Archive of SID

دوره شانزدهم ـ شماره ۳ ـ پاییز ۱۳۹۹
DOI: 10.22055/ivj.2020.63960.1819

اثر انجماد شیشه‌ای تخمک‌های نابالغ گوسفند بر بیان ژن HSP70 در تخمک و بلاستوسیست‌های حاصله

نغمه فرمانی[۱]، فرید براتی[۲*]، علی کدیور[۲] و ابراهیم احمدی[۳]

[۱] دانش آموخته دکتری عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
[۲] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
[۳] استادیار پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۱۶

چکیده

انجماد شیشه‌ای سبب حذف بسیاری از مشکلات مربوط به انجماد تخمک و جنین شده است. از سویی برخی مشکلات در رابطه با تولید جنین در شرایط آزمایشگاهی ممکن است هر گونه تغییر در رونویسی ژنوم جنین را نشان دهد. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر انجماد بر بیان ژن HPS70 (از ژن‌های مربوط به استرس‌های محیطی) در جنین گوسفند است. تعداد ۱۲۰ مجموعه تخمک کومولوس گوسفند در مرحله‌ی وزیکول زایا از تخمدان گوسفندان کشتارگاهی بازیابی شد. مجموعه‌ی تخمک کومولوس به منظور انجماد وارد محلول پایه‌ی HTCM (با ۲۰ درصد FBS) قرار گرفته و بلافاصله روی کرایوتاپ منتقل شده و در نیتروژن مایع قرار گرفتند. بعد از ۴۸ ساعت از آغاز انجماد، تخمک‌ها به ترتیب در محلول‌های W1، W2 و W3 (هر یک به مدت ۵ دقیقه) گرمسازی شدند. W1 شامل محلول پایه و ۱ مول سوکرز، W2: شامل محلول پایه و ۰/۵ مول سوکرز و W3 محلول پایه و ۰/۲۵ مول سوکرز بود. مجموعه‌ی تخمک کومولوس شیشه‌ای و گرم شده (۶۰ عدد، گروه تیمار) و مجموعه تخمک کومولوس تازه (۶۰ عدد، گروه کنترل) طبق روال عادی آزمایشگاهی با پایه‌ی SOF وارد فرایند IVM، IVF و IVC شدند. سپس مراحل رشد تخمک و همچنین میزان بیان ژن HSP70 نسبت به ژن β اکتین (به عنوان کنترل داخلی) بین بلاستوسیت و اووسیت قبل و بعد از انجماد مقایسه شد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه انجماد شیشه‌ای بر روی جنین در مراحل مختلف تکوین تأثیر معنی‌دار داشت و باعث کاهش میزان تکوین شد. همچنین میزان زنده‌مانی در گروه منجمد شیشه‌ای کاهش یافت و این نکته مؤید آن است که انجماد تأثیرات منفی بر زنده‌مانی و میزان تکوین دارد. در مطالعه‌ی حاضر با در نظر گرفتن دو گروه تخمک‌های تازه و منجمد، میزان بیان ژن HSP70 تغییر معنی‌دار نشان داد ولی این اختلاف ناشی از تأثیر شیشه‌ای‌سازی نبود. مرحله‌ی تکاملی جنین اثر معنی‌داری بر بیان ژن HSP70 داشت ولی میزان بیان در مراحل مختلف تکامل جنینی تحت تأثیر شیشه‌ای شدن تخمک قرار نگرفت.

کلمات کلیدی: تخمک کومولوس، انجماد شیشه ای، HSP70، بلاستوسیست، گوسفند

مقدمه

انجماد تخمک یکی از تکنیک‌های مهم با قابلیت‌های کاربردی وسیع در زیست فناوری تولید مثل است. این فناوری می‌تواند در حفظ تنوع زیستی گونه‌های اهلی، جلوگیری از انقراض گونه‌های در معرض خطر، حفظ نسل

*نویسنده مسئول : فرید براتی ، دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده فناوری جنین دام دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
E-mail: baratif@sku.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

