ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکتری عمومی دامپزشکی

عنوان

تاثیر هم کشتی سلول‌های کومولوس گاو بر بلوغ و تکامل پس از لقاح تخمک گاومیش

نگارش

مهسا افروغ

دکتر فرید براتی — **استاد راهنما**

(استادیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز)

دکتر مسعود رضا صیفی آباد شاپوری — **مشاور**

(استاد دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز)

دکتر قدرت الله محمدی — **داور**

(استادیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز)

دکتر علی شهریاری — **داور**

(استادیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز)

دکتر محمود خاکساری مهابادی — **ناظر تحصیلات تکمیلی**

(استادیاردانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز)

تیر ۱۳۸۹

ABBYY PDF Transformer 2.0
Click here to buy
www.ABBYY.com

بسمه تعالی

دانشگاه شهید چمران اهواز

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دوره دکتری حرفه ای

(نتیجه ارزشیابی پایان نامه دکترای حرفه ای دامپزشکی)

بدینوسیله گواهی می شود پایان نامه خانم **مهسا افروغ** دانشجوی دکترای عمومی دامپزشکی به شماره دانشجویی **۸۲۷۹۰۶** تحت عنوان :

تاثیر هم کشتی سلول‌های کومولوس گاو بر بلوغ و تکامل پس از لقاح تخمک گاومیش

جهت اخذ درجه دکترای دامپزشکی در تاریخ **۸۹/۴/۷** توسط هیات داوران مورد ارزشیابی قرار گرفت و با **درجه عالی** تصویب گردید.

۱- اعضاء هیات داوران	مرتبه علمی	امضاء
الف- استاد راهنمای اول: دکتر فرید براتی	استادیار	.....
ب- استاد مشاور : دکتر مسعود رضا صیفی آباد شاپوری	استاد	.....
ج- داور اول : دکتر قدرت الله محمدی	استادیار	.....
د – داور دوم : دکتر علی شهریاری	استادیار	.....
و - نماینده تحصیلات تکمیلی دانشگاه (استاد ناظر) :		
دکتر محمود خاکساری مهابادی	استادیار	.....
۲- مدیر گروه علوم درمانگاهی :		
دکتر علیرضا غدیری	دانشیار	.....
۳- معاون پژوهشی و نماینده تحصیلات تکمیلی دانشکده :		
دکتر سید رضا فاطمی	استادیار	.....
۴- معاون تحصیلات تکمیلی دانشگاه :		
دکتر رحیم پیغان	استاد	.....

ABBYY PDF Transformer 2.0
Click here to buy
www.ABBYY.com

تقدیم به پدربزرگ و مادربزرگ مهربانم

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

سپاس و تقدیر پایان از:

جناب آقای دکتر فرید براقی

استاد راهنمای محترم پایان نامه که افتخار شاگردی ایشان را داشته ام و در محضرشان صبر و دقت را آموخته ام.

جناب آقای دکتر صیفی مشاور محترم که در انجام این پایان نامه هیچ گاه از کمک و مساعدت من دریغ ننمودند.

مهدی و جناب آقای دکتر شهریاری که صمیمانه همکاری نموده و داوری پایان نامه را بر عهده گرفتند.

و

ABBYY PDF Transformer 2.0
Click here to buy
www.ABBYY.com

جناب آقای دکتر حاکساری به خاطر نظارت بر حسن

اجرای جلسه دفاعیه پایان نامه

ABBYY PDF Transformer 2.0
Click here to buy
www.ABBYY.com

سپاس فراوان از

تمامی دوستان خوبم در ورودی بهمن ۸۲

به خاطر روزهای خوب و خاطره انگیزی با هم بودنمان.

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول مقدمه و هدف ۱

فصل دوم مروری برمنابع .....

