

انتقال جنین در گاو

ترجمه: مرتضی وفائی خانجانی و علیرضا رفیعی - دانشجویان دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی کرج

مقدمه

تکنیک انتقال جنین در گاو در چند مرحله صورت می‌گیرد که هر مرحله بنوبه خود پیچیده است. شکست در هر یک از مراحل این تکنیک محتملاً شکست در تمام مراحل آن را سبب میشود. بنابراین موفقیت بستگی به دانش، تجربه، و توجه به اصول جزئی و اساسی در این کار دارد.

روند چند تخمک‌گذاری یک روشی است که توجه محض به جزئیات را احتیاج دارد. تحقیقات در ده سال اخیر اطلاعات لازم برای مسائلی همچون کاهش تغییرپذیری در واکنش چند تخمک‌گذاری، افزایش درصد لقاح و بهبودی در خصوصیات جنین را فراهم نکرده است. در تبیین با این موضوع، تکنولوژی انتخاب و انتقال جنین بخوبی بررسی شده و طوری پیشرفت کرده که نسبتاً به صورت یک فن درآمده است و می‌تواند تا حدی مشکلات بالا را جبران کند. بهر حال، ممکن است در کسب مهارت در این روش، مرحله دیگری جزء تمرین و تجربه بیشتر لازم نباشد.

روند چند تخمک‌گذاری^(۱)

* کلیات- در اکثر گاوهای دهنده جنین اگر معالجات چند تخمک‌گذاری بین روزهای هشتم تا چهاردهم فحلی برقرار باشد، به‌طور قابل پیش‌بینی و مطلوبی از خود واکنش نشان خواهند داد. برخی محققین بطور ابتکاری معالجات را زودتر و از روز ششم سیکل فحلی با موفقیت آغاز کرده‌اند، اما نباید معالجات را از بعد از روز چهاردهم سیکل فحلی آغاز کرد، زیرا در طول سیکل فحلی تغییر ایجاد خواهد کرد.

* معالجات- به‌طور رایج، یک تزریق تک‌دوز ۱۵۰۰ تا ۳۰۰۰ واحد بین‌المللی از PMSG^(۲) را در گاوهای چند تخمک‌گذار بکار می‌برند. به‌هر حال تخمک‌گذاری بیشتر، جنین‌های حاصله و حاملگی‌هایی بعد از یک رژیم چند تخمک‌گذاری با هورمونهای FSH و LH که با یک نسبت ۵ به ۱ دو بار در روز و با دوزهای کاهش یا بنده به مدت ۵ روز تجویز شده‌اند گزارش شده است. محققین اخیراً یک پاسخ و واکنش بهتر را نشان داده‌اند وقتی که LH به دوز کاهش‌یافته FSH اضافه نشده بود. هرچند، به نظر می‌رسد که بعضی از

گاوها برای یک یا چند تخمک‌گذاری موفقیت‌آمیز به ۲۰٪ LH نیاز دارند. از این گذشته، ممکن است گاوهایی وجود داشته باشند که فقط با PMSG چند تخمک‌گذار باشند. معالجه دیگری که عموماً بخاطر سادگی آن برای کار در فارم استفاده می‌شود، تجویز FSH ۵ mg به مدت ۵ روز و روزی دو بار است. این عمل نباید با یک دوز بیشتر صورت بگیرد زیرا این کار می‌تواند کاهش کیفیت جنین را نتیجه دهد. FSH و PMSG ممکن است که به صورت زیرجلدی و یا به صورت داخل عضلانی تزریق شوند. سه روش چند تخمک‌گذاری در تابلو ۱ خلاصه شده‌اند.

همزمان سازی^(۳)

به‌طور طبیعی یک دوز لوتهولیتیک 2x PGF در ۴۸ تا ۷۲ ساعت بعد از آغاز درمان بکار می‌رود. انتظار می‌رود که فحلی حوالی ۴۸ ساعت بعد از استعمال 2x PGF رخ دهد. گاوهایی که یک یا چند روز دیرتر فحل می‌شوند معمولاً نتایج ضعیفی را سبب می‌شوند.

بعضی اوقات، فحلی ۲۴-۱۲ ساعت زودتر رخ خواهد داد. چنین گاوهایی معمولاً یک چند تخمک‌گذار خوب هستند که توانایی تولید جنین با خصوصیات مطلوب را دارا می‌باشند. اولین فحلی که آشکار شد، معالجات متوقف شده و تلقیح آغاز می‌گردد.

اگر در یک گاو دهنده جنین به مشکلاتی در تخمک‌گذاری شک برده شد (برپایه تجارب قبلی) تزریق ۲۵۰۰ واحد بین‌المللی از HCG^(۴) و یا ۲۰۰ میکروگرم از GnRH^(۵) شاید سبب فحلی شود. گاوهای دهنده به‌طور نامحدود همیشه می‌توانند ۶۰-۵۰ روز زودتر چند تخمک‌گذاری کنند.

