Original Article

The Arrangement of Microtubules in Embryos Derived from Mice Young, Old and Reconstructed Oocytes

A. Shahverdi, Ph.D.[1,2], M. Movahedin, Ph.D.[1], M. Rezazadeh Valojerdi, Ph.D.[1,2], S. Kazemi Ashtiani, Ph.D.[2], H. Kashani, M.Sc.[3]

1. Anatomical Sciences Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University
2. Embryology Department, Cell Sciences Research Center, Royan Institute, ACECR
3. Epidemiology Department, Reproductive Medicine Research Center, Royan Institute, ACECR

Corresponding Addresses:

P.O.Box: 14115-175, Anatomical Sciences Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: mansoure@modares.ac.ir

P.O.Box: 19395-4644, Embryology Department, Cell Sciences Research Center, Royan Institute, ACECR, Tehran, Iran
Email: shahverdi@royaninstitute.org

Abstract

Received: 14/Jan/2008, Accepted: 12/May/2008

Objective: To study the structure and distribution of microtubules in embryos derived from young, old and reconstructed oocytes.

Materials and Methods: Embryos obtained from old (50 embryos), young (50 embryos) and reconstructed oocytes (10 embryos) were studied by immunocytochemistry. The microtubule structures of the embryos were studied by using fluroscent microscopy with FITC-PI filter and polyclonal antibody against alfa tubulin.

Results: The spindle structure of MII young oocyte and the obtained embryos were normal with the suitable condensation. There was no contact between chromosome and spindle in old Oocytes as well as the obtained embryos, in addition, the spindle was extended in old group. In reconstructed embryos, thin and scattered filaments were observed.

Conclusion: This study reveals that the arrangement of microtubules in reconstructed embryos was caused by repeating of injection and oocyte manipulation. Also, interactions between karyoblast, cytoplasm and microtubuls may not be suitable. This may be caused by low fertilization in these oocytes.

Keywords: Microtubules, Mitotic Spindle, Reconstructed Oocytes

Yakhteh Medical Journal, Vol 10, No 2, Summer 2008, Pages: 145-151

آرایش میکروتوبول‌ها در جنین‌های اولیه حاصل از تخمک‌های جوان، پیر و بازسازی شده موش

عبدالحسین شاهوردی .Ph.D[۲،۱*]، منصوره موحدین .Ph.D[۱*]، مجتبی رضازاده ولوجردی .Ph.D[۲،۱]، سعید کاظمی آشتیانی .Ph.D[۲]، حسین کاشانی .M.Sc[۳]

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه آناتومی
۲. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی جهاد دانشگاهی، گروه جنین شناسی
۳. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه اپیدمیولوژی

* آدرس نویسندگان مسئول:
تهران، صندوق پستی: ۷۱۵-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی
پست الکترونیک: Email:mansoure@modares.ac.ir

تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی جهاد دانشگاهی، گروه جنین شناسی
پست الکترونیک: Email:shahverdi@royaninstitute.org

چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۱۰/۲۴، پذیرش مقاله: ۸۷/۲/۲۳

* **هدف:** بررسی ساختار و توزیع میکروتوبول‌ها در جنین‌های اولیه حاصل از تخمک‌های جوان، پیر و بازسازی شده موش

* **مواد و روش‌ها:** در این تحقیق سه گروه از تخمک‌ها و جنین‌های حاصل از تخمک پیر (۵۰ عدد)، تخمک جوان (۵۰ عدد) و تخمک پیر بازسازی شده (۱۰ عدد) مورد مطالعه ایمونوسیتوشیمی قرار گرفتند. تخمک پیر بازسازی شده با انتقال ماده ژنتیکی تخمک پیر به تخمک بی‌هسته شده جوان به دست آمده است. جنین‌ها از مرحله 2Pn تا مرحله دو سلولی از نظر ساختمان میکروتوبولی با استفاده از آنتی‌بادی‌پلی کلونال علیه آلفاتوبولین و با میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند.

* **یافته‌ها:** ساختار دوکی در تخمک جوان در مرحله متافاز II و جنین های حاصل از آن طبیعی و از تراکم مناسبی برخوردار بود. در حالی که در تخمک پیر و جنین های حاصل رشته های دوک ارتباط خوبی با کروموزوم نداشت و مساحت زیادی به خود اختصاص داده بود. در جنین های بازسازی شده نیز رشته های پراکنده و نازک توبولینی مشاهده شد.

* **نتیجه‌گیری:** وضعیت قرارگیری رشته های توبولینی در جنین های بازسازی شده احتمالا به دلیل دفعات تزریق و دست کاری تخمک باشد و تعامل خوبی بین ماده ژنتیکی منتقل شده و سیتوپلاسم و میکروتوبول ها به وجود نیامده است و ممکن است یکی از دلایل کاهش میزان لقاح در این تخمک ها باشد.

