به نام خدا

دانشگاه شهرکرد

دانشکده دامپزشکی

شماره پایان نامه: ۱۹۲

قابلیت بقای جنین‌های تولید شده گاوی در شرایط آزمایشگاهی پس از فرایند بیوپسی در مرحله مورولا

پایان نامه دکترای عمومی دامپزشکی

سارا برجیان بروجنی

واحد اطلاعات مدارک علمی بروجن
شعبه مدارک
۱۳۸۹/۱/۲۲

استاد راهنما

دکتر ابوالفضل شیرازی

۱۳۸۶

۱۳۳۵۳۷

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکترای عمومی دامپزشکی خانم سارا برجیان بروجنی

تحت عنوان

قابلیت بقای جنین‌های تولید شده گاوی در شرایط آزمایشگاهی پس از فرایند بیوپسی در مرحله مورولا

در تاریخ ۸۷/۱۱/۰۶ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و با رتبه ... مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

۱. استاد راهنمای پایان نامه	دکتر ابوالفضل شیرازی
۲. استاد مشاور پایان نامه	دکتر ناصر شمس اسفندآبادی
۳. استاد داور	دکتر سعید حبیبیان
۴. استاد داور	دکتر علی محمد احدی
معاون پژوهشی دانشکده	دکتر پژمان میرشکرایی

مسئولیت کلیه عقاید و نظراتی که در این پایان نامه آورده شده است به عهده نگارنده بوده و دانشکده دامپزشکی هیچ گونه مسئولیتی را در این زمینه تقبل نمی نماید.

دکتر عبدالکریم زمانی مقدم

رئیس دانشکده دامپزشکی

با تشکر و قدردانی از:

استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر ابوالفضل شیرازی که در نهایت مهربانی، صبر و شکیبائی در تمام مراحل انجام پایان نامه مرا یاری نمودند، روحیه ی جستجگی ناپذیر ایشان، امید و انگیزه ی حرکت به سوی علم و دانش را در ضمیرم بارور نمود. خداوند را شاکرم از این که افتخار شاگردی در محضر پربار علمی و اخلاقی ایشان را به من عطا فرمود، سرافرازی و موفقیت روز افزون ایشان را در تمامی امور از خداوند متعال خواستارم.

استاد گرانقدرم جناب آقای دکتر محمد نیا، نمیدانم چگونه پاس بدارم این همه بزرگواری را، پدرانه همراهیم کردید تا ناملایمات زندگی لحظه ای مرا از حرکت باز ندارد، سخنان دلنشینتان همیشه امید بخش زندگیم خواهم بود. سلامتی و موفقیت روز افزونتان را در تمام مراحل زندگی آرزومندم.

راهنمایی استاد مشاور گرانقدرم جناب آقای دکتر ثمین.....

جناب آقای دکتر حبیبیان و جناب آقای دکتر احدی که زحمت داوری این پایان نامه را پذیرا شدند.

جناب آقای دکتر احمدی به خاطر راهنمائی های ارزنده شان و با آرزوی موفقیت روز افزون برای ایشان در تمام مراحل زندگی.

جناب آقای دکتر نظری که برادرانه همراهیم نمودند و تجارب ارزشمند شان را صادقانه و مشتاق در اختیارم گذاشتند. روزهایی سرشار از موفقیت و بهروزی را برای ایشان آرزومندم.

یاوران گرامیم در پژوهشکده فناوری جنین دام، سرکار خانم دکتر حیدری، دکتر سمیه استاد حسینی و جناب آقای دکتر امین بحیرایی.

کلیه اساتید گرانقدر و کارکنان محترم دانشکده دامپزشکی که در سالیان پرشور دانشگاهی مرا درس علم و زندگی آموختند.

دوستان عزیزم نسیم، فروغ، سیما، فاطمه، فروغ، الهام، نیلوفر و کاملیا به پاس محبت های بی دریغشان و به حرمت دوستی و مهربانی شکرگزار همراهیشان خواهم ماند.

همکلاسی های عزیزم به خاطر همه ی لحظات ناب و پرخاطره ی روزگار دانشگاهی که در کنارشان سپری کردم.

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات،

ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع

این پایان نامه متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

تقدیم به

پدرم

رفتنت را هنوز باورم نیست.....

لبخند پر محبت و طنین صدای گرمت همیشه در خاطرم زنده است

آفتاب مهرت در آسمانی قلبم همچنان پابرجاست و هرگز غروب نخواهد کرد.

و

مادرم

امید زندگیم

دستان رنج کشیده ات را بوسه می زنم و خاک پایت را توتیای چشمانم می کنم.

اگر دعای خالصانه ات همراهم نبود....

