

اثر پورمورفامین بر بلوغ تخمک و بیان ژن‌های هیستون داستیلاز در تکامل جنین‌های پارتنوزن گوسفند

پریسا ندری^{*}، سعید انصاری مهباری^۲، محمد صالحی^۳، احمد ریاسی^۴ و آزاده زحمتکش^۱

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۲۹

^۱ بترتیب فارغ التحصیل دوره کارشناسی ارشد و دکتری گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

^۲ استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، گروه پژوهشی زیست فناوری جانوری و مهندسی زیستی دانشگاه صنعتی اصفهان

^۳ استادیار بیوتکنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

^۴ دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، گروه پژوهشی زیست فناوری جانوری و مهندسی زیستی دانشگاه صنعتی اصفهان

*مسئول مکاتبه: Email: parisa.nadri@yahoo.com

چکیده

زمینه مطالعاتی: پورمورفامین، آگونیست مولکول سونیک هدیهاگ است که نقش مهمی در تنظیم فعالیت گیرنده‌ها و عامل رونویسی دارد. **هدف:** در این مطالعه اثر پورمورفامین بر میزان بلوغ تخمک‌ها و بیان ژن‌های هیستون داستیلاز در جنین‌های پارتنوزن گوسفند مورد بررسی قرار گرفت. **روش کار:** نمونه‌های تخمدان گوسفند از کشتارگاه صنعتی پوریای شرق سال ۱۳۹۲ در استان ورامین تهیه و مجموعه کومولوس-تخمک در محیط حاوی ۲۵۰ و ۵۰۰ نانوگرم پورمورفامین و کنترل (بدون پورمورفامین) کشت داده شد. ۲۲ ساعت بعد از بلوغ، سلول‌های کومولوس از تخمک‌ها جدا شده و برای ارزیابی بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک به ترتیب از رنگ آمیزی هوخست و سل تراکر بلو استفاده گردید. همچنین گروهی از تخمک‌ها وارد مرحله فعال‌سازی شده و تا مرحله بلاستوسیست کشت داده شد. تعیین میزان بیان ژن‌های Hdac 1، Hdac 2 و Hdac 3 به روش کمی بوسیله دستگاه Real Time PCR (qPCR) مورد ارزیابی قرار گرفت. **نتایج:** در تحقیق حاضر در مقدار ۵۰۰ نانوگرم پورمورفامین، علی‌رغم اینکه تاثیر معنی‌داری بر بلوغ هسته‌ای تخمک نداشت اما منجر به افزایش بلوغ سیتوپلاسمی تخمک شد. همچنین در گروه‌های تیمار یافته با پورمورفامین درصد زایگوت و بلاستوسیست به ازای هر کلیواژ در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار نشد. آنالیز qPCR نشان داد که در محیط حاوی ۲۵۰ نانوگرم پورمورفامین در مقایسه با گروه کنترل بیان ژن Hdac 2-3 و Hdac 1 به ترتیب افزایش و کاهش معنی‌دار پیدا کرد. **نتیجه‌گیری نهایی:** بر طبق نتایج، پورمورفامین اثر مثبتی بر میزان بلوغ سیتوپلاسمی تخمک به نظر می‌رسد که مقدار ۵۰۰ نانوگرم پورمورفامین باعث القاء بلوغ سیتوپلاسمی تخمک می‌شود و یک عامل خوبی برای بهبود بلوغ سیتوپلاسمی تخمک است.

واژگان کلیدی: بلوغ هسته، بلوغ سیتوپلاسم، پورمورفامین، گوسفند، جنین

مقدمه

گزارشات نشان داده‌اند که کیفیت تخمک بالغ شده در شرایط آزمایشگاهی کمتر از تخمک‌های بالغ در بدن موجود زنده^۱ می‌باشد (مور و همکاران ۲۰۰۵). لذا افزایش تعداد تخمک‌های بالغ بمنظور استفاده در لقاح آزمایشگاهی ضروری است. فرایند بلوغ تخمکی شامل بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی است. در بلوغ هسته‌ای، اولین جسم قطبی تشکیل شده و سلول در مرحله متافاز II قرار می‌گیرد. حال آنکه در بلوغ سیتوپلاسمی، افزایش اندازه تخمک و محتویات سیتوپلاسمی مشاهده می‌گردد (سیرارد و همکاران ۲۰۰۱). بلوغ تخمک در بدن موجود زنده تحت تاثیر عوامل مختلف از جمله مواد استروئیدی و فاکتورهای رشد است (دریانکورت و همکاران ۱۹۹۸). لذا محققان با اضافه نمودن عوامل متعددی مانند فاکتور مهار کننده لوکمی^۲، فاکتور عصبی مشتق‌شده از مغز^۳ و غیره موفق به اعمال تغییرات زیادی در روند بلوغ تخمک و متعاقب آن رشد و نمو جنین در شرایط آزمایشگاهی گردیده‌اند (ایکدا و همکاران ۲۰۰۰). از جمله عواملی که به نظر می‌رسد بر روند بلوغ تخمک و همچنین بر روند تکثیر و تکامل جنین در گونه‌های مختلف جانوری و انسانی اثر داشته باشد، فاکتور سونیک هدجیهاگ^۴ است (نگوئن و همکاران ۲۰۱۰). مسیر سیگنالی سونیک هدجیهاگ شامل دو پروتئین غشایی PTC^۵ و SMO^۶ می‌باشد. عدم حضور سونیک هدجیهاگ، باعث مهار SMO توسط گیرنده PTC می‌شود و متعاقب آن موجب عدم فعالیت فاکتور رونویسی GLI^۷ می‌گردد. در حضور سونیک هدجیهاگ، SMO رها و پروتئین GLI وارد هسته می‌شود و باعث افزایش فعالیت رونویسی هیستون

