مجله علوم پزشکی زانکو/ دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ بهار ۱۳۹۴/ ۵۲-۴۲

مقاله پژوهشی
(Original paper)

بررسی لقاح برون تنی و مراحل اولیه رشد در رویان‌های گوسفند نژاد قزل

علی گلچین[1]، رضا اسدپور[2]، لیلا روشنگر[3]، پریسا کنگری[4]

۱- دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد ماکو، دانشگاه آزاد اسلامی، ماکو، ایران

ایمیل: Agolchin.vet10@yahoo.com– شماره تماس: ۰۹۳۵۶۹۵۶۵۶۳

۲- دانشیار بیماری‌های تولیدمثل دامی، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۳- استاد بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، گروه علوم تشریحی و بافت‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۴- کارشناس ارشد بیوشیمی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد مرند، دانشگاه آزاد اسلامی، مرند، ایران

چکیده:

زمینه و هدف: امروزه تکنیک لقاح برون‌تنی به‌طور موفقیت‌آمیزی در تولید رویان‌های آزمایشگاهی به کار می‌رود. این رویان می‌تواند بعد از جمع‌آوری برای فن‌آوری‌های دیگر همچون انتقال جنین، انتقال ژن، تقسیم جنین، کپی‌سازی، اختلاط چند جنین، انجماد جنین، تشخیص جنسی و جداسازی اسپرم‌های X و Y مورداستفاده قرار گیرد. انجام لقاح برون تنی در گوسفند بیشتر جنبه پژوهشی دارد لذا هدف از این مطالعه بررسی لقاح برون تنی در اووسیت‌های گوسفند نژاد قزل و ارزیابی جنین‌های حاصل‌شده برای مطالعات مختلف می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه مجموعه اووسیت-کومولوس‌های گوسفند نژاد قزل پس از استحصال از تخمدان گوسفندهای کشتار شده در کشتارگاه صنعتی تبریز سه مرتبه شست‌وشو گردیدند. از مجموع ۳۳۸ اووسیت استحصالی ۲۰۱ اووسیت باکیفیت خوب و مناسب برای لقاح و کشت تشخیص داده شد. اووسیت‌ها در محیط TCM199 در شرایط حداکثر رطوبت، دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و ۶CO_2 درصد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از انجام لقاح آزمایشگاهی بررسی میزان لقاح و میزان رشد طی دو مرحله در فواصل ۴۸-۹۶ ساعته بررسی گردید.

یافته‌ها : مطالعه ما نشان داد که میزان بلوغ اووسیت‌ها و باروری برون تنی به ترتیب ۹۵/۰۲ و ۷۸/۰۱٪ می‌باشد که از این میزان باروری۴۶/۳٪ تسهیم داشته‌اند.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهند که میزان باروری و تولید جنین در این گوسفند بیشتر است و می‌توان از رویان‌های گوسفندی این نژاد برای مطالعات رویان‌شناسی، ترانس ژنتیک و اختلاط جنینی در پستان داران بزرگ استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: اووسیت، رویان، لقاح برون تنی، گوسفند

[Downloaded from zanko.muk.ac.ir on 2025-05-17]

مقدمه

لقاح برون‌تنی[1] روشی است که در آن سلول‌های تخمک بالغ از ماده گرفته‌شده و توسط اسپرم بارور می‌شوند. این روش اولین بار در حیوانات انجام گرفت و بعدها با مشاهده موفقیت‌های حاصل‌شده از این روش، انجام آن در انسان موردتوجه پزشکان قرار گرفت. تولد نخستین حیوان شبیه‌سازی‌شده خاورمیانه (گوسفندی با نام رویانا) در سال ۱۳۸۵ مطالعات پژوهشی را به سمت کار بر روی این حیوان سوق داده است و از طرفی اولین بزغاله حاوی ژن فاکتور ۹ انسانی و همچنین بزغاله تراریخته حاوی ژن tPT انسانی به ترتیب در سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ در پژوهشگاه رویان تولیدشده‌اند. تولید جنین با استفاده از روش IVF و تزریق آن به رحم نشخوارکنندگان کوچک به‌منظور افزایش دام امری هزینه‌بر و دشوار می‌باشد (۱) و به همین دلیل انجام لقاح برون تنی در گوسفند بیشتر جنبه پژوهشی دارد. علی‌رغم تلاش در جهت بهبود تکنولوژی لقاح خارج رحمی در نشخوارکنندگان کوچک با استفاده از جمع‌آوری تخمک در کشتارگاه و یا جمع‌آوری سیستمیک آن از حیوان زنده هنوز فاصله زیادی با حالت ایده آل و انتقال بلاستوسیت به رحم در مقایسه با لقاح داخل رحمی در نشخوارکنندگان کوچک وجود دارد (۲, ۳). چندین پروتکل برای لقاح برون تنی (IVF) تخمک با استفاده از مایع منی تازه و یا منجمد ایجاد و توسعه یافته است (۴, ۵).

