

Original Article

Effect of Ultrasound on Parthenogenic Activation of Mouse Oocyte

Nahid Nasiri, M.Sc.^{1,2}, Ahmad Vosough Taqi Dizaj, M.D.^{3*}, Firoozeh Ahmadi, M.D.³,
Hamid Gurabi, Ph.D.⁴, Darush Hamrahi, M.Sc.⁵, Poopak Eftekhari-Yazdi, Ph.D.^{1*}

1. Embryology Department, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran
2. Developmental Biology Department, University of Science and Culture, Tehran, Iran
3. Reproductive Imaging Department, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran
4. Genetics Department, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran
5. Iranian Center for Medical Lasers (ICML), Tehran, Iran

* Corresponding Addresses: P.O.Box: 19395-4644, 3. Reproductive Imaging Department, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran
P.O.Box: 19395-4644, Embryology Department, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran
Emails: vosough@royaninstitute.org
eftekhari@royaninstitute.org

Received: 27/Jul/2009, Accepted: 21/Dec/2009

Abstract

Objective: Artificial stimulation of mouse oocyte, in the absence of sperm contribution, can induce its parthenogenic activation of oocyte. Ultrasound is one of the newest methods for artificial activation of mammal oocytes, and its successful utilization in pig oocyte activation has been recently reported. Our objective was to assess the effect of ultrasound on mouse oocyte activation.

Materials and Methods: Our groups included 1 control group, 3 experimental groups consisting of 1, 2 and 3 repetitions of ultrasound exposure, and 3 sham groups handled similar to experimental groups but ultrasound system was off during treatments.

In experimental groups, adult female NMRI mice at the interval between pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) and human chorionic gonadotropin (hCG) injections, were exposed to continuous ultrasound with 3.28 MHz frequency and peak intensity (I_{pk}) = 355 mW/cm².

Sixteen hours after injection of hCG, the mice were euthanized and their oocytes were collected; thereafter, parthenogenic oocytes were counted.

Results: Data analysis using the ANOVA test shows a significant increase in the number of parthenogenic oocytes in mice with 3 overall exposures to ovarian ultrasound ($p < 0.05$).

A significant decrease in the number of metaphase II (MII) oocytes numbers was also seen in mice treated with ultrasound ($p < 0.05$).

Conclusion: Ultrasound is thought to induce pores generation in oocyte membranes and provides an easier inward transport of Ca⁺⁺ into oocytes. This phenomenon can induce meiosis resumption in immature oocytes. With increased exposure repetitions from 1 to 3 times and greater Ca⁺⁺ arrival, oocytes can be parthenogenetically activated.

Keywords: Ultrasound, Parthenogenesis, Mouse, Oocyte

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 2, Summer 2010, Pages: 165-172

اثر امواج فراصوتی بر فعال‌سازی پارتنوژنیک تخمک موش

ناهید نصیری^۱، M.Sc.؛ احمد وثوق تقی دیزج^۲، M.D.؛ فیروزه احمدی^۳، M.D.؛ حمید گورابی^۴، Ph.D.؛ داریوش همراهی^۵، M.Sc.؛
پوپک افتخاری یزدی^{۱*}، Ph.D.

۱. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه جنین‌شناسی، تهران، ایران
۲. دانشگاه علم و فرهنگ، گروه زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران
۳. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه تصویربرداری تولیدمثل، تهران، ایران
۴. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه ژنتیک، تهران، ایران
۵. جهاد دانشگاهی دانشکده علوم پزشکی تهران (JDTUMS)، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی (ICML)، تهران، ایران

* آدرس نویسندگان مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۴۶۴۴، پژوهشکده رویان، گروه تصویربرداری تولیدمثل
ایران، تهران، صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۴۶۴۴، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه جنین‌شناسی
پست الکترونیک: Emails: vosough@royaninstitute.org
eftekhari@royaninstitute.org

دریافت مقاله: ۸۸/۵/۵، پذیرش مقاله: ۸۸/۹/۳۰

مکیده

* هدف: بررسی اثر امواج فراصوت در فعال‌سازی تخمک موش

* مواد و روش‌ها: موش‌های بالغ نژاد NMRI با سن ۶ تا ۸ هفته، در قالب ۷ گروه آزمایشی (۳ گروه تحت تیمار تابش با امواج فراصوت، ۳ گروه شم، و یک گروه کنترل) قرار گرفتند. موش‌های تحت تیمار تابش در فاصله بین تزریق HCG و Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) بین ۱ تا ۳ مرتبه، تحت تابش امواج پیوسته فراصوت با فرکانس ۳/۲۸ مگاهرتز و شدت بیشینه $I_{pk} = 355$ میلی‌وات بر سانتی‌متر مربع واقع شدند، ۱۶ ساعت پس از تزریق hCG موش‌ها کشته شده و پس از جمع‌آوری تخمک‌ها، تخمک‌های پارتنوژنیک شمارش شدند.
* یافته‌ها: آنالیز داده‌ها با استفاده از تست ANOVA، افزایش معنی‌دار تعداد تخمک‌های پارتنوژنیک، پس از ۳ مرتبه تابش را نشان می‌دهد، در حالی که تعداد تخمک‌های بالغ در گروه‌های تحت تیمار تابش به صورت معنی‌داری کاهش یافته‌اند.
* نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد فراصوت با ایجاد منافذی در غشای تخمک‌ها و ورود کلسیم به داخل سیتوپلاسم، سبب تسریع فرایند از سرگیری میوز در تخمک‌های نارس شده و با افزایش دفعات تابش تا ۳ مرتبه و ورود بیشتر کلسیم، مقدمات لازم جهت فعال شدن پارتنوژنیک تخمک فراهم می‌شود.

