DOI: 10.22055/ivj.2024.421673.2645

بررسی تأثیر استفاده از اسپرم اپیدیدیمی در روند تولید آزمایشگاهی جنین گوسفند بر قابلیت تکوینی جنین‌ها متعاقب انتقال جنین

ابراهیم احمدی[۱*]، ناصر شمس اسفندآبادی[۲]، علی کدیور[۳]، حسن نظری[۱]، نجمه داودیان[۱]، آرش علاءالدینی[۴]، احسان رومیانی[۵] و شاکر شایسته‌نیا[۶]

[۱] دانشیار پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
[۲] استاد پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران و گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
[۳] دانشیار پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران و گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
[۴] استادیار مرکز علم و فناوری امنیت غذایی و کشاورزی (غدیر)، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
[۵] استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
[۶] مربی مرکز علم و فناوری امنیت غذایی و کشاورزی (غدیر)، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۸/۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۴/۱۳

چکیده

تولید آزمایشگاهی جنین در کنار انتقال جنین در گونه‌های مختلف حیوانات اهلی به کار می‌رود و پتانسیل بالقوه فراوانی در افزایش بهره‌وری تولید و نیز افزایش سرعت اصلاح ژنتیکی گله‌ها ایفا می‌کند. اسپرم استحصال شده از ناحیه دم اپیدیدیم منبع مهمی برای گامت‌های دام‌های دارای ارزش اصلاحی بالا و گونه‌های در معرض خطر انقراض است. مطالعه حاضر به منظور بهینه‌سازی و کاربردی کردن فناوری انتقال جنین‌های تولید شده در آزمایشگاه و نیز بررسی قابلیت تکاملی جنین‌های آزمایشگاهی تولید شده با استفاده از اسپرم اپیدیدیمی متعاقب انتقال جنین انجام شد. ابتدا میش‌های گیرنده جنین، به مدت ۱۲ روز سیدرگذاری شدند. همزمان با خروج سیدر، به هر میش ۴۰۰ واحد PMSG تزریق شد. روز بعد از خروج سیدر، روند تولید جنین‌های آزمایشگاهی در دو گروه با استفاده از اسپرم اپیدیدیمی (۷۴۹ تخمک در ۶ تکرار) و اسپرم انزالی (۵۴۰ تخمک در ۴ تکرار) شروع شد. ۹ روز پس از خروج سیدر، ۲ عدد جنین ۶ روزه در مرحله بلاستوسیست به صورت نیمه لاپاروسکوپیک به رحم هر گیرنده جنین منتقل شد (۳۸ گیرنده گروه اسپرم اپیدیدیمی، ۳۲ گیرنده گروه اسپرم انزالی). آبستنی، ۴۴ روز پس از انتقال جنین به روش اولتراسونوگرافی در گیرنده‌ها تعیین شد. نتایج به دست آمده نشان داد که در بین گروه اسپرم اپیدیدیمی و گروه اسپرم انزالی از نظر شاخص‌های تکوین جنین در آزمایشگاه (میزان تسهیم: ۱/۷±۸۳/۰ درصد در مقابل ۳/۲۷±۷۱/۹ درصد؛ میزان بلاستوسیست ۱/۳±۳۹/۸ درصد در مقابل ۱/۳۱±۳۳/۵ درصد، به ترتیب) و نیز از نظر میزان آبستنی (۵۰ درصد در مقابل ۴۵/۷ درصد، به ترتیب)، بره‌زایی (۲۵ درصد در مقابل ۲۱/۹ درصد، به ترتیب) و سایر شاخص‌های بررسی شده اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. از روش‌های استفاده شده در مطالعه حاضر می‌توان برای انتقال جنین‌های گوسفند در شرایط مزرعه استفاده کرد. همچنین بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان گفت اسپرم اپیدیدیمی در گوسفند از نظر قابلیت تکاملی تفاوتی با اسپرم انزالی ندارد.

کلمات کلیدی: لاپاروسکوپی، آبستنی، میزان بره‌زایی، اسپرم اپی‌دیدیمی، اسپرم انزالی

مقدمه

گوسفند به عنوان یکی از منابع اصلی تولید مواد پروتئینی در ایران، نقش اساسی در اقتصاد بسیاری از مناطق کشور دارد. از این رو صنعت پرورش گوسفند نقشی بنیادی در تأمین امنیت غذایی و اقتصادی کشور دارد. یکی

* نویسنده مسئول: ابراهیم احمدی، دانشیار پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
E-mail: eahmadi@sku.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