داستیلانزهای موجود در هسته می‌شوند. آنزیم‌های هیستون داستیلانز ۱، ۲، ۳، متعلق به خانواده هیستون داستیلانزها هستند که در انسان به ترتیب بوسیله ژن-های Hdac1، Hdac2، Hdac3 بیان می‌شوند. این پروتئین‌ها نقش مهمی در برنامه‌ریزی اپی‌ژنتیک، تنظیم بیان ژن، تنظیم رونویسی، پیشرفت چرخه سلولی و رشد و نمو جنین ایفا می‌کنند (مهنرت و همکاران ۲۰۰۷). سیگنال‌های مولکولی هدجیهاک در سیستم تولیدمثل موش صحرایی (راشل و همکاران ۲۰۰۷) و گاو (اسپیسر و همکاران ۲۰۰۹) وجود دارند و به عنوان فاکتور پاراکراین در جهت بالا بردن تکثیر سلولی و تولید هورمون‌های استروئیدی عمل می‌کند. در سال ۲۰۰۹ نگوئن و همکاران با اضافه کردن سونیک هدجیهاگ به محیط بلوغ آزمایشگاهی، تغییراتی در روند تکامل هسته، سیتوپلاسم و رشد جنین خوک ایجاد نمودند. مسیر سیگنالی سونیک هدجیهاگ تحت تأثیر بسیاری از فاکتورهای رشد و مولکول‌های کوچک است که در این بین می‌توان به پورموفامین اشاره داشت. پورموفامین ترکیب آگونیستی مولکول سونیک هدجیهاگ است که توسط استچالز و همکاران (۱۹۹۹) کشف شد. این مولکول کوچک نقش مهمی در تنظیم فعالیت گیرنده‌های SMO، PTC و فاکتورهای رونویسی GLI ایفا می‌کند (وو و همکاران ۲۰۰۲).

طبق نتایج نگوئن و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی فاکتور سونیک هدجیهاگ و اثر مثبت این فاکتور بر روند بلوغ تخمک و تکامل جنین‌های خوک می‌توان چنین فرض کرد که پورموفامین می‌تواند اثر مثبتی بر روند بلوغ تخمک‌های گوسفندی نیز داشته باشد. به همین دلیل در این تحقیق برای نخستین بار اثر این فاکتور بر میزان بیان بلوغ تخمک‌های گوسفندی و میزان بیان ژن-های Hdac1، Hdac2، Hdac3 در جنین‌های پارتورژنز گوسفند به روش کمی توسط دستگاه Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

¹ In Vivo

² Leukemia inhibitory factor (LIF)

³ Brain-derived neurotropic factor (BDNF)

⁴ Sonic Hedgehog (SHH)

⁵ Patched

⁶ Smoothed

⁷ Gliome-associated oncogene homologue

مواد و روش

تمامی مواد شیمیایی و محیط‌های استفاده شده در این تحقیق به ترتیب از شرکت سیگما و جیبکو فراهم شده است.

جمع‌آوری تخمک‌ها و بلوغ آزمایشگاهی

تخمندان‌های گوسفند از کشتارگاه صنعتی پوریای شرق سال ۱۳۹۲ در استان ورامین تهیه و پس از قرار دادن در سرم فیزیولوژی با دمای ۳۷-۳۲ درجه سانتی‌گراد، طی مدت ۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل شد. سپس به روش آسپیره، مجموعه کومولوس-اووسیت از فولیکول‌ها (با قطر ۷-۳ میلی‌متر) استخراج گردید. مجموعه کومولوس - اووسیت که شامل سه لایه کامل از سلول‌های کومولوس و سیتوپلاسم همگن بودند انتخاب گردید و چندین بار در محیط کشت بدون هپارین^۱ شستشو داده شد. سپس در قطره‌های ۵۰ میکرولیتری حاوی محیط کشت بلوغ در گروه‌های ۱۰ - ۸ تایی کشت داده و روی آن با روغن معدنی پوشانده شد و در انکوباتور با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن نگهداری شد. محیط بلوغ آزمایشگاهی (TCM199 (31100-02, Gibco/ Invitrogen +۱۰ درصد FBS^۲، ۵ میکروگرم در میلی-لیتر هورمون لوتهینه‌کننده^۳، ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر هورمون محرک فولیکول^۴ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر استرادیول بود (تامپسون ۱۹۹۵). در این تحقیق گروه‌های تیماری شامل گروه ۱: پورمورفامین (شرکت سانتا کروز) ۲۵۰ نانوگرم، گروه ۲: پورمورفامین ۵۰۰ نانوگرم، گروه ۳: کنترل (بدون تیمار با پورمورفامین) بودند.

رنگ آمیزی هسته‌ی تخمک‌ها

بعد از جدا کردن کومولوس از تخمک‌ها بوسیله آنزیم هیالورونیداز، بمنظور رنگ آمیزی هسته‌ای و تعیین میزان بلوغ هسته‌ای، تخمک‌های مورد نظر در محیط ۱۰۰ میلی‌لیتر فسفات بافر سالین^۶ دارای ۱ میلی‌گرم پلی ونیل الکل^۷ شستشو داده شده و در محیط پارافرمالدهید ۴/۰ درصد تثبیت شد. سپس تخمک‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محلول هوخست نگهداری شد. در ادامه، تخمک‌های مربوط به گروه‌های کنترل و تیمارها در قطره گلیسرول موجود بر روی لام قرار داده و با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت درصد تخمک‌های موجود در تقسیم میوز II مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت (محمدی سنگ چشمه ۲۰۱۲). در این آزمایش برای هر یک از گروه‌های کنترل و گروه‌های تیمار یافته با مقادیر ۲۵۰ و ۵۰۰ نانوگرم پورمورفامین، ۵ تکرار و برای هر گروه ۱۰۰ نمونه تخمک عکس برداری شد.