www.SID.ir

Archive of SID

دام‌های با قابلیت ژنتیکی بالا کمک کننده باشد (Ambrosini et al, 2006). در طب انسانی نیز انجماد تخمک نظرهای بسیاری را برای استفاده در درمان ناباروری‌ها به خود جلب کرده است. در برخی از کشورها که انجماد جنین غیرقانونی است، انجماد تخمک به عنوان جایگزین می‌تواند مطرح باشد. در بیمارانی که تحت شیمی‌درمانی یا پرتودرمانی قرار می‌گیرند نیز انجماد تخمک به عنوان یک راه حفظ باروری مطرح می‌باشد (Gook and Edgar 2007). انجماد سلول یک فرایند بیوشیمیایی و بیوفیزیکی است. در طی این فرایند با در معرض قرار گرفتن به محلول‌های هیپراسمول سلول به دماهای زیر صفر منتقل می‌شود. فرایند انجماد تخمک امروزه به عنوان راهی برای حفظ باروری خانم‌های تحت درمان با داروهای توکسیک و همین‌طور در مورد گونه‌های در حال انقراض اهمیت دارد. در خصوص اهمیت فرایند انجماد تخمک دو پارامتر هم‌زمان باید دیده شود: الف) حفظ حیات سلول و ب) باروری پس از انجماد. بر این اساس روش‌های مختلف انجماد آهسته، سریع و فوق سریع و شیشه‌ای سازی مورد بررسی قرار گرفته است. انجماد با تغییر در بیان ژن و رونویسی آن، آپوپتوز در تخمک همراه است. بیان ژن در روند رشد تخمک برای رشد و نمو جنین بسیار مهم است، انجماد در حجم زیاد محلول انجماد باعث آسیب DNA در COCs (مجتمع تخمک-کومولوس) می‌شود و بر شایستگی تکاملی تخمک تأثیر می‌گذارد (Men et al. 2003; Rojas et al. 2004). افزایش پلی‌پلوئیدی پس از لقاح، کاهش باروری و باریک و دراز شدن و پراکندگی کروموزوم‌ها متعاقب انجماد تخمک گزارش شده است. ناکارآمد بودن روش‌های انجماد تخمک باعث گردیده است که استفاده‌ی بالینی از این فناوری به ویژه در بخش زیست فناوری تولیدمثل دام‌ها رواج چندانی نداشته باشد. از همین‌رو پژوهش در مورد روش‌های کارآمد انجماد تخمک و راه‌های کم کردن آسیب‌ها در حین انجماد در سراسر جهان و در گونه‌های مختلف در جریان است. در معرض قرار گرفتن تخمک به ترکیبات هیپراسمول و تغییرات دمایی شدید می‌توانند به عنوان یک عامل استرس‌زا بر سلول مطرح باشند و یکی از مهم‌ترین پروتئین‌هایی که نقش آن در حفاظت از ساختار پروتئینی سلول در پی در معرض قرارگیری به استرس‌های محیطی شناخته شده است پروتئین شوک حرارتی[1] است. پروتئین‌های شوک حرارتی از مکانیسم‌های شناخته شده سلول در پاسخ به استرس‌های محیطی می‌باشند. در داخل بدن و در محیط آزمایشگاهی نشان داده شده که برخورد با عوامل استرس‌زای مختلف موجب افزایش موقت در تولید HSPها به عنوان محافظی در برابر عوامل آسیب‌رسان، می‌شود. افزایش این پروتئین‌ها پس از تنش‌های محیطی، عفونت، فرآیندهای فیزیولوژیکی طبیعی و انتقال ژن رخ می‌دهد. در معرض قرارگیری به مواد شیمیایی سمی مانند کادمیوم (Brunt et al, 2012) در معرض قرارگیری به دماهای بالای محیط (Luce and Vincent, 1992; Olexikova et al, 2010) از معمول‌ترین استرس‌زاهایی هستند که نقش این پروتئین‌ها مخصوصاً HSP70 در محافظت از سلول در آن‌ها اثبات شده است. این پروتئین‌ها معمولاً از طریق محافظت از ساختار چهارم از پروتئین‌های سلول محافظت می‌کنند. عمده مطالعات در خصوص عملکرد تولیدمثلی به تأثیر قابل توجه این پروتئین بر حفاظت از جنین و تخمک پستاندارن در شرایط استرس حرارتی می‌باشد. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی تغییرات کمی بیان ژن HSP70 در جنین‌های گوسفند حاصل از تخمک‌های شیشه‌ای شده می‌باشد.

مواد و روش کار

تخمدان‌های گوسفند از کشتارگاه جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد، تخمدان‌ها شسته شده به منظور انجام روند آسپیراسیون در بن‌ماری ۳۸ درجه‌ی سانتی‌گراد