رویان می‌تواند بعد از جمع‌آوری برای فن‌آوری‌های دیگر همچون انتقال جنین، انتقال ژن، تقسیم جنین، کپی‌سازی[2]، اختلاط چند جنین[3]، انجماد جنین، تشخیص جنسی و جداسازی اسپرم‌های X و Y مورداستفاده قرار گیرد (۶, ۷). کاربرد IVF در دام‌پروری بیشتر به‌منظور اصلاح نژاد، پژوهش‌های بیولوژیک و انتقال ژن می‌باشد (۸).

تخمک پستانداران در طول زندگی جنینی تشکیل و در مرحله پروفاز تقسیم میوز تا حدود زمان تخمک-گذاری متوقف می‌شود. ازسرگیری مجدد میوز بستگی به هورمون‌های گنادوتوفینی دارد که موجب ترشح پروژسترون از سلول‌های فولیکول‌های تخمدانی می-شود و اثر مستقیم بر بلوغ اووسیت دارد (۹). این تحریک هورمونی موجب شکسته شدن وزیکول ژرمینال شده و متراکم شدن کروموزوم می‌گردد و مرحله متافاز میوز یک شروع می‌شود و پس از تشکیل جسم قطبی اول، سلول وارد متافاز دوم می‌شود (۱۰). القای بلوغ اووسیت فرایندی شناخته‌شده است که شامل یک واکنش آگونیستی اولیه در سطح اووسیت می‌باشد که موجب بلوغ سیتوپلاسمی اووسیت و تحریک ادامه میوز می‌شود. ازآنجایی‌که اغلب اووسیت‌های جمع‌آوری‌شده برای لقاح برون تنی از فولیکول‌های تابع نیستند اغلب تا مرحله بلاستوسیست نمی‌رسند (۱۱).

برخلاف بسیاری از دام‌های اهلی گوسفند تولیدمثل فصلی دارد ولی بااین‌وجود تغییرات فیزیولوژیکی در قوچ کمتر از میش تحت تأثیر فصل است (۱۲, ۱۳). بیشتر مطالعات پیرامون طول روز و تأثیر آن بر باروری میش و تأثیر آن بر کیفیت مایع منی در دام‌های زنده صورت گرفته است (۱۳). تخمدان‌های گوسفند برحسب عوامل مختلف فیزیولوژیک دام حاوی انواع مختلف فولیکول‌ها می‌باشند ولی تنها طیف بخصوصی از اووسیتهای فولیکول‌های آسپیره شده برای لقاح برون تنی قابل‌استفاده هستند که تعداد این اووسیت‌های استحصالی در فصل‌های تولیدمثلی بیشتر از دیگر فصل-هاست (۱۴). به‌منظور استحصال اووسیت از تخمدان

1- In Vitro Fertilization
2- cloning
3- chimera

[Downloaded from zanko.muk.ac.ir on 2025-05-17]

روش‌های آسپیره کردن، برش نازک و پانکسیون[4] کل سطح تخمدان و بازیابی اووسیت از طریق سانترفیوژ[5] استفاده می‌شود. روش استحصال اووسیت از تخمدان و تأثیرات فصل دو عامل مهم در بلوغ اووسیت و عملکرد رویان می‌باشد (۱۵،۱۶).

نژاد قزل از برترین نژادهای گوسفندی ایران که بومی شمال غرب کشور، مناطق شمالی کردستان، جنوب و جنوب شرقی استان آذربایجان غربی (شاهین-دژ، میاندوآب) و دامنه‌های سهند و شهرهای اطراف تبریز در استان آذربایجان شرقی می‌باشد. این نژاد از نژادهای سنگین‌وزن گوشتی شیری با رنگ عمومی بدن قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره با تنوع رنگ قرمز و دنبه‌دار می‌باشد و پنیر معروف لیقوان که شهرت جهانی دارد از شیر این گوسفند به عمل می‌آید (۱۷،۱۸). این نژاد سازگار با شرایط جغرافیایی منطقه است. در مواردی که شرایط آب و هوایی مساعد باشد، این حیوانات قادرند تا برای تغذیه به چرا رفته و از یونجه و شبدر تغذیه کنند و در شرایط آب و هوایی سرد به‌صورت دستی با یونجه، ساقه و دانه جو تغذیه می-شوند (۱۹) ازجمله ویژگی‌های این نژاد تولید شیر و گوشت بالا می‌باشد. پرورش بره‌های پرواری یکی از مهم‌ترین منابع درآمد برای پرورش‌دهندگان این نژاد محسوب می‌شوند. مطالعاتی در مورد آنالیز وزن این نژاد صورت گرفته است (۲۰) اما اطلاعاتی در مورد عوامل ژنتیکی دخیل در ویژگی‌های این نژاد صورت نگرفته است. ازآنجایی‌که انجام لقاح برون تنی در گوسفند بیشتر جنبه پژوهشی دارد لذا هدف از این مطالعه بررسی لقاح برون تنی در اووسیت‌های گوسفند نژاد قزل و ارزیابی جنین‌های حاصل‌شده در مراحل اولیه رشد به‌منظور استفاده از آن در مطالعات مختلف مربوطه می‌باشد.

