Archive of SID

تاثیر تغییرات ولتاژ و زمان فیوژن بر تسهیم جنینهای تتراپلوییدی حاصل از الکتروفیوژن جنینهای دو سلولی گاو

محمدرضا دارابی Ph.D.[1]، حسین بهاروند Ph.D.[2]، محمدحسین نصراصفهانی Ph.D.[3]
[1] دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی
[2] پژوهشکده رویان، گروه سلولهای بنیادی
[3] پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی
آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی
پست الکترونیک: Email: mh_nasr@med.mui.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۳/۴/۲۰، پذیرش مقاله: ۸۳/۹/۲۵

هدف: ارزیابی آثار ولتاژ و زمان بر میزان فیوژن جنینهای دو سلولی گاو و تسهیم جنینهای تتراپلویید حاصل از الکتروفیوژن

مواد و روشها: پس از بلوغ و لقاح آزمایشگاهی توده‌های تخمک- کومولوس، جنینهای دو سلولی حاصل، به سه گروه تقسیم شدند: ۱-گروه فیوز شده (FG: Fused group) شامل جنینهای دو سلولی بود که بلاستومرهایشان بعد از الکتروفیوژن، در ولتاژها (۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵، ۱/۵ کیلو ولت بر سانتی‌متر) و زمانهای مختلف (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میلیونیم ثانیه) به هم ملحق شدند. ۲- گروهی که بعد از الکتروفیوژن، بلاستومرهایشان در هم الحاق نشدند (ECG Exposed control group) . ۳- گروه کنترل که در معرض الکتروفیوژن قرار نگرفتند. (UCG: Unexposed control group). تودهٔ جنینهای هر گروه در محیط SOF_1 کشت شدند و میزان فیوژن و تسهیم در آنها با هم مقایسه شد.

یافته ها: افزایش ولتاژ به طور معنی‌داری سبب افزایش میزان فیوژن و کاهش میزان تسهیم شد. افزایش زمان تاثیر معنی‌داری بر میزان فیوژن نداشت. افزایش زمان در ولتاژهای بالا به طور معنی‌داری سبب کاهش تسهیم اما در ولتاژهای پایین موجب افزایش تسهیم شد. میزان تسهیم در گروه ECG از گروه FG تبعیت می‌نمود، و در گروه FG وECG به طور معنی‌داری از گروه UCG کمتر بود.

نتیجه گیری: بهترین میزان فیوژن و تسهیم می‌تواند در ولتاژهای ۰/۷۵تا ۱ کیلو ولت بر سانتی‌متر و مدت زمان ۶۰میکروثانیه حاصل شود.

گل واژگان: گاو، تتراپلویید، الکتروفیوژن، ولتاژ

مقدمه

پیشرفتهای اخیر در قلمرو مولکولی، ژنتیک و تکنولوژی تولید مثل و شبیه‌سازی، به واسطه تولید حیوانات ترانس ژنیک لزوم انجام تحقیقات جهت توسعه صنعت دامپروری را به وجود آورده است و از جمله موفقیت‌هایی که در این زمینه حاصل شده تولید داروهای پروتئینی فارماکوتیکال و بهبود نژاد حیوانات از نظر تولیدات گوشتی و لبنی بوده است.

حیوانات ترانس ژنیک را می‌توان به طرق مختلف تولید نمود، که یکی از این روشها تولید کایمرها به واسطه ادغام (Aggregation) سلولهای توده درونی (ICM: Inner cell mass) و یا سلولهای شبه بنیادی جنینی (ESLC: Embryonic Stem Like Cell) با جنینهای تتراپلویید مرحله مورولا است. لازم به ذکر است که در این روش پس از زدودن دیواره شفاف جنینهای تتراپلویید توسط پروناز ۰/۵ درصد دو توده از بلاستومرهای حاصل با توده‌ای از سلولهای ESLC به صورت مثلثی در کنار هم قرار گرفته و به منظور رسیدن به بلاستوسیست و ترانسفر، به محیط کشت منتقل می‌شوند. به این ترتیب جنین تشکیل شده صرفاً از ICM یا سلولهای ESLC که به داخل بلاستوسیست تتراپلویید تزریق شده مشتق می‌گردد، و جفت از بلاستوسیست تتراپلوئید فاقد ICM تشکیل می‌شود. با ادغام سلولهای ESLC در جنینهای دیپلویید سه روزه گاو، سلولهای ESLC در بافتهای مختلف، دارای توزیع محدودی خواهند بود، اما اگر سلولهای ESLC را در جنینهای تتراپلویید گاوی ادغام نماییم، جنین حاصله به طور اخص از سلولهای ESLC تشکیل خواهد شد و فرزندان حاصل از این کایمرها به طور اخص از سلولهای دیپلویید تشکیل خواهند شد (۱، ۲).