به‌هر حال این موضوع مهم است که گاو دهنده هر چند وقت یک‌بار گوساله‌ای بدنیا آورد. این عمل به منظور دوباره جوان‌سازی و تحریک سیستم تناسلی و آب شدن چربی‌های پشت حیوان بر اثر شیردادن به گوساله صورت می‌گیرد و برای گاو دهنده بسیار مفید و مناسب خواهد بود.

تزریق دوز لوتهولیتیک 2x PGF به گاوهای گیرنده جنین معمولاً ۱۸-۱۲ ساعت زودتر از گاوهای دهنده



برگرداندن جنین به گاوهای گیرنده با استفاده از سوزن مخصوص.



ایستای تنه‌دلیل اجتناب ناپذیر برای توان بارورسازی اسپرم است.

جنین صورت می‌گیرد. گاوهای گیرنده کمی قبل و یا درست همزمان با گاوهای دهنده فعل خواهند شد. خصوصیات یک گاو گیرنده یکی از مهمترین فاکتورهای دخیل در انتقالهای موفقیت‌آمیز است.

چند تخمک‌گذاری در گاوهای دهنده و همزمان‌سازی فعلی گاوهای گیرنده با فعلی گاوهای دهنده احتیاج به یک برنامه دقیق باتوجه به جزئیات دارد. گاوهای دهنده باید همیشه قبل از معالجه برای تعیین اینکه هیچ ناهنجاری ندارند و جسم زرد در آنها به‌طور سالمی عمل می‌کند آزمایش شوند. هم دامدار و هم دامپزشک باید یک آموزش کامل در این زمینه داشته باشند. از این گذشته دامپزشک هر ناحیه باید وظیفه بسیار مهمی را در انتخاب، سلامت و تغذیه و همزمان‌سازی فعلی گیرنده‌ها با گاوهای دهنده انجام دهد.

ارتباطات خوب پایه چنین چیزهای ساده‌ای هستند، آن افرادی که پیش از زمانی که انتظار فعلی می‌رود، به فعلی گاوهای گیرنده یا دهنده می‌پردازند به کار خود مسلط نیستند.

* پرورش / تلقیح: نشان داده شده است که تخمک‌گذاری در گاوهای چند تخمک‌گذار تقریباً بعد از ۲۴ ساعت گسترش می‌یابد، اما همیشه اولین فعلی با اولین تخمک‌گذاری همزمان نیست. از این رو گاوهای چند تخمک‌گذار سه یا چهار دفعه و به فاصله هر ۱۲ ساعت و بعد از ۸-۱۲ ساعت از آغاز اولین فعلی تلقیح می‌شوند. بعضی از دامداران در هر بار تلقیح دو دوز از منی را بکار می‌برند. منی تازه و یا تلقیح طبیعی درصدهای خوب لقاح را سبب می‌شوند. بوسیله تلقیح برنامه‌ریزی شده و باروری ذاتی گاو نمی‌توان یکسری از مهمترین فاکتورهای محدود کننده تعداد تخمکهای لقاح یافته را مشخص کرد. اگر میسر است، منی قبل از استفاده از طریق توجه دقیق به ریخت‌شناسی کروموزومها و درصد اکروموزومهای سالم ارزشیابی شود. نهایتاً باید به پاکیزگی و بهداشت مداوم و تکنیکهای خوب تلقیح بسیار توجه و اهمیت داده شود.

جمع‌آوری جنین (۶)

تا سال ۱۹۷۵ بیشترین تخمکها را بوسیله روشهای جراحی بدست می‌آوردند. هرچند اغلب این تکنیکها چسبندگی مجرای تناسلی را نتیجه می‌داد که کم‌کردن

رکتوم از مدفوع و هوا خالی می‌شود. اندازه جسم زرد در این زمان و یا در آغاز جمع‌آوری جنین تخمین زده می‌شود. تا به یک بیحسی ایبی دوران رضایت‌بخش دست نیافته‌ایم مبادرت به جمع‌آوری جنین نمی‌کنیم. سپس ناحیه پیرینه و لبهای فرج کاملاً شستشو داده شده و دم را از روی مجرا کنار می‌زنیم و در یک طرف گره می‌زنیم. اجتناب از وارد شدن هوا به رکتوم امر مهمی است. در مواردی که با اشکال برخورد کردیم از یک لوله معده و پمپ، جهت خروج هوا می‌توانیم استفاده کنیم.

سوندها:

سه نوع اصلی از سوندهایی که در جمع‌آوری جنین به روش غیرجراحی بکار می‌روند وجود دارد. گزارشات انتشار یافته بکار بردن ۲-۳ روش را برای سوندهای فولی (۹) شرح می‌دهند. بسیاری از گروههای انتقال جنین سوند فولی را بدلیل ارزانی و در دسترس بودن آن به‌کار می‌برند. هرچند، بدلیل آنکه جنس سوند از لاستیک نرم است مشکل بداخل رحم کشیده می‌شود. بعلاوه سوند فولی بدلیل کم بودن فاصله بین ابتدا و انتهای آن نسبتاً برای گاوهای بزرگ کوتاه است. در عوض سوند روش (۱۰) بوسیله خیلی‌ها ترجیح داده شده است. این سوند دارای ۶۷ cm طول و ۱۸ درجه قطر بیرونی و ستهای لواز- لک (۱۱) می‌باشد. نوك سوند در جلوی حلقه آن ۵/۵ cm طول و ۴ سوراخ دارد. سوند بوسیله یک استایلت (۱۲) از جنس استیل برای عبور از گردن رحم سفت می‌شود. این سوند به اندازه کافی برای گاوهای بزرگ طویل بوده و آنقدر سفت هست که بتواند براحتی بداخل فضای رحم راه یابد.

