Original Article

Efficiency of Ovine Fibroblast or Cumulus Cells for Somatic Cell Nuclear Transfer in Sheep

Frozanfar M., M.Sc., Nasr Esfahani M.H., Ph.D.,* Rezazadeh M., Ph.D., Molavi F., M.Sc., Hosseini M., M.Sc., Hajian M., M.Sc.

** P.O.Box:19395- 4644, Embryology, Department, Reproductive Medicine Research Center, Royan Institute (Esfahan Compose) ACECR, Tehran, Iran*

Abstract

Purpose: Despite remarkable progresses have been achieved in the field of somatic cell nuclear transfer (SCNT), there is little information regarding the effect of donor cell type on the efficiency mammalian somatic cell cloning in vitro. This study compared in vitro developmental competency of sheep enucleated oocytes reconstructed with either fibroblast or cumulus cells.

Material and methods: Adult fibroblast cells were taken from skin biopsies of one male and one female adult sheep. Cumulus cells were harvested from the same female sheep. Direct whole cell injection procedure was used for embryo reconstitution. Activated reconstructs were cultured in TCM+10%FCS medium up to days 7 post activation whereas, in vitro fertilized oocytes served as control. Results: Although the rate of day 7 blastocyst formation in cumulus donor cells (19.7%) were greater than the male and female fibroblast donor cells (17.5% and 15.7% respectively), these differences were not significant. Control group, on the other hand, induced significantly greater blastocyst rate (29.7%) rather than all the three treatment groups.

Conclusion: Both of cumulus and fibroblast can be used as donor cell for ovine somatic cell nuclear transfer. Since no significant difference was observed in term of blastocyst rates between the three SCNT groups, therefore concluding donor cell type has no significant effect on the overall efficiency of in vitro production of cloned sheep blastocyst.

Key words: Ovine, Somatic cell nuclear transfer, Cumulus, Fibroblast

مقاله تحقیقی

مقایسه کارایی سلولهای کومولوس تخمدان و سلولهای فیبروبلاست گوش در تکوین قبل از لانه گزینی جنینهای شبیه سازی شده گوسفند

محسن فروزانفر M.Sc.*، محمد حسین نصر اصفهانی Ph.D.*، مجتبی رضازاده Ph.D.***، کاظم پریور Ph.D.****، فریبا مولوی M.Sc.**، سید مرتضی حسینی M.Sc.***، مهدی حاجیان M.Sc.****

* دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

** گروه جنین شناسی، پژوهشکده رویان، اصفهان، ایران

*** گروه جنین شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهران

***** گروه زیست شناسی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

تاریخ وصول: اردیبهشت‌ماه ۸۶، تاریخ پذیرش: تیرماه ۸۶

چکیده

هدف: علیرغم پیشرفتهای شگرف در انتقال هسته سلولهای سوماتیک(SCNT: Somatic Cell Nuclear Transfer)، اطلاعات اندکی در زمینه اثر نوع سلول دهنده بر کفایت روند آزمایشگاهی شبیه سازی پستانداران وجود دارد. هدف این مطالعه بررسی کفایت سلولهای کومولوس تخمدان و سلول های فیبروبلاست به عنوان سلولهای دهنده هسته در روند شبیه سازی گوسفند است.

مواد و روشها: در این مطالعه که یک مطالعه تجربی است، سلولهای فیبروبلاست بالغ از بیوپسی پوست یک گوسفند نر و یک گوسفند ماده و سلولهای کومولوس از همان گوسفند ماده تهیه شد. روش تزریق کامل درون سیتوپلاسمی سلول دهنده برای ایجاد جنینهای ساختار مجدد استفاده شد و پس از فعال سازی به مدت هفت روز در محیط کشت TCM+10%FCS کشت داده شدند. جنینهای حاصل از لقاح آزمایشگاهی نیز به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که درصد تشکیل بلاستوسیست روز ۷ جنینی درجنینهای شبیه سازی شده یا استفاده از سلولهای کومولوس (۱۹/۷درصد) در مقایسه با سلولهاس فیبروبلاستی نر(۱۷/۵ درصد) و ماده (۱۵/۷ درصد) بالاتر است. هرچند این افزایش از نظر آماری معنی دار ناست ولی درصد تشکیل بلاستوسیست در هر سه گروه جنینهای شبیه سازی شده به طور معنی داری کمتر از گروه کنترل (۲۹/۷ درصد) بود.

نتیجه‌گیری: سلولهای کومولوس و سلولهای فیبروبلاست را می‌توان به عنوان سلولهای دهنده هسته جهت تولید جنینهای شبیه سازی شده گوسفند استفاده نمود. ازآنجا که تفاوت چمشگیری در میزان تولید بلاستوسیت بین سه گروه SCNT وجود نداشت بنابراین به نظر می‌رسد که نوع سلول دهنده هسته اثرچشمگیری بر توان کلی تولید بلاستوسیت شبیه سازی شده گوسفند ندارد.