کلیدواژگان: میکروتوبول، دوک تقسیم، تخمک پیر بازسازی شده

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دهم، شماره ۲، تابستان ۸۷، صفحات: ۱۵۱-۱۴۵

مقدمه

میکروتوبول یک نقش حیاتی در حین لقاح تخمک پستانداران دارد و احتمالا با فعالیت پیش‌هسته‌ها در شکل‌گیری هسته تخم در تعامل هستند. میکروتوبول‌ها از نواحی مشخصی در سیتوپلاسم تخمک به نام مراکز سازماندهی میکروتوبولی (Microtubule Orangization Center: MTOC) پلیمریزه می‌شوند (۱). چستن و همکارانش در تخمک‌های موش مرحله متافاز II چندین MTOC را گزارش کرده‌اند که در سیتوپلاسم پراکنده است و به واسطه همین مراکز، رشته‌های دوک کروموزومی تشکیل می‌شود. پس از برداشتن غشای هسته در مرحله ژرمینال وزیکول، مراکز MTOC فعال و به سمت کروموزوم‌ها هدایت می‌شوند و میکروتوبول‌ها شکل می‌گیرند. میکروتوبول‌ها به طور تصادفی رشد کرده و ناحیه دو قطبی در اطراف کروموزوم‌ها را به وجود می‌آورند (۲).

مهاجرت کروموزوم‌ها به طور کامل نیاز به یک هماهنگی و تعامل بین پروتئین کیناز و فسفاتاز، میکروتوبول‌ها، پروتئین‌های حرکتی (Motor Proteins) و عوامل دیگر دارد (۳). عملکرد غیرطبیعی یا اختلال موقتی میان واکنش‌های بیوشیمی و ارگانل‌های سلولی که مسئول جابجایی کروموزوم‌ها هستند، باعث ایجاد آنوپلوئیدی می‌شوند (۴).

اهمیت نقش و تعامل کروموزوم‌ها، میکروتوبول‌ها و فاکتورهای همراه در تشکیل دوک میوزی، در تخمک موش فاقد کروموزوم بررسی و مشاهده شد که در سیتوپلاست، دوک‌های دو قطبی پایداری در غیاب کروموزومی شکل می‌گیرد ولی هدف‌دار و کنترل شده نیست. بنابراین نقش کروموزوم‌ها در محدود کردن و هدف‌دار شدن فعالیت MTOC مشخص می‌شود (۱).

تحقیقات نشان می‌دهد در تخمک‌های زنان ۴۰ ساله، موارد غیرطبیعی در میکروتوبول جدا نشدن کروموزوم‌ها در مرحله متافاز II را موجب می‌شوند (۵). درصد بالایی از ناهنجاری‌های تک کروماتیدی در تخمک‌های زنان بارور مسن نیز گزارش شده است (۶). سقط جنین در زنان مسن با علت ناهنجاری‌های کروموزومی افزایش یافته و شیوع ناهنجاری‌های ژنتیکی در نوزادان این مادران نیز افزایش می‌یابد (۷، ۸). ونگ و همکارانش گزارش کرده‌اند که در تخمک افراد مسن دوک‌های تقسیم به صورت ناقص تشکیل شده و یا کاملا شکل نگرفته بود و فقط تعداد معدودی میکروتوبول در اطراف کروموزوم‌ها یا به صورت پراکنده در سیتوپلاسم مشاهده می‌شد (۹). باتاگلیا و همکارانش تاثیر سن مادر را روی ساختمان‌های میوزی در دو گروه تخمک‌های جوان و مسن بررسی

کردند و در گروه مسن جابه‌جایی غیرطبیعی توبولین گزارش و به طور معنی‌داری نیز در آنان آنوپلوئیدی مشاهده شد (۱۰). تخمک‌های حاصل از زنان جوان، دوک‌های قطبی منظمی را طی متافاز II تشکیل می‌دهند که در این حالت کروموزوم‌ها به طور تنگاتنگی در دوک مرتب شده‌اند، در حالی که دوک میوزی تخمک‌های زنان مسن، بیشتر منتشر شده و دو قطب دوک‌ها مشاهده نمی‌شود و کروموزوم‌ها به طور نامنظم و به شکل سست به دوک‌ها در نقاط متفاوتی متصل شده‌اند (۱۱).

جهت رفع نقیصه تخمک‌های مسن محققان با انتقال تمام یا چند پیکولیتر از سیتوپلاسم تخمک جوان به تخمک مسن (۱۲) و نیز با جداسازی میتوکندری و میکروتوبول و انتقال به سیتوپلاسم تخمک‌های مسن اقدام کرده‌اند (۱۳، ۱۴). هدف از انتقال سیتوپلاسم تخمک جوان حفظ رشد طبیعی در تکوین تخمک مسن و جنین حاصل از آن است. کوهن و همکارانش نیز تجربه انتقال سیتوپلاسم از تخمک متافاز II به تخمک‌های دارای ضایعه را کسب و میزان لقاح و تکوین جنین را گزارش کرده‌اند (۱۲). با پیشرفت تکنیک همانندسازی پیشنهاد شد می‌توان با انتقال ماده ژنتیک تخمک پیر به تخمک جوان بی‌هسته این نقیصه را رفع کرد.