تولید حیوانات ترانس ژنیک به روش فوق یکی از موثرترین روشهای تولید حیوانات ترانس ژنیک است، لذا دستیابی به این روشها می‌تواند در زمینه‌های مختلف صنعتی و دامپزشکی موثر باشد. نظر به اینکه تولید گاوهای ترانس ژنیک با توجه به تولید بالای شیر در آنها می‌تواند از اهمیت خاصی برخوردار باشد، لذا این نوع حیوانات را

www.SID.ir

Archive of SID

می‌توان با تزریق مستقیم DNA به داخل پیش هسته‌ها و یا به واسطه ادغام سلولهای بنیادی ترانسفکت شده (یا جنینهای دیپلوییدترانسفکت شده) با مورولاهای تتراپلوییدو یا به واسطه تزریق این سلولها به داخل بلاستوسل بلاستوسیستهای تتراپلوییدایجاد نمود.

گر چه برای تولید کایمرهای دیپلوییدتتراپلوییدروش تزریق سلول (ترانس ژن شده) به داخل بلاستوسل، نسبت به روش ادغام سلولها با مورولاهای تتراپلوییدموثرتر است (۳، ۴) اما باید اذعان نمود که به ابزار و مهارتهای بیشتری نیز نیاز است.

پدیده پلی‌پلوییدی (که تتراپلوییدی نیز در زیر مجموعه آن قرار دارد) به طور طبیعی در گیاهان، بی‌مهرگان و بعضی از مهره‌داران اتفاق می‌افتد (۵)، اما در انسان وقوع این پدیده می‌تواند کشنده باشد.

امروزه از بین روشهای مختلفی که برای الحاق دو سلول وجود دارد، از الکتروفیوژن به عنوان ارزشمندترین و قابل اعتمادترین روش استفاده می‌شود، زیرا بر خلاف سایر روشها تکرارپذیری آن دقیقاً با شرایط قبلی امکان‌پذیر بوده و مدتی که جنینها تحت تاثیر محرک قرار می‌گیرند در حد میلیونیم ثانیه و به دقت قابل تنظیم است. این روش برای اولین بار توسط Berg و همکاران بر روی موش (۶) و نیز توسط Iwasaki و همکاران بر روی جنینهای گاوی با موفقیت آزمایش شد (۷).

با اینکه روش الکتروفیوژن به طور رایج در مراکز باروری و ناباروری و تحقیقاتی پیشرفته استفاده می‌شود اما هنوز تاثیر شدت تحریک (ولتاژ) و زمان آن بر روی میزان فیوژن و تسهیم جنین به طور دقیق مورد مطالعه قرار نگرفته است، به طوری که Thatam در مطالعه خود آثار تغییرات ولتاژ و زمان را در طی الکتروفیوژن تخمک بدون هسته با بلاستومرگاو که به منظور انتقال هسته را بررسی نمود(۸). Teissie و همکاران نیز آثار ولتاژ و زمان تماس سلولی را بر روی میزان فیوژن و بقاء سلولهای تخمدان هامستر مورد مطالعه قرار دادند (۹). از طرفی در مطالعه Cornow نیز که به مطالعه حاضر نزدیک است، تاثیر تغییرات ولتاژ و زمان مورد بررسی قرار نگرفته، بلکه از بین سه ولتاژ (۱، ۱/۴، ۲/۴) و دو زمان مختلف (۵۰ و ۱۰۰میلونیم ثانیه) که فاصله عددی زیادی نیز با هم دارند، فقط به انتخاب پارامتر مطلوب جهت الحاق و تکوین پرداخته است (۱۰). هدف مطالعه حاضر ارزیابی آثار ولتاژها و زمانهای مختلف بر روی میزان الحاق و تسهیم جنینهای تتراپلوییدگاوی است.

مواد و روشها

تمامی مواد شیمیایی از شرکت سیگما خریداری شده است در غیر این صورت نام شرکت مربوطه و شماره کاتالوگ آن ذکر گردیده است.

به منظور بلوغ آزمایشگاهی تودههای تخمک کومولوس گاو (COCs: Cumulus oocyte complexes)، با مراجعه به کشتارگاه صنعتی اصفهان ۲۰-۱۰ دقیقه بعد از ذبح، ۱۱۵۰ عدد تخمدان از رحم جدا و پس از شستشوی مقدماتی در آب معمولی (دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد) به سالین ۰/۹درصد در همان دما منتقل و در طی مدت۲-۱ ساعت به آزمایشگاه مرکز باروری و ناباروری اصفهان منتقل شدند. سپس با استفاده از سر سرنگ نمره ۱۸ مایع فولیکولی، فولیکولهای ۶-۲ میلی متری آسپیره و در لوله‌های ته مخروطی ریخته شد و به منظور ته نشینی به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در انکوباتور نگهداری و در زیر استریومیکروسکوپ ۱۳۵۰۰ عدد توده تخمک کومولوس با کیفیت که دارای سیتوپلاسم هموژن و گرانوله و حداقل سه لایه سلولهای کومولوس در اطراف خود داشتند در محیط شستشو جمع آوری شدند.

