

# تأثیر تغییرات ولتاژ و زمان فیوژن بر تسهیم جنینهای تتراپلوئیدی حاصل از الکتروفیوژن جنینهای دو سلولی گاو

محمدرضا دارابی Ph.D.\*، حسین بهاروند Ph.D.\*، محمدحسین نصراصفهانی Ph.D.\*

\* دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

\* پژوهشکده رویان، گروه سلولهای بنیادی

\* پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

پست الکترونیک: mh\_nasr@med.mul.ac.ir

## مکیده

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

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

**\* مواد و روشها:** پس از بلوغ و لقاح آزمایشگاهی توده‌های تخمک-کومولوس، جنینهای دو سلولی حاصل، به سه گروه تقسیم شدند: ۱- گروه فیوز شده (FG: Fused group) شامل جنینهای دو سلولی بود که بلاستومرهایشان بعد از الکتروفیوژن، در ولتاژها (۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵، ۱/۵ کیلو ولت بر سانتی متر) و زمانهای مختلف (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میلیونیم ثانیه) به هم ملحق شدند. ۲- گروهی که بعد از الکتروفیوژن، بلاستومرهایشان در هم الحاق نشدند (ECG: Exposed control group). ۳- گروه کنترل که در معرض الکتروفیوژن قرار نگرفتند. (UCG: Unexposed control group). توده جنینهای هر گروه در محیط SOF<sub>1</sub> کشت شدند و میزان فیوژن و تسهیم در آنها با هم مقایسه شد.

**\* یافته ها:** افزایش ولتاژ به طور معنی داری سبب افزایش میزان فیوژن و کاهش میزان تسهیم شد. افزایش زمان تأثیر معنی داری بر میزان فیوژن نداشت. افزایش زمان در ولتاژهای بالا به طور معنی داری سبب کاهش تسهیم اما در ولتاژهای پایین موجب افزایش تسهیم شد. میزان تسهیم در گروه ECG از گروه FG تبعیت می نمود، و در گروه FG و ECG به طور معنی داری از گروه UCG کمتر بود.

**\* نتیجه گیری:** بهترین میزان فیوژن و تسهیم می تواند در ولتاژهای ۰/۷۵ تا ۱ کیلو ولت بر سانتی متر و مدت زمان ۶۰ میکروثانیه حاصل شود.

کل واژگان: گاو، تتراپلوئید، الکتروفیوژن، ولتاژ

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، زمستان ۸۳، شماره ۲۴، صفحات ۲۲۶-۲۳۱

## مقدمه

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

حیوانات ترانس ژنیک را می توان به طرق مختلف تولید نمود، که یکی از این روشها تولید کایمرها به واسطه ادغام (Aggregation) سلولهای توده درونی (ICM: Inner cell mass) و یا سلولهای شبه بنیادی جنینی (ESLC: Embryonic Stem Like Cell) با جنینهای تتراپلوئید مرحله مورولا است. لازم به ذکر است که در این روش پس از زدودن دیواره شفاف جنینهای تتراپلوئید توسط پروناز ۰/۵ درصد دو توده از بلاستومرهای حاصل با توده‌ای از سلولهای ESLC به صورت مثلی در کنار هم قرار گرفته و به منظور رسیدن به بلاستوسیست

و ترانسفر، به محیط کشت منتقل می شوند. به این ترتیب جنین تشکیل شده صرفاً از ICM یا سلولهای ESLC که به داخل بلاستوسیست تتراپلوئید تزریق شده مشتق می گردد، و جفت از بلاستوسیست تتراپلوئید فاقد ICM تشکیل می شود. با ادغام سلولهای ESLC در جنینهای دیپلوئید سه روزه گاو، سلولهای ESLC در بافتهای مختلف، دارای توزیع محدودی خواهند بود، اما اگر سلولهای ESLC را در جنینهای تتراپلوئید گاوی ادغام نماییم، جنین حاصله به طور اخص از سلولهای ESLC تشکیل خواهد شد و فرزندان حاصل از این کایمرها به طور اخص از سلولهای دیپلوئید تشکیل خواهند شد (۱، ۲).