خواهر عزیزتر از جانم

ملیکا

و برادر نازنینم

امید

و تقدیم به

روح بلند همکلاسی عزیزم، "دکتر محمد تقدیری"

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول

مقدمه ۱

۱-۱- مقدمه ۱

فصل دوم

کلیات ۳

۲-۱- تولید جنین در شرایط In vivo ۳

۲-۱-۱- روند ایجاد سلول جنسی ماده ۳

۲-۱-۱-۱- ویژگی‌های اووسیت ثانویه ۵

۲-۱-۲- روند ایجاد سلول جنسی نر ۶

۲-۱-۳- لقاح ۷

۲-۱-۴- تسهیم ۹

۲-۲- تولید جنین در شرایط *In vitro* ۱۱

۲-۲-۱- بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM) ۱۱

۲-۲-۲- ظرفیت پذیری اسپرم ۱۴

۲-۲-۳- لقاح آزمایشگاهی (IVF) ۱۶

۲-۲-۴- کشت جنین در آزمایشگاه (IVC) ۱۷

۲-۳- مقایسه‌ی جنین‌های طبیعی با جنین‌های آزمایشگاهی ۱۹

۲-۴- بیوپسی ۲۰

۲-۴-۱- بیوپسی از تخمک (اخذ جسم قطبی) ۲۱

۲-۴-۲- بیوپسی از جنین ۲۳

۲-۴-۲-۱- بیوپسی از جنین ۴ سلولی ۲۴

۲-۴-۲-۲- بیوپسی از جنین ۸ سلولی ۲۵

۲-۴-۲-۳- بیوپسی از مورولا ۲۵
۲-۴-۲-۴- بیوپسی از بلاستوسیست ۲۶
۲-۴-۳- بیوپسی از جنین در سنین مختلف ۲۷
۲-۴-۴- روش های بیوپسی ۲۸
۲-۴-۴-۱- آسپیره کردن سلول ها با استفاده دستگاه میکرومنیپولاسیون ۲۸
۲-۴-۴-۱-۱- روش های سوراخ کردن زونا پلوسیدا ۲۹
۲-۴-۴-۲- برش بر روی زونا پلوسیدا و جداسازی سلولها با استفاده از تیغه فلزی ۳۰
۲-۴-۵- مقایسه دو روش بیوپسی ۳۳
۲-۴-۶- توجه به برخی عوامل در حین بیوپسی و بعد از آن ۳۲
۲-۴-۷- کاربرد های بیوپسی از جنین ۳۴
۲-۴-۷-۱- تشخیص قبل از لانه گزینی جنین (PGD) ۳۴
۲-۴-۷-۲- تولید سلولهای بنیادی جنینی ۳۷
۲-۴-۷-۳- تخمین میزان رشد و تکامل جنین ۳۹
۲-۴-۷-۴- استفاده از بلاستومر بیوپسی شده به عنوان سلول دهنده در روند شبیه سازی ۴۰
۲-۴-۸- تاثیر سیستم کشت بر روی جنین‌های بیوپسی شده ۴۰
۲-۴-۹- ویژگی های بلاستومر اخذ شده از جنین در مراحل مختلف تکوین ۴۱
۲-۵- انجماد ۴۴
۲-۵-۱- انجماد شیشه ای ۴۵
۲-۵-۲- انجماد جنین ۴۵
۲-۵-۲-۱- انجماد جنین در مراحل مختلف تکوینی ۴۷
۲-۵-۲-۱-۱- انجماد زیگوت ۴۷
۲-۵-۲-۱-۲- انجماد جنین تسهیم شده ۴۸
۲-۵-۲-۱-۳- انجماد بلاستوسیست ۴۸
۲-۵-۳- آسیب های حاصل از انجماد جنین (در طول روند انجماد و ذوب) ۴۸
۲-۵-۴- عوامل تکنیکی موثر در انجماد شیشه ای ۴۹
۲-۵-۴-۱- زمان تعادل و آبگیری ۴۹
۲-۵-۴-۲- سرعت سرد کردن ۵۰

۲-۵-۴-۳- سرعت گرم کردن ۵۱
۲-۵-۴-۴- ترکیب مناسب محلول انجماد ۵۲
۲-۵-۴-۵- نقش ضدیخ ها ۵۲
۲-۵-۴-۶- ظرف حامل جنین جهت انجماد شیشه ای ۵۳
۲-۵-۴-۷- خاستگاه جنین (In vivo یا In vitro) ۵۴
۲-۵-۵- ذوب و آبدهی ۵۵
۲-۵-۶- انجماد جنین بیوپسی شده ۵۵

فصل سوم

مواد و روش کار ۵۹
۳-۱- تولید جنین های حاصل از لقاح خارج رحمی (IVF) ۶۰
۳-۱-۱- جمع‌آوری تخمدان‌ها از کشتارگاه و استحصال تخمک‌ها از مایع فولیکولی ۶۰
۳-۱-۲- بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌ها (IVM) ۶۰
۳-۱-۳- آماده سازی اسپرم و لقاح داخل آزمایشگاهی (IVF) ۶۱
۳-۱-۴- کشت داخل آزمایشگاهی جنین‌های حاصل از IVF ۶۱
۳-۱-۵- تازه کردن محیط کشت جنین‌ها ۶۲
۳-۲- بیوپسی ۶۲
۳-۲-۱-نفوذ به‌داخل لایه زونا پلوسیدا به روش شیمیایی ۶۲
۳-۲-۲- بیوپسی بلاستومر از جنین ۶۴
۳-۳- ارزیابی جنین‌ها ۶۶
۳-۳-۱- ارزیابی کمی جنین‌های بیوپسی شده ۶۶
۳-۳-۲- ارزیابی کیفی جنین‌های بیوپسی شده با استفاده از رنگ‌آمیزی افتراقی ۶۶
۳-۴- انجماد جنین‌های بیوپسی شده ۶۷
۳-۴-۱- تهیه محلول‌های انجمادی ۶۷
۳-۴-۲- مراحل انجام روند انجماد شیشه ای ۶۸
۳-۴-۳- ذوب جنین ۶۹
۳-۴-۴- ارزیابی قابلیت حیاتی جنین‌های منجمد شده ۶۹

