

Original Article

Quantitative Expression of *BAG1*, *BAX* and *BCL-2* genes in Human Embryos with Different Fragmentation Grades Derived from ART

Azam Piltan, M.Sc.^{1,2}, Mehdi Totonchi, M.Sc.³, Mojtaba Rezazadeh, Ph.D.¹,
Hamid Gourabi, Ph.D.³, Leila Karimian, M.Sc.¹, Mohamadreza Baghaban Eslaminejad, Ph.D.^{1,4},
Poopak Eftekhari Yazdi, Ph.D.^{1*}

1. Embryology Department, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran

2. University of Science and Culture, Tehran, Iran

3. Genetics Department, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran

4. Department of Stem Cells and Developmental Biology, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

* Corresponding Address: P.O.Box: 19395-4644, Embryology Department, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran

Email: eftekhari@royaninstitute.org

Received: 7/Nov/2009, Accepted: 23/Feb/2010

Abstract

Objective: The purpose of this study was to evaluate the quantitative expressions of *BAG1*, *BAX* and *BCL-2* in human embryos with different fragmentation grades as derived from assisted reproduction technology (ART).

Materials and Methods: Fragmented and normal human 8-cell embryos were scored according to the degree of fragmentation with an inverted microscope and divided into four grades (grade I: no or minimal fragmentation (<5%), grade II: embryos with <25% fragmentation, grade III: embryos with >25% fragmentation and grade IV: apoptotic induced embryos with actinomycin D). In this study, TUNEL labeling was initially used to detect apoptosis, and then reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and quantitative PCR were used to define the quantitative expressions of experimental genes in human embryos with different fragmentation grades.

Results: The results of TUNEL labeling showed that embryos with higher fragmentation had a high number of apoptotic bodies. The results of RT-PCR and q-PCR analyses showed a significantly decreased amount of *BAG1* transcript expression from group I to group IV. The highest expression of *BAX* gene was observed in group II, however, the transcript of *BCL-2* gene was not observed in any of the experimental groups. The effect of actinomycin D on transcript expression amounts of experimental genes in apoptotic induced embryos (group IV) compared to control embryos (group I) showed a significant decrease.

Conclusion: mRNA expression of *BAG1* gene can be used as a good marker to detect apoptosis in human embryos. However, the transcript of *BCL-2* gene does not play a role in the detection of apoptosis in human embryos at the 8-cell stage.

Keywords: Human Embryo, Fragmentation, Apoptotic Genes, Actinomycin D, TUNEL Method

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 2, Summer 2010, Pages: 257-266

بیان کمی ژنهای *BAG1*، *BAX* و *BCL-2* در جنین‌های انسانی با درجات مختلف فراگمتاسیون حاصل از ART

اعظم پیلتن ^۱، مهدی توتونچی ^۲، مجتبی رضازاده ^۳، حمید گورابی ^۴، لیلی کریمیان ^۱، محمدرضا باغبان اسلامی نژاد ^۱، پویک افتخاری یزدی ^{۱*}، ^۱Ph.D.

۱. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه جنین‌شناسی، تهران، ایران
۲. دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران
۳. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه ژنتیک، تهران، ایران
۴. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه جنین‌شناسی
پست الکترونیک: [Email: eftekhari@royaninstitute.org](mailto:eftekhari@royaninstitute.org)

دریافت مقاله: ۸۸/۸/۱۶، پذیرش مقاله: ۸۸/۱۲/۴

چکیده

* **هدف:** بررسی بیان ژنهای *BAG1*، *BAX* و *BCL-2* در جنین‌های انسانی با درجات مختلف فراگمتاسیون حاصل از Assisted Reproduction Technology (ART)

* **مواد و روش‌ها:** با استفاده از میکروسکوپ معکوس و بر اساس درجه فراگمتاسیون، جنین‌های انسانی در مرحله هشت سلولی به چهار گروه تقسیم شدند: گروه I جنین‌هایی با کم‌ترین میزان فراگمتاسیون (کمتر از ۵ درصد)، گروه II جنین‌هایی با کم‌تر از ۲۵ درصد فراگمتاسیون، گروه III جنین‌هایی با بیشتر از ۲۵ درصد فراگمتاسیون و گروه IV جنین‌های الفاشده آپوتوزی با اکتینومایسین D. در این مطالعه در ابتدا به منظور تشخیص آپوتوز در جنین‌های آزمایشی رنگ‌آمیزی TUNEL انجام شد و بعد از آن به منظور بررسی بیان کمی ژن‌های مورد مطالعه در هر چهار گروه مختلف از روش (RT-PCR) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction و Quantitative PCR (q-PCR) استفاده شد.

* **یافته‌ها:** نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی TUNEL، نشان داد که جنین‌هایی با فراگمتاسیون بالا، دارای میزان بیشتری از اجسام آپوتوزی می‌باشند. نتایج حاصل از بررسی RT-PCR و q-PCR نشان داد که از گروه I به سمت گروه IV، از میزان بیان رونوشت *BAG1* به طور معنی‌داری کاسته می‌شود. همچنین بالاترین میزان بیان ژن *BAX* در گروه II مشاهده شد، در حالی که رونوشت ژن *BCL2* در هیچ یک از گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد. تاثیر اکتینومایسین D بر میزان بیان رونوشت ژن‌های مورد مطالعه در گروه جنین‌های الفاشده آپوتوزی (گروه IV) نسبت به گروه کنترل (گروه I) با کاهش معنی‌داری همراه بود.

* **نتیجه‌گیری:** بیان رونوشت ژن *BAG1*، می‌تواند به عنوان یک مارکر مناسب جهت تشخیص آپوتوز در جنین‌های انسانی به کار رود، در حالی که رونوشت ژن *BCL-2* در جنین‌های انسانی مرحله هشت سلولی نقشی در شناسایی آپوتوز ندارد.

* **کلیدواژگان:** جنین‌های انسانی، فراگمتاسیون، ژن‌های آپوتوزی، اکتینومایسین D، روش TUNEL

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات: ۲۶۶-۲۵۷

مقدمه

۵ درصد) است که به صورت متمرکز در زیر زونا پلوسیدا و در فضای Perivitelline قرار گرفته است. حال اگر فراگمت‌های کوچک و پراکنده‌ای (حدود ۲۰ درصد کل جنین) بین بلاستومرها مشاهده شود، چنین جنینی در گروه II جای دارد. در الگوی III فراگمت‌های بزرگی حدود ۳۵ تا ۵۰ درصد فضای جنین را اشغال کرده‌اند و در الگوی IV فراگمت‌ها به شکل گرانوله و نکروتیک بوده که به طور تقریب کل فضای جنین را پوشانده‌اند (۱). از جمله عوامل متعددی که سبب ایجاد فراگمت در جنین می‌شود شامل: شرایط نامطلوب محیط کشت از قبیل کمبود فاکتورهای رشد و بقای سلول، افزایش H_2O_2 و رادیکال‌های آزاد، حضور اسپرماتوزوای اضافی در محیط کشت، بلوغ شیمیایی غیرطبیعی و زود هنگام تخمک‌ها در اثر تحریک تخمک‌گذاری و ناهنجاری‌های کروموزومی و هسته‌ای در سلول‌های جنینی (۳).

