✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۵۲، پاییز ۱۳۸۰

روش آماده‌سازی سلول تخمک برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی

● **مجتبی کافی**، گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز
● **حسن نیلی**، گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز
● **فخرالدین مصباح**، گروه علوم پایه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۷۹ تاریخ پذیرش: مرداد ماه ۱۳۸۰

چکیده
مطالعه ساختار فراریزبینی سلولهای جنسی راهی جهت شناخت و تبیین فرآیند تولید مثل در پستانداران است. کوچک بودن سلول تخمک و امکان از دست دادن آن در حین جابجائی در طی مراحل مختلف آماده‌سازی برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی (TEM)، ضرورت بکارگیری یک روش ساده، قابل تکرار و مطمئن را برای آماده‌سازی نمونه تخمک ایجاب می‌کند. در مطالعه حاضر، با استفاده از اسلاید حفره‌دار، سرنگ و سر سوزن انسولین و پیپت پاستور و بدون جابجائی نمونه، مراحل آماده‌سازی ۸ عدد سلول تخمک گوسفند و ۴۳ عدد تخمک شتر با موفقیت انجام گرفت. کیفیت نمونه‌ها، برش‌ها و تصاویر بدست آمده در این مطالعه قابل مقایسه با روشهای متداول در سایر آزمایشگاههای میکروسکوپ الکترونی است.
کلمات کلیدی: شتر، تخمک، فراریزبینی

✓ **Pajouhesh & Sazandegi, No 52 PP:53-55**

A preparation method of oocyte for electron microscopy study

By: Kafi M., Dept. of Clinical Science, Veterinary School, Shiraz Univ.; Nili H., Dept. of Clinical Science, Veterinary School, Shiraz Univ.; Mesbah F.; Dept. of Anatomy, Medical School, Shiraz Univ.

Establishment of a simple, fast and reliable procedure is necessary for study of ultrastructural features of mammalian oocytes. The present study was conducted to obtain a simple and reliable procedure to examine the fine structure of mammalian oocytes and/or embryos. Excellent quality immature oocytes from apparently non-atretic camel and ewe ovarian follicles were collected and rinsed with normal saline. All steps of fixation, dehydration and embedding of the oocytes were performed using only a cavity slide. An insulin syringe and pasture pippet were used for removing and adding the solutions, respectively. Therefore, no transfer of the oocytes was required from dish to dish. The study was replicated 3 times on 8 ewe oocytes and 43 dromedary camel oocytes. The technique applied here has the advantages that makes a faster processing of the oocyte with a negligible possibility of loosing the specimen. Also obtaining high quality electron-photomicrograph of the camel oocytes was possible using this technique. Structures such as nuclei, nucleoli, mitochondria and cortical granules were preserved, photographed without any ultrastructural changes.

Key words: Camel, Oocyte, Ultrastructure

مقدمه

مطالعه ساختار سلول تخمک با میکروسکوپ الکترونی شامل مراحل آماده‌سازی متعدد و دقیقی است که انجام آن به مهارت و وقت کافی نیاز دارد. اگر چه ابعاد توصیه شده برای بافت‌های مورد مطالعه با میکروسکوپ الکترونی در حدود ۱ میلی‌متر مکعب است ولی به دلیل کوچک بودن سلول تخمک (حدود ۰/۱ اندازه ذکر شده) آماده‌سازی آن برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی (TEM) در مقایسه با بسیاری از نمونه‌های بیولوژیک دیگر مشکل‌تر است. به علاوه وجود مراحل متعدد جابجایی نمونه از محلولی به محلول دیگر خطر از دست رفتن آن را طی این مراحل افزایش می‌دهد. در همین رابطه مطالعه فوق ریزبینی تخمک در گونه‌های مختلف حیوانی توسط محققین انجام گرفته است (۴، ۵، ۱۳). در تحقیقات منتشر شده به از دست رفتن سلول تخمک حین آماده‌سازی اشاره شده است (۲، ۷، ۹، ۱۷).

