اثرات انجماد شیشه‌ای بر بیان اینتگرین‌های αv و β3 در جنین موش سوری در مرحله لانه‌گزینی

هانا پسندیده[۱]، دکتر مریم سلیمان‌نژاد[۲]، دکتر شهرام دارابی[۳]، مریم زمانی[۴]، دکتر سید امیر حسینی[۲*]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریح، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.
۲. استادیار گروه علوم تشریح، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پیشگیری از بیماری‌های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.
۳. دانشیار گروه علوم تشریح، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پیشگیری از بیماری‌های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.
۴. دانشجوی کارشناسی علوم تشریح، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۰۵ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۵/۰۳

خلاصه

مقدمه: انجماد شیشه‌ای، یکی از مباحث مهم در زمینه تکنیک‌های کمک باروری (ART) به‌شمار می‌رود. اینتگرین‌ها، عواملی مهم در زمینه لانه‌گزینی هستند. با توجه به اهمیت انجماد جنین، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات انجماد شیشه‌ای بر میزان بیان اینتگرین‌های vα و β3 در فرآیند لانه‌گزینی موش سوری انجام شد.

روش‌کار: در این مطالعه برای دست‌یابی به ۵۰ عدد بلاستوسیست از شاخ رحم موش‌های ماده ۸-۶ هفته، موش‌ها بعد از تحریک تخمک‌هایشان، یک شب در کنار موش نر ۱۲-۸ هفته از همان نژاد قرار گرفتند. صبح روز بعد، پلاک واژن مثبت‌ها جدا شدند. ۹۸ ساعت بعد از تزریق HCG، جنین‌های به‌دست آمده به کمک روش flushing، به دو گروه انجمادی (۳۰) و کنترل (۲۰) تقسیم شدند. بلاستوسیست‌های انجمادی پس از دو مرحله آبگیری و انجماد به‌وسیله کرایوتاپ، تحت تأثیر محلول انجمادی فریز شدند. پس از مراحل ذوب و رقیق‌سازی، میزان بیان ژن اینتگرین‌های αv و β3 با روش RT-PCR تعیین شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۴) و آزمون تی جفتی انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که میزان بیان ژن اینتگرین‌های αv و β3 پس از انجماد و ذوب در مقایسه با ژن رفرنس ACTB با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری داشت ($p<0/01$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که انجماد شیشه‌ای به‌وسیله کرایوتاپ با کاهش میزان بیان اینتگرین‌های αv و β3، باعث آسیب به لانه‌گزینی جنین می‌شود.

کلمات کلیدی: انجماد شیشه‌ای، اینتگرین، بلاستوسیست، روش‌های کمک ناباروری، لانه‌گزینی

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر سید امیر حسینی؛ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پیشگیری از بیماری‌های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران. **تلفن:** ۰۲۸-۳۳۳۳۶۰۰۱؛ **پست الکترونیک:** amirhosseininew1358@gmail.com

مقدمه

تغییرات سبک زندگی (افزایش سن ازدواج و افزایش مشکلات ناباروری) و افزایش بیماری‌هایی که منجر به تغییر در هورمون‌ها و غدد درون‌ریز می‌شوند، باعث افزایش چشم‌گیر در میزان ناباروری زوجین شده است. با توجه به نیاز جوامع، بهبود تکنیک‌های انجماد، چشم‌انداز درمانی دوباره‌ای را در درمان ناباروری‌ها و فناوری‌های کمک باروری (ART)[1] شکل داده است. امروزه ناباروری دغدغه ۱۵-۱۰٪ مردم دنیا می‌باشد. افزایش تمایل افراد و همچنین دلایل اجتماعی در زنانی که مایل به بهبود شانس باروری خود در سنین بالاتر هستند و یا به دلایل پزشکی مانند حفظ تخمک یا جنین پیش از درمان‌های ضدسرطان سایتوتوکسیک، لزوم تحقیقات در تکنیک‌های ART را افزایش می‌دهد. طبق اعلام سازمان جهانی بهداشت، تعداد زوجین نابارور دنیا بالغ بر ۵۱۰ میلیون زوج می‌باشد. از زمان تولد اولین نوزاد (لوییس براون) توسط روش کمک باروری در سال ۱۹۷۸ میلادی، در روش‌های نوین باروری افق جدیدی برای درمان نازایی با علت زنانه به روی محققین گشوده شده است. همچنین میزان آگاهی مردم از درمان‌های نوین ناباروری افزایش یافت (۱). محققین به‌دنبال یافت روش‌هایی برای افزایش میزان موفقیت روش‌های ART می‌باشند (۲، ۳). انجماد جنین، یک روش متعارف و کارآمد می‌باشد که تا به امروز در حال توسعه است. ماحصل تمامی تلاش‌ها و مطالعاتی که در زمینه تولیدمثل صورت می‌گیرد، توسعه روش‌های تشخیصی و درمانی جدیدی است که می‌تواند در جهت حل مشکل ازدواج‌های ناموفق گام برداشته و امید فرزنددار شدن را به تمامی زوجین نابارور نوید دهد (۴). نتایج مطالعات نشان می‌دهد، بکارگیری روش‌های انجماد، علی‌رغم نقش غیرقابل انکار آن در درمان افراد نابارور، به‌دلیل استفاده از غلظت‌های مختلف ضدیخ و تغییرات شدید برودتی و حرارتی، می‌تواند تأثیرات نامطلوبی بر فراساختمان سلول داشته باشند. در این مطالعه سعی شد به این سؤال اساسی پاسخ داده شود که چه مکانیسم‌های مولکولی با تأثیر بر کیفیت جنین‌ها بعد از فریز کردن، باعث پایین آمدن کیفیت جنین‌ها می‌شود. پاسخ به این سؤال می‌تواند در آینده به بهبود روش‌های انجماد جنین در درمان ناباروری کمک نماید. امروزه جهت انجماد جنین از روش انجماد شیشه‌ای[2] استفاده می‌شود که اولین بار در سال ۱۹۳۷ توسط لایت مطرح شد (۵). انجماد شیشه‌ای، پروسه فیزیکی است که طی آن محلول غلیظ ضدیخ پس از قرار گرفتن در برودت زیاد، بدون تشکیل کریستال یخ به یک‌باره تبدیل به حالت جامد می‌شود. این حالت به‌عنوان "شیشه‌ای شدن" شناخته می‌شود (۶). در این وضعیت، مولکول‌ها و یون‌ها مشابه حالت مایع، پراکندگی طبیعی خود را حفظ می‌کنند (۷). مولکول‌های اینتگرین، پروتئین‌های سطح سلولی هستند که در اتصال سلول به سلول و سلول به ماتریکس خارج سلولی نقش دارند که در فرآیند لانه‌گزینی جنین نقش اساسی را ایفا می‌کنند. اینتگرین‌ها به‌صورت هترودیمرهایی از زیرواحدهای آلفا و بتا هستند که توسط پیوند غیرکووالانسی به هم متصل می‌شوند و در سطح سلول‌ها بیان می‌شوند (۸، ۹). لقاح، لانه‌گزینی و تشکیل جفت، فرآیندهای پویایی هستند که سبب برقراری ارتباط سلول با سلول، مهاجرت، تهاجم، کنترل فعالیت سلولی و تأثیر بر سازمان‌دهی سیتواسکلتون می‌شوند. با توجه به اینکه اتصال اولیه جنین با آندومتر رحم با واسطه انجام واکنش متقابل بین مولکول‌های اینتگرین روی آندومتر و لیگاندهایی روی جنین صورت می‌گیرد، بنابراین هر عاملی که بر روی ساختار و یا توزیع اینتگرین‌ها تأثیر گذارد، می‌تواند در فرآیند لانه‌گزینی نیز مؤثر باشد. بنابراین بررسی اثر انجماد شیشه‌ای و محیط کشت روی بیان اینتگرین در مرحله بلاستوسیست، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که اینتگرین‌های $v\alpha$ و $\beta 3$ نقش اساسی در لانه‌گزینی ایفا می‌کنند، زیرا در طول پنجره لانه‌گزینی بیان می‌شوند. همچنین بیان این دو اینتگرین در افراد نابارور کاهش می‌یابد (۱۰). لانه‌گزینی یک فرآیند پیچیده است که با چسبندگی بلاستوسیت به پوشش سطح آندومتر و