قابلیت باروری گاوهای دهنده با ارزش را سبب می‌شد. بعلاوه بهبودی پس از جراحی نیز به سختی صورت می‌گیرد. با توجه به این موضوع تکنیکهای غیرجراحی ترجیح داده می‌شوند. زیرا که آنها به مجرای تناسلی آسیبی نمی‌زنند، قابل تکرارند و در فارم قابل اجراء می‌باشند. البته تکنیکهای غیرجراحی فقط وقتی می‌توانند اجراء شوند که جنین بداخل رحم آمده و نیز در گاوهایی قابل اجراء اند که گردن رحم آنها در طول مرحله دی استروس فعلی قابل نفوذ باشد.

روشهای غیرجراحی:

به‌طور طبیعی جنینها ۸-۶ روز بعد از اولین فعلی جمع‌آوری میشوند. پیش از این زمان جنینها شاید هنوز در اوویدوکت باشند، و بعد از این زمان تخمک شروع به رسیدن از زوناپلاسیدا می‌کند که در این صورت یافتنش بشدت مشکل می‌شود. گاوهای شیرین پیر بخصوص در ناحیه پیرینه عضلات سفتی ندارند و باید مواظب بود تا هنگامیکه بیحسی ایبی دوران صورت می‌گیرد هوا بداخل رحم و رکتوم کشیده نشود. این موضوع هنگامیکه شکمبه پر باشد رخ نخواهد داد. بلند کردن پاهای جلو و یا آماده کردن یک باند شکم (۷) برای بلند کردن ساختمانهای شکمی در یک سطح همتراز لگن و تولید یک فشار مثبت به فشار منفی بوجود آمده در شکم نیز از ورود هوا بداخل رحم و رکتوم جلوگیری می‌کند.

آماده‌سازی (۸)

گاوهای دهنده در داخل یک تراوایل قرار گرفته و

نیوکامب^(۱۳) يك سوند جمع آوری جنین پیشرفته ارائه داد که ۱۱۵ cm طول دارد و دارای يك بخش المحاقی ۴۲/۵ cm مابین حلقه سوند تا مجرای خروج مایع است. مایع از طریق مجرای ورودی انتهای سوند بداخل رحم رفته و از طریق يك مجرای خروجی بلافاصله قبل از اینکه حلقه متورم شود خارج می شود. در آزمایش سوند نیوکامب با تلیسه ها، این سوند توانست نسبت به سوندهای مرسوم دیگر جنینهای بیشتری را جمع آوری کند.

تکنیکهای جمع آوری جنین:

دو روش برای جمع آوری جنین وجود دارد، یکی روش «جریان مداوم یا سیستم گردشی بسته»^(۱۴) و دیگری روش «سرنگ منقطع»^(۱۵). هر ترکیبی که از این روشها توصیف شده باشد نیز ممکن است. هر سیستم مزیتها و نقاط ضعفی نسبت به سیستمهای دیگر دارد، این بسته به شخص عامل است که کدام روش را با توجه به نتایج موفقتری که برایش دارد برگزیند. در سیستم گردشی بسته، نگهداری شرایط استریل آسانتر بوده و امکان کمتری در تلف شدن محیط کشت و در

کننده پوشیده شده و از میان گردن رحم و واژن عبور داده می شود. اگر التهاب مهبل وجود دارد برای جلوگیری از آلودگی رحم بهتر است که از روش سوند دوپل استفاده کرد. بعلاوه قبل از هر کوششی باید از عدم آلودگی باکتریایی سوند اطمینان حاصل کرد. سوند می تواند با اتیلن اکسید و یا با هر محلول استریل کننده سرد^(۱۶) استریل شود. پیش از استریل شدن سوندها با اتیلن اکسید باید کاملاً از خشک بودن آنها مطمئن شد و اجازه داد تا برای ۱ هفته بعد از استریل کردن در مجاورت هوا قرار نگیرند، زیرا اتیلن اکسید می تواند جنینها را بکشد، به طور مشابه مهمترین محلولهای استریل کننده سرد نیز جنین کش بوده و باید از روی سوندها با محلول سالیین شسته شوند.

