



دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی

شماره ثبت :

۳۸۷

تاثیر فاکتورهای مترشحه از اووسیت بر بلوغ آزمایشگاهی اووسیت در گاو

به کوشش:

سیما همتیان خیاط

استاد راهنما:

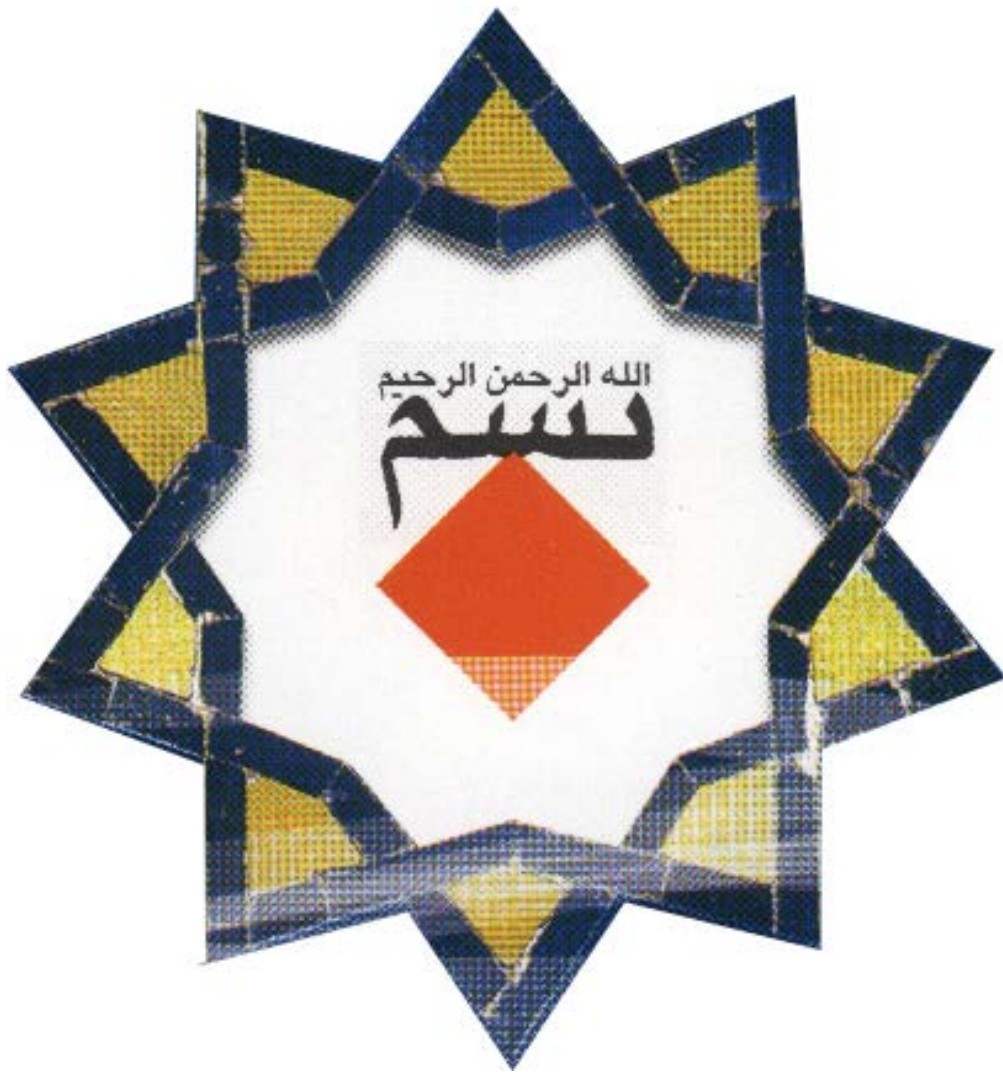
دکتر عباس ابویسانی

استاد مشاور:

دکتر حسام دهقانی

بهمن ماه ۱۳۹۰





## تعهدنامه

اینجانب سیمایا همپیان خیاط دوره دکتری حرفه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، عنوان پایان‌نامه: تاثیر فاکتورهای مترشحه از اووسیت بر بلوغ آزمایشگاهی اووسیت در گاو تحت راهنمایی آقای دکتر عباس ابویسانی متعهد می‌شوم:

- تحقیقات در این پایان‌نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان‌نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد و مقالات مستخرج با نام «دانشگاه فردوسی مشهد» و یا «Ferdowsi University of Mashhad» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان‌نامه تأثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است، اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

