بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه شهید چمران اهواز
دانشکده دامپزشکی

۹۳۵۸۹۶۲

پایان‌نامه دکترای عمومی دامپزشکی

عنوان:

تاثیر کلسترول بارگذاری شده بر سیکلودکسترین بر پاسخ شیشه‌ای شدن اسپرم اپیدیدیمی گربه

اساتید راهنما:

دکتر فرید براتی

دکتر قدرت‌اله محمدی

استاد مشاور:

دکتر بهمن مصلی‌نژاد

نگارش:

مریم رهبر

شهریورماه ۱۳۹۳

چهلمین سالگرد تأسیس دانشکده دامپزشکی اهواز گرامی‌باد

بسمه تعالی

دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده دامپزشکی

(نتیجه ارزشیابی پایان نامه‌ی دکتری عمومی)

پایان‌نامه‌ی خانم **مریم رهبر** دانشجوی رشته: **دامپزشکی** از دانشکده دامپزشکی به شماره دانشجویی: **۸۷۵۸۲۲** تحت عنوان: **تاثیر کلسترول بارگذاری شده بر سیکلودکسترین بر پاسخ شیشه‌ای شدن اسپرم اپیدیدیمی گربه** ، جهت اخذ مدرک: **دکتری عمومی دامپزشکی** در تاریخ: **۱۳۹۳/٦/۲۵** توسط هیأت محترم داوران مورد ارزشیابی قرار گرفت و با درجه: **ممتاز** به تصویب رسید.

	اعضای هیأت داوران	مرتبه علمی	سمت	امضا
	دکتر فرید براتی	دانشیار	استاد راهنمای اول	
	دکتر قدرت‌اله محمدی	استادیار	استاد راهنمای دوم	
	دکتر بهمن مصلی‌نژاد	دانشیار	استاد مشاور	
	دکتر سعد گورانی‌نژاد	استاد	استاد داور	
	دکترسیدرضا فاطمی طباطبایی	دانشیار	استاد داور	
	دکتر محمد راضی جلالی	استاد	استاد ناظر	
۲	دکتر مهرزاد مصباح	دانشیار	مدیر گروه	
۳	دکترمحمدحسین‌راضی جلالی	دانشیار	معاون پژوهشی دانشکده	
٤	دکتر عبدالرحمن راسخ	استاد	مدیر تحصیلات تکمیلی دانشگاه	

گواهی صحت و اصالت

عنوان پایان‌نامه: **تاثیر کلسترول بارگذاری شده بر سیکلودکسترین بر پاسخ شیشه‌ای شدن اسپرم اپیدیدیمی گربه**

اینجانب **مریم رهبر** دانشجوی دکترای عمومی رشته‌ی دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران به شماره دانشجویی**۸۷۵۸۲۲** تحت راهنمایی **دکتر فرید براتی** و **دکتر قدرت‌اله محمدی** و مشاوره **دکتر بهمن مصلی‌نژاد** ، گواهی می‌دهم که:

۱- تحقیقات ارائه شده در این پایان‌نامه حاصل مطالعات علمی و عملی شخص اینجانب بوده و صحت و اصالت تمام مطالب مندرج در آن را تایید می‌کنم.

۲- در صورت استفاده از آثار دیگران، مشخصات کامل آن‌ها را در منابع ذکر نموده‌ام.

۳- تاکنون مطالب درج شده در این پایان‌نامه، توسط اینجانب یا شخص دیگری به منظور اخذ هر نوع مدرک یا امتیازی به هیچ مرجعی تسلیم نشده و بعد از این نیز نخواهد شد.

٤- در تدوین متن پایان نامه، شیوه‌نامه مصوب دانشکده را رعایت نموده‌ام.

۵- کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه شهید چمران تعلق داشته و مقالات مستخرج از آن، ذیل نام دانشگاه شهید چمران اهواز (Shahid Chamran University of Ahvaz) به چاپ خواهد رسید.

٦- حقوق معنوی تمامی افرادی که در این پایان‌نامه تاثیرگذار بوده‌اند (اساتید راهنما و مشاور) در مقالات مستخرج از آن رعایت خواهد شد.