در مورد مکانیسم‌های ایجاد فراگمت‌اسیون نظرات، مختلفی وجود دارد. اکثر محققانی که در این زمینه مطالعه می‌کنند معتقدند که این فرایند حاصل پدیده مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده Programmed Cell Death (PCD) یا آپوتوز می‌باشد (۱، ۲). هاردی

فراگمت‌اسیون به عنوان یک پدیده شایع میان جنین‌های انسانی در مرحله پیش از لانه‌گزینی شناخته شده است (۱). فراگمت‌اسیون اشاره به حالتی دارد که در آن قطعاتی از سلول‌ها که کوچک‌تر از اندازه بلاستومرهای طبیعی و سالم هستند در جنین دیده می‌شوند (۲). در این پدیده که به تقریب بیش از ۵۰ درصد جنین‌های حاصل از *In Vitro Fertilization (IVF)* و *Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)* را در بر می‌گیرد، برخی از بلاستومرهای یک جنین به صورت قطعه‌قطعه درآمده یا قطعاتی از بلاستومرها جدا شده و در لابه‌لای سایر بلاستومرها قرار می‌گیرند. طی مراحل بعدی تکوین، جنین‌های فراگمت شده دچار اختلال شده و اغلب منجر به توقف در کلیواژ و تخریب جنین می‌شود. به محض انتقال این جنین‌ها، پتانسیل تکوینی‌شان کاهش یافته و به کاهش بارداری منجر می‌شود. طی تحقیقی که افتخاری یزدی و همکاران انجام دادند، درجات مختلف فراگمت‌اسیون بدین گونه شرح داده شد: جنین نوع I دارای کمترین میزان فراگمت (کمتر از

بیان ژن‌های آپوپتوزی در جنین‌های فراگمنته

از آزمایشگاه جنین شناسی پژوهشگاه رویان دریافت شد. تحریک تخمدانی به صورت Long Protocol با استفاده از آگونیست (GnRH) Buserelin, Hoechst,) Gonadotropin-Releasing Hormone human Menopausal Gonadotropins و (Frankfort, Germany (hMG) (Organon, Holland) انجام شد. ۳۶ ساعت بعد از تزریق hCG (Organon, Holland) و تخمک‌گیری، تخمک‌ها به روش IVF یا ICSI در محیط G1™ver5 (Vitrolife, Sweden) بارور و کشت شدند. بعد از گذشت سه روز (۷۲ ساعت) در محیط *in vitro* جنین‌هایی با بهترین کیفیت برای انتقال به بیماران و یا انجماد انتخاب شدند. بعد از انتقال، جنین‌های سه روزه اضافی با کیفیت پایین و یا جنین‌هایی با کیفیت خوب که والدین آنها رضایت به انجماد نداشتند، با رضایت آگاهانه بیماران جهت مطالعه به آزمایشگاه تحقیقات انتقال یافتند. در آزمایشگاه تحقیقات ابتدا جنین‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Nikon TE 300, Japan) و عدسی شیئی ۴۰× ارزیابی شده و بر اساس میزان فراگمتاسیون نسبت به فضای کل جنینی (به صورت درصد) درجه‌بندی شدند. بر این اساس جنین‌های مورد مطالعه به چهار گروه تقسیم شدند (۱) (شکل ۱):

- I. گروه جنین‌های دارای کمترین میزان فراگمت (> ۵ درصد) یا کنترل منفی
- II. گروه جنین‌هایی با کمتر از ۲۵ درصد فراگمتاسیون
- III. گروه جنین‌هایی با بیشتر از ۲۵ درصد فراگمتاسیون
- IV. گروه جنین‌هایی که به واسطه یک ماده القاگر آپوپتوز به نام اکتینومایسین D (Sigma, USA) به مدت ۱۶ ساعت با غلظت ۰/۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، به صورت آپوپتوزی درآمدند. در هر گروه تعداد ۳۵-۳۰ جنین در هر بار تکرار استفاده شد و تعداد تکرارها ۳ مرتبه بود.

رنگ‌آمیزی TUNEL

تعداد ۲۰ جنین در مرحله هشت سلولی با کیت (In Situ Cell Death Detection System, Roche, Germany) TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transfrase - Mediated dUTP nick - End Labelin)

رنگ‌آمیزی شدند. این جنین‌ها متعلق به هر چهار گروه مورد مطالعه بوده و از هر گروه پنج جنین رنگ‌آمیزی شدند. این نوع رنگ‌آمیزی برای مشخص کردن قطعه‌قطعه شدن منظم DNA در جریان مرگ سلولی به کار می‌رود. در این تکنیک می‌توان به منظور تشخیص آپوپتوز از نکروز از رنگ پروپیدیوم یدید (Propidium Iodide, Sigma) استفاده کرد. در ابتدا جنین‌ها در محلول پروپیدیوم یدید به میزان ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محیط (HTF) Human Tubal Fluid به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. بعد از سه مرتبه شست‌وشو در بافر فسفات (Phosphate Buffered Saline; PBS)، عمل فیکس در محلول پارافرمالید ۴ درصد (Sigma, USA) در بافر فسفات به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. سپس جنین‌ها در PBS حاوی ۰/۳ درصد پلی‌وینیل‌پیرولیدون (PVP, Sigma) شش مرتبه شست‌وشو داده شده و به مدت دو دقیقه در محلول تریتون ۰/۱ درصد روی یخ قرار گرفتند. پس از سه بار شست‌وشو در محلول PBS/PVP جنین‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محلول TUNEL حاوی ۵ میکرولیتر محلول آنزیمی و ۴۵ میکرولیتر محلول نشان‌دار قرار گرفتند و در نهایت با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شدند.

و همکارانش نشان دادند که در بلاستوسیت‌های جنین انسان تعدادی سلول که ظاهر آپوپتوز دارند مشاهده می‌شوند. وی هم‌چنین نشان داد که جنین‌هایی که در مراحل آغازین کلیواژ دچار توقف تکوین می‌شوند، دارای سلول‌هایی هستند که ظاهر آپوپتوزی را نشان می‌دهند (۳).

در این نوع مرگ سلولی، انتقال فسفاتیدیل سرین از بخش داخلی به بخش خارجی (۴) در مراحل اولیه و وزیکوله شدن غشا، تراکم کروماتین، قطعه‌قطعه شدن DNA و تشکیل اجسام آپوپتوتیک در مراحل نهایی آن دیده می‌شود (۷-۵).