[1] assistance reproductive technology

[2] vitrification

تهاجم بلاستوسیت به آندومتر مشخص می‌شود. چسبندگی و تهاجم شامل فعل و انفعالات سلول به سلول و سلول به ماتریکس است و تصور می‌شود که به گیرنده‌های چسبنده مانند اینتگرین αv و $\beta 3$ نیاز دارد. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات انجماد شیشه‌ای بر میزان بیان اینتگرین‌های αv و $\beta 3$ انجام شد.

روش‌کار

نمونه‌های مورد مطالعه: ابتدا موش‌های سوری ماده از نژاد Swiss Albino با سن ۸-۶ هفته و موش‌های سوری نر از همان نژاد با سن ۱۲-۸ هفته از پژوهشگاه رویان تهیه و به مرکز پرورش و نگه‌داری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انتقال یافتند. پس از ورود به حیوان‌خانه به‌مدت یک هفته در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی، به‌منظور تطابق با شرایط محیطی جدید، در قفس نگهداری موش، به‌صورت گروهی نگهداری شدند و امکان دسترسی به آب و غذای کافی فراهم گردید.

تخمک‌گذاری: به‌منظور تحریک تخمک‌گذاری، مقدار ۹-۷ واحد بین‌المللی بسته به اندازه موش هورمون Pregnant Mar Gonadotropine,) PMSG Folligon, Invert, Holand e) و ۴۸ ساعت بعد ۹-۷ واحد human Chorionic) hCG Gonadotropine, Oregone, Holland) به طریق داخل صفاقی تزریق شد (۱۱). بلافاصله بعد از تزریق HCG، موش‌های ماده به‌صورت تک یا دوتایی داخل قفس موش‌های نر از همان نژاد قرار گرفتند تا جفت‌گیری صورت گیرد. برای اطمینان از وقوع حاملگی، موش‌های ماده‌ای که به‌مدت یک شب در قفس موش‌های نر قرار گرفتند، صبح روز بعد معاینه واژینال شدند. موش‌هایی که دارای پلاک واژن بودند، حامله تلقی شده و تا حدود ۹۸ ساعت پس از تزریق HCG یعنی هنگامی که تخم لقاح یافته به مرحله بلاستوسیست رسیده و در ناحیه شاخ رحمی قرار می‌گیرد، در قفس دیگر نگهداری شدند.

تهیه نمونه: برای دستیابی به شاخ رحم، موش‌های ماده‌ای که پلاک واژن آنها تأیید شده بود، پس از گذشت زمان مورد نظر (۹۸ ساعت) با روش جابجایی مهره‌های گردنی[1] کشته شدند و در شرایط استریل، پوست، عضلات شکم و صفاق آنها باز شد و با کنار زدن روده‌ها، رحم در معرض دید قرار گرفت. شاخ رحم، بلافاصله به قطره حاوی محیط کشت گرم شده و CO_2دار منتقل شد و حتی‌المقدور، بلافاصله جنین‌ها از شاخ رحم به بیرون هدایت شد. برای خارج کردن جنین‌ها از لوله رحم، از روش flushing استفاده شد.

تمامی مراحل کار با حیوانات، طبق دستورالعمل کمیته اخلاق و ایمنی انجام شد. کد اخلاق در کار با حیوانات آزمایشگاهی این پژوهش با شناسه IR.QUMS.AEC.1401.002 مصوب گردید و در سامانه ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی قابل مشاهده است.