1- Heat Shock Protein

www.SID.ir

Archive of SID

قرار داده شد و فولیکول‌های با قطر ۲–۶ میلی‌لیتر آسپیره گردید. در زیر استریو میکروسکوپ COC های با کیفیت انتخاب شد و پس از شست‌وشو به قطرات بلوغ منتقل شد. تخمک‌ها بعد از شست‌وشو به قطرات محیط کشت بلوغ منتقل و پس از آن تحت شرایط ۹ درصد CO_2 و رطوبت حداکثر و در دمای ۳۹ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴–۲۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. تخمک‌ها از محیط بلوغ به قطره‌های شست‌وشو انتقال داده شد. در این محیط شسته شده و در قطرات محیط لقاح، قرار می‌گرفتند. سپس اسپرم با غلظت مناسب اضافه شد و دیش‌ها در انکوباتور ۳۹ درجه، CO2٪۹ و رطوبت حداکثر و به مدت ۱۸–۲۶ ساعت قرار داده شد. ۲۲ تا ۲۴ ساعت پس از شروع IVF، محیط شست‌وشوی جنین در یک لوله کونیکال ریخته شده و ورتکس شد. این عمل به منظور جلوگیری از چسبیدن احتمالی جنین‌ها به دیواره‌ی لوله انجام گرفت. سپس جنین‌های برهنه شده از آن جدا شده و شست‌وشو شد. در این مرحله تخمک‌های دژنره شده جداسازی و شمارش شد. همچنین میزان تسهیم شدن ثبت می‌شد. تعداد ۶–۵ جنین در هر قطره قرار داده شد و جنین‌ها در دمای ۳۹ درجه، CO2 ۹ درصد، O2 ۸ درصد و رطوبت حداکثر کشت داده شد. ۴۸ ساعت بعد از شروع کشت جنین‌ها، قطرات محیط کشت IVC SOF که به آن ۱۰ درصد CSS (FBS تیمار شده با چارکول) اضافه شده بود آماده شده و حداقل ۲ ساعت در انکوباتور انکوبه شد (عمل Refresh محیط‌های کشت رویان). جنین‌های تسهیم شده جدا شده و در قطرات آماده شده ۵ روز دیگر کشت شدند. در روزهای ششم تا هشتم بعد از شروع کشت جنین‌ها بلاستوسیست‌ها شمارش و ثبت شدند.

محلول انجماد شیشه‌ای شامل محیط کشت HTCM+ ۲۰ درصد FBS+ ۲۰ درصد DMSO+ ۲۰ درصد اتیلن‌گلیکول+ نیم مول ساکاروز بود. انجماد شیشه‌ای تخمک‌ها در دمای محیط و ذوب تخمک‌ها بر روی یک سطح گرم که در داخل محیط کشت دمای ۳۷–۳۹ درجه‌ی سانتی‌گراد ایجاد می‌کرد، انجام شد. در یک پتری‌دیش استریل محیط پایه، محلول تعدیل‌کننده و محلول انجماد قرار داده شد. ۵–۷ تخمک توسط پیپت به قطره محیط کشت پایه منتقل شدند، پس از یک دقیقه تخمک‌ها از محیط پایه برداشته شده و سپس به قطره‌ی محلول تعدیل‌کننده منتقل شدند. پس از ۳۰ ثانیه تخمک‌ها به قطره محلول انجماد منتقل شده و بلافاصله برداشته شده و به سطح نوک کرایوتاپ منتقل شدند و کرایوتاپ در داخل ازت مایع فرو برده شد. کل زمان انتقال تخمک‌ها به محلول انجماد تا انتقال کرایوتاپ به داخل ازت مایع ۲۰ ثانیه طول کشید.

محلول ذوب اول شامل محیط کشت HTCM+ ۲۰ درصد FBS+ ۱ مول سوکروز بود. محلول ذوب دوم شامل محیط کشت HTCM+ ۲۰ درصد FBS+ ۰/۵ مول سوکروز بود و محلول ذوب سوم شامل محیط کشت HTCM+ ۲۰ درصد FBS+ ۰/۲۵ مول سوکروز بود. برای ذوب تخمک‌ها ابتدا محلول‌های ذوب به صورت زیر آماده می‌شد: دو تا ۳ کرایوتاپ از ازت مایع خارج شد و بلافاصله نوک آن‌ها در محلول ذوب اول فرو برده شد. پس از ۶۰–۹۰ ثانیه تخمک‌ها به محلول ذوب دوم منتقل شد و پس از ۳۰–۴۵ ثانیه به محلول ذوب سوم منتقل شد. سپس تخمک‌ها به قطره محیط پایه برای ۳–۵ دقیقه منتقل شدند. در انتها تخمک‌ها در محیط شستشو شسته شده و به قطرات بلوغ منتقل شد. رویان‌ها در ظروف محتوی ازت مایع، به آزمایشگاه انتقال داده شد و تا زمان استخراج در فریزر ۸۰– نگهداری گردید. در آزمایشگاه لوله‌های حاوی رویان از فریزر ۸۰– ^{o}C خارج گردید و RNA کل رویان با استفاده از کیت ایرازول استخراج گردید.