امضای

دانشجو

### مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

به نام خدا

### گواهی اعضای کمیته ی پایان نامه

# تأثیر فاکتورهای مترشحه از اووسیت بر بلوغ آزمایشگاهی اووسیت در گاو

به کوشش:

سیما همتیان خیاط

پایان نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه فردوسی مشهد به عنوان بخشی از فعالیت‌های  
تحصیلی لازم جهت اخذ درجه دکتری حرفه‌ای دامپزشکی

در رشته دامپزشکی

از دانشگاه فردوسی مشهد

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی کمیته ی پایان نامه، با درجه: عالی و نمره: ۱۹/۷۵

استاد راهنما: دکتر عباس ابویسانی (استادیار گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد)

استاد مشاور: دکتر حسام دهقانی (دانشیار گروه بیوتکنولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد)

داور پایان نامه: دکتر امیر هوشنگ فلاح راد (دانشیار گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی  
مشهد)

داور پایان نامه: دکتر نیما فرزانه (دانشیار گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد)

بهمن ماه

این پایان نامه را تقدیم می‌کنم به:

مادرم

زیباترین جلوه‌گاه جمال خداوندی و

پرشورترین مصداق هر آنچه که هست و نیست

به پاس عشق، محبت، صبر، گذشت و فداکاری

اش

سپاس

سپاس شایسته پروردگار دو عالم است؛ او می بخشد چون باری

ستاند و باری ستاند چون می بخشد.

پدرم، روح در آرامش باد!

با سپاس از خانواده، همیشه سبزیم؛ مادر و دو برادر نازنینم - احسان و

داود - که همواره در مسیر زندگی همراه و تکیه گاهم بودند.

باشکر از جناب آقای دکتر ابویسانی استاد راهنمای گرامی و

جناب آقای دکتر دهقانی استاد مشاور کراتقدر که دلسوزانه و مدبرانه

این حقیر را در امر پایان نامه راهنمایی کردند.

از جناب آقای دکتر فلاح راد و جناب آقای دکتر فرزانه به

خاطر قبولی داوری این پایان نامه صمیمانه تشکر میکنم.



قدردان زحمات تمام اساتید بزرگوارم طی دوران تحصیل در  
دانشکده دامپزشکی، مسم.

از جناب آقای سادمان، خانم دکتر اسحاقی و خانم یوسفی به  
خاطر همکاری در امر پایان نامه صمیمانه تشکر میکنم.

از همه ی همکلاسیهای عزیزم در ورودی ۸۴ بوئره تهمنه،  
مرجان، مینا و نگار نازینم کمال تشکر و سپاس را دارم و برایشان  
بهترین ها را آرزو میکنم.

## چکیده

تأثیر فاکتورهای مترشحه از اووسیت بر بلوغ آزمایشگاهی اووسیت در گاو

به کوشش:

### سیما همتیان خیاط

فاکتورهای مترشحه از اووسیت (از قبیل GDF<sub>9</sub>, BMP<sub>15</sub>, BMP<sub>6</sub> و...) دارای نقش حیاتی در وقایع کلیدی تولید مثل پستانداران همچون تنظیم عملکرد سلول های فولیکولی، حفظ فنوتیپ سلول های کومولوس، تنظیم پراکندگی سلول های کومولوس و تنظیم تکوینی فرآیندهایی نظیر عملکرد سلول های گرانولوزا در طی مراحل رشد فولیکول، عملکرد سلول های کومولوس در طی بلوغ اووسیت و وقایع منجر به تخمک گذاری و پس از تخمک گذاری است. در این مطالعه، تأثیر فاکتورهای مترشحه از اووسیت های لخت شده و افزایش غلظت آنها بر بلوغ برون تنی اووسیت های گاو به ویژه بر پراکندگی سلول های کومولوس و پیشبرد میوز مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور تعداد ۱۲۱۱ اووسیت از ۷۸۰ تخمدان گاوهای ذبح شده در کشتارگاه جمع آوری گردید و کمپلکس های اووسیت-کومولوس (COC) احاطه شده با حداقل سه لایه از سلول های کومولوس با اووسیت های لخت در قطره ۵۰ میکرولیتری از محیط کشت بلوغ، کشت داده شدند. کمپلکس

