مقاله مروری

شبیه سازی و عوامل موثر بر آن

بنفشه حیدری[۱]، سارا برجیان بروجنی[۱]، محمود جدی تهرانی[۲]، امیر حسن زرنانی[۳،۴]، محمدمهدی آخوندی [۱]، ابوالفضل شیرازی[۱،۵]*

۱- پژوهشکده بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم زیستی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران

۲- پژوهشکده آنتی بادی مونوکلونال، پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم زیستی جهاددانشگاهی- ابن سینا، تهران، ایران

۳- پژوهشکده نانوبیوتکنولوژی، پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم زیستی جهاددانشگاهی- ابن سینا، تهران، ایران

٤- مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تهران، تهران، ایران

٥- گروه شبیه سازی و سلول‌های بنیادی، پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

زمینه و هدف: واژه Cloning، به معنای شبیه‌سازی، برگرفته از کلمهٔ‌یونانی "Klon" است و به معنی شاخه کوچکی که می‌تواند خود را تکثیر نموده و تبدیل به یک درخت بارور گردد، می‌باشد. شبیه‌سازی در حقیقت تولید مثل غیرجنسی و یا تکثیر کپی یا کپی‌های متعدد از یک ارگانیسم است که غالباً از طریق انتقال DNA سلول سوماتیک به تخمک MII فاقد هسته تحقق می‌یابد. علیرغم مزایا و کاربردهای گسترده این فناوری لیکن بازده نامناسب آن به ویژه در تولید نتاج با قابلیت حیات قابل قبول، کاربرد آنرا همچنان با چالشی جدی مواجه نموده است. هدف از این گردآوری، طرح عوامل تاثیرگذار بر کارایی روند شبیه سازی با تاکید بر تغییرات اپی‌ژنتیک می‌باشد.

روش بررسی: منابع این نوشتار با جستجو در پایگاه‌های اطلاع رسانی الکترونیک، شامل Scopus, PubMed, ScienceDirect جمع‌آوری گردید. در فرایند جستجو هیچ دامنه زمانی در نظر گرفته نشد و روند بروز رسانی تا زمان ارسال مقاله پیگیری شد.

نتایج: با توجه به تعدد عوامل تاثیرگذار بر روند شبیه سازی، افزایش کارایی این فناوری مستلزم ارتقا دانش تئوریک و مهارت‌های فنی پیرامون مراحل انجام کار می‌باشد. انجام این مهم از طریق بهبود شرایط کیفی بلوغ تخمک (به ویژه بلوغ سیتوپلاسم)، همزمانی سیکل سلولی سلول دهنده هسته باسیتوپلاسم تخمک MII، اعمال حداقل آسیب فیزیکی به ساختار سایتواسکلتال تخمک در روند خارج سازی هسته تخمک و انتقال هسته دهنده، بهبود شرایط کشت و الحاق سلولی، و در نهایت کاربرد روش‌های موثر در جهت القای تغییرات اپی‌ژنتیک به منظور اعطای وضعیت همه توانی در هسته سلول دهنده جهت بهبود شرایط برنامه‌ریزی مجدد، امکان‌پذیر می‌باشد. با توجه به اهمیت و نقش ترانس کریپتها و پروتئین‌های با منشا مادری موجود در سیتوپلاسم تخمک مرحله MII در حمایت از تقسیمات جنینی تا مرحله فعال شدن ژنوم جنینی (Embryionic genomic activation; EGA) و نیز قابلیت سیتوپلاسم تخمک مرحله MII در القای برنامه ریزی مجدد هسته سلول سوماتیک (reprogramming) و همزمانی EGA و کاهش مشخص ترانس کریپت‌های با منشا مادری، reprogramming هسته سلول سوماتیک مبتنی بر تغییرات اپی‌ژنتیک می‌بایست همزمان با EGA تکمیل شده باشد. معهذا از آنجائیکه الگوی تغییرات اپی ژنتیک در طی روند تکاملی جنین در مراحل قبل از لانه‌گزینی از وضعیت دینامیکی برخوردار بوده، اتخاذ روش‌های درمانی در القای برنامه‌ریزی مجدد هسته می‌بایست از الگوی این تغییرات در جنین‌های طبیعی تبعیت نماید.

نتیجه گیری: علیرغم تمامی پیشرفت‌های حاصله در روند شبیه سازی با استفاده از روش‌های کارآمد، لیکن هر گونه انحراف از الگوی طبیعی بیان ژنها ناشی از تغییرات اپی ژنتیک ایجاد شده بواسطه مداخلات شیمیایی در جنین مرحله قبل از لانه‌گزینی، می‌تواند نتایج نامطلوبی را در مراحل تکاملی فتوسی و حتی مراحل بعدی بدنبال داشته باشد. مع‌الوصف فهم دقیق روند وقایع مولکولی طبیعی مرتبط با تغییرات اپی ژنتیک و مشخص نمودن عوامل اختصاصی ضروری موجود در سیتوپلاسم تخمک با تغییرات اپی ژنتیک، امکان درک بهتر مکانیزم‌های درگیر در وقایع مذکور را فراهم نموده و بدین ترتیب امکان بهبود بازده شبیه سازی و فناوری‌های مرتبط را میسر می‌نماید.

کلید واژگان: برنامه ریزی مجدد هسته، تغییرات اپی ژنتیک، خارج سازی هسته، شبیه سازی.

نحوه استناد به این مقاله: حیدری بنفشه، برجیان بروجنی سارا، جدی تهرانی محمود، زرنانی امیر حسن، آخوندی محمدمهدی، شیرازی ابوالفضل. شبیه سازی و عوامل موثر بر آن. سال ۱۲ (۱۳۹۰)، شماره ۲، صفحات: ۷۲-٤۷.

*** مسئول مکاتبه:** ابوالفضل شیرازی، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی ـ ابن‌سینا، دانشگاه شهید بهشتی، صندوق پستی: ۱۱۷۷- ۱۹۶۱۵، تهران، ایران

رایا نامه:
shiraziabbas@yahoo.com
a.shirazi@avicenna.ac.ir

دریافت: ۸۹/۷/۸

پذیرش: ۸۹/۱۰/۱

Downloaded from http://www.jri.ir

زمینه و هدف

پس از تولد خارق‌العاده دو گوسفند به نام‌های Moran و Megan تو به دنبال تحقیقات Campbell و Wilmute در سال ۱۹۹۵، Wilmute و همکاران در جولای ۱۹۹٦ موفق به تولد دالی، اولین گوسفند شبیه‌سازی شده با استفاده از سلول سوماتیک کاملاً بالغ و تمایز یافته، شدند که موجب تحسین و تعجب سایر محققین گردید (۱،۲).

طی ۱۵ سال اخیر تغییرات شگرف و پیشرفت‌های قابل توجهی در روند شبیه‌سازی[1] تحقق یافته و محققین به منبع وسیعی از سلول‌های دهنده هسته دست یافته و شبیه سازی در بسیاری از گونه‌ها نظیر موش، خرگوش، خوک، اسب، قاطر، موش صحرایی، میمون، گربه، سگ، گاو، گوسفند، بز و ... با موفقیت به انجام رسیده است (۳).

علیرغم پتانسیل بالا و گستره وسیع کاربرد شبیه سازی در حوزه‌های مختلف، معایب عدیده پیرامون این فناوری و پیآمدهای منفی حاصل از آن، کاربرد آن را از بعد کارایی به چالش کشانده است. در خصوص کاربرد، مزایا و معایب شبیه سازی می‌توان به طور اجمال به موارد ذیل اشاره نمود.

مزایای شبیه‌سازی

۱- حفظ گونه‌های جانوری در معرض خطر انقراض: از جمله گاو وحشی هندی[2] (٤)، گاو نژاد Han Woo (٥)، گاومیش[3] (٦)، گاو کوهان‌دار[4] (۷) قوچ کوهی مفلون[5] (۸) و گربه وحشی آفریقایی[6] (۹).

۲- احیا گونه‌های جانوری منقرض شده: با توسعه تکنیک شبیه سازی و دست یابی به دانش شبیه سازی بین گونه‌ای، محققین موفق به تولید مجدد برخی گونه‌های منقرض شده از جمله گرگ قرمز[7]، گرگ سیاه حبشی[8] و گرگ خاکستری[9] شده‌اند (۱۰،۱۱). ایده تولید جنین شبیه سازی بین گونه‌ای از گونه‌های منقرض شده با تولد موفق گرگ خاکستری با استفاده از تخمک سگ و سلول‌های سوماتیک گرگ مرده (چند ساعت پس از مرگ) در ذهن محققین قوت گرفت (٥). به طوریکه امروزه تفکر احیای گونه‌های منقرض شده از جمله برخی از حیوانات منقرض شده مانند ماموتها، دایناسورها و ... با استفاده از این تکنیک در برخی محافل علمی مورد توجه قرار گرفته است (۸).

۳- تولید یک گونه جدید جانوری: از طریق دستکاری‌های ژنوم، ژن‌درمانی، حذف خصوصیات نامطلوب و یا اضافه نمودن برخی خصوصیات ویژه به ژنوم (۱،۲).

٤- افزایش سرعت تکثیر ژن‌های برتر، تسریع روند تغییرات ژنتیکی (۱۲،۱۳) ودر نهایت تولید و تکثیر سریع نژادهای مقاوم به برخی از بیماریها (۱).

٥- تولید انبوه حیوانات ممتاز ژنتیکی با مقاصد اقتصادی (۱٤،۱٥).

٦- انتخاب جنسیت حیوان از طریق انتخاب نوع سلول دهنده (۱٤،۱٦).

۷- درک بهتر تعاملات پایه‌ای سیتوپلاسم تخمک[10] با هسته سلول سوماتیک و بررسی مکانیسم‌های کنترل کننده روند تکاملی جنین و چگونگی شکل گیری بیماری‌های ژنتیکی.

۸- پیشگویی سریعتر، ارزانتر و بهتر وضعیت سلولی- بیولوژیکی موجود زنده بواسطه تولید کپی‌های ژنتیکی تقریباً مشابه از آن (۱،۲).

۹- توسعه تکنیک‌های درمانی جدید (شبیه سازی درمانی) و ایجاد مدل‌های سلولی جدید از بیماری‌های انسانی با تولید انبوه جنین (قبل از لانه گزینی) و تهیه منابع کافی و مناسب از سلول‌های بنیادی جنینی[11] (۱۷).

۱۰- کمک به درک صحیح دینامیسم سلولی در سرطانها و آشکار شدن پتانسیل‌های سلول‌های بنیادی جنینی (۱۳).

۱۱- تسهیل تولید حیوانات تراریخته به منظور تولید پروتئین‌های دارویی: به دلیل قابلیت و سرعت تکثیر بسیار بالای سلول‌های دهنده می‌توان تعداد نامحدودی از سلول‌های حامل ژن الحاقی[12] را تولید و همچنین جنسیت حیوان

1- Cloning
2- Gaur (B. gaurus)
3- Yak (B. grunniens)
4- Zebu (B. indicus)
5- Muflon (O. orientalis musimon)
6- African wild cat (F.silvestris)
7- Canis rufus
8- Canis simensis
9- Canis lupus

10- Ooplasm
11- Embryonic stem cells
12- Transfected cells

Downloaded from http://www.jri.ir

تراریخته را نیز مشخص نمود (۱۵،۱۶). در روش شبیه سازی مشکلات مطرح در خصوص احتمال موزائیسم و نقص در موقعیت استقرار کروموزومها که در روش تزریق DNA به داخل پرونوکلئوس تخمک لقاح یافته بسیار شایع است، منتفی می‌گردد (۱۷).

۱۲- انجام مطالعات وسیع در زمینه برنامه ریزی مجدد ژنوم[1]، نقش پذیری ژنی[2]، بررسی عملکرد ژنها و ژن درمانی (۱۵).

معایب شبیه‌سازی

۱- ایجاد درجات مختلفی از اختلالات کروموزومی از آنپلوئیدی[3] تا تغییرات ساختاری شدید کروموزومی(۹): این قبیل اختلالات کروموزومی به دلیل عدم همزمانی سیکل سلولی سلول‌های دهنده و تخمک به خصوص در گونه‌هایی که اولین چرخه‌سلولی در آنها کوتاه می‌باشد، رخ می‌دهد مانند دوزیستان (Xenopus, Rana به ترتیب با طول چرخه ۱ و ۳ ساعت) و برخی از پستانداران نظیر موش. فراوانی این اختلالات در پستانداران بسیار کمتر از دوزیستان (۱۹) است به طوریکه این میزان در گاو، گوسفند و موش به ترتیب ٦٤، ٤٠ و ۹۳ درصد گزارش شده است (۱۸).

۲- عدم بیان و یا بیان ناقص ژنها: بروز این مشکل را می‌توان در پستانداران از طریق مجاورت سلول‌های دهنده با ترکیبات القاء کننده مناسب در محیط کشت قبل از انتقال مرتفع نمود (۲۰). اختلالات مشاهده شده در فنوتیپ حیوانات شبیه‌سازی شده، از الگوی بیان ژنها نشأت گرفته و این تنوع حتی قبل از لانه‌گزینی[4] بسته به نوع سلول دهنده متفاوت است (۲۱).

۳- کاهش میزان آبستنی: درصد آبستنی و بقاء آن بسته به نوع سلول دهنده متفاوت می‌باشد. به عنوان مثال آبستنی و زایمان موفق جنین‌های شبیه‌سازی شده با استفاده از سلول‌های کومولوس، سلول‌های گرانولوزای جداری بالغ و سلول‌های اپیتلیال اویداکت بالا و میزان سقط جنین بسیار پایین گزارش شده است. در حالی که درصد آبستنی با جنین‌های حاصل از سلول‌های فیبروبلاست بسیار پایین است و اکثر جنینها در نیمه‌اول آبستنی سقط می‌گردند (۲٤-۲۲، ۱۵،۱۸). مع‌الوصف درصد آبستنی جنین‌های شبیه سازی شده در مقایسه با جنین‌های حاصل از IVF[5] بسیار پایین‌تر می‌باشد (۲۳،۲۵).

٤- کاهش تولد نتاج زنده: احتمال زنده ماندن جنین‌های شبیه‌سازی شده بدون توجه به گونه، بسیار پایین و بین ۱۰-۱٪ و حتی در مورد برخی سلول‌های دهنده کمتر از ۱٪ گزارش شده است (۲،۱٦،۱۹،۲٤،۲٦).

۵- تولد جنین با نقایص تکاملی: عدم بازسازی تلومرهای کروماتین سلول دهنده، بیان نادرست ژن‌های اختصاصی در مراحل ابتدایی تکامل جنین و زمان تشکیل جفت یا جنین، الگوی نادرست تغییرات اپی ژنتیک (متیله شدن DNA، تغییرات پروتئین هیستون از قبیل استیله شدن، فسفوریله شدن و...)، کاربرد محیط‌های کشت مختلف، روش‌های مختلف خارج سازی هسته[6]، الحاق[7] و کشت جنین زمینه ساز بروز نقایص تکاملی در جنین می‌باشند. بیشترین احتمال بروز این اختلالات در مراحل ابتدایی رشد و تکامل جنین (مورولا[8] و بلاستوسیت) می‌باشد (۵،۲۵).

٦- افزایش میزان سقط جنین: در گوسفند، قسمت اعظم آبستنیها در نیمه اول، بین روزهای ٦۰-۳۵ (۲٦،۲۹) و یا ۳۵-۲۱ (۲۹) خاتمه می‌یابند. در حالیکه در گاو، بیشترین میزان سقط بین روزهای ٦۰-۳۰ آبستنی به خصوص روز ٤۰-۳۰ آبستنی (۲٦،۳۰) و یا پس از روز ۹۰ آبستنی (۲۳،۲۷) رخ می‌دهد. شایعترین علل سقط، اختلالات و نارسایی‌های جفت به ویژه ادم، وجود پلاسنتوم‌های بزرگ و محدود (۳۱،۳۲)، هیدروآلانتوئیس[9] (۱٦،۲٦)، خونریزی کارنکولی (۳۰) و کاهش تعداد و اندازه کوتیلدونها (۳۰،۳۳) عنوان شده است. از دیگر علل سقط در جنین‌های شبیه سازی شده می‌توان به نارسایی‌های تنفسی و ریوی (۱٦،۲٦)، اختلالات متابولیکی نظیر دیابت ملیتوس (۲٤،۲٦)، اختلالات ادراری- تناسلی،

1- Genomic reprograming
2- Genomic imprinting
3- Aneuploidy
4- Implantation

5- In Vitro Fertilization
6- Enucleation
7- Fusion
8- Morula
9- Hydroallantosis

Downloaded from http://www.jri.ir

نارسایی‌های کلیوی به خصوص در بره‌ها (۳۱) و نارسایی‌های کبدی (۲٤) اشاره نمود.

علیرغم مزایا و کاربردهای گسترده شبیه سازی و درصد تولید قابل قبول بلاستوسیست‌های حاصل از Sematic cell Nuclear Transfer (SCNT)، لیکن بازده این روش از نظر تولید نتاج زنده و پایدار همچنان کمتر از حد انتظار می‌باشد. با توجه به معایب و مشکلات عدیده مذکور، هدف از پژوهش حاضر تشریح عوامل تاثیرگذار بر روند شبیه سازی، معرفی تغییرات اپی‌ژنتیک و روش‌های دستکاری این تغییرات با تاکید بر اهمیت و لزوم شناخت شاخص‌های اپی‌ژنتیک دخیل در رشد و تکامل جنین‌های شبیه سازی شده، می‌باشد.