۷- در صورت استفاده از موجودات زنده یا بافت‌های آن‌ها، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مندرج در منشور موازین و اصول اخلاق پژوهش وزارت علوم، تحقیقات و فناوری رعایت شده است.

در صورت اثبات تخلف از مندرجات فوق، مسئولیت هر گونه پاسخگویی به اشخاص حقیقی و حقوقی و مراجع ذیصلاح بر عهده اینجانب بوده و دانشگاه شهید چمران هیچ مسئولیتی بر عهده نخواهد داشت. همچنین در صورت تضییع حقوق و منافع دانشگاه، حق پیگیری موضوع در مراجع ذیصلاح و اعمال قوانین مربوطه برای دانشگاه شهید چمران در حال و آینده محفوظ بوده و اینجانب مسئول پرداخت کلیه خسارات وارده خواهم بود.

۱۳۹۳/٦/۲۵

مریم رهبر

مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه‌ی حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه شهید چمران تعلق داشته و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل واگذاری به غیر نیست. استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

این پایان نامه را در کمال افتخار تقدیم می نمایم به:

پدر

و

مادر عزیزم ، به پاس خوبی هایشان....

تقدیم به همسرم، دوستی همراه، همراز، صبور و پشتیبان در تمام

لحظات زندگی

تشکر و سپاس

پروردگارا،

هر چه دارم از لطف و مهربانی توست و خوب می‌دانم که هیچ‌گاه نمی‌توانم سپاسگذار این همه خوبی تو باشم، اما تو با لطف بی‌پایان خود سپاس مرا بپذیر، ای مهربان دوست داشتنی.

اکنون که به لطف خداوند مهربان این تحقیق به پایان رسیده برخود لازم می‌دانم از همه عزیزانی که مرا در انجام آن یاری نموده‌اند، تقدیر و تشکر نمایم.

از اساتید راهنما، جناب آقای دکتر **براتی** و جناب آقای دکتر **محمدی** که همواره با راهنمایی‌های ارزنده مرا مرهون لطف و محبت خود قرار داده‌اند و همچنین استاد مشاور جناب آقای دکتر **مصلی نژاد** کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از اساتید محترم جناب آقای دکتر **گورانی نژاد** و جناب آقای دکتر **فاطمی طباطبایی** که زحمت داوری این پایان نامه را تقبل کردند و جناب آقای دکتر **راضی جلالی** نماینده تحصیلات تکمیلی، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

همچنین تقدیر و تشکر می کنم از کلیه اساتید محترمی که در طول این دوره تحصیلی افتخار شاگردیشان را داشتم.

عنوان **فهرست**

صفحه

چکیده..... ۱

فصل اول- مقدمه و هدف..... ۳

فصل دوم- مروری بر منابع..... ۹

الف- ویژگی‌های تولید مثلی در گربه‌سانان..... ۱۱

ب- فن‌آوری‌های کمکی تولید مثل در گربه‌سانان..... ۱۳

ج- تخمک..... ۱۵

ج-۱- ارزیابی تخمک..... ۱۵

ج-۲- بلوغ تخمک..... ۱۶

ج-۳- بلوغ آزمایشگاهی تخمک..... ۱۷

ج-۳-۱- فاکتورهای موثر بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک..... ۱۷

ج-۳-۲- روش استحصال..... ۱۸

ج-۳-۳- محیط‌های کشت بلوغ آزمایشگاهی تخمک..... ۱۸

د- اسپرم..... ۱۹

د-۱- ارزیابی اسپرم ۱۹
د-۲- بلوغ اسپرم ۲۱

عنوان **فهرست**

صفحه

د-۳- جمع آوری اسپرم ۲۲
د-۳-۱- جمع آوری اسپرم پس از مرگ ۲۲
د-۳-۲- جمع‌آوری اسپرم در شرایط طبیعی ۲۳
هـ- لقاح آزمایشگاهی ۲٤
هـ-۱- محیط‌های لقاح آزمایشگاهی ۲٤
و- کشت آزمایشگاهی رویان ۲۵
و-۱- محیط‌های کشت آزمایشگاهی رویان گربه ۲۵
ز- انجماد ۲٦
ز-۱- سرمامحافظ‌ها ۲٦
ز-۱-۱- مکمل‌های محلول سرمامحافظ ۲۸
ز-۲- تکنیک‌های مختلف انجماد ۲۹
ز-۲-۱- انجماد آهسته ۲۹
ز-۲-۲- انجماد سریع ۳۰