بندرت بیش از چند دقیقه وقت لازم است تا سوند بداخل گردن رحم فرو شود. گهگاه استفاده از يك گشاد کننده گردن رحم^(۱۷) برای گشاد کردن کانال گردن رحم قبل از عبور سوند لازم می شود. سوند بداخل شاخ راست رحم هدایت شده و استایلت بتدریج از رویش برداشته می شود. سوند یا قرار گرفتن حلقه متورمش در محل تقریبی نیمه راه بین بدنه و رأس رحم، جایگزین و مستقر می شود. حلقه در ابتدا با ۵ میلی لیتر سالیین

داخل ظروف پتری^(۱۹) يك بار مصرف استریل قرار داده شده و با میکروسکوپ بوسیله يك دستیار، موقعیت جنینها مشخص شود. جنینها معمولاً در یکی از اولین چهار تزریق که از هر شاخ رحم کشیده می شود یافت می شوند (حدود ۸۵٪ جنینها) در گاوهای دهنده جنین چند تخمک گذار، هر شاخ رحم با هشت تزریق منفرد برانگیخته می شود که آنها را در يك سیلندر مدرج ۵۰۰ میلی لیتری قرار داده اند.

تکنیک جمع آوری جنین یکی از مشکلترین مراحل تسلط یافتن بر کار انتقال جنین است. فرد باید با ملایمت عمل کند و در عین حال اطمینان یابد که کشتها مخلوط شده و به تمام فضای آندومتر رسیده اند. دو تزریق و یا بیشتر، اغلب در شاخ رحم با یکدیگر قبل از تحریک و تنفس واقع می شوند. اطمینان از اینکه محیط کشت با فشار و په زور به داخل رحم رانده نشده است مهم است، زیرا آندومتر ممکن است که شکافته شده و در نتیجه خونریزی و از دست رفتن محیط کشت و جنینها را خواهیم داشت.

جلوگیری از پیچ خوردگی شاخ رحم نیز موضوع مهمی است، زیرا باعث تورم بیش از حد يك بخش کوچک از رحم شده و دوباره می تواند ایجاد يك شکاف را در آندومتر سبب شود. وقتی که عمل جمع آوری در شاخ راست رحم کامل شد، استایلت بدون بیرون آوردن سوند از داخل رحم بروی آن استقرار می یابد. سپس سوند همراه با استایلت داخل شاخ چپ رحم می شود و حلقه سوند همانطوریکه قبلاً شرح داده شده بود قرار می گیرد. وقتی که تزریق محیط کشت به هر دو شاخ رحم کامل شد، هر شاخ رحم با ۳۰-۴۰ میلی لیتر محلول ضدباکتری یا آنتی بیوتیک و بوسیله يك سرنگ و يك سوند تزریق داخل رحمی انفرزه می شود. PGF 2α ممکن است در این زمان و یا يك هفته دیرتر سبب لیزه کردن جسم زرد شود. هرچند بازگشت فحلی را تا ۲-۱ هفته نمی توان انتظار داشت. درک اولین فحلی به خوبی فحلی های بعد نیست.

تکنیک جریان مداوم یا سیستم گردشی بسته:

جمع آوری جنین با روش يك سوند فولی سه راهه و يك جریان مداوم، یا سیستم گردشی بوسیله «السدن»^(۲۰) شرح داده شده است. يك سوند فولی سه راهه درجه ۲۴-۱۸ استریل با يك میله سخت استیل درونش با ملایمت بداخل واژن و سرویکس فرو می شود. سپس بداخل شاخ انتخاب شده رحم که حلقه متورم شونده رحم در شکافگاه آشکار رحم قرار داده شده وارد می شود. بعضی از افراد حلقه را درست در آنسوی دهانه داخلی گردن رحم قرار می دهند، هرچند اینکار تزریق محیط کشت فلاشینگ را به هر شاخ به طور جداگانه مشکل می کند. حلقه ممکن است با ۱۵ میلی لیتر هوا یا مایع متورم شود که در صورت نیاز و برای محکم نگاه داشتن آن در جایش هوا یا مایع بیشتری اضافه می شود. تقریباً ۸۰۰-۵۰۰ میلی لیتر از محیط کشت گرم شده تا دمای ۳۷°C که

تابلو ۱- معالجات چند تخمک گذاری در گاو

روز	زمان	معالجه ۱	معالجه ۲	معالجه ۳
۱۰	صبح	۲۵۰۰ واحد بین المللی PMSG	۵ میلی گرم	۵ میلی گرم
۱۱	بعد از ظهر		۵ میلی گرم	۵ میلی گرم
	صبح	گاوهای گیرنده جنین PGF2α دریافت دارند	۴ میلی گرم	۵ میلی گرم
	بعد از ظهر		۴ میلی گرم	۵ میلی گرم
۱۲	صبح	گاوهای دهنده جنین PGF2α دریافت دارند	۳ میلی گرم	۵ میلی گرم
	بعد از ظهر		۳ میلی گرم	۵ میلی گرم
۱۳	صبح		۲ میلی گرم	۵ میلی گرم
	بعد از ظهر		۲ میلی گرم	۵ میلی گرم
۱۴	صبح	تلقیح مصنوعی	تلقیح مصنوعی	تلقیح مصنوعی
	بعد از ظهر	تلقیح مصنوعی	تلقیح مصنوعی	تلقیح مصنوعی
۱۵	صبح	تلقیح مصنوعی	تلقیح مصنوعی	تلقیح مصنوعی
	بعد از ظهر	تلقیح مصنوعی	تلقیح مصنوعی	تلقیح مصنوعی