کلید واژه‌ها: انتقال هسته سلول سوماتیک،کومولوس، فیبروبلاست، شبیه سازی گوسفند

آدرس مکاتبه: تهران، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکد رویان، جهاد دانشگاهی (پایگاه تحقیقات علوم سلولی اصفهان) گروه جنین‌شناسی صندوق پستی ٤٦٤٤-١٩٣٩٥

E-mail: mh_nasr@med.mui.ac.ir

مقدمه

شبیه سازی (cloning) پستانداران اهلی با استفاده از فناوری انتقال هسته سلول سوماتیک (SCNT) یکی از شگرف ترین پیشرفتهای حاصل در حیطه دانش سلولی و تکوینی جنینی است. این فناوری حاصل مطالعات گسترده محققین بیولوژی بر برهم کنش میان هسته و سیتوپلاسم طی روند تمایز است. طی فرایند SCNT هسته یک سلول سوماتیک تمایز یافته جایگزین هسته اووسیت شده و سپس این جنین بازسازی شده مراحل رشد و نمو جنینی را – درست مانند وقایعی که بعد از لقاح صورت می‌گیرد – طی می‌کند [۱]. فناوری SCNT فرصتهای نوینی را برای ازدیاد جانوران با ژنوتیپ برتر [۲]، حفظ و افزایش گونه های در معرض خطر انقراض [۳]، تولید جانوران ترانس ژنیک و درمان بیماریهای انسانی از طریق شبیه سازی درمانی [٤] فراهم می‌آورد. به علاوه جانوران ایزوژنیک تولید شده بوسیله تکنیک SCNT با کاهش دادن تعداد نمونه های مورد نیاز برای تجربیات با ارزش از دیدگاه آماری به ویژه در گونه هایی که دسترسی به تعداد زیاد آنها محدودیت دارد، می‌توانند مدلهای بسیار مناسبی برای تحقیقات بیوشیمیایی باشند [۵]. هر چند بعد از تولد اولین پستاندار شبیه سازی شده (دالی) با استفاده از تکنیک SCNT شبیه سازی بسیاری از گونه ها از جمله گوسفند [٦]، گاو [۷]، موش [۸]، بز [۹]، خوک [۱۰]، گربه [۱۱]، خرگوش [۱۲] و اسب [۱۳] با استفاده از این روش با موفقیت انجام شده است، با این حال در صد موفقیت در این روش بسیار پایین است. به طوری که کمتر از ۱ درصد جنینهای ساختار مجدد پس از انتقال به رحم حیوانات گیرنده منجر به تولد زنده شده اند. این امر باعث شده که در حال حاضر کاربردهای بالقوه SCNT به وسیله کارایی نسبتا پایین آن محدود شود.

فاکتورهای متعددی موفقیت یا شکست هر یک از مراحل مختلف SCNT را تحت تاثیر قرار می‌دهند که شامل کیفیت اووسیت گیرنده هسته، رشد و بلوغ اووسیت، روش انجام الحاق سلولی (fusion) بین سلول دهنده هسته و اووسیت، روش فعال سازی مصنوعی، روش کشت جنین و..... است. فاکتور مهم دیگر، انتخاب نوع سلول سوماتیک دهنده هسته در فرایند SCNT است. سلولهای سوماتیک مختلفی نظیر سلولهای غدد پستانی [٦]، سلولهای اپیتلیال اویداکت [١٤ و١٥]، سلولهای کومولوس [۸ و ۱۵]، سلولهای ماهیچه ای [١٦]، سلولهای اپیتلیال رحم و سلولهای فیبروبلاستی گوش [۱۷]، برای SCNT استفاده شده اند. از آنجا که سلولهای فوق دارای خصوصیات متفاوتی هستند، می‌توانند کارایی SCNT را تحت تاثیر قرار دهند. در حال حاضر در باره اساس سلولی و ملکولی که طی برنامه ریزی مجدد هسته سلول سوماتیک پس از انتقال به سیتوپلاسم اووسیت مرحله متافاز II صورت می‌گیرد اطلاعات کمی در دست است. یکی از تئوریهای احتمالی مطرح برای توضیح کارایی پایین SCNT که اولین بار توسط واکایاما (Wakayama) پیشنهاد شد این است که فقط تعداد کمی از سلولهای سوماتیک بالغ، مستعد شبیه سازی هستند [۱۸]. از سایر فاکتورهایی که توان تکوینی هر سلول دهنده در فرایندSCNT را تحت تاثیر قرار می‌دهند می‌توان به ماهیت بافت [۱۹]، هماهنگی سیکل سلولی سلول دهنده هسته و اووسیت [۲۰]، مرحله تمایز سلول دهنده هسته [۲۱]، سن سلول دهنده هسته [۲۲]، شرایط کشت سلولی [۲۳]، ژنوتیپ [٢٤] و جنسیت سلول دهنده [۲۵] اشاره نمود.

در گونه گوسفند اولین نوع سلول مورد استفاده به عنوان دهنده هسته،سلولهای بلاستومری کشت و تمایز داده شده حاصل از یک جنین ۹ روزه و سپس سلولهای اپیتلیال پستان بود [٦]، ولی معمولترین سلولها ی مورد استفاده در شبیه سازی گوسفند و همچنین گاو سلولهای کومولوس و گرانولوزای تخمدان است [۲۳] علیرغم مطالعات متعدد برای بهبود روند شبیه سازی گوسفند، تاکنون کفایت انواع مختلف

سلولی این پستاندار در تکوین قبل از لانه گزینی جنینهای شبیه سازی شده بررسی نشده است. با توجه به اینکه طی روند شبیه سازی توانایی سلولهای مختلف دهنده هسته در برنامه ریزی مجدد پس از انتقال به اووسیت گیرنده با یکدیگر متفاوت است بنابراین در تحقیق حاضر به منظور مقایسه کفایت دوتیپ مختلف سلولی کومولوس (cumulus cell) و سلولهای فیبروبلاست گوش (هر دو از یک گوسفند ماده) و نیز سلولهای فیبروبلاست گوش گوسفند نر طی مراحل تکوین قبل از لانه گزینی جنین های SC NT گوسفند و مقایسه با جنینهای حاصل لقاح آزمایشگاهی (IVF: In vitro fertilization) انجام شد. با توجه به اینکه سلولهای فیبروبلاست از گوسفند نر و ماده و سلولهای کومولوس از همان گوسفند ماده دهنده سلولهای فیبروبلاست تهیه شد،بنابراین در این مطالعه، اثر، نوع، جنسیت و نیز اثر ژنوتیپ سلول دهنده هسته در تکوین قبل از لانه گزینی جنینهای شبیه سازی شده گوسفند بررسی شد.