ز-۲-۳- شیشه‌ای شدن ۳۱

عنوان **فهرست**

صفحه

ز-۲-۳-۱- مزایا و معایب شیشه‌ای شدن ۳۲

ز-۳- اثر کلسترول بر انجماد اسپرم ۳۲

ز-۳-۱- اضافه کردن کلسترول به غشاء سلول با استفاده از سیکلودکسترین ۳٤

ز-۳-۱-۱- تاریخچه‌ی استفاده از کلسترول بارگذاری شده بر سیکلودکسترین در انجماد اسپرم ۳۵

فصل سوم- مواد و روش کار ۳۷

الف- مواد و وسایل استفاده شده ۳۹

الف-۱- مواد ۳۹

الف-۲- وسایل ٤۰

ب- آماده‌سازی محیط و محلول‌ها ٤۱

ب-۱- محیط تریس به همراه BSA ٪۱ ..... ٤۱

ب-۲- محلول سوکروز ٤۱

ب-۳- آماده‌سازی متیل‌بتاسیکلودکسترین ٤۲

ب-٤- محیط BO ٤۲

ب-۵- محیط بلوغ تخمک ٤۳

ب-٦- محیط کشت جنین..... ٤٣

عنوان **فهرست** **صفحه**

ج- نمونه‌گیری از حیوانات و انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه..... ٤٣

د- استخراج اسپرم اپیدیدیمی ٤٤

هـ- آنالیز اولیه اسپرم..... ٤٥

هـ-١- ارزیابی میکروسکوپی تحرک اولیه‌ی اسپرم ٤٥

هـ-٢- تخمین درصد زنده‌مانی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین نگروزین..... ٤٥

هـ-٣- بررسی ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی گیمسا..... ٤٥

و- محاسبه‌ی غلظت اسپرم به روش هموسیتومتری..... ٤٦

ز- فرایند شیشه‌ای شدن..... ٤٧

ز-١- آماده‌سازی محیط و محلول‌ها قبل از فرایند شیشه‌ای شدن..... ٤٧

ز-٢- اضافه کردن CLC و محلول سوکروز..... ٤٧

ز-٣- شیشه‌ای شدن..... ٤٨

ز-٤- گرم شدن..... ٤٩

ز-٥- آنالیز اسپرم پس از شیشه‌ای شدن..... ٤٩

ح- بلوغ آزمایشگاهی تخمک..... ٥٠

ط- لقاح آزمایشگاهی و مراحل کشت رویان..... ٥١

عنوان **فهرست** **صفحه**

ی- طرح آزمایشی ۵۱

ی-۱- گروه اسپرم تازه اپیدیدیمی ۵۱

ی-۲- گروه اسپرم شیشه‌ای شده در حضور CLC ۵۲

ی-۳- گروه اسپرم شیشه‌ای شده بدون حضور CLC ۵۲

ک- آنالیز آماری ۵۳

فصل چهارم- نتایج ۵۵

الف- آنالیز اسپرم ۵۷

الف-۱- تحرک اسپرم ۵۷

الف-۲- زنده‌مانی اسپرم ۵۸

الف-۳- قطره‌ی پروتوپلاسمی ۵۸

الف-٤- ناهنجاری‌های سر اسپرم ۵۹

الف-۵- ناهنجاری‌های دم اسپرم ٦۰

الف-٦- ناهنجاری سر کنده شده اسپرم ٦۰

الف-۷- ناهنجاری‌های قطعه میانی ٦۱

ب- لقاح آزمایشگاهی ٦۳

عنوان **فهرست** **صفحه**

فصل پنجم- بحث و نتیجه‌گیری..... ٦٧

نتیجه‌گیری نهایی ٧٣

پیشنهادها..... ٧٥

منابع..... ٧٧

چکیده انگلیسی ٩٣

جدول **فهرست جداول** **صفحه**

٤-١: میانگین نسبت تحرک، زنده‌مانی و قطره‌های پروتوپلاسمی اسپرم اپیدیدیمی گربه بعد از انجماد به قبل از انجماد در دو گروه واجد CLC و فاقد CLC (LSMean±S.E.M).....٥٩

