دینامیک میان کنش اسپرم گوسفند با پلاسمید حاوی ژن لیزوزیم انسانی در انتقال ژن به واسطه اسپرم

خسرو حسینی‌پژوه[۱]، پرویز تاجیک*[۲]، مرتضی کریمی‌پور[۳]

چکیده

مطالعات قابلیت اسپرم برای انتقال ژن خارجی به تخم را ثابت کرده است. گزارش‌های مربوط به اثرات زمان گرمخانه‌گذاری و میزان DNA بر میزان جذب و پارامترهای اسپرم متفاوت و گاه متناقض بوده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر زمان گرمخانه‌گذاری اسپرم گوسفند با DNA خارجی و مقدار این DNA بر سرعت، میزان جذب و تحرک اسپرم و مقایسه اسپرم انزالی و اپیدیدیمی از این نظر بود. برای این منظور اسپرم انزالی (N=٤) و اپیدیدیمی (N=٦) با مدت‌زمان متفاوت(۱۵ تا ۹۰ دقیقه) و مقادیر متفاوت با پلاسمید pEGFPN حامل ژن لیزوزیم انسانی(۵ تا ۵۰۰ نانوگرم/$۱۰^{٦}$ اسپرم/۲۵ میکرولیتر) گرمخانه‌گذاری شده و میزان ورود پلاسمید به اسپرم و تحرک اسپرم‌ها ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که تا متوسط ٦۵/۳۳ درصد اسپرم‌ها توانستند پلاسمید حاوی ژن لیزوزیم انسانی را جذب کنند. افزایش میزان DNA خارجی و زمان انکوباسیون به‌خصوص تا ٦۰ دقیقه باعث افزایش مقدار DNA جذب‌شده توسط اسپرم و افزایش اسپرم‌های حاوی DNA خارجی شد اگرچه بیشترین سرعت جذب در ۱۵ دقیقه اول رخ داد. به نظر می‌رسد هرچه مقدار DNA خارجی بیشتر باشد سرعت جذب بیشتر و زمان رسیدن به حداکثر تعداد اسپرم‌های دارای جذب کوتاه‌تر باشد. کاهش اندکی در تحرک تام و پیش‌رونده اسپرم‌های گروه تیمار با گروه شاهد به‌استثنای ۵ دقیقه انکوباسیون مشاهده شد. هیچ اسپرم متحرکی که دارای جذب DNA در ناحیه پشت آکروزوم باشد مشاهده نشد. به نظر می‌رسد گرمخانه‌گذاری اسپرم با مقادیر متوسط(۲۰تا۲۰۰ نانوگرم) DNA خارجی بیش از ۳۰ دقیقه و در مقادیر کم(۵ نانوگرم) بیش از ٦۰ دقیقه لازم نباشد.

واژگان کلیدی: *اسپرم، انتقال ژن، گوسفند، لیزوزیم انسانی*

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/٦/۱٦

مقدمه

در طول دو دهه گذشته، روش‌های زیادی برای انتقال ژن به ژنوم حیوانات اهلی معرفی‌شده است. تزریق به داخل پیش هسته اولین تکنیکی بوده که توانست موش‌های ترانسژنیک ایجاد کند و از آن به بعد برای ایجاد سایر گونه‌های ترانسژنیک (خرگوش، گوسفند، خوک و گاو) استفاده شد، اما به دلیل معایب زیاد همچون بازدهی بسیار کم و هزینه بالا تمایل به استفاده از تکنیک‌های جایگزین برای انتقال ژن شده است. توانایی اسپرم در گرفتن DNA بیگانه در مطالعات اولیه توسط Brackett و همکاران در سال ۱۹۷۱ با نشان دادن ورود DNA نشان‌دار شده با تیمیدین رادیواکتیو به سر اسپرم خرگوش مطرح گشته است (٦). اما این گزارش به‌سرعت و به‌شدت توسط Brenstein و همکاران رد شد(٤). Maione و همکاران (۱۹۹۷) با تکرار آن آزمایش‌ها نشان دادند که این کار واقعاً عملی است (۲۰).

بعضی گزارش‌های نشان می‌دهد که ورود DNA خارجی به اسپرم ممکن است باعث تغییر در سیستم دفاعی طبیعی اسپرم شود که منجر به نقص در عملکرد آن می‌گردد (١٦). به نظر می‌رسد که اتصال DNA خارجی به اسپرم باعث غیرطبیعی شدن حرکات اسپرم می‌شود و درصد اسپرم‌های با حرکت پیش‌رونده به سرعت کاهش می‌یابد. این حالت در خوک (۱۳)، گاو(۲۳ و ۸، ۲) و بز (۱۹) گزارش شده است.

تلاش‌هایی برای افزایش جذب DNA خارجی توسط اسپرم انجام‌شده است. افزایش غلظت DNA گرچه میزان DNA داخل شده به اسپرم خوک را افزایش می‌دهد اما به نظر می‌رسد در عین حال می‌تواند میزان تحرک و باروری آن را کاهش دهد (۲۲). افزایش میزان DNA تا ۱۰۰ میکروگرم در ۱ میلی لیتر یعنی ۲۰ برابر مقدار معمول (۵ میکروگرم در ۱ میلی لیتر) پارامترهای فیزیولوژیک اسپرم را که در گرمخانه‌گذاری صدمه دیده است را بدتر کرده است (۳). بنابراین از عوامل مؤثر در موفقیت

۱ـ دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
*۲ـ گروه علوم درمانگاهی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
ptajik@ut.ac.ir
۳ـ گروه پزشکی مولکولی، موسسه پاستور، ایران

این روش به دست آوردن مقدار مناسب DNA خارجی و زمان مناسب انکوباسیون اسپرم با DNA خارجی است تا بتوان بیشترین میزان جذب را در عین کم‌ترین تأثیر بر حرکت اسپرم به دست آورد.

با توجه به آن‌که اطلاعات زیادی از انتقال ژن به واسطه اسپرم (SMGT) در گوسفند منتشر نشده است مطالعه حاضر برای بررسی دینامیک میان کنش اسپرم گوسفند با پلاسمید حاوی ژن لیزوزیم انسانی و تعیین ظرفیت اسپرم در جذب این پلاسمید و اثر جذب DNA بر کارایی اسپرم گوسفند جهت بررسی امکان استفاده از این روش برای انتقال ژن لیزوزیم انسانی به گوسفند انجام شد. ما در مطالعه قبلی جذب DNA خارجی توسط اسپرم انزالی گوسفند مشاهده کردیم اما هیچ اسپرم متحرکی که حاوی DNA خارجی باشد دیده نشد(اطلاعات در دست انتشار). از آنجایی که میزان DNA خارجی و زمان گرمخانه‌گذاری می‌تواند در میزان بهینه جذب و تحرک اسپرم‌های حاوی DNA خارجی مؤثر باشد، این آزمایش برای بررسی اثر گرمخانه‌گذاری مقادیر مختلف DNA خارجی با اسپرم انزالی و اپیدیدیمی گوسفند در درصد اسپرم‌های حاوی DNA خارجی و شدت جذب در زمان‌های مختلف گرمخانه‌گذاری و همچنین یافتن این‌که آیا با تغییر میزان DNA و زمان گرمخانه‌گذاری می‌توان اسپرم‌های ترا فرست شده متحرک جهت استفاده در IVF یا تلقیح مصنوعی به دست آورد انجام شد.

مواد و روش کار

در این مطالعه از پلاسمید حاوی ژن GFP استفاده شد. برای بررسی اتصال پلاسمید به اسپرم و محل تجمع آن پلاسمید استخراج شده با رود آمین نشان‌دار شد. بدین منظور از کیت tetramethyl – Rhodamine – 5 – dutp شرکت Roche استفاده شد (Ex Max 551 nm, Em Max 575nm). برای این کار ابتدا پلاسمید استحصال شده توسط آنزیم StuI (EcoR147) (شرکت Fermentas)، برش داده شد و سپس تقریباً طبق دستورالعمل کیت نشان‌دار کردن پلاسمید برش خورده انجام شد.

تهیه اسپرم: اسپرم اپیدیدیمی از بیضه گوسفندهای گرفته‌شده از کشتارگاه بر اساس روش Blash وهمکاران (۵) به دست آمد. بدین منظور پس از انتقال بیضه در کنار یخ به آزمایشگاه، با برش ناحیه دم اپیدیدیم با استفاده از پیپت، اسپرم جمع‌آوری و به لوله ۲ میلی‌لیتری حاوی۵۰۰ میکرولیتر محیط TCM 199 (شرکت Gibco) منتقل شد. سپس اسپرم‌ها از نظر کیفیت مورد ارزیابی قرار گرفت و تعداد اسپرم و درصد اسپرم‌های متحرک بررسی شد. نمونه‌هایی که بالای۹۵ درصد اسپرم متحرک داشت مورد آزمایش قرار گرفتند.