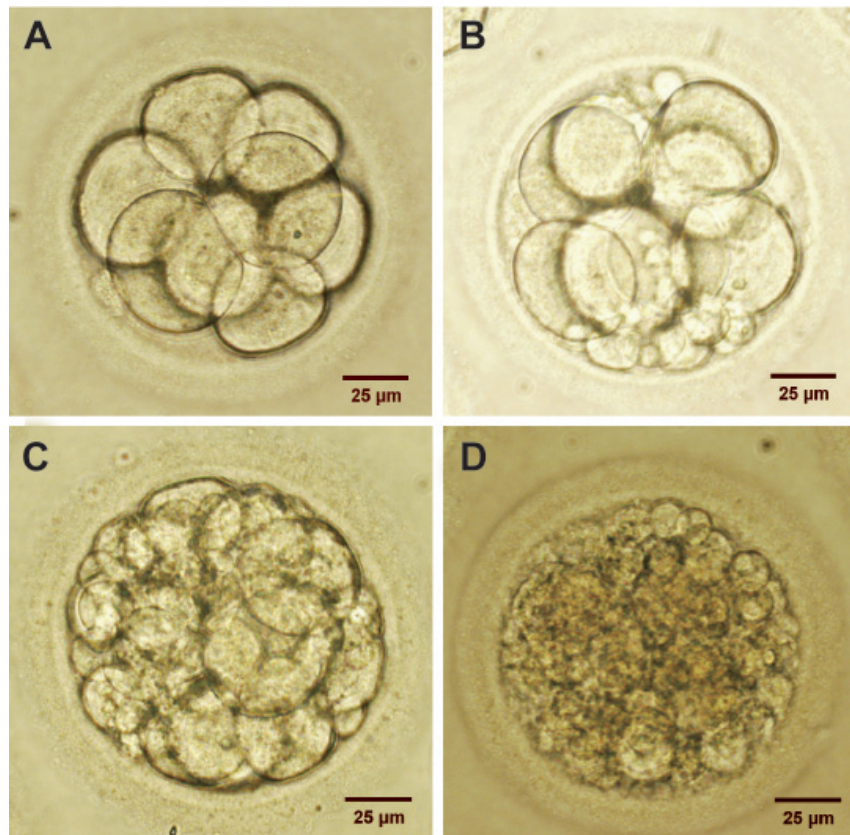
مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده به طور دقیق به کنش و برهم کنش برخی از محصولات ژنی بستگی دارد که فرایند خودکشی سلول را فعال یا مهار می‌کنند. بیشتر از ۱۰۰ ژن مختلف شناسایی شده که بر بقای سلول تاثیر می‌گذارند. دو خانواده بزرگ ژنی *BCL-2* و *Caspases* در مسیر آپوپتوز درگیر می‌باشند. خانواده *Bcl-2* دارای دو گروه پروتئینی پیش‌برنده آپوپتوز (-Pro-Apoptot) *ic* Proteins و مهارکننده آپوپتوز (*Anti-Apoptotic Proteins*) است. نسبت متوسط این پروتئین‌ها سرنوشت یک سلول را تعیین می‌کند (۸، ۹). پروتئین *BCL-2* یک مولکول *prosurvival* است. این پروتئین غشایی در پوشش هسته و میتوکندری قرار گرفته است و از طریق اتصال به *BAX* وظیفه خود را انجام می‌دهد (۶). پروتئین *BAG1*، از اعضای آنتی‌آپوپتوز خانواده *BCL-2* بوده و آپوپتوز را مهار می‌کند (۲). پروتئین *BAX*، از نظر ساختاری هومولوگ *BCL-2* بوده و پیش‌برنده آپوپتوز می‌باشد که در سیتوپلاسم یا غشای سلولی قرار می‌گیرد. بنابراین از نظر عملکردی این پروتئین آنتاگونیست (*Antagonist*) نقش حفاظتی *BCL-2* می‌باشد (۱۰). مولکول‌های کاسپاز به صورت پیش‌ساز غیرفعال ساخته شده و تنها بعد از دریافت یک سیگنال مرگ توسط سلول، فعال خواهند شد. کاسپاز-۳، کاسپاز اجرایی بوده که توسط کاسپازهای آغازگر فعال می‌شود و پروتئین‌های بقا و اینتگریتی سلول را می‌شکند (۱۱، ۱۲). سیگنال‌های مرگ، سبب راه‌اندازی پروتئین‌های آپوپتوزی خانواده *BCL-2* (به ویژه *BAX*) می‌گردند (۵، ۱۳). این پروتئین‌ها موجب تراوش سیتوکروم C از میتوکندری به بیرون می‌شوند. سیتوکروم C آزاد شده و فاکتور فعال‌کننده پروتئاز آپوپتوزی (*Apaf-1*) به کاسپاز ۹ متصل گشته و آبشار کاسپازی (*Caspase Cascade*) را فعال می‌کند که منجر به مرگ سلولی خواهد شد (۷، ۱۶-۱۴).

در مطالعه حاضر، برآئیم تا الگوی بیان برخی از مهارکننده‌های مرگ سلولی (*BCL-2*، *BAG1*) و القاگرهای مرگ سلولی (*BAX*) را در جنین‌های فراگمنته انسانی با درجات مختلف فراگمتاسیون در مرحله هشت سلولی بررسی کنیم. به عبارت دیگر هدف ما از این مطالعه این است که آیا بیان mRNA ژن‌های دخیل در آپوپتوز (*BAG1*، *BCL-2*، *BAX*) می‌تواند به عنوان مارکر مناسب جهت تشخیص آپوپتوز در جنین‌های فراگمنته انسانی استفاده شود؟

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری جنین‌های انسانی و تقسیم‌بندی آنها

با کسب رضایت از بیماران تحت درمان (ART) Assisted Reproduction Technology و (ICSI) Intra Cytoplasmic Sperm Injection (IVF)، *In Vitro Fertilization* و تایید کمیته اخلاق پزشکی پژوهشگاه رویان، تعداد تقریبی ۴۰۰ جنین انسانی اضافی فراگمت با شرایط زیر



شکل ۱: توصیف جنین‌های هشت سلولی انسانی بر اساس الگوی فراگمنتاسیون. A: گروه I با کمترین میزان فراگمنت (> ۵ درصد)، B: گروه II با < ۲۵ درصد، C: گروه III با < ۲۵ درصد، D: گروه IV که با اکتینومایسین D آپوتوز در آنها القا شده است.

استفاده شد (۱۷).

به طور خلاصه جنین‌های جمع‌آوری شده در هر گروه به تعداد ۳۰-۴۰ عدد، در ۳۰ میکرولیتر محلول بافری حاوی (0.01mM Tris-HCl, 3mM EDTA, 0.5% SDS, 10µg glycogen) حل شدند. بعد از چند بار انجماد-ذوب کردن جنین‌ها، ۱/۵ میکرولیتر پروتیناز K و (۱۰ میکروگرم بر میکرولیتر) به هر مخلوط واکنش افزوده شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس ۷۰ میکرولیتر محلول لیزکننده حاوی گوانیدین تیوسیانات (4M)، ۲- بتا مرکاپتواتانول (0.1M) و سدیم استات (0.4M) به مخلوط واکنش اضافه شد.

پس از رنگ‌آمیزی تنها بلاستومرایی که TUNEL مثبت و پروپیدیوم یدید منفی بود، به عنوان سلول‌های آپوتوتیک محسوب شدند.

