تاثیر پالس‌های مستقیم الکتریکی بر بلوغ تخمک‌های نارس موش و تکوین جنین‌های حاصله

حسین ایمانی Ph.D.[☆ ☆ ♦]، مجتبی رضازاده Ph.D.[☆ ☆]، محمدحسین نصراصفهانی Ph.D.[☆]
محمدحسین بهاروند M.Sc.[☆]، سعید کاظمی Ph.D.[☆]، عبدالحسین شاهوردی M.Sc.[☆]

☆ پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

☆ دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

چکیده

دریافت مقاله: ۸۲/۳/۴، پذیرش مقاله: ۸۲/۷/۲۴

* **هدف:** مطالعه تاثیر پالس‌های مستقیم الکتریکی (Direct Electric DC) بر از سرگیری میوز و بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نارس موش و تکوین جنین‌های حاصل از آن.

* **مواد و روشها:** تخمک‌های نارس در نوبتهای مختلف از تخمدان موشهای بالغ (۶-۴) هفته نژاد NMRI در شرایط استریل جدا شد. تخمک‌های حاصل در پنج گروه دسته بندی شدند. تخمک‌های گروه یک تا چهار در محیط M2 به ترتیب در معرض ۱، ۲، ۳ و ۴ تحریک تخمک الکتریکی DC (۵۰V، ۳۰μs) با فاصله نیم ساعت قرار داده شدند. تخمک‌ها پس از شستشو در محیط T6 جهت بلوغ در محیط MEM-α بمدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۷° با Co_2 پنج‌درصد قرار گرفتند. تخمک‌های بالغ شده (Metaphas II) درکنار اسپرم موشهای نر همان نژاد قرار گرفتند.

* **یافته‌ها:** علی رغم معنی‌داری نتایج فعال‌کردن تخمک‌ها و از سرگیری میوز در تمام گروهها، تحریک الکتریکی DC (۵۰V، ۳۰μs) اکثر تخمک‌های نارس را فعال کرده (۸۹-۷۷درصد) و ۶۸ تا ۷۷درصد آنها بالغ شده و ۸۲-۴۲درصد تخمک‌های بالغ شده نیز بارور شدند. شکل‌گیری جنین‌ها در گروه سوم (۳ بار تحریک) نسبت به دیگر گروهها بطور معنی‌دار نسبت به بقیه گروهها بالاتر بود.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد: جریان الکتریکی‌مستقیم در بازسرگیری میوز، شکسته شدن هسته و آزاد شدن اولین جسمک قطبی، بلوغ آزمایشگاهی، لقاح، شکل‌گیری و تکوین جنین‌ها تاثیر دارد و احتمالاً با تعمیم این روش بلوغ تخمک‌های نارس خانمهای نابارور با ترشح نامنظم و ناقص FSH و LH امکان پذیر خواهد بود.

کل واژگان: بلوغ آزمایشگاهی، فعال کردن الکتریکی، تخمک نارس، موش

مقدمه

فعال کردن مصنوعی تخمک پستانداران به منظور ایجاد سیتوپلاسم مناسب میزبان برای همانندسازی جنین، بررسی تاثیرات پلوئیدی و بیان صفات والدین در تکوین جنین‌ها استفاده می‌شود؛ علاوه بر فعال‌کردن تخمک‌ها راه مناسبی برای بهبود کیفیت بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌هاست، چراکه در لقاح آزمایشگاهی ارزیابی بلوغ سیتوپلاسم و بکارگیری تخمک مناسب، عامل مؤثری در بهبود لقاح و تکوین جنین‌هاست (۱).

اگر چه القاء فعالیت مصنوعی تخمک در گونه‌های مختلف با استفاده از مواد شیمیایی (۲) از قبیل کلسیم یونوفوز (۳)، استرونسیم sr^{+2} (۴) اتانول (۵) و سیکلوهگزآمید (۶) گزارش شده است، اما مواد شیمیایی در فعال ساختن تخمک بعضی از حیوانات از جمله تخمک Procine مؤثر نیست (۷، ۸). فعال کردن پارتنوژنیک تخمک بوسیله تحریکات الکتریکی در انتقال هسته بطور گسترده‌ای مورد استفاده دارد و لازمه شروع تکوین جنین‌های حاصل از انتقال هسته با فعال کردن تخمک است، که عموماً بوسیله تحریک الکتریکی صورت می‌گیرد، لیکن علیرغم گزارشات متعدد مبنی بر سودمندی این روش، هنوز مطلوب نیست و حداقل اثر بخشی را دارد.