در ابتدا با استفاده از RNA استخراج شده و رونوشت‌برداری معکوس شده از آن، DNA ساخته شد که به آن DNA مکمل (cDNA) گفته می‌شود. برای تولید cDNA از کیت مخصوص PrimeScript ™ RT Reagent Kit محصولات شرکت بیوتکنولوژی تاکارا، ژاپن، استفاده گردید. بعد از استخراج cDNA و طراحی و ساخت پرایمرها (Table 1)، نمونه‌ها بر اساس دستورالعمل جهت انجام Real–time PCR آماده شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

به منظور ارزیابی نسبی بیان ژن، داده‌های مربوط به بیان ژن هدف (HSP70) با استفاده از داده‌های ژن β–ACTIN به عنوان کنترل داخلی نرمال‌سازی شدند. بدین منظور ابتدا داده‌های به دست آمده از نرم‌افزار Rotor-Gene Q (شرکت کیاژن، آلمان، هیلدن)، در قالب فایل اکسل به نرم‌افزار LinRegPCR نسخه 2012.0 (هلند، آمستردام) منتقل و توسط آن مورد بررسی قرار گرفتند و با توجه به عملکرد آغازگرها در هر کدام از cDNA های مورد نظر، میانگین کارایی (Efficiency) هر کدام از ژن‌ها محاسبه شد. در مرحله‌ی بعد برای محاسبه‌ی بیان نسبی و تجزیه و تحلیل–های آماری از نرم‌افزار REST (Available at http://rest.gene-quantifi cation.info)، استفاده شد. برای این منظور داده‌های مربوط به چرخه‌ی آستانه (Ct) تمامی واکنش‌های انجام شده به همراه میانگین کارایی واکنش هر کدام از ژن‌ها وارد نرم‌افزار REST شد و داده–های اختصاصی مربوط به هر کدام از ژن‌ها برای نرم‌افزار تعریف شد. نرم‌افزار REST از رابطه‌ی زیر برای محاسبه‌ی بیان نسبی ژن‌ها استفاده می‌کند.

$$\text{Ratio} = \frac{E_{Target}^{\ \Delta Ct\ Target\ (control-sample)}}{E_{Reference}^{\ \Delta Ct\ Reference\ (control-sample)}}$$

E_{Target} : کارایی واکنش ژن هدف، $E_{Reference}$: کارایی واکنش ژن کنترل داخلی، Ct: چرخه آستانه

Table 1. Primer sequences

	sequence	Sequence code in gene bank
OvHSP70	F: CGTGGAGGAGTTCAAGAGG R: CCTGGTGATGGACGTGTAG	XM_027958816.1
OVActB	F: CGCAGACAGGATGCAGAAAG R: GCTGATCCACATCTGCTGGA	U39357.2

روش آماری

توان تکاملی جنین‌های حاصل از انجماد تخمک با استفاده از رویه CATMOD مورد آنالیز رگرسیون قرار گرفت. متوسط درصد تکامل جنین‌ها در مراحل مختلف با استفاده از رویه‌ی t-test تحلیل گردید. میزان بیان ژن‌های مختلف در مراحل تمامی متفاوت حاصل از تخمک‌های منجمد شده و نشده با استفاده در یک طرح آزمایشی خرد شده مورد آنالیز واریانس دو طرفه قرار گرفت. میانگین‌ها با استفاده از ازمون توکی مقایسه گردید. نتایج به صورت حداقل مربعات میانگین و خطای معیار نشان داده شد. مقادیر $p<0.05$ معنی‌دار تلقی گردید. نرم‌افزار آماری SAS 9.1.3 جهت انجام تحلیل آماری مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه انجماد شیشه‌ای به صورت معنی‌دار ($p<0.05$) بر روی مراحل مختلف جنین تأثیر داشت (Table 2).

Table 2. The percentage (mean±statndard erro of mean) of different stages of ovine embryoniuc development follwing oocyte vitrification (numebr of repluicate=3)

Embryo	Fresh COC's	Virtrified COC's	P-value
	n=60	n=60	
Viability	96.4±1.69	56.42±1.87	<0.0001
Cleaved zygotes day 1	27.75±2.4	8.6±2.15	0.0001
Cleaved zygotes day 3	64.1±4.24	36.43±1.78	0.0001
Cleaved zygotes day 6	18.2±2.55	2.08±1.02	0.0002
Total	30.3±2.3	3.26±1.2	<0.0001

