

Efficient Method for Combined Electrical-Chemical Parthenogenetic Activation of Bovine Oocytes

Nasr-Esfahani M.H., Ph.D.* , Hajian M., M.Sc. Hosseini S.M., D.V.M., Molavi F., B.Sc. Forozanfar M., Ph.D., Abedi P., B.Sc., Memar Emamieh M., B.Sc., Pilevarian A.A., Ph.D., Shahverdi A., Ph.D.

**P.O.Box: 8158968433, Embryology Department, Royan institute, Esfahan, Iran*

Abstract

purpose: Parthenogenetic activation is among the crucial steps determining successful development of mammalian cloned embryos. This study, therefore, was conducted to evaluate the efficiency of a novel combined electrical-chemical artificial activation method for bovine cloning.

Materials and Methods: In vitro matured bovine oocytes than were initially exposed to electrical pulse, used for cell fusion during cloning, and then treated with temporal sequential combinations of 3 chemical activators [calcium ionophore (CI), strontium (SR) and ethanol (ET)], followed by exposure to a protein kinase inhibitor or used for in vitro fertilization as control group. Treated and naturally fertilized oocytes were further cultured for up to 8 days. Embryo development was scored daily and blastocyst cell counting carried out using differential staining at day 8 of culture.

Results: Among 15 temporal sequential combinations of three chemical activators, the best cleavage rates were associated with double (SR–CI, 84.4%), triple (CI–SR–ET, 79.4%) and single (CI, 73.7%) compounds, respectively, which were not significantly different with each other and with in vitro fertilized (IVF) (85.5%). The highest blastocyst rates were gained with ET–SR (25%), SR–CI–ET (21.7%) and CI (20.3%) accordingly which were not significantly different with each other but significantly lower than IVF (46%). Embryo cell counting further confirmed reasonably better quality of blastocysts produced using double, triple and single compounds.

Conclusion: Although most of the sequential artificial activation compounds induced high cleavage rate close to IVF, but this did not assure comparable further embryo development to the blastocyst stage. Nevertheless, the results suggest exposure of in vitro matured bovine oocytes to electrical pulse, followed by exposure to CI–6- dimethylaminopurine (6-DMAP) or ET–SR–6-DMAP could be regarded as the optimal artificial activation.

Key Words: Bovine, Oocyte, Parthenogenetic activation, Embryo development

تحقق یک روش کارآمد اکتیواسیون الکتریکی - شیمیایی جهت فعال سازی پارتنوژنیک اووسیت گاو

✍ محمد حسین نصر اصفهانی Ph.D.*، مهدی حاجیان M.Sc.*، سید مرتضی حسینی D.V.M.*، فریبا مولوی B.Sc.*،

محسن فروزانفر Ph.D.**، پروانه عابدی B.Sc.*، مریم معمار امامیه B.Sc.*،

علی اصغر پیله وریان Ph.D.***، عبدالحسین شاهوردی Ph.D.*

* گروه جنین شناسی پژوهشکده رویان تهران
 ** گروه علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت
 *** گروه زیست شناسی دانشگاه پیام نور اصفهان
 تاریخ وصول: مهر ماه ۸۵، تاریخ پذیرش: آذر ماه ۸۵

چکیده

هدف: جستجوی یک راهبرد کارآمد برای اکتیواسیون پارتنوژنیک اووسیت گاو

مواد و روشها: اووسیت های بالغ شده آزمایشگاهی ابتدا در معرض پالس الکتریکی قرار گرفته و پس از درمان با ۱۵ ترکیب متوالی ممکن از سه اکتیواتور شیمیایی Calcium Ionophore(CI)، Strontium(SR) و Ethanol (ET)، تحت تأثیر یک مهارکننده پروتئین کینازی قرار گرفتند. اووسیت های تحت درمان و نیز اووسیت های لقاح یافته (گروه کنترل) تا ۸ روز کشت داده شدند. تکوین جنینی به صورت روزانه و شمارش سلولی بلاستوسیست با استفاده از رنگ آمیزی افتراقی در روز ۸ کشت انجام پذیرفت.

یافته ها: بالاترین میزان تولید بلاستوسیست به ترتیب در گروه ET-SR (۲۵ درصد)، SR-CI-ET (۲۱/۷ درصد)، SR-ET-CI (۲۰/۷ درصد) و CI (۲۰/۳ درصد) ثبت شد که تفاوت چشمگیری با همدیگر و با IVF (۴۶ درصد) نداشتند به جز گروه CI که به طور معنی دار کمتر از IVF (In Vitro Fertilization) بود. شمارش تعداد سلول جنینی نیز کیفیت بهتر بلاستوسیست های تولید شده توسط ترکیبات دوتایی (ET-SR)، سه تایی (SR-CI-ET) و تکی (CI) را تأیید کرد.

نتیجه گیری: نتایج حاصله بیانگر آن است که ترکیب دو تایی ET-SR می تواند بهترین راهبرد اکتیواسیون مصنوعی اووسیت های بالغ شده آزمایشگاهی گاو باشد.

کلید واژه ها: پارتنوژنز، اکتیواسیون مصنوعی، اووسیت، کلیواژ

✉ آدرس مکاتبه: اصفهان، پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی،

صندوق پستی: ۸۱۵۸۹۶۸۴۳۳

E-mail: mh_nasr@med.mui.ac.ir

مقدمه

پیشرفت‌های اخیر در زمینه بهره‌گیری از فناوری انتقال هسته سلول‌های سوماتیک^۱ برای تولید حیوانات شبیه‌سازی شده دریچه‌های نوینی را در قلمرو بیولوژی تولید مثلی و نیز در زمینه پزشکی و به‌خصوص شبیه‌سازی درمانی^۲ گشوده است [۱]. علیرغم اینکه تولید حیوانات کلون در گونه‌های مختلف گزارش شده است [۴-۲]، ولی هنوز کارایی کلی شبیه‌سازی با استفاده از روند SCNT پایین بوده و توان تکاملی اووسیت‌های ساختار مجدد^۳ حاصل از سلول‌های سوماتیک مختلف پائین‌تر از IVF است [۵ و ۶].

فیوژن (الحاق سلولی: fusion) و متعاقب آن اکتیواسیون (فعال‌سازی: activation) اووسیت‌های ساختار مجدد ازجمله مراحل الزامی است که موفقیت انتقال هسته (NT)^۴ و تکوین بعدی جنین‌های شبیه‌سازی شده را تبیین می‌کند [۷ و ۸]. یک پروتکل اکتیواسیون مناسب ممکن است باعث بهبود برنامه‌ریزی مجدد و توان تکاملی جنین‌های ساختار مجدد شده گردد، که این امر به نوبه خود شانس موفقیت SCNT را افزایش می‌دهد [۹]. به همین دلیل از دهه ۱۹۹۰ توجه خاصی به امر تدوین یک پروتکل کارآمد برای فیوژن و اکتیواسیون اووسیت‌های ساختار مجدد پستانداران شد [۱۰]. تحریک فعال‌سازی که در آن زمان استفاده می‌شد شامل یک یا دو پالس الکتریکی بود که هم باعث الحاق سلول دهنده و گیرنده هسته^۵ و هم اکتیواسیون آن می‌شد [۱۱].