محیط شستشو (WM: Washing medium) از (M-۲۵۲۰) TCM-۱۹۹ که دارای افزودنیهای ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، و ۰/۲۲میلی گرم بر میلی‌لیتر سدیم پیروات، ۲۵ سدیم میلی مولار بیکربنات است، تشکیل و PH آن در حد ۷/۴-۷/۳ تنظیم شده و حداقل ۲ ساعت قبل از استفاده، درانکوباتور دارای ۵ درصد CO و ماکزیمم رطوبت در ۳۹ درجه سانتی گراد انکوبه شد.

بلوغ آزمایشگاهی

پس از جمع‌آوری COCها در WM دو بار دیگر آنها را در همین محیط شستشو داده و دو بار نیز آنها را در محیط بلوغ (MM: Maturation medium) که از محیط شستشو به علاوه ۰/۰۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هفده بتا استرادیول، ۰/۱ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر hMG، FCS ۱۰درصد و ۱/۳ میلی‌مولار ال- گلوتامین، شستشو داده شد. سپس COCها در گروههای ۵تایی به قطرات ۵۰میکرولیتر از MM در زیر روغن پارافین استریل منتقل و به مدت ۲۴-۲۲ ساعت انکوبه شدند (۱۱، ۱۲).

لقاح آزمایشگاهی

بعد از بلوغ COCها که به واسطه اتساع (Expansion) سلولهای کومولوس اطراف تخمک و رها شدن اولین جسم قطبی مشخص می‌گردید و نیم ساعت قبل از تلقیح، دو بار آنها را در محیط لقاح (۱۳) شستشو داده و در گروههای ۱۰تایی به قطرات ۵۰ میکرولیتری از محیط لقاح در زیر روغن پارافین استریل منتقل و به مدت ۲۲-۱۸ ساعت در انکوباتوری مشابه با دوران بلوغ انکوبه می‌شدند.

سپس مایع سمن (Semen) تازه گاوی با قدرت باروری اثبات شده از مرکز اصلاح نژاد دام اصفهان گرفته شد و در پرکول با گرادیان ۴۵درصد و ۹۰درصد و دور ۱۸۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ شد. متعاقباً ته‌نشین حاصل، دو بار در محیط لقاح به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و ته‌نشین نهایی توسط محیط لقاح به نحوی رقیق شد که غلظت نهایی اسپرمها در قطرات محیط لقاح به ۲-۱

www.SID.ir

Archive of SID

میلیون در میلی‌لیتر برسد. لازم به ذکر است که ظرفیت‌پذیری (Capacitation) و افزایش تحرک اسپرمها در همین محیط انجام می‌گردید (۱۳).

کشت آزمایشگاهی

مدت ۲۲-۱۸ ساعت پس از تلقیح COCها، به منظور جداکردن اسپرمهای مرده و سلولهای کومولوس از تخمکهای تلقیح شده، به مدت دو دقیقه آنها را در محیط WM به وسیله دستگاه ورتکس لرزانده و پس از جداسازی به محیط کشت SOF_1(Synthetic oviductal fluid) که از مایعی سنتتیک شبیه مایع لوله رحمی گوسفند ساخته شده، منتقل شدند (۱۴، ۱۵).

۳۵-۳۳ ساعت بعد از لقاح ۳۵۴۰ عدد جنین دوسلولی انتخاب و تعدادی از آنها برای مدت ۳۹-۳۷ ساعت دیگر بدون قرار گرفتن در معرض الکتروفیوژن به عنوان گروه شاهد (UCG) به محیط کشت SOF_1 و انکوباتور منتقل و مابقی جنینهای دو سلولی به منظور الکتروفیوژن استفاده شد.

الکتروفیوژن

گروههای ۱۰-۵ عددی از جنینهای دو سلولی به مدت ۱۰-۵ ثانیه در بافر فیوژن (۰/۳ مولار مانیتول، ۰/۱ میلی‌مولار سولفات منیزیم ، ۰/۰۵ میلی مولار کلریدکلسیم و ۰/۰۵درصد BSA، PH=7/2-7/4) متعادل شده و سپس به قطره‌ای از همین بافر که در محفظه الکتروفیوژن (بین دو الکترود) قرار داده شده بود منتقل شدند.

محفظه الکتروفیوژن

از دو الکترود ورقه ای شکل باریک و دراز فلزی (فولاد ضد زنگ) که به فاصله ۱ میلی‌متر از هم بر روی اسلاید چسبیده، تشکیل شده، که هر یک به وسیله سیمی به دستگاه الکتروفیوژن (CF-150B Biological Laboratory Service, H-1165 Budapest, Zselyi A.U.31 Hungary) متصل است. جنینهای دو سلولی طوری به بافر بین الکترودها منتقل شدند که سطح بین دو بلاستومر به موازات الکترودها قرار گرفته تا ماکزیمم جریان الکتریکی از آن عبور نماید. سپس جنینها تحت تاثیر یک پالس جریان مستقیم (DC: Direct current) با ولتاژ (۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵، ۱/۵ کیلو ولت بر سانتی متر) و زمان معین (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میلیونیم ثانیه) قرار داده شدند. به منظور جداسازی جنینهای فیوز شده، در زمانهای ۳۰ و ۶۰ دقیقه بعد از الکتروفیوژن آنها را در زیر لوپ انتخاب و تحت عنوان گروه فیوز شده (FG) از ما بقی جنینهای دو سلولی که تحت تاثیر جریان قرار گرفتند، ولی فیوژن در آنها اتفاق نیفتاد (ECG) جدا شدند و برای مدت ۳۹-۳۷ ساعت دیگر در محیط SOF_1 کشت داده شدند (۱۰).