بررسی بیان ژن‌های تنظیم‌کننده مرگ سلولی در جنین‌های انسانی از روش نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (RT-PCR) و Real-Time PCR برای ارزیابی بیان رونوشت‌های (Transcripts) ویژه آپوتوزی استفاده شد. برای پی‌بردن به بیان ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق از پرایمرهای جدول ۱ استفاده گردید.

استخراج RNA از جنین‌های هشت سلولی با درجات گوناگون فراگمنتاسیون
به منظور جدا سازی RNA از این سلول‌ها از روش لیو با کمی تغییر

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در روش نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Real-Time RT-PCR, RT-PCR)

Gene name	Sequence of primers (5'-3')	Product size (bp)	Genbank Code
rh-BAX-F rh-BAX-R	TTTGCTTCAGGGTTTCATCC CAGCTCCATGTTACTGTCCA	153 bp	NM-004323
rh-BCL2-F rh-BCL2-R	GTGGATGACTGAGTACCTGA AGCCAGGAGAAATCAAACAGA	119 bp	NM-000633
rh-BAG1-F rh-BAG1-R	AGTGAACCAAGTTGTCCAAGA GTGTTCCATTTCCCTCAGAGA	111 bp	NM-004324

(واسرشتگی اولیه) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، Denaturation هر سیکل در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، Annealing در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، Extension در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد جدا شدند و با اتیدیوم بروماید قابل رویت گردیدند. سپس با دستگاه ترانس لومینوتور UV (Uvidoc, UK) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بررسی بیان کمی ژن‌های تنظیمی مرگ سلولی توسط Real-Time PCR

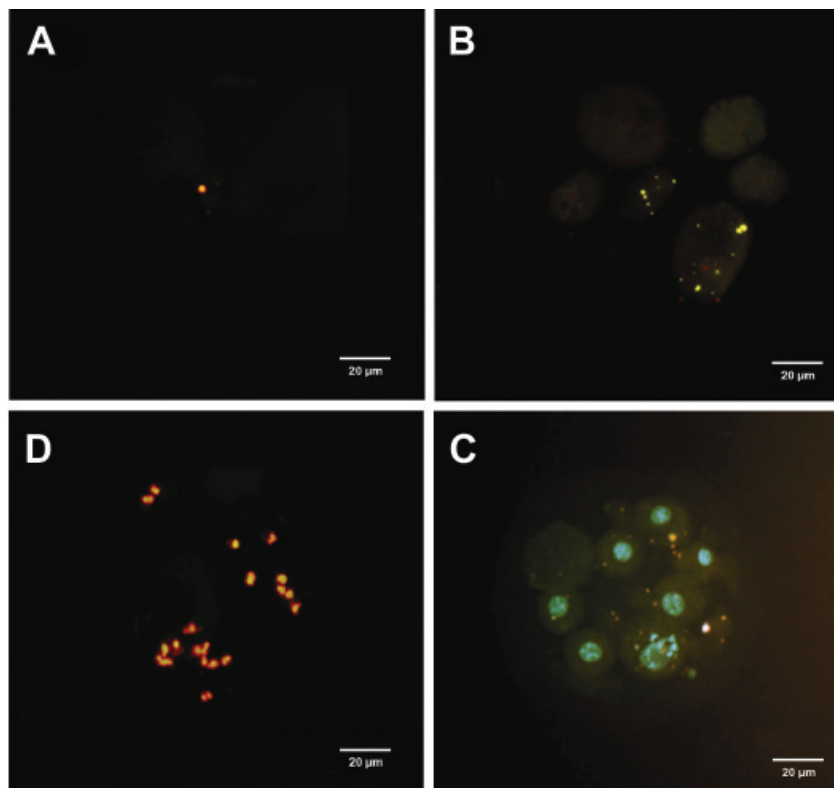
جهت انجام واکنش‌های Real-Time PCR از دستگاه Applied Biosystem Real-Time PCR مدل ۷۵۰۰ (ABI) استفاده شد. واکنش PCR با ۲ میکرولیتر از cDNA سنتز شده، پرایمرهای جدول ۱ و Power SYBR Green PCR Master Mix با برنامه واسرشتگی اولیه ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، Denaturation هر سیکل ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، Annealing و Extension و نیز خواندن فلورسنت تاییده شده در پایان هر چرخه، ۶۰ ثانیه‌ای در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در پایان، برای نشان دادن اختصاصی بودن تولید محصولات PCR، یک مرحله با عنوان (Melting Curve) یا منحنی ذوب دمایی به برنامه اضافه شد. برای افزایش دقت، هر واکنش به صورت دوتایی انجام گرفت. از هر گروه آزمایشی نیز سه تکرار مستقل زیستی در نظر گرفته شده بود.

اسید نوکلئیک سلولی با ۱۰۰ میکرولیتر فنول-کلروفرم-ایزوامیل‌الکل به ترتیب از چپ به راست به نسبت (۱:۲۴:۲۵) استخراج گردید، ریونوکلئک اسید (RNA) واقع در فاز آبی با حجم مساوی از محلول ایزوپروپانل رسوب داده و با محلول اتانل ۷۰ درصد شسته شد. در نهایت ۲۰ میکرولیتر آب تیمار شده با دی‌اتیل پیروکربنات (Diethylpyr Carborate; DEPC) به رسوب اضافه و در آن حل شد. سپس RNA استخراج شده به منظور حذف آلودگی DNA ژنومی تحت تیمار با DNase I قرار گرفت و خلوص و غلظت RNA استخراج شده نیز با روش اسپکتروفوتومتری تعیین گردید.

سنتز cDNA و انجام نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (RT-PCR)

۱ میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از پرایمر Random Hexamer و کیت (K 1632 Fermentas) Revert Aid™ H-Minus First Strand cDNA Synthesis نسخه‌برداری معکوس گردید.

در اینجا علاوه بر نمونه‌ای که تمام مواد لازم برای واکنش را دارا بود (RT⁺)، از نمونه کنترل منفی (RT⁻) که فاقد آنزیم RT بود نیز استفاده شد تا آلودگی احتمالی نمونه به DNA مورد ارزیابی قرار گیرد. سپس از cDNA تولید شده به عنوان الگو برای PCR استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های آپوپتوزی انجام شد. شرایط PCR به صورت Initiation Denaturation



تصویر ۲: شناسایی آپوپتوز در جنین‌های انسانی با استفاده از رنگ آمیزی TUNEL (A). جنین‌های نرمال و یا کمتر از ۵ درصد فراگمنتاسیون. (B) جنین‌های با کمتر از ۲۵ درصد فراگمنتاسیون. (C) جنین‌های با بیشتر از ۲۵ درصد فراگمنتاسیون. (D) جنین‌هایی که آپوپتوز در آنها توسط اکتینو مایسین D القا شده است.

