

Effect of Demecolicne Treatment on the Developmental Competency of In Vitro Matured Bovine Oocytes

Khoobbakht Z., B.Sc., Hajian M., M.sc., Hosseini M., D.V.M., Furozanfar M., Ph.D., Moulavi F., B.Sc., Abedi P., B.Sc., Hosseini L., M.sc., Karami Shabankareh H., Ph.D., Nasr-Esfahani M.H., Ph.D.*

**P.O.Box: 8158968433, Department of Embryology, Center of Cell Science Research, Royan Institute, ACECR, Isfahan, Iran.*

Abstract

Purpose: The aim of this study was to investigate whether demecolicne treatment of matured bovine oocytes adversely affects the process of in vitro fertilization and embryo development.

Materials and Methods: Bovine Cumulus Oocyte Complexes (COC's) were matured in vitro and then were randomly allocated to two treatment groups of common concentrations of demecolicne (0.05 and 0.4 µg/ml for 30 min) and a control group. COC's were then fertilized and cultured in vitro for up to 9 days when the ratios of in vitro embryo development and the viability of the hatched blastocysts were assessed and compared with the control group ($p < 0.05$).

Results: The ratios of the cleavage and blastocyst formation of demecolicne treated groups (0.4 and 0.05 µg/ml) were 68.6, 63.5% and 23.3, 32.8%, which were not significantly different from the control group (73.3, 29.0%), respectively. The results of cell-viability were also not significantly different between the control vs. treatment groups.

Conclusion: Since the overall indices of in vitro embryo development revealed no significant difference between the demecolicne treated compared to control bovine oocytes, it seems that demecolicne treatment of matured bovine oocytes may not compromise their potency for further in vitro development.

Keywords: Demecolicne, Bovine oocyte, Developmental competency, Viability

اثر تیمار دمکولسین بر روند تکوین آزمایشگاهی اووسیت‌های گاو

زینب خوب بخت **B.Sc.**، مهدی حاجیان **M.Sc.**، سید مرتضی حسینی **D.V.M.**، محسن فروزانفر **Ph.D.**، فریبا مولوی **B.Sc.**، پروانه عابدی **B.Sc.**، لاله حسینی **M.Sc.**، حامد گرمی شبانکاره **Ph.D.**، محمد حسین نصر اصفهانی **Ph.D.**

* گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

** گروه جنین‌شناسی مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی پایگاه تحقیقات علوم سلولی اصفهان پژوهشکده رویان، اصفهان، ایران

*** گروه علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت، مرودشت، ایران

**** گروه جنین‌شناسی مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی پایگاه تحقیقات علوم سلولی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ وصول: اردیبهشت‌ماه ۸۷، تاریخ پذیرش: مردادماه ۸۷

چکیده

هدف: بررسی آثار تیمار اووسیت‌های گاو بالغ شده با دمکولسین بر روند لقاح آزمایشگاهی و تکوین رویانی آن

مواد و روش‌ها: تحقیق حاضر به روش تجربی انجام شد. کمپلکس اووسیت - کومولوس در آزمایشگاه بالغ شده و سپس به دو گروه درمانی با غلظت‌های متداول دمکولسین ($0/05$ و $0/4$ $\mu\text{g/ml}$) و گروه کنترل تقسیم شدند. سپس کمپلکس کومولوس - اووسیت لقاح یافته و در آزمایشگاه به مدت ۹ روز کشت شدند. میزان تکوین آزمایشگاهی و زنده مانی بلاستوسیست‌های تفریح شده ارزیابی و با گروه کنترل مقایسه شدند ($p < 0.05$).

یافته‌ها: میزان تسهیم و تشکیل بلاستوسیست گروه‌های $0/4$ و $0/05$ به ترتیب $68/6$ ، $63/5$ و $23/3$ ، $32/8$ درصد بود که با گروه کنترل (به ترتیب $73/3$ و $29/0$ درصد)، تفاوت معنی‌داری نداشت. نتایج ارزیابی سلول‌های زنده نیز نشان داد که بین گروه کنترل در مقایسه با گروه‌های درمانی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد.

نتیجه‌گیری: از آنجا که در مراحل تکوین رویان آزمایشگاهی، بین گروه کنترل در مقایسه با گروه‌های درمانی تفاوتی مشاهده نشد، به نظر می‌رسد که درمان دمکولسین اووسیت‌های بالغ گاو بر توانایی تکوین رویان‌ها در آزمایشگاه اثر سوئی ندارد.

کلیدواژه‌ها: دمکولسین، اووسیت گاو، توانایی تکوین، زنده مانی.

از فناوری انتقال هسته سلول سوماتیک

(SCNT: Somatic Cell Nuclear Transfer) در چندین گونه

مقدمه

اگر چه تکنولوژی شبیه‌سازی پستانداران اهلی با استفاده

آدرس مکاتبه: ایران، اصفهان، گروه جنین‌شناسی مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد

دانشگاهی، پژوهشکده رویان اصفهان، صندوق پستی: ۸۱۵۸۹۶۸۴۳۳

E-mail: mh_nasr@med.ui.ac.i

موجب افزایش راندمان بی‌هسته سازی شود. در اووسیت‌های تیمار شده با دمکولسین، یک بیرون زدگی غشایی در پلاسما ظاهر می‌شود که تمامی کروموزوم‌های اووسیت در آن قرار دارند و می‌توان با حذف این بیرون زدگی به سهولت اووسیت را بی‌هسته ساخت [۱۵]. اگر چه در چندین گونه از جمله گوسفند [۱۷]، گاو [۱۵ و ۲۱]، موش [۱۶ و ۱۸]، خرگوش [۱۹] و خوک [۱۳ و ۱۴] میزان بی‌هسته سازی بالایی به وسیله تیمار با دمکولسین در مراحل مختلف بلوغ اووسیت شامل مرحله ژرمینال و زیکول (GV)، مرحله رهایی از ژرمینال و زیکول (GVBD)^۲، متافاز I، متافاز II و اووسیت‌های فعال شده به دست آمده و همچنین تکوین مناسب رویانی در مراحل قبل و بعد از لانه‌گزینی گزارش شده است، با این حال با توجه به مکانیسم عمل دمکولسین نگرانی‌هایی در رابطه با تأثیر این ماده بر توسعه رویانی وجود دارد.

