



مقایسه کیفیت اوسیت های بدست آمده از تخمدان-

های کشتارگاهی و اوسیت های بدست آمده از دام

زنده (OPU) در تولید آزمایشگاهی رویان

افشین سیفی جمادی^۱، حمید کهرام^{۲*}

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی دام دانشگاه تهران

۲. استادیار بخش فیزیولوژی دام گروه علوم دامی دانشگاه تهران

چکیده

تخمدان های گوساله ماده در بدو تولد، حاوی حدود صد هزار فولیکول اولیه است. هر یک از این فولیکول ها بالقوه توانایی آن را دارند که در دوران بازدهی تولیدمثلی حیوان رشد کنند و لقاح یابند و به نوزاد تبدیل شوند. در عین حال، حدود ۹۹/۹ درصد این فولیکول ها در شرایط طبیعی تولیدمثل تحلیل رفته، از بین می روند. تنها حدود یک درصد آن ها می توانند مراحل رشد را طی کنند و از میان این درصد ناچیز، تنها تعداد انگشت شماری لقاح می یابند و نهایتاً به نوزاد تبدیل می شوند. تکنیک هایی که در جهت افزایش راندمان گوساله دهی گاو قابل استفاده است می توان موارد زیر را نام برد.

وادار کردن گاو به تخمک گذاری چند تایی و تولید همزمان چندین جنین

- نصف کردن جنین های تولید شده و تولید نوزاد پس از انتقال هر یک از نیمه های جنین
- تولید جنین های آزمایشگاهی با استفاده از تخمک های موجود در تخمدان های گاوهای کشتار شده
- برداشت تخمک از تخمدان های گاو زنده و تولید جنین های آزمایشگاهی
- انبوه سازی جنین از طریق تفکیک سلول های یک جنین چند روزه و استفاده از هر یک از سلول ها برای تولید یک جنین دیگر
- تعیین جنسیت جنین و تولید نوزاد با جنسیت از پیش تعیین شده

- انتقال ژن مطلوب به داخل ژنوم جنین و تولید دام های اصلاح شده ژنتیکی
- انجماد جنین تولید شده و انتقال آن ها به دام های گیرنده در زمان ها و مکان های متفاوت.

تکنیک اووسیت گیری از حیوان زنده عمدتاً در گاو متداول شده است و هدف آن بر مبنای افزایش راندمان گوساله دهی گاوهایی با توانایی ژنتیکی بالا است که توانایی تولید جنین را به هر دلیلی از دست داده اند ولی تخمدان های آن ها هنوز فعال بوده و قادر به عرضه تخمک برای تولید جنین های آزمایشگاهی هستند. این گونه گاوها معمولاً نازا تلقی شده و روانه کشتارگاه می شوند و حداکثر کاری که قبلاً در مورد آن ها صورت می گرفت، جمع آوری تخمدان های آن ها پس از کشتار بود تا بتوانند فولیکول های موجود در سطح تخمدان ها را برای تولید جنین های آزمایشگاهی مورد استفاده قرار دهند. با روی کار آمدن تکنیک اووسیت گیری از گاو زنده (Ovum Pick-Up)، ضرورت کشتار گاوهای نازا که از توانایی ژنتیکی بالایی برخوردار بودند، از بین رفت و امکان جمع آوری مرتب تخمک از تخمدان حیوان زنده فراهم شد و از این طریق، راندمان تولید جنین گاو به میزان قابل توجهی افزایش یافت.

مقدمه

تخمدان ها در زمان تولد دارای تعداد زیادی اووسیت هستند که در فولیکول های تخمدانی قرار گرفته اند. بسیاری از این فولیکول ها پس روی می کنند و تنها شمار اندکی از آن ها به گامه تخمک ریزی می رسند. این اووسیت ها، منبع خوبی برای تولید برون تنی رویان می باشند. اگر چنین اووسیت هایی به جای اینکه با تحریک هورمونی و افزایش شمار تخمک ریزی لقاح یابند و رویان های تولید شده از رحم بیرون آورده شوند، مستقیماً از تخمدان ها بیرون آورده شوند، می توان شمار قابل توجهی اووسیت را پی در پی از تخمدان ها گرفت و در تولید برون تنی رویان استفاده کرد. در این صورت امکان تولید رویان از دام های بسیار جوان نیز امکان پذیر است. همچنین با این روش می توان به بررسی مشکلات آبستنی و پیامدهای آن پرداخت. برای نمونه در این روش می توان از گاوهایی که بعد از سه یا چهار بار تلقیح یا بیشتر، آبستن می شوند و گاوهایی که ناهنجاری های رشد و تکامل اووسیت دارند،



به دلیل مشکلات تولید مثلی از گله‌ها حذف می‌شوند. استفاده از تخمدان‌های آن‌ها برای تولید رویان‌های آزمایشگاهی، یک روش برای حفظ ذخایر ژنتیکی محسوب می‌شود (۶).

