



ارزیابی کیفیت و بیان ژن‌های اختصاصی تروفواکتودرمی *Eomes* و *Cdx2* در بلاستوسیست‌های سوراخ

شده به کمک ریزسوزن، پیش از انجماد شیشه‌ای

فروغ مهدوی نژاد، مجتبی دشتی زاد*، سمانه فیاضی

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (NIGEB)، تهران، ایران
*مسئول مکاتبات: dashtizad@nigeb.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۶

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۱۴

چکیده

انجماد رویان در مراحل مختلف تکوینی شامل زیگوت، مراحل اولیه‌ی تسهیم و بلاستوسیست، یکی از بخش‌های اصلی در اکثر برنامه‌های لقاح آزمایشگاهی است. به دلیل هماهنگی بهتر اندومتر و رویان و نیز نرخ لانه‌گزینی بالاتر بلاستوسیست، انجماد آن نسبت به سایر مراحل در ارجحیت قرار دارد. با این وجود حضور مایع درون حفره‌ی بلاستوسل و نیز تشکیل کریستال یخ، انجماد آن را با محدودیت روبرو ساخته است. لذا در این مطالعه، با خارج ساختن این مایع با کمک تکنیک سوراخ نمودن مصنوعی و بررسی کیفیت بلاستوسیست از لحاظ سلولی و مولکولی، علاوه بر بهبود انجماد بلاستوسیست، سعی در بررسی ارتباط بین این روش و تغییر بیان ژن‌های رده‌ی سلولی تروفواکتودرم نمودیم. بدین منظور تعداد ۴۲۱ بلاستوسیست برون‌تنی موش از نژاد NMRI پس از انجام IVF، و کشت به مدت ۴/۵-۴ روز در محیط آزمایشگاه، به دست آمدند و به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند. گروه اول پس از قرارگیری در محیط‌های انجماد، به وسیله‌ی کرایوتاپ درون ازت غوطه‌ور و سپس ذوب شدند. گروه دوم پس از انجام تکنیک سوراخ نمودن مصنوعی، بلافاصله منجمد- ذوب گردیدند. سپس هر دو گروه از نظر زنده‌مانی، خروج از زونا و بیان ژن‌ها با نتایج گروه سوم (کنترل) مقایسه شدند. در این مطالعه، میزان خروج از زونا با سوراخ کردن مصنوعی بلاستوسیست قبل از انجماد، به صورت معنی‌داری افزایش یافت. این در حالی است که میزان زنده‌مانی در گروه‌های تحت تیمار، مشابه با گروه کنترل، بالا بود. انجماد شیشه‌ای موجب افزایش در میزان بیان ژن‌های *Eomes* و *Cdx2* شد. اما با کاهش مایع بلاستوسل قبل از انجماد، میزان بیان این ژن‌ها نسبت به گروه انجماد شیشه‌ای به صورت معنی‌داری کاهش پیدا کرد و به گروه کنترل نزدیک شد ($p < 0/05$). از آنجایی که هیچ نتیجه‌ای مبنی بر تاثیر منفی استفاده از این تکنیک مشاهده نگردید و با توجه به افزایش میزان خروج از زونا، کاهش حجم مایع بلاستوسل قبل از انجماد شیشه‌ای می‌تواند مفید واقع شود.

کلمات کلیدی: لقاح آزمایشگاهی، بلاستوسیست، انجماد شیشه‌ای، سوراخ نمودن مصنوعی، ژن‌های *Eomes* و *Cdx2*.

مقدمه

تکوینی رویانی تغییر یافته‌اند [۱، ۲]. انجماد رویان در مراحل مختلف تکوینی آن صورت می‌پذیرد. انتظار می‌رود هرچه رویان از نظر مرحله تکوینی جلوتر می‌رود، با توجه به کوچک شدن بلاستومرها و کاهش میزان آب درون سلولی طی فرآیند تسهیم، آسیب کمتری نیز ضمن انجماد به آن وارد شود و نرخ زنده‌مانی رویان‌های ذوب شده‌ی