با این وجود به نظر می‌رسد که پالس الکتریکی (EP)^۶ مورد استفاده برای فیوژن قادر به ایجاد اکتیواسیون مناسب که بتواند تکوین جنینی متعاقب آن را هدایت کند نیست، بنابراین در اکثر مطالعات علاوه بر EP از اکتیواتورهای دیگر نیز استفاده می‌شود [۱۲ و ۱۳]. با توجه به این نیاز و نیز تلاش

برای الگوبرداری از روندهای بیوشیمیایی و مورفولوژیک طبیعی حاصل از لقاح اووسیت و اسپرم، طیف وسیعی از اکتیواتورهای شیمیایی معرفی و آرایه شد [۱۴ و ۱۵]. طی مطالعات اولیه مشخص شد اووسیت‌هایی که به‌طور پارتونژنیک فعال شده‌اند می‌توانند مدل مناسبی برای مطالعه کیفیت اکتیواسیون باشند. در همین ارتباط، بهترین ملاک ارزیابی روش‌های اکتیواسیون، توان بعدی این اووسیت‌ها در تکوین ماقبل و حتی مابعد لانه‌گزینی است [۱۶]. تاکنون به جزء فاکتور اسپرم خوک، استحصال شده از اسپرم‌های خوک، هیچ ماده اکتیواتوری که بتواند به تنهایی باعث ایجاد نوسانات فیزیولوژیک Ca^{2+} و تکوین اووسیت‌های جوان گاو باشد به‌دست نیامده است [۱۷ و ۱۸].

پروتکل‌های موجود اکتیواسیون جنین‌های ساختار مجدد گاو معمولاً بر مبنای استفاده از مواد محرک کلسیم از قبیل یونوفور کلسیم (CI)، اتانول (ET) و استرونسیم (SR) به‌عنوان تحریک اولیه ایجاد نوسانات کلسیم [۱۸] و درمان ثانویه با سیلکوهگزاماید (CHX) [۱۹] یا 6-DMAP (6-Dimethylaminopurine) [۲۰] برای غیرفعال‌سازی فاکتور محرک میتوز (MPF)^۷ یا فاکتور ایست سلولی (CSF)^۸ برنامه‌ریزی شده است. این نوع درمان منجر به ازسرگیری میوز اووسیت و ورود آن به اولین سیکل سلولی جنینی می‌شود [۲۱].

علیرغم کارهای زیادی که در این زمینه انجام پذیرفته هنوز هیچ توافق واحدی در جهت استفاده از یک پروتکل مشترک وجود ندارد. افزون بر این، جز در خوک در هیچ کدام از مطالعات اولیه انجام پذیرفته در زمینه پارتونژن، اثر استفاده همزمان پالس الکتریکی و اکتیواسیون شیمیایی بر روی پروسه اکتیواسیون و نیز کارایی SCNT مورد توجه قرار نگرفته است [۲۲]. بنابراین مطالعه حاضر به منظور ایجاد بهترین پروتکل اکتیواسیون SCNT گاو انجام پذیرفت تا اثر درمان‌های مرکب نوین حاصل از EP، ترکیبات متوالی CI، ET و SR در

1. SCNT: Somatic Cell Nuclear Transfer
2. Therapeutic cloning
3. Reconstituted
4. Nuclear transfer
5. Karyoplast cytoplasm fusion
6. Electrical pulse

7. Mitosis promoting factor
8. Cytostatic factor

اووسیت‌های بالغ شده پس از دو بار شستشو در گروه‌های ۲۵ تا ۳۰ تایی به قطره‌های ۲۰۰ میکرولیتری محیط بلوغ در زیر روغن مینرال انتقال داده می‌شدند. محیط IVF از Fert-TALP [۲۴] غنی‌سازی شده با پنی سیل آمین ($20 \mu\text{M}$) و ($10 \mu\text{M}$) هیپوتارین و اپی‌نفرین و ($0.56 \mu\text{g/ml}$) هپارین تشکیل شده بود. پس از ذوب سیمن در آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اسپرماتوزوآهای متحرک به روش (Swim-up) استحصال شده و در غلظت نهایی $1 \times 10^6/\text{ml}$ به قطره‌های لقاح افزوده شدند. اووسیت و اسپرم قطره لقاح برای مدت ۲۰ ساعت در شرایط $38/6$ درجه سانتی‌گراد، $5\% \text{ CO}_2$ درصد، O_2 ۵ درصد و رطوبت ماکزیمم انکوبه شدند.

متعاقب لقاح، سلولهای کومولوس از اطراف زیگوت‌های فرضی^۵ جدا شده و پس از شستشو به محیط کشت حاوی مونولایر سلولهای ورو انتقال داده شدند. در تمام طول دوره کشت، جنینها روزانه به دیشهای کشت حاوی سلولهای ورو انتقال داده می‌شدند.

اکتیواسیون پارتنوزنتیک

۲۶-۲۴ ساعت پس از کشت برای بلوغ، با استفاده از ورتکس سلولهای کومولوس اووسیت‌ها حذف شد. تنها اووسیت‌های برهنه حاوی جسم قطبی اول و سیتوپلاسم گرانوله یکنواخت انتخاب و به‌طور تصادفی بین گروهها تقسیم شدند. برای ایجاد پالس الکتریکی، ابتدا اووسیت‌های هر گروه به‌طور کامل در محیط فیوژن (0.1 mM MgCl_2 ، 0.05 mM CaCl_2 ، 0.3 M Mannitol) شستشو و سپس به محیط فیوژن تازه موجود در بین الکترودهای دستگاه فیوژن ($0.5 \text{ mm electrode apart}$) انتقال داده شدند. بعد از یک پالس هم‌راستاسازی^۶ کوتاه (5 Sec ، 600 KHZ)، پالس فیوژن DC با فاصله ۱ ثانیه که معمولاً طی روند SCNT گاو به‌کار می‌رود استفاده شد ($1.7/5 \text{ kv/cm}$).

فرم‌های یکی، دوتایی و سه تایی به همراه 6-DMAP را بر توان تکامل اووسیت‌های گاو بررسی نماید.

مواد و روشها

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده مطالعه حاضر به‌جز مواردی که مشخص شده است، از شرکت Sigma (St. Louis, Mo, USA) و محیط‌های کشت از شرکت Gibco (Life Technologies, Rockville, MD, USA) خریداری شد. طی این مطالعه، یک سیستم کشت آزمایشگاهی جنینی با استفاده از سلولهای ورو (vero) به‌کارگرفته شد که میزان تولید بلاستوسیست آن به‌طور یکنواخت ۴۶ درصد بود [۲۳]. به‌طور خلاصه، تخمدانهای گاو در فلاسکهای گرمایشی در دمای ۳۰-۳۵ درجه سانتی‌گراد از یک کشتارگاه محلی به آزمایشگاه انتقال داده می‌شد. در آزمایشگاه، مجموعه اووسیت - سلولهای کومولوس (COCs)^۱ فولیکولهای آنترال (قطر ۸-۲ میلی‌متر) با استفاده از سرنگ ۱۰ ml مجهز به سوزن گوژ ۱۸ آسپیره شده و درون لوله‌های ۵۰ ml تخلیه می‌شد. بعد از سه بار شستشو در محیط $\text{H-TCM199}+10\% \text{ FCS}$ ، COC هایی که حاوی بیش از سه لایه سلولهای کومولوس بودند انتخاب شده و سه بار در محیط بلوغ شستشو داده شدند. برای انجام بلوغ آزمایشگاهی، تعداد ۲۰ تا ۲۵ اووسیت انتخاب شده در زیر روغن مینرال در قطره‌های ۱۰۰ میکرولیتری محیط بلوغ که حاوی تک لایه (monolayer) سلولهای ورو بود کشت داده شدند.

