دانشکده دامپزشکی

گروه علوم درمانگاهی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکتری حرفه ای دامپزشکی

عنوان

لقاح آزمایشگاهی اووسیت های گوسفند در حضور آمونیوم و اثرات آن بر روی بیان ژن Bcl-2

اساتید راهنما

دکتر رضا اسدپور

دکتر لیلا روشنگر

استاد مشاور

دکتر رضی ا... جعفری جوزانی

پژوهشگر

علی گلچین

۱۳۹۳ آذر

منت خدای را عزوجل که

طاعتش موجب قربت

است و به شکر اندرش

مزید نعمت.

تقدیم به:

پدرم، ستون پایدار زندگی ام

مادرم، نگاه سبز زندگی ام

برادرم، که سرگردانی و ترس در پناهش به شجاعت می گراید

خواهرانم، به پاس قلب های بزرگ و محبت های بی دریغشان

تشکر صمیمانه از اساتید ارجمند و گرانمایه

جناب آقای دکتر رضا اسدپور

سرکار خانم لیلا روشنگر

به پاس راهنمایی های بی دریغ شان

جناب آقای دکتر رضی الله جعفری جوزانی

به پاس مشاوره و همکاری صمیمانه ایشان

جناب آقای دکتر غلامرضا حمیدیان

جهت مطالعه و داوری این پایان نامه

و با تشکر از

خانم کریمیان و همکاران ایشان در گروه علوم تشریحی

دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

سپاس از زحمات دوستان عزیزم جناب آقایان

دکتر حسین باقرنیایی و دکتر مهدی هوشمند

و کلیه اساتید، دوستان و عزیزانی که طی این دوره اندیشیدن را به من آموختند.

نام خانوادگی: گلچین نام: علی
عنوان: لقاح آزمایشگاهی اووسیت های گوسفند در حضور آمونیوم و اثرات آن بر روی بیان ژن Bcl-2
اساتید راهنما: دکتر رضا اسدپور دکتر لیلا روشنگر استاد مشاور: دکتر رضی الله جعفری جوزانی
مقطع تحصیلی: دکترای حرفه ای رشته: دامپزشکی دانشگاه: تبریز دانشکده: دامپزشکی
کلید واژه ها: آمونیوم کلراید، بلاستوسیست، تکوین رویانی، لقاح آزمایش گاهی، گوسفند

چکیده: در این مطالعه اثرات غلظت های مختلف آمونیوم کلراید در محیط کشت در طول لقاح آزمایشگاهی (IVF) و کشت (IVC) و بیان ژن Bcl-2 در رویان های گوسفند، در گروه های کاملا تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. تخمدان های گوسفندان نژاد قزل از کشتارگاه به آزمایشگاه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انتقال یافت. کمپلکس اووسیت – کومولوس جمع آوری شده در شرایط آزمایشگاهی، دمای ۳۹ درجه سانتی گراد، حداکثر رطوبت و دی اکسید کربن ۶٪ در قطره های محیط بلوغ اووسیت به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند.

آمونیوم کلراید در غلظت های صفرµM ، µM۲۹، µM۸۸، µM۱۳۲ و µM۱۷۶ به محیط های کشت اضافه گردید. در بررسی لقاح آزمایشگاهی(IVF) کاهش معنی داری ($p = 0/009$) بین گروه ها مشاهده گردید. و از لحاظ رشد و تداوم سلولی نیز اختلاف آماری بین گروه ها معنی دار بود($p = 0/02$) . رابطه معنی داری بین بیان ژن Bcl-2 و غلظت های مختلف آمونیوم بدست نیامد.

این نتایج نشان می دهد که اثرات آمونیاک در لقاح و توسعه جنینی پیش از لانه گزینی در گوسفند به غلظت آمونیوم و مرحله زمانی آن بستگی دارد. علاوه بر این حضور آمونیوم در محیط کشت، اثر منفی بر رشد و نمو جنین دارد و اثر منفی آن در لقاح آزمایشگاهی بیشتر از کشت جنین می باشد.