انجماد شیشه‌ای و ذوب جنین‌ها: تمام مراحل انجماد - ذوب در دمای اتاق (۲۴-۲۲ درجه سانتی‌گراد) انجام شد.

جنین‌ها طی دو مرحله تحت تأثیر محلول انجمادی قرار گرفتند:

الف- مرحله اول (مرحله آب‌گیری یا تعادل): به‌وسیله پیپت‌های مناسب، ۲ تا ۳ جنین داخل محیط تعادل با فرمول زیر قرار داده شد.

M) ۱,۳ v/v +٪۷,۵ (DMSO)M۱,۰۶v/v, (٪۷,۵ EG

این مرحله در دمای اتاق انجام شد و زمان مورد نیاز ۱۵-۵ دقیقه بود.

ب- مرحله دوم (مرحله انجماد): جنین‌هایی که مرحله آب‌گیری را سپری کردند، وارد محلول انجماد شیشه‌ای با فرمول زیر شدند:

15% (v/v, 2.1M) DMSO + 15% (v/v, 2.6M) EG + 5.8 mg/ml Ficoll400 + 0.58 M Sucrose

جنین‌ها با حداقل حجم به محیط انجماد منتقل شدند (کمتر از ۱ دقیقه)؛ این مرحله هم در دمای اتاق انجام شد. بعد از انتقال به محلول انجمادی، جنین‌ها ظرف

[1] cervical dislocation

کمتر از ۶۰-۳۰ ثانیه وارد نیتروژن مایع شدند. جنین‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در نیتروژن مایع نگهداری شدند (۱۲). انکوبه شدن طولانی قبل از انجماد، احتمالاً روی توانایی جنین اثرگذار است.

- مرحله ذوب: در این مرحله جنین‌ها به‌مدت ۱۰ ثانیه در معرض هوا نگه داشته شدند. سپس وارد محیط گرم شدند، بعد از آن وارد محیط‌های به‌ترتیب، رقیق شدن ۱ و رقیق شدن ۲ شدند. بعد از آن ۲ مرحله شستشو انجام شد تا سلول کاملاً دوباره گسترش یافته گردد. در هر محیط ۳ دقیقه قرار داده شدند. بعد از انجام مراحل انجماد و ذوب، میزان بیان جنین‌های به‌دست آمده با روش RT-PCR تعیین شد.

در این مطالعه ۲۰ عدد از بلاستوسیست‌ها به‌صورت تصادفی به‌عنوان گروه کنترل به‌مدت ۲ ساعت در محیط کشت ۱۶ میلی‌مول در داخل انکوباتور قرار گرفتند و سپس جهت بررسی به آزمایشگاه فرستاده شدند.

تمامی مواد استفاده شده در این تحقیق، اعم از محیط-های flush، تعادل، انجماد و warming از طریق شرکت آریا رویان طب (A.R.T) تهیه شده است. محیط‌های کشت متعلق به کمپانی (origio) Cooper Surgical می‌باشد.

شناسایی اینتگرین‌ها: از ۵۰ بلاستوسیت به‌دست آمده، ۳۰ عدد به‌عنوان گروه انجمادی و ۲۰ بلاستوسیت، گروه کنترل را دربرگرفتند. جنین‌ها به‌طور تصادفی انتخاب شدند. با روش‌های ایمونوهیستوشیمی و بر اساس دستورالعمل کارخانه سازنده، بیان اینتگرین‌های αv و β3 در گروه‌های مورد مطالعه مشخص گردید.

تعیین میزان بیان اینتگرین‌ها با روش RT-PCR: از سلول‌های تهیه شده در مراحل قبل، RNA استخراج شده و cDNA تهیه شد. سپس برای اطمینان از پروسه استخراج، از تمام نمونه‌ها بررسی وجود ژن بتا اکتین با استفاده از Real time PCR انجام شد. سپس نمونه با استفاده از ۱۰ میکرولیتر SYBR Green qPCR mastermix و پرایمرهای مربوطه و یک ژن خانه‌دار (در این مطالعه از ژن بتا اکتین ACTB به‌عنوان ژن رفرنس استفاده شد) تکثیر و در پایان منحنی ذوب[1] آنها برای تأیید به‌دست آمده و تغییرات ژن‌ها قبل از پردازش و بعد از آن نسبت به ژن خانه‌دار محاسبه گردید. پس از پایان آزمایش، دیتاهای حاصل شامل اعداد CT یا سیکل آستانه[2]، منحنی‌های تکثیر و ذوب مربوط به هر ژن جهت آنالیز آماده شدند. اعداد CT مربوط به ژن رفرنس و ژن اصلی هر نمونه، در فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ (که بهترین روش بیان میزان تغییرات ژن، در گروه مورد مطالعه و گروه کنترل می‌باشد) محاسبه گردید؛ به این‌ترتیب موش‌های مورد مطالعه به دو گروه تقسیم شدند: گروه کنترل همان بلاستوسیست‌های (Fresh) که ۳۰ بلاستوسیست و گروه انجمادی بلاستوسیست‌های پس از انجماد شیشه‌ای که شامل ۲۰ بلاستوسیست بودند. گروه اول شامل بلاستوسیت‌هایی بود که تحت تأثیر محیط فریز قرار نگرفتند و در محیط flush سانتریفیوژ شدند، مستقیماً وارد نیتروژن مایع شدند و بیان ژن اینتگرین آنها توسط بتا اکتین (ژن رفرنس) محاسبه شد. گروه دوم freeze شامل بلاستوسیت‌هایی بودند که پس از قرارگیری در محیط‌های فریز در نیتروژن مایع فریز شدند و بیان ژن اینتگرین‌های αv و β3 آنها محاسبه شد.