روش بررسی

منابع این نوشتار با جستجو در پایگاه‌های اطلاع رسانی الکترونیک، شامل Scopus, PubMed, ScienceDirect جمع‌آوری گردید. در فرایند جستجوی اینترنتی از کلید واژه‌های epigenetic modification and SCNT (۲۱۵ مقاله)، Nuclear reprogramming and SCNT (۲۹۹ مقاله) و Reconstructed oocyte and SCNT (۲۳۲ مقاله) بهره گرفته شد. برای آغاز جستجو هیچ دامنه زمانی در نظر گرفته نشد و روند بروز رسانی تا زمان ارسال مقاله پیگیری شد.

بحث

تاکنون علل متعددی برای پایین بودن درصد تولید بلاستوسیست و وقوع بالای اختلالات عملکردی سیستم‌های حیاتی در جنین‌های شبیه سازی شده، عنوان شده است که از مهمترین آنها می‌توان به ناهمگونی و ناسازگاری پروتئین‌های تخمک با پروتئین‌های سلول دهنده، هتروپلاسمی میتوکندریایی، عدم برنامه ریزی کامل و مناسب ژنوم هسته انتقال داده شده، الگوی نامناسب تغییرات اپی ژنتیکی سلول دهنده (به ویژه متیلاسیون ژنوم و متیلاسیون و استیلاسیون غیرطبیعی هیستون)، بیان نامناسب (عدم بیان و یا بیان ناقص) ژن‌های جنینی و نقص در رونوشت‌برداری ژن‌های imprinting در سلول‌های جفتی اشاره نمود.

عوامل موثر در روند شبیه‌سازی

عوامل موثر در کسب موفقیت در روند شبیه‌سازی را می‌توان به عوامل مرتبط با سلول دهنده[1]، سلول تخمک، همزمانی سیکل سلولی سلول دهنده و تخمک، روش خارج سازی هسته، روش فعال‌سازی تخمک پس از انتقال هسته، تغییرات اپی ژنتیک هسته سلول دهنده و هتروپلاسمی میتوکندریایی طبقه بندی نمود.

۱- عوامل مربوط به سلول دهنده

۱-۱- نوع سلول سوماتیک: انتخاب نوع سلول دهنده یکی از عوامل موثر و تعیین کننده درصد موفقیت در روند SCNT[2] می‌باشد. تاکنون از سلول‌های مختلفی به عنوان سلول دهنده در روند SCNT استفاده شده که به ترتیب اهمیت شامل: سلول‌های فیبروبلاست جنینی، فیبروبلاست بالغ (جدا شده از پوست، عضله، رحم، اویداکت و ریه)، کومولوس[3]، گرانولوزی جداری[4]، بلاستومر، سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های ستیغ تناسلی[5]، سلول‌های ژرمینال جنینی[6]، سلول‌های ژرمینال اولیه[7]، سلول‌های اپی‌تلیال غدد پستانی، سرتولی نابالغ، لکوسیت‌های بالغ T و B، ماکروفاژ، لنفوسیت، مونوبلاست، سلول‌های عضلانی، کبدی، تیروئیدی و طحال می‌باشند.

۱-۱-۱- سلول‌های فیبروبلاست جنینی: پس از تولد دالی، قسمت عمده‌تحقیقات صورت گرفته در زمینه شبیه‌سازی به خصوص در نشخوار کنندگان معطوف به استفاده از این سلولها بعنوان سلول دهنده شده است. علت اصلی این انتخاب، سرعت رشد و تکثیر بالای این سلولها و پتانسیل بالای آنها در انجام تقسیمات متوالی تا رسیدن به مرحله پیری و مرگ می‌باشد (۱٤،۲۲،۳٤،۳۵). مهمترین عیب این سلولها، اندازه نسبتاً کوچک آنها (۲۰-۱۲ μm) است. هر چه اندازه‌سلول دهنده کوچکتر باشد احتمال تماس مؤثر سلولها (دهنده و گیرنده) کمتر و بالطبع درصد الحاق سلولها کمتر خواهد بود. از طرف دیگر برداشتن حجمی از سیتوپلاسم، هر چند کوچک،

1- Donor cell
2- Somatic Cell Nuclear Transfer
3- Cumulus cell
4- Moral granulosa cell
5- Genital ridge cell
6- Embryonic germ cell
7- Primordial germ cell

Downloaded from http://www.jri.ir

در زمان خارج سازی هسته، سبب افزایش فضای بین زوناپلوسیدا و غشاء پلاسمایی تخمک[1] شده بنابراین در صورت استفاده از سلول‌های کوچک به عنوان سلول دهنده، درصد الحاق بمراتب کمتر خواهد شد. این معضل به ویژه در روش معمول شبیه‌سازی[2] جلب توجه می‌نماید (۱۰،۳٤،۳۵).

۲-۱-۱- *سلول‌های فیبروبلاست بالغ:* اغلب این سلولها از پوست و عضله اخذ می‌گردند. از معایب اصلی این سلولها نسبت به سلول‌های فیبرو بلاست جنینی، نیمه عمر کوتاه و پیر شدن سریع‌تر آنها در محیط کشت (۱٦،۳۵) و سرعت تکثیر پایین‌تر آنها (۳۵،۳٦) است. تنها مزیت قابل توجه آنها نسبت به سلول‌های رویانی، طولانی‌تر بودن بارز مرحله G_0 و یا G_1 درآنهاست. با پیر شدن سلول‌سرعت سیکل سلولی کمتر شده و طول سیکل و نیز طول فازهای G_0 و یا G_1 افزایش می‌یابد (۳۵،۳۷).

۳-۱-۱- *سلول‌های کومولوس:* این سلولها جمعیت سلولی اختصاصی و تمایز یافته‌تری نسبت به سلول‌های گرانولوزا بوده که به دنبال افزایش ناگهانی هورمون LH در اواسط سیکل، تمایز نهایی خود را بدست می‌آورند (۳۸). مزایای اصلی این سلولها شامل استحصال سریع و آسان آنها بدون وارد آمدن هرگونه آسیب به دام، مجاورت طبیعی این سلولها با تخمک و احتمالاً واکنش متقابل سیتوپلاسمی بین آنها، سازگاری بهتر با سیتوپلاسم تخمک، درصد بالای الحاق این سلولها با اووپلاسم، درصد بالای تولید بلاستوسیست، آبستنی و زایمان موفق (٤۱-۳۸) و نیز توقف طبیعی سیکل سلولی آنها در مرحله G_0 و یا G_1 (۲۲،۲۷،۳۵) می‌باشد. از معایب اصلی آنها می‌توان قابلیت محدود این سلولها جهت رشد و تکثیر در آزمایشگاه، متوقف شدن روند تقسیمات جنینی در مراحل ابتدایی تکامل و عدم توانایی شبیه سازی موجود نر اشاره نمود (۳۵،٤۰،٤۲). گزارش‌هایی مبنی بر تولد نتاج زنده شبیه سازی شده به دنبال استفاده از این روش در گاو (٤۱)، خوک (٤۳)، موش (٤٤،٤۵) و بز (٤٦) وجود دارد.

۴-۱-۱- *سلول‌های گرانولوزی جداری:* این سلولها دارای خاصیت پرتوانی[3] هستند و میانگین مدت زمان دو برابر شدن جمعیت[4] (PD) این سلولها در محیط کشت ۱/۱±٤۲ ساعت است (٤۷). مزیت اصلی این سلولها، دسترسی آسان و جمع آوری سریع این سلولها به وسیله‌آسپیراسیون تخمک توسط دستگاه لاپاراسکوپی و یا سونوگرافی و نیز متوقف بودن سیکل سلولی آنها در مرحله G_0 و G_1 و تنها عیب آنها، همانند سلول‌های کومولوس، امکان شبیه‌سازی انحصاری حیوانات ماده است (٤۸).

۵-۱-۱- *بلاستومرها:* شبیه‌سازی با استفاده از بلاستومر را شبیه سازی رویانی[5] (EC) می‌نامند (۳۲). این سلولها دارای خاصیت همه توانی[6] (۱) و یا پرتوانی (۳۰) هستند. تحقیقات اولیه در خصوص شبیه‌سازی، اساساً معطوف به استفاده از بلاستومرهای جنینی به عنوان سلول دهنده بوده است. با توجه به اینکه این سلولها نسبت به سایر سلول‌های سوماتیک تمایز نیافته‌تر می‌باشند، پس از انتقال نیاز به حداقل مدت زمان لازم برای برنامه‌ریزی مجدد[7] دارند (۱۰،۲۸،۳٤،٤۹). اخیراً گزارشی مبنی بر عدم نیاز این سلولها برای سازماندهی مجدد پس از انتقال و برنامه ریزی خودبخودی آنها وجود دارد (٤۹). از معایب اصلی استفاده از این سلولها محدود بودن تعداد آنها و طبعاً تعداد جنین‌های شبیه‌سازی شده، نامشخص بودن پتانسیل ژنتیکی جنین‌های حاصله، کوتاه بودن بارز طول مرحله G1 (۱۵٪ طول سیکل سلولی)، موثر نبودن روش همزمانی کشت آنها در محیط حاوی مقادیر پایین سرم[8] (۰/۵-۰/۱٪) و عدم توانمندی جنین‌های شبیه سازی با استفاده از این سلولها در عبور از مرحله بلوکه شدن سلولی اشاره نمود (۱٦،۲۸،۳٤،۳٦،٤۹).

۶-۱-۱- *سلول‌های بنیادی جنینی:* این سلولها پرتوان و کاملاً تمایز نیافته و از لحاظ مورفولوژی دارای غشایی نسبتاً شفاف، هسته کاملاً بزرگ وشفاف با هسته‌های کاملاً مشخص و برجسته و نسبت بالای هسته به سیتوپلاسم هستند. در سیتوپلاسم این سلولها وزیکول‌های چربی فراوان

1- Periviteline
2- Zona intact cloning

3- Pluripotency
4- Population doubling
5- Embryonic cloning
6- Totipotency
7- Reprogramming or remodeling
8- Serum starvation

Downloaded from http://www.jri.ir

مشاهده می‌گردد. این سلولها در پاساژهای متعدد (در گاو پس از ۵۰ پاساژ یا ۱۲ ماه کشت در آزمایشگاه) کاریوتیپ طبیعی خود را حفظ می‌کنند و قادر به تشکیل اجسام شبه جنینی[1] هستند. ظاهر این اجسام، مشابه جنین مرحله بلاستوسیست است و می‌توانند به انواع مختلف سلولها تمایز یابند. معایب اصلی این سلولها مشکل بودن استخراج و تخلیص آنها، سرعت رشد و تکثیر پایین در شرایط آزمایشگاهی، درصد آبستنی بسیار پایین، خاتمه یافتن آبستنی و سقط، به خصوص در نیمه اول آبستنی که غالباً به دلیل عدم و یا نقص در تشکیل کوتیلدونها و یا خونریزی کارنکولی است، می باشد. میانگین دو برابر شدن جمعیت این سلولها در گونه‌های مختلف معمولاً ۲۴ ساعت است (۳۰،۳۴).

۲-۱- اندازه سلول سوماتیک: انتخاب سلول دهنده با قطر و ویژگی‌های مناسب، درصد الحاق سلولی و روند تکاملی جنین را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در صورت انتخاب سلولی با قطر بسیار کوچک، به دلیل عدم تماس مؤثر آن‌با غشاء پلاسمایی تخمک، درصد الحاق سلولی کاهش یافته و حال آنکه با انتخاب سلولی با قطر بسیار بزرگ، علیرغم درصد الحاق بالا، لیکن اختلالات کروموزومی (از آنپلوئیدی تا پلی پلوئیدی) در جنین‌های حاصله افزایش و درصد تولید مورولا و بلاستوسیست به طور مشخص کاهش می‌یابد (۱۲،۱۴،۲۶،۳۱،۳۳).

۳-۱- جنسیت حیوان دهنده سلول سوماتیک: تلاش‌های اولیه در زمینه SCNT، اساساً معطوف به استفاده از سلول‌های حیوان ماده (سلول‌های اپیتلیال پستان، اپیتلیال اویداکت، کومولوس و گرانولوزا) به عنوان سلول دهنده بوده است. گزارشات ضد ونقیضی در خصوص تاثیر جنس حیوان دهنده سلول سوماتیک بر روی کارایی و درصد موفقیت SCNT به چشم می‌خورد.

Hosseini و همکاران با بررسی و مقایسه سلول‌های کومولوس، فیبروبلاست قوچ و فیبروبلاست میش، تاثیر جنسیت حیوان دهنده سلول را روی میزان آسیب سلولی پس از انتقال به فضای Perivitelline، میزان برنامه ریزی مجدد هسته (NR)[2]، درصد تسهیم[3]، درصد جنین‌های ۱۶-۸ سلولی، مورولا و بلاستوسیست را منتفی دانسته و تنها تاثیر جنسیت را روی درصد جنین‌های ۸-۵ سلولی گزارش نموده‌اند. این محققین درصد جنین‌های ۸-۵ سلولی شبیه سازی شده با استفاده از سلول‌های نر را به طور معنی‌دار بیشتر از سلول‌های ماده گزارش نموده‌اند (۳۸). Kato و همکاران نیز با مقایسه سلول‌های اخذ شده از گاوهای نر نابالغ و جنین‌های نر با گاوهای ماده بالغ و جنین‌های ماده، وجود هرگونه ارتباط معنی‌دار بین جنسیت حیوان دهنده و درصد تولید بلاستوسیست را منتفی دانسته‌اند (۵۰). این در حالی است که گزارش Stice و همکاران و نیز Wakayama و همکاران حاکی از وجود ارتباط معنی‌دار بین جنسیت حیوان دهنده و درصد تولید بلاستوسیست می‌باشد. به نحوی که انتخاب سلول دهنده از حیوان نر، درصد تولید بلاستوسیست را به طور معنی‌دار کاهش داده است (۳۰،۴۵). لیکن انتقال این جنین به رحم حیوان، درصد آبستنی بالاتری را به دنبال داشته است (۳۰).

۴-۱- سن حیوان دهنده سلول سوماتیک: علیرغم عدم وجود ارتباط معنی‌دار بین سن حیوان دهنده سلول و طول سیکل سلولی، لیکن با افزایش سن حیوان دهنده‌سلول سوماتیک، درصد تولید بلاستوسیست به طور معنی‌دار کاهش می‌یابد (۵۱). Tian و همکاران با مقایسه و بررسی سلول‌های اخذ شده از گاوهای بالغ (۲ ساله، ۱۲-۱۰ ساله و ۱۶ ساله)، گوساله‌های تازه متولد شده و جنین های ۵۷ روزه، هیچ تفاوت معنی‌داری در درصد تسهیم جنین‌های شبیه‌سازی شده با استفاده از سلول‌های بالغ و جنینی مشاهده ننموده‌اند؛ لیکن اغلب جنین‌های حاصل از سلول‌های بالغ در مراحل پیشرفته‌آبستنی سقط شده و یا در صورت زنده ماندن طیف وسیعی از اختلالات را نشان دادند (۱۵).

۵-۱: همزمان نمودن سیکل سلولی سلول‌های دهنده:

۱-۵-۱- سیکل سلولی و طریقه کنترل آن: سیکل سلولی در سلول‌های یوکاریوت شامل سه مرحله اینترفاز[4] (مرحله رشد)،

1- Embryoid body

2- Nuclear reprogramming
3- Cleavage rate
4- Interphase

Downloaded from http://www.jri.ir

میتوز یا کاریوکینز[1] (مرحله تقسیم هسته) و سایتوکینز[2] (مرحله تقسیم سیتوپلاسم و ارگانل‌های آن) می‌باشد. اینترفاز خود شامل سه مرحله G1[3]، S[4] و G2[5] بوده و G1 مهمترین و طولانی‌ترین مرحله اینترفاز می‌باشد. برخی سلولها از مرحله G1 خارج و وارد مرحله G0 (مرحله سکون) می‌گردند. سلول‌های این مرحله با حفظ فعالیت اختصاصی خود، در وضعیت غیرفعال (کمون) باقی می‌مانند. مراحل مختلف سیکل سلولی بوسیله پروتین‌های مختلف سیتوپلاسمی کنترل و تنظیم می‌گردد. سایکلینها[6]، سایکلین کینازها[7] (Cdks) و سایکلوزومها[8] (APC)[9] مهمترین کنترل کنندگان سیکل سلولی بوده و فعالیت آنها توسط مکانیسم‌های مختلف داخل و خارج سلولی کنترل و تنظیم می‌گردد.

از بین سایکلین‌های تنظیم کننده روند سیکل سلولی، سایکلین‌های گروه B (فاکتورهای پیشبرنده مراحل G2[10] و M[11])، سایکلین A (فاکتورهای پیشبرنده مراحل S[12] و M)، سایکلین‌های D و E (فاکتورهای پیشبرنده مرحله G1[13]) و سایکلین K (فاکتورهای پیشبرنده مرحله S) و نقش مهمی را ایفا می‌کنند. مقادیر این سایکلینها در سلول با پیشرفت سیکل سلولی تغییر می‌نماید.