بنابراین به نظر می‌رسد که چنانچه اثر (آثار) جانبی و احتمالی دمکولسین بر روند تکوین رویانی با انجام مطالعات اولیه بررسی شود، می‌توان اطلاعات مفید و با ارزشی را در زمینه نحوه استفاده از این ماده طی روند شبیه‌سازی ارائه نمود. بدین ترتیب هدف مطالعه حاضر بررسی آثار احتمالی دمکولسین در دو غلظت متداول مورد استفاده (۰/۴ μg/ml و ۰/۰۵) بر روند تکوین رویان‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی اووسیت‌های گاو است.

مواد و روش‌ها

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده مطالعه حاضر به‌جز مواردی که مشخص می‌شود از شرکت (Sigma, St. Louis, Mo, USA) تهیه شد.

پستاندار به‌طور موفقیت‌آمیزی به‌کار برده شده است، با این حال درصد موفقیت در این روش بسیار پایین است. به‌طوری‌که فقط در حدود ۲-۱ درصد رویان‌های ساختار مجدد پس از انتقال به رحم حیوانات گیرنده به تولد موجود کلون زنده منجر می‌شود [۲۱]. این امر باعث شده است که در حال حاضر کاربردهای بالقوه SCNT به‌علت کارایی نسبتاً پایین آن محدود شود. به‌طور کلی فاکتورهایی که موفقیت یا شکست SCNT را مشخص می‌کنند پیچیده‌اند [۳]، با این حال می‌توان آن‌ها را به دو دسته تقسیم نمود: فاکتورهای بیولوژیکی، از جمله تفاوت‌های بین گونه‌ای، ویژگی کاریوپلاست و سیتوپلاست همراه با برهمکنش بین آنها و فاکتورهای تکنیکی [۴] که آماده سازی اووسیت به‌عنوان سیتوپلاست گیرنده (بی‌هسته سازی) از جمله فاکتورهای تکنیکی تأثیرگذار در فرایند SCNT است. بنابراین بی‌هسته سازی یکی از مراحل کلیدی است که موفقیت روند شبیه‌سازی حیوانات را به میزان بالایی تضمین می‌کند. به‌طور سنتی و مرسوم بی‌هسته سازی اووسیت پستانداران در طی فرایند SCNT به‌صورت فیزیکی و به کمک روش دستکاری میکروسکوپی (micromanipulation) انجام می‌شود [۵-۸]، این روش و روش‌های فیزیکی دیگر از جمله سانتریفوژ کردن اووسیت [۹] و دو نیم کردن اووسیت [۱۰]، پرهزینه و زمان‌بر بوده و به تجهیزات پیشرفته و همچنین افراد ماهر نیاز دارد. به‌علاوه این روش‌ها تهاجمی بوده و به سازمان‌دهی سیتوپلاست آسیب رسانده و بدین ترتیب منجر به کاهش کارایی SCNT می‌شود [۱۱].

از جمله روش‌های نوین که می‌توان به‌عنوان جایگزین با روش‌های بی‌هسته سازی فیزیکی استفاده کرد، تیمار اووسیت‌ها با مواد شیمیایی (بی‌هسته سازی شیمیایی) [۱۱] نظیر اتوپوساید [۱۲] نوکودازول [۱۳ و ۱۴]، دمکولسین [۱۴-۲۱] است نشان داده شده که استفاده از این مواد می‌تواند

1. Germinal vesicle

2. Germinal vesicle break down

تهیه اووسیت و بلوغ آزمایشگاهی

با مراجعه به کشتارگاه محلی تخمدان‌های گاوهای کشتارگاهی جمع‌آوری و در فلاسک‌های حاوی نرمال سالین (۰/۹ گرم کلرید سدیم در یک لیتر آب) قرار داده شدند و در کمتر از دو ساعت در دمای ۳۵ - ۳۰ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه به کمک سرنگ ۱۰ سی‌سی و سوزن گوز ۱۸ حاوی حدود ۱ ml محلول $10\% \text{FCS} + \text{H-TCM}$ غنی‌سازی شده با ۵۰ IU/ml هیپارین، فولیکول‌های با قطر ۸-۲ mm موجود در ناحیه قشری تخمدان‌ها، به آرامی آسپیره شدند. سپس در زیر استریومیکروسکوپ (OLYMPUS SZX16) کمپلکس‌های کومولوس - اووسیت (COCs) که از نظر سیتوپلاسمی یکنواخت بوده و حداقل دارای سه لایه از سلول‌های کومولوس بودند جدا شده و در دیش‌های حاوی قطرات ۲۰۰ μL از محیط H-TCM + 10% FCS پوشیده شده با روغن معدنی شستشو شدند. سپس COC‌های شستشو داده شده برای انجام مراحل بلوغ آزمایشگاهی در دیش‌های حاوی قطرات ۱۰۰ μL از محیط بلوغ (TCM199 + 10% FCS) حاوی $1 \mu\text{g/ml}$ $17\text{-}\beta\text{-estradiol}$ ، $5 \mu\text{g/ml}$ LH، $5 \mu\text{g/ml}$ FSH (به مدت ۲۳/۵ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد، غلظت ۵ درصد CO_2 و رطوبت حداکثر کشت داده شدند.

