فناوری تولید آزمایشگاهی جنین دام

ترجمه و گردآور أ : محبوبه حیدری نصیرآبادی- دانشجوی PhD بیوتکنولوژی تولیدمثل دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد

مقدمه

فناوری تولید جنین در شرایط آزمایشگاه به ما اجازه‌ی تولید مقادیر انبوه جنین در مراحل تکاملی گوناگون را می‌دهد و از این رو بسیار مورد توجه دانشمندان علوم زیستی تولیدمثلی و بیوتکنولوژی قرار گرفته است. از جمله کاربردهای این روش می‌توان به درمان ناباوری به ویژه در انسان، ایجاد روش‌های نوین تعیین جنسیت جنین، درمان بیماری‌ها با استفاده از سلول‌های بنیادی، مقاصد دارویی، تحقیقات در تمامی جنبه‌های شبیه سازی (Cloning)، پیشرفت فناوری تزریق ژن، مطالعه‌ی مراحل مختلف جنینی و کاربردهای تجاری همانند تسهیل دوقلوزایی در گله‌های گوشتی، سرعت بخشیدن به برنامه‌های اصلاح نژاد، نجات گونه‌های در حال انقراض و بسیاری کاربردهای دیگر اشاره کرد. پیشرفت موفقیت‌آمیز و کاربرد گسترده این روش‌ها و فناوری‌های وابسته، ارتباط تنگاتنگی با گسترش فناوری‌های پایه مرتبط با بلوغ آزمایشگاهی تخمک، لقاح آزمایشگاهی (In vitro fertilization, IVF) کشت آزمایشگاهی رویان (In vitro culture, IVC) تکنیک‌های انتقال رویان و روش‌های کشت اسپرم در آزمایشگاه دارد. در ابتدا در بسیاری موارد، کار بر روی تخمدان‌های جمع‌آوری شده از سطح کشتارگاه‌ها انجام می‌شد. امروزه نیز استفاده از نمونه‌های کشتارگاهی کاربرد فراوانی دارد، البته هم اکنون یکی از روش‌های متداول، برداشت تخمک با استفاده از روش‌های اولتراسونوگرافی از حیوانات بارور یا نابارور می‌باشد.

مراحل انجام تولید جنین

۱-بلوغ تخمک

تخمک‌های مورد نیاز برای تولید جنین آزمایشگاهی از فولیکول‌های تخمدان‌هایی که در کشتارگاه جمع‌آوری می‌شوند به دست می‌آید. به منظور انتقال تخمدان به آزمایشگاه از ظرف‌های عایق حرارتی استفاده می‌گردد تا در معرض نوسانات حرارتی کمتری قرار گیرند. در آزمایشگاه بافت‌های اضافی را از تخمدان جدا نموده و تخمدان‌ها را به وسیله محلول‌های مناسب شستشو می‌دهند، سپس با سرنگ یا پمپ خلاء و سر سوزن مناسب و یا با روش‌های دیگر محتویات فولیکول‌هایی را که در سطح تخمدان هستند تخلیه نموده و در لوله آزمایش مناسب قرار می‌دهند. قابل ذکر است که در این مرحله جداسازی تخمک‌های واجد شرایط برای تولید جنین از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در عین حال جمع‌آوری تخمک در آزمایشگاه معمولاً از تمامی فولیکول‌هایی که در سطح تخمدان حضور دارند صورت می¬گیرد و ملاک انتخاب آنها مشخصات ظاهری خود تخمک‌ها است که در زیر میکروسکوپ قابل مشاهده می‌باشند. ملاک بالغ شدن تخمک در شرایط آزمایشگاهی تداوم یافتن تقسیمات میوزی هسته تخمک و ظاهر شدن اولین گویچه قطبی (بلوغ هسته) و تغییر در فعالیت و نحوه استقرار اندامک‌های سیتوپلاسمی (بلوغ سیتوپلاسم) است.بنابراین برای انجام بلوغ آزمایشگاهی موفق، بایستی بلوغ هسته‌ای به همراه بلوغ سیتوپلاسمی در شرایط آزمایشگاه صورت پذیرد، زیرا حوادثی که

در طی بلوغ تخمک رخ می‌دهد، پیشرفت‌های رویانی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. تخمک‌ها به منظور طی نمودن روند بلوغ در محیط مطلوب در شرایط ۳۹-۳۸ درجه سانتیگراد در ۵ درصد CO_2، رطوبت حداکثر به مدت ۲۶ تا ۳۲ ساعت در انکوباتور قرار می¬گیرند.

