بررسی تاثیر شرایط هایپوکسی بر تکوین رویان‌های دوسلولی موش نژاد NMRI

دیبا باقری، مجتبی دشتی‌زاد*، مرتضی دلیری جوپاری، احسان هاشمی، آیدین رحیم‌طایفه

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری (NIGEB)، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: dashtizad@nigeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۳۰

چکیده

تکوین رویان در شرایط آزمایشگاهی، وابسته به پارامترهای متعددی است که از میان آن‌ها می‌توان به میزان اکسیژن محیط کشت اشاره نمود. کشت رویان در شرایط محیطی با میزان بالای اکسیژن می‌تواند منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن شود و در نتیجه آسیب‌های احتمالی را برای رویان به همراه داشته باشد. بررسی‌های پیشین نشان داده است که مرحله‌ی پره‌نوکلئوس مرحله‌ای حیاتی در نمو رویان می‌باشد که نسبت به میزان اکسیژن محیط حساس است و با شروع کشت از مراحل بعدی ممکن است این اثرات مخرب اکسیژن اتمسفری ناپدید شود. جهت بررسی دقیق‌تر این موضوع، مطالعه حاضر کشت رویان‌ها از مرحله‌ی دو سلولی تا مرحله‌ی بلاستوسیست را مد نظر قرار داده است و کیفیت رویان‌ها را در شرایط هایپوکسی (غلظت اکسیژن ۵ درصد و اتمسفری (غلظت اکسیژن ۲۰ درصد) با یکدیگر مقایسه می‌کند. رویان‌های دوسلولی پس از جمع‌آوری، به صورت تصادفی در دو گروه هایپوکسی و اتمسفری تقسیم و تا مرحله‌ی بلاستوسیست کشت داده شدند. تاثیر غلظت متفاوت اکسیژن بر کیفیت رویان‌ها با بررسی نرخ تشکیل بلاستوسیست، میزان خروج رویان از زونا، تعداد کل سلول‌ها، نسبت تعداد سلول‌های توده‌ی داخلی بلاستوسیست به تعداد کل سلول‌ها و نرخ لانه‌گزینی پس از انتقال رویان ارزیابی گردید. نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) در نرخ تشکیل بلاستوسیست (۷۸/۸۱ به ۷۳/۰۵)، خروج از زونا (۵۶/۰۷ به ۴۹/۵۰) و نسبت توده‌ی سلولی داخلی به کل سلول‌ها در رویان‌های گروه هایپوکسی در مقایسه با گروه کنترل (۰/۵۴ به ۰/۲۸) بود. همچنین نرخ لانه‌گزینی پس از انتقال رویان هایپوکسی (۵۹/۲۰) نسبت به گروه کنترل بهبود ($p<۰/۰۵$) یافت (۲۹/۵۰). برخلاف گزارشات پیشین اثرات مخرب اکسیژن موجب سرکوب رشد رویان در تمامی مراحل نمو می‌شود و براین نکته تاکید می‌کند که شرایط هایپوکسی از نمو رویان بهتر حمایت می‌کند.

کلمات کلیدی: بلاستوسیست، تعداد سلول‌های بلاستوسیست، کشت رویان، لانه‌گزینی، شرایط هایپوکسی.

مقدمه

بارداری، پدیده‌ی زیستی منحصر به فردی است که شامل مراحل پیچیده و متنوعی می‌باشد و توسط فاکتورهای متعددی کنترل می‌گردد. در طی این فرآیند سلول تخم که حاصل ترکیب سلول‌های جنسی نر و ماده است، پس از تقسیمات متعدد و رسیدن به مرحله‌ی بلاستوسیست وارد رحم می‌شود و لانه‌گزینی خود را شروع می‌نماید. در طی آن رویان به داخلی-ترین لایه‌ی رحم (اندومتریوم) اتصال می‌یابد و سپس اندومتریوم رحم آماده برای پذیرش رویان (دسیدوا) را مورد تهاجم قرار می‌دهد (۲۳). لانه‌گزینی رویان در داخل اندومتریوم مادر اولین مرحله در تشکیل جفت می‌باشد و ضامن دست‌یابی رویان به منبع خون کافی برای برآورده ساختن نیازهای خود است. لذا می‌توان لانه‌گزینی را مرحله‌ای حیاتی در شروع بارداری در نظر گرفت (۳۲). متاسفانه در سال‌های اخیر شاهد رشد فزاینده ناباروری در بین زوجین هستیم به گونه-

ای که ۱۵ درصد زوجین از این مسئله رنج می‌برند (٤٠). خوشبختانه بخش قابل توجهی از این موارد به کمک روش‌های کمک‌باروری قابل درمان می‌باشند، اما با وجود همه‌ی این پیشرفت‌ها، تنها حدود ۳۰ درصد رویان‌هایی که در در مرحله تسهیم انتقال می‌یابند، موفق به لانه‌گزینی می‌شوند (۱۰، ٤١). یکی از راهکارهای مرسوم برای افزایش نرخ لانه‌گزینی، انتقال تعداد بالای رویان به رحم است که سبب افزایش نرخ چند قلوزایی می‌شود که به دلیل خطرات فراوان برای مادر و فرزند بی‌گمان یکی از چالش‌های رایج در درمان ناباروری است (٤١). این در حالی است که با کشت رویان تا مرحله بلاستوسیست و سپس انتقال آن در روز ۵ و ٦ شاهد میزان بالایی از لانه‌گزینی و تولد نوزاد زنده خواهیم بود، زیرا رویان‌ها در این مرحله، دارای پتانسیل تکوینی بالاتری نسبت به مراحل پیشین هستند. بنابراین می‌توان رویان مناسب تری را جهت انتقال به رحم انتخاب کرد. در این صورت بدون کاهش نرخ باروری می‌توان تعداد رویان‌های انتقالی را کاهش داد (۱۵). با این وجود هنوز هم نرخ بارداری در حدود ۳۵-۳۰ درصد می‌باشد (۲۳، ٣٤). یکی از دلایل این نرخ پایین، عدم مشابهت محیط آزمایشگاهی با محیط درون‌تنی (In vivo) است (٢٦، ٣٩).