۳-۵- تجزیه و تحلیل آماری ۷۰

فصل چهارم

نتایج ۷۶

۴-۱- تأثیر سن و تعداد سلول جنین‌های بیوپسی شده بر رشد و تکامل بعدی جنین ۷۶

٤-۲- تأثیر سن و تعداد سلول جنین‌های بیوپسی شده بر تعداد سلول‌های بلاستوسیست حاصل از آن‌ها ۷۷

۴-۳- تأثیر سن و تعداد سلول جنین‌های بیوپسی شده بر ماندگاری بلاستوسیست‌های منجمد – ذوب شده ۷۸

فصل پنجم

بحث ۸۱

منابع ۸۷

چکیده‌ی انگلیسی ۱۰۷

چکیده:

با پیشرفت در زمینه دستکاری های جنین، امکان بیوپسی (نمونه برداری) جنین و استفاده از این فناوری در برنامه‌های اقتصادی انتقال جنین و انجام آنالیزهای ژنتیکی مستقیم در مراحل قبل از لانه‌گزینی جنین فراهم شده است.

هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، ارزیابی رشد و تکامل جنین‌های گاوی بیوپسی شده در سنین مختلف و در مرحله‌ی مورولا ، در آزمایشگاه بوده است که علاوه بر آن مقاومت بلاستوسیست‌های حاصل از جنین‌های بیوپسی شده در برابر انجماد نیز، مورد بررسی قرار گرفت.

تخمک‌های مشتق شده از تخمدان‌های به دست آمده از کشتارگاه، با اسپرم‌های منجمد-ذوب شده‌ای که با غلظت‌های مختلف پرکل جدا گردیدند، بارور شده و سپس به صورت هم‌کشتی با سلول‌های اویداکتی کشت داده شدند. جنین‌های ۲، ۳ و۴ روزه‌ی تولید شده در شرایط آزمایشگاهی (روز صفر، روز لقاح) و در مراحل ۱۶-۴ سلولی، به منظور انجام بیوپسی به روش آسپیراسیون، در قطرات ۱۰۰ میکرولیتری HEPES-SOF + 4mg/ml BSA قرار می‌گرفتند. بلاستوسیست‌های به دست آمده، پس از کشت مجدد جنین‌های بیوپسی شده در محیط کشت، در روز هفتم، به روش معمول انجماد شیشه ای و با استفاده از نی انجماد، پس از ۲ بار مجاورت با محلول‌های تعدیل کننده به مدت ۵ دقیقه، توسط یک پیپت پاستور نازک و بلند به ستون ۱۵ میلی متری انجماد (حاوی ۳/۴ مول گلیسرول و ۴/۶ مول اتیلن گلیکول) درون نی منتقل شده و در نیتروژن مایع قرار می گرفت.

نتایج این مطالعه نشان می دهد که رشد و تکامل جنین‌های بیوپسی شده به طور مشخصی تحت تأثیر سن و همین‌طور تعداد سلول‌های جنین در زمان بیوپسی است. میزان رشد و تکامل جنین‌های ۱۶ سلولی بیوپسی شده در روز ۴ (لقاح، روز۰) تا مرحله‌ی بلاستوسیست، بیشتر از دیگر گروه‌ها بوده و درصد بلاستوسیست در جنین‌های ۸ سلولی بیوپسی شده در روز ۴ نیز به طور معنی‌داری از جنین‌های بیوپسی شدهی ۲ روزه و همین‌طور جنین‌های گروه IVF، بالاتر مشاهده شد. کمترین میزان بلاستوسیست مربوط به جنین‌های بیوپسی شده در روز ۲ بود. ضمن این که میزان تفریخ در بین گروه‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری نداشت.

از نظر آماری تفاوت در تعداد کلی سلول‌ها، سلول‌های تروفکتودرم و توده سلولی داخلی بلاستوسیست های حاصل از جنین‌های بیوپسی شده ۴، ۸ و ۱۶ سلولی در سنین مختلف، معنی‌دار نیست.

میزان تفریخ بلاستوسیست‌های منجمد – ذوب شده در جنین‌های ۴ سلولی بیوپسی شده در روز ۲، نسبت به جنین‌های ۸ سلولی بیوپسی شده در روز ۲ و ۳ و همین‌طور جنین‌های ۱۶ سلولی بیوپسی شده در روز ۴ ، به طور معنی‌داری بالاتر نشان داده شد.

با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که بیوپسی به روش آسپیراسیون قبل از متراکم شدن جنین، تأثیر مخربی بر رشد و تکامل جنین‌های گاوی بر جا نمی‌گذارد و بهترین زمان برای بیوپسی از جنین‌های گاوی، روز چهارم و در جنین‌های ۱۶ سلولی می‌باشد. به علاوه انجماد شیشه‌ای، ماندگاری بلاستوسیست‌های حاصل از جنین‌های بیوپسی شده‌ی گاوی را متأثر نمی نماید.