تولید حیوانات ترانس ژنیک به روش فوق یکی از موثرترین روشهای تولید حیوانات ترانس ژنیک است، لذا دستیابی به این روشها می تواند در زمینه‌های مختلف صنعتی و دامپزشکی موثر باشد. نظر به اینکه تولید گاوهای ترانس ژنیک با توجه به تولید بالای شیر در آنها می تواند از اهمیت خاصی برخوردار باشد، لذا این نوع حیوانات را می توان با تزریق مستقیم DNA به داخل پیش هسته‌ها و یا به واسطه ادغام سلولهای

مدت ۱-۲ ساعت به آزمایشگاه مرکز باروری و ناباروری اصفهان منتقل شدند. سپس با استفاده از سر سرنگ شماره ۱۸ مایع فولیکولی، فولیکولهای ۲-۶ میلی متری آسپیره و در لوله‌های ته مخروطی ریخته شد و به منظور ته نشینی به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در انکوباتور نگهداری و در زیر استریومیکروسکوپ ۱۳۵۰۰ عدد توده تخمک کومولوس با کیفیت که دارای سیتوپلاسم هموزن و گرانوله و حداقل سه لایه سلولهای کومولوس در اطراف خود داشتند در محیط شستشو جمع آوری شدند.

محیط شستشو (WM: Washing medium) از TCM-199 (M-2520) که دارای افزودنیهای ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر پنی سیلین، ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر استرپتومایسین، و ۰/۲۲ میلی گرم بر میلی لیتر سدیم پیروات، ۲۵ سدیم میلی مولار بیکربات است، تشکیل و PH آن در حد ۷/۴-۷/۳ تنظیم شده و حداقل ۲ ساعت قبل از استفاده، در انکوباتور دارای ۵ درصد CO<sub>2</sub> و ماکزیم رطوبت در ۳۹ درجه سانتی گراد انکوبه شد.

### بلوغ آزمایشگاهی

پس از جمع آوری COCها در WM دو بار دیگر آنها را در همین محیط شستشو داده و دو بار نیز آنها را در محیط بلوغ (MM: Maturation medium) که از محیط شستشو به علاوه ۰/۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر هفده بتا استرادیول، ۰/۱ واحد بین المللی در میلی لیتر FCS، hMG، ۱۰ درصد و ۱/۳ میلی مولار آل-گلوتامین، شستشو داده شد. سپس COCها در گروههای ۵ تایی به قطرات ۵۰ میکرولیتر از MM در زیر روغن پارافین استریل منتقل و به مدت ۲۴-۲۲ ساعت انکوبه شدند (۱۱، ۱۲).

### لقاح آزمایشگاهی

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

سپس مایع سمن (Semen) تازه گاوی 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 در محیط لقاح به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و ته نشین نهایی توسط محیط لقاح به نحوی رقیق شد که غلظت نهایی اسپرمها در قطرات محیط لقاح به ۱-۲ میلیون در میلی لیتر برسد. لازم به ذکر است که ظرفیت پذیری (Capacitation) و افزایش تحرک اسپرمها در همین محیط انجام می گردید (۱۳).

بنیادی ترانسفکت شده (با جنینهای دیپلوئید ترانسفکت شده) با مورولاهای تتراپلوئید و یا به واسطه تزریق این سلولها به داخل بلاستوسول بلاستوسیتهای تتراپلوئید ایجاد نمود.

گر چه برای تولید کایمرهای دیپلوئید-تتراپلوئید روش تزریق سلول (ترانس ژن شده) به داخل بلاستوسول، نسبت به روش ادغام سلولها با مورولاهای تتراپلوئید موثرتر است (۳، ۴) اما باید اذعان نمود که به ابزار و مهارتهای 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 می افتد (۵)، اما در انسان وقوع این پدیده می تواند کشنده باشد.