برای شبیه‌سازی هرچه بیشتر محیط کشت رویان با شرایط فیزیولوژیک، تاکنون فاکتورهای محیطی مختلفی مورد بررسی قرار گرفته‌اند از جمله: pH، دما، میزان شدت نور محیط آزمایشگاه در زمان دستکاری رویان و میزان اکسیژن محیط کشت (۱۳).

در شرایط درون‌تنی به جز حبابچه‌های ششی هیچ یک از بافت‌های انسان در معرض غلظت بالای اکسیژن قرار ندارند. همچنین اندازه‌گیری میزان اکسیژن در سیستم تولیدمثلی ماده نیز نشان داد که به واقع گامت‌ها و رویان‌ها هرگز در معرض اکسیژن با غلظت بیش از ۱۰درصد نمی‌باشند (۲۱، ۲۸). برای مثال میزان اکسیژن در اویداکت خرگوش بین ۲ تا ٦ درصد و در اویداکت همستر و میمون رزوس در حدود ۸ درصد می‌باشد (۱).

مهم‌ترین اثر مثبت کشت رویان در اکسیژن با غلظت ۵٪ (شرایط هایپوکسی)، کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در محیط نمو رویان است (٤). گونه‌های فعال اکسیژن توانایی عبور از غشا را دارند و افزایش آن‌ها آسیب‌های جبران‌ناپذیری را به رویان می‌رساند (٦). از جمله موجب پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء سلولی، قطعه قطعه شدن DNA، اختلال در متابولیسم، کمبود ATP و توقف میتوزی می‌گردند (٤، ١٦، ٢٢).

اگرچه مطالعات انجام شده بر روی پستانداران گوناگون نشان داد که کاهش غلظت اکسیژن محیط کشت، دارای اثرات مثبتی بر نمو رویان می‌باشد و موجب ارتقاء بسیاری از پارامترهای کیفی آن مانند افزایش تعداد سلول‌های بلاستوسیست می‌شود (۷، ۱۲، ۳۹) اما با این وجود هنوز هم پاسخی قطعی به این پرسش که رویان در کدام مرحله از نمو نسبت به اثرات مخرب اکسیژن اتمسفری مقاوم است، داده نشده است. به طور مثال مطالعات نشان می‌دهد که مرحله پره‌نوکلئوس در موش حساس‌ترین مرحله در نمو رویان است به طوریکه اگر رویان‌ها تنها به مدت یک ساعت در معرض اکسیژن اتمسفری قرار گیرند در آینده اثرات جبران‌ناپذیری ازجمله کاهش نرخ تشکیل بلاستوسیست خواهند داشت (۳۰). همچنین اگر رویان‌ها از مرحله دوسلولی و یا حتی از مرحله هشت سلولی در میزان اکسیژن ۲۰ یا ۵ درصد کشت داده شوند تفاوتی در نتایج آن‌ها مشاهده نخواهد شد (۲۱). این در حالی‌است که آنالیز داده‌های حاصل از سایر مطالعات نشان دادند که رویان‌ها در تمام مراحل نمو خود مکانسیم‌های محدودی برای مقابله با شرایط

استرس‌زا دارند به طوریکه اگر ٤٨ ساعت پس از شروع کشت در شرایط هایپوکسی، رویان‌ها را به محیطی با غلظت اکسیژن اتمسفری منتقل کنیم سبب ایجاد آثار مخربی بر نمو رویان در مراحل بعدی می‌شود (۳۹).

از این رو در این پروژه در نظر داریم با آغاز کشت رویان‌ها از مرحله دوسلولی میزان حساسیت آن‌ها را نسبت به مقادیر بالای اکسیژن در این مرحله ارزیابی نماییم. برای این منظور پس از جمع‌آوری رویان‌های دوسلولی و کشت آن‌ها در دو گروه هایپوکسی و اتمسفری، به سنجش کیفیت بلاستوسیست‌های دو گروه از طریق پارامترهایی نظیر نرخ تشکیل بلاستوسیت، شمارش تعداد سلول‌ها و نرخ لانه‌گزینی می‌پردازیم.

مواد و روش کار

استحصال و کشت رویان: در این بررسی از موش‌های سوری نژاد NMRI با سن تقریبی ۸ تا ۱۲ هفته استفاده گردید. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بدون محدودیت از نظر آب و غذا نگه‌داری شدند. به منظور تحریک تخمک‌گذاری به هریک از موش‌های ماده IU ۷ هورمون (PMSG (Folligon®, A007A02, Intervet در روز اول به صورت درون صفاقی و با استفاده از سرنگ انسولین (0197-KpH) تزریق شد و ٤٨ ساعت پس از آن IU ۷ هورمون (hCG (Pregnyl®, 111, Darou Pakhsh تزریق گردید. پس از تزریق هورمون hCG هر یک از این موش‌ها به مدت یک شب در مجاورت یک موش نر (۱۰–۱۲ هفته) قرار داده شدند. صبح روز بعد موش‌های ماده از لحاظ پلاک واژنی بررسی گردیدند و موش‌های پلاک مثبت، باردار تلقی و از سایرین جدا گردیدند. این موش‌ها ٤٠ ساعت پس از تزریق hCG، به روش جابجایی مهره‌ی گردن کشته شدند. پس از تشریح، لوله‌های تخم‌بر جدا و درون پتری دیش حاوی قطره‌های محیط M2 (۳۱) به همراه سدیم پیروات (P-4562, Sigma) و آلبومین سرم گاوی (A6003, Sigma)، که سطح آن‌ها نیز با روغن معدنی استریل (M-5310, Sigma) پوشانده شده بود قرار گرفتند. در مرحله‌ی بعد، به کمک سوزن استریل در زیر استرئومیکروسکوپ (Nikon, SMZ1000, JAPAN) رویان‌های دوسلولی از لوله‌های تخم‌بر خارج شدند.