فصل اول

مقدمه و معرفی طرح:

پیشرفت در زمینه روش‌های دستکاری جنین، زمینه را برای استفاده از فناوری بیوپسی (نمونه برداری) جنین در برنامه‌های اقتصادی انتقال جنین فراهم نموده و امکان انجام آنالیزهای ژنتیکی مستقیم در مراحل قبل از لانه‌گزینی جنین را میسر نموده است.

از جمله کاربردهای آنالیز ژنتیکی می‌توان به تعیین جنسیت جنین، تعیین مارکرهای ژنتیکی مرتبط با ویژگی‌های مهم اقتصادی حیوان و همچنین به شناسایی ژن‌های مرتبط با بیماری‌های ژنتیکی اشاره نمود. تولید نوزادان با جنسیت مشخص، ضرورتی مهم در برنامه‌های تولیدمثل حیوانات اهلی است. اگرچه چگونگی انتخاب اسپرم و روش‌های غیر تهاجمی برای تعیین جنسیت جنین مطرح شده‌اند، ولیکن تعیین جنسیت دقیق جنین مستلزم استفاده از بیوپسی و آنالیز ژنتیکی به وسیله‌ی روش‌های بیولوژی مولکولی است. در انسان نیز توسعه‌ی روش‌های PGD (Pre-implantation Genetic Diagnosis) به همراه روش بیوپسی جنین شانس تولد بچه‌هایی سالم را به زوج‌های مبتلا به بیماری‌های ژنتیکی قابل انتقال، اعطا نموده است.

به منظور بالا بردن دقت آزمون در آنالیزهای ژنتیکی چندگانه، میزان DNA باید به اندازه‌ی کافی زیاد بوده و در عین حال برای حفظ قابلیت بقای جنین‌های بیوپسی شده، می‌بایست تعداد سلول‌های اخذ شده از جنین را تا حد ممکن کاهش داد. در عین حال ابقای جنین‌های بیوپسی شده تا زمانی که نتیجه‌ی تعیین ژنوتیپ مشخص شود، امری ضروری است. از طرفی مطالعات انجام شده در مورد حساسیت جنین نسبت به دستکاری‌های بعمل آمده معرف ایجاد تاثیرات منفی بر روی جنین و در نتیجه کاهش ماندگاری آن می‌باشد. به عنوان مثال ایجاد منفذی کوچک در زونا پلوسیدا به منظور انجام ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) بر

روی Cryosurvival جنین انسان تأثیرگذار نبوده چرا که ساختار سطح تخمک بالغ، به شدت قابل انعطاف می‌باشد. ولیکن در Assisted hatching (AI) و یا بیوپسی جنین به منظورPGD، ایجاد منفذی بزرگ در زونا پلوسیدا بر روی Cryosurvival جنین تاثیر منفی داشته است. در واقع کاهش توده سلولی در اثر بیوپسی جنین و نیز صدمات ناشی از انجماد تاثیر منفی مضاعفی بر رشد جنین به همراه دارد.

مشخص‌گردیده است بیوپسی جنین‌های مرحله ۱۶ تا ۳۲ سلولی (مورولا) و بلاستوسیست به منظور تعیین جنسیت به روش PCR، زمانی‌که بیوپسی در روز ۴ انجام شده باشد، میزان تولید بلاستوسیست‌های قابل انتقال پس از تعیین جنسیت و Cryopreservation را نسبت به بیوپسی در روز ۷/۵ (مرحله بلاستوسیست) افزایش داده است.

حدود ۶۴-۶۲ ساعت پس از لقاح، اتصالات بین سلولی ما بین بلاستومرها شکل گرفته و باعث متراکم شدن جنین می‌شوند. به منظور جلوگیری از آسیب‌های سلولی، مشخص شده است که انجام بیوپسی در زمان کوتاهی قبل از این مرحله هیچ تأثیر منفی بر روی رشد بعدی جنین نداشته است. از طرفی بیوپسی سلول‌های تروفواکتودرم در مرحله بلاستوسیست، امکان استفاده بیش از ۲ سلول را برای آزمون‌های تشخیصی فراهم نموده و درعین حال به توده سلول‌های داخلی (ICM) که برای رشد جنین ضروری است، آسیبی وارد نمی‌نماید.

روش‌های مختلفی برای انجام بیوپسی قبل از لانه‌گزینی جنین مورد استفاده قرار گرفته است. از جمله این روش‌ها می‌توان به برش دادن جنین با استفاده از تیغه‌ی Microrazor، آسپیره کردن چند بلاستومر از طریق منفذ ایجاد شده در لایه زونا به‌وسیله‌ی سوزن، استفاده از محلول‌های اسیدی و یا پیپت‌های نوک تیز (Bevelled pipette) اشاره نمود.

با توجه به اهمیت کاربرد نمونه‌برداری از جنین در تعیین جنسیت و PGD، در مطالعه حاضر ضمن بررسی قابلیت حیاتی و تکاملی جنین‌های گاوی بیوپسی شده در مرحله ۴ تا ۱۶ سلولی، کیفیت بلاستوسیست‌های حاصله نیز مورد بررسی قرارخواهد گرفت.