روش بررسی

تمامی ظروف یک‌بارمصرف استفاده‌شده در این مطالعه اعم از پلیت‌ها، پیت، لوله‌های فالکون ۱۵ و ۵۰ سی‌سی، ویال‌های ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌لیتر از شرکت‌های BD-falcon و Eppendorph تهیه گردید. تمامی مواد مورداستفاده در مطالعه حاضر از شرکت SIGMA (St.Luis, MO, USA) و تمام محیط‌های مورداستفاده از شرکت گیبکو خریداری‌شده بود و در غیر این صورت نام شرکت مربوطه و شماره کاتالوگ آن ذکرشده است. روش کار این پژوهش بر اساس مطالعات قبلی انجام شد (۱۶،۲۱،۲۲).

جمع‌آوری و کشت تخمک‌ها: تعداد ۱۴۰ تخمدان گوسفند بالغ (سن۱/۵-۴) در فصل پاییز بلافاصله بعد از کشتار دام در کشتارگاه صنعتی تبریز جمع‌آوری‌شده و حداکثر در مدت ۲ ساعت بعد از کشتار در فلاسک حاوی سرم فیزیولوژی و آنتی‌بیوتیک (penicillin 100 streptomycin 100 µg/ml+IU/ml) در دمای ۳۷-۳۹ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه تخمدان‌ها چند بار با سرم فیزیولوژی استریل شست‌وشو و توده‌های سلول‌های کومولوس- اووسیت (COCs) از فولیکول‌های شفاف با سایز ۲mm-۸ توسط سرنگ ۱۰ میلی‌لیتری پیستون‌دار با سرسوزن شماره ۱۸ یک‌بارمصرف حاوی محیط آسپیراسیون در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد آسپیره شده و سپس COC های حاوی سیتوپلاسم گرانوله یکنواخت احاطه شده با بیش از دولایه سلول‌های کومولوس انتخاب و پس از سه بار شست‌وشو در محیط شست‌وشو، به محیط مخصوص بلوغ اووسیت (جدول ۱) انتقال داده شدند (۱۶).

4- puncture
5- oocyte recovery via centrifugation(ORC)

[Downloaded from zanko.muk.ac.ir on 2025-05-17]

تخمک‌های جمع‌آوری‌شده بر اساس تعداد لایه سلول‌های کومولوس اطرافشان دسته‌بندی شدند:

دسته اول (درجه ۱): تخمک‌هایی که اطرافشان چندلایه سلولی متراکم از سلول‌های کومولوس داشتند.

دسته دوم (درجه ۲): تخمک‌های دارای دو یا سه لایه از سلول‌های کومولوس

دسته سوم (درجه ۳): تخمک‌های فاقد کومولوس (به‌اصطلاح تخمک‌های لخت).

درمجموع از میان ۳۳۸ تخمک جمع‌آوری‌شده ۲۰۱ تخمک باکیفیت خوب و متوسط از دسته اول و دوم برای بلوغ آزمایشگاهی[6] انتخاب شدند. برای انجام بلوغ هر ۱۰- ۲۰ کمپلکس اووسیت- کومولوس درون یک قطره ۱۰۰ میکرو لیتری از محیط بلوغ سلول‌های اووسیتی قرار گرفت. بلوغ آزمایشگاهی در شرایط رطوبت ۹۰ درصد، دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و $6CO_2$ درصد انجام گرفت (۲۲) که تعداد ۱۹۱ اووسیت علائم بلوغ را نشان دادند. پس از ۲۴ ساعت سلول‌های اووسیت‌های کشت‌شده از انکوباتور خارج‌شده و میزان پراکنده شدن کومولوس بررسی گردیده و برای اضافه شدن اسپرم به محیط کشت جنین (جدول ۲) انتقال یافت.

آماده‌سازی اسپرم و لقاح برون‌تنی: برای هر بار آزمایش تعداد دو عدد بیضه از گوسفندان نژاد قزل ذبح‌شده در کشتارگاه صنعتی تبریز اخذشده و در فلاسک مخصوص حاوی سرم فیزیولوژی و آنتی‌بیوتیک در دمای ۳۲ درجه، با سرعت به آزمایشگاه انتقال می‌یافت. اسپرم‌های تازه جداشده از اپیدیدم گوسفند ذبح‌شده با استفاده از روش swim up جداسازی شد که مقدار ۲ میلی‌لیتر از مایع حاوی اسپرم داخل لوله ریخته و به آن به آن ۵ میلی‌لیتر محیط کشت HamsF10 اضافه گردید و سپس تمام نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰ سانترفیوژ شدند. پس از سانترفیوژ و جمع شدن اسپرم در ته لوله، مایع بالایی دور ریخته شده و مایع انتهایی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در انتها میزان ۲ میکرولیتر از این مایع با غلظت نهایی 1×10^6 اسپرم در هر میلی‌لیتر به هر قطره محیط لقاح جنین اضافه گردید. مجموعه اسپرم و اووسیتها برای مدت ۶ ساعت در شرایط ۳۷/۵ درجه سانتی‌گراد CO_2 ۶٪ و رطوبت ۹۰ درصد انکوبه شد و سپس عمل حذف سلول‌های کومولوس احاطه‌کننده اووسیت از اسپرم‌ها انجام گرفت و اووسیت‌های لقاح یافته به مدت سه روز به محیط کشت انتقال و در شرایط فوق انکوبه گردید. محیط کشت هر ۲۴ ساعت یک‌بار تعویض می‌گردید و وضعیت رویان‌ها به‌صورت روزانه در زیر استریومیکروسکوپ مورد ارزیابی قرار می‌گرفت (۱۶،۲۳).