۷۲ ساعت پس از لقاح جنینهای هر سه گروه (FG, ECG UCG) برای ارزیابی میزان تسهیم مورد بررسی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که آزمایشات بین ۵-۳ مرتبه تکرار شد.

رنگ آمیزی کروموزومها

به منظور شمارش تعداد کروموزمها و اثبات تتراپلوییدی، جنینهای مرحله ۸-۲ سلولی از گروه FG طبق روش تارکوفسکی، با کمی تغییر (۱۶، ۱۷) رنگ‌آمیزی و کروموزومهای آنها شمارش شد. در این روش با قرار دادن جنینها در پروناز ۰/۵درصد به مدت ۵۰-۴۰ ثانیه دیواره شفاف نرم و سپس به منظور توقف کروموزمها در متافاز، جنینها به مدت ۱۲-۱۰ ساعت در محیط Ham`S F10 حاوی ۰/۱میکروگرم بر میلی‌لیتر کالسمید (Gibco cat No. 15212-012 Auckland .U.K) در انکوباتور کشت داده شدند. سپس جنینها در قطره‌ای از محلول هیپوتونیک (کلریدپتاسیم ۰/۰۷۵مولار) به حجم ۰/۴میلی‌لیتر قرار داده شده و برای مدت ۲۵-۲۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس جنینها با حداقل محلول هیپوتونیک بر روی لام منتقل و با انداختن چند قطره محلول فیکساتیو (نسبت ۱:۱ متانول و اسید استیک) بر روی آنها فیکس شدند.

بلافاصله کیفیت گسترش کروموزمها در زیر میکروسکوپ بررسی شد و در صورت باقی بودن سیتوپلاسم، با انداختن یک قطره دیگر از فیکساتیو (نسبت سه به یک، متانول و اسیداستیک) سیتوپلاسم اضافی برداشته شد. سپس گسترش کروموزومی به مدت ۱۰ دقیقه توسط محلول گیمسای ۲درصد رنگ‌آمیزی و بعد از شستشو و خشک شدن اسلاید و لامل‌گذاری اقدام به شمارش کروموزومها گردید (شکل ۱) .

یافته‌ها

جدول۱ گویای آن است که با افزایش زمان (۲۰۰-۱۰۰میکروثانیه) در هر یک از ولتاژهای مختلف (۰/۵ تا ۱/۵ کیلوولت بر سانتی‌متر) افزایش معنی‌داری در میزان فیوژن، ایجاد نخواهد شد.

*زمان ** ولتاژ	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰
۰/۵۰	٪ ۳۶	٪ ۳۵	٪ ۴۷	٪ ۲۸	٪ ۳۴/۵
۰/۷۵	٪ ۶۴	٪ ۶۹	٪ ۶۹	٪ ۶۴	٪ ۷۳
۱	٪ ۶۴	٪ ۶۲	٪ ۶۴	٪ ۷۳	٪ ۷۲
۱/۲۵	٪ ۷۱	٪ ۷۶	٪ ۸۱	٪ ۷۰	٪ ۸۲/۵
۱/۵	٪ ۸۲	٪ ۷۸	٪ ۸۳	٪ ۸۷	٪ ۸۸
	P=۰/۰۲۶ r=۰/۹۲۱	P=۰/۰۴ r=۰/۸۴۵	P=۰/۰۳۱ r=۰/۹۱۲	P=۰/۰۴۳ r=۰/۸۹۰	P=۰/۰۴۵ r=۰/۸۸۰

جدول ۱: همبستگی پیرسون بین میزان (درصد) فیوژن و ولتاژهای مختلف در زمانهای مختلف
*** زمان: برحسب میلینیوم ثانیه (میکروثانیه) ** ولتاژ: برحسب کیلوولت بر سانتی متر**
r: همبستگی بین دو متغیر (ولتاژ و فیوژن) است که در زمانهای مختلف گزارش شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