فهرست مطالب **صفحات**

فصل اول:..... ۱
فصل دوم : کلیات..... ۴
۲-۱ گوسفند نژاد قزل..... ۵
۲-۱-۱ پراکنش و خصوصیات ظاهری:..... ۵
۲-۱-۲ ویژگی های نژاد قزل..... ۶

۲-۱-۳ خصوصیات تولیدی ۶
۲-۲ مروری برآناتومی و بافت شناسی تخمدان و بیضه ۷
۲-۲-۱ آناتومی و بافت شناسی تخمدان ۷
۲-۲-۲ بلوغ اووسیت و لقاح ۸
۲-۲-۳ آناتومی و بافت شناسی بیضه : ۱۰
۲-۳ لقاح آزمایشگاهی (IVF) و تاریخچه آن ۱۱
۲-۳-۱ لقاح آزمایشگاهی در گوسفند ۱۲
۲-۳-۲تکنیک لقاح آزمایشگاهی(IVF) ۱۳
۲-۴ محیط های کشت ۱۷
۲-۵ منشا آمونیوم در بدن ۱۹
۲-۵-۱ چرخه اوره و دفع نیتروژن حاصل از کاتابولیسم آمینواسیدها و دیگر منابع ازت دار: ۲۰
۲-۵-۲ نمکهای آنیونی و مکملهایی چون آمونیوم کلراید در گوسفندان پرواری ۲۲
۲-۵-۳ تاثیر پروتئین جیره بر باروری ۲۳
۲-۶ ژن Bcl-2 و نقش آندر رویان ۲۳
۲-۶-۱ آپوپتوز و مکانیسم عمل Bcl-2 ..... ۲۴
۲-۷ واکنش زنجیره ای پلی مراز یا PCR ۲۶
۲-۷-۱ استخراج mRNA و اندازه گیری میزان بیان آن ۲۸
۲-۷-۲ اصطلاحات مورد استفاده در Real time PCR ۲۹
فصل سوم: مواد و روش کار ۳۱
۳-۱ تجهیزات و لوازم مورد نیاز: ۳۲
۳-۱-۱ تجهیزات ۳۲
۳-۱-۲ لوازم و مواد مورد نیاز ۳۳
۳-۱-۲-۱ محیط های کشت مورد نیاز: ۳۴
۳-۲ اخذ نمونه ها و کشت ۳۹
۳-۲-۱ جمع آوری وکشت تخمک ها ۳۹
۳-۲-۳ جداسازی اسپرم و آماده سازی آن ۴۱

۳-۲-۳ انجام لقاح آزمایشگاهی (In Vitro Fertilization): ۴۱
۳-۳ ارزیابی لقاح و رشدونمو زیگوت ۴۳
۳-۴ آنالیز آماری ۴۳
۳-۵ بررسی بیان ژن Bcl-2 ۴۳
۳-۵-۱ پروتکل برای ترسیب سلولهای رویانی و انتقال به آزمایشگاه مولکولی ۴۳
۳-۵-۲ RT real time-PCR برای میزان بیان Bcl-2 در رویان های حاصله ۴۴
۳-۵-۳ لوازم مورد نیاز استخراج mRNA: ۴۴
۳-۵-۴ سنتز cDNA لوازم مورد نیاز: ۴۴
۳-۵-۵ لوازم مورد نیاز برایPCR ۴۵
۳-۵-۶ مواد نیاز برای الکتروفورز ۴۶
۳-۵-۷ انجام Real time PCR(SYBR GREEN) ۴۷
۳-۵-۸ لوازم مورد نیاز برای بررسی بیان ژنBcl-2 ۴۸
فصل چهارم:نتایج ۵۰
۴-۱ نتایج حاصل از میزان لقاح آزمایشگاهی در حضور آمونیوم کلراید ۵۱
۴-۱-۱ نتایج حاصل از میزان لقاح در تیمار های مختلف ۵۱
۴-۲ نتایج حاصل از میزان بیان ژن Bcl-2 در رویان های حاصله ۵۴
فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری ۵۵
منابع ۶۲