محیط بلوغ شامل TCM ۱۹۹ به‌همراه ۲۵ mM سدیم بی‌کربنات و Earle salts غنی شده با ۱۰ درصد FCS^۲، $17\text{-}\beta\text{-estradiol } 1 \mu\text{g/ml}$ ، $\text{LH } 5 \mu\text{g/ml}$ ، $\text{FSH } 5 \mu\text{g/ml}$ و ۰/۲۵ mM سدیم پیروات بود. نمونه سیمن فریز که به‌طور تجاری از دو گاو نر با قدرت باروری بالا استحصال می‌شد در سرتاسر این مطالعه استفاده شد. برای انجام IVF،

1. Cumulus-Oocyte Complexes
2. Fetal Calf Serum
3. Follicle Stimulating Hormone
4. Luteinizing Hormone

5. Presumptive zygotes
6. Alignment

سلول جنینی با استفاده از رنگ آمیزی افتراقی فلورسانس مطابق روش تواس (Thouas) و همکارانش [۲۸] رنگ آمیزی شد. به طور خلاصه ابتدا بلاستوسیتها در ۵۰۰ میکرولیتر از triton X100 حاوی 100µg/ml از propidium iodide برای مدت ۳۰ ثانیه انکوبه شده و سپس به سرعت به ۵۰۰ میکرولیتر از اتانول (۱۰۰ درصد) حاوی ۲۵µg/ml رنگ فلورسنت Hoechst (bisbenzimidazole) انتقال داده شده و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. جنینهای مزبور سپس به آرامی روی قطره گلیسرول موجود در لام میکروسکپ انتقال داده شده و با استفاده از لامل به آرامی روی سطح لام پهن شده و سپس برای شمارش سلولی با استفاده از میکروسکپ فلورسنت مشاهده شدند (excitation: ۴۶۰ nm). برای رنگ آبی و ۵۶۰ nm برای رنگ قرمز).

با استفاده از این روش سلولهای تروفوکتودرمی (TE)^۱ به رنگ آبی و توده سلولی داخلی (ICM)^۲ به رنگ صورتی تا قرمز مشاهده می شود. تعداد کلی سلول جنینی (ICM) نیز با محاسبه مجموع ICM و TE محاسبه شد.

طرح آزمایشی

این مطالعه شامل ۱۵ گروه درمانی در قالب ۳ گروه آزمایشی و حداقل ۳ تکرار بود. گروه لقاح آزمایشگاهی (IVF) به موازات هر گروه آزمایشی به عنوان کنترل انجام پذیرفت. در هر گروه آزمایشی، اووسیتها ابتدا مطابق روش ذکر شده در معرض EP قرار گرفته و سپس در گروه آزمایشی ۱ (ترکیبات تکی)، اووسیتها در معرض تنها یکی از ۳ اکتیواتور شیمیایی (ET, CI, SR) قرار گرفتند. در حالی که، در گروه آزمایشی ۲ (ترکیبات دوتایی) و در گروه آزمایشی ۳ (ترکیبات سه تایی) اووسیتها به ترتیب در معرض درمانهای متوالی دوتایی و سه تایی از سه ترکیب SR, CI و ET قرار گرفتند. سپس تمام اووسیتهای گروههای آزمایشی در معرض 6-DMAP قرار گرفتند. اووسیتهای درمان شده پس از شستشوی کامل برای

بلافاصله بعد از پالس الکتریکی، اووسیتها در محیط ده درصد TCM + FCS ۱۹۹ شستشو داده شده و سپس مطابق طرح آزمایشگاهی تصویر ۱ در معرض یک، دو یا هرسه اکتیواتور CI (۰/۲ mM) برای ۵ دقیقه، SR (۱۰ mM) برای ۳۰ دقیقه و ET (۷ درصد (v/v) برای ۵ دقیقه) قرار گرفت. غلظت و طول دوره مواجهه با هر اکتیواتور براساس مقالات مطرح در زمینه گاو بود [۲۵]، به جز طول دوره SR، که براساس بهترین نتایج حاصل از مطالعات اولیه (اطلاعات حاصله نشان داده نشده) روی گزارشهای موجود در زمینه گاو [۲۶ و ۲۷] طرح ریزی شد. در نهایت تمام اووسیتهای گروههای درمانی در ۲-DMAP (۲ mM) برای مدت ۴ ساعت انکوبه شدند تا با جلوگیری از خروج جسم قطبی دوم باعث تکوین جنین پارتنوژنیک دیپلوئید شود (diploidization).

کشت جنینهای پارتنوژنیک

بعد از انکوباسیون در ۲-DMAP، اووسیتهای تحت درمان به طور کامل در محیط TCM ۱۹۹ + ده درصد FCS شستشو داده شده و سپس در محیط کشت مشابه که حاوی هم کشتی سلولهای ورو [۲۳] بود در شرایط ۵ CO₂ درصد و O₂ و ۳۸/۶ درجه سانتی گراد و رطوبت ماکزیمم تا ۸ روز بعد از اکتیواسیون پارتنوژنیک کشت داده شدند (روز صفر = روز اکتیواسیون).

ارزیابی گروههای درمانی

آنالیز ۱؛ کارایی اکتیواسیون: ۴۸ ساعت بعد از درمان کارایی اکتیواسیون با بررسی میزان کلیواژ ارزیابی شد.

آنالیز ۲؛ تکوین پارتنوژنیک جنینی: جنینها به طور روزانه ارزیابی شده و نحوه پیشرفت آنها به صورت تسهیم یافته (cleaved)، مورولا و بلاستوسیت به ترتیب در روزهای ۲، ۵، ۷ و ۸ بعد از اکتیواسیون ثبت می گردید.

آنالیز ۳؛ کیفیت جنینی: در پایان دوره کشت (روز ۸ بعد از اکتیواسیون)، بعضی از بلاستوسیتهای حاصله از لقاح (IVF) و نیز اکتیواسیون پارتنوژنیک برای شمارش تعداد

1. Trophectodermal cell
2. Inner Cell Mass

آنالیز آماری

تفاوت بین گروهها برحسب مورد با آزمونهای t-test و chi-square در نرم افزار spss بررسی شد. تفاوتی موجود در $p \leq 0.05$ معنی دار یا چشمگیر ثبت شد.

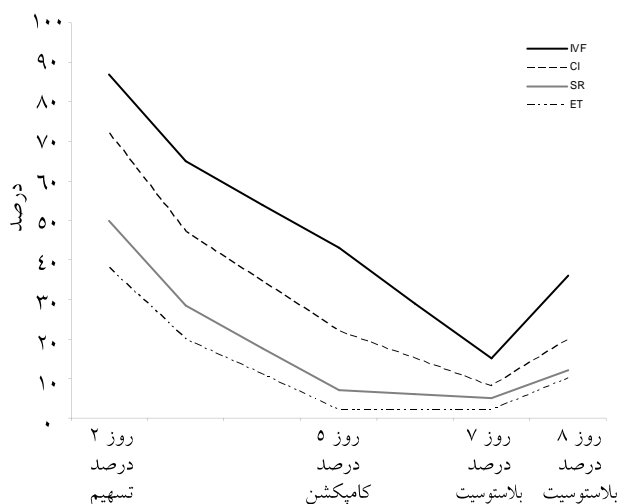
یافته‌ها

توان تکاملی اووسیت‌ها پس از اکتیواسیون مصنوعی

جدول ۱ توان تکاملی اووسیت‌های بالغ شده آزمایشگاهی (in-vitro maturation) که به طریق مصنوعی با ۱۵ گروه درمانی و یا به طریق طبیعی با روند IVF درمان شده‌اند را نشان می‌دهد. به منظور ارائه تصویر مقایسه‌ای بهتر، نتایج ترکیبات تکی، دو تایی و سه تایی ابتدا به صورت مقایسه درون گروهی و سپس بین گروهی ارائه شده است.