اووسیت‌گیری از تخمدان‌های کشتارگاه

برای تولید رویان از اووسیت‌های تخمدان‌های حاصل از کشتارگاه لازم است روش‌هایی بهبود یابد که در آن‌ها دریافت اووسیت‌ها از تخمدان آسان‌تر باشد. تعداد اووسیت‌های گرفته شده از هر تخمدان با روش‌های مختلف اووسیت‌گیری، متغیر خواهد بود. روش‌های مختلفی که برای اووسیت‌گیری از تخمدان‌های کشتارگاهی وجود دارد، در زیر توضیح داده شده است.

قطعه‌قطعه کردن فولیکول‌ها^۴

این روش، اولین روش استفاده شده برای جمع‌آوری اووسیت‌ها از تخمدان بوده است. در این روش پراکنده شدن سلول‌های کومولوس اطراف اووسیت هنگام جمع‌آوری حداقل است. در این روش فولیکول‌های غیر آترزی تشخیص داده می‌شوند، که از ویژگی‌های این فولیکول‌ها ظاهری روشن، نیمه شفاف، دارای شبکه مویرگی گسترده و دارای لایه سلول‌های گرانولوزا در داخل فولیکول است. در مقابل فولیکول‌های آترزی دارای ظاهری تیره و شبکه مویرگی فقیرتری هستند. بایستی در نظر داشت که فولیکول‌ها در مراحل اولیه آترزی شدن، ممکن است اووسیت‌هایی با قابلیت رشد و نمو^۵ بالاتری نسبت به روش اسپیره تولید کنند. در این روش با پاره شدن فولیکول، کمپلکس کومولوس- اووسیت‌ها^۶ در محیط پتری دیش آزاد می‌شوند (۶، ۴).

فن آوری اسپیره کردن^۵

اووسیت‌گیری از تخمدان‌های گاوی حاصل از کشتارگاه از طریق اسپیره کردن فولیکول‌های آنترال با استفاده از وسایل مختلف (پپیت، سرنگ و...) معمولی‌ترین روش به کار برده شده است. یکی از مشکلات اولیه این روش این است که ممکن است فقط ۳۰-۶۰٪ اووسیت‌ها از فولیکول‌ها گرفته شوند و این تفاوت مشخص اسپیره با قطعه‌قطعه کردن فولیکولی

استفاده کرد. این روش به ویژه برای تولید موجودات ترانس ژنیک کاربرد دارد.

در اوایل به منظور تولید رویان‌های گاوی در آزمایشگاه از اووسیت‌های جمع‌آوری شده از تخمدان‌های کشتارگاهی استفاده می‌شد. در صورتی که این اووسیت‌ها از لحاظ ژنتیکی برای برنامه‌های اصلاح نژادی مفید نیستند. کاربرد عملی تولید برون تنی رویان‌ها بستگی به تعداد اووسیت‌های نابالغ جمع‌آوری شده به ویژه از گاوهایی با توانایی ژنتیکی بالا دارد. در صورتی که این اووسیت‌ها به طور مکرر از یک حیوان، در یک دوره حداقل چند ماهه جمع‌آوری شوند، تعداد آن‌ها افزایش خواهد یافت. در یک مطالعه‌ای از یک گاو ۱۳ اووسیت مناسب در یک هفته بدست آمد و نرخ تولید بلاستوسیت‌های ماندنی ۱۶٪ بود و در کل ۲/۱ رویان از یک گاو در یک هفته بدست آمد. با گرفتن اووسیت‌ها به مدت ۶ ماه از یک گاو با توانایی ژنتیکی بالا بیش از ۵۰ رویان از این گاو تولید می‌شود که چهار برابر بیشتر از حالتی است که رویان‌ها در خود حیوان با ایجاد سوپراوولاسیون تولید می‌شوند. در کشورهای پیشرفته تقریباً ۱۰٪ رویان‌ها در صنعت انتقال جنین از طریق تکنولوژی آزمایشگاهی تولید می‌شوند (۷).