فهرست اشکال و تصاویر

شکل ۲-۱ تخمدان و انواع فولیکول های موجود در سطح آن ۸
شکل ۲-۲ چرخه اوره در نشخوارکنندگان ۱۹
تصویر ۲-۱ گوسفند نژاد قزل ۵
تصویر ۲-۲ آناتومی مجاری بیضه ۱۰

تصویر ۳-۱ قطره های محیط کشت در پلیت های مخصوص کشت جنین ۳۹
تصویر ۳-۲ تخمدان ها و کمپلکس اووسیت- کومولوس ۴۰
تصویر ۴-۱ سلول های رویانی تشکیل شده در محیط کشت..... ۵۲
تصویر ۴-۲ منحنی PCR ژن Bcl-2..... ۵۴
تصویر ۴-۳ منحنی ذوب برای ژن Bcl-2 ..... ۵۴
تصویر ۴-۴ منحنی استاندارد..... ۵۵

فهرست جداول

جدول ۳-۱ نوع و مقدار مواد مورد نیاز جهت ساخت محیط لازم برای جدا کردن اووسیت از تخمدان..... ۳۴
جدول ۳-۲ نوع و مقدار مواد مورد نیاز جهت ساخت محیط لازم برای شستشوی COCs ۳۴
جدول ۳-۳ نوع و مقدار مواد مورد نیاز جهت ساخت محیط بلوغ ۳۵
جدول ۳-۴ نوع و مقدار مواد مورد نیاز جهت ساخت محیطcapacitation ۳۶
جدول ۳-۵ نوع و مواد مورد نیاز برای ساخت محیط لقاح آزمایشگاهی..... ۳۷
جدول ۳-۶ نوع و مواد مورد نیاز برای ساخت محیط کشت جنین های آزمایشگاهی..... ۳۸
جدول ۳-۷ زمان و دمای تنظیم شده برای دستگاه ترموسایکلر ۴۷
جدول ۳-۸ مواد مورد استفاده برای Real time PCR با حجم کلی ۱۰ میکرولیتر (MM2x+) ۴۸
جدول ۴-۱ تیمارهای مختلف و تعداد اووسیت های مورد استفاده برای هر تیمار ۵۱
جدول۴-۲ میزان لقاح آزمایشگاهی و نمو در تیمار های مختلف ۵۳
جدول ۴-۳ کمیت سنجی نسبی (ΔΔCt) ۵۵

فصل اول:

مقدمه

تولید و انتقال رویان[1] در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند برای ازدیاد سریع جمعیت گله‌های در حال انقراض، تهیه نتاج بیشتر از حیوانات ماده ارزشمند، تسریع بهبود ژنتیکی از طریق تسهیل آزمون نتاج ماده و کاهش فاصله‌ی بین نسل‌ها مورد استفاده قرار گیرد[۱]. همچنین تولید رویان و انتقال آن یک تکنولوژی کارآمدی است که امکان انجام آزمایش‌های دقیق به منظور بررسی مشکلات ژنتیکی ، مشکلات تولید مثلی ، روند تکامل رویان و روندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تولید مثل را فراهم می‌کند . امروزه تولید رویان به دو طریق انجام می شود:

۱) از طریق سوپر اوولاسیون حیوانات ماده برتر و تلقیح مصنوعی و سپس جمع آوری رویان‌های حاصله

۲) از طریق بالغ کردن اووسیت ها[2] ، لقاح و کشت[3] در شرایط آزمایشگاهی طی سه پروتکل رایج (که در تحقیقات و بالین مورد استفاده قرار گرفته) تولید شده و انتقال داده می‌شود یا منجمد می‌گردد[۲].

علی رغم گذشت زمان قابل توجه از ابداع و انجام این روش‌ها و همچنین بهبود بخشیدن آنها، هنوز نیل به راندمان مناسب و مطلوب امکان پذیر نشده است و لذا انجام مطالعات بیشتر برای رسیدن به نتایج مطلوبتر و راندمان بیشتر مورد نیاز است. بیشترین کارهای پژوهشی دررابطه با لقاح آزمایشگاهی بر روی موش به سبب ارزانی و گاو به علت جنبه های اقتصادی آن صورت گرفته است.

