بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

دانشکده علوم دامی

برای اخذ درجه کارشناسی ارشد
(فیزیولوژی دام)

عنوان:
اثر عصاره گیاه شقایق بر بلوغ و تکوین تخمک های نارس موش

نگارش:
افسانه گل کار نارنجی

اساتید راهنما:
دکتر فیروز صمدی

دکتر حسین ایمانی

اساتید مشاور:

دکتر سعید حسنی

دکتر عبدالحسین شاهوردی
دکتر پوپک افتخاری یزدی

پاییز ۸۹

اثر عصاره گیاه شقایق بر بلوغ و تکوین تخمک های نارس موش

بلوغ تخمک خارج از بدن روشی آسان و ارزان جهت تولید جنین خارج از بدن در انسان و حیوانات می باشد. در شرایط خارج از بدن، تخمک در معرض غلظت های اکسیژن بیشتری قرار می گیرد که خطرتولید گونه های فعال اکسیژن را در تخمک بالا می برند. بعلاوه، تولید گونه های فعال اکسیژن در شرایط بدنی نیز اجتناب ناپذیر بوده و می تواند موجب اثرات مخرب برتولید مثل شود. استفاده از آنتی اکسیدان ها در محیط کشت بلوغ می تواند مانع تولید بیش از حد گونه های فعال اکسیژن شود. همچنین مصرف آنتی اکسیدان ها می تواند مانع اثرات مخرب گونه های فعال اکسیژن شود. هدف از این تحقیق، بررسی استفاده از عصاره گیاه شقایق بعنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی در محیط کشت بلوغ تخمک و بررسی اثرات مصرف این عصاره گیاهی بر عملکرد تخمدان های موش ماده می باشد. تخمک های نابالغ جمع آوری شده و بطور تصادفی به محیط های کشت بلوغ حاوی غلظت های مختلف عصاره شامل دو گروه (۰، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میکروگرم در هر میلی لیتر)و(۰، ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر) انتقال داده شدند. طی بلوغ تخمک خارج از بدن، تعداد تخمک ها در مرحله وزیکول ژرمینال، تجزیه وزیکول ژرمینال و متافازی ثبت و پس از لقاح خارج از بدن، میزان لقاح تخمک های متافازی، اندازه گیری شد. در ارزیابی تکوین جنین ها طی یک دوره ۹۶ ساعته، تعداد جنین های دو سلولی، چهار تا هشت سلولی، مورولا و بلاستوسیست ثبت شد. دوز های۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در هر کیلو گرم وزن بدن به مدت ۱۲ روز به صورت صفاقی به موش های ماده تزریق شده و با تحریک تخمک گذاری، میزان لقاح و تکوین تخمک های تیمار شده و شاهد ارزیابی و دوز تاثیر گذار تعیین گردید. توانایی بلوغ، لقاح و تکوین خارج از بدن تخمک های نابالغ تخمدان های تیمار شده با دوز مؤثر و گروه شاهد نیز ارزیابی شد. عملکرد تخمدان های تیمار شده با دوز مؤثر طی رنگ امیزی هماتوکسیلین-ائوزین نیز مورد بررسی قرار گرفت. کلیه آزمایشات ۷ بار تکرار و داده ها با استفاده از طرح کاملا تصادفی، آنالیز شدند. مقایسات میانگین ها با آزمون دانکن و در سطح معنی داری۵٪ انجام شد. از میان غلظت های آزمایش شده اضافه کردن ۱۰۰ میکروگرم عصاره در هر میلی لیتر محیط کشت موجب افزایش معنی داری در بلوغ و تکوین خارج از بدن تخمک ها در مقایسه با گروه شاهد شد(p <٪۵). تزریق ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم عصاره گیاه شقایق به موش های ماده موجب افزایش معنی داری در توانایی تکوین خارج از بدن تخمک های حاصل از تحریک تخمک گذاری نسبت به گروه شاهد شد (p <٪۵). میزان بلوغ و تکوین خارج از بدن تخمک های تیمار شده با دوز مؤثر تفاوت معنی داری با گروه شاهد نداشت(P>٪۵). بررسی های بافت شناسی نشان داد که تعداد فولیکول های پرایمری در تخمدان های تیمار شده بطور معنی داری بالاتر از گروه شاهد بود(p <٪۵). همچنین در بررسی کیفی میزان آپوپتوزیس، تفاوتی میان تخمدان گروه تیمار شده و تخمدان گروه شاهد، مشاهده نشد. نتایج حاصل از آزمایشات نشان داد اضافه کردن عصاره گیاه شقایق به محیط کشت بلوغ تخمک موجب افزایش میزان بلوغ وتکوین تخمک ها می شود. همچنین توانایی بالاتر تخمک های بدست آمده از تخمدان های تیمار شده با دوز مؤثر در تکوین تا مرحله بلاستوسیست، نشانه کیفیت بهتر تخمک های تیمار شده با عصاره شقایق می باشد. آزمایشات *in vitro* و *in vivo*، نشان دهنده تاثیر گذاری عصاره بر بلوغ تخمک می باشد که این اثرات به میزان مورد استفاده عصاره بستگی دارد. این اثرات افزاینده ممکن است بدلیل خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاه شقایق باشد.