از سال ۱۹۹۹ که اولین انتقال و حاملگی رویان منجمد- ذوب شده، توسط متد انجماد شیشه‌ای با موفقیت انجام شد، تحقیقات بسیاری در راستای ارتقای پروتوکل این روش انجمادی صورت پذیرفته است [۱۳]. در این تحقیقات عوامل متعددی از جمله ترکیبات محیط انجماد و ذوب، حامل، مدت زمان و تعداد مراحل انجماد و نیز مراحل



همان راستا خارج می‌شود. که این عمل موجب خروج مایع بلاستوسلی و جمع‌شدگی بلاستوسیست می‌گردد. به همین دلیل ما در این طرح با استفاده از دستگاه ریزدستکاری و روش سوراخ نمودن مصنوعی AC (Artificial Collapse)، مایع بلاستوسلی را خارج و بلاستوسیست‌های با منشا برون‌تنی (*In vitro*) را منجمد نمودیم.

کیفیت رویان‌ها از لحاظ سلولی با سنجش نرخ زنده‌مانی و بازگشت رویان‌ها به شکل طبیعی و درصد بلاستوسیست‌های خارج شده از زونا و نیز از طریق مولکولی با بررسی بیان فاکتورهای *Eomes* (*Eomesodermin*) و *Cdx2* (Caudal-related homeobox 2) به عنوان مارکرهای ژنی لایه‌ی TE، ارزیابی گردید. بررسی بیان ژن‌های لایه‌ی TE به علت آسیب آن ضمن AC، نقش مهمی در زمینه ارزیابی وقایع مولکولی این تکنیک برای ما فراهم می‌سازد.

مواد و روش کار

جداسازی تخمک، لقاح آزمایشگاهی و کشت رویان: در این طرح موش‌های نژاد NMRI مورد مطالعه قرار گرفتند. حیوان در قفس‌هایی با شرایط دمایی °C ۱۸-۲۲، رطوبت ۷۰-۳۰ درصد و دوره‌ی نوری ۱۲ ساعته نگهداری گردید. تحریک تخمک‌گذاری در موش‌های ماده با سنی حدود ۶-۸ هفته و وزنی حدود ۳۵-۳۰ گرم با تزریق ۷ IU هورمون PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) (Folligon®, A007A02, Intervet) در روز اول و ۴۷ ساعت پس از آن، ۷ IU هورمون hCG (Human Chorionic Gonadotropin) (Pregnyl®, 111, Darou Pakhsh) به صورت داخل صفاقی انجام شد. حدود ۱۶ ساعت پس از تزریق hCG، توده‌های تخمک-کومولوس از درون اویداکت خارج و به محیط M2 [۱۸] به همراه ۴ mg/ml آلبومین سرم گاوی (10106, sigma) و ۰/۳۳ mM پیرووات سدیم (P-5280, sigma) منتقل گشت. سپس تخمک‌ها به تعداد ۱۰

مراحل انتهایی، بیشتر از مراحل قبلی باشد. اما به علت وجود حفره پر از مایع بلاستوسل و تشکیل کریستال یخ ضمن کاهش دما، با موفقیت کمتری نسبت به مراحل قبل مواجه است. همچنین حضور این مایع می‌تواند به عنوان مانعی در مقابل نفوذ ترکیبات ضدیخ به داخل رویان عمل کند [۹].