روشهای مختلفی برای آماده‌سازی سلول تخمک و مطالعه با میکروسکوپ الکترونی ارائه و مورد استفاده قرار گرفته است. روش استفاده از شیشه ساعت و درست کردن آمپول ثبوت به وسیله پیپت پاستور توسط Saacke و Senger پیشنهاد شده است (۱۴). در این روش عمل انتقال تخمک از محلولی به محلول دیگر دشوار و امکان از دست دادن آن وجود دارد. امروزه این روش کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد Madsen و Hyttel برای جلوگیری از مفقود شدن تخمک ابتدا آن را در آگار قالبگیری نموده و تخمک را تا مرحله آبگیری پیش بردند(۷). سپس با قالبگیری مجدد برشهای ضخیم برای مشاهده ساختمان‌های مورد نظر مانند هسته، مشکل از دست دادن تخمک را تا حدودی کمتر کرده است. اما قالبگیری مجدد ممکن است همیشه قابل انجام نباشد. به علاوه در این روش از شیشه ساعت جهت انتقال سلول تخمک در قبل از آبگیری استفاده می‌گردد. لذا احتمال از دست رفتن سلول تخمک هنوز وجود دارد. Nogues و همکاران (۹) برای جلوگیری از جابجایی تخمک با پیپت به وسیله دهان و استفاده مستمر از میکروسکوپ استریو، همچنین از دست دادن نمونه، از روش Pre-embedding اووسیت در آگار استفاده نموده است. Britton و همکاران (۲) ابتدا تخمک‌ها را با محلول گلوتارآلدئید و BSAD در Beem (capsule) سانتریفوژ کرده سپس تخمک‌های ته‌نشین شده در کپسول را به یک ویال منتقل و مراحل آماده‌سازی در همین ویال انجام گرفت. تعداد مطالعات انجام گرفته در آزمایشگاههای میکروسکوپ الکترونی ایران در خصوص روش آماده‌سازی و مطالعه‌فوق‌ریزبینی تخمک پستانداران بسیار کم است (۱). هدف از انجام این مطالعه ارائه یک روش ساده، قابل اجرا و موفق جهت بررسی ساختمان فوق ریزبینی تخمک و رویان اولیه پستانداران با میکروسکوپ الکترونی است. تخمک شتر یک کوهانه که تاکنون در دنیا مطالعه‌ای روی آن انجام نگرفته است به عنوان یکی از نمونه‌ها مورد آزمایش قرار گرفت.

مواد و روش کار

جمع‌آوری تخمک

این مطالعه طی سه تکرار در آزمایشگاه میکروسکوپ

الکترونی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز انجام گرفت. در تکرار اول تعداد ۸ نمونه تخمک گوسفند و در تکرار دوم و سوم به ترتیب تعداد ۸ و ۳۵ نمونه تخمک شتر یک کوهانه مورد استفاده قرار گرفت.

تخمدان گوسفندها و شترهای ذبح شده در کشتارگاه شیراز بلافاصله جمع‌آوری و در فلاسک حاوی سرم فیزیولوژی (۰/۹ درصد) و دمای ۳۲ تا ۳۶ درجه سانتیگراد قرار گرفت. نمونه‌ها در مدت ۱ تا ۲ ساعت پس از ذبح حیوان به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه پس از شستشوی تخمدان‌ها با سرم فیزیولوژی با استفاده از یک سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری و سر سوزن ۲۲ اقدام به تخلیه مایع فولیکولی از فولیکول‌های با قطر ۲ تا ۶ میلیمتر (غیر آترتیک) گردید. مایع فولیکولی داخل دیش ۳۵ میلی‌متری ریخته شد، سپس با استفاده از یک میکروسکوپ لوپ (Zeiss MC 80) تخمک‌های دارای چند لایه سلولهای کومولوس و اووپلاسم یکنواخت برای مطالعه میکروسکوپ الکترونی انتخاب شدند.