اسپرم‌های انزالی مورد بررسی از ٤ گوسفند ۳ تا ٤ ساله بارور توسط تحریک الکتریکی(الکترو اجکولاتور) تهیه گردید. اسپرم انزالی در لوله‌های از پیش گرم شده (۳۷ºC) جمع‌آوری و در عرض ۱۰ـ۵ دقیقه به آزمایشگاه ارسال شد. در زمان ارسال نمونه‌ها به آزمایشگاه لوله‌ی حاوی منی در آب ۳۷ºC قرار داده شد. پس از رسیدن به آزمایشگاه نمونه‌ها از نظر کیفیت منی مورد ارزیابی قرار گرفت و تعداد اسپرم و درصد اسپرم‌های متحرک بررسی شد. نمونه‌هایی که بالای ۹۰٪ اسپرم متحرک داشتند مورد استفاده قرار گرفتند. برای حذف مایع منی این نمونه‌ها مورد شستشو قرار گرفت. برای شستشو و گرمخانه-گذاری اسپرم از محیط TCM 199 (شرکت Gibco) بدون سرم و آنتی‌بیوتیک استفاده گردید. پس از بررسی منی گرفته‌شده، نمونه ۳ بار با ٤ برابر حجم محیط TCM شستشو گردید (۵۰۰g، ۵ دقیقه) و پس از شستشوی آخر محیط مذکور به رسوب اسپرم اضافه شد. سپس تعلیق اسپرم مجدداً از لحاظ تحرک بررسی و شمارش گردید. در نهایت تعداد ۱×۱۰^{٦} اسپرم به لوله‌های ۰/۵ میلی لیتری حاوی محیط TCM و DNA پلاسمید اضافه شد به‌طوری که حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسید. سپس تعلیق اسپرم در محیط ترا فرست (Transfection)

در گرمخانه ۳۷°C و ۵ درصد CO2 برای زمان‌های مورد نظر قرار داده می‌شد. گروه‌های کنترل تحت همان شرایط اما بدون افزودن DNA پلاسمید تهیه گردیدند.

بررسی تحرک اسپرم‌ها: پس از مدت‌زمان لازم برای گرمخانه‌گذاری اسپرم‌ها ابتدا از لحاظ میزان تحرک کل و تحرک پیش‌رونده با استفاده از میکروسکوپ NIKON (ECLIPSE E600) و با بزرگنمایی ٤٠ با نور مرئی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای ارزیابی حداقل ۳ میدان میکروسکوپی و جمعیت ۱۰۰ اسپرم بررسی شد. برای تعیین صحت ارزیابی تحرک به‌طور متناوب با ارزیابی انجام‌شده روش CASA مقایسه شد.

ارزیابی جذب DNA خارجی: جهت بررسی درصد، شدت و نحوه جذب DNA خارجی، از میکروسکوپ فلورسنت(ECLIPSE NIKON E600) با طول موج ۵۱۰nm-۵۸۰ (فیلتر سبز) و بزرگنمایی ۱۰۰ استفاده گردید. جذب پلاسمید با مشاهده تابش قرمز درخشان مشخص می‌شد. برای تعیین درصد جذب حداقل ۱۰۰ اسپرم در حداقل ٤ میدان میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. جهت ارزیابی اسپرم‌ها ٦ میکرولیتر از نمونه توسط یک پیپت سمپلر که سر سمپلر آن قبلاً بر روی صفحه گرم ۳۷°C قرار داشت بر روی یک لام که آن نیز با قرار دادن روی صفحه گرم به ۳۷°C رسیده بود قرار داده و سپس توسط لامل پوشیده شد. برای ارزیابی شدت جذب نیز بر اساس شدت فلورسانت ایجاد شده جذب به چهار درجه ۱: بسیار ضعیف (حداقل بازتاب قابل تشخیص)؛ ۲: ضعیف، اما به‌خوبی قابل تشخیص ۳: قوی، کاملاً درخشان؛ ٤: بسیار قوی، بسیار پر درخشش تقسیم شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱٦/۰) استفاده شد. اطلاعات به‌صورت میانگین± اشتباه معیار میانگین (mean±SEM) بیان شد و به روش تحلیل واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) تحلیل شده‌اند. هنگامی که آزمایش تفاوت معنی‌داری را نشان می‌داد مقادیر با Post hoc test به‌صورت جفت‌جفت مقایسه شدند. برای بررسی اثر گرمخانه‌گذاری و جذب DNA بر تحرک و قابلیت حیات از روش آماری آزمون t با دو نمونه جفتی یا همبسته (Paired-samples T-Test) استفاده شد. تفاوت‌ها در سطح P<۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌داری محسوب شدند.

جهت ارزیابی ظرفیت جذب DNA خارجی توسط اسپرم اپیدیدیمی و انزالی گوسفند و تأثیر آن بر تحرک لازم بود که سئوالات زیر پاسخ داده شود ۱- اثر زمان انکوباسیون اسپرم با DNA خارجی (دینامیک) بر روند جذب این DNA (درصد اسپرم‌هایی که DNA خارجی را به داخل خود جذب کرده بودند) و شدت جذب (میزان نسبی DNA خارجی وارد شده در اسپرم) ۲- اثر مقدار DNA خارجی انکوباسیون اسپرم بر روند جذب این DNA (درصد اسپرم‌هایی که DNA خارجی را به داخل خود جذب کرده بودند) و شدت جذب.

آزمایش اول: پس از تهیه و آماده سازی اسپرم از بیضه ٦ گوسفند طبق روش مذکور اسپرم تهیه شده و پس از مراحل آماده سازی (طبق آن چه در قبل آمده است)، اسپرم‌ها با مقادیر ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ نانوگرم DNA خارجی در ۲۵ میکرولیتر محیط TCM به ازای 1×10^{6} اسپرم به مدت ٦۰ دقیقه در دمای ۳۷°C و رطوبت ۹۸٪ و ۵٪ CO2 گرمخانه‌گذاری شدند. اسپرم‌های مورد آزمایش پس از ٦۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری از نظر تحرک کل و پیش‌رونده ارزیابی شدند و سپس با میکروسکوپ فلورسنت جهت تعیین درصد اسپرم‌های حاوی DNA خارجی و شدت جذب یعنی میزان نسبی DNA خارجی وارد شده در اسپرم بررسی شدند.

آزمایش دوم: جهت بررسی اثر گرمخانه‌گذاری اسپرم با مقادیر کم DNA خارجی و در زمان های مختلف خارجی بر روند جذب DNA و شدت جذب، تحرک کل و پیش‌رونده و این‌که آیا با استفاده از مقادیر کم DNA و تغییر زمان گرمخانه‌گذاری می‌توان اسپرم‌های ترا فرست شده متحرک جهت استفاده در IVF به دست آورد این آزمایش انجام شد. بدین جهت از بیضه

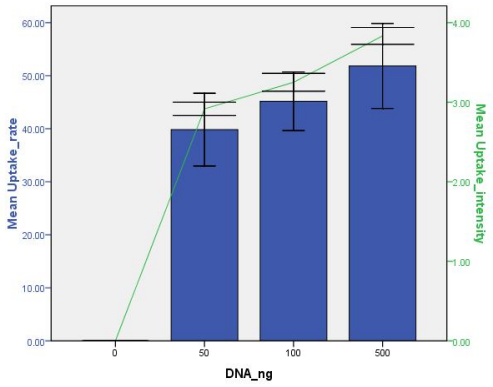
٦ گوسفند اسپرم گرفته شد و پس از تهیه و آماده سازی طبق روش مذکور، گرمخانه‌گذاری با مقادیر ٥ ،١٠، ٢٠ و ٥٠ نانوگرم DNA خارجی در ٢٥میکرولیتر محیط و $١٠^{٦}$ ×١ اسپرم و در دمای ٣٧°C و رطوبت ٩٨٪ و ٥ درصد CO2 انجام شد. اسپرم‌های مورد آزمایش پس از زمان های٣٠، ٦٠ و ٩٠ دقیقه گرمخانه‌گذاری از نظر تحرک کل و پیش‌رونده ارزیابی شدند و سپس با میکروسکوپ فلورسنت جهت تعیین درصد اسپرم‌های حاوی DNA خارجی و شدت جذب بررسی شدند.

آزمایش سوم: پس از تهیه و آماده سازی اسپرم انزالی طبق روش مذکور، گرمخانه‌گذاری با مقادیر ٥٠، ١٠٠، ٢٠٠ و ٥٠٠ نانوگرم DNA خارجی در ٢٥میکرولیتر محیط و $١٠^{٦}$ ×١ اسپرم و با زمان‌های ١٥، ٣٠، ٦٠ و ١٢٠ دقیقه انجام شد.

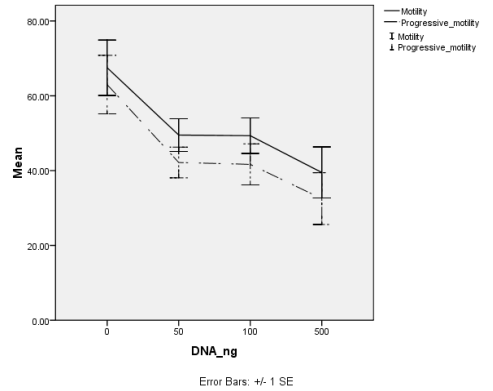
آزمایش چهارم: برای بررسی تفاوت اسپرم انزالی و اپیدیدیمی ١٥ نمونه اسپرم اپیدیدیمی و ٣ نمونه اسپرم انزالی با ٥ تکرار با ١٠٠ نانوگرم پلاسمید به مدت ٦٠ دقیقه گرمخانه‌گذاری و میزان و شدت جذب ارزیابی شد.

