

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

علی گلچین^۱، رضا اسدپور^۲، لیلا روشنگر^۳، پریسا کنگری^۴

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 مرنند، دانشگاه آزاد اسلامی، مرنند، ایران

چکیده:

زمینه و هدف: امروزه تکنیک لقاح برون تنی به طور موفقیت آمیزی 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 مورد استفاده 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 حاصل شده 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 6CO_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 باروری ۴۶/۳٪ تسهیم داشته‌اند.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده 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

مقدمه

مورد استفاده قرار گیرد (۶، ۷). کاربرد IVF در دام پروری بیشتر به منظور 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 تخمک‌گذاری متوقف می‌شود. از سرگیری مجدد میوز بستگی به هورمون‌های گنادوتروفینی دارد که موجب ترشح پروژسترون از سلول‌های فولیکول‌های تخمدانی می‌شود و اثر مستقیم بر بلوغ اووسیت دارد (۹). این تحریک هورمونی موجب شکسته شدن وزیکول ژرینال 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 شناخته شده است که شامل یک واکنش آگونیستی اولیه در سطح اووسیت می‌باشد که موجب بلوغ سیتوپلاسمی اووسیت و تحریک ادامه میوز می‌شود. از آنجایی که اغلب اووسیت‌های جمع‌آوری شده برای لقاح برون تنی از فولیکول‌های تابع نیستند اغلب تا مرحله بلاستوسیت نمی‌رسند (۱۱).

برخلاف بسیاری از دام‌های اهلی گوسفند تولیدمثل فصلی دارد ولی باین وجود 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 بر حسب عوامل مختلف فیزیولوژیک دام حاوی انواع مختلف فولیکول‌ها می‌باشند ولی تنها طیف بخصوصی از اووسیت‌های فولیکول‌های آسپیره شده برای لقاح برون تنی قابل استفاده هستند که تعداد این اووسیت‌های استحصالی در فصل‌های تولیدمثلی بیشتر از دیگر فصل‌هاست (۱۴). به منظور استحصال اووسیت از تخمدان

لقاح برون تنی^۱ روشی است که در آن سلول‌های تخمک بالغ از ماده گرفته شده و توسط اسپرم بارور می‌شوند. این روش اولین بار در حیوانات انجام گرفت و بعدها با مشاهده موفقیت‌های حاصل شده از این روش، انجام آن در انسان مورد توجه پزشکان قرار گرفت. تولد نخستین حیوان شبیه‌سازی شده 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 تولید شده‌اند. تولید جنین با استفاده از روش IVF و تزریق آن به رحم نشخوارکنندگان کوچک به منظور 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^۲، اختلاط چند جنین^۳، انجماد جنین، تشخیص جنسی و جداسازی اسپرم‌های X و Y

1- In Vitro Fertilization
2- cloning
3- chimera

اولیه رشد به منظور استفاده از آن در مطالعات مختلف مربوطه می‌باشد.

روش بررسی

تمامی ظروف یک‌بار مصرف استفاده شده 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 مورد استفاده در مطالعه حاضر از شرکت SIGMA (St. Louis, MO, USA) و تمام محیط‌های مورد استفاده از شرکت گیبکو خریداری شده بود و در غیر این صورت نام شرکت مربوطه و شماره کاتالوگ آن ذکر شده است. روش کار این پژوهش بر اساس مطالعات قبلی انجام شد (۲۲، ۲۱، ۱۶).

جمع‌آوری و کشت تخمک‌ها: تعداد ۱۴۰ تخمدان

گوسفند بالغ (سن ۱/۵-۴) در فصل پاییز بلافاصله بعد از کشتار دام در کشتارگاه صنعتی تبریز جمع‌آوری شده 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- 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 ۲-۸ میلی‌لیتری پیستون‌دار با سرسوزن شماره ۱۸ یک‌بار مصرف حاوی محیط آسپیراسیون در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد آسپیره شده و سپس COC های حاوی سیتوپلاسم گرانوله یکنواخت احاطه شده با بیش از دو لایه سلول‌های کومولوس انتخاب و پس از سه بار شست‌وشو در محیط شست‌وشو، به محیط مخصوص بلوغ اووسیت (جدول ۱) انتقال داده شدند (۱۶).

