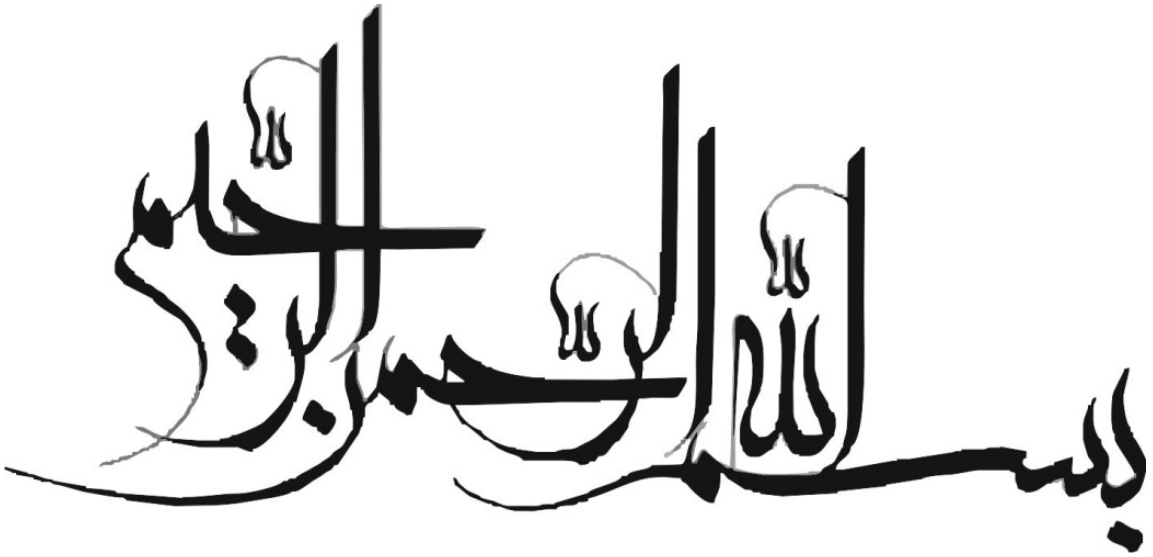

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

اثر اسیدهای چرب جیره‌ای بر رشد فولیکولی و میزان بیان ژن Bone Morphogenetic Protein 15 در گوسفند

پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دامی

نیلوفر مجیدی

اساتید راهنما

دکتر احمد ریاسی

دکتر حمید کهرام

۱۳۹۰

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته علوم دامی خانم نیلوفر مجیدی

تحت عنوان

اثر اسیدهای چرب جیره‌ای بر رشد فولیکولی و میزان بیان ژن Bone Morphogenetic Protein 15 در گوسفند

در تاریخ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای پایان‌نامه	دکتر احمد ریاسی
۲- استاد راهنمای پایان‌نامه	دکتر حمید کهرام
۳- استاد مشاور پایان‌نامه	دکتر کامران قائدی
۴- استاد مشاور پایان‌نامه	دکتر رحمان جهانیان
۵- استاد داور	دکتر احد یامچی
۶- استاد داور	دکتر مهدی محمدعلیپور
سرپرست تحصیلات تکمیلی	دکتر احمد ریاسی

مهربان خدایا تو را شکر می‌گویم به خاطر همه آنچه به من عطا کردی و به خصوص آنچه به من ندادی. چرا که در آنچه دادی، رحمتی است و در آنچه ندادی، حکمتی است. زیر باران رحمتت ایستاده‌ام و از شدت آن نفس برنمی‌آورم. عجیب خدایی داریم مهربان و مدبر ... .

به نام مادر

بوسه ای باید زد

دست هایی را

که می شویند

غبار خستگی روزگار را

و سیراب می کنند روح تشنه را

به نام پدر

بوسه ای باید زد

دست هایی را

که می تابانند نیرو را

و محکم می کنند

استواری پایه های زیستن را

تقدیم به مادر و پدر عزیزم

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فهرست مطالب	هشت
چکیده	۱
فصل اول: مقدمه	
۱-۱- کلیات	۳
۱-۲- اهداف	۴
فصل دوم: بررسی منابع	
۲-۱- چرخه فحلی گوسفند	۷
۲-۲- تکامل و تمایز فولیکولی	۸
۲-۳- رشد فولیکولی	۸
۲-۳-۱- فولیکول آغازین	۸
۲-۳-۲- انتقال از مرحله رشد فولیکولی آغازین به مرحله اولیه	۸
۲-۳-۳- انتقال از مرحله فولیکول اولیه به مرحله پری‌انترال بزرگ	۹
۲-۳-۴- تکامل از مرحله پری‌انترال بزرگ به فولیکول وابسته به گنادوتروفین	۱۰
۲-۴- فولیکول وابسته به گنادوتروفین‌ها	۱۱
۲-۵- فولیکول‌های تخمک‌ریزی‌کننده	۱۱
۲-۶- الگوی موجی‌مانند تکامل فولیکولی در گوسفند	۱۲
۲-۷- چیرگی (غالبیت) فولیکول تخمدانی	۱۴
۲-۸- نرخ تخمک‌ریزی	۱۴
۲-۹- دستکاری تکامل فولیکولی و باروری با استفاده از مکمل‌های تغذیه‌ای	۱۵
۲-۱۰- چربی‌ها و تاثیرگذاری آن‌ها بر عملکرد تولید مثلی	۱۵
۲-۱۰-۱- اسیدهای چرب و رشد و تکامل فولیکول	۱۶
۲-۱۰-۲- اسیدهای چرب و استرادیول	۱۸
۲-۱۰-۳- چربی‌ها و عملکرد لوتیالی	۱۸
۲-۱۰-۴- چربی‌ها و تاثیر آن‌ها بر ارتباطات بین اندازه فولیکول پیش از تخمک‌ریزی و غلظت‌های استروئیدها	۲۰
۲-۱۰-۵- اسیدهای چرب و کیفیت اووسیت	۲۱
۲-۱۰-۶- اسیدهای چرب، کیفیت جنین و شایستگی تکاملی آن	۲۱
۲-۱۱- تعامل تغذیه و فاکتورهای رشد در تکامل فولیکولی تخمدان	۲۲
۲-۱۲- فاکتور رشد Bone Morphogenetic Protein 15	۲۲
۲-۱۲-۱- سیستم عملکرد BMP15	۲۳