۲- ظرفیت‌پذیری اسپرم

مادامی که اسپرم‌ها، مسیر داخل لوله تناسلی ماده را طی نکرده‌اند، ظرفیت کامل برای لقاح تخمک را ندارند. اسپرم باید تغییرات فیزیولوژیکی تکمیلی (ظرفیت دارشدن اسپرم) را متحمل شود تا بتواند از لایه‌ی شفاف عبور کرده و با هسته تخمک ادغام شود. در خلال ظرفیت‌پذیری، غشای پلاسمایی اسپرم متحمل واکنش‌های بیوشیمیایی شده و ناپایدار می‌گردد. در نتیجه این واکنش‌ها میزان نفوذپذیری غشا به مواد مختلف به ویژه کلسیم تغییر می‌کند. این تغییرات در ظاهر به عنوان عامل اصلی برای واکنش کلاهکی عمل می‌نمایند. واکنش‌های کلاهکی موجب متراکم شدن، شکسته شدن و در نهایت متخلخل شدن غشاهای پلاسمایی و غشای خارجی کلاهک می‌شوند. کلاهک حاوی آنزیم‌هایی است که پس از متخلخل شدن از آن خارج گشته و بافت‌هایی را که در اطراف تخمک در مسیر حرکت اسپرم قرار دارند هضم نموده و از بین می‌برند و در نتیجه اسپرم قادر خواهد بود وارد تخمک شود و آن را بارور نماید. مطالعات نشان می‌دهد که شستشوی و قرار گرفتن در محیط‌های سر شار از یون و محیط‌های کلسیم‌دار می‌توانند واکنش آکروزومی را در محیط آزمایشگاهی هدایت کرده و عمل لقاح را سرعت بخشند. با استفاده از تکنیک¬های موجود می‌توان اسپرم های متحرک را جدا نمود.

۳- لقاح آزمایشگاهی

پس از ظرفیت‌پذیری، اسپرم را به محیط مخصوص لقاح انتقال می‌دهند، غلظت اسپرم در این محیط در حدود یک میلیون در میلی‌لیتر است. زمانی که اسپرم و تخمک با هم کشت داده می‌شوند، یکی از اسپرم‌ها وارد تخمک می‌شود و پیامد آن، یک ردیف اعمال را به جریان می‌اندازد که در نهایت منجر به لقاح می‌شود. لقاح موفق نیازمند فراهم نمودن و تکمیل روند بلوغ تخمک، ظرفیت‌پذیری اسپرم، غلظت مناسب اسپرم جهت نفوذ به تخمک، کیفیت مناسب تخمک برای حمایت پیشرفت‌های رویانی و شرایط کشت مساعد و قابل قبول برای فعالیت‌های متابولیسمی گامت‌های نر و ماده می‌باشد.

اسپرم دارای میزان زیادی پروتئین در سطح خود برای اتصال به زونا می‌باشد. فرآیند لقاح از زمانی شروع می‌شود که اسپرم به رسپتورهای زونای تخمک ثانویه متصل شود. این رسپتورها به صورت اختصاصی عمل نموده به طوری که اسپرم گاو فقط قادر به باور ساختن تخمک گاو می‌باشد. در روند فعال‌سازی زمانی که میزان زرده کم شده و مقداری مایع به فضای پیرامون زرده‌ای آزاد می‌شود سر اسپرم در زرده متورم شده، قوام ژله‌ای پیدا کرده و به طور کلی شکل خاص و ویژه خود را از دست می‌دهد و در نهایت ساختاری که حاصل می‌شود شباهت بیشتری به هسته‌ی سلول سوماتیک دارد

تا یک سر اسپرم، این ساختار پرونکلئوس نر نامیده می‌شود. از جمله تغییرات بیوشیمیایی که در اثر نفوذ اسپرم در تخمک حاصل می‌شود تغییر در الگوی یون کلسیم داخل سلولی است، در طی پدیده لقاح موجب القای اگزوسیتوز گرانول‌های قشری و مهار پلی‌اسپرمی می‌شود.

در فرآیند لقاح تخمک توسط اسپرم فعال شده، به طوری که بدون وجود هیچ گونه محرکی، تقسیمات سلولی آغاز می شوند.