رویان‌های دو سلولی به‌دست آمده به طور کاملاً تصادفی به دو گروه تقسیم شدند و به منظور کشت به پتری دیش‌های چهارحفره‌ای حاوی محیط KSOM (۲٦) به همراه سدیم پیروات، آلبومین سرم گاوی، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)(E-4127, Sigma) و جنتامایسین (L0011-010, Bio- West) انتقال یافتند و سطح آن‌ها نیز با روغن معدنی استریل پوشانده شد. سپس یک گروه (اتمسفری) در انکوباتور (Memmert, Germany) با شرایط ۳۷°C، ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۸ درصد به مدت ۷۲–٤٨ ساعت قرار گرفت و گروه دوم (هایپوکسی) در انکوباتور با شرایط ۳۷°C، ۵ درصد CO_2 ، O_2 ۵ درصد، ۹۰ درصد N_2 و رطوبت ۹۸ درصد کشت داده شدند. پس از سپری شدن این بازه‌ی زمانی و محاسبه‌ی نرخ تشکیل بلاستوسیست و خروج از زونا، بلاستوسیست‌های هر تیمار از لحاظ تعداد سلول‌ها، و میزان لانه‌گزینی مورد بررسی قرار گرفتند.

رنگ‌آمیزی افتراقی: جهت رنگ‌آمیزی، در محیط تاریک، بلاستوسیست‌ها ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه در رنگ پروپیدیوم آیداید (P4170, Sigma) با غلظت ۱۰۰ µg/ml قرار داده شدند. سپس به رنگ هوخست ۳۳۲۵۸ (Calbiochem, 382061) با غلظت ۲۵ µg/ml منتقل گردیدند و به‌مدت ۱۲–۱۸

ساعت در یخچال نگهداری شدند. پس از سپری شدن این زمان، بلاستوسیست‌ها به کمک پیپت شیشه‌ای برداشته شدند و به لامی که روی آن یک قطره گلیسرول بود منتقل گردیدند و سطح آن‌ها نیز بوسیله یک لامل که اطراف آن به چسب مایع آغشته شده بود مهر و موم گردید. لام‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسنت (Nikon TI-U, Japan) با طول موج ۲۰۰–۴۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفتند. توده‌ی سلولی داخلی به رنگ آبی و توده سلول‌های خارجی به رنگ قرمز دیده شدند. سپس سلول‌ها به تفکیک شمارش گردیدند.

انتقال بلاستوسیست به مادرخوانده: همزمان با جفت‌گیری موش‌های دهنده، موش‌های مادر کاذب در مجاورت موش‌های نر وازکتومی شده قرار گرفتند. با مشاهده پلاک واژنی در روز بعد، روز اول حاملگی کاذب برای آن‌ها در نظر گرفته شد. در روز چهارم موش‌های ماده با تزریق درون صفاقی محلول بیهوشی، شامل کتامین (1110282-01, IMAN VA SABA) و زایلزین (1110284-02, IMAN VA SABA) بیهوش شدند. سپس موهای ناحیه‌ی پشتی تراشیده و در فاصله‌ی ۰/۵ cm از خط میانی پشتی، بین برآمدگی پشت و نقطه‌ی اتصال پا و شکم یک برش ایجاد گردید. پس از بیرون آوردن شاخ رحم، به کمک سرنگ انسولین سوراخی در دیواره‌ی رحم ایجاد شد و ۵ عدد از بلاستوسیست‌های یک تیمار بوسیله پیپت شیشه‌ای استریل به یکی از شاخ‌ها منتقل گردید. همین عمل برای تیمار بعدی در شاخ مقابل نیز تکرار شد. سپس شاخ‌های رحم به داخل حفره‌ی شکمی بازگردانده و ناحیه جراحی بخیه زده گردید.

بررسی لانه‌گزینی: سه روز پس از انتقال، این موش‌ها دوباره بیهوش شدند و ۲۰۰ میکرولیتر رنگ ایوانس بلو (E2139, SIGMA) ۱٪ به صورت درون وریدی به سیاهرگ دمی آن‌ها تزریق شد. پس از ۱۵ دقیقه موش‌های ماده به روش جابجایی مهره‌ی گردن کشته شدند و پس از تشریح نقاط لانه‌گزینی شده در رحم توسط رنگ ایوانس بلو به صورت دانه‌های تسبیح آبی رنگ نمایان شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای بررسی گروه‌های کنترل و تیمار از تست T-test استفاده گردید. تفاوت‌ها در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شدند. برای این منظور از نرم‌افزار آماری SPSS 16 استفاده گردید.