بررسی گلوکوتایون در تخمک‌های بالغ

برای ارزیابی بلوغ سیتوپلاسمی، تخمک‌ها ابتدا در قطره‌های ۵۰ میکرولیتری حاوی ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سل تراکر بلو^۸ (شرکت اینویترژن)، و ۱۰۰ میلی‌لیتر فسفات بافر سالین دارای ۱ میلی‌گرم پلی ونیل الکل (در هر قطره ۱۰ تخمک) قرار داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه مجدداً در محیط ۱۰۰ میلی‌لیتر فسفات بافر سالین دارای ۱ میلی‌گرم پلی ونیل الکل شستشو داده شد. در ادامه تخمک‌های مربوط به گروه‌های کنترل و تیمارها در قطره ۱۰ میکرولیتری گلیسرول موجود بر روی لام قرار داده و زیر میکروسکوپ فلورسنت (نیکون، توکیو، ژاپن) با فیلتر UV مشاهده شد. میزان پیکسل رنگ آبی تخمک‌ها توسط نرم افزار ایمیج جی تجزیه و تحلیل شد (پارک و

^۱Hepese Tissue Cultuer Media (HTCM)

^۲Tissue Cultuer Media-199 (TCM-199)

^۳Fetal Bovine Serum (FBS)

^۴Luteinizing hormone (LH)

^۵Follicle-stimulating hormone (FSH)

^۶Phosphate Buffer Saline(PBS)

^۷Poly Vinyl Alcohol (PVA)

^۸Cell TrackerBlue

inhibitor $20 \mu\text{U}/\mu\text{L}$ به تیوب‌ها اضافه گردید و در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد (لیواک ۲۰۰۱).

Real Time PCR

در این تحقیق میزان بیان ژن‌های Hdac1, Hdac2 و Hdac3 در مرحله بلاستوسیسست جنین‌های پارتنوژنز گوسفندی بین گروه کنترل و مقادیر ۲۵۰ و ۵۰۰ نانوگرم پورمورفامین به روش کمی توسط دستگاه Real Time PCR (روتور-کیاژن) (ساخت شرکت کیاژن)) بررسی شد. ژن Gapdh نیز بعنوان ژن مرجع استفاده شد. جهت سنتز RNA از کیت سنتز RNA (کیاژن) استفاده شد. جهت بررسی میزان بیان ژن‌ها به ازای هر واکنش $6/5$ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین (تاکارا) و $4/5$ میکرولیتر آب مقطر، ۱ میکروگرم آغازگر $10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ به cDNA اضافه شد و به دستگاه روتور-کیاژن منتقل شد. حجم کل نمونه‌ها ۱۳ میکرولیتر بود و نمونه‌ها برای چهل چرخه در دستگاه قرار داده شد (لیواک ۲۰۰۱). Real Time PCR در دو مرحله با تنظیم حرارتی ۳ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای فعال-سازی آنزیم‌های اولیه پس از ۴۰ چرخه تکثیر (هر ۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد با تعیین فلورسنت) و آخرین مرحله با منحنی ذوب آنالیز شد. سپس سطح بیان ژن‌ها با نرم افزار رست ۲۰۰۹ (کیاژن) تجزیه و تحلیل گردید. لیست آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است.

همکاران ۲۰۱۰). در این آزمایش برای هر یک از گروه‌های کنترل و گروه‌های تیمار یافته با مقادیر ۲۵۰ و ۵۰۰ نانوگرم پورمورفامین ۳ تکرار و برای هر گروه ۳۰ نمونه تخمک عکس برداری شد.

فعال کردن تخمک‌ها (پارتنوژنز)

تخمک‌ها در قطره‌های ۵۰ میکرولیتری حاوی ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر ینومایسین و ۹۹۵ میکروگرم در میلی‌لیتر HTCMT شستشو داده شد. سپس در ۱ میلی‌لیتر محیط HTCMT دارای ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سرم آلبومین گاو شستشو داده شد و پنج دقیقه بعد تخمک‌ها به قطره‌های ۵۰ میکرولیتری حاوی محیط ۶-دی متیل آمین پورین انتقال یافته و به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. سپس تخمک‌ها به محیط کشت جنین (CR1) منتقل شده و در انکوباتور (دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و ۵ درصد اکسیژن) نگهداری شد (نگوئن و همکاران ۲۰۱۰). در این آزمایش برای هر یک از گروه‌های کنترل و گروه‌های تیمار یافته با مقادیر ۲۵۰ و ۵۰۰ نانوگرم پورمورفامین ۳ تکرار در نظر گرفته شد.