داده‌ها پس از گردآوری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۴) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. متغیرهای پیوسته به‌صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شدند. جهت بررسی متغیرها قبل و پس از عمل در صورت نرمال بودن توزیع داده‌ها، از آزمون تی جفتی و در صورت غیرنرمال بودن توزیع داده‌ها، از آزمون من‌ویتنی استفاده شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

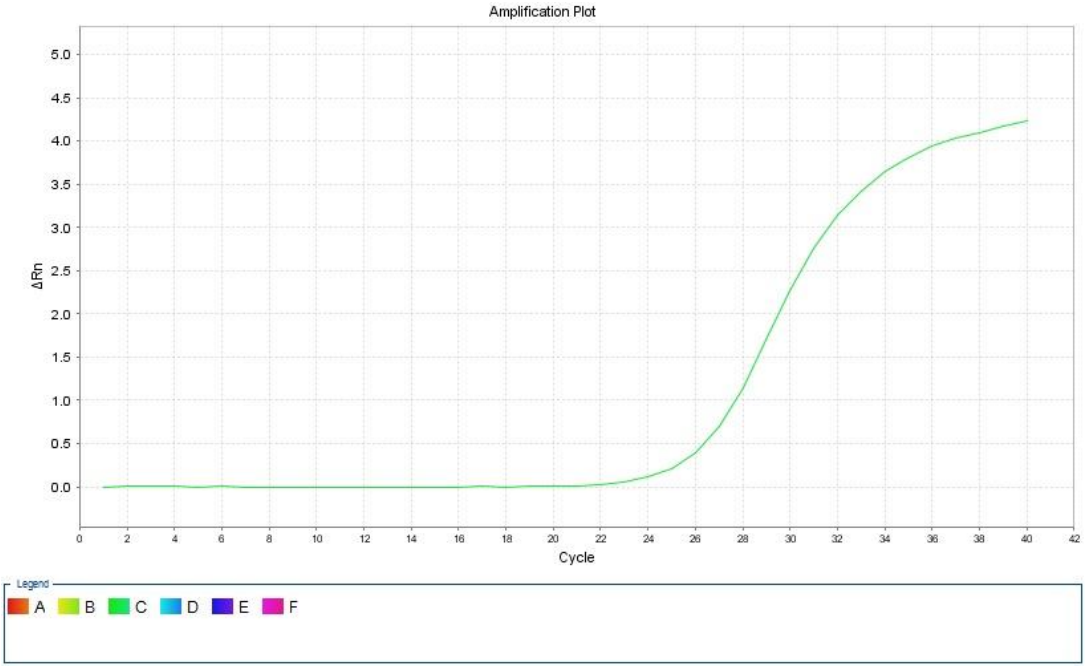
یافته‌ها

هدف از این مطالعه، بررسی اثر انجماد شیشه‌ای بر میزان بیان اینتگرین‌های αv و β3 در مرحله لانه‌گزینی در جنین موش سوری بود، با این فرضیه که انجماد شیشه-ای باعث تغییر در میزان بیان اینتگرین‌ها می‌شود.