روش‌های آسپیره کردن، برش نازک و پانکسیون^۴ کل سطح تخمدان و بازیابی اووسیت از طریق سانترفیوژ^۵ 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 سنگین وزن گوشتی شیری با رنگ عمومی بدن قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره با تنوع رنگ قرمز و دنبه‌دار می‌باشد و پنیر معروف لبقوان 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 چاررفته و از یونجه و شبدر تغذیه کنند و در شرایط آب و هوایی سرد به صورت دستی با یونجه، ساقه و دانه جو تغذیه می‌شوند (۱۹) از جمله ویژگی‌های این نژاد تولید شیر و گوشت بالا می‌باشد. پرورش بره‌های پرواری یکی از مهم‌ترین منابع درآمد برای پرورش دهندگان 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. از آنجایی که 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 حاصل شده در مراحل

4- puncture

5- oocyte recovery via centrifugation (ORC)

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 سانتی گراد انکوبه گردید. در انتها میزان ۲ میکرولیتر از این مایع با غلظت نهایی 1×10^6 اسپرم در هر میلی لیتر به هر قطره محیط لقاح جنین اضافه گردید. مجموعه اسپرم و اووسیتها برای مدت ۶ ساعت در شرایط $37/5$ درجه سانتی گراد CO_2 ۶٪ و رطوبت ۹۰ درصد انکوبه شد و سپس عمل حذف سلولهای کومولوس احاطه کننده 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 می گردید و وضعیت رویانها به صورت روزانه در زیر استریومیکروسکوپ مورد ارزیابی قرار می گرفت (۱۶،۲۳).

ارزیابی لقاح و رشد و نمو زیگوت: در پستانداران مزرعه‌ای از جمله گاو و گوسفند و بز سیتوپلاسم اووسیت به شدت گرانونه است و مشاهده پرونوکلئوس نر و ماده بعد از لقاح آزمایشگاهی در زیگوت به راحتی امکان پذیر نمی باشد. بنابراین می توان از اولین کلیواژ به عنوان 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 می آید. 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 می گردید و پیشرفت رشد رویانها به صورت روزانه در زیر استریومیکروسکوپ مورد ارزیابی قرار می گرفت (۲۴).

تخمکهای جمع آوری شده بر اساس تعداد لایه سلولهای کومولوس اطرافشان دسته بندی 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 (به اصطلاح تخمکهای لخت).

در مجموع از میان ۳۳۸ تخمک جمع آوری شده ۲۰۱ تخمک با کیفیت خوب و متوسط از دسته اول و دوم برای بلوغ آزمایشگاهی^۶ 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 سانتی گراد و CO_2 ۶ درصد انجام گرفت (۲۲) که تعداد ۱۹۱ اووسیت علائم بلوغ را نشان دادند. پس از ۲۴ ساعت سلولهای اووسیتهای کشت شده از انکوباتور خارج شده و میزان پراکنده شدن کومولوس بررسی گردیده و برای اضافه شدن اسپرم به محیط کشت جنین (جدول ۲) انتقال یافت.

آماده سازی اسپرم و لقاح برون تنی: برای هر بار آزمایش تعداد دو عدد بیضه از گوسفندان نژاد قزل ذبح شده در کشتارگاه صنعتی تبریز اخذ شده و در فلاسک مخصوص حاوی سرم فیزیولوژی و آنتی بیوتیک در دمای ۳۲ درجه، با سرعت به آزمایشگاه انتقال می یافت. اسپرمهای تازه جدا شده از اپیدیدم گوسفند ذبح شده با استفاده از روش swim up جداسازی شد که مقدار ۲ میلی لیتر از مایع حاوی اسپرم داخل لوله ریخته و به آن به آن ۵ میلی لیتر محیط کشت HamsF10 اضافه گردید و سپس تمام نمونهها