استریل متورم شده و سپس با اضافه کردن سالیین به مقدار بیشتر به طور کامل مجرای داخل رحم را پر می کند. متورم شدن بیشتر و یا متورم کردن خیلی سریع حلقه ممکن است شکافته شدن آندومتر و در نتیجه خونریزی و اتلاف محیط کشت فلاشینگ^(۱۸) را در میان رباط پهن رحم سبب شود. سپس استایلت به آرامی و به طور کامل برداشته شده و يك بست در روی انتهای خارجی سوند قرار داده می شود. عمل جمع آوری معمولاً با سرنگهای يك بار مصرف صورت می گیرد و در هر تزریق ۲۵-۳۵ میلی لیتر از محیط کشت مورد استفاده قرار می گیرد.

هنگامیکه فردی جنین منحصر بفردی را جمع آوری می کند این عمل مفید است که محیطهای کشت فلاشینگ جمع آوری شده از داخل رحم، جدا جدا و در

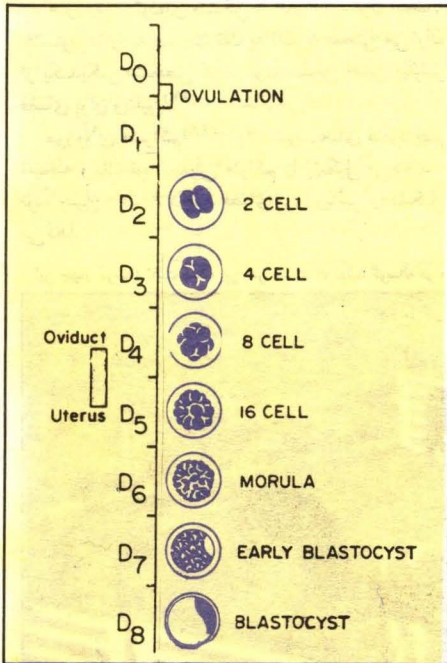
نتیجه جنینها وجود دارد، هر چند سیستم بسته بسیار کند است و لوله گذارهای اضافی يك زمینه مساعدی را برای آلودگیهای ثانویه باکتریایی و شیمیایی ایجاد می کند. روش سرنگ منقطع امکان استفاده از کلیه تجهیزاتی را که در این زمینه عرضه شده است (به استثناء سوندها) به شخص عامل می دهد. در این روش همچنین امکان جستجو برای جنینها در طول مدت جمع آوری وجود دارد.

تکنیک سرنگ منقطع:

يك نظر اجمالی بر عملکرد سوند روش و تکنیک جمع آوری با سرنگ منقطع به شرح زیر است: سوند که استایلت رویش قرار دارد با يك ماده استریل لزوج

۲۰-۱۰ درصد FCS در يك ظرف پتری كوچك (با ابعاد ۳۵×۱۵ میلی متر) ذخیره می شود و در هر نوبت به ظرف پتری بزرگتری انتقال می یابد. بعد از آنکه محل جنینها در محیط مشخص شد آنها را به کمک يك سوند پلاستیکی داخل رگی استریل نموده ۲۰ جمع آوری می کنند که این سوند به يك سرنگ ۱ میلی لیتری متصل است. این جنینها بعد از جمع آوری در يك ظرف كشت دیگر ذخیره می شود. جنینهایی که در این محیط كشت تازه قرار گرفته اند با بزرگ نمایی ۵۰ میکروسکوپ ارزیابی می شوند. جنینها را قبل از عمل انتقال ۳-۴ دفعه شستشو می دهند. سپس ظروف كشت در دمای اتاق قرار داده می شود و یا اینکه بین دو لایه حوله های تری (۲۵) و یا در يك اینکوباتور و یا در يك طبقه گرم در دمای ۳۷-۳۵°C قرار داده می شوند. اندکی پیش از عمل انتقال، ممکن است که جنینها دوباره در يك محیط كشت تازه قرار داده شوند.

نقش دما و استریل بودن: به نظر نمی رسد که دما مشکل خاصی ایجاد کند. دمای اتاق در این مورد رضایتبخش است و خنک کننده ها آماده اند و از دوران باد جلوگیری می شود. استریل بودن به طور مستمر و یکسان ممکن است اما همه کوشش انجام خواهد شد تا پاکیزگی میسر شود. ضد عفونی کردن با مواد شیمیایی جنینها را مانند ذرات باکتریایی از بین می برد. اگرچه جنینها ممکن است که در محیط PBS بیش از يك روز نیز كشت شوند، اما محیط كشت هر چند وقت یکبار عوض خواهد شد تا آلودگی و تبخیر بوقوع نپیوندد.