در این تحقیق نیز این تکنیک تجربه و وضعیت آرایشی میکروتوبول‌ها در جنین‌های حاصل از تخمک‌های پیر، جوان و بازسازی شده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه تخمک

در این تحقیق از موش‌های سوری ماده نژاد NMRI، تولید شده در انستیتو رازی کرج استفاده شد. سن موش سوری ماده مسن ۹-۷ ماه و سن موش‌های سوری ماده جوان ۷-۶ هفته بود (۱۵، ۱۶).

موش‌های ماده با تزریق داخل صفاقی (PMSG, Intervet, Netherlands) (Pregnant Mare's Serum Gonadotrophin: PMSG) به میزان ۷/۵ واحد بین‌المللی و پس از ۴۸ ساعت ۷/۵ واحد بین‌المللی (hCG, Intervet, Netherlands) (Human Chorionic Gonadotrophin: hCG) تحریک تخمک‌گذاری شدند.

۱۷ ساعت پس از تزریق hCG، موش‌ها با جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته و به منظور جداسازی توده‌های حاوی تخمک، لوله رحم آنها جدا و به داخل قطره محیط کشت منتقل شد.

بازسازی تخمک پیر

بعد از جدا کردن تخمک‌های همراه کومولوس از اویداکت، به محیط KSOM حاوی ۳۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر هیالورونیداز منتقل و با ۱ دقیقه انکوباسیون سلول‌های گرانولوزا از تخمک جدا شد. پس از شست‌وشو، تخمک‌های متافاز II به منظور بی‌هسته کردن به قطرات دیش مخصوص میکرواینجکشن منتقل شدند.

تخمک‌های جوان در قطره حاوی سیتوکالازین ۷/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر (Sigma, USA) به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و سپس در قطره حاوی رنگ هوخست ۳ درصد (Hoechst 33342: Sigma) به مدت ۵ دقیقه برای تعیین موقعیت ماده ژنتیکی به وسیله رنگ تیمار شدند. ماده ژنتیکی رنگ شده تخمک‌های جوان با تکنیک پیزو خارج و تخمک‌های بی‌هسته شده پس از شست‌وشو در محیط KSOM به انکوباتور برای مدت ۱۵ دقیقه منتقل و سپس به قطرات گذاشته شده در دیش میکرواینجکشن جهت انتقال هسته پیر منتقل شدند. به منظور تعیین محل ماده ژنتیکی تخمک پیر و برای جلوگیری از آسیب رنگ هوخست به ماده ژنتیکی، فقط در قطرات حاوی ساکارز ۵ درصد (Sigma, USA) تیمار شدند. پس از تیمار، محل ماده ژنتیکی به صورت برآمدگی به خوبی در سطح تخمک پیر قابل مشاهده است. هسته تخمک پیر نیز با تکنیک پیزو به صورت کاریوبلاست خارج شد. در تکنیک پیزو با استفاده از پالس الکتریکی و تبدیل این پالس به یک حرکت مکانیکی سریع در مایع داخل سوزن تزریق زوناپلوسیدا و غشای تخمک بدون ایجاد ضایعه‌ای در سیتوپلاسم باز می‌شود. این تکنیک در مورد تخمک موش که غشای آن خاصیت الاستیسیته بالایی دارد بهترین گزینه است.

تهیه و آماده‌سازی اسپرم

در این تحقیق از موش‌های سوری نر نژاد NMRI، تولید شده در انستیتو رازی کرج استفاده شد. سن موش سوری نر ۱۲-۱۰ هفته بود.

برای دست‌یابی به اسپرم، دم اپیدیدیم جدا و به محیط (KCl Simplex Optimized Medium: KSOM) حاوی ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA انتقال و برای ظرفیت‌گیری به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت.

جهت آماده‌سازی اسپرم برای تزریق به تخمک جوان بی‌هسته ابتدا به قطره PVP دیش میکرواینجکشن حدود ۱ میکرولیتر اسپرم اضافه شد (در محیط حاوی PVP حرکت اسپرم کند می‌شود). سپس اسپرم از ناحیه دم تا قسمت گردن به داخل سوزن مخصوص پیزو (این سوزن دارای نوک صاف است) کشیده شد و با وارد کردن ۲ تا ۳ پالس پیزو، سر اسپرم جدا و به ناحیه مشخص شده در یک قطره محیط KSOM داخل دیش میکرواینجکشن منتقل شد.

تلقیح تخمک‌های کنترل و بازسازی شده

لقاح تخمک پیر بازسازی شده با انتقال سر اسپرم همراه با کاریوبلاست تخمک پیر به داخل تخمک جوان بی‌هسته شده صورت گرفت. تخمک‌های بازسازی شده پس از پایان کار، چندین بار در محیط شسته و به انکوباتور منتقل شدند.