ثبوت و آب‌گیری

تخمک‌ها بوسیله سرنگ انسولین و یونوپت (شماره ۲۲) به طور جداگانه درون اسلاید حفره‌دار (با حجم ۰/۶ تا ۰/۸ میلی‌لیتر) قرار گرفتند. سپس تخمک‌ها دو مرتبه هر بار به مدت ۱۵ دقیقه به ترتیب در درجه حرارت اتاق و درجه حرارت ۴ درجه سانتیگراد با استفاده از محلول ۲/۵ درصد گلوتارآلدئید در بافرفسفات ۰/۱ مولار ثابت گردید. تخمکها با محلول بافرفسفات ۰/۱ مولار (هر بار مدت ۱۵ دقیقه) در دمای اتاق شستشو داده شد، سپس با استفاده از محلول ۰/۱ اسمیوم تتراکسید (OsO_4) در بافرفسفات ۰/۱ مولار (۶۰-۴۵ دقیقه) (در دمای ۴ درجه سانتیگراد) اقدام به ثبوت ثانویه تخمکها گردیدند تخمکها مجدداً با محلول بافرفسفات ۰/۱ مولار شستشو گردیدند. در مرحله بعد تخمکها دو مرتبه (هر بار به مدت ۱۰-۵ دقیقه) با آب مقطر دو بار تقطیر در دمای اتاق شسته شدند. مرحله آب‌گیری تخمکها با استفاده از اتانول (Merck) در غلظت‌های ۳۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد (هر غلظت به مدت ۱۰-۵ دقیقه) در دمای اتاق انجام گرفت.

نفوذ رزین و قالب‌گیری

مرحله جایگزینی و نفوذ رزین در تخمک با استفاده از ترکیب اتانول یا پروپیلن اکسید و رزین (Agar 100, Resin) به نسبت ۱:۳، ۱:۱، ۳:۱ به ترتیب به مدت ۱، ۱ و ۲ ساعت و سرانجام رزین خالص به مدت ۱۶ ساعت انجام شد. کلیه مراحل فوق بدون جابجائی سلولهای تخمک انجام شد. برای حذف یک محلول از محیط تخمک از سرنگ انسولین و برای اضافه کردن محلول جدید از پیپت پاستور استفاده گردید. مرحله قالب‌گیری مطابق روش‌های متداول (۷) انجام گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون با حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای پلی مریزه شدن، قرار داده شد. برای تهیه برشهای ضخیم (۱ میکرون) از تیغه‌های شیشه‌ای استفاده گردید و برشها با محلول تولیدین بلو یک درصد رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. پس از ارزیابی تخمک در برش‌های ضخیم و دستیابی به مقطع مورد نظر، برشهای نازک (۹۰-۶۰ نانومتر) تهیه و روی گریدهای ۱۰۰ و یا مش ۲۰۰ منتقل و با استات اورانیوم و سیترات سرب رنگ‌آمیزی شدند. سپس بوسیله میکروسکوپ Philips CM10) (TEM مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

خلاصه نتایج این مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. در تکرار اول از مجموع ۸ تخمک گوسفند، تعداد ۳ عدد در حین آماده‌سازی حالت طبیعی خود را از دست داده، چروکیده شده بودند. بقیه تخمک‌ها مراحل آماده‌سازی را به خوبی تحمل کرده، پس از تهیه برشهای ضخیم مورد ارزیابی قرار گرفتند. در تکرار دوم، همه ۸ تخمک شتر پس از انجام مراحل آماده‌سازی چروکیده شده بودند. در این تکرار در مرحله نفوذ و جایگزینی رزین از پروپیلن اکسید به جای اتانول استفاده شده بود.