تیمار اووسیت‌ها با دمکولسین

۲۳/۵ ساعت پس از آغاز بلوغ، اووسیت‌ها به‌طور تصادفی به ۲ گروه تیماری شامل تیمار با $0.05 \mu\text{g/ml}$ دمکولسین (تیمار ۰/۴) و تیمار با $0.05 \mu\text{g/ml}$ دمکولسین (تیمار ۰/۰۵) و یک گروه کنترل تقسیم شدند که گروه‌های تیماری به مدت

۳۰ دقیقه در محیط تیمار قرار گرفتند (تیمار به دلیل تکمیل دوره بلوغ ۲۴ ساعته در محیط بلوغ انجام شد) و گروه کنترل در همان محیط بلوغ تا اتمام ۲۴ ساعت باقی ماندند. پس از ۲۴ ساعت هر ۳ گروه به منظور انکوباسیون با اسپرم و انجام لقاح آزمایشگاهی به محیط لقاح انتقال داده شدند.

آماده سازی اسپرم و انجام لقاح آزمایشگاهی

در سراسر این مطالعه از ویال‌های سیمن منجمد یک گاو هلشتاین با باروری بالا که به‌صورت تجاری موجود بود استفاده شد. پس از ذوب سیمن در آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اسپرم‌های متحرک با استفاده از روش Swim up جداسازی شدند. برای انجام لقاح آزمایشگاهی، پس از دو بار شستشو، COC‌های بالغ در گروه‌های ۲۵ تا ۳۰ تایی به قطره‌های ۲۰۰ میکرولیتری محیط لقاح (Fert-TALP) غنی‌سازی شده با پنی سیل آمین ($20 \mu\text{M}$)، هیپوتارین ($10 \mu\text{M}$)، اپی‌نفرین ($1 \mu\text{M}$) و هیپارین ($0.056 \mu\text{g/ml}$) پوشیده شده با روغن مینرال منتقل شدند و اسپرم با غلظت نهایی 1×10^6 در هر میلی‌لیتر به قطره‌های لقاح افزوده شد. مجموعه اسپرم و اووسیت‌ها به مدت ۲۰ ساعت در شرایط ۳۸/۵، ۵ درصد دی‌اکسید کربن، ۵ درصد اکسیژن و رطوبت حداکثر انکوبه شدند.

کشت جنین‌ها

پس از طی شدن زمان انکوباسیون اسپرم و تخمک (۲۰ ساعت)، سلول‌های کومولوس اطراف زیگوت‌های احتمالی در گروه‌های تیماری و همچنین گروه کنترل با پیپتینگ ملایم حذف شد. به منظور ارزیابی مراحل مختلف رویانی از جمله درصد تسهیم، درصد بلاستوسیست روز ۷ رویانی و درصد شکوفایی رویان‌ها، زیگوت‌های احتمالی به

1. Fetal Calf Serum
2. Hepes-Tissu Culture Medium
3. Cumulus-Oocyte Complexes

4. Fertilisation Tyrod Albumin Lactat Payrovat

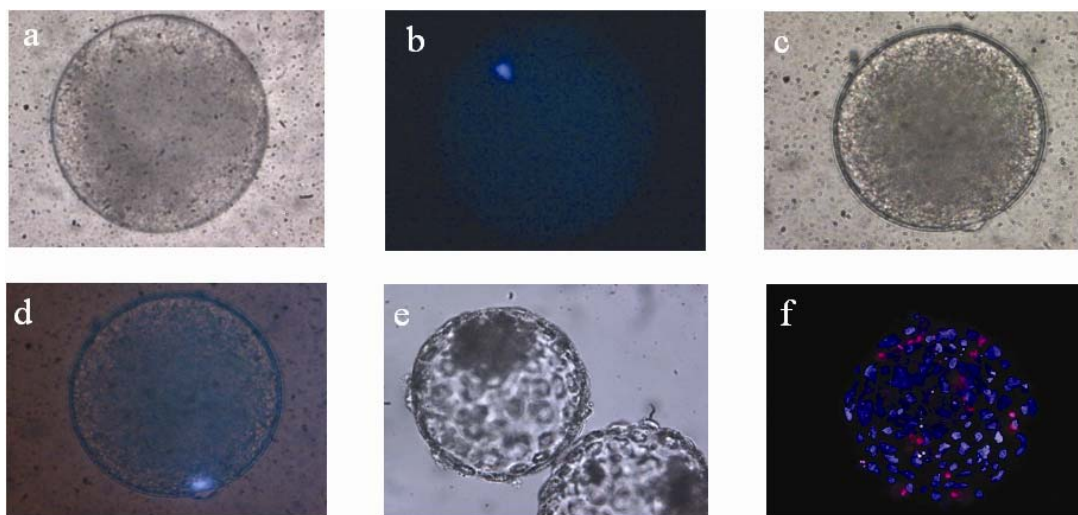
محلول رنگ [هوخست ۳۳۳۴۲: ۳۰۰ µg/ml] پروپدیوم یداید و (۵ µg/ml) انکوبه شدند. پس از طی زمان انکوباسیون در رنگ، برای حذف رنگ باقیمانده بلاستوسیت‌ها سه مرتبه در- PBS شستشو داده شدند و به سرعت در گلوترآلدئید ۲/۵٪ به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق تثبیت شدند. رویان رنگ‌آمیزی شده روی لام قرار داده شد و به وسیله لامل پوشانده شد. سپس بلاستوسیت‌ها به وسیله میکروسکوپ اپی فلورسنت (BX 51 OLYMPUS) ارزیابی شدند. سلول‌های مرده (سلول‌هایی که در مرحله اولیه و ثانویه نکروز و مرحله تأخیری آپوپتوز بودند) به رنگ قرمز و سلول‌های زنده به رنگ آبی مشاهده شدند (شکل f-۱). برای ارزیابی اثر دمکولسین بر کیفیت جنین‌های شکوفا شده، تعداد کل سلول‌ها، تعداد سلول‌های زنده و مرده در گروه‌های تیماری (گروه ۰/۴ و ۰/۰۵ µg/ml دمکولسین) و گروه کنترل (از هر گروه ۷ عدد بلاستوسیت) شمارش و با یکدیگر مقایسه شدند.