طراحی آزمایش: رویان‌های دوسلولی استحصال شده با کیفیت مناسب از لحاظ ظاهر انتخاب و بطور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول در میزان اکسیژن ۲۰٪ (اتمسفری) تا مرحله‌ی بلاستوسیست کشت داده شدند. گروه دوم در میزان اکسیژن ۵٪ (هایپوکسی) قرار گرفتند. پس از طی شدن ۴۸ ساعت، گروه‌ها از لحاظ پارامترهایی نظیر نرخ تشکیل بلاستوسیست، نرخ خروج از زونا ارزیابی گردیدند. سپس بلاستوسیست‌ها به منظور رنگ‌آمیزی افتراقی و شمارش سلول‌ها و انتقال مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج

نرخ تشکیل بلاستوسیست و خروج از زونا: نرخ تشکیل بلاستوسیست و خروج از زونا برای ۳۷۷ عدد رویان دوسلولی، ۴۸ ساعت پس از کشت در شرایط ذکر شده محاسبه شد. نتایج حاصله در جدول ۱ قابل مشاهده است. طبق نتایج بدست آمده، علاوه بر این که افزایش معنی‌داری در میزان تشکیل بلاستوسیست در شرایط هایپوکسی (۱/۴ ± ۷۸/۸۱) نسبت به اتمسفری (۲/۰۵ ± ۷۳/۰۵) مشاهده شد، نرخ خروج از زونا نیز در گروه دوم (۲/۶ ± ۵۶/۰۷) نسبت به گروه اول (۱/۵۹ ± ۴۹/۵۰)، به‌طور قابل ملاحظه‌ای بهبود یافت.

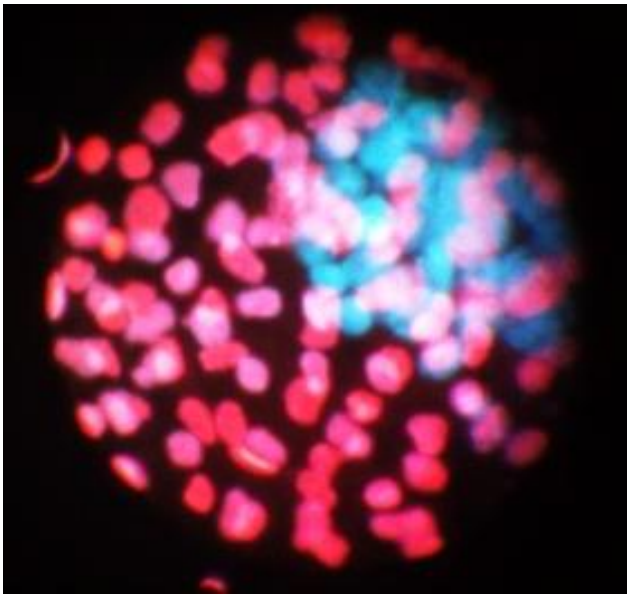
نرخ لانه‌گزینی: برای بررسی نرخ لانه‌گزینی ۱۰۰ عدد بلاستوسیت انتقال داده شد. سه روز پس از انتقال به

موش‌های مادر کاذب، این موش‌ها کشته و تشریح شدند و نقاط لانه‌گزینی شده مطابق (شکل ۱) شمارش گردید. نتایج حاصل از این بررسی‌ها در جدول ۲ قابل مشاهده است. بررسی نرخ لانه‌گزینی نشان می‌دهد که تیمار اعمال شده موجب افزایش معنی‌دار نرخ لانه‌گزینی (۳ ± ۵۹/۲۰) نسبت به گروه کنترل (۲/۵ ± ۲۹/۵۰) می‌شود (p <۰/۰۵).

اثر میزان اکسیژن محیط کشت بر کیفیت بلاستوسیست‌ها با استفاده از روش رنگ‌آمیزی افتراقی: در بررسی اثر میزان اکسیژن محیط کشت بر کیفیت بلاستوسیست، در مجموع ۷۷ بلاستوسیست، حاصل از کشت رویان‌های دوسلولی در شرایط ذکر شده رنگ‌آمیزی شدند (شکل ۲). تعداد سلول‌های ICM، TE و تعداد کل سلول‌های هر بلاستوسیست شمارش شد و نسبت تعداد سلول‌های ICM به کل سلول‌های بلاستوسیست نیز بعنوان ملاکی دیگر جهت ارزیابی کیفیت محاسبه گردید. جدول ۳ داده‌های حاصل از این آزمایش را نشان می‌دهد.

نتایج نشان داد که تعداد سلول‌های ICM، تعداد کل سلول‌های هر بلاستوسیست و همچنین نسبت تعداد سلول‌های ICM در بلاستوسیست‌های کشت داده شده در شرایط هایپوکسی به طور معنی‌داری نسبت به گروه اکسیژن ۲۰٪ افزایش می‌یابند (P <۰/۰۵).

شکل ۱- رنگ‌آمیزی با ایوانس بلو. نقاط برجسته مشخص شده با فلش، رویان‌های لانه‌گزینی شده را نشان می‌دهند.



شکل ۲- رنگ‌آمیزی افتراقی بلاستوسیست. سلول‌های ICM به رنگ آبی و سلول‌های TE به رنگ قرمز دیده می‌شوند (بزرگنمایی ٤٠٠×).

جدول ۱- بررسی نرخ تشکیل بلاستوسیست و خروج از زونا در رویان‌های کشت داده شده در غلظت اکسیژن ۵٪ و ۲۰٪

تیمار	تعداد رویان دوسلولی	تعداد بلاستوسیست‌های تشکیل شده	تعداد بلاستوسیست‌های خارج شده از زونا
۲۰٪ اکسیژن	۱۸۱	۱۳۲ (۷۳/۰۵ ± ۲/۰۵) [a]	۹۱ (٤۹/۵۰±۱/۵۹) [a]
۵٪ اکسیژن	۱۹٦	۱۵۳ (۷۸/۸۱ ±۱/٤) [b]	۱۰۹ (۵٦/۰۷±۲/٦) [b]

داده‌ها مجموع سه تکرار می‌باشند. در هر ستون [a] و [b] نسبت به‌هم دارای تفاوت معنی‌دار هستند ($p < ۰/۰۵$).