خانواده سایکلین کینازها در کنترل روند پیشرفت تقسیمات سلولی بویژه تبدیل مرحله G_1 به S، تکثیر سلولها و بقاء موجود زنده دخالت می‌نمایند. در پستانداران سایکلین کیناز ۲؛ Cdk2 با اتصال به سایکلین‌های D و E سبب کنترل مرحله G1 و با اتصال به سایکلین A سبب کنترل مرحله S می‌گردد. Cdk1 با اتصال به سایکلین‌های A و B سبب کنترل مرحله S و با اتصال به سایکلین B سبب کنترل مراحل G2 و M می‌گردد. سایکلین کینازهای ٤، ٥ و ٦ (CdK4, 5, 6) نیز با اتصال به سایکلین D سبب کنترل مرحله G1 سیکل سلولی می‌گردند. سطح این سایکلین کینازها در سلول نسبتاً ثابت بوده؛ لیکن با توجه به اینکه فعال شدن آنها اساساً وابسته به اتصال آنها به گروه فسفات سایکلین مربوط به خود بوده و سطح سایکلینها در سلول بسیار متغیر می‌باشد، بنابراین توجه به میزان فعالیت سایکلین کینازها بسیار مهمتر از میزان کمی آنها در سلول است.

فاکتورهای پیشبرنده مرحله M به ویژه سایکلین A با اتصال به Cdk2 وارد هسته شده و سلول را برای رونوشت برداری از DNA آماده می‌نماید. با ادامه رونوشت برداری از DNA، سطح سایکلین E به شدت کاهش و سطح سایکلین B شروع به افزایش می‌نماید. در این مرحله سلول وارد مرحله G_2 می‌گردد. فاکتورهای پیشبرنده مرحله M به ویژه سایکلین B با اتصال به Cdk1 موجب شکل گیری دوک تقسیم، NEBD، توقف تمامی ژن‌های رونوشت برداری و متراکم شدن کروماتین می‌گردند. این سایکلین با فعال نمودن سایکلوزومها (APC) سلول را به سمت مرحله متافاز پیش می‌برد.

سایکلوزومها، کمپلکس پیشبرنده مرحله آنافاز (APC) نیز نامیده می‌شوند. این مجموعه محرک وقایعی هستند که منجر به کاهش میزان سایکلین‌های B در سلول، از بین رفتن چسبندگی کروماتیدهای دختر و تسهیل جدا شدن آنها از یکدیگر می‌گردد. به دنبال فعال شدن APC، سطح سایکلینB بسیار کاهش، سنتز سایکلین D به طور معنی‌دار افزایش و کروماتیدهای دختر روی صفحه متافازی از یکدیگر جدا و به جوانب کشیده خواهند شد (۵۲). از طرف دیگر سایکلوزومها نقش به سزایی در کاهش Geminin دارند. Geminin (Gmnn) پروتئین هسته‌ای متشکل از ۲۰۰ اسید آمینه، وزن ملکولی تقریباً ۲۵ KDa و عضوی از سیستم APC-ubiguitin بوده و نقش به سزایی در کنترل سیکل سلولی دارد. سلول‌های مرحله G1 فاقد این پروتئین بوده به تدریج با شروع مرحله S در سلول تظاهر یافته وتا مرحله M به حداکثر میزان خود می‌رسد. در انتهای مرحله M بدنبال فعالیت زیاد کمپلکس APC و سایکلین کینازها میزان آن به شدت کاهش می‌یابد. این پروتئین دارای نقش به سزایی در مهار لود شدن کمپلکس MCM (کمپلکس ضروری جهت آغاز رونوشت برداری

1- Kariokinase
2- Cytokinase
3- Gap1
4- Synthesis
5- Gap2
6- Cyclins
7- Cyclin-dependent kinases (Cdks)
8- Cyclosomes
9- Anaphase-promoting copmplex (APC)
10- G2- phase promoting factor (G2PF)
11- M- phase promoting factor (MPF)
12- S- phase promoting factor (SPF)
13- G1- phase promoting factor (G1PF)

Downloaded from http://www.jri.ir

ژن‌های یوکاریوت)، مهار عملکرد فاکتورهای پروتئینی رونوشت برداری از جمله Brg1, Scmh1, SW1/SNF بویژه cdt1 (جلوگیری از رونوشت برداری DNA به بیش از ۱ راند در هر سیکل)، مهار روند یوبیکویتیناسیون cdt1 (مهمترین فاکتور رونوشت برداری) و پروتئولیز (غیرفعال شدن) آن، خاتمه میتوز (جلوگیری از رونوشت برداری مجدد DNA تازه رونوشت برداری شده مرحله S)، کنترل روند تقسیم و تمایز سلولی (بویژه در سیستم اعصاب مرکزی، اسکلتی و چشم) و هماهنگ کننده تقسیمات سلولی در راستای تمایز سلولها می‌باشد. میزان این پروتئین بستگی تام به نحوه بیان ژن Gmnn دارد. لیکن با تمهیداتی نظیر کنترل روند پروتئولیز ubiquitin در زمان تقسیم میتوز (مهار روند مذکور سبب کاهش مشخص میزان Geminin و شروع دور جدید رونوشت برداری DNA می‌گردد) و نیز RNAi می‌توان تا حدودی میزان آنرا تنظیم نمود. RNAi فرایند خاموشی ژنها وابسته به RNA می‌باشد که بنام‌های سرکوب کننده، خاموش کننده ژنها پس از رونوشت برداری و یا ساپرس کنندگان همزمان نیز نامیده می‌شوند. این فرایند نقش بسزایی در تنظیم عملکرد سلول‌های دفاعی بدن در مقابل ژن‌های مهاجم به سلول (ژن‌های ویروسی، انگلی، ترانسپوزونها و ...)، کنترل عملکرد ژن‌های فعال مرتبط با روند تکثیر و تمایز سلولها و همچنین در تنظیم نحوه بیان آنها دارد. مهار Geminin بواسطه RNAi سبب رونوشت برداری مجدد قطعه‌ای از ژنوم و متعاقب آن آنپلوییدی می‌گردد. این موضوع در درمان سرطان و تخریب سلول‌های توموری اهمیت فراوانی دارد چرا که بدنبال مهار این پروتئین به سرعت (در عرض چند روز) رشد و تکثیر سلول‌های توموری کاهش و روند آپپتوزیس آغاز می‌گردد. البته این نکته حائز اهمیت است که هنوز سلول‌های توموری اولیه و پیش ساز به این استراتژی پاسخ مناسبی نشان نداده‌اند (۵۳).

۲-۵-۱- انتخاب سلول مناسب جهت انتقال: با توجه به استفاده از تخمک‌های MII به عنوان سلول گیرنده در روند SCNT، شناخت و انتخاب سلول دهنده در مرحله مناسب از سیکل سلولی (G0 و یا G1) امری اجتناب ناپذیر است. در این بین برخی از سلولها مانند سلول‌های سرتولی و عصبی (۲۲،۲۷،۴۷) و ۹۰٪ از سلول‌های کومولوس (۲۲،۲۷) به طور طبیعی و بدون اعمال هیچگونه برنامه همزمانی در فاز G_0 و یا G_1 متوقف می‌باشند. در همین خصوص برخی از محققین سلول‌های گرانولوزا، کومولوس و فیبروبلاست جنینی را به دلیل اینکه اغلب در فاز G_0 و یا G_1 از سیکل سلولی به سر می‌برند، سلول‌های مناسب جهت انتقال معرفی نموده‌اند (۲۶). Tomii و همکاران با مقایسه سلول‌های فیبروبلاست گاوی فاز G_0 و G_1 گزارش نمودند انتقال سلول‌های فاز G_0 نسبت به سلول‌هایی که در اوایل و یا اواخر فاز G_1 همزمان شده‌اند موجب افزایش معنی‌دار در تولد نتاج زنده می‌شوند و این در حالی است که انتقال سلول‌های فیبروبلاست ترانسژنیک فاز G_1 نسبت به G_0 افزایش مشخص در درصد آبستنی، تولد نتاج زنده و قابلیت ماندگاری جنین پس از تولد را به دنبال داشته است (۵۴). در صورت انتقال سلول سوماتیک مراحل S، G1 و G2 به اووپلاسم مرحله MII، گسیختگی غشاء هسته؛ (NEBD)[1]، متراکم شدن زودرس کروموزومها؛ (PCC)[2]، شکل گیری مجدد غشاء هسته و رونوشت برداری از DNA حتمی خواهد بود. وقوع و شدت این تحولات بسته به گونه، روش انتقال هسته، سن تخمک، نوع سلول سوماتیک، سطح و میزان فعالیت فاکتور پیشبرنده بلوغ (MPF)[3] اووپلاسم و مدت زمان مواجهه سلول سوماتیک با فعالیت بالای MPF متفاوت می‌باشد. در صورت انتقال سلول‌های سوماتیک فاز G2 به اووپلاسم مرحله MII، سریعاً NEBD و PCC اتفاق افتاده، کروماتین متراکم گردیده و کروموزوم‌های طویل با دو کروماتید تشکیل خواهند شد. سپس به دنبال شکل گیری مجدد غشاء هسته رونوشت برداری مجدد از DNA صورت گرفته و جنین حاصله دچار ناهنجای‌های وسیع کروموزومی خواهد شد. در صورت استفاده از سلول‌های فاز S، سرعت PCC کندتر خواهد بود. پس از شکل گیری مجدد غشاء هسته، رونوشت برداری مجدد به طور کامل یا جزئی صورت خواهد گرفت و مجدداً جنین دچار ناهنجاری‌های کروموزومی خواهد شد. تنها در صورت انتقال سلول‌های سوماتیک فاز G1

1- Nuclear Envelop Breake Down
2- Premature Chromatin Condensation
3- Maturation Promoting Factor

Downloaded from http://www.jri.ir

به اووپلاسم مرحله MII، روند طبیعی NEBD و PCC و به دنبال آن رونوشت برداری طبیعی از DNA اتفاق خواهد افتاد. در صورت انتقال سلول سوماتیک مرحله G2 به اووپلاسم مرحله S، رونوشت برداری مجدد از DNA اتفاق نمی‌افتد. مگر زمانی که از دترجنتها به منظور افزایش نفوذپذیری غشاء سیتوپلاسمی هسته استفاده گردد. در این صورت رونوشت برداری مجدد از DNA صورت گرفته و جنین حاصله دچار ناهنجاری‌های کروموزومی خواهد شد (۵۵).

۳-۵-۱- روش‌های همزمانی سیکل سلولی: به منظور همزمان سازی سیکل سلولی سلول‌های دهنده در مراحل G0 و یا G1 از ترکیبات و یا روش‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود.

۱- استفاده از ترکیبات دارویی و شیمیایی: ترکیبات شیمیایی که تاکنون مرد استفاده قرار گرفته عبارتند از: Democolcine (دپلاریزه‌کننده‌میکروتوبولها)، Nocodazole، Colcemid (مهارکننده میکروتوبولها)، Aphidicoline (مهار کننده قابل برگشت و موثر DNA پلیمراز پستانداران) و Roscovitine (مهارکننده MPF و Cdk2 اختصاصی) (۱۰،۵۱،۵۶،۵۷).

سه ترکیب نخست سبب توقف سیکل سلولی در مرحله M می‌شود. به دنبال قطع این ترکیبات، سلولها از مرحله M عبور می‌نمایند و وارد فاز G_1 می‌گردند.

Aphidicoline که معمولاً همراه با داروهای مهار کننده‌میکروتوبولها به کار برده می‌شود سبب توقف سیکل سلولی در مرحله‌ی G_1/ S می‌گردد (۵۱،۵۶).

Roscovitine مهار کننده سایکلین کیناز ۲ (Cdk2)[1] و MPF است و موجب همزمانی سیکل سلولی، افزایش وقوع احتمال برنامه ریزی و سازماندهی مجدد هسته سلول سوماتیک پس از انتقال؛ (SCNR)[2] و نیز افزایش درصد آبستنی خواهد شد (۱۱،۵۷،۵۸). این دارو معمولاً همراه با داروهای مهار کننده‌میکروتوبولها به کار برده می‌شود و سبب همزمانی سیکل سلولی سلول‌های سوماتیک در فاز G_1، افزایش معنی‌دار احتمال SCNR و بهبود درصد آبستنی و زایمان موفق خواهد شد (۱۰،۱۱).

ترکیبات شیمیایی دیگری نیز وجود دارند که به واسطه تداخل در عوامل تنظیم کننده‌های پروتئین کینازها سبب توقف تقسیمات سلولی در مرحله G_1 می‌گردند.

۲- استفاده از سلول‌های دهنده با درجه تراکم[3] بالا (۹۰-۸۰٪) در محیط کشت: کشت‌های متراکم حاوی سلول‌هایی با سیکل سلولی طولانی‌تر هستند زیرا تماس نزدیک سلولها با یکدیگر سبب متوقف شدن تقسیمات سلولی (مهار تماسی)[4] و بالطبع طولانی‌تر شدن فاز G_1 می‌گردد (۱۰،۴۹،۵۱).

۳- روش Shake-off: این روش سبب جداسازی سلول‌های فاز G_1 می‌گردد. برخی از محققین دقت این روش در جداسازی سلول‌های فاز G1 را ۱۰۰٪ عنوان می‌نمایند و با مقایسه این روش با روش قبل نشان داده‌اند در صورتی که از سلول‌های فاز G1 همزمان شده با روش shake-off استفاده گردد، درصد آبستنی و زایمان موفق به طور معنی دار بیشتر از مواردی است که از سلول‌های همزمان شده با روش قبل استفاده گردد (۵۹). در این روش سلول‌های تازه تقسیم شده‌ای که توسط ارتباطات سیتوپلاسمی به یکدیگر متصل شده‌اند به عنوان سلول‌های فاز G1 قلمداد می‌گردند (۵۱).

۴- افزایش تعداد دفعات پاساژ: این کار سبب افزایش درصد سلول‌های فازهای G_0 و G_1 می‌گردد؛ زیرا افزایش تعداد دفعات پاساژ، سبب پیرتر شدن سلولها و افزایش طول سیکل سلولی به خصوص فاز G_1 می‌گردد (۲۸).

۵- کشت سلولها در محیط‌های حاوی مقادیر پائین سرم[5] (۰/۵-۰/۱٪): کشت سلولها در این شرایط نه تنها سبب کاهش فعالیت رونوشت برداری و تغییر ساختار هسته و کروماتین سلولهای سوماتیک می‌گردد؛ بلکه سبب توقف سیکل سلولی در فاز G_1 (۱۵،۳۳،۶۰،۶۱) و یا G_0 (۲،۲۲،۶۲) و نیز تسریع SCNR پس از مواجهه با فاکتورهای سیتوپلاسمی می گردد (۱۰،۲۲،۳۱،۴۹). در صورت استفاده از بلاستومر به عنوان سلول دهنده، استفاده از این روش همزمانی موثر نخواهد بود؛ چرا که روند پیشرفت و کنترل سیکل سلولی سلول‌های بلاستومر با سایر سلول‌های سوماتیک متفاوت است (۴۹،۶۳).

1- Specific Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2)
2- Somatic cell nuclear reprograming

3- Confluency
4- Contact inhibition
5- Serum starvation

Downloaded from http://www.jri.ir

بررسی‌های اخیر نشان داده است استفاده از این روش همزمان سازی سبب افزایش وقوع آپپتوزیس سلول‌های سوماتیک، کاهش معنی‌دار درصد بلاستوسیست، آبستنی و زایمان موفق می‌گردد (٦٤).

مقایسه سه روش Shake-off، کشت با تراکم بالا (مهار تماسی) و کشت در محیط‌های حاوی سرم پایین نشان داده است، کشت سلول‌های دهنده تا در درجات تراکم بالا (روش مهار تماسی) سبب همزمانی بهتر و دقیقتر سلول‌های دهنده در فاز G_1 (٥٩) و یا G_0 (٥١) می‌گردد.

۶-۱- نحوه ورود سلول‌های دهنده: سلول‌های دهنده را می‌توان از دو طریق با اووپلاسم تلفیق نمود:

- الحاق سلولها با اعمال پالس الکتریکی (روش راسلین)[1]: تولد دالی به عنوان مهمترین رخداد در تاریخ علم شبیه سازی با استفاده از این روش صورت گرفته است. در این روش همزمانی سیکل سلولی سلول دهنده و تخمک از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. در این روش پس از اخذ سلول سوماتیک از دام بالغ و همزمانی سیکل سلولی آنها در مراحل G0 و یاG1 (اغلب با استفاده از روش کشت در محیط‌های حاوی مقادیر پایین سرم)، سلول دهنده و تخمک در کنار یکدیگر قرار داده می‌شوند و پالس الکتریکی اعمال می گردد. پالس الکتریکی نه تنها سبب الحاق سلولها می‌شود؛ بلکه موجب فعال سازی جنین جهت القای روند تکاملی تقسیمات جنینی نیز می‌گردد (١،٢،٢٣).

- روش تزریق مستقیم سلول به داخل اووپلاسم[2]: این روش برای اولین بار توسط Wakayama و Yanagimachi در دانشگاه هاوایی روی موش انجام شد. این محققین در سال ١٩٩٨ با استفاده از سلول‌های کومولوس، سرتولی و عصبی موفق به تولید ٥ بچه موش از سه سویه مختلف شدند (٤٥). مزیت مشخص این تکنیک نسبت به روش قبل، درصد بالاتر تولید بلاستوسیست و موفقیت بیشتر روند شبیه سازی است (١،٢،٢٣).