مواد و روشها

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده مطالعه حاضر به جز مواردی که مشخص شده، از شرکت Sigma (St. Louis , Mo, USA) تهیه شده است.

تهیه اووسیت وبلوغ آزمایشگاهی

با مراجعه به کشتارگاه محلی، تخمدانهای گوسفندهای کشتارگاهی جمع آوری ودر فلاسکهای حاوی نرمال سالین (۹ گرم نمک در یک لیتر آب) قرار داده شدند و در کمتر از دو ساعت در دمای ۳۵ – ۳۰ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه به کمک سرنگ ۲ سی سی و نیدل گوژ ۲۰ حاوی حدود ۰/۲ ml محلول هپارینه H-TCM + 10% FCS، فولیکولهای با قطر ٦–۲ mm موجود در ناحیه قشری تخمدانها، به آرامی آسپیره شدند. سپس در زیر استریومیکروسکوپ کمپلکس های کومولوس – اووسیت Comulus Oocyte Complex (COCs) که از نظر سیتوپلاسمی یکنواخت بوده و حد اقل دارای چند لایه از سلولهای کومولوس بودند جدا و در دیشهای حاوی قطرات ۲۰۰ µ L از محیط H-TCM + 10% FCS پوشیده شده با روغن معدنی شستشو شدند. سپس COC های شستشو داده شده برای انجام مراحل بلوغ آزمایشگاهی در دیشهای حاوی قطرات ۱۰۰ µ L از محیط بلوغ (TCM199 + 10% FCS حاوی FSH ۵ µg/ml، LH ۵ µg/ml، 17-β-estradiol ۱ µg/ml) به مدت ٢٤ – ٢٢ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۸/۵ درجه سانتی گراد، غلظت ۵ درصد CO2 و رطوبت حداکثر کشت داده شدند.

آماده سازی اسپرم و لقاح آزمایشگاهی (IVF) وکشت جنینها

به منظور آماده سازی اسپرم از بیضه های قوچهای کشتارگاهی استفاده شد. پس از انتقال بیضه ها به آزمایشگاه و شستشوی آنها، با ایجاد برش کوچکی در ناحیه اپی دیدیم، به کمک تیغ پیستوری اسپرمهای موجود در ناحیه دم اپی دیدیم جدا و به محیط H-TCM + 10% FCS انتقال داده شد. اسپرمهای استحصالی برای ظرفیت یابی به مدت ۲ ساعت به محیط capacitation (Parish et. al) منتقل شدند.برای انجام لقاح آزمایشگاهی روزانه تعدادی از COC های بالغ شده آزمایشگاهی به طور تصادفی انتخاب و در محیط لقاح (Parish et. al) به مدت ۲۲ –۲۰ ساعت با اسپرمهای ظرفیت یابی شده مجاور شدند. سپس جنینهای حاصل در شرایط انکوباتور با دمای ۳۸/۵ درجه سانتی گراد، غلظت ۵ درصد O2، غلظت ۵ درصد CO2 و رطوبت حداکثر تا زمان لازم کشت داده شدند.

آماده سازی سلولهای دهنده

آماده سازی فیبروبلاستها: از هر یک از حیوانهای دهنده، بیوپسی به ابعاد mm ۳ × ۳ از لاله گوش تهیه و در محیط PBS (phosphate buffer saline) حاوی آنتی بیوتیک (penicillin 100 iu / ml. streptomycin 100 µg / ml) به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه ابتدا بافت پوست به دقت از بیوپسی گوش جدا شد و پس از ۵ –٤ سری شستشوی کامل در محیط PBS به کمک اسکالپل به قطعات بسیار کوچک برش داده شد و در محیط DMEM + 15% FCS درون فلاسکهای T 25 در انکوباتور دمای ۳۸ درجه سانتی گراد ، غلظت ۵ درصد CO2 و رطوبت حداکثر کشت داده شدند. پس از کشت اولیه و با تشکیل یک لایه سلولی از فیبروبلاستها در کف فلاسک کشت، قطعات بافتی اضافی خارج شده و سپس سلولهای فیبروبلاست به روش معمول کشت سلولی، کشت و پاساژ داده شدند.