*زمان ** ولتاژ	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰
۰/۵۰	٪ ۶۴	٪ ۶۴	٪ ۷۲	٪ ۷۰	٪ ۷۴
۰/۷۵	٪ ۵۳	٪ ۶۱	٪ ۶۶	٪ ۸۰	٪ ۵۷
۱	٪ ۵۲	٪ ۴۹	٪ ۵۶	٪ ۵۱	٪ ۵۸
۱/۲۵	٪ ۴۵	٪ ۱۳	٪ ۱۸	٪ ۳۹	٪ ۲۳
۱/۵	٪ ۵۳	٪ ۱۹	٪ ۲۷	٪ ۱۹	٪ ۱۸
	P=۰/۱۹۱ r=-۰/۶۹۷	P=۰/۰۲۸ r=-۰/۹۱۸	P=۰/۰۳۳ r=-۰/۹۰۹	P=۰/۰۲۲ r= -۰/۸۹۰	P=۰/۰۱۳ r=-۰/۹۳۰

جدول ۲: همبستگی پیرسون بین میزان تسهیم و ولتاژهای مختلف در زمانهای مختلف
*** زمان: برحسب میلینیوم ثانیه (میکروثانیه) ** ولتاژ: برحسب کیلوولت بر سانتی متر**
r: همبستگی بین دو متغیر (ولتاژ و تسهیم) که در زمانهای مختلف گزارش شده است.

آنالیز آماری نتایج حاصل با استفاده از آزمون Chi-square نیز هیچ گونه اختلاف معنی‌داری در میزان فیوژن در زمانهای مختلف در هر یک از ولتاژها نشان نداد.

نتایج جدول۱ از طرفی نشان می‌دهد که افزایش ولتاژ (از۰/۵ تا ۱/۵ کیلوولت بر سانتی‌متر) در هریک از زمان ها به طور معنی‌داری موجب افزایش میزان فیوژن شده است (همبستگی پیرسون مثبت). اگرچه حداقل ولتاژی که می‌تواند فیوژن را به میزان زیادی افزایش دهد ۰/۷۵ کیلوولت بر سانتی‌متر است. نتایج نشان داد که ماکزیمم میزان فیوژن در ولتاژ ۱/۵ کیلوولت بر سانتی‌متر حاصل شد، در این حالت تغییر زمان تاثیر معنی‌داری در میزان فیوژن نداشت.

جدول۲ همچنین نشان می‌دهد که کاهش ولتاژ از ۱/۵ به سمت ۰/۵ کیلو ولت بر سانتی‌متر، موجب افزایش میزان تسهیم در تمامی زمانهای فوق‌الذکر باستثنای ۲۰ میکروثانیه شد (همبستگی پیرسون منفی).

آنالیز آماری نتایج حاصل با استفاده از آزمون Chi-square نیز حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در میزان تسهیم جنینها، در دو گروه ولتاژی ۱/۵ و ۱/۲۵ کیلو ولت، با سه گروه ۱ و ۰/۷۵ و ۰/۵ کیلوولت در تمامی زمان ها به جز ۲۰میکروثانیه بود. نتایج همچنین نشان داد که میزان تسهیم، در دو ولتاژ ۱/۵ و ۱/۲۵ کیلو ولت با زمان ۲۰میکروثانیه به طور معنی‌داری بیش از زمان های ۴۰ تا ۱۰۰ بود. میانگین میزان تشکیل مورولا نیز از روند تسهیم تبعیت نموده و میانگین میزان تسهیم و مورولا در گروه ECG نیز از روند گروه FG تبعیت می نمود (در سه مورد فوق اطلاعات مربوطه در مقاله آورده نشد).

از تعداد ۵۶ جنین تتراپلوئید که به منظور آنالیز کروموزومی مورد بررسی قرار گرفتند کروموزومهای ۳۷ جنین به خوبی در مرحله متافاز متوقف و مورد شمارش قرار گرفت. از این تعداد ۳ عدد (۸درصد) هاپلوئید (۳۰ کروموزمی) و ۶ عدد (۱۶درصد) دیپلوئید (۶۰ کروموزمی) و ۲۸ عدد (۷۶درصد) تتراپلوئید (۱۲۰ کروموزمی) بودند (شکل شماره ۱).

شکل ۱: گسترش کروموزومی جنینهای الکتروفیوز شده به روش رنگ‌آمیزی گیسما، که در ۸درصد موارد هاپلوئید (A) و در ۱۶درصد دیپلوئید (B) و ۷۶درصد تتراپلوئید (C) بودند.

بحث

مطالعات قبلی نشان داده است که با قرار گرفتن سلولها در معرض پالسهای الکتریکی کوتاه مدت نفوذپذیری غشای آنها به طور برگشت‌پذیر افزایش می یابد (۱۸). دراین روش بر اثر میدان الکتریکی حاصل از جریان مستقیم (DC) غشاها پلاریزه و ناپایدار شده و جذب غشای مقابل بر اثر فیوژن نقطه‌ای غشا و توسط اتصالات محکم انجام

www.SID.ir

Archive of SID

می‌گیرد. در این مرحله به واسطه تشکیل سوراخهایی که برگشت‌پذیر (reversible) هستند غشای دیافراگمی شکل یکنواختی تشکیل می‌دهد. دیافراگم مذکور در صورت بهینه بودن شرایط از بین رفته و الحاق دو سلول اتفاق می‌افتد (۱۹).

