

Archive of SID

www.SID.ir

TE، سبب خروج بلاستوسیست از زونا می‌گردد. حال زمانی‌که عمل سوراخ کردن به صورت مصنوعی توسط سوزن انجام می‌شود، سوزن پس از سوراخ کردن زونا وارد اتصالات سلولهای تروفواکتودرمی می‌شود و فرآیند ترشح آنزیم لایزین را تحریک می‌کند، همین امر می‌تواند کمکی باشد برای جنین که یا از محل سوراخ شده به صورت اتفاقی و یا از محلی که در حالت طبیعی باید از زونا خارج می‌شده این عمل صورت گیرد (۱۰). بر اساس نتایج گزارش شده، نرخ زنده‌مانی بلاستوسیستهای برون‌تنی موش حاصل از فرآیند سوراخ کردن مصنوعی نسبت بلاستوسیستهای درون‌تنی موش حاصل از فرآیند سوراخ کردن مصنوعی کاهش غیر معنی‌دار داشته است. که این کاهش جزئی می‌تواند ناشی از اعمال فشار ریز سوزنها بر زوناپلوسیدا هنگام سوراخ کردن باشد. همچنین میزان خروج از زونای بلاستوسیستهای برون‌تنی موش حاصل از فرآیند سوراخ کردن مصنوعی نسبت به بلاستوسیستهای درون‌تنی موش کاهش معنی‌دار پیدا کرده است که این کاهش می‌تواند به علت شرایط کشت در محیط آزمایشگاه و استرسهای ناشی از آن بر روی جنین باشد. لقاح و کشت در آزمایشگاه با تغییر در الاستیسیته زونا باعث افزایش مقاومت آن و کاهش توانایی خروج بلاستوسیست از زونا می‌شود. خروج بلاستوسیست از زونا در آزمایشگاه نیازمند مشارکت فعال تروفواکتودرم است. با گسترش بلاستوسیست در محیط آزمایشگاهی زونا نازک می‌شود و این به علت فشار ناشی از گسترش بلاستوسیست و لیز شدن زونا توسط لیزین تروفواکتودرمال می‌باشد.

فرآیند خروج بلاستوسیست از زونا در محیط آزمایشگاهی با ایجاد سوراخهای متعدد درغشاء زونا انجام می شود. این فرآیند متفاوت با خروج بلاستوسیست از زونا در رحم که زونا کاملاً حل می‌شود، می‌باشد. خروج بلاستوسیست از زونا در شرایط آزمایشگاهی به علت غیاب آنزیم پرومئاناز لیزین رحمی رخ می‌دهد (۵ و ۲۶).

بحث مولکولی: استرسهای ایجاد شده توسط تکنیکهای کمک باروری، از جمله انجماد، لقاح آزمایشگاهی و سوراخ کردن مصنوعی می‌توانند اثرات نامطلوبی در سطح مورفولوژی، متابولیسم، فراساختار و سطح ژنومی سلولها داشته باشد و با ایجاد تغییر در الگوی بیان ژن باعث اختلال در رشد و نمو، ایجاد ناهنجاری، کاهش قابلیت لانه‌گزینی و در نهایت مرگ رویان شود. ارزیابی کیفیت رویانها از نظر مولکولی علاوه بر بررسی سلولی، می‌تواند به درک بهتر اثرات این تکنیکها کمک نماید. تنها مطالعه‌ای که تأثیر سوراخ کردن مصنوعی حفره بلاستوسل را بر روی بیان ژنهای بلاستوسیست ارزیابی کرده است، در سال ۲۰۱۴ انجام گرفت. در این مطالعه، Min و همکارانش، بیان ژنهای مرتبط با آپوپتوز *Bax* و *Bcl-XL* را در دو گروه بلاستوسیستهای منجمد- ذوب شده و بلاستوسیستهایی که قبل از انجماد توسط سوزن درجه ۲۹ سوراخ شده بودند بررسی کردند. نتیجه حاکی از تأثیر مثبت تکنیک سوراخ کردن مصنوعی در کاهش روند آپوپتوز بود. به این صورت که میزان بیان ژن *Bax* که به نوعی پیش برنده آپوپتوز است، در این گروه نسبت به گروه انجماد کاهش و در مقابل میزان بیان ژن *Bcl-XL* که از آپوپتوز جلوگیری می‌کند افزایش یافته بود (۱۸). از آنجایی که تا کنون مطالعه‌ای در مورد اثر این تکنیک بر روی عوامل مولکولی دخیل در تکوین صورت نپذیرفته است، فرایند سوراخ کردن مصنوعی نیز می‌تواند، با تأثیر بر بیان ژنهای دخیل در تکوین بلاستوسیست و پرتوانی توده سلولی داخلی بر توسعه و عملکرد جنین تأثیرگذار باشد. از میان این ژنها می‌توان به ژنهای خانواده *Wnt* اشاره کرد که از مراحل اولیه رشد جنینی بیان می‌شود و به ICM و سپس به اپی‌بلاست و بعد از گاسترولاسیون به رده سلولی زاینده محدود می‌گردد و نقش عمده‌ای در رشد و تکامل جنین ایفاء می‌نمایند.