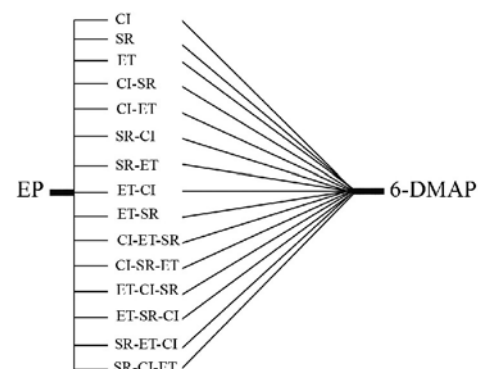
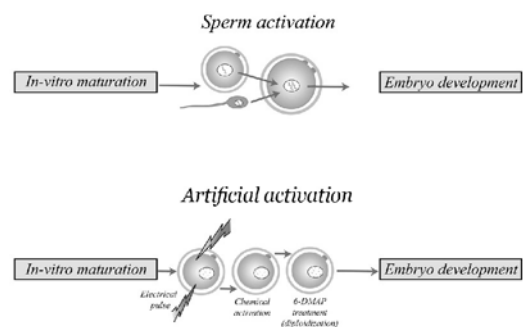
الف: ترکیبات تکی (single compounds)

از میان ترکیبات تکی، میزان تسهیم ترکیب CI به طور چشمگیری بالاتر از SR و ET است ولی تفاوت بین ET و SR چشمگیر نیست. با این وجود میزان کلیواژ چشمگیر CI منجر به تولید بالاتر بلاستوسیت به طور معنی دار نشده است (جدول ۱ و شکل ۲).



شکل ۲. الگوی تکوین جنینی در ترکیبات تکی (CI, SR و ET) و IVF

مدت ۸ روز در آزمایشگاه به روش مشابه اووسیت‌های لقاح یافته (IVF) کشت داده شدند. با توجه به بعضی از گزارشهای موجود در زمینه مزیت نسبی CI برای فعال‌سازی مصنوعی در طی روند SCNT در گاو، گروه درمانی EP-CI-6DMAP در ترکیبات تکی به عنوان کنترل درون گروهی ثانویه در نظر گرفته شد. شکل ۱، الگوی گروههای آزمایشی و نیز مدل شماتیک کل روند مطالعه را نشان می‌دهد.



شکل ۱. نمای شماتیک مراحل آزمایشگاهی این مطالعه.

اووسیت‌های گاو در آزمایشگاه بالغ شده و سپس به صورت تصادفی به ۱۵ گروه تیماری و یک گروه کنترل تقسیم شدند. برای تیمار سلولهای کومولوس از اطراف اووسیت‌ها جدا شده و در معرض یکی از روشهای اکتیواسیون مصنوعی شامل پالس الکتریکی (EP) سپس ترکیبات ترتیبی کلسیم یونوفور (CI)، استرونیسیم (SR) و اتانل (ET) قرار گرفتند و در انتها در 6-DMAP انکوبه شدند. برای گروه کنترل (لقاح آزمایشگاهی) اووسیت‌ها با اسپرم مجاور گردیدند. تمام گروه‌های تیماری و گروه کنترل برای ۸ روز کشت داده شدند. گروه EP-CI-6-DMAP بعنوان گروه کنترل داخلی جهت گروه‌های تیماری در نظر گرفته شد

جدول ۱. بررسی میزان پیشرفت جنینی اووسیت‌های گاو (بلوغ آزمایشگاهی) تیمار شده با ترکیبات تکی، دو تایی و سه تایی و مقایسه آنها با گروه کنترل (IVF)

		تعداد اووسیت‌های تیمار شده [‡]	کلیواژ (%)	بلاستوسیت روز ۸ (%)
لقاح آزمایشگاهی		۳۴۵	۸۷	۴۶
آزمایش اول (ترکیبات تکی)	CI	۲۸۹	۷۲/۵*ab	۲۰/۳*
	SR	۱۰۵	۵۰* ^a	۱۴/۳*
	ET	۱۵۵	۳۸/۲* ^b	۱۰/۵*
آزمایش دوم (ترکیبات دوتایی)	CI-ET	۱۵۰	۷۶ ^c	۱۰/۵*
	CI- SR	۱۵۵	۷۶/۴ ^e	۱۹*
	ET- SR	۱۵۱	۵۷/۱* ^g	۲۵/۱
	ET-CI	۱۴۱	۵۶/۶* ^{cde}	۱۵*
	SR-CI	۱۵۰	۸۶ ^{def}	۱۸/۶*
	SR-ET	۱۳۹	۶۸*	۱۷/۴*
	CI- SR-ET	۱۴۵	۸۰	۱۳/۹*
آزمایش سوم (ترکیبات سه تایی)	CI-ET- SR	۱۴۲	۶۶/۷*	۰*
	ET- SR-CI	۱۴۱	۷۳/۲*	۱۳/۳*
	ET-CI- SR	۱۴۱	۶۳/۴*	۱۱/۵*
	SR-ET-CI	۱۴۰	۷۲/۵*	۲۰/۷
	SR-CI-ET	۱۴۰	۶۱/۹*	۲۱/۷

[‡]: تعداد کلی اووسیت‌های کشت داده شده (از سه تا هشت تکرار).

مواردی که با * مشخص شده در هر ستون دارای اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل (IVF) می‌باشد ($p \leq 0.05$).

مواردی که در ترکیبات تکی، دو تایی و سه تایی با (a, b, c, d, e, f, g) مشخص شده با یکدیگر دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($p \leq 0.05$).

[#]: مقدار ۰ درصد از تمام گروهها بطور معنی‌داری پایین‌تر است و از آنالیز آماری حذف شده است.

[⊗]: گروههای مشخص شده با این علامت دارای اختلاف معنی‌داری با گروه CI (کنترل داخلی) هستند.

ب: ترکیبات دوتایی (double compounds)

برخلاف تفاوت‌های چشمگیر موجود در میزان کلیواژ بعضی از ترکیبات دوتایی، هیچ تفاوت چشمگیری در میزان تکوین بلاستوسیت گروهها وجود ندارد. بهترین میزان تسهیم و تولید بلاستوسیت به ترتیب در گروه SR-CI (۸۴/۴ درصد) و ET-SR (۲۵/۱ درصد) مشاهده می‌شود. در مقایسه با کنترل دوم (CI)، تنها گروه ET-CI به‌طور چشمگیری میزان کلیواژ کمتری دارد (جدول ۱ و شکل ۳).