پروتئین ها گروه مهمی از جیره دام را تشکیل می دهد که برای رشد بدنی، رشد جنین و تولید شیر مورد نیاز است. میزان پروتئین جیره از جمله موارد مورد توجه در جیره نویسی دام می باشد که افزایش میزان آن در جیره موجب افزایش میزان اوره و آمونیاک خون و کاهش باروری در دام می

[1] Embryo Transfer
[2] *In vitro* maturation (IVM)
[3] *In vitro* culture (IVC)

گردد[۳, ۴] بطوری که افزایش ۱۹-۲۰ میلی گرم بر دسی لیتر اوره خون موجب کاهش ۲۰ درصدی باروری در دام می شود. مطالعات اخیر بر روی رویان موش نشان داده است که محیط کشت حاوی آمونیوم با غلظت ۱۸/۸-۳۰۰ به طور معنی داری تعداد بلاستوسیست ها در محیط کشت را کاهش می دهد و میزان آپوپتوز در بلاستوسیست را افزایش می دهد[۵]. ژن Bcl-2 از ژن های درگیر در فرایند آپوپتوز می باشد.

دست یابی به سیستم کشت پیشرفته برای فولیکول های پری آنترال[1] در فناوری زیستی مربوط به تولید تعداد بالای اووسیت و ایجاد جنین آزمایشگاهی و انتقال آن بسیار مهم است. استفاده از سیستم هم کشتی مدت هاست که با هدف بهبود کیفی رویان پستانداران، شبیه سازی محیط داخلی بدن در آزمایشگاه، افزایش بقاء رویان و حمایت محیط های کشت، کاهش استرس های محیطی و متابولیسمی محیط های کشت به کار رفته است. تاثیراضافه کردن غلظت های مختلف آمونیوم در دو مرحله لقاح و تکوین آزمایشگاهی رویان گوسفند نژاد قزل و بررسی بیان ژن[2] Bcl-2 در رویان های تولید شده که از ژن های دخیل در فرایند آپوپتوز می باشد، از اهداف خاص این پژوهش می باشد.

[1] Preantral follicles
[2] Gene expression

فصل دوم :

کلیات

۲-۱ گوسفند نژاد قزل

تصویر ۲-۱ گوسفند نژاد قزل

۲-۱-۱ پراکنش و خصوصیات ظاهری:

نژاد قزل گوسفندی است گوشتی- شیر که رنگ عمومی بدن آن قهوه ای روشن تا قهوه ای تیره متمایل به قرمز می باشد (تصویر ۱-۲) [۶]. این نژاد پراکنش قابل توجهی در جنوب و جنوب شرقی استان آذربایجان غربی و دامنه های سهند در استان آذربایجان شرقی (اطراف مراغه، بناب، میانه، آذرشهر، سراسکندر و هشترود دارد که هر چه به طرف بناب و مراغه نزدیکتر شویم، گله ها بزرگتر شده و بر تعداد گوسفند قزل در آنها افزوده می شود) دارد. پنیر معروف لیقوان که شهرت جهانی دارد از شیر این گوسفند به عمل می آید. در این نژاد گوسفندان اغلب زیر گردن منگوله دارند و چهار دست و پای آنها برای راهپیمایی های طولانی مدت در مراتع و کوهستان ها مناسب است[۷]. شکل دنبه که یکی از وجوه تمایز خاص این نژاد می باشد، کاملا گرد و دارای دنبالچه مناسب به شکل گلابی می باشد. هر چه دنبه از حالت S و از نیمرخ بصورت فوق خارج شده باشد به همان اندازه از مطلوبیت گوسفند کاسته می شود. رنگ دنبه و سینه و چهار قلم تیره تر از سایر نقاط بدن می باشد.