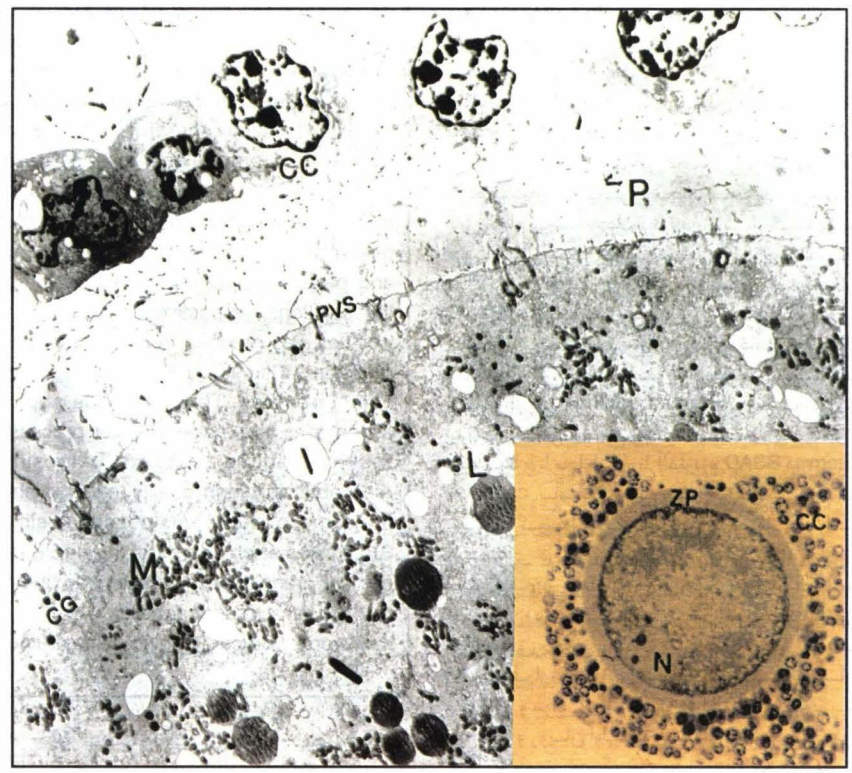
در تکرار سوم از مجموع ۳۵ تخمک شتر، تعداد ۳۱ تخمک (۸۸/۵٪) تا مرحله آخر حفظ و تعداد ۴ تخمک (۱۱/۵٪) مفقود گردید. پس از بررسی برش ضخیم با میکروسکوپ نوری، تعداد ۲۴ تخمک شکل طبیعی خود را حفظ کرده بودند. برش نازک تهیه شده از این نمونه‌ها دارای کیفیت خوب جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی بود.

در بررسی برشهای ضخیم با میکروسکوپ نوری، شکل کروی تخمک حفظ شده، لایه شفاف[1] یکنواخت و حاوی زواید سلولی بود. قطرات چربی، وزیکولها، تعداد زیادی میتوکندری و دانه‌های قشری[2] در اووپلاسم بخوبی قابل مشاهده و تشخیص بودند (تصویر ۱). در مشاهده برشهای نازک، لایه شفاف حاوی زواید سلولی، پیوند بین سلولهای گرانولوزا و سلول تخمک و بین سلولهای گرانولوزا، غشاء سلولی، فضای پری ویتلین[3] اجزاء سیتوپلاسمی نظیر میتوکندری در شکل‌های مختلف، شبکه اندوپلاسمی، دستگاه گلژی، دانه‌های قشری، هسته و غشاء دو لایه آن و در بعضی نمونه‌ها هستک به خوبی قابل مشاهده و ارزیابی بود.

بحث

در مطالعه حاضر تخمک‌ها پس از طبقه‌بندی

تصویر ۱- ساختار فرا ریزبینی تخمک نابالغ شتر یک کوهانه (برش ضخیم: X۲۵۰ و نازک: X۳۳۰۰)
CC = سلول کومولوس، ZP = پرده شفاف، PVS = فضای پری ویتلین
M = میتوکندری، V =وزیکول، L=قطره چربی، N= هسته، CG= دانه‌های قشری



جدول شماره ۱- خلاصه نتایج مختلف آماده‌سازی نمونه‌های سلول تخمک گوسفند و شتر

تکرار	ابتدای آزمایش	تعداد در مرحله قالب گیری	تعداد در مرحله برش ضخیم	تعداد در مرحله برش نازک	تعداد غیر قابل استفاده (درصد)
اول	۸	۸	۸	۵	۳ (۳۷/۵)
دوم	۸*	۸	۸	**	۸ (۱۰۰)
سوم	۳۵	۳۱	۳۱	۲۴	۷ (۲۲/۵)
جمع	۵۱	۴۷	۴۷	۲۹	۱۸

* از پروپیلن اکسید در مرحله نفوذ و جایگزینی استفاده شد.