* کلیدواژگان: امواج فراصوت، پارتنوژن، تخمک موش

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات: ۱۷۲-۱۶۵

مقدمه

فعال‌سازی متابولیسم تخمک طی فرایند لقاح به واسطه یک سری وقایع که تحت عنوان وقایع اولیه و ثانویه دسته‌بندی می‌شوند، انجام می‌شود. حوادث اولیه شامل آگروسیتوز گرانول‌های قشری است که سبب تغییر ماهیت گلیکو پروتئین‌های پوسته تخمک (زونا پلوسیدا) شده و مانع از پلی‌اسپرمی می‌شود، وقایع ثانویه شامل رهایی تخمک از مرحله توقف در متافاز تقسیم ۲ میوز است که حاصل آن آزاد شدن دومین جسم قطبی، تشکیل و مهاجرت پیش‌هسته‌ها، آغاز ترجمه پیش‌هسته‌های مادری و نیز سنتز مولکول DNA جدید است (۱) که حاصل مجموع این واکنش‌ها فعال شدن تخمک است. تمامی وقایع یاد شده از افزایش گذرا و تکرار شونده غلظت کلسیم داخل سلولی نشأت می‌گیرد (۲).

اگر بخواهیم رویدادهایی را که در جریان لقاح اتفاق می‌افتند، بدون دخالت اسپرم شبیه‌سازی کنیم، باید از تکنیک‌های تحریک مصنوعی به منظور افزایش غلظت درون سیتوپلاسمی کلسیم و به عبارت دیگر فعال‌سازی پارتنوژنیک تخمک بهره بگیریم. یکی از انواع پارتنوژن (بکرزایی)، تشکیل جنین از یک گامت ماده، بدون مشارکت ژنتیکی گامت نر است که این گونه جنین‌ها به موجود بالغ تبدیل نمی‌شوند (۳). بنابراین با توجه به توضیحات ارائه شده، فعال‌سازی پارتنوژنیک تخمک بالغ (تخمکی که از لحاظ چرخه سلولی میوزی در مرحله

متافاز ۲ متوقف شده است) می‌تواند به جای لقاح با اسپرم، به منظور آماده‌سازی تخمک برای انتقال هسته و انجام شبیه‌سازی، مورد استفاده قرار بگیرد (۴). انواع روش‌های فعال‌سازی تخمک در پستانداران به چند دسته عمده تقسیم می‌شوند که عبارتند از: تحریک فیزیکی که این تحریک ممکن است مکانیکی (سوراخ کردن پوسته تخمک)، دمایی (گرم و سرد کردن) و یا الکتریکی باشد، تحریک شیمیایی که عبارت است از قرار دادن تخمک بالغ (تخمکی که از لحاظ چرخه سلولی میوزی در مرحله متافاز ۲ متوقف شده است) در محیط‌های حاوی یون‌های Ca^{++} و Mg^{++} آزاد (۵)، هیالورونیداز (۶)، اتانول (۷)، یونفورهای کلسیم (۸)، سیکلو هگزامید (۹)، کلرید کلسیم (۱۰)، مهارکننده‌های سنتز پروتئین (۱۱) و عواملی که آبشار G پروتئین/فسفولیپاز C را تحریک می‌کند (۱۲). در بین روش‌های یاد شده استفاده از پالس الکتریکی از همه رایج‌تر است.

لازم به یادآوری است که پیشروی جنین‌های شبیه‌سازی شده حاصل از انتقال هسته بسیار زمان بر است، لذا کیفیت تخمک‌ها و استفاده از تکنیک ساده و کارا اهمیت زیادی دارد (۱۳).

در حال حاضر، اکثر مطالعات بازده شبیه‌سازی را در سطح تولد جنین‌های حاصل بین ۰ تا ۳ درصد گزارش کرده‌اند. این بازده پایین، استفاده از تکنیک شبیه‌سازی را در کلینیک و دامپروری محدود کرده است. از این رو در این تکنیک پایه‌گذاری پروتوکول‌های جدید و

اثر امواج فراصوت بر فعال‌سازی تخمک

به نام مولد یا پروب انجام می‌شود. در مطالعه حاضر، موج‌دهی به تخمدان موش‌ها توسط یک پروب استوانه‌ای با قطر ۴ سانتی‌متر (Phyaction 190i, Germany) با مد پیوسته و فرکانس $0.18 \pm 3/28$ مگاهرتز انجام شد. در این دستگاه، امواج فراصوت بر اساس پدیده پیزو الکتریک معکوس به وجود می‌آید، در واقع این دستگاه قادر است صورتی از انرژی (انرژی الکتریکی) را به صورتی دیگر (انرژی مکانیکی) تبدیل کند. دسته امواج فراصوت همگن نیست و به طور طبیعی شدت آن با فاصله گرفتن از مولد تغییر می‌کند. با توجه به این ویژگی، مولد امواج فراصوت دارای دو میدان نزدیک (Fresnel Field) و میدان دور (Frunhofer Field) است که شدت امواج فراصوت در این دو میدان غیریکنواخت است، ناحیه انتقال و در واقع حد واصل بین این دو منطقه، ناحیه‌ای موسوم به Last Axial Maximum (LAM) است که در این ناحیه به دلیل تداخل سازنده امواج، موج فراصوت بیشترین و یکنواخت‌ترین شدت را دارد. با توجه به این مطلب در مطالعه حاضر به منظور محاسبه دقیق‌تر شدت، تخمدان در ناحیه LAM دستگاه قرار گرفت. شکل ۱ سیستم تابش طراحی شده در این مطالعه را نشان می‌دهد، جنس این سیستم از پرسپکس است که مناسب با جهت جذب امواج صوتی اضافی و به حداقل رساندن امواج بازگشتی است. محفظه استوانه‌ای سیستم از آب مقطر بدون گاز پر شده است، پروب فراصوت در انتهای سمت چپ محفظه و حیوان به صورت عمودی در انتهای سمت راست محفظه قرار می‌گیرد، طوری که ناحیه کمر حیوان در تماس با انتهای محفظه باشد. مکان و حالت قرارگیری موش در دستگاه به واسطه اندازه‌گیری‌های دقیق و میلی‌متری طوری تعیین شده است که تخمدان در مرکز ناحیه LAM یعنی در فاصله ۲۵/۵ سانتی‌متری پروب قرار بگیرد. برای این منظور از قطعات مکعبی شکل یونولیتی برای تثبیت موش بر روی آن استفاده شده است (شکل ۱).