www.SID.ir

Archive of SID

تخمک‌ها و رویان‌های منجمد شده در مرحله‌ی تکاملی بلاستوسیست را تفکیک نموده و به عنوان گروه تیمار در نظر گرفته شدند و تخمک‌ها و رویان‌های حاصل از تخمک‌های تازه به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند و میزان بیان ژن HSP70 بین گروه‌ها مورد مقایسه قرار گرفت. در مدل مورد مطالعه با در نظر گرفتن پارامترهای نمونه‌های تازه و منجمد تغییرات میانگین ژن HSP70 به بیان ژن β–ACTIN معنی‌دار بود (P=۰/۰۰۰۳) و این تأثیر ناشی از تأثیر شیشه‌ای سازی نبود (P=۰/۳۱۲۳). مرحله‌ی تکاملی جنین اثر معنی‌داری بر نسبت بیان ژن HSP70 به بیان ژن β–ACTIN داشت. الگوی تغییرات نسبت بیان ژن HSP70 به β–ACTIN در مراحل مختلف تکامل جنینی تحت تأثیر شیشه‌ای شدن تخمک قرار نگرفت (P=۰/۰۰۶۶) (Table 3).

Table 3: Effects of vitrification on the HSP70/ β-actin gene exprression* of ovine immature oocytes and blastocyst

	COC (n=60)	Blastocycst (n=15)
Fresh COC's	0.037 ± 0.004^{A}	0.011 ± 0.005^{A}
Vitrified COC's	0.072 ± 0.005^{B}	0.008 ± 0.005^{A}

*Least Square Means±Standard Error of Means, ^{AB}Different superscript indicates significant difference (P<0.05)

بحث

انجماد با تغییر در بیان برخی ژن‌ها و آغاز فرایند آپوپتوز در تخمک همراه است. انجماد در حجم زیاد محلول انجماد باعث آسیب DNA در COCs شده و بر توان تکاملی و میزان تکوین تخمک تأثیر می‌گذارد (Men et al, 2003; Rojas et al, 2004). افزایش میزان پلی‌پلوئیدی، کاهش باروری و اختلالات کروموزومی، متعاقب انجماد تخمک گزارش شده است، از دیگر تأثیرات منفی انجماد می‌توان به وارد شدن صدمات غیرقابل برگشت به غشای پلاسمایی تخمک، کاهش نفوذپذیری انتخابی غشای پلاسمایی، اگزوسیتوز زودرس گرانول‌های قشری، سفت و سخت شدن غشای شفاف و کاهش شدید ریزپرزها اشاره کرد (Succu et al, 2008; Massip, 2003). Chen و همکاران در سال ۲۰۱۶ به تأثیر انجماد شیشه‌ای بر وضعیت اپی‌ژنیک و میزان رشد و تکوین جنین، در جنین‌های گاو پرداختند. نتایج نشان داد که انجماد تخمک تأثیری بر سرعت تسهیم زیگوت ندارد اما نرخ رشد بلاستوسیست به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. در گروه منجمد شده سطح متیلاسیون DNA در تخمک و مراحل اولیه تسهیم پایین‌تر از گروه کنترل بود (Chen et al, 2016). Li JJ و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی بیان ژن (HDAC1 Histon Deacetyl transferase1) در جنین‌های حاصل از تخمک‌های منجمد و ذوب شده موش پرداختند. نتایج نشان داد که پس از لقاح آزمایشگاهی (IVF) نرخ رشد به جنین ۲ سلولی، جنین ۴ سلولی، مورولا و بلاستوسیست در گروه منجمد به طور معنی‌داری کم‌تر از تخمک تازه بود. به علاوه بیان ژن HDAC1 در گروه منجمد نسبت به گروه شاهد پایین‌تر بود (Li et al, 2011). Yang و همکاران در سال ۲۰۰۸ میزان رشد و تسهیم در تخمک گاو را تحت تأثیر انجماد بررسی کردند و نشان دادند که به دنبال انجماد و ذوب میزان تسهیم و سرعت شکل‌گیری بلاستوسیست در گروه منجمد کاهش می‌یابد (Yang et al, 2008). نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز تأثیر منفی انجماد شیشه‌ای بر روی جنین در مراحل مختلف تکوین را نشان داد. همچنین میزان زنده‌مانی در گروه منجمد شیشه‌ای کاهش یافت و این نکته مؤید آن است که انجماد تأثیرات منفی بر زنده‌مانی و میزان تکوین دارد.