تاکنون تاثیر سیگنال مستقیم الکتریکی با دوره زمانی بر شکل‌گیری پیش هسته تخمک خوکچه (۹، ۱۰، ۱۱) و همچنین تغییرات پارتنوژنیک حاصل از پالس‌های مشخص در تکوین جنین‌های خرگوش مورد بررسی قرار گرفته است (۱۲، ۱۳، ۱۴).

در شرایط طبیعی فعال کردن الکتریکی تخمک‌ها در حالت اتصال اسپرم به تخمک، حدود ۹۰ دقیقه طول می‌کشد و نتیجهٔ آن آزادسازی جسمک قطبی است. اگر در این دوره زمانی چندین پالس الکتریکی بر تخمک‌ها اعمال گردد، خصوصیات یک تخمک فعال را نشان می‌دهد (۱۵، ۱۶، ۱۷) و آزاد سازی دومین جسمک قطبی دیپلوئیدی را در آنها مشهود می‌گردد (۱۸). باکاهش تعداد و شدت پالس‌های الکتریکی و جلوگیری از تحریکات بیش از حد، تخمک‌ها بطور طبیعی فعال شده و ساختار هاپلوئیدی پیدا خواهند کرد (۱۸). از این رو بعضی محققین معتقدند: کاهش نسبت تعداد پالس‌ها به تناوب زمانی راه حل مناسبی است و این اثر بخشی با افزایش فواصل بین اعمال پالس‌ها بیشتر می‌شود. تعیین تعداد تحریکات پالس‌های الکتریکی قبل از اعمال آن از اصول ضروری فعال سازی الکتریکی تخمک‌هاست (۱۵، ۱۸، ۱۹). علاوه بر این فاکتورهای کیفی تخمک، نژاد حیوان، مرحله تکوینی تخمک در زمان فعال شدن نقش مهمی در میزان موفقیت این پدیده دارد (۱۶، ۲۰، ۲۱). تاثیر میزان پالس‌های الکتریکی در بلوغ تخمک پس از اوولاسیون در زمانهای مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است، و باروری ۷۷درصد تخمک‌های فعال شده گزارش شده است (۲۲). در این تحقیق تاثیر پالس‌های الکتریکی مستقیم ۷۰ ولتی در تناوب ۳۰ میکرو ثانیه‌ای در دفعات مختلف بدون القا اوولاسیون و بدون دریافت هورمونهای گنادوتروپینی خارجی در تخمک‌های نارس موش، میزان فعال شدن تخمک‌های نارس، بلوغ، لقاح و تکوین جنین‌های حاصل از تخمک‌های بالغ شده مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روشها

* تهیه تخمک‌های نارس

در این تحقیق از موشهای سوری نژاد NMRI ۶-۴ هفته‌ای تهیه شده از انیستیتو رازی کرج (ایران) استفاده شد. موشهای ماده با قطع نخاع کشته شده و تخمدان آنها در شرایط استریل خارج و پس از انتقال درون قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت MEM-α حاوی FCS ۵درصد، چربیهای اضافی اطراف تخمدان حذف و با استفاده از سرنگ‌های انسولین Dissect شده و تخمک‌های نارس و حاوی ژرمینال وزیکل همراه با سلولهای گرانولوزا جدا شد. سپس با روش پیپت کردن سلولهای گرانولوزای اطراف آن برداشته شد. تخمک‌های نارس هسته دار (Germinal) با سیتوپلاسم روشن، ZP (Zona Pellucida) یکنواخت با فضای Prevettline مناسب یکسان برای پنج گروه انتخاب شدند.

* فعال کردن تخمک‌ها

تخمک‌های عاری از سلولهای گرانولوزا بین دو ورقه استیل الکترودی دستگاه الکتروفیوژن روی لام مخصوص در داخل محیط کشت M_2 حاوی ۰/۱۸M مانیتول، ۱۰۰μM کلرید کلسیم و ۱۰۰μM کلرید منیزیم قرار داده شد. پالس الکتریکی مستقیم (30μs, 50v; DC) در چهار گروه آزمایش اعمال و با گروه کنترل (پنجم) مقایسه شد.