ج: ترکیبات سه تایی (triple compounds)

در بین ترکیبات سه تایی، علیرغم کلیواژ بالای مشاهده شده

در گروه CI – ET – SR، میزان تولید بلاستوسیت این گروه صفر درصد است. بنابراین این گروه از روند مقایسه حذف شد. در سایر موارد هیچ تفاوت چشمگیری در میزان کلیواژ و تولید بلاستوسیت در این گروه مشاهده نشد (جدول ۴).

توان تکاملی اووسیت‌های لقاح یافته (IVF) در

مقایسه با اووسیت‌های اکتیواسیون مصنوعی

(AA: artificially activated)

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، میزان کلیواژ

تنها سه ترکیب دوتایی (CI-SR، CI-ET و SR-CI) و یک

ترکیب سه تایی (CI-SR-ET) از گروه درمان قابل مقایسه با

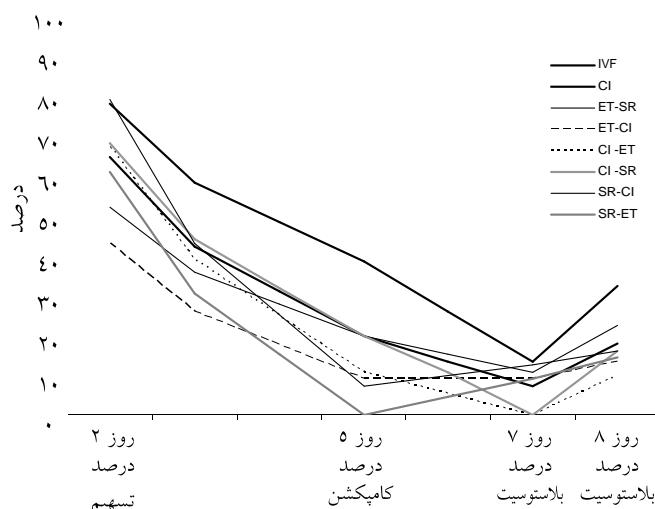
بیانگر آن بود که کیفیت بلاستوسیت‌های حاصل از لقاح به‌طور چشمگیری بهتر از گروه‌های CI، SR-ET-CI و ET-SR است. با این وجود، کیفیت بلاستوسیت‌های گروه ET-SR قابل مقایسه با IVF است (جدول ۲).

بحث

یکی از عواملی که تأثیر چشمگیری بر راندمان SCNT دارد اکتیواسیون اووسیت است. طی روند SCNT، هسته دیپلوئید سوماتیک جایگزین ژنتیکی سلول اسپرم و نیز تخمک می‌شود، بنابراین فعال‌سازی مصنوعی بایستی به منظور شبیه‌سازی روند اکتیواسیون طبیعی ناشی از تداخل اثر اسپرم - تخمک و شروع روند تکوین جنینی انجام پذیرد [۱۷].

اکثر پروتکل‌های فعال‌سازی مصنوعی باعث ایجاد یک افزایش مونوتونیک (monotonic) در غلظت کلسیم داخل سلولی اووسیت ساختار مجدد و مهار فسفوریلاسیون یا سنتز پروتئین می‌شوند [۲۹ و ۳۰]. ولی طی درلقاح، اسپرم با ایجاد یک سری از نوسانات کلسیم داخل سلولی که چند ساعت به طول می‌انجامد باعث فعال‌سازی اووسیت می‌شود [۳۱]. فاصله زمانی بین این نوسانات کلسیم در گونه‌های مختلف متفاوت و مختص همان گونه بوده و در اووسیت‌های گاو هر ۲۰ دقیقه یکبار رخ می‌دهد [۳۲]. در طی مطالعات اولیه این

IVF است درحالی‌که در سایر موارد میزان کلیواژ به‌طور چشمگیری کمتر از اووسیت‌های لقاح یافته است. افزون بر این، با توجه به میزان تولید بلاستوسیت روز ۸، بهترین گروه‌های درمانی ET-SR (۲۵ درصد)، SR-CI-ET (۲۱/۷ درصد) و SR-ET-CI (۲۰/۷ درصد) هستند که میزان تولید بلاستوسیت آنها به‌طور غیرچشمگیری کمتر از IVF (۴۶ درصد) است.



شکل ۳. الگوی تکوین جنینی در ترکیبات دوتایی (CI) و IVF

کیفیت بلاستوسیت اووسیت‌های لقاح یافته و فعال‌سازی مصنوعی

کیفیت بلاستوسیت‌ها در گروه‌های CI، ET-SR، SR-ET و CI-ET با انجام شمارش سلولی ارزیابی شد. این نتایج

جدول ۲. تعداد سلول‌های توده سلولی داخلی (ICM)، تروفکتودرم (TE) و تعداد کل سلول‌های (TCN) بلاستوسیت‌های روز ۸ حاصل از بهترین ترکیبات تکی (CI)، دوتایی (ET-SR) و سه تایی (SR-CI-ET) در مقایسه با گروه کنترل (IVF).

	IVF	CI	ET-SR	SR-CI-ET
تعداد بلاستوسیت	۲۵	۷	۱۲	۱۰
تعداد کل سلول‌ها	۳۵۷/۵ ± ۱۳	۲۷۷/۲۵ ± ۶/۶*	۳۰۵/۳ ± ۷/۴*	۲۸۵/۷۵ ± ۹/۳*
تعداد سلول‌های ICM	۶۷/۷۵ ± ۲/۷۵	۴۷/۰۵ ± ۲/۸*	۵۵/۴۲ ± ۲/۰۸*	۵۰/۳۵ ± ۱/۴*
تعداد سلول‌های TE	۲۸۹/۷۵ ± ۱۱/۸	۲۳۰/۲ ± ۵/۴*	۲۵۰/۰۸ ± ۵/۵۷*	۲۳۵/۴ ± ۷/۸*
ICM/TCN درصد	۱۸/۹۵	۱۶/۹۷	۱۸/۱۴	۱۷/۶۲
نسبت ICM:TE	۴:۱/۲۸	۴:۱/۸۹	۴:۱/۵۱	۴:۱/۶۷

موارد مشخص شده با * با گروه کنترل (IVF) دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($p \leq 0.05$).

همكارانش [۳۷] بيانگر مزيت غيرچشمگير SR در مقابل ET است. با اين وجود، هم كليواژ و هم ميزان توليد بلاستوسيست مطالعه حاضر به طور بسيار چشمگير بالاتر از گزارش آنان است. شايد ذكر است كه طي مطالعات اوليه، زماني كه فعال سازي پارتوژنيك با استفاده از EP و تركيبات متوالي گوناگون ولي بدون درمانهاي نهايي با 6-DMAP صورت پذيرفت، ميزان تكوين جنيني در مقايسه با گروهی كه با استفاده از 6-DMAP درمان شده بودند به طرز چشمگيري كاهش مي يافت. اين امر ممكن است كليواژ و توليد جنين بالاتر مطالعه پيش رو را توجيه نمايد. تصور مي شود كه 6-DMAP باعث مهار MAP-Kinase شده و از اين طريق باعث تخريب ارگانيزاسيون دوک در اووسيتهاي متافاز II مي شود. [۳۸] و [۳۹] كه خود از ديگر سو منجر به عدم دفع گويچه قطبي دوم مي شود [۲۹]. بدین ترتيب تمام اووسيتها حاوی یک پرونوكلئوس با پلوئیدی طبيعي هستند. لوی (Loi) و همكارانش [۱۵] نیز در یک کار مشابه افزایش ۳۰ درصدی در ميزان تشكيل اووسيتهاي پرونوكلئار ديپلوئیدی را با انكوباسيون 6-DMAP متعاقب اکتیواسیون شیمیایی گزارش نمودند. نتایج اکتیواسیون مصنوعی گروههای دوتایی نشانگر آن است كه بهترين ميزان كليواژ حاصله (۸۶ درصد) مربوط به گروه SR-CI است كه به طور چشمگيري بالاتر از ميزان كليواژ گروههای ET-SR، SR-ET و ET-CI است. گرچه اين كليواژ بالا در نهايت به توليد بلاستوسيست پايين تر (۱۸/۶ درصد) در مقايسه با (۲۵/۱ درصد) ET-SR شده است در تركيبات دوتایی گروه اخير (ET-SR) بالاترين ميزان تكوين بلاستوسيست را دارا است.