آماده سازی سلولهای کومولوس

برای آماده سازی سلولهای کومولوس تخمدان، ابتدا اسفنج واژنی آغشته به پروژسترون استات

(FGA , Chronogest International , The Netherlands) به مدت ١٤ روز در واژن گوسفند ماده قرار داده شد. ٤٨ ساعت قبل از خارج کردن اسفنج واژنی مقدارIU ۵۰۰ از گونادوتروپین سرم مادیان آبستن (International , Holland Folligon , Intervet) به صورت عضلانی تزریق شد. یک تزریق mg ٤٥ از پروستاگلاندین (Estrumate , Shering – Plough , Levallios , France) و یک محرک اوولاسیون

(hcg ,Chrolo, Holland) در صبح روز چهاردهم (روز خارج سازی اسفنج) و روز بعد از آن استفاده شد. ٢٤ ساعت پس از خارج سازی اسفنج، حیوان دهنده سلول سوماتیک تحت عمل جراحی قرار گرفت و COC ها از قشر تخمدانها آسپیره شدند و پس ازشستشو، دردیش کشت حاوی DMEM + 10 % FCS کشت داده شدند. سه روز پس ازکشت اولیه و جدا شدن سلولهای کومولوس از اووسیتها و چسبیدن آنها به کف دیش، اووسیت ها از محیط خارج شدند و لایه سلولی ایجاد شده بعد از رسیدن به مرحله تراکم سلولی (confluency) به روش معمول کشت سلولی، کشت و پاساژ داده شد.

همزمانی سیکل سلولی سلولهای دهنده هسته در این تحقیق برای همزمان سازی سلولهای دهنده هسته در فاز G0 / G1 سلولی، سلولهای فیبروبلاست و کومولوس واقع در پاساژهای سلولی۱۰ – ۵ پس از رسیدن به مرحله تراکم سلولی به مدت ۸– ۵ روز در معرض مقادیر اندک سرم (۵/. درصد) قرار گرفتند (serum starvation). بلافاصله قبل از انتقال هسته، سلولهای دهنده به روش تریپسینه کردن به حالت سوسپانسیون سلولی در آمده و به عنوان سلول دهنده هسته در فرایند انتقال هسته استفاده شدند.

بی هسته سازی (enucleation) اووسیت گیرنده

پس از انجام بلوغ آزمایشگاهی، COC های رشد یافته و بالغ شده با سیتوپلاسم یکنواخت و همراه با سلولهای کومولوس متسع شده مناسب انتخاب شده و پس از شستشو در H -TCM 10% FCS +، هر ۸ تا ۱۰ عدد COC به مدت ۳۰ ثانیه در قطرات µl ۲۰۰ از محیط H-TCM + 10% FCS حاوی IU/ml ۳۰۰ آنزیم هیالورونیداز قرار داده شدند. سپس با پیپتینگ ملایم سلولهای کومولوس اطراف اووسیتها جدا شد (denuding) و اووسیتهای دارای سیتوپلاسم یکنواخت و زونا پلاسیدای مناسب، برای انجام مراحل انتقال هسته انتخاب شدند. برای تخلیه ژنوم اووسیت، گروههای ۸ – ۵ تایی اووسیتها به مدت ۱۵ دقیقه در محیط حاوی µg / ml ۷/۵ از ماده سیتو کلایزین B در شرایط انکوباتور قرار داده شدند و پس از شستشو در محیط H -TCM + 10% FCS برای

دستکاری میکروسکوپی، به دیشهای مخصوص منتقل شدند. عمل هسته زدایی با آسپیراسیون مقدار اندکی از سیتوپلاسم اووسیت که درست در زیر اولین جسم قطبی قرار گرفته بود و با استفاده از میکروپیپتهای شیشه ای با قطر خارجی ۲۰ µm بر روی میکروسکوپ مجهز به میکرومانیپولاتور انجام شد. برای تایید هسته زدایی، سیتوپلاسم خارج سازی شده به مدت ۱۵ دقیقه تحت تاثیر رنگ فلوئورسنت Hoechst (10 µg / ml) قرار گرفت و در زیر میکروسکوپ فلوئورسنت در بزرگنمایی ۱۰۰ برابر مشاهده شد. اووسیتهایی که عمل هسته زدایی در آنها با موفقیت انجام شده بود، برای مراحل بعدی انتخاب شدند.

انتقال هسته (renucleation)

پس از هسته زدایی، یکی از سلولهای دهنده (فیبروبلاست ماده یا فیبروبلاست نر و یا کومولوس) با ظاهر مدور انتخاب و از طریق شکاف ایجاد شده در زونا پلاسیدای اوسیت در هنگام هسته زدایی، وارد سیتوپلاسم اووسیت شد. اووسیتهای بازسازی شده (reconstructed) برای انجام فیوژن و اکتیواسیون، ابتدا درمحیط فیوژن (0.3Mmanitol,0.1mM Mgso4) شستشو شدند و سپس به درون مایع فیوژن ما بین دو الکترود (با فاصله ۵ mm) انتقال داده شدند. فیوژن سلولی با القا دو پالس الکتریکی مستقیم با مشخصات 1.75 KV/Cm برای ۸۰ µ sec تاخیر زمانی یک ثانیه (Cryologic , Australia) انجام پذیرفت. برای اکتیواسیون شیمیایی اووسیتهای بازسازی شده ابتدا به مدت ٤ دقیقه در محیط H-TCM+10%FCS حاوی یونومایسین و سپس به مدت ٤ ساعت در محیط H-TCM+10%FCS حاوی 6-DMAP قرار داده شدند. هر ۵ -٤ جنین بازسازی شده درمحیط کشت TCM+10%FCS در شرایط انکوباتور : دمای ۳۸/۵ درجه سانتی گراد، CO_2 و رطوبت ماکزیمم کشت داده شدند. تعویض محیط کشت جنین ها به صورت روزانه انجام شد. سپس مراحل تسهیم، ۸ تا ١٦ سلولی، مورولای روز ۵ جنینی و بلاستوسیست روز ۷ جنینهای ساختار مجدد با یکدیگر و با گروه لقاح آزمایشگاهی که به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد، مقایسه شدند.