تغییرات در بیان ژن‌های مختلفی پس از انجماد جنین یا تخمک تا کنون مورد مطالعه قرار گرفته است. Yan و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر انجماد شیشه‌ای در تخمک‌های MII گوسفند را بر قابلیت بقا و تغییرات مرتبط با پروتئین هیستون بررسی و نشان دادند که در انجماد شیشه‌ای،

www.SID.ir

Archive of SID

استیلاسیون هیستون ۴ (H4K5) و متیلاسیون هیستون ۳ (H3K9) کاهش می‌یابد (Yan et al, 2010). Monzo و همکاران در سال ۲۰۱۲ به بررسی بیان برخی ژن‌ها در دو روش انجماد آهسته و انجماد شیشه‌ای پرداختند و مشاهده شد که هر دو روش تأثیراتی بر بیان این ژن‌ها داشتند. در انجماد آهسته ژن‌های درگیر در نگهداری ساختار کروموزومی (KIF2C و KIF3A) و تنظیم چرخه‌ی سلولی (CDKN1B) دچار افت بیان شدند که این مسأله می‌تواند سبب کاهش صلاحیت تکاملی تخمک در روش انجماد آهسته نسبت به انجماد شیشه‌ای شود. Ebrahimi و همکاران در سال ۲۰۱۰ به ارزیابی بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز در تخمک بالغ تحت اثر انجماد با کرایوتاپ و همچنین بروز اختلالات کروموزومی پرداختند. نتایج نشان داد که اگر چه انجماد تأثیری بر بلوغ یا بیان ژن‌های آپوپتوز ندارد، کاستی‌های قابل توجهی در سازماندهی کروموزومی تخمک مشاهده می‌شود (Ebrahimi et al, 2010).

در مطالعه‌ی حاضر میزان بیان ژن HSP70 طی انجماد شیشه‌ای در تخمک و بلاستوسیست شیشه‌ای شده با کرایوتاپ در گوسفند مورد بررسی قرار گرفت. از آن جایی که در مطالعات پیشین گوسفند کم‌تر به عنوان مدل مورد بررسی توسط محققین انتخاب شده و همچنین ارزش‌های اقتصادی گوسفند حایز اهمیت می‌باشد، این گونه طی این تحقیق انتخاب گردید. بیان ژن پروتئین شوک حرارتی (HSP) وسیله‌ی طبیعی حفاظت سلول‌ها علیه استرس‌های محیطی و فیزیولوژیک می‌باشد (Nicchitta & Baker-LePain, 2004). سلول‌هایی که تحت استرس قرار می‌گیرند به کمک القای پروتئین‌های شوک حرارتی یا بر استرس وارد شده غلبه کرده و زنده می‌مانند و یا تسلیم شده و دچار مرگ می‌گردند. این توانایی در طی فرایند تکامل همچنان حفظ شده است (Kim & Lee 2002). Edvards و همکاران در سال ۱۹۹۵بیان کردند که، تغییرات بیان ژن HSP70 در جنین‌های گاو و موش بعد از در معرض قرارگیری با استرس حرارتی به مرحله‌ی تکاملی بستگی دارد. به طوری که تا قبل از مرحله‌ی فعال شدن ژنوم مقدار آن ثابت و پس از آن در مواجهه با استرس حرارتی افزایش قابل توجه می‌یابد (Edwards et al, 1995). در مطالعه‌ی انجام شده به وسیله‌ی Succu و همکاران در سال ۲۰۰۸، تأثیر انجماد شیشه‌ای تخمک‌های بالغ شده گوسفندی بر ظرفیت تکاملی تخمک و الگوی بیان و فراوانی نسبی ترنس کریپت‌های ژن‌های مسئول در بلوغ تخمک و تکامل رویان بررسی شد. در این مطالعه میزان بیان ژن HSP90 در تخمک‌های منجمد-ذوب شده به طور معنی‌داری کم‌تر از گروه کنترل بود. همچنین سرعت و میزان تسهیم در گروه منجمد کم‌تر از گروه کنترل بود (Succu et al, 2008). Miriam Castillo-Martín و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که اعمال استرس برودتی و حرارتی بر جنین‌های آزمایشگاهی خوک، منجر به افزایش بیان ژن HSPA1A می‌گردد (Castillo-Martín et al, 2015). PAN و همکاران در سال ۲۰۱۵ به میزان بیان ژن HSP90 در تخمک نابالغ منجمد-ذوب شده در گاو پرداختند و مشاهده کردند که میزان بیان ژن HSP90 در بلاستوسیست گروه‌های منجمد-ذوب شده افزایش یافته و این قضیه با صلاحیت رشد جنین مرتبط است (Pan et al, 2015). Boonkusol و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مطالعه‌ای اثر انجماد به روش نی انجماد را در جنین‌های موش پیش از مرحله‌ی لانه‌گزینی و ۸ سلولی مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده شد که همه‌ی ژن‌های وابسته به استرس از جمله HSP70، در جنین‌های آزمایشگاهی منجمد شده در مرحله‌ی پیش هسته‌ای افزایش می‌یابد. Shin و همکاران در سال ۲۰۱۱ به مقایسه‌ی کارایی انجماد آهسته و انجماد شیشه‌ای بر توسعه و تعداد بلاستوسیست و تغییر در بیان ژن در جنین‌های تازه و منجمد موش پرداختند. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری در زنده‌مانی در دو گروه تحت اثر انجماد شیشه‌ای و آهسته وجود نداشت. اما بیان ژن HSP70 در جنین‌های منجمد بیش از جنین تازه بود (Shin et al, 2011). Thurathum و همکاران در سال ۲۰۱۰ به بررسی اثر انجماد شیشه‌ای بر بلوغ هسته‌ای و تغییرات ساختاری و بیان ژن در تخمک