تصویر ۱- تخمک گذاری و رشد و توسعه جنین در گاو چند تخمک گذار. تخمک گذاری ۲۴-۲۸ ساعت بعد از اولین فعلی رخ می دهد. جنینها بین روزهای ۴ و ۵ داخل رحم می شوند. در روزهای ششم تا هشتم اگر جمع آوری جنین به روش غیرجراحی انجام گیرد، جنینی که در دسترس خواهد بود بین مرحله مورولای اولیه تا بلاستوسیت منبسط یا توسعه یافته قرار دارد.

ضروری است که محیط كشت تكان داده نشود. زیرا لرزشهای حاصل از تكان ممكن است هنگامیکه جنین در حال عبور است توسعه یابد. ناچاراً، شخص ممکن است بسادگی بعد از اینکه محیط كشت ساکن شد ۳۵ میلی لیتر محیط كشت را از ته سیلندر بکشد. این عمل ۱۵-۱۰ دقیقه بعدتر نیز قابل تکرار است.

هم چنین استفاده از يك فیلتر پلانکتونی ۵۰ میکرومتری می تواند نتایج خوبی داشته باشد. محیط كشت از این فیلتر عبور داده می شود و سپس برای جستجوی جنین بداخل يك ظرف پتری ریخته می شود. هیچ شکی وجود ندارد که جستجو برای شناختن و ارزیابی کردن جنینها یکی از مشکلترین کارهایی است که يك کارآموز تکنیکهای انتقال جنین فرا می گیرد. شما می توانید عمل جستجو را با میکروسکوپ سه بعدی انجام داده و از این طریق به عمل خویش اطمینان ببخشید.

دریچه سوراخ داری در ته میکروسکوپ قرار داده شده، و ظروف پتری با بزرگنمایی ۱۰ جستجو می شوند. هنگامیکه عمل جستجو یکبار انجام شد، ظروف چرخانده می شود تا بدین طریق جنین از یکسوی پریمتر حرکت کرده و عمل جستجو دوباره انجام گیرد. هر ظرف بعد از آخرین جنینی که یافت شد لااقل دو بار دیگر با حرکت چرخشی که در بالا شرح داده شد جستجو خواهد شد.

محیط كشت: محیط كشت فلاشینگ قبل از آماده سازی گاو تهیه می شود. در این مورد معمولاً از محلول PBS که در بطریهای ۵۰۰ میلی لیتری آماده مصرف، سرد و نگهداری می شود استفاده می کنند. بعلاوه مقادیر ۱۰ ml سرم جنین گوساله (FCS) که با حرارت غیرفعال شده و ۵ میلی لیتر محلول ضدقارچ- ضد باکتری که به صورت یخزده نگهداری می شود به صورت يك تك دوز در دسترس است که در هر ۵۰۰ میلی لیتر محلول PBS بکار برده می شود. سپس به محیط كشت ۱۰۰ واحد بین المللی پنی سیلین، ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین و ۲۵ میکروگرم آمفوتریسین B اضافه می شود. گلوکز و پیروات نیز از موادی هستند که می توان به محیط اضافه کرد که در این صورت محیط كشت حاوی ۱ میلی گرم در هر میلی لیتر گلوکز و ۰/۳۳ میلی مول پیروات سدیم خواهد شد.

۸ میلی لیتر از FCS به محیط كشت فلاشینگ برای تولید يك محلول ۲٪ اضافه می شود (محیط جمع آوری) و در صورتیکه ۸ میلی لیتر محیط كشت فلاشینگ به ۲ میلی لیتر FCS برای تولید ۱۰ میلی لیتر محیط كشت اضافه شود يك محلول ۲۰٪ FCS حاصل خواهد شد که برای محیط كشت قبل از عمل انتقال مناسب است.

قبل از استفاده از محیط كشت باید آنرا از يك فیلتر پلانکتونی با سوراخهای ریز ۲۲/۰ میکرومتری عبور داد. به نظر می رسد که وجود گلوکز و پیروات در محیط تنها در كشت جنین در زمانهای طولانی مورد احتیاج اند. بنابراین به هنگام کار در فارم، محیط كشتی که برای عمل جمع آوری بکار می رود لازم است فقط حاوی PBS، آنتی بیوتیکها و ۲٪ FCS و محیط كشتی که قبل از عمل انتقال بکار می رود حاوی ۲۰-۱۰ درصد FCS باشد. محیط كشت حاوی

در يك فلاسك ارلن مهیر (۲۱) قرار دارد به همراه يك متر از تیوب تایگون (۲۲) با قطر داخلی ۸-۶ میلی متر برای انفوزیون مناسب اند. فلاسك بوسیله تیوب به لوله جریان رو بداخل سوند فولی بوسیله يك اتصال دهنده شیشه ای وصل شده است. قسمت دیگر لوله تایگون با ۱ متر طول به لوله جریان رو به خارج سوند بوسیله يك اتصال دهنده شیشه ای متصل شده و ته آزاد دیگر آن به سر يك سیلندر مدرج ۱۰۰۰ میلی لیتری وصل است. اگر از سوند فولی ۲ راه استفاده می شود باید از يك لوله شیشه ای «T» شكل که به لوله های جریان رو بداخل و رو به خارج و مجرای داخلی سوند فولی متصل است استفاده کرد.