تصویر ۱: قطره‌های محیط کشت در پلیت‌های مخصوص کشت جنین

جدول ۲: نوع و مواد مورد نیاز برای ساخت محیط کشت جنین‌های آزمایشگاهی

میزان مورد نیاز	نوع مواد
mM ۱/۷	NaCl
mM ۷/۱۶	KCl
mM ۱/۱۹	KH ₂ PO ₄
mM ۱/۷۸	CaCl ₂ .2H ₂ O
mM ۰/۳۹	NaH ₂ PO ₄
mM ۰/۷۴	MgSO ₄ .7H ₂ O
mM ۳/۳۰	Na-Lactate
mM ۰/۳۳	Na-Pyrovate
mM ۲/۰۵	L-Glutamine
۲۵	NaHCO ₃
%۲	BME amino acids
%۱	MEM amino acids
IU/mL ۱۰۰	Penicillin
μm/mL ۱۰۰	Streptomycin
mg/mL ۱۰۰	BSA

جدول ۱: نوع و مقدار مواد مورد نیاز جهت ساخت محیط بلوغ جهت بانگ سازی آزمایشگاهی کمپلکس-های اووسیت - کومولوس نابالغ

مقدار مورد نیاز	نوع مواد
ml ۹	TCM 199
μg/ml ۱۰	LH
μg/ml ۱۰	FSH
ml ۱	FBS
Mm ۰/۱	Cysteamine
μg/ml ۱	Esteradiol-17β
ng/ml ۱۰۰	EGF
Mm ۲/۵	Na pyruvate
μg/ml ۱۰۰	Pen -Strept

یافته‌ها

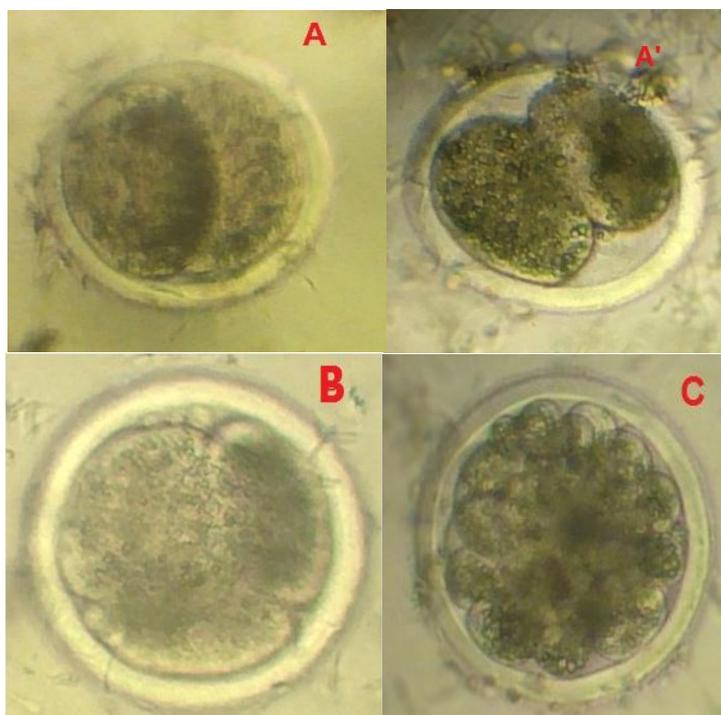
در این بررسی مجموعاً ۱۴۰ تخمدان گوسفند نژاد قزل بالغ برای استحصال اووسیت از کشتارگاه صنعتی تبریز جمع‌آوری شد و پس از اسپیره کردن فولیکول‌های بالغ تخمدانی تعداد ۳۳۸ اووسیت به دست آمد. از مجموع ۳۳۸ اووسیت استحصالی ۲۰۱ اووسیت باکیفیت خوب برای کشت تشخیص داده شد (جدول ۳). به دنبال کشت اووسیت‌ها ۱۹۱ عدد از 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 حاصل شده 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*

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

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



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

بحث و نتیجه گیری

تعیین میزان بلوغ اووسیت‌های به‌دست‌آمده از تخمدان‌ها به سائز فولیکول‌های تخمدانی بستگی دارد (۲۵) که در گوسفند فولیکول‌های با سائز ۱-۱/۵ میلی-متر ۵۰ درصد اووسیتها و در فولیکول‌های با سائز 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 سائز 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 قابل کشت تشخیص داده شدند.