الف-جمعیت گاومیش وتوزیع آن در جهان ۲

ب-ویژگی های تولید مثلی در گاومیش ۲

ج- فن آوری های کمکی تولید مثل در گاومیش(ART) ۵

د- بلوغ تخمک ۸

هـ- بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM) ۹

هـ- ۱- فاکتورهای موثر برکیفیت تخمک ۹

هـ-۱-۱- فصل ۹

هـ۱-۲- وضعیت تولید مثلی ماده گاومیش ۱۰

هـ-۱-۳- اندازه فولیکول ۱۰

هـ-۱-۴-روش استحصال ۱۱

هـ-۲-محیط های کشت بلوغ آزمایشگاهی تخمک ۱۳

هـ-۲-۱- سیستم بافری ۱۵

هـ-۲-۲-اسمولاریتی ۱۶

هـ-۲-۳- کشش سطحی ۱۶

هـ۲--۴-آب ۱۶

هـ-۲-۵-سرم ۱۷

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

هـ-۲-۶- گنادوترپین ها و هورمون ها ۱۸
هـ-۲-۷-مایع فولیکولی (FF) ۱۹
هـ-۲-۷- ویتامین ها ۲۱
هـ-۲-۸- آنتی اکسیدان ها ۲۲
هـ-۲-۹-فاکتورهای رشد ۲۳
هـ-۲-۱۰-زمان انکوباسیون ۲۳
هـ-۲-۱۱-هم کشتی ۲۴
هـ-۲-۱۱-۱- سلول های کومولوس ۳۰
و-لقاح ۳۴
و-۱-عوامل موثر بربازده لقاح آزمایشگاهی (IVF) ۳۵
و-۱-۱-محیط IVF ۳۵
و-۱-۲-اسپرم ۳۶
و-۱-۲-۱-نوع اسپرم به کار رفته در IVF ۳۶
و-۱-۲-۲- جدا سازی و توانا سازی اسپرم ۳۷
و-۱-۲-۳- غلظت اسپرم مورد استفاده در IVF ۳۹
و-۱-۲-۴-طول مدت انکوباسیون اسپرم باتخمک ۴۰
و۱-۲-۵- حضور سلول های کومولوس ۴۰
و-۱-۲-۶- دمای انکوباتور ۴۱
ز-کشت آزمایشگاهی رویان گامیش ۴۱
ز-۱-محیط و شرایط کشت IVC گامیش ۴۱

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com
ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

مواد و روش کار.....
الف- مواد.....۴۵
ب- روش کار.....۴۵
ب -۱-آماده سازی محیط ها.....۴۵
ب -۲- جمع آوری تخمک ها و بلوغ درمحیط آزمایشگاه.....۴۶
ب -۳- باروری در آزمایشگاه و مراحل کشت رویان.....۴۶
ب -۴- تهیه کشت تک لایه کومولوس گاو.....۴۷
ب -۵- طرح آزمایشی.....۴۸
ب -۵-۱- آزمایش ۱.....۴۸
ب -۵-۲- آزمایش ۲.....۴۹
ب -۶- آنالیز آماری.....۴۹
نتایج.....۵۰
بحث.....۵۳
پیشنهادات.....۶۲
منابع.....۶۳

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار ۴-۱- مقایسه میزان بلوغ تخمک گاومیش در محیط های مختلف (کنترل، هم کشتی COC و هم کشتی تخمک‌های برهنه با کشت تک لایه سلول‌های کومولوس گاو)..... ۵۰

نمودار ۴-۲- میزان تسهیم حاصل از بلوغ تخمک گاومیش در محیط های مختلف (کنترل، هم کشتی مجموعه‌ی تخمک-کومولوس و هم کشتی تخمک های برهنه با کشت تک لایه سلول های کومولوس گاو). بین گروه های مختلف اختلاف معنی‌دار نمی باشد. ۵۱

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

فهرست تصاویر

عنوان **صفحه**

تصویر ۳-۱-تک لایه تشکیل شده از سلول های کومولوس در کف قطره دیش هم کشتی (چپ×۴۰۰)و تخمک های برهنه کشت داده شده و بر روی تک لایه (راست×۴۰)..... ۴۸

تصویر ۴-۱- تخمک های بلوغ یافته (سمت راست) و بالغ نشده گاومیش (سمت چپ): به خروج جسم قطبی در تخمک بالغ توجه نمایید ۵۲

