مقاله تحقیقی

تأثیر ولتاژها و زمانهای مختلف بر میزان تکوین جنین‌های تتراپلوییید حاصل از الکتروفیوژن جنینهای دوسلولی گاو

محمدرضا دارابی .Ph.D*، محمدحسین نصر اصفهانی .Ph.D**، حسین بهاروند .Ph.D***، حسین ایمانی .Ph.D****
محمد مردانی .Ph.D*****

* استادیار گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی اراک

** استادیار پژوهشی گروه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان

*** استادیار پژوهشی گروه سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان

**** استادیار گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله

***** استادیار گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

تاریخ وصول: فروردین ماه ۸۳، تاریخ پذیرش: تیر ماه ۸۳

چکیده

هدف: اهمیت سلولهای شبه بنیادی جنینی و شبیه سازی برکسی پوشیده نبوده و تولید بافتها و حیوانات شبیه سازی شده را می‌توان با ادغام و تزریق این سلوها به مورولا و بلاستوسیستهای تتراپلوییید انجام داد. جنینهای تتراپلوییدکه از آنها به عنوان بستری برای رشد و تکوین سلولهای شبه بنیادی جنینی استفاده می شود را می‌توان با روش الکتروفیوژن جنینهای دو سلولی در آزمایشگاه تولید نمود. هدف این مطالعه ارزیابی آثار ولتاژ و زمان بر میزان تکوین جنینهای تتراپلوییید حاصل از الکتروفیوژن و مقایسه آن با گروههای کنترل است.

مواد و روشها: پس از بلوغ و لقاح آزمایشگاهی توده‌های تخمک کومولوس، جنین‌های دو سلولی حاصل، به سه گروه تقسیم شدند: ۱- گروه فیوز شدن (FG: Fuesd Group) شامل جنین‌های دو سلولی بود که بلاستومرهایشان بعد از الکتروفیوژن، در ولتاژهای (۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵، ۱/۵ کیلوولت بر سانتیمتر) و زمانهای مختلف (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میکروثانیه) به هم فیوز شدند. ۲- گروهی که بعد از الکتروفیوژن بلاستومرهایشان در هم فیوز نشد (ECG: Exposed Control Group). ۳- گروه کنترل که در معرض الکتروفیوژن قرار نگرفتند (UCG: Unexposed Control Group). جنینها در محیط SOF_1 و SOF_2 کشت شدند و میزان تکوین در هر یک از گروهها با هم مقایسه شد.

یافته‌ها: افزایش ولتاژ به طور معنی داری سبب کاهش میزان تکوین شد. افزایش زمان در ولتاژهای بالا به طور معنی داری سبب کاهش میزان تکوین شد و در ولتاژهای پایین موجب افزایش آن شد. میزان تکوین در گروه ECG نیز از گروه FG تبعیت نمود و در گروه FG و ECG به طور معنی داری از گروه UCG کمتر بود.

نتیجه‌گیری: بهترین میزان تکوین می‌تواند در ولتاژ ۰/۷۵ کیلو ولت بر سانتیمتر و مدت زمان ۶۰ میکروثانیه حاصل شود.

کلید واژه‌ها: گاو، تتراپلوییید، الکتروفیوژن، ولتاژ، تکوین

مقدمه

پیشرفتهای اخیر در رشته بیولوژی مولکولی، ژنتیک و تکنولوژی تولید مثل و شبیه سازی به واسطه تولید حیوانات ترانس ژنیک لزوم انجام تحقیقات برای توسعه صنعت

آدرس مکاتبه : تهران، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵ Email: m_darabi36@hotmail.com

دامپروری را به وجود آورده است و از جملهٔ موفقیت هایی که در این زمینه حاصل شده تولید داروهای پروتئینی فارموسوتیکال 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 کیمراها به واسطه ادغام سلولهای توده درونی (ICM: Inner Cell Mass) یا سلولهای شبه بنیادی جنینی (ESLC: Embryonic Stem Like Cell) با جنینهای تتراپلوییید مرحله مورولا است. لازم به ذکر است در این روش پس از زدودن دیواره شفاف جنینهای تتراپلوییید 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 انتقال به مادر اجاره‌ای در محیط کشت قرار می‌گیرند. به این ترتیب جنین تشکیل شده صرفاً از ICM یا سلولهای ESLC که به داخل بلاستوسیست تتراپلوییید تزریق شده مشتق و جفت از بلاستوسیست تتراپلوییید فاقد ICM تشکیل می‌شود. با ادغام سلولهای ESLC در جنینهای دیپلوییید سه روزه گاو، سلولهای ESLC در بافتهای مختلف، دارای توزیع محدودی خواهند بود، اما اگر سلولهای ESLC را در جنینهای تتراپلوییید گاوی ادغام شود جنین حاصل به طور خاص از سلولهای ESLC تشکیل خواهد شد و فرزندان حاصل از این کیمراها به طور اختصاصی از سلولهای دیپلوییید تشکیل خواهند شد [۱ و ۲].