استخراج RNA و ساخت همزمان cDNA

به منظور سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA (شرکت فرمنتاز، آلمان) استفاده شد. به این منظور از هر گروه ۲ جنین بلاستوسیسست انتخاب شد و در قطره‌ای از فسفات بافر سالین شستشو داده شد و به داخل تیوب حاوی $1/5$ میکرولیتر از بافر لیز سلولی منتقل شد تا تمامی محتویات سلول از جمله تمامی DNA و RNA از سلول خارج شوند. سپس ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر رندوم هگزامر و ۵ میکرولیتر آب به آن اضافه شد و به مدت پنج دقیقه در دستگاه ترمال سایکلر با دمای 75°C قرار داده شد. بعد از گذشت این زمان ۵ میکرولیتر RT Buffer 5x، ۱ میکرولیتر $200 \text{ U}/\mu\text{L}$ Enzyme RT، ۳ میکرولیتر، 10 mM dNTP10، $0/25$ میکرولیتر RNase

جدول ۱- توالی آغازگرها، اندازه طولی آغازگر و تعداد الحاق آغازگر

آغازگرها	توالی آغازگرها	اندازه طولی آغازگرها	تعداد الحاق آغازگرها
Sh.HDAC1	F: GAC AAA CGC ATC TC AT R:TTG GCT TTC TTG AAG TT	119	XM_004005023.1
Sh.HDAC2	F: ATG GAA AAG ATA AAA CAG R:CTA TTC GTT TGT GTG ATG CT	169	X M_004011189.1
Sh.HDAC3	F:ACA AAT ACG GAA ACT T R:GAA AAG GTGCTT GTA ACT C	131	XM_00400891.1
Sh.GAPDH	F:AGT GTC GTT GAA GTC R:GAA ACC TGC CAA GTA TGA	121	XM_001190390.1

آنالیز آماری

تعداد کل تخمک‌ها و نیز تعداد کل جنین‌ها در برنامه SAS، به کمک رویه ی GENMOD، توزیع پویسون و تابع لینک log در غلظت‌های مختلف پورمورفامین مورد مقایسه قرار گرفتند. برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف پورمورفامین بر مراحل مختلف بلوغ هسته‌ای و تکامل جنین با توجه به نسبی بودن داده‌های شمارشی (نسبت به تعداد کل)، از برنامه SAS، رویه ی GENMOD، توزیع دوجمله‌ای و تابع لینک logit استفاده شد. برای بررسی اثر پورمورفامین بر بلوغ سیتوپلاسمی تخمک (میزان گلوکوتایون در هر تیمار) نیز از طرح کاملاً تصادفی به کمک نرم‌افزار آماری SAS و رویه ی One- Way ANOVA استفاده شد و مقایسات میانگین تیمارها به کمک آزمون توکی در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. مدل آماری مورد استفاده به صورت زیر می‌باشد:

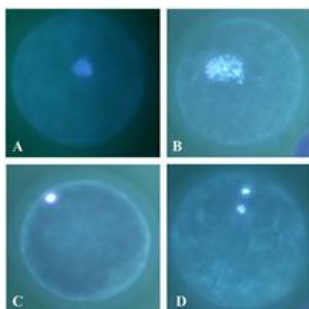
$$y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

y_{ij} : میزان گلوکوتایون تخمک i امین تیمار. μ : میانگین کل، T_i : اثر ثابت i امین تیمار (صفر نانوگرم، ۲۵۰ نانوگرم و ۵۰۰ نانوگرم پورمورفامین)، e_{ij} : اثر تصادفی خطا. مقایسات سطح بیان ژن‌های داستیلاز در غلظت‌های مختلف پورمورفامین به کمک نرم‌افزار REST در سطح احتمال ۵٪ صورت گرفت.

بررسی بلوغ هسته‌ای تخمک

تصاویر میکروسکوپ فلورسنت و آنالیز آماری نشان داد بین گروه کنترل (بدون تیمار با پورمورفامین) با

مقادیر ۲۵۰ و ۵۰۰ نانوگرم پورمورفامین در مرحله میوز II از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. همچنین بین دو گروه تیماری ۲۵۰ و ۵۰۰ نانوگرم پورمورفامین در مرحله GVBD اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۱، جدول ۲)



شکل ۱- مراحل بلوغ تخمک با روش رنگ‌آمیزی هوخست

A- هیچ گونه تغییری در هسته دیده نمی‌شود (GV). B- غشای اطراف هسته شکسته می‌شود ولی به بلوغ نهایی نرسیده است (GVBD). C- زمانی که بلوغ رخ داده ولی جسم قطبی مشاهده نمی‌شود (MI). D- زمانی است که بلوغ نهایی رخ داده است (MII).

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف پورمورفامین بر مراحل مختلف بلوغ هسته‌ای (خطای استاندارد ± اختلاف برآوردهای میانگین‌های

حداقل مربعات)

مقایسه مقادیر پورمورفامین	کل تخمک‌های رنگ‌آمیزی شده	GV [§]	GVBD	MI	MII
کنترل (بدون پورمورفامین) و ۲۵۰ نانوگرم	۰/۱۳ ± ۰/۱۱ ^{NS}	— ^{NS}	۰/۷۷ ± ۰/۵۲ ^{NS}	۰/۰۶ ± ۰/۴۳ ^{NS}	۰/۰۳ ± ۰/۳۳ ^{NS}
کنترل و ۵۰۰ نانوگرم	۰/۱۲ ± ۰/۰۶ ^{NS}	— ^{NS}	۰/۲۸ ± ۰/۴۱ ^{NS}	۰/۱۵ ± ۰/۴۱ ^{NS}	۰/۳۶ ± ۰/۳۰ ^{NS}
۲۵۰ نانوگرم و ۵۰۰ نانوگرم	۰/۰۵ ± ۰/۱۲ ^{NS}	— ^{NS}	۰/۰۶ ± ۰/۴۹*	۰/۰۹ ± ۰/۳۹ ^{NS}	۰/۳۹ ± ۰/۳۰ ^{NS}

§ به علت اینکه بیشتر تخمک‌های مورد بررسی در مرحله GV قرار نداشتند، در اکثر تکرارها تعداد برابر با صفر بود، بنابراین از ارائه مقادیر برآورده شده صرف نظر شد، *؛ معنی‌دار در سطح ۵٪، NS: عدم معنی‌داری.