منحنی تکوين جنینی شکل ۳ بيانگر آن است كه گرچه بعضی تركيبات اکتیواتورها شیمیایی ممكن است تكوين جنینی بهتری را در مراحل اوليه راه اندازی كنند ولی اين امر متضمن تكوين مناسب متعاقب آن تا مرحله بلاستوسيست نخواهد بود. در مقايسه با CI به عنوان كنترل دوم، تنها بهترين اکتیواتور تركيبات دو تایی (ET-SR) ميزان توليد

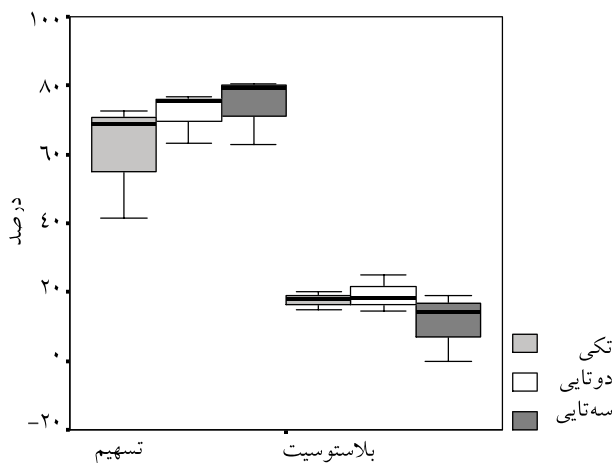
آزمایشگاه، مراحل مختلف SCNT گاو منجمله شرایط کشت و تکوين آزمایشگاهی جنين گاو بهينه سازی شد [۲۳]. به منظور بهينه سازی بهترين روش اکتیواسيون مصنوعی برای اووسيتهاي ساختار مجدد گاو، تنظيمات ابتدایی براساس مطالعات پارتوژنيك قبل پایه گزاری گردید. در همین راستا، یک سری متوالي از اکتیواتورهای شیمیایی CI، SR و ET برای SCNT گاو استفاده شد. طي روند معمول SCNT در گاو، پالس الكتريكي (EP) علاوه بر اينكه برای اتصال غشای پلاسمایی دهنده هسته با اووپلاسم فاقد هسته (enucleated) گاو استفاده می شود؛ قادر به ایجاد افزایش نوسانات كلسیم داخل سلولی نیز است [۲۳]. با عنایت به این امر، برای مشابه سازی روند اکتیواسيون SCNT، EP، بلافاصله قبل از اکتیواسيون متوالي شیمیایی القاء شد. مطابق روش معمول شبیه سازی پستانداران [۲۴] تمام اووسيتهاي درمان شده، برای اکتیواسيون بیشتر به مدت ۴ ساعت در حضور 6-DMAP انكوبه شدند. سپس جنينهای حاصل برای بیش از ۸ روز کشت داده شدند. نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد كه از نظر استفاده از یک ماده شیمیایی، CI بهترين اکتیواتور از لحاظ ميزان تسهيم و نیز توليد بلاستوسيست است. اين نتایج در تطابق با استفاده معمول از CI برای اکتیواسيون اووسيت های گاو است. يونوفورها شامل موادی از جمله CI و Ionomycin است كه باعث ایجاد یک افزایش تك (Single) در غلظت كلسیم داخل سلول اووسيت متافاز II كه عموماً از منابع داخلی نشأت گرفته است می شود [۳۵]. یکی از نتایج احتمالی اين امر فعال شدن چندین مسير پروتئوليتيك وابسته به كلسیم است كه خود منجر به تخريب Cyclin B، كاهش فعاليت MPF و از سرگیری میوز می شود.

جالب است بدانيم كه در بعضی پستانداران [۳۶] و از جمله گاو (نتایج منتشر نشده مطالعات مؤلفين)، كلسیم يونوفور در ایجاد اکتیواسيون مصنوعی اووسيت های بالغ شده موثرتر از ionomycin به نظر می رسد.

نتایج حاصل از ET و SR مشابه گزارش مئو (Meo) و

ولی طول دوره (duration) طولانیتری از آنچه در لقاح طبیعی مشاهده می شود دارد [۴۱]. این افزایشهای کلسیم ناشی از ورود کلسیم خارج سلولی و نیز تحریک منابع داخل سلولی است [۱۵]. بنابراین احتمالاً تحریک اکتیواسیون با ET در صورتی که با SR دنبال شود ممکن است به خاطر مشابهت بهتر با الگوی اکتیواسیون لقاح باعث تکوین بهتر جنینی شود. مطالعات موجود در زمینه فعال سازی مصنوعی نیز بیانگر آن است که مؤثرترین تحریکات آنهایی هستند که چندین نوسان کلسیم داخل سلولی را ترغیب نمایند [۴۱].

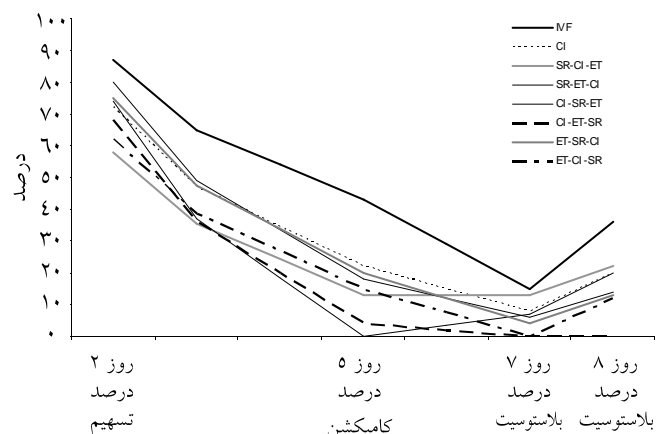
با توجه به نتایج این طور به نظر می رسد که درمان اووسیت های بالغ شده آزمایشگاهی با استفاده از ET و سپس SR بهترین مشابهت را با وقایع لقاح طبیعی داشته و نیز ممکن است مبین تولید بلاستوسیست بالاتر آن در بین گروه های درمانی باشد. سایر ترکیبات ممکن است الگوی طبیعی نوسانات کلسیم (Ca^{2+}) را که در طی لقاح طبیعی مشاهده می شود تغییر بدهند.