۲-۱۲-۲- بیان BMP15 در بافت‌های تولید مثلی ۲۵
۲-۱۲-۳- اعمال تولید مثلی BMP15 در تخمدان ۲۸
۲-۱۲-۴- اعمال BMP15 در هیپوفیز ۲۹
۲-۱۲-۵- تنظیم عمل BMP15 ..... ۳۰
۲-۱۲-۶- جهش‌های ژنتیکی BMP15 ..... ۳۰
فصل سوم: مواد و روش‌ها
۳-۱- مکان و زمان اجرای طرح ۳۵
۳-۲- نحوه اجرای طرح ۳۵
۳-۳- مکمل‌های چربی ۳۵
۳-۴- تنظیم جیره‌ها و نحوه تغذیه گوسفندان ۳۶
۳-۵- همزمان‌سازی فحلی گوسفندان ۳۷
۳-۶- بررسی فعالیت فولیکولی تخمدان ۳۸
۳-۷- جمع‌آوری نمونه خون ۳۹
۳-۸- جمع‌آوری سلول‌های اووسیت ۳۹
۳-۸-۱- جمع‌آوری و انتقال تخمدان به آزمایشگاه ۳۹
۳-۸-۲- آسپیره کردن فولیکول‌ها و جداسازی سلول‌های اووسیت ۴۰
۳-۹- جمع‌آوری مایع فولیکولی ۴۰
۳-۱۰- اندازگیری هورمون پروژسترون ۴۱
۳-۱۰-۱- مواد موجود در کیت پروژسترون ۴۱
۳-۱۰-۲- روش اندازگیری هورمون با کیت پروژسترون ۴۱
۳-۱۱- استخراج RNA ۴۲
۳-۱۱-۱- محتویات کیت RNeasy Micro Kit ۴۲
۳-۱۱-۲- روش استخراج RNA با کیت RNeasy Micro Kit ۴۳
۳-۱۲- اندازه‌گیری غلظت RNA ۴۴
۳-۱۳- روش ساخت cDNA ۴۴
۳-۱۴- اندازه‌گیری بیان نسبی ژن BMP15 با استفاده از یک ژن با بیان ثابت ۴۵
۳-۱۵- اندازه‌گیری بیان ژن BMP15 با روش Quantitative Real-time PCR ۴۷
۳-۱۵-۱- آغازگرها ۴۸
۳-۱۵-۲- بررسی عملکرد آغازگرها ۴۸
۳-۱۵-۳ - واکنش Real-time PCR ۵۰
۳-۱۵-۴- محاسبات میزان بیان ژن BMP15 ..... ۵۱
۳-۱۶-تجزیه و تحلیل آماری ۵۱

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- دینامیک فولیکولی تخمدان ۵۳
۴-۲- هورمون‌ها و متابولیت‌های پلاسما و مایع فولیکولی ۶۵
۴-۲-۱ کلسترول پلاسمایی ۶۵
۴-۲-۲ HDL پلاسمایی ۶۵
۴-۲-۳ پروژسترون پلاسمایی و مایع فولیکولی ۶۶
۴-۳- بیان رونوشت BMP15 در سلول اووسیت ۶۹

فصل پنجم: نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادات

۵-۱ نتیجه‌گیری کلی ۷۵
۵-۲ پیشنهادات ۷۶
منابع ۷۷

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۲-۱. تاثیر مکمل چربی بر قطر فولیکول غالب تخمدانی گاوهای شیری	۱۶
جدول ۳-۱. آنالیز پروفیل اسیدهای چرب مکمل‌های چربی مصرفی	۳۶
جدول ۳-۲. ترکیب شیمیایی مواد خوراکی مصرف‌شده در جیره بر اساس ماده خشک	۳۷
جدول ۳-۳. ترکیب مواد خوراکی و مغذی جیره‌های آزمایشی	۳۷
جدول ۳-۴. ترادف آغازگرهای BMP15 و GAPDH	۴۸
جدول ۳-۵. اجزای واکنش PCR	۴۹
جدول ۳-۶ . شرایط دمایی واکنش	۴۹
جدول ۳-۷. اجزای واکنش Real-time PCR	۵۱
جدول ۳-۸. برنامه چرخه گرمایی	۵۱
جدول ۴-۱. مقایسه ویژگی‌های تکامل فولیکولی تخمدان گوسفندان (براساس میانگین حداقل مربعات تیمارها) در چرخه فحلی همزمان‌شده	۶۰
جدول ۴-۲. مقایسه تاثیرات جیره‌های آزمایشی بر تعداد فولیکول‌ها در کلاس‌های ۳-۲ میلی‌متری، ۴≥ میلی‌متری و ۲≥ میلی‌متری (میانگین ± حداقل مربعات) در همه روزهای چرخه فحلی همزمان‌شده	۶۳