از مشکلات اساسی این صنعت در کشور ما عدم استفاده از فناوری‌های نوین به خصوص فناوری‌های تولید مثلی است. فناوری‌های تولید مثلی نظیر تلقیح مصنوعی، همزمان‌سازی سیکل تولید مثلی، تولید آزمایشگاهی جنین و انتقال جنین امروزه به صورت گسترده در صنعت دامپروری در دنیا مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد (Falchi et al, 2022). استفاده از این فناوری‌ها می‌تواند سرعت بهبود ژنتیکی گله‌ها را افزایش داده و نقش اساسی در حفظ پتانسیل ژنتیکی دام-های پرارزش داشته باشد (Tonamo, 2015). همچنین این روش‌ها می‌توانند در حفاظت از تنوع ژنتیکی دام‌ها و نیز حفظ نژادهای بومی کشور نقش مؤثری ایفا کنند (Sharkey et al, 2001). پرورش گوسفند در کشور عمدتا به صورت سنتی و با کم‌ترین استفاده از روش‌های نوین علمی انجام می‌شود. دلایل اصلی عدم بهره‌مندی از روش‌های علمی از یک طرف ناآگاهی دامداران از مزایای این فناوری‌ها و از طرف دیگر عدم تناسب عملی بسیاری از این روش‌ها با شرایط مزرعه و نبود نیروهای آموزش دیده با مهارت کافی است. تکنولوژی تولید آزمایشگاهی جنین در کنار تکنولوژی انتقال جنین در گونه‌های مختلف حیوانات اهلی به کار می‌رود و پتانسیل بالقوه فراوانی در افزایش بهروری تولید و نیز افزایش سرعت اصلاح ژنتیکی گله‌ها ایفا می‌کند (Zhu et al, 2018). با توجه به قابلیت‌های این فناوری، در گوسفند نیز پژوهش‌های فراوانی برای کاربردی نمودن این فناوری‌ها در سراسر دنیا در حال انجام است.

اسپرم استحصال شده از ناحیه دم اپیدیدیم منبع بیولوژیک مهمی برای گامت‌های دام‌های دارای ارزش اصلاحی بالا و گونه‌های در معرض خطر انقراض است. در دام‌های نری که دارای ارزش اصلاحی بالا بوده، در معرض انقراض هستند و به دلیل آسیب‌دیدگی و یا مرگ ناگهانی و یا دلایل دیگر امکان اسپرم‌گیری از طریق انزال از آن‌ها میسر نباشد، استفاده از اسپرم اپیدیدیمی راه حل جایگزین است (Fickel et al, 2007). از اسپرم اپیدیدیمی می‌توان در تلقیح مصنوعی یا لقاح آزمایشگاهی استفاده کرد. گزارش‌ها نشان می‌دهد که اسپرم اپیدیدیمی موش توانایی باروری تخمک در فرآیند تولید آزمایشگاهی جنین و تولید جنین‌های سالم تا مرحله تولد را دارد (Songsasen et al, 1998).

با توجه به تأثیر انتقال جنین‌های آزمایشگاهی در تسریع فرآیند اصلاح ژنتیکی دام‌ها و حفظ پتانسیل ژنتیکی دام‌های پرارزش و نیز اهمیت به کارگیری اسپرم اپیدیدیمی، در مطالعه حاضر به منظور آزمودن امکان استفاده از اسپرم اپیدیدیمی در فرآیند تولید آزمایشگاهی جنین، اسپرم‌های استحصال شده از ناحیه دم اپیدیدیم بیضه قوچ‌های کشتار شده در مقایسه با اسپرم انزالی مورد مقایسه قرار گرفت. جنین‌های تولید شده به صورت تازه به رحم میش‌های گیرنده منتقل شده و نتایج آبستنی و تولد بره‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش کار

تخمدان‌های مورد استفاده در این پژوهش از میش‌های کشتار شده در کشتارگاه صنعتی جونقان استحصال شده و در محلول نرمال سالین حاوی آنتی‌بیوتیک (۲۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین) در دمای ۳۷-۳۰ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه بافت‌های اضافی از تخمدان‌ها جدا شده و چند بار با آب ۳۷-۳۰ درجه سانتی‌گراد و چند بار هم با سرم فیزیولوژی حاوی آنتی‌بیوتیک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد شستشو داده شده و سپس در سرم فیزیولوژی حاوی آنتی‌بیوتیک و در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

آسپیره کردن فولیکول‌ها و استحصال تخمک‌ها در لوله کونیکال ۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت با استفاده از ست تزریق پروانه‌ای ۲۱ متصل به پمپ خلاء انجام گردید. تمام فولیکول‌های قابل روئیت ۶-۲ میلی‌متری آسپیره شدند. محیط آسپیراسیون HEPES-buffered M199 حاوی۱۰ درصد سرم گوساله جنینی (fetal bovine serum, FBS) بود. مایع آسپیره شده حدود ده دقیقه جهت رسوب ذرات بی‌حرکت گذاشته شد و پس از ۱۰ دقیقه

رسوب ته لوله به وسیله پیپت پاستور کشیده و درون پتری دیش خط‌کشی شده تخلیه شد. پس از آن در زیر استریومیکروسکوپ تخمک‌های با کیفیت مطلوب (حداقل دارای ۳ لایه سلول کومولوس متراکم، سیتوپلاسم گرانوله یکنواخت و توزیع یکنواخت قطرات چربی در سیتوپلاسم) جدا شده و به قطرات محیط شستشو منتقل شدند. محیط شستشو HEPES-buffered M199 به همراه سرم بود.