بررسی بلوغ سیتوپلاسمی تخمک

برای ارزیابی بلوغ سیتوپلاسمی تخمک از ۳۰ تخمدان گوسفندی، ۹۰ مجموعه کومولوس-تخمک به روش آسپیره جدا شد. سپس در هر یک از گروه‌های تیماری ۲۵۰ و ۵۰۰ نانوگرم پورمورفامین و گروه کنترل ۳۰ تخمک کشت داده شد و جهت تعیین سطح گلو تاتیون با روش سل تراکر بلو ارزیابی شد. بر اساس ارزیابی میزان فلورسنت ساعت شده از تخمک‌ها و میزان پیکسل رنگ آبی، میزان بلوغ سیتوپلاسمی مورد بررسی قرار گرفت که در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد در مقدار ۲۵۰ نانوگرم پورمورفامین اختلاف معنی-میانگین‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

اثر مقادیر مختلف پورمورفامین بر روی جنین‌های پارتنورنژ گوسفندی در محیط آزمایشگاهی: در این مطالعه با اضافه کردن مقادیر مختلف پورمورفامین ۲۵۰ و ۵۰۰ نانوگرم به محیط بلوغ تخمک‌ها در شرایط آزمایشگاه، درصد زایگوت و درصد بلاستوسیسیت به

داری نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. با افزایش مقدار پورمورفامین به ۵۰۰ نانوگرم میزان بلوغ سیتوپلاسمی در مقایسه با گروه کنترل بطور معنی-داری افزایش پیدا کرد.

جدول ۳- اثر پورمورفامین برای ارزیابی میزان فلورسنت ساعت شده از تخمک‌ها بر اساس پیکسل رنگ آبی در تخمک

گوسفند

مقدار پورمورفامین	میانگین ± خطای استاندارد (Mean ± SE)
کنترل (بدون پورمورفامین)	۲۳۶/۴ ± ۲/۱ b
۲۵۰ نانوگرم	۲۲۲/۳ ± ۲/۳ b
۵۰۰ نانوگرم	۲۴۱/۳ ± ۱/۳ a

ازای هر کلیواژ در جنین‌های گوسفندی مورد آزمایش قرار گرفت که در جدول ۴ بطور خلاصه مشاهده می-شود. نتایج نشان داد بین گروه کنترل با تیمارهای ۲۵۰ و ۵۰۰ نانوگرم پورمورفامین از لحاظ میزان درصد -زایگوت و بلاستوسیسیت به ازای هر کلیواژ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت

جدول ۴- اثر غلظت‌های مختلف پورمورفامین بر تکامل جنین (خطای استاندارد ± اختلاف برآوردهای میانگین‌های حداقل

مربعات)

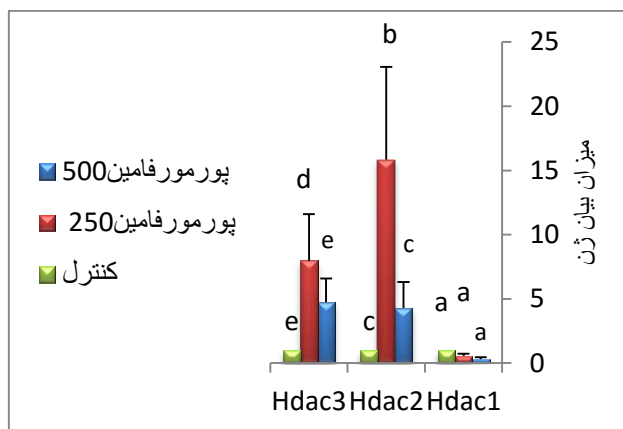
مقایسه مقادیر پورمورفامین	تعداد کل جنین	زایگوت	بلاستوسیسیت به ازای هر کلیواژ
کنترل (بدون پورمورفامین) و ۲۵۰ نانوگرم	۰/۰۵ ± ۰/۱۸ ^{NS}	۰/۳۹ ± ۰/۴۳ ^{NS}	۰/۱۱ ± ۰/۱۳ ^{NS}
کنترل و ۵۰۰ نانوگرم	۰/۰۵ ± ۰/۱۸ ^{NS}	۰/۰۶ ± ۰/۴۵ ^{NS}	۰/۷۲ ± ۰/۶۵ ^{NS}
۲۵۰ نانوگرم و ۵۰۰ نانوگرم	۰/۰۰ ± ۰/۱۸ ^{NS}	۰/۴۵ ± ۰/۴۳ ^{NS}	۰/۴۰ ± ۰/۵۲ ^{NS}

NS: عدم معنی‌داری.

بیان *Hdac2* در مقدار ۲۵۰ نانوگرم پورمورفامین نسبت به کنترل بطور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($P < 0.05$). اما در مقدار ۵۰۰ نانوگرم اختلاف معنی‌داری در میزان بیان ژن *Hdac2* مشاهده نشد. در بررسی میزان بیان ژن *Hdac3*، گروه تیماری ۲۵۰ نسبت به گروه کنترل بطور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($P < 0.05$). با افزایش مقدار به ۵۰۰ نانوگرم پورمورفامین میزان بیان ژن *Hdac3* نسبت به کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۳).