های اووسیت - کومولوس انتخاب شده به طور تصادفی در ۴ گروه کشت داده شدند: گروه ۱) COC ها به تنهایی کشت داده شدند. گروه ۲) COC ها به نسبت ۱ به ۱ با اووسیت های لخت (DOS) کشت داده شدند. گروه ۳) COC ها به نسبت ۱ به ۳ با DOS کشت داده شدند. گروه ۴) COC ها به نسبت ۱ به ۶ با DOS کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت کشت، بررسی نتایج نشان داد که افزودن غلظت های مختلف از فاکتورهای مترشحه از اووسیت اندوژن پراکندگی سلول های کومولوس و بلوغ هسته ای را بهبود نمی بخشد ( $P > 0.05$ ). اهمیت فاکتورهای مترشحه از اووسیت در بهبود شایستگی تکوینی اووسیت های گاو تایید شده است، لذا به نظر می رسد برای فهم بهتر اثرات فاکتورهای مترشحه از اووسیت در گاو بایستی سایر جوانب بلوغ اووسیت بویژه در سطح مولکولی، باروری و تولید رویان قبل از لانه گزینی مورد بررسی قرار گیرند.

کلمات کلیدی: گاو ماده، کمپلکس اووسیت-کومولوس، فاکتورهای مترشحه از اووسیت، بلوغ برون تنی، پراکندگی سلول های کومولوس، بلوغ هسته ای.

## فهرست مطالب

تاثیر فاکتورهای مترشحه از اووسیت بر بلوغ آزمایشگاهی اووسیت در گاو

مقدمه..... ۱

### فصل اول: مروری بر تحقیقات انجام شده

۱ + خلاصه ای از سیستم تناسلی گاو ماده و اعضای تنظیم کننده آن.....

۴

۱ ۴ چرخه تخمدانی گاو.....

۴

۱-۲-۱- چرخه تولیدمثلی در گاو..... ۵

.....	۴	۱	فرایند تشکیل اووسیت	.....
	۶			
ابتدایی	۴	۱	تشکیل فولیکول های	.....
	۸			
.....	۵	۱	انتقال فولیکول های ابتدایی به فولیکول های اولیه	.....
	۹			
.....	۶	۱	رشد اووسیت و تشکیل فولیکول های چندلایه	.....
	۱۱			
.....	۴	۱	رشد اووسیت و تشکیل فولیکول های آنترال	.....
	۱۴			
.....	۸	۱	بلوغ اووسیت (نقش سلول های گرانولوزا و اووسیت در آن)	.....
	۲۰			
کومولوس	۹	۱	پراکندگی سلول های	.....
	۲۵			
اووسیت	۱+	۱	بلوغ برون تنی	.....
	۲۶			
اووسیت	۱+	۱	شناسایی فاکتورهای مترشحه از	.....
	۲۷			
GDF۹ و BMP۱۵	۱۴-	۱	اعضای فوق خانواده TGFβ	.....
	۲۸			
.....	GDF۹-۱-۱۲-۱	۲۹		