روش آماری

نتایج حاصل با استفاده از تست آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA)، آزمون تعقیبی Tukey و در سطح معنی داری $p < 0.05$ مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها

تست TUNEL بر روی جنین‌های طبیعی و فراگمنته انسانی در این مطالعه به منظور تأیید آپوپتوزی بودن جنین‌ها در گروه‌های چهارگانه فراگمنته‌سایون از رنگ TUNEL استفاده شد. در ابتدا جنین‌های انسانی با استفاده از میکروسکوپ معکوس به صورت جنین‌های طبیعی و فراگمنته با درجات مختلف دسته‌بندی شدند. تکنیک TUNEL بر همه گروه‌ها انجام شد تا تعیین کند که آیا فراگمنته‌سایون با شکست DNA ژنومی آپوپتوزی همراه است یا خیر؟ نتایج حاصل از این رنگ‌آمیزی در شکل ۲ آمده است.

بر اساس نتایج به دست آمده، بیشترین میزان سلول‌های آپوپتوتیک در جنین‌های گروه IV (جنین‌هایی که در آنها آپوپتوز توسط ماده اکتینومایسین D القا شده بود) است. این رنگ‌آمیزی نشان داد که آنزیم ترمینال داکسی نوکلئوتید ترانسفراز (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase; TDT) سبب افزودن FITC- dUTP به انتهای ۳' - هیدروکسیل DNA در طی فراگمنته‌سایون DNA آپوپتوتیکی می‌شود. حدود ۲۰ جنین با این

تکنیک رنگ‌آمیزی شدند. نتایج حاصل از این تکنیک تأیید می‌کند که جنین‌هایی با میزان بیشتر فراگمنته‌سایون، نسبت به جنین‌های طبیعی و یا فراگمنته‌سایون کمتر، در شرایط رنگ‌آمیزی TUNEL، متحمل درجه بالاتر آپوپتوز می‌گردند و با توجه به این مطلب که آپوپتوز در گروه IV القا شده بود، این گروه به عنوان گروه کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

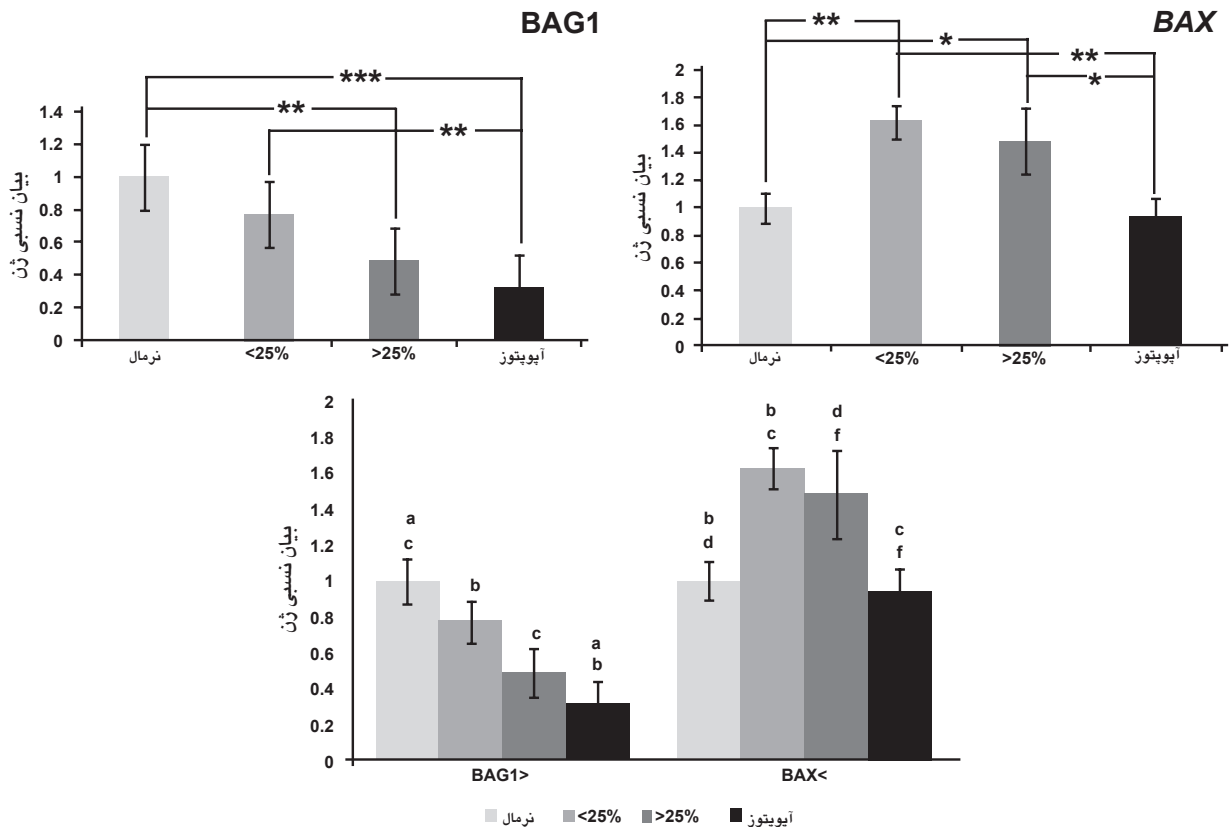
بیان ژن‌های آنتی و پرو آپوپتوز در جنین‌های فراگمنته انسانی جنین‌های انسانی در هر چهار گروه آزمایشی ($n = 30-40$) به منظور تشخیص بیان ژن‌های مرتبط به آپوپتوز با استفاده از RT-PCR و سپس Real-Time PCR مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایشات با سه بار تکرار در سه مخزن (Pool) جداگانه جنینی در مرحله هشت سلولی انجام شد. نتایج حاصل، نشان داد که رونوشت‌های رمزگردانی شده توسط ژن‌های *BAG1* و *BAX* در جنین‌های هشت سلولی انسانی حضور دارند، در حالی که رونوشت ژن *BCL-2* در هیچ یک از جنین‌ها مشاهده نشد. از نمونه فیبروبلاست انسانی به عنوان کنترل مثبت پرایمرها و ژن *GAPDH* به عنوان کنترل مثبت آزمایش و همچنین به عنوان نرمالایزر استفاده شد (شکل ۳A). محصولات تکثیر شده در RT-PCR - به واسطه اندازه آنها - بر روی ژل آگارز ۲ درصد مشخص شده و بعد از رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید مشاهده گشتند. نتایج حاصل در شکل ۳ نشان داده شده است.



B

بیان ژن‌های آپوپتوزی				
نام ژن	کمتر از ۵ درصد آپوپتوز	کمتر از ۲۵ درصد آپوپتوز	بیشتر از ۲۵ درصد آپوپتوز	جنین‌های القای آپوپتوز شده
BAG1	+	+	+	+
BCL2	-	-	-	-
BAX	+	+	+	+

شکل ۳: (A) شناسایی محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۲ درصد. هر ستون نشان‌دهنده: ۱. جنین‌های نرمال و یا با کمتر از ۵ درصد فراگمنته‌سایون، ۲. جنین‌های حاوی کمتر از ۲۵ درصد فراگمنته‌سایون، ۳. جنین‌های حاوی بیشتر از ۲۵ درصد فراگمنته‌سایون، ۴. جنین‌هایی که در آنها آپوپتوز توسط اکتینومایسین D القا شده است، سلول‌های فیبروبلاست انسانی که به عنوان کنترل مثبت استفاده شده است، کنترل منفی RT-minus، PCR (blank)، گروه RT منفی جهت اطمینان از آلودگی DNA می‌باشد. (B) نتایج حاصل از آنالیز RT-PCR ژن‌های *BAG1* و *BAX*، *BCL-2* در جنین‌های انسانی فراگمنته.