گروه اول (GI)، ۱۵۸ تخمک نارس با یک پالس الکتریکی (DC)، گروه دوم (GII) تعداد ۱۵۱ عدد تخمک نارس با دو پالس الکتریکی (DC) به فاصله نیم ساعت، گروه سوم (GIII) ۱۰۵ عدد تخمک نارس با سه پالس الکتریکی (DC) به تناوب با فاصله زمانی نیم ساعت، گروه چهارم ۱۰۵ تخمک نارس با چهار پالس الکتریکی به تناوب و با فاصله زمانی نیم ساعت تحریک شدند و در گروه پنجم (GN) تعداد ۱۹۴ تخمک نارس بدون تحریک الکتریکی بعنوان گروه کنترل انتخاب شد.

تخمک‌های نارس فعال شده با DC و تخمک‌های گروه کنترل بمدت ۲۴ ساعت در محیط کشت MEM-α حاوی FCS ۵درصد در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با Co_2 ۵درصد قرار داده شد و سپس با میکروسکوپ معکوس، مراحل بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز در تمام گروهها بررسی شد. تخمک‌های بدون تغییر در هسته را با عنوان تخمک‌های GV با نارس (Germinal Vesicle)، تخمک‌های با هسته شکسته شده بعنوان GVB (Germinal Vesicle Breakdown) با نشانهٔ شروع تقسیم میوز و تخمک‌های دارای جسمک قطبی بعنوان تخمک‌های بالغ یا MII (Metaphase II) شناسایی گردید.

* لقاح و تکوین تخمک‌های بالغ شده

ابتدا موشهای سوری نژاد NMRI به روش قطع نخاعی کشته، دم اپیدیدیم آنها جدا و قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت T6 حاوی ۵ میکروگرم BSA (Bovin Serum Albumin) در هر میلی‌لیتر منتقل شده، سپس نمونه‌ها بمدت ۱/۵ ساعت در داخل انکوباتور

۳۷درجه سانتی‌گراد حاوی Co_2 ۵درصد انکوبه شد. با انتقال اسپرمهای فعال، سالم از کناره قطره (در هر میلی‌لیتر ۱×۱۰۵ عدد اسپرم) به داخل قطرات محیط T6 حاوی ۱۶ میلی‌گرم BSA بر میلی‌لیتری، تخمک‌های بالغ شده نیز به آنها منتقل شد. تخمک‌ها پس از ۶-۴ ساعت از محیط فعلی به قطره‌های محیط T6 حاوی ۵میلی‌گرم BSA بر میلی‌لیتری منتقل شدند. وضعیت تخمک‌ها پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت بوسیله میکروسکوپ معکوس برای ثبت مراحل تکوین جنینی بررسی شد و نتایج حاصل با آزمون آماری Chi-Square بررسی شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۷۱۳ تخمک نارس و سالم در نوبتهای مختلف از تخمدان مرشهای سوری جدا شد و بطور تصادفی در چهار گروه آزمایشی و یک گروه کنترل تقسیم بندی شد. همانطور که در جدول شماره یک آمده است، در گروه آزمایشی اول (GI) از ۱۵۸ تخمک نارس که در معرض یک پالس الکتریکی DC قرار گرفت، پس از ۲۴ ساعت در ۱۱/۴درصد آنها نشانی از علایم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۸۸/۶درصد تخمک‌های نارش مشاهده شد، که از این میزان ۱۱/۴درصد هسته آنها شکسته شد. ۷۷/۲درصد آنها تا مرحله MII پیش رفته و بالغ شدند. میزان بلوغ این گروه با دیگر گروههای آزمایشی و گروه کنترل اختلاف داشت که از نظر آماری معنی دار بود. ۹۲ عدد تخمک بالغ شده آزمایشگاهی با اسپرم‌های موش نر مجاور (Inseminate) گردید. جدول نشانگر میزان لقاح و وضعیت تکامل تخمک‌های بارور شده است (جدول ۱).