بررسی میزان بیان ژن‌های *Hdac1*، *Hdac2* و *Hdac3* به روش Real Time PCR

در این مطالعه میزان بیان ژن‌های *Hdac1*، *Hdac2* و *Hdac3* در مرحله بلاستوسیست جنین‌های پارتنوژنز گوسفندی بین گروه کنترل و مقادیر مختلف پورمورفامین توسط دستگاه Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق میزان بیان ژن *Hdac1* بین گروه‌های تیماری ۲۵۰ و ۵۰۰ نانوگرم پورمورفامین با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین میزان



شکل ۳- میزان بیان ژن‌های هیستون داستیلاز در جنین‌های پارتنوژنز گوسفندی به روش Real Time PCR. حروف غیر مشترک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

کیفیت جنین آزمایشگاهی گونه‌های مختلف شده‌اند. مطالعات زیادی در بررسی اثر عوامل مختلف در افزایش کیفیت تخمک‌های بالغ شده در شرایط آزمایشگاه وجود دارد. محققین در مطالعه‌ی بررسی اثر فاکتور مهار کننده لوکمی بر روند بلوغ تخمک گاو، به این نتیجه رسیدند که اضافه کردن ۲۵ نانوگرم از این فاکتور به محیط IVM باعث افزایش بلوغ هسته‌ای و کاهش بلوغ سیتوپلاسمی تخمک در شرایط آزمایشگاهی می‌شود (مو و همکاران ۲۰۱۴). در همین راستا در مطالعه دیگری با اثر فاکتور مهار کننده لوکمی بر روند بلوغ تخمک خوک مشخص شد که فاکتور مورد نظر باعث افزایش روند بلوغ هسته‌ای تخمک خوک گردیده ولی بر بلوغ سیتوپلاسمی هیچ اثری ندارد

بحث

کیفیت تخمک از اهمیت بالایی در فرایند بلوغ تخمکی و بارور شدن آنها در شرایط آزمایشگاه برخوردار است و بر همین اساس تحقیقات گسترده‌ای بمنظور بلوغ بهتر تخمک و کاهش نقایص آن انجام گرفته است. بدون شک کیفیت تخمک‌های نابالغ و سلول‌های کومولوس تمایز یافته، شرط اساسی در فرایند لقاح و تکامل پیش از لانه‌زینی جنین است. لذا تولید جنین آزمایشگاهی، مستلزم تولید تخمک‌های بالغ با کیفیت بالا است (فونگ و همکاران ۲۰۰۰). محققین با اضافه کردن فاکتورهای رشد (کیم و همکاران ۲۰۰۶)، سیتوکین‌ها (یوهم و همکاران ۲۰۰۷)، ویتامین‌ها و آمینواسیدها (گوپتا و همکاران ۲۰۰۷) به محیط بلوغ آزمایشگاهی باعث بهبود

شدن هیستون‌ها بواسطه چندین زیر مجموعه کاتالیز می‌شود و نقش مهمی در تنظیم بیان ژن یوکاریوتی و رشد و نمو جنین ایفا می‌کند (مهنرت و همکاران ۲۰۰۷). استچالز و همکاران در سال ۲۰۰۱ در بررسی میزان بیان Hdac2 و Hdac3 توسط Real Time PCR بدون تیمار کردن محیط کشت تخمک‌های موش دریافتند که میزان بیان Hdac2 و Hdac3 در جنین بلاستوسیست بطور معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند. در مطالعه‌ی دیگر سرگ مک گراو و همکاران در سال ۲۰۰۳ بدون تیمار کردن محیط بلوغ تخمک‌های گاو مشاهده کردند، میزان بیان ژن‌های Hdac2 و Hdac3 در مرحله بلاستوسیست جنین‌های IVF نسبت به دیگر مراحل تکامل جنین افزایش پیدا می‌کند. در تحقیق حاضر به بررسی میزان بیان ژن‌های Hdac1، Hdac2 و Hdac3 بر روی جنین‌های بلاستوسیست پارتوژنز گوسفندی با دستگاه Real Time PCR پرداخته شد. نتایج نشان داد در مقدار ۲۵۰ نانوگرم پورمورفامین در مقایسه با گروه کنترل (بدون تیمار با پورمورفامین) میزان بیان ژن‌های هیستون داستیلاز Hdac2 و Hdac3 بطور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرد اما Hdac1 تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشت. با افزایش غلظت به ۵۰۰ نانوگرم پورمورفامین میزان بیان Hdac1، Hdac2 و Hdac3 با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج نشان می‌دهند که ژن‌های Hdac1، Hdac2 و Hdac3 با وجود همولوگ بودن اما میزان بیان ژن متفاوتی در مرحله بلاستوسیست در پاسخ به اثر پورمورفامین دارند. همچنین ممکن است از نظر موقعیت درون سلولی و تغییرات پس از ترجمه تفاوت داشته باشند. ضمناً با توجه به اینکه فعال شدن ژنوم در گوسفند در مرحله ۸ تا ۱۶ سلولی می‌باشد این انتظار می‌رود که در مرحله بلاستوسیست فعالیت رونویسی کم و یا متوقف شود. طبق نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد که با افزایش بیان Hdacs در مرحله بلاستوسیست، میزان