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

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

### مواد و روشها

تمامی مواد شیمیایی از شرکت سیگما خریداری شده است در غیر این صورت نام شرکت مربوطه و شماره کاتالوگ آن ذکر گردیده است. به منظور بلوغ آزمایشگاهی توده‌های تخمک کومولوس گاوی (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

## کشت آزمایشگاهی

شده، در زمانهای ۳۰ و ۶۰ دقیقه بعد از الکتروفیوژن آنها را در زیر لوپ انتخاب و تحت عنوان گروه فیوز شده (FG) از ما بقی جنینهای دو سلولی که تحت تاثیر جریان قرار گرفتند، ولی فیوژن در آنها اتفاق نیفتاد (ECG) جدا شدند و برای مدت ۳۹-۳۷ ساعت دیگر در محیط SOF<sub>1</sub> کشت داده شدند (۱۰).

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

## رنگ آمیزی کروموزوما

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

بلافاصله کیفیت گسترش کروموزوما در زیر میکروسکوپ بررسی شد و در صورت باقی بودن سیتوپلاسم، با انداختن یک قطره دیگر از فیکساتیو (نسبت سه به یک، 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 لامل گذاری اقدام به شمارش کروموزوما گردید (شکل ۱).

## یافته‌ها

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

مدت ۱۸-۲۲ ساعت پس از تلقیح COC ها، به منظور جدا کردن اسپرمهای مرده و سلولهای کومولوس از تخمکهای تلقیح شده، به مدت دو دقیقه آنها را در محیط WM به وسیله دستگاه ورتکس لرزانده و پس از جداسازی به محیط کشت SOF<sub>1</sub> (Synthetic oviductal fluid) که از مایعی سنتتیک شبیه مایع لوله رحمی گوسفند ساخته شده، منتقل شدند (۱۴، ۱۵).

۳۳-۳۵ ساعت بعد از لقاح ۳۵۴۰ عدد جنین دوسلولی انتخاب و تعدادی از آنها برای مدت ۳۹-۳۷ ساعت دیگر بدون قرار گرفتن در معرض الکتروفیوژن به عنوان گروه شاهد (UCG) به محیط کشت SOF<sub>1</sub> و انکوباتور منتقل و مابقی جنینهای دو سلولی به منظور الکتروفیوژن استفاده شد.

## الکتروفیوژن

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

## محفظه الکتروفیوژن

از دو الکتروود ورقه ای شکل باریک و دراز فلزی ( فولاد ضد زنگ) که به فاصله ۱ میلی متر از هم بر روی اسلاید چسبیده، تشکیل شده، که هر یک به وسیله سیمی به دستگاه الکتروفیوژن (CF-150B Biological Laboratory Service, H-1165 Budapest, Zselyi A.U.31 Hungary) متصل است. جنینهای دو سلولی طوری به بافر بین الکتروودها منتقل شدند که سطح بین دو بلاستومر به موازات الکتروودها قرار گرفته تا ماکزیمم جریان الکتریکی از آن عبور نماید. سپس جنینها تحت تاثیر یک پالس جریان مستقیم (DC: Direct current) با ولتاژ (۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵، ۱/۵ کیلوولت بر سانتی متر) و زمان معین (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میلیونیم ثانیه) قرار داده شدند. به منظور جداسازی جنینهای فیوز

زمان*	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰
** ولتاژ	۰/۵۰	۰/۷۵	۱	۱/۲۵	۱/۵
	٪ ۳۶	٪ ۶۹	٪ ۶۹	٪ ۶۴	٪ ۷۲
	٪ ۳۵	٪ ۶۲	٪ ۷۶	٪ ۷۱	٪ ۸۲
	٪ ۴۷	٪ ۶۴	٪ ۸۱	٪ ۸۷	٪ ۸۸
	P=۰/۰۲۶	P=۰/۰۴	P=۰/۰۳۱	P=۰/۰۴۳	P=۰/۰۴۵
	f=۰/۹۲۱	f=۰/۸۲۵	f=۰/۹۱۲	f=۰/۸۹۰	f=۰/۸۸۰