حضور مایع بلاستوسل اهمیت بالایی در تغذیه سلول‌های تروفوکتودرم TE (Trophectoderm) و توده سلولی داخلی ICM (Inner Cell Mass) رویان و نیز حرکت و موضع‌گیری مناسب بلاستومرها دارد. همچنین حاوی فاکتورهای رشد متعددی است که برای تمایز مناسب رده‌ی سلولی اندودرم اولیه (Primitive Endoderm) از ICM حیاتی است. بنابراین بلاستوسل نقش مهمی در رده‌زایی رویان مرحله پیش از لانه‌گزینی (Preimplantation) دارد [۱۱]. با کاهش یا حذف این مایع پیش از انجماد، می‌توان آسیب وارده ناشی از تشکیل کریستال‌های یخ را کاهش داد. راه حل‌های متعددی برای این منظور گزارش شده است. از جمله می‌توان زمان مجاورسازی با ضدیخ و نیز غلظت آن را بالا برد که هر دو برای سلامت رویان مضر می‌باشند [۸]. راه‌حل موثرتر جهت کاهش حجم حفره، خروج مایع بلاستوسلی با استفاده از دست‌کاری لایه‌ی TE، به یکی از روش‌های مکانیکی، لیزر [۱۷] و یا شیمیایی است. در روش مکانیکی خروج مایع می‌تواند به کمک دستگاه میکروساکشن [۳]، سوراخ کردن TE به وسیله‌ی ریز سوزن شیشه‌ای (سوراخ کردن مصنوعی بلاستوسیست) [۲۶] و میکروپیپت کردن بلاستوسیست با استفاده از پیپت پاستور با سایز بسیار باریک صورت پذیرد. در سال ۲۰۰۲، Vanderzwalmen با استفاده از ریزسوزن شیشه‌ای، توانست بلاستوسیست را سوراخ و نرخ بالاتری از زنده‌مانی پس از ذوب در مقایسه با عدم استفاده از این روش دریافت کند [۲۶]. طبق این روش، سوزن به آرامی از میان سلول‌های TE وارد حفره شده و در



گاوی (10270, GIBCO) شست‌وشو گردیدند و برای مدت ۱۵ دقیقه در محیط متعادل‌سازی (Equilibration Medium) حاوی ۷/۵٪ ضدیخ اتیلن گلیکول (324558, Sigma) و ۷/۵٪ ضدیخ دی متیل سولفوکساید (DMSO) (D-2650, Sigma) در محیط پایه، قرار گرفتند.

بلاستوسیت‌ها طی زمانی حدود ۴۵-۶۰ ثانیه در محیط انجماد حاوی ۱۵٪ اتیلن گلیکول و ۱۵٪ DMSO و ساکارز ۰/۵ مولار (S-9378, sigma) در محیط پایه، شست‌وشو شده و بر روی کرایوتاپ با مقدار بسیار کم محیط قرار گرفتند و بلافاصله درون ازت غوطه‌ور شدند. به منظور ذوب، کرایوتاپ به سرعت به محیط ذوب حاوی ساکارز یک مولار در محیط پایه با دمای 37°C وارد شد و رویان‌ها به مدت یک دقیقه در آن شست و شو گردیدند.

بلاستوسیت‌ها به مدت ۳ دقیقه در محیط رقیق‌سازی (Dilution Medium) حاوی ساکارز ۰/۵ مولار در محیط پایه و ۱۰ دقیقه در محیط پایه قرار گرفتند و سپس به محیط KSOM منتقل گشتند. نرخ زنده‌مانی به عنوان درصد بلاستوسیت‌های دوباره گسترش یافته پس از ذوب در نظر گرفته شد. همچنین دو معیار سلولی زنده‌مانی و خروج از زونا حدود ۱۲ ساعت پس از ذوب بررسی گردیدند.

استخراج RNA و واکنش Real Time PCR: پس از جمع‌آوری نمونه‌های بلاستوسیت با ظاهر نرمال، برای هر تیمار از حدود ۱۰۰ بلاستوسیت، بوسیله‌ی کیت RNeasy Plus Micro Kit® (Qiagen, USA)، RNA کل استخراج و توسط کیت AccuPower® RocketScript™ RT PreMix (Bioneer, Korea) kit، به cDNA تبدیل گشت. هر واکنش در حجم کلی $15\ \mu\text{l}$ شامل $7/5\ \mu\text{l}$ مستر میکس سایبر گرین ۲X (Intron, Korea)، $3\ \mu\text{l}$ cDNA و $0/7\ \mu\text{l}$ از هر پرایمر (با غلظت ۵ pm) تهیه گردید. واکنش توسط سیستم ABI Applied Biosystems StepOne, USA) با شرایط ۹۵ درجه برای ۲ دقیقه و ۴۰ سیکل ۹۰ درجه برای ۱۰ ثانیه و