نتایج

آزمایش اول: بررسی گرمخانه‌گذاری اسپرم اپیدیدیمی با مقادیر ٥٠، ١٠٠ و ٥٠٠ نانوگرم DNA خارجی به مدت٦٠ دقیقه برای بررسی اثر مقادیر مختلف DNA، گرمخانه‌گذاری اسپرم با مقادیر ٥٠، ١٠٠ و ٥٠٠ نانوگرم DNA به مدت ٦٠ دقیقه انجام شد. درصد اسپرم‌هایی که DNA خارجی را جذب کرده‌اند (در ناحیه پشت آکروزوم) برای مقادیر مختلف DNA در نگاره ١ نشان داده‌شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، درصد اسپرم‌های ترا فرست شده در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری باهم نداشتند به عبارت دیگر افزایش میزان DNA خارجی از ٥٠ تا ٥٠٠ نانوگرم در ٢٥میکرولیتر محیط و $١٠^{٦}$ ×١ اسپرم تأثیری در تعداد اسپرم‌هایی که DNA خارجی را جذب کرده‌اند نداشت. اما شدت جذب DNA خارجی با افزایش میزان DNA به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و این اختلاف در تمام تیمارها وجود دارد. درصد اسپرم‌های جذب کرده در ناحیه آکروزوم نیز به ترتیب ٤١/١٦±٥/٦٤، ٣٨/٨٣±١/٦٠ و ٣٥/٥٠±٦/٠٧ بود که این اختلاف در مقادیر مختلف DNA معنی‌دار نبود.



نگاره ١- درصد اسپرم‌های حاوی DNA خارجی (ستون ها) و شدت جذب (خط) DNA خارجی در گرمخانه‌گذاری اسپرم با مقادیر ٥٠، ١٠٠ و ٥٠٠ نانوگرم DNA به مدت ٦٠ دقیقه



نگاره ٢: تحرک کل و تحرک پیش‌رونده در گرمخانه‌گذاری اسپرم با مقادیر صفر، ٥٠، ١٠٠ و ٥٠٠ نانوگرم DNA به مدت ٦٠ دقیقه

میزان تحرک کل و تحرک پیش‌رونده در گروه‌های تیمار و شاهد در نگاره ٢ آمده است. در بررسی اختلاف تحرک کل و تحرک پیش‌رونده در تیمارهای مختلف با گروه شاهد مشاهده شد که میزان تحرک کل در گروه شاهد با گروه ٥٠٠ نانوگرم DNA تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهد اما با دو

گروه تیمار دیگر این تفاوت معنی‌دار نبود. بین گروه‌های تیمار نیز اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. درصد تحرک پیش‌رونده در گروه شاهد با تمام گروه‌های تیمار تفاوت معنی‌داری نشان می‌داد اما اختلافی بین گروه‌های تیمار در این مورد نبود. با بررسی اختلاف تحرک کل و تحرک پیش‌رونده هر تیمار با گروه کنترل به روش آزمون t با دو نمونه جفتی (Paired-Samples T test) نیز اختلاف معنی‌دار در تمام گروه‌های تیمار با گروه شاهد مشاهده شد. همچنین هیچ یک از اسپرم‌هایی که دارای جذب در ناحیه پشت آکروزوم بودند متحرک نبودند گرچه بسیاری از اسپرم‌هایی که فقط در ناحیه آکروزوم دارای جذب DNA خارجی بودند حرکت پیش‌رونده داشتند.

آزمایش دوم: بررسی گرمخانه‌گذاری اسپرم اپیدیدیمی با مقادیر ۵، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ نانوگرم پلاسمید و به مدت زمان های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه در درصد جذب، شدت جذب و تحرک درصد اسپرم‌هایی که پس از ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری DNA خارجی را جذب کرده‌اند در تیمار ۵ نانوگرم DNA اختلاف معنی دار و قابل توجهی را با سایر تیمارها نشان می‌داد اما اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای ۱۰ و ۲۰ نانوگرم وجود نداشت. همچنین این تعداد در تیمار ۵۰ نانوگرم نیز به‌طور معنی‌داری از سایر تیمارها بیشتر است. در شدت جذب نیز بین تیمارهای ۵، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ نانوگرم اختلاف معنی‌داری وجود داشت و با افزایش میزان DNA شدت جذب بالا می‌رفت. در این زمان میزان تحرک کل و تحرک پیش‌رونده با افزایش میزان DNA خارجی کاهش می‌یافت گرچه این اختلاف با روش ANOVA بین تیمارهای مختلف با یک دیگر و با گروه شاهد (۰ نانوگرمDNA) معنی‌داری نبود اما در بررسی به روش آزمون t با دو نمونه جفتی یا همبسته (Paired Samples T-test) این تفاوت‌ها در همه مقادیر DNA معنی‌دار بودند.

پس از ۶۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری گرچه با افزایش میزان DNA خارجی در متوسط درصد جذب افزایش دیده می‌شود اما این اختلاف تنها در تیمار ۵ نانوگرمDNA با بقیه معنی دار است. اما شدت جذب با افزایش میزان DNA افزایش یافته و این افزایش در تمام تیمارها معنی دار است. در میزان تحرک کل و تحرک پیش‌رونده با روش ANOVA نیز اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف با گروه شاهد دیده نشد اما به روش آزمون t با دو نمونه جفتی یا همبسته این تفاوت در حرکت و حرکت پیش‌رونده در تمام مقادیر DNA (به جز گروه ۵ نانوگرم برای حرکت تام) معنی‌دار بود.

پس از ۹۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری تیمارهای مختلف نیز فقط بین تیمار ۵ و ۵۰ نانوگرم اختلاف معنی‌داری در درصد اسپرم‌های ترا فرست شده وجود دارد یعنی در ۹۰ دقیقه تنها در تیمار ۵۰ نانوگرم درصد جذب به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه ۵ نانوگرم DNA است. شدت جذب نیز مانند زمان ۶۰ دقیقه در تیمار ۵ نانوگرم به‌طور معنی‌داری از سایر تیمارها کمتر بود. اما بین تیمار ۱۰ و ۲۰ در این زمان نیز اختلاف معنی دار وجود نداشت. شدت جذب در تیمار ۵۰ نانوگرم DNA نیز به‌طور معنی دارای از سایر گروه‌ها بیشتر بود. در این زمان نیز با روش ANOVA اختلاف معنی‌داری بین تحرک کل و پیش‌رونده بین گروه‌های تیمار با گروه شاهد (۰ نانوگرم) وجود نداشت اما به روش آزمون t با دو نمونه جفتی یا همبسته این تفاوت‌ها در همه مقادیر DNA معنی‌دار بودند.

نمودار درصد جذب DNA توسط اسپرم اپیدیدیمی، شدت جذب و تحرک کل در طول زمان گرمخانه‌گذاری (۳۰، ۶۰، ۹۰ دقیقه) برای مقادیر ۵، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ نانوگرم DNA در نگاره۳ نشان داده‌شده است. در گرمخانه‌گذاری با ۵۰ نانوگرم DNA اختلاف معنی‌داری در درصد اسپرم‌های ترا فرست پس از ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری وجود نداشت. در گرمخانه‌گذاری با ۲۰ نانوگرم DNA پس از ۶۰ دقیقه افزایشی در درصد اسپرم‌های ترا فرست وجود نداشت. در گرمخانه‌گذاری با ۱۰ نانوگرم DNA اگرچه تا ۹۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری نیز افزایش دیده می‌شد اما این افزایش غیرقابل توجه است و اختلاف معنی‌داری بین ۶۰ و ۹۰ دقیقه

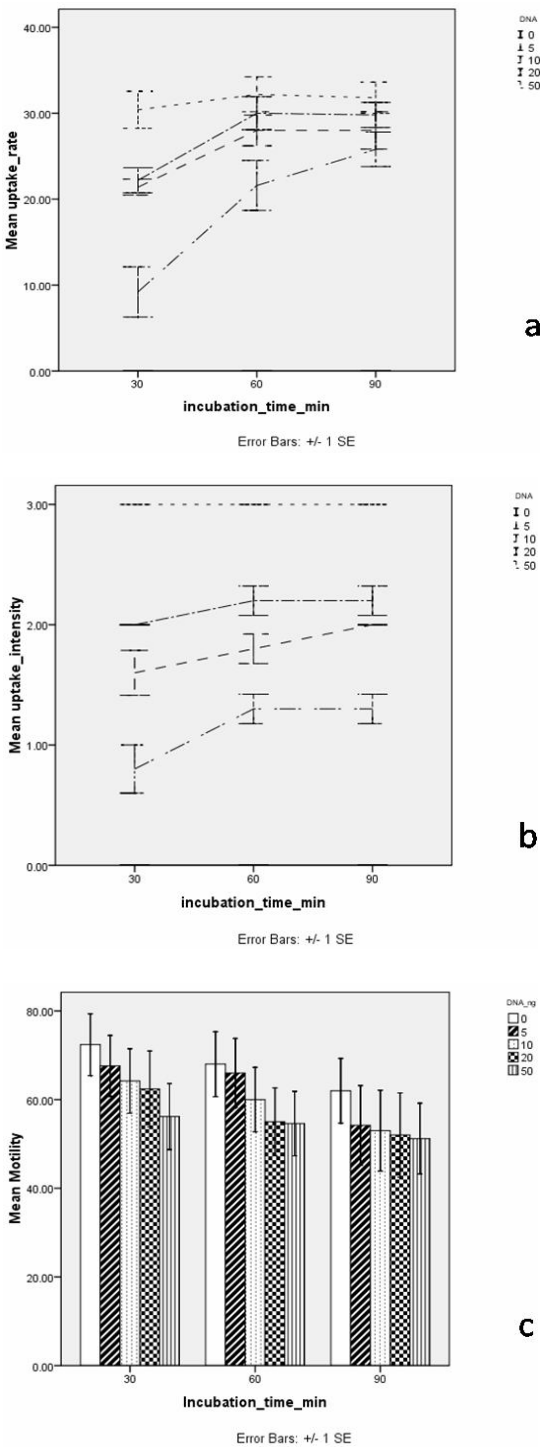
گرمخانه‌گذاری در هیچ‌کدام از این دو تیمار در درصد جذب وجود نداشت. در گرمخانه‌گذاری با ۵ نانوگرم DNA شیب افزایش درصد جذب تا ٦٠ دقیقه کاملاً افزایشی بود و تا ۹۰ دقیقه نیز این افزایش کاملاً وجود داشت. گرچه این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود. نمودار شدت جذب برای ۵۰ نانوگرم DNA پس از ۳۰ دقیقه مسطح بود اما برای گروه ۵، ۱۰ و ۲۰ نانوگرم تا ٦٠ دقیقه هنوز افزایشی بود و این افزایش برای گروه ۵ نانوگرم شدید تر بود. گرچه اختلاف شدت جذب بین ۳۰ و ٦٠ دقیقه گرمخانه‌گذاری تنها برای تیمار ۵ نانوگرم معنی‌دار بود.