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱. تکثیر سلولی در فولیکول‌های تازه در حال تکامل و ارتباطات سلول- سلول ۹
شکل ۲-۲. الگوی رشد و تکامل فولیکولی و غلظت‌های FSH و استرادیول هماهنگ با آن در طول چرخه فحلی در گوسفند ۱۳
شکل ۲-۳. مکانیسم پیشنهادی برای تعامل بین BMP15 و گیرنده‌های آن ۲۴
شکل ۲-۴. نمایش جزییات انتقال پیام توسط عوامل پاراکرینی از اووسیت به سلول‌های کومولوس ۲۵
شکل ۲-۵. بیان BMP15، GDF9، BMP6 و گیرنده‌های اعضای خانواده بزرگ TGFβ ۲۷
شکل ۲-۶. تعامل BMP15 و KL در تنظیم میتوز سلول گرانولوزا ۲۹
شکل ۲-۷. جمعیت فولیکولی در تخمدان میش Inverdale ۳۱
شکل ۳-۱. بررسی اولتراسونوگرافی سیستم تولید مثلی میش ۳۸
شکل۳-۲. تصویر اولتراسوند تخمدان راست میش شماره ۴ ..... ۳۹
شکل۳-۳. منحنی استاندارد غلظت پروژسترون ۴۲
شکل ۳-۴. تصویر ژل آگارز ۱/۲٪ از محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آغازگر GAPDH ۵۰
شکل ۴-۱. ویژگی‌های تکامل فولیکولی طی یک چرخه فحلی در گوسفند شماره ۱ ..... ۵۴
شکل ۴-۲. ویژگی‌های تکامل فولیکولی طی یک چرخه‌ی فحلی در گوسفند شماره‌ی ۲ ..... ۵۴
شکل ۴-۳. ویژگی‌های تکامل فولیکولی طی یک چرخه فحلی در گوسفند شماره ۳ ..... ۵۵
شکل ۴-۴. ویژگی‌های تکامل فولیکولی طی یک چرخه فحلی در گوسفند شماره ۴ ..... ۵۵
شکل ۴-۵. ویژگی‌های تکامل فولیکولی طی یک چرخه فحلی در گوسفند شماره ۵ ..... ۵۶
شکل ۴-۶. ویژگی‌های تکامل فولیکولی طی یک چرخه فحلی در گوسفند شماره ۶ ..... ۵۶
شکل ۴-۷. ویژگی‌های تکامل فولیکولی طی یک چرخه فحلی در گوسفند شماره ۷ ..... ۵۷
شکل ۴-۸. ویژگی‌های تکامل فولیکولی طی یک چرخه فحلی در گوسفند شماره ۸ ..... ۵۷
شکل ۴-۹ ویژگی‌های تکامل فولیکولی طی یک چرخه فحلی در گوسفند شماره ۹ ..... ۵۸
شکل ۴- ۱۰ ویژگی‌های تکامل فولیکولی طی یک چرخه فحلی در گوسفند شماره ۱۰ ..... ۵۸
شکل ۴- ۱۱ ویژگی‌های تکامل فولیکولی طی یک چرخه فحلی در گوسفند شماره ۱۱ ..... ۵۹
شکل ۴- ۱۲. ویژگی‌های تکامل فولیکولی طی یک چرخه فحلی در گوسفند شماره ۱۲ ..... ۵۹
شکل ۴-۱۳. تعداد فولیکول‌های کلاس یک (۳-۲ میلی‌متری) طی روزهای چرخه فحلی ۶۱
شکل ۴-۱۴. تعداد فولیکول‌های کلاس دو (۴≥ میلی‌متری) طی روزهای چرخه فحلی ۶۲
شکل ۴-۱۵. تعداد فولیکول‌های کلاس سه (۲≥ میلی‌متری) طی روزهای چرخه فحلی ۶۳
شکل ۴-۱۶. غلظت پلاسمایی کلسترول طی چرخه فحلی ۶۵
شکل ۴-۱۷. غلظت پلاسمایی HDL طی چرخه فحلی ۶۶

شکل ۴-۱۸. غلظت پلاسمایی پروژسترون طی چرخه فحلی ۶۷
شکل ۴-۱۹. غلظت پروژسترون در مایع فولیکولی گوسفندان ۶۷
شکل ۴-۲۰. بیان نسبی رونوشت BMP15 در سلول‌های اووسیت ۷۰
شکل ۴-۲۱. اثر اندازه فولیکول بر میزان بیان نسبی رونوشت BMP15 در سلول‌های اووسیت ۷۰

