تاثیر سرعت فیوژن بر میزان تکوین و رشد جنین‌های دوسلولی الکتروفیوز شده تتراپلوییدگاو

دکتر محمدرضا دارابی[1] *، دکتر محمد حسین نصر اصفهانی[2]

۱. استادیار، گروه تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

۲. استادیار ، گروه جنین شناسی، پژوهشکده رویان تهران

تاریخ دریافت۸٤/٤/۲۵ ، تاریخ پذیرش۸٤/٦/٦

چکیده

مقدمه: امروزه از الکتروفیوژن جنین‌های دو سلولی و ایجاد تتراپلوئیدی به عنوان یکی از مهم‌ترین مراحل در بیوتکنولوژی حیوانی نام می‌برند، زیرا از جنین‌های تتراپلوئید به عنوان بستری جهت رشد و تکوین سلول‌های ترانس ژنیک استفاده می‌گردد. این مطالعه به منظور تعیین اثر سرعت فیوژن ایجاد شده بوسیله تحریک الکتریکی بر میزان تکوین جنین‌های تتراپلوئید انجام شد.

روش کار: در این مطالعه تجربی پس از بلوغ توده‌های تخمک کومولوس و ۳۵-۳۳ ساعت پس از تلقیح، تعدادی از جنین‌های دو سلولی به عنوان گروه کنترل جدا گردید (UCG). مابقی جنین‌های دو سلولی به روش الکتروفیوژن تحت تاثیر ولتاژ ۰/۷۵ کیلوولت بر سانتی‌متر و زمان ۸۰ میلیونیم ثانیه قرار گرفتند و به محیط SOF_1 منتقل شدند. سپس در زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه بعد از الکتروفیوژن، جنین‌های فیوز شده (FG) از فیوز نشده (ECG) ، در دو گروه FG_{30} و FG_{60} جدا شدند. میزان تکوین جنین‌ها در گروه های FG_{30} و FG_{60} و UCG و ECG با هم مقایسه شد و رابطه سرعت فیوژن و میزان تسهیم و تکوین مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: سرعت تسهیم تا مرحله ۸ سلولی در جنین‌های گروه FG_{60} به طور معنی‌داری بیشتر از FG_{30} بود($p<$ ۰/۰۵)، در حالی‌که میزان بلاستوسیست در دو گروه تفاوت معنی‌داری با هم نداشت. میزان تسهیم و تکوین به ترتیب در گروه UCG به طور معنی‌داری بیش از گروه‌های ECG و FG_{60} و FG_{30} بود. گسترش کروموزومی جنین‌های الکتروفیوز شده نیز نشان داد که ۷۶ درصد آنها تتراپلوئید واقعی بودند.

نتیجه گیری: در صورت نیاز به تعداد بیشتری جنین‌های ۸ سلولی و کمتر، احتمالاً جنین‌های الکتروفیوز شده در گروه FG_{60} قادرند نسبت به FG_{30} ، تعداد بیشتری جنین تولید نمایند. توانایی تسهیمی و تکوینی جنین‌ها با تاثیر پالس‌های الکتریکی کاهش می یابد.

واژگان کلیدی: زمان فیوژن، بلاستوسیست، تتراپلوییدگاو

***نویسنده مسئول:** سردشت، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

E mail: m_darabi36@hotmail.com

مقدمه

مطالعات اخیر نشان داده است که به منظور فیوز کردن سلول‌ها می‌توان از روش‌های مختلفی استفاده نمود که در بین آنها روش الکتروفیوژن به دلیل قابلیت تنظیم و تکرار پذیری دقیق اهمیت دارد(۱). به علاوه در حیواناتی نظیر گوسفند، موش، گاو و خوک می‌توان برای انتقال هسته[1] از الکتروفیوژن سلول‌های سوماتیک یا جنینی (ترانس ژن شده) با تخمکی که هسته آن استخراج شده استفاده نمود(۲).