۳۰..... BMP۱۵-۲-۱۲-۱

۳۰..... activin و GDF۹, BMP۱۵ سیگنالینگ مسیرهای ۳-۱۲-۱

## فصل دوم: مواد و روش ها

۳۵ ..... ۱-۲- مکان و زمان انجام تحقیق

۳۵ ..... ۲-۲- تهیه محلول های ذخیره یا استاک

۳۷ ..... ۳-۲- آماده سازی محیط های کشت

۳۷..... ۱-۳-۲- محیط کشت شستشو

۳۷..... ۲-۳-۲- محیط کشت بلوغ

۳۸ ..... ۴-۲- جمع آوری تخمدان ها، کشت اووسیت و کشت آن ها

۳۸..... ۱-۴- ۲- جمع آوری تخمدان ها

۳۹..... ۲-۴-۲- آسپیراسیون فولیکول ها و گرفتن اووسیت ها

۳۹..... ۳-۴-۲- جستجوی اووسیت ها، جداسازی و انتخاب آن ها برای کشت

۴۰..... ۴-۴-۲- کشت اووسیت ها

۴۰ ..... ۵-۲- طراحی آزمایش

۴۱ ..... ۶-۲- ارزیابی بلوغ اووسیت ها

۴۱..... ۱-۶-۲- ارزیابی میزان پراکندگی و موکوسی شدن کومولوس ها

۴۲..... ۲-۶-۲- ارزیابی بلوغ هسته ای

۴۳ ..... ۷-۲- آنالیز آماری

## فصل سوم: نتایج

۴۵..... ۱-۳- تاثیر فاکتورهای مترشحه از اووسیت بر پراکندگی سلول های کومولوس

۳-۲- تاثیر فاکتورهای مترشحه از اووسیت بر بلوغ هسته ای ..... ۴۶

## فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهاد ها

۴-۱- بحث ..... ۴۸

۴-۲- نتیجه گیری ..... ۵۱

۴-۳- پیشنهادها ..... ۵۲

منابع و مراجع ..... ۵۳

## فهرست جدول ها

صفحه

عنوان و شماره

---

- جدول ۱-۲- مواد مصرفی جهت تهیه PBS ..... ۳۵
- جدول ۲-۲- مواد مصرفی جهت تهیه محیط کشت شستشو ..... ۳۷
- جدول ۳-۲- مواد مصرفی جهت تهیه محیط کشت بلوغ ..... ۳۷
- جدول ۴-۲- تهیه استاک DAPI ..... ۴۳
- جدول ۵-۲- تهیه استاک پارافرم آلدئید به همراه بافر فسفات-منیزیم-کلسیم ..... ۴۳
- جدول ۱-۳- تاثیر فاکتورهای مترشحه از اووسیت بر پراکندگی سلول های کومولوس اووسیت در گاو ..... ۴۵
- جدول ۳-۳- تاثیر فاکتورهای مترشحه از اووسیت بر بلوغ هسته ای اووسیت گاو ..... ۴۶

## فهرست شکل ها

عنوان و شماره	صفحه
شکل ۱-۱- چرخه فحلی در گاو .....	۶
شکل ۱-۲- تصویری شماتیک از فاکتورهای مشتق از اندودرم و اکتودرم خارج رویانی .....	۷
شکل ۱-۳- تصویری شماتیک از فولیکول ابتدایی که اووسیت و فاکتورهای مشتق از سلول های گرانولوزا را نشان می دهد.....	۹
شکل ۱-۴- تصویری شماتیک از فاکتورهای مشتق از اووسیت، سلول گرانولوزا و استرومای اطراف تخمدانی که ممکن است در انتقال فولیکول ابتدایی به فولیک اولیه موثر باشند.....	۹
شکل ۱-۵- تصویری شماتیک از فولیکول های چندلایه که نشان دهنده فاکتورهای موثر در تکامل است.....	۱۲
شکل ۱-۶- تصویری شماتیک از فولیکول چندلایه که نشان دهنده تاثیر فاکتورهای مشتق از اووسیت، سلول های گرانولوزا، سلول های تکا و استرومای تخمدان بر تکامل فولیکولی است.....	۱۳
شکل ۱-۷- تصویری شماتیک از فولیکول آنترال اولیه که نشان دهنده فاکتور سیستمی (LH) و ۳ فاکتور داخل فولیکولی است که تشکیل آنتروم را تحریک می کند.....	۱۵
شکل ۱-۸- تصویری شماتیک از رشد فولیکول در پستانداران .....	۱۶



- شکل ۱-۹- تصویری شماتیک از فولیکول های آنترال که نشان دهنده فاکتورهای دخیل در فراخوانی آن است..... ۱۷
- شکل ۱-۱۰- تصویری شماتیک از فولیکول آنترال که نشان دهنده فاکتورهای دخیل در انتخاب آن است..... ۱۸
- شکل ۱-۱۱- تصویری شماتیک از فولیکول آنترال که نشان دهنده فاکتورهای مشتق از اووسیت است که در هدایت تکاملش نقش دارند ..... ۱۹
- شکل ۱-۱۲- اووسیت بالغ شده گاو..... ۲۱
- شکل ۱-۱۳- مسیره های فعال شده به واسطه پروژسترون که فعال سازی MPF در اووسیت های xenopus را کنترل می کند ..... ۲۱
- شکل ۱-۱۴- تصویری شماتیک از مراحل مختلف بلوغ هسته ای و فعالیت MPF..... ۲۲
- شکل ۱-۱۵- تصویری شماتیک از کمپلکس اووسیت-کومولوس/گرانولوزا که نشان دهنده فرایندهای منجر به میوز است..... ۲۴
- شکل ۱-۱۶- اعمال فاکتورهای مترشحه از اووسیت ..... ۲۸
- شکل ۱-۱۷- مسیر سیگنالینگ GDF۹ و BMP۱۵ ..... ۳۱
- شکل ۲-۱- COC های مناسب جهت کشت ..... ۳۹
- شکل ۲-۲- COC های مورد استفاده جهت لخت کردن ..... ۴۰
- شکل ۲-۳- اووسیت های لخت ..... ۴۰
- شکل ۲-۴- هم کشتی COC با اووسیت لخت ..... ۴۱