تصویر ۴-۲ مورولا (راست) و رویان در مرحله ۴ سلولی (چپ) گاومیش..... ۵۲

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

نام خانوادگی دانشجو: افروغ | **نام:** مهسا

عنوان: تأثیر هم کشتی سلول های کومولوس گاو بر بلوغ و تکامل پس از لقاح تخمک گاومیش

استاد راهنما: دکتر فرید براتی

رشته: دامپزشکی | **درجه تحصیلی:** دکترای حرفه ای

محل تحصیل (دانشگاه): دانشگاه شهید چمران اهواز | **دانشکده**: دامپزشکی

تاریخ فارغ التحصیلی:۱۳۸۹/۴/۷

تعداد صفحات:۷۹

واژه های کلیدی: هم کشتی، گاو، سلول های کومولوس، تخک گاومیش، بلوغ آزمایشگاهی، تسهیم

گاومیش رودخانه ای (بوبالوس بوبالیس) دامی با توانایی بالای تولید شیر و گوشت نقش مهمی در اقتصاد روستایی کشور بازی می کند. عمده ترین مشکل این گونه دامی برونده تولیدمثلی بسیار پایین آن است. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثرات هم کشتی سلول های کومولوس گاو بر بلوغ و تکامل پس از لقاح گاومیش می باشد. تخمدان های گاومیش از کشتارگاه اهواز فراهم و در دمای ۳۷-۳۰ به آزمایشگاه منتقل شدند. تخمک ها از فولیکول های ۸-۲ میلی متر بزل و پس از ارزیابی ظاهری تخمک های درجه A و B به سه گروه درمانی تقسیم شدند. آزمایش اول: گروه ۱ (تعداد=۸۰) تخمک ها به برنامه بلوغ معمول آزمایشگاه شامل استفاده از محیط TCM-199، ۵٪ FCS، ۵٪ BFF، LH۱۰ µg/ml ، FSH ۱۰ µg/ml قرار گرفتند. گروه ۲ (تعداد=۷۲) تخمک سالم (همراه با سلول های کومولوس) گاومیش بر روی کشت تک لایه سلول های کومولوس گاو در محیط TCM-199 و ۵ ٪FCS قرار گرفتند. گروه ۳ (تعداد=۵۲) تخمک های درجه A و B گاومیش که برهنه شدنه بودند همانند گروه ۲ بر روی کشت تک لایه سلول های کومولوس گاو قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در در محیط با دمای ۳۸/۵ درجه سانتی گراد و ۵ ٪ CO_2 و ۹۵٪ رطوبت، تخمک ها تثبیت و با رنگ معمول استو-اورسئین وضعیت بلوغ هسته در آن ها ارزیابی شد. متوسط درصد بلوغ ۶۶/۶، ۸۵/۳ و ۷۰ به ترتیب در گروه های ۱، ۲ و ۳ ($P<$۰/۰۵) ثبت گردید. آزمایش دوم هم شبیه آزمایش اول طراحی شد (گروه ۱: تعداد=۵۲، گروه ۲: تعداد=۷۱ و گروه ۳: تعداد=۵۵) با این تفاوت که تخمک ها پس از زمان انکوباسیون بلوغ برنامه IVF بر روی آن ها انجام می شد و ۳ و ۶ روز پس از لقاح وضعیت تکامل جنین گاومیش در مراحل تسهیم و بلاستوسیست مورد بررسی قرار می گرفت. میزان تسهیم ۳ روز پس از لقاح ۴۱/۳، ۴۸/۲ و ۳۲/۹ درصد به ترتیب در گروه های ۱، ۲ و ۳ ($P<$۰/۰۵) ثبت گردید. در هیچ یک از گروه ها بلاستوسیست به دست نیامد. نتایج این مطالعه اثر بسیار مطلوب هم کشتی سلول های کومولوس گاو را بر بلوغ تکامل پس از لقاح تخمک گاومیش نشان داد.

ABBYY PDF Transformer 2.0
Click here to buy
www.ABBYY.com
ABBYY PDF Transformer 2.0
Click here to buy
www.ABBYY.com

ABBYY PDF Transformer 2.0
Click here to buy
www.ABBYY.com

فصل اول

مقدمه و هدف

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

استفاده از تکنولوژی‌های جدید زیستی در حوزه انسان توانسته نقش بسیار مهمی در درمان ناباروری بازی کند. در رابطه با حیات وحش و گونه های در حال انقراض این فناوری ها نقش ممتازی دارند. در رابطه با دام‌های اهلی این فناوری‌ها می توانند در انتقال صفات مفید و انتشار سریعتر ژن‌های ارزشمند از نظر تولید دامی و یا فراورده‌های دارویی موثر باشند. بعلاوه استفاده از این دست تکنولوژی‌ها از جمله تولید جنین آزمایشگاهی و انتقال جنین می تواند در شرایط نامطلوب مثل حرارت بالای محیط که فعالیت دستگاه تولیدمثل دام شدیداً تحت تأثیر قرار می گیرد، به بهبود فعالیت آن کمک کند (۱۴).