لقاح گروه‌های تخمک‌های پیر و جوان با افزودن اسپرم های شناور در سطح محیط انکوبه شده (Swim Up) (در هر میلی‌لیتر ۱×۱۰^{۵} عدد اسپرم) به قطرات حاوی تخمک‌های جوان و پیر صورت گرفت. پس از افزودن اسپرم به قطره حاوی تخمک‌ها، دیش به انکوباتور منتقل و وضعیت جنین‌ها تا ۲۴ ساعت بررسی و مراحل تکوین ثبت شد.

ایمونوسیتوشیمی

سه گروه از تخمک‌ها و جنین‌های حاصل از آنها (پیر و جوان و بازسازی شده) مورد مطالعه ایمونوسیتوشیمی قرار گرفتند. تعداد جنین‌ها در هر گروه از پیر و جوان ۵۰ و در گروه بازسازی شده ۱۰ عدد بود. جنین‌ها تا مرحله دو سلولی از نظر ساختمان میکروتوبولی (آلفاتوبولین) مورد بررسی قرار گرفتند.

جنین‌ها با حداقل محیط کشت در chamber slide قرار گرفتند و سپس در قطره پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد فیکس شدند. جنین‌ها دو بار با محلول ۵ درصد PBS-TWEEN شسته و در محلول ۵ درصد TritonX-100 به همراه ۵ درصد BSA جهت نفوذپذیر شدن به مدت ۱۰ دقیقه تیمار شدند.

برای جلوگیری از اتصال غیراختصاصی

آنتی‌بادی (blocking) تیمار با سرم بز ۱۰ درصد (goat serum %10 sigma) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت و پس از مسدودسازی در طول شب با آنتی‌بادی علیه آلفا توبولین (Rabbite Poly to Alpha Tubulin-ab4074) که با TritonX-100 به همراه ۵ درصد BSA که به نسبت ۱:۵۰ رقیق شده بود، تیمار شدند و سپس به مدت ۵ دقیقه شست‌وشو و به مدت یک ساعت (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) در آنتی‌بادی ثانویه (Goat Anti Rabbit IgG-FITC) که با TritonX-100 به همراه ۵درصد BSA به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شده، قرار گرفت و ادامه کار در تاریکی ادامه یافت.

به منظور رنگ‌آمیزی هسته (کروموزوم‌ها) جنین‌ها به مدت ۳ دقیقه در محلول ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر PI (پروپیدیوم ایوداید USA, Sigma) قرار گرفتند و سپس با میکروسکوپ فلورسنت (Olympus) در فیلتر دو رنگ FITC-PI مشاهده و مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته‌ها

در گروه تخمک پیر و جوان به ترتیب ۲۶۰ و ۲۸۰ تخمک متافاز II برای لقاح استفاده شد که ۱۸۰ (۶۹/۲درصد) و ۲۱۰ (۷۵درصد) جنین تشکیل گردید. در گروه تخمک پیر بازسازی شده نیز ۴۰۰ تخمک متافاز II موش جوان پس از تیمار هوخست بی‌هسته شده و ۲۱۵ تخمک (۵۴ درصد) زنده ماند و قابلیت پذیرش کاریوبلاست تخمک پیر را داشت. پس از انتقال کاریوبلاست و سر اسپرم، ۵۰ تخمک پس از ۱ تا ۲ ساعت از انتقال، زنده ماند و در (۴۱درصد) ۲۰ تخمک (۴۱ درصد) تزریق شده پس از ۴-۳ ساعت، پیش هسته نرو ماده مشاهده شد.

بررسی نتایج آرایش ساختمانی میکروتوبولی

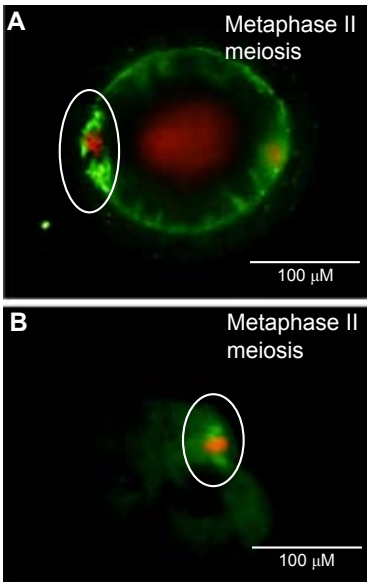
در متافاز II، دوک از حالت بطری شکل خارج و حالت Astral و دوکی دارد و نواحی سانتروزومی در دو قطب دوک کاملا مشخص است. دوک متافاز II مجاور قشر تخمک است و سهم کمی از فضای سلول را به خود اختصاص می‌دهد.

در این تحقیق که بیش از ۹۰ درصد تخمک‌های جوان به مرحله متافاز II رسیده بودند. ساختار طبیعی دوکی شکل متافاز II در تخمک جوان دیده شد (شکل ۱).