٤-٢: میانگین درصد تحرک، زنده‌مانی و قطره‌های پروتوپلاسمی اسپرم اپیدیدیمی گربه قبل از انجماد و بعد از انجماد در دو گروه واجد CLC و فاقد CLC (LSMean±S.E.M).....٥٩

٤-٣: میانگین نسبت ناهنجاری‌های سر ، دم ، سرکنده شده و قطعه میانی اسپرم اپیدیدیمی گربه بعد از انجماد به قبل از انجماد در دو گروه واجد CLC و فاقد CLC (LSMean±S.E.M).....٦١

٤-٤: میانگین درصد ناهنجاری‌های سر ، دم ، سرکنده شده و قطعه میانی اسپرم اپیدیدیمی گربه قبل از انجماد و بعد از انجماد در دو گروه واجد CLC و فاقد CLC (LSMean±S.E.M).....٦٢

٤-٥: اثر CLC بر اسپرم اپیدیدیمی گربه بر روی پارامترهای لقاح آزمایشگاهی(LSMean±S.E.M).....٦٤

تصویر **فهرست تصاویر** **صفحه**

۳-۱: بیضه گربه(راست) و دم اپیدیدیم (چپ)..... ٤٤

۳-۲: COCs درجه A (با پیکان مشخص شده)..... ۵۰

٤-۱: اسپرم زنده (۱) و اسپرم مرده (۲)، (رنگ آمیزی ائوزین نگروزین، بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰×)..... ۵۸

٤-۲: سر کنده شده (۱)، ناهنجاری دم (۲) و ناهنجاری قطعه میانی (۳)، (قبل از انجماد، رنگ آمیزی گیمسا، بزرگ‌نمایی ٦۰۰×)..... ٦۲

٤-۳: ناهنجاری دم (۱)، سر کنده شده (۲) و ناهنجاری قطعه میانی (۳)، (بعد از انجماد در گروه واجد CLC، رنگ آمیزی گیمسا، بزرگ‌نمایی ٦۰۰×)..... ٦۳

٤-٤: بلاستوسیست (۱)، تسهیم (۲) و تخمک لقاح نیافته (۳)، (بزرگ‌نمایی ۱۰۰×)..... ٦٤

٤-۵: تسهیم (راست) و بلاستوسیست (چپ، با پیکان مشخص شده؛ بزرگ‌نمایی٤۰۰×)..... ٦۵

چکیده

نام خانوادگی: مریم	**نام:** رهبر	**شماره دانشجویی:** ۸۷۵۸۲۲
عنوان پایان‌نامه: تاثیر کلسترول بارگذاری شده بر سیکلودکسترین بر پاسخ شیشه‌ای شدن اسپرم اپیدیدیمی گربه		
اساتید راهنما: دکتر فرید براتی و دکتر قدرت‌اله محمدی		
استاد مشاور: دکتر بهمن مصلی‌نژاد		
درجه تحصیلی: دکترای حرفه‌ای	**رشته:** دامپزشکی	
دانشگاه: شهید چمران اهواز	**دانشکده:** دامپزشکی	**گروه:** علوم درمانگاهی
تاریخ فراغت از تحصیل: شهریور ۱۳۹۳	**تعداد صفحه:** ۹۳	
کلید واژه‌ها: اسپرم اپیدیدیمی، گربه، شیشه‌ای شدن، سیکلودکسترین و لقاح آزمایشگاهی		