شکل ۴: میزان نسبی رونوشت ژن‌های *BAG1* و *BAX* در جنین‌های انسانی با درجات مختلف فراگمنته‌سایون. در شکل A و B علامت یک ستاره (*) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ($p < 0.05$), دو ستاره (**) در سطح ($p < 0.01$) و سه ستاره (***) در سطح ($p < 0.001$) می‌باشند. در شکل C مقایسه بیان رونوشت‌های *BAG1* و *BAX* در یک نمای کلی نشان داده شده است، حروف مشابه به هم نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در میزان بیان ژن‌هاست. حرف a اختلاف در سطح ($p < 0.001$), حروف b و c در سطح ($p < 0.01$), حروف d و f در سطح ($p < 0.05$) معنی‌دار است.

بحث

در مطالعه حاضر، مشابه مطالعات قبلی (۴، ۶، ۸) با استفاده از تکنیک رنگ‌آمیزی TUNEL ثابت شد که فراگمنته‌سایون در جنین‌های انسانی با فرایند آپوپتوز ارتباط دارد، به طوری که در جنین‌های گروه I که دارای کمترین میزان فراگمنته بودند تعداد هسته‌های TUNEL مثبت نیز کم بوده و هر چه به سمت گروه IV که در آنها درجه فراگمنته‌سایون شدیدتر می‌شد، پیش می‌رفتیم به تعداد هسته‌های TUNEL مثبت افزوده می‌شد. نکته‌ای که در اینجا حایز اهمیت است این است که هر چند رنگ‌آمیزی TUNEL می‌تواند شکست‌های ۳'-OH رشته DNA را شناسایی کند اما این شکست‌ها ممکن است با روشی غیر از هضم اندونوکلازای مرتبط با آپوپتوز ایجاد شده باشند. بنابراین روش TUNEL مدرک استواری برای تایید وقوع آپوپتوز نیست؛ با این حال نمی‌توان این احتمال را رد کرد که برخی از فراگمنته‌سایون‌های شناسایی‌شده DNA اثری از فرایند آپوپتوز باشند.

افزون بر یافته‌های مورفولوژیک که نشان‌دهنده‌ی تاثیر پدیده آپوپتوز در بروز فراگمنته‌های جنین‌های پیش از لانه‌گزینی هستند، مطالعات بیوشیمیایی و ژنتیکی‌ای نیز در این زمینه صورت گرفته

بیان ژن *BAG1* در جنین‌های با درجات مختلف فراگمنته‌سایون
 نتایج حاصل از آنالیز Real-Time PCR نشان داد بالاترین میزان بیان رونوشت ژن آنتی آپوپتوز *BAG1* در گروه I و کمترین مقدار آن در گروه IV می‌باشد. بیان رونوشت ژن *BAG1* با کیفیت مورفولوژیکی جنین ارتباط داشت، به طوری که بیان *BAG1* در جنین‌های هشت سلولی با کیفیت مناسب (گروه I) به شکل معنی‌دار ($p < 0.001$) بالاتر از میزان بیان آن در جنین‌های با کیفیت پایین (گروه IV) بود و هر چه از گروه I به سمت گروه IV پیش می‌رفتیم، از میزان بیان رونوشت *BAG1* کاسته می‌شد (شکل ۴A). همچنین کاهش بیان mRNA ژن *BAG1* در گروه III نسبت به گروه I و در گروه IV نسبت به گروه II معنی‌دار بود ($p < 0.01$).

بیان ژن *BAX* در جنین‌های با درجات مختلف فراگمنته‌سایون
 میزان بیان رونوشت ژن *BAX* در گروه II نسبت به گروه I در سطح ($p < 0.01$) و در گروه III نسبت به گروه I در سطح ($p < 0.05$) به شکل معنی‌دار افزایش یافت، اما گروه IV نسبت به گروه II در سطح ($p < 0.01$) و گروه IV نسبت به گروه III در سطح ($p < 0.05$) به شکل معنی‌دار کاهش بیان نشان داد (شکل ۴B).

است. برای اثبات پدیده آپوپتوز در جنین‌ها، دانشمندان مبادرت به کشف بیان ژن‌های دخیل در مرگ سلولی و محصولات آنها در سلول‌های جنینی و فراگمت‌ها کرده‌اند تا دلایل کافی برای اثبات فرضیه خود به دست آورند. همان‌گونه که پیش‌تر نیز گفته شد، به طور کلی دو خانواده ژنی کاسپازها و *BCL-2* در پدیده آپوپتوز دخیل هستند. بر اساس مطالعات پیشین می‌دانیم که ژن‌های دخیل در مسیر آپوپتوز در جنین‌های انسانی و جانوری در مرحله پیش از لانه‌گزینی بیان می‌گردند (۴، ۸، ۱۳).

وندیل و همکارانش طی مطالعه‌ای در اواخر سال ۲۰۰۸، به بررسی بیان mRNA ژن‌های *bcl-2*، *bax*، *casp3* و *casp7* به عنوان یک نشانگر برای شناسایی آپوپتوز در بلاستوسیت گاو پرداختند. مطالعه ایشان شامل دو گروه جنینی بود که یکی از آن دو گروه با یک ماده القاگر آپوپتوزی به نام استاروسپورین (*Staurosporine*) تیمار شده بود و گروه دیگر جنین‌های کنترل بودند که تحت هیچ تیماری قرار نگرفتند. در این مطالعه میزان بیان هیچ یک از ژن‌ها میان دو گروه آزمایشی اختلاف معنی‌دار نداشت. ایشان پیشنهاد کردند که بیان رونوشت ژن‌های مورد مطالعه نمی‌تواند به عنوان یک مارکر مناسب برای تشخیص آپوپتوز به کار رود (۴).

همچنین در مطالعه‌ای که توسط ملکا و همکارانش انجام شد، بیان ژن‌های آپوپتوزی *bax* و *casp3* در گروه‌های جنینی گاو با کیفیت‌های گوناگون (خوب، متوسط و بد) در مراحل پیش از لانه‌گزینی مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه بر خلاف نتایج وندیل نشان داد که *bax* و *casp3* مارک‌های بالقوه‌ای در ارزیابی کیفیت جنین محسوب می‌شوند. بیان رونوشت *bax* در جنین‌های دارای کیفیت بد در مرحله چهارسلولی به طور معنی‌دار بیشتر از جنین‌های با کیفیت خوب در همان مرحله بود. همچنین بیان رونوشت *casp3* در جنین‌های دارای کیفیت بد در مراحل دو و چهارسلولی به طور معنی‌دار بالاتر از جنین‌های دارای کیفیت خوب در همان مراحل بود. نکته جالب توجه این است که در مراحل دیگر تکوین پیش از لانه‌گزینی، هیچ اختلافی در میزان بیان رونوشت‌های مورد مطالعه دیده نشد. ملکا پیشنهاد کرد که در صورت عدم وجود اختلاف در مقدار بیان ژن‌های مورد مطالعه در گروه‌های گوناگون جنینی، هیچ ارتباطی میان بیان آن ژن‌ها و کیفیت مورفولوژیکی جنین وجود ندارد (۱۳).