آزمایش سوم، بررسی اثر گرمخانه‌گذاری اسپرم انزالی با مقادیر مختلف پلاسمید و به مدت‌زمان‌های مختلف در گرمخانه‌گذاری اسپرم با ۵۰ نانوگرم DNA خارجی درصد اسپرم‌های دارای جذب DNA در ١٥، ۳۰، ٦٠ و ١٢٠ دقیقه گرمخانه‌گذاری به ترتیب ٣/١٧± ٣١/٦٦، ٣/٣٨± ٤٢/٦٦، ٧/٤٤± ٥٠/٦٦ و ٥/٤٥±٥٥/٦٦ درصد بود که در ١٥ و ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت اما در ٦٠ و ١٢٠ دقیقه اختلاف معنی‌داری با ١٥ دقیقه گرمخانه‌گذاری وجود داشت یعنی افزایش زمان گرمخانه‌گذاری تا ٦٠ دقیقه باعث افزایش میزان جذب شده است. اما بیش از آن زمان تاثیری در این افزایش نداشته است. در شدت جذب تفاوت معنی‌داری در شدت جذب DNA در زمان‌های ١٥ و ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری وجود داشت اما بیش از آن مدت این تفاوت معنی‌دار نبود. یعنی با ۵۰ نانوگرم DNA خارجی افزایش زمان بیش از ۳۰ دقیقه باعث افزایش شدت جذب نشد.

در گرمخانه‌گذاری با ١٠٠ نانوگرم DNA میزان جذب برای زمان‌های ١٥، ۳۰، ٦٠، ١٢٠ دقیقه گرمخانه‌گذاری به ترتیب ٨/٣٥±٤١/٣٣، ٣/٨٤±٥٥/٣٣، ٤/٨٠±٥٨/٦٧ و ٤/١٨±٥٧/٦٧ درصد بود که بین زمان ١٥ دقیقه با سایر گروه‌ها اختلاف معنی دار وجود داشت. به عبارت دیگر افزایش زمان گرمخانه‌گذاری تا ۳۰ دقیقه باعث افزایش معنی‌دار اسپرم‌های ترا فرست شده می‌شود اما بیش از آن تأثیری در این میزان ندارد. شدت جذب نیز به ترتیب ٠/١٧±٢/١٧، ٠/٣٣±٢/٦٧، ٠/١٧±٢/٨٣ و ٠/٣٣±٢/٦٧ بود. که اختلاف معنی‌داری در شدت جذب DNA در زمان‌های ١٥ و ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری وجود داشت اما افزایش زمان گرمخانه‌گذاری بیش از ۳۰ دقیقه در حضور ١٠٠ نانوگرم DNA خارجی باعث افزایش شدت جذب نشده است.

در گرمخانه‌گذاری اسپرم با ٢٠٠ نانوگرم DNA خارجی میزان جذب برای زمان‌های ١٥، ۳۰، ٦٠ و ١٢٠ دقیقه گرمخانه‌گذاری، ترتیب ٣/٠٠±٤٥/٠٠، ٢/٠٧± ٥٩/٦٦، ٢/٦٠±٦٤/٦٦ و ٢/٧١±٦٥/٦٦ بود که اختلاف معنی‌داری بین ١٥ دقیقه گرمخانه‌گذاری با سایر زمان ها در درصد اسپرم‌های دارای جذب DNA خارجی وجود داشت. یعنی با ٢٠٠ نانوگرم DNA خارجی افزایش زمان گرمخانه‌گذاری تا ۳۰ دقیقه باعث افزایش در صد اسپرم‌های دارای جذب DNA خارجی می‌شد اما بیش از آن تاثیری در این میزان نداشت. شدت جذب در زمان‌های مذکور گرمخانه‌گذاری با ٢٠٠ نانوگرم DNA خارجی نیز به ترتیب ٠/٠٠±٣/٠٠، ٠/١٦±٣/٨٣، ٠/١٦±٣/٨٣ و ٠/٣٣±٣/٦٦ بود. که گروه ١ (١٥ دقیقه) با سایر گروه‌ها اختلاف معنی دار داشت یعنی افزایش زمان گرمخانه‌گذاری تا ۳۰ دقیقه نیز باعث افزایش شدت جذب DNA شده است اما پیش از آن تأثیری نداشت.

در گرمخانه‌گذاری اسپرم با ٥٠٠ نانوگرم DNA خارجی میزان جذب برای زمان‌های مختلف ١٥، ۳۰، ٦٠ و ١٢٠ دقیقه به ترتیب ٤/٩٧ ± ٤٩/٦٦، ١/١٥±٦٣/٠٠، ١/٤٥ ±٦٥/٣٣ و ١/٢٠±٦٥/٦٦ بود. که بین گروه اول با سایر گروه‌ها اختلاف معنی دار وجود داشت به عبارت دیگر در گرمخانه‌گذاری با ٥٠٠ نانوگرم DNA افزایش زمان تا ۳۰ باعث افزایش معنی دارد تعداد اسپرم‌های حاوی DNA خارجی می‌شود اما بیش از آن در این تعداد تأثیری ندارد. شدت جذب DNA نیز برای این زمان‌های گرمخانه‌گذاری در همه زمان‌ها برابر با ٠±٤/٠٠ بود که اختلاف معنی‌داری در این زمان‌ها وجود نداشت به عبارت دیگر با ٥٠٠ نانوگرم DNA خارجی افزایش زمان گرمخانه‌گذاری از ١٥ دقیقه تأثیری در شدت DNA جذب شده نداشت.



نگاره ۳: نمودار درصد اسپرم‌های حاوی DNA خارجی (a) ، شدت جذب (b) و تحرک کل (c)در طول زمان گرمخانه‌گذاری (۳۰، ۶۰، ۹۰ دقیقه) برای مقادیر۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ نانوگرم DNA

آزمایش چهارم

در مقایسه ۱۵ نمونه اسپرم اپیدیدیمی و ۳ نمونه اسپرم انزالی با ۵ تکرار گرمخانه‌گذاری شده با ۱۰۰ نانوگرم پلاسمید به مدت ۶۰ دقیقه، میزان ترانسفکشن به ترتیب ۴۸/۹۳±۴/۴۰ و ۵۵/۲۶±۱/۹۶ درصد و شدت جذب به ترتیب ۳/۲۶±۰/۱۲ و ۲/۹۶±۰/۰۳ بود که در میزان تراسفکشن تفاوتی وجود نداشت اما شدت جذب در اسپرم انزالی به‌طور معنی‌داری کمتر بود.

بحث

نتایج به دست آمده از SMGT در تحقیقات مختلف بسیار متفاوت و ناهمخوان بوده است، لذا کارایی SMGT هنوز مورد سؤال است. مکانیسم اتصال و دخول DNA خارجی و اسپرم سوالی است که هنوز به درستی جواب داده نشده است. اختلاف شدیدی بین آزمایشگاه‌های مختلف وجود داشته است. از عوامل موءثر در موفقیت این روش به دست آوردن مقدار مناسب DNA خارجی و زمان مناسب گرمخانه‌گذاری اسپرم، شرایط محیطی مناسب در گرمخانه‌گذاری اسپرم و تعیین خصوصیات اسپرم برای جذب بهینه است تا بتوان بیشترین میزان جذب را در عین کمترین تاثیر برحرک اسپرم به دست آورد.