شکل ۵. نمای گرافیکی پراکندگی درصد کلیواژ و میزان بلاستوسیست در ترکیبات تکلی، دوتایی و سه تایی

در اووسیت جوان و تازه بالغ گاو، سنتز فعال پروتئینها از جمله Cyclin B، باعث برگشت مجدد فعالیت MPF بعد از تحریک تک کلسیم مشاهده خواهد شد که این امر منجر به ایجاد دوباره MPF و بنابراین یک ایست M-phase جدید با

بلاستوسیست چشمگیرتری دارد. شکل ۴ از ترکیبات سه تایی نیز نشاندهنده تکوین بهتر در مراحل اولیه رشد جنینی در بعضی ترکیبات علیرغم عدم پیشرفت مناسب بعدی آنها است. بعضی از درمانهای سه تایی مثل CI-ET-SR ممکن است اثر(های) معکوسی بر رشد بعدی جنین داشته باشند (صفر درصد تولید بلاستوسیست).



شکل ۴. الگوی تکوین جنینی در ترکیبات سه تایی، کنترل داخلی IVF و (CI)

مقایسه میزان کلیواژ و تکوین جنینی در ترکیبات تکلی، دوتایی و سه تایی نشانگر آن است که توان کلی تکاملی در اووسیت های گروه ترکیبات دو تایی به میزان اندکی - البته نه چشمگیر - بالاتر از ترکیبات تکلی و سه تایی است (شکل ۵). همچنین جالب است یادآور شویم که کمترین میزان تولید بلاستوسیست مربوط به دو گروه CI-ET (۱۰/۵ درصد) و CI-ET-SR (صفر درصد) است که این ایده را به ذهن متبادر می سازد که فعال سازی مصنوعی با CI در صورتی که بلافاصله با ET یا ET و سپس SR دنبال شود، احتمالاً آثار معکوسی بر توان تکاملی جنینی دارند و بنابراین کاربرد این نوع توالی های اکتیواسیون توصیه نمی شود (جدول ۱).

استرونسوم (SR) با جابه جایی باندهای کلسیم، آنها را از منابع داخل سلولی آزاد نموده و پالسهای Ca^{+} را تحریک می نماید که تواتر (frequency) و دامنه (amplitude) پایینتر

غیرچشمگیری بالاتر از بهترین گروه درمانی ترکیبات سه تایی (ET-SR-CI) و تکی (CI) است، بنابراین به نظر می‌رسد که ET-SR می‌تواند جایگزین مناسبتری برای تحریک ناشی از اسپرم (sperm - mediated) طی روند اکتیواسیون مصنوعی جنینهای ساختار مجدد باشد.

با این وجود کیفیت و کمیت بسیار بهتر جنینهای حاصل از لقاح (IVF) نسبت به جنینهای پارتنوزنیک حاصله آشکارا بیانگر آن است که روندهای فعلی اکتیواسیون مصنوعی اووسیت از آنچه که طی روند نفوذ اسپرم به درون اووسیت اتفاق می‌افتد فاصله زیادی دارد و بنابراین ایجاد یک روش کارآمد در این زمینه یک ضرورت مسلم در پیش روی محققین است. نتایج موجود بیانگر آن است که در صورت استفاده از اکتیواتور شیمیایی این مطالعه، اکتیواسیون کلی و توان تکاملی در صورتی که به صورت دو تایی (ET-SR) سه تایی (SR-CI-ET) و سپس تکی (CI) برنامه‌ریزی شود به طور قابل قبولی بالاتر از سایر انواع ترکیبات خواهد بود. افزون بر این گروه درمانی ET-SR مورد مطالعه باعث ایجاد بالاترین میزان تولید بلاستوسیت می‌شود که از لحاظ کیفیت قابل مقایسه با IVF است؛ هر چند که توان تولید بلاستوسیت آن هنوز کمتر از IVF است. در نهایت با توجه به روند SCNT، می‌توان پیشنهاد کرد که ترکیب دو تایی ET-SR وقتی به صورت EP-(ET-SR)-6-DMAP استفاده شود می‌تواند یک پروتکل بهینه برای روند کلونینگ گاو باشد.

تقدیر و تشکر

هزینه مطالعه حاضر از محل بودجه‌های تحقیقاتی پژوهشکده رویان تأمین شده است. مؤلفین این تحقیق ضمن درود به روان دکتر سعید کاظمی آشتیانی از زحمات و حمایت‌های بی‌شائبه آقای دکتر حمید گورابی ریاست پژوهشکده رویان و نیز آقای دکتر احمد وثوق قدردانی می‌نمایند.

عنوان متافاز III می‌شود [۴۲ و ۴۳]. بنابراین از آنجا که تحریک تک با کلسیم باعث غیرفعال شدن موقت MPF می‌شود به منظور ایجاد بهترین الگوی مشابه با اکتیواسیون ناشی از اسپرم، افزایش‌های مکرر ولی موقتی سطوح کلسیم بایستی با بازگشت سریع به سطوح پایه دنبال شود [۴۴]. این واقعیت می‌تواند توضیحی دیگر بر میزان بالای تولید بلاستوسیت گروه ET-SR باشد. درواقع درمان اووسیتها با ET-SR باعث ترغیب ایجاد الگوی نوسانات کلسیم به گونه‌ای مشابه با IVF می‌شود. ET یک افزایش تک در کلسیم داخل سلولی با دامنه بزرگتر و طولانی تر از IVF [۴۵] تولید می‌کند که با نوسانات مکرر ناشی از SR که فرکانس و دامنه کمتر ولی طول دوره بیشتری از IVF دارد دنبال می‌شود.

در مجموع، نتایج موجود بیانگر آن است که ترکیبات دو تایی به طور غیرچشمگیری نتایج تا حدودی بهتر از ترکیبات سه تایی و نیز تکی ایجاد کرده‌اند. با این وجود تغییرپذیری (variability) بین نتایج به دلیل روشهای گوناگون افزایش Ca^{2+} ناشی از هر ماده زیاد است. به نظر می‌رسد که ترتیب و توالی این اکتیواتورها آثار عمده‌ای بر کلیواژ، توان تکاملی و در نتیجه بر میزان تولید بلاستوسیت دارند (شکل ۵).

با نگاه دوباره به الگوی تکوین جنینی (شکلهای ۲ تا ۵) می‌توان گفت که میزان بالای کلیواژ مربوط به گروه IVF به طور ثابتی منجر به تولید بالای بلاستوسیت شده است. درحالی که در گروه‌های درمانی، میزان بالای کلیواژ متضمن تولید بلاستوسیت بالا است. بنابراین به نظر می‌رسد که علیرغم کارایی مناسب بعضی ترکیبات در فعال‌سازی اولیه اووسیت، قادر به تحریک مناسب سیر آزمایشگاهی تکوین جنینی نیست.