ابتدا ۲۰-۳۰ میلی لیتر از محیط كشت به داخل رحم جریان یافته و از آن خارج می شود تا از اینکه هیچ انسدادی در سیستم وجود نداشته و از هرگونه موكوس یا لخته خون پاك است اطمینان حاصل شود. سپس لوله جریان رو به خارج بوسیله يك گیره بسته شده و شاخ رحم با محیط كشت وارده از لوله جریان رو بداخل پر می شود. در این حالت معمولاً شاخ رحم در يك تلیسه به اندازه يك آبستنی ۳۵ روزه و در يك گاو به اندازه يك آبستنی ۴۵ روزه متورم می شود رحم به آرامی ماساژ داده می شود تا مایع، تخمکها را تحریک به بیرون آمدن از چین های اندومتر بکند. حال گیره لوله جریان رو به خارج آزاد شده و لوله جریان رو به داخل با گیره بسته شده به مایع اجازة داده می شود تا از رحم به درون سیلندر راه یابد.

یکبار دیگر میزان مایع به انتها رسیده و محیط كشت باقیمانده درون رحم به خارج مکیده می شود. این فرآیند تکرار می شود تا تقریباً ۸۰۰ میلی لیتر از محیط كشت از مجرای داخلی رحم عبور کند.

جریان سنگین و آرام مایع باعث می شود تا بافتهای رحم بدون اینکه صدمه ای به آنها وارد شود تا بیشترین میزان گنجایششان منبسط شوند. رحم گاوهایی که چند بار زائیده اند بتدریج با هر تزریق بزرگتر می شود و بدین ترتیب با باز شدن چین های اندومتر تخمکهای بدام افتاده در آنها آزاد می شوند. آندومتر رحم کاملاً منبسط شده است و قبل از اینکه سوند فولی از آن شاخ رحم خارج و بداخل شاخ دیگر برده شود سه مرتبه شستشو می شود.

آزمایش نشان می دهد که چقدر مهارت چقدر محیط كشت برای عمل جمع آوری لازم است.

جستجو برای جنینها:

صرف نظر از روش جمع آوری، محیط كشت اجازة می یابد تا برای حداقل ۳۵ دقیقه در يك سیلندر مستقیم- یکسو (۲۳) ساکن شود. يك سیفون لوله ای استریل سیالستیک (۲۴) ممکن است که همه مایع كشت بجز ۵۰ میلی لیترته سیلندر را برداشت کند. سپس محیط كشت باقیمانده چرخیده شده و بایک پیپت تزریق داخل رحمی بداخل يك سرنگ کشیده شده و در ظروف پتری استریل يك بار مصرف (با ابعاد ۱۵×۱۰۰ میلی متر) جهت جستجو قرار داده می شوند. بعضی اوقات يك جنین از سیفون عبور می کند. این مطلب

ارزیابی جنینهای گاو معمولاً در حالیکه جنین در یک محیط کشت کوچک قرار دارد با بزرگنمایی ۵۰-۱۰۰ میکروسکوپ انجام می گیرد. توانایی تشخیص مراحل گوناگون پیشرفت و رشد جنین در ارزیابی جنین امری مهم محسوب می شود (تصویر ۱). جنینهایی که دارای کیفیت مشکوکی هستند می توانند برای چند ساعت در محیط کشت قرار داده شوند. شایستگی جنین در انتخاب آن برای عمل انتقال، بر پایه منظره میکروسکوپی و قابلیت استفاده آن برای گیرنده مشخص می شود. مثلاً جنینهای خوب و ممتاز می توانند درصدهای آبدستی بالا را نتیجه بدهند، اما کیفیت متوسط ضعیف جنینها نیز می تواند در آبدستی اثر بگذارد و احتمال آن را کاهش دهد.

طبقه بندی:

قطر سرتاسری جنین گاو در حدود ۱۹۰-۱۵۰ میکرومتر است که شامل زوناپلاسیدا به ضخامت تقریبی ۱۲-۱۵ میکرومتری شود. باید اذعان داشت که قطر سرتاسری جنین از مرحله تک سلولی تا مرحله بلاستوسیستی واقعاً بدون تغییر می ماند. در جنینهایی که از مرحله ۱۶ سلولی بیشتر گسترش می یابند دیگر باید مقیاس مورفولوژیک بکار برد. کلا دوره های مختلف رشد و گسترش جنینها و کیفیت یا سلامت آنها در ذیل می آید:

مراحل:

مورولا: توده ای متشکل از اقل ۱۶ سلول است. بلاستومرها را به صورت تک به تک به سختی می توان از یکدیگر مشخص کرد. توده سلولی جنین بیشتر فضای پری ویتلین (۲۷) را اشغال می کند. مورولای متراکم (۲۸): بلاستومرهای منفرد بهم آمیخته و یک توده سلولی متراکم را تشکیل می دهند. توده جنین ۷۰-۶۰ درصد فضای پری ویتلین را تشکیل می دهد.

این چهار گوساله ثابت کننده این امر هستند که تولید گوساله در داخل لوله آزمایشگاهی امکان پذیر است.