حیوانات ترانس ژنیک به طرق مختلف تولید می‌شوند(۳) که یکی از آنها تولید کایمرا بواسطه تزریق سلول‌های شبه بنیادی جنینی (ESLC[2]) به داخل بلاستوسیست‌های تراپلوئید می‌باشد. لازم به ذکر است که بلاستوسیست‌های تراپلوئید حاوی وزیکول‌های تروفوبلاستی و فاقد توده سلول درونی (ICM[3]) واضح هستند و در صورتی که به داخل آنها ICM یا ESLC تزریق شود توان رشد و نمو تا مرحله تولد را پیدا می‌کنند، به طوری که جنینی که تشکیل می‌شود صرفاً از ICM یا سلول‌های ESLC که به داخل بلاستوسیست تراپلوئید تزریق شده مشتق می‌گردد، و جفت از بلاستوسیست تراپلوئید فاقد ICM تشکیل می‌شود(۴). روش تولید حیوانات ترانس ژنیک به روش فوق یکی از موثرترین روش‌های تولید حیوانات ترانس ژنیک می‌باشد، لذا دستیابی به این روش‌ها در کشور ما می‌تواند در زمینه‌های مختلف تحقیقاتی، صنعتی و دامپزشکی موثر باشد.

مطالعات قبلی نشان داده است که با قرار دادن سلول‌ها در معرض پالس‌های الکتریکی کوتاه مدت نفوذپذیری غشای آنها به طور برگشت‌پذیری افزایش می‌یابد(۵) که به این تکنیک الکتروپوریشن[4] می‌گویند. معمولاً از تکنیک الکتروفیوژن و الکترو پوریشن برای اهداف مختلفی نظیر تسهیل عبور داروها و مواد شیمیایی[5] و ژن‌ها از غشای سلولی و هسته استفاده می‌شود. دراین تکنیک‌ها براثر میدان الکتریکی حاصل ازجریان مستقیم، غشاها پلاریزه و ناپایدار شده و جذب غشای مقابل بر اثر فیوژن نقطه‌ای غشا توسط اتصالات محکم (در اریتروسیتها توسط ملکول‌های اسپکترین[6]) انجام می‌گیرد. در این مرحله به واسطه تشکیل سوراخ‌هایی که برگشت پذیر هستند غشای دیافراگمی شکل یکنواختی تشکیل می‌شود. دیافراگم مذکور درصورت بهینه بودن شرایط از بین رفته و جوش خوردن[7] دو سلول با هم اتفاق می‌افتد که در صورت انتقال به محیط کشت می‌تواند مراحل تسهیم و تا حدی تکوین را نیز طی نماید(۶). لازم به ذکر است که در هیچ یک از مطالعات انجام گرفته تاثیرمتغیرهای مختلف نظیر ولتاژ و دیوریشن، به طور دقیق مورد مطالعه قرار نگرفته، جز یک مطالعه که به وسیله خود محقق صورت گرفته و این مطالعه نیز بخشی از آن به شمار می‌آید(۷). لذا هدف این مطالعه ارزیابی اثر سرعت فیوژن بر روی میزان تسهیم و تکوین جنین‌های دو سلولی الکتروفیوز شده گاو می‌باشد، تا با انتخاب بهترین پارامترها بتوان به نتایج مطلوب جهت ایجاد بستری برای شبیه سازی و رشد و تکوین سلول‌های ترانس ژن شده دست یافت.

روش کار

این مطالعه از نوع تجربی می‌باشد. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت سیگما خریداری و در

1 - Nuchlear transfer.
2 - Embryonic stem-like cell.
3 - Inner cell mass.

4- Electroporation.
5 - Electrochemotherapy.
6 - Spectrin.
7 - Fusion.

غیر این صورت نام شرکت مربوطه و شماره کاتالوگ آن ذکر شده است.