چکیده

اسیدهای چرب غیراشباع با چندین پیوند دوگانه می‌توانند در روندهای تولید مثلی مختلف از طریق سازوکارهای متنوعی تاثیر بگذارند. در این مطالعه تاثیرات مکمل‌های اسیدهای چرب امگا ۳ و امگا ۶ بر ویژگی‌های تکامل فولیکولی و استروئیدزایی تخمدان و همچنین بیان فاکتور رشد Bone Morphogenetic Protein 15 در اووسیت، که در فولیکول‌زایی تخمدانی نقش دارد، بررسی شد. ۳۰ میش ۴-۲ ساله غیرشیرده به ۳ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند و هر گروه به مدت ۵۰ روز بطور تصادفی با یکی از سه جیره آزمایشی یعنی شاهد، امگا ۶ و یا امگا ۳ تغذیه شدند. با استفاده از سیدر پروژسترون اقدام به همزمان‌سازی چرخه فحلی گوسفندان شد. تغییرات روزانه دینامیک فولیکول‌های تخمدانی با استفاده از اولتراسونوگرافی، طی چرخه فحلی همزمان شده ثبت گردید. خونگیری نیز در طی چرخه فحلی همزمان شده هر ۳ روز یک بار و به منظور اندازگیری غلظت هورمون پروزسترون و متابولیت‌های لیپیدی، انجام شد. فولیکول‌های تخمدانی در انتهای چرخه فحلی همزمان‌شده و پیش از تخمک‌ریزی آسپیره شدند. استخراج RNA از اووسیت‌های فولیکول‌های ۴-۲ میلی‌متری و ≥۵ میلی‌متری تخمدان های هر گوسفند بطور جداگانه انجام گرفت. بیان نسبی رونوشت Bone Morphogenetic Protein 15 در سلول‌های اووسیت به روش Quantitative Real-time PCR اندازگیری شد. مصرف مکمل اسید چرب امگا ۶ سبب افزایش تعداد فولیکول‌های اندازه متوسط (۳-۲ میلی‌متر) و همچنین بزرگ (۴ ≥ میلی‌متر) در گوسفندان شد. تعداد امواج فولیکولی درگوسفندان گروه امگا ۶ یک تمایلی به افزایش نسبت به دو گروه دیگر داشت. یک افزایشی در غلظت کلسترول، HDL و همچنین پروژسترون پلاسمایی گوسفندان گروه امگا ۶ نسبت به گوسفندان گروه‌های امگا ۳ و شاهد مشاهده شد. مکمل‌های اسید چرب هیچ اثری بر غلظت پروژسترون مایع فولیکولی نداشتند. بیان رونوشت Bone Morphogenetic Protein 15 در اووسیت‌های فولیکول‌های ۴-۲ میلی‌متر گوسفندان مصرف کننده مکمل‌های اسید چرب امگا ۳ و امگا ۶ بیش از گروه شاهد بود. اما مکمل‌های اسید چرب هیچ اثری بر بیان این فاکتور رشد در اووسیت فولیکول‌های ≥۵ میلی‌متری نداشتند. همچنین بررسی‌ها نشان داد که اندازه فولیکول نیز بر میزان بیان رونوشت Bone Morphogenetic Protein 15 موثر بوده‌است، چنان که بیان Bone Morphogenetic Protein 15 بطور معنی‌داری در اووسیت فولیکول‌های ≥۵ میلی‌متری نسبت به اووسیت فولیکول‌های ۴-۲ میلی‌متری کاهش یافت. به این ترتیب اسیدهای چرب غیراشباع با چندین پیوند دوگانه و به‌ویژه اسیدهای چرب امگا ۶، می‌توانند با تاثیرگذاری بر بیان فاکتورهای رشد موثر در فولیکول‌زایی و همچنین افزایش تعداد فولیکول‌ها و استروئیدزایی تخمدان سبب بهبود روند تولید مثلی گوسفند شوند.

واژه‌های کلیدی: گوسفند، اسیدهای چرب، فولیکول، استروئید، Bone Morphogenetic Protein 15

فصل اول
مقدمه و اهداف

۱-۱- کلیات

چربی‌های جیره، ویژگی‌های تولید مثلی را در نشخوارکنندگان بهبود می‌بخشند. تغذیه چربی می‌تواند با تغییر اندازه فولیکول غالب و میزان فولیکول‌زایی، کوتاه کردن فاصله بین زایمان تا اولین تخمک‌ریزی بعد آن، افزایش سنتز هورمون‌های استروئیدی، تنظیم سنتز پروستاگلندین‌های رحمی و بهبود بخشیدن کیفیت اووسیت، جنین و شایستگی تکاملی آن‌ها، بر عملکرد تولید مثلی تاثیر بگذارد. البته هنوز مشخص نشده است که این تاثیرات توسط خود این اسیدهای چرب ایجاد می‌شود و یا توسط واسطه‌های بالقوه‌ای که با بیوهیدروژناسیون آن‌ها در شکمبه تولید می‌شوند. تغییرات طول زنجیره کربنی، درجه غیراشباع بودن و جایگاه پیوند دوگانه در زنجیره اسیدی اسیدهای چرب همگی می‌توانند تاثیرات قابل توجهی بر عملکرد آن داشته باشند، که احتمالا خود این مسئله هم عملکرد تولید مثلی دام را متاثر خواهد ساخت. اصولا تاثیرگذاری چربی‌ها روی عملکرد تولید مثلی یا با افزایش بالانس انرژی است و یا با اعمال تغییراتی روی روندهای تولید مثلی که کاملا غیروابسته به ویژگی انرژی‌زایی چربی‌ها است. بعضی از این تاثیرات با تغییر نوع اسیدهای چرب تغییر خواهند کرد. به نظر می‌رسد اسیدهای چرب بلند زنجیره با چندین پیوند دوگانه PUFA[1] که از خانواده‌های امگا ۳ و امگا ۶ هستند، تاثیرات قابل توجه‌تری روی پاسخ‌های تولید مثلی نشخوارکنندگان دارند. تغذیه‌ی میش‌ها با PUFA (نمک کلسیمی اسیدهای چرب روغن ماهی) تعداد فولیکول‌ها را در تخمدان این میش‌ها افزایش داد و همچنین سبب افزایش تعداد اووسیت‌های با کیفیت بالا گشت [۸۸].رابینسون و همکاران [۶۴] گزارش‌کردند، در مقایسه بین مکمل‌سازی جیره با دو منبع چربی امگا ۳ و امگا ۶ ، گاوهای تغذیه شده با هر دو جیره دارای نسبت بیشتری فولیکول‌های اندازه متوسط (۱۰-۵ میلی‌متر) در مقایسه با گاوهای گروه شاهد بودند. اما نکته‌ای که قابل توجه بود این بود که قطر اولین فولیکول غالب به شکل قابل توجهی در گاوهایی که تیمار حاوی امگا ۶ را دریافت کردند، نسبت به گاوهای گروه شاهد