ارزیابی لقاح و رشد و نمو زیگوت: در پستانداران مزرعه‌ای ازجمله گاو و گوسفند و بز سیتوپلاسم اووسیت به‌شدت گرانوله است و مشاهده پرونوکلئوس نر و ماده بعد از لقاح آزمایشگاهی در زیگوت به‌راحتی امکان‌پذیر نمی‌باشد. بنابراین می‌توان از اولین کلیواژ به‌عنوان شاخصی برای لقاح آزمایشگاهی موفق استفاده کرد. یکی از نشانه‌های کلیواژ در زیگوت گوسفند وجود یک یا دو فرورفتگی در سیتوپلاسم زیگوت است این فرورفتگی‌ها در واقع شیارهای کلیواژی هستند که در زیگوت به وجود می‌آید. بررسی میزان لقاح ابتدا ۲۴ ساعت بعد صورت گرفت و میزان لقاح و میزان فراگمنتاسیون و رشد و نمو و یا عدم رشد بررسی گردید. محیط‌های کشت هر ۲۴ ساعت یک‌بار تعویض می‌گردید و پیشرفت رشد رویان‌ها به‌صورت روزانه در زیر استریومیکروسکوپ مورد ارزیابی قرار می‌گرفت (۲۴).

6- In Vitro Maturation (IVM)

[Downloaded from zanko.muk.ac.ir on 2025-05-17]

تصویر ۱: قطره‌های محیط کشت در پلیت‌های مخصوص کشت جنین

جدول ۱: نوع و مقدار مواد موردنیاز جهت ساخت محیط بلوغ جهت بالغ سازی آزمایشگاهی کمپلکس-های اووسیت - کومولوس نابالغ

نوع مواد	مقدار موردنیاز
TCM 199	ml۹
LH	µg/ml۱۰
FSH	µg/ml۱۰
FBS	ml۱
Cysteamine	Mm۰/۱
Esteradiol-17β	µg/ml۱
EGF	ng/ml۱۰۰
Na pyruvate	Mm۲/۵
Pen –Strept	µg/ml۱۰۰

جدول۲: نوع و مواد موردنیاز برای ساخت محیط کشت جنین‌های آزمایشگاهی

نوع مواد	میزان موردنیاز
NaCl	mM۱/۷
KCl	mM۷/۱۶
KH_2PO_4	mM۱/۱۹
$CaCl_2.2H_2O$	mM۱/۷۸
NaH_2PO_4	mM۰/۳۹
$MgSO_4.7H_2O$	mM۰/۷۴
Na-Lactate	mM۳/۳۰
Na-Pyrovate	mM ۰/۳۳
L-Glutamine	mM۲/۰۵
$NaHCO_3$	۲۵
BME amino acids	٪۲
MEM amino acids	٪۱
Penecillin	IU/mL۱۰۰
Streptomycin	µm/mL۱۰۰
BSA	mg/mL۱۰۰

[Downloaded from zanko.muk.ac.ir on 2025-05-17]