بلاستوسیست اولیه: یک جنین که دارای یک حفره پر از مایع بنام بلاستوسول (۲۹) است و شکل عمومی یک حلقه انگشتری را داراست. توده جنین ۸۰-۷۰ درصد فضای پری ویتلین را اشغال می کند. بزودی در این مرحله جنین خصوصیات مشکوکی را از خود ظاهر می سازد.

بلاستوسیست: تمایز میان لایه تروفوبلاست خارجی و لایه تارک کننده و خیلی متراکم توده سلولی داخلی آشکار است. بلاستوسول بسیار واضح بوده و جنین بیشتر فضای پری ویتلین را اشغال کرده است. تمایز بصری مابین لایه تروفوبلاست خارجی و توده سلولی داخلی در مرحله بعد کامل می شود. بلاستوسیست منبسط یا توسعه یافته (۳۰): در این مرحله قطر سرتاسری جنین ظاهراً افزایش یافته است، به طور همزمان زوناپلاسیدا به یک سوم قطر اصلی اش رسیده است.

بلاستوسیست بالغ: جنینهای بدست آمده در این مرحله می توانند دستخوش روند بلوغ شوند و یا ممکن است زوناپلاسیدا را به طور کامل از دست بدهند. بلاستوسیستهای بالغ ممکن است با یک بلاستوسول احاطه شده و یا روی هم بیفتند شناسائی جنینها در این مرحله برای شخص بی تجربه بسیار مشکل است. درجه بندی:

ممتاز: یک جنین ایده آل، کروی متناسب، دارای سلولهای یک اندازه و یک رنگ، به مانند آنکه سلولهایش را بهم بافته اند.

خوب: جنینی با عیوب کوچک، مانند تعدادی از بلاستومرهای بیرون افتاده و یا دارای شکلی نامنظم و دارای چند وزیکول است.

متوسط: جنینی با عیوب آشکاری مانند افزایش تعداد بلاستومرهای بیرون افتاده، وزیکولاسیون شدیدتر و وجود چند سلول دژنره شده.

نامرغوب: جنینی با عیوب آشکار و شدیدتری مانند: بلاستومرهای بیرون افتاده بیشمار، سلولهای دژنره شده، سلولهای چند اندازه ای، وزیکولهای بزرگ

بیشمار، اما یک توده جنینی ظاهراً زنده ماندنی. کلاً خصوصیات انتقال پذیری را دارا نیست.

نتایج:

در گاو چند تخمک گذار نسبت قابل توجه احتمالی در مورد تخمکها در طول رشد و گسترش وجود ندارد، یعنی اینکه در همان زمانی که ممکن است جنینهایی با کیفیت ممتاز وجود داشته باشد در عین حال ممکن است که تخمکهای غیر قابل لقاح و جنینهای دژنره شده نیز موجود باشد. علل این اختلافات ناشناخته است، اما آنها ممکن است که بعلت تفاوتهایی در زمان تخمک گذاری و یا در ترشح غدد درون ریز باشد. کلاً، اختلافات زیادی که در کیفیت جنین و مراحل رشد و پیشرفت آن وجود دارد نشانه هایی هستند دال بر اینکه جنینهای زنده مانده کاملاً طبیعی نبوده و یا اینکه نسیتهای آبدستی ممکن است مایوس کننده باشد. جنینهای خوب و ممتازی که در مرحله تبدیل مورولای اولیه به بلاستوسیست قرار دارند بهترین درصدهای آبدستی را نتیجه می دهند. هم چنین به نظر می رسد که جنینهای ضعیف و متوسط بیشترین احتمال زنده ماندن را در بیشترین همزمانی گیرنده ها دارا می باشند. □

پاورقی:

- 1- Superovulation آزاد شدن همزمان چند تخمک در یک گاو
- 2- Pregnant mare's Serum gonadotropin (PMSG) گناد و تروپین سرم مادبان آبدستن
- 3- Synchronini Zation
- 4- Human Chorionic gonadotropin (hcg)
- 5- Gonadotropin-releasing hormone (GnRh)
- 6- Embryo Colection
- 7- Belly Band
- 8- Pre Paration
- 9- Foley Catheter
- 10- Rush Catheter
- 11- Luer-Lok fitting
- 12- Stilette
- 13- New Comb
- 14- The Continuos flow, closed-circuit system
- 15- Interrupted-syringe method
- 16- Cold Sterilizing solution
- 17- Cervical dilator
- 18- Flush- نوع محیط کشت میانجی برای جمع آوری جنین
- 19- Petri dish
- 20- Elsdon
- 21- Erlenmeyer flask
- 22- Tygon tubing
- 23- Straight-Sideel Cylinder
- 24- a siphon of sterile silastic tubing
- 25- Terry Towels
- 26- Evaluation of Embroys
- 27- Perivitelline Space
- 28- Compact Morula
- 29- Blasto محوطه بند بندی مرکزی پر از مایع بلاستولا
- 30- Expanded Blasto Cyst

منبع مورد استفاده:

Current Therapy in Theriogenology (MORROW.D.A)