روش‌های اووسیت‌گیری

فن آوری استحصال اووسیت بر طبق اینکه اووسیت‌گیری قبل یا بعد از تخمک‌گذاری انجام شود و یا اینکه جمع‌آوری اووسیت‌ها از حیوانات کشته شده و یا از گاوهای زنده به صورت پی در پی یا فقط یک بار انجام شود، متفاوت خواهد بود. در اووسیت‌گیری از گاوهای زنده دو روش وجود دارد. یک روش این است که گاوها تخمدان‌برداری^۱ شوند و راه دیگر به دست گرفتن تخمدان‌ها از طریق رکتوم و استفاده از اولتراسوند برای اووسیت‌گیری و یا از طریق لاپاراسکوپی است در حالت تخمدان‌برداری، تخمدان‌ها از گاوهایی برداشته می‌شوند که هویت آن‌ها کاملاً شناخته شده است و از لحاظ توانایی ژنتیکی برتر هستند. ولی تخمدان‌هایی که از کشتارگاه جمع‌آوری می‌شوند این شرایط را ندارند. گزارش شده که سالیانه دو میلیون گوساله و گاو شیری با توانایی ژنتیکی بالا

^۴ - Cumulus- oocyte complexes (COCs)

^۵ - Aspiration

^۱ - Ovariectomy

^۲ - Dissection

^۳ - Developmental of competence



سرسوزن می‌کشند. مشکلات مربوط به جراحی و عوارض ناشی از عمل جراحی نظیر، تورم صفاق^۹ و غیره موجب می‌شود که این روش اووسیت‌گیری چندان مورد استقبال قرار نگیرد. در اووسیت‌گیری به روش لاپاراسکوپی^{۱۰}، از بروز بخش اعظم مشکلاتی که در اووسیت‌گیری از طریق جراحی دیواره شکم وجود دارد، پرهیز می‌شود. این روش به وسیله بسیاری از محققان مورد استفاده قرار گرفته و نتایج مطلوبی نیز در بر داشته است. در عین حال، بدن گاو در محل سوراخ‌هایی که برای عبور دادن لوله‌های لاپاراسکوپ در دیواره شکم حیوان ایجاد می‌شود، واکنش نشان داده، عوارضی مانند تورم صفاق ایجاد می‌شود. لذا این روش نیز چندان کاربرد عمومی نمی‌یابد و بیشتر در تحقیقات به کار می‌رود. روش جراحی دیگری نیز وجود دارد که برای اسب به کار می‌رود و در گاو نیز قابل استفاده است. در این روش، شکافی در دیواره مهبل ایجاد می‌شود تا بتوان دستی را از طریق مهبل وارد حفره صفاق نمود. سپس تخمدان را با دست گرفته و به دیواره شکم در ناحیه تهیگاهی تکیه می‌دهند. از بیرون بدن نیز سوراخی در تهیگاه ایجاد می‌کنند تا بتوانند تخمدان را از طریق آن سوراخ رویت کرده، فولیکول‌های سطحی آن را شناسایی کنند و تخمک را از داخل آن خارج کنند. این روش نیز عوارضی مانند تورم صفاق را در پی دارد (۸).

اووسیت‌گیری از ناحیه تهیگاه را می‌توان به کمک اولتراسونوگرافی نیز انجام داد (۵). در این روش، ضمن آن که راندمان اووسیت‌گیری بالا است، عوارض جراحی نیز به حداقل می‌رسد. در اووسیت‌گیری با اولتراسونوگرافی، تخمدان را از طرق توشه رکتال به طرف تهیگاه می‌کشاند و مقید می‌کنند، تا بتوانند تصویر فولیکول‌های سطح تخمدان را روی صفحه مشاهده کنند. سپس سرسوزنی که در التراسونوگرافی تعبیه شده و به یک مکنده وصل است، در فولیکول‌ها فرو می‌برند تا محتویات آن‌ها را آسپیره کنند. در این روش، گاو را بی‌حسی خارج سخت شامه‌ای یا بی‌حسی نخاعی^{۱۱} می‌دهند. میانگین راندمان اووسیت‌گیری در این روش حدود ۴۲ درصد (۴۲) تخمک از هر صد فولیکول آسپیره شده) است.