تا ۱۲ عدد در قطرات $50\ \mu\text{l}$ محیط HTF [۱۹] به همراه $6\ \text{mg/ml}$ آلبومین سرم گاوی، $0/33\ \text{mM}$ پیروات سدیم و گلوکاتایون (M-18047, sigma) قرار گرفتند. به منظور لقاح، موش‌های نر با سنی حدود ۸-۱۰ هفته و وزن ۳۵-۴۰ گرم کشته و سپس توده‌ی اسپرمی از لوله‌ی اسپرم‌بر و اپیدیدیم دمی خارج و درون محیط HTF قرار داده شد. پس از قرارگیری به مدت یک ساعت درون انکوباتور به منظور ظرفیت پذیرش اسپرم‌ها، غلظت 1×10^6 عدد در هر میلی-لیتر اسپرم به قطرات حاوی تخمک اضافه گردید. ۴ ساعت بعد، تخمک‌های تلقیح شده جدا و در محیط KSOM [۱۴] به همراه $10\ \text{mg/ml}$ آلبومین سرم گاوی، $0/2$ میلی-مولار پیروات سدیم، 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر جنتامایسین-G (Sigma, 1264) و 50 نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمی (E-4127, Sigma) به مدت ۴ روز در انکوباتور با شرایط دمایی 37°C ، رطوبت ۹۷٪ و $5\% \text{CO}_2$ نگهداری گشتند.

سوراخ نمودن مصنوعی بلاستوسیت: بلاستوسیت‌های با کیفیت مناسب پس از جمع‌آوری، با کمک ریزسوزن شیشه‌ای دستگاه ریزدستکاری (Micromanipulator) (Narishige, 10291, Japan)، سوراخ گردیدند. به طور مختصر، با کمک پیپت نگهدارنده، بلاستوسیت به نحوی که توده‌ی سلولی داخلی در ساعت ۶ یا ۱۲ باشد ثابت گردید. پیپت تزریق کننده در جهت پیپت نگهدارنده و موازی با سطح، از میان سلول‌های TE وارد حفره‌ی بلاستوسل گشت و چند ثانیه بعد در همان راستا به آرامی عقب کشیده و خارج شد [۲۶].

تکنیک انجماد شیشه‌ای، ذوب و ارزیابی زنده‌مانی بلاستوسیت: بلاستوسیت‌های AC شده و نیز AC نشده، توسط پروتوکل انجمادی Kuwayama با اندکی تغییر، منجمد شدند [۱۲]. بلاستوسیت‌ها ابتدا چندین مرتبه در محیط پایه‌ی TCM199 به همراه ۲۰ درصد سرم رویان



۵۸ درجه برای ۳۰ ثانیه انجام شد.

طراحی آزمایش: برای بررسی تاثیر سوراخ نمودن مصنوعی پیش از انجماد، رویان‌های برون‌تنی به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند:

گروه اول منجمد و سپس ذوب شدند. گروه دوم پس از انجام تکنیک سوراخ نمودن مصنوعی بلافاصله منجمد-ذوب گردیدند.

گروه سوم (کنترل) نیز بلاستوسیت‌های بدون تیماری بودند که تحت شرایط کشتی مشابه دو گروه دیگر قرار گرفتند. سپس هر دو گروه از نظر زنده‌مانی، خروج از زونا و بیان ژن‌ها با نتایج گروه سوم مقایسه شدند.

بررسی‌های آماری: همه‌ی آزمایشات در تکرارهای سه تایی انجام پذیرفت. سپس نتایج به منظور مشخص شدن از نظر معنی‌دار بودن، در نرم‌افزار SPSS 16.0 با استفاده از تست One Way ANOVA و Duncan برای مقایسه‌ی چندگانه‌ی داده‌ها بررسی گردیدند. در همه‌ی نتایج، تفاوت در سطح $p < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد و نیز داده‌ها براساس رابطه‌ی $Mean \pm SD$ گزارش شدند. بیان هر ژن با متد $2^{-\Delta\Delta CT}$ ارزیابی و نیز ژن $B2M$ به عنوان ژن کنترل داخلی (House Keeping) در نظر گرفته شد.