تخمک‌ها پس از چهار بار شستشو به صورت تصادفی به قطرات ۵۰ میکرولیتری محیط کشت بلوغ انتقال داده شده (به هر قطره ۱۰ تخمک) و سپس در شرایط ۵ درصد CO2 و رطوبت ۱۰۰ درصد و در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۲۲ ساعت گرمخانه گذاری شدند. محیط بلوغ Bicarbonate-buffered M199 حاوی ۱۰ درصد سرم و ۰/۰۵ واحد هورمون FSH به ازای هر میلی‌لیتر بود.

پس از اتمام زمان بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های بالغ شده (دارای اتساع مناسب سلول‌های کومولوس و عدم وجود نشانه‌های دژنراسیون در سلول‌های کومولوس و سیتوپلاسم تخمک) با استفاده از اسپرم اپیدیدیمی و یا اسپرم انزالی در آزمایشگاه تلقیح شدند. به منظور جداسازی اسپرم‌های اپیدیدیمی دارای تحرک بالا از گرادیان غلظت هیستوپرپ ۵۰ و ۱۰۰ درصد استفاده شد. استحصال اسپرم از ناحیه دم اپیدیدیم بیضه‌های منتقل شده به آزمایشگاه، با ایجاد برش در این ناحیه و جمع‌آوری مایع خارج شده در یک میکروتیوب انجام شد. برای انجام ظرفیت‌پذیری، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم اپیدیدیمی به ۱ میلی‌لیتر محیط کشت HEPES-TCM حاوی ۴ میلی‌گرم BSA در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه شده و میکروتیوب در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت نگهداری شد. اسپرم انزالی با استفاده از واژن مصنوعی از یک رأس قوچ با باروری مناسب اخذ و در دمای اتاق به آزمایشگاه منتقل شد. برای جداسازی اسپرم‌های متحرک از سوسپانسیون اسپرم، از سانتریفوژ بر روی گرادیان هیستوپرپ استفاده شد. برای این منظور، ۴۵۰ میکرولیتر از هیستوپرپ ۱۰۰ درصد در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد، سپس ۴۵۰ میکرولیتر هیستوپرپ ۵۰ درصد به آرامی به نحوی که با هیستوپرپ ۱۰۰ درصد مخلوط نگردد، بر روی آن تخلیه شد. پس از آن، ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپرم ظرفیت‌پذیر شده اپیدیدیمی یا اسپرم انزالی، به آرامی بر روی دو غلظت ۱۰۰ و ۵۰ درصد هیستوپرپ تخلیه شد و میکروتیوب مذکور به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰g سانتریفیوژ شد. بعد از اتمام سانتریفیوژ مایع رویی دور ریخته شده و پلت کف به آرامی مخلوط شده تا یکنواخت شود. پس از آماده‌سازی اسپرم، تخمک‌ها به وسیله پیپت پاستور نازک شده از قطرات بلوغ به قطره‌های شستشو منتقل و پس از ۴ بار شستشو در این محیط کشت، در گروه‌های ده‌تایی با کم‌ترین میزان محیط شستشو به قطرات ۵۰ میکرولیتری محیط لقاح منتقل شدند. محیط شستشوی تخمک‌ها در این مرحله HEPE-SOF دارای ۴ میلی‌گرم BSA بود. سپس اسپرم آماده شده به میزان ۱ تا ۲ میلیون اسپرم به ازای هر میلی‌لیتر یا ۱۰۰۰۰-۵۰۰۰ اسپرم به ازای هر تخمک به قطرات حاوی تخمک اضافه شد. پس از اضافه کردن اسپرم، پتری‌دیش‌ها در انکوباتور ۳۹ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO2 و دارای رطوبت حداکثر به مدت ۲۲-۲۴ ساعت قرار گرفتند، محیط لقاح F-TALP دارای ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA بود.

بعد از انجام IVF، جنین‌ها در داخل لوله حاوی محیط شستشو به مدت یک دقیقه ورتکس و زیگوت‌های احتمالی برهنه شده پس از چهار بار شستشو به قطره‌های ۲۰ میکرولیتری محیط کشت جنین منتقل شده و در شرایط دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO2، ۷ درصد O2 و رطوبت حداکثر گرمخانه‌گذاری شدند. محیط کشت جنین IVC-SOF بود. پس از ۴۸ ساعت، جنین‌هایی که تسهیم شده بودند به قطرات جدید محیط کشت جنین که دارای ۵ درصد سرم بودند منتقل شده و در شرایط قبل تا رسیدن به مرحله بلاستوسیت گرمخانه‌گذاری شدند. جنین‌ها در مرحله بلاستوسیست متسع ۶ روزه به رحم دام‌های گیرنده منتقل شدند.