در گروه دوم آزمایشی (GII) از ۱۵۱ تخمک نارس سالم که در معرض دو پالس الکتریکی DC قرار گرفته، پس از ۲۴ ساعت در ۲۲/۵۱درصد آنها هیچ تغییری مشاهده نشد. از سرگیری میوز در ۸۰/۱۲درصد تخمک‌ها شروع شد که از این میزان در ۱۱/۲۵درصد هسته شکسته و ۶۸/۷۸درصد آنها بالغ و تا مرحله MII پیش رفتند، که از نظر آماری با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت. ۸۴ تخمک بالغ شده با اسپرم‌های موش نر مجاور (Inseminate) شد، جدول ۱ نشانگر میزان لقاح و وضعیت تکوین تخمک‌های بارور شده است (جدول ۱).

در گروه سوم آزمایشی (GIII) از ۱۰۵ تخمک نارس سالم که در معرض سه پالس الکتریکی DC قرار گرفتند پس از ۲۴ ساعت در ۱۶/۱۹درصد آنها تغییری مشاهده نگردید. از سرگیری میوز در ۸۳/۸درصد تخمک‌ها شروع شد که از این میزان در ۱۲/۲۵ درصد هسته‌ها شکسته شد و ۷۱/۴۲درصد تخمک‌ها بالغ شدند و به مرحله MII رسیدند، که با گروه کنترل و سه گروه آزمایشی دیگر اختلاف معنی‌داری داشتند. ۳۹ عدد تخمک بالغ شده با اسپرم نر مجاور (Inseminate) شد. جدول شماره یک نشانگر میدان لقاح و وضعیت تکوین تخمک‌های بارور شده است (جدول ۱).

در گروه چهارم آزمایشی (GIV) از ۱۰۵ تخمک نارس سالم که در معرض چهار پالس الکتریکی DC قرار گرفتند، پس از ۲۴ساعت در ۱۱/۴۲درصد آنها نشانی از شروع میوز مشاهده نشد. از سرگیری میوز در ۷۹/۹۹درصد مشاهده شد که از این میزان در ۸/۵۷ درصد هسته تخمک‌ها شکسته شد و ۷۱/۴۲درصد این تخمک‌ها روند میوز خوبی طی شد و در محیط آزمایشگاه بالغ گردید. ۵۰ عدد تخمک بالغ شده آزمایشگاهی با اسپرم‌های موش نر مجاور (Inseminate) شدند که پس از ۲۴ ساعت ۲۸درصد تخمک‌ها به جنین‌های دو سلولی تبدیل شدند که نسبت به گروه کنترل و دیگر گروههای آزمایشی اختلاف فاحش معنی‌داری داشت. وضعیت تکوین تخمک‌های بارور شده در روزهای دوم، سوم و چهارم در جدول شماره یک آورده شده است (جدول ۱).

در گروه کنترل (N) ۱۹۴ تخمک نارس سالم در معرض تحریک الکتریکی قرار نگرفتند و مستقیماً وارد محیط کشت شدند. پس از ۲۴ ساعت در ۲۲/۶۸درصد هیچ علامتی از شروع میوز مشاهده نگردید، که نسبت به تمام گروههای آزمایشی اختلاف معنی‌داری داشت. هسته ۹/۲۷درصد هسته تخمک‌های نارس شکسته شد و در ۶۸/۰۴درصد تخمک‌ها روند میوز بخوبی طی شد و در محیط آزمایشگاه بالغ شدند، که بجز با گروه دوم آزمایش با بقیه گروههای آزمایشی اختلاف داشت.

۸۴ تخمک بالغ شده با اسپرم‌های موش نر مجاور (Inseminate) شدند، که پس از ۲۴ ساعت ۹درصد تخمک‌ها به جنین‌های دو سلولی تبدیل شدند و وضعیت تکوین تخمک‌های بارور شده در روزهایا بعد در جدول شماره یک آورده شده است (جدول ۱).