به منظور بلوغ آزمایشگاهی توده‌های تخمک کومولوس، با مراجعه به کشتارگاه صنعتی اصفهان ۳۰- ۱۰ دقیقه بعد از ذبح، ۱۳۵۰ عدد تخمدان گاو از رحم جدا و پس از شستشوی مقدماتی در آب معمولی (دمای ۳۵- ۳۰ درجه سانتی‌گراد)، به سالین ۰/۹ درصد در همان دما منتقل و در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس با استفاده از سرنگ‌های ۱۰ میلی‌لیتری و سرسرنگ نمره ۱۸ مایع فولیکولی فولیکول‌های ۶- ۲ میلی‌متری آسپیره و در لوله‌های ته تیز ریخته شد و به منظور تشکیل رسوب، مدت ۱۵- ۱۰ دقیقه در انکوباتور نگهداری شد.

به منظور بلوغ آزمایشگاهی، تعداد ۱۳۵۳۰ توده تخمک کومولوس (COC[1]) با کیفیت، که دارای سیتوپلاسم هموژن و گرانوله بوده و با بیش از سه لایه سلول‌های گرانولوزا احاطه شده‌اند، در زیر استریومیکروسکوپ انتخاب و پس از سه بار شستشو در محیط شستشو (WM[2]: از Earle`s based TCM-199/ M-2520 حاوی افزودنی‌های ۰/۵ میلی‌گرم در میلی لیترپنی سیلین، ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین، و ۲۲ میکروگرم در میلی‌لیترسدیم پیروات، ۲۵ میلی مولارسدیم بیکربنات با pH ۷/۳-۷/۴ که از ۲۴ ساعت قبل از استفاده در انکوباتور دارای $5Co_2$ درصد و ماکزیمم رطوبت در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده بود)، دو بار نیز در محیط بلوغ(MM[3] : شامل محیط شستشو به همراه افزودنی‌های یک میکروگرم در میلی لیتر ۱۷- بتا استرادیول، ۰/۱ واحد بین المللی در میلی لیتر hMG[4]، ۱۰ درصد FCS[5] و ۱/۳ میلی مولار ال- گلوتامین) شستشو داده شد. سپس COCها در گروه‌های ۵ تایی به قطرات ۵۰ میکرولیتری از MM در زیر روغن منتقل شد و به مدت ۲۴-۲۲ ساعت در همان شرایط انکوبه شد (۱۰-۸). به منظور لقاح آزمایشگاهی پس از بالغ شدن COCها، که به واسطه متسع شدن سلول‌های کومولوس[6] اطراف تخمک و رها شدن اولین جسم قطبی[7] مشخص می‌شود و ۲۰- ۱۰ دقیقه قبل از تلقیح، COCها دو بار در محیط WM و سپس دو بار در محیط لقاح[8] شسته شدند و در گروه‌های ده تایی به قطرات ۵۰ میکرولیتری ازمحیط لقاح در زیر روغن منتقل و به مدت ۲۲- ۱۸ ساعت انکوبه شدند(۱۱).

سپس مایع منی تازه گاو با قدرت باروری اثبات شده از مرکز اصلاح نژاد دام اصفهان گرفته شد و در پرکول با گرادیان ۴۵ درصد و ۹۰ درصد و دور ۱۸۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ شد. متعاقباً ته نشین حاصل دو بار با محیط لقاحی که فاقد هپارین، پنیسیلامین، هیپوتورین و اپی‌نفرین بود با همان دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و ته نشین نهایی توسط محیط لقاح به نحوی تعیین غلظت شد که غلظت نهایی آن بعد از تلقیح COC ها در قطرات محیط لقاح به ۲- ۱ میلیون در میلی‌لیتر برسد. لازم به ذکر است که تواناسازی[9] و افزایش تحرک اسپرم‌ها در همین محیط انجام شد(۸، ۹).

به منظور کشت آزمایشگاهی و حذف سلول‌های گرانولوزا و اسپرم‌های مرده از اطراف

1 - Cumulus oocyte complex.
2 - Washing medium.
3 - Maturation medium.