برنامه استفاده شده برای همزمان‌سازی سیکل فحلی

میش‌های گیرنده جنین (۳۸ رأس در گروه اسپرم اپیدیدیمی و ۳۲ رأس در گروه اسپرم انزالی) شامل استفاده از سیدر (EAZI-BREEDER ساخت شرکت Zoetis، کشور نیوزیلند) به مدت ۱۲ روز بود. در روز ۱۲ سیدرها خارج و هم‌زمان ۴۰۰ واحد بین‌المللی PMSG به صورت عضلانی تزریق شد. در مطالعه حاضر به دلیل در دسترس نبودن قوچ‌های فحل‌یاب، از انتقال جنین به روش زمان ثابت استفاده شد. نه روز پس از خروج سیدر برای انتقال لاپاروسکوپیک بلاستوسیست‌های ۶ روزه در نظر گرفته شد. در روز انتقال جنین، دو عدد بلاستوسیست در یک نی انجمادی ۰/۲۵ میلی‌لیتری استریل حاوی محیط کشت HEPES TCM دارای ۱۰ درصد FBS بارگذاری شده و به محل انتقال جنین منتقل می‌شد.

پرهیز غذایی، ۲۴ ساعت پیش از انجام لاپاروسکوپی در مورد میش‌های گیرنده اعمال شد و ۱۲ ساعت پیش از عمل جراحی به آن‌ها آب نیز داده نشد. برای اعمال آرامبخشی، ۳۰ دقیقه پیش از عمل، به هر میش گیرنده ۰/۰۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن زایلازین به صورت عضلانی تزریق شد. به منظور انجام انتقال رویان به روش نیمه لاپاروسکوپی دام به صورت خوابیده به پشت بر روی تخت جراحی مناسب مقید شد. سپس پشم ناحیه جلوی پستان تا ناف با استفاده از تیغ تراشیده شده و ناحیه با استفاده از الکل ۷۰ درصد و بتادین ضدعفونی شد. در همین زمان اکسی‌تتراسیکلین ۲۰ درصد (طولانی اثر) به میزان ۵ میلی‌لیتر (۱ گرم) به صورت عضلانی به هر دام گیرنده تزریق شد. سپس قسمت انتهای بدن و پاها با زاویه ۴۵ درجه بالا آورده شد تا سر در نزدیک زمین قرار گیرد.

پس از آماده‌سازی میش، ابتدا بیحسی موضعی در ناحیه ایجاد سوراخ‌ها با تزریق ۵ میلی‌لیتر لیدوکائین ۲ درصد در سطح و عمق دیواره شکم اعمال شد. سپس، تروکار ضخیم، ۵-۷ سانتی‌متر جلوتر از پستان و در ۵ سانتی‌متری سمت چپ خط میانی دام با احتیاط به دیواره شکم فرو برده می‌شد. پس از اطمینان از ورود به محوطه شکمی، استیلت تیز تروکار خارج شده و لوله تروکار، چند سانتی‌متر دیگر به داخل فرو برده می‌شد. با وصل کردن شلنگ تزریق گاز به تروکار، تا اتساع کامل محوطه شکمی به آن گاز تزریق می‌شد. سپس، تلسکوپ از طریق تروکار وارد شکم شده و محوطه شکمی مورد بررسی قرار می‌گرفت. پس از اطمینان از نبود روده‌ها در محل، قیچی دو سر تیز در سمت راست خط میانی و در نقطه قرینه ورود تروکار به صورت بسته و با احتیاط به دیواره شکم فرو برده شده و با باز کردن قیچی سوراخ ایجاد شده تا حداکثر ۲ سانتی‌متر بزرگ‌تر می‌شد. هم‌زمان با خارج کردن قیچی، پنس روده‌بند وارد شکم می‌شد. عامل جراحی با استفاده از پنس، احشای شکمی را جابجا می‌کرد تا رحم قابل مشاهده شود. پس از مشاهده رحم، تخمدان‌ها نیز مورد بررسی قرار می‌گرفت تا تخمدان دارای جسم زرد مشخص شود. پس از مشخص شدن تخمدان دارای جسم زرد، شاخ رحمی متناظر با آن با پنس روده‌بند گرفته شده و از دیواره شکم خارج می‌شد. شاخ رحمی خارج شده با استفاده از سرم فیزیولوژی حاوی یک گرم در ۵۰۰ میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون شسته می‌شد. سپس، بر روی خمیدگی بزرگ یک آنژیوکت شماره ۱۸ در لومن رحم کارگذاری و استیلت آن خارج می‌شد. نی انجمادی حاوی جنین‌ها به آنژیوکت متصل شده و انتهای دارای پودر پلی‌وینیل‌پیرولیدون و کتان آن با قیچی بریده می‌شد. با کمک یک سرنگ انسولین، محتویات نی انجمادی به داخل رحم منتقل شده و آنژیوکت از دیواره رحم خارج می‌شد. پس از انتقال جنین‌ها به شاخ رحم، شاخ با سرم دارای آنتی‌بیوتیک شسته شده و به داخل شکم باز گردانده می‌شد. وسایل از شکم دام خارج شده و نقاط سوراخ شده با اسپری اکسی‌تتراسیکلین پوشانده می‌شد. دام آزاد شده و به محل نگهداری بازگردانده می‌شد. در روز-های بعد، دام‌های دریافت کننده رویان از نظر نشانه‌های عفونت مورد بررسی قرار می‌گرفتند. تشخیص آبستنی در دام‌های گیرنده در روز ۵۰ پس از انتقال جنین با استفاده از سونوگرافی با پروب سکتور از روی دیواره شکم یا پروب واژینال از طریق واژن انجام شد.