روش تولید حیوانات ترانس ژنیک به روش فوق یکی از مؤثرترین روشهای تولید حیوانات ترانس ژنیک است.

بنابراین دستیابی به این روشها می‌تواند در زمینه‌های مختلف صنعتی و دامپزشکی مؤثر باشد و نظر به اینکه تولید گاوهای ترانس ژنیک با توجه به تولید بالای شیر در آنها می‌تواند از اهمیت خاصی برخوردار باشد. بنابراین این نوع حیوانات را می‌توان با تزریق مستقیم DNA به داخل پیش هسته‌ها یا به واسطه ادغام سلولهای بنیادی ترانسفکت شده (یا جنین‌های دیپلوییید ترانسفکت شده) با مورولاهای تتراپلوئیدی یا به واسطه تزریق این سلولها به داخل بلاستوسل بلاستوسیست‌های تتراپلوئید ایجاد نمود.

گرچه برای تولید کیمراهای دیپلوئید - تتراپلوئید روش تزریق سلول (ترانس ژن شده) به داخل بلاستوسل، نسبت به روش ادغام سلولها با مورولاهای تتراپلوئید مؤثرتر است [۳و۴] اما باید اذعان نمود که ابزار و مهارت بیشتری نیز نیاز است.

پدیده پلی پلوئیدی (که تتراپلوئیدی نیز در زیر مجموعه آن قرار دارد) به طور طبیعی در گیاهان، بی مهرگان و بعضی از مهره داران اتفاق می‌افتد [۵]. اما در انسان وقوع این پدیده می‌تواند کشنده باشد. جنینهای تتراپلوئید را می‌توان به روشهای غیرپلاریزه (شیمیایی، میکروسرجیکال، ویروسی و نور لیزر) و پلاریزه (الکتروفیوژن) تولید نمود. در روش شیمیایی می‌توان برای فیوز کردن بلاستومرها از پلی اتیلن گلیکول ۴۵ درصد استفاده نمود[۶]؛ یا به منظور مهار تقسیم سلولی می‌توان از مهار کننده‌های سیتوکینز نظیر کالشیسین یا سیتوکلازین B استفاده نمود، بدون آنکه در کاریوکینز اختلالی به وجود آید [۷و۸]. در روش ریز جراحی با انتقال هسته به تخمکهای تک سلولی لقاح شده می‌توان جنینهای تتراپلوئید تولید نمود[۹]. همچنین می‌توان از ویروس غیر فعال شده [۱۰] و الکتروفیوژن نیز برای تولید جنینهای تتراپلوئید استفاده نمود.

در بین روشهای مذکور از الکتروفیوژن به عنوان ارزشمندترین و قابل اعتمادترین روش استفاده می‌شود زیرا تکرار پذیری آن دقیقاً با شرایط قبلی امکان‌پذیر بوده و مدتی که جنینها تحت تأثیر محرک قرار می‌گیرند در حد میکروثانیه و به دقت قابل تنظیم است. این روش برای اولین بار در سال ۱۹۸۲ توسط برگ (Berg) و همکاران بر روی موش [۱۱] و نیز در سال ۱۹۸۹ توسط ایواساکی (Iwasaki) و همکاران بر روی جنینهای گاوی با موفقیت آزمایش شد [۱۲]. با اینکه روش الکتروفیوژن به طور رایج در مراکز باروری و ناباروری تحقیقاتی پیشرفته استفاده می‌شود اما هنوز تأثیر شدت محرک (ولتاژ) و زمان آن روی میزان تکوین جنین به طور دقیق مورد مطالعه قرار نگرفته است، بنابراین هدف این مطالعه ارزیابی آثار ولتاژ و مدت زمانهای مختلف بر میزان تکوین جنینهای تتراپلوئید گاوی استوار می‌باشد.

مواد و روشها

تمامی مواد شیمیایی از شرکت سیگما خریداری شده در

غیر این صورت نام شرکت مربوط و شماره کاتولوگ آن ذکر شده 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 سانتی گراد) به سالین ۰/۹ درصد در همان دما منتقل و در طی مدت ۲-۱ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس با استفاده از سرسرنگ نمره ۱۸ مایع فولیکولی فولیکولهای ۶-۲ میلی‌متری 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 ۱۳۵۳۰ عدد تخمک کومولوس با کیفیت که سیتوپلاسم یکنواخت و گرانوله و حداقل سه لایه سلولهای گرانولوزا در اطراف خود داشتند در محیط شستشو جمع‌آوری شدند.