جمعیت متنابهی از گاومیش در کشور وجود دارد در صورت سازماندهی و برنامه ریزی می توان از پتانسیل اقتصادی آن استفاده نمود. میزان باروری پایین گاومیش نسبت به گاو یکی از موانع اصلی توسعه این توده دامی در کشور است. مطالعات متنوعی بر روی جنبه های مختلف تولیدمثای گاومیش در ایران صورت پذیرفته است اما هنوز به نقطه مطلوب خود در این رمینه نرسیده است. یکی از جنبه های تولیدمثلی که در صورت بهینه سازی می تواند به بهبود روند تولیدمثلی گاومیش کمک کند تولید آزمایشگاهی جنین و انتقال جنین در این گونه است. با توجه به مشکلاتی که در این مورد وجود دارد و از جمله پاسخ بسیار ضعیف بلوغ تخمک گاومیش نسبت

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

به گاو که در مطالعه قبلی (۱) به اثبات رسیده بود، بررسی روش های مختلف بهینه سازی پروسه بلوغ تخمک و تولید جنین آزمایشگاهی ضرورت پیدا کرد. با توجه به اینکه یکی از عوامل موثر در بلوغ تخمک سلول های کومولوس می باشد و با توجه به اینکه پاسخ تخمک گاو بسیار بالا می باشد این مطالعه به دنبال بررسی تاثیر سلول های تخمک گاو بر بلوغ تخمک گاومیش است.

فصل دوم

مروری بر منابع

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

الف - جمعیت گاومیش و توزیع آن در جهان

جمعیت گاومیش در دنیا تقریباً بیش از ۱۷۷،۰۰۰،۰۰۰ راس در سال ۲۰۰۷ اعلام شده است. جمعیت تقریبی گاومیش در ایران ۶۲۰،۰۰۰ رأس در همان سال اعلام گردیده است (۶۹). تقریبا ۹۵/۸۳ درصد گاومیش‌های دنیا در قاره کهن آسیا پرورش می یابند. اما در قاره های آمریکا و اروپا نیز درصدی از گاومیش‌های دنیا پرورش می یابند. گاومیش از خانواده بویده[۱] است که از گاومیش آسیایی از زیر خانواده بوبالینا[۲] می‌باشد. یکی از دیگر زیرخانواده های خانواده بویده سن سرینا[۳] است که عمدتا گاومیش های آفریقایی از این خانواده هستند. گونه های بوبالوس ماندورینوس[۴] در فیلیپین و گونه های بوبالوس بوبالیس[۵] و بوبالوس آرنه ای[۶] در هند اهلی شده اند. گاومیش‌های بوبالوس بوبالس دو زیر گونه رودخانه ای[۷] و باتلاقی[۸] دارند. گونه رودخانه ای ۵۰ کروموزوم و گونه باتلاقی ۴۸ کروموزوم دارد (۱۲).

---

1 - Bovidae
2 -Bubalina
3 -Sencerina
4 -*Bubalus mandorinus*
5 -*Bubalus bubalis*
6 -*Bubalus arenee*
7 -River buffalo, or Water buffalo
8 -Swamp buffalo

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

در دهه ۱۹۳۰ تقریباً ۱/۵ میلیون راس گاومیش در ایران بوده است که در سال ۱۹۹۶ به کمتر از ۵۰۰ هزار رأس رسیده است. با اعمال مدیریت و کنترل بر پرورش گاومیش هم اینک جمعیت این گونه دامی در ایران بر خلاف سایر گونه های دامی در حال افزایش است (۱۲).