۲- فاکتورهای مربوط به تخمک گیرنده

در روند شبیه سازی، غالبا از تخمک بعنوان سلول گیرنده استفاده می‌گردد. علل این انتخاب را می‌توان به دلیل دسترسی و استحصال آسان آنها، قابلیت این سلولها در حمایت از ادامه‌روند تکاملی تقسیمات جنینی و قابلیت الحاق این سلولها دانست (٦٤،٦٥). البته به جای تخمک‌های متافازII، می‌توان از زیگوت و یا جنین دوسلولی فاقد هسته نیز استفاده نمود. این جایگزینی در موش برخلاف پستانداران کاربرد وسیعی دارد. مزیت اصلی زیگوت‌این است که در آن لقاح به طور طبیعی سبب فعال‌سازی سیتوپلاسم می‌گردد؛ لذا به نظر می‌رسد برنامه‌ریزی مجدد هسته‌سلول‌های دهنده پس از انتقال در مورد آنها تسهیل شود (٦٧،٦٨).

۲-۱- سن حیوان دهنده تخمک: علیرغم اینکه تخمک‌های اخذ شده از حیوانات مسن‌تر نسبت به تخمک‌های گونه‌های جوانتر سریعتر و راحت‌تر فعال می‌گردند و به نظر می‌رسد روند فعال سازی بعدی جنین تجدید ساختار شده بسیار ساده تر و سریعتر باشد (٦٩،٧٠،٧١). لیکن با افزایش سن حیوان دهنده، تخمک به دلیل تضعیف ساختار سایتواسکلتال، سریعتر در روند خارج سازی هسته دچار آسیب شدید سلولی می‌گردد و احتمال آپپتوزیس در جنین حاصله به طور قابل توجه افزایش می‌یابد. از آنجائیکه دوک تقسیم توسط ارگانل‌های اووپلاسم شکل‌می‌گیرد با افزایش سن ارگانل‌های سیتوپلاسم، قابلیت دوک در جدا نمودن کروموزوم‌های هومولوگ کاهش و احتمال هر گونه اختلال در جدا شدن کروموزومها (به ویژه آنپلوئیدی) به طور مشخص افزایش می‌یابد (٦٦،٧١).

مقایسه تخمک‌های اخذ شده از گاوهای سنین مختلف نشان داده است با افزایش سن حیوان دهنده تخمک نه تنها درصد تسهیم، مورولای متراکم و بلاستوسیست به طور معنی‌دار کاهش می‌یابد؛ بلکه پس از انتقال جنین‌های شبیه سازی شده درصد آبستنی، زایمان موفق و نیز قابلیت زنده ماندن گوساله‌های متولد شده نیز به طور مشخص کاهش یافته است (٧٠). علل احتمالی این رخداد می‌تواند قابلیت بالاتر تخمک‌های جوان‌تر در طی نمودن روند تکاملی، کیفیت بالاتر جنین‌های حاصله و سطح بالای پروتئینها، پروتئین کینازها و ترانسکریپت‌های مرتبط با روند SCNR در اووپلاسم تخمک‌های جوان است (٧١،٧٢).

1- Roslin technique
2- Honolulu technique

Downloaded from http://www.jri.ir

Rizos و همکاران نیز با مقایسه تخمک‌های گوساله‌های زیر ۳۰ ماه با گاوهای بالای ٤ سال نشان داده‌اند علیرغم یکسان بودن تعداد تخمک‌های جمع آوری شده از تخمدان‌های هر دو گروه، درصد مورولا و بلاستوسیست بدست آمده از گوساله‌های زیر ۳۰ ماه به طور معنی‌دار بیشتر از گروه دوم بوده است (۷۲). Mermillod و همکاران نیز درصد مورولا و بلاستوسیت حاصل از تخمک‌های جمع آوری شده از گاوهای ۳-۱ سال را مشابه یکدیگر و به طور معنی‌دار بیشتر از گاوهای بالای ۳ سال گزارش نموده‌اند (۷۳).

۲-۲- وضعیت تخمک گیرنده:

۲-۲-۱- تخمک‌های فعال نشده فاقد هسته: تغییرات سلول‌های دهنده پس از انتقال توسط پروتئین کینازهای مختلف اووپلاسم (از جمله MPF و MAPK)[1] کنترل و تنظیم می‌گردند. این پروتئین کینازها سبب متراکم شدن کروماتین و منظم شدن کروموزومها در مرکز دوک تقسیم می‌شوند. سیتوپلاسم این تخمکها در مرحله متافاز II دارای سطح بالای فعالیت هیستون H_1 کیناز، MPF و MAPK هستند. به دنبال انتقال سلول سوماتیک و مواجهه هسته با سطح بالای این پروتئین کینازها یک سری تغییرات ساختاری خاصی در سلول دهنده رخ می‌دهد که شامل NEBD و به دنبال آن PCC، منظم شدن کروموزومها در مرکز دوک تقسیم، ناپدید شدن هسته، تشکیل مجدد غشاء هسته و متورم شدن آن است (۳٤،۵۱،٦٦،۷٤،۷۵).

شدت و میزان وقوع PCC و NEBD بسته به میزان فعالیت پروتئین کینازهای مذکور به ویژه MPF اووپلاسم، مدت زمان مجاورت هسته سلول سوماتیک با آنها، نوع سلول سوماتیک منتقل شده، سن تخمک و گونه، متفاوت است. در موش میزان و فعالیت بالایی از MPF و MAPK در هسته تخمک و در مجاورت دوک تقسیم وجود دارد که به دنبال خارج سازی هسته، حجم بالایی از این کینازها از تخمک خارج می‌گردد. در حالی که در خوک اغلب این کینازها و عملکرد اصلی آنها در اووپلاسم متمرکز است و خارج سازی هسته تفاوت چندانی در میزان و فعالیت کینازها ایجاد نمی‌نماید.

بررسیها در گوسفند نشان داده است تخمک‌های دارای هسته نسبت به تخمک‌هایی که هسته آنها خارج گردیده‌اند بسیار مستعدتر و دارای سطح بالاتری از پروتئین کیناز می‌باشند، با این حال خارج سازی حجمی از سیتوپلاسم متعاقب خارج سازی هسته و حذف مقادیری از MAPK و MPF منجر به کاهش قابل توجهی در میزان SCNR و توقف روند تکامل جنین نمی‌گردد (٦٨).

به منظور افزایش سطح MAPK و MPF و فعالیت آنها می‌توان از کافئین که یک عامل مهارکننده پروتئین فسفاتاز و نیز مهارکننده پروتئوزوم است، استفاده نمود. استفاده از کافئین سبب افزایش SCNR و افزایش درصد تسهیم جنین‌های شبیه سازی شده می‌گردد (٤۹).

۲-۲-۲- تخمک‌های فعال شده فاقد هسته: به فعال سازی تخمک قبل از انتقال هسته، پیش فعال سازی[2] گفته می‌شود و بیشتر زمانی به کار می‌رود که از بلاستومرها به عنوان سلول‌های دهنده استفاده گردد (٦۷). به دنبال لقاح و یا فعال سازی جنین، میزان و فعالیت MPF، MAPK و آنزیم هیستون H_1 کیناز بدلیل نوسانات کلسیم و تخریب سایکلین B1، توسط دستجات پروتئوزومی، کاهش می‌یابد. این شرایط سبب می‌گردد تخمک از مرحله‌متافاز II خارج، پرونوکلئوس تشکیل و روند تکاملی تقسیمات سلول ادامه یابد (۲۹). تحت این شرایط سیتوپلاسم این تخمکها در مرحله اینترفاز (۵۱،٦٦) گیرنده مناسبی برای سلول‌های دهنده با مراحل مختلف سیکل سلولی است. به طوریکه پس از انتقال سلول سوماتیک مراحل G1،G2،S و G0، به دلیل سطح پایین پروتئین کینازها، NEBD و PCC اتفاق نخواهد افتاد و رونوشت برداری از DNA بسته به مرحله سیکل سلولی سلول دهنده مشاهده خواهد شد. در صورت انتقال سلول‌های مراحل G0 و G1، رونوشت برداری از DNA آغاز و به طور طبیعی پیش خواهد رفت. در صورت انتقال سلول‌های مرحله S، رونوشت برداری از DNA ادامه یافته و به طور طبیعی خاتمه خواهد یافت و در صورت انتقال سلول‌های مرحله G2، رونوشت برداری از DNA ادامه خواهد یافت و قطعاتی از DNA که قبلاً رونوشت برداری شده، مجدداً رونوشت برداری نخواهد شد. در تمامی موارد جنین

1- Mitogen Activated Protein Kinase

2- Preactivation

Downloaded from http://www.jri.ir

حاصله از لحاظ کروموزومی کاملاً طبیعی و فاقد هر گونه ناهنجاری می‌باشند (۴۹،۵۱،۶۷،۶۸،۷۵) البته گزارش‌هایی مبنی بر انتقال سلول‌های مرحله G_2 و آسیب کروموزومی متعاقب PCC و ایجاد جنین‌های با کروموزومها غیر متعارف وجود دارد (۵۱،۶۷).

۲-۳- توانایی اووپلاسم در برنامه‌ریزی مجدد هسته‌سلول دهنده: اصطلاح برنامه ریزی مجدد هسته (NR) برای اولین بار در روند شبیه سازی دوزیستان به کار گرفته شد و به معنای تغییرات مورفولوژیک و مولکولی هسته سلول سوماتیک پس از مواجهه با اووپلاسم است (۷۶). بعدها این تعریف، تغییرات کروماتین و نحوه بیان ژن را نیز شامل شد. وقایعی که در روند NR در هسته سلول سوماتیک رخ می‌دهد اساساً مشابه تغییرات DNA اسپرم و تخمک در روند لقاح طبیعی است؛ لیکن تفاوت‌هایی در این بین وجود دارد که به آنها پرداخته خواهد شد. SCNR اساساً وابسته به فاکتورهای سیتوپلاسمی تخمک می‌باشد. این عوامل خاص، منحصراً در اووپلاسم تخمک‌های بالغ (مرحله MII) بارور نشده (یا به عبارتی فعال نشده) و فقط به مدت کوتاهی پس از فعال شدن تخمک وجود دارند و لازم است کروماتین سلول سوماتیک مستقیماً با این فاکتورها مواجه گردد (۳۳). محرک اصلی روند SCNR، فعالیت بالای MPF اووپلاسم می‌باشد. MPF از دو زیر واحد به نام زیر واحد کاتالیتیک[1] CDC2 که مشابه پروتئین کیناز cdc2 مخمر[2] می‌باشد و زیر واحد تنظیم کننده[3] CyclinB تشکیل شده است. به دنبال ورود سلول سوماتیک به داخل اووپلاسم، فعالیت بالای MPF سبب شروع وقایعی نظیر NEBD، PCC و یکسری تغییرات اپی‌ژنتیکی در کروماتین سلول سوماتیک می‌گردد. در صورتیکه این تغییرات اپی‌ژنتیک به طور منظم در روند طبیعی خود پیش نروند، دامنه وسیعی از انواع ناهنجاری‌های کروموزومی در جنین ایجاد می‌گردد. از جمله مهمترین آنها، تغییرات اپی‌ژنتیکی مسئول NR،

استیله ومتیله شدن هیستون و متیله شدن DNA می‌باشند.

۲-۴- زمان خارج سازی محتویات ژنومی تخمک: مناسب ترین زمان برای خارج سازی جسم قطبی (pb)[4] و صفحه متافازی تخمک در گوسفند h ۲۴-۲۲ و در گاو h ۲۶-۲۴ پس از شروع IVM بوده و توصیه شده تخمک‌هایی که در گوسفند و گاو به ترتیب ظرف مدت ۲۴ و ۲۶ ساعت پس از شروع کشت، pb مشخصی ندارند از مطالعه حذف گردند (۳۵).

۲-۵- کیفیت و کمیت اووپلاسم: کیفیت اووپلاسم تخمک‌هایی که در شرایط in vitro بالغ شده‌اند بسیار پایین تر از تخمک‌هایی است که در in vivo بالغ شده‌اند. لیکن به دلیل دسترسی آسان و فراوانی تخمک‌های کشت داده شده در شرایط آزمایشگاهی معمولاً از این تخمکها به عنوان سلول گیرنده استفاده می‌گردد. در صورت استفاده از تخمک‌های بلوغ یافته در آزمایشگاه توجه به نکاتی از جمله انتخاب فولیکول جهت آسپیره کردن، مدت زمان و شرایط محیط کشت تخمکها، شرایط اتمسفر حاکم بر انکوباتور و انتخاب تخمک‌های مناسب جهت خارج سازی هسته ضروری است (۳۵).

۳- همزمانی سیکل سلولی سلولهای دهنده و گیرنده

به منظور اجتناب از اختلالات کروموزومی جنین‌های شبیه سازی شده، بایستی سیکل سلولی سلول‌های دهنده با میزان بالای MPF تخمک متافاز II هماهنگی و همخوانی داشته باشد. به همین دلیل تنها سلول‌های دهنده‌ای که DNA دیپلوئید داشته و در فاز G1 و یا G0 هستند برای این کار مناسب‌اند (۲۲،۳۴،۴۷،۶۸،۷۸).

۴- روش خارج‌سازی هسته

خارج سازی دقیق تمام محتویات هسته در روند شبیه سازی، کاری وقت گیر و خسته کننده و در عین حال بسیار حساس و کلیدی است. انتخاب روشی سریع، ساده، کارامد و با حداقل آسیب وارده به تخمک سبب افزایش مشخص راندمان شبیه سازی خواهد شد. تاکنون از روش‌های مختلفی به منظور خارج سازی محتویات کروموزومی تخمک استفاده شده که مرسوم‌ترین آنها عبارتند از:

1- Catalytic subunit; CDC2
2- Yeast cdc2 protein kinase
3- Regulatory subunit; Cyclin B

4- Polar body

Downloaded from http://www.jri.ir

۱-۴- ***خارج سازی هسته به روش فیزیکی:*** در این روش محل استقرار صفحه متافازی و کروموزومها از روی موقعیت جسم قطبی تخمین زده شده لیکن در اغلب موارد (بیش از ۵۰٪) Pb از محل اولیه‌خود حرکت می‌نماید و معمولاً نزدیک به صفحه‌متافازی قرار ندارد. در این روش با وارد کردن سر سوزن به داخل سیتوپلاسم، pb و حجمی از سیتوپلاسم (۳۰-۱۰٪، ترجیحاً ۱۰٪) خارج می‌گردد؛ لیکن در این روش هیچ تضمین قطعی برای خارج‌سازی واقعی کروموزومها وجود ندارد (۳۵،۴۲). از طرف دیگر خارج سازی حجم بالای سیتوپلاسم سبب کاهش قابلیت برنامه ریزی مجدد اپی ژنتیکی[1] هسته سلول دهنده توسط تخمک خواهد شد (۳۵،۴۴،۶۸). در این روش به منظور افزایش اطمینان از خارج سازی صفحه متافازی از رنگ هوخس[2] استفاده و پس از مجاورت تخمک با UV (کمتر از ۵ ثانیه) و مشخص شدن جایگاه هسته، محتویات ژنتیکی خارج می‌شود.

۲-۴- ***خارج سازی هسته به روش شیمیایی:*** در این روش پس از مجاورت تخمک با ترکیبات شیمیایی مختلف، روند سایتوکاینز و کاریوکاینز سلول دچار تغییر می‌گردد. در گذشته بدین منظور از Cyclohexamide و Etoposide (مهار کننده topoisomerase II) استفاده می گردید. بعدها با پیشرفت‌های حاصله مشخص گردید که تخمک‌هایی که با Cyclohexamide و Etoposide و یا ترکیبی از آنها فعال می‌شوند در انتهای روند خارج سازی هسته فاقد آنزیم MPF kinase فعال هستند و درصد تسهیم و تولید بلاستوسیت در آنها به طور معنی‌دار کمتر از سایر روشها است. بنابراین Democolcine (DEM) و Nocodazole (NOC) به عنوان جایگزین مناسبی برای دو داروی فوق مطرح گردید. DEM با اتصال به دایمر توبولین از پلیمریزه شدن میکروتوبولها جلوگیری و دانسیته‌آنها را کاهش داده و همچنین سبب بیرون زدگی توده کاملاً متراکم کروماتین از سطح غشاء سیتوپلاسمی تخمک می‌گردد. استفاده از این ترکیب سبب تحریک روند تکاملی تقسیمات جنینی و افزایش درصد بلاستوسیت می‌گردد. این ترکیب معمولاً همراه با اتانول استفاده گردیده و کاربرد وسیعی در شبیه سازی موش، بز، خرگوش و خوک دارد (۴۴،۵۴،۶۴). NOC نیز دارای تاثیری مشابه DEM بوده با این تفاوت که درصد خارج سازی موثر تمامی محتویات ژنومی با استفاده از این ترکیب در مقایسه با DEM پایین‌تر می‌باشد. اخیراً مشخص شده استفاده از DEM و NOC سبب بیرون زدگی کامل ولی موقت محتویات کروموزومی تخمک گردیده و در صورت عدم خارج سازی هسته به صورت فیزیکی، توده کروموزومی مجدداً جذب سیتوپلاسم تخمک می‌گردد (۷۹). لذا به نظر می‌رسد خارج سازی هسته به روش شیمیایی به تنهایی نمی‌تواند اطمینان کافی از بدون هسته شدن تخمک را فراهم نماید و تنها سبب سهولت در خارج سازی محتویات کروموزومی تخمک می‌گردد.