میزان استحصال اووسیت از تخمدان در روش برش نازک و بازیابی اووسیت از طریق ساتریفیوژ نسبت به روش‌های آسپیره کردن و پانکسون سطحی تخمدان بیشتر است و همچنین تعداد اووسیت‌های باکیفیت خوب (درجه یک) در روش آسپیره کردن نسبت به دیگر روش‌ها کمتر و تعداد اووسیت‌های 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 گزارش شده است. در مطالعه‌ای که بر روی میزان و کیفیت اووسیت استحصالی از تخمدان بز انجام گرفته است نیز استفاده از روش برش نازک برای به دست آوردن اووسیت‌های باکیفیت خوب (درجه یک) توصیه شده است (۲۶).

دستیابی به حداکثر میزان لقاح اووسیت و تعداد رویان به عوامل مختلفی از جمله: روش استحصال اووسیت از

فولیکول‌های تخمدانی، سائز فولیکول‌ها، شرایط و محتویات محیط‌های مورد استفاده 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 اپیدیم از روش swim up برای آماده‌سازی اسپرم استفاده کردیم که از روش‌هایی است که باعث بهبود کیفیت اسپرم از لحاظ حرکت، غلظت و مورفولوژی می‌شود (۲۷). بر اساس ترکیبات محیط‌های کشت مختلف میزان بلوغ اووسیت، رشد و تقسیم سلولی رویان گوسفند متفاوت گزارش شده 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 اووسیتی، 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 مورد نیاز باعث کاهش درصد لقاح و استفاده از غلظت‌های بالا باعث پلی‌اسپرمی می‌شود (۳۳). در مطالعه ما از غلظت

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 ۱ و ۲) 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 مشاهده شده 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. با این وجود بازده این روش در گوسفند نسبت به دیگر پستان داران مزرعه شرایط مطلوبی را از لحاظ تولید رویان‌های آزمایشگاهی و انجام مطالعات مربوطه فراهم می‌سازد.

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

میزان بلوغ اووسیت‌های گاو در لقاح برون تنی ۵۵ تا ۸۳ درصد و در گاو میش ۶۷/۵۲ تا ۸۲/۰۸ درصد گزارش شده است (۳۰،۳۴،۳۵). این میزان در گوسفند ۵۲/۴۴ تا ۸۵/۲۰ درصد گزارش شده 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 قابل کشت، میزان بلوغ اووسیت‌های استحصالی برابر با ۹۵/۰۲ درصد بود که بیشتر از حداکثر مقدار گزارش شده می‌باشد.

میزان لقاح اووسیت‌های بالغ شده در گاو ۷۰ درصد و در گاو میش ۲۲ تا ۵۵ درصد گزارش شده است (۳۰،۳۵) میزان لقاح برون تنی اووسیت‌های استحصالی از فولیکول‌های با سایزهای مختلف در گوسفند ۷۶/۶۵ تا ۷۹/۵۴ گزارش شده است (۳۵) و حداکثر میزان توانایی اسپرم در بارورسازی اووسیت گوسفند و بز ۸۵٪ گزارش گردیده است (۳۷). در تحقیق ما میزان لقاح برون تنی ۷۸/۰۱ درصد بود و تقریباً نزدیک به حداکثر میزان گزارش شده است. احتمالاً دلیل اندک درصد پایین لقاح نسبت به حداکثر میزان لقاح گزارش شده،

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.

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 harvesting techniques on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. *Small Rumin Res*. 2000; 36(1): 63-7.
16. Dadashpour Davachi N, Zeinoaldini S, Kohram H. A novel ovine oocyte recovery method from slaughterhouse material. *Small Rumin Res*. 2012; 106(2-3): 168-72.
17. Atlas of Iran National Livestock: Plan and Budget Organization. National Cartographic Publishing. 2008: 52 (Persian).
18. Khaldari M. The principles of breeding sheep and goats. Publications SID of Tehran. 2003 (Persian).
19. Nourian E. Estimation genetic parameters for perweaning in ghezel sheep. 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, Sastry Yarla N, Thomas VM, Palni Samy 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 Gorgan Uni 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 fertilization. *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

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, Jaikani 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 vitro maturation, 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. Khodaei Motlagh M, Zareh Shahne 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

Original paper

The Evaluation of in vitro fertilization and early embryonic development in ghezel sheep**Ali Golchin¹, Reza Asadpour², Leila Roshangar³, Parisa Kangari⁴**

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.