گروههای آزمایشی	تعداد تخمک نارس	تعداد پالس	۲۴ ساعت پس از تحریک الکتریکی GVB	MII	GV	پس از ۲۲ ساعت insemination شده 2-Cell	تعداد تخمک MII	جنین‌ها ۲۸ ساعت پس از insemination 8-Cell	20Cell	4-Cell	جنین‌ها ۷۲ ساعت پس از insemination 8-Cell	4-Cell	2-Cell	جنین‌ها ۹۶ ساعت پس از insemination 8-Cell	2-Cell	4-Cell
			%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
GI	۱۵۸	۱	۱۱۴ ۷۲/۱۲	۱۸ ۱۱/۳۹	۱۸ ۱۱/۳۹	۵ ۵/۴۲	۹۲	۲۰ ۲۱/۷۳	۲۴ ۲۶/۰۸	۳ ۳/۲۶	۱۵ ۱۶/۳	۲۲ ۲۶/۰۸	۳ ۳/۲۶	۹ ۹/۷۸	۱۰ ۱۰/۸۶	۲ ۱۲/۱۷
GII	۱۵۱	۲	۱۰۲ ۶۸/۸۷	۱۷ ۱۱/۲۵	۳۲ ۲۲/۱۵	۳ ۳/۵۷	۸۴	۳۲ ۳۸/۰۹	۱۵ ۱۷/۸۵	۰	۱۳ ۱۵/۴۷	۷ ۲۰/۲۳	۳ ۳/۵۷	۱۰ ۱۲/۰۹	۷ ۲۰/۲۳	۲ ۲/۷۹
GIII	۱۰۵	۳	۷۵ ۷۱/۴۲	۱۳ ۱۲/۳۸	۱۷ ۱۶/۹	۱۰ ۲۵/۶۴	۳۹	۱۵ ۴۳/۶۴	۱۷ ۳۸/۴۶	۰	۱۴ ۳۵/۸۹	۱۵ ۳۸/۴۶	۴ ۱۰/۲۵	۸ ۲۰/۵۱	۲۵ ۵۱/۳۸	۳ ۷/۶
GIV	۱۰۵	۴	۷۵ ۷۱	۹ ۸/۵۷	۱۱ ۱۱/۴۲	۱۲ ۲۸	۵۰	۲۴ ۴۸	۶ ۱۲	۰	۲۲ ۴۴	۶ ۱۲	۰	۱۴ ۲۸	۱۲ ۲۴	۰
N	۱۹۴	۰	۱۲۲ ۶۸/۰۲	۱۸ ۹/۲۷	۴۴ ۲۲/۶۸	۹ ۱۰/۵۸	۸۵	۱۹ ۲۲/۳۵	۱۶ ۱۸/۸۲	۳ ۳/۵	۲۲ ۲۵/۰۸	۱۵ ۱۷/۶۴	۶ ۷/۰۵	۸ ۹/۴۱	۱۱ ۱۲/۹۴	۴ ۴/۶۷

بحث

تخمک‌های بالغ پستانداران در مرحله متافاز II آزاد می‌شوند و تا زمان ورود اسپرم به داخل تخمک‌های بالغ در این مرحله متوقف می‌شوند و به دنبال ورود اسپرم به داخل تخمک تحرکات لازم برای رهایش از این وقف و آزاد سازی جسمک قطبی به نشانه ارائه میوز صورت می‌پذیرد (۲۲).

نتایج این مطالعه نشان داد که اعمال جریان مستقیم الکتریکی در دفعات مختلف و با فواصل زمانی سی دقیقه‌ای بر فعال کردن تخمک‌های نارس موش، بلوغ، لقاح و تسهیم جنین‌های حاصل از این تحرک تاثیر دارد. تعداد پالس‌ها در بلوغ و تسهیم جنین‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد. مطالعات Ozil در سال ۱۹۹۹ نیز مؤید این موضوع است. وی تاثیر پالس الکتریکی را در بهبود تقسیم جنین‌های حاصل از تخمک‌های بالغ خرگوش در آزمایشگاه را گزارش کرد (۱۲).

در این پژوهش بلوغ تخمک‌های نارس بدون استفاده از هورمونهای گنادوتروپینی خارجی، صرفاً با تحریک الکتریکی مستقیم مورد نظر بود. در مطالعات بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نارس بدون سلولهای گرانولوزای موش در حضور استروئید، فاکتور رشد و دیگر ترشحات پاراکرینی به میزان ۵۷درصد گزارش کرده‌اند (۴). در گروه کنترل پژوهش حاضر، بدون افزودن فاکتورهایی مانند استروئیدها، فاکتور رشد، هورمونهای گنادوتروپینی... تخمک‌های نارس در محیط MEM-α میزان ۶۸درصد بالغ گردیدند. احتمالاً این اختلاف بدلیل تفاوت در محیط کشت است. اگر چه با ارائه کافی هورمونهای گنادوتروپینی به محیط کشت بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌ها افزایش چشمگیری پیدا خواهد کرد (۲۳). البته در تخمک بعضی از حیوانات همچون خوکچه، با اعمال تحریکات الکتریکی در ۴۸ ساعت دوم بلوغ آزمایشگاهی بدون حضور هورمونها افزایش معنی‌دار در فعال سازی آنها نسبت به گروه کنترل اتفاق می‌افتد (۲۴).