جدول ۲- بررسی تاثیر میزان اکسیژن محیط بر نرخ لانه‌گزینی پس از انتقال.

گروه مورد آزمایش	تعداد بلاستوسیست‌ها	نرخ لانه‌گزینی (٪)
۲۰٪ اکسیژن	۵۰	۲۹/۵۰±۲/۵۰ [a]
۵٪ اکسیژن	۵۰	۵۹/۲۰±۳ [b]

داده‌ها حاصل میانگین ۳ تکرار می‌باشند [a, b] تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها را نشان می‌دهند ($P < ۰/۰۵$).

جدول ۳- بررسی تأثیر شرایط هایپوکسی بر تعداد سلول‌های بلاستوسیست

تیمار	تعداد بلاستوسیست رنگ‌آمیزی شده	تعداد سلول‌های ICM	تعداد سلول‌های TE	تعداد کل سلول‌ها	تعداد سلول‌های ICM/ کل سلول‌ها
۲۰٪ اکسیژن	٤۰	۱۵±۱/۲۳[a]	۳۷/۹۰±۱/۰۸	۵۲/۹۰±۱/٤٦[a]	۰/۲۸±۰/۰۳[a]
۵٪ اکسیژن	۳۷	۲۰/۵۲±۱/۵۷[b]	۳۹/۳۳±۱/۱٦	۵۹/۸٦±۱/۷۹[b]	۰/۵٤±۰/۰٤[b]

داده‌ها مجموع سه بار تکرار می‌باشند. در هر ستون [a] و [b] نسبت بهم دارای تفاوت معنی‌دار هستند ($p < ۰/۰۵$).

بحث

در سال‌های اخیر اگرچه با کمک روش لقاح آزمایشگاهی و انتقال رویان‌های حاصل از آن، نرخ ناباروری در انسان کاهش چشمگیری داشته است، اما هنوز هم مرحله لانه‌گزینی به عنوان اصلی‌ترین چالش در دست‌یابی به موفقیت محسوب می‌شود (۲۳، ۳۷). یکی از دلایل عدم موفقیت در فرایند لانه‌گزینی کیفیت نامطلوب رویان‌های تولید شده در آزمایشگاه است (۳۷) که ناشی از عدم شباهت محیط کشت رویان در شرایط آزمایشگاهی با شرایط فیزیولوژیک است (۲۷). نمو رویان وابسته به پارامترهای متعددی است از جمله می‌توان به میزان اکسیژن محیط کشت که اثراتی حیاتی بر تولید، کیفیت و لانه‌گزینی رویان‌ها دارد اشاره نمود.

اکسیژن از طریق انتشار فعال یا غیرفعال در اختیار رویان قرار می‌گیرد و میزان آن توسط فاکتورهای فیزیکی و یا شیمیایی کنترل می‌شود. در ابتدای شکل گیری تکنیک IVF، آزمایشگاه‌هایی که در حوزه درمان ناباروری فعالیت داشتند، به کشت رویان در انکوباتورهایی با شرایط محیطی ۵-۶ درصد CO_2 اقدام نمودند (۸). در حالیکه میزان اکسیژن در شرایط فیزیولوژیک بسیار کمتر از این مقدار است (۱۱). ارزیابی‌های متعدد انجام شده نشان داد که در طول مرحله‌ی پیش از لانه‌گزینی، رحم و اویداکت، محیطی غنی از مولکول‌های احیا شده و اکسیژن کاهش یافته برای نمو رویان فراهم می‌کنند. شرایط این چنینی برای نمو و ارگانوژنز رویان بسیار حیاتی است زیرا رویان‌ها در این بازه زمانی مکانیسم‌های اندکی برای مقابله با استرس‌های اکسیداتیو دارند (٦). یکی از مضرات کشت رویان در شرایط اتمسفری افزایش تولید ترکیبات ROS (گونه‌های فعال اکسیژن) می‌باشد (٤، ١٦). این ترکیبات در حقیقت محصول جانبی کاهش اکسیژن هستند که به طور مستقیم از طریق متابولیسیم رویان و یا توسط شرایط نامناسب محیطی تولید می‌شوند (٦، ١٦). مطالعات پیشین نشان می‌دهد که افزایش میزان ROS سبب انواع مختلفی از آسیب‌های سلولی مانند آسیب به DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها می‌گردد (٤، ١٦، ٢٠) و همچنین دارای اثرات نامطلوبی برروی کیفیت رویان پستانداران می‌باشند (۲۱، ۳۱، ۳۵، ۳٦، ۳۹، ٤۲). برخلاف آنچه تصور می‌شود گونه‌های فعال اکسیژن در فرایند گامت‌زایی، لقاح، تنظیم سرعت نمو رویان دارای تاثیرات مثبتی می‌باشند و تنها زمانی ایجاد آسیب می‌کنند که تولید آن‌ها افزایش یابد اما مکانیسم‌های حذف به درستی عمل نکرده و سبب افزایش انباشتگی آن‌ها در محیط اطراف شود (٦). در سال ۲۰۰۰ میلادی Catt و Hemmen مشاهده نمودند که یکی از اصلی‌ترین راهکارهای کاهش تولید ROS، کاهش سطح اکسیژن محیط کشت در زمان لقاح و رشد رویان است (٤).