بنابراین، نقص در بیان آنها منجر به تولید بلاستوسیستهایی خواهد شد که ICM آنها قدرت تمایز به سایر سلولها را

Archive of SID

www.SID.ir

ندارد و حتی در صورت لانه‌گزینی نیز در مراحل اولیه تکامل جنینی و از بین می‌روند (۱۶). تا کنون گزارشی مبنی بر بررسی مولکولی تأثیر سوراخ کردن مصنوعی بر میزان بیان ژن *Wnt3a* در بلاستوسیست مشاهده نشده و فقط در زمینه سلولی بررسی شده است.

مایع درون حفره بلاستوسل، با وجود اثرات آن در ایجاد کریستال یخ حین انجماد، برای سلولهای توده داخلی نقش تغذیه‌ای دارد و به حرکت و موضع‌گیری صحیح بلاستومرها و در نتیجه رده‌زایی رویان کمک می‌نماید. ایجاد سوراخ به صورت مصنوعی در بلاستوسیست، موجب کاهش مایع موجود در حفره بلاستوسل می‌شود و به انجماد بهتر رویان یاری می‌رساند. اما در مقابل، شوک مکانیکی حاصل از سوراخ کردن بلاستوسیست توسط ریز سوزن و همچنین نقش مهم مایع بلاستوسل در تکوین رویان قرار دارد. سوالی که در اینجا مطرح می‌شود این است که گرفتن آب حفره بلاستوسل در بین روزهای ۴/۵- ۳/۵ چه تأثیری بر میزان بیان ژن *Wnt3a* می‌گذارد؟ در این آزمایش پس از بررسی بیان ژن *Wnt3a*، مشاهده شد که بیان این ژن در بلاستوسیستهای درون‌تنی حاصل از فرآیند سوراخ کردن مصنوعی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار داشت. علت این افزایش ممکن است پاسخ به از بین رفتن بلاستومرهای آسیب دیده در AC برای ثابت نگه داشتن سطح بیان این ژن باشد که برای اطلاعات بیشتر نیازمند تحقیقات بیشتری در این زمینه می‌باشد. میزان بیان ژن *Wnt3a* در بلاستوسیستهای برون‌تنی موش حاصل از فرآیند سوراخ کردن مصنوعی نسبت به بلاستوسیستهای درون‌تنی موش، کاهش معنی‌دار پیدا کرده است. مطالعات نشان می‌دهند که تفاوت در ظاهر و کیفیت رویانهای درون‌تنی نسبت به برون‌تنی می‌تواند به واسطه بروز مجموعه تغییرات پایه‌ای در طول مدت کشت رویان در شرایط آزمایشگاهی باشد. تغییراتی مانند افزایش در تعداد سلولها، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و یا زمان قرارگیری بلاستومرها در لایه‌های اختصاصی رویان که می‌توانند به واسطه تغییر در نوع اتصالات بین بلاستومرها و تفاوت در الگوی بیان ژنها رخ دهند. تا کنون مطالعات متعددی نشان داده‌اند که سطح بیان بسیاری از ژنها، در رویانهای رشد یافته در محیط کشت با رویانهای به دست آمده از محیط داخل بدن متفاوت است (۷).