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

زمان*	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰
**ولتاژ	۰/۵۰	۰/۷۵	۱	۱/۲۵	۱/۵
	٪۶۴	٪۶۱	٪۶۶	٪۷۰	٪۷۴
	٪۵۳	٪۴۹	٪۵۶	٪۵۱	٪۵۸
	٪۴۵	٪۱۳	٪۱۸	٪۳۹	٪۲۳
	٪۵۳	٪۱۹	٪۲۷	٪۱۹	٪۱۸
	P=۰/۱۹۱	P=۰/۰۲۸	P=۰/۰۲۳	P=۰/۰۲۲	P=۰/۰۱۳
	r=-۰/۶۹۷	r=-۰/۹۱۸	r=-۰/۹۰۹	r=-۰/۸۹۰	r=-۰/۹۳۰

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

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

جدول ۲ همچنین نشان می‌دهد که کاهش ولتاژ از ۱/۵ به سمت ۰/۵ کیلوولت بر سانتی‌متر، موجب افزایش میزان تسهیم در تمامی زمانهای فوق‌الذکر باستانی ۲۰ میکروثانیه شد (همبستگی پیرسون منفی).

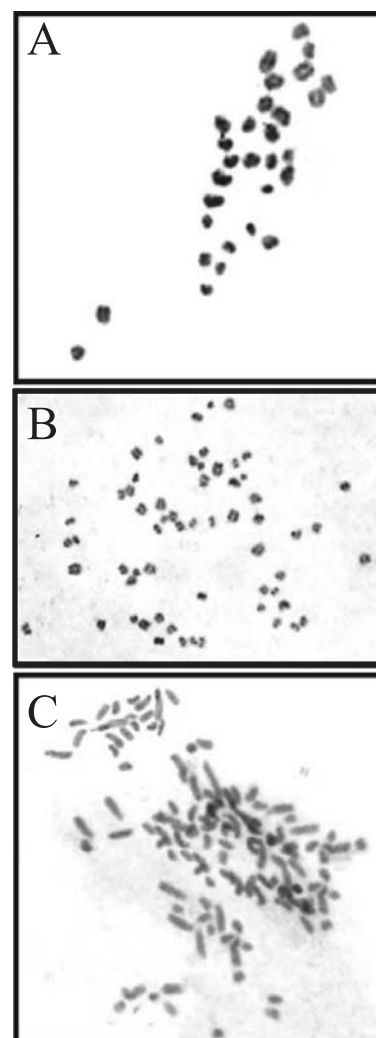
آنالیز آماری نتایج حاصل با استفاده از آزمون Chi-square نیز حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در میزان تسهیم جنینها، در دو گروه ولتاژی ۱/۵ و ۱/۲۵ کیلوولت، با سه گروه ۱ و ۰/۷۵ و ۰/۵ کیلوولت در تمامی زمان‌ها به جز ۲۰ میکروثانیه بود. نتایج همچنین نشان داد که میزان تسهیم، در دو ولتاژ ۱/۵ و ۱/۲۵ کیلوولت با زمان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

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

### بحث

مطالعات قبلی نشان داده است که با قرار گرفتن سلولها در معرض پالسهای الکتریکی کوتاه مدت نفوذپذیری غشای آنها به طور برگشت پذیر افزایش می‌یابد (۱۸). در این روش بر اثر میدان الکتریکی حاصل از جریان مستقیم (DC) غشاهای پلاریزه و ناپایدار شده و جذب غشای مقابل بر اثر فیوژن نقطه‌ای غشا و توسط اتصالات محکم انجام می‌گیرد. در این مرحله به واسطه تشکیل سوراخهایی که برگشت پذیر

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



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

آثار خود را بر روی سلول و میزان تسهیم آن آشکار سازد به این منظور بایستی زمان میدان الکتریکی را آنقدر افزایش داد تا آثار آن بر میزان تسهیم آشکار شود، که چنین افزایشی خارج از حیطه این مطالعه بود.