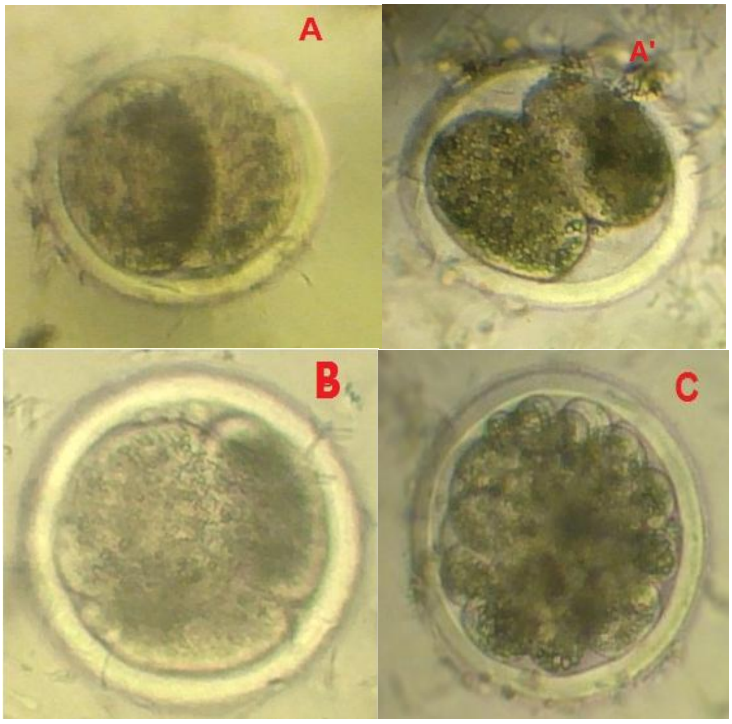
یافته‌ها

در این بررسی مجموعاً ۱۴۰ تخمدان گوسفند نژاد قزل بالغ برای استحصال اووسیت از کشتارگاه صنعتی تبریز جمع‌آوری شد و پس از آسپیره کردن فولیکول‌های بالغ تخمدانی تعداد ۳۳۸ اووسیت به دست آمد. از مجموع ۳۳۸ اووسیت استحصالی ۲۰۱ اووسیت باکیفیت خوب برای کشت تشخیص داده شد (جدول ۳). به دنبال کشت اووسیت‌ها ۱۹۱ عدد از آن‌ها علائم بلوغ را با خارج شدن جسم قطبی از خود نشان دادند و به دنبال مجاورت اووسیتهای بالغ شده با اسپرم‌های ظرفیت پذیر شده ۷۸/۰۱ درصد آن‌ها لقاح یافتند. با پیشرفت رشد اووسیت‌های حاصل‌شده ۴۶/۳ درصد به تقسیم و رشد ادامه داده و ۱۵ درصد آن‌ها به رویان‌های چند سلولی و مرولا تبدیل شدند (جدول ۳ – تصویر ۲).

جدول ۳: میزان بلوغ و لقاح اووسیت‌ها و رشد رویان‌ها در لقاح برون تنی*

تعداد کل اووسیت ها	تعداد اووسیت های قابل کشت	اووسیتهای بالغ شده (٪)	اووسیت های لقاح یافته (٪)	رویان‌های تسهیم شده (٪)	رویان‌های ۲-۴ سلولی (٪)	مرولا (٪)
۳۳۸	۲۰۱	۱۹۱ **(۹۵/۰۲)	۱۴۹ (۷۸/۰۱)	۶۹ (۴۶/۳)	۵۳ (۲۷/۷۴)	۱۶ (۸/۳)

*: درصدها نسبت به تعداد اووسیتهای بالغ گرفته‌شده است. **: درصد نسبت به اووسیتهای باکیفیت و قابل کشت



تصویر ۲: سلول‌های رویانی تشکیل‌شده در محیط کشت : A و 'A رویان دوسلولی ؛ B رویان چهار سلولی؛ C رویان چند سلولی (مورولا) ؛ *درشتنمایی X۲۰۰*

[Downloaded from zanko.muk.ac.ir on 2025-05-17]

بحث و نتیجه‌گیری

تعیین میزان بلوغ اووسیت‌های به‌دست‌آمده از تخمدان‌ها به سایز فولیکول‌های تخمدانی بستگی دارد (۲۵) که در گوسفند فولیکول‌های با سایز ۱-۱/۵ میلی-متر ۵۰ درصد اووسیتها و در فولیکول‌های با سایز بزرگ‌تر از ۱/۶ میلی‌متر ۹۰ درصد اووسیت‌های استحصالی قادر به انجام کامل میوز دو و بلوغ می‌باشند (۲۵). به‌طور میانگین ۸۲ درصد اووسیتهای استحصالی از فولیکول‌های ۲-۳/۵ میلی‌متری قادر به لقاح موفق‌اند که از این میزان ۲۹ درصد می‌توانند با موفقیت به رشد تا مرحله بلاستوسیست ادامه دهند. در بررسی حاضر فولیکول‌های با سایز ۲-۸ میلی‌متری آسپیره شدند و تعداد اووسیتهای استحصالی به ازای هر تخمدان ۲/۴۱ عدد بود که ۵۶/۵ درصد اووسیت‌های استحصالی بعد از انتقال به محیط بلوغ قابل‌کشت تشخیص داده شدند.

میزان استحصال اووسیت از تخمدان در روش برش نازک و بازیابی اووسیت از طریق سانتریفیوژ نسبت به روش‌های آسپیره کردن و پانکسون سطحی تخمدان بیشتر است و همچنین تعداد اووسیت‌های باکیفیت خوب (درجه‌یک) در روش آسپیره کردن نسبت به دیگر روش‌ها کمتر و تعداد اوسیت‌های درجه سه در این روش بیشتر است. میزان استحصال اووسیت به ازای هر تخمدان میش به روش آسپیراسیون ۲/۳-۳/۸(۲۶) و به روش برش نازک ۴/۱۳-۸/۶ (۲۶،۲۱) عدد گزارش‌شده است. در مطالعه‌ای که بر روی میزان و کیفیت اووسیت استحصالی از تخمدان بز انجام‌گرفته است نیز استفاده از روش برش نازک برای به دست آوردن اووسیتهای باکیفیت خوب (درجه‌یک) توصیه‌شده است (۲۶).