www.SID.ir

Archive of SID

سگ پرداختند. در این مطالعه بیان ژن HSP70 تفاوتی بین دو گروه نشان نداد (Turathum et al. 2010).

در مطالعه‌ی حاضر با در نظر گرفتن پارامترهای نمونه‌های تازه و منجمد، تغییرات میانگین ژن HSP70 به بیان ژن β–ACTIN معنی‌دار بود. این تأثیر ناشی از تأثیر شیشه‌ای سازی نبود. مرحله‌ی تکاملی جنین اثر معنی‌داری بر نسبت بیان ژن HSP70 به بیان ژن β–ACTIN داشت. الگوی تغییرات نسبت بیان ژن HSP70 به β–ACTIN در مراحل مختلف تکامل جنینی تحت تأثیر شیشه‌ای شدن تخمک مشابه بود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دانشگاه شهرکرد به دلیل تأمین مالی و پرسنل کشتارگاه جونقان به دلیل همکاری در تهیه‌ی تخمدان‌ها قدرانی به عمل می‌آورند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه ادعایی در خصوص تعارض منافع ندارند.

منابع مالی

پروژه در غالب پایان‌نامه‌ی دانشجوی دکترای حرفه ای دامپزشکی توسط دانشگاه شهرکرد تأمین مالی شد.

منابع

Ambrosini, G.A., Andrisani, E., Porcu, E., Rebellato, A., Revelli, Donatella Caserta, E., Cosmi, R., Marci, & Moscarini, M. (2006). Oocytes cryopreservation: state of art. *Reproductive Toxicology 22* (2): 250-262.

Brunt, J.J, Khan, S. & Heikkila, J.J. (2012). Sodium arsenite and cadmium chloride induction of proteasomal inhibition and HSP accumulation in Xenopus laevis A6 kidney epithelial cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 155* (2): 307-317.

Castillo-Martín, M., Marc, Y., Eva, P., Roser, M., Alfonso, G.A., & Bonet, S. (2015). Effects of vitrification on the expression of pluripotency, apoptotic and stress genes in in vitro-produced porcine blastocysts. *Reproduction, Fertility and Development 27* (7): 1072-1081.

Chen, H., Lei Z., Tengfei D., Pengda Z., Yongsheng W., Fusheng Q, & Yong Z. (2016). Effects of oocyte vitrification on epigenetic status in early bovine embryos. *Theriogenology 86* (3): 868-878.

Ebrahimi, B., Rezazadeh Valojerdi, M., Eftekhari-Yazdi, P. & Baharvand, H. (2010). In vitro maturation, apoptotic gene expression and incidence of numerical chromosomal abnormalities following cryotop vitrification of sheep cumulus-oocyte complexes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics 27* (5): 239-246.

Edwards, J.L., Ealy, A.D. & Hansen, P.J. (1995). Regulation of heat shock protein 70 synthesis by heat shock in the preimplantation murine embryo. *Theriogenology 44* (3): 329-337.

Kim, H.J. & Kong-Joo L. (2002). Heat shock and ceramide have different apoptotic pathways in radiation induced fibrosarcoma (RIF) cells. *Molecular and Cellular Biochemistry 229* (1-2): 139-151.

Li, J. J., Yan P., Guang-Bin Z., Lun S., Yan-Ping W., Guo-Quan W., Xiang-Wei F., Yun-Peng H. & Shi-En Z. (2011). Histone deacetyltransferase1 expression in mouse oocyte and their in vitro-fertilized embryo: effect of oocyte vitrification. *CryoLetters 32* (1): 13-20.

Massip, A. (2003). Cryopreservation of bovine oocytes: current status and recent developments. Reproduction Nutrition Development. *43* (4):325-330.

Men, H., Monson, R.L., Parrish, J.J. & Rutledge, J.J. (2003). Detection of DNA damage in bovine metaphase II oocytes resulting from cryopreservation. *Molecular Reproduction and Development 64* (2): 245-250.

www.SID.ir

Archive of SID

Monzo, C., Haouzi, D., Roman, K., Assou, S. (2012). Slow freezing and vitrification differentially modify the gene expression profile of human metaphase II oocytes. *Human Reproduction 27* (7): 2160-2168.