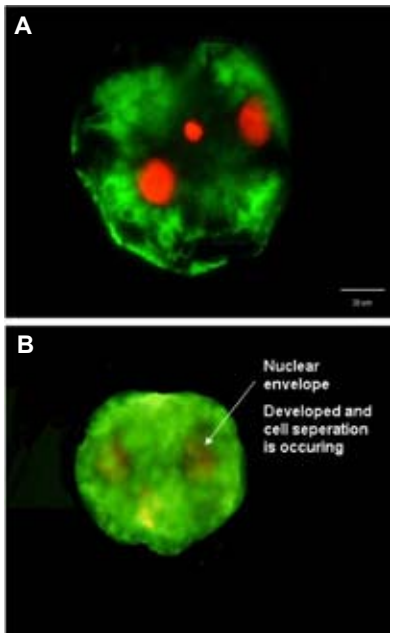
کروموزوم‌ها در تخمک‌های پیر متافاز II در خط متافازی قرار نگرفته و پراکنده بودند. رشته‌های دوک نیز به خوبی در ارتباط با کروموزوم‌ها نبوده و مساحت زیادی به خود اختصاص داده و تراکم توبولین ها نیز یکنواخت نبود.

۶-۴ ساعت پس از لقاح، پرونوکلئوس نر و ماده در تخمک به همراه دو جسم قطبی دیده می‌شود و در این مرحله دو پرونوکلئوس از قسمت قشر تخمک به سمت مرکز سلول حرکت می‌کند و با یکدیگر متحد می‌شود و اولین تقسیم میتوز شکل می‌گیرد.

حدود ۱۸ ساعت پس از تزریق hCG پرونوکلئوس نر و ماده به یکدیگر نزدیک می‌شود و آماده انجام تقسیم میتوزی هستند. در این زمان اندازه آسترهای حاصل از مراکز MTOC با پلیمریزه شدن توبولین‌ها افزایش می‌یابد و تعدادی از آنها دورتادور دو پرونوکلئوس قرار می‌گیرند. تعداد استرهای تخمک پیر در این مرحله بسیار بیش از تخمک‌های جوان است ولی اندازه کوچکتری داشته یا رشد کمی دارند. در حالی که بیشتر تخمک‌های لقاح یافته جوان در این مرحله استرهایی با پلیمریزاسیون بالا دارند که کاملا اطراف 2pn را احاطه کرده‌اند و آماده تشکیل دوک میتوزی هستند (شکل ۲).



شکل ۱: ایمونوسیتوشیمی سازماندهی میکروتوبولی در تخمک جوان (A) و پیر (B). دوک‌های میوزی تخمک‌های جوان در مرحله متافاز II (A) و تخمک پیر (B) به رنگ سبز و ماده ژنتیکی به رنگ قرمز مشاهده می‌گردد.

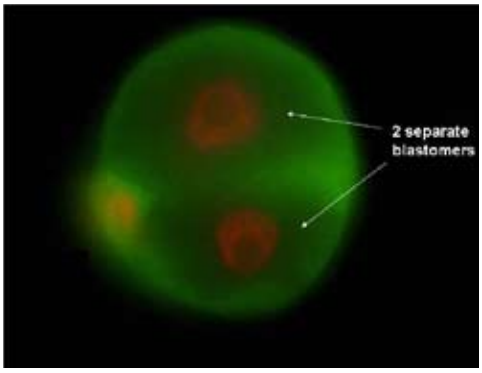


شکل ۲: ایمونوسیتوشیمی در جنین‌های حاصل از تخمک جوان (A) و پیر(B). دوک‌های آلفاتوبولین در جنین‌های حاصل از تخمک جوان (A) و تخمک پیر (B) به رنگ سبز مشاهده می‌گردد تراکم دوک‌ها در جنین‌های جوان بیشتر دیده می‌شود. هسته‌ها به رنگ قرمز مشاهده می‌گردد.

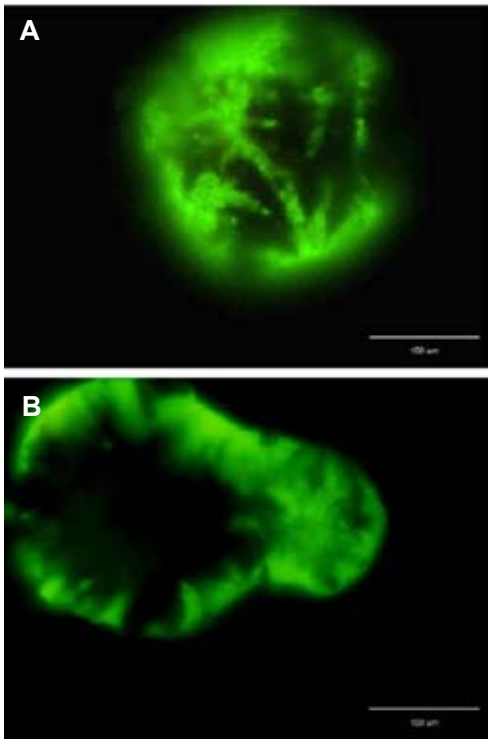
بیش از ۹۰ درصد سلول‌های تخم جوان تقسیم میتوزی سالمی انجام داده و دو سلولی شدند (شکل ۳).