دستیابی به حداکثر میزان لقاح اووسیت و تعداد رویان به عوامل مختلفی ازجمله: روش استحصال اووسیت از فولیکول‌های تخمدانی، سایز فولیکول‌ها، شرایط و محتویات محیط‌های مورداستفاده و کیفیت اسپرم (۲۸،۲۷). که استفاده از منی منجمد درصد لقاح پایینی را در لقاح آزمایشگاهی و لقاح در بدن موجود زنده نشان داده است. ما در این مطالعه پس از اخذ بیضه و برش اپیدیدم از روش swim up برای آماده‌سازی اسپرم استفاده کردیم که از روش‌هایی است که باعث بهبود کیفیت اسپرم ازلحاظ حرکت، غلظت و مورفولوژی می‌شود (۲۷). بر اساس ترکیبات محیط‌های کشت مختلف میزان بلوغ اووسیت، رشد و تقسیم سلولی رویان گوسفند متفاوت گزارش‌شده است. محیط‌های $TCM199^-$، $TCM199^+$و CR1aa نتایج خوبی برای تحریک بلوغ اووسیت نشان داده‌اند که CR1aa حاوی ۱۰۰ میکرومولار ال- اسکوربیک نتایج خوبی در بلوغ اوسیتی، تکامل مرولا و بلاستوسیست دارد (۲۱،۲۹). در رویان دام‌هایی همچون گوسفند، بز، گاو و اسب زمان فعال شدن ژنوم بعد از مرحله ۸-۱۶ سلولی می‌باشد و تا آن لحظه سلول‌ها از مواد ذخیره‌ای داخل اووسیت استفاده می‌کنند (۳۰). میزان بلوغ اووسیت، شرایط لقاح و رشد و توسعه رویانی در شرایط داخل بدن بهتر از شرایط آزمایشگاهی هست (۳۱،۲۹) و در لقاح برون تنی سعی در نزدیک کردن این شرایط آزمایشگاهی به شرایط فیزیولوژیک بدن است، برای مثال دمای انتقال تخمدان‌ها به آزمایشگاه و همچنین شرایط بلوغ اووسیت ۳۷/۵-۳۹ درجه سانتی-گراد و دمای انتقال بیضه ۴-۵ درجه سانتی‌گراد پایین‌تر در نظر گرفته می‌شود. استفاده از منی تازه نسبت به منی منجمد در لقاح برون تنی نتایج بهتری به دنبال دارد (۳۲). استفاده از غلظت‌های اسپرم کمتر از حد موردنیاز باعث کاهش درصد لقاح و استفاده از غلظت‌های بالا باعث پلی‌اسپرمی می‌شود (۳۳). در مطالعه ما از غلظت

[Downloaded from zanko.muk.ac.ir on 2025-05-17]

نهایی اسپرم 1×10^{6} استفاده شد که غلظت توصیه‌شده در اغلب مطالعات می‌باشد (۶،۳۳).مدت‌زمان رسیدن به مرحله بلوغ اوسیتی در گوسفند و بز در شرایط مطلوب آزمایشگاهی ۲۴-۲۷ ساعت می‌باشد (۳۷). در بررسی ما مدت‌زمان لازم برای بلوغ اووسیت ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد.

میزان بلوغ اووسیتهای گاو در لقاح برون تنی ۵۵ تا ۸۳ درصد و در گاومیش ۶۷/۵۲ تا ۸۲/۰۸ درصد گزارش‌شده است (۳۰،۳۴،۳۵). این میزان در گوسفند ۵۲/۴۴ تا ۸۵/۲۰ درصد گزارش‌شده است (۳۶) و در مطالعه خدایی مطلق و همکاران بلوغ ۸۵/۲۷ درصدی اووسیت‌های استحصالی گزارش گردیده است (۳۸). در تحقیق حاضر با در نظر گرفتن اووسیتهای قابل‌کشت، میزان بلوغ اووسیت‌های استحصالی برابر با ۹۵/۰۲ درصد بود که بیشتر از حداکثر مقدار گزارش‌شده می‌باشد.

میزان لقاح اووسیتهای بالغ شده در گاو ۷۰ درصد و در گاومیش ۲۲ تا ۵۵ درصد گزارش‌شده است (۳۰،۳۵) میزان لقاح برون‌تنی اووسیتهای استحصالی از فولیکول‌های با سایزهای مختلف در گوسفند ۷۶/۶۵ تا ۷۹/۵۴ گزارش‌شده است(۳۵) و حداکثر میزان توانایی اسپرم در بارورسازی اووسیت گوسفند و بز ۸۵ ٪ گزارش گردیده است (۳۷). در تحقیق ما میزان لقاح برون‌تنی ۷۸/۰۱ درصد بود و تقریباً نزدیک به حداکثر میزان گزارش‌شده است. احتمالاً دلیل اندک درصد پایین لقاح نسبت به حداکثر میزان لقاح گزارش‌شده، پایین بودن تعداد اووسیت‌های باکیفیت مناسب برای کشت و لقاح بوده است، چرا که در استفاده از روش آسپیراسیون برای استحصال اووسیت از فولیکول‌ها درصد اووسیتهای باکیفیت (درجه ۱و۲) نسبت به دیگر روش‌های استحصال اووسیت پایین می‌باشد (۲۶،۲۱). میزان تسهیم در اووسیت‌های لقاح یافته در گوسفند در مطالعه وانی و همکاران ۱۹/۳۲ تا ۳۴/۱۳ درصد گزارش گردیده است (۳۶) که در بررسی ما ۴۶/۳ درصد تسهیم مشاهده‌شده است. این تفاوت در میزان تسهیم احتمالاً بیانگر مقاومت رویان‌های حاصله به استرس‌های محیطی و نیز رعایت استریلیته بیشتر ضمن انجام کار می‌باشد (۳۹).