یافته‌های ما در این مطالعه نشان داد که با وجود آغاز کشت رویان‌ها از مرحله دوسلولی باز هم شاهد افزایش معنی‌دار نرخ تشکیل بلاستوسیست در شرایط هایپوکسی نسبت به گروه اتمسفری بودیم. این نتایج مشابه مطالعات پیشین است که بیان می‌دارد کشت رویان در شرایط هایپوکسی سبب افزایش نرخ لقاح، سرعت تسهیم، سرعت تشکیل حفره‌ی بلاستوسیست و در نهایت افزایش نرخ شکل‌گیری بلاستوسیت در محیط آزمایشگاه می‌شود (٤، ۲۹، ۳۸، ۳۹). در حالی که تلاش‌های kargence و همکارانش نشان داد که رویان موش در مرحله‌ی پره‌نوکلئوس نسبت به مقادیر بالای اکسیژن حساس‌تر است و با شروع کشت رویان از مراحل بعدی تفاوتی در نرخ تشکیل بلاستوسیست‌ها مشاهده نمی‌شود (۲۱). همچنین تحقیقات Pabon و همکارانش نیز نشان داد که اگر

رویان‌ها در این مرحله تنها به مدت یک ساعت در معرض اکسیژن اتمسفری قرار گیرند موجب اثرات جبران ناپذیری از جمله توقف رویان در مرحله دوسلولی، کاهش یا تاخیر در مرحله فشردگی در آینده می‌شود (۳۰). یکی از دلایل عنوان شده پیرامون آسیب‌پذیری بالای رویان‌ها در این مرحله مربوط به افزایش حساسیت ژنوم به اثرات اکسیژن محیط می-باشد (۱٦). مطالعات ما نیز همچون مطالعات صورت گرفته توسط Wale و همکارانش (۳۹) بر این حقیقت که رویان‌ها در تمام مراحل نمو خود نسبت به غلظت اکسیژن بالا آسیب‌پذیرند تاکید دارد. در توجیح تناقضات مشاهده شده با نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان به دلایلی چون تفاوت در محیط کشت، تفاوت در روش‌های کشت رویان در هر آزمایشگاه و گونه‌های مورد آزمایش اشاره نمود.

علاوه بر افزایش نرخ تشکیل بلاستوسیست، بررسی‌ها نشان می‌دهند که بلاستوسیت‌های پرورش یافته در شرایط هایپوکسی دارای کیفیت بالاتری نسبت به شرایط اتمسفری هستند به طوریکه بلاستوسیست‌ها در این شرایط دارای تعداد سلول‌های بیشتری نسبت به شرایط اتمسفری می‌باشند (۷، ۲۱، ۳۹). نتایج این بررسی نیز حاکی از افزایش میانگین تعداد کل سلول-ها، تعداد سلول‌های ICM و درصد ICM/Total در شرایط هایپوکسی بود. رویان در دوران پیش از لانه-گزینی تحت حوادث بی‌شماری قرار دارد از جمله شکل‌گیری پره‌نوکلئوس، فعالسازی ژنوم، تسهیم، فشرده‌سازی، جدایی رده‌ی سلولی و شکل‌گیری بلاستوسل که همه‌ی این موارد فعالیت‌هایی انرژی-خواه هستند (۵، ٤۳). در عین حال تحقیقات نشان می‌دهند، که کشت رویان در شرایط اتمسفری سبب آسیب رسیدن به ارگانل‌ها نیز می‌شود (۱٦).

یکی از اندامک‌هایی که دچار آسیب می‌شوند میتوکندری‌ها هستند (۲۵). میتوکندری‌ها به دلیل نداشتن سیستم ترمیمی DNA نسبت به میزان بالای ROS حساسیت بالایی دارند و ٤ برابر بیشتر نسبت به DNA هسته‌ای دچار آسیب می‌شوند (۱٦). میتوکندری‌ها وظیفه کد کردن آنزیم‌های دخیل در متابولیسم را به عهده دارند. در نتیجه آسیب به آن‌ها سبب کاهش تولید ATP می‌شود (۱۹). بنابراین رویان، انرژی لازم برای انجام فعالیت‌های حیاتی خود را مانند تقسیم سلولی و یا ترمیم آسیب‌های ناشی از ROS در اختیار ندارد. همچنین این آسیب‌ها در بلاستومرها تجمع پیدا می‌یابد و در نهایت موجب تاخیر در نمو، توقف، آپوپتوز و از دست رفتن سلول-های بلاستوسیست می‌گردد (۳، ۲٤، ۳۹، ٤۲). پس می‌توان نتیجه گرفت که در شرایط هایپوکسی به دلیل کاهش آسیب‌های وارد شده به رویان، ATP تولید شده توسط رویان تنها صرف متابولیسم و سایر فرایندهای سلولی مانند تقسیم سلولی می‌گردد و در نهایت موجب افزایش تعداد سلول‌ها می‌شود. علاوه بر دلایل فوق رویان‌ها در مراحل بعد از فشردگی از گلوکز به عنوان منبع اصلی کربن استفاده می‌کند و انتقال آن نیز توسط ناقل‌ها (GLUT) تسهیل می‌گردد. مطالعات نشان می‌دهد که در شرایط هایپوکسی رونویسی از ژن‌های ناقل گلوکز توسط فاکتور HIF1α (فاکتور رونویسی فعال شده در شرایط هایپوکسی) افزایش می‌یابد. لذا رویان منبع بیشتری از کربن جهت نمو در اختیار خواهد داشت (۱۸).

