Original Article

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

مقاله تحقیقی

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 کرمی شبانکاره .Ph.D*، ✍محمد حسین نصر اصفهانی .Ph.D ***و*****

* 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 گاوی 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 (۰/٤µg/ml و ۰/۰۵) 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 تفریخ شده ارزیابی و با گروه کنترل مقایسه شدند ($p< 0.05$).

یافته‌ها: میزان تسهیم و تشکیل بلاستوسیست گروه‌های ۰/٤و ۰/۰۵ به ترتیب ٦٨/٦، ٦٣/٥ و ٢٣/٣، ٣٢/٨ درصد بود که با گروه کنترل(به ترتیب۷۳/۳ و ۲۹/۰ 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 گاوی بر توانایی تکوین رویان‌ها در آزمایشگاه اثر سوئی ندارد.

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

مقدمه

اگر چه تکنولوژی شبیه‌سازی پستانداران اهلی با استفاده از فناوری انتقال هسته سلول سوماتیک (SCNT: Somatic Cell Nuclear Transfer) در چندین گونه

✍ آدرس مکاتبه: ایران، اصفهان، گروه جنین‌شناسی مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، پژوهشکده رویان اصفهان ، صندوق پستی : ۸۱۵۸۹٦۸٤۳۳
E-mail: mh_nasr@med.ui.ac.i

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 [۱و۲]. این امر باعث شده است که در حال حاضر کاربردهای بالقوه SCNT به‌علت کارایی نسبتاً پایین آن محدود شود. به‌طورکلی 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 [٤] 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 بی هسته سازی اووسیت پستانداران در طی فرایند SCNT به‌صورت فیزیکی و به کمک روش دستکاری میکروسکوپی (micromanipulation) انجام می‌شود [۸- ۵]، 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 ١٤]، دمکولسین [۲۱-١٤] است نشان داده شده که استفاده از این مواد می‌تواند موجب افزایش راندمان بی‌هسته سازی شود.

در اووسیت‌های تیمارشده با دمکولسین، یک بیرون زدگی غشایی در پلاسمالما ظاهر می‌شود که تمامی کروموزوم‌های اووسیت در آن قرار دارند و می‌توان باحذف این بیرون زدگی به سهولت اووسیت را بی‌هسته ساخت [۱۵]. اگر چه در چندین گونه ازجمله گوسفند [۱۷]، گاو [۱۵ و ۲۱]، موش [١٦ و ۱۸]، خرگوش [۱۹] و خوک [۱۳ و١٤] میزان بی‌هسته سازی بالایی به‌وسیله تیمار با دمکولسین در مراحل مختلف بلوغ اووسیت شامل مرحله ژرمینال وزیکول (GV)[1]، مرحله رهایی از ژرمینال وزیکول (GVBD)[2]، متافاز I، متافاز II و اووسیت‌های فعال شده به‌دست 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 دررابطه 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 (٠/٤ µg/ml و ٠/٠٥) 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.

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 گوژ ۱۸ حاوی حدود ۱ ml محلول H-TCM +۱۰٪FCS[1]، [2] غنی سازی شده با ۵۰IU/ml هپارین، 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)[3] 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 ۵ µg/ml FSH ، ۵ µg/ml LH ، ۱ µg/ml 17-β-estradiol) به مدت ۲۳/۵ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد، غلظت ۵ درصد CO2 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 ۰/٤µg/ml دمکولسین (تیمار ۰/٤) و تیمار با ۰/۰۵µg/mlدمکولسین (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 ٢٤ ساعته در محیط بلوغ انجام شد) و گروه کنترل در همان محیط بلوغ تا اتمام ٢٤ ساعت باقی ماندند. پس از ٢٤ 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)[4] غنی‌سازی شده با پنی سیل آمین (۲۰ µM)، هیپوتارین (۱۰ µM)، اپی‌نفرین (۱ µM) و هپارین (۰/٥٦ µg/ml) پوشیده شده با روغن مینرال منتقل شدند و اسپرم با غلظت نهایی ۱۰٦ × ۱ در هر میلی‌لیتر به قطره‌های لقاح افزوده شد. مجموعه اسپرم و اووسیت‌ها به مدت ۲۰ ساعت در شرایط ۳۸/۵ ، ۵ درصد دی اکسید 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 درصدتسهیم، درصد بلاستوسیست روز ۷ رویانی و درصد شکوفایی رویان‌ها، زیگوت‌های احتمالی به