4 - Human monoposal gonadotropin.
5 - Fetal calf serum.
6- Cumulus expansion.
7 - Polar body.
8 - Fertilization medium.
9 - Capacitation.

تخمک‌های تلقیح شده، مدت ۲۲- ۱۸ ساعت بعد از تلقیح، COCها به مدت ۲ دقیقه در WM لرزانده[1] شدند. سپس تخمک‌های تلقیح شده پس از دو بار شستشو به محیط کشت SOF_1[2] منتقل شدند(۱۲).

تعداد ۳۵٤۰ عدد جنین دو سلولی حاصل از بلوغ و لقاح آزمایشگاهی بعد از حذف جنین‌هایی با سلول‌های فراگمنته شده و اندازه نابرابر، ۳۵-۳۳ ساعت بعد از تلقیح (که اکثر جنین‌ها در اواسط مرحله دو سلولی هستند) به سه گروه تقسیم گردیدند: ۱- گروه شاهد که تحت تاثیر جریان الکتریکی قرار نگرفتند (UCG^3) ۲- گروه فیوز شده که تحت تاثیر جریان الکتریکی با ولتاژ ۰/۷۵ کیلو ولت بر سانتی‌متر و زمان ۸۰ میلیونیم ثانیه قرار گرفته (۷) و طی مدت ۳۰ و ٦۰ دقیقه پس از تحریک الکتریکی در دو گروه فیوز شدند FG_{30}[4] و FG_{60} ۳- گروه فیوز نشده (ECG^5) که تحت تاثیر جریان الکتریکی مذکور قرار گرفته ولی فیوز نشدند. سرانجام تمامی جنین‌ها برای مدت ۳۹- ۳۷ ساعت دیگر به محیط SOF_1 منتقل شدند (۱۳).

۷۲ ساعت پس از لقاح جنین‌های هر چهار گروه FG_{30} ، FG_{60} ، ECG ، UCG برای مدت ۱۶۸ ساعت دیگر یعنی تا پایان روز دهم پس از لقاح به محیط SOF_2 منتقل شدند. محیط SOF_2 شبیه SOF_1 بود با این تفاوت که فاقد پیروات سدیم و دارای ۲ میلی‌مولار گلوکز و ۱۰ درصد FCS و ۱ درصد اسیدهای آمینه ضروری بود(۱۴، ۱۵). لازم به ذکر است که هر گروه بین۳ تا ۵ مرتبه تکرار شد.

به منظورالکتروفیوژن، گروه‌های ۱۰- ۵ عددی از جنین‌های دو سلولی به مدت ۱۰- ۵ ثانیه در بافر فیوژن (۰/۳ مولارمانیتول، ۰/۱ میلی‌مولارسولفات منیزیم، ۰/۰۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم و ۰/۰۵درصد BSA[6]، pH= ۷/۲-۷/۴) متعادل شده و سپس به قطره ای از همین بافر که در محفظه الکتروفیوژن (بین دو الکترود) قرار داشت منتقل شدند، به طوری که سطح بین دو بلاستومر به موازات الکترودها قرار گرفت تا پس از تحریک الکتریکی با جریان مستقیم، ماکزیمم جریان الکتریکی از آن عبور نماید و متعاقباً پس از دو بار شستشو در محیط SOF ، بلافاصله به این محیط برگردانده شدند(۱۳).

محفظه الکتروفیوژن از دو الکترود ورقه‌ای شکل باریک و دراز فلزی (فولاد ضد زنگ) که به فاصله ۱ میلی متر از هم بر روی اسلاید چسبیده، تشکیل می‌شود. هر یک از الکترودها به وسیله سیمی به دستگاه الکتروفیوژن CF-150B Biological Laboratory (Service، H-1165)، (.Zselyi A.U.31 بودا پست، مجارستان)متصل است.