موفق‌تر لازم به نظر می‌رسد.

طی رسیدن به این هدف در مطالعات اخیر موفقیت استفاده از امواج فراصوت در فعال‌سازی پارتنوژنیک تخمک بالغ خوک و تکوین آن تا مرحله تولد بچه خوک‌های سالم گزارش شده است (۱۴). امواج فراصوت به دسته‌ای از امواج صوتی گفته می‌شود که دارای فرکانسی بالاتر از محدوده شنوایی انسان هستند. این امواج، مکانیکی بوده و برای انتشار به یک محیط الاستیک و قابل انعطاف نیاز دارد. یکی از آثار مکانیکی فراصوت به هنگام عبور از مواد و یا برهم‌کنش با آن، تشکیل حباب در محیط‌های سیال و ایجاد امواج شوکی یا ضربه‌ای (Shock Wave) است که این امواج در اثر ترکیب حباب‌های در حال نوسان در محیط اطراف سلول پدید می‌آیند و موجب وارد آمدن ضرباتی به غشای پلاسمایی سلول‌ها شده و در نهایت منافذی را در آن به وجود می‌آورند (۱۵). بر اساس گزارشات موجود، یون کلسیم می‌تواند از طریق منافذ ایجاد شده با امواج فراصوت در حین تابش، وارد سلول شود که این امر سبب افزایش غلظت درون سلولی کلسیم شده و در نهایت می‌تواند منجر به فعال شدن تخمک شود (۱۶).

در رابطه با موش، گزارشی مبنی بر استفاده از این امواج در فعال‌سازی پارتنوژنیک تخمک متافاز ۲ وجود ندارد، لذا مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر امواج فراصوت در تحریک مصنوعی و فعال‌سازی پارتنوژنیک تخمک موش طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه بر اساس مصوبه کمیته اخلاق پزشکی پژوهشکده رویان و رعایت مقررات استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است.

طراحی سیستم تابش

تولید امواج فراصوت در دستگاه فراصوت به وسیله ابزاری



شکل ۱: دستگاه طراحی شده جهت موج‌دهی به موش، تصاویر کوچک سمت راست (پایین تصویر) وضعیت قرار گرفتن موش در دستگاه را نشان می‌دهد.

محاسبه شدت امواج فراصوت

اندازه‌گیری شدت امواج فراصوت در این مطالعه به کمک سه تکنیک مختلف (تکنیک فشار تابشی، روش رنگ و کاغذ و اندازه‌گیری توسط دستگاه هایدروفون (Hydrophone) انجام شده است. از تکنیک فشار تابشی یا (Radiation Force) به منظور اندازه‌گیری توان صوتی، استفاده گردید. روش رنگ و کاغذ برگرفته از روش مورد استفاده توسط جرج کاسف (۱۷) است که به کمک یک دانسیتومتر (Kodak, Japan) جهت تعیین شدت بیشینه (Peak Intensity; I_{pk}) مورد استفاده قرار گرفت و در نهایت با استفاده از یک دستگاه هایدروفون سوزنی (Needle, England) از این مطالعه برابر با 355 میلی‌وات بر سانتی‌متر مربع، و شدت میانگین ($I_{average}$) برابر با $99/69$ میلی‌وات بر سانتی‌متر مربع تعیین شد.

با این تفاوت که هنگام قرارگیری موش‌های گروه شم در سیستم موج‌دهی، دستگاه فراصوت خاموش بود و هیچ موجی منتقل نشد. در گروه کنترل، به استثنای تحریک تخمدان‌ها به وسیله تزریق هورمون، موش‌ها تحت هیچ تیماری (بیهوشی، تابش و ...) قرار نگرفتند.

به منظور تابش، ابتدا موش‌ها بیهوش شدند و این کار با تزریق درون صفاقی 1 میلی‌گرم کتامین (Ketamin) و 1 میلی‌گرم زایلزین (Xylazine) (Alfasan-WOC-RDEN, Holand) به صورت رقیق شده در $4/6$ میلی‌لیتر آب مقطر و در ازای هر 30 گرم موش $0/2$ میلی‌لیتر، انجام شد.

حدود ناحیه تخمدان موش‌ها در دو طرف ستون فقرات از قبل در یک مطالعه پایلوت مشخص شد و موهای این ناحیه به طور کامل از ریشه کنده شد و در نهایت پس از مالیدن حدود $0/5$ میلی‌لیتر از ژل سونوگرافی بر روی ناحیه فاقد مو، موج‌دهی انجام شد.