مدت ۹ روز دیگر در محیط کشت B2 و در شرایط هم‌کشتی با سلول‌های vero [۲۲] در انکوباتور با شرایط ۳۸/۶ سانتی‌گراد، ۵ درصد دی‌اکسید کربن، ۵ درصد اکسیژن و حداکثر رطوبت کشت داده شدند. تعویض محیط کشت رویان‌ها نیز به صورت دو روز در میان (هر ۴۸ ساعت یکبار) انجام شد.

رنگ آمیزی بلاستوسیت‌ها

برای تمایز سلول‌های زنده از مرده در رویان‌های گروه‌های تیماری و کنترل از روش رنگ‌آمیزی دو گانه پروپدیوم یداید - هوخست شرح داده شده به وسیله حسینی (Hosseini) و همکاران [۲۳] استفاده شد که به طور خلاصه به شرح زیر است:

ابتدا بلاستوسیت‌های شکوفا شده در محلول فسفات بافر سالین بدون کلسیم و منیزیم (PBS-) گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) شستشو داده شدند سپس به مدت ۲۰ دقیقه در



شکل ۱. اووسیت‌های گاوی بالغ شده آزمایشگاهی (a-d) و رویان‌های شکوفا شده (e-f). اووسیت گاوی بالغ شده آزمایشگاهی گروه کنترل (تیمار نشده) پس از حذف زونا پلاسیدا که بیرون‌زدگی غشایی در آن مشاهده نمی‌شود (a)؛ اووسیت رنگ‌آمیزی شده (هوخست) گروه کنترل پس از حذف زونا پلاسیدا، کروموزوم‌ها در سطح درونی اووسیت قرار دارند (b)؛ اووسیت تیمار شده با دمکولسین پس از حذف زونا پلاسیدا، در اثر تیمار با دمکولسین بیرون‌زدگی غشایی ایجاد شده است (c)؛ اووسیت تیمار شده با دمکولسین و رنگ‌آمیزی شده (هوخست) پس از حذف زونا پلاسیدا، در اثر تیمار با دمکولسین بیرون‌زدگی غشایی ایجاد شده و محتوی تمامی کروموزوم‌های اووسیت است (d)؛ بلاستوسیت‌های شکوفا شده بدون رنگ‌آمیزی (e) و پس از رنگ‌آمیزی دوگانه (هوخست-پروپدیوم یداید)، سلول‌های زنده به رنگ آبی و سلول‌های مرده به رنگ قرمز مشاهده می‌شوند (f).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی با استفاده از طرح آزمایشی کاملاً تصادفی و آنالیز واریانس صورت گرفت و مقایسه بین میانگین گروه‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن Duncan's Multiple Range Test انجام شد و $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

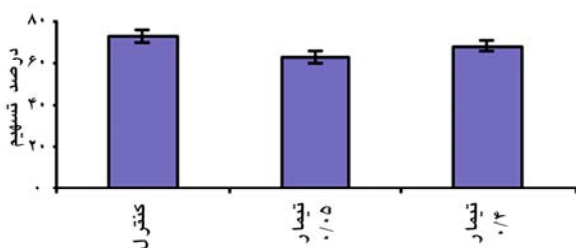
(۳۲/۸ درصد) و کاهش آن در گروه تیماری ۰/۴ (۲۳/۳ درصد) در مقایسه با گروه کنترل (۲۹ درصد) بود؛ با این حال تفاوت موجود از نظر آماری معنی‌دار نبود. میزان شکوفایی بلاستوسیست‌ها در روز ۹ جنینی در گروه کنترل، تیمار ۰/۰۵ و تیمار ۰/۴ به ترتیب، ۳۹/۹، ۴۳/۵ و ۳۶ درصد بود که تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