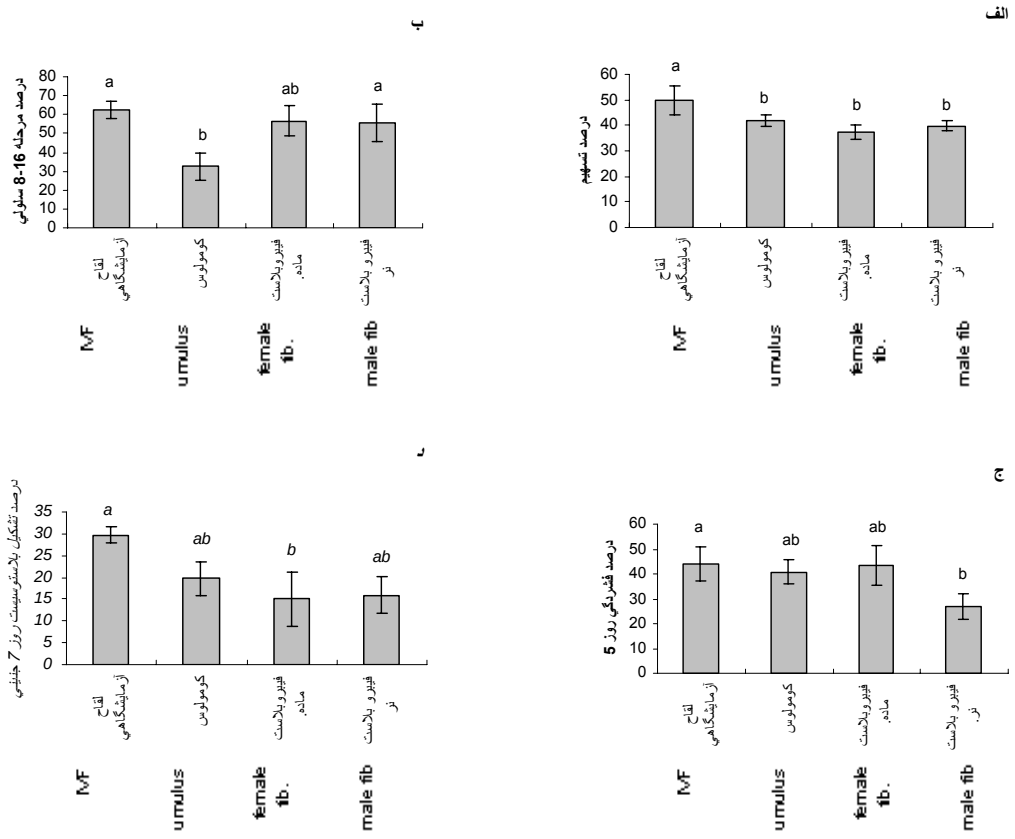
تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی

تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی با استفاده از طرح آزمایشی کاملا تصادفی و آنالیز واریانس صورت گرفت و مقایسه بین میانگین گروهها (تیمارها) با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan's Multiple Range Test) انجام شد.

یافته ها

در این تحقیق توان بالقوه سلولهای فیبروبلاستی گوش گوسفند نر (گوسفند ۹ ماهه نژاد افشاری) و سلولهای فیبروبلاستی گوش و سلولهای کومولوس تخمدان گوسفند ماده (هر دو از گوسفند ۹ ماهه نژاد افشاری) به عنوان سلولهای دهنده در فرایند انتقال هسته با یکدیگر و با گروه جنینهای حاصل از لقاح آزمایشگاهی مقایسه شد. به طور کلی در هر یک از گروههای شبیه سازی و همچنین گروه لقاح آزمایشگاهی ۹ تکرار انجام شد که نتایج کلی آن همراه با تعداد جنینها طی مراحل تکوین قبل از لانه گزینی در جدول۱ خلاصه شده است. برای ارزیابی قابلیت سلولهای سوماتیک فوق به عنوان سلولهای دهنده هسته، جنینهای شبیه سازی شده در هر یک از گروههای تیماری در شرایط مساوی کشت داده شدند و سپس درصد پیشرفت جنینهای حاصل تا مراحل مختلف تکوین جنینی قبل از لانه گزینی شامل مرحله تسهیم، مرحله ۸ تا ١٦ سلولی، مرحله فشردگی روز ۵ جنینی و مرحله بلاستوسیست روز ۷ جنینی با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که درصد تسهیم در

گروههای مختلف شبیه سازی شده تفـاوت معنـی داری ($p \leq 0.05$) را با یکدیگر نشان نمی دهد، در حالی کـه در هـر سـه گروه تیماری این تحقیق، درصد تـسهیم در مقایـسه بـا گـروه لقاح آزمایشگاهی (IVF) که بـه عنـوان گـروه کنتـرل در نظـر گرفته شـده اسـت. تفـاوت معنـی داری ($p \leq 0.05$) را نـشان می‌دهند (نمودار۱ الف). در مقایسه نتایج حاصل از مرحلـه ۸ تـا ۱٦ سـلولی، جنینهـای شـبیه سـازی شـده بـا اسـتفاده از سلولهای کومولوس به عنوان سلولهای دهنـده، در مقایـسه بـا سایر گروههای تیماری و همچنین گروه کنترل کاهش معنـی داری ($p \leq 0.05$) مشاهده شد (نمـودار۱ ب). مقایـسه درصـد پیشرفت تا فشردگی روز۵ جنینی در بین گروههـای مختلـف تیماری این تحقیق و گروه کنترل بیانگر این است که جنینهای شبیه سازی شده با استفاده از سـلولهای فیبروبلاسـتی نـر، بـه عنوان سلولهای دهنده هسته در مقایسه با گروه کنترل کـاهش معنی داری ($p \leq 0.05$) را نشان می‌دهند (نمودار۱ ج). مقایسه درصد پیشرفت تا مرحله بلاستوسیست روز۷ جنینـی در بـین گروههای مختلف تیمـاری و همچنـین گـروه کنتـرل نـشان می‌دهد که فرایند انتقـال هـسته انجـام شـده ایـن تحقیـق در جنینهای حاصل از سلولهای فیبروبلاستی مـاده در مقایـسه بـا گروه کنترل تفاوت معنی داری ($p \leq 0.05$) را نـشان مـی‌دهـد (نمودار۱ د).