کلسترول بارگذاری شده بر سیکلودکسترین به صورت کارآمد توانسته است از اسپرم تعدادی از گونه‌ها محافظت کند. همچنین شیشه‌ای کردن اسپرم به خصوص در انسان، افق‌های جدیدی را در زمینه‌ی انجماد اسپرم گشوده است. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر CLC بر شیشه‌ای سازی اسپرم گربه می‌باشد. اسپرم اپیدیدیمی گربه (۲۲ زوج بیضه) از اپیدیدیم استخراج شد و سپس در معرض شیشه‌ای شدن در محلول تریس به همراه CLC قرار گرفت. اسپرم یخ‌گشایی شده از نظر زنده‌مانی و تحرک ارزیابی شد. بخشی از اسپرم‌های یخ‌گشایی شده به‌همراه تخمک‌های بالغ گربه در برنامه لقاح آزمایشگاهی قرار گرفتند. تخمک‌ها به روش قطعه‌سازی تخمدان جمع آوری شدند. تخمک‌ها جهت بلوغ در محیطی با رطوبت ٪۹۵ و ٪۵ دی‌اکسیدکربن با دمای ۳۸ درجه برای مدت ۳۰-۲۸ ساعت قرار گرفتند. بعد از بلوغ، تخمک‌ها به‌همراه اسپرم‌های یخ‌گشایی شده انکوبه شدند و میزان تشکیل تسهیم و بلاستوسیست بررسی شد. شیشه‌ای شدن به صورت معناداری (P<۰/۰۰۰۱) باعث کاهش درصد تحرک اسپرم در گروه واجد CLC (۲/۲۸±۳/٦) و گروه فاقد CLC (۲/۰۲±۱/۱) در مقایسه با اسپرم تازه (۱/۸۲±۲۸/۳) شده است. زنده-مانی نیز به دنبال شیشه‌ای شدن به صورت معناداری هم در گروه واجد CLC (۲/٤٤±۸۰/٦) و هم گروه فاقد CLC (۲/۱۵±۷۸/۲) در مقایسه با قبل از انجماد (۱/۹٤±۸۹/۹) کاهش یافته است (P=۰/۰۰۱۱). درصد تشکیل تسهیم ۷/۵٤±٤٤/٤، ۸/۷±۵۹/۳ و ۷/۵٤±٦۳/۹ به ترتیب برای

نمونه‌ی تازه، واجد و فاقد CLC بود که تحت تاثیر انجماد قرار نگرفت (P=۰/۲٤۰۱). درصد تشکیل بلاستوسیست ۵/۶۳±۱٤/۷، ۶/۵±۲۰/۱ و ۵/۶۳±۱۵/۰۳ به ترتیب برای نمونه‌ی تازه، واجد و فاقد CLC بود که تحت تاثیر انجماد قرار نگرفت (P=۰/۷۸۷۳). اسپرم گربه در مقابل فرایند شیشه‌ای شدن دارای تحملی ذاتی است و حضور CLC تاثیر قابل ملاحظه‌ای روی آن نداشته است.