مقایسه تکثیر ژن ACTB و αv

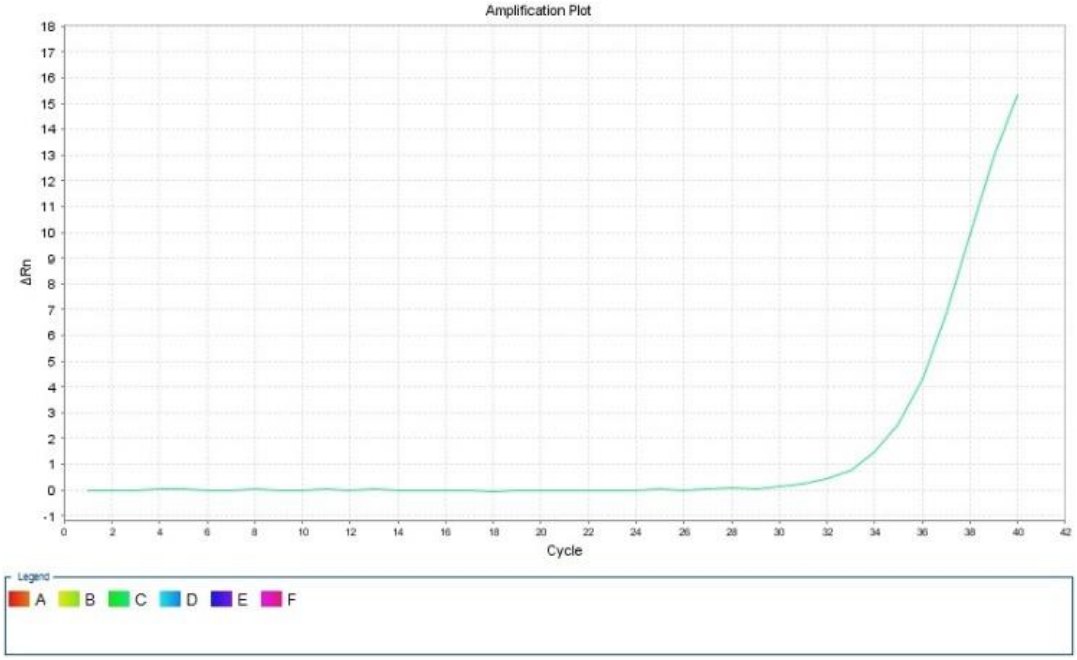
[1] melting curve

[2] Cycle of Thresold



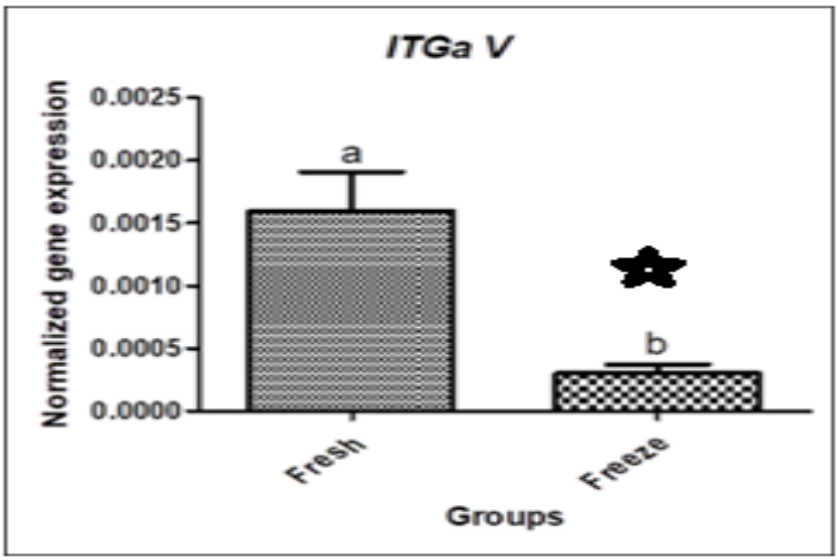
شکل ۱- منحنی تکثیر ژن بتا اکتین (ژن رفرنس): سیکل آستانه برای ژن رفرنس برابر با ۲۳

همانطور که در منحنی ۱ مشاهده می‌شود، Baseline region یا Linear phase تا سیکل ۲۲ و Exponential phase و Log liner phase تا حدود سیکل ۳۳ بود. سیکل آستانه (Ct) برای این ژن حدود ۲۳ و به‌عنوان ژن رفرنس قابل قبول می‌باشد، همچنین مرحله Plateau phase برای این ژن از سیکل ۳۳ تا ۴۰ می‌باشد.



شکل۲- منحنی تکثیر ژن αv

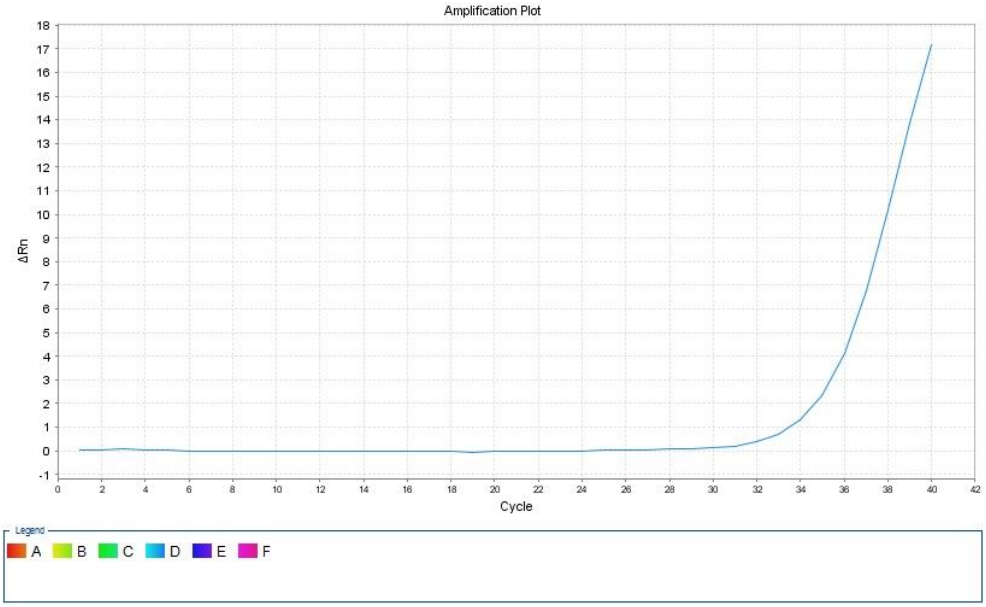
همانطور که در منحنی ۲ مشاهده می‌شود، Baseline region یا Linear phase تا سیکل ۳۰ و Exponential phase و Log liner phase تا حدود سیکل ۳۹ بود. سیکل آستانه (Ct) برای این ژن حدود ۳۱ است. Ct ژن αv در مقایسه با Ct ژن بتا اکتین بیشتر می‌باشد، در نتیجه بیان کمتری در مقایسه با آن دارد.



شکل ۳- مقایسه بیان ژن αv در دو گروه فریز و کنترل: کاهش چشمگیر بیان ژن گروه فریز در مقایسه با گروه کنترل

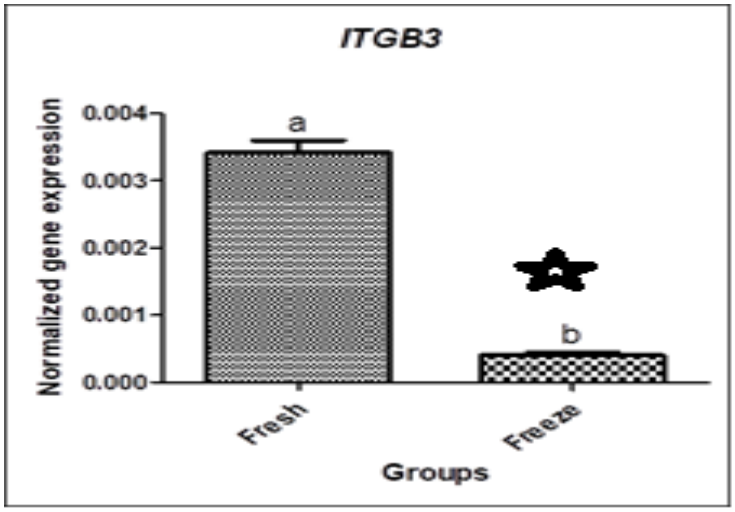
در شکل ۳، مقایسه بیان ژن αv در گروه fresh و گروه freeze مشاهده می‌گردد. تأثیر انجماد شیشه‌ای بر میزان بیان اینتگرین αv به‌طور معناداری مشاهده شد. کاهش قابل توجه در میزان بیان اینتگرین αv در مقایسه با ژن رفرنس بتا اکتین در گروه انجمادی قابل مشاهده است. p<۰/۰۵ معنی‌دار می‌باشد. ★ نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت با گروه fresh می‌باشد.