پالس‌های الکتریکی نفوذپذیری دیواره سلولها را افزایش می‌دهد و حرکت یونها به داخل سلول را القا می‌کند و بدنبال آن جریان ورود کلسیم سیتوپلاسم افزایش پیدا می‌کند (۲۵). با ورود کلسیم به سلول مانند کشیده شدن ماشه تفنگ، باعث پدیده القا کننده افزایش کلسیم به (Calcium Induced Calcium Risel; CICR) داخل سلولی می‌شود و بدنبال این پدیدهٔ القا نوسانات کلسیمی در تخمک مشاهده و میزان کلسیم در سیتوپلاسم زیاد می‌شود (۲۶). بدون توجه به ماهیت محیط‌های کشت الکتروپوریشن، روشن است که تخمک‌های خوکچه با تحریک الکتریکی بدون حضور Ca^{2+}، Mg^{2+} خارج سلولی فعال نمی‌شود (۱۱، ۲۷) در مقابل به تناوب گزارش شده است که تحریک الکتریکی تخمک‌های Porcine به صورت (in-vivo) در محیط آزمایشگاه میزان بالایی از نرخ فعالیت را حین بلوغ، حتی بدون حضور Ca^{2+}، Mg^{2+} در محیط الکتروپوریشن از خود نشان می‌دهد (۲۸، ۲۹)، بر اساس این نتایج مطرح شده است که مکانیزم رهایی کلسیم داخل سلولی در تخمک‌های بالغ شده آزمایشگاهی Porcine در مقایسه با داخل بدن ناکافی یا غیرطبیعی است (۲۷). در هر حال بایستی کلسیم خارج سلولی در تخمک‌های موش و خرگوش بطور دقیق تحت کنترل باشد تا با حالت طبیعی برابری کرده یا حداقل نیازمندیها را برای تخمک برطرف نماید و القا فعال سازی شروع تحریکات کلسیمی لقاح و مراحل بعدی تکوین جنین به خوبی انجام شود (۱۲، ۳۰ تا ۳۴). همچنین با حضور کافی Mg^{2+}، Ca^{2+} در محیط کشت نرخ بالایی از فعال شدن تخمک‌ها گزارش شده است (۳۲، ۳۳ و ۳۵) و در اغلب تخمک‌های فعال شده پس از ۲۴ ساعت اولین تقسیم مشاهده شده است و ثابت شده است که تمام وقایع ورود Mg^{2+}، Ca^{2+} خارج سلولی و آزاد شده Ca^{2+} داخل سلول به دنبال فعال سازی اتفاق می‌افتد (۲۳).

در این پژوهش نیز محیطی سرشار از Mg^{2+}، Ca^{2+} برای فعال سازی تخمک‌های نارس بکار گرفته شد. بنظر می‌رسد که پس از نفوذپذیری غشا تخمک، کلسیم خارج سلولی موجود در محیط کشت وارد سیتوپلاسم تخمک‌های نارس شده و وقایع فعال شدن تخمک‌ها رخ داده و تخمک‌ها فعال می‌شوند. برخی از محققان گزارش نموده‌اند که هر چه تخمک‌ها پیرتر باشند حساسیت بیشتری نسبت به تحریکات الکتریکی دارند (۳، ۳۶). شاید به همین دلیل هر چه تخمک‌ها زمان بیشتری در محیط بماند نسبت به تحریکات الکتریکی حساسیت بیشتری از خود نشان می‌دهد و همانطور که در جدول شماره یک آمده است نرخ بلوغ تخمک‌های نارس در گروه سوم و چهارم آزمایش به دلیل ماندگاری ۲ ساعته در محیط کشت افزایش یافته است.