به منظور ارزیابی و مقایسه میزان تسهیم، ۷۲ ساعت بعد از لقاح، جنین‌های تسهیم شده در زیر میکروسکوپ شمارش شد و میزان تکوین نیز با شمارش تعداد بلاستوسیست‌ها در روز ۱۰- ۷ تعیین شد(۱۳).

به منظور شمارش کروموزوم‌ها و اثبات تتراپلوئیدی، جنین‌های ۸-۲ سلولی از گروه FG با کمی تغییر در روش تارکوفسکی(۱۶، ۱۷) رنگ آمیزی و کروموزوم‌ها مورد شمارش قرار گرفت. در این روش جنین‌ها به مدت ۵۰ — ۴۰ ثانیه در پروناز ۰/۵درصد قرار گرفتند تا دیواره شفاف نرم شد و سپس به منظور توقف کروموزوم‌ها در متافاز، جنین‌ها به مدت ۱۲- ۱۰ ساعت در محیط Ham`S F10 حاوی ۰/۱ میکرو گرم در

1 - Vortex.
2 - Synthetic oviductal fluid.
3 - Unexposed control group.
4 - Fused group.
5 - Exposed control group.
6 - Bovine serum albumin.

میلی‌لیتر کالسمید (Gibco Cat. No. 15212-012 آکلند، بریتانیا) کشت شدند. متعاقباً جنین‌ها در قطره‌ای از محلول هیپوتونیک (کلریدپتاسیم ۰/۰۷۵ مولار) به حجم ۰/٤ میلی‌لیتر قرار داده 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 از متانول و اسید استیک) بر روی آنها فیکس شدند. کیفیت گسترش کروموزوم‌ها در زیر میکروسکوپ فوراً بررسی شد و در صورت باقی بودن سیتوپلاسم، با انداختن یک قطره دیگر از فیکساتیو (نسبت سه به یک از متانول و اسید استیک) سیتوپلاسم اضافی برداشته شد. سپس گسترش کروموزومی به مدت ۱۰ دقیقه توسط محلول گیمسای ۲ درصد رنگ آمیزی و بعد از شستشو و خشک شدن اسلاید و چسباندن لامل اقدام به شمارش کروموزوم‌ها شد.

با توجه به این که FG_{30} و FG_{60} به عنوان متغیرهای مستقل و میانگین درصد تسهیم و مورولا و بلاستوسیست به عنوان متغیرهای وابسته در نظر گرفته شدند، به منظور تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه میانگین درصدهای آنها از آزمون کای دو وضریب همبستگی پیرسون استفاده و p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی شد. محققین در تمام طول پژوهش متعهد به رعایت بیانیه اخلاق پزشکی هلسینکی بودند.

نتایج

مقایسه میزان تسهیم بین گروه‌های FG_{30} ، FG_{60} ، ECG ، UCG نشان دهنده آن بود که میانگین میزان تسهیم در گروه UCG به طور معنی داری($p<۰/۰۵$) بیش از گروه‌های دیگر می‌باشد(جدول ۱). در گروه ECG نیز این میزان از دو گروه FG_{30} و FG_{60} بیشتر بود ولی به لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

بررسی میزان تسهیم تا مرحله ۸ سلولی در گروه جنین‌های FG_{60} نشان دهنده آن بود که میزان تسهیم در این گروه به طور معنی‌داری نسبت به گروه FG_{30} بیشتر است($p<۰/۰۵$)، ولی در مرحله بیش از ۸ سلولی میزان تسهیم در جنین‌های این دو گروه و همچنین میزان پلاستوسیست ها نیز تفاوت معنی‌داری با هم نداشت. لازم به ذکر است که چون نتایج حاصل از میزان مورولا نیز از میزان بلاستوسیست تولید شده تبعیت می‌نمود اطلاعات مربوطه فقط در جدول ۱ آورده شد.