نمودار۱. درصد تسهیم (الف)، در صد پیشرفت مرحله ۱٦-۸ سلولی(ب)، در صد پیشرفت مرحله فشردگی روز ۵ جنینی (ج) و درصد تشکیل بلاستوسسیست روز ۷ جنینی (د) جنینهای نوسازی شده در گروههای تیماری کومولوس، فیبروبلاست ماده و فیبروبلاست نر همراه با گروهIVF به عنوان گروه کنترل. ستونهای با حروف متفاوت تفاوت معنی داری را در $p \leq 0.05$ نشان می‌دهند

جدول ۱. تعداد کل موارد انجام شده در گروههای شبیه‌سازی شده با استفاده از سلولهای کومولوس، فیبروبلاست نر و ماده وگروه لقاح آزمایشگاهی همراه با تعداد جنینها درطی مراحل تکوین قبل از لانه گزینی

نوع آزمایش	تعداد اووسیتهای بالغ شده	تعداد اووسیتهای انتخاب شده برای انتقال هسته	تعداد انتقال هسته انجام شده	انتقال هسته موفق	اووسیتهای فعال سازی شده	اووسیتهای لقاح نیافته	تسهیم	مرحله ۵ تا ۸ سلولی	مرحله ۸ تا ۱۶ سلولی	کامپکشن	بلاستوسیست روز ۷ جنینی
شبیه سازی با سلولهای کومولوس	۸۰۵	٤۸۰	۲۳۷	۱۷۰	۱۷۰	۲۵	۷۱	۵۰	۲۳	۲۹	١٤
شبیه سازی با سلولهای فیبروبلاست ماده	۹۷۱	۳۳۹	۲۲٦	١٤۲	١٤۲	۲۳	۵۱	۳۳	۳۰	۲۳	۸
شبیه سازی با سلولهای فیبروبلاست نر	۷۲۷	۳۵۳	۲۳۸	۱۵۸	۱۵۸	۳۵	٦۳	۵۱	۳۵	۱۷	۱۱
لقاح آزمایشگاهی	٤۱۹	–	–	–	–	۱۹۷	۲۲۲	١٤۵	۱۳۸	۹۸	٦٦

بحث

در این تحقیق توان بـالقوه سـلولهای سـوماتیک فیبروبلاسـتی گوش گوسفند نـر و مـاده و سـلولهای کومولـوس تخمـدان گوسفند به عنوان سلولهای دهنده در فرایند انتقال هسته و بـه منظور تولید جنینهای شبیه سازی شده تا مرحله قبـل از لانـه گزینی با یکدیگر مقایسه شدند. طی تکوین قبل از لانه گزینی جنین گوسفند چندین مرحله بحرانی جنینی صورت می‌گیـرد: اولین تقسیم کلیواژی، مرحله ۸ الی ١٦ سلولی که ژنوم جنـین فعال می‌شود، مرحله کامپکشن مـورولا در روز ۵ کـه اولـین تماسهای سلول– سلول در جنین تثبیت می‌شـود و در نهایـت مرحلـه بلاستوسیـست در روز ٦ الـی ۷ جنینـی کـه دو تیـپ مختلـف سـلولی بـه نـام تـوده سـلولی درونـی و سـلولهای تروفواکتودرم شکل می‌گیرند [٢٦]. به طور کلی نتایج حاصـل از بررسی مراحل بحرانی تکوین قبل از لانه گزینـی جنینهـای شبیه سازی شده این تحقیق نشان داد که هر دو تیـپ سـلولی فوق را می‌توان به عنـوان سـلولهای دهنـده در فراینـد انتقـال هسته به کار برد. گرچـه سـلولهای کومولـوس در مقایـسه بـا سلولهای فیبروبلاست نر و سلولهای فیبروبلاست مـاده میـزان بالاتر تولید بلاستوسیت را القا کرد ولی از آنجا کـه تفاوتهـای موجود معنی دار نیست، بنابراین توجه بـه سـایر جنبـه هـای استفاده از ایـن سـلولها ازجملـه سـهولت دسترسـی و تکثیـر آزمایشگاهی می‌بایست مد نظر قرار گیرد.

در تحقیق حاضر بـه منظـور قـرار دادن سـلولهای سـوماتیک کشت داده شده در فاز G0 سلولی از روش محـدودیت سـرم (S.S : serum starvation) استفاده شد. گزارش شده اسـت کـه S.S سلولهای سوماتیک موجب می‌شود تا اکثر سلولها در فـاز G0 سلولی متوقف شوند [۲۷]. به نظر می‌رسد نحـوه اسـتقرار میکروارگانلهای سلولهای دهنده هسته در مرحله G0، احتمـالا برای رخداد فرایند برنامه ریزی مجدد هسته سلول دهنده پس از انتقال به سیتوپلاسـم اووسـیت گیرنـده طـی شـبیه سـازی مـی‌توانـد مفیـد باشـد [۲۸]. چـو (Cho) و همکـاران درصـد پیشرفت مراحل قبل از لانـه گزینـی را در جنینهـای نوسـازی

شده گاو با استفاده از چهار تیپ مختلف سلولی (سلولهای فیبروبلاستی گوش، سلولهای کومولوس تخمدان، سلولهای اپیتلیال اویداکت و سلولهای اپیتلیال رحم) را با محدودیت سرم (S.S) یا بدون محدودیت سرم بررسی نمودند. نتایج تجربیات آنها نشان داد که به طور کلی قابلیت شبیه سازی چهار نوع سلولی سوماتیک فوق در سلولهایی که در معرض محدودیت سرم بوده اند در مقایسه با سلولهای کشت داده شده در حضورسرم بالاتر است، به جز درصد تشکیل بلاستوسیست جنینهای حاصل از سلولهای کومولوس در هر دو گروه تفاوت معنی داری ($p \leq 0.05$) را نشان نداد (٤٢/٦ در برابر ٤٣/٨درصد). از سوی دیگر در جنینهای شبیه سازی شده با سلولهای کومولوس و فیبروبلاستی S.S شده، تفاوت معنی داری ($p \leq 0.05$) در درصد تسهیم (٩٤/٣ در برابر ٩٣/٤ درصد) و درصد بلاستوسیست (٤٣/٨ در برابر ٤٠/٦درصد) مشاهده نشد [۲۹]. به نظر می‌رسد که سلولهای کومولوس در مقایسه با سایر سلولهای سوماتیک مورد مطالعه توان کمتری برای کشت در محیطهای فاقد سرم داشته باشند. مقایسه درصد کلیواژ جنینهای نوسازی شده این تحقیق نشان داد که تفاوت معنی داری ($p \leq 0.05$) در بین گروههای مختلف وجود ندارد هر جند در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری ($p \leq 0.05$) را نشان می‌دهند. همچنین بین درصد تشکیل بلاستوسیست روز هفتم جنینی در جنینهای نوسازی شده با سلولهای فیبروبلاستی نر، سلولهای فیبروبلاستی ماده و سلولهای کومولوس تفاوت معنی داری ($p \leq 0.05$) مشاهده نشد. برخلاف نتایج این محققین، در مطالعه مشابه دیگر (۳۰) در گاو، سلولهای کومولوس توانایی بالاتری برای تولید رویان ماقبل لانه گزینی و نیز تولید نتاج زنده شبیه سازی شده دارند. همچنین به نظر می‌رسد که سلولهای کومولوس استحصالی از اووسیت تازه بالغ کاندیدای مناسبی برای انجام شبیه سازی در موش باشند. یکی از نظریه های مطرح در این زمینه، سیکل مناسب سلولی (G0/G1) است. یک شبکه درونی از اتصالات منفذ دار (G.J.: Gap Junction) ارتباط مستقیم بین سلولهای فولیکولی و اووسیت را برقرار می‌سازد.G.J ها سلولهای کومولوس را به یکدیگر مرتبط می‌سازند و درونی ترین لایه سلولهای کومولوس احاطه کننده اووسیت، زواید سیتوپلاسمی خود را از زونا پلاسیدا عبور داده و با غشای سیتوپلاسمی اووسیت تشکیل G.J های متعددی را می‌دهند [۳۱]. احتمالا به علت ارتباط نزدیک سلولهای کومولوس و اووسیت، سلولهای کومولوس تخمدان می‌توانند سلولهای مناسب تری به عنوان سلولهای دهنده در فرایند شبیه سازی باشند. نتایج حاصل از این تحقیق نیز بیانگر این است که درصد تشکیل بلاستوسیست روز ۷ جنینی در سلولهای کومولوس (۱۹/۷ درصد) در مقایسه با سلولهای فیبروبلاستی نر(۱۷/۵ درصد) وماده (۱۵/۷ درصد) بالاتر است. هرچند این افزایش از نظر آماری معنی دار ($p \leq 0.05$) نیست. با این حال جمع آوری (collection) سلولهای فیبروبلاستی گوش (بوسیله بیوپسی کوچک ناحیه گوش) در مقایسه با جمع آوری سلولهای کومولوس (سوپر اوولاسیون حیوان دهنده و جراحی) راحت تر، کم هزینه تر و غیر مخرب تر است. طی مراحل مختلف جنینی قبل از لانه گزینی ارزیابی شده این تحقیق، استفاده از سلولهای فیبروبلاستی نر در مقایسه با سلولهای فیبروبلاستی ماده به عنوان سلولهای دهنده هسته، تفاوت معنی داری ($p \leq 0.05$) را در درصد جنینهای تولید شده بعد از انتقال هسته نشان نداد. به نظر می‌رسد که جنسیت سلولهای دهنده هسته در فرایند شبیه سازی، نمی تواند تاثیر معنی داری بر مراحل جنینی قبل از لانه گزینی اعمال کند. گرچه تئوری های موجود در زمینه فرایند X-inactivation رویانی و نیز برخی مطالعات اولیه بیانگر آن است که سلولهای نر کاندیدای مناسب تری برای انجام شبیه سازی هستد ولی هنوز هیچ کار جدی در این زمینه انجام نپذیرفته است. با این

حال انجام مطالعات مقایسه ای توان شبیه سازی تیپهای مختلف سلولی در نر و ماده برای انتخاب بهترین نوع سلول دهنده ضروری به نظر می‌رسد. از طرف دیگر در تحقیق حاضر درصد سلولهای سوماتیک کومولوس و فیبروبلاست نر و ماده، قرار داده شده در فاز G0 / G1 سلولی به روش محدودیت سرم، تعیین نشد. بنابراین انجام مطالعات تکمیلی برای بررسی درصد نسبی فاز G0 /G1 سلولهای تیمار شده این تحقیق ضروری به نظر می‌رسد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از مدیریت محترم پژوهشکده رویان که امکانات تجهیزاتی و همچنین هزینه های مادی انجام این طرح را فراهم نمودند، سپاسگزاری می‌نمایند.

References

1. **Keit HS.** Nuclear transfer in farm animal species .Cell and developmental biology 1999; 10: 245-52
2. **Robl JM.** Development and application of technology for large scale cloning of cattle.Theriogenology 1999; 51: 499-508.
3. **Wells DN, Misica PM, Tervit HR, Vivanco WH.** Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. Reprod Fertil Dev 1998; 10: 369-78.
4. **Lanza, RP, Caplan AL, Silver LM, Cibelli GB, West MD, Green RM.** The ethical validity of using nuclear transfer in human transplantation. JAMA 2000; 284: 3175-9.
5. **Wolf DP, Meng L, Ouhibi N, Zelinski-Wooten M.** Nuclear transfer in the rhesus monkey: Practical and basic implications. Biol Reprod 1999; 60: 199-204.
6. **Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 1997; 385: 810–3.
7. **Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell.** Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. Science 1998; 280: 1256–8.
8. **Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R.** Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature 1998; 394: 369–74.
9. **Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Cammuso C.** Production of goats by somatic cell nuclear transfer. Nat Biotech 1999; 17: 456–61.
10. **Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T.** Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. Science 2000; 289: 1188–90.
11. **Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, et al.** A cat cloned by nuclear transplantation. Nature 2002; 415:859.
12. **Chesne P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP.** Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. Nat Biotech 2002; 20: 366–9.
13. **Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N.** A cloned horse born to its dam twin. Nature 2003; 424: 635- 40.
14. **Goto Y, Kaneyama K, Kobayashi S, Imai K, kojima T.** Birth of cloned calves drived from cultured oviductal epithelial cells of a diary cow. Anim Sci J 1999; 70: 243-5.
15. **Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Tsunoda Y.** Eght calves cloned from somatic cells of a single adult. Science 1998; 282: 2095-8.
16. **Shiga K, Fugita T, Hirose K, Sasae Y, Nagai T.** Production of cows by transfer of nuclei from cultured somatic cell obtained from Japanese black

bulls. Theriogenology 1999; 25: 527-35.

17. **Hwang WS, Shin TY, Park JI, Roh SH, Lee BC.** Production of Holestein and Korean native cattle cloned by somatic cell nuclear transfer in Korea. In Proceeding of the transgenic Animal Research Conference 1999 [abs].
18. **Wakayama T, Yanagimachi R.** Mouse cloning with nucleus donor cell of different age and type. Mol Reprod Dev 2001; 58 : 376-83.
19. **Kato Y, Tani T, Tsunoda, Y.**Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. J Reprod Fetil 2000; 120: 231-7.
20. **Wells DN, Laible G, Tucker F.** Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. Theriogenology 2003; 59: 45-49.
21. **Panelli S, Damiani D, Galli C.** Rearranged genomes of bovine blood cells can allow the development of clones till late fetal stages, but rare unrearranged genomes have greater potential and lead to adulthood. Gene 2004; 334: 99-103.
22. **Hill JR, Winger QA, Long C.** Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. Biol Reprod 2000; 62: 1135-40.
23. **powell, AM, Talbot NC, Wells KD.** Cell donor influences of producing cattle by somatic cell nuclear transfer. Biol. Reprod 2004; 71: 210-216.
24. **Inour K, Ogonuli N, Mochida K.** Effects of donor cell type and genotype on the efficiency of mouse somatic cell cloning. Biol Reprod 2003; 69: 1394-400.
25. **Wakayama T, Yanagimachi R.** Cloning of male mice from adult tail-tip cells. Nat. Genet 1999; 22: 127-8.
26. **Lonergan, P, Risos, D.** Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. Reproduction 2003; 126: 337-46.
27. **Boquest AC, Day BN, Prather RS.** Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. Biol Reprod 1999; 60: 1013-9.
28. **Withfiled JF, Boynton Al, Rixon RH, Youdale T.** The control of cell proliferation by calcium-calmodolin and cyclic AMP. Anim. Cell Prod 1985; 1: 331-65.
29. **Cho JK, Lee BC, Park JM, Lim JM, Shin S, Kim J. Development** of bovine oocyte reconstructed with different donor somatic cells with or without serum starvation. Theriogenology 2002; 57: 1819-1828.
30. **Enright Bp, Jeong B, Yang X, Tian XC.** Epigenetic characteristics of bovine donor cells for nuclear transfer;levels of histone acetylation.Biology of reproduction 2003; 69: 1525-30.
31. **Rebecca E, David T.** Armstrong, Robert B. Gilchrist. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell specific cyclic adenosine 3,5 monophosphate levels. Biol Reprod 2004; 70: 548-56.