نتایج

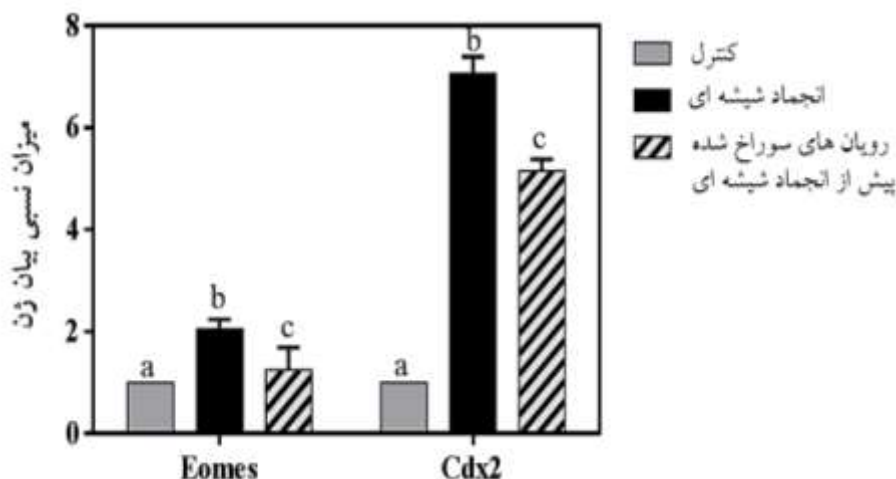
تاثیر سوراخ نمودن مصنوعی قبل از انجماد شیشه‌ای بر نرخ زنده‌مانی و خروج از زونا: همچنان که در **تاثیر سوراخ نمودن مصنوعی قبل از انجماد شیشه‌ای بر میزان بیان ژن:** در مقایسه‌ی انجماد شیشه‌ای با گروه کنترل، بیان هر دو ژن $Cdx2$ و $Eomes$ افزایش یافت (۷/۰۴۸ و ۲/۰۹۹ به ترتیب). اما زمانی که رویان‌ها تحت تیمار AC قرار گرفتند بیان آن‌ها به طور معناداری نسبت به تیمار انجماد کمتر و به کنترل نزدیک‌تر شد (۵/۲۲۷ و ۱/۲۱۲ به ترتیب) ($p < 0.05$).

جدول ۱ نشان داده شده است نرخ زنده‌مانی بلاستوسیت‌ها در هر دو گروه انجماد شیشه‌ای و رویان‌های AC شده پیش از انجماد شیشه‌ای، مشابه کنترل بود (۹۷/۳۶، ۹۸/۷۶ در مقابل ۹۹/۴۸). نرخ خروج از زونا در گروه انجماد، به طور معناداری از گروه کنترل پایین‌تر بود (۴۷/۳۳ در مقابل ۶۳/۴). اما این نرخ در رویان‌های AC شده پیش از انجماد، بالاتر از گروه انجماد بود (۶۱/۲۳).

جدول ۱- اثر انجماد شیشه‌ای و AC پیش از انجماد شیشه‌ای، بر کیفیت رویان‌های برون‌تنی موش

میزان خروج بلاستوسیت از زونا (%)	میزان زنده‌مانی (%)	تعداد بلاستوسیت	گروه‌های آزمایشی
$63/4 \pm 2/51^a$	$99/48 \pm 0/72^a$	۱۷۹	کنترل
$47/33 \pm 2/57^b$	$97/36 \pm 2/5^a$	۱۱۸	انجماد شیشه‌ای
$61/23 \pm 2/63^c$	$98/76 \pm 1/9^a$	۱۲۴	رویان‌های AC شده پیش از انجماد شیشه‌ای

داده‌ها حاصل ۳ تکرار می‌باشند. در هر ستون، a، b و c نسبت به هم دارای تفاوت معناداری هستند ($p < 0.05$).