[1] Poly Unsaturated Fatty Acid

بالاتر بود و گاوهای تیمار امگا ۳ هم دارای مقادیر میانه‌ای بودند. البته پروژسترون پلاسمایی در هر دوگروه مصرف‌کننده مکمل چربی کاهش یافت. تغذیه‌ی گاوها با مکمل چربی حاوی سطوح بالای لینولئیک اسید نیز سبب افزایش قطر فولیکول‌های پیش از تخمک‌ریزی شد ولی تاثیری بر تعداد فولیکول‌ها نداشت. استفاده از این مکمل چربی تاثیری بر غلظت یا محتوای کل پروژسترون مایع فولیکولی نداشت [۸۷]. در مطالعه‌ای دیگر تغذیه‌ی میش‌ها با مکمل دارای سطوح بالای امگا ۳ موجب افزایش غلظت پروژسترون مایع فولیکولی در مقایسه با میش‌های تغذیه شده با مکمل حاوی سطوح بالای امگا ۶ شد [۸۶]. مطالعات بعدی نشان داد که افزایش پروژسترون در فولیکول‌های تخمدانی میش‌های تغذیه شده با مکمل حاوی اسیدچرب امگا ۳ متناسب با افزایش بیان یکی از ژن‌های موثر در استروئیدزایی یعنی STAR[1] در سلول‌های تکای میش‌ها بود [۲۷]. بدین ترتیب چربی‌ها درسطح سلول نیز می‌توانند تاثیر مستقیمی بر رونویسی ژن‌هایی داشته‌باشندکه این ژن‌ها پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که برای وقایع تولیدمثلی ضروری هستند. در همین راستا نشان داده‌شده‌است که اعضای خانواده‌ی بزرگ TGFβ[2] نقش مهمی در تنظیم اعمال تخمدانی نظیر تکامل فولیکولی، تولید هورمون‌های استروئیدی و بیان گیرنده‌های گنادوتروپینی در پستانداران برعهده‌دارند [۶۹]. BMP15 یکی از اعضای خانواده بزرگ TGFβ است که بطور غالب در اووسیت و از مرحله‌ی اولیه رشد فولیکولی به بعد بیان می‌شود [۴۹]. BMP15 یک فاکتور حیاتی است که فاز غیروابسته به هورمون‌های گنادوتروپینی را در تکامل فولیکولی پستاندران تنظیم می‌کند [۵۲]. این فاکتور رشد به‌عنوان یک میتوژن عمل می‌کند و تکثیر سلول‌های گرانولوزا را تحریک می‌کند، همچنین در تنظیم عمل دیگر فاکتورهای تنظیمی همچون kit ligand نقش دارد [۶۹]. BMP15 بیان رونوشت گیرنده FSH را مهار می‌کند و در نتیجه اعمال FSH روی سلول‌های گرانولوزا را بلوکه می‌کند و به این ترتیب این فاکتور رشد در تنظیم تکثیر سلول‌های گرانولوزا و حساسیت آن‌ها به FSH در فولیکول‌های در حال تکامل، نقش دارد [۵۹].

با توجه به اهمیتی که BMP15 در تنظیم فولیکول‌زایی و استروئیدزایی تخمدانی دارد، احتمال دارد که این فاکتور رشد اختصاصی اووسیت، یکی از عوامل پاراکرینی داوطلب باشد که می‌تواند تحت‌تاثیر سیگنال‌های مولکول‌های چربی حاصل از مصرف مکمل‌های چربی قرارگیرد و به این ترتیب در تنظیم وقایع تولیدمثلی پی‌آیند نقش داشته‌باشد. براساس اطلاعات موجود در منابع معتبر علمی تاکنون تاثیر مکمل‌های چربی بر بیان فاکتور رشد BMP15 بررسی نشده‌است. به همین منظور مطالعه حاضر برای اولین بار اثر تغذیه‌ی اسیدهای چرب امگا ۳ و امگا ۶ بر بیان فاکتور رشد BMP15 در سلول‌های اووسیت گوسفند و در شرایط درون‌تنی را بررسی کرده است.

۱-۲- اهداف

۱ـ بررسی وجود یا عدم وجود تاثیر اسیدهای چرب مصرفی بر میزان بیان ژن BMP-15 در سلول‌های اووسیت.

۲ـ بررسی ارتباط میان میزان بیان BMP-15 با شمار و اندازه فولیکول‌ها در تخمدان پیش از تخمک‌ریزی.

۳ـ با انجام اولتراسونوگرافی تخمدان، تغییرات اندازه فولیکول‌ها درطول چرخه فحلی بررسی می‌شود.

---

[1] Steroidogenic acute regulatory protein

[2] Transforming Growth Factor β

۴ـ اندازگیری میزان پروژسترون پلاسمایی و مایع فولیکولی و بررسی ارتباط بین میزان پروژسترون با اندازه فولیکول‌ها.

فصل دوم
بررسی منابع

۲-۱- چرخه فحلی گوسفند

میش یک نشخوارکننده پلی‌استروس فصلی است. این حیوان دارای الگوهای عملکرد تولید مثلی کنترل شونده با دو فاز مجزا است. فاز اول، چرخه‌های ۱۷-۱۶ روزه فحلی است که توسط مارشال در سال ۱۹۰۳ [۴۰] توضیح داده شد. دومین فاز، چرخه سالانه فعالیت تخمدانی است‌که توسط دوره نوری (فتوپریود) مشخص می‌شود [۲۴]. چرخه‌های تخمک‌ریزی نرمال در بیشتر نژادهای گوسفند در اواخر تابستان و اوایل پاییز اتفاق می‌افتد (فصل جفت‌گیری)، و معمولا تخمک‌ریزی در زمستان و بهار متوقف می‌شود (فصل غیرتولید مثلی) [۸۲].