مقایسه تکثیر ژن ACTB و β3



شکل ۴- منحنی تکثیر ژن β3

همانطور که در منحنی ۴ مشاهده می‌شود، Baseline region یا Linear phase تا سیکل ۲۹ و Exponential phase و Log liner phase تا حدود سیکل ۳۹ بود. سیکل آستانه (Ct) برای این ژن حدود ۲۹ است. Ct ژن β3 در مقایسه با Ct ژن ACTB بیشتر می‌باشد، در نتیجه بیان کمتری در مقایسه با آن دارد.



شکل ۵- مقایسه بیان ژن β3 در گروه‌های فریز و کنترل: کاهش چشم‌گیر بیان ژن گروه فریز در مقایسه با گروه کنترل

در شکل ۵، بیان ژن اینتگرین β3 در دو گروه انجمادی و کنترل مقایسه شده است. کاهش قابل توجه در میزان بیان اینتگرین β3 در مقایسه با ژن رفرنس بتا اکتین قابل مشاهده می‌باشد. $p<۰/۰۵$ معنی‌دار می‌باشد. ★ نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت با گروه fresh می‌باشد.

بحث

پیشرفت در تکنیک‌های انجماد و پروتکل‌های مؤثر تحریک تخمدان، انتقال جنین منجمد به‌صورت انتخابی را امکان‌پذیر کرده است. در کنار این پیشرفت‌ها، بحث در مورد اینکه آیا انتقال جنین منجمد در مقایسه با دیگر روش‌ها (انتقال به‌صورت تازه)، یک گزینه درمانی استاندارد و دردسترس برای کل جمعیت IVF است یا تنها برای زیرگروه خاصی از بیماران مؤثر است؟ مورد بحث و چالش می‌باشد. دست‌یابی به نتایج موفقیت‌آمیز در ART تحت تأثیر طیف گسترده‌ای از عوامل می‌باشد که شامل کارایی پروتکل‌ها و تکنیک‌های IVF و انتقال جنین است. پژوهش‌های زیادی در زمینه نقش اینتگرین‌ها در باروری و اثرات انجماد شیشه‌ای بر جنین، تخمک و اسپرم صورت گرفته است، بر اساس مطالعاتی که تا به امروز انجام گرفته است، این اولین مطالعه‌ای است که به‌طور خاص به بررسی اینتگرین‌ها در زمان لانه‌گزینی در بلاستوسیت پرداخته است. به‌دلیل مشکلات اجتماعی خاصی که از گذشته تاکنون در زمینه ناباروری مطرح شده است، تمرکز پژوهشگران به این قسمت به‌طور ویژه افزایش یافته است. مطالعه حاضر با هدف بررسی میزان بیان اینتگرین‌های αv و β3 از روش RT-PCR انجام شد.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، میزان بیان اینتگرین‌های رحم موش در مرحله لانه‌گزینی پس از انجماد شیشه‌ای با کرایوتاپ و ذوب، کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد. راکو و همکاران (۲۰۱۳)، ۶۳۳ چرخه باروری را در زنان ۳۳-۲۷ ساله به‌منظور مقایسه انتقال جنین منجمد با انتقال جنین تازه به آندومتر رحم و میزان باروری بررسی کردند و بیان داشتند که انتقال جنین‌های فریز شده، نرخ حاملگی را در مقایسه با انتقال جنین تازه به‌طور قابل توجهی بالا می‌برد و دلیل آن را هماهنگی بهتر آندومتر و جنین در اثر آماده‌سازی