با توجه به اهمیت روزافزون پژوهش‌های ناباروری، تولید حیوانات تراریخته، طب پیوند با شناخت مبانی پایه زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی، توسعه تحقیقات ترجمانی سلول‌های بنیادی روی حیوانات مختلف، تولید دام و محصولات وابسته مرتبط با زیست‌فناوری آن‌ها و انجام کارآزمایی‌های بالینی، داشتن اطلاعات جامع پیرامون ایجاد شرایط مناسب جهت بلوغ اووسیت، لقاح و توسعه رویانی در شرایط آزمایشگاهی لازم می‌باشد (۳۹). مشکلات و محدودیت‌هایی در لقاح برون تنی گوسفند و بز وجود دارد. بااین‌وجود بازده این روش در گوسفند نسبت به دیگر پستان داران مزرعه شرایط مطلوبی را ازلحاظ تولید رویان‌های آزمایشگاهی و انجام مطالعات مربوطه فراهم می‌سازد.

منابع:

1.Thibier M, Guérin B. Embryo transfer in small ruminants: the method of choice for health control in germplasm exchanges. Livestock Production Science. 2000;62(3):253-70.

2.Papadopoulos S, Rizos D, Duffy P, Wade M, Quinn K, Boland M, et al. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts. Animal reproduction science. 2002;74(1):35-44.

[Downloaded from zanko.muk.ac.ir on 2025-05-17]

3.Cognie Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. Theriogenology. 2003;59(1):171-88.

4.Dattena M, Accardo C, Pilichi S, Isachenko V, Mara L, Chessa B, et al. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. Theriogenology. 2004;62(3):481-93.

5.Pereira R, Mesquita P, Batista M, Baptista M, Barbas J, Pimenta J, et al. Doppel gene polymorphisms in Portuguese sheep breeds: insights on ram fertility. Animal reproduction science. 2009; 114(1):157-66.

6.Johnson LA. Flow cytometric determination of sperm sex ratio in semen purportedly enriched for X-or Y-bearing sperm. Theriogenology. 1988;29(1):265.

7.Tecirlioglu RT, Cooney MA, Lewis IM, Korfiatis NA, Hodgson R, Ruddock NT, et al. Comparison of two approaches to nuclear transfer in the bovine: hand-made cloning with modifications and the conventional nuclear transfer technique. Reproduction, Fertility and Development. 2005; 17(5):573-85.

8.Markle GE, Nam CB. Sex predetermination: Its impact on fertility. Biodemography and Social Biology. 1971; 18(1):73-83.

9.Dennis Smith L. The induction of oocyte maturation: transmembrane signaling events and regulation of the cell cycle. Development (Cambridge). 1989; 107(4):685-99.

10.Johnson MH. Essential reproduction: John Wiley & Sons; 2012.

11.Jones B, Fish R, Martin A, Duff G, Ax R. Case study: effects of supplemental linoleic and linolenic acids on reproduction in Holstein cows. The Professional Animal Scientist. 2008;24(5):500-5.

12.Wang Z-g, Yu S-d, Xu Z-r. Effects of collection methods on recovery efficiency, maturation rate and subsequent embryonic developmental competence of oocytes in holstein cow. ASIAN AUSTRALASIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES. 2007; 20(4):496.

13.Rosa H, Bryant M. Seasonality of reproduction in sheep. Small Ruminant Research. 2003;48(3):155-71.

14. Cognie Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. Theriogenology. 1999;51(1):105-16.

15. Wani NA, Wani GM, Khan MZ, Salahudin S. Effect of oocyte har-vesting techniques on in vitro maturation and in vitro fertiliza-tion in sheep. Small Rumin Res. 2000; 36(1): 63–7.

16. DadashpourDavachi N, Zeinoaldini S, Kohram H. A novel ovineoocyte recovery method from slaughterhouse material. SmallRumin Res. 2012; 106(2-3): 168–72.

17. Atlas ofIran Nationallivestock: Plan and Budget Organization. National CartographicPublishing. 2008: 52 (Persian).

18. Khaldari M. The principles ofbreeding sheepand goats. PublicationsSID of Tehran.2003 (Persian).

19. Nourian E. Estimation genetic parameters for perweaning in ghezelsheep.University of Tarbiat Modares.2000.

20. Baneh H. Estimation of genetic parameters of body weight traits in ghezel sheep. Asian-Aust J Anim Sc. 2010; 23(2): 149-153.

21. Sreenivas D, Kaladhar D, SastryYarla N, Thomas VM, PalniSamy A, Rao Vadlapudi V, Preethi R. In Vitro Production of Sheep Embryos in CR1aa Medium Supplemented with L-Ascorbic Acid. Tissue Sci Eng. 2014; 5:1

22. Hammon DS, Wang S, Holyoak GR. Effects of ammonia during different stages of culture on development of in vitro produced bovine embryos.Animal Reproduction Science. 2000; 59: 23–30

23. Basirat Z, Joorsaraee S G, Farsi M. Comparison of sperm parameters in swim up method with single and double washing. J GorganUni Med Sci. 2009; 11 (2):55-60

24. Abbasi M, Sadrekhanloo RA. In vitro fertilization and early embryonic development in buffalo. J.Vet.Res. 2000; 55(3): 33-36

25. Houdebine LM, Transgenic Animals: generation and use. Netherland. Harwood Academic Publisher. 1997; 45-51

26. Pawshe CH, Totey SM, Jain SK. A comparison of three methods of recovery of goat oocytes for in vitro maturation and feritilization. Theriogenol J.1994;42(1):117–25.