محیط شستشو (WM: Washing Medium) از TCM-199 (M-2520) که دارای افزودنیهای ۰/۵mg/ml پنی سیلین ۰/۵mg/ml استرپتومایسین و ۲۲μg/ml سدیم پیروات، ۲۵ میلی‌مولار سدیم بیکربنات است، تشکیل شده و pH آن در حد ۷/۴-۷/۳ تنظیم شده و حداقل دو ساعت قبل ازاستفاده در انکوباتور دارای ۵Co_2 درصد و ماکزیمم رطوبت در ۳۹ درجه سانتی گراد انکوبه شد.

بلوغ آزمایشگاهی

پس از جمع آوری COCs در WM دو بار در همین محیط شستشو داده و مجدداً آنها را در محیط بلوغ (MM: Maturation Medium) از محیط شستشو به علاوه ۱μg/ml هفده بتا استرادیول، ۰/۱ واحد بین‌المللی در میلی‌متر HMG، سرم آلبومین گاوی ۱۰ درصد FCS و ۱/۳mM ال-گلوتامین ساخته شده، شستشو داده شد. سپس COCs در گروههایی ۵تایی به قطرات ۵۰ میکرولیتری از MM در زیر روغن منتقل و به‌مدت ۲۴-۲۲ ساعت انکوبه شد [۱۶-۱۳].

لقاح آزمایشگاهی

بعد از بالغ شدن توده‌های تخمک کومولوس که به واسطه متسع شدن سلولهای کومولوس اطراف تخمک و رها شدن اولین جسم قطبی مشخص می‌شود و نیم ساعت قبل از تلقیح، دو بار آنها را در محیط لقاح [۱۷] شسته و در گروههای ۱۰ تایی به قطرات ۵۰ میکرولیتری از محیط لقاح در یزر روغن منتقل و به مدت ۲۲-۱۸ ساعت انکوبه شدند.

سپس مایع سمن تازه گاوی با قدرت باروری اثبات شده از مرکز اصلاحات نژاد دام گرفته شد و در پرکول با گرادیان ۴۵ و ۹۰ درصد و دور ۱۸۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ شد. متعاقباً ته نشین حاصل دوبار در محیط لقاح به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و ته نشین نهایی توسط محیط لقاح به نحوی تعیین غلظت شد که غلظت نهایی اسپرمها در قطرات محیط لقاح به ۲-۱ میلیون در میلی لیتر برسد. لازم به ذکر است که تواناسازی و افزایش تحرک اسپرمها در همین محیط انجام خواهد شد [۱۳، ۱۴ و ۱۷].

کشت آزمایشگاهی

مدت ۲۲-۱۸ ساعت پس از تلقیح، به منظور جداکردن اسپرمهای مرده و سلولهای گرانولوزا از تخمکهای تلقیح شده مدت ۲ دقیقه در محیط WM ورتکس شدند و سپس به محیط کشت SOF_1 (Synthetic Oviductal Fluid) که از مایعی سنتتیک شبیه مایع لوله رحمی گوسفند ساخته شده [۱۸] منتقل شدند [۲۲-۱۹].

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

الکتروفیوژن

گروههای ۵ تا ۱۰ عددی از جنینهای دو سلولی به مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه به بافر فیوژن (۰/۳ M مانیتول، ۰/۱mM سولفات منیزیم، ۰/۰۵mM کلرید کلسیم و ۰/۰۵BSA درصد، pH=۷/۲-۷/۴) در محفظه الکتروفیوژن (بین دو الکترود) منتقل شدند [۲۳].

محفظه الکتروفیوژن

از دو الکترود ورقه‌ای شکل باریک و دراز فلزی (فولاد ضد زنگ) که به فاصله یک میلیمتر از هم 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 جنینهای تحت تأثیر یک پالس جریان مستقیم (DC: Direct Carrent) با ولتاژ و زمان معین قرار داده شدند. به منظور جداسازی جنینهای فیوز شده حداکثر ۶۰ دقیقه بعد از الکتروفیوژن آنها را در زیر لوپ انتخاب و تحت عنوان گروه فیوز شده (FG) از مابقی جنینهای دو سلولی تحت تأثیر جریان قرار گرفته بدون فیو (ECG) جدا شدند و برای مدت ۳۷ تا ۳۹ ساعت دیگر به محیط SOF_1 منقل شدند [۲۳]. ۷۲ ساعت پس از لقاح جنینهای هر سه گروه (FG,ECG,UCG) به محیط SOF_2 منتقل شدند. محیط SOF_2 شبیه SOF_1 بوده با این تفاوت که فاقد پیروات سدیم و دارای ۲ میلی مولار گلوکز و ۱۰ درصد FCS و ۱ درصد اسیدهای آمینه ضروری است [۱۹، ۲۰و ۲۲]. سپس در روز ششم اقدام به تعویض نیمی از محیط کشت SOF_2 با محیط تازه شد؛ لازم به ذکر است که هر گروه بین ۳ تا ۵ مرتبه تکرار شد.