تفاوت اثر کاهش مایع بلاستوسل بر رویانهای برون‌تنی می‌تواند ناشی از تأخیر در شکل‌گیری لایه‌های جنینی باشد، در نتیجه کشیدن مایع در این مرحله، تأثیر بیشتری بر بیان ژن *Wnt3a* گذاشته است. از آنجایی که هیچ نتیجه‌ای مبنی بر تأثیر منفی استفاده از این تکنیک نیز وجود ندارد و با توجه به مزایای ذکر شده در مورد میزان خروج از زونا و نتایج بالینی، کاهش مایع بلاستوسل قبل از انجماد شیشه‌ای می‌تواند مفید واقع شود. هرچند بهتر است اثر آن در مورد سایر ژنهای دخیل در تکوین نیز مورد مطالعه قرار بگیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب طرح پژوهشی به شناسه‌ی ۴۴۴ و با حمایت مالی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست-فناوری صورت پذیرفته است. نگارندگان، مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری صمیمانه‌ی آقایان دکتر مرتضی دلیری، دکتر هادی حجاریان، احسان هاشمی و دکتر آیدین رحیم‌طایفه اعلام می‌نماید.

منابع

1. Aktan, E., et al., *The effect of zona thinning size on implantation and pregnancy rates of ICSI-ET patients with advanced woman age.* 2007.
2. Balaban, B., et al., *Laser-assisted hatching increases pregnancy and implantation rates in cryopreserved embryos that were allowed to cleave in vitro after thawing: a prospective randomized study.* Human Reproduction, 2006. **21**(8): p. 2136-2140.
3. Bansal, P. and S. Gupta, *Binding characteristics*

Archive of SID
www.SID.ir

of sperm with recombinant human zona pellucida glycoprotein-3 coated beads. Indian Journal of Medical Research, 2009. **130**(1): p. 37-43.

4. Cruz, J.R., et al., *Is blastocyst transfer useful as an alternative treatment for patients with multiple in vitro fertilization failures?* Fertility and sterility, 1999. **72**(2): p. 218-220.
5. Desai, N., et al., *Artificial collapse of blastocysts before vitrification: mechanical vs. laser technique and effect on survival, cell number, and cell death in early and expanded blastocysts.* Cell Preservation Technology, 2008. **6**(3): p. 181-190.
6. Ebner, T., M. Moser, and G. Tews, *Possible applications of a non-contact 1.48 µm wavelength diode laser in assisted reproduction technologies.* Human Reproduction Update, 2005. **11**(4): p. 425-435.
7. Gao, Y., et al., *Epigenetic regulation of gene expression in porcine epiblast, hypoblast, trophectoderm and epiblast-derived neural progenitor cells.* Epigenetics, 2011. **6**(9): p. 1149-1161.
8. Hiraoka, K., et al., *Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts.* Human Reproduction, 2004. **19**(12): p. 2884-2888.
9. Hiraoka, K., et al., *Impact of the size of zona pellucida thinning area on vitrified-warmed cleavage-stage embryo transfers: a prospective, randomized study.* Journal of assisted reproduction and genetics, 2009. **26**(9-10): p. 515-521.
10. Hur, Y.S., et al., *Effect of artificial shrinkage on clinical outcome in fresh blastocyst transfer cycles.* Clinical and experimental reproductive medicine, 2011. **38**(2): p. 87-92.
11. Iwayama, H., S. Hochi, and M. Yamashita, *In vitro and in vivo viability of human blastocysts collapsed by laser pulse or osmotic shock prior to vitrification.* Journal of assisted reproduction and genetics, 2011. **28**(4): p. 355-361.
12. Kono, T., O. Suzuki, and Y. Tsunoda, *Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification.* Cryobiology, 1988. **25**(2): p. 170-173.
13. Levitas, E., et al., *Blastocyst-stage embryo transfer in patients who failed to conceive in three or more day 2–3 embryo transfer cycles: a prospective, randomized study.* Fertility and sterility, 2004. **81**(3): p. 567-571.
14. Liebermann, J., et al., *Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now?* Reproductive BioMedicine Online, 2003. **7**(6): p. 623-633.
15. Liebermann, J. and M.J. Tucker, *Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application.* Fertility and sterility, 2006. **86**(1): p. 20-26.
16. Marois, E., A. Mahmoud, and S. Eaton, *The endocytic pathway and formation of the Wingless morphogen gradient.* Development, 2006. **133**(2): p. 307-317.
17. Martins, W.P., et al., *Assisted hatching of human embryos: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.* Human Reproduction Update, 2011. **17**(4): p. 438-453.
18. Min, S.H., et al., *Forced Collapse of the Blastocoel Cavity Improves Developmental Potential in Cryopreserved Bovine Blastocysts by Slow-Rate Freezing and Vitrification.* Reproduction in Domestic Animals, 2014. **49**(4): p. 684-692.
19. Mukaida, T., et al., *Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts.* Human Reproduction, 2006. **21**(12): p. 3246-3252.
20. Mukaida, T., K. Takahashi, and M. Kasai, *Blastocyst cryopreservation: ultrarapid vitrification using cryoloop technique.* Reproductive BioMedicine Online, 2003. **6**(2): p. 221-225.
21. Petersen, C.G., et al., *Implantation failures: success of assisted hatching with quarter-laser zona thinning.* Reproductive BioMedicine Online, 2005. **10**(2): p. 224-229.
22. Sagoskin, A.W., et al., *Laser assisted hatching in good prognosis patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer: a randomized controlled trial.* Fertility and sterility, 2007. **87**(2): p. 283-287.
23. Santos Filho, E., J. Noble, and D. Wells, *A review on automatic analysis of human embryo microscope images.* The open biomedical engineering journal, 2010. **4**: p. 170.
24. Shapiro, B.S., et al., *Dramatic declines in implantation and pregnancy rates in patients who undergo repeated cycles of in vitro fertilization with blastocyst transfer after one or more failed attempts.* Fertility and sterility, 2001.