است که در آن ممکن است ۱۰۰٪ اووسیت‌ها از فولیکول‌ها گرفته شوند. اووسیت‌های حاصل از آسپیره از نظر کیفیت در سطح پایینی قرار دارند. مزیت این روش در سرعت عمل اپراتور است که آن را سریع انجام می‌دهد و این در یک مرکز تولید رویان تجاری مهم می‌باشد. با این وجود توجه به کیفیت اووسیت خیلی مهم است.

فن آوری لایه لایه کردن (اسلایس) تخمدان^۶

فن آوری اسلایس یا به طور مستقیم بر روی تخمدان‌های دست نخورده انجام می‌گیرد یا بعد از آسپیره کردن، دوباره اسلایس بر روی همان تخمدان آسپیره شده انجام می‌گیرد. بعضی محققان سه برابر افزایش در تعداد اووسیت‌ها را در حالت اسلایس در مقایسه با حالت آسپیره گزارش کردند.

تخمدان‌های کشتارگاه

روش‌های اووسیت‌گیری از تخمدان‌ها به منظور تولید جنین، براساس منابع تخمدانی متفاوت است. اووسیت‌هایی که از تخمدان‌های کشتارگاهی بدست می‌آیند لازم است که قبل از شروع بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌ها^۷، به زمان و دمای کار با تخمدان توجه شود و اگر اووسیت‌ها از گاوهای زنده حاصل شوند در این صورت مقداری تفاوت در شروع بلوغ آزمایشگاهی وجود دارد.

اووسیت‌گیری از گاوهای زنده^۸

در سال‌های اخیر چندین فن آوری جدید در تولیدمثل گاو شناخته شده و با شروع برنامه‌های IVF، نیاز به اووسیت‌هایی با کیفیت بالا افزایش یافته است. از طریق فن آوری MOET کمتر از صد رویان در طول عمر یک گاو می‌توان تولید کرد اگر چه ممکن است صد هزار اووسیت در تخمدان گاو وجود داشته باشد. در صورتی که بیشتر این اووسیت‌ها تبدیل به رویان گردند در برنامه‌های اصلاح گاو شیری تاثیر به‌سزایی خواهد داشت.

اووسیت‌گیری از گاو زنده به طرق مختلف امکان‌پذیر است. در جراحی دیواره شکم، تخمدان‌ها را پس از باز کردن دیواره شکم در معرض دید قرار می‌دهند و محتویات فولیکول‌هایی را که در سطح تخمدان قابل رویت هستند، با سرنگ و

^۹ - Peritoneal Infection

^{۱۰} - Laparoscopy

^{۱۱} - Epidural

^۶ - Slicing

^۷ - In vitro Maturation (IVM)

^۸ - Ovum Pick up (OPU)



توانایی‌های متفاوت می‌باشند. در شکل (۵) منبع اووسیت در سیستم‌های مختلف تولید رویان نشان داده شده است (۸). (۹).

فاکتورهای موثر بر کیفیت اووسیت‌های گرفته شده

یکی از مسائل مهم در تولید برون تنی رویان، توانایی اووسیت در طی کردن مراحل باروری و رشد و تکامل و تبدیل به رویان است. در حقیقت پایه و اساس در تولید برون تنی رویان اووسیت است که باید از قابلیت رشد و نمو بالا و کیفیت خوبی برخوردار باشد. بعضی ویژگی‌ها در رابطه با ناتوانی اووسیت و ضعیف بودن آن در اوایل پروسه تولید رویان قابل مشاهده هستند در حالیکه بعضی از این ویژگی‌ها ممکن است تا مرحله باروری اووسیت معلوم نباشد. فاکتورهای زیادی، کیفیت اووسیت را تحت تاثیر قرار می‌دهند و راه‌های زیادی برای افزایش کیفیت اووسیت وجود دارد (۹).

شکل (۱) منابع اووسیت در سیستم‌های مختلف تولید رویان

سن حیوان

کیفیت اووسیت‌های گرفته شده از حیوانات خیلی جوان و پیر در چندین گونه بررسی شده‌اند. کاهش تدریجی در قدرت باروری انسان، با افزایش سن یک پدیده کاملاً مشخص است، اما در مورد تولید برون تنی رویان از اووسیت‌های گاو، اووسیت‌های تلپسه‌های جوان پیش از بلوغ نسبت به اووسیتی که از گاوهای نابالغ گرفته می‌شود، کارایی کمتری دارد. اگر چه فولیکول‌های آنترال در تخمدان گوساله‌های تازه متولد شده دارای اووسیت‌های رشد یافته هستند، اما تولید برون تنی رویان با استفاده از این اووسیت‌ها ناامید کننده است (۲).