آنالیز آماری داده‌های تولید جنین با استفاده از روش

آماری t-student و نرم افزار IBM-SPSS نسخه ۲۲ انجام شده و داده‌ها به صورت "میانگین± خطای استاندارد میانگین" نشان داده شد. داده‌های مربوط به آبستنی و زایش در میش‌های گیرنده با استفاده از روش آماری مربع کای مورد تحلیل قرار گرفت.

نتایج

برای تولید آزمایشگاهی جنین در گروه اسپرم اپیدیدیمی ۷۴۹ تخمک در ۶ تکرار و در گروه اسپرم انزالی ۵۴۰ تخمک در ۴ تکرار استفاده شد. نتایج تکوین آزمایشگاهی جنین در Figure 1 آورده شده است. همان‌گونه که مشخص است، در بین دو گروه در شاخص‌های تکوین جنینی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

در Table 1، نتایج حاصل از انتقال بلاستوسیست‌های روز ۶ به میش‌های گیرنده جنین آورده شده است. همان‌گونه که مشخص است از نظر آماری در شاخص‌های ارزیابی شده در بین دو گروه اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد.

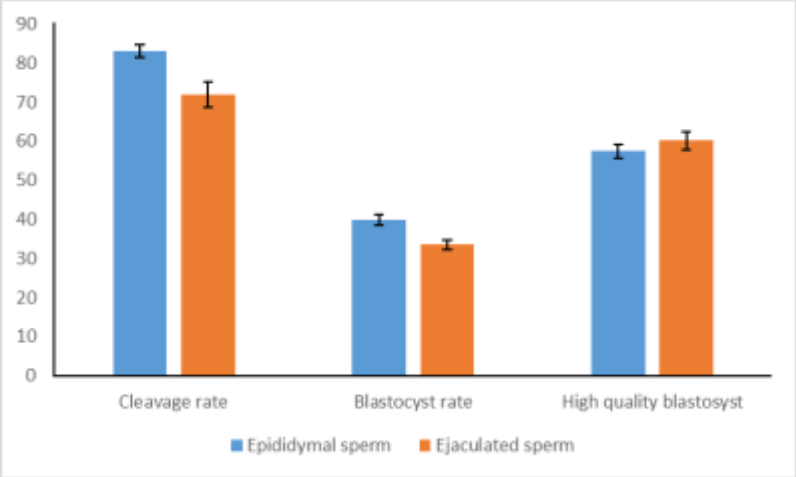

Figure 1: The results of in vitro development of embryos. Data are presented as mean±SEM.

Table 1: the results of the pregnancy and lambing of recipient ewes following the transfer of in vitro produced embryos

Groups	Recipient No.*	Replicate No.	Day-50 pregnant recipients n (%)	Abortion n (%)$	Stillbirth n (%)$	Live birth n (%)	Lambing rate %# (n)
Epididymal sperm	38	6	19 (50)	4 (21.1)	2 (10.5)	13 (68.4)	25 (19)
Ejaculated sperm	32	4	15 (45.7)	3 (20)	0	12 (80)	21.9 (14)

*two day-6 blastocysts were transferred to each recipient.
$in proportion to the day-50 pregnant recipient ewes.
#number of live lambs divided by the number of transferred embryos.