برای مشاهده لقاح، می‌توان با مشاهده میکروسکوپی و یا با رنگ‌آمیزی و تثبیت نمودن تخمک ۲۴-۱۸ ساعت پس از تلقیح به وقوع تسهیم پی برد. نرخ بالای لقاح در IVF، به وجود تعداد مناسب اسپرم‌های باروری که به شدت متحرک بوده و تخمک‌های باروری که دارای اولین گویچه قطبی هستند، بستگی دارد. بعضی از معیارهایی که به عنوان نشانه لقاح به کار می‌روند عبارتند از:

الف. نفوذ اسپرم به داخل اووپلاسم

ب. تورم سر اسپرم

پ. تقسیمات سلولی با ظاهر طبیعی

ت. مشاهده دم یک اسپرم در اووپلاسم

۴- کشت جنین در آزمایشگاه

تکامل رویان‌های پستانداران پیش از لانه‌گزینی به صورت در آزمایشگاه با مشکلات زیادی همراه است. سیستم‌های کشت موجود، نتوانسته‌اند شرایط محیطی و فیزیکی دستگاه تناسلی ماده را فراهم کنند. در داخل سیستم تناسلی ماده، رویان در حال تکامل در معرض حجم کمی از مایع قرار می‌گیرد و بر عکس در محیط کشت، رویان در معرض حجم بیشتری از مایع قرار دارد. با وجود این، فاکتورهای اتوکرینی که به وسیله‌ی رویان ترشح می‌شود در حجم زیاد مایع رقیق شده و ممکن است بی اثر شود.

اکنون ثابت شده که در موش سرعت تسهیم و تشکیل بلاستوسیست با کم کردن حجم محیط افزایش می‌یابد. نتایج مشابهی نیز از رویان گوسفند به دست آمده است، در ضمن فاکتورهای پاراکرینی هم که به وسیله‌ی سیستم تناسلی ماده ترشح می‌شود در محیط کشت وجود ندارد.بنابراین در روش‌های اولیه‌ای که برای کشت رویان تدوین شده بود، محیط‌های کشت مورد استفاده پاسخ‌گوی احتیاجات رشد رویان نبود و رشد رویان پس از رسیدن به مرحله‌ی ۸-۱۶ سلولی متوقف می‌گردید. لذا برای تداوم رشد رویان و رسیدن به مراحل پیشرفته‌تر (مورولا و بلاستوسیست) آن‌ها را به شرایط طبیعی انتقال می‌دادند و برای این منظور از لوله رحمی حیواناتی نظیر گاو، گوسفند یا خرگوش استفاده می‌نمودند. پس از این که رویان‌ها چند روزی را در این شرایط سپری کردند، آن‌ها را از لوله رحمی خارج و مورد استفاده قرار می‌دادند.

مهم‌ترین مشکل این روش از دست دادن تعدادی از رویان‌ها در جریان انتقال آنها به لوله رحمی میزبان واسط و بازیابی مجدد آن‌ها بود. همچنین استفاده از حیوان زنده برای تأمین تداوم رشد رویان‌ها نیز کاری مشکل بود و کاربرد عملی نداشت. در تحقیقات بعدی محققین این مشکل را با اضافه نمودن سلول‌های حمایت کننده‌ی رشد رویان (کشت هم زمان سلول‌های اویداکتی، کومولوس، اپیتلیان رحم، Vero، BRLو ....)، عوامل رشد و یا ترشحات لوله تناسلی به محیط کشت برطرف ساخته و امکان رشد رویان تا مرحله‌ی بلاستوسیست را در شرایط آزمایشگاهی فراهم نمودند. ۲۲تا ۲۴ ساعت پس از لقاح جنین های حاصله را در قطرات محیط کشت جنین انتقال داده و به مدت ۵ تا ۷ روز در آزمایشگاه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داری می¬کنند، پس از طی این مدت زمان جنین های با کیفیت مناسب را به رحم حیوانی که تحت درمان هورمونی قرار گرفته اند انتقال داده می شوند.

Wahid H. Monaghan P. amd Gordon I. 1992. In vitro maturation of sheep follicular oocytes. Journal of Reprodution and Fertility 9: 52-61.

Wani N.A. Wani G.M. and Wani M.Z. 2009. Effect of different factors on the recovery of oocytes for IVM-IVF procedures in sheep. Small Rumminant Research 34: 71-76.

Wani NA. 2002. In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocyte. Small Rumminant Research 44: 89-95.