چرخه‌های رحم دانستند (۱۳). بنابراین با توجه به این مطالعه، می‌توان بیان داشت که شاید انجماد جنین بر لانه‌گزینی تأثیر مثبت دارد که با مطالعه حاضر متفاوت است. علت تفاوت را می‌توان با توجه به تفاوت‌های مطالعه توجیه کرد، زیرا در مطالعه ی راکو و همکارانش به‌طور کلی میزان موفقیت در باروری بررسی شده، ولی فاکتور خاصی مدنظر قرار نگرفته بود، ولی در مطالعه حاضر به‌طور اختصاصی، بیان اینتگرین مورد بررسی قرار گرفت. همچنین مطالعه راکو و همکاران روی نمونه انسانی کار شده بود که میزان خطای آن را می‌توان به‌دلیل ناتوانی در یکسان کردن شرایط در انسان‌ها نسبت به حیوانات دانست، زیرا شرایط روحی و جسمی، تأثیر بسیار زیادی بر باروری دارد. به‌طور مشابهی نتایج مطالعه مزدارانی و همکار (۲۰۰۵)، نشان‌دهنده تأثیر انجماد شیشه‌ای بر بقای سلول بعد از انجماد و وقوع ناهنجاری‌های کروموزومی بود. نتایج مطالعه مذکور نشان داد که نگهداری جنین‌های موش در مدت زمان طولانی در ازت مایع، از طرفی باعث کاهش بقای جنین‌ها و از طرفی موجب افزایش ناهنجاری کروموزومی در جنین‌ها می‌شود که خود منجر به کاهش بقاء می‌گردد. این مطالعه که بر روی جنین‌های ۸ سلولی موش انجام شد، بر روی بقای سلول تمرکز شده بود، می‌توان گفت هرچه تغییرات سلولی (برای مثال تغییر در بیان ژن‌ها) بیشتر باشد، میزان بقای سلولی کمتر است که با مطالعه حاضر همخوانی داشت (۱۴). میاک و همکاران (۱۹۹۳) بیان داشتند، با استفاده از روش انجماد شیشه‌ای، میزان حیات بلاستوسیست‌ها به‌دلیل وسیع شدن حفره بلاستوسل کاهش می‌یابد (۱۵). بررسی‌ها نشان می‌دهد ناحیه شفاف جنین‌های موش و گاو، به‌دلیل تغییرات حرارتی، آسیب دیده‌اند (۱۶). این رخدادها احتمالاً باعث تغییرات مورفولیژیکی در جنین‌ها می‌شوند که پس از ذوب به شکل‌های مختلفی قابل مشاهده می‌باشند. برخی جنین‌ها در سرمای زیر درجه حرارت فیزیولوژیکی، به‌شدت دچار آسیب می‌شوند. در مطالعه کریمی و همکاران (۲۰۰۴) که اثر انجماد شیشه‌ای بر توده داخل سلولی بلاستوسیست بررسی شد، درصد حیات در گروه شاهد و انجماد به‌ترتیب ۹۶٪ و ۸۵٪ بود و پیشنهاد شد که برای تولید سلول‌های بنیادی از بلاستوسیست‌های منجمد نشده استفاده شود (۱۷) که این مطالعه نیز اثر سوء انجماد را نشان می‌دهد. در مطالعه لِمه و همکاران (۲۰۱۶) که بلاستوسیست‌های گاو در دو گروه انجماد و کنترل مورد بررسی قرار گرفتند، برای انجماد از کرایوتاپ استفاده شد و گزارش گردید که میزان بیان ژن بلاستوسیست بعد از انجماد ۸۶٪ و در گروه شاهد ۱۰۰٪ بود (۱۸). انجماد شیشه‌ای برای بلاستوسیست‌های گاو (۱۹)، موش (۲۰) و انسان (۲۱) رایج است. همانطور که مشاهده می‌شود، لانه‌گزینی بعد از انجماد متضرر می‌شود، به‌همین دلیل محققان بر تأثیرات انجماد بر لانه‌گزینی و بلاستوسیست متمرکز شده‌اند. در مطالعه گذشته‌نگر ویکلند و همکاران (۲۰۱۰) در اسکاندیناوی، کودکانی که در سال ۲۰۰۸-۲۰۰۶ پس از انتقال بلاستوسیست‌های منجمد، بلاستوسیست‌های تازه و جنین‌های مرحله انجماد آهسته در یک مرکز متولد شدند، مورد بررسی قرار گرفتند تا پیامدهای آن‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد. بر اساس نتایج، تفاوت معنی‌داری در مرگ‌ومیر و اختلال مادرزادی وجود نداشت، وزن در نوزادانی که از بلاستوسیست‌های منجمد به دنیا آمده بودند، به‌طور قابل توجهی بالاتر بود، تعداد بیشتری از نوزادان به‌دست آمده از بلاستوسیت تازه، کم‌وزن برای آن سن تولد بودند و میزان خون‌ریزی عمده در زمان زایمان در مادرانی که انتقال بلاستوسیست منجمد صورت گرفته بود، بیشتر بود (۲۱). در مطالعاتی که بر روی موجوداتی به غیر از انسان صورت گرفته، از آنجایی که آنها به‌طور طبیعی نابارور نبوده و همچنین یافتن موارد نابارور موجودات دست نیافتنی می‌باشد و همچنین برخلاف انسان‌ها تحت شرایط خاص غذایی و محیطی یکسان قرار می‌گیرند و استرس‌های محیطی برای آن‌ها یکسان است، نتایج با مطالعه حاضر مشابهت ندارد. در مطالعات متعدد، نظرات و پژوهش‌های ضدونقیضی در این زمینه مشاهده می‌شود که ملزم به تمرکز بیشتر و صرف زمان بیشتر در علم ناباروری است. نتایج محققین نشان می‌دهد که استفاده از ضدیخ‌های مختلف به تنهایی یا طی فرآیند انجماد، هر کدام می‌تواند تأثیرات بسیاری را بر فراساختار سلول داشته باشد (۲۲) و از

حساس‌ترین ساختار نسبت به تغییرات برودتی و حرارتی می‌توان اسکلت سلولی را نام برد و از آنجایی که بسیاری از فعالیت‌های مهم سلول از جمله جابه‌جایی کروموزوم‌ها طی تقسیم و سیتوکینز وابسته به عناصر اسکلت سلول می‌باشد، هرگونه آشفتگی در آن می‌تواند تأثیر زیادی بر تکامل جنین و تخمک داشته باشد (۲۳).

بر اساس مطالعات گذشته، علت احتمالی تغییر بیان ژن در اینتگرین‌ها طی انجماد را باید در سطح مولکولی بررسی کرد. شواهد نشان داده است، انجماد باعث افزایش قطعه قطعه شدن ژن و رونویسی از ژن مرتبط با آپوپتوز می‌شود و در نهایت ظرفیت رشد جنین‌های فریز و ذوب شده را کاهش می‌دهد (۲۴). در این زمینه همچنان تحقیقات بیشتری نیاز است.