۳-۴- ***خارج سازی هسته به کمک سانتریفیوژ:*** برخی از محققین تمهیداتی نظیر سانتریفیوژ تخمک قبل از خارج سازی هسته را به کار برده و گزارش نموده‌اند سانتریفیوژ تخمک بدون هیچ تاثیر مضر روی تخمک و جنین حاصله، سبب کاهش زاویه استقرار جسم قطبی (pb) نسبت به صفحه متافازی و افزایش درصد خارج سازی موفق هسته خواهد شد (۴۴،۷۷،۸۰).

Hua و همکاران با مقایسه سرعت‌های مختلف سانتریفیوژ تخمک‌های گاو (*RPM* ۳۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۱۰۰۰) به مدت ۲۰ دقیقه و بررسی تاثیر آن بر روی درصد خارج سازی موفق هسته، درصد جنین‌های ۲ سلولی ۱۶-۸ سلولی، درصد بلاستوسیست و نیز تعداد بلاستومرهای روز ۸، مشخص نمودند که سانتریفیوژ تخمک در دورهای ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ نسبت به دور ۱۰۰۰ و گروه کنترل سبب افزایش معنی‌دار درصد خارج سازی موفق هسته خواهد شد. این محققین زاویه نسبی استقرار جسم قطبی نسبت به صفحه متافازی را با کمک رنگ آمیزی هوخس، به سه گروه زاویه کوچک (کمتر از ۲۰ درجه)، متوسط (۳۰-۲۰ درجه) و بزرگ (۱۸۰-۳۰) تقسیم و گزارش نمودند پس از سانتریفیوژ با سرعت‌های بالا (۲۰۰۰ و ۳۰۰۰) زاویه مذکور در اغلب موارد (۹۰-۸۰٪) ۲۰ درجه و ۳۰-۲۰ درجه خواهد بود و این در حالی است که در سرعت ۱۰۰۰ زاویه استقرار تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشته و زوایای ۱۸۰-۲۰ درجه را نشان داده است (۷۷). در مجموع

1- Epigenetic reprograming
2- Hoechst 33342

Downloaded from http://www.jri.ir

بررسیها نشان داده است سانتریفیوژ تخمک قبل از انتقال هسته هیچ تاثیر مضری بر روی درصد لقاح و روند تکاملی جنین ندارد (۴۳،۷۷).

خارج سازی هسته با استفاده از سوکروز ۳٪: سوکروز به واسطه ایجاد یک ظاهر نیمه شفاف و مات در دوک میتوزی تشخیص دوک تقسیم را زیر میکروسکوپ نوری بسیار راحت‌تر می‌نماید. استفاده از این ترکیب در موش کاربرد بسیار وسیعی یافته است؛ در حالی که در سایر گونه‌ها به دلیل ایجاد برآمدگی‌های متعدد، تشخیص صفحه متافازی مشکل‌تر خواهد بود (۴۴).

اخیراً روش‌های دیگری نیز به منظور خارج سازی هسته مطرح شده است؛ از جمله استفاده از میکروسکوپ POL-Scope (Cambridge Research & Instrumentation; Cri) به منظور مشاهده بهتر و دقیقتر دوک تقسیم، Clone XY Laser System به منظور ایجاد شکاف در لایه زونا پلوسیدا قبل ازخارج سازی هسته و استفاده از پالس‌های متعدد Laser به منظور خرد نمودن کامل کروموزوم (۴۴).

۵- فعال سازی جنین پس از انتقال هسته

در حالت طبیعی بلافاصله پس از لقاح، مجموعه‌ای از وقایع زنجیره‌ای به وقوع می‌پیوندد که نتیجه آنها جلوگیری از پلی اسپرمی و به راه افتادن وقایع آبشاری است که منجر به فعال شدن ژن‌های رونوشت برداری مرتبط با روند تکاملی جنین می‌گردد. فعال شدن جنین روند پیچیده‌ای است که خود شامل مکانیسم‌های متعددی می‌باشد. مهمترین مکانیسم مرتبط با فعال سازی جنین سیگنالینگ کلسیم است. به دنبال لقاح یا وارد نمودن سلول سوماتیک به داخل اووپلاسم، کلسیم به واسطه گیرنده ۵- ۴-۱ تری فسفات[1] از منابع داخل سلولی (عمدتاً شبکه اندوپلاسمی) آزاد و موجی ناگهانی از کلسیم در اووپلاسم شکل می‌گیرد. شکل گیری اول این موج از محل وارد شدن سلول سوماتیک است و سپس این موج در سرتاسر جنین پخش می‌گردد. در اسپرم عاملی به نام پروتئین القاء کننده آبشار کلسیم؛ (COIP)[2] وجود دارد که این پروتئین مسئول فعال سازی تخمک است و کاندیدای اصلی این پروتئین، اعضای خانواده فسفولیپاز C؛ (PLC)[3] می‌باشند. در روند شبیه سازی بسیاری از اعضای این خانواده، غیر فعال هستند و قادر به راه اندازی آبشار کلسیم نمی‌باشند؛ لیکن در صورت تزریق mRNA اعضاء این خانواده به ویژه PLC -Zeta، در زمان انتقال هسته به داخل تخمک، روندی مشابه در جنین به راه می‌افتد. بنابراین در روند فعال سازی جنین شبیه سازی شده تحریک تولید COIP و PLC ضروری به نظر می‌رسد. از طرف دیگر منبع و نحوه آزادسازی کلسیم و الگوی چگونگی شکل گیری موج کلسیم تاثیر به سزایی در نحوه بیان ژنها به خصوص ژن‌های مرتبط با روند تکاملی جنین دارد؛ چرا که شکل گیری موج ضعیف کلسیم داخل سلولی بیان حداقل ۲۰٪ از ژن‌های مسئول روند تکاملی جنین را کاهش می‌دهد و به دنبال کاهش بیان ژن و کاهش mRNA مربوطه، جنین از قابلیت مناسبی در طی نمودن و اتمام روند تکاملی خود برخوردار نخواهد بود. شکل گیری موج بسیار قوی کلسیم نیز می‌تواند تا حدودی الگوی بیان ژنها و رشد بعدی جنین را تحت تاثیر قرار دهد بطوریکه که مشخص شده موج قوی کلسیم می‌تواند

سبب تنظیم عملکرد اعضاء پروتئینی خانواده Bcl-2 و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با روند آپپتوزیس در این بلاستومرهای شبیه سازی شده گردد؛ لیکن اثر مضر آن بسیار کمتر از موج ضعیف است. بنابراین توجه به نحوه فعال سازی جنین و استقرار الگوی مناسب و مختص گونه نه تنها می‌تواند سبب افزایش کیفیت و کمیت جنین‌های شبیه سازی شده گردد؛ بلکه روند تکاملی جنین را تا تولد نتاج زنده بهبود خواهد بخشید (۸۱،۸۲). بررسیها نشان داده است بلافاصله پس از فعال سازی جنین، فعالیت MPF شروع به کاهش می کند به طوریکه ظرف مدت یک ساعت به میزان ۶۳/۲٪ و در عرض دو ساعت به ۳۴/۸٪ می‌رسد و NEBD حاکثر هفت ساعت پس از فعال سازی جنین کامل می‌گردد (۸۵-۸۳).

۱-۵- روشهای فعال سازی جنین: انتخاب روشی مناسب جهت فعال سازی جنین تاثیر بسزایی در روند SCNR و افزایش کیفی و کمی جنین‌های شبیه سازی شده دارد. تاکنون از ترکیبات و روش‌های مختلف به منظور فعال سازی جنین

1- 1,4,5- triphosphate receptor
2- Ca2 oscillation-inducing protein
3- Phospholipase C

Downloaded from http://www.jri.ir

استفاده شده و انتخاب روش فعال‌سازی مناسب بسته به گونه‌حیوانی و شرایط خاص مطالعه متفاوت است. اکثر محققین توصیه نموده‌اند به منظور فعال سازی جنین از ترکیبات مختلف به صورت توام استفاده گردد. روش‌های فعال سازی جنین شامل تحریکات شیمیایی، تحریکات الکتریکی و تحریکات مکانیکی می‌باشد.

۱-۱-۵- اعمال تحریکات شیمیایی: درصد موفقیت در فعال سازی جنین با این روش بستگی به نوع و غلظت ترکیبات شیمیایی استفاده شده و نیز فاصله زمانی بین الحاق سلولها و شروع روند فعال سازی جنین دارد. محققین استفاده از این روش را به منظور فعال سازی جنین تمامی گونه‌ها (به ویژه دام‌های اهلی) توصیه نموده و نشان داده‌اند این روش نسبت به تحریکات الکتریکی سبب افزایش معنی‌دار درصد الحاق و تشکیل پرونوکلئوس می‌گردد. محرک‌های شیمیایی مرسوم به ترتیب اهمیت و کاربرد عبارتند از:

۲-۱-۵- یونومایسین[1] یا یونوفور کلسیم[2] (A23187): 23187 یک ترکیب آنتی‌بیوتیکی است و از آنجائیکه قادر به تشکیل کمپلکس با کاتیونهای دو ظرفیتی (مثل کلسیم) می‌باشد به نام یونوفور کلسیم نامیده می‌شود. این ترکیب مرسوم‌ترین ترکیب شیمیایی استفاده شده به منظور فعال سازی جنین است و موجب تسریع روند تخریب سایکلین B، آزاد سازی کلسیم از ذخایر درون سلولی، تسریع ورود کلسیم به داخل جنین از منابع خارج سلولی، کاهش فعالیت MAPK و MPF و از سرگیری تقسیمات میوز می‌گردد (۳۲،۱۵،۷۱). در تخمک‌های جوان، استفاده از یونوفور به تنهایی به منظور فعال سازی جنین توصیه نمی‌گردد؛ چرا که در این تخمکها به دنبال استفاده از این ترکیب، فعالیت MAPK تغییری نمی‌یابد و تنها کاهش موقت در فعالیت H1 کیناز مشاهده می‌گردد. در حالی که در تخمک‌های مسن فعالیت هر دو کیناز مشخصاً کاهش می‌یابد (۷۱). علیرغم اینکه یونومایسین نسبت به یونوفور کلیسم از قابلیت بیشتری در جابجایی و انتقال کلسیم برخوردار است، لیکن به دلیل تکرارپذیر نبودن موج کلسیم ایجاد شده توسط یونومایسین و ایجاد موج کلسیم از منابع داخل سلولی و نیز عدم وجود تفاوت معنی‌دار در افزایش ناگهانی و سریع کلسیم درون سلولی، کارایی این دو دارو معادل یکدیگر قلمداد می‌گردد (۴۴،۷۸،۸۶،۸۷).

این ترکیبات در بسیاری از گونه‌ها به ویژه گاو ($5\mu M$) به مدت ٤ دقیقه) (۳٤،٤۷،۵۰)، خوک ($5\mu M$) به مدت ۲۰ دقیقه (۸۸)، بز و گوسفند ($5\mu M$) به مدت ۵-۱ دقیقه) (۸۹)، اسب ($5\mu M$) به مدت ٤ دقیقه) (۹۰)، الاغ ($5\mu M$) به مدت ۵ دقیقه) (۹۱) و سگ ($10\mu M$) به مدت ٤ دقیقه) (۹۲) کاربرد وسیعی یافته است.

در اکثر موارد یونوفور کلسیم به همراه یک مهار کننده‌پروتئین کینازهای دفسفوریله کننده (٦-دمتیل آمینوپورین (6-DMAP)[3] و یا سیکلوهگزامید (CHX[4])) (۸٤،۸۸) و یا اتانول[5] (۲۲) استفاده می‌شود. البته تفاوت‌های گونه‌ای نیز در این بین وجود دارد؛ به طوریکه مشخص شده است در گاو و گوسفند استفاده از ترکیب توام یونومایسین و 6-DMAP علیرغم افزایش معنی‌دار درصد الحاق و تشکیل بلاستوسیست، موجب افزایش احتمال وقوع ناهنجاری کروموزومی در جنین می‌گردد. بنابراین در این گونه‌ها ترکیب یونوفور کلسیم با سیکلوهگزامید توصیه می‌گردد (۲۰،۸۷).

۳-۱-۵- مهارکننده‌های پروتئین کینازهای دفسفوریله کننده پروتئینها: استفاده از این ترکیبات موجب تحریک فعال‌سازی تخمک و از سرگیری میوز می‌گردد. زمانی‌که پروتئوگلیکان‌های در برگیرنده غشاء هسته، دفسفوریله می‌شوند غشاء هسته، شکل گرفته و زمانی که فسفوریله می‌گردند غشاء هسته گسسته می‌گردد. از طرف دیگر دفسفوریله شدن پروتئینها موجب فعال شدن MPF و توقف طولانی‌تر تقسیمات میوزی می‌گردد. لذا می‌توان با مهار نمودن این پروتئین کینازها (MPF کیناز، کینازهای میوزین، MLC کیناز و ...) موجبات فعال شدن تخمک و از سرگیری مجدد تقسیم میوز را فراهم نمود. از جمله این مهارکننده‌ها می‌توان به ٦- دمتیل آمینو پورین (6DMAP) و سیکلوهگزامید اشاره نمود.

1- Ionomycine
2- Calcium ionophore (A23187)

3- 6-dimethylaminopurine
4- Cyclohexamide
5- Ethanol

Downloaded from http://www.jri.ir

6-DMAP مهار کننده وسیع‌الطیف سرین پروتئاز است که با مهار روند فسفوریله کردن پروتئین و جلوگیری از دفسفوریله شدن MPF سبب غیرفعال شدن MPF و عبور سلول از مرحله ایست میوزی می‌گردد. در بسیاری از گونه‌ها 6-DMAP از خروج دومین جسم قطبی ممانعت و بدین ترتیب به دنبال القای افزایش کلسیم درون سلولی از آن می‌توان در فعال سازی تخمک بعد از انتقال هسته استفاده نمود (۳۲،۳۵،۷۱،۸۷).

از این ترکیبات می‌توان به منظور فعال نمون تخمک‌های جوان استفاده نمود. تخمک‌های جوان با اینکه کیفیت بسیار خوبی دارند؛ لیکن به‌دلیل فعالیت بالا و مستمر MPF به سختی فعال می‌شوند. در نتیجه می‌توان به منظور فعال سازی آنها، از ترکیب توام یونوماسیون و 6-DMAP استفاده نمود (۱۰،۳۲).

سیکلوهگزامید نیز مهارکننده قوی پروتئین کینازها است. در تمامی گونه‌ها (به جز گاو و گوسفند) مقایسه CHX و 6-DMAP هیچ تفاوت معنی‌داری را در درصد تولید بلاستوسیست، تعداد کلی بلاستومرها و میزان وقوع ناهنجاری‌های کروموزومی در جنین‌های حاصله نشان نمی‌دهد (۱۰،۴۴،۹۳).

۵-۱-۴- اتانول: این ترکیب سبب تحریک ساخت mRNA اینوزیتول ۱، ۴، ۵ – تری فسفات[1]، افزایش ورود کلسیم از منابع خارج سلولی، آزادسازی کلسیم از منابع داخل سلولی، تسریع روند تشکیل پرونوکلئوس و فعال‌سازی موثر جنین (به ویژه در موش، گاو و خوک) می‌گردد. غلظت مرسوم این ترکیب ۸-۷٪ است و معمولاً همراه با مهار کننده‌های پروتئین کینازهای دفسفوریله کننده استفاده می‌گردد (۴۴،۷۱،۸۱،۹۴).

Gaynor و همکاران با مقایسه‌اتانول و یونومایسین گزارش نموده‌اند هیچ تفاوت معنی‌داری در درصد الحاق و تسهیم جنین‌های شبیه‌سازی شده و فعال شده با استفاده از این دو ترکیب وجود ندارد. این محققان با مشاهده عدم تفاوت معنی‌دار در درصد تشکیل مورولا و تولید بلاستوسیست در دو گروه، ترکیبات فوق را دارای پتانسیل کافی و مشابه در روند شبیه سازی عنوان نموده‌اند (۹۵).

Chen و همکاران با بررسی و مقایسه تاثیر دو فعال کننده اتانول و یونومایسین بر قابلیت تکاملی جنین‌های میمون گزارش نموده‌اند، علیرغم عدم وجود تفاوت معنی‌دار در درصد تشکیل پرونوکلئوس‌های نر و ماده، لیکن درصد جنین‌های ۲ سلولی (درصد تسهیم) در گروهی که از اتانول به منظور فعال سازی جنین استفاده شده بود، به طور معنی‌دار بالاتر از گروه یونومایسین بود. البته در این مطالعه تفاوت معنی‌دار در درصد جنین‌های ٤ و ٨ سلولی بین دو گروه گزارش نگردید (٦١).