جمع‌آوری جنین‌های پارتنوژنیک

در حدود 16 ساعت پس از تزریق hCG، موش‌های ماده به روش قطع نخاع گردنی کشته شده و اویداکت‌های آنها خارج گردید. سپس به صورت مکانیکی با استفاده از سوزن، اویداکت پاره شد و توده COC‌ها (کمپلکس کومولوس اووفروس-اووسایت) در محیط T_6 حاوی 4 درصد سرم گاوی (Bovine Serum Albumin; BSA, Sigma, A-3311) جمع‌آوری شد. پس از بیناژهای مداوم به وسیله پیست پاستور با دهانه مناسب و جدا شدن سلول‌های گرانولوز از اطراف تخمک، تعداد تخمک‌هایی که متحمل پارتنوژن شده و به صورت جنین دو سلولی بودند، جدا شده و شمارش شدند. به منظور بررسی نرمال بودن گروه‌ها از تست Kolmogorov-Smirnov و برای بررسی اختلاف واریانس‌ها از تست Leven استفاده شد. از تست ANOVA جهت آنالیز واریانس و از تست Tukey نیز به منظور مقایسه دو به دو گروه‌ها، استفاده شد. نتایج آماری گزارش شده دارای سطح اطمینان 95 درصد (سطح خطای $0/05$)، هستند.

یافته‌ها

در هر 7 گروه، 30 سر موش مورد مطالعه قرار گرفت که از این تعداد 2 موش ماده در گروه شم 1 و یک موش در گروه US_3 بعد از تزریق مواد بیهوشی مرده و از مطالعه خارج شدند. بررسی داده‌ها نشان می‌دهد که تعداد تخمک‌های متافاز 2 در گروه‌های تحت تیمار تابش با امواج فراصوت در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم مربوطه به صورت معنی‌داری کاهش پیدا کرده است و تنها بین گروه US_3 و گروه شم مربوطه این تفاوت معنی‌دار نیست ($p > 0/05$). گروه کنترل در مقایسه با سایر گروه‌ها بیشترین تعداد تخمک‌های متافاز 2 را داراست و اختلاف آن با همه گروه‌ها به استثنای شم 1 و شم 2 معنی‌دار است ($p < 0/05$) (شکل ۲).

از طرف دیگر، همان‌طور که آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد، تعداد تخمک‌های پارتنوژنیک در گروه‌های US (تحت تیمار تابش) در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم سیر صعودی دارد. به عبارت دیگر، با تابش به تخمدان‌ها و افزایش تکرار موج‌دهی، به تعداد تخمک‌های پارتنوژنیک افزوده می‌شود، اما این افزایش تنها در گروه US_3 معنی‌دار است ($p < 0/05$) (شکل ۳).

کمترین تعداد تخمک‌های پارتنوژنیک نیز به گروه‌های شم اختصاص دارد در مقایسه با گروه‌های کنترل و US مربوطه - همان‌طور که اشاره شد - این کاهش بین دو گروه US_3 و شم 3 معنی‌دار است ($p < 0/05$) (شکل ۳).

حیوانات مورد مطالعه

در این مطالعه از موش‌های ماده نژاد NMRI با سن 6 تا 8 هفته، تهیه شده از انستیتو پاستور (کرج - ایران) استفاده شد. موش‌ها در اتاق مخصوص حیوانات با دما و رطوبت مناسب و تحت شرایط 12 ساعت نور و 12 ساعت تاریکی نگهداری شدند. تعداد کل موش‌های بررسی شده در این مطالعه در حدود 200 سر می‌باشد و به عبارت دیگر در هر گروه 28 تا 30 موش بالغ ماده بررسی شد. حجم مطالعه بر اساس بررسی مطالعات مشابه و طبق نظر کارشناس آمار تعیین شد.

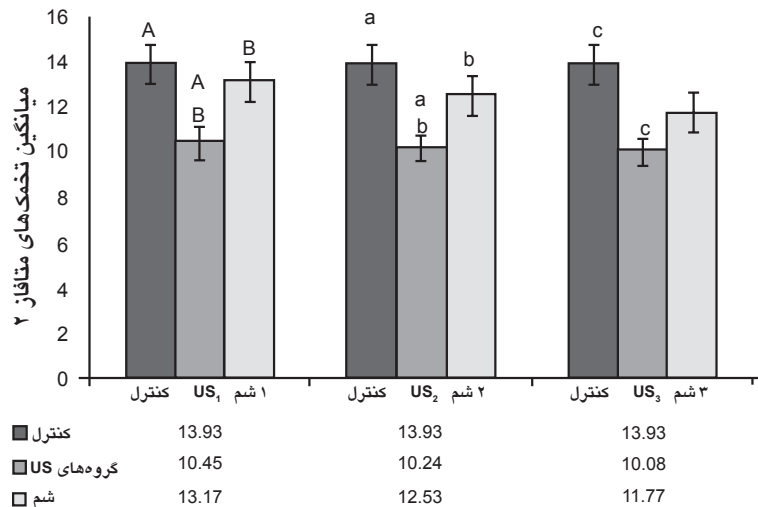
تحریک تخمک‌گذاری

به منظور تحریک تخمک‌گذاری در موش‌های بالغ با وزن تقریبی $30-25$ گرم، ابتدا به میزان $7/5$ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر گنادوتروپین سرم مادیان حامله Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) (Organon, Holand) به صورت درون صفاقی (Intraperitoneal; ip) تزریق شد، این هورمون سبب تحریک رشد تعداد زیادی از تخمک‌ها به صورت همزمان می‌شود. در مرحله بعد، پس از 48 ساعت، تزریق درون صفاقی گنادوتروپین کوریونی انسان (Human Corionic Gonadotropin; hCG) (Organon, Holand) به میزان $7/5$ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر صورت گرفت. تزریق hCG سبب آزاد شدن تخمک‌هایی می‌شود که در قبل تحت تاثیر PMSG رشد کرده بودند.