مراحل مختلف چرخه استروس و مورفولوژی

تخمدانی

تعداد فولیکول‌ها و کیفیت اووسیت‌ها در طی مراحل مختلف سیکل فحلی گاو مورد مطالعه قرار گرفتند. در آزمایشی اووسیت‌های با کیفیت بالا از تخمدان‌هایی بدست آمده‌اند که در فاز لوتئال قرار داشتند و دارای جسم زرد بودند و نشان داده شده که وقتی اووسیت‌ها در روزهای ۱۶-۱۴ چرخه فحلی، از گاوها گرفته می‌شوند، درصد زیادی از این اووسیت‌ها

مقایسه منابع اووسیت‌های استفاده شده در تکنولوژی رویان

چرخه استروس گاو شامل دو یا سه موج فولیکولی است که هر یک از موج‌ها با افزایش غلظت FSH در سرم شروع به رشد و توسعه می‌کنند. افزایش غلظت FSH رشد یک گروه از فولیکول‌های بزرگتر از ۳ میلی‌متر و وابسته به FSH را شروع می‌کند. موج اول در روز یک چرخه فحلی شروع می‌شود در طول ۳ روز بعدی فولیکول‌های اولیه و فولیکول‌های دیگری که به مرحله ۳ میلی‌متری رسیده‌اند به رشد خود ادامه می‌دهند و یک جمعیت فولیکولی ۸-۴ میلی‌متری را در روز سوم چرخه بوجود می‌آورند. در این مرحله یک فولیکول بزرگتر رشد کرده (فاز رشد) و از رشد فولیکول‌های کوچکتر جلوگیری می‌کند. در روز ششم، فولیکول غالب به حداکثر اندازه خود می‌رسد و دو الی چهار روز دیگر در این اندازه باقی می‌ماند تا این مرحله کامل شود (فاز فولیکول غالب). در این مرحله اگر دام در دوره فولیکولی بوده و میزان پروژسترون در خون در حداقل باشد پالس‌های LH افزایش یافته و با سرژ آن تخمک‌گذاری انجام می‌گیرد و اووسیت آزاد شده لقاح یافته به رویان تبدیل می‌شود. ولی اگر دام در دوره لوتئال باشد جسم زرد فعال و میزان پروژسترون بالا باشد فولیکول غالب دوره آترزی خود را شروع کرده و با افزایش FSH در خون موج جدید فولیکولی آغاز می‌شود. در تکنولوژی رویان اووسیت‌هایی که به منظور تولید رویان استفاده می‌شوند از فولیکول‌هایی به دست می‌آیند که این فولیکول‌ها اندازه‌های مختلفی داشته و در مراحل مختلف موج فولیکولی قرار دارند. واضح است که به دلیل تنوع و ناهمگنی این اووسیت‌ها رویان‌هایی که از این اووسیت‌ها بدست می‌آیند در مقایسه با حالت طبیعی از کیفیت و بهینه کمتری برخوردارند. انجام OPU به صورت پی در پی منجر به حذف فولیکول‌های غالب و آترتیک می‌شود بنابراین اووسیت‌های استفاده شده در تکنیک OPU-IVP نسبت به MOET از همگنی بیشتری برخوردارند. در روش استحصال اووسیت از تخمدان‌های کشتارگاهی تمامی فولیکول‌هایی که در سطح تخمدان قابل مشاهده هستند آسیب‌پذیر می‌شوند، با توجه به این که این فولیکول‌ها در مراحل رشد متفاوتی قرار دارند دارای



که علت آن احتمالاً به دلیل سطوح پروژسترون بالا در گردش خون گاوهای آبستن است.

فاکتورهای حیوانی

پیشنهاد می‌شود که شایستگی ژنتیکی گاوهای شیری، بر روی کیفیت اووسیت‌ها تأثیر دارد. گاوهایی با شایستگی بالا نسبت به گاوهایی با شایستگی ژنتیکی متوسط، اووسیت‌هایی با کیفیت پایین‌تر تولید می‌کنند.