رنگ‌آمیزی کروموزومها

به منظور شمارش تعداد کروموزومها و اثبات تتراپلوئیدی، جنینهای مرحله ۸-۲ سلولی از گروه FG طبق روش تارکوفسکی و با کمی تغییر در آن [۲۴ و ۲۵] رنگ‌آمیزی و کروموزومهای آنها مورد شمارش قرار گرفت. در این روش با قرار دادن جنینها در پروناز ۰/۵ درصد (به مدت ۴۰ تا ۵۰ ثانیه) دیواره شفاف نرم و سپس به منظور توقف کروموزومها در متافاز، جنینها به مدت ۱۰ تا ۱۲ ساعت در محیط Ham'sF10 حاوی ۰/۱ $\mu g/ml$ کالسمید (Gibco Cat. No. 15212-021 Auckland U.K) در انکوباتور کشت داده شدند. سپس جنینها در قطره‌ای از محلول هیپوتونیک (کلرید پتاسیم ۰/۰۷۵M) به حجم ۰/۴ میلی لیتر قرار داده شد و برای مدت ۲۰ تا ۲۵ دقیقه انکوبه شد. سپس جنینها با حداقل محلول هیپوتونیک روی لام منتقل و با انداختن چند قطره محلول تثبیت کننده (نسبت 1:1 از متانول و اسید استیک) تثبیت شدند. فوراً کیفیت گسترش کروموزومها در زیر میکروسکوپ بررسی شد و در صورت باقی بودن سیتوپلاسم، با انداختن یک قطره تثبیت کننده (نسبت سه به یک از متانول و اسید استیک) سیتوپلاسم اضافی برداشته شد. سپس گسترش کروموزومی به مدت ۱۰ دقیقه توسط محلول گیسما ۰/۲ درصد رنگ آمیزی و بعد از شستشو و خشک شدن اسلاید و مونت (mount) اقدام به شمارش کروموزومها شد.

یافته‌ها

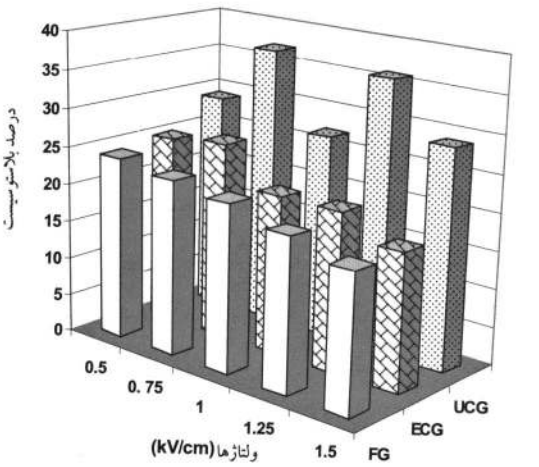
نمودار یک نشان دهنده آن است که با افزایش ولتاژ ۰/۵ تا ۱/۵ کیلو ولت بر سانتیمتر، میزان تشکیل بلاستوسیست در زمانهای مختلف کاهش یافته و با افزایش زمان در ولتاژهای پایی، میانگین میزان تشکیل بلاستوسیست افزایش می‌یابد، گرچه این کاهش معنی دار نیست. از طرفی افزایش زمان در ولتاژهای بالا موجب کاهش میزان بلاستوسیست خواهد شد که معنی دار نیست. همبستگی پیرسون نیز نشان دهنده وجود رابطه‌ای منفی بین ولتاژهای مختلف و میزان تشکیل بلاستوسیست در تمامی زمانها به جز ۶۰ و ۸۰ میکروثانیه است (جدول ۱).