چرخه فحلی تحت تاثیر یک زنجیره ترشحات هورمونی است که توسط هیپوتالاموس با ترشح هورمون رهاکننده گنادوتروفین (GnRH[1])، غده هیپوفیز با ترشح هورمون لوتئینی‌کننده (LH[2]) و هورمون محرک فولیکول (FSH[3]) ، فولیکول که استروئیدها و اینهیبین را ترشح می‌کند، جسم زرد که پروژسترون و اکسی‌توسین را ترشح می‌کند و رحم که مسئول ترشح پروستاگلندین F2α است، تنظیم می‌شود. هر واقعه‌ای در این زنجیره آغاز کننده تغییر هورمونی بعدی است. هورمون GnRH هیپوتالاموس ترشح LH از هیپوفیز پیشین را تحریک می‌کند و آن هم تخمک‌ریزی یک فولیکول بزرگ را سبب می‌شود و لوتئینی‌شدن بقایای فولیکول را تحریک می‌نماید. همچنان‌که جسم زرد تکامل می‌یابد، غلظت‌های پروژسترون شروع به افزایش می‌کند و در طول فاز لوتئالی بالا باقی می‌ماند. در روزهای ۱۳-۱۱ چرخه که حداقل حمایت لوتئوتروپیکی وجود دارد منجر به افزایش پروستاگلندین و به این وسیله القای لوتئولایزیز می‌شود و در نتیجه غلظت‌های پروژسترون در خون کاهش می‌یابد [۲۴]. لوتئولایزیز علامتی برای شروع گامه فولیکولی است. کاهش سطوح پروژسترون منجر به افزایش در فرکانس پالس‌های LH می‌شود و تحریک ترشح استرادیول از فولیکول

[1] Gonadotrophin releasing hormone
[2] Luteinizing hormone
[3] Follicle-stimulating hormone

تخمک‌ریزی‌کننده سبب القای فحلی و پیک LH[1] می‌شود. در مرحله بعد، پیک LH به ترشح استرادیول، با القای تخمک‌ریزی و لوتئینی شدن خاتمه می‌دهد و به این ترتیب چرخه بعدی آغاز می‌شود [۲].

۲-۲- تکامل و تمایز فولیکولی

مخزن بزرگی از فولیکول‌های آغازین در طی تکامل جنینی در تخمدان گوسفند ذخیره می‌شود. بررسی‌ها نشان داده‌است که اولین فولیکول‌ها حوالی ۷۰ روزگی آبستنی شکل می‌گیرند [۳۹]. این ذخیره تجدیدپذیر نیست و در طول زندگی حیوان این فولیکول‌ها به مراحل اولیه، ثانویه و انترال تا پیش از تخمک‌ریزی نمودن تکامل می‌یابند. تعداد خیلی کمی از فولیکول‌ها تا تخمک‌ریزی پیش می‌روند و بیشترشان (بیش از ۹۹٪) در هر مرحله تکامل طی فرایند آترزی از بین می‌روند. با وجودی‌که این عدد خیلی متغیر است ولی تخمین زده شده است که حدود ۱۰۰۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰۰ فولیکول در تخمدان یک بره در زمان تولد وجود دارد [۳۳] و در هر زمان حدود ۵۰ فولیکول انترال در تخمدان یک گوسفند بالغ وجود دارد [۱۵].

۲-۳- رشد فولیکولی

۲-۳-۱- فولیکول آغازین[2]

در میش فولیکول‌های آغازین از ابتدا حوالی روز ۷۵ جنینی شکل می‌گیرند و حداکثر شمارآن‌ها بین روزهای ۱۲۰-۱۰۰ آبستنی در جنین موجود است [۶۷]. با بالارفتن سن میش تعداد فولیکول‌های آغازین به طور فزاینده‌ای کاهش می‌یابد. با وجودی‌که شمار دقیق فولیکول‌های آغازین در میش‌های مسن مشخص نیست، داده‌های بی‌شماری از میش‌هایی که هنوز در ۱۴ سالگی هم تولید نتاج می‌کنند وجود دارد و این موضوع می‌تواند بیانگر این حقیقت باشد که این گونه‌ها در سراسر زندگی‌شان دارای فولیکول هستند [۴۸].

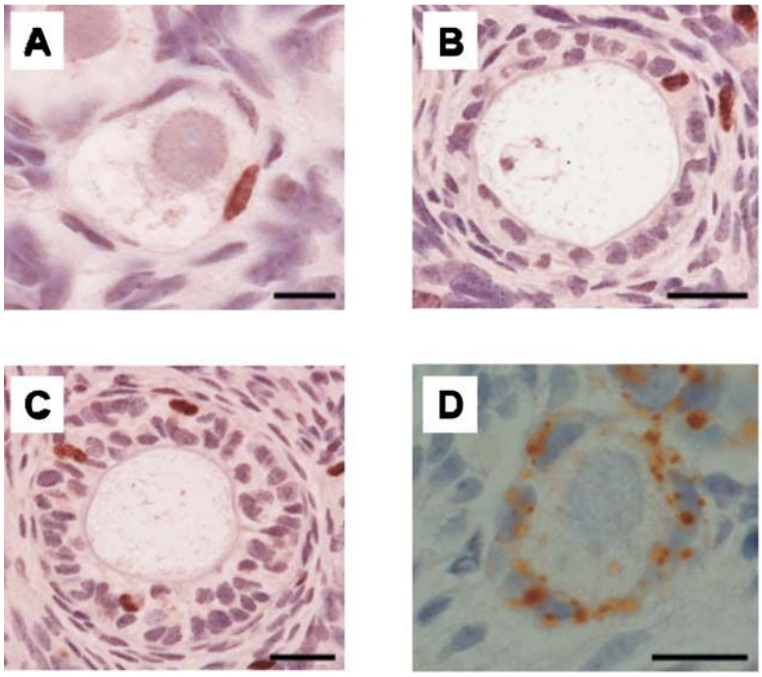
در گوسفند فولیکول آغازین که خیلی آرام نیز رشد می‌کند (شکل ۲-۱، تیپ ۱)، دارای ۳ تا ۵۲ (به طور متوسط ۱۶) سلول گرانولوزا و یک اووسیت که قطرش بین ۵۲-۲۳ میکرومتر (به طور متوسط ۳۵ میکرومتر) است [۳۷]. تقریبا هیچ آترزی در فولیکول آغازین اتفاق نمی‌افتد [۸].