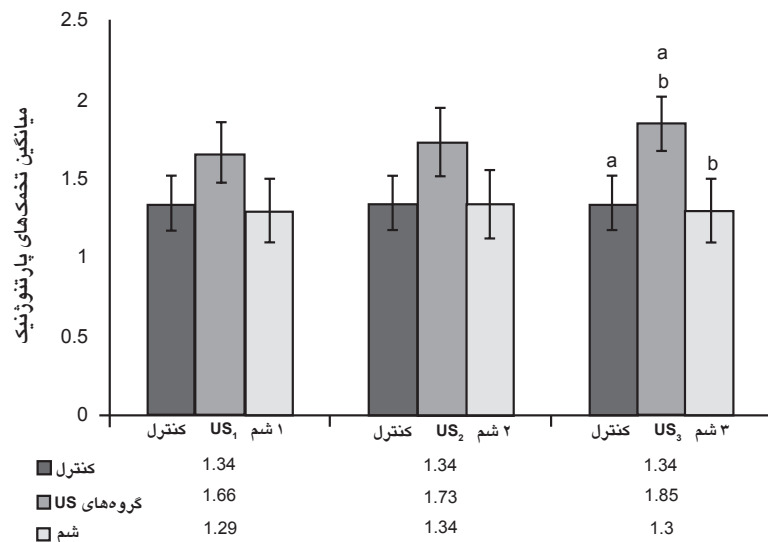
تابش امواج فراصوت

در فاصله زمانی بین تزریق PMSG و hCG، موش‌ها مورد تابش امواج فراصوت قرار گرفتند. بدین ترتیب به منظور بررسی اثر تکرار دفعات تابش بر میزان فعال‌سازی پارتنوژنیک تخمک‌ها، 3 گروه آزمایشی تعریف شد.

گروه US_1 (Ultrasound 1): یک بار تابش به تخمدان موش‌ها در روز اول (روز تزریق PMSG) به مدت 5 دقیقه، گروه US_2 (Ultrasound 2): دو مرتبه تابش در روزهای اول و سوم (روز تزریق hCG) و هر بار به مدت 5 دقیقه، گروه US_3 (Ultrasound 3): سه مرتبه تابش در روزهای اول، دوم و سوم و هر بار به مدت 5 دقیقه، همچنین به منظور حذف عوامل مداخله‌گر در مطالعه، برای هر گروه آزمایشی، یک گروه شم جداگانه تعریف شد. در هر گروه شم، تمامی تیمارهای اعمال شده در موش‌های گروه آزمایشی مربوطه انجام شد،



شکل ۲: نمودار مقایسه میانگین تخمک‌های متافاز ۲ بین گروه‌های US با گروه‌های کنترل و شام. میله‌ها نشان دهنده SE می‌باشند و معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ است. در هر گروه ستون‌های دارای حروف مشابه، نسبت به هم معنی‌دار هستند.



شکل ۳: نمودار مقایسه میانگین تعداد تخمک‌های پارتنورژنیک بین گروه‌های US با گروه‌های کنترل و شام. میله‌ها نشان دهنده SE می‌باشند و معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ است. ستون‌های دارای حروف مشابه، نسبت به هم معنی‌دار هستند.

گزارشات دیگری مبنی بر ورود یون کلسیم و افزایش غلظت درون سلولی آن در تخمک از طریق منافذ ایجاد شده با امواج فراصوت در حین موج‌دهی وجود دارد که در نهایت موجب فعال شدن تخمک شده است (۱۷). از این رو با توجه به گزارشات موجود به منظور بررسی اثر امواج فراصوت بر نحوه بلوغ و پارتنورژن تخمک موشی، به توضیح نقش کلسیم در فرایندهای یاد شده می‌پردازیم. در تخمک‌های نارس موش، مرحله شکسته شدن هسته زایا (Germinal Vesicle Break Down; GVBD) حدود ۲ ساعت پس از آزاد شدن از فولیکول اتفاق می‌افتد (۱۹) که این زمان در گاو ۹ ساعت (۲۰) و در خوک ۱۲ تا ۱۶ ساعت (۲۱) است. بنابراین با در نظر گرفتن سیگنال کلسیمی به عنوان فاکتور عمومی مورد نیاز

بحث

بر اساس گزارشات متعدد، یکی از آثار مکانیکی فراصوت به هنگام برهم‌کنش با مواد، تشکیل حباب در محیط‌های سیال و ایجاد امواج شوکی (Shock Wave) است. در واقع این امواج شوکی در اثر ترکیدن حباب‌های در حال نوسان در محیط اطراف سلول پدید می‌آیند و موجب وارد آمدن ضرباتی به غشای پلاسمایی سلول‌ها شده و در نهایت منافذی را در آن به وجود می‌آورند (۱۸).

ایجاد منافذ یاد شده در غشای سلول‌ها در حین تابش، ورود مولکول‌های مختلف را از محیط خارج سلول به داخل آسان‌تر می‌کند، از طرف دیگر اکثر سلول‌ها قادر به ترمیم صدمات وارد بر غشا و بستن منافذ، بلافاصله پس از اتمام تابش هستند (۱۵).

برای GVBD، به احتمال تخمک‌های موشی، چنین سیگنالی را قبل از آزاد شدن از فولیکول می‌گیرند (۲۱). در مطالعه حاضر، موج‌دهی به تخمدان موش‌ها در هر ۳ گروه تحت تیمار تابش در فاصله بین تزریق hCG و PMSG انجام شد. بنابراین تخمک‌های نارس موشی در مرحله قبل از آزاد شدن از فولیکول و در زمان ارتباط با سلول‌های گرانولوزای مادری، تحت تیمار با امواج فراصوت قرار گرفته‌اند.