جدول ۱. همبستگی پیرسون بین میزان بلاستوسیست و ولتاژهای مختلف در زمانهای مختلف

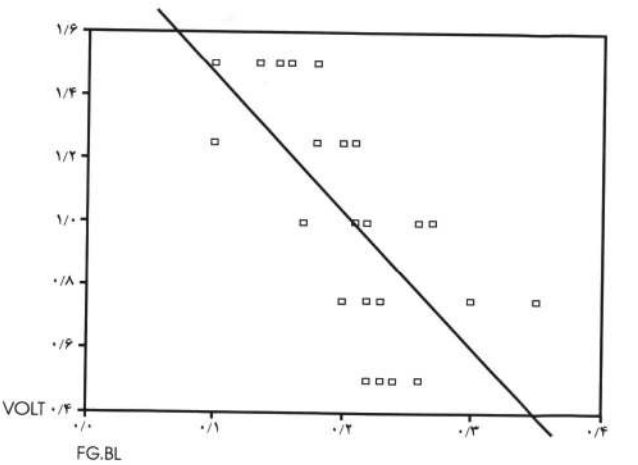
زمان (میکروثانیه)	r[1] v, BL	p-Valu
۲۰	-۰/۹۸۵	۰/۰۰۲
۴۰	-۰/۹۱۴	۰/۰۳۰
۶۰	-۰/۷۶۶	۰/۱۳۱
۸۰	-۰/۷۰۴	۰/۱۸۴
۱۰۰	-۰/۹۷۱	۰/۰۰۶

(همبستگی بین دو متغیر (ولتاژ و بلاستوسیست) است که در زمانهای مختلف گزارش شده است.

با رسم نمودار خطی ساده مربوط به همبستگی بین ولتاژ و بلاستوسیست در گروه FG (نمودار۲) نیز وجود رابطه‌ای معنی‌دار ($p<0.0005$) و منفی ($r=-0.877$) بین میزان بلاستوسیت و ولتاژهای مختلف به خوبی دیده می‌شود. با توجه به نمودار ۱ حداکثر میزان تشکیل بلاستوسیت‌را می‌توان در ولتاژ ۰/۷۵kv/cm و زمان ۶۰ میکرو ثانیه مشاهده نمود ($p<0.05$).



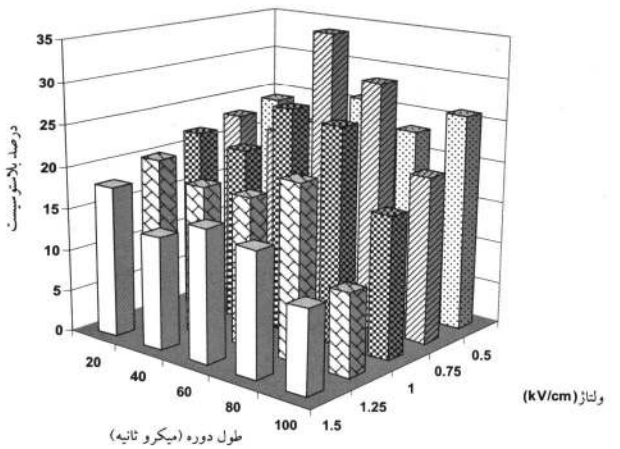
نمودار ۱. تأثیر ولتاژ (kV/cm) و زمان (میکروثانیه) بر میزان تکوین جنینهای دو سلولی الکتروفیوز شده تتراپلوئید گاو



نمودار ۲. همبستگی بین میزان بلاستوسیست و ولتاژ در گروه FG یا فیوز شده ($p=0.0005$) ($r=0.877$) FG

میانگین میزان تشکیل مورولا نیز از روند تشکیل بلاستوسیست تبعیت نمود، بنابراین اطلاعات مربوط ارایه نشد. میزان تشکیل مورولا و بلاستوسیست در گروه ECG نیز از روند گروه FG تبعیت می‌کند که در این مورد نیز اطلاعات مربوط ارایه نشد. میانگین میزان تشکیل بلاستوسیت در گروه UCG به میزان ۳۲ درصد بود. این مقدار با ماکزیمم میزان آن در گروه FG (۳۵ درصد) و ECG (۳۸ درصد) خیلی متفاوت نبوده و اختلاف آنها با هم معنی‌دار نیست ($p<0.05$).

نمودار ۳ نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($p<0.05$)، در میزان تشکیل بلاستوسیست در دو گروه FG و ECG (در ولتاژهای مختلف و زمان ۲۰ میکرو ثانیه) از یک سو و گروه UCG از سوی دیگر است. همان طور که در نمودار مشاهده می‌شود با افزایش ولتاژ در دو گروه FG و UCG میزان بلاستوسیست در هر دو گروه کاهش می‌یابد که نشان دهنده آن است که اختلاف معنی داری بین دو گروه FG و UCG وجود نداشته اما مقایسه میزان بلاستوسیست بین دو گروه FG و UCG از یک سو و گروه UCG از سوی دیگر نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار (حداقل $p<0.05$) بین آنها است. همین نتیجه‌گیری در مورد زمانهای ۴۰ تا ۱۰۰ میکروثانیه نیز صادق است، اما برای جلوگیری از طولانی شدن مطلب از ارایه نمودارها و آمار مربوط خودداری شد.