همبستگی پیرسون بین سرعت فیوژن در دو گروه FG_{30} و FG_{60} و میزان تسهیم تا مرحله ۸ سلولی نشان دهنده یک ارتباط معنی دار و مثبت($r = ۰/۷۶۱$)($p<۰/۰۵$)، بین آنها بود، به طوری که هرچه زمان فیوژن طولانی تر شود میزان تسهیم تا مرحله ۸ سلولی نیز بیشتر می‌شد. این در حالی است که بین افزایش زمان فیوژن و میزان تکوین از مرحله بیشتر از ۸ سلولی تا مرحله بلاستوسیست ارتباط معنی داری وجود نداشت (جدول۱).

از تعداد ٥٦ 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 (۸ درصد) هاپلوئید (۳۰ کروموزومی) و ٦ عدد (١٦ درصد) دیپلوئید (٦٠ کروموزومی) و ۲۸ عدد (٧٦ درصد) تتراپلوئید (۱۲۰ کروموزومی) بودند.

جدول ۱. میانگین درصد تسهیم تا مرحله ۸ سلولی و بیشتر از ۸ سلولی و درصد تکوین تا مرحله مورولا و بلاستوسیست در گروه های شاهد و مورد

گروه مورد مطالعه	UCG	ECG	FG_{30}	FG_{60}	p-value
وضعیت تکوین					
۸سلولی و کمتر	٪۸۱	٪۷۶	٪۶۳	٪۷۱	۰/۰۲۲×
بیشتر از ۸ سلولی	٪۷۹	٪۷۰	٪۶۶	٪۷۰	۰/۰۹۸
مورولا	٪۴۵	٪۴۰	٪۴۳	٪۴۹	۰/۱۹۱
بلاستوسیست	٪۳۸	٪۳۵	٪۳۱	٪۳۴	۰/۱۸۴

× همبستگی پیرسون بین زمان فیوژن و میزان تسهیم تا مرحله ۸سلولی(r=۰/۷۶۱)

بحث

مطالعات قبلی نشان داده است که با قرار گرفتن سلول‌ها در معرض پالس‌های الکتریکی کوتاه مدت نفوذپذیری غشای آنها به طور برگشت پذیری افزایش می‌یابد(۵). دراین تکنیک براثر میدان الکتریکی حاصل ازجریان مستقیم ، غشاها پلاریزه و ناپایدار شده و جذب غشای مقابل بر اثر فیوژن نقطه به نقطه غشا توسط اتصالات محکم، انجام می‌گیرد. در این مرحله به واسطه تشکیل سوراخ‌هایی که برگشت پذیر هستند غشای دیافراگمی شکل یکنواختی تشکیل می‌شود. دیافراگم مذکور درصورت بهینه بودن شرایط از بین رفته و جوش خوردن دو سلول به هم اتفاق می‌افتد(۶). به این ترتیب پالس‌های الکتریکی می‌توانند فرآیند فیوژن را شروع و کامل نمایند. از طرفی با تاثیر پالس‌های الکتریکی بر ریز ساختمان‌های درون سلول از یک سو و احتمالاً جوش خوردن آنها و نیز تاثیر آن بر سیتواسکلت سلولی(۲) از سوی دیگر، می‌توان آستانه‌ای از شدت جریان الکتریکی را پیدا نمود که فراتر از آن می‌تواند نقص در عملکرد سلول و احتمالاً کندی روند تسهیم و تکوین را به دنبال داشته باشد. از سوی دیگر در صورتی که شدت پالس الکتریکی به درستی تنظیم شود، می‌توان بهبود میزان تسهیم و تکوین جنین را بر اثر فعال سازی[1] آن انتظار داشت، به طوری که بعضی مطالعات انجام شده نیز چنین مطلبی را تایید می‌کنند(۳، ۲۰-۱۸). از این نتایج می‌توان دریافت که میزان فعال سازی سیتوپلاسم در طی لقاح و بعد از آن، احتمالاً روند تکامل اولیه جنینی را بهبود می‌بخشد، در حالی که مطالعه ژانگ وهمکاران نشان داد که تحریک الکتریکی سلول تاثیری بر ساختار کروموزومی جنین‌ها ندارد(۲۰).