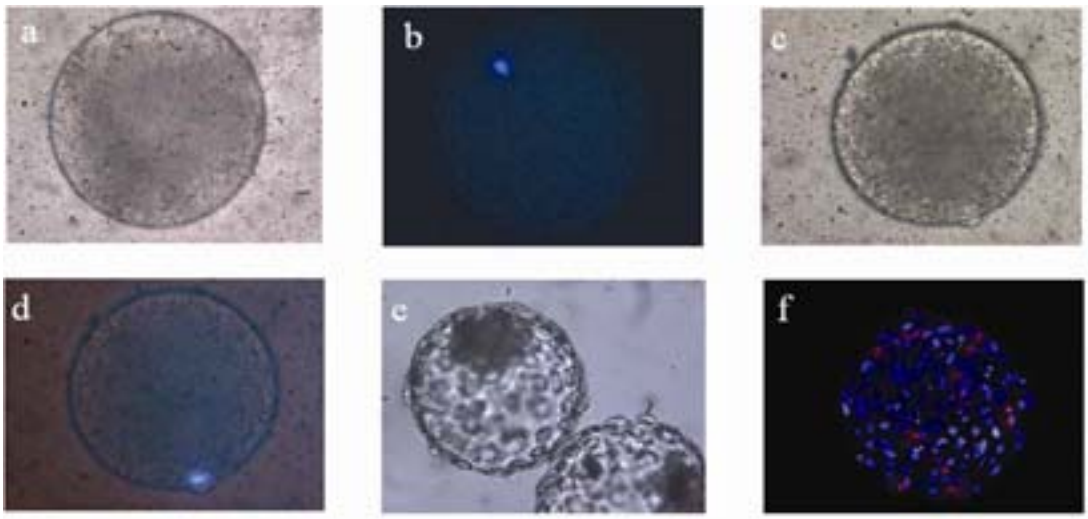
1. Fetal Calf Serum
2. Hepes-Tissu Culture Medium
3. Cumulus-Oocyte Complexes
4. Fertilisation Tyrod Albumin Lactat Payrovat

مدت ۹ روز دیگر در محیط کشت B2 و در شرایط هم‌کشتی با سلول‌های vero [۲۲] در انکوباتور با شرایط ۳۸/٦ سانتی‌گراد، ۵ درصد دی اکسید کربن، ۵درصد اکسیژن و حداکثر رطوبت کشت داده شدند. تعویض محیط کشت رویان‌ها نیز به‌صورت دو روز در میان (هر ٤٨ ساعت یک‌بار) انجام شد.

رنگ آمیزی بلاستوسیست‌ها

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

ابتدا بلاستوسیست‌های 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 محلول رنگ [هوخست ۳۳۳٤۲: (۳۰۰ µg/ml) پروپدیوم یداید و (۵ µg/ml) انکوبه شدند. پس از طی زمان انکوباسیون در رنگ، برای حذف رنگ باقیمانده بلاستوسیست‌ها 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 به‌وسیله لامل پوشانده شد. سپس بلاستوسیست‌ها 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 (شکلf-۱). برای ارزیابی اثر دمکولسین بر کیفیت جنین‌های شکوفا شده، تعداد کل سلول‌ها، تعداد سلول‌های زنده و مرده در گروه‌های تیماری (گروه ۰/٤ و ۰/۰۵ µg/ml دمکولسین) و گروه کنترل (از هر گروه ۷ عدد بلاستوسیست) شمارش و با یکدیگر مقایسه شدند.



شکل ۱. اووسیت‌های گاوی بالغ شده آزمایشگاهی (a-d) و رویان‌های شکوفا شده (eو f). اووسیت گاوی بالغ شده آزمایشگاهی گروه کنترل (تیمار نشده) پس از حذف زونا پلاسیدا که بیرون‌زدگی غشایی در آن مشاهده نمی‌شود (a)؛ اووسیت رنگ آمیزی 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 دموکلسین بیرون‌زدگی غشایی ایجاد شده است (c)؛ اووسیت تیمار شده با دمکولسین و رنگ‌آمیزی شده (هوخست) پس از حذف زونا پلاسیدا، در اثر تیمار با دموکلسین بیرون‌زدگی غشایی ایجاد شده و محتوی تمامی کروموزوم‌های اووسیت است (d)؛ بلاستوسیت‌های شکوفا شده بدون رنگ آمیزی(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

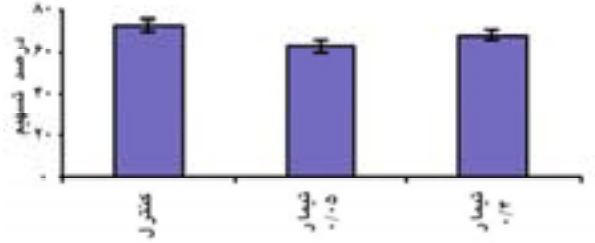
تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی با استفاده از طرح آزمایشی کاملاً تصادفی و آنالیز واریانس صورت گرفت و مقایسه بین میانگین گروه‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن Duncan's Multiple Range Test انجام شد و $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