شکل ۱- مقایسه‌ی بیان ژن‌های *Eomes* و *Cdx2* در بلاستوسیست‌های AC شده و AC نشده پیش از انجماد شیشه‌ای

بحث

حل کرد. تحقیقات متعددی با متدهای مختلفی مایع بلاستوسلی را خارج و افزایش نرخ خروج از زونا، لانه-گزینی و حاملگی را گزارش نمودند [۵، ۷، ۱۷، ۲۲، ۲۶]. نتایج ما نیز در این تحقیق در راستای نتایج تحقیقات پیشین بود. براساس این مشاهدات به نظر می‌آید ایجاد سوراخ درون زونا طی پروسه‌ی AC، موجب کمک به خروج رویان از زونا شده و به نوعی Assisted Hatching به حساب می‌آید [۲۲]. این قضیه به ویژه برای رویان‌های تولید شده در آزمایشگاه، بسیار حائز اهمیت است. زیرا لقاح و کشت در محیط آزمایشگاه موجب تغییر در انعطاف‌پذیری و افزایش مقاومت (سخت شدن) زونا و به تبع آن کاهش خروج بلاستوسیست از زونا و نرخ حاملگی می‌گردد [۱۰]. بنابراین AC می‌تواند به عنوان راهبردی مفید استفاده شود. احتمال دیگر برای توضیح این قضیه ممکن است مربوط به سطح انرژی رویان‌های AC شده و AC نشده باشد [۶]. همان‌طور که Iwayama بیان می‌کند، پمپ سدیم/پتاسیم ATPase موجود در سلول‌های TE، حدود ۶۰ درصد ATP تولید شده در طول تکوین بلاستوسیست را برای گسترش حفره

با توجه به گسترش ناباروری و افزایش استفاده از تکنیک‌های کمک‌باروری، مطالعات متعددی با هدف ارتقای نتایج انجماد گامت و رویان صورت پذیرفته است. بسیاری از این تحقیقات با تغییر در پروتوکل انجمادی، نرخ زنده‌مانی بالایی برای انجماد رویان و تخمک گزارش نموده‌اند [۷، ۲۳]. در مطالعه‌ی حاضر نیز نرخ زنده‌مانی بالایی از بلاستوسیست‌ها پس از انجماد شیشه‌ای حاصل شد. اما برخلاف آن نرخ خروج از زونا در بلاستوسیست‌های منجمد شده، پایین‌تر از کنترل بود [۱۶]. یک علت احتمالی برای آن می‌تواند تاثیری باشد که انجماد شیشه‌ای بر الاستیسیته و ساختار گلیکوپروتئینی زونا پلوسیدا می‌گذارد که ممکن است مانع از خروج خود به خودی رویان شود [۸، ۲۵]. ارتباط معکوسی بین نتایج انجماد شیشه‌ای و گسترش حفره‌ی بلاستوسل گزارش شده است [۲۶]. در حقیقت حضور مایع درون بلاستوسل با ممانعت از نفوذ کارای ضدیخ‌ها و آب‌گیری مناسب از سلول‌ها، موجب تشکیل کریستال یخ و آسیب رویان می‌گردد. بنابراین تصور براین بود که با کاهش مایع بلاستوسلی این مشکل را بتوان



مصرف می‌کند.

این کاهش بیان را به این‌گونه بتوان توجیه کرد که در اثر سوراخ نمودن حفره بلاستوسل، ترکیبات ضدیخ، ضمن ورود به فضای بین زرده‌ای (Perivitelline space)، در تماس مستقیم با سلول‌های تروفوکتودرمی قرار می‌گیرند، همچنین از حفره‌ی ایجاد شده ترکیبات ضدیخ نفوذناپذیر، وارد بلاستوسل می‌شود [۲۷]. این تماس مستقیم موجب حداکثر آب‌گیری از بلاستوسل و حداقل تشکیل کریستال یخ و استرس سلولی می‌شود. که این امر کاهش بیان ژن‌ها در رویان‌های AC شده نسبت به انجماد تنها را در پی دارد.

نتیجه‌گیری

بطور خلاصه با توجه به افزایش نرخ خروج از زونا و کاهش بیان ژن‌های تروفوکتودرمی، می‌توان نتیجه گرفت که AC پیش از انجماد شیشه‌ای، می‌تواند به عنوان ابزار مفیدی در بهینه‌سازی انجماد شیشه‌ای عمل نماید.