فصل دوم

کلیات

۲-۱- تولید جنین در شرایط *In vivo*

۲-۱-۱- روند ایجاد سلول جنسی ماده[1]

واحدهای عملکردی تخمدان فولیکول نام دارند که تحت سازماندهی سلولی خاص تخمک را در خود جای داده‌اند. این سازماندهی سلولی ثابت نبوده و در طی مراحل مختلف زندگی فولیکول تغییرات پیچیده‌ای می‌یابد. حاصل این تغییرات به آزاد شدن تخمک[2] و یا تحصیل فولیکول رسیده منجر خواهد شد (Richard, 1996; Gordon, 2003).

تولید مثل با تکامل تخمک‌ها در تخمدان آغاز می‌گردد. تعداد ۱ تا ۲۵ تخمک، بسته به گونه حیوان اصلی، در مرحله‌ای از سیکل جنسی حیوان ماده به نام فاز اوولاسیون[3] از فولیکول تخمدانی به داخل حفره شکمی آزاد می‌شوند.آنگاه این تخمک‌ها از طریق لوله رحمی مربوطه وارد رحم می‌شوند. فولیکول‌های تخمدانی متعددی در مراحل مختلف تکاملی در استرومای کورتکس واقع شده‌اند. بیشترین فولیکول‌ها، فولیکول‌های پریموردیال[4] هستند. هر فولیکول پریموردیال حاوی یک تخمک اولیه است که توسط یک لایه از سلول‌های فولیکولی سنگفرشی احاطه شده است.

1- Oogenesis
2- Ovulatian
3- Ovulation phase
4- Primordial follicle

در ادامه رشد این فولیکول‌ها، سلول‌های فولیکولی تبدیل به سلول‌های مکعبی یا استوانه‌ای کوتاه می‌شوند (Richard, 1996; Slavik, 1992).

مجموع وقایعی که منجر به تولید سلول زایایی تخمک در جنس ماده می‌شود، باعث بروز تمامی واکنش‌های لازم قبل، حین و بعد از واکنش با اسپرم در تخمک می شود که شامل یک پروسهٔ طولانی از تمایز اووگونی در تخمدان جنینی تا بلوغ نهایی تخمک، درست قبل از اوولاسیون آن می‌باشد.

از مدت‌ها قبل مشخص شده که فقط تعداد کمی از تخمک‌های اولیه حیوانات و نیز انسان می‌توانند رشد ثانویه خود را دنبال کرده، تبدیل به تخمک ثانویه شده و تخمک‌گذاری کنند. بطور مثال در مورد گاو تخمین زده اند که در تخمدان‌های گوساله تازه متولد شده حدود ۲۰۰۰۰۰ تخمک وجود دارد که احتمالاً کمتر از ۳۰۰ عدد آن‌ها به مرحله تخمک‌گذاری می‌رسند (Slavik, 1992; Gordon, 2003; Ledda, 2001).

در فرآیند بلوغ، اووسیت اولیه، پروفاز نخستین تقسیم میوزی پس از تولد را تکمیل می‌کند. در زمان بلوغ، تغییرات بعدی رخ می‌دهند. اووسیت اولیه حاوی تعداد کرموزوم‌های دیپلوئید (XX) است. به طوری که در مرحله‌ی بلوغ، اووسیت بزرگ شده، سلول‌های فولیکولی، مکعبی و به چندین لایه تکثیر می‌یابند. همچنین یک غشای مخطط به نام زوناپلوسیدا[1]، پیرامون اووسیت تشکیل می‌شود (این لایه با به هم پیوستن زواید اووسیت اولیه و گلیکوپروتئین موجود در محل تشکیل شده است)، فولیکول بزرگ شده و فضاهای پر از مایع، بین سلول‌های فولیکولی، پدیدار شده و به هم می‌پیوندند تا آنتروم فولیکول[2] را تشکیل دهند. به همین دلیل، سلول‌های فولیکولی، تفکیک می‌شوند تا لایه‌ی گرانولوزوم[3] و کومولوس اووفوروس[4]، را تشکیل دهند. تک خارجی[5] (لایه‌ی فیبروزی) و تک داخلی[6] (لایه‌ی عروقی و سلولی) به وسیله‌ی سلول‌های استرومایی تخمدان در خارج از لایه‌ی گرانولوزوم، به وجود آمده و به این ترتیب، فولیکول گراف بالغ به وجود می‌آید. اووسیت اولیه، نخستین تقسیم میوزی را که در خلال حیات پیش از تولد آغاز شده بود، کامل می‌کند. در نتیجه دو سلول دختر هر یک با تعداد کروموزوم‌های هاپلوئید (n) تشکیل می‌شوند. در این فرآیند تقسیم هسته‌ای برابر بوده اما تقسیم سیتوپلاسمی نابرابر است. بنابراین یک سلول دختر که سیتوپلاسم فراوانی از سلول مادر دریافت کرده، بزرگ

1- Zona pellucida
2- Antrum folliculi
3- Stratum granulosum
4- Cumulus oophorus
5- Theca externa
6- Theca interna

می‌شود. این سلول اووسیت ثانویه نامیده می‌شود. سلول کوچک، نخستین گویچه‌ی قطبی[1] است که در فضای پیرامون زرده‌ای[2] جای داده می‌شود. در شکل ۲-۱ روند کلی انجام اووژنز آمده است.