نمودار ۳. مقایسه میزان تشکیل بلاستوسیست در ولتاژهای مختلف و زمان ۲۰ میکرو ثانیه بین گروههای FG, ECG, UCG

شکل ۱ نشان دهنده گسترش کروموزومی جنینهای الکتروفیوز (۰/۷۵ kV/cm و ۶۰ میکروثانیه) شده است، که به

روش گیسما رنگ‌آمیزی شده‌اند. از تعداد ۵۶ جنین که در مرحله ۸-۲ سلولی رنگ‌آمیزی شدند، کروموزومهای ۳۷ (۶۶ درصد) جنین به خوبی در مرحله متافاز متوقف و مورد شمارش قرار گرفت. به طوری که ۳ عدد (۸ درصد) از آنها هاپلوئید (دارای ۳۰ کروموزوم)، و ۶ عدد (۱۶ درصد) دیپلوئید (دارای ۶۰ کروموزوم) و ۲۸ عدد (۲۶ درصد) از آنها تتراپلوئید (دارای ۱۲۰ عدد کروموزوم) بودند.

بحث

غشای سلول وظیفه محافظت از محتویات سیتوپلاسم در برابر ورود مولکولهای خارجی و ممانعت از فیوژن خود به خودی سلولهای مختلف را به عهده دارد. فیوژن خود به خودی سلولهای حیوانی در مراحل معینی از تکامل رخ می‌دهد که از آن جمله می‌توان به فیوژن میوبلاست‌ها و تولید فیبرهای عضلانی اشاره کرد. علت فقدان فیوژن سلولی در اکثر بافتها را می‌توان در دو مورد زیر خلاصه کرد: ۱- ماتریکس خارجی سلولها به عنوان مانعی فیزیکی از فیوژن جلوگیری می‌کند. ۲- هیدروفیل بودن دو لایه لیپیدی غشا در طرفین و هیدروفوب بودن آن در درون، از فیوژن خود به خود دو لایه‌های لیپیدی سالم جلوگیری می‌کند [۲۶].

افزایش بیش از حد مدت زمان و شدت میدان الکتریکی منجر به تشکیل برگشت‌ناپذیر سوراخهایی در دیافراگم و سایر بخشهای غشا شده که تخریب سلول را به دنبال خواهد داشت. بنابراین هدف از این مطالعه ارزیابی آثار شدت ولتاژ و مدت زمان الکتروفیوژن روی میزان توانایی تکوینی جنینهای دو سلولی الکتروفیوز شده گاو است.

در این مطالعه بین میزان بلاستوسیست تشکیل شده و افزایش ولتاژ، در زمانهای ۲۰ و ۴۰ و ۱۰۰ میکروثانیه نیز رابطه منفی مشاهده شد که معنی دار بود. بنابراین استفاده از ولتاژهای بالا طی الکتروفیوژن، میزان بلاستوسیت را کاهش می‌دهد. افزایش زمان در دامنه بین ۲۰ تا ۱۰۰ میکرو ثانیه هیچ تأثیر معنی داری بر میزان بلاستوسیست تشکیل شده ندارد. در واقع از نبود اختلاف معنی‌دار (جدول ۱) بین شدت ولتاژ به کار رفته و میزان بلاستوسیست تشکیل شده در زمانهای ۶۰ تا ۸۰ میکروثانیه نیز می‌توان پیشنهاد نمود که به منظور افزایش توانایی جنینهای دو سلولی الکتروفیوز شده بایستی از ولتاژهای کمتر از ۰/۷۵kV/cm و بیشتر از ۱kV/cm اجتناب شده و به منظور حصول بهترین نتیج می‌توان از ولتاژ ۰/۷۵kV/cm و زمان ۶۰ تا ۸۰ میکروثانیه استفاده نمود. از طرفی پایین آمدن توانایی تکوین در ولتاژهای بالا را می‌توان به ایجاد سوراخهای بزرگ و نشت محتویات سیتوپلاسمی مورد نیاز برای تکوین مربوط دانست.

آنالیز کروموزومی جنینهای تتراپلوئید نیز نشان دهنده ایجاد ۷۶ درصد تتراپلوئید واقعی در گروه FG است که این میزان با مقدار گزارش شده توسط ایواساکی (Iwasaki) و همکارانش روی گاو (۱۹۸۹) تقریباً یکسان (۷۸ درصد) است [۱۲]. لازم به ذکر است که مطالعه آنها نیز به منظور تعیین اثر ولتاژ (۰/۵ و ۱kV/cm) و مدت زمان (۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروثانیه) و تعداد پالس روی میزان فیوژن و تکوین تا مرحله مورولا انجام گرفت.