بحث

مطالعه حاضر به منظور دستیابی به روش بهینه انتقال جنین در گوسفند و نیز ارزیابی امکان استفاده از اسپرم اپیدیدیمی در فرآیند تولید جنین و نتایج بالینی حاصل از انتقال جنین‌های تولید شده، انجام شد. نتایج نشان داد که جنین‌های حاصل از تلقیح تخمک‌ها با اسپرم اپیدیدیمی از نظر تشکیل و تکوین جنینی اختلافی با جنین‌های حاصل

از اسپرم انزالی ندارند. همچنین، از نظر میزان آبستنی در گیرنده‌های جنین و نیز سایر شاخص‌های پس از انتقال جنین نیز اختلافی بین دو گروه مشاهده نشد. علاوه بر این، روش‌های آماده‌سازی گیرنده‌های جنین و نیز تکنیک انتقال جنین به صورت نیمه لاپاروسکوپیک نیز به خوبی در این مطالعه بهینه‌سازی شده و نتایج قابل قبولی از آن به دست آمد.

استحصال اسپرم از ناحیه دم اپیدیدیم آخرین شانس بهره‌مندی از قابلیت ژنتیکی دام‌های نر ارزشمند پس از مرگ یا نژادها و گونه‌های در معرض انقراض است (Bergstein-Galan et al, 2018). همانند اسپرم‌های انزالی، این اسپرم‌ها را نیز می‌توان منجمد و برای مدت‌های طولانی‌تر نگهداری نمود (Ehling et al, 2006). البته قابلیت باروری این اسپرم‌ها می‌بایستی مورد سنجش قرار گیرد. در گزارش‌های متعدد نشان داده شده است که تلقیح مصنوعی میش‌ها با اسپرم اپیدیدیمی منجر به ایجاد آبستنی و تولد بره‌های زنده با نرخ موفقیتی مشابه اسپرم انزالی می‌شود (Bergstein-Galan et al, 2017). همچنین، امکان استفاده از این نوع اسپرم در تلقیح تخمک‌ها در شرایط آزمایشگاهی مورد تایید قرار گرفته است (Ahmadi et al, 2022; Licea et al, 2018). با این حال، قابلیت تکوین جنین‌های آزمایشگاهی تولید شده با این نوع اسپرم متعاقب انتقال جنین و نیز میزان ایجاد آبستنی و بره‌زایی حاصله تا پیش از این مطالعه، مورد بررسی قرار نگرفته بود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که این جنین‌ها از نظر ایجاد آبستنی و سایر شاخص‌ها تفاوتی با جنین‌های آزمایشگاهی تولید شده به واسطه تلقیح با اسپرم انزالی ندارند. از این رو، اسپرم اپیدیدیمی را می‌توان با اطمینان در برنامه‌های حفاظت از گونه‌های در معرض خطر انقراض و نیز متعاقب مرگ دام‌های پرارزش مورد استفاده قرار داد.

افزایش میزان آبستنی با انتقال جنین‌ها در مرحله بلاستوسیست نسبت به انتقال جنین در مراحل پایین‌تر تکوینی در نشخوارکنندگان کوچک یک مسئله پذیرفته شده است (Menchaca et al, 2018). از این رو در مطالعه حاضر، انتقال جنین‌ها در مرحله بلاستوسیست انجام شد. همچنین، مشخص شده است که انتقال ۲ جنین به هر میش گیرنده سبب افزایش ۱۰ درصدی نرخ آبستنی نسبت به انتقال یک جنین می‌شود ولی انتقال ۳ جنین به هر گیرنده سبب کاهش نرخ آبستنی می‌شود (Menchaca et al, 2018). به همین دلیل در این مطالعه، به هر گیرنده جنین ۲ عدد بلاستوسیست منتقل شد. علاوه بر این، هماهنگی سن جنین با مرحله زمانی سیکل فحلی دام گیرنده نیز در موفقیت فرآیند انتقال جنین اهمیت زیادی دارد (Larsson et al, 1991). کارگذاری وسایل آزاد کننده پروژسترون (سیدر یا اسفنج) در واژن دام‌های گیرنده به مدت ۱۰ تا ۱۴ روز و سپس تزریق ۳۰۰ تا ۵۰۰ واحد هورمون PMSG در زمان خروج وسیله آزاد کننده پروژسترون معمول‌ترین پروتکل همزمان‌سازی سیکل فحلی در گوسفند است (Cognié et al, 2004; Menchaca et al, 2018). در این پروتکل، تعیین زمان وقوع فحلی در دام گیرنده به منظور مشخص کردن زمان انتقال جنین‌ها انجام می‌شود. با استفاده از این پروتکل ۹۰ درصد فحلی‌ها و تخمک‌گذاری‌ها به ترتیب در ۳۰ تا ۶۰ ساعت پس از خروج وسیله رخ خواهد داد (Alejo Menchaca and Rubianes, 2004). در صورت عدم استفاده از قوچ فحل‌یاب، انتقال بلاستوسیست‌ها ۶ روزه (روز ۰ یعنی روز لقاح آزمایشگاهی) در ۸/۵ تا ۹ روز پس از خروج وسیله آزاد کننده پروژسترون انجام می‌شود (Menchaca et al, 2018). در مطالعه حاضر نیز این پروتکل مورد استفاده قرار گرفت و نتایج حاصله نیز قابل قبول بود.