تعداد کلی سلولهای جنینی (TCN) یکی از حساسترین معیارهای ارزیابی توان تکاملی مابعد لانه‌گزینی جنینی‌های آزمایشگاهی است [۴۷]. از آنجا که نتایج شمارش سلولی جنینهای پارتنوزنیک حاصل از گروه ET-SR بطور بالا ولی

References

1. **Tian XC, Kubota C, Enright B, Yang X.** Cloning animals by somatic cell nuclear transfer – biological factors. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 98-104.
2. **Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810-3.
3. **Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, et al.** Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 1998; 282: 2095-8.
4. **Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R.** Full term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; 394: 369-74.
5. **Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, Edwards JF, Hooper NL, Miller MW, et al.** Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology* 1999; 51: 1451-65.
6. **Shin SJ, Lee BC, Park JI, Lim JM, Hwang WS.** A separate procedure of fusion and activation in an ear fibroblast nuclear transfer program improves preimplantation development of bovine reconstituted oocytes. *Theriogenology* 2000; 55: 1697-704.
7. **Shen PC, Lee SN, Wu JS, Huang JC, Chu FH, Chang CC, et al.** The effect of electrical field strength on activation and development of cloned caprine embryos. *Anim Reprod Sci* 2006; 92: 310-20.
8. **Machaty Z, Parther RS.** Strategies for activating nuclear transfer oocytes. *Reprod Fertil Dev* 1998; 10:599-613.
9. **De Sousa PA, Dobrinsky JR, Zhu J, Archibald AL, Ainslie A, Bosma W, et al.** Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biol Reprod* 2002; 66: 642-50.
10. **Loi P, Boyazoglu S, Fulka Jr J, Naitana S, Cappai P.** Embryo cloning by nuclear transfer: experiences in sheep. *Livestock Prod Sci* 1999; 60: 281-94.
11. **Sun FJ, Hoyland J, Huang X, Mason W, Moor RM.** A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilisation and electroactivation. *Development* 1991; 115: 947–56.
12. **Cheong HT, Park KW, Im GS, Lai L, Sun QY, Day BN, et al.** Effect of elevated Ca^{2+} concentration in fusion/activation medium on the fetal fibroblast nuclear transfer embryos. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 488-92.
13. **Collas P, Fissore R, Robl JM, Sullivan EJ, Barnes FL.** Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 1993; 34: 212-23.
14. **Cuthbertson KSR, Whittingham DG, Cobbold PH.** Free Ca^{2+} increases in exponential phases during mouse oocyte activation. *Nature* 1981; 294: 754-7.
15. **Loi P, Ledda S, Fulka JR J, Cappi P, Moor RM.** Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. *Biol Reprod* 1998; 58: 1177-87.
16. **Lee JW, Tian XC, Yang X.** Optimization of parthenogenetic activation protocol in porcine. *Mol Reprod Dev* 2004; 68: 51-7.
17. **Knott JG, Poothapillai K, Wu H, Li He C, Fissore RA.** Porcine sperm factor support activation and development of bovine nuclear transfer embryos. *Biol Reprod* 2002; 66: 1095-103.

18. Ware CB, Barnes FL, Miki –Laurila M, First NL. Age dependence of bovine oocyte activation. Gamete Res 1989; 22: 265-75.
19. Zakhartchenko V, Durcova-Hills G, Stojkovic M, Schernthaner W, PrelleK, Steinborn R, et al. Effects of serum starvation and recloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. J Reprod Fertil 1999; 115: 325-31.
20. Wells DN, Misica PM, Tervit HR. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. Biol Reprod 1999; 60: 996-1005
21. Bhak JS, Lee SL, Ock SA, Kumar BM, Choe SY, Rho GJ. Developmental rate and ploidy of embryos produced by nuclear transfer with different activation treatments in cattle. Anim Reprod Sci 2006; 92: 37-49.
22. Kragh PM, Du Y, Corydon TJ, Purup S, Bolund L, Vajta G. Efficient in vitro production of porcine blastocysts by handmade cloning with a combined electrical and chemical activation. Theriogenology 2005; 64: 1536-45.
23. Moulavi F, Hosseini SM, Kazemi Ashtiani S, Shahverdi A, Nasr-Esfahani MH. Can vero cell co-culture improve in vitro maturation of bovine oocytes? Reprod BioMed online 2006; 13: 404-11.
24. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology 1986; 25: 591-600.
25. Ikumi, S, Asada M, Sawai K, Fuki Y. Effect of activation methods for bovine oocytes after intracytoplasmic injection. J Reprod Dev 2003; 49: 37-43.
26. Meo SC, Yamazaki W, Lima Verda Leal C, De Olivera JA, Mansano Garcia J. Use of strontium for bovine oocyte activation. Theriogenology 2005; 63: 2089-102.
27. Yamazaki W, Ferreira CR, Meo SC, Leal CL, Meirelles FV, Garcia JM. Use of strontium in the activation of bovine oocytes reconstructed by somatic cell nuclear transfer. Zygote 2005; 13: 295-302.
28. Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and Trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. Reprod BioMed Online (web paper) 2001; 149: 25-29.
29. Susko-Parris JL, Leibfried-Rutledge ML, Northey DL, Schutzkus V, First NL. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. Dev Biol 1994; 166: 729-39.
30. Presicce GA, Yang X. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured in vitro for 24 hours and activated by ethanol and cycloheximide. Mol Reprod Dev 1994; 166: 380-5.
31. Miyasaki S, Hashimoto N, Yoshimoto T, Igusa Y. Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intracellular free calcium at fertilization of golden hamster eggs. Dev Biol 1986; 118: 259-67.
32. Fissore RA, Dobrinsky JR, Balise JJ, Duby RT, Robl JM. Patterns of intracellular Ca^{2+} concentration in fertilized bovine eggs. Biol Reprod 1992; 47: 960-9.
33. Ozil JP. Parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical activation. Development 1990; 109: 117-27.
34. Ledda S, Loi P, Fulka J Jr, Moor RM. The effect of 6-dimethylaminopurine on DNA synthesis in activated mammalian oocytes. Zygote 1996; 4: 7-9.

35. **Hoth M, Penner R.** Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 1992; 355: 353-5.
36. **Collas P, Balise JJ, Hoffmann GA, Robl JM.** Electrical activation of mouse oocytes. *Theriogenology* 1989; 32: 835-43.
37. **Meo SC, Leal CLV, Garcia JM.** Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. *Anim Reprod Sci* 2004; 81: 35-46.
38. **Szollosi MS, Kubiak JZ, Debey P, de Pennart H, Szollosi D, Maro B.** Inhibition of protein kinases by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. *J Cell Sci* 1993; 104: 861-72.
39. **Presicce GA, Yang X.** Nuclear dynamic of parthenogenesis of bovine oocytes matured in vitro for 20 and 40 h and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. *Mol Reprod dev* 1994; 37: 61-8.
40. **Kline D, Kline JT.** Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in mouse egg. *Dev Biol* 1992; 149: 80-9.
41. **Vitullo AD, Ozil JP.** Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. *Dev Biol* 1992; 151: 128-36.
42. **Kubiak JZ.** Mouse oocytes gradually develop the capacity for activation during the metaphase II arrest. *Dev Biol* 1989; 136: 537-45.
43. **Liu L, Ju JC, Yang X.** Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 1998; 59: 537-45.
44. **Fissore RA, Kurokawa M, Knott J, Zhang M, Smyth J.** Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory aging. *Reproduction* 2002; 124: 745-54.
45. **Gruppen CG, Nottle MB, Nagashima H.** Calcium release at fertilization: artificially mimicking the oocyte's response to sperm. *J Reprod Dev* 2002; 48: 313-33.
46. **Jellerette T, He CL, Wu H, Parys JB, Fissore RA.** Down -regulation of the Inositol 1,4,5-triphosphate receptor in mouse egg following fertilization or parthenogenetic activation. *Dev Biol* 2000; 223: 238-50.
47. **Brinsko SP, Ball BA, Miller PG.** In vitro development of day 2 embryos obtained from young, fertile mares and aged, subfertile mares. *J Reprod Fertil* 1994; 102: 371-8.