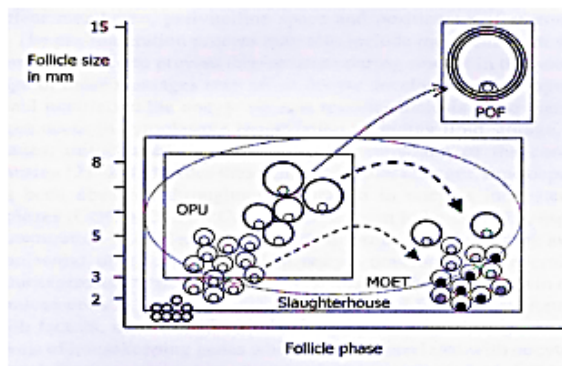
فاکتورهای محیطی

مشخص شده که استرس گرمایی در تابستان بر روی کیفیت اووسیت‌ها ممکن است تأثیر منفی داشته باشد، حتی اگر حیوان تحت استرس گرمایی طولانی قرار نگیرد و در طی ماه‌های سرد نیز باروری کاهش یابد.

منابع

- ۱- ضمیری، م.ج. ۱۳۸۵. فیزیولوژی تولید مثل. چاپ اول، ص ۳۲۳.
- 2) Duby, R.T., Damiani, P., Looney, C.R., Long, C.R., Balise, J.J. and Robl, J.M. 1996 Prepubertal calves oocyte donors: promise and problems. *Theriogenology*. 121-130.
- 3) Fazio, R.A., Hockett, M.E., Edwards, J.L., Rohrbach, N.R. and Schrick, F.N. 1999 Effect of body condition and /or pregnancy status on developmental potential of bovine oocytes. *Theriogenology*. 51:223.
- 4) Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R. and Lazzari, G. 2001. Embryo production by Ovum pick up from live donors. *Theriogenology*. 55:1341-1357.
- 5) Garcia, A. and Sallahadin, M. 2000 Ultrasonic morphology of the corpora lutea and central luteal cavities during selection of recipients for embryo transfer. *Reproduction in Domestic Animals*. 35:113-118.
- 6) Gordon, I. 2003 laboratory production of cattle embryos, 2nd edition. CAB International publishing, Wallingford, pp
- 7) Kruij, Th.A.M., Boni, R., Wurth, Y.A., Roelofsen, M.W.M. and Pieterse, M.C. 1994 Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 47:675-684.

تا مرحله بلاستوسیت رشد می‌کنند ولی اووسیت‌هایی که در روزهای ۷-۹ و ۱۹-۲۰ و یا در روز دوم چرخه فحلی گرفته شده بودند از قابلیت کمتری برخوردار بودند.



عوامل تغذیه‌ای و شرایط بدنی

تخمندان گاوهای لاغر دارای فولیکول‌های کوچک کمتری نسبت به گاوهایی با شرایط بدنی خوب هستند و پیشنهاد می‌شود که گاوهایی با شرایط بدنی خوب برای اووسیت‌گیری انتخاب شوند. نسبت اووسیت‌های با کیفیت خوب در گاوهایی با نمره بدنی^۱ نسبت به گاوهایی با نمره بدنی ۲-۳ پایین‌تر گزارش شده است (۳). واضح است که تغذیه اثراتش را در طی ظرفیت داشتن اووسیت برای رشد و نمو و در همان اوایل رشد و نمو رویان می‌گذارد و برای انجام تولیدمثلی با راندمان بالا، احتیاجات غذایی باید تامین شود و مقدار هر یک از ترکیبات جیره مخصوصاً در گاوهای پرتولید بالانس شود. همچنین مصرف غذایی بالا یا متابولیسم بیشتر در گاوهای پرتولید ممکن است قابلیت رشد و نمو نرمال اووسیت‌ها و برقراری آبستنی را به مخاطره اندازد. و مشخص شده که جیره‌های با پروتئین بالا منجر به افزایش سطوح آمونیاک و اوره در گاوهای شیری شده و ممکن است به عنوان یک فاکتور برای کاهش باروری اغلب حیوانات محسوب شود.

وضعیت تولیدمثلی گاوهای دهنده

نشان داده شده که از گاوهای آبستن نسبت به گاوهای سیکلیک می‌توان تعداد زیادی اووسیت با کیفیت بالا گرفت.

^۱ - Body condition