۵-۱-۵- کلرید استرونتیوم[2] SrCl2: استرونتیوم یک کاتیون دو ظرفیتی (Sr^{2+}) بوده که قادر به آزادسازی متناوب و تدریجی کلسیم از ذخایر درون سلولی به ویژه شبکه‌سارکوپلاسمیک (۷۱،۹۵) و تسریع ورود کلسیم از منابع خارج سلولی بداخل سلول می‌باشد (۹۵). بررسی نوسانات کلسیم درون سلولی نشان داده است الگوی نوسانات ایجاد شده توسط این ترکیب بسیار مشابه نوسانات ایجاد شده به دنبال نفوذ طبیعی اسپرم است. به نظر می‌رسد این ترکیب در غیاب کلسیم خارج سلولی مؤثرتر عمل نماید. استفاده از این ترکیب در موش و همستر کاربرد وسیعی در فعال‌سازی جنین تجدید ساختار داده شده داشته و معمولاً همراه با سایتوشالازین B استفاده می‌گردد (۱۵،۴۴،۸۰،۹۴،۹۶،۹۷،۹۸).

بررسیها نشان داده است در گاو استفاده توام این ترکیب با اتانول سبب فعال سازی پارتنوژنیک تخمک می‌گردد؛ در حالی که همراه با یونومایسین می‌تواند سبب فعال سازی جنین‌های تجدید ساختار داده شده و رسیدن به مرحله بلاستوسیست گردد (۴۴،۸۰،۸۴،۹۹).

۵-۱-۶- Phorbol ester: این ترکیب سبب فعال سازی پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم و فسفولیپید، ایجاد موج کلسیم داخل سلولی و ترغیب تشکیل پرونوکلئوس می‌گردد. این ترکیب در فعال سازی جنین‌های شبیه سازی شده موش کاربرد گسترده‌ای داشته لیکن به دلیل پائین‌تر بودن درصد فعال سازی موثر جنین‌های موش با استفاده از این ترکیب در مقایسه با ترکیبات کاربردی‌تر، استفاده از آن در سایر پستانداران توصیه نمی‌گردد (۸۰).

1- Inositol 1,4,5tri phosphate (Insp3)

2- Strontium chloride (SrCL2)

Downloaded from http://www.jri.ir

۷-۱-۵- *Thimerosal*: یک ترکیب اکسیده کننده گروه سولفیدریل[1] است و سبب افزایش ممتد و پیوسته کلسیم داخل سلولی می‌گردد. استفاده از این ترکیب در گاو کاربرد وسیع تری دارد؛ لیکن به دلیل کوتاه تر بودن مدت زمان موج کلسیم و حداکثر غلظت کلسیمی درون تخمک، کاربرد آن محدودتر از سایر ترکیبات است (۸۰،۱۰۰).

۸-۱-۵- *اعمال تحریکات الکتریکی*: استفاده از تحریکات الکتریکی جایگزین مناسب تحریکات شیمیایی و مرسوم‌ترین روش فعال سازی جنین در تمامی گونه‌های حیوانی به ویژه خوک و گوسفند است. موفقیت این روش وابسته به اندازه و ابعاد منافذ ایجاد شده در غشاء سلول به دنبال اعمال تحریکات الکتریکی و قدرت یونی محیط کشت می‌باشد. مدت زمان اصلاح منافذ ایجاد شده و ترمیم یکپارچگی غشاء به درجه حرارت محیط فعال سازی جنین، سیالیت لیپیدها و جابجایی پروتئین‌های غشاء سلولی بستگی دارد. قدرت و مدت زمان اولین موج ایجاد شده به دنبال اعمال اولین تحریک الکتریکی اساساً وابسته به غلظت یون کلسیم خارج سلولی است. به دنبال اعمال پالس‌های الکتریکی بعدی، ساخت اینوزیتول‌تری فسفات در سلول به شدت تقویت شده و بر قدرت و طول امواج کلسیم درون سلول افزوده می‌شود (۴۴،۱۰۱). متعاقب این تحریکات تغییراتی در الگوی استقرار میتوکندری‌های درون اووپلاسم ایجاد می‌گردد. بدین صورت که ابتدا میتوکندریها در اطراف هسته و نواحی جداری اووپلاسم تجمع یافته و تشکیل دستجات متعدد با اندازه‌های مختلف را می‌دهند. سپس چندین مرکز سازماندهی شده متشکل از میکروتوبولها؛ (MTOC)[2] در اووپلاسم و معمولاً در یک سمت دوک تقسیم شکل می‌گیرد و در نهایت یک یا دو پرونوکلئوس ماده تشکیل می‌شود. شکل گیری این پرونوکلئوسها اساساً مرتبط با میتوکندریها است؛ به طوریکه ارتباط ساختارهای شبه پرونوکلئوس و میتوکندریها در ۴۲٪ جنین‌های تجدید ساختار شده دیده می‌شود (۱۰۱).

بررسیها نشان داده است درصد فعال سازی جنین با استفاده از تحریکات الکتریکی به قدرت میدان الکتریکی و مدت زمان اعمال پالس بستگی دارد (۴۴،۵۵،۷۱،۱۰۲).

برخی محققین تاثیر قدرت پالس جریان مستقیم (DC) بر بازده شبیه سازی را نسبت به تأثیر تعداد دفعات پالس و طول مدت پالس بالاتر دانسته‌اند (۴۴،۱۰۳). این در حالی است که De souse تعداد دفعات پالس را موثرتر می‌داند و گزارش نموده است استفاده از پالس‌های متعدد با قدرت کمتر نسبت به اعمال یک پالس با قدرت بیشتر سبب افزایش معنی‌دار درصد تولید بلاستوسیست می‌گردد (۱۰۲).

Daniel، با بررسی و مقایسه تاثیر قدرت میدان الکتریکی (۱-۱/۵*kv/cm*، ۲-۲/۵، ۳ و بالاتر) بر درصد الحاق سلول‌های کومولوس و فیبروبلاست با تخمک، بهترین ولتاژ را برای این سلولها، ۲-۲/۵*kv/cm* گزارش نموده است. در این مطالعه در تمامی ولتاژها الحاق سلول‌های کومولوس با تخمک به طور معنی‌دار بیشتر از سلول‌های فیبروبلاست گزارش شده است. علل درصد الحاق کمتر سلول‌های فیبروبلاست نسبت به کومولوس را ابعاد کوچکتر این سلولها، ویژگیها و خصوصیات خاص این سلول از جمله وجود منافذ کمتر با قطر کوچکتر در غشاء هسته، ایجاد گرما و جریان آهسته یونی به دنبال اعمال پالس در این سلولها و نیز قرابت بسیار کمتر غشاء سلول‌های فیبروبلاست با غشاء تخمک در مقایسه سلول‌های کومولوس عنوان نموده‌اند (۵۶).

معمولا به دنبال اعمال پالس، استفاده از ترکیبات شیمیایی جهت فعال نمودن جنین‌های تجدید ساختار داده شده ضروری به نظر رسیده و سبب بهبود معنی‌دار درصد تولید بلاستوسیست می‌گردد. بررسی و مقایسه تاثیر توام thimerosal با 6-DMAP و CHX پس از تحریک الکتریکی روی قابلیت تکاملی جنین و میزان وقوع آپپتوزیس نشان می‌دهد که استفاده از ترکیبات شیمیایی فوق پس از اعمال پالس سبب افزایش معنی‌دار تعداد بلاستومرها و در عین حال افزایش وقوع آپپتوزیس در جنین‌های حاصله می‌گردد. همچنین مقایسه زمان‌های مختلف مواجهه جنین با این ترکیبات شیمیایی (قبل از اعمال پالس الکتریکی، بلافاصله پس از اعمال پالس و مواجهه پس از وقفه زمانی چند ساعته) نشان داده است ایجاد وقفه زمانی سبب مواجهه بیشتر و طولانی‌تر هسته سلول منتقل شده با سطح بالای فعالیت MPF درون

1- Sulfhydryl oxidizing
2- Microtubule-organising centre

Downloaded from http://www.jri.ir

سیتوپلاسم تخمک گردیده که این سبب افزایش معنی‌دار احتمال SCNR و تغییر در الگوی رونوشت برداری ژن‌های مرتبط با روند تکاملی جنین (تولید بلاستوسیست) از جمله زیر واحد α1 آنزیم Na/K-ATPase، E-cadherin، Zonula occludens protein-1(ZO-1)، desmocollin II (Dc II)، plakophilin (Plako)، Interferon (IF) و glucose transporter1,3,4 می‌گردد. نتیجه این تغییرات افزایش کیفی و کمی تولید بلاستوسیست شبیه سازی شده است (۹۲،۱۰۴،۱۰۵،۱۰۶).

۹-۱-۵- اعمال تحریکات مکانیکی: یک روش فعال سازی قدیمی است و امروزه کاربرد چندانی به منظور فعال سازی جنین ندارد. از جمله تحریکات مکانیکی می‌توان به مواجهه تخمک با درجه حرارت اتاق قبل از شروع NT اشاره نمود (۸۱).

۶- تغییرات اپی ژنتیک

پس از بررسی تغییرات اپی ژنتیکی صورت گرفته در روند تولید جنین‌های (بلاستوسیست) شبیه سازی شده و مقایسه آن با تحولات صورت گرفته در هسته سلول اسپرم و تخمک پس از لقاح طبیعی، متوجه تشابه بسیار زیاد این تغییرات با یکدیگر خواهیم شد. از جمله مهمترین تغییرات اپی ژنتیکی می‌توان به الگوی متیلاسیون DNA و تغییرات ایجاد شده در پروتئین هیستون (متیلاسیون، استیلاسیون، داستیلاسیون، فسفوریلاسیون، یوبیکویتیناسیون و...) و نقش microRNAs[1] در ژنوم سلول دهنده، اشاره نمود.

به دنبال لقاح و یا ورود هسته سلول سوماتیک به داخل اووپلاسم، گروه متیل باز آلی سیتوزین[2] در نوکلئوتید CpG برداشته شده و سیتوزین غیرمتیله جایگزین ۵- متیل سیتوزین[3] می‌گردد. مجدداً پس از رسیدن جنین به مرحله ۸ سلولی و مراحل بعدی، متیلاسیون مجدد ژنوم صورت گرفته و مجدداً ۵- متیل سیتوزین تشکیل می‌گردد. این الگوی متیله و دمتیله شدن ژنوم نقش بسیار مهمی در تعیین توانمندی جنین برای عبور از مرحله توقف سلولی دارد. تفاوت این الگو در لقاح و یا SCNT در میزان متیلاسیون ژنوم است. به طوریکه در لقاح طبیعی میزان متیله شدن هسته اسپرم و تخمک، قبل از لقاح بسیار بیشتر از متیل شدن هسته سلول سوماتیک پس از انتقال می‌باشد (۱۰۷) و همین موضوع می‌تواند یکی از علل پایین بودن بازده تولید جنین شبیه سازی شده نسبت به لقاح طبیعی باشد.

از طرف دیگر میزان متیلاسیون لیزین ٤ هیستون ٣ (H3K4[4]) و نیز لیزین‌های ۹ و ۲۷ هیستون ۳ (H3K9[5]، H3K27[6]) و همچنین استیله شدن آنها در روند SCNR بسیار تاثیرگذار بوده به طوریکه هایپومتیله شدن و یا دمتیله شدن سیتوزین نوکلئوتید CpG و لیزین پروتئین هیستون سبب افزایش مشخص و معنی‌دار ظرفیت تکاملی جنین و افزایش درصد تولید بلاستوسیست می گردد. استفاده از سلول‌هایی که اساساً دارای ژنوم هایپومتیله می‌باشند نیز سبب افزایش مشخص بازده SCNT خواهد شد (۶۸،۱۰۷،۱۰۸). از طرفی مشخص شده است که استفاده از آلل‌های هایپومورفیک DNA- متیل ترانسفراز I[7]، بدلیل هایپومتیله بودن ژنوم سلول‌های سوماتیک (تمایز یافته)، سبب افزایش مشخص میزان تولید مورولا و بلاستوسیست شبیه سازی شده می‌گردد (٦٨).

از طرف دیگر افزایش میزان استیله شدن هیستون به خصوص هیستون ۳ در انجام موفقیت آمیز روند SCNR و درصد تولید بلاستوسیست‌های شبیه سازی شده بسیار تاثیرگذار است. به طوریکه مشخص شده است اضافه شدن گروه استیل به لیزین ۹ هیستون ۳ (AcH3K9)[8] و نیز به لیزین‌های ۹ و ١٤ هیستون ۳ به طور همزمان (AcH3K9-K14)[9] و نیز به لیزین ٥ هیستون ۳ (AcH3K5)[10] سبب تحریک روند تکاملی جنین و رسیدن جنین به مرحله بلاستوسیست می‌گردد. در حالیکه داستیله شدن و یا هایپواستیله شدن آنها منجر به توقف روند تکاملی تقسیمات

1- Nouncoding RNA
2- Cytosine
3- 5-methyl cytosine

4- Histone H3 at lysines 4
5- Histone H3 at lysines 9
6- Histone H3 at lysines 27
7- DNA methyltransferase I
8- Acetylation on lysine 9 of histone 3 (AcH3K9)
9- Acetylation on lysines 9 and 14 of histone 3(AcH3K9/K14)
10- Acetylation on lysine 5 of histone 3 (AcH3K5)

Downloaded from http://www.jri.ir

جنین در مرحله چند سلولی می‌گردد (۱۰۸). میزان استیله و متیله شدن بیشتر از آن که تحت تاثیر نوع سلول، سیکل سلولی و تعداد پاساژهای سلول دهنده باشد، به کیفیت اووپلاسم و یکپارچگی آن بستگی دارد (۱۶،۱۰۶،۱۰۷).

تغییرات اپی ژنتیکی مذکور (الگوی استیله شدن هیستون و متیله شدن هسته سلول دهنده) علاوه بر وراثت پذیر بودنشان، به دلیل نقش برجسته آنها در تنظیم فعالیت ژن‌های سلول‌های یوکاریوتیک از اهمیت به سزایی در کسب موفقیت در SCNR برخوردار هستند. به طوریکه محققین میزان متیله شدن و یا استیله شدن هسته سلول سوماتیک را به عنوان شاخص اپی ژنتیکی روند شبیه سازی معرفی نموده و علل اصلی پایین بودن بازده SCNR، SCNT و وقوع بالای ناهنجاری‌های کروموزومی را در متعادل نبودن تغییرات اپی ژنتیکی سلول دهنده و عدم برنامه‌ریزی اپی‌ژنتیکی مناسب می‌دانند. به عبارتی پس از انتقال سلول سوماتیک، شاخص‌های اپی ژنتیکی سلول دهنده به عنوان یک سلول کاملاً تمایز یافته باید حذف و الگوی جدیدی از شاخص‌های اپی ژنتیک در جنین تجدید ساختار داده شده، با ویژگی پرتوانی، شکل گیرد (۴۴،۶۸). بنابراین شناخت دقیق این شاخصها و درک صحیح روش‌های کنترلی و تنظیمی آنها می‌تواند معیار انتخابی بسیار دقیقی جهت انتخاب سلول سوماتیک مناسب جهت انتقال و هدایت این سلول به سمت سازماندهی مجدد و تولید جنینی با کیفیت بالا باشد (۴۴،۴۹،۶۸،۱۰۸).

با توجه به اهمیت و نقش ترانس کریپتها و پروتئین‌های موجود در سیتوپلاسم تخمک مرحله MII در حمایت از تقسیمات جنینی تا مرحله فعال شدن ژنوم جنینی (Embryionic genomic activation; EGA) و نیز قابلیت سیتوپلاسم تخمک مرحله MII در القای برنامه ریزی مجدد هسته سلول سوماتیک (reprogramming) و همزمانی EGA و کاهش مشخص ترانس کریپت‌های با منشا مادری، reprogramming هسته سلول سوماتیک مبتنی بر تغییرات اپی ژنتیک می بایست همزمان با شروع EGA تکمیل شده باشد. معهذا از آنجائیکه الگوی تغییرات اپی‌ژنتیک در طی روند تکاملی جنین در مراحل قبل از لانه گزینی از وضعیت دینامیکی برخوردار بوده، اتخاذ روش‌های درمانی در القای برنامه ریزی مجدد هسته می‌بایست از الگوی این تغییرات در جنین‌های طبیعی تبعیت نماید.

۱-۶- ایجاد تغییرات اپی‌ژنتیک در جهت حمایت از شاخص‌های اپی ژنتیک: ترکیبات مختلفی به منظور تغییر در الگوی اپی ژنتیک سلول‌های سوماتیک در جهت حمایت از تغییرات مناسب اپی‌ژنتیک مطرح و مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

۱-۱-۶- تریکوستاتین A (TSA)[1]: TSA یک عامل تغییر دهنده کروماتین است که سبب هایپراستیله شدن هیستون و دمتیله شدن DNA می‌گردد. به دنبال تغییرات ساختاری ایجاد شده در کروماتین متعاقب استفاده از این ترکیب، وقایعی نظیر بهبود و تسریع روند SCNR، تقویت بیان ترانسژن، افزایش بیان ژن‌های آندوژن مرتبط با رونوشت برداری و نیز ژن‌های جنینی به ویژه در مرحله قبل از مرحله لانه گزینی، رخ خواهد داد.