در این مطالعه با استفاده از متغیرهای شدت میدان ۰/۷۵ کیلوولت بر سانتی‌متر و زمان ۸۰ میلیونیوم ثانیه میزان تسهیم جنین‌های تتراپلوئید در گروه FG_{60} تا ۷۱ درصد به دست آمد، که نسبت به گروه FG_{30} به میزان تسهیم جنین‌های دیپلوئید درگروه UCG نزدیک‌تر (۸۱ درصد) است. لذا به نظر می‌رسد استفاده از جنین‌های الکتروفیوز شده گروهFG_{60} در مطالعاتی که نیاز به تعداد بیشتری جنین ۸ سلولی و کمتر می‌باشد، مفیدتر خواهد بود. ولی در صورتی که هدف مطالعه بر میزان تکوین نهایی جنین‌ها استوار باشد تفاوت معنی‌داری بین جنین‌های دو گروه FG_{60}و FG_{30} وجود ندارد. با توجه به اینکه متغیرهای مورد مطالعه، سرعت فیوژن، تسهیم و تکوین بودند در مطالعات قبلی انجام

1 - Activation.

گرفته، آماری از تاثیر سرعت فیوژن بر روی تسهیم و تکوین یافت نشد تا مقایسه‌ای در این خصوص انجام شود.

نتایج حاصل از آنالیز کروموزومی نشان داد که میزان تتراپلوئیدی واقعی (۱۲۰ کروموزوم) حاصل از این مطالعه با میزان گزارش شده در مطالعه ایواساکا که به میزان ۷۹ درصد بود، تفاوت چندانی نداشت(۲۱).

نتیجه گیری

با توجه به آنکه یکی از آثار ایجاد شده در سلول‌ها بعد از الکتروفیوژن، ایجاد نفوذپذیری[1] می‌باشد، احتمالاً می‌توان با انجام مطالعات پایه در کشور، از این تکنیک برای اهداف درمانی (الکتروکموتراپی) استفاده نمود. همچنین پیشنهاد می‌شود مطالعاتی برروی کیفیت جنین های تولید شده در این مطالعه، انجام روش‌های ادغام[2] و تزریق سلول‌های پایه به جنین‌های تتراپلوئید و تولید کایمرا انجام گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از طرح «کلونینگ گاو» مصوب شورای علمی پژوهشکده رویان و دفتر مرکزی جهاد دانشگاهی (کدطرح۲۱ - ۵۹٤) (شماره طرح ۸۱۱۳۹) است. بدین وسیله نویسندگان بر خود واجب می‌دانند که از همکاری بی‌دریغ آقای دکتر سعید کاظمی 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 دکترشرکت) و مسؤل محترم اصلاح نژاد دام اداره جهاد کشاورزی اصفهان (آقای مهندس دهقان) تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. Zimmerman U, Vienken J. Electric field-induced cell-to-cell fusion. J Membr Biol 1982; 67: 165-182.

2. Suzuki H, Ogasavara I, Takahashi H, Imada Y, Toyokava K. Electrofusion of blastomeres of hamster 2-cell embryos and dynamic changes of the cytoskeletal distribution. J of Rep and Dev 2001; 47: 227-35.

3. Kuang-Wook P, Liangxue L, Hee-Tae C, Gi-Sun I, Qing-Yuan S. Developmental potential of porcine nuchlear transfer embryos derived from transgenic fetal fibroblasts infected with the gene for the green fluorescent protein: Comparison of different fusion/activation conditions. Biol of Rep 2001; 65: 1681-1685.

4. Yugi G, Junko M, Nobuo T. Developmental potential of mouse tetraploid cells in diploid tetraploid chimeric embryos. Int J Dev Biol 2002; 46: 741-745.

5. Neumann E, Rosenheck B. Permeability induced by electric impulsions in vesicular membranes. J Membr Biol 1972; 10: 279-290.