در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد که رونوشت ژن‌های *BAG1* و *BAX* در جنین‌های انسانی با کیفیت‌های مختلف از لحاظ مورفولوژی در مرحله ۸ سلولی بیان شده و mRNA ژن *BCL-2* در جنین‌های هشت سلولی انسانی بیان نمی‌گردد. ژن *BAX*، یک ژن آنتی‌آپوپتوز (موافق با مطالعه حاضر) می‌باشد. متکاف و همکاران نشان دادند که رونوشت و پروتئین ژن *BAX* در همه مراحل تکوین جنین‌های انسانی بیان می‌گردد. به نظر می‌رسد که *BAX* یک ژن اصلی پروآپوپتوزی در تکوین جنین انسان به شمار آید (۱۸). سطح بیان رونوشت *BAX* در گروه II نسبت به گروه I به طور معنی‌دار افزایش یافت، اما در گروه III (بدون اختلاف معنی‌دار) با گروه II و گروه IV (با اختلاف معنی‌دار) نسبت به گروه‌های II و III به ترتیب از میزان بیان این ژن کاسته شد. کاهش بیان ژن *BAX* در جنین‌هایی با درجه بالای فراگمتاسیون ممکن است به این علت باشد که ژن *BAX* به عنوان آغازکننده مسیر مرگ سلولی در یک فاصله زمانی کوتاه بیان شده و ادامه این مسیر توسط عوامل دیگری انجام خواهد شد.

بیان ژن *BAG1* که یک عنصر آنتی‌آپوپتوز از خانواده *BCL2* می‌باشد، با کیفیت مورفولوژیکی جنین از لحاظ فراگمتاسیون مرتبط بود؛ یعنی هر چه کیفیت جنین از نظر مورفولوژی کاهش پیدا می‌کرد از میزان بیان ژن *BAG1* نیز کاسته می‌شد، به طوری که بالاترین میزان بیان این ژن در گروه I و پایین‌ترین آن در گروه IV با اختلاف معنی‌دار مشاهده شدند.

اکتینومایسین D، یک آنتی‌بیوتیک پلی‌پپتیدی است که سبب القای آپوپتوز در بیشتر بلاستومرهای جنینی می‌گردد. در مطالعه‌ای فایان به بررسی تاثیر اکتینومایسین D بر روی بیان ژن‌های دخیل در مسیر آپوپتوز در جنین موش پرداخت. ایشان mRNA ژن‌های انتخابی (*bax*، *bcl2l2*، *bad*...) را در بلاستوسیت کشت شده به مدت ۲۴ ساعت در محیط دارای غلظت‌های بالای اکتینومایسین D و نیز در محیط فاقد آن آزمایش کرد. در همه ژن‌های مورد مطالعه، میزان نسبی رونوشت‌ها در بلاستوسیت‌های تیمار شده به طور معنی‌دار پایین‌تر از بلاستوسیت‌های گروه کنترل بود. وی ثابت کرد تیمار با این القاگر آپوپتوزی منجر به توقف تکوینی و افزایش معنی‌دار در ایجاد خصوصیات شاخص آپوپتوز در سلول می‌شود (۱۹). همچنین ایشان در مطالعه دیگری نشان داد که افزودن القاگرهای آپوپتوزی نظیر اکتینومایسین D و $\text{TNF-}\alpha$ و $\text{Tumor Necrosis Factor-}\alpha$ به محیط کشت به طور معنی‌داری وقوع مرگ سلولی در بلاستوسیت موش را افزایش می‌دهد (۲۰).

در مطالعه حاضر نیز اکتینومایسین D سبب کاهش معنی‌دار در سطح بیان رونوشت *BAG1* در گروه IV نسبت به گروه I و II گردید. اثر اکتینومایسین D بر بیان رونوشت ژن *BAX* به صورت کاهش معنی‌دار در گروه IV نسبت به گروه II و III مشاهده شد. به نظر می‌رسد اکتینومایسین D با تغییر در نسبت بیان ژن‌های پروآپوپتوز به آنتی‌آپوپتوز، باعث ایجاد تغییرات ویژه‌ای در جهت عدم تعادل و توازن بیان ژن‌های پرو و آنتی‌آپوپتوز می‌گردد. ما نشان دادیم که بیان mRNA ژن‌های *BAG1* و *BAX* در جنین‌هایی با شدت بالای فراگمتاسیون که متحمل آپوپتوز می‌شوند، نه تنها بالا نبوده بلکه نسبت به جنین‌های طبیعی و یا با کم‌ترین میزان فراگمتاسیون، پایین می‌باشد. اکثر پژوهشگرانی که در این زمینه مطالعه می‌کنند، به نتایج متفاوتی از میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی دست یافته‌اند. اختلاف در میزان بیان رونوشت‌های ژن‌های آپوپتوزی در درجه‌ی اول به تغییرپذیری (*Variability*) ذاتی این ژن‌ها در جنین‌های انسانی نسبت داده می‌شود، به عبارت دیگر الگوی بیان ژنی در جنین‌های مختلف انسانی متفاوت است. تغییرپذیری ژن‌های خانواده *BCL2* در جنین‌های جانوری نیز مشاهده شده (۱۸)، بنابراین اصل، تغییرپذیری بیان ژن‌های این خانواده به قطعیت رسیده است، به احتمال فراوانی رونوشت‌ها و ماهیت ناپایدار بیان برخی از اعضای این خانواده در این امر نقش دارند. همچنین خطا در انتخاب و کیفیت پایین جنین‌ها ممکن است توضیحی برای این تغییرپذیری باشد. شاید بتوان از احتمالات دیگری در رابطه با اختلاف در میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی در جنین‌های انسانی استفاده نمود:

۱. مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده یک فرایند فعال است، بنابراین ممکن است جنین دارای بلاستومرهایی با ظاهر طبیعی بوده اما شروع به تغییر در الگوی بیان ژنی خود کرده باشد.

رمزگردانی شده توسط ژن‌های *BAG1* و *BAX* را بیان می‌کنند، در حالی که رونوشتی از ژن *BCL-2* در این جنین‌ها مشاهده نمی‌گردد. بنابراین به احتمال بسیار قوی ژن *BCL-2* حداقل در مرحله هشت سلولی جنین انسانی نقشی در شناسایی مسیر آپوپتوز ایفا نمی‌کند. البته این یافته نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

ما برای اولین بار نشان دادیم که تفاوت در کیفیت مورفولوژیکی جنین‌ها از لحاظ فراگمنتاسیون با میزان بیان ژن *BAG1* ارتباط دارد و این ژن می‌تواند به عنوان یک مارکر مناسب جهت تشخیص آپوپتوز در جنین‌های انسانی به کار رود. با این حال به منظور تعیین ارتباط دقیق بین تنظیم بیان ژن‌های آپوپتوزی و فراگمنتاسیون سلولی جنین‌ها در مرحله پیش از لانه‌گزینی، می‌باید مطالعات عملکردی بیشتری با استفاده از مدل‌های انسانی و جانوری در رابطه با فعالیت سایر ژن‌های آپوپتوزی و تنظیم آنها در سطح بعد از رونویسی مثل ترجمه، پردازش و سنتز پروتئین صورت بگیرد.