منابع

- 1- Abdelhafez F.F., Desai N., Abou-Setta A.M., Falcone T., Goldfarb J. (2010), Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: A systematic review and meta-analysis. *Reproductive Biomedicine Online*, 20(2): 209-222.
- 2- Al-Azawi T., Tavukcuoglu S., Khaki A.A., Al Hasani S. (2013), Cryopreservation of human oocytes, zygotes, embryos and blastocysts: A comparison study between slow freezing and ultra rapid (vitrification) methods. *Middle East Fertility Society Journal*, 18(4): 223-232.
- 3- Chen S.U., Lee T.H., Lien Y.R., Tsai Y.Y., Chang L.J., Yang Y.S. (2005), Microsuction of blastocoelic fluid before vitrification increased survival and pregnancy of mouse expanded blastocysts, but pretreatment with the cytoskeletal stabilizer did not increase blastocyst survival. *Fertility and Sterility*, 84(SUPPL.2): 1156-1162.
- 4- Chen Y., Wang K., Gong Y.G., Khoo S.K.,

زمانی که بلاستوسیست درون محیط‌های انجماد قرار می‌گیرد و آب خود را از دست می‌دهد، پرکردن دوباره‌ی این حفره نیز نیازمند مصرف مقدار زیادی انرژی است، که این انرژی مضاعف مصرف شده منجر به کند شدن روند تکوینی بلاستوسیست می‌گردد [۷]. بنابراین سوراخ کردن حفره توسط ریزوسوزن، سریع‌تر شدن اتساع دوباره‌ی بلاستوسیست را باعث می‌شود. به همین دلیل بلاستوسیست‌های AC نشده نسبت به AC شده سطح انرژی پایین‌تر و خروج از زونای کمتری دارند.

در مطالعه‌ی حاضر برای ارائه‌ی جزئیات بیشتر از اثر AC پیش از انجماد شیشه‌ای، ژن‌های رده‌ی TE، به عنوان رده‌ی سلولی که ضمن تکنیک AC دچار آسیب احتمالی می‌شود، بررسی گردیدند. فاکتور *Cdx2* یکی از مهم‌ترین فاکتورهای موثر در تکوین TE می‌باشد که بیان آن از مرحله‌ی ۸ سلولی آغاز و در ادامه رشد، محدود به سلول‌های محاطی مرولا و بلاستوسیست می‌گردد. به طوری که القاء بیان آن در سلول‌های بنیادی رویانی، تمایز به این رده را در پی دارد [۴] و جهش در آن نیز منجر به مرگ رویان در مرحله‌ی پیش از لانه‌گزینی می‌گردد [۲۴]. این فاکتور همچنین سبب محدود شدن بیان ژن‌های پرتوانی به سلول‌های درونی رویان می‌شود [۲۱]. فاکتور رونویسی متصل شونده به جعبه‌ی T، *Eomes*، در مرحله انتهایی تمایز TE و تشکیل مزودرم نقش مهمی دارد و جهش در آن مانع تمایز TE به تروفوبلاست و در نتیجه عدم لانه‌گزینی رویان می‌شود. ژن *Eomes* در پایین دست *Cdx2* قرار دارد [۲۴، ۲۰]. نتایج ما نشان داد که سطح بیان ژن‌های *Cdx2* و *Eomes* به طور معناداری در رویان‌های منجمد شده در مقایسه با کنترل افزایش یافت. در حالی که بیان نسبی آن‌ها زمانی که پیش از انجماد AC شدند نسبت به انجماد تنها، کاهش نشان داد و به کنترل (به عنوان حالت ایده‌آل) نزدیکتر شد. شاید علت



vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Biomedicine*, 11(3): 300-308.

13- Lane M., Schoolcraft W.B., Gardner D.K., Phil D. (1999), Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique, *Fertility and Sterility*, 72(6): 1073-1078.

14- Lawitts J.A., Biggers J.D., Culture F. (1993), preimplantation mouse embryos. In: Wasserman PM, De Pamphilis PM, editors. *Methods in enzymology*, volume 225 (Guide to techniques in mouse development) San Diego: Academic, pp: 153-164.

15- Liebermann J., Tucker M.J. (2006), Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertility and Sterility*, 86(1): 20-26.