در مطالعه کورنو (Curnow) و همکاران با پارامترهای (۱۰۰μs ۱/۴ kV/cm و ۱۰۰ میکروثانیه) میزان تکوین جنینها تا مرحله بلاستوسیست (۵۷ درصد) بهتر از نتایج به دست آمده در این مطالعه بود (۳۵ درصد) که یکی از علل مؤثر در این زمینه را می‌توان تأثیر نژاد دامها بر میزان تکوین ذکر نمود [۲۳].

با توجه به نتایج فوق و به منظور حصول بالاترین میزان بلاستوسیست‌های تتراپلوئید از جنینهای دو سلولی گاو با روش الکتروفیوژن، می‌توان پیشنهاد نمود که از متغیرهای ۰/۷۵kV/cm و ۶۰ میکرو ثانیه استفاده شود. البته این مقادیر به مقادیر گزارش شده توسط ایواساکی (Iwasaki) و همکاران [۱۲] نسبتاً نزدیک ولی با مقادیر گزارش شده توسط سایرین تفاوت دارد.

در این مطالعه با استفاده از پارامترهای ۰/۷۵ kV/cm و ۶۰ میکرو ثانیه میانگین میزان بلاستوسیست در گروه FG تا میزان ۳۵ درصد به دست آمد که به میانگین میزان بلاستوسیست‌های دیپلوئید در گروه UCG نزدیک (۳۲ درصد) است. با توجه پایین بودن میزان تکوین تا مرحله بلاستوسیست در دو گروه FG و ECG نسبت به گروه UCG، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً

تحریک الکتریکی، تغییرات دما و pH و دستکاریهای انجام گرفته در مورد این دو گروه موجب کاهش توانایی تسهیم و تکوین شده است. علت دقیق کاهش توانایی تکوینی در گروه FG مشخص نبوده و احتمالاً می‌توان آنها را به‌دلیل قرارگرفتن جنینها در معرض محیط غیر الکترولیت و ساختارکروموزومی جنینهای تتراپلوئید و تحریک الکتریکی مربوط دانست. بنابراین پیشنهاد می‌شود که به منظور تعیین اثر پلوئیدی، روی تکوین قبل از لانه گزینی مطالعاتی صورت گیرد. از طرفی با توجه به آن که یکی از آثار ایجاد شده در سلولها بعد از الکتروفیوژن، ایجاد نفوذ پذیری (Electropermeabilization) است، احتمالاً می‌توان با انجام مطالعات پایه در کشور از این روش برای اهداف درمانی (الکتروکموتراپی) استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

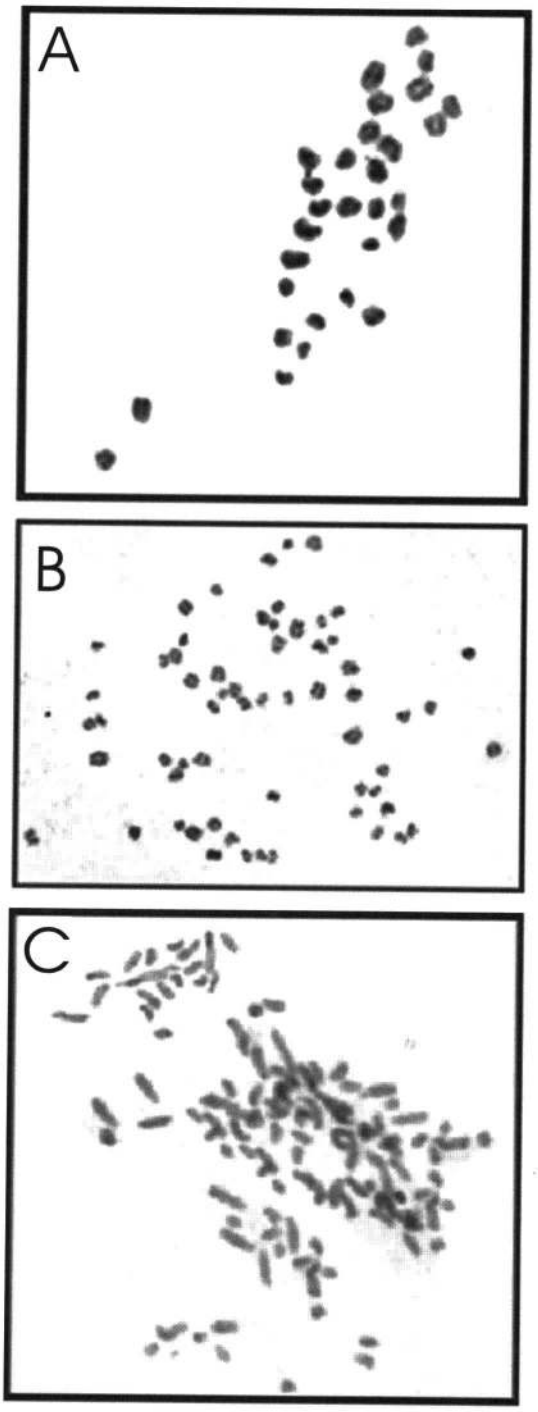
این مطالعه بخشی از طرح «کلونینگ گاو» مصوب شورای علمی پژوهشکده رویان و دفتر مرکزی جهاد دانشگاهی (کد طرح ۲۱-۵۹۴) (شماره طرح ۸۱۱۳۹) است. بدین وسیله نویسندگان بر خود واجب می‌دانند که از همکاری بی دریغ آقای دکتر سعید کاظمی آشتیانی، آقای دکتر وثوق، آقای عبدالحسین شاهوردی و مسئولین و پرسنل مرکز باروری و ناباروری اصفهان تشکر و قدر دانی نمایند.