فصل اول- مقدمه و هدف

با توجه به فراوانی گونه‌های در حال انقراض حیات وحش، گربه‌ی بومی ایران به عنوان یک گوشت‌خوار می‌تواند یک الگوی مناسب برای کمک به حفظ گونه‌های گوشت‌خوار در معرض انقراض باشد. از این‌رو استفاده از برنامه لقاح آزمایشگاهی به عنوان یک روش قابل قبول در این راه کمک کننده است. از ملزومات آن تهیه بانک‌های اسپرم می‌باشد که همگی بر اساس روندهای انجماد اسپرم پایه‌گذاری شده‌اند. انجماد اسپرم اپیدیدیمی، یکی از حوزه-های مهم تکنولوژی‌های تولیدمثل است و اهمیت زیادی در تحقیقات تولیدمثل گونه‌های در خطر و وحشی دارد (James و همکاران، ۲۰۰۲). اسپرم ذخیره شده در دم اپیدیدیم معمولا دارای کیفیت مناسبی است و دارای سطوح بالایی از اسپرم بالغ می‌باشد و توانایی بارور کردن تخمک را دارد (Blash و همکاران، ۲۰۰۰). در برنامه‌های معمول انجماد جهت محافظت از اسپرم می‌بایست از دستگاه‌های قابل برنامه‌ریزی استفاده نمود که هزینه‌های بالایی دارند (Isachenko و همکاران، ۲۰۱۱) و از طرف دیگر جهت حفاظت از غشای سلولی می‌بایست از سرمامحافظ‌های شیمیایی مانند گلیسرول و اتیلن‌گلیکول استفاده کرد که بسیار سمی هستند (Isachenko و همکاران، ۲۰۰۳) و یا از سرمامحافظ‌های با منشاء بیولوژیک استفاده کرد که خطر انتقال بیماری‌ها را دارند. برای حل مشکلات فوق استفاده از شیشه‌ای کردن هم ارزان‌تر و هم موثرتر از روش‌های معمول است. این روش با موفقیت در انجماد تخمک و جنین گاو مورد استفاده قرار گرفته است (شایق، ۱۳۸۹). اخیرا مطالعات انجام شده، نشان داده‌اند که اسپرم را نیز می‌توان با روش شیشه‌ای کردن منجمد نمود و همچنین حذف سرمامحافظ‌های معمول نیز تاثیر نامطلوبی بر روند شیشه‌ای سازی اسپرم نداشته است (Isachenko و همکاران، ۲۰۱۲).

فرایند انجماد منجر به تغییر در ساختار غشا می‌شود، بنابراین پروتئین و لیپیدهای وابسته به آن آسیب دیده و در نتیجه سبب از دست دادن نفوذپذیری انتخابی غشا و تغییر در سیالیت غشا می‌شود. همچنین در طی روند انجماد میزان کلسترول غشای سلول کاهش می‌یابد (Cormier و Bailey، ۲۰۰۳). از سوی دیگر مطالعات انجام شده نشان دهنده‌ی این است که در گونه‌هایی که نسبت کلسترول به فسفولیپید غشا بیشتر است (مانند انسان و خرگوش) نسبت به گونه‌هایی که این نسبت کمتر است (مانند نریان، گاو و قوچ) مقاومت بیشتری در برابر فرایند انجماد وجود دارد (Watson، ۲۰۰۰). با توجه به این اطلاعات، غنی سازی غشای اسپرم با کلسترول قبل از انجماد ممکن است صدمات ایجاد شده در طی انجماد را کاهش دهد (Moore و همکاران، ۲۰۰۵). کلسترول در محلول‌های آبی غیر

قابل حل است، اما می‌توان آن را با استفاده از سیکلودکسترین وارد غشای سلول کرد (Belmonte و همکاران، ۲۰۰۵).

هدف از مطالعه‌ی حاضر تاثیر شیشه‌ای کردن اسپرم اپیدیدیمی گربه بومی ایران بر لقاح و تکامل بعد از لقاح آزمایشگاهی و بررسی اثر استفاده از کلسترول بارگذاری شده بر متیل‌بتاسیکلودکسترین در محافظت از غشای سلول در برابر آسیب‌های ناشی از فرایند شیشه‌ای شدن می باشد.

مریم رهبر شهریور ۹۳

فصل دوم- مروری بر منابع

الف- ویژگی‌های تولید مثلی در گربه‌سانان

اسپرم گربه از سن ۵ ماهگی قابل جمع آوری است، اگر چه بیشتر گربه‌های نر در سن ۸ ماهگی به بلوغ جنسی و تولید اسپرم می‌رسند. تستوسترون پلاسما در سن ۸ ماهگی به سرعت افزایش می‌یابد و به میزان پیک خود (۲/٦ نانوگرم به میلی‌لیتر) در سن ۱۰ ماهگی می‌رسد (Tsutsui و همکاران، ۲۰۰٤). گربه‌ی نر تولید مثل غیر فصلی دارد (Spindler و Wildt، ۱۹۹۹)، ولی تحقیقات مشخص کرده است که اسپرماتوژنز[1] تحت تاثیر فصل می‌باشد (Kirkpatrick، ۱۹۸۵).