در سلول‌های تخم پیر به دلیل آرایش نامنظم مراکز سنتز میکروتوبولی و همچنین ناهنجاری‌هایی که طی تقسیمات میوز به وجود آمده بود، اکثرا به صورت چند سلولی حاصل پارتنوژنیک به جای دو سلولی دیده شدند و به دلیل تقسیمات پی در پی، چندین سلول با اندازه‌های متفاوت دیده شدند.

تقسیم میتوز صحیح هم در سلول تخم پیر، همانند سلول تخم جوان صورت گرفته و دو سلولی نیز شکل گرفت.



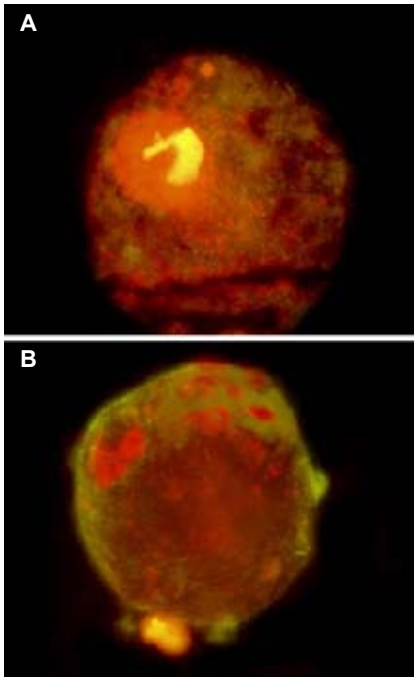
شکل ۳: ایمونوسیتوشیمی در جنین‌های دو سلولی حاصل از تخمک جوان. بلاستومرهای حاصل از تقسیم میتوزی مشاهده می‌گردد و دیواره بین سلولی در حال شکل گرفتن است.



شکل ۴: ایمونوسیتوشیمی سازماندهی میکروتوبولی در تخمک جوان بدون هسته. ماده ژنتیکی تخمک جوان خارج شد و تخمک بدون هسته با آنتی بادی آلفاتوبولین مورد مطالعه قرار گرفت، دو کهای آلفاتوبولین و آسترهای آن در ناحیه محیطی نشان داده می‌شود.

بررسی نتایج آرایش ساختمانی میکروتوبولی در جنین بازسازی شده

جایگزینی هسته تخمک پیر به همراه سر اسپرم به تخمک‌هایی که هسته آن خارج شده بود (شکل ۴)، نیم ساعت بعد انجام شد. ۵ تا ۶ ساعت بعد از انکوباسیون آنها، به مرحله 2pn رسیدند و ۱۰ جنین برای بررسی ایمونوسیتوشیمی فیکس و مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی نشان داد قطعات DNA کروموزومی در سیتوپلاسم پراکنده است و انسجام لازم را ندارد (شکل ۵). گرچه می‌توان مکان پرونوکلئوس نر و پرونوکلئوس ماده را از یکدیگر تفکیک کرد ولی هیچ یک از آنها در موقعیت و شکلی که در حالت طبیعی باید در آن وضعیت دیده شوند، قرار نگرفته بودند. استرها و رشته های پلیمریزه شده α- توبولین که هم اکنون باید به شکل متحد در سیتوپلاسم حد واسط دو پرونوکلئوس و اطراف پرونوکلئوس‌ها قرار می‌گرفتند، در جای خود حضور نداشتند. تنها رشته‌های پراکنده و نازک توبولینی، و ساختارهای توبولینی پراکنده با تراکم بیشتر در اطراف کروموزوم‌ها دیده شدند.



شکل ۵: ایمونوسیتوشیمی سازماندهی میکروتوبولی جنین حاصل از تخمک پیر بازسازی شده. کاریوبلاست تخمک پیر و سر اسپرم با تکنیک پیزو به تخمک جوان بی‌هسته منتقل گردیده که ماده ژنتیکی بصورت قرمز (A) و آلفاتوبولین به میزان کم در ناحیه به رنگ سبز محیطی دیده می‌شود.

بحث

در این تحقیق ۱۶-۱۲ ساعت پس از تزریق hCG تخمک‌های جوان و پیر که به مرحله متافاز II رسیده بودند مورد بررسی قرار گرفتند که در این مرحله یک جسم قطبی در نزدیکی محل تشکیل دوک متافازی وجود داشت. دوک تقسیم در مرحله متافاز II حالت دوکی شکل (Astral) دارد و کمی دوکی شده است و حضور نواحی سانتروزومی در دو قطب کاملا مشخص است.