تقدیر و تشکر

طرح تحقیقاتی شماره ۱-۲۷۱، در پژوهشکده رویان انجام شد. بدینوسیله صمیمانه از همکاری اعضای محترم آزمایشگاه جنین شناسی و آزمایشگاه ژنتیک به خصوص جناب آقای روح الله فتحی، جناب آقای امیر امیری یکتا و سرکار خانم فاطمه حسنی قدردانی می‌شود. همچنین از کلیه مسئولین پژوهشکده رویان به خاطر فراهم نمودن امکانات این مطالعه تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

1. Eftekhari Yazdi P, Valojerdi MR, Ashtiani SK, Eslaminejad MB, Karimian L. Effect of fragment removal on blastocyst formation and quality of human embryos. *Reprod Biomed Online*. 2006; 13(6): 823-832.
2. Jurisicova A, Antenos M, Varmuza S, Tilly JL, Casper RF. Expression of apoptosis-related genes during human preimplantation embryo development: potential roles for the Harakiri gene product and Caspase-3 in blastomere fragmentation. *Mol Hum Reprod*. 2003; 9(3): 133-141.
3. Hardy K. Apoptosis in the human embryo. *Rev Reprod*. 1999; 4(3): 125-134.
4. Vandaele L, Goossens K, Peelman L, Van Soom A. mRNA expression of Bcl-2, Bax, caspase-3 and -7 cannot be used as a marker for apoptosis in bovine blastocysts. *Anim Reprod Sci*. 2008; 106(1-2): 168-173.
5. Badr H, Bongioni G, Abdoon AS, Kandil O, Puglisi R. Gene expression in the in vitro-produced preimplantation bovine embryos. *Zygote*. 2007; 15(4): 355-367.
6. Liu HC, He ZY, Mele CA, Veeck LL, Davis O, Rosenwaks Z. Expression of apoptosis-related genes in human oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet*. 2000; 17(9): 521-533.
7. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update*. 2005; 11(2): 162-177.
8. Opiela J. Apoptosis in preimplantation bovine embryos and methods used for its detection. *Ann Anim Sci* 2009; 9(1): 3-16.
9. Gopisetty G, Ramachandran K, Singal R. DNA methylation and apoptosis. *Mol Immunol*. 2006; 43(11): 1729-1740.
10. Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: life-or-death

۲. ارتباط بین آپوپتوز و کیفیت جنین توضیح دیگری می‌تواند باشد. فراگمنت‌های سیتوپلاسمی در جنین‌های انسانی به طور فراوان مشاهده می‌شوند، این قطعات از نظر ظاهری مشابه اجسام آپوپتوتیک می‌باشند. تفاوت این فراگمنت‌ها با اجسام آپوپتوتیک در این است که اجسام آپوپتوتیک حاوی DNA فراگمنته بوده و کاسپازهای فعال را بیان می‌کنند در حالی که فراگمنت‌های سیتوپلاسمی فاقد DNA می‌باشند. بنابراین علائم همیشگی آپوپتوز در فراگمنت‌های سیتوپلاسمی غیر قابل شناسایی می‌باشند و این نشان می‌دهد که آپوپتوز و فراگمنتاسیون سیتوپلاسمی همیشه به هم مرتبط نیستند.

۳. میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی ممکن است تحت تاثیر شرایط نامطلوب محیطی افزایش یابد ولی هنوز مکانیسم آن مشخص نیست.

۴. اگر در میزان بیان یک ژن آپوپتوزی در بین گروه‌های مختلف کیفی جنین اختلافی وجود نداشته باشد، نشان می‌دهد که میان بیان آن ژن موردنظر و کیفیت مورفولوژیکی جنین ارتباطی وجود ندارد؛ یعنی هر چند ممکن است جنین از نظر ظاهری دارای فراگمنت‌های بسیار باشد اما این امر به معنای میزان بالای بیان ژن آپوپتوزی نخواهد بود.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر، نشان می‌دهد که جنین‌های انسانی با درجات مختلف فراگمنتاسیون در مرحله هشت سلولی، رونوشت‌های

- switch. *FEBS Lett*. 2000; 466(1): 6-10.
11. Spanos S, Rice S, Karagiannis P, Taylor D, Becker DL, Winston RM, et al. Caspase activity and expression of cell death genes during development of human preimplantation embryos. *Reproduction*. 2002; 124(3): 353-363.
12. Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*. 2000; 256(1): 12-18.
13. Melka MG, Rings F, Holker M, Tholen E, Havlicek V, Besenfelder U, et al. Expression of apoptosis regulatory genes and incidence of apoptosis in different morphological quality groups of in vitro-produced bovine pre-implantation embryos. *Reprod Domest Anim* 2009 [Epub ahead of print].
14. Loureiro B, Brad AM, Hansen PJ. Heat shock and tumor necrosis factor-alpha induce apoptosis in bovine preimplantation embryos through a caspase-9-dependent mechanism. *Reproduction*. 2007; 133(6): 1129-1137.
15. Vandaele L, Mateusen B, Maes DG, de Kruif A, Van Soom A. Temporal detection of caspase-3 and -7 in bovine in vitro produced embryos of different developmental capacity. *Reproduction*. 2007; 133(4): 709-718.
16. Jousan FD, de Castro E Paula LA, Brad AM, Roth Z, Hansen PJ. Relationship between group II caspase activity of bovine preimplantation embryos and capacity for hatching. *J Reprod Dev*. 2008; 54(3): 217-220.
17. Liu HC, He ZY, Tang YX, Mele CA, Veeck LL, Davis O, et al. Simultaneous detection of multiple gene expression in mouse and human individual preimplantation embryos. *Fertil Steril*. 1997; 67(4): 733-741.

18. Metcalfe AD, Hunter HR, Bloor DJ, Lieberman BA, Picton HM, Leese HJ, et al. Expression of 11 members of the BCL-2 family of apoptosis regulatory molecules during human preimplantation embryos development and fragmentation. *Mol Reprod Dev.* 2004; 68(1): 35-50.
19. Fabian D, Cikos S, Koppel J. Gene expression in mouse preimplantation embryos affected by apoptotic inducer actinomycin D. *J Reprod Dev.* 2009; 55 (5): 576-582.
20. Fabian D, Juh'as S, Il'kov'a G, Koppel J. Dose- and time- dependent effects of TNF alpha and actinomycin D on cell death incidence and embryo growth in mouse blastocysts. *Zygote.* 2007; 15(3): 241-249.
-