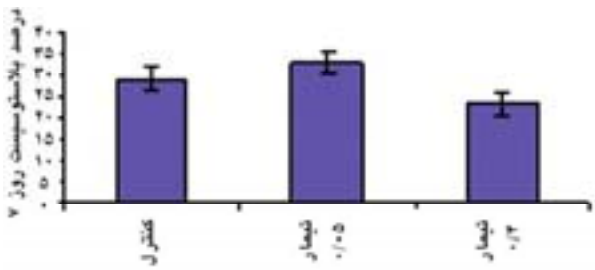
در این تحقیق تأثیر احتمالی ماده شیمیایی دمکولسین بر لقاح آزمایشگاهی و تکوین قبل از لانه‌گزینی رویان‌های گاو در دو غلظت متداول مورد استفاده (۰/٤μg/ml و ۰/۰۵) بررسی شد. بدین منظور در هر تکرار (مجموعاً ۱۰ تکرار) اووسیت‌ها پس از بلوغ آزمایشگاهی به‌طور تصادفی به دو گروه تیماری و گروه کنترل تقسیم شدند: اووسیت‌های بالغ شده در گروه‌های تیماری به مدت ۳۰ دقیقه به ترتیب با غلظت‌های ۰/٤و ۰/۰۵دمکولسین 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 دراین بیرون‌زدگی قرار دارند. بیرون‌زدگی غشایی در شکل c-۱و 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 هم کشتی 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 (۳۲/۸ درصد) و کاهش آن در گروه تیماری۰/٤ (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 ۰/٤ به‌ترتیب، ۳۹/۹، ٤۳/۵ و ۳٦ درصد بود که تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

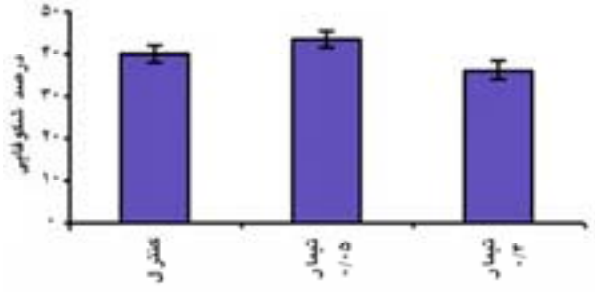
الف



ب



ج

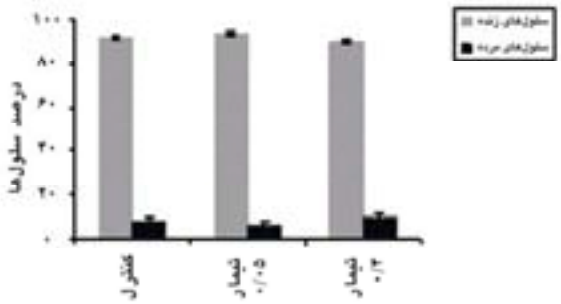


نمودار ۱. الف: در صد تسهیم، ب: درصد تشکیل بلاستوسیست روز ۷ جنینی، درصد شکوفایی بلاستوسیست‌ها، ج: در گروه‌های تیماری ۰/۰۵ و ۰/٤ دمکولسین همراه با گروه کنترل.

جدول ۱ اثر تیمار اووسیت‌های گاوی بالغ شده آزمایشگاهی با دو غلظت مختلف دمکولسین (۰/۰۵ µg/ml و ۰/٤µg/ml) بر روند تکوین آزمایشگاهی و کیفیت رویان‌ها در گروهای تیماری و گروه کنترل

گروه	تعداد اووسیت‌ها	تسهیم (٪)	بلاستوسیست (٪) ۷ روز	کل بلاستوسیست‌های شکوفا شده (٪)	میانگین تعداد سلول‌ها در رویان‌های شکوفا شده		
					زنده (٪)	مرده (٪)	تعداد کل
کنترل	٥٣٤	٣٧٤ (٧٣/٣)^{a}	١٠٨ (٢٩/٠)^{a}	٦٣ (٣٩/٩)^{a}	١٣٥ (٩٢)^{ab}	١١/٨ (٨)^{ab}	١٤٦/٨ ^{ab}
تیمار۰/۰۵	٤٣٣	٢٧٥ (٦٣/٥)^{a}	٨١ (٣٢/٨)^{a}	٤٧ (٤٣/٥)^{a}	١٨٨/٤ (٩٤/٢)^{a}	١١/٦(٥/٨)^{a}	٢٠٠ ^{a}
تیمار۰/٤	٤٣٨	٢٩٧ (٦٨/٦)^{a}	٦٨ (٢٣/٣)^{a}	٣٧(٣٦/٠)^{a}	١٢٦/٣ (٩٠)^{b}	١٤ (١٠)^{b}	١٤٠/٣ ^{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 ($p<0.05$).