تخمک گذاری[3]، هنگامی رخ می‌دهد که یک فولیکول گراف بالغ در سطح تخمدان، پاره شود. تخمک‌گذاری می‌تواند در هر نقطه از سطح، به جز ناف تخمدان صورت گیرد. در این فرآیند، اووسیت ثانویه‌ی احاطه شده به وسیله‌ی زوناپلوسیدا و سلول‌های کومولوس اوفوروس از تخمدان بیرون رانده می‌شوند.

۲-۱-۱-۱- ویژگی‌های اووسیت ثانویه:

الف: از سایر سلول‌ها بزرگتر است. قطر آن نزدیک به ۱۵۰ میکرومتر است.

ب: غشای سلولی آن، غشای زرده‌ای[4] نامیده می‌شود. این غشا به وسیله‌ی زوناپلوسیدا، پوشیده شده است.

ج: فضای بین غشای زرده‌ای و زوناپلوسیدا فضای پیرامون زرده‌ای نامیده می‌شود.

د: هسته بزرگ خارج مرکزی و حاوی نیمی از کروموزوم‌ها است.

ه: در بیشتر پستانداران، اووپلاسم[5] یا زرده شبیه به سیتوپلاسم سلول‌های دیگر است. این نوع تخم‌ها، تخم‌های میکرولسیتال[6] (کم زرده) نامیده می‌شود. تخم‌های پرندگان، حاوی زرده سرشار از مواد مغذی (دیوتوپلاسم) بوده و به همین سبب تخم‌های ماکرولسیتال[7] (پرزرده) نامیده می‌شوند.

اووسیت‌های پستانداران عالی، حاوی زرده‌ی اندکی هستند که تقریباً یکنواخت و پراکنده بوده و بنابراین تخم‌های ایزو لسیتال[8] نامیده می‌شوند.

و: سلول‌های پیرامون اووسیت، به طور شعاعی به زوناپلوسیدا، متصل شده‌اند. این لایه‌های سلولی تاج مشعشع[9] نامیده می‌شوند.

ز: سانتروزوم[10] با دو سانتریول[11]، مجاور هسته قرار گرفته است (Gier, 1989).

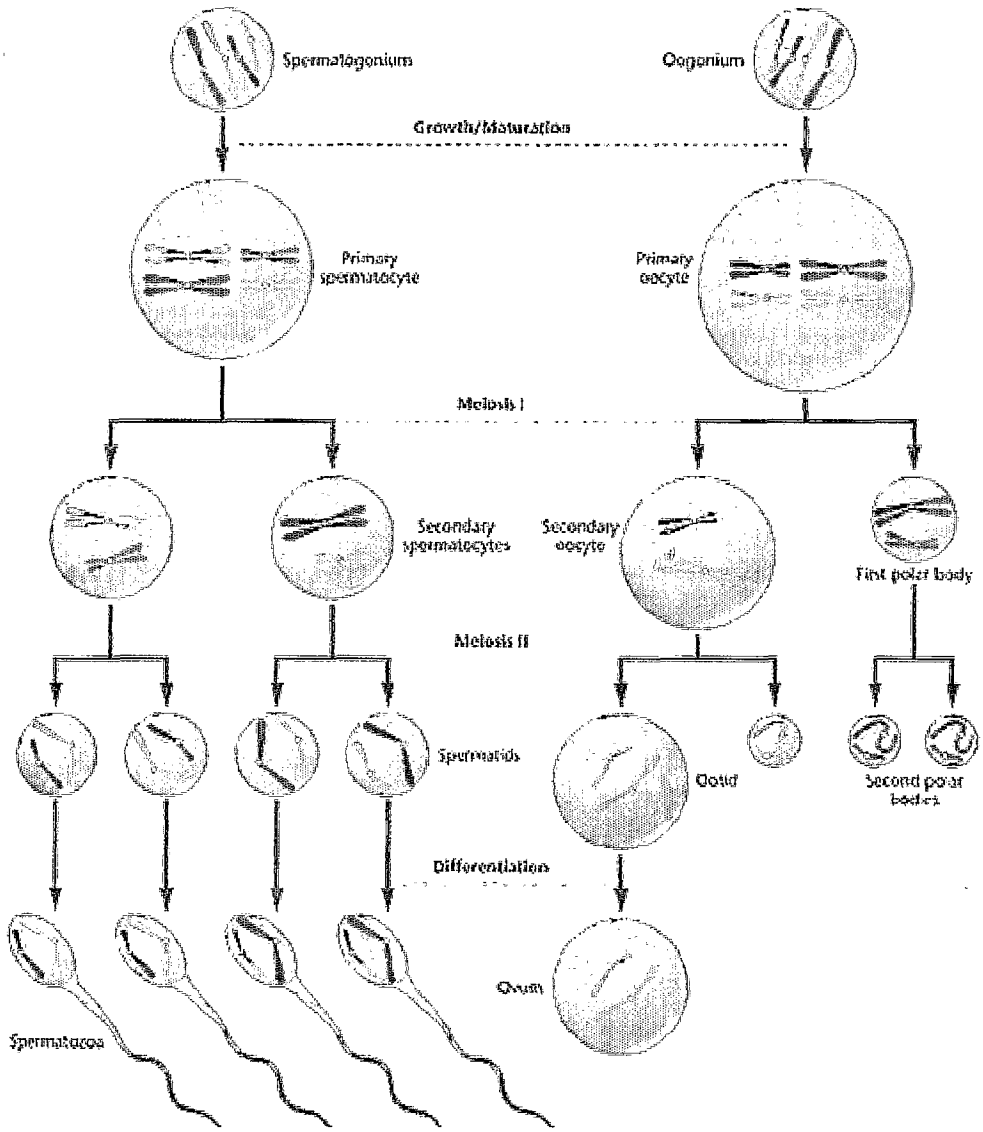
1- First polar body
2- Perivitelline space
3- Ovulation
4- Vitelline membrane
5 - Ooplasm
6- Microlecithal eggs
7- Macrolecithal eggs
8- Isolecithal eggs
9- Corona radiata
10- Centrosome
11- Centriol