افزایش بیش از حد زمان و شدت میدان الکتریکی، منجر به تشکیل برگشت‌ناپذیر سوراخهایی در دیافراگم و سایر بخشها ی غشا شده که تخریب سلول را به دنبال خواهد داشت. در مطالعه ای که توسط Ramus انجام گرفت، مشخص شد که تغییرات شدت میدان در یک زمان ثابت می‌تواند وسعت ناحیه نفوذپذیر شده (Permeabilized) را افزایش دهد، در صورتی‌که تغییرات زمان در میدانی با شدت ثابت فقط قادر است موجب افزایش تراکم سوراخها در ناحیه مذکور شود (۲۰).

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که میزان فیوژن وا بسته به ولتاژ بوده و افزایش شدت ولتاژ از ۰/۵ تا ۱/۵ کیلوولت بر سانتی متر، در تمامی زمانهای این مطالعه، میزان فیوژن را افزایش می‌دهد و رابطه قوی و مثبتی بین این دو وجود دارد (جدول۱). گرچه تغییر زمان میدان الکتریکی از ۲۰-۱۰۰میکروثانیه در ولتاژهای مختلف، تاثیری در میزان فیوژن نداشت، که این می‌تواند نتیجه مطالعه Zhelev و همکاران درسال ۱۹۸۸ را تایید نماید (۲۱)، اما بر خلاف مطالعه وی در این مطالعه رابطه‌ای بین ولتاژ و زمان لازم جهت ایجاد سوراخ و پارگی در غشا (Membrane rupture) یا همان فیوژن پیدا نشد، که می‌تواند به دلیل محدود بودن زمان در دامنه بین ۲۰ تا ۱۰۰میکروثانیه باشد، زیرا بهترین میزان فیوژن، در زمانهای مذکور حاصل شده است.

نتایج مشابهی نیز توسط Tathamو همکاران با الکتروفیوژن اووسیت بدون هسته و بلاستومر گاو به منظور انتقال هسته (Nuclear transfer) گزارش شده است، به طوری که این محققان نشان داد که افزایش شدت ولتاژ در زمانهای کم باعث ایجاد سوراخهای کوچکتری می‌شود (۸)، که با نتایج مطالعه حاضر هماهنگ است. گرچه در این مطالعه به دلیل کسب میزان فیوژن قابل قبول درزمانهای بین ۲۰-۱۰۰ میکروثانیه از زمانهای بیش از ۱۰۰میکروثانیه استفاده نشد.

نتایج حاصل از فیوژن جنینهای دو سلولی در این مطالعه حاکی از وجود رابطه ای منفی بین شدت ولتاژ و تسهیم در تمامی زمانها به جز ۲۰میکروثانیه است (جدول۲) . همچنین به دلیل تاخیر مشاهده شده بین اعمال پالس الکتریکی و اولین علایم وقوع فیوژن می‌توان دریافت که فیوژن نمی‌تواند مستقیما ناشی از میدان الکتریکی باشد بلکه احتمالا ناشی از تغییرات القاء شده در غشای سلول است. درواقع با افزایش شدت میدان الکتریکی اعمال شده زمان تاخیر نیز کاهش می‌یابد، مگر آنکه شدت میدان آنقدر بالا باشد که به دلایل تخریبی اساسا فیوژنی اتفاق نیفتد. لذا می‌توان گفت که قرار گرفتن جنینهای دو سلولی در معرض ولتاژهای بالا، تاثیر مهاری بر میزان تسهیم خواهد داشت، که احتمالا به دلیل تشکیل سوراخهای بزرگتر، آن هم در تمامی غشای دو بلاستومر و تحمیل آثار مخرب بر روی سلول است. نتایج همچنین نشان می‌دهد که انجام الکتروفیوژن با ولتاژهای بیش از ۱ کیلوولت بر سانتی‌متر به طور معنی‌داری میزان تسهیم را کاهش می‌دهد، بنابراین بایستی از ولتاژهای بیش از ۱ کیلوولت بر سانتی‌متر اجتناب شود. از طرفی در این مطالعه هیچ رابطه‌ای بین مقادیر متفاوت زمان در یک ولتاژ معین بر روی تسهیم مشاهده نشد، بنابراین افزایش زمان تاثیری بر میزان تسهیم نخواهد داشت،که می‌تواند ناشی از این واقعیت باشد که دامنه تغییرات زمان به کار گرفته شده در این مطالعه در حدی نیست که بتواند آثار خود را بر روی سلول و میزان تسهیم آن آشکار سازد به این منظور بایستی زمان میدان الکتریکی را آنقدر افزایش داد تا آثار آن بر میزان تسهیم آشکار شود،که چنین افزایشی خارج از حیطه این مطالعه بود.