۲-۳-۲- انتقال از مرحله رشد فولیکولی آغازین به مرحله اولیه[3]

در میش فولیکول اولیه دارای ۵۲۰-۳۰ سلول گرانولوزا (به طور متوسط ۱۲۸) سلول و اووسیتی با قطر ۳۱ تا ۸۱ میکرومتر (به طور متوسط ۵۲ میکرومتر) است [۳۷]. در طول این مرحله از رشد، سلول‌های گرانولوزا همگی از نظر ظاهری مکعبی شکل می‌شوند و جمعیت آن‌ها دستخوش ۲-۱ بار دو برابر شدن، همراه با افزایشی در قطر اووسیت می‌شود (شکل ۲-۱). سیگنال‌های مولکولی که ورود فولیکول آغازین یا انتقالی (نوع ۱ یا نوع 1a) را به مراحل تکامل فولیکول اولیه یا پری-

[1] Surge
[2] Primordial
[3] Primary

انترال آغاز می‌کنند نامعلوم هستند، اما به احتمال زیاد شامل چندین فاکتور تحریک‌کننده و ممانعت‌کننده خواهد بود. آنچه مشخص است این است که هورمون‌های هیپوفیزی نقشی در این فاز اولیه رشد ندارند، چرا که هیچ گیرنده‌ای برای FSH روی سلول‌های گرانولوزا تا زمان شکل گرفتن فولیکول اولیه وجود ندارد، وگیرنده‌های LH نیز فقط زمانی روی سلول‌های تکا مشخص می‌شوند که این نوع سلول به فولیکول‌های ثانویه تمایز یابند و علاوه بر این، برداشتن هیپوفیز این فاز رشد را متوقف نکرد [۴۸].



شکل ۲-۱- تکثیر سلولی در فولیکول‌های تازه در حال تکامل و ارتباطات سلول- سلول که با نشان‌گذاری BrdU در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های آغازین (تیپ ۱، A)، اولیه (تیپ ۲، B)، ثانویه (تیپ ۳، C) و همچنین با روشconnexin 37 immunostaining در فولیکول تیپ ۱ (D) تشخیص داده شده است [۳۷].

۲-۳-۳- انتقال از مرحله فولیکول اولیه به مرحله پری‌انترال بزرگ

یک فولیکول پری‌انترال بزرگ در میش دارای ۱۰۹۰ تا ۳۴۰۴ سلول گرانولوزا (به طور متوسط ۲۱۰۴) و اووسیتی با قطر ۱۲۰-۷۱ میکرومتر (به طور متوسط ۸۸ میکرومتر) است. به این ترتیب برای شکل‌گیری یک فولیکول پری انترال بزرگ از مرحله اولیه به بعد، جمعیت سلول‌های گرانولوزا بیش از ۶ بار دو برابر می‌شود و قطر اووسیت نیز ۱/۷ برابر خواهد شد [۳۷] (شکل ۲-۱).

آنچه در این مرحله قابل توجه است این است که سلول‌های گرانولوزا گیرنده FSH و سلول‌های تکا نیز گیرنده LH را به تکامل می‌رسانند و در شرایط آزمایشگاهی، فولیکول‌های پری‌انترال بزرگ به گیرنده‌های LH و FSH با سنتز

cAMP، و بعد آن نیز فولیکول‌های انترال کوچک با سنتز پروژستین‌ها و اندروژن‌ها واکنش نشان می‌دهند [۴۵]. در میش‌های دارای هیپوفیز سالم، سطح آترزی فولیکول در فولیکول‌های پری‌انترال خیلی پایین است [۸]. همچنین بعد از هیپوفیزبرداری، هیچ افزایشی در رواج آترزی فولیکول‌های پری‌انترال در کوتاه مدت وجود ندارد. هرچند بعد از گذشت مدت طولانی از برداشتن هیپوفیز (که بیش از ۶۰ روز می‌باشد) یک افزایش درآترزی مشاهده‌شد ولی شمارکل فولیکول‌های با قطر حدود ۳-۲ میلی‌متر بدون تغییر باقی ماند و هیچ اختلافی تحت شرایط آزمایشگاهی در شمار فولیکول‌های حساس با توجه به سنتز cAMP القا شده با گنادوتروفین مورد توجه نبود [۴۶]. از اواخر فاز پری‌انترال تا زمان تخمک‌ریزی، حداقل در گونه‌های تک قلوزا مثل انسان و گوسفند مشخص است که فولیکول‌ها به یک شیوه وابسته به سلسله مراتب[1] تکامل می‌یابند، و تعداد خیلی کم و حتی بعضا هیچ دو فولیکولی در یک لحظه زمانی در یک مرحله یکسان از تکامل نخواهند بود. گزارش شده است که در میش این الگوی سلسله مراتبی تکامل با برداشتن هیپوفیز تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد [۴۵]. همچنین می‌توان در میش‌هایی که مدت طولانی است هیپوفیزبرداری در آن‌ها انجام شده، و یا ارتباط هیپوفیز- هیپوتالاموسی آن‌ها قطع شده، تخمک‌ریزی را در ادامه یک دوره‌کوتاه مدت تیمار با PMSG[2] و HCG[3] و یا با پالس‌های خارجی GnRH، PMSG و رژیم قرص GnRH القا کرد. در مجموع یافته‌ها نشان می‌دهند که رشد فولیکول طی مراحل پری‌انترال، وابسته به غلظت‌های آستانه‌ای یا نوسانات کوتاه مدت هورمون‌های هیپوفیزی نیست [۴۸].