۲-۱-۲- روند ایجاد سلول جنسی نر[1]:

فرآیند تبدیل سلول‌های جنسی اولیه‌ی نر به اسپرم، نتیجه‌ی مجموعه‌ای از تغییرات شیمیایی و فیزیکی است. این فرآیند از زمان بلوغ آغاز می‌شود. سلول‌های جنسی اولیه‌ی نر، از راه میتوز تقسیم شده و اسپرماتوگونیا را به وجود می‌آورند، آن‌ها تمایز می‌یابند تا اسپرماتوسیت‌های اولیه را به وجود آورند که هر یک از آن‌ها حاوی همان تعداد کروموزوم‌های دیپلوئید (2n) معمول گونه است. هر اسپرماتوسیت اولیه، دستخوش تقسیم کاهشی (میوز I) شده و دو سلول اسپرماتوسیت‌های ثانویه را به وجود می‌آورند. بنابراین، اسپرماتوسیت‌های ثانویه، حاوی تعداد کروموزوم‌های هاپلوئید (n) هستند. هر اسپرماتوسیت ثانویه، دیگر بار با تقسیم غیرکاهشی (میوزII)، تقسیم شده و اسپرماتیدها را به وجود می‌آورد.

اسپرماتیدها از راه فرآیند اسپرمیوژنز[2]، بدون هیچ تقسیم سلولی، متحمل تغییر شکل متامورفولوژیکی[3] شده و به اسپرماتوزوآ تبدیل می‌شوند. وزیکول‌های گلژی[4] به هم می‌پیوندند تا کلاهک سری تشکیل شود. سانتریول خلفی، فیلامنت‌های محور[5] بدنه و دم را به وجود می‌آورد. میتوکندری‌ها به شکل مارپیچی، آرایشی دوباره یافته و غلاف میتوکندریایی[6] را تشکیل می‌دهند. اسپرماتید طویل می‌شود (Rogers, 1982). در شکل ۲-۱ روند کلی اسپرماتوژنز آمده است.

1- Spermatogenesis
2- Spermiogenesis
3- Methamorphological transformation
4- Golgi vesicles
5- Axial filament
6- Mitochondrial sheat



شکل ۲-۱- روند انجام اووژنزیزیس و اسپرماتوژنزیس

۲-۱-۳- لقاح:

فرآیندی است که در خلال آن دو سلول جنسی بالغ (یک اسپرم و یک تخمک) در هم آمیخته و یک سلول واحد به نام سلول تخم را تشکیل می‌دهند. بنابراین سلول تخم، یک سلول دیپلوئید تمایز نیافته است که از در هم آمیختن دو گامت هاپلوئید بسیار تخصص یافته تشکیل شده است. لقاح در لوله‌ی رحمی رخ می‌دهد.

در زمان لقاح، اووسیت ثانویه (هاپلوئید)، در پی تولید شدن از اووسیت اولیه با فرآیند نخستین تقسیم کاهش میوزی، آزاد می‌شود. اووسیت ثانویه، به لوله‌ی رحمی رسیده و در تماس با اسپرماتوزوآ قرار می‌گیرد.

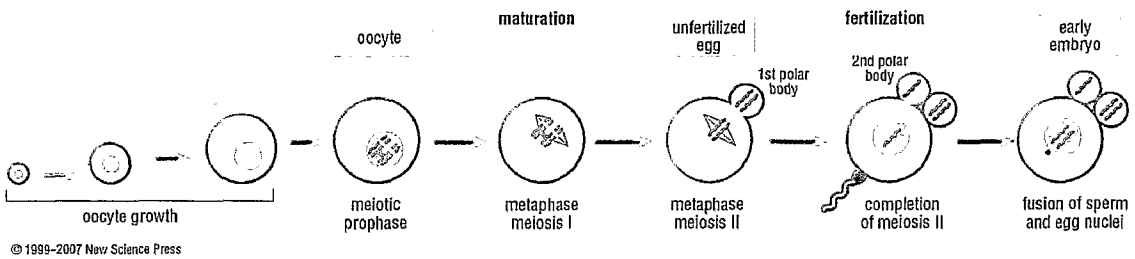
در هر انزال[1]، نزدیک به ۲۰۰ تا ۳۰۰ میلیون اسپرم، آزاد می‌شود. از این تعداد، نزدیک به ۵۰۰ اسپرم به محل لقاح می‌رسند. تنها یک اسپرم پس از گذشتن از سد تاج مشعشع، زوناپلوسیدا و غشای زرده‌ای اووسیت ثانویه، به اووسیت می‌پیوندند. سایر اسپرم‌هایی که به تخمک رسیده‌اند، درگیر تجزیه‌ی ماتریکس بین سلول‌های تاج مشعشع به وسیله‌ی ترشح آنزیم هیالورونیداز[2] می‌شوند. بقیه‌ی اسپرم‌ها در عرض ۲۴ ساعت پس از انزال می‌میرند.