یافته‌ها

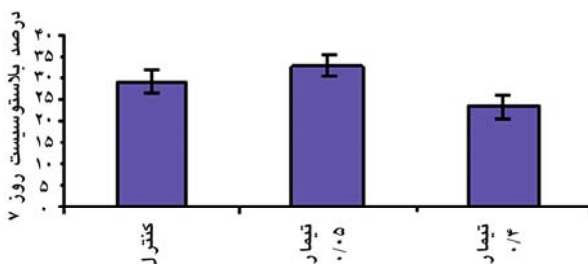
در این تحقیق تأثیر احتمالی ماده شیمیایی دمکولسین بر لقاح آزمایشگاهی و تکوین قبل از لانه‌گزینی رویان‌های گاو در دو غلظت متداول مورد استفاده (۰/۴ μg/ml و ۰/۰۵) بررسی شد. بدین منظور در هر تکرار (مجموعاً ۱۰ تکرار) اووسیت‌ها پس از بلوغ آزمایشگاهی به طور تصادفی به دو گروه تیماری و گروه کنترل تقسیم شدند: اووسیت‌های بالغ شده در گروه‌های تیماری به مدت ۳۰ دقیقه به ترتیب با غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۴ دمکولسین تیمار شدند. در هر یک از گروه‌های تیماری تعدادی از COC‌ها پس از تیمار با دمکولسین، برهنه شدند، پس از حذف زونا پلاسیدا در اکثر آن‌ها یک بیرون‌زدگی غشایی ظاهر شد. رنگ‌آمیزی هوخست اووسیت‌های تیمار شده نشان داد که تمام کروموزوم‌های اووسیت در این بیرون‌زدگی قرار دارند. بیرون‌زدگی غشایی در شکل c-۱ و d-۱ نشان داده شده است. رویان‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی COC‌های تیمار شده و تیمار نشده (گروه کنترل) برای بررسی مراحل بعدی رشد و نمو رویانی به مدت ۹ روز دیگر در شرایط هم‌کشتی با سلول‌های vero کشت داده شدند.

بررسی روند تسهیم رویان‌های هر سه گروه نشان داد که میزان تسهیم در دو گروه تیماری کمتر از گروه کنترل بود، هر چند این تفاوت از نظر آماری ($p < 0.05$) معنی‌دار نبود. همچنین بررسی میزان بلاستوسیست روز ۷ در گروه‌های تیماری و گروه کنترل بیانگر افزایش آن در گروه تیمار ۰/۰۵

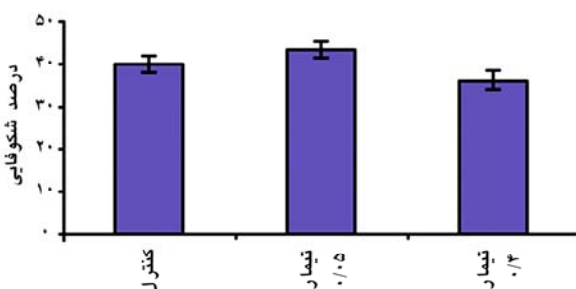
الف



ب



ج



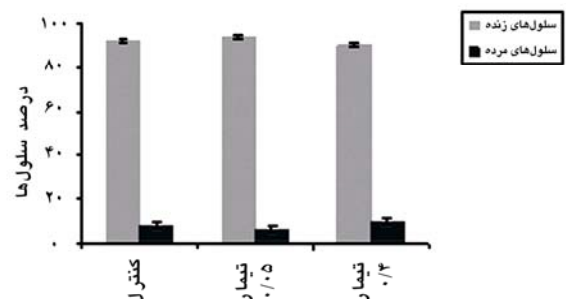
نمودار ۱. الف: درصد تسهیم، ب: درصد تشکیل بلاستوسیست روز ۷ جنینی، درصد شکوفایی بلاستوسیست‌ها، ج: در گروه‌های تیماری ۰/۰۵ و ۰/۴ دمکولسین همراه با گروه کنترل.

جدول ۱ اثر تیمار اووسیت‌های گاوی بالغ شده آزمایشگاهی با دو غلظت مختلف دمکولسین (۰/۰۵ μg/ml و ۰/۴ μg/ml) بر روند تکوین آزمایشگاهی و کیفیت رویان‌ها در گروه‌های تیماری و گروه کنترل

گروه	تعداد اووسیت‌ها	تسهیم (%)	بلاستوسیت ۷ روز (%)	کل بلاستوسیت‌های شکوفا شده (%)	میانگین تعداد سلول‌ها در رویان‌های شکوفا شده	
					زنده (%)	مرده (%)
کنترل	۵۳۴	۳۷۴ (۷۳/۳) ^a	۱۰۸ (۲۹/۰) ^a	۶۳ (۳۹/۹) ^a	۱۳۵ (۹۲) ^{ab}	۱۱/۸ (۸) ^{ab}
تیمار ۰/۰۵	۴۳۳	۲۷۵ (۶۳/۵) ^a	۸۱ (۳۲/۸) ^a	۴۷ (۴۳/۵) ^a	۱۸۷/۴ (۹۴/۲) ^a	۱۱/۶ (۵/۸) ^a
تیمار ۰/۴	۴۳۸	۲۹۷ (۶۸/۶) ^a	۶۸ (۲۳/۳) ^a	۳۷ (۳۶/۰) ^a	۱۲۶/۳ (۹۰) ^b	۱۴ (۱۰) ^b

در هر ستون مقادیری که حداقل یک حرف مشترک دارند از لحاظ آماری معنی‌دار نیستند و مقادیری که حرف مشترک ندارند از لحاظ آماری معنی‌دار هستند ($p < 0.05$).

نشان داد ($p < 0.05$). جدول ۱ اثر دو غلظت مختلف دمکولسین (۰/۰۵ و ۰/۴) روی درصد تسهیم، بلاستوسیت روز ۷، کل بلاستوسیت‌های شکوفا شده و کیفیت رویان‌ها را نشان می‌دهد.



نمودار ۲. میانگین درصد سلول‌های زنده و مرده در بلاستوسیت‌های گاوی گروه کنترل و گروه‌های تیماری ۰/۰۵ و ۰/۴. میانگین درصد سلول‌های زنده در گروه ۰/۴ در مقایسه با گروه ۰/۰۵ کاهش و درصد سلول‌های مرده افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($p < 0.05$).