27. Aurich C. Burgmann F. Hoppe H. Opioid regulation of LH and prolactin release in the horse identical or independent endocrine pathways? Anim. Reprod. Sci. 1996; 44: 127–134

28: Rosa H. J. D. Brayant, M. J. Seasonality of reproduction in sheep. Small Rum. Res.2003; 48: 155-171

29. Metwally M., Ledger W.L. Long-term complications of assisted reproductive technologies. Hum. Fertil. (Camb). 2011; 14: 77-87

30. Sirard M.A, Assist J. Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. Reprod. Genet. 2011;28:483-488

[Downloaded from zanko.muk.ac.ir on 2025-05-17]

31. Lonergan P., Rizos D., Gutierrez-Adan A., Fair T., Boland M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. Reprod. Domest. Anim. 2003; 38: 259-267
32. Madan ML, Singla SK, Jailkani S, Ambrose JD.In vitro fertilization in buffalo and birth of first ever IVF buffalo calf. Post cong post congproc3rd World buffalo, Bulgaria.1991; 7: 11-17
33. Saeki K, Nagao Y, Hoshi M, Nagai M. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on in vitro fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium." *Theriogenology* 1995; 43(4):751-759.
34. Kim CI, Ellington JE, Foote RH. Maturation, fertilization and development of bovine oocytes in vitro using TCM199 and a simple defined medium with co-culture. Theriogenology. 1990; 33(2):433-40
35. Greve T,Madison V, Avery B, Callesen H,Hyttel P. In vitro production of bovine embryos: A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations.Animal Reprod Sci. 1993; 33(1-4): 51-69
36. Wani AR, Khan MZ, Sofi KA, Malik AA, Lone FA, Bhat F A.Effect of follicular size on in vitromaturation, fertilization and culture of sheep embryos. Iranian Journal of Veterinary Research. 2013; 14(4): 299-304
37. Smedt V de, Crozet N, Gall L. Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. J Exp Zool. 1994;269(2):128-39.
38.KhodaeiMotlagh M, ZarehShahne A, Daliri M, Kohram H, Gharegozloo F, Zhandi M, et al. Effect of Two Heterologous Sera on Meiotic and Fertilization Capacity of the Ovine Oocytes In Vitro.Journal of Cell & Tissue (JCT).2013; 4(2): 217-223
39. Wani NA. In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. Small Ruminant Research J.2002; 44: 89-95

[Downloaded from zanko.muk.ac.ir on 2025-05-17]

Original paper

The Evaluation of in vitro fertilization and early embryonic development in ghezel sheep

Ali Golchin[1], Reza Asadpour[2], Leila Roshangar[3], Parisa Kangari[4]
1- DVM, Young Researchers and Elit club, Maku branch, Islamic Azad University, Maku,Iran
Email: Agolchin.vet10@yahoo.com Mobile: +98 935 695 6563
2- Associate Professor of Animalreproductivediseases, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
3- Professor of Histology and Embryology, Department of Histology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
4- Young Researchers and Elit club, Marand branch, Islamic Azad University, Marand ,Iran

Abstract
Background and Aim: Nowadays in vitro fertilization techniques have been successfully used in the production of embryos in vitro. The embryos are then collected and used for embryo transfer, gene transfer, embryo splitting, copying, chimera, embryo freezing, sexual recognition, separation of X and Y sperm and other technologies. In vitro fertilization in ovine has mostly a research aspect. Therefore, the aim of this study was to evaluate in vitro fertilization in Ghezel sheep and to evaluate the resulting embryos for different researches.
Methods: In this study, cumulus- oocyte complexes of Ghezel sheep after extraction from the ovaries of slaughtered sheep were washed three times in Tabriz abattoir. Of 338 oocytes, 201 oocytes were suitable for in vitro fertilization (IVF) and in vitro culture (IVC).The oocytes were transferred to the IVM medium and cultured in a maximum humidified, 5% CO atmosphere at 39C for 24 h. After, in vitro fertilization rate and the growth rate, they were evaluated at intervals of 48-96 hours.
Results: The results of this study revealed that rate of oocyte maturation and in vitro fertilization is 95.02, 78.01 of which 46.3 % fertilized oocytes were reached to early cleavage stage.
Conclusion: According to the results of this study and their comparison with other studies, fertility and embryo production rates in sheep are more than other large mammals. Therefore, Ghezel sheep embryos can be used for transgenic, chimera and embryology studies on mammals.
Keywords: Embryos, In vitro fertilizationm, Oocytes, Sheep.

[Downloaded from zanko.muk.ac.ir on 2025-05-17]