بلوغ در گربه‌ی ماده در سن ۸ تا ۱۰ ماهگی اتفاق می‌افتد. تولید مثل آن‌ها به صورت پلی‌استروس فصلی و تخمک‌گذاری القایی می‌باشد. سیکل استروس اغلب هر ۲ تا ۳ هفته اتفاق می‌افتد. تخمک‌گذاری معمولا ۲٤ تا ۳٦ ساعت و لانه‌گزینی ۱۲ تا ۱۳ روز بعد از جفت‌گیری می‌باشد. طول مدت آبستنی در گربه ٦۷-٦٤ روز (به صورت میانگین ٦٦ روز) است. اجسام زرد پروژسترون ترشح می‌کنند که شروع آن ۲-۱ روز بعد از تخمک‌گذاری است. اگر لانه‌گزینی اتفاق بیفتد، غلظت پروژسترون در طول ۳۰-۲۵ روز افزایش می‌یابد، سپس مقدار آن تا انتهای آبستنی به آرامی کم می‌شود. اگر آبستنی اتفاق نیفتد اجسام زرد به پیک تولید پروژسترون خود در طول ۱۵-۱۰ روز می‌رسند و سپس مقدار آن کاهش می‌یابد. میزان پایه‌ی پروژسترون در روزهای ۳۵-۳۰ بعد از تخمک‌گذاری گزارش شده است. ریلاکسین از روز ۲۰ آبستنی از واحدهای جنینی-جفتی[2] ترشح می‌شود و تولید آن تا انتهای آبستنی ادامه دارد و تولید پرولاکتین از روز ۳۵ آبستنی افزایش می‌یابد (Tsutsui و Stabenfeld، ۱۹۹۳).

---

1. Spermatogenesis
[1]. Fetoplacental unit

اگر چه همه‌ی گربه‌سانان تخمک‌گذاری القایی دارند ولی ممکن است تخمک‌گذاری خودبه‌خودی در بین گونه‌ها و حتی افراد یک گونه اتفاق بیافتد. پلنگ ابری[3]، گربه‌ی ماهیگیر[4] و گربه‌ی پلنگی آمریکا[5] غالبا تخمک‌گذاری خود به خودی دارند، که به صورت نادر در یوزپلنگ، گربه‌ی کوچک خالدار[6] و پلنگ پاکوتاه[7] دیده می‌شود.

تفاوت گونه‌ای زیادی در مورد تولید مثل فصلی گربه‌سانان وجود دارد. برخی به دوره‌ی روشنایی بسیار حساس هستند (مانند گربه‌ی پالاس[8])، برخی به طور نسبی تحت تاثیر قرار می‌گیرند (مانند ببر، پلنگ ابری و پلنگ برفی) و بقیه مانند پلنگ پا کوتاه، گربه‌ی کوچک خالدار، گربه‌ی پلنگی آمریکا، شیر، پلنگ و گربه‌ی ماهیگیر اصلا تحت تاثیر قرار نمی‌گیرند (Brown، ۲۰۱۱).

ب- فن‌آوری‌های کمکی تولید مثل در گربه‌سانان

تلقیح مصنوعی دارای پتانسیل گرانبهایی در جهت کمک به تولید مثل گربه‌سانان است. منی جمع‌آوری شده به وسیله‌ی واژن مصنوعی از گربه‌های نر با یک بار تلقیح باعث بارور شدن ٪۵۰ از گربه‌های ماده شده است (Sojka و همکاران، ۱۹۷۰). در مطالعه‌ی دیگری در زمینه‌ی تلقیح مصنوعی به روش لاپاروسکوپی نشان داده شده است که اسپرم‌های به دست آمده به وسیله-ی الکتروجکولاتور[9] می‌توانند باعث ایجاد آبستنی در گربه‌های ماده شوند (Howard و همکاران، ۱۹۹۲a). مطالعه‌ای که بر روی اثر بخشی تلقیح مصنوعی در چیتا صورت گرفته است، نشان می-دهد که پس از القاء تخمک‌گذاری به وسیله‌ی تزریق هورمون و تلقیح اسپرم به قسمت قدامی هر شاخ رحم، آبستنی و تولید نوزاد زنده مشاهده می‌شود (Howard و همکاران، ۱۹۹۲b). تلقیح مصنوعی به روش غیرجراحی در پلنگ ایرانی توانست ایجاد آبستنی کند (Dresser و همکاران، ۱۹۸۲). روش تلقیح مصنوعی میزان موفقیت بالایی در آبستنی یوزپلنگ و پلنگ پا کوتاه داشته است، این در حالی است که میزان موفقیت این روش در ایجاد آبستنی در پلنگ ابری، گربه‌ی ماهیگیر و ببر کمتر بوده است (Brown، ۲۰۱۱).