افزایش تعداد تخمک‌های متافاز II به دنبال ارائه تحریکات الکتریکی درگروههای آزمایشی موید همین مطلب است. به نظر می‌رسد اعمال پالس‌های الکتریکی به تناوب به تخمک‌های نارس موش ورود میزان کافی کلسیم از محیط کشت به داخل تخمک‌ها تسهیل می‌کند و پدیده CICR رخ می‌دهد و با القا افزایش Ca^{2+} در داخل تخمک فعال سازی را القا و تخمک‌های بیشتری در محیط آزمایشگاه بالغ می‌سازد. از طرفی بدلیل تاثیر گذاری ورودی کافی Ca^{2+} بداخل تخمک‌ها، تخمک‌های بالغ شده آزمایشگاهی مراحل تکوین و تشکیل جنین‌های بهتری را پس از Insemination از خود نشان می‌دهند و همانطور که در جدول شماره یک آمده است، تشکیل جنین‌ها در گروههای سوم و چهارم آزمایشی (سه تحریک الکتریکی به بالا) درصد بیشتری دارد و در گروه سوم نسبت به گروه کنترل و حتی دیگر گروههای آزمایشی اختلاف فاحش معنی‌داری مشاهده می‌شود. که حاکی از تاثیرگذاری ۳ بار تحریک و به دنبال آن حضور کافی Ca^{2+} در داخل تخمک این گروه است و مجموع جنین‌های دو، چهار، هشت سلولی به ۸۴ درصد می‌رسد که نسبت به دیگر گروههای آزمایشی (۶۰-۵۱ درصد) و گروه کنترل (۵۰ درصد) اختلاف فوق‌العاده زیاد است.

بر اساس نتایج بدست آمده از این پژوهش حدس می‌زنیم که القاء فعال شدن تخمک‌های نارس در آزمایشگاهی و بلوغ آنها بستگی به بلوغ کامل هسته، سیتوپلاسم پیرو تحریک الکتریکی و به دنبال آن انتقال کلسیم از محیط دارد. هر چه محیط مورد استفاده و تعداد تحریکات به عمل آمده شرایط دلخواه داخل بدن را پیدا کند تکوین جنین‌های حاصل از تخمک‌های بالغ شده بیشتر می‌شود. به طوری که در تحقیق حاضر تخمک‌ها تا ۷۷درصد بالغ شدند و جنین‌های حاصل

از این تخمک‌ها تا ۸۴درصد می‌رسد.

تقدیر و تشکر

کلیه هزینهٔ پژوهش حاضر از محل بودجه طرح همانندسازی معاونت پژوهش پژوهشکده رویان تامین گردیده است. بر خود فرض می‌دانیم که از کلیه همکاران شاغل در بخش‌های مختلف تحقیقاتی و بالینی رویان بخصوص سرکار خانم طائی و جناب آقای صبور که تمام مراحل انجام طرح صمیمانه همکاری نموده‌اند تشکر و قدردانی شود.