16- Min S.H., Kim J.W., Lee Y.H., Park S.Y., Jeong P.S., Yeon J.Y., Park H., Chang K.T., Koo D.B. (2014), Forced collapse of the blastocoel cavity improves developmental potential in cryopreserved bovine blastocysts by slow-rate freezing and vitrification. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(4): 684-692.

17- Mukaida T., Oka C., Goto T., Takahashi K. (2006), 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*, 21(12): 3246-3252.

18- Quinn P., Barros C., Whittingham D.G. (1982), Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 66(1): 161-168.

19- Quinn P., G. M. WARNES, J. F. KERIN, and C. KIRBY (1985), Culture Factors Affecting the Success Rate of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer. *Annals of the New York Academy of Sciences: In Vitro Fertilization and Other Assisted Reproduction*, 442(1): 195-204.

Leach R. (2013), Roles of CDX2 and EOMES in human induced trophoblast progenitor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 431(2): 197-202.

5- Hiraoka K., Hiraoka K., Kinutani M., Kinutani K. (2004), Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. *Human Reproduction*, 19(12): 2884-2888.

6- Houghton F.D., Humpherson P.G., Hawkhead J.A., Hall C.J., Leese H.J. (2003), Na⁺, K⁺, ATPase activity in the human and bovine preimplantation embryo. *Developmental Biology*, 263(2): 360-366.

7- Iwayama H., S. Hochi, M. Yamashita (2011), 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*, 28(4): 355-361.

8- Kader A., Choi A., Orief Y., Agarwal A. (2009), Factors affecting the outcome of human blastocyst vitrification. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7: 99.

9- Kader A., Choi A., Sharma R.K., Falcone T., Agarwal A. (2010), Effect of varying equilibration time in a two-step vitrification method on the post-warming DNA integrity of mouse blastocysts. *Fertility and Sterility*, 93(8): 2640-2645.

10- Ko C.S., Ding D.C., Chu T.W., Chu Y.N., Chen I.C., Chen W.H., Wu G.J. (2008), Changes to the meiotic spindle and zona pellucida of mature mouse oocytes following different cryopreservation methods. *Animal Reproduction Science*, 105(3-4): 272-282.

11- Kovacic B., Vlaisavljevic V., Reljic M., Cizek-Sajko M. (2004), Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *Reproductive Biomedicine Online*, 8(6): 687-694.

12- Kuwayama M., Kato O., Leibo S.P., Genetics P. (2005), Article Highly efficient



Ralston A., Chawengsaksophak K., Beck F., Rossant J. (2005), Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoctoderm in the mouse blastocyst. *Development*, 132(9): 2093-2102.

25- Vanderzwalmen P. (2003), Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. *Human Reproduction*, 18(7): 1504-1511.

26- Vanderzwalmen P., Bertin G., Debauche C., Standaert V., van Roosendaal E., Vandervorst M., Bollen N., Zech H., Mukaida T., Takahashi K., Schoysman R. (2002), Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Human Reproduction*, 17(3): 744-751.

27- Zech N., Lejeune B., Zech H., Vanderzwalmen P. (2005), Vitrification of hatching and hatched human blastocysts: effect of an opening in the zona pellucida before vitrification. *Reproductive Biomedicine Online*, 11(3): 355-361.

20- Russ A.P., Wattler S., Colledge W.H., Aparicio S.A., Carlton M.B., Pearce J.J., Barton S.C., Surani M.A., Ryan K., Nehls M.C., Wilson V., Evans M.J. (2000), Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature*, 404(6773): 95-99.

21- Sasaki H. (2010), Mechanisms of trophoctoderm fate specification in preimplantation mouse development. *Development Growth and Differentiation*, 52(3): 263-273.

22- Son W.Y., Yoon S.H., Yoon H.J., Lee S.M., Lim J.H. (2003), Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele. *Human Reproduction*, 18(1): 137-139.

23- Stehlik E., Stehlik J., Katayama K.P., Kuwayama M., Jambor V., Brohammer R., Kato O. (2005), Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reproductive Biomedicine Online*, 11(1): 53-57.

24- Strumpf D., Mao C.A., Yamanaka Y.,