انتقال جنین در گوسفند با توجه به خصوصیات آناتومیک این گونه، می‌بایستی به طریق جراحی انجام شود، بنابراین استفاده کاربردی و اقتصادی از فناوری‌های تولید و انتقال جنین در گوسفند نیازمند دستیابی به روشی کارآمدتر، سریع‌تر و با آسیب کم‌تر به دام است (King et al, 2022). اولین روش استفاده شده جهت انتقال جنین در نشخوارکنندگان کوچک، روش لاپاروتومی است. این روش با توجه به آسیب‌های وارده به دام، روش مناسبی

برای انتقال جنین در گوسفند به صورت کاربردی نیست (Ishwar and Memon, 1996). از این رو انتقال به روش نیمه لاپاروسکوپیک به عنوان روش انتقال جنین در این مطالعه انتخاب شد. این روش در مطالعات دیگر به عنوان بهینه‌ترین روش انتقال رویان در نشخوارکنندگان سبک معرفی شده است (Selionova et al, 2023). با توجه به این که پیشینه چندانی در زمینه روش فوق در پژوهشکده و کشور موجود نبود، تمرکز نگارندگان بر دستیابی و بهینه-سازی این روش انتقال جنین قرار گرفت. بهینه‌سازی روش انتقال جنین و دستیابی به روش انتقال نیمه لاپاروسکوپیک، روش همزمان‌سازی سیکل فحلی میش‌های گیرنده جهت انتقال رویان، مراقبت‌های پیش و پس از عمل، از دستاورد-های اصلی این مطالعه هستند.

از روش‌های استفاده شده در مطالعه حاضر می‌توان برای انتقال جنین‌های گوسفند در شرایط مزرعه استفاده کرد. همچنین بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان گفت اسپرم اپیدیدیمی در گوسفند از نظر قابلیت تکاملی تفاوتی با اسپرم انزالی ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از پژوهشکده فناوری جنین دام به دلیل پشتیبانی فنی از انجام این مطالعه تقدیر و تشکر می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع مالی

این مطالعه با حمایت مالی و پشتیبانی مرکز علم و فناوری امنیت غذایی غدیر وابسته به دانشگاه جامع امام حسین (ع) انجام شد.

منابع

Ahmadi, E., Shams-Esfandabadi, N., Nazari, H., Davoodian, N., & Kadivar, A. (2022). Ram epididymal sperm frozen in an extender containing ethylene glycol have higher post-thaw longevity and in vitro fertility. *Andrology, 10*(3), 604-613. doi:10.1111/andr.۱۳۱۳۷

Bergstein-Galan, T., Weiss, R., Barbosa, T., Kozicki, L., & Bicudo, S. (2018). Viability of ovine spermatozoa collected from epididymides stored at 18°-25° C for 48 hours post mortem. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 70*, 1023-1 .۰۲۸

Bergstein-Galan, T. G., Weiss, R. R., Bertol, M. A. F., Abreu, A. C. M. R., Busato, E., Kozicki, L. E., & Bicudo, S. D. (2017). Quality and fertility of frozen ovine spermatozoa from epididymides stored at room temperature (18–25 °C) for up to 48 h post mortem. *Theriogenology, 96*, 69-75.

Cognié, Y., Poulin, N., Locatelli, Y., & Mermillod, P. (2004). State-of-the-art production, conservation and transfer of in-vitro-produced embryos in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development, 16*(4), 437-445.

Ehling, C., Rath, D., Struckmann, C., Frenzel, A., Schindler, L., & Niemann, H. (2006). Utilization of frozen–thawed epididymal ram semen to preserve genetic diversity in Scrapie susceptible sheep breeds. *Theriogenology, 66*(9), 2160-2164.

Falchi, L., Ledda, S., & Zedda, M. T. (2022). Embryo biotechnologies in sheep: Achievements and new improvements. *Reproduction in Domestic Animals, 57 Suppl 5*(Suppl 5), 22-33. doi:10.1111/rda.14127

Fickel, J., Wagener, A., & Ludwig, A. (2007). Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *European Journal of Wildlife Research, 53*, 81-89.

Ishwar, A. K., & Memon, M. A. (1996). Embryo transfer in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Research, 19*(1), 35-43.

King, C., Osborn, D., & Grupen, C. (2022). Multiple ovulation and embryo transfer in sheep: Effects of embryo developmental stage and quality on viability in vivo under farm conditions. *Australian Veterinary Journal, 100*(9), 451-458.