بررسیها نشان داده است مجاورت سلول‌های دهنده با این ترکیب قبل از انتقال نه تنها سبب تسریع و تشدید روند باز شدن کروماتین، افزایش حجم هسته جنین‌های شبیه سازی شده ومتعاقب آن افزایش معنی‌دار میزان استیله شدن لیزین‌های۲۷، ٤، ۹ و ١٤ هیستون ۳ (H3K14, H3K27, H3K4, H3K9) و لیزین ٥ و ١٦هیستون ٤ (H4K16, H4K5) می‌گردد، بلکه موجب مهار آنزیم‌های داستیله کننده هیستون (HDACs)[2] در سلول‌های سوماتیک، افزایش بیان ژن‌های مرتبط با روند تکاملی جنین، کاهش بیان ژن‌های مرتبط با متیلاسیون DNA، افزایش بیان ژن‌های OCT4, Nanog, SOX2 و cMYC در بلاستوسیست، افزایش میزان تولید بلاستوسیست، افزایش مشخص تعداد بلاستومرهای جنین‌های شبیه سازی شده و افزایش درصد آبستنی و زایمان موفق خواهد شد. آنزیم‌های HDACs نقش بسیار مهمی در تغییر ساختار کروماتین، کنترل مدت زمان بقای سلول، کنترل روند سیکل سلولی و روند شکل گیری تومور دارند (۴۴،۶۸،۱۰۸،۱۰۹،۱۱۰،۱۱۱،۱۱۲،۱۱۳).

1- Trichostatin A
2- Histon deadetylase (HDACs)

Downloaded from http://www.jri.ir

بررسی Shahper و همکاران با اشاره به نقش این آنزیمها در اصلاح و ترمیم نواحی آسیب دیده زنجیره دوتایی DNA، نشان داده است که جنین‌های موش فاقد آنزیم HDAC1 تا قبل از روز ۱۰/۵ آبستنی به علت نقایص تکاملی شدید و تاخیر در رشد سقط می‌گردند. همچنین جنین‌های موش‌های آبستن فاقد HDAC3 نیز به علت عدم پیشرفت سیکل سلولی از فاز S و آسیب‌های شدید DNA تا قبل از روز ۹/۵ آبستنی سقط می‌شوند (۱۱٤).

به نظر استفاده از TSA به عنوان یک ترکیب مهارکننده HDACs به واسطه تنظیم فعالیت آنزیم‌های دخیل در تغییرات اپی ژنتیکی سلول، موجب حذف شاخص‌های اپی ژنتیکی سلول‌های سوماتیک و تغییر آنها به شاخص‌های اپی ژنتیکی موثر در روند تکاملی جنین می‌گردد و بدین ترتیب سلول سوماتیک قابلیت سازماندهی مجدد و برگشت به وضعیت پرتوانی خود را به دست می‌آورد و قادر خواهد بود جنین شبیه سازی شده‌ای با تمامی سلولها و ارگان‌های طبیعی تولید نماید. دستکاری شاخص‌های اپی ژنتیکی رمز موفقیت در SCNR،SCNT و تولید سلول‌های iPS[1] است (۹۲).

غلظت معمول TSA در نشخوار کنندگان اهلی ۱/۲۵μM می‌باشد. غلظت‌های بالاتر این ترکیب موجب آسیب کروموزومی (شکسته شدن کروماتین)، افزایش توقف سلولی، مهار روند تکاملی جنین و افزایش احتمال وقوع آپوپتوزیس و غلظت‌های پایین‌تر سبب تغییر ظاهر مورفولوژیک سلول‌های سوماتیک خواهد شد (۱۵).

۲-۱-۶- پنج آزا داکسی سیتیدین؛ 5-aza-dC[2]: این ترکیب مهارکننده DNA متیل ترانسفراز (DNAmt) است و مجاورت سلول‌های سوماتیک قبل از انتقال، با این ترکیب موجب دمتیله شدن و یا هایپومتیله شدن DNA می‌گردد. Campbell و همکاران معتقدند استفاده از این ترکیب سبب بهبود بازده SCNT می‌گردد؛ در حالی که سایر محققین کاهش مشخص درصد تولید بلاستوسیست‌های شبیه سازی شده را با استفاده از این ترکیب گزارش نموده‌اند (۱۵،٤٤،٤۹). استفاده طولانی مدت از این ترکیب حتی در دوزهای پایین سبب هایپومتیله شدن شدید و کاهش بیان ژن‌های اصلی روند تکاملی جنین می‌گردد. غلظت معمول این ترکیب در نشخوارکنندگان μM ۵-۱ است. غلظت‌های بالاتر آن سایتوتوکسیک می‌باشد (۱۵).

۳-۱-۶- افزودن عصاره سیتوپلاسمی سلولهای سوماتیک: افزودن عصاره برخی سلول‌های سوماتیک به محیط کشت سلول سوماتیک و جنین، به ویژه در مورد سلول‌هایی که روند تقسیمات میتوزی آنها متوقف گردیده می‌تواند منجر به تسریع PCC و بهبود SCNR گردد (٤۹،٦۸).

۴-۱-۶- افزودن محتویات سیتوپلاسمی تخمک: اضافه نمودن محتویات سیتوپلاسمی تخمک دوزیستان به محیط کشت جنین شبیه سازی شده، منجر به فعال و یا غیر فعال شدن برخی ژن‌های سلول‌های سوماتیک پستانداران و سازماندهی و برنامه ریزی مجدد هسته این سلولها پس از انتقال می‌گردد. Campbell و همکاران نشان داده‌اند افزودن عصاره این تخمکها منجر به بیان ژن OCT4 (فاکتور رونوشت برداری سلول‌های پرتوان مانند ESC) و افزایش mRNA مربوط به آن در جنین، تسریع روند SCNR، تجزیه سریعتر هستکها، تغییر لامینای هسته، تغییر در الگو و میزان استیلاسیون DNA و افزایش استیله شدن هیستون ۳ و افزایش درصد تولید بلاستوسیست می‌گردد (٤٤). همچنین افزودن عصاره تخم Xenopus Laevis سبب تغییر در الگوی رونوشت برداری ژنها و مهار سایکلین کیناز ۲ شده و این تغییرات منجر به افزایش قابلیت SCNR و درصد بقای جنین‌های شبیه سازی شده می‌گردد (۳۵).

۵-۱-۶- MG132 و کافئین: افزودن این ترکیبات به محیط کشت جنین، بدون داشتن هرگونه تاثیر مضر بر روند تکاملی جنین، از فعال شدن خودبه‌خودی تقسیمات جنینی جلوگیری کرده و سبب افزایش کیفیت و کمیت بلاستوسیست و افزایش تولد نتاج زنده خواهد شد. کافئین یک مهار کننده غیراختصاصی فسفاتاز است و افزودن این ترکیب به محیط کشت جنین نه تنها سبب افزایش معنی‌دار درصد تسهیم و میزان MPF و MAPK اووپلاسم می‌گردد؛ بلکه از کاهش شدید این پروتئین کینازها پس از رسیدن تخمک به مرحله MII جلوگیری کرده و کاهش آنها را به تعویق می‌اندازد.

1- Induced Pluripotent Stem Cell
2- 5-aza-deoxy cytidine (5-aza-dC)

Downloaded from http://www.jri.ir

MG132 نیز مهارکننده پروتئوزوم است و افزودن آن به محیط کشت سلول‌های دهنده هسته و تخمک سبب بهبود مشخص SCNR و جلوگیری از فعال شدن خود به خودی تخمک، تسریع روند تکاملی جنین، افزایش کیفیت و کمیت بلاستوسیست و تولد نتاج زنده خواهد شد (۴۶،۴۹،۱۱۵،۱۱۶). استفاده از این ترکیبات در روند شبیه‌سازی موش، خوک و میمون و رت به منظور افزایش کارایی SCNT توصیه می‌شود (۴۹).

۶-۱-۶- سدیم بوتیرات: (***NaBu***)[1]: این ترکیب موجب مهار داستیله شدن هیستون می‌گردد و افزودن این ترکیب به محیط کشت سلول سوماتیک سبب بهبود روند SCNR و افزایش مشخص کیفیت و کمیت بلاستوسیست‌های شبیه سازی شده می‌شود (۱۰۴،۱۰۸).

تمامی ترکیبات فوق با تغییر در الگوی تغییرات اپی ژنتیک سبب حذف شاخص‌های اپی ژنتیکی سلول سوماتیک و تغییر در الگوی بیان ژنها گردیده به گونه‌ای که سلول تا حد امکان ویژگی همه توانی خود را باز یافته و بدین ترتیب قابلیت و توان SCNR در روند SCNT افزایش می‌یابد.

۷- هتروپلاسمی میتوکندریایی

یکی از علل پایین بودن درصد موفقیت و بازده SCNT، هتروپلاسمی میتوکندریایی است. برخلاف لقاح طبیعی که در آن DNA میتوکندریایی اساساً منشأ مادری داشته و میتوکندری‌های اسپرم کاملاً تخریب می‌شوند، در روند شبیه سازی ژن‌های میتوکندریایی سلول دهنده با همان حجم بسیار پایین سیتوپلاسم وارد اووپلاسم شده، غشاء پلاسمایی میتوکندریها طی وقایع سیتوپلاسمی شکسته شده و DNA میتوکندریایی سلول دهنده با DNA میتوکندریایی تخمک مخلوط می‌گردد (۱۱۶). در نتیجه جنین شبیه‌سازی شده دچار هتروپلاسمی میتوکندریایی می شود. از این رو حیوان شبیه‌سازی شده کاملاً از نظر ژنتیکی مشابه حیوان دهنده سلول سوماتیک نمی‌باشد.

از آنجائیکه میتوکندریها دارای نقش بسیار مهمی در تأمین انرژی سلول، سیگنالینگ، برنامه ریزی زمان آپپتوزیس سلول و کنترل روند تکاملی جنین و فتوس می‌باشند، به نظر می‌رسد هرگونه آشفتگی و ناهمگونی میتوکندریایی سبب کاهش عملکرد میتوکندریها، متابولیسم ناقص آنها و کاهش مشخص بازده SCNT می‌گردد (۱۱۷). البته این بدان معنا نیست که هتروپلاسمی میتوکندریایی علت اصلی پایین بودن بازده شبیه سازی است، چرا که در گربهٔ وحشی و اهلی آفریقایی که به طور طبیعی دارای هتروپلاسمی میتوکندریها می‌باشند، رشد و تولیدمثل طبیعی و باروری موفق دیده می‌شود (۱۰۸).

نتیجه گیری

در مجموع انتظار می‌رود با ارتقاء دانش فنی و تئوری در تمامی ابعاد شبیه سازی از جمله به حداقل رساندن آسیب‌های فیزیکی به ساختار سایتواسکلتال تخمک در زمان خارج سازی هسته، به حداکثر رسانیدن همزمانی هسته سلول دهنده با سیتوپلاسم تخمک گیرنده، و نیز القای کمی و کیفی تغییرات اپی ژنتیک در جهت ایجاد شرایط همه توانی در هسته سلول دهنده از طریق حذف وضعیت اپی ژنتیک قبلی سلول سوماتیک و اعمال تغییرات اپی ژنتیک جدید و بهبود شرایط reprogramming، بتوان بازدهی روند شبیه سازی را در جهت تولید حیوانات با قابلیت حیاتی بالا و تولید مثل موثر به حداکثر رسانید. مع‌الوصف هر گونه انحراف از الگوی طبیعی بیان ژنها بواسطه کاربرد ترکیبات شیمیایی در جنین مرحله قبل از لانه گزینی، می تواند نتایج نامطلوبی را در مراحل تکاملی جنینی و حتی مراحل پس از تولد بدنبال داشته باشد. بدیهی است با ارتقا کیفی این فناوری، سایر علوم و فناوری‌های مرتبط از قبیل تولید حیوانات تراریخته و دسترسی به فرآورده‌های بیولوژیک حاصله، ابقای گونه‌های جانوری در معرض خطر انقراض و بعضاً امکان احیای گونه‌های جانوری منقرض شده و نهایتاً امکان انجام شبیه سازی بین گونه‌ای با اهداف عدیده به‌ویژه در راستای شبیه سازی درمانی در انسان، به نحو شایسته‌ای متأثر خواهد شد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از تمامی محققین عرصه زیست شناسی تکوینی و شبیه سازی به دلیل تلاشها و یافته‌های علمی ایشان و

1- Sodium Butyrate (NaC3H7COO)

Downloaded from http://www.jri.ir

قدردانی از زحمات تیم شبیه سازی پژوهشکده فناوری جنـین دام دانشگاه شهرکرد.

References

1. Campbell K, McWhir J, Ritchie B, Wilmut I. Production of live lambs following nuclear transfer of cultured embryonic disc cells. Theriogenology. 1995;43 (1):181.
2. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature. 1997;385(6619):810-3.
3. Beyhan Z, Iager AE, Cibelli JB. Interspecies nuclear transfer: implications for embryonic stem cell boilogy. Cell Stem Cell. 2007;1(5):502-12.
4. Mastromonaco GF, Favetta LA, Smith LC, Filion F, King WA. The influence of nuclear content on developmental competence of gaur x cattle hybrid in vitro fertilized and somatic cell nuclear transfer embryos. Biol Reprod. 2007;76(3):514-23.
5. Roh S, Yoon JT. Production of HanWoo (Bos taurus coreanae) fetuses following interbreed somatic cell nuclear transfer. J Vet Med Sci. 2001;63(9):945-8.
6. Li Y, Dai Y, Du W, Zhao C, Wang L, Wang H, et al. In vitro development of yak (Bos grunniens) embryos generated by interspecies nuclear transfer. Anim Reprod Sci. 2007;101(1-2):45-59.
7. Meirelles FV, Bordignon V, Watanabe Y, Watanabe M, Dayan A, Lôbo RB, et al. Complete replacement of the mitochondrial genotype in a Bos indicus calf reconstructed by nuclear transfer to a Bos taurus oocyte. Genetics. 2001;158(1):351-6.
8. Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka J Jr, Cappai P, Clinton M. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. Nat Biotechnol. 2001;19(10):962-4.
9. Gómez MC, Pope CE, Giraldo A, Lyons LA, Harris RF, King AL, et al. Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. Cloning Stem Cells. 2004;6(3):247-58.
10. Jang G, Kim MK, Lee BC. Current status and applications of somatic cell nuclear transfer in dogs. Theriogenology. 2010;74(8):1311-20.
11. Oh HJ, Fibrianto YH, Kim MK, Jang G, Hossein MS, Kim HJ, et al. Effects of canine serum collected from dogs at different estrous cycle stages on in vitro nuclear maturation of canine oocytes. Zygote. 2005;13(3):227-32.
12. Bousquet D, Blondin P. Potential uses of cloning in breeding schemes: dairy cattle. Cloning Stem Cells. 2004;6(2):190-7.
13. Ng SC, Chen N, Yip WY, Liow SL, Tong GQ, Martelli B, et al. The first cell cycle after transfer of somatic cell nuclei in a non-human primate. Development. 2004;131(10):2475-84.
14. Cho J, Bhuiyan MM, Shin S, Park E, Jang G, Kang S, et al. Development potential of transgenic somatic cell nuclear transfer embryos according to various factors of donor cell. J Vet Med Sci. 2004;66 (12):1567-73.
15. Tian XC, Kubota C, Enright B, Yang X. Cloning animals by somatic cell nuclear transfer--biological factors. Reprod Biol Endocrinol. 2003;1:98.
16. Hodges CA, Stice SL. Generation of bovine transgenics using somatic cell nuclear transfer. Reprod Biol Endocrinol. 2003;1:81.
17. Kim TM, Park TS, Shin SS, Han JY, Moon SY, Lim JM. An interclass nuclear transfer between fowl and mammal: in vitro development of chicken-to-cattle interclass embryos and the detection of chicken genetic complements. Fertil Steril. 2004;82 (4):957-9.
18. Verma PJ, Trounson AO. Nuclear Transfer Protocols, Cell Reprogramming and Transgenesis. Totowa: Humana Press; 2006. p. 169.
19. Booth PJ, Viuff D, Tan S, Holm P, Greve T, Callesen H. Numerical chromosome errors in day 7 somatic nuclear transfer bovine blastocysts. Biol Reprod. 2003;68(3):922-8.
20. Spemann H. Embryonic development and induction. New York: Yale University Press; 1938. p. 401.
21. Gao S, Chung YG, Williams JW, Riley J, Moley K, Latham KE. Somatic cell-like features of cloned mouse embryos prepared with cultured myoblast nuclei. Biol Reprod. 2003;69(1):48-56.
22. Kühholzer B, Tao T, Machaty Z, Hawley RJ, Greenstein JL, Day BN, et al. Production of transgenic porcine blastocysts by nuclear transfer. Mol Reprod Dev. 2000;56(2):145-8.
23. Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M, et al. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(3):990-5.
24. Reggio BC, James AN, Green HL, Gavin WG, Behboodi E, Echelard Y, et al. Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goat: oocytes derived from both follicle-stimu-

Downloaded from http://www.jri.ir

lating hormone-stimulated and nonstimulated abattoir-derived ovaries. Biol Reprod. 2001;65(5):1528-33.