** در این مرحله تخمک‌ها پس از انجام مراحل آماده‌سازی چروکیده شده بودند.

بلافاصله از دیش به اسلاید حفره‌دار منتقل شدند. کلیه مراحل آماده‌سازی در همان اسلاید حفره‌دار، بدون جابجائی تخمک و فقط با تعویض محلولهای مختلف انجام گرفت. تعویض محلولها با استفاده از پیپت پاستور و سرنگ و سر سوزن انسولین انجام شد. کل زمان مورد نیاز در این روش تا قبل از نفوذ رزین خالص ۷/۵-۸/۵ ساعت می‌باشد. در این روش ۹۲/۱۵ درصد تخمک‌ها (۴۷ نمونه از مجموع ۵۱ نمونه) تا آخرین مرحله آماده‌سازی (قالب‌گیری) حفظ گردیدند. از این تعداد ۶۱/۷۰٪ (۲۹ نمونه از مجموع ۴۷ نمونه) آنها کاملاً حالت طبیعی داشته و قابل بررسی با میکروسکوپ الکترونی بودند. Senger و Saacke (۱۴) میزان تخمک‌هایی که به مرحله قالب‌گیری رسیده‌اند را ۹۰ درصد ذکر نموده است. در مطالعه حاضر مقاطع (ضخیم و نازک) از کیفیت بالایی برخوردار و عکسهای گرفته شده نیز قابل مقایسه با روشهای دیگران می‌باشد.

نتایج بدست آمده در این آزمایش نشان دهنده نامناسب بودن استفاده از پروپیلن اکسید در مرحله نفوذ زرین است. زمانی که از این محلول استفاده گردید، کلیه تخمک‌ها چروکیده شدند. این مشاهده مطابق با نظر برخی از محققین در مورد عدم استفاده از پروپیلن اکسید در مرحله نفوذ رزین می‌باشد (۱۵). در آزمایش حاضر دلیل چروکیده شدن تخمک‌ها را می‌توان ناشی از پروپیلن اکسید و یا تحمیل فشار ستون رزین بر تخمک‌ها دانست. ابتدا رزین در حرارت آون روان و شل شده، در این زمان به دلیل سنگین‌تر بودن تخمک نسبت به رزین امکان جابجایی آن نیز وجود دارد. این مشکل را با استفاده از روش Saacke و Senger (۱۴) می‌توان برطرف نمود. به این ترتیب که ابتدا تخمک با چند قطره رزین در نوک قالب در حرارت ۴۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴ تا ۶ ساعت ثابت نمود. سپس محفظه قالب‌گیری کاملاً از رزین پر و به مدت ۲۴ تا ۴۲ ساعت در آون قرار داده می‌شود تا پلیمریزه شود.

تهیه تصویر خوب و با کیفیت از ساختار فرا ریزبینی سلول تخمک نه تنها نیازمند استفاده از روش مناسب می‌باشد، بلکه به دقت و مهارت کافی در تمام مراحل زیر نیاز می‌باشد. تهیه و انتقال صحیح نمونه، درجه حرارت مناسب محلول انتقال، مدت زمان انتقال، چگونگی تخلیه فولیکول و بدست آوردن تخمک، ثبوت سریع تخمک، نوع و غلظت محلولهای ثبوت (۱۰، ۱۲) شستشو، آبگیری و نفوذ زرین و نوع محلول واسطه (۱۵)، نوع و نسبت محلولهای مورد استفاده در تهیه رزین خالص (۳، ۶، ۸)، کیفیت تیغ مورد استفاده در تهیه برش، تنظیم بودن میکروتوم، درجه حرارت محیط کار، آرام بودن محیط کار، غلظت و کیفیت مواد رنگ کننده (۱۱، ۱۶). شاید بتوان مشکل‌ترین مرحله در روند آماده‌سازی سلول تخمک برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی را تهیه مقاطع ضخیم و نازک از ساختارهای مورد نظر در تخمک دانست. چراکه به دلیل کوچک بودن ابعاد، هرگونه لرزش اضافی در مراحل تهیه مقطع ممکن است به از دست رفتن تخمک منجر گردد.