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 , pp 1993; 147-80.
2. **James RM, Klerkx A, Keighren M, Flockhart JH, West JD.** Restricted distribution of tetraploid cells in mouse tetraploid-diploid chimaeras. Dev Biol 1995; 167: 213-26.
3. **Wood SA, Allen ND, Rossant J, Auerrbach A, Nagy A.** Non-injection methods for the production ofembryonic stem cell embryo chimeras 1993; 365: 87-0.
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: 833-42.
5. **Beatty RA, Fischberg M.** Spontaneous and induced triploidy in preimplantation mouse eggs. Nature 1949; 163: 807-8.
6. **Eglitis MA.** Formation of tetraploid mouse blastocysts following blastomere fusion with polyethylenglycol. J Exp Zool 1980; 213: 309-3.
7. **Snow MHL.** Tetraploid mouse embryos produced by cytochalasin B during cleavage. Nature 1973; 244: 513-5.
8. **Lu TY, Markert CL.** Manufacture of diploid/tetraploid Chimeric mice. Proc. Natl Acad Scil USA 1980; 77: 6012-6.
9. **Modinski JA.** Transfer of embryonic nuclei to fertilized mouse eggs and development of tetraploid blastocysts. Nature 1978; 273: 466-7.
10. **O Neil GT, Speirs S, Kaufman MH.** Sex chromosome constituation of post implantation tetraploid mouse embryos . Cytogenet Cell Genet 1990; 53: 191-5.
11. **Berg H.** Fusion of blastomers and blastocysts of mouse embryos. Bioelectrochem Bioenerg 1982; 9: 223-8.
12. **Iwasaki S, Kono T, Fukatsa H, Nakahara T.** Production of bovine tetraploid embryos by electrofusion and their developmental capacity in vitro. Gamte Research 1989; 24: 26-7.
13. **Gandolfi F, Luciano MA, Modine S, Ponzini A, Armstrong DT, Lauria A.** The in vitro developmental competence of bovine oocytes can be related the morphology of the ovary. Theriogenology 1997; 48: 1153-60.
14. **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. Theriogenology 2000; 54: 741-56.
15. **Neg;ia G, Gasparrini B, Brienza VC, Palo RD, Campanile G, Presicce GA, Zicarelli L.** Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes drived from abbatoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. Theriogenology 2003; 59: 11223-30.
16. **Tanghe S, Soom AV, Mehrzad J, Maes D, Duchateau L, Kruif A.** Cumulus contributions during bovine fertilization in vitro. Theriogenology 2003; 60: 135-49.
17. **Parrish JJ, Susko-parrish JL, Winer MA, First NL.** Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol Reprod

1988;l 38: 1171-80.

18. **Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G.** Bovin embryo technologies. Theriogenology 2003; 59: 599-616.
19. **Yoshika 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.
20. **Steeves TE, Gardner DK.** Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. Biol Reprod 1999; 61: 731-40.
21. **Hevitt DA, England GCW.** Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation in vitro. Animal Reproduction Science; 1999: 63-75.
22. **Carolan C, Lonergan P, Langendonckt AV, Mermillod P.** Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviductal fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. Theriogenology 1995; 43: 1115-28.
23. **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: 372-7.
24. **Tarkowski AK.** An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. Cytogenetics 1966; 5: 94-400.
25. **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. Theriogenology 1999; 51: 1239-50.
26. **Mekid H, Mir LM.** In vivo cell electrofusion. Biochimica Biophysica Acta 2000; 1524: 118-30.



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