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

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

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

در این مطالعه میزان فیوژن در ولتاژ ۱/۵ کیلوولت بر سانتی متر و زمان ۱۰۰ میکروثانیه به میزان ۸۸ درصد بود، که به میزان گزارش در مطالعه انجام شده توسط Curnow و همکاران (۷۶ درصد) با پارامترهای (۱۰۰ میکروثانیه  $1/4\text{ks/cm}^-$ ) نزدیک است (۲۲). لازم به ذکر است که مطالعه Curnow با پارامترهای (۱، ۱/۴ و ۲/۴ کیلوولت بر سانتی متر) و (۵۰ و ۱۰۰ میکروثانیه) انجام گرفت، که نتایج به دست آمده در مورد تکوین جنینها تا مرحله بلاستوسیست (۵۷ درصد) بهتر از نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر بود که یکی از علل احتمالی موثر در این زمینه را می توان تأثیر نژاد دامها بر میزان تکوین ذکر نمود. با توجه به نتایج فوق و به منظور حصول بالاترین میزان فیوژن و تسهیم از جنینهای دو سلولی گاو به روش الکتروفیوژن، می توان پیشنهاد نمود که بهتر است پارامترهای لازم بر روی ۷۵ کیلوولت بر سانتی متر و ۶ میکروثانیه تنظیم شود. البته این مقادیر به مقادیر گزارش شده توسط Iwasaki و همکاران نسبتاً نزدیک (۷) ولی با مقادیر گزارش شده توسط سایرین تفاوت دارد.

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

با توجه به آنکه میزان تسهیم در دو گروه FG و ECG نسبت به

(reversible) هستند غشای دیافراگمی شکل یکنواختی تشکیل می دهد. دیافراگم مذکور در صورت بهینه بودن شرایط از بین رفته و الحاق دو سلول اتفاق می افتد (۱۹).

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

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

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

نتایج حاصل از فیوژن جنینهای دو سلولی در این مطالعه حاکی از وجود رابطه ای منفی بین شدت ولتاژ و تسهیم در تمامی زمانها به جز ۲۰ میکروثانیه است (جدول ۲). همچنین به دلیل تأخیر مشاهده شده بین اعمال پالس الکتریکی و اولین علائم وقوع فیوژن می توان دریافت که فیوژن نمی تواند مستقیماً ناشی از میدان الکتریکی باشد بلکه احتمالاً ناشی از تغییرات القاء شده در غشای سلول است. در واقع با افزایش شدت میدان الکتریکی اعمال شده زمان تأخیر نیز کاهش می یابد، مگر آنکه شدت میدان آنقدر بالا باشد که به دلایل تخریبی اساساً فیوژنی اتفاق نیفتد. لذا می توان گفت که قرار گرفتن جنینهای دو سلولی در معرض ولتاژهای بالا، تأثیر مهاری بر میزان تسهیم خواهد داشت، که احتمالاً به دلیل تشکیل سوراخهای بزرگتر، آن هم در تمامی غشای دو بلاستومر و تحمیل آثار مخرب بر روی سلول است. نتایج همچنین نشان می دهد که انجام الکتروفیوژن با ولتاژهای بیش از ۱ کیلوولت بر سانتی متر به طور معنی داری میزان تسهیم را کاهش می دهد، بنابراین بایستی از ولتاژهای بیش از ۱ کیلوولت بر سانتی متر اجتناب شود. از طرفی در این مطالعه هیچ رابطه ای بین مقادیر متفاوت زمان در یک ولتاژ معین بر روی تسهیم مشاهده نشد، بنابراین افزایش زمان تأثیری بر میزان تسهیم نخواهد داشت، که می تواند ناشی از این واقعیت باشد که دامنه تغییرات زمان به کار گرفته شده در این مطالعه در حدی نیست که بتواند

جهت انجام روشهای ادغام و تزریق سلولهای پایه با جنینهای تتراپلوئید و تولید کیمرای صورت گیرد.

### تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از طرح شماره ۸۱۱۳۹ مصوب شورای علمی پژوهشکده رویان 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 مسئولین کشتارگاه صنعتی اصفهان (آقای دکتر رهگذر، آقای دکتر حسین آبادی، آقای دکتر شرکت) تشکر و قدردانی نمایند.