ب – ویژگی‌های تولیدمثلی گاومیش

در مقایسه با گاو (۱۸- ۷ ماه) بلوغ در گاومیش با تاخیر صورت می گیرد. تعیین زمان بلوغ در گاومیش به علت مشکلات تشخیص فحلی در این گونه مشکل است. اغلب زمان تقریبی بلوغ بر اساس اولین زایمان است. سن بلوغ در گاومیش های رودخانه ای (۱۸-۱۵ ماه) نسبت به گاومیش باتلاقی (۲۴-۲۱ ماه) کمتر است. معمولا اولین آبستنی در سن ۲۴ تا ۳۶ ماهگی اتفاق می‌افتد. همانند گاو عوامل مختلفی بر روی سن بلوغ گاومیش موثر هستند. نژاد، اقلیم، تغذیه و رشد فاکتورهای موثر بر سن اولین زایش هستند. همانند گاو در گاومیش القا بلوغ به روش‌های هورمونی امکان پذیر است (۳۷).

از نظر ظاهری تخمدان گاومیش واجد تفاوت هایی با تخمدان گاو است. تخمدان گاومیش تخم مرغی و واجد حدودا ۲/۵ سانتیمتر طول و ۳/۹ گرم وزن است. در حالی که تخمدان گاو تخم مرغی و در حدود ۳/۷ سانتیمتر طول و ۸/۶ گرم وزن دارد. از نظر فیزیولوژیک تخمدان گاومیش پتانسیل تولبدمثلی ضعیف تری نسبت به گاو دارد. تعداد فولیکول‌ها کمتر و میزان دژنرسانس تخمک بیشتر است. جسم زرد بر خلاف گاو اغلب در تخمدان فرو رفته و خاکستری رنگ است. در حالیکه در گاو جسم زرد بیرون زده و زرد رنگ است. با اینحال بسته به وضعیت فیزیولوژیک دام اندازه تخمدان متفاوت است (۶۵).

الگوی رشد فولیکولی در تخمدان گاومیش همانند گاو مطالعه شده است. جدول ۲-۱ کفایت تولید جنین در گاو و گاومیش مقایسه شده است. در سال ۱۹۸۴ الگوی تکامل و آترزی فولیکولی فولیکول‌های بیش از ۸ میلی متر بر سطح تخمدان گاومیش تهیه شده که موید نظریه راجاکوفسکی در مورد گاو بوده است (۱۲، ۱۵). در گونه گاومیش ذخیره فولیکولی گاومیش بسیار

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

کمتر از گاو است به طوری که در گاومیش رودخانه ای تعداد فولیکول‌های ابتدایی ۱۲۰۰۰ تا ۱۹۰۰۰تخمین زده می شود. در تلیسه گاو این رقم به ۱۵۰۰۰۰ و بالاتر می رسد.

جدول ۱-۱. مختصات مورفولوژیک تخمدان گاومیش خوزستان (۲)

	چپ	راست
طول (میلی متر)	۲۰/۸±۱/۴۴	۱۹/۴±۱/۷
عرض (میلی متر)	۱۷/۱±۰/۲۵	۱۵/۷±۱/۸
ضخامت (میلی متر)	۸/۹±۲/۲۵	۹/۹۵±۰/۵
وزن (گرم)	۱/۸±۰/۴۵	۱/۷±۰/۴۹

جدول ۱-۲. قطر (میلی متر) فولیکول‌های تخمدان گاومیش خوزستان در دو فصل سرما و گرما (۴)

		اولیه	ثانویه	ثالثیه	بالغ	آترتیک	در حال رشد
تابستان	فولیکولار	۳۱±۱۵	۴/۷±۱۱/۳	۲/۸±۳/۸	۶/۵±۵/۲	۵۷/۳±۱۳/۱	۴۱/۴±۱۴/۴
	لوتئال	۱۸/۷±۵/۱	۰/۷±۱/۶	۲/۴±۲/۳	۳±۲/۴	۷۵/۲±۶/۴	۲۴/۷±۶/۴
زمستان	فولیکولار	۵۹/۵±۱۵/۲	۵/۴±۳/۱	۳/۴±۳/۵	۳/۸±۲/۴	۲۸/۳±۱۷	۱۷/۷±۱۵/۱
	لوتئال	۴۲/۹±۱۵/۵	۷/۷±۶/۲	۶/۶±۷/۴	۳/۳±۲/۲	۴۴/۶±۱۴/۳	۵۲/۷±۱۹/۸