بعضی از گله داران معتقدند که اصیل ترین میش ها آنهایی هستند که به رنگ قرمز، حنائی و فاقد شاخ بوده و دارای لکه سفید روی پیشانی باشند.

۲-۱-۲ ویژگی های نژاد قزل

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 به صورت دستی با یونجه، ساقه و دانه جو تغذیه می شوند [۸]. از جمله ویژگی های این نژاد تولید شیر و گوشت بالا می باشد. پرورش بره های پرواری یکی از مهمترین منابع درآمد برای پرورش دهندگان این نژاد محسوب میشوند. مطالعاتی در مورد آنالیز وزن این نژاد صورت گرفته است[۹]. اما اطلاعاتی در مورد عوامل ژنتیکی دخیل در ویژگی های این نژاد صورت نگرفته است. نژاد قزل یک نژاد سنگین وزن می باشد.

۲-۱-۳ خصوصیات تولیدی

میانگین وزن تولد بره ها: ۴/۵ کیلوگرم

میانگین وزن ۶ ماهگی: ۳۵ کیلوگرم

میانگین وزن بلوغ :۵۰ کیلوگرم

درصد دو قلوزائی : ۲۰٪

۲-۲ مروری بر آناتومی و بافت شناسی تخمدان و بیضه

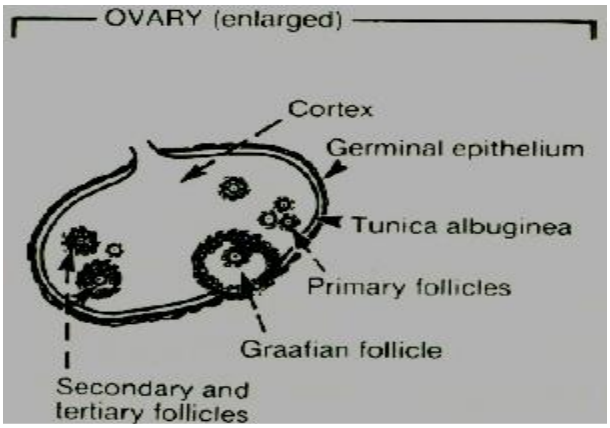
تمایز جنسی[1] روند پیچیده ای است که ژنهای بسیاری که برخی از آنها اتوزوم هستند در آن دخالت دارند[۱۰]. در مراحل اولیه رشد و تکامل، رویان تمام مهره داران واجد گناد و مجاری تناسلی اولیه هر دو جنس می باشند و با مهاجرت سلول های زایا[2] نر و ماده از کیسه زرده به داخل برآمدگی تناسلی رشد و تکامل گناد تناسلی شروع می شود[۱۱]. اگرچه از لحاظ زمان بندی رشد، تکامل و تشکیل فولیکول های اولیه[3] در تمامی پستانداران مشابه است ولی الگوی طبیعی رشد و تکامل جنین توصیف شده است[۱۱،۱۰].

۲-۲-۱ آناتومی و بافت شناسی تخمدان

زمان وقوع رشد و تکامل اصلی تخمدان در خلال مراحل انتخابی آبستنی شامل مراحل تمایز تخمدان جنین (روزهای ۰ تا ۳۰ آبستنی) رشد تخمدان و میوز سلول های زاینده (روزهای ۳۱ تا ۶۵ آبستنی) و فولیکولوژنز[4] (روزهای ۶۵ تا۱۱۰ آبستنی) می باشد. تخمدان در داخل حفره شکمی بوده و دارای دو نقش برون ریزی (آزادسازی تخمک) و درون ریزی (تولید استروئید) است. قشر تخمدان بافت اصلی آن بشمار می رود. در ابتدا لایه ای از سلول های فولیکولی اطراف اووسیت های ابتدایی تخمدان را احاطه می کند و این کار موجب شکل گیری فولیکول های آغازین می گردد. تخمدان در گوسفند بادامی شکل و در داخل حفره شکمی می باشد و اپیتلیوم سطحی که معمولا به اپیتلیوم زاینده معروف است تخمدان را در بر می گیرد. قسمت مرکزی تخمدان از بافت فیبروالاستیک نامنظم و سیستم عروقی و عصبی گسترده تشکیل شده است که از طریق ناف به تخمدان می رسد. قشر

[1]Sexual Differentiation
[2] Germinal cells
[3]Primary follicles
[4]Folliculogenesis

تخمدان از فولیکول های تخمدانی در مراحل مختلف رشد، تحلیل و یا جسم زرد تشکیل شده است[۱۲،۱۳].