به طور معمول، تخمک‌های ناری که در مرحله دیاکینز پروفاز ۱ میوز متوقف شده‌اند و زونا پلوسیدای سالمی دارند، با سلول‌های گرانولوزای اطراف از طریق اتصالات شکافدار مرتبط هستند (۲۳). حضور سلول‌های گرانولوزا می‌تواند توانایی تخمک‌ها را در انجام بلوغ میوزی نرمال تحت تاثیر قرار دهد (۲۴). مشاهده شده است که گاهی در غیاب یون کلسیم، اتصالات شکافدار بین تخمک و سلول‌های گرانولوزای مادری بسته شده و منجر به اختلالات یونی و در نهایت مرگ سلولی می‌گردد (۲۳). همچنین مشاهدات میکروسکوپ کانفوکال، تبادل کلسیم بین تخمک و سلول‌های کومولوسی اطراف را تایید کرده است (۲۵).

به طور معمول در جریان بلوغ تخمک‌های موشی، القای موج هورمون LH (Luteinize Hormone) سبب شروع فعالیت فسفوانیزیتاینها در سلول‌های لوتئال و گرانولوزا و در نهایت آزادسازی کلسیم در این سلول‌ها می‌شود، به احتمال این کلسیم آزاد شده، سیگنال مثبتی با منشا سلول‌های فولیکولی است که به تخمک منتقل و سبب از سرگیری میوز متوقف شده در دیاکینز پروفاز می‌شود (۲۵). تایید این مطلب آن است که حذف کلسیم خارج سلولی از محیط اطراف فولیکول‌های آنترال جدا شده از تخمدان، در حضور موج LH نیز بلوغ میوزی تخمک را مهار می‌کند (۲۶) و بر عکس، تیمار این فولیکول‌ها با یونوفورهای کلسیم، از سرگیری میوز را تحریک می‌کند (۲۷). بنابراین به نظر می‌رسد عاملی که بتواند سبب تبادل کلسیم از سلول‌های فولیکولی اطراف به سمت تخمک نارس شود، شرایطی را مشابه با القای موج LH در تخمک به وجود آورده و سبب از سرگیری میوز می‌شود. به عنوان مثال فراصوت می‌تواند با ایجاد منافذ یاد شده در غشای سلول‌های گرانولوزا و تخمک سبب ورود کلسیم از سلول‌های فولیکولی اطراف به تخمک شود که این شرایط، مشابه با شرایطی است که پس از القای موج LH به واسطه تزریق hCG در روند معمول از سرگیری میوز در تخمک اتفاق می‌افتد. به این ترتیب ممکن است به هنگام موج‌دهی فولیکول‌ها، حوادثی مشابه با زمان ترشح LH اتفاق بیفتد و تخمک‌ها بتوانند قبل از تزریق hCG و القای LH، تقسیم میوز خود را تا مرحله متافاز ۲ پیش ببرند.

از سوی دیگر، با تحریکات مصنوعی می‌توان حوادثی را که در هنگام ورود اسپرم به تخمک بالغ اتفاق می‌افتد، شبیه‌سازی کرد، به گونه‌ای که تخمک بتواند بدون انجام لقاح و به صورت پارتنوژن فعال شده و به سمت تشکیل جنین پیش برود (۱۷).

گفته می‌شود فاکتور پیش برنده متافاز (Maturation Promoting Factor; MPF) کلید تنظیمی برای از سرگیری میوز پس از توقف تخمک در مرحله متافاز میوز است (۲۸). MPF به عنوان بخش هتروادیمی دو زیر واحد کاتالیک و تنظیمی که به ترتیب *cdc2* و سایکلین B نامیده می‌شوند، شناخته می‌شود (۲۹). در جریان لقاح، ورود اسپرم سبب یک سری نوسانات در غلظت درون سلولی تخمک می‌شود که این نوسانات غلظتی به واسطه تخریب وابسته به کلسیم سایکلین B منجر به غیرفعال شدن MPF می‌شود (۳۰).

انواع روش‌های تحریک مصنوعی مثل تیمار محیط حاوی تخمک با یونوفورهای کلسیم (۸)، تزریق کلسیم به داخل سیتوپلاسم (۱۰) و تحریک الکتریکی (۳۱)، از طریق افزایش غلظت سیتوپلاسمی کلسیم، قادر به فعال‌سازی پارتنوژنیک تخمک بالغ است (۱۷). در این بین، تحریک الکتریکی به عنوان رایج‌ترین روش جهت از سرگیری چرخه سلولی میوزی تخمک پس از انتقال هسته سلول‌های سوماتیکی شناخته می‌شود که سبب ایجاد منافذی در غشای پلاسمایی تخمک شده و جذب و ورود کلسیم را از محیط خارج سلولی آسان‌تر می‌کند و به این ترتیب سبب افزایش غلظت درون سلولی کلسیم در تخمک و فعال شدن آن می‌شود (۳۲).

به تازگی گزارش‌هایی مبنی بر توانایی امواج فراصوت در فعال‌سازی موفق تخمک موش و پیش روی جنین‌ها تا تولد بچه خوک سالم، ارائه شده است. غلظت خارج سلولی کلسیم به هنگام موج‌دهی تخمک با امواج فراصوت، عامل مهمی در فعال شدن تخمک است و به صورت مستقیم میزان کلسیمی را که وارد سلول می‌شود، تحت تاثیر قرار می‌دهد (۳۳).

بنابراین به نظر می‌رسد که تخمک خوک به واسطه ورود کلسیم از طریق منافذ ایجاد شده با امواج فراصوت فعال شده است (۱۷). احتمالاً مکانیسمی که به واسطه آن امواج فراصوت سبب فعال شدن تخمک می‌شود، مشابه مکانیسمی است که بعد از به کار بردن پالس الکتریکی اتفاق می‌افتد (۳۳)؛ یعنی همان تشکیل منافذ. بر اساس آنالیز داده‌ها در مطالعه حاضر، تنها در گروه US_3 افزایش معنی‌دار در تعداد تخمک‌های پارتنوژنیک وجود دارد؛ گروه US_3 گروهی است که در آن بیشترین تکرار موج‌دهی را یعنی در ۳ روز متوالی (حد فاصل بین تزریق PMSG و hCG) داشتیم.

مکانیسم پیشنهادی برای توضیح نتیجه به دست آمده این است که به احتمال امواج فراصوت قادرند همانند LH موجی از کلسیم را از طریق منافذ به وجود آمده در تخمک ایجاد کنند، به این ترتیب با افزایش غلظت درون سلولی تخمک، میوز متوقف شده در دیاکینز پروفاز از سر گرفته شده و تا مرحله متافاز ۲ (تخمک بالغ) پیش می‌رود. در این صورت ممکن است بلوغ تخمک‌ها در گروه‌های US_2 زودتر از سایر گروه‌ها (شم و کنترل) اتفاق بیفتد. از طرفی، در گروه US_3 موج‌دهی بیش از دو گروه دیگر تکرار می‌شود و دور از ذهن نیست که پس از بلوغ تخمک‌ها، با تکرار موج‌دهی و شکل‌گیری منافذ بیشتر در غشا، کلسیم مورد نیاز برای فعال شدن تخمک از محیط خارج سلولی وارد تخمک شده و به این ترتیب با افزایش غلظت سیتوپلاسمی کلسیم، تخمک به صورت پارتنوژنیک فعال شود. از طرف دیگر، همان‌طور که پیش‌تر در قسمت نتایج اشاره شد، تعداد تخمک‌های متافاز ۲، در گروه‌های تحت تیمار موج دهی (US)، در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم، کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد، در واقع این نتیجه با نتایجی که هینر و همکارانش در سال ۱۹۸۹ (۳۴) گزارش کردند، مطابقت می‌کند. آنها پس از انجام مطالعه خود اعلام کردند که تابش فراصوت به واسطه بالا بردن موضعی دمای بافت تخمدان، سبب کاهش میزان تخمک‌گذاری می‌شود. ما نیز در مطالعه‌ای نشان دادیم که موج‌دهی به تخمدان موش‌ها با مد پیوسته و با فرکانس، شدت و مدت زمان مشابه با مطالعه حاضر، در محیط *in vivo*، سبب افزایش $1/171 \pm 0/13$ درجه‌ای دمای تخمدان می‌شود (اطلاعات نشان داده نشده است). البته این میزان افزایش دما طبق گزارشات متعدد بی‌خطر اعلام شده است. به هر حال، فاکتوری که تحت تاثیر امواج فراصوت قرار می‌گیرد تعداد

سوماتیکی که نیازمند فعال شدن تعداد زیادی از جنین‌های شبیه‌سازی شده است، احساس می‌شود (۱۴). به هر حال مکانیسم حقیقی این نتایج نامعلوم است و ضرورت مطالعات بیشتر در این رابطه به ویژه کاربرد آن در مدل *in vitro* ایجاب می‌شود.

تقدیر و تشکر

از آقایان، دکتر محمد جواد ابوالحسنی (دانشگاه علوم پزشکی تهران)، دکتر محمد باقر شیران (دانشگاه علوم پزشکی ایران) و خانم دکتر منیژه مختاری (دانشگاه تربیت مدرس) که ما را در انجام این مطالعه همراهی کردند، سپاسگزاریم. هزینه انجام این طرح توسط پژوهشکده رویان تامین شده است.

References

1. Nulcitelli R. How do sperm activate eggs? In current topics in Developmental Biology. Bode HR (ed). New York: Academic Press; 1991; 1-16.
2. Xu Z, Kopf G S, Schultz M. Involvement of inositol 1, 4, 5 trisphosphate-mediate Ca^{++} release in early and late events of mouse egg activation. Development. 1994; 120: 1851-1859.
3. Kaufman MH. The experimental production of mammalian parthenogenic embryos. Daniel J.C. Methods in mammalian reproduction. New York: Academic Press; 1978; 21.
4. Kaufman MH. Parthenogenesis: a system facilitating understanding of factor that influences early mammalian development. Prog In Anat. 1981; 1: 1-34.
5. Surani MAH, Kaufman NH. Influence of extracellular Ca^{++} and Mg^{++} ions on the second meiotic division of mouse oocytes: Relevance to obtaining haploid and diploid parthenogenic embryos. Dev Biol. 1977; 59: 86-90.
6. Graham CF. Parthenogenic mouse blastocysts. Nature. 1970; 242: 475-476.
7. Cuthbertson KSR. Parthenogenic activation of mouse oocytes in vitro with ethanol and benzyl alcohol. J Exp Zool. 1983; 226: 311-314.
8. Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SL, Day BN. In vitro development of in vitro matured porcine oocytes following chemical activation or in vitro fertilization. Biol Reprod. 1994; 50: 1072-1077.
9. Nussbaum DJ, Prather RS. Differential effect of protein synthesis inhibitors on porcine oocyte activation. Mol Reprod Dev. 1995; 41: 70-75.
10. Machaty Z, Funahashi H, Mayes MA, Day BN, Prather RS. Effect of injecting calcium chloride into in vitro-matured porcine oocytes. Biol Reprod. 1996; 54: 316-322.
11. Mayes MA, Stogsdill PL, Prather RS. Parthenogenic activation of pig oocyte by protein kinase inhibition. Biol Reprod. 1995; 53: 270-275.
12. Machaty Z, Mayes MA, Parther RS. Parthenogenic activation of porcine oocyte with guanosine-5-O-(3-thiotriphosphate). Biol Reprod. 1995; 52: 753-758.
13. Wendy J, Jolliff and Randall S, Parther RS. Parthenogenic development of in vitro-matured, in vivo-cultured porcine oocyte beyond blastocyst. Biol Reprod. 1997; 56: 544-548.
14. Sato K, Yoshida M, Mioshi K. Utility of ultrasound

فولیکول‌هایی نیست که با آغاز تحریک، شروع به رشد می‌کنند، بلکه سرعت از سرگیری میوز و در واقع بلوغ زودرس فولیکول‌ها است. جالب اینکه نتایج مشابهی تحت عنوان القای تخمک‌گذاری زودرس به واسطه امواج فراصوت توسط تستارت و همکارانش در سال ۱۹۸۲ گزارش شده است (۳۵).

نتیجه‌گیری

مطلب قابل‌تامل این است که گزارش‌های موجود حاکی از برتری و مزیت استفاده از امواج فراصوت در مقایسه با تحریک الکتریکی است. با استفاده از این امواج شاید بتوانیم تعداد تخمک‌های بیشتری را در یک زمان تحت تیمار قرار دهیم. این مزیت در انتقال هسته سلول‌های

- stimulation for activation of pig oocytes matured in vitro. Mol Reprod Dev. 2005; 72: 396-403.
15. Tachibana K, Uchida T, Ogawa K, Yamashita N, Tamura K. Induction of cell-membrane porosity by ultrasound. Lancet. 1999; 353: 1409.
16. Hironori M, Yamato M, Shin I, Akari U, Mitsuru T, Mitsutoshi Y, et al. Effect of cycloheximide on parthenogenetic development of pig oocyte by ultrasound treatment. J Reprod Dev. 2008; 54: 364-369.
17. Kossof G. Calibration ultrasonic therapeutic equipment. Acustica. 1962; 12: 84-90.
18. Ward M, Wu J, Chiu JF. Experimental study of the effect of optison concentration on sonoporation in vitro. Ultrasound Med Biol. 2000; 26: 1169-1175.
19. Donahue RP. Maturation of the mouse oocyte in vitro. I. Sequence and timing of nuclear progression. J Exp Zool. 1968; 169: 237-249.
20. Homa ST. Effect of cyclic AMP on the spontaneous meiotic maturation of cumulus free bovine oocytes cultured in chemically defined medium. J Exp Zool. 1988; 248: 222-231.
21. Kaufman ML, Homa ST. Defining a role for calcium in the resumption and progression of meiosis in the pig oocyte. J Exp Zool. 1993; 265: 69-76.
22. Carrol J, Swann K. Spontaneous cytosolic calcium oscillations driven by inositol trisphosphate occur during in vitro maturation of mouse oocyte. J Biol Chem. 1992; 267: 11196-11201.
23. De Felici M, Dolci S, Siracusa J. Influence of cumulus cell processes on oolemma permeability and lethality of isolated mouse oocyte cultured in Ca^{++} Free medium. Gamete Res. 1989; 23: 245-253.
24. Biggers JD, Powers RD. Comments on the control of meiotic maturation in mammals. In: Midgley AR, Sadler WA (eds), Ovarian Follicular Development and Function. New York: Raven Press; 1979; 365-373.
25. Homa ST, Carroll J, Swann K. The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. Hum Reprod. 1993; 8: 1274-1281.
26. Goron S, Oron Y, Dekel N. Rat oocyte maturation: role of calcium in hormone action. Molec Cell Endocrinol. 1990; 72: 131-138.
27. Tsafiriri A. Oocyte maturation in mammals. In: Jones E. (ed.), the Vertebrate Ovary. New York: Plenum press; 1978; 409-442.
28. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. Nature. 1990; 344: 503-508.

29. Lohka MJ, Hayes MK, Miller JL. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 85: 3009-3013.
30. Hislop LA, Nixon VL, Levasseur M, Champan F, Chiba K, McDougall A, Venables JP et al. Ca^{2+} -promoted cyclin B1 degradation in mouse oocytes requires the establishment of the metaphase arrest. *Dev Biol*. 2004; 269: 206-219.
31. Kim NH, Simerly C, Funahashi H, Schaten G, Day BN. Microtubule organization in porcine oocytes during fertilization and parthenogenesis. *Biol Reprod*. 1996; 54: 1397-1404.
32. Collas P, Fissore R, Robi JM, Sullivan EJ, Barnes FL. Electrically induced calcium elevation, activation and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*. 1993; 34: 212-223.
33. Miyoshi K, Fujimoto Y, Mori H, Yoshida M. Activation and parthenogenetic development of pig oocytes exposed to ultrasound in media containing different concentration of Ca^{2+} . *J Reprod Dev*. 2008; 54: 42-45.
34. Heyner S, Abraham V, Wicarszuk ML, Zickin MC. Effect of ultrasound on ovulation in the mouse. *Gamete Research*. 1989; 22: 333-338.
35. Testart J, Thebaout A, Frydman R. Premature ovulation after ovarian sonography. *Br J Obstet Gynecol*. 1982; 89: 694-700.
-