بحث

آماده‌سازی اووسیت به‌عنوان سیتوپلاست گیرنده یکی از مراحل کلیدی است که موفقیت روند شبیه‌سازی حیوانات را به میزان بالایی تضمین می‌کند. معمول‌ترین روش که در حال حاضر برای هسته‌زدایی طی فرایند SCNT استفاده می‌شود، هسته‌زدایی فیزیکی به کمک روش دستکاری میکروسکوپی (micromanipulation) است، در این روش توسط میکروپیپت‌های نازک شیشه‌ای، مقداری از سیتوپلاسم همراه با صفحه متافازی اووسیت‌های متافاز II که درست در زیر اولین جسم قطبی قرار دارد، از اووسیت خارج می‌شوند. با این حال صفحه متافازی ممکن است همیشه در زیر اولین جسم قطبی قرار نداشته باشد. برای رفع این مشکل از رنگ‌آمیزی حیاتی DNA استفاده و عمل هسته‌زدایی در زیر میکروسکوپ فلورسنس انجام می‌شود [۲۴ و ۲۵]. هر چند که این روش تا حدودی کارایی هسته‌زدایی را افزایش داده

شمارش تعداد کل سلول‌ها و مقایسه درصد سلول‌های مرده و زنده در رویان‌های شکوفا شده پس از تثبیت و رنگ‌آمیزی دوگانه آن‌ها نشان داد که در گروه کنترل در هر جنین ۹۲/۲ درصد سلول‌ها زنده و ۸/۱ درصد سلول‌ها مرده بودند. در حالی‌که در گروه‌های تیماری ۰/۰۵ μg/ml و ۰/۴ μg/ml دمکولسین به ترتیب ۹۴/۲ و ۹۰ درصد سلول‌ها زنده و ۵/۸ و ۱۰ درصد سلول‌ها مرده بودند (جدول ۱ و نمودار ۲). بررسی آماری این داده‌ها نشان داد که درصد سلول‌های زنده و مرده در گروه کنترل با هیچ یک از گروه‌های تیماری اختلاف معنی‌داری نداشت، در صورتی‌که این صفت در گروه تیماری ۰/۰۵ افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه ۰/۴

سلولی هستند که حرکت کروموزوم‌ها را طی تقسیم سلولی تنظیم می‌کنند [۲۸]. دمکولسین یک ممانعت‌کننده میکروتوبول است که به دایمرهای توبولین متصل شده و مانع از پلیمریزاسیون آنها می‌شود و بدین ترتیب منجر به از دست رفتن دینامیک میکروتوبول‌های دوک می‌شود [۱۵].

با توجه به اینکه در تحقیق حاضر در میزان تسهیم، بلاستوسیت روز ۷ و همچنین شکوفایی بلاستوسیت در بین گروه تیماری و همچنین گروه کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد احتمالاً اثر تیمار اووسیت‌ها با دمکولسین قابل برگشت است. در مطالعه راسل و همکاران (۱۵) نشان داده شده که قرار دادن اووسیت‌های فعال شده با دمکولسین در محیط فاقد دمکولسین موجب برگشت بیرون‌زدگی (پس از چند ساعت) به درون اووسیت می‌شود. لی (Li) و همکاران اختلاف معنی‌داری در میزان تسهیم و بلاستوسیت در اووسیت‌های بالغ شده آزمایشگاهی گاو که به مدت دو ساعت با غلظت $0.5 \mu\text{g/ml}$ دمکولسین تیمار شدند در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نکردند [۲۹] که مطابق با نتایج حاصل از تحقیق حاضر است.

طی فرایند لقاح و پس از نفوذ اسپرم به درون اووسیت، غلظت کلسیم درون سلولی به صورت تکرار شونده و به مدت چندین ساعت افزایش می‌یابد [۳۰]. موسس (Moses) و همکاران با تیمار اووسیت‌های بالغ شده آزمایشگاهی موش با غلظت $25 \mu\text{g/ml}$ دمکولسین به مدت سه ساعت و سپس لقاح آزمایشگاهی آنها دریافتند که نفوذ اسپرم به داخل اووسیت منجر به افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی شده و در نتیجه موجب توقف عمل دمکولسین روی اسکلت سلولی می‌شود [۳۱]. بنابراین در آزمایش‌های ما نیز با توجه به اینکه میزان تسهیم در گروه‌های تیماری با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشتند، این احتمال می‌رود که شاید نفوذ اسپرم و ایجاد نوسانات کلسیمی در اووسیت باعث تسریع از بین رفتن مکانیسم مهارتی که توسط

است، ولی به علت مواجهه اووسیت با نور ماوراء بنفش، در این روش نیز شک و تردیدهایی وجود دارد، از طرف دیگر طی هسته زدایی فیزیکی اووسیت حدود ۱۰ الی ۳۰ درصد سیتوپلاسم اووسیت حذف می‌شود که منجر به حذف ارگانل‌های مهم سیتوپلاسمی و همچنین پروتئین‌های ضروری طی تکوین بعدی رویان می‌شود. همچنین طی هسته زدایی فیزیکی به علت نفوذ میکروپیت شیشه‌ای به درون اووسیت ممکن است به فراساختار اووسیت آسیب وارد شود [۲۶].