یکی از مراحلی که پیش از اتصال رویان به دیواره‌ی اندومتریوم رخ می‌دهد خروج بلاستوسیست از پوشش زوناست. فشار ناشی از افزایش تعداد سلول-های بلاستوسیست یکی از مهم‌ترین عوامل موثر بر این مرحله است. ما نیز در این مطالعه، شاهد ارتباط معنی دار بین افزایش تعداد سلوهای بلاستوسیت و بهبود نرخ خروج از زونا در گروه هایپوکسی بودیم. نتایج این مطالعه مشابه تحقیقات انجام شده توسط

Wale برروی موش (۳۹) و Booth برروی رویان-های خوک (۲) بود. این در حالی‌است که بررسی رویان‌های کشت شده در آزمایشگاه بیانگر کاهش نرخ خروج از زونا در بلاستوسیست‌های کشت شده در آزمایشگاه است (۳۳) که یکی از دلایل احتمالی آن کاهش تعداد سلول‌های بلاستوسیست‌هایی است که معمولا در اکسیژن اتمسفری پرورش داده می‌شوند. لانه‌گزینی ارتباطی به شدت تنظیم شده و دو طرفه بین بلاستوسیت و اندومتریوم آماده‌ی پذیرش است. بازه‌ی پذیرندگی رحم برای دریافت بلاستوسیست و شروع لانه‌گزینی بسیار محدود می‌باشد (٤٠). لذا تاخیر در هریک از مراحل این فرایند می‌تواند منجر به شکست در لانه‌گزینی شود. بنابراین به عنوان یک نتیجه‌ی کلی می‌توان عنوان نمود که شرایط هایپوکسی از طریق افزایش تعداد سلول‌های بلاستوسیست سبب بهبود نرخ خروج از زونا و در نهایت افزایش نرخ لانه‌گزینی می‌شود.

در مورد نرخ لانه‌گزینی مشاهدات ما نشان داد که میزان لانه‌گزینی در رویان‌های کشت شده در شرایط اکسیژن اتمسفری نسبت به گروه هایپوکسی به شدت کاهش می‌یابد. سایر مطالعات نیز نشان می‌دهند اگر میزان اکسیژن در طول لقاح و کشت رویان کاهش یابد سبب افزایش موفقیت در میزان لانه‌گزینی و بارداری (٤، ۱۷، ۲۹، ۳۸) در مقایسه با کشت رویان در شرایط اکسیژن اتمسفری می‌شود. علاوه بر دلایل فوق پیرامون تاثیر شرایط هایپوکسی در افزایش نرخ خروج از زونا و تاثیر آن بر بهبود لانه‌گزینی، می‌توان به تاثیر کاهش اکسیژن محیط بر افزایش تعداد سلول-های ICM بلاستوسیت اشاره نمود که در یافته‌های ما نیز مشاهده شد. ICM منبع ایجاد رویان می‌باشد و بین افزایش تعداد سلول‌های ICM و افزایش میزان لانه‌گزینی و زنده‌مانی رویان در مراحل بعدی ارتباط مستقیمی وجود دارد (۱۲). این در حالی‌است که کشت رویان در شرایط اکسیژن اتمسفری آسیب وارده به ICM مانند عدم تقارن سلول‌ها و واکوئل‌دار شدن آن‌ها را بیشتر می‌نماید (۹) و می‌تواند موجب کاهش نرخ لانه‌گزینی در بلاستوسیست‌ها می‌شود (١٤).

نتیجه‌گیری

در انتها می‌توان نتیجه گرفت که اگرچه یافته‌های پیشین مرحله پره‌نوکلئوس را به عنوان حساس‌ترین مرحله نسبت به اثرات مخرب اکسیژن معرفی نموده-اند اما داده‌های حاصل از شمارش سلولی و لانه‌گزینی در این پروژه اثبات نموده‌اند که حتی شروع کشت رویان‌ها از مرحله‌ی دو سلولی سبب کاهش اثرات مخرب اکسیژن در مراحل بعدی نمو نمی‌شود. بنابراین کشت رویان در شرایط هایپوکسی سبب به دست آوردن رویان‌هایی با کیفیت بهتر و میزان لانه-گزینی بالاترمی گردد.

منابع

1. Bavister B., 2004. Oxygen concentration and preimplantation development. *Reproductive Biomedicine Online*, 9(5): 484-486.

2. Booth P.J., Holm P., Callesen H., 2005. The effect of oxygen tension on porcine embryonic development is dependent on embryo type. *Theriogenology*, 63(7): 2040-2052.

3. Boron W.F., Boulpaep E.L., 2009. Medical physiology: a cellular and molecular approach. Saunders, Elsevier, Philadelphia, PA.

4. Catt J.W., Henman M., 1975. Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Human Reproduction*, 15(suppl 2): 199-206.

5. Chason R.J., Csokmay J., Segars J.H., DeCherney A.H., Armant D.R., 2011. Environmental and epigenetic effects upon preimplantation embryo metabolism and

6. Dennery P.A., 2007. Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 81(3): 155-162.

7. Dumoulin J.C., Meijers C.J., Bras M., Coonen E., Geraedts J.P. , Evers J.L., (1999. Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryoculture. *Human Reproduction*, 14(2): 465-469.

8. Edwards R., Purdy J., Steptoe P., Walters D., 1981. The growth of human preimplantation embryos in vitro. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 141(4): 408-416.

9. Enders A., Boatman D., Morgan P., Bavister B., (1989. Differentiation of blastocysts derived from in vitro-fertilized rhesus monkey ova. *Biology of Reproduction*, 41(4): 715-727.

10. Ferraretti A.P., Devroey P., Magli M.C., Gianaroli L., 2017. No need for luteal phase support in IVF cycles after mild stimulation: proof-of-concept study. *Reproductive Biomedicine Online*, 34: 162 - 165.