شکل ۱-۲ تخمدان و انواع فولیکول های موجود در سطح آن

بطور کلی در قسمت قشری تخمدان دو گروه عمده فولیکولی وجود دارد:

۱) فولیکول های در حال رشد

۲) فولیکول های ساکن یا مقدماتی

از لحاظ بافتی فولیکول های در حال رشد به پنج گروه طبقه بندی می شوند و عبارتند از فولیکول های اولیه، ثانویه[۱]، ثالثیه (وزیکولی)[۲]، فولیکول های رسیده (دوگراف)[۳] و فولیکول های آترتیک[۴].

گزارشاتی وجود دارد که فولیکول های مقدماتی فعال دچار یک روند خود تمایزی شده و به مراحل اولیه و ثانویه تبدیل می شود. تحت تاثیر گنادوتروپین های هیپوفیزی سلول های گرانولوزای فولیکول های چند لایه ای مایعی ترشح می کنند به نام مایع فولیکولی که در فضای ما بین سلول ها جمع می گردد و با تداوم ترشح مایع حفره بزرگ پر از مایع (آنتروم) تشکیل می شود. در فولیکول گراف

[1] Secondary follicles
[2] Tertiary follicles
[3] Graph follicles
[4] Atretic follicles

زوناپلوسیدا توسط توده جامدی از سلول های شعاعی فولیکول در بر گرفته شده است. اندازه سلول های فولیکولی افزایش یافته و مملو از مایع می گردد. اووسیت به یک طرف فشرده و با مجموعه ای از سلول های فولیکولی (کومولوس اووفروس) احاطه می شود. در قسمت دیگر حفره فولیکولی، اپیتلیوم که از لحاظ ضخامت نسبتا یکسان است (و غشاء گرانولوزا نامیده می شود) شکل می گیرد. فولیکول قبل از تخمک گذاری بصورت ساختمانی تاول مانند از سطح تخمدان برآمده می شود. تقسیمات اووسیت متوقف شده در پروفاز میوز یک، چندین ساعت قبل از تخمک گذاری از سر گرفته می شود [۱۳].

۲-۲-۲ بلوغ اووسیت و لقاح

تخمک پستانداران در طول زندگی جنینی تشکیل و درمرحله پروفاز تقسیم میوز تا حدود زمان تخمک گذاری متوقف می شود. از سرگیری مجدد میوز بستگی به هرمون های گنادوتوفینی دارد که موجب ترشح پروزسترون از سلول های فولیکول های تخمدانی می شود و اثر مستقیم بر بلوغ اووسیت دارد[۱۴]. این تحریک هورمونی موجب شکسته شدن ویزیکول ژرمینال و متراکم شدن کروموزوم می گردد و مرحله متافاز میوز یک شروع می شود و پس از تشکیل جسم قطبی اول، سلول وارد متافاز دوم می شود[۱۵]. القای بلوغ اووسیت فرایندی شناخته شده است که شامل یک واکنش آگونیستی اولیه در سطح اووسیت می باشد که موجب بلوغ سیتوپلاسمی اووسیت و تحریک ادامه میوز می شود. از آنجایی که اغلب اووسیت های جمع آوری شده برای لقاح آزمایشگاهی از فولیکول های تابع نیستند اغلب تا مرحله بلاستوسیست نمی رسند. در حالت طبیعی بعد از آزاد شدن اووسیت از فولیکول گراف، توسط فیمبریه های لوله فالوپ گرفته شده و با حرکت مژک های لوله رحمی به سمت رحم حرکت می کند که سرعت حرکت بستگی به وضعیت سلول های کومولوس اطراف