---

3. Clouded leopard
4. Fishing cat
5. Margay
6. Tigrina
7. Ocelot
7. Pallas cat
9. Electroejaculator

تولید جنین آزمایشگاهی[10] و انتقال جنین[11] با موفقیت در ببر (Donoghue وهمکاران، ۱۹۹۰)، گربه‌ی وحشی آفریقا (pope و همکاران، ۲۰۰۰)، پلنگ پا کوتاه (Swanson و Brown، ۲۰۰٤)، گربه‌ی سیاه گوش[12] (Pope و همکاران، ۲۰۰۱)، گربه‌ی ماهیگیر (Pope وهمکاران، ۲۰۰٦a) انجام شده است. بهترین دما و شرایط کشت برای بلوغ آزمایشگاهی تخمک[13] مورد مطالعه قرار گرفته و بیشتر تخمک‌های نابالغ گربه، بلوغ هسته‌ی خود را در شرایط آزمایشگاهی در طول ۳۲ ساعت کامل کرده‌اند (Pope و همکاران، ۱۹۹۳). انتقال جنین اولیه به اویداکت (Goodrow و همکاران، ۱۹۸۸b) و مورولا[14] و بلاستوسیست[15] به رحم (Pope و همکاران، ۱۹۹۳) باعث ایجاد آبستنی در گربه‌ی پذیرنده شده است. تزریق اسپرم به داخل سیتوپلاسم[16] نوعی IVF تغییر شکل یافته می‌باشد که یک اسپرم مستقیما به داخل تخمک تزریق می‌شود که این روش در گربه موفق بوده است (Comizzoli و همکاران، ۲۰۰٦).

تحقیقات بسیاری در مورد انجماد طولانی مدت گامت و جنین گربه انجام گرفته است (Wildt و Wemmer، ۱۹۹۹). تکنیک انجماد اسپرم برای کاهش تخریب غشاء و به حداقل رساندن تغییرات سریع اسمزی در حین سرد کردن، انجماد و یخ‌گشایی توسعه یافته است. گلیسرول به عنوان یک سرمامحافظ در داخل بافر زرده‌ی تخم مرغ به اسپرم تازه‌ی گربه قبل از ذخیره‌سازی آن در نیتروژن مایع اضافه شد (Luvoni، ۲۰۰٦). میزان سرما، یخ‌گشایی و حذف سرمامحافظ در جهت بهتر شدن حرکت اسپرم و کاهش آسیب‌های غشاء بعد از یخ‌گشایی بهبود یافته است. در تحقیقات مشخص شده که اسپرم‌های ناهنجار گربه‌سانان به نسبت اسپرم‌های نرمال در مقابل سرما آسیب بیشتری می‌بینند (Pukazhenthi و همکاران، ۲۰۰۲). اسپرم گربه در گذشته با استفاده از روش آهسته منجمد شده است (Villaverde و همکاران، ۲۰۱۳؛ Cocchia و همکاران، ۲۰۱۰؛ Vick و همکاران، ۲۰۱۲؛ Zambelli و همکاران،۲۰۱۰؛ Naomi، ۲۰۰۵).

---

10. In vitro fertilization (IVF)
11. Embryo transfer (ET)
12. Caracal
13. In vitro oocyte maturation (IVM)
14. Morula
15. Blastocyst
16. Intra cytoplasmic sperm injection (ICSI)