میزان جذب: درصد اسپرم‌هایی که توانسته‌اند بدنبال گرمخانه‌گذاری با DNA خارجی آن را جذب کنند در جانوران مختلف و در گزاش‌های مختلف به‌شدت متفاوت ذکر شده است Castro و همکاران در یک بررسی این مقدار را ۲-۱۰درصد در موش، ۷/۶-۲۵ درصد درماهی کارپ، ۷/۲ -۲۵ درصد در خروس ۱/۵ تا ۳ درصد در گاو، ۰/۰۷-۰/۱ درصد در بوفالو، ۰/۲۶-۰/۳ درصد در خوک و ۶/۴ - ۱۰ درصد برای گوسفند و بز گزارش کردند (۹). اما تحقیقات بعدی عمدتاً نتایج بالاتری را گزارش کردند مثلاً ۲۹ تا ۴۹ درصد در گاو (۸ و۲) و ۶۰ تا ۷۰ درصد درخوک(۱۷). در خوک و در شرایط

مناسب در ۹۰٪ اسپرم‌ها اتصال صورت گرفته و در ۷۰٪ آن‌ها DNA داخل اسپرم شده است. واکنش DNA با اسپرم در ۲ تا ٤ ساعت کامل می‌شود(۱۷).

در مطالعه حاضر نیز به‌طور متوسط تا ٥٦ درصد اسپرم‌های اپیدیدیمی و ٦٥ درصد اسپرم‌های انزالی (٥٠٠ نانوگرم DNA و ٦٠ دقیقه گرمخانه‌گذاری) توانسته بودند pIRES2-EGFP–Lys را جذب کنند که بسیار بیشتر از نتایج قبل است. البته اختلاف زیادی در میزان ترانسفکشن بین گوسفندان مختلف و حتی دفعات مختلف اسپرم گیری از یک گوسفند وجود داشت. این میزان برای یکی از نمونه‌های اسپرم اپیدیدیمی تیمار شده با ٥٠٠ نانوگرم پلاسمید به ۸٥ درصد می رسید. البته نحوه ارزیابی جذب می‌تواند بر نتایج بررسی میزان اسپرم‌های متصل به DNA خارجی مؤثر باشد، لذا ارزیابی سنجش تعداد با روش فلوسایتومتری(١٤) به علت عدم توانایی تفکیک اسپرم‌هایی که تنها در ناحیه پشت آکروزوم به DNA خارجی متصل شده‌اند، می‌تواند نتیجه را نادرست نشان دهد.

آغاز زمان جذب و ارتباط زمان گرمخانه‌گذاری و میزان DNA با درصد اسپرم‌های ترا فرست شده: مدت‌زمان گرمخانه‌گذاری اسپرم با DNA در میزان جذب DNA مؤثر است (۲۸ و ۱۱،۱۷،۱۸، ۹). بعضی مطالعات نشان داده است در SMGT، DNA خارجی بعد از ۱٥ تا ۲۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری با اسپرم میان کنش می‌کند و بعد از ٤٥ – ۳۰ دقیقه به حداکثر می‌رسد و سپس به‌صورت خطی درمی‌آید (۲٦ و ۱۱, ۹ ,۷).

اما بررسی ما نشان داد که این امر می‌تواند بسیار زودتر رخ دهد و اگرچه بخصوص تا ٦٠ دقیقه تعداد اسپرم‌های جذب کرده می‌تواند افزایش معنی‌داری یابد (با متوسط میزان جذب ٥۲/۲ درصد) اما بیشترین سرعت جذب در حضور بیش از ۲۰ نانوگرم DNA در ۱٥ دقیقه اول گرمخانه‌گذاری رخ می‌دهد و به‌تدریج از سرعت جذب کاسته می‌شود.

در گروه گرمخانه‌گذاری با ٥٠ نانوگرم DNA در عرض ۳۰ دقیقه درصد اعظم جذب انجام می‌شود (۲/۱٥ ±۳۰/٤) و اختلاف معنی‌داری بین ۳۰ ، ٦٠ و ۹۰ گرمخانه‌گذاری در درصد اسپرم‌های ترا فرست وجود ندارد. در ۲۰ نانوگرم DNA نیز پس از ٦٠ دقیقه افزایش درصد وجود ندارد. در ۱۰ نانوگرم DNA اگرچه تا ۹۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری نیز افزایش دیده می‌شود اما این افزایش بسیار کم و غیرقابل توجه است و اختلاف معنی‌داری بین ٦٠ و ۹۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری در هیچ‌کدام از این دو تیمار در درصد جذب وجود ندارد. در گرمخانه‌گذاری با ٥ نانوگرم DNA شیب افزایش درصد جذب تا ٦٠ دقیقه کاملاً افزایشی است و تا ۹۰ دقیقه نیز این افزایش کاملاً وجود دارد. گرچه این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود. بنابراین در گرمخانه‌گذاری اسپرم اپیدیدیمی با مقادیر کم (٥ تا ٥٠ نانوگرم) نیز سرعت جذب در ۱٥ دقیقه اول سریع بود و بعد آهسته می‌شد به‌طوری که پس از حدود ۳۰ دقیقه، منحنی شدت جذب و درصد اسپرم‌های جذب کرده تقریباً بصورت مسطح (Platue) دیده می‌شد به‌طوری که بیش از ۹۰درصد میزان ترانسفکشن در گرمخانه‌گذاری با ٥٠ نانوگرم DNA و بیش از ۸۰درصد میزان ترانسفکشن در گرمخانه‌گذاری با ٥ نانوگرم DNA در۳۰ دقیقه اول رخ داد و با گرمخانه‌گذاری بیش از ٦٠ دقیقه، افزایشی در میزان ترانسفکشن مشاهده نشد. سرعت جذب برای مقادیر متفاوت DNA متفاوت بود. در مقادیر زیادتر DNA زمان رسیدن به مرحله مسطح کوتاه‌تر و در مقادیر کمتر DNA این زمان بیشتر بود.

در آزمایش با گرمخانه‌گذاری اسپرم انزالی شسته شده گوسفند با ۱۰۰ نانوگرم از پلاسمید pEGFP-hlys با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری تا ۳۰ دقیقه افزایش معنی‌داری در تعداد اسپرم‌های حاوی DNA خارجی و شدت جذب آن مشاهده شد. اگرچه حد اکثر میزان اسپرم‌های حاوی DNA خارجی در ۱۲۰ دقیقه و حدود ٦٠ درصد بود اما این افزایش در بیش از ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری معنی‌دار نبود. بیشترین سرعت (میزان) جذب یعنی حدود ٦٥درصد جذب کل در ۱٥ دقیقه اول گرمخانه‌گذاری بوده است و ۸٥درصد جذب کل در عرض ۳۰

دقیقه رخ داده بود و تا ٦٠ دقیقه به تدریج از سرعت جذب کاسته شده است که با یافته های به دست آمده در خوک (١٧) همخوانی داشت. همچنین تنها تا ٣٠ دقیقه گرمخانه‌گذاری باعث افزایش معنی‌دار شدت جذب DNA خارجی در اسپرم‌ها می‌شد.

در بررسی گرمخانه‌گذاری اسپرم انزالی گوسفند با ٥٠ تا ٥٠٠ نانوگرم پلاسمید نیز گرمخانه‌گذاری بیش از ٣٠ دقیقه باعث افزایش معنی‌دار در میزان جذب نمی‌شد. پس از ١٥ دقیقه گرمخانه‌گذاری حدوداً بین ٥٦٪ (برای ٥٠ نانوگرم پلاسمید) تا ٧٥ درصد (برای ٥٠٠ نانوگرم پلاسمید) میزان کل ترانسفکشن رخ می دهد. این میزان برای ٣٠ دقیقه گرمخانه‌گذاری حدود ٧٤ درصد تا ٩٥ درصد بود. لذا به نظر می‌رسد گرمخانه‌گذاری اسپرم با مقادیر متوسط(٢٠تا٢٠٠ نانوگرم) DNA خارجی بیش از ٣٠ دقیقه و در مقادر کم (٥ نانوگرم) بیش از ٦٠ دقیقه لازم نباشد.

همچنین به نظر می‌رسد که هر چه غلظت DNA خارجی بیشتر باشد زمان رسیدن به حداکثر میزان ترانسفکشن کوتاهتر خواهد بود اما در میزان نهایی اسپرم‌های ترا فرست شده اثر زیادی نداشته باشد.

این یافته ها با نتایج به دست آمده در خوک توسط Lavitrano و همکاران (٢٠٠٣) که مشاهده شد در همه نمونه‌ها بیشترین سرعت جذب در ١٥ دقیقه اول گرمخانه‌گذاری بوده است (بیش از ٦٠ درصد جذب کل) و تا ٦٠ دقیقه به تدریج در سرعت جذب کاسته شده است (بیش از ٨٠ درصد در عرض ٣٠ دقیقه) همخوانی دارد(١٧).

در مطالعه بر اسپرم گاو نیز نشان داده‌شده است که حتی پس از ٣٠ دقیقه گرمخانه‌گذاری این اتصال به حداکثر می‌رسد (٨). لذا به نظر می‌رسد گرمخانه‌گذاری طولانی قبل از لقاح لازم نباشد به‌خصوص با توجه به آن که طولانی‌تر شدن میزان گرمخانه‌گذاری اثر سوء بر تحرک و قابلیت حیات اسپرم دارد. البته در این رابطه میزان DNA موجود در تعلیق اسپرم نیز مهم است. Fitossa و همکاران (٢٠٠٩) در بررسی اسپرم فریز تاو شده گاو دریافتند که افزایش میزان DNA به ٥٠٠ نانوگرم در هر میلی لیتر به ازای $١٠^{٦} \times ١$ اسپرم با مدت انکوبانسیون ٢ ساعت (بالاترین میزان DNA و بیشترین زمان گرمخانه‌گذاری) باعث افزایش میزان جذب کلی DNA می‌شود (١١) اما مشخص نبود که این افزایش کلی ناشی از افزایش میزان DNA جذب شده در هر اسپرم است یا به خاطر افزایش تعداد اسپرم‌های حاوی DNA اگزوژن (به علت استفاده از روش Real time PCR در سنجش DNA اگزوژن).