کلمات کلیدی: آنتی اکسیدان، تخمک، تخمدان، جنین، گیاه شقایق

فهرست عناوین

فصل اول: مقدمه ۱

فصل دوم: مروری بر مطالعات گذشته ۵

۲-۱- رشد و بلوغ تخمک ٦

۲-۱-۱- رشد تخمک ٦

۲-۱-۲- بلوغ تخمک ۸

۲-۱-۳- توقف و از سرگیری میوز طی بلوغ تخمک ۹

۲-۱-٤- منبسط شدن سلول های گرانولوزا ۱۰

۲-۱-۵- تجزیه وزیکول ژرمینال ۱۱

۲-۲- بلوغ تخمک خارج از بدن ۱۲

۲-۲-۱- محیط کشت بلوغ تخمک ۱۳

۲-۲-۱-۱- اضافه کردن سرم به محیط کشت بلوغ تخمک ۱۳

۲-۲-۱-۲- اضافه کردن گنادوتروپین ها به محیط کشت بلوغ تخمک ۱٤

۲-۳- لقاح خارج از بدن و تکوین جنین ها ۱٤

۲-۳-۱- لقاح خارج از بدن ۱٤

۲-۳-۲- تکوین جنین ها در آزمایشگاه ۱۵

۲-۳-۳- مورفولوژی و میزان رشد جنین ۱۵

۲-۳-٤- چالش ها و مشکلات کشت جنین در آزمایشگاه ۱۹

۲-٤- شوک اکسیداتیو ، آنتی اکسیدان ها و اثرات آنها بر تخمدان، فولیکول، تخمک و جنین ۲۳

۲-٤-۱-گونه های فعال اکسیژن و شوک اکسیداتیو ۲۳

۲-٤-۲- تاثیر گونه های فعال اکسیژن بر عملکرد تخمدان و تخمک گذاری ۲۵

۲-٤-۳- تاثیر شوک اکسیداتیو بر فولیکول، تخمک و جنین ۲٦

۲-۵- آنتی اکسیدان ها ۲۸
۲-۵-۱- آنتی اکسیدان های آنزیمی ۲۸
۲-۵-۲- آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی ۲۹
۲-۵-۳- آنتی اکسیدان های گیاهی ۲۹
۲-۵-۱- تاثیر آنتی اکسیدان ها بر تخمک و جنین ۳۰
فصل سوم: مواد و روش ها ۳۳
۳-۱- تاریخ و محل انجام تحقیق ۳٤
۳-۲- حیوانات آزمایشگاهی ونگهداری انها ۳٤
۳-۳- عصاره گیری ۳۵
۳-٤- تهیه محیط کشت ها وقطره گذاری ۳۵
۳-٤-۱- تهیه محیط کشت