### References

- Nagy A, Rossant J: Production of completely ES Cell-derived fetuses. In Joyner, A.L. (ed), Gene Targeting: a Practical Approach, IRL Press Oxford, 1993; 147-180
- James RM, Klerkx A, Keighren M, Flockhart JH, West JD: Restricted distribution of tetraploid cells in mouse tetraploid-diploid chimaeras. Dev Bio 1995; 167: 213-226
- Wood SA, Allen ND, Rossant J, Auerrbach A, Nagy A: Non-injection methods for the production of embryonic stem cell embryo chimeras. Nature 1993; 365: 87-89
- Peli J, Schmolz F, Laurincik J, Brem G, Schelander K: Comparison of aggregation and injection techniques in producing chimeras with embryonic stem cells in mice. Theriogenology 1996; 45: 833-842
- Beatty RA, Fischberg M: Spontaneous and induced triploidy in pre-implantation mouse eggs. Nature 1949; 163: 807-808
- Berg H: Fusion of blastomers and blastocysts of mouse embryos. Bioelectrochem Bioenerg 1982; 9: 223-228
- Iwasaki S, Kono T, Fukatsu H, Nakahara T: Production of bovine tetraploid embryos by electrofusion and their developmental capacity in vitro. 1989; 24: 26-27
- Tatham BG, Pushett DA, Giliam KJ, Dowsing AT, Mahavorasilpa TL, Ttounson AO: Electrofusion of in vitro produced bovine embryonic cells for the production of isofusion contours for cells used in nuclear transfer. J. of Rep. and Fert. Supp. 1995; 49: 5
- Teissie J, Ramos C: Correlation between electric field pulse induced long-lived permeabilization and fusogenicity in cell membranes. BioPhysical Journal 1998; 74: 1889-1898
- Cornow EC, Gunn LM, Trounson AO: Electrofusion of two-cell bovine embryos for the production of tetraploid blastocysts in vitro. Mol Rep Dev 2000; 56: 372-377
- 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
- Khurana NK, Nieman H: Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and

گروه UCG پایین تر است، 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 خواهد شد. علت دقیق کاهش توانایی تکوینی در گروه FG ناشناخته بوده و احتمالاً می‌توان آن را به قرار گرفتن جنینها در معرض مدیای غیر الکترولیت و ساختار کروموزومی جنینهای تتراپلوئید و تحریک الکتریکی مربوط دانست. در پایان پیشنهاد می‌شود که: ۱- به منظور حصول نتایج بهتر در روش الکتروفیوژن با تعیین اثر انواع مدیای غیر الکترولیت بر روی میزان فیوژن، تسهیم و تکوین تا بلاستوسیت و نیز مقایسه آنها با مدیاهای الکترولیتی مطالعاتی صورت گیرد. ۲- به منظور تعیین اثر پلوئیدی بر روی تکوین قبل از لانه گزینی مطالعاتی صورت گیرد. ۳- مطالعاتی

- energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. Theriogenol 2000; 54: 741-756
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL: Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol. Reprod 1988; 38: 1171-1180
- Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G: Bovine embryo technologies. Theriogenol 2003; 59: 599-616
- 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
- Tarkowski AK: An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. Cytogenetics 1966; 5: 394-400
- Yoshizawa M, Konno H, Zhu S, Kageyama S: Chromosomal diagnosis in each individual blastomere of 5-to 10-cell bovine embryos derived from in vitro fertilization. Theriogenol 1999; 51: 1239-1250
- Neumann E, Rosenheck B: Permeability induced by electric impulses in vesicular membranes. J Membr Biol 1972; 10: 279-290
- Chernomerdik LV, Sowers AE: Physical and ultrastructural evidence that integrin of the spectrin network controls the macroscopic fusion produce morphology following the electrofusion of erythrocyte ghosts. Biophysical J 1991; 60: 1026-1037
- Ramos C, Teissie J: Electrofusion: A bioPhysical modification of cell membrane and a mechanism in exocytosis. Biochimie 2000; 82: 511-518
- Zhelev DV, Dimitrov DS, Doinov P: Correlation between physical parameters in electrofusion and electroporation of protoplasts. Bioelectrochemistry and Bioenergetics 1988; 20: 155-167
- Carolan C, Monaghan P, Gallagher M, Gordon I: Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro. Theriogenol 1993; 1061-1068