Nicchitta, C.V., Deanna M.C. & Baker-LePain, J.C. (2004). The messenger and the message: gp96 (GRP94)-peptide interactions in cellular immunity. *Cell stress & Chaperones 9*(4): 325-331.

Olexikova, L, Makarevich, A.V., Pivko, J. & Chrenek, P. (2010). Antibody to Hsp70 alters response of rabbit preimplantation embryos to hyperthermia in vitro. *Animal Reproduction Science 119*(1): 130-136.

Pan, Y., Yan C., Abdul Rasheed B., Jiangfeng F., Junfeng H., Yifu Z., Hongfei Z., Guyue L. & Sijiu Y. (2015). Association of heat shock protein 90 with the developmental competence of immature oocytes following Cryotop and solid surface vitrification in yaks (Bos grunniens). *Cryobiolog 71*(1): 33-39.

Rojas, C., María J. P., José L. A. & Teresa M. (2004). Vitrification of immature and in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. *Cryobiology 49*(3): 211-220.

Succu, S., Daniela, B., Luisa, B., Federica, A., Stefano, F., Giovanni, G.L.i, Fiammetta, B., Salvatore, N. & Sergio L. (2008). Vitrification of in vitro matured ovine oocytes affects in vitro pre-implantation development and mRNA abundance. *Molecular Reproduction and Development 75*(3): 538-546.

Turathum, B.h, Kulnasan S., Parisatcha S. & Yindee, K. (2010). Effects of vitrification on nuclear maturation, ultrastructural changes and gene expression of canine oocytes. *Reproductive Biology and Endocrinology 8* (1): 70.

Yan, L.Y., Jie, Y., Jie, Q., Pan-Lin, Z. & Ping, L. (2010). Effects of oocyte vitrification on histone modifications. *Reproduction, Fertility and Development 22*(6): 920-925.

Yang, B.C., Gi-Sun, I., Dong-Hun, K., Boh-Suk, Y., Hyun-Ju, O., Hyo-Suk, P., et al. (2008). Development of vitrified–thawed bovine oocytes after in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science 103*(1): 25-37.

www.SID.ir

Archive of SID
Vol. 16, No. 3, Autumn, 2020
DOI: 10.22055/ivj.2020.63960.1819

Effect of vitrification of ovine immature oocytes on subsequent oocyte and blastocyct HSP70 gene expression

Naghmeh Farmani[1], Farid Barati[2*], Ali Kadivar[2] and Ebrahim Ahmadi[3]

[1] DVM Graduated, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
[2] Asociate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine and Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
[3] Assistant Professor, Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Receive: 15.05.2019 Accepted: 06.01.2020

Abstract

Vitrification removed many of the problems related to cryopreservation of oocytes and embryos. On the hand, some problems related to in vitro produced embryos may indicate any alteration in embryonic genome transcription. The present study aimed to investigate whether oocyte vitrification may alter expression of a gene that can change following environmental stress, i. e., HSP70 or not. Total of 120 immature germinal vesicle stage ovine cumulus oocyte complexes (COC) were retrieved from abattoir collected ovine ovaries. The COCs were subjected to vitrification in HTCM based (with 20% FBS) media as V1: DMSO (10 %), Ethylene glycol (10 %) for 30 min, V2: DMSO (10 %), Ethylene glycol (10 %) and 0.5 M sucrose immediately left on the cryotop device and immersed within liquid nitrogen. At least after 48 hrs of vitrification, the oocytes were warmed in warming solutions as W1: basic medium with 1 M sucrose, W2: basic medium and 0.5 M sucrose and W3 basic medium and 0.25 M sucrose, each of them for 5 min. The vitrified-warmed COCs (n=60) and fresh COCs (n=60) were subjected to routine IVM, IVF and IVC procedures of the laboratory with SOF based media. The developmental stages of oocytes were compared and the expression rate of HSP70 to an average of β-actin and B2m genes expressions were compared between blastocysts and oocytes before and after vitrification. The results of the study showed the impact of vitrification of germinal vesicle stage oocytes on the next developmental competence of the respected embryos in all stages. The expression of HSP70 was significantly different between oocytes and blastocysts; however the vitrification of immature ovine oocytes did not affect the expression rate of HSP70 in oocytes the respective blastocysts. In conclusion, vitrification does not affect the vitrified ovine immature oocytes and the next developed blastocysts.

Keywords: Ovine COCs, Vitrification, HSP70, Blastocysts, Oocyte

* **Corresponding Author**: Farid Barati, Asociate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, and Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran, E-mail: baratif@sku.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

www.SID.ir