(نگوئن و همکاران ۲۰۱۴). در مطالعه‌ی اثر فاکتور عصبی مشتق‌شده از مغز بر بلوغ تخمک‌های گاو، مشاهده شد که این فاکتور رشد بدون اثر بر بلوغ هسته‌ای، موجب افزایش بلوغ سیتوپلاسمی تخمک می‌گردد (مارتین و همکاران ۲۰۰۵). در مطالعه‌ی محققین با اضافه کردن فاکتور سونیک هدجیهاگ به محیط بلوغ تخمک خوک، دریافتند که بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک و به دنبال آن تکامل جنین پارتوژنز افزایش پیدا می‌کند (نگوئن و همکاران ۲۰۰۹). با توجه به اثر مثبت فاکتور سونیک هدجیهاگ بر روی بلوغ تخمک و تکامل جنین‌های خوک بر آن شدیم تا اثر آگونیست آن یعنی پورمورفامین بر روند بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک و تکامل جنین‌های پارتوژنز گوسفند بررسی کنیم. در تحقیق حاضر در مقدار ۵۰۰ نانوگرم پورمورفامین به محیط بلوغ تخمک، مشاهده شد علی‌رغم اینکه تاثیر معنی‌داری بر روند بلوغ هسته‌ای تخمک نداشت اما منجر به افزایش بلوغ سیتوپلاسمی تخمک شد. همچنین مشاهده شد در گروه‌های تیمار یافته با ۲۵۰ و ۵۰۰ نانوگرم پورمورفامین، درصد زیگوت و بلاستوسیست به ازای هر کلیواژ نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. با توجه به اینکه بلوغ سیتوپلاسمی تخمک تعیین کننده کمیت و کیفیت نهایی بلاستوسیست‌های بدست آمده در جنین‌های پارتوژنز و لقاح آزمایشگاهی می‌باشد (سیراد ۲۰۰۱)، لذا بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه که در مقدار ۵۰۰ نانوگرم پورمورفامین میزان سطح گلوکوتایون در تخمک بطور چشمگیری افزایش پیدا کرد، به نظر می‌رسد غلظت ایده آلی برای القاء بلوغ سیتوپلاسمی تخمک باشد. فعال‌سازی ژن‌ها باید روند برگشت‌پذیری داشته باشد و گرنه ژن‌هایی که روشن می‌شوند به طور دایم فعال باقی خواهند ماند. بنابراین وجود آنزیم‌هایی که بتوانند گروه استیل را از دم هیستون‌ها جدا کند ضروری است که به آن‌ها هیستون داستیلاز گفته می‌شود. داستیله

سیاسگزاری

تمامی امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی و همچنین حمایت‌های مالی در این مطالعه از مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته تأمین شده است. بدینوسیله از مسؤولین گرامی در مرکز تحقیقات بن یاخته کمال تشکر را دارم. همچنین بخشی از حمایت مالی توسط دانشگاه صنعتی اصفهان تأمین شده است.

استیلاسیون کاهش و در نتیجه سبب خاموشی ژن در این مرحله از تکامل جنینی می‌شود. لذا برای بررسی میزان استیلاسیون در این مرحله از بلاستوسیست، نیاز به بررسی در مطالعات آتی دارد.

منابع مورد استفاده

- Akiyama T and Nagata MF, 2006. Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 7339–7344.
- Blanco M, Demydas R, Moreno MM and Genero E, 2011. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocyte. *Biotechn Mol Biol Rev* 6: 155-165.
- Driancourt MA and Thuel, 1998. Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. *Rev Reprod Nutr Dev* 38: 345–362.
- Elia D, Madhala D, Ardon E, Reshef R and Halevy O, 2007. Sonic hedgehog promotes proliferation and differentiation of adult muscle cells: involvement of MAPK/ERK and PI3K/Akt pathway. *Biochim Biophys Acta* 1773:1438–1446.
- Fong CY, Bongso A and Trounson A, 2000. Regulation of human and mouse oocyte maturation in vitro with 6-methylaminopurine. *Anderliesz C. Human Reprod* 15: 379-388.
- Gupta MK, Uhm SJ, Han DW and Lee HT, 2007. Embryo quality and production efficiency of porcine parthenotes is improved by phytohemagglutinin. *Mol Reprod Dev* 74:435– 444.
- Hassig CA, Tong JK, Fleischer TC, Ow aT, Grable PG, Ayer DE and Schreiber SL, 1998. A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3519–3524.
- Ikeda S, Ichihara T, Azuma KT, Muramatsu T and Yamada M, 2000. Effects of midkine during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent developmental competence. *Biology Reprod* 63: 1067–1074.
- Kim S, Lee SH, Kim JH, Jeong YW, Hashem MA, Koo OJ, Park SM, Lee EG, Hossein MS, Kang SK, Lee BC and Hwang WS, 2006. Anti-apoptotic effect of insulin-like growth factor (IGF)-I and its receptor in porcine preimplantation embryos derived from in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 73:1523–1530.
- Livak KJ and Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C (T)) method *Methods* 25:402–418.
- Martins da Silva S J, Gardner JO, Taylor JE and Anderson RA, 2005. Brain-derived neurotrophic factor promotes bovine oocyte cytoplasmic competence for embryo development. *Reprod* 129: 423–434.
- Mehnert JM and Kelly WK, 2007. Histone deacetylase inhibitors: biology and mechanism of action. *J Cancer* 13: 23–29.
- Mo X, Wu G, Yuan D, Jia B and Liu C, 2014. Leukemia inhibitory factor enhances bovine oocyte maturation and early embryo development. *Mol Reprod Dev* 81:608-618.
- Mohammadi-Sangcheshmeh A, Soleimani M, Deldar H, Salehi M, Soudi S and Hashemi SM, 2012. Prediction of oocyte developmental competence in ovine using glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity determined at retrieval time. *J Assist Reprod Genet* 29:153–168.
- Moor R and Dai Y, 2005. Maturation of pig oocytes in vivo and invitro. *Reprod Suppl* 58: 91-100.
- Nguyen NT, Haraguchi S, Kikuchi K and Somfai T, 2014. Leukemia inhibitory factor promotes porcine oocyte maturation and is accompanied by activation of signal transducer and activator of transcription 3. *Mol Reprod Dev* 81:230-239.