در صورتی که بتوان پس از بلوغ اووسیت‌ها، به کمک مواد شیمیایی کروموزوم‌های اووسیت را به ناحیه قشری هدایت نمود، هسته زدایی آن بسیار ساده‌تر انجام خواهد شد. راسل (Russell) و همکاران نشان دادند که تیمار اووسیت‌های فعال شده گاوی با غلظت $0.4 \mu\text{g/ml}$ دمکولسین باعث $91/7 - 33/3$ درصد بی‌هسته سازی می‌شود [۱۵]. همچنین کاواکامی (Kawakami) و همکاران اووسیت‌های مرحله متافاز II خوک را با غلظت $0.4 \mu\text{g/ml}$ دمکولسین به مدت ۶۰-۳۰ دقیقه تیمار کرده و بیش از ۷۰ درصد بیرون‌زدگی در آنها مشاهده کردند [۲۷]. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نیز نشان داد که تیمار اووسیت‌های بالغ شده آزمایشگاهی گاو با ماده شیمیایی دمکولسین می‌تواند منجر به ایجاد یک بیرون‌زدگی غشایی حاوی کروموزوم‌ها در سطح اووسیت شود. از طرف دیگر با بی‌هسته سازی به واسطه تیمار با دمکولسین می‌توان کمترین حجم سیتوپلاسم محتوی کروموزوم را کشید و کمترین آسیب را به فراساختار سیتوپلاسم اووسیت وارد نمود (۱۵) و در صورتی که آثار مضر بر تکوین آزمایشگاهی رویان‌ها نداشته باشد می‌تواند به عنوان یک روش مؤثر در فرایند انتقال هسته سلول‌های سوماتیک با هدف شبیه‌سازی جانوران استفاده شود. از جمله آثاری که دمکولسین بر سلول‌ها اعمال می‌کند می‌توان به تاثیر آن بر اسکلت سلولی اشاره نمود. میکروتوبول‌ها و میکروفیلانمنت‌ها اجزای اصلی اسکلت

با توجه به آثاری که دمکولسین بر اووسیت‌های تیمار شده به‌جا می‌گذارد، این احتمال می‌رود که این ماده می‌تواند باعث افزایش آنیوپلوئیدی در رویان‌های بازسازی شده شود، اگر چه این موضوع در آزمایش‌های ما بررسی نشد ولی راسل و همکاران نشان دادند در رویان‌های بازسازی شده‌ای که اووسیت آن‌ها با تیمار دمکولسین بی‌هسته شده بود، میزان پلوئیدی تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نداشت [۱۵].

به‌طور کلی هرچند مکانیسم دقیق عملکرد دمکولسین هنوز به‌خوبی شناخته نشده است [۱۳]، اما تیمار اووسیت‌های گاوی بالغ شده با دمکولسین تأثیر منفی معنی‌داری بر تکوین مراحل جنینی از جمله تسهیم، میزان بلاستوسیست، میزان شکوفایی و تعداد سلول‌های زنده و مرده نداشت با این حال استفاده از این ماده شیمیایی در تجربیات SCNT نیازمند مشخص کردن مکانیسم دقیق مولکولی عملکرد آن بر تکوین قبل و حتی بعد از لانه‌گزینی است.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از مدیریت محترم پژوهشکده رویان که امکانات تجهیزاتی و همچنین هزینه‌های مادی انجام این طرح را فراهم نمودند، سپاسگزاری می‌نمایند.

دمکولسین القاء شده است شود، بنابراین ممکن است افزایش میزان کلسیم داخل سلولی بتواند اثر تیمار اووسیت‌ها با دمکولسین طی فرایند SCNT را نیز حذف کند.

بررسی اثر تیمار دمکولسین بر کیفیت بلاستوسیست‌های شکوفا شده نشان داد که اگر چه از نظر آماری در تعداد کل سلول، تعداد سلول‌های زنده و مرده، بین گروه‌های تیماری و گروه کنترل اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ولی گروه‌های تیماری در مقایسه با هم در این صفات اختلاف معنی‌داری نشان دادند به‌طوری‌که درصد سلول‌های زنده در گروه تیماری $0/05 \mu\text{g/ml}$ دمکولسین بیشتر از گروه تیماری $0/4 \mu\text{g/ml}$ دمکولسین بود. همچنین در تحقیقی مشابه که توسط تنگ (Teng) و همکاران روی سلول‌های فیروبللاست صورت گرفت، نشان داده شد که غلظت‌های خیلی بالای دمکولسین ($3 \text{ M} - 10 \times 10^{-2}$) شروع سنتز DNA را به تأخیر انداخته و دوره سنتز DNA را طولانی می‌کند و غلظت‌های کم آن ($1 \text{ VM} - 2 \times 10^{-2}$) آثار سینرژستی با فاکتورهای رشد دارد که باعث تسریع حرکت از فاز G1 به فاز S مرحله ایتترفاز می‌شود [۳۲]. بنابراین می‌توان گفت که غلظت $0/05 \mu\text{g/ml}$ دمکولسین علاوه بر اینکه آثار سوئی بر تکوین رویان‌های آزمایشگاهی گاو ندارد بلکه احتمالاً می‌تواند کیفیت این رویان‌ها را از طریق مکانیسم‌های ناشناخته افزایش دهد.