Larsson, B., Gustafsson, A., Nasholm, A., & Bjurström, L. (1991). A programme for oestrus synchronization and embryo transfer in sheep. *Reproduction in Domestic Animals, 26*(6), 301-308.

Licea, M. G., Pichardo, J. E. H., Rodríguez, J. L., García-Contreras, A., Rosales, B. C., Palma-Irizarry, M., . . . Kjelland, M. E. (2018). 130 In Vitro Production of Hybrid Desert Bighorn × Domestic Sheep Embryos Using Frozen–Thawed Epididymal Semen from a Hunter-Harvested Ram. *Reproduction, Fertility and Development, 30*(1), 205-205.

Menchaca, A., Barrera, N., dos Santos Neto, P., Cuadro, F., & Crispo, M. (2018). Advances and limitations of in vitro embryo production in sheep and goats. *Animal Reproduction (AR), 13*(3), 273-278.

Menchaca, A., & Rubianes, E. (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development, 16*(4), 403-413.

Selionova, M. I., Aibazov, M. M., & Zharkova, E. K. (2023). Cryopreservation and Transfer of Sheep Embryos Recovered at Different Stages of Development and Cryopreserved Using Different Techniques. *Animals, 13*(14), 2361.

Sharkey, S., Callan, R. J., Mortimer, R., & Kimberling, C. (2001). Reproductive Techniques in Sheep. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 17*(2), 435-455.

Songsasen, N., Tong, J., & Leibo, S. (1998 .(Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. *Journal of Experimental Zoology, 280*(2), 189-196.

Tonamo, A. (2015). Review on Status of Animal Biotechnology and Options for Improving Animal Production in Developing Countries. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare, 5*(19), 21-31.

Zhu, J., Moawad, A. R., Wang, C. Y., Li, H. F., Ren, J. Y., & Dai, Y. F. (2018). Advances in in vitro production of sheep embryos. *Int J Vet Sci Med, 6*(Suppl), S15-s26.

Received: 24.10.2023
Accepted: 03.07.2024

Vol. 20, No. 4, Winter, 2025 **Original Article**
DOI: 10.22055/ivj.2024.421673.2645

Investigating the effect of utilizing epididymal sperm in the process of ovine in vitro embryo production process on the developmental competency of the embryos following embryo transfer

Ebrahim Ahmadi[1*], Naser Shams-Esfandabadi[2], Ali Kadivar[3], Hassan Nazari[1], Nejmeh Davoodian[1], Arash Alaoddini[4], Ehsan Roominai[5] and Shaker Shayestenia[6]

[1] Associate Professor, Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
[2] Professor, Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran and Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
[3] Associate Professor, Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran and Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
[4] Assistant Professor, Science and Technology Center for Food security and Agriculture (Ghadir), Imam Hossein University, Tehran, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Lorestan, Khorramabad, Iran
[6] Instructor, Science and Technology Center for Food security and Agriculture (Ghadir), Imam Hossein University, Tehran, Iran

Received: 24.10.2023 Accepted: 03.07.2024

Abstract

In vitro production of embryos (IVEP) and embryo transfer (ET) have been utilized in various livestock and showed to have a potential to enhance production efficiency and accelerate genetic gain. The sperm recovered from the cauda epididymis is an important source of gametes in valuable males and endangered species. The present study was aimed to optimize ET of ovine IVP embryos and to make it applicable and to investigate the developmental competence of IVP embryos using epididymal sperm following ET. At first, the estrous cycle of embryo recipient ewes was synchronized using CIDR for 12 days. At the time of CIDR removal, 400 IU PMSG was injected to the recipient ewes. A day after CIDR removal, in vitro embryo production was initiated in epididymal sperm group (749 oocytes in 6 replicates) and ejaculated sperm group (540 oocytes in 4 replicates). Nine days after CIDR removal, semi-laparoscopic embryo transfer was performed and 2 blastocysts were transferred to the uteri of recipients (38 recipients in epididymal sperm group and 32 recipients in ejaculated sperm group). Forty-four days after embryo transfer, ultarsonographic embryo detection was performed. There were no significant differences between epididymal sperm and ejaculated sperm groups regarding in vitro embryo development indices (cleavage rate: 83±1.7% vs. 71.9±3.27%; blastocyst rate: 39.8±1.3% vs. 33.5±1.31%, respectively), pregnancy rate (50% vs. 45.7%, respectively), lambing rate (25% vs. 21.9%, respectively), and other evaluated indices. The methods used in the present study can be used to transfer sheep embryos in farm conditions. Also, based on the results of this study, it can be concluded that there is no significant difference in the developmental ability between epididymal sperm and ejaculated sperm in sheep.

Key words: Laparoscopy, Pregnancy, Lambing rate, Epididymal sperm, Ejaculated sperm

[*] **Corresponding Author**: Ebrahim Ahmadi, Associate Professor, Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
E-mail: eahmadi@sku.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).