پس از لقاح وقایع زیر رخ می دهد:

۱- اووسیت ثانویه، به محض ورود اسپرم، دومین تقسیم میوزی (بلوغ) را کامل کرده و همچنان که دومین گویچه‌ی قطبی[3] را به بیرون از غشای زرده‌ای (فضای پیرامون زرده‌ای) می‌راند، یک تخمک بالغ را تشکیل می‌دهد.

۲- هسته‌ی تخمک بالغ، پیش هسته‌ی ماده[4] نامیده می‌شود. هم زمان، سر اسپرم، متورم می‌شود تا پیش هسته‌ی نر[5] را تشکیل دهد . هر دو پیش هسته، در هم آمیخته و تعداد کروموزوم دیپلوئید، دوباره در سلول تخم، بر قرار می‌شود.

۳- جنسیت کروموزومی[6]، تعیین می‌شود. اگر اسپرم حاوی کروموزوم X ، تخمک را بارور کند، نتاج ماده شده و اگر یک اسپرم حاوی کروموزوم Y، تخمک را بارور کند یک حیوان نر، به وجود می‌آید.



شکل ۲-۲- روند انجام لقاح از زمان رشد تخمک

1- Ejaculation
2- Hyaluronidase
3- Second polar body
4- Female pronucleus
5- Male pronucleus
6- Choromosomal sex

۲-۱-٤- تسهیم:

پس از تشکیل تخم، رویان متحمل تقسیمات میتوزی متعددی می‌شود. سلول تخم در مقایسه با سلول‌های غیر جنسی بدن دارای نسبت سیتوپلاسم به هسته بیشتری است. طی تقسیماتی که این سلول انجام می‌دهد، این نسبت به تدریج کوچکتر می‌شود ، یعنی از مقدار سیتوپلاسم آن به تدریج کم شده و هسته آن نسبتاً بزرگ‌تر می‌شود. این نوع تقسیمات را تسهیم گویند.

از طرفی الگو و نحوه تسهیم به میزان زرده‌ای که در زایگوت موجود است بستگی خواهد داشت . در پرندگان حجم زیاد زرده مانع از تقسیم کامل زایگوت شده ، بنابراین کلیواژ نسبی[1] و مروبلاستیک[2] است. کلیواژ کامل[3] یا هلو بلاستیک[4] در پستانداران جفت‌دار که زایگوت دارای حداقل مقدار زرده است رخ می‌دهد.

تقسیمات میتوزی رویان را می‌توان به مراحل مختلف تقسیم کرد .

پس از اولین تقسیم، سلول تخم به رویان دو سلولی تبدیل می‌شود و هر یک از این سلول‌ها که اینک یک بلاستومر[5] نامیده می‌شود ، مجدداً چندین بار تقسیم شده به ترتیب رویان‌های چهار سلولی ، هشت سلولی و شانزده سلولی را به وجود می‌آورند. در هر یک از این مراحل بلاستومرها به طور هم زمان دچار تقسیمات میتوزی می‌شوند. حدوداً از مرحله‌ی شانزده سلولی به بعد در گاو، هم زمانی تقسیم میتوز بین بلاستومرها از بین می‌رود و سلول‌ها از نظر فیزیولوژیکی تفرق می‌یابند. به عبارت دیگر تا مرحله شانزده سلولی هر یک از سلول‌ها قادرند که پس از چند تقسیم میتوزی به یک رویان تبدیل شوند ولی از مرحله شانزده سلولی به بعد سلول‌ها به گروه‌های مختلف (از نظر فیزولوژیکی) تقسیم شده و تقسیم وظایف می‌شوند.

زمانی که رویان به مرحله شانزده سلولی رسید مورولا[6] نامیده می‌شود . در مرحله‌ی مورولا بلاستومرها از حالت کروی خارج می‌شوند و جداره‌ی سلول‌ها در تماس کامل با یکدیگر قرار می‌گیرند و نهایتاً یک توده‌ی سلولی کروی شکل ر ا به وجود می‌آورند. در این مرحله آن را مورولای متراکم[7] می‌گویند. تماس سلول‌ها به خصوص سلول‌هایی که در حاشیه‌ی توده‌ی سلولی مورولای متراکم قرار دارند، سبب می‌شود مایعاتی که وارد سلول‌ها شده، نتواند به راحتی از آن خارج شود.

1- Partial cleavage
2- Meroblastic
3- Meroblastic
4- Holoblastic
5- Blastomer
6- Morulla
7- Compact morulla