در مجموع، انجماد در حال حاضر چشم‌انداز درمانی در زمینه ناباروری را به‌طور قابل توجهی تغییر داده است و ما باید پروتکل‌ها و کاربردهای استفاده از آن را همچنان بیشتر بیاموزیم. در آینده کارآزمایی‌های کنترل شده تصادفی بیشتری در این باره مورد نیاز است. پروتکل‌ها باید به دقت تنظیم شوند، مطالعات مقرون به‌صرفه انجام گیرد و در همه آن‌ها جنبه‌های اجتماعی مورد توجه باشد و در نهایت، نکته مهم اینکه ایمنی مادران و فرزندان مورد ارزیابی دقیق و طولانی‌مدت قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

انجماد شیشه‌ای با استفاده از کرایوتاپ، باعث کاهش چشم‌گیر در میزان بیان ژن‌های اینتگرین αv و β3 در مقایسه با ژن خانه‌دار بتااکتین در بلاستوسیست می‌شود. بنابراین مطالعات زیادی لازم است تا اثرات انجماد بر روی جنین در سطح سلولی و مولکولی را بررسی نماید. علاوه بر این، شاید این تحقیق از نخستین گام‌ها در جهت آشنایی نقش اینتگرین‌ها در لانه‌گزینی بلاستوسیست‌های منجمد شده باشد و باعث طراحی هرچه بهتر و قوی‌تر پروتکل‌های انجمادی شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین که در استفاده از امکانات حیوان‌خانه و آزمایشگاه نهایت همکاری را داشتند، تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

1. Toner JP, Coddington CC, Doody K, Van Voorhis B, Seifer DB, Ball GD, et al. Society for Assisted Reproductive Technology and assisted reproductive technology in the United States: a 2016 update. Fertility and sterility 2016; 106(3):541-6.
2. Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. New England Journal of Medicine 2002; 346(10):725-30.
3. Ludwig M, Diedrich K. Follow-up of children born after assisted reproductive technologies. Reproductive biomedicine online 2002; 5(3):317-22.
4. Nagy ZP, Shapiro D, Chang CC. Vitrification of the human embryo: a more efficient and safer in vitro fertilization treatment. Fertility and sterility 2020; 113(2):241-7.
5. Shi W, Xue X, Zhang S, Zhao W, Liu S, Zhou H, et al. Perinatal and neonatal outcomes of 494 babies delivered from 972 vitrified embryo transfers. Fertility and sterility 2012; 97(6):1338-42.
6. Farhi J, Farhi J, Ben-Haroush AV, Dresler H, Pinkas H, Sapir O, et al. Male factor infertility, low fertilisation rate following ICSI and low number of high-quality embryos are associated with high order recurrent implantation failure in young IVF patients a. Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica 2008; 87(1):76-80.
7. Roy TK, Bradley CK, Bowman MC, McArthur SJ. Single-embryo transfer of vitrified-warmed blastocysts yields equivalent live-birth rates and improved neonatal outcomes compared with fresh transfers. Fertility and Sterility 2014; 101(5):1294-301.
8. Clavero A, Castilla JA, Martinez L, Mendoza N, Fontes J, Maldonado V. Expression of integrin fraction and adhesion molecules on human granulosa cells and its relation with oocyte maturity and follicular steroidogenesis. Journal of assisted reproduction and genetics 2004; 21:187-95.
9. Mimouni NE, Ialy-Radio C, Denizot AL, Lagoutte I, Frolikova M, Komrskova K, et al. Fertilization, but Not Post-Implantation Development, Can Occur in the Absence of Sperm and Oocyte Beta1 Integrin in Mice. International Journal of Molecular Sciences 2022; 23(22):13812.
10. Cavagna M, Mantese JC. Biomarkers of endometrial receptivity—a review. Placenta 2003; 24:S39-47.
11. Campbell K, Swann K. Ca2+ oscillations stimulate an ATP increase during fertilization of mouse eggs. Developmental biology 2006; 298(1):225-33.

12. Wang B, Sheng JZ, He RH, Qian YL, Jin F, Huang HF. High expression of l-selectin ligand in secretory endometrium is associated with better endometrial receptivity and facilitates embryo implantation in human being. American Journal of Reproductive Immunology 2008; 60(2):127-34.
13. Roque M, Lattes K, Serra S, Sola I, Geber S, Carreras R, et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. Fertility and sterility 2013; 99(1):156-62.
14. Mozdarani H, Zarei Moradi S. Effect of Vitrification on Survival and Chromosomal Abnormalities of Frozen-Thawed 8-Cell Mouse Embryos. Journal of Rafsanjan University Of Medical Sciences 2005; 4(4):210-219.
15. Miyake T, Kasai M, Zhu SE, Sakurai T, Machida T. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. Theriogenology 1993; 40(1):121-34.
16. Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. Reproduction 2006; 131(1):53-61.
17. Jashni H, Nasr esfahani M, Baharvand H, Ïmani H, Mardani M. Effect of vitrification on number and survival of in vitro produced bovine inner cell blastocytes. J Mazandaran Univ Med Sci 2004; 14(42):1-11
18. de Oliveira Leme L, Dufort I, Spricigo JF, Braga TF, Sirard MA, Franco MM, et al. Effect of vitrification using the Cryotop method on the gene expression profile of in vitro–produced bovine embryos. Theriogenology 2016; 85(4):724-33.
19. Morató R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of in vitro-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. Reproduction, Fertility and Development 2010; 22(7):1141-7.
20. Huang CC, Lee TH, Chen SU, Chen HH, Cheng TC, Liu CH, et al. Successful pregnancy following blastocyst cryopreservation using super-cooling ultra-rapid vitrification. Human Reproduction 2005; 20(1):122-8.
21. Wikland M, Hardarson T, Hillensjö T, Westin C, Westlander G, Wood M, et al. Obstetric outcomes after transfer of vitrified blastocysts. Human Reproduction 2010; 25(7):1699-707.
22. Vanderzwalmen P, Ectors F, Grobet L, Prapas Y, Panagiotidis Y, Vanderzwalmen S, et al. Aseptic vitrification of blastocysts from infertile patients, egg donors and after IVM. Reproductive biomedicine online 2009; 19(5):700-7.
23. Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Comprehensive chromosome screening of trophectoderm with vitrification facilitates elective single-embryo transfer for infertile women with advanced maternal age. Fertility and sterility 2013; 100(3):615-9.
24. Park SY, Kim EY, Cui XS, Tae JC, Lee WD, Kim NH, et al. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. Zygote 2006; 14(2):125-31.