۲-۳-۴- تکامل از مرحله پری‌انترال بزرگ به فولیکول وابسته به گنادوتروفین

در میش یک فولیکول تخمدانی به محض رسیدن به قطر حدود ۳ میلی‌متر وابسته به گنادوتروفین‌ها می‌شود. بنابراین لازم است که جمعیت سلول‌های گرانولوزا از مرحله پری‌انترال به بعد حدود ۸ بار دو برابر شود [۴۶]. در طول این مرحله رشد، یک نسبت رو به افزایشی از سلول‌های گرانولوزا اساسا از یک موقعیت تکثیری[4]، تبدیل به یک موقعیت تمایزی[5] می‌شوند. علاوه بر این، در طی این دوران نیز فولیکول‌ها در حال تکامل به یک شیوه وابسته به سلسله مراتب هستند، و هیچ دو فولیکولی در یک زمان یک ریزمحیط[6] هورمونی مشترک ندارند. همچنین در این فاصله شمار قابل توجهی از فولیکول‌ها (بیشتر از ۸۰-۳۰ ٪) با پدیده آترزی از دست می‌روند [۱۷]. تعداد فولیکول‌های غیراترتیک که تا قطر ۳ میلی‌متر رشد می‌کنند در گوسفند خیلی متغیر است (۲۵-۱)، و بستگی به ژنوتیپ، مرحله چرخه فحلی و فصل سال دارد [۴۷].

رشد فولیکول از مرحله اولیه به مرحله پری‌انترال از حدود ۲۵ روز در دوران زندگی جنینی، تا چندین ماه در زندگی زمان بلوغ متغیر است [۷۰]. اگرچه رشد فولیکول انترال از زمانی‌که به قطر حدود ۲ میلی‌متر می‌رسد تا وقتی‌که تخمک‌ریزی نماید، خیلی سریع‌تر است و زمان کوتاهی نظیر ۳ روز وقت می‌برد [۸].

---

[1] Hierarchial manner
[2] Pregnant mares serum gonadotropin
[3] Human chorionic gonadotropin
[4] Proliferating state
[5] Differentiating state
[6] Microenvirironment

القای فعالیت اروماتاز که مرحله حیاتی در تکامل فولیکول است نیز در مرحله فولیکول انترال اتفاق می‌افتد. اگرچه مقادیر قابل ارزیابی استرادیول تا زمانی‌که فولیکول به قطر تقریبی ۰/۵ میلی‌متر برسد، در مایع فولیکولی تشخیص داده نمی‌شود. فعالیت اروماتازی هرسلول به موازات افزایش حساسیت سلول‌های گرانولوزا به FSH افزایش می‌یابد [۱۷]. فاکتور رشد IGF-I[1] تکثیر سلول‌های‌گرانولوزا را تحریک می‌کند و در متمایز نمودن سلول‌های گرانولوزا با FSH همکاری می‌نماید [۶۲]. اکثر فولیکول‌های حساس به گنادوتروفین‌ها دارای اندروژن در مایع فولیکولی هستند و پیشرفته‌ترین آن‌ها مقداری فعالیت اروماتازی هم دارد و در نتیجه دارای استرادیول در مایع فولیکولی خود نیز هست [۶۸].

۲-۴- فولیکول وابسته به گنادوتروفین‌ها

برای پیش رفتن یک فولیکول از مرحله حساسیت و پاسخ‌گویی به گنادوتروفین‌ها تا وابستگی به گنادوتروفین‌ها، یک ضرورت قطعی برای حضور میزانی از FSH در خون وجود دارد. با حمایت کافی FSH، افزایش بیشتری در فعالیت اروماتازی و فولیکول‌هایی که استرادیول بیشتری ترشح می‌کنند وجود خواهد داشت. گیرنده LH روی سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های این مرحله ظاهر می‌شود. بدون حمایت کافی FSH فعالیت اروماتاز حفظ نمی‌شود، ترشح استرادیول کاهش می‌یابد، اندروژن‌ها درون فولیکول جمع می‌شوند و موجب آترزی فولیکول می‌شوند [۸۲].

۲-۵- فولیکول‌های تخمک‌ریزی‌کننده

در میش‌های تک‌قلوزا، فولیکول‌های تخمک‌ریزی‌کننده دارای قطر ۵ ≤ میلی‌متر هستند. تبدیل یک فولیکول وابسته به گنادوتروفین به فولیکولی که قادر به تخمک‌ریزی باشد نیازمند غلظت‌های کم ولی ضروری FSH است [۹]. فولیکول‌های تخمک‌ریزی کننده دارای تعداد بیشتری گیرنده LH و FSH در سلول‌های گرانولوزای خود هستند. افزایش اندازه فولیکول تخمک‌ریزی‌کننده سبب افزایشی در شمار سلول‌های گرانولوزا و تجمع مایع فولیکولی در انتروم می‌شود [۷۹]. فعالیت اروماتاز در این فولیکول‌ها در حداکثر میزان خود است و به همین دلیل فولیکول تخمک‌ریزی کننده دارای بالاترین سطوح استرادیول درون‌فولیکولی است. فولیکول تخمک‌ریزی کننده مسئول بیش از ۹۰٪ غلظت در گردش این هورمون است. عامل حیاتی در تکامل مداوم فولیکول تخمک‌ریزی کننده توانایی آن در سنتز استرادیول است [۷۹]. تعداد فولیکول‌هایی که از یک مرحله تکاملی به مرحله دیگر می‌روند پیوسته کاهش می‌یابد، به این ترتیب شمار فولیکول‌هایی که برای تخمک‌ریزی انتخاب می‌شوند و در حقیقت سهمیه تخمک‌ریزی، به طور دقیقی تنظیم می‌شود. در طی روند تکامل، فولیکول‌ها پی‌درپی به گنادوتروفین‌ها حساس‌تر می‌شوند [۸۵]. مراحل تکامل فولیکولی توسط گنادوتروفین‌ها به شیوه‌ای چرخشی۲ تنظیم می‌شود که امواج فولیکولی نامیده می‌شود.

---

[1] Insulin-like Growth Factor I
[2] Cyclic manner