لیو و همکارانش و هولیستون و همکارانش نیز دوک تقسیم مرحله متافاز I را در تخمک موش بطری شکل و متافاز II را به صورت دوکی شکل (Astral) گزارش کرده‌اند. دوک تقسیم متافاز II مجاور قشر سلول است و سهم کمی از فضای سلول را به خود اختصاص می‌دهد. در تخمک جوان بیش از ۹۰درصد تخمک‌ها به مرحله متافاز II رسیدند ولی در تخمک‌های پیر به علت تقسیم نامناسب دوک‌ها و ارتباط نادرست با کروموزوم‌ها تعداد کمتری به متافاز II رسیده و تخمک‌ها دچار پارتنوژنز شدند و به جای یک جسم قطبی کوچک چند سلول دیده شد. در تخمک‌های جوان، کروموزوم به خوبی در خط متافازی ردیف شده بود و در مواردی که در تخمک پیر در یک خط نبود و مساحت زیادی را به خود اختصاص داده بود به شدت پراکندگی ملاحظه می‌شد و توبولین‌ها از تراکم یکسانی برخوردار نبودند. با توجه به مشاهدات در میکروسکوپ فلورسنت ضخامت رشته‌های دوک در تخمک پیر با تخمک جوان تفاوت داشت.

تیلور و دابلس و همکارانشان نیز عدم اتصال

میکروتوبول‌ها را با کروموزوم‌های تخمک پیر در مرحله متافاز II گزارش کرده‌اند که نتایج تحقیق حاضر یافته‌های قبل را تایید می‌کند (۱۷، ۱۸). محققان قبلی گزارش کرده بودند که این عدم اتصال به کروموزوم‌ها و جدا نشدن کروموزوم‌ها در تخمک پیر یکی از علل ناباروری است (۹، ۱۰، ۱۷، ۲۳-۱۹).

پرونوکلئوس نر و ماده در تخمک پس از دومین تقسیم میوزی از قسمت قشری به ناحیه مرکز سلول حرکت می‌کند و پس از یکی شدن اولین تقسیم میتوزی صورت می‌گیرد.

در اطراف هر پرونوکلئوس، ساختار میکروتوبولی مجتمع می‌شود و اینها دو هسته را به یکدیگر نزدیک می‌کند و مرحله دو پیش هسته شکل می‌گیرد. در این مرحله تفاوتی در بررسی میکروسکوپی بین تخمک پیر و جوان دیده نمی‌شود به جز آنکه آسترهای فعال زیادتری در تخمک‌های پیر دیده می‌شود که احتمالا نشان دهنده فعالیت غیرمتعادل آسترها است. پس از نزدیک شدن، پیش هسته ها آماده تقسیم میتوزی هستند. آسترهایی که اطراف دو پیش هسته را گرفته‌اند با پلیمریزاسیون بالا، آماده تشکیل دوک میوزی هستند. در این مرحله، وقفه و تاخیری را در تخمک پیر با توجه به هم‌زمانی با تخمک جوان می‌توان دید. دوک میتوزی فضای بیشتری از سلول را نسبت به دوک میوزی اشغال می‌کند که در سلول تخم جوان دوک میتوزی به صورت منسجم تشکیل می‌شود و کروموزم‌ها در صفحه میانی قرار می‌گیرند در حالی که در سلول تخم پیر با توجه به استرهای متعدد، سازمان میکروتوبولی سالمی تشکیل نمی‌شود و به نظر می‌رسد کروموزوم‌ها در لابه‌لای دوک میتوزی غیرطبیعی به دام افتاده‌اند. تقسیم میتوز صحیح هم در سلول تخم پیر همانند سلول تخم جوان اتفاق می‌افتد و دو سلولی تشکیل می‌شود ولی از نظر زمانی در شکل‌گیری تا دو سلولی با تاخیر همراه است.

در جنین‌های بازسازی شده، جایگزینی ماده ژنتیکی پیر به سیتوپلاسم تخمک جوان پس از ۳۰-۱۵ دقیقه بعد از بی‌هسته کردن آن همراه با سر اسپرم به صورت تزریق درون سیتوپلاسمی انجام گرفت که حدود ۶-۵ ساعت بعد از انکوبه شدن، مرحله 2pn مشاهده شد. در بررسی ایمونوسیتوشیمی قطعات DNA در بستر سیتوپلاسم پراکنده بود و انسجام لازم را نداشت. اگر چه می‌توان محل پرونوکلئوس نر و ماده را از یکدیگر تشخیص داد ولی آسترها و رشته‌های پلیمریزه شده آلفاتوبولین، همانند جنین‌های جوان، در جای خود حضور ندارند و تنها رشته‌های پراکنده و نازک توبولینی تراکم بیشتر در اطراف کروموزوم ها دیده می‌شوند. محققان نیز گزارش کرده‌اند ساختمان ناهنجار کروموزومی و اسکلت سلولی یک تقسیم نامناسب یا مرگ سلول‌ها را به دنبال خواهد داشت (۱۱، ۱۷).