6. 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. Biophys J 1991; 60: 1026-37.

۷. دارابی م ر، نصر اصفهانی م ح، بهاروند ح، ایمانی ح، مردانی م. تاثیر ولتاژها و زمان‌های مختلف بر میزان تکوین جنین‌های تتراپلوئید حاصل از الکتروفیوژن جنین‌های دو سلولی گاو .مجله علوم تشریحی ایران، تابستان ۱۳۸۳، سال دوم، شماره ۲، ص ۶۵ – ۵۷.

8.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.

1 - Electropermeabilization.
2 - Aggregation.

9. 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: 741-756.
10. Tanghe S, Soom AV, Mehrzad J, Maes D, Duchateau L, Kruif A. Cumulus contributions during bovine fertilization *in vitro*. Theriogenology 2003; 60: 135-149.
11. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin.Biol Reprod 1988; 38: 1171-1180.
12. Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. Bovine embryo technologies. Theriogenology 2003; 59: 599-616.
13. 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.
14. Steeves TE, Gardner DK. Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. Biol of Reprod 1999; 61:731-740.
15. 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; 43:1115-1128.
16. 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.
17. Tarkowski AK. An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs.Cytogenet 1966; 5: 394-400.
18. Ozil JP, Huneau D. Activation of rabbit oocytes: The impact of the ca $^{2+}$ signal regime on development. Development 2001; 128: 917-928.
19. Hwang S, Lee E, Yoon J, Yoon B, Lee J, Choi D. Effects of electric stimulation on bovine oocyte activation and embryo development in intracytoplasmic sperm injection procedure. J Asist Reprod Genet 2000; 17: 310-314.
20. Zhang J, Wang CW, Blaszcyzk A, James A. Electrical activation and in vitro development of human oocytes that fail to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. Fertil and Steril 1999; 72 (3) : 509-12.
21. Iwasaki S, Kono T, Fukatsu H, Nakahara T. Production of bovine tetraploid embryos by electrofusion and their developmental capability in vitro**.** Gamete Res 1989; 24: 261-267.

Effect of fusion duration on cleavage and developmental rate of electrofused tetraploid 2-cell bovine embryo

Darabi MR [1], Nasr Isfahani MH[2]

Abstract

Introduction: Because tetraploid embryo is used as a base for growth and development of transgenic cells, one of the most important stages in animal biotechnology is to produce tetraploidy by electrofused 2-cell embryo. The aim of this study was to determine the effect of fusion duration on developmental rate of tetraploid embryos.

Materials and Methods*:* In this experimental study some of the bovine 2-cell embryos were obtained from in vitro matured and fertilized cumulus oocyte complexes 33-35 hr post fertilization as an unexposed control group (UCG). The remaining 2-cell embryos were exposed to 0.75 kilovolt per centimeter for 80 microsecond, and were transferred to SOF1 medium. Subsequently those embryos fused at 30 and 60 minute post electrofusion were categorized as fused groups (FG_{30} and FG_{60}) and separated from unfused embryos as exposed control group (ECG). The developmental rate was compared between UCG, ECG, FG_{30}, and FG_{60} groups and the relation between fusion duration and cleavage and developmental rate was surveyed.

Results: The cleavage rate up to 8-cell stage in FG_{60} was increased significantly compared to FG_{30} ($p<0.05$) while the blastocyst rate has no significant difference between the two groups. The cleavage and developmental rate in UCG was significantly higher than ECG, FG_{60} and FG_{30}. Chromosomal analysis showed that 76% of embryos were true tetraploid.

Conclusion: The fused embryos in FG_{60} had more ability to produce embryos up to 8-cell stage than FG_{30}. The electrical pulse can decrease the cleavage and developmental ability of embryo.

Key word*:* Fusion time, Blastocyst, tetraploid, bovine

1 - Assistant professor, Department of anatomy, Arak university of medical sciences.
2 - Assistant professor, Department of embryology, Royan institute, Tehran.