References

1. Nagai T: Current status and perspective in IVM-IVF ofPorcineOocytes.Theriogen, 1994; 41: 73-78
2. Raufman MH: Early Mammalian Development. Parthenogenetic Studies Cambridge Unive, 1983; 34-40
3. Ware CB, Barnes FL, Maiki Laurila M, First NL: Age dependence of bovine Oocyte activation Gamete Res, 1989; 22: 265-275
4. Marcus GL: Activation of cummulus free Mouse Oocytes Mol. Reproduct Dev, 1989; 26: 150-162
5. Whittingham DG: Parthenogrnesis in Mammals Oxford Rev. Reproductive Biol, 1980; 2: 205-231
6. Bos-Mikich A, Swann K, Whiuingham DG: Calcium oscillations and protein synthesis inhibition synergistically activate mouse Oocytes. Mol Reproduct, 1999; 41: 84-90
7. Funabashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Tertouw SL, Day BN: In vitro development of in vitro matured porcine Oocytes following chemical activation or in vitro fertilisation. Biol Reproduct, 1994; 50: 1027-1077
8. Hagen DR, Prather RS, First NI: Response of poreine Oocytes to electrial and chemical activation during maturation in vitro. Mol Reproduct Dev, 1999; 28: 70-73
9. Prather RS, Eichen PA, Nicks DK, Peters MS: Artificial activation of porcine Oocytes matured in vitro. Mol Reproduct Dev, 1991; 28: 405-409
10. Prochaza R, Kanka J, Sutovsky P, Fulka J, Morlik J: Development of prouclei in pig Oocytes Activated by a single electric pulse. J Reproduct Fertil, 1992; 96: 725-734
11. Sun FZ, Hoyland J, Huang X, Mason W, Moor RM: Acomparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation. Develop, 1992; 115: 947-956
12. Ozil JP: The parthenogenetic development of rabbit Oocytes after repetitive pulsatile stimulation Develop, 1990; 109: 117-127
13. McCulloh DH, Rexroad CE, Levitan H: Insemination of rabbit eggs is associated with slow depolarization and repetitive diphasic membrane potentials. Dev Biol, 1983; 95: 372-377
14. 0h YK, Brackett BG: Ultrastructure of rabbit ova recovered from ovarian follicles and inseminated in vitro, Fertil, 1975; 26: 665-685
15. Ozil JP: The parthenogenetic development of rabbit Oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation, Develop, 1999; 109: 117-127
16. Collas P, Fissore R, Robl JM, Sulivan AJ, Barnes FL: Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of bovine Oocyte, Mol Reprod Dev, 1993; 34; 212-223
17. Prochazka R, Durnford R, Fiser PS, Marcus GJ: Patheneogenetic development of activated in itro atured bovine Oocytes, Theriogen, 1993; 39: 1025-1032
18. Escriba MJ, Garcia-Ximenez Fe: Electroactivation of rabbit Oocytes in an hypotonic pulsing medium and parthenogenetic in vitro development without cytochalasin B-diploidizing pre- treatment, Theriogen 1999; 51: 963-973
19. Onodera M, Tsunoda Y: Parthenogenetic activation of mouse and rabbit eggs by electric stimulation in vitro. Gam Raes 1989; 22
20. Fissore RA, Robl JM: Intracellular Ca2+ response of rabbit Oocytes to electrical stimulation. Mol Reprod Dev, 1992; 32: 9-16
21. Collas P, Robl JM: Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo, Biol Reprod, 1990; 43: 877-884
22. Escriba MJ, Garcia- Ximenez Fe: Use of a variable electrical pulsing sequence in rabbit Oocyte activation Reprod, 2000; Nutr. 40: 261-269
23. L Liu , RM Moor: Factors affecting electrical activation of porcine Oocyte matured in vivo animal Reproduct Science, 1997; 48: 67-80
24. Funahashi H, Cantley TC, Day BN: Different hormonal requirements of pig Oocyte-cumulus complexes during maturation in vitro. J Reproduct fenit, 1994; 98: 179-185
25. Zimmermann U, Vicken J: Electric Field induced cell to cell fusion. J Membrane Biol, 1982; 65: 165-182
26. Swann K, Ozil JP: Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. Int Rev Cytol, 1994; 152: 183-222

27. idion BA, Martin MJ, Market GL: Parthenogenetic activation of mouse and pig Oocytes matured in vitro. Theriogen, 1990; 33: 1165-1175
28. Prather RS, Sims MM, First NI: Nuclear Transplantation in the early porcine embryo. Theriogen 1988; 29: 290
29. Prather RS, Sims MM, First NI: Nuclear Transplantation in early pig embryos. Biol Reproduct, 1989; 41: 414-418
30. Onodera M, Tsunoda T: Parthenogenctic activation of Mouse and rabbit eggs by electric stimulation in Vitro. Gamete Res, 1989; 22: 277-283
31. Richords LF, White KI: Electrofusion- induced intracellular Ca2+ flux and its effect on murine Oocyte activation. Mol Reproduct, 1992; 31: 152-159
'32. Rickords Lf, White KJ: Electroporation of inositol 1, 4, 5, triphosphate induces repectitive calcium Oscilations in murine Oocytes J Experimental Zootogy, 1993; 265: 178-184
33. Ricckords LF, Peters MS, Schocnbeck RA, Stumpf TT, Prather RS: Okadaic acid increases rate of activation of electrically activated in vitro matured porcine Oocytes. Theriogen, 1993; 39: 296
34. Vitullo AD, Ozil JP: Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse Oocyte activation, 1992; 151: 128-136
35. Schoenbeck RA, Peters MS Rickords LF, Stump TT, Terlouw SL, Prather RS: Diacylglye erol- enhanced Electrical of porcine Oocytes matured in vitro. Theriogen 1993; 40: 257-266
36. Collas P, Robl JM: Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryos. Biol Reproduct 1990; 43, 877-884