این وضعیت در جنین‌های بازسازی شده احتمالا به دلیل دفعات تزریق و دست‌کاری تخمک باشد. برونت و همکارانش نیز با بررسی میکروتوبول‌های تخمک بدون ماده ژنتیکی، به تعامل ماده ژنتیکی و اسکلت سلولی اشاره کرده‌اند (۲۴) که به نظر می‌رسد این تعامل به خوبی بین ماده ژنتیکی منتقل شده با سیتوپلاسم و میکروتوبول‌ها به وجود نیامده است. هرچند این عدم تعامل شاید به آسیب میکروتوبول‌ها و ساختار اسکلتی تخمک جوان به علت ورود سوزن باشد که تا بازسازی آن، هم‌زمانی لازم بین ماده ژنتیکی و شکل‌گیری دوک‌ها به وجود نیامده است.

نتیجه‌گیری

وضعیت قرارگیری رشته‌های توبولینی در جنین‌های بازسازی شده احتمالا با دفعات تزریق و دست‌کاری تخمک ارتباط دارد و تعامل خوبی بین ماده ژنتیکی منتقل شده و سیتوپلاسم و میکروتوبول‌ها به وجود نیامده و ممکن است یکی از علل کاهش میزان لقاح در این تخمک‌ها باشد.

References

1. Houliston E, Pickering SJ, Maro Bernard. Redistribution of microtubules and pericentriolar material during the development of polarity in mouse blastomers. The Journal of Cell Biol 1987; 104: 1299-1308
2. Schatten G, Simerly C, Schatten H. Microtubule configurations during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammalian fertilization, Cell Biol 1985; 82: 4152-4156
3. Stricker SA. Structural reorganization of the endoplasmic reticulum during egg maturation and fertilization. Semin Cell Dev Biol 2006; 17(2): 303-13
4. Steuerwald NM, Steuerwald MD, Mailhes JB. Post-ovulatory aging of mouse oocytes leads to decreased MAD2 transcripts and increased frequencies of premature centromere separation and anaphase. Mol Hum Reprod. 2005; 11(10): 623-630
5. Battaglia D, Goodwin P, Klein N, Soules MR. Influence of maternal age of meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. Hum Reprod 1996; 11: 2217-2222
6. Angell R. Aneuploidy in older women. Hum Reprod 1994; 9: 1199-1201
7. Stein Z. A woman's age, childbearing and child rearing. Am. J Epidemiol 1985; 121: 327-342
8. Hook E. Rates of chromosomal abnormalities at different maternal ages. Obstet Gynecol 1981; 58: 282
9. Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R, Keefe DL. The spindle observation and its relationship with fertilization after intra cytoplasmic sperm injection in living human oocytes. Fertil Stril 2001; 75(2): 348-353
10. Battaglia DE, Klein NA, Sooules MR. Changes in centrosomal domains during meiotic matruaton in the human oocytes. Mol Hum Reprod 1996; 2(11): 845-851
11. Sanfins A, Lee GY, Plancha CE, Overstrom EW, Albertini DF. Distinctions in Meiotic Spindle Structure and Assembly During In Vitro and In Vivo Maturation of Mouse Oocytes. Biol Reprod 2003; 69: 2059-2067
12. Cohen J, Scott R, Alikan M, Schimmel T, Munne S, Leveron J, et al. cytoplasmic transfer in mature human oocytes. Mol Hum Rerprod 1998; 4(3): 269-280
13. Shinozawa T, Mizutani E, Tomioka I, Kawahara M, Sasada H, Matsumoyo H, et al. Differential effect of recipient cytoplasm for microtubule organization and preimplantation

development in rat reconstituted embryos with two-cell unclear transfer. Mol Rep Develop 2004; 63: 313-318
14. Smith L, Alcivar A. Cytoplasmic inhertitance and its effects on development and performance. J. Reprod Fertil 1993; 48: 31-43
15. Ishikawa H, Endo A. Prolongation in ageing mice. J. Reprod Fertil 1996; 108: 107-170
16. Finn CA. Reproductive ageing and the menopause. Int. J. Dev. Biol 2001; 45: 613-617
17. Dobles M, Liberal V, Scott ML, Benezra R, Sorger PK. Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. Cell 2000; 101: 635-645
18. Hassold TJ. The origin of aneuploidy in humans. In Dellarco VL, Voytek PE, Hollaender A. Aneuploidy: Etiology and Mechanisms. Plenum Press, New York, 103-115
19. Taylor SS, Scott MI, Holland AJ. The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. Chromosome Res2004 ; 12: 599-616
20. Dominko T, Mitalipova M, Haley B, Beynan Z, Memili E, McKusick B. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos producted by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. Biol Reprod 1999; 60: 1496-1502
21. Palermo GD, Takeuchi T, Rosenwaks Z. Oocyte-induced haploidization. Reprod Biomed online 2002; 4(3): 237-242
22. Plachot M, DeGrouchy J, Junca AM, Mandelbaum J, Salat-Baroux J, Cohen J. Chromosome analysis of human oocyte and embryos: does delayed fertilization increase chromosome imbalance? Human Reprod 1988; 3: 125-127
23. Volarcik K, Sheean L, Goldfarb J, Woods L, Abdul Karim F, Hunt PA. The meiotic competence of matured human oocytes is influenced by donor age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary. Hum Reprod 1998; 13: 154-160
24. Brunet S, Maro B. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse