دانشکده دامپزشکی

پایان‌نامه دکتری حرفه‌ای رشته‌ی دامپزشکی

قابلیت تکاملی رویان‌های گوسفندی حاصل از تخمک‌های منجمد در هم‌کشتی با رویان‌های حاصل از تخمک‌های غیر منجمد

استاد راهنما:
دکتر ابولفضل شیرازی

استاد مشاور:
ناصر شمس اسفندآبادی

پژوهشگر:
محبوبه حیدری نصیرآبادی

شهریور ۱۳۹۱

دانشکده دامپزشکی

گروه علوم درمانگاهی

پایان‌نامه **خانم محبوبه حیدری نصیرآبادی** جهت اخذ درجه دکتری رشته دامپزشکی با عنوان: **قابلیت تکاملی رویان‌های گوسفندی حاصل از تخمک‌های منجمد در هم‌کشتی با رویان‌های حاصل از تخمک‌های غیر منجمد** در تاریخ ۱۳۹۱/۶/۲۶ با حضور هیأت داوران زیر بررسی و با رتبه / نمره ..... مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

۱. استاد راهنمای پایان‌نامه دکتر ابولفضل شیرازی با مرتبه علمی دانشیار	**امضاء**
۲. استاد مشاور پایان‌نامه دکتر ناصر شمس اسفندآبادی با مرتبه علمی دانشیار	**امضاء**
۳. استاد داور داخلی گروه دکتر محمد شادخواست با مرتبه علمی استادیار	**امضاء**
۴. استاد داور خارجی گروه دکتر خداداد پیرعلی خیرآبادی با مرتبه علمی دانشیار	**امضاء**

مسئولیت کلیه عقاید و نظراتی که در این پایان‌نامه آورده شده است به عهده نگارنده بوده و دانشکده دامپزشکی هیچ مسئولیتی را در این زمینه تقبل نمی‌نماید.

دکتر سعید حبیبیان دهکردی
معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی
دانشکده دامپزشکی

دکتر حسین نورانی
رئیس دانشکده دامپزشکی

کلیه حقوق مادی حاصله از نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

حمد و ثنای خداوند سبحان که تمامی تلاشها، بدون عنایت و مساعدتش بی حاصل است.

با سپاس و تشکر فراوان از خانواده عزیز و دوست داشتنی ام، که در لحظه لحظه زندگی ام همراه و حامی من بوده اند و بی شک بدون حمایت های ایشان رسیدن به این مرحله برایم غیر ممکن بود.

با تشکر فراوان از زحمات بی دریغ استاد عزیزم جناب آقای دکتر شیرازی که تا همیشه عمر مدیون مهربانی هایشان هستم و منش ایشان تا همیشه راه و رسم زندگی ام خواهد بود.

بر خود واجب می دانم از همکاری و مساعدت صمیمانه استاد گرانقدر و بزرگوارم آقای دکتر حسن پور در انجام مراحل علمی پایان نامه اینجانب سپاسگزاری نمایم و از آقای دکتر شمس که در مراحل تهیه و تدوین این پایان نامه اینجانب را یاری و مساعدت نموده اند، تشکر نمایم.

تشکر ویژه و صمیمانه از تیم جنین شناسی پژوهشگاه ابن سینا بدلیل در اختیار گذاردن رویان های منجمد و تازه در گروه های آزمایشی مختلف جهت ارزیابی مولکولی که بی تردید بدون همکاری ایشان انجام مطالعه حاضر میسر نمی گردید.

از آقای دکتر پیرعلی و آقای دکتر شاد خواست که زحمت داوری این پایان نامه را به عهده داشتند، کمال تشکر را دارم.

با تشکر فراوان از آقای دکتر جیبیان، آقای دکتر میرشکرایی و تمامی اساتید گرانقدر دانشکده دامپزشکی که شش سال از دانشنشان بهره مند شدم.

با تشکر آقای دکتر احمدی، آقای دکتر نظری و آقای دکتر کدیور که با خوشرویی تمام مرا در انجام کارهای علمی این پایان نامه یاری رساندند.

با تشکر از دوستان خوبم الهام، اسما، ساناز، مژده، زهرا، الهه، سونیا، سمانه، سیما، شیوا، عارفه، مریم و همه ی دوستان دوران تحصیلم که خاطراتشان تا همیشه ایام در ذهنم ماندگار است.

حاصل بهترین سال های زندگی ام راتقدیم می کنم به:

پدرم

هم اوکه کوشید تابیارامم ورنج کشید تابیاسایم، وجودش افتخار وتداوم سایه اش آرزویم،

مادرم

که زندگی رادر ژرفای فداکاری هایش معناکردم و استقامت را از چهره ی صبورش آموختم،

خواهران و برادران عزیزم

که تاهمیشه جهان، هستی مدیون بودنشان، هستم.

و برادرزاده های عزیزم غزاله و محمد

چکیده:

با توجه به قابلیت تکاملی ضعیف رویان های حاصل از تخمک های منجمد شده، در مطالعه ی حاضر قابلیت تکاملی رویان های حاصل از تخمک های منجمد شده در همکشتی با رویان های حاصل از تخمک های غیر منجمد مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور رویان های حاصل از تخمک های منجمد شده در مجاورت رویان های حاصل از تخمک های غیر منجمد (۲ رویان حاصل از تخمک های منجمد شده و ۲ رویان حاصل از تخمک های غیر منجمد) در گوده های ایجاد شده در قطره، کشت داده شدند. در دو گروه دیگر نیز رویان های حاصل از تخمک های منجمد و رویان های حاصل از تخمک های غیرمنجمد به صورت جداگانه کشت داده شدند. طبق نتایج حاصله میزان تسهیم (Cleavage) در گروه تخمک های غیرمنجمد نسبت به گروه تخمک های منجمد به صورت معنی داری بیشتر بوده لیکن تفاوتی با گروه های هم کشتی نداشته است. همچنین میزان تولید بلاستوسیست در رویان های حاصل از تخمک های منجمد صفر و در رویان های حاصل از تخمک غیرمنجمد ۲۷/۹٪ بوده است ($p<0.05$). در شرایط هم کشتی علیرغم عدم تولید بلاستوسیست در رویان های حاصل از تخمک های منجمد لیکن میزان تسهیم بطور غیر معنی دار نسبت به رویان حاصل از تخمک های منجمد شده در گروه غیر هم کشتی افزایش یافته است. و لذا می توان نتیجه گرفت که روش هم کشتی در بهبود شرایط بطور نسبی تاثیر گذار بوده است. همچنین در این مطالعه میزان بیان نسبی ژن های E-Cad و Stat3 در مراحل رویانی ۷-۲ سلولی، ۱۶-۸ سلولی، مورولا و بلاستوسیست در رویان های حاصل از تخمک منجمد و رویان های حاصل از تخمک غیر منجمد با روش Real time PCR ارزیابی شد. بر اساس نتایج به دست آمده میزان بیان نسبی E-Cad در رویان های حاصل از تخمک غیر منجمد بیشتر از میزان بیان در رویان های حاصل از تخمک های منجمد بوده و این افزایش در مرحله بلاستوسیست معنی دار ($p<0.05$) بود. و میزان بیان STAT3 در رویان های حاصل از تخمک های منجمد شده بیشتر بوده که این افزایش در مرحله ی ۸-۲ سلولی و مورولا از نظر آماری معنی دار ($p<0.05$) بوده است. می توان نتیجه گرفت که انجماد سبب کاهش میزان بیان نسبی E-Cad و افزایش میزان بیان نسبی Stat3 با توجه به نقش آن در القای بیان ژن های آنتی آپوپتوز و فعال شدن روند آپوپتوز به دنبال انجماد می شود.

کلید واژه ها: تخمک منجمد، هم کشتی، Real time PCR، بیان ژن، Stat3، E-cad

فهرست مطالب

عنوان	شماره صفحه
فصل اول	۶
فصل دوم	۸
۲-۱- تولید آزمایشگاهی رویان	۸
۲-۱-۱- بلوغ تخمک	۹
۲-۱-۲- ظرفیت پذیری اسپرم	۱۱
۲-۱-۳- لقاح آزمایشگاهی	۱۱
۲-۱-۴- کشت رویان در آزمایشگاه	۱۳
۲-۱- ۵- کشت گروهی رویان ها	۱۳
۲-۱-۵-۱- سیستم کشت well of the well	۱۴
۲-۲- انجماد	۱۴
۲-۲-۱- تاریخچه	۱۴
۲-۲-۱-۱- انجماد رویان	۱۴
۲-۲-۱-۲- انجماد تخمدان	۱۵
۲-۲-۱-۳- انجماد تخمک	۱۶
۲-۲-۲- روش های انجماد	۱۶
۲-۲-۲-۱- انجماد آهسته	۱۶
۲-۲-۲-۲- انجماد شیشه ای	۱۶
۲-۲-۳- اصول انجماد شیشه ای	۱۷
۲-۲-۳-۱- مواد ضد یخ	۱۷
۲-۲-۳-۲- میران سرمادهی	۱۸
۲-۲-۳-۳- ظرف حامل جهت انجماد شیشه ای	۱۸
۲-۲-۴- انجماد شیشه ای تخمک	۱۹
۲-۲-۴-۱- آسیب های ناشی از انجماد	۲۰
۲-۲-۴-۲- کاربرد انجماد تخمک	۲۱
۲-۳- چگونگی بیان ژن در رویان	۲۲
۲-۳-۱- stat3	۲۳
۲-۳-۲- Epithelialcadherin	۲۳
۲-۳-۳- واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)	۲۴
۲-۳-۴- الکتروفوروز	۲۶
۲-۳-۵-Real time PCR	۲۶
۲-۳-۵-۱- منبع نور	۲۶
۲-۳-۵-۲- نرم افزار دستگاه Real time PCR	۲۸

۲-۳-۵-۳ رنگ اینترکاله ۲۸
فصل سوم – مواد و روش کار ۳۰

۳-۱-تولید آزمایشگاهی رویان گوسفند (IVF) ۳۰
۳-۱-۱- جمع آوری تخمدان از کشتارگاه ۳۰
۳-۱-۲- آسپیره کردن فولیکول و استحصال تخمک ها ۳۰
۳-۱-۳- بلوغ آزمایشگاهی تخمک ها (IVM) ۳۱
۳-۱-۴- آماده سازی اسپرم و لقاح داخل آزمایشگاهی (IVF) ۳۲
۳-۱-۴-۱- استفاده از شیب غلظت پرکل ۳۲
۳-۱-۵- آماده سازی تخمک ها به منظور انجام IVF ۳۳
۳-۱-۶- لقاح داخل آزمایشگاهی ۳۴
۳-۱-۷- کشت داخل آزمایشگاهی رویان های حاصل از IVF ۳۴
۳-۱-۸- تازه کردن محیط های کشت رویان ۳۵
۳-۲- انجماد تخمک ۳۵
۳-۲-۱- تهیه محلول های انجمادی ۳۵
۳-۲-۱-۱- محیط پایه ۳۵
۳-۲-۱-۲- محیط های انجماد ۳۶
۳-۲-۱-۳- محیط های ذوب ۳۶
۳-۲-۲- انجماد تخمک در مرحله تکامل MII ۳۶
۳-۲-۳- ذوب تخمک های منجمد شده ۳۶
۳-۲-۴- همکشتی رویان ها ۳۷
۳-۲-۴-۱- هم کشتی رویان ها در محیط کشت ۳۷
۳-۳- اندازه گیری بیان ژن ۳۷
۳-۳-۱- استخراج و خالص سازی Total RNA رویان ۳۷
۳-۳-۲- Real time PCR ۳۸
۳-۳-۲-۱- طراحی و توالی پرایمرها ۳۹
۳-۳-۲-۲- تنظیم و بهینه سازی غلظت پرایمرها ۴۰
۳-۳-۳-۳- پرایمر دایمر ۴۰
۳-۳-۴- آنالیز داده های کمی ۴۱
۳-۳-۴-۱- ارزیابی نسبی داده ها ۴۱
۳-۳-۴-۲- آنالیز کمی نسبی داده ها ۴۱
۳-۳-۴-۳- منحنی تکثیر ۴۲
۳-۳-۵- محاسبات آماری ۴۳

فصل چهارم ۴۴

فصل پنجم- بحث ۵۱

منابع ۵۷

فهرست شکل ها

عنوان شماره صفحه

شکل ۲-۱ پروفایل سیکل حرارتی PCR ۲۵
شکل ۳-۱ باندهای E-Cad، Stat3 و GAPDH در ژل الکتروفورز ۳۹
شکل ۳-۲ مقایسه منحنی پرایمر دایمر و محصولات تکثیر یافته ۴۱
شکل۳-۳ منحنی تکثیر ایده آل ۴۲
شکل ۴-۱ نمودار میزان تسهیم در گروه های آزمایشی مختلف ۴۵
شکل۴-۲ منحنی تفکیک ژن GAPDH ۴۵
شکل ۴-۳ منحنی تفکیک ژن Stat3 ۴۶
شکل ۴-۴ منحنی تفکیک ژن E-Cad ۴۶
شکل ۴-۵ منحنی تکثیر ژن GAPDH ۴۶
شکل ۴-۶ منحنی تکثیر ژن **E-cad** ۴۷
شکل ۴-۷ منحنی تکثیر ژن Stat3 ۴۷
شکل ۴-۸ باندهای E-cad، Stat3، GAODH در ژل الکتروفورز ۴۷
شکل ۴-۹ میزان بیان نسبی ژن E-cad ۴۸
شکل ۴-۱۰ میزان بیان نسبی ژن Stat3 ۴۹
شکل ۴-۱۱ مقایسه بیان ژن در رویان ها در گروه های مختلف ۵۰

فهرست جدول ها

عنوان شماره صفحه

جدول ۳-۱ ترکیبات محیطی HEPES buffered M199 ۳۱
جدول ۳-۲ ترکیبات محیطی Bicarbonate buffered M199 ۳۱
جدول ۳-۳ Medium A ۳۲
جدول ۳-۴ S-TALP ۳۳
جدول ۳-۵ ترکیبات محیطی H-SOF ۳۳
جدول ۳-۷ترکیبات محیطی IVC-SOF ۳۴
جدول ۳-۸ توالی پرایمر طراحی شده ۴۰
جدول ۴-۱ میزان تسهیم و بلاستوسیست در گروههای آزمایشی مختلف ۴۴
جدول ۴-۲میزان بیان نسبی ژن E-cad ۴۸
جدول ۴-۳ میزان بیان نسبی ژن Stat3 ۴۹
جدول ۴-۴ مقایسه میزان بیان ژن در گروههای مختلف ۵۰

فصل اول

مقدمه

انجماد شیشه‌ای یک تکنیک جدید و امیدبخش جهت منجمد کردن تخمک می‌باشد. استفاده از انجماد سلول‌های جنسی و رویان به همراه انتقال رویان جهت حفظ تنوع ژنتیکی در حیوانات آزمایشگاهی، اصلاح نژاد درحیوانات مزرعه و در زنانی که به علت جراحی و یا روش‌های شیمی‌درمانی دچار اختلال در عملکرد غدد جنسی می‌گردند، سودمند می‌باشد.

نظر به این که تخمک، یک سلول منفرد، بزرگ، تخصص یافته و حساس به سرما می‌باشد[۱۷]، انجماد و حفظ تمامیت ساختاری آن (برای کاربرد های آتی و تکامل رویان)، بسیار مشکل بوده[۲۱] و با وجود تلاش‌های قابل توجه صورت گرفته، بقای آزمایشگاهی تخمک‌ها پس از انجماد، همچنان پایین می‌باشد.

با توجه به تولید و ترشح فاکتورهای مختلف رشد توسط رویان‌های حاصل از تخمک‌های غیر منجمد از قبیل Platelet-activating factor (PAF)، Platelet-derived growth factor (PDGF) Epidermal growth factor (EGF) و قابلیت تکاملی بیشتر رویان‌ها در کشت گروهی نسبت به کشت انفرادی [۴،۸،۲۸]، بواسطه تولید فاکتورهای رشد در سطحی وسیعتر[۴،۱۱،۱۲،۲۷،۲۸،۲۹]، و نیز با توجه به موانع و مشکلات مطرح در خصوص قابلیت تکاملی تخمک‌های منجمد-ذوب شده گوسفند و نیز قابلیت تکاملی بهتر رویان‌های حاصل از تخمک‌های غیر منجمد، هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر هم‌کشتی رویان‌های حاصل از تخمک‌های منجمد با رویان‌های حاصل از تخمک‌های غیرمنجمد با فرض تولید و ترشح عوامل آمبریوتروفیک (embryotrophic) از رویان‌های حاصل از تخمک‌های تازه و القای تاثیر مثبت آنها بر رویان‌های حاصل از تخمک‌های منجمد می‌باشد[۱۳۰،۱۲۸،۵۷،۵۲،۴۵]. همچنین در این پژوهش میزان بیان ژن‌های E-Cad و Stat3 در مراحل مختلف رویانی در رویان‌های حاصل از تخمک‌های منجمد و تازه با استفاده از روش Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. پروتئین‌های Stat3 در واقع فاکتورهای پنهان رونویسی می‌باشند که در پاسخ به اتصال برخی پلی‌پپتیدها به گیرنده‌های سطحی سلول فعال می‌شوند. این پلی‌پپتیدها شامل تعدادی از سیتوکین‌ها می‌باشند که حین رشد و توسعه‌ی قبل و بعد از لانه‌گزینی رویان توسط بافت‌های مادری و رویانی ترشح

می‌شوند. به دنبال این اتصال آنزیم‌های Janus Kinas وارد عمل شده و فسفوریلاسیون تیروزین و سرین روی پروتئین‌های Stat3 را کاتالاز می‌نمایند، پس از انجام فسفوریلاسیون پروتئین‌های Stat3 به هسته منتقل شده و سبب فعال شدن فرایند رونویسی می‌گردند[۳۵].

E-cad یکی از اعضای خانواده‌ی Cadhern می‌باشد. تشکیل بلاستوسیست با فشرده شدن و قطبی شدن سلول‌ها در مراحل آغازین تمایز شروع می‌شود[۷]. و با نفوذ مایع از طریق ارتباطات بین سلولی بلاستومرهای خارج سلولی تشکیل می‌شود. در گوسفند فشردگی (compaction) در مرحله ۸ تا ۱۶ سلولی اتفاق می‌افتد. که این مرحله بستگی شدیدی به بیان ژن‌های تنظیم کننده‌ی چسبندگی سلولی cell adhesion از جمله E-cad دارد[۸۳].

فصل دوم

کلیات

۲-۱- تولید آزمایشگاهی رویان

فناوری تولید رویان در شرایط آزمایشگاه به ما اجازه‌ی تولید مقادیر انبوه رویان در مراحل تکاملی گوناگون را می‌دهد و از این رو بسیار مورد اقبال 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 رویان، درمان بیماری‌ها با استفاده از سلول‌های بنیادی، مقاصد دارویی، تحقیقات در تمامی جنبه‌های شبیه سازی (Cloning)، پیشرفت فناوری تزریق ژن، مطالعه‌ی مراحل مختلف رویانی و کاربردهای تجاری همانند تسهیل دوقلوزایی در گله‌های گوشتی، سرعت بخشیدن به برنامه‌های اصلاح نژاد، نجات گونه‌های در حال انقراض و بسیاری کاربردهای دیگراشاره کرد[۱۲۳،۶۶].

پیشرفت موفقیت‌آمیز و کاربرد گسترده این روش‌ها و فناوری‌های وابسته، ارتباط تنگاتنگی با گسترش فناوری‌های پایه مرتبط با بلوغ آزمایشگاهی تخمک (*In Vitro* Maturationm, IVM)، 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.

۲-۱-۱- بلوغ تخمک

بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM) فناوری زیستی نوینی است که قابلیت‌های ویژه‌ای به فناوری تولیدمثل بخشیده است. IVM پروسه‌ی بسیار پیچیده‌ای است که هنوز تمامی جنبه‌های آن به درستی شناخته نشده است. در IVM می‌بایست محیط میکرو آندوکرینی مناسب جهت بلوغ تخمک فراهم گردد. در چنین شرایطی تخمک‌های نابالغ می‌توانند مراحل بلوغ سیتوپلاسمی و هسته‌ای را با موفقیت پشت سر بگذارند.

در شرایط خارج سازی تخمک از فولیکول و انتقال آن به محیط کشت مهار اعمال شده از جانب سلول‌های گرانولوزا برداشته شده و لذا تقسیم میوزی از سر گرفته خواهد شد[۱۱۹،۴۰]. با این وجود در شرایط بلوغ آزمایشگاهی علی‌رغم این که حدود ۸۰-۷۰ در صد از تخمک‌های کشت داده شده به مرحله‌ی متافاز II از تقسیمات هسته‌ای می‌رسند لیکن تولید بلاستوسیست پس از انجام لقاح خارج رحمی به طور متوسط ۳۰ درصد خواهد بود که علت این امر را می توان تا حدود زیادی مربوط به نقصان بلوغ سیتوپلاسم دانست.

تخمک‌های مورد نیاز برای تولید رویان آزمایشگاهی از فولیکول‌های تخمدان‌هایی که در کشتارگاه جمع‌آوری می‌شوند به دست می‌آید[۱۶۰]. 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. از اوایل دهه ۱۹۹۰ گرفتن تخمک از حیوانات دهنده‌ی زنده در شرایط طبیعی از راه پاره کردن فولیکول به کمک لاپاراسکوپی[۳۸] و اولتراسونوگرافی[۷۳] در حال گسترش است. اما این روش‌ها گران قیمت و میزان تخمک استحصالی به ازای هر تخمدان بسیار کم می‌باشد[۱۱۴]. در گذشته از تکنیک جداسازی فولیکول آنترال کامل به منظور دست‌یابی به تخمک استفاده می‌شد. اما روش برش تخمدان[۱۵۴] و آسپیراسیون در گوسفند معمول‌تر می‌باشد. یکی از رایج‌ترین روش‌های استحصال تخمک‌ها، از تخمدان‌های به دست آمده از کشتارگاه آسپیراسیون می‌باشد[۱۵۶]. یکی از مشکلات این رهیافت این است که تنها ۳۰ تا ۶۰ درصد تخمک‌ها از فولیکول‌ها استحصال می‌شود، درحالی که با تکنیک جداسازی فولیکول درصد استحصال تخمک‌ها از فولیکول به صد درصد نیز می‌رسد. برتری این تکنیک سرعت اجرای آن است. فولیکول های با قطر ۷-۲ میلیمتر با نیدل گیج ۲۲-۱۸ متصل به پمپ خلأ با فشار ۱۰۰-۷۵ میلیمتر جیوه آسپیره می‌شوند[۴۴]. افزایش فشار خلأ موجب کاهش تخمک‌های با کیفیت مطلوب و زیست‌پذیر شده که احتمالاً به دلیل کنده شدن سلول‌های کومولوس از تخمک است. هنگامی که فشار خلأ بالاست افزایش چشمگیری در تعداد تخمک‌های برهنه (Denuded) دیده می شود. با افزایش فشار آسپیراسیون شمار Cumulus Oocyte Complexes کاهش می‌یابد[۱۸].

جداسازی تخمک‌های واجد شرایط برای تولید رویان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بر اساس آزمایش‌های انجام شده تنها آن دسته از تخمک‌های نارس قدرت بالغ شدن دارند که دارای چندین ردیف سلول کومولوس

به صورت متراکم و یکنواخت در اطراف خود باشند و سیتوپلاسم تخمک‌ها یا اووپلاسم آنها نیز ترکیب یکنواختی داشته باشد. تخمک‌های بدون سلول کومولوس یا دارای سلول‌های کومولوس پراکنده و یا تخمک‌های حاوی اووپلاسم قطعه قطعه شده، فاقد توانایی لازم جهت بالغ شدن هستند.

تحقیقات نشان می‌دهند که در گوسفند فولیکول‌هایی که قطر آنها بین ۶-۲ میلیمتر می‌باشد، حاوی تخمک‌های واجد شرایط برای بالغ شدن در شرایط آزمایشگاهی هستند و تخمک‌هایی که از فولیکول‌های با قطر کمتر از ۲ میلیمتر و یا با قطر بیش از ۶ میلیمتر تهیه می‌شوند به ترتیب دارای سلول‌های کومولوس کم و یا زیاد ولی پراکنده بوده‌اند قابلیت بارور شدن را ندارند.

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 IVM 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[۱۴۵]. محیط کشت دارای بیشترین اثر در بلوغ تخمک است، یکی از بهترین محیط‌ها و به طور معمول محیطی که به منظور بلوغ تخمک‌های گوسفند و بز به کار می‌رود محیط Tissue (TCM199) Culture Medium می‌باشد. اسیدیته این محیط را پس از آماده نمودن آن، به وسیله‌ی یون‌های بیکربنات یا محلول HEPES متعادل نموده و محیط را پس از غنی‌سازی با سرم و هورمون‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌دهند. افزودن Luteinizing Hormone، Follicle-Stimulating Hormone و استرادیول به محیط بلوغ به طور معنی‌داری موجب افزایش میزان بلوغ می شود[۷۰،۴۷،۳۵]. که به‌طور اولیه باعث تنظیم نمودن بلوغ هسته‌ی تخمک پستانداران می‌شوند و اثرات سودمندشان برای تخمک‌هایی که از حیوانات جوان نابالغ استحصال می‌شود مشخص‌تر است[۸۳]. استرادیول نیز با تحریک DNA polymerase B و افزایش سنتز فاکتور مورد نیاز برای رشد پرونوکلئوس نر باعث انجام بلوغ سیتوپلاسمی می‌شود. همچنین در حضور استرادیول میزان تولید بلاستوسیت افزایش می‌یابد[۱۱۳].

عموما به محیط بلوغ میزان ۱۰-۲۰ درصد سرم که در ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده می‌شود، نیز اضافه می‌شود. حرارت باعث غیرفعال شدن فاکتورهای نامساعدی چون کمپلمان می‌شود. سرم به عنوان یک منبع غذایی برای COCs مطرح بوده، همچنین از سخت شدن زونا Zona hardening زمانی که تخمک از محیط اطراف فولیکول آزاد می‌شود، جلوگیری می‌کند[۱۵۷]. در گوسفند و بز در بیشتر مطالعات سرم مورد استفاده FBS می‌باشند.

تخمک‌ها به منظور طی نمودن روند بلوغ در محیط مطلوب در شرایط ۳۹-۳۸ درجه سانتیگراد در ۵ درصد CO2، رطوبت حداکثر به مدت ۳۲-۲۶ ساعت گرمخانه‌گذاری می‌شوند.

۲-۱-۲- 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 زرده 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 اسپرم قبل از گرمخانه‌گذاری 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[۱۵۷].

با استفاده از تکنیکی‌های Swim up[۱۲]، گرادیان پرکل (Swim down) و سانتریفیوز نمودن[۱۴،۱۱] و فیلتراسیون مایع منی به وسیله‌ی ستون پشم شیشه[۱۱] می‌توان اسپرم‌های متحرک را از اسپرم‌های غیر متحرک به منظور انجام IVF جدا نمود. در موارد اسپرم تازه، با استفاده از روش Swim up می‌توان اسپرم متحرک بیشتری را جدا نمود اما درمیزان نفوذ اسپرم در تخمک و میزان تسهیم هیچ تفاوتی بین دو روش Swim up و پرکل دیده نمی‌شود[۱۱۰]. اما در مورد اسپرم منجمد استفاده از گرادیان پرکل و سانتریفیوز نمودن نتایج بهتری را در میزان لقاح و پیشرفت‌های رویان‌ی نسبت به روش های Swim up و ستون پشم شیشه ایجاد می‌کند[۱۲۶].

۲-۱-۳- 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 قادر به باور ساختن تخمک گاو می‌باشد.

در فرآیند لقاح تخمک توسط اسپرم فعال شده، به طوری که بدون وجود هیچ گونه محرکی، تخمک می‌بایستی قادر به تشکیل پرونکلئوس‌ها و ایجاد زیگوت باشد.

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.

Decondense شدن سر اسپرم ۲-۱ ساعت بعد از نفوذ در تخمک و شکل‌گیری پرونکلئوس نر ظرف ۵-۳ ساعت رخ می‌دهد[۶۲]. 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[۱۴۳].

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، تشکیل پیش هسته نر

پ. تسهیم با ظاهر طبیعی، تشکیل بلاستوسیست

ت. متلاشی شدن دانه‌های قشری

ث. مشاهده دم یک اسپرم در اووپلاسم

هیچ یک از موارد فوق به تنهایی نمی‌تواند بیانگر لقاح طبیعی باشد، چرا که به عنوان مثال، رویان‌های حاصل از بکرزایی (Parthenogenesis) هم، بعضی از معیارهای فوق را دارا هستند.