Archive of SID

www.SID.ir

76(3): p. 538-542.

25. Sifer, C., et al., *A prospective randomized study to assess the benefit of partial zona pellucida digestion before frozen-thawed embryo transfers.* Human Reproduction, 2006. **21**(9): p. 2384-2389.
26. Sommerfeld, V. and H. Niemann, *Cryopreservation of Bovine< i> in Vitro</i> Produced Embryos Using Ethylene Glycol in Controlled Freezing or Vitrification.* Cryobiology, 1999. **38**(2): p. 95-105.
27. Soom, A.V., et al., *Cell allocation to the inner cell mass and the trophectoderm in bovine embryos cultured in two different media.* Molecular reproduction and development, 1996. **45**(2): p. 171-182.
28. Vanderzwalmen, P., et al., *Aseptic vitrification of blastocysts from infertile patients, egg donors and after IVM.* Reproductive BioMedicine Online, 2009. **19**(5): p. 700-707.
29. Zech, N., et al., *Vitrification of hatching and hatched human blastocysts: effect of an opening in the zona pellucida before vitrification.* Reproductive BioMedicine Online, 2005. **11**(3): p. 355-361.
30. Zhu, S., et al., *Cryopreservation of zona-hatched mouse blastocysts.* Journal of reproduction and fertility, 1996. **107**(1): p. 37-42.

Effect of artificial collapse of *mouse* blastocyst on viability and *Wnt3a* gene expression

Gharib S.[1], Dashtizad M.[2], Farokhi F.[1] and Shamsara M.[2]

[1] Biology Dept., Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

[2] Animal Biotechnology Dept., National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

Abstract

In recent years, using the assisted hatching techniques such as puncture of blastocyst, are used in *in-vitro* fertilization (IVF) for increase the rate of implantation. This study was designed in order to evaluate of AC effect in survival and hatching rate of mouse blastocysts by expression of *Wnt3a* gene. *In vivo* and *In vitr*o blastocysts are obtained. Some of them in *in-vivo* and *In vitr*o groups were collapsed with a micro-needle and non-collapsed blastocysts in each group were used as a control. Evaluated survival and hatching rate and quantitative expression of *Wnt3a* gene in both groups was investigated by using Real time PCR. Our results revealed that AC of blastocyst in *in-vivo* and *In vitro* blastocysts did not improve survival rate although hatching rate had a significant difference in the collapsed blastocysts compared to non-collapsed blastocysts in both groups. The results real time PCR quantitative analysis showed that expression level of *Wnt3a* gene has increased in *in-viv*o blastocysts and it has decreased in *in-vitro* blastocysts comparing to control group in both treatment. AC could be effective way to improve the assisted hatching techniques.

Key words*:* Assisted hatching- Artificial collapse- Blastocyst- *Wnt3a* gene.

Archive of SID

www.SID.ir