آنالیز کروموزومی جنینهای تتراپلویید نیز حاکی ازایجاد ۷۶درصد تتراپلویید واقعی درگروه FG بود (شکل ۱)، که این میزان با مقدار گزارش شده توسط Iwasaki و همکاران بر روی گاو تقریبا یکسان (۷۸درصد) است (۷). لازم به ذکر است که مطالعه Iwasaki نیز به منظور تعیین اثر ولتاژ (۰/۵ و ۱کیلوولت بر سانتی‌متر) و زمان (۱۰۰ و ۵۰ و ۲۵ و ۱۰میکروثانیه) و تعداد پالس بر روی میزان فیوژن و تکوین تا مرحله مورولا انجام گرفت.

مطالعه Teissie و همکاران بر روی سلولهای (CHO: Cell hamster ovary) نشان داد که میزان فیوژن و بقاء سلولها به دنبال الکتروفیوژن بستگی به شدت ولتاژ و زمان و تعداد پالس دارد، به طوری که میزان فیوژن را می‌توان با افزایش شدت ولتاژ و زمان میدان الکتریکی و تعداد پالس تا حد آستانه افزایش داد، ولی میزان بقاء(Viability) با افزایش زمان و افزایش تعداد پالس کاهش می‌یابد و افزایش شدت ولتاژ میدان تاثیری بر میزان بقاء ندارد (۹). وی همچنین به بررسی تاثیر تماس سلولهای CHO قبل و بعد از تحریک الکتریکی پرداخت و نشان داد که اگر قبل از تحریک الکتریکی به واسطه سانتریفوژ سلولها در تماس با هم قرار گیرند، می‌توان بین میزان فیوژن و تماس سلولها قبل از تحریک الکتریکی، همبستگی مثبتی مشاهده کرد.

با توجه به آنکه در مطالعه Teissie و همکاران دامنه تغییرات زمان بین صفر تا ۱۰۰۰میکروثانیه و در مطالعه حاضر بین ۲۰ تا ۱۰۰میکروثانیه قرار داشت، احتمالا بدینوسیله می‌توان اختلاف در نتایج زمان بین این دو مطالعه را توجیه نمود. از طرفی پایین آمدن توانایی تکوین در ولتاژهای بالا را می‌توان در ارتباط با ایجاد سوراخهای بزرگ و نشت محتویات سیتوپلاسمی مورد نیاز جهت تکوین مربوط دانست.

در این مطالعه میزان فیوژن در ولتاژ ۱/۵ کیلوولت بر سانتی‌متر و زمان ۱۰۰ میکروثانیه به میزان ۸۸درصد بود، که به میزان گزارش در مطالعه انجام شده توسط Curnow و همکاران (۷۶درصد) با پارامترهای (۱۰۰میکروثانیه -۱/۴ks/cm) نزدیک است (۲۲). لازم به ذکر است که مطالعه Curnow با پارامترهای (۱، ۱/۴ و ۲/۴ کیلوولت بر سانتی‌متر) و (۵۰ و ۱۰۰میکروثانیه) انجام گرفت، که نتایج به دست آمده در مورد تکوین جنینها تا مرحله بلاستوسیست (۵۷درصد) بهتر از نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر بود که یکی از علل احتمالی موثر در این زمینه را می‌توان تاثیر نژاد دامها بر میزان تکوین ذکر نمود. با توجه به نتایج فوق و به منظور حصول بالاترین میزان فیوژن و تسهیم از جنینهای دو سلولی گاو به روش الکتروفیوژن، می‌توان پیشنهاد نمودکه بهتر است پارامترهای لازم بر روی ۷۵/کیلوولت بر سانتی‌متر و ۶ میکروثانیه تنظیم شود. البته این مقادیر به مقادیر گزارش شده توسط Iwasaki و همکاران نسبتا نزدیک (۷) ولی با مقادیر گزارش شده

www.SID.ir

Archive of SID

توسط سایرین تفا وت دارد.

در این مطالعه با استفاده از پارامترهای ۰/۷۵کیلوولت بر سانتی‌متر و ۸۰ میکروثانیه میانگین میزان تسهیم در گروه FG تا میزان ۸۰درصد به دست آمد، که به میانگین میزان تسهیم جنینهای دیپلوییـد درگروه UCG نزدیک (۹۰درصد) است.

با توجه به آنکه میزان تسهیم در دوگروه FG و ECG نسبت به گروه UCG پایین‌تر است، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالا تحریک الکتریکی، تغییرات دما و PH و دستکاریهای انجام گرفته در مورد این دو گروه موجب کاهش توانایی تسهیم و تکوین خواهد شد. علت دقیق کاهش توانایی تکوینی در گروه FG ناشناخته بوده و احتمالا می‌توان آن را به قرار گرفتن جنینها در معرض مدیای غیر الکترولیت و ساختار کروموزومی جنینهای تراپلوییـد و تحریک الکتریکی مربوط دانست.