اثر زمان گرمخانه‌گذاری و میزان DNA خارجی برشدت جذب DNA خارجی: زمان گرمخانه‌گذاری و غلظت DNA بر شدت جذب یعنی متوسط میزان DNA جذب شده توسط هر اسپرم نیز موءثر است. آزمایش‌ها دیگران نشان داده است که طولانی تر کردن زمان گرمخانه‌گذاری DNA با اسپرم باعث افزایش میزان اتصال DNA خارجی با اسپرم و بدنبال آن ورود آن به اسپرم می‌شود (١٢ و ٩). اضافه کردن بیش از حد DNA باعث صدمه دیدن اسپرم و یا کاهش باروری در مقایسه با اسپرم معمولی می‌شود. لذا بهینه کردن میزان DNA به ازای هرسلول اسپرم برای آن‌که بیشترین تعداد اسپرم DNA را جذب کنند مهم است.

در گرمخانه‌گذاری اسپرم اپیدیمی با ٥٠ و ١٠٠ نانوگرم DNA خارجی نشان داده شد که با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری تا ٣٠ دقیقه شدت جذب DNA خارجی افزایش می‌یابد و پس از آن این افزایش معنی‌دار نیست. پس از ٦٠ دقیقه نیز به حداکثر ظرفیت خود می‌رسد و منحنی شدت جذب مسطح می‌شود. اما شدت جذب DNA خارجی برای گروه ٥، ١٠ و ٢٠ نانوگرم تا ٦٠ دقیقه هنوز افزایشی است و این افزایش برای گروه ٥ نانوگرم شدید تر است. گرچه اختلاف شدت جذب بین ٣٠ دقیقه و ٦٠ گرمخانه‌گذاری تنها برای تیمار ٥ نانوگرم معنی دار است. در اسپرم انزالی نیز افزایش شدت جذب در گرمخانه‌گذاری با مقادیر ٥٠، ١٠٠ و ٢٠٠ نانوگرم DNA

خارجی تنها تا۳۰ دقیقه معنی دار بود و بیش از آن باعث افزایش معنی دار نمی شد. البته در گرمخانه‌گذاری با مقادیر ۵۰۰ نانوگرم DNA خارجی این زمان به ۱۵ دقیقه کاهش یافت. این یافته ها موءید یافته های دیگران است (۱۲ و ۱۷). گرچه بعضی محققین بیشترین میزان ورود را در همان ۱۵ دقیقه اول می‌دانند (۱۷)، اما در مطالعه ما بیشترین مقدار جذب به اسپرم‌ها در ۳۰ دقیقه اول دیده شد. همچنین مشاهده شد که سرعت جذب در همه اسپرم‌های یک نمونه نیز مشابه نیست یعنی در حالی که در یک زمان ممکن است اسپرم‌هایی با شدت های متفاوت از بازتاب فلورسنت در یک نمونه مشاهده کرد. این حالت در زمان های ابتدایی گرمخانه‌گذاری که هنوز جذب به حد اکثر خود نرسیده بیشتر مشاهده می‌شود. به نظر می‌رسد مقدار DNA خارجی در سرعت جذب و زمان رسیدن به حداکثر شدت جذب موثر باشد یعنی برای مقادیر کمتر مثل ۵ نانوگرم این زمان طولانی تر و برای مقادیر بالا مثل ۵۰۰ نانوگرم این زمان کوتاه‌تر باشد. در مطالعه حاضر نشان داده شد که با افزایش میزان DNA خارجی از ۱۰۰ نانوگرم به ۵۰۰ نانوگرم برای ۲۵میکرولیتر و 1×10^{6} اسپرم اپیدیدیمی پس از ٦۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری گرچه باعث افزایش میانگین اسپرم‌های حاوی DNA خارجی شد اما این افزایش معنی‌دار نبود. گرچه ممکن است که افزایش میزان DNA خارجی در زمان های کوتاه‌تر گرمخانه‌گذاری در میزان اسپرم‌های ترا فرست شده مؤثر باشد. زیرا به نظر می‌رسد با گرمخانه‌گذاری اسپرم با مقادیر زیاد DNA خارجی ظرفیت جذب اسپرم‌ها زودتر به حد نهایی خود میرسد. با این حال افزایش میزان DNA خارجی در محیط گرمخانه‌گذاری به‌طور معنی‌داری باعث افزایش شدت جذب یعنی میزان DNA جذب شده در این اسپرم‌ها شد. در گرمخانه‌گذاری اسپرم اپیدیدیمی با مقادیر کم DNA خارجی یعنی ۵ تا ۵۰ نانوگرم، شدت جذب برای ۵۰ نانوگرم DNA پس از ۳۰ دقیقه خطی می‌شود اما برای گروه ۵، ۱۰ و ۲۰ نانوگرم تا ٦۰ دقیقه هنوز افزایشی است و این افزایش برای گروه ۵ نانوگرم شدید تر است. گرچه اختلاف شدت جذب بین ۳۰ دقیقه و ٦۰ گرمخانه‌گذاری تنها برای تیمار ۵ نانوگرم معنی دار است. بنابر این میزان مناسب DNA خارجی می‌تواند در موفقیت SMGT بسیار مهم باشد. در حالی که بعضی مطالعات میزان مناسب DNA خارجی را ۳۰ نانوگرم برای 1×10^{6} اسپرم پیشنهاد کرده‌اند (۲٤ و ۲۱) اما بعضی دیگر این مقدار را بسیار بیشتر یعنی ۵۰۰ نانوگرم دانسته اند.

درباره مقدار DNA خارجی در هر اسپرم مطالعات انجام‌شده در گونه‌های مختلف سه نکته ثابت است ۱ : مقدار DNA خارجی همبستگی مثبتی با مقدار DNA گرفته‌شده توسط اسپرم دارد. ۲ ـ DNA خارجی داخل شده هنگامی که بالاتر از یک مقدار آستانه باشد ، باعث روندی می‌شود که منجر به مرگ اسپرم می‌گردد. ۳ ـ DNA خارجی حمل شده توسط اسپرم دارای اثر سمی وابسته به دوز (وابسته به مقدار DNA وارد شده) بر روی رویان است (۲٤ و ۲۱) بنابراین این که اسپرم بتواند حامل DNA خارجی شود به این بستگی دارد که میزان و غلظت DNA نه بسیار زیاد و نه بسیار کم باشد.

به نظر می‌رسد میزان DNA خارجی در بیان ژن انتقالی نیز نقش کلیدی دارد (۲۵) و احتمال میان کنش ضعیف اسپرم با DNA در حضور مقادیر کم DNA خارجی، به‌خصوص هنگامی که برای مدت کوتاهی گرمخانه‌گذاری می‌شوند وجود دارد. اگرچه افزایش میزان DNA و زمان گرمخانه‌گذاری باعث افزایش میزان جذب می‌شود اما اعتقاد به این است که این امر یعنی جذب بیش از حد باعث شروع روند فعالیت آندونوکلئازهای اسپرم می‌شود (۲۱) که احتمالاً باعث تجزیه هم DNA آندوژن و هم اگزوژن و کاهش میزان تحرک و باروری می‌شود (۲٤ و ۲۲،۱). شاید به همین دلیل باشد که shadanloo و همکاران (۲۰۱۰) با افزایش میزان DNA از ۲۰۰ نانوگرم به ۵۰۰ نانوگرم به ازای 1×10^{6} اسپرم ، ۱/٤ برابر کاهش در میزان بیان ژن انتقالی در رویان‌های به دست آمده از ICSI با اسپرم زنده غیر متحرک و با افزایش DNA از ۱۰۰ به ۵۰۰ نانوگرم ٤/۳ برابر کاهش در

بیان ژن انتقالی در رویان‌های حاصل از ICSI با اسپرم مرده را گزارش کردند. لذا میزان DNA خارجی ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم به ازای هر ۱×۱۰^{۶} اسپرم برای تکامل طبیعی رویان و بیان مؤثر ژن انتقالی در بز پیشنهاد شده است (۲۵). Sciamanna و همکاران (۲۰۱۰) مقدار مناسب پلاسمید pVLCNhGH (حاوی رتروترانسپوزون VL30) را ۱ نانوگرم برای ۱×۱۰^{۶} اسپرم در موش دانسته است. ۱۰–۲۰ نانوگرم باعث کاهش تولید موش تراریخته شد و با ۵۰–۵۰۰ نانوگرم DNA هیچ موش تراریخته ایجاد نشد. در مقابل پلاسمید حاوی پروموتر CMV با تکامل رویان سازگارتر است حتی با مقادیر بالاتر DNA (۲٤) .