25. Koo DB, Kang YK, Choi YH, Park JS, Kim HN, Oh KB, et al. Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. Biol Reprod. 2002;67(2):487-92.
26. Hill JR, Winger QA, Long CR, Looney CR, Thompson JA, Westhusin ME. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. Biol Reprod. 2000;62(5):1135-40.
27. Mullins LJ, Wilmut I, Mullins JJ. Nuclear transfer in rodents. J Physiol. 2004;554(Pt 1):4-12.
28. Mello MR, Caetano HV, Marques MG, Padilha MS, Garcia JF, Milazzotto MP, et al. Production of a cloned calf from a fetal fibroblast cell line. Braz J Med Biol Res. 2003;36(11):1485-9.
29. Wells DN, Laible G, Tucker FC, Miller AL, Oliver JE, Xiang T, et al. Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. Theriogenology. 2003;59(1):45-59.
30. Stice SL, Strelchenko NS, Keefer CL, Matthews L. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. Biol Reprod. 1996;54(1):100-10.
31. Wells DN, Misica PM, Day TA, Tervit HR. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between in vivo- and in vitro matured cytoplasts. Biol Reprod. 1997;57(2):385-93.
32. Reggio BC. Production of transgenic goats by somatic cell nuclear transfer [dissertation]. [Louisiana]: The Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College; 2002. 153 p.
33. Smith LC, Wilmut I. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. Biol Reprod. 1989;40(5):1027-35.
34. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. Science. 1998;280(5367):1256-8.
35. Heidari B, Shirazi A, Tajic P, Ahmadi E, Nazari H, Shams-Esfandabadi N, et al. Effect of donor cell age on development of ovine nuclear transfer embryos in vitro. Zygote. 2010;18(4):331-8.
36. McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. Nature. 2000;405(6790):1066-9.
37. Zalokar M. Transplantation of nuclei into the polar plasm of Drosophila eggs. Dev Biol. 1973;32(1):189-93.
38. Hosseini SM, Moulavi F, Foruzanfar M, Hajian M, Abedi P, Rezazade-Valojerdi M, et al. Effect of donor cell type and gender on the efficiency of in vitro sheep somatic cell cloning. Small Rumin Res. 2008;78(1-3):162-8.
39. Forsberg EJ, Strelchenko NS, Augenstein ML, Betthauser JM, Childs LA, Eilertsen KJ, et al. Production of cloned cattle from in vitro systems. Biol Reprod. 2002;67(1):327-33.
40. Willadsen SM. The viability of early cleavage stages containing half the normal number of blastomeres in the sheep. J Reprod Fertil. 1980;59(2):357-62.
41. 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(5396):2095-8.
42. Liu JL, Sung LY, Barber M, Yang X. Hypertonic medium treatment for localization of nuclear material in bovine metaphase II oocytes. Biol Reprod. 2002;66(5):1342-9.
43. Cheong HT, Ikeda K, Martinez Diaz MA, Katagiri S, Takahashi Y. Development of reconstituted pig embryos by nuclear transfer of cultured cumulus cells. Reprod Fertil Dev. 2000;12(1-2):15-20.
44. Campbell KH, Fisher P, Chen WC, Choi I, Kelly RD, Lee JH, et al. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. Theriogenology. 2007;68 Suppl 1:S214-31.
45. Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature. 1998;394(6691):369-74.
46. Zhou Q, Jouneau A, Brochard V, Adenot P, Renard JP. Developmental potential of mouse embryos reconstructed from metaphase embryonic stem cell nuclei. Biol Reprod. 2001;65(2):412-9.
47. Wells DN, Misica PM, Tervit HR. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. Biol Reprod. 1999;60(4):996-1005.
48. Keefer CL, Keyston R, Lazaris A, Bhatia B, Begin I, Bilodeau AS, et al. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. Biol Reprod. 2002;66(1):199-203.

Downloaded from http://www.jri.ir

49. Mitalipov SM, Zhou Q, Byrne JA, Ji WZ, Norgren RB, Wolf DP. Reprogramming following somatic cell nuclear transfer in primates is dependent upon nuclear remodeling. Hum Reprod. 2007;22(8):2232-42.
50. Kato Y, Tani T, Tsunoda Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. J Reprod Fertil. 2000;120 (2):231-7.
51. Kasinathan P, Knott JG, Wang Z, Jerry DJ, Robl JM. Production of calves from G1 fibroblasts. Nat Biotechnol. 2001;19(12):1176-8.
52. Ekholm SV, Reed SI. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. Curr Opin Cell Biol. 2000;12(6):676-84.
53. Nishitani H, Lygerou Z. Control of DNA replication licensing in a cell cycle. Genes Cells. 2002;7(6): 523-34.
54. Tomii R, Kurome M, Wako N, Ochiai T, Matsunari H, Kano K, et al. Production of cloned pigs by nuclear transfer of preadipocytes following cell cycle synchronization by differentiation induction. J Reprod Dev. 2009;55(2):121-7.
55. Campbell KH. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. Cloning. 1999;1(1):3-15.
56. Daniel SM, Raipuria P, Sarkhel BC. Efficiency of cloned embryo production using different types of cell donor and electric fusion strengths in goats. Small Rumin Res. 2008;77(1):45-50.
57. Gibbons J, Arat S, Rzucidlo J, Miyoshi K, Waltenburg R, Respess D, et al. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. Biol Reprod. 2002;66(4):895-900.
58. Yang X, Cheng T, Sung LY, Gao S, Shen H, Yu H, et al. Reply to "On the cloning of animals from terminally differentiated cells". Nat. Genet. 2007;39 (2):137-138.
59. Kasinathan P, Knott JG, Wang Z, Jerry DJ, Robl JM. Production of calves from G1 fibroblasts. Nat Biotechnol. 2001;19(12):1176-8.
60. Tatham BG, Dowsing AT, Trounson AO. Enucleation by centrifugation of in vitro-matured bovine oocytes for use in nuclear transfer. Biol Reprod. 1995;53(5):1088-94.
61. Markert CL, Petters RM. Manufactured hexaparental mice show that adults are derived from three embyronic cells. Science. 1978;202(4363):56-8.
62. Chen N, Liow SL, Yip WY, Tan LG, Tong GQ, Ng SC. Early development of reconstructed embryos after somatic cell nuclear transfer in a non-human primate. Theriogenology. 2006;66(5):1300-6.
63. Fluckiger AC, Marcy G, Marchand M, Négre D, Cosset FL, Mitalipov S, et al. Cell cycle features of primate embryonic stem cells. Stem Cells. 2006;24 (3):547-56.
64. Miranda Mdos S, Bressan FF, Zecchin KG, Vercesi AE, Mesquita LG, Merighe GK, et al. Serum-starved apoptotic fibroblasts reduce blastocyst production but enable development to term after SCNT in cattle. Cloning Stem Cells. 2009;11(4):565-73.
65. Takeuchi T, Ergün B, Huang TH, Rosenwaks Z, Palermo GD. A reliable technique of nuclear transplantation for immature mammalian oocytes. Hum Reprod. 1999;14(5):1312-7.
66. Shirazi A, Shams-Esfandabadi N, Ahmadi E, Heidari B. Effects of growth hormone on nuclear maturation of ovine oocytes and subsequent embryo development. Reprod Domest Anim. 2010;45(3):530-6.
67. Willadsen SM. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. Nature. 1979;277(5694):298-300.
68. Campbell KH, Alberio R. Reprogramming the genome: role of the cell cycle. Reprod Suppl. 2003; 61:477-94.
69. Ware CB, Barnes FL, Maiki-Laurila M, First NL. Age dependence of bovine oocyte activation. Gamete Res. 1989;22(3):265-75.
70. Karja NW, Otoi T, Wongsrikeao P, Shimizu R, Murakami M, Agung B, et al. Effects of electric field strengths on fusion and in vitro development of domestic cat embryos derived by somatic cell nuclear transfer. Theriogenology. 2006;66(5):1237-42.
71. Shirazi A, Bahiraee A, Ahmadi E, Nazari H, Heidari B, Borjian S. The effect of the duration of In Vitro Maturation (IVM) on parthenogenetic development of ovine oocytes. Avicenna J Med Biotechnol. 2009;1(3):113-8.
72. Rizos D, Burke L, Duffy P, Wade M, Mee JF, O'Farrell KJ, et al. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production in vitro. Theriogenology. 2005;63(3):939-49.
73. Mermillod P, Le Bourhis D, Lonergan P, Khatir H, Heyman Y. Assessment of cytoplasmic competence of prepubertal calf oocytes by use of nuclear transfer. Theriogenology. 1998;49(1):187.
74. Dominko T, Mitalipova M, Haley B, Beyhan Z, Memili E, McKusick B, et al. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from vari-

Downloaded from http://www.jri.ir

ous mammalian species. Biol Reprod. 1999;60(6): 1496-502.

75. Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. Biol Reprod. 2001;64(1):324-30.
76. Gurdon JB. Genetic reprogramming following nuclear transplantation in Amphibia. Semin Cell Dev Biol. 1999;10(3):239-43.
77. Campbell KH, Loi P, Otaegui PJ, Wilmut I. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. Rev Reprod. 1996;1(1):40-6.
78. Hua S, Zhang Z, Zhang C, Zhang Y. An improved enucleation method of bovine somatic cell nuclear transfer. J Genet Genomics. 2007;34(6):491-6.
79. Costa-Borges N, Paramio MT, Santaló J, Ibáñez E. Demecolcine- and nocodazole-induced enucleation in mouse and goat oocytes for the preparation of recipient cytoplasts in somatic cell nuclear transfer procedures. Theriogenology. 2011;75(3):527-41.
80. George A, Shah RA, Sharma R, Palta P, Singla SK, Manik RS, et al. Activation of zona-free buffalo (Bubalus bubalis) oocytes by chemical or electrical stimulation, and subsequent parthenogenetic embryo development. Reprod Domest Anim. 2010. [Epub ahead of print]
81. Mtango NR, Potireddy S, Latham KE. Oocyte quality and maternal control of development. Int Rev Cell Mol Biol. 2008;268:223-90.
82. Samiec M. The Bcl-2 family proteins and calcium signaling in mammalian embryos generated by somatic cell cloning. Biotechnologia. 2010;1:66-81.
83. Yong Z, Yuqiang L. Nuclear-cytoplasmic interaction and development of goat embryos reconstructed by nuclear transplantation: production of goats by serially cloning embryos. Biol Reprod. 1998;58 (1):266-9.
84. Vignon X, Lebourhis D, Chesne P, Marchal J, Heyman Y, Renard JP. Development of bovine nuclear transfer embryos reconstituted with quiescent and proliferative skin fibroblasts. Theriogenology. 1999; 51(1):216.
85. Samiec M. Calcium signal transduction in reconstructed oocytes and somatic cell nuclear transfer embryos of mammals in the conditions of artificial activation. Biotechnologia. 2010;1:46-65.
86. Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. Science. 1997;278 (5346):2130-3.
87. Shirazi A, Ostad-Hosseini S, Ahmadi E, Heidari B, Shams-Esfandabadi N. In vitro developmental competence of ICSI-derived activated ovine embryos. Theriogenology. 2009;71(2):342-8.
88. Betthauser J, Forsberg E, Augenstein M, Childs L, Eilertsen K, Enos J, et al. Production of cloned pigs from in vitro systems. Nat Biotechnol. 2000;18(10): 1055-9.
89. Lan GC, Chang ZL, Luo MJ, Jiang YL, Han D, Wu YG, et al. Production of cloned goats by nuclear transfer of cumulus cells and long-term cultured fetal fibroblast cells into abattoir-derived oocytes. Mol Reprod Dev. 2006;73(7):834-40.
90. Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, et al. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. Nature. 2003;424(6949):635.
91. Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, et al. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. Science. 2003;301(5636): 1063.
92. Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, et al. Dogs cloned from adult somatic cells. Nature. 2005;436(7051):641.
93. Bhak JS, Lee SL, Ock SA, Mohana Kumar B, 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(1-2):37-49.
94. Malcuit C, Fissore RA. Activation of somatic cell nuclear transfer embryos. In: Sutovsky P, editor. Somatic cell nuclear transfer. USA: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, ILC; 2007. p. 123.
95. Gaynor P, Wells DN, Oback B. Couplet alignment and improved electrofusion by dielectrophoresis for a zona-free high-throughput cloned embryo production system. Med Biol Eng Comput. 2005;43(1): 150-4.
96. Tsunoda Y, Yasui T, Shioda Y, Nakamura K, Uchida T, Sugie T. Full-term development of mouse blastomere nuclei transplanted into enucleated two-cell embryos. J Exp Zool. 1987;242(2):147-51.
97. Gao S, McGarry M, Ferrier T, Pallante B, Priddle H, Gasparrini B, et al. Effect of cell confluence on production of cloned mice using an inbred embryonic stem cell line. Biol Reprod. 2003;68(2):595-603.
98. Gao S, Czirr E, Chung YG, Han Z, Latham KE. Genetic variation in oocyte phenotype revealed through parthenogenesis and cloning: correlation

Downloaded from http://www.jri.ir

with differences in pronuclear epigenetic modification. Biol Reprod. 2004;70(4):1162-70.

99. Vignon X, Chesné P, LeBourhis D, Heyman Y, Renard JP. Developmental potential of bovine embryos reconstructed with somatic nuclei from cultured skin and muscle fetal cells. Theriogenology.1998;41(1):392-5.
100. Cuthbertson KS, Whittingham DG, Cobbold PH. Free Ca2+ increases in exponential phases during mouse oocyte activation. Nature. 1981;294(5843): 754-7.
101. Katayama M, Zhong Z, Lai L, Sutovsky P, Prather RS, Schatten H. Mitochondrial distribution and microtubule organization in fertilized and cloned porcine embryos: implications for developmental potential. Dev Biol. 2006;299(1):206-20.
102. 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(3):642-50.
103. Heidari B, Shirazi A, Ahmadi E, Nazari H, Shams Esfandabadi. The effect of strength of DC pulse on fusion and development of reconstructed ovine oocytes. In: Sirivaidyapong S, Wongtavatchai J, editors. Proceedings of the 13th Associations of Institutions for Tropical Veterinary Medicine (AIT VM) conference 2010; 2010 Aug 23-26; Bangkok. Thailand: Chulalongkorn University; 2010. p. 139.
104. Im GS, Seo JS, Hwang IS, Kim DH, Kim SW, Yang BC, et al. Development and apoptosis of pre-implantation porcine nuclear transfer embryos activated with different combination of chemicals. Mol Reprod Dev. 2006;73(9):1094-101.
105. Wells DN, Misica PM, Tervit HR, Vivanco WH. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. Reprod Fertil Dev. 1998;10(4): 369-78.
106. Peura TT, Kleemann DO, Rudiger SR, Nattrass GS, McLaughlan CJ, Walker SK. Effect of nutriation of oocyte donor on the outcomes of somatic cell nuclear transfer in the sheep. Biol Reprod. 2003;68(1):45-50.
107. Aston KI, Li GP, Hicks BA, Sessions BR, Pate BJ, Hammon D, et al. Effect of the time interval between fusion and activation on nuclear state and development in vitro and in vivo of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. Reproduction. 2006;131(1):45-51.
108. Lee HS, Yu XF, Bang JI, Cho SJ, Deb GK, Kim BW, et al. Enhanced histone acetylation in somatic cells induced by a histone deacetylase inhibitor improved inter-generic cloned leopard cat blastocysts. Theriogenology. 2010;74(8):1439-49.
109. Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, Miller A, Oliver J, Tervit R, et al. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. Biol Reprod. 2001;65 (1):309-17.
110. Yan ZH, Zhou YY, Fu J, Jiao F, Zhao LW, Guan PF, et al. Donor-host mitochondrial compatibility improves efficiency of bovine somatic cell nuclear transfer. BMC Dev Biol. 2010;10:31.
111. Li X, Kato Y, Tsuji Y, Tsunoda Y. The effects of trichostatin A on mRNA expression of chromatin structure-, DNA methylation-, and development-related genes in cloned mouse blastocysts. Cloning Stem Cells. 2008;10(1):133-42.
112. Wang F, Kou Z, Zhang Y, Gao S. Dynamic reprogramming of histone acetylation and methylation in the first cell cycle of cloned mouse embryos. Biol Reprod. 2007;77(6):1007-16.
113. Bui HT, Wakayama S, Kishigami S, Park KK, Kim JH, Thuan NV, et al. Effect of trichostatin A on chromatin remodeling, histone modifications, DNA replication, and transcriptional activity in cloned mouse embryos. Biol Reprod. 2010;83(3): 454-63.
114. Khan SN, Khan AU. Role of histone acetylation in cell physiology and diseases: An update. Clin Chim Acta. 2010;411(19-20):1401-11.
115. Gao S, Han Z, Kihara M, Adashi E, Latham KE. Protease inhibitor MG132 in cloning: no end to the nightmare. Trends Biotechnol. 2005;23(2):66-8.
116. Do JT, Lee JW, Lee BY, Kim SB, Ryoo ZY, Lee HT, et al. Fate of donor mitochondrial DNA in cloned bovine embryos produced by microinjection of cumulus cells. Biol Reprod. 2002;67(2): 555-60.
117. Hiendleder S, Zakhartchenko V, Wolf E. Mitochondria and the success of somatic cell nuclear transfer cloning: from nuclear-mitochondrial interactions to mitochondrial complementation and mitochondrial DNA recombination. Reprod Fertil Dev. 2005;17(1-2):69-83.

Downloaded from http://www.jri.ir