References

1. 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.
2. Kato Y, Tetsuya T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 1998; 282: 2095-8.
3. Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 2000; 407: 86-90.
4. Wilmut I. Special method issue. *Cloning Stem Cells* 2003; 5: 221-337.
5. Forsberg E, Strelchenko N, Augenstein M, Betthausen J, Childs L, Eilertsen K, et al. Production of cloned cattle from in vitro systems. *Biol. Reprod* 2002; 67: 327-33.
6. Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M, et al. Six

- clone calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad. Sci USA* 2000; 97: 990–5.
7. **Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, et al.** Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 2000; 289: 1188–90.
 8. **Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka J, Cappai P, Clinton M.** Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotech* 2001; 19: 962-4.
 9. **Tatham BG, Sathananthan AH, Dhannawardena V, Munasinghe DY, Lewis I, Trounson AO.** Centrifugation of bovine oocytes for nuclear micromanipulation and sperm microinjection. *Hum Reprod* 1996; 11: 1499-503.
 10. Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986; 320: 63-5.
 11. **Fulka JJr, Loi, Fulka H, Ptak G, Nagai T.** Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts. *TRENDS Biotech* 2004; 22: 279- 83.
 12. **Fulka JJr, Moor, RM.** Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 1993; 34: 427–30.
 13. **Yin Xi, Tani T, Yonemura I, Kawakami M, Miyamoto K, Hasegawa R, Kato Tsunoda Y.** Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol Reprod* 2002; 67: 442-446.
 14. **Overstrom EW, Wilmut I, De Sousa PA.** Effect of demecolcine and nocodazole on the efficiency of chemically assisted removal of chromosomes and the developmental potential of nuclear transferred porcine oocytes. *Cloning and stem cells* 2003; 5 (abs).
 15. **Russell FD, Ibanez E, Albertini DF, Overstrom EW.** Activated bovine cytoplasts prepared by demecolcine-induced enucleation support development of nuclear transfer embryos in vitro. *Mol Reprod Dev* 2005; 72: 161–70.
 16. **Gasparini B, Gao S, Ainslie A, Fletcher J, McGarry M, Ritchie WA, et al.** Cloned mice derived from embryonic stem cell karyoplasts and activated cytoplasts prepared by induced enucleation. *Biol Reprod* 2003; 68: 1259–66.
 17. **HOU J, Tinghua L, LIU L, CUI X, Xiaorong A, CHEN Y.** Demecolcine-induced enucleation of sheep meiotically maturing oocytes. *Reprod Nutr Dev* 2006; 46: 219–26.
 18. **Ibanez E, Albertini DF, Overstrom EW.** Demecolcine-induced oocyte enucleation for somatic cell cloning: coordination between cell-cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interactions, and second polar body extrusion. *Biol Reprod* 2003; 68: 1249-58.
 19. **Yang F.** Nuclear transfer in rabbits with different types of donor cells. Thesis for the attainment of the title of Doctor in Veterinary Biology, Munich, 2005, pp 1-95.
 20. **Yin Xi, Sang Lee H, Kim L, shin H, Kim N, Kong I.** Effect of serum starvation on the efficiency of nuclear transfer using odd-eyed white cat fibroblasts. *Theriogenology* 2007; 67: 816-23.
 21. **Tani T, Shmada H, Kato y, Tsunoda Y.** Demecolcine-assisted enucleation for bovine cloning. *Cloning and stem cells* 2006; 8 (abs).
 22. **Moulavi F, Hosseini SM, Ashtiani SK, Shahverdi A, Nasr-Esfahani MH.** Can Vero cell co-culture improve in-vitro maturation of bovine oocytes? *Reprod Biomed Online* 2006; 13: 404-11.
 23. **Hosseini M, Hajian M, Asgari V, Forozanfar M, Abedi P, Nasr-Esfahani M H.** Novel approach of differential staining to detect necrotic cells in preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2007; 3: 103-5.
 24. **Tsunoda Y, Shioda Y, Onodera M, Nakamura K, Uchida T.** Differential sensitivity of mouse pronuclei and zygote cytoplasm to Hoechst staining and ultraviolet irradiation. *Reprod Fertil* 1988; 82: 173–8.
 25. **Dominko T, Chan A, Simerly C, Luetjens CM,**

- Hewitson L, Martinovich C, et al.** Dynamic imaging of the metaphase II spindle and maternal chromosomes in bovine oocytes: Implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis. *Biol Reprod* 2000; 62:150-4.
26. **Simerly C, Dominko T, Navara C, Payne C, Capuano S, Gosman G, et al.** Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. *Science* 2003; 300: 297.
27. **Kawakami M, Tani T, Yabuuchi A, Kobayashi T, Murakami H, Fujimura T, et al.** Effect of demecolcine and nocodazole on the efficiency of chemically assisted removal of chromosomes and the developmental potential of nuclear transferred porcine oocytes. *Cloning Stem Cells* 2003;5:379-87.
28. **Simerly C, Navara C, Wu G-J, Schatten G.** Cytoskeletal organization and dynamics of mammalian oocytes during maturation and fertilization. In: Grudzinskas JG, Yovich JL, editors. *Gametes—The oocyte*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995, pp. 54-94.
29. **Li, XC, Zhang Y, Hua S, Shu J H, Zhang, Cao JW.** The use of demecolcine for enucleation of bovine oocytes. *Belg J Zool* 2007; 137: 209-14.
30. **Cuthbertson KS, Whittingham DG, Cobbold PH.** Free Ca²⁺ increases in exponential phases during mouse oocyte activation. *Nature* 1981; 294: 754-7.
31. **Moses RM, Kline D, Masui Y.** Maintenance of metaphase in colcemid-treated mouse eggs by distinct calcium- and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP)-sensitive mechanisms. *Deve Biol* 1995; 167: 329-37.
32. **Teng MH, James C, Bartholomew G, Mina J.** Synergism between anti-microtubule agents and growth stimulants in enhancement of cell cycle traverse. *Nature* 1977; 268: 739 – 41.