- Nguyen NT, Loc NW and Chuang SP, 2011. Sonic hedgehog supplementation of oocyte and embryo culture media enhances development of IVF porcine embryos. *Reprod* 142: 87–97.
- Nguyen NT, Lin DP and Loc NW, 2010. Sonic hedgehog improves in vitro development of porcine parthenotes and handmade cloned embryos. *Theriogen* 74: 1149-1160.
- Nguyen NT, Lin DPC, Yen SY, Tseng JK, Chuang JF, Hung HT, Lin TA and Chang HH, 2009. Sonic hedgehog promotes porcine oocyte maturation and early embryo development. *Reprod Fertil Dev* 21: 805–815.
- Park WH and You BR, 2010. The effects of antimycin A on endothelial cells in cell death, reactive oxygen species and GSH levels. *Toxicol* 24:1111–1118.
- Pengpeng M and Richard MS, 2008. Histone deacetylase 1 (HDAC1) regulates histone acetylation, development, and gene expression in preimplantation mouse embryos. *Biology*. 319:110-120.
- Ren Y, Cowan RG, Harman RM and Quirk SM, 2009. Dominant activation of Hedgehog signaling pathway in the ovary alters theca development and prevents ovulation. *Mol Endocrin* 23: 711–723.
- Russell MC, Cowan RG, Harman RM, Walker AL and Quirk S, M.2007. The hedgehog signaling pathway in the mouse ovary. *Biol Reprod* 77:226 –237.
- Serge MC, Claude R, Lyne M and Marc-Andre S, 2003. Quantification of Histone Acetyltransferase and Histone Deacetylase1 Transcripts During Early Bovine Embryo Development. *Biol Reprod* 68: 383–389.
- Schultz RM, Davis WJ and Stein P, 1999. Svoboda. Reprogramming of gene expression during preimplantation development. *J Exp Zool* 285:276–282.
- Sirard MA, 2001. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogen* 55: 1241-1254.
- Spicer LJ, Sudo S, Aad PY, Wang LS, Chun SY, Ben-Shalom I and Hsueh AJW, 2009. The hedgehog-patched signaling pathway and function in the mammalian ovary: a novel role for hedgehog proteins in stimulating proliferation and steroid genesis of theca cells. *Reprod* 138: 329–339.
- Thompson JG, Gardner DK, Pugh PA, McMillan WH and Tervit HR, 1995. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during 548 in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biol Reprod* 53:1385–1391.
- Uhm SJ, Gupta MK, Yang JH, Lee SH and Lee HT, 2007. Selenium improves the developmental ability and reduces the apoptosis in porcine parthenotes. *Mol Reprod Dev* 1386 –1394.
- Wu X, Ding Q, Gray N and Schultz PG, 2002. Purmorphamin is a synthetic sonic hedgehog pathway agonist. *J A C Soc* 124: 14520–14532.

The effect of purmorphamine on oocyte maturation and expression of histon deacetylase genes in development of sheep parthenogenetic embryos

P Nadri^{*1}, S Ansari-mahyari², M Salehi³, A Riasi⁴ and A Zahmatkesh¹

Received: August 30, 2014 Accepted: May 19, 2015

¹MSc and PhD Graduated, respectively, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

²Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Institute for Biotechnology and Bioengineering University of Technology Isfahan, Iran

³Assistant Professor, Department of Biotechnology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Institute for Biotechnology and Bioengineering University of Technology Isfahan, Iran

*Corresponding author: Email: parisa.nadri@yahoo.com

Abstract

BACKGROUND: Purmorphamine is a synthetic Sonic Hedgehog pathway agonist, which plays a critical role in the regulation activity of receptors and transcription factors. **OBJECTIVES:** In this study, the effect of purmorphamine on sheep oocytes maturation, and the rate expression of histon deacetylase on sheep parthenogenetic embryos development were considered. **METHODS:** Sheep ovaries were obtained from East Poria local slaughterhouse at Varamin in 1392 and cumulus-oocyte complexes were cultured in the medium containing 250 and 500 ng purmorphamine, and without purmorphamine as a control. After 22 hours maturation, for evaluating nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, oocytes were denuded from cumulus cells and stained with Hoechst and cell tracker blue. Also a group of oocytes entered the parthenogenetic stage and were cultured to the blastocyst stage. **RESULTS:** The quantitative rate expression of histon deacetylase I, II, III were examined by Real-Time PCR (qPCR). In this study, In 500 ng purmorphamine, though it had no significant effect on nuclear oocyte maturation, it increased cytoplasmic maturation. Also percentage of zygotes and blastocysts per cleavage in purmorphamine treated groups was not significantly different from control group. qPCR analysis showed that in 250 ng purmorphamine the histone deacetylase II-III and histone deacetylase I rate expression were higher and lower than control group, respectively. **CONCLUSIONS:** According to the results, purmorphamine had positive influences on the cytoplasmic maturation. It seems that 500 ng concentration of Purmorphamine induces cytoplasmic oocyte maturation and is a good agent for oocyte cytoplasmic maturation in vitro.

Keywords: Cytoplasmic maturation, Nuclear maturation, Oocyte, Purmorphamine, Sheep