نمودار۲. میانگین درصد سلول‌های زنده و مرده در بلاستوسیست‌های گاوی گروه کنترل و گروه‌های تیماری ۰/۰۵ و ۰/٤. میانگین درصد سلول‌های زنده در گروه ۰/٤ در مقایسه با گروه ۰/۰۵ کاهش و درصد سلول‌های مرده افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($p<0.05$).

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 جنین۹۲/۲ درصد سلول‌ها زنده و۸/۱ درصد سلول‌ها مرده بودند. در حالی‌که در گروه‌های تیماری ۰/۰۵µg/ml و ۰/٤µg/ml دمکولسین به‌ترتیب ۹٤/۲ و۹۰ درصد سلول‌ها زنده و ۵/۸ و۱۰ درصد سلول‌ها مرده بودند (جدول۱ و نمودار۲). 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 صورتی که این صفت در گروه تیماری ۰/۰۵ افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه ۰/٤ نشان داد ($p < 0.05$). جدول ۱ اثر دو غلظت مختلف دمکولسین (۰/۰۵ و ۰/٤) روی درصد تسهیم، بلاستوسیست روز ۷، کل بلاستوسیست‌های شکوفا شده و کیفیت رویان‌ها را نشان می‌دهد.

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 هسته زدایی طی فرایند SCNT استفاده می‌شود، هسته زدایی 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 هسته زدایی در زیر میکروسکوپ فلورسنس انجام می‌شود [۲٤ و ۲۵]. هر چند که این روش تا حدودی کارایی هسته‌زدایی را افزایش داده

است، ولی به‌علت 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 به‌علت نفوذ میکروپیپت شیشه‌ای به درون اووسیت ممکن است به فراساختار اووسیت آسیب وارد شود [۲۶].

درصورتی 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 ۰/٤µg/ml دمکولسین باعث۹۱/۷ – ۳۳/۳ درصد بی‌هسته سازی می‌شود [۱۵]. همچنین کاواکامی (Kawakami) و همکاران اووسیت‌های مرحله متافاز II خوک را با غلظت ۰/٤µg/ml دمکولسین به مدت ٦۰–۳۰ 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 به‌واسطه 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 مضری بر تکوین آزمایشگاهی رویان‌ها نداشته باشد می‌تواند به‌عنوان 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 میکروفیلامنت‌ها اجزای اصلی اسکلت 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، بلاستوسیست روز ۷ و همچنین شکوفایی بلاستوسیست 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 بلاستوسیست در اووسیت‌های بالغ شده آزمایشگاهی گاو که به مدت دو ساعت با غلظت۰/۵ µg/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 ازنفوذ 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 ۲۵ µg/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 مهاری‌ای که توسط

دمکولسین القاء شده است شود، بنابراین ممکن است افزایش میزان کلسیم داخل سلولی بتواند اثر تیمار اووسیت‌ها با دمکولسین طی فرایندSCNT 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 ۰/۰۵µg/ml دمکولسین بیشتر از گروه تیماری ۰/٤µg/ml دمکولسین بود. همچنین در تحقیقی مشابه که توسط تنگ (Teng) و همکاران روی سلول‌های فیبروبلاست صورت گرفت، نشان داده شد که غلظت‌های خیلی بالای دمکولسین (M ۳-۱۰× ۳۵-۲) شروع سنتز DNA را به تأخیر انداخته و دوره سنتز DNA را طولانی می‌کند و غلظت‌های کم آن (M۷-۱۰× ۲-۱) آثار سینرژیستی با فاکتورهای رشد دارد که باعث تسریع حرکت از فاز G1 به فاز S مرحله اینترفاز می‌شود [۳۲]. بنابراین می‌توان گفت که غلظت ۰/۰۵µg/ml دمکولسین علاوه بر اینکه آثار سوئی برتکوین رویان‌های آزمایشگاهی گاو ندارد بلکه احتمالاً می‌تواند کیفیت این رویان‌ها را از طریق مکانیسم‌های ناشناخته افزایش دهد.

با توجه به آثاری که دمکولسین بر اووسیت‌های تیمار شده به‌جا می‌گذارد، این احتمال می‌رود که این ماده می تواند 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.

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,DoguchiH,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, Betthauser 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, Munesinghe DY, Lewis I., Trounson AO**. Centrifugation of bovine oocytes for nuclear micromanipulation and sperm microinjection. Hum Reprod1996; 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 Sousa1 PA**. Effect of demecolcine and nocodazole on the efficiency of chemically assisted removal of chromosomes and the developmental potantial 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. Gasparrini **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, ChanA, 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.