در پایان پیشنهاد می‌شود که: ۱- به منظورحصول نتایج بهتر در روش الکتروفیوژن با تعیین اثر انواع مدیای غیرالکترولیت بر روی میزان فیوژن، تسهیم و تکوین تا بلاستوسیست و نیزمقایسه آنها با مدیاهای الکترولیتی مطالعاتی صورت گیرد. ۲- به منظور تعیین اثر پلوییـدی بر روی تکوین قبل از لانه گزینی مطالعاتی صورت گیرد. ۳- مطالعاتی جهت انجام روشهای ادغام و تزریق سلولهای پایه با جنینهای تراپلوییـد و تولید کیمرا صورت گیرد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از طرح شمارهٔ ۸۱۱۳۹ مصوب شورای علمی پژوهشکـــده رویان است. بدین وسیله نویسندگان بر خود واجب می‌دانندکه از همکاری بی‌دریغ آقای دکتر سعیدکاظمی آشتیانی، آقای دکتر وثوق، آقای عبدالحسین شاهوردی و مسئولین و پرسنل مرکز باروری و ناباروری اصفهان و مسؤلین کشتارگاه صنعتی اصفهان (آقای دکتر رهگذر، آقای دکترحسین آبادی ، آقای دکتر شرکت) تشکرو قدردانی نمایند.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Nagy A, Rossant J: Production of completely ES Cell-derived fetuses .In Joyner, A.L. (ed), Gene Targeting: a Practical Approach, IRL Press Oxford, 1993; 147-180
2. James RM, Klerkx A, Keighren M, Flockhart JH, West JD: Restricted distribution of tetraploid cells in mouse tetraploid-diploid chimaeras. Dev Bio l995; 167: 213-226
3. Wood SA, Allen ND,Rossant J, Auerrbach A, Nagy A: Non-injection methods for the production of embryonic stem cell embryo chimeras. Nature 1993; 365: 87-89
4. Peli J,Schmoll F, Laurincik J, Brem G, Schelander K: Comparison of aggregation and injection techniques in producing chimeras with embryonic stem cells in mice.Theriogenology 1996;45 833-842
5. Beatty RA, Fischberg M: Spontaneous and induced triploidy in pre-implantation mouse eggs.Nature 1949; 163: 807-808
6. Berg H: Fusion of blastomers and blastocysts of mouse embryos. Bioelectrochem Bioenerg 1982; 9: 223-228
7. Iwasaki S, Kono T, Fukatsu H, Nakahara T: Production of bovine tetraploid embryos by electrofusion and their developmental capacity in vitro.1989; 24 26-27
8. Tatham BG, Pushett DA, Giliam KJ, Dowsing AT, Mahavorasilpa TL, Ttounson AO: Electrfusion of in vitro produced bovine embryonic cells for the production of isofusion contours for cells used in nuclear transfer. J.of Rep. and Fert. Supp.1995; 49: 5
9. Teissie J, Ramos C: Correlation between electric field pulse induced long-lived permeabilization and fusogenicity in cell membranes. BioPHysical Journal 1998; 74:1889-1898
10. Cornow EC, Gunn LM, Trounson AO: Electrofusion of two- cell bovine embryos for the production of tetraploid blastocysts in vitro.Mol Rep Dev 2000; 56 372-377
11. Gandolfi F, Luciano MA, Modina S, Ponzini A, Pocar P, Armstrong DT, Lauria A: The in vitro developmental competence of bovine oocytes can be related to the morPHology of the ovary.Theriogenology 1997; 48 1153-1160
12. Khurana NK, Nieman H: Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density,cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. Theriogenol 2000; 54: 741-756
13. Parrish JJ, Susko-Parrish JL,Winer MA, First NL: Capacitation of bovine sperm by heparin.Biol. Reprod 1988; 38: 1171-1180
14. Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G: Bovine embryo technologies. Theriogenol 2003; 59: 599-616
15. Yoshioka K, Othman AM, Taniguchi T, Yamanaka H, Sekikawa K: Differential pattern of blastulation in bovine morulae cultured in synthetic oviductal fluid medium containing FCS or BSA. Theriogenology 1997; 48: 997-1006
16. Tarkowski AK: An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. Cytogenetics 1966; 5: 394-400
17. Yoshizawa M, Konno H, Zhu S, Kageyama S: Chromosomal diagnosis in each individual blastomere of 5-to 10-cell bovine embryos derived from in vitro fertilization.Theriogenol 1999; 51 1239-1250
18. Neumann E, Rosenheck B: Permeability induced by electric impulsions in vesicular membranes. J Membr Biol 1972; 10 279-290
19. Chernomerdik LV, Sowers AE: Physical and ultrastructural evidence that integrin of the spectrin network controls the macroscopic fusion produce morphology following the electrofusion of erythrocyte ghosts. Biophysical J 1991; 60: 1026-1037
20. Ramos C, Teissie J: Electrofusion: A bioPHysical modification of cell membrane and a mechanisem in exocytosis. Biochimie 2000; 82: 511-518
21. Zhelev DV, Dimitrov DS, Doinov P: Correlation between physical parameters in electrofusion and electroporation of protoplasts. Bioelectrochemistry and Bioenergetics 1988; 20: 155-167
22. Carolan C, Monaghan P, Gallagher M, Gordon I: Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation ,fertilization and culture in vitro. Theriogenol 1993; 1061-1068

www.SID.ir