در این مطالعه، با استفاده از تخمک گوسفند و شتر به عنوان نمونه، مراحل آماده‌سازی تخمک برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی با روشی ساده و موفقیت‌آمیز انجام گرفته است. این روش در مقایسه با سایر روشها که از Re-embedding استفاده شده است ساده‌تر می‌باشد، اما امکان از دست رفتن تخمک در هر کدام از روشها و همچنین روش حاضر وجود دارد. همچنین بر اساس اطلاعات موجود، مطالعه حاضر نخستین مطالعه‌ای است که تصویر فرا ریزبینی (TEM) سلول تخمک شتر یک کوهانه را ارائه می‌دهد.

تشکر و تقدیر

نویسندگان مقاله از همکاریهای مدیریت محترم دانشکده دامپزشکی شیراز و همچنین زحمات بی‌شائبه آقایان دکتر سهراب اکبری و آیت صفوی برای انجام این مطالعه در آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی دانشکده دامپزشکی شیراز تشکر و قدردانی می‌نمایند و آقای مهندس زین‌العابدین تقی‌پور در آزمایشگاه مامائی همچنین از سرکار خانم شریف‌پور به خاطر تایپ مقاله قدردانی می‌گردد.

پاورقی‌ها

1- Zona pellucida

2- Cortical granules

3- Peri-vitteline space

منابع مورد استفاده

۱- صالح‌نیا، م.، رضازاده، م. و الطریحی، ت.، ۱۳۷۸. انجماد شیشه‌ای تخمک متافاز II موش با استفاده از ضد یخ اتیلن گلیکول، یاخته، شماره ۳، صص ۳۲-۲۵. چاپ تهران.

2- Britton A.P., Moon Y.S. and Yuen B.H.A., 1991. Simple handling technique for mammalian oocytes and embryos during preparation for transmission electron microscopy. Journal of Microscopy. 161 (3): 497-499.

3- Burke C.N., Geiselman C. and Wayne J., 1971. Exact anhydride epoxy percentages for electron microscopy embedding. Journal of Ultrastructure Research. 36: 119-126

4- Fair T., Huishof S.C.J., Hyttel P. and Greve T. 1997. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. Anatomy and Embryology. 195:327-336.

5- Falconnier C. and Kress A., 1992. Ultrastructural aspects of oocyte growth in marsupial *Mondolphis domestica* (grey short tailed opossum). Journal of Anatomy. 181:481-498.

6- Hilton H., 1994. Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy. Stain Technology 39:111-114.

7- Hyttel P. and Madsen I., 1987. Rapid method to prepare mammalian oocytes and emberyos for transmission electron microscopy. Acta Anatomica. 124:12-14.

8- Luft John H., 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology. 9:404-409.

9- Nogues C., Marti M. Boada M. and Ponsa M., 1994. Simple method for processing individual oocytes and embryos for electron microscopy. Journal of Microscopy. 174:51-54.

10- Plalde G.E.A., 1951. Study of fixation for microscopy. Journal of Experimental Medicine. 95:285-297.

11- Reynolds E.S., 1962. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. Journal of Cell Biology. 17:208-212.

12- Sabatini D.D., Bensch K. and Barrnett R.J., 1963. Cytochemistery and electron microscopy the preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. Journal of Cell Biology. 17:19-58.

13- Suzuki H., 1987. Ultrastructure and some biologic properties of human oocytes and granulosa cell cultured invitro. Fertility and Sterility. 35(2):142-149.

14- Senger L. and Saacke R.G.A., 1970. Amethod for preparing single mammalian ova for cytological studies using light and electron microscopy. Journal of Reproduction and Fertility. 21:177-178.

15- Szollosi D. and Hunter R.H.F., 1973. Ultrastructural aspects of fertilization in the domestic pig sperm penetration and pronucleus formation. Journal of Anatomy. 116:181-206.

16- Venable J.H. and Coggeshall R.A., 1965. Simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. Journal of Cell Biology. 25:407-413.

17- Wahnschaffe U.A., 1985. A method for re-embedding semi thin resin sections ultra-thin sectioning. Mikroscopie. 42:108-110.