شکل ۲-۵- کشت COC به تنهایی و با اووسیت لخت شده ..... ۴۱

شکل ۲-۶- انواع پراکندگی سلول های کومولوس ..... ۴۲

شکل ۲-۷- مراحل پیشرفت تقسیم میوزی ..... ۴۳

شکل ۳-۱- انواع پراکندگی سلول های کومولوس ..... ۴۵

شکل ۳-۳- مراحل پیشرفت تقسیم میوزی ..... ۴۶

﴿مقدم﴾

## مقدمه

تولید و انتقال رویان در شرایط آزمایشگاهی می تواند برای ازدیاد سریع جمعیت گله های در حال انقراض، تهیه نتاج بیشتر از حیوانات ماده ارزشمند و تسریع بهبود ژنتیکی از طریق تسهیل آزمون نتاج ماده و کاهش فاصله ی بین نسل ها مورد استفاده قرار گیرد [۱]. همچنین تولید رویان و انتقال آن یک تکنولوژی کارآمدی است که امکان انجام آزمایش های دقیق به منظور بررسی مشکلات ژنتیکی، مشکلات تولید مثلی، روند تکامل رویان، روندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تولید مثل را فراهم می کند. حمل رویان منجمد تا فواصل طولانی می تواند به عنوان یک راه ارزان برای صادرات حیوان زنده به کار گرفته شود. رویان منجمد گاو را اولین بار توانستند در سال ۱۹۷۷ با موفقیت از نیوزیلند به استرالیا حمل کنند و از آن پس حمل رویان منجمد گاو، گوسفند و بز به اجرا درآمد [۲].

تولید و انتقال رویان می تواند نقش مهمی در بیوتکنولوژی از جمله تولید رویان التقاطی (کایمری)، شبیه سازی و سایر فنون ریز دستکاری سلول های جنسی و رویان ایفا کند. امروزه تولید رویان یا از طریق سوپراوولاسیون حیوانات ماده برتر و تلقیح مصنوعی و سپس جمع آوری رویان ها انجام می شود و یا اینکه به دلیل محدودیت های خاص این روش، رویان ها از طریق بالغ کردن اووسیت ها، لقاح و کشت آنها طی سه پروتکل (IVM (In vitro maturation)، IVF (In vitro fertilization) و IVP (In vitro production) تولید شده و انتقال داده می شوند یا منجمد می گردند [۲]. علی رغم گذشت زمان قابل توجه از ابداع و انجام این روش ها و همچنین بهبود بخشیدن آن ها، هنوز نیل به راندمان مناسب و مطلوب امکان پذیر نشده است و لذا انجام مطالعات بیشتر برای رسیدن به نتایج مطلوب تر و راندمان بیشتر مورد نیاز است.

تخمندان ها، در زمان تولد شمار فراوانی اووسیت دارند که به شکل فولیکول های تخمدانی هستند. بسیاری از این فولیکول ها در دوران قبل و بعد از بلوغ دچار آترزی شده و از بین می روند و تنها شمار اندکی از آن ها تخمک آزاد خواهند کرد. همچنین حیوانات ماده ارزشمندی که به دلایل مختلف حذف می شوند تخمدان غنی از فولیکول آن ها نیز از دست می رود. لذا اووسیت های موجود در این فولیکول ها می تواند منبع خوبی برای تولید برون تنی رویان باشد. بدین منظور، فولیکول های واجد اووسیت های نابالغ را از تخمدان خارج نموده و تحت شرایط خاصی در خارج از بدن حیوان زنده به بلوغ می رسانند. از اووسیت های بالغ بدست آمده می توان در برنامه های تولید و انتقال رویان برون تنی، شبیه سازی، تولید حیوانات ترانس ژنیک، حفظ گونه های در حال انقراض، انجماد اووسیت های بالغ یا بارور شده در آزمایشگاه، تهیه ی بانک اووسیت و تولید رویان های جنس مورد نظر به کمک اسپرم های تعیین جنسیت شده بهره جست [۱].