11. Fischer B., Bavister B., 1993. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99(2): 673-679.

12. Gardner D.K., Lane M., 1996. Fertilizationand early embryology: alleviation of the ‘2-cell block’and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Human Reproduction*, 11(12): 2703-2712.

13. Gardner D.K., Lane M., Stevens J., Schoolcraft W.B., 2001. Noninvasive assessment ofhuman embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertility and Sterility*, 76(6): 1175-1180.

14.Gardner R., Papaioannou V., 1975. Differentiation in the trophectoderm and inner cell mass. *The Early Development of Mammals*, 107-132.

15. Guerif F., Bidault R., Gasnier O., Couet M., Gervereau O., Lansac J., Royere D., 2004. Efficacy of blastocyst transfer after implantation failure. *Reproductive Biomedicine Online*, 9(6): 630-636.

16. Guerin P., El Mouatassim S., Menezo Y., 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*, 7(2): 175-189.

17. Guo N., Li Y., Ai J., Gu L., Chen W., Liu Q., 2014. Two different concentrations of oxygen for culturing precompaction stage embryos on human embryo development competence: a prospective randomized sibling-oocyte study. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(9): 6191.

18. Harvey A., Kind K., Pantaleon M., Arm strong D., Thompson J., 2004. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biology of Reproduction*, 71(4): 1108-1119.

19. Hyslop P., Hinshaw D., Halsey W., Schraufstätter I., Sauerheber R., Spragg R., Jackson J., Cochrane C., 1988. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are majorintracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 263(4): 1665-1675.

20. Johnson M.H., Nasresfahani M.H., 1994. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development

of preimplantation mammalian embryos in vitro? *Bioessays*, 16(1): 31-38.

21.Karagenc L., Sertkaya Z., Ciray N., Ulug U., Bahceci M., 2004. Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes. *Reproductive Biomedicine Online*, 9(4): 409-417.

22. Kasterstein E., Strassburger D., Komarovsky D., Bern O., Komsky A., Raziel A., Friedler S., Ron-El R., 2013. The effect of two distinct levels of oxygen concentration on embryo development in a sibling oocyte study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(8): 1073-1079.

23. Koot Y., Teklenburg G., Salker M., Brosens J.J., Macklon N., 2012. Molecular aspects of implantation failure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(12): 1943-1950.

24. Kovačič B., Vlaisavljević V., 2008. Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts invitro: a prospective study on sibling oocytes. *Reproductive Biomedicine Online*, 17(2): 229-236.

25. Kowaltowski A.J., Vercesi A.E., 1999. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(3): 463-471.

26. Lawitts J.A., Biggers J.D., 1993. Culture of preimplantation embryos. *Methods in enzymology*, 225: 153-164.

27. Maria J., Gámiz P., Albert C., Galán A., Viloria T., Pérez S., Romero J.L., Remohï J., 2013. Reduced oxygen tension improves embryo quality but not clinical pregnancy rates: a randomized clinical study into ovum donation cycles. *Fertility and Sterility*, 100(2): 402-407.

28. Mastroianni L., Jones R., 1965. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. *Journal of Reproduction and Fertility*, 9(1): 99-102.

29. Meintjes M., Chantilis S.J., Douglas J.D., Rodriguez A.J., Guerami A.R., Bookout D.M., Barnett B.D., Madden J.D., 2009. A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. *Human Reproduction*, 24(2): 300-307.

30. Pabon J.E., Findley W.E., Gibbons W.E., 1989. The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertility and Sterility*, 51(5): 896-900.

31. Quinn P., Barros C., Whittingham D., 1982. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 35(2):66**,** 161-168.

32. Salamonsen L.A., 1999. Role of proteases in implantation. *Reviews of Reproduction*, 4(1): 11-22.

33. Seshagiri P.B., Roy S. S., Sireesha G., Rao R.P., 2009. Cellular and molecular regulation of mammalian blastocyst hatching. *Journal of Reproductive Immunology*, 83(1): 79-84.

34. Shen X.F., Liu X., Zhang Y.H., Li N., Wang J.H., Liu F.J., 2016. Obesity impaired oocyte maturation and embryo implantation rate in Chinese women without polycystic ovary syndrome undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *International Journal of Clinical Experimental Medicine*, 9(10): 19995-20001.

35. Thompson J., Simpson A., Pugh P., Donnelly P., Tervit H., 1990. Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 89(2): 573-578.

36. Umaoka Y., Noda Y., Narimoto K., Mori T., 1992. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 31(1): 28-33.

37. Urman B., Yakin K., Balaban B., 2005. Recurrentimplantation failure in assisted reproduction: how to counsel and manage. B. Treatment options that have not been proven to benefit the couple. *Reproductive Biomedicine Online*, 11(3): 382-391.

38. Waldenström U., Engström A.B., Hellberg D., Nilsson S., 2009. Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study. *Fertility and Sterility*, 91(6): 2461-2465.

39. Wale P., Gardner D., 2010. Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients. *Reproductive Biomedicine Online*, 21(3): 402-410.

40. Wang H., Dey S.K., 2006. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Reviews Genetics*, 7(3): 185-199.

41. Weissman A., Biran G., Nahum H., Glezerman M., Levran D., 2008. Blastocyst culture and transfer: lessons from an unselected, difficult IVF population. *Reproductive Biomedicine Online*, 17(2): 220-228.

42. Yang Y., Xu Y., Ding C., Lin M., Awonuga A.O., Dai J., Puscheck E.E., Rappolee D.A., Zhou C., 2016. Comparison of 2, 5, and 20% O2 on the development of post-thaw human embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1-9.

43. Zernicka-Goetz M., Morris S.A., Bruce A.W., 2009. Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo. *Nature Reviews Genetics*, 10(7): 467-477.