Wu و همکاران (۲۰۰۹) اسپرم‌های منجمدـ ذوب شده مرده خوک را در معرض مقادیر متفاوت پلاسمید حاوی eGFP قرار دادند (۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ نانوگرم در ۲ میلی لیتر محیط). در این غلظت‌ها تکامل رویان‌های حاصل از ICSI اختلاف معنی‌داری نداشتند اما میزان بیان eGFP در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ نانوگرم بیشتر از ۱۰ نانوگرم بود (۲۷). Feitosa و همکاران (۲۰۰۹) اگرچه با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری اسپرم و افزایش مقدار DNA (۵۰۰ نانوگرم) افزایش میزان جذب DNA توسط اسپرم گاو را مشاهده کردند اما تجزیه و تخریب DNA آندوژن اسپرم در هیچ تیماری دیده نشد. همچنین افزایش DNA فقط در ۲ ساعت گرمخانه‌گذاری باعث افزایش جذب شد(۳).

تحرک اسپرم: تحرک کل و پیش‌رونده از پارامترهایی است که به‌طور مستقیم با قابلیت باروری اسپرم ارتباط دارد. حرکت اسپرم در خط مستقیم نیز ممکن است نقش مهمی در حرکت آن در مجرای تناسلی ماده داشته باشد. لذا تعیین اثر گرمخانه‌گذاری به DNA خارجی بر تحرک بسیار با اهمیت است. نتایج به دست آمده از اثر این تکنیک بر تحرک اسپرم در گروه‌های مختلف بسیار متفاوت و متناقض است. بعضی از مطالعات نشان دهنده کاهش معنی‌دار تحرک تام و پیش‌رونده اسپرم بعد از تیمار با DNAدر خوک (۲۲ و ۱۳) و گاو (۲۳ و ٦، ۲) است که می‌تواند منتج به عدم امکان استفاده از آن در روش‌هایی مثل IVF یا تلقیح مصنوعی باشد. با این حال بعضی از محققین دیگر این اثرات منفی را مشاهده نکردند (۱۰ و۱). این تفاوت می‌تواند ناشی از تفاوت مشاهده کننده در ارزیابی‌های وابسته به شخص باشد. Canovas و همکاران (۲۰۱۰) مشاهده کردند که سایر پارامترهای حرکت مثل حرکت مستقیم نیز کاهش پیدا می‌کند اما این کاهش در اسپرم‌های گرمخانه‌گذاری شده با DNA خارجی به حدی نبود که به‌طور کامل توانایی لقاح این اسپرم‌ها را به خطر اندازد (۸). اما نکته‌ای که در تحقیق Canovas و بعضی تحقیق‌های دیگر اشاره نشده است آن است که آیا کاهش تحرک در اسپرم‌های گرمخانه‌گذاری شده مربوط به اسپرم‌های متصل شده به DNA خارجی هستند که در این صورت این کاهش حرکت اثر سوء مستقیمی بر انتقال ژن که هدف SMGT است خواهد داشت. به نظر می‌رسد حتی در مطالعاتی که کاهش حرکت در اسپرم گرمخانه‌گذاری شده با DNA خارجی گزارش شده این تفاوت زیاد نیست مثلاً Canovas و همکاران مشاهده کردند که ۲۹ درصد اسپرم‌های گرمخانه‌گذاری شده با DNA نشان‌دار ($۱۰^{۸}$ اسپرم در ۱ میلی لیتر محیط و ۵ میکروگرم DNA) با سنجش به روش فلوسایتومتری متصل به DNA بودند در حالی که اختلاف تحرک گروه تیمار و شاهد تنها ۸درصد (٦۳ درصد در مقابل ۷۱ درصد) بود(۸). البته بعضی تحقیقات نیز کاهش معنی‌داری را در تحرک تام و پیش‌رونده اسپرم بعد از تیمار با DNA نشان نداده است (۱۱)، و حتی در بعضی موارد این پارامترها بهتر شده است (۱۰).

در مطالعه حاضر در گرمخانه‌گذاری با ۱۰۰ نانوگرم کاهش اندکی در تحرک تام و پیش‌رونده اسپرم‌های گروه تیمار با گروه شاهد به استثنای ۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری مشاهده شد. اگر بپذیریم که علت کاهش حرکت اسپرم‌های گروه تیمار اثر DNA خارجی بر آپوپتوز این اسپرم‌ها باشد، شاید با توجه به آن‌که بیشترین درصد جذب در ۱۵ تا ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری رخ می‌دهد و بیشترین مقدار جذب شده به اسپرم نیز پس از ۳۰

دقیقه مشاهده می‌شود، می‌توان کاهش تحرک بیشتر و شدیدتر را پس از ۱۵ و ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری را بدین جهت توجیه کرد. پس از این زمان با توجه به کاهش سرعت میزان و شدت جذب سرعت بی تحرک شدن نیز کاهش می‌یابد. همچنین با افزایش DNA خارجی تنها بین گروه شاهد و ۵۰۰ نانوگرم در تحرک کل و بین گروه شاهد و همه گروه‌های تیمار در تحرک پیش‌رونده اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. در مقادیر زیر ۱۰۰ نانوگرم اختلافی بین تیمار های مختلف با هم و با شاهد در تحرک تام و پیش‌رونده نبود. در بررسی اسپرم انزالی گرمخانه‌گذاری شده با ۱۰۰ نانوگرم DNA خارجی گرچه به جز تحرک کل در ۱۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری اختلاف تحرک کل و پیش‌رونده اسپرم‌های گرمخانه‌گذاری شده با DNA خارجی و اسپرم‌های گروه شاهد معنی‌دار بود، اما این اختلاف به هیچ وجه برابر درصد اسپرم‌های حاوی DNA خارجی نبود. مثلاً پس از ٦٠ دقیقه گرمخانه‌گذاری تعداد اسپرم‌هایی که داری جذب DNA خارجی بوده‌اند حدود ۵۸ درصد بود اما اختلاف تحرک این اسپرم‌ها با گره شاهد تنها حدود ٤ درصد بوده است. لذا به نظر نمی‌رسد جذب DNA خارجی عامل اصلی در این اختلاف بوده است. از بررسی نتایج به دست آمده این طور به نظر می‌رسد که تنها گرمخانه‌گذاری اسپرم با مقادیر بالای DNA خارجی یعنی ۲۰۰ نانوگرم و بیشتر می‌تواند باعث کاهش تحرک کل و پیش‌رونده اسپرم‌ها شود و آنچه باعث کاهش تحرک اسپرم‌ها می‌شود تراکم کم آن‌ها در محیط آزمایش است. دو نکته مهم باید مورد توجه قرار گیرد. یکی آنکه گرچه اکثر اسپرم‌هایی که اتصال DNA به ناحیه قدامی اسپرم را داشتند متحرک بودند اما هیچ اسپرم متحرکی که دارای جذب DNA در ناحیه پشت آکروزوم باشد مشاهده نشد که با یافته‌های بعضی گروه‌ها در گاو و خوک هم‌خوانی دارد (۲۵ و ۲) .

دیگر آن‌که این تفاوت در میزان تحرک تام بین گروه تیمار و شاهد به هیچ وجه برابر درصد اسپرم‌هایی که جذب DNA خارجی داشته‌اند نبود مثلاً پس از ۵، ۱۵، ۳۰، ٦٠ و۹۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری با ۱۰۰ نانوگرم DNA خارجی، متوسط کاهش تحرک نسبت به گروه شاهد به ترتیب ۰/۵، ۷/۲، ۹/۰، ۹/۱ و ۹/۱ درصد بود در حالیکه میزان جذب DNA خارجی به ترتیب ۹/۸، ۳۰/٤، ٤٤/۰، ۵۲/۲ و ٥٦/٤ درصد بود. لذا به نظر نمی‌رسد که تنها جذب DNA خارجی باعث بی تحرک شدن اسپرم‌ها شده باشد.

در این مطالعه در میزان تراسفکشن در اسپرم اپیدیدیمی و اسپرم انزالی تفاوتی وجود نداشت اما شدت جذب در اسپرم انزالی به‌طور معنی‌داری کمتر بود. که ممکن است به علت وجود مقادیر بسیار کم مایع منی در اسپرم انزالی باشد. همان طور که در مطالعه قبل نشان دادیم مایع منی میتواند باعث کاهش اتصال DNA خارجی به اسپرم شود (در دست انتشار). Garcia-Vasquez و همکاران (۲۰۱۰) در قابلیت اتصال DNA به اسپرم‌هایی اپیدیدیمی و انزالی خوک تفاووتی مشاهده نکردند (۱۲/٦۳ درصد و ۱۰/۹٤ درصد به ترتیب) گرچه درصد اسپرم‌های زنده متصل به DNA در گروه اپیدیدیمی کمی بیشتر بود (۲/۱٪ در مقابل ۱/۰۵٪) (۱۵). در بعضی مطالعات مشاهده شده است که کارایی کلی ترانسفکشن اسپرم انزالی بهتر از اسپرم اپیدیدیمی است. گفته می‌شود علت کمتر بودن موفقیت در اسپرم اپیدیدیمی مربوط به فعال شدن آندو نوکلئاز در این سلول‌ها و پاسخ آپوپتوتیک بسیار کاراتر می‌باشد (٢٤). احتمالاً اسپرم اپیدیدیمی نوکلئاز آندوژن را فعال می‌کند که باعث تخریب هم DNA آندوژن و هم DNA اگزوژن در اسپرم می‌شود. اسپرم انزالی پاسخ آندونوکلنازی ضعیفتری دارد که باعث می‌شود سلول‌های بیشتری زنده بمانند (۲۱).

اگرچه SMGT یک روش ساده، ارزان و سریع در تولید حیوانات تراریخت است اما هنوز به‌طور گسترده‌ای استفاده نمی‌شود زیرا کارایی این روش هنوز ثابت نیست و از ۰ تا ۱۰۰ متغیر گزارش شده است. این امر احتمالاً به خاطر پایین بودن احتمال جایگری پایدار DNA خارجی در ژنوم و تکرار پذیری ضعیف آن است. برای افزایش کارایی SMGT کینتیک

میان کنش بین اسپرم و DNA خارجی مورد بررسی مطالعات مختلف قرار گرفته است.

اسپرم گوسفند به میزان بالایی توانایی جذب DNA خارجی را دارد و تفاوت قابل‌توجهی بین اسپرم انزالی و اپیدیدیمی در این مورد وجود ندارد. جذب DNA خارجی خیلی زود می‌تواند آغاز شود. افزایش زمان گرمخانه‌گذاری برای مقادیر کم DNA خارجی تا ٦٠ دقیقه باعث افزایش مقدار DNA جذب‌شده توسط اسپرم می‌شود اما با مقادیر زیاد DNA خارجی پس از ١٥ دقیقه میزان جذب افزایش نمی‌یابد. گرچه عقیده بر این است که جذب مقدار زیاد DNA خارجی توسط اسپرم باعث آغاز روند فعال شدن آندونوکلئازها شود که منجر به تخریب DNA آندوژن و اگروژن شبیه روند آپوپتوز می‌شود که می‌تواند باعث کاهش تحرک و قابلیت حیات اسپرم شود. اما در این آزمایش‌ها اختلاف قابل‌توجهی در تحرک گروه‌های تیمار و شاهد مشاهده نکردیم. به نظر می‌رسد گرمخانه‌گذاری اسپرم با مقادیر متوسط(٢٠تا٢٠٠ نانوگرم) DNA خارجی بیش از ٣٠ دقیقه و در مقادیر کم (٥ نانوگرم) بیش از ٦٠ دقیقه لازم نباشد.

تشکر و سپاسگزاری

از مسئولین بخش پزشکی مولکولی موسسه پاستور که قسمتی از این مطالعه در آنجا صورت گرفت تشکر و قدردانی می‌شود.

فهرست منابع

1. Alderson, J., Wilson, B., Laible, G., Pfeffer, P., L'Huillier, P. (2006): Protamine sulfate protects exogenous DNA against nuclease degradation but is unable to improve the efficiency of bovine sperm mediated transgenesis. Anim. Reprod. Sci. 91(1-2): 23-30.
2. Anzar, M., Buhr, M. (2006): Spontaneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa. Theriogenology. 65(4): 683-690.
3. Bacci, M. L., Zannoni, A., De Cecco, M., Fantinati, P., Bernardini, C., Galeati, G., Spinaci, M., R.Giovannoni, Lavitrano, M., Seren, E., Forni, M. (2009): Sperm-mediated gene transfer–treated spermatozoa maintain good quality parameters and in vitro fertilization ability in swine, Theriogenology. 72(9): 1163-1170.
4. Bernstein, A., Breitman, M. (1989): Genetic ablation in transgenic mice. Mol. Biol. Med. 6(6): 523-530.
5. Blash, S., Melican, D., Gavin, W. (2000): Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats, Theriogenology. 54(6): 899-905.
6. Brackett, B. G., Baranska, W., Sawicki, W., and Koprowski, H. (1971): Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization, Proc Natl Acad Sci 68: 353-357.
7. Camaioni, A., Russo, M., Odorisio, T., Gandolfi, F., Fazio, V., Siracusa, G. (1992): Uptake of exogenous DNA by mammalian spermatozoa: specific localization of DNA on sperm heads. Reproduction. 96(1): 203-212.
8. Canovas, S., Gutierrez-Adan, A., Gadea, J. (2010): Effect of exogenous DNA on bovine sperm functionality using the sperm mediated gene transfer (SMGT) technique. Mol. Reprod. Dev. 77(8): 687-698.
9. Castro, F. O., Hernandez, O., Uliver, C., Solano, R., Milanes C, Aguilar A, Perez A, de Armas R, Herrera L, J. (1990): Introduction of foreign DNA intro the spermatozoa of farm animals. Theriogenology. 34: 1099–1110.
10. Chan, A. W., Luetjens, C. M., Schatten, G. P. (2000): Sperm-mediated gene transfer. Curr. Top. Dev. Biol. 50: 89-102.
11. Feitosa, W. B., Milazzotto, M. P., Simões, R., Rovegno, M., Nicacio, A. C., Nascimento, A. B., Gonçalves, J. S. A., Visintin, J. A., Assumpção, M. E. O. D. Á. (2009): Bovine sperm cells viability during incubation with or without exogenous DNA. Zygote. 17(4): 315-320.

12. Francolini, M., Lavitrano, M., Lamia, C. L., French, D., Frati, L., Cotelli, F., Spadafora, C. (1993): Evidence for nuclear internalization of exogenous DNA into mammalian sperm cells. Mol. Reprod Dev. 34(2): 133-139.
13. Gandolfi, F., Terqui, M., Modina, S., Brevini, T., Ajmone-Marsan, P., Foulon-Gauze, F., Courot, M. (1996): Failure to produce transgenic offspring by intra-tubal insemination of gilts with DNA-treated sperm. Reprod. Fertil. Dev. 8(7): 1055-1060.
14. Garcia-Vazquez, F. A., Ruiz, S., Grullon, L. A., Ondiz, A. D., Gutierrez-Adan, A., and Gadea, J. (2010): Factors affecting porcine sperm mediated gene transfer. Res. Vet. Sci. 91(3): 446-453.
15. García-Vázquez, F., Gutiérrez-Adán, A., and Gadea, J. (2009): Evaluation of binding sperm-exogenous DNA in ejaculate and epididimary porcine spermatozoa, Evaluación de la unión espermatozoide-ADN exógeno en espermatozoides porcinos eyaculados y epididimarios. 41(2): 131-138.
16. Kang, J., Hakimov, H., Ruiz, A., Friendship, R., Buhr, M., Golovan, S. (2008): The negative effects of exogenous DNA binding on porcine spermatozoa are caused by removal of seminal fluid. Theriogenology. 70(8): 1288-1296.
17. Lavitrano, M., Forni, M., Bacci, M. L., Di Stefano, C., Varzi, V., Wang, H., Seren, E. (2003): Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. Mol. Reprod. Dev. 64(3): 284-291.
18. Lavitrano, M., French, D., Zani, M., Frati, L., Spadafora, C. (1992): The interaction between exogenous DNA and sperm cells. Mol. Reprod. Dev. 31(3): 161-169.
19. Ma, H., Quan, F., Chen, D., Zhang, B., Zhang, Y. (2010): Alterations in mitochondrial function and spermatozoal motility in goat spermatozoa following incubation with a human lysozyme plasmid. Anim. Reprod. Sci. 121(1-2): 106-114.
20. Maione, B., Lavitrano, M., Spadafora, C., Kiessling, A. A. (1998): Sperm-mediated gene transfer in mice. Mol. Reprod. Dev. 50(4): 406-409.
21. Maione, B., Pittoggi, C., Achene, L., Lorenzini, R., Spadafora, C. (1997): Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. DNA Cell Biol. 16(9): 1087-1097.
22. Sasaki, S., Kojima, Y., Kubota, H., Tatsura, H., Hayashi, Y., Kohri, K. (2000): Effects of the gene transfer into sperm mediated by liposomes on sperm motility and fertilization in vitro. Hinyokika Kiyo. 46(8): 591-595.
23. Schellander, K., Peli, J., Schmoll, F., Brem, G. (1995): Artificial insemination in cattle with DNA-treated sperm. Anim. Biotechnol. 6(1): 41-50.
24. Sciamanna, I., Piccoli, S., Barberi, L., Zaccagnini, G., Magnano, A. R., Giordano, R., Campedelli, P., Hodgson, C., Lorenzini, R., Spadafora, C. (2000): DNA dose and sequence dependence in sperm-mediated gene transfer, Mol. Reprod Dev. 56(2): 301-305.
25. Shadanloo, F., Najafi, M. H., Hosseini, S. M., Hajian, M., Forouzanfar, M., Ghaedi, K., Abedi, P., Ostadhosseini, S., Hosseini, L., Eskandari-Nasab, M. P., Esfahani, M. H. N. (2010): Sperm status and DNA dose play key roles in sperm/ICSI-mediated gene transfer in caprine. Mol. Reprod Dev. 77(10): 868-875.
26. Sperandio, S., Lulli, V., Bacci, M. L., Forni, M., Maione, B., Spadafora, C., Lavitrano, M. (1996): Sperm□mediated DNA transfer in bovine and swine species. Anim Biotechnol. 7(1): 59-77.
27. Wu, Y., Liu, C. J., Wan, P. C., Hao, Z. D., Zeng, S. M. (2009): Factors affecting the efficiency of producing porcine embryos expressing enhanced green fluorescence protein by ICSI-mediated gene transfer method. Anim Reprod Sci. 113(1): 156-166.
28. Zi, X. D., Chen, S. W., Liang, G. N., Chen, D. W., Zhang, D. W., Yin, R. H. (2009): The effect of retroviral vector on uptake of human lactoferrin dna by yak (bos grunniens) spermatozoa and their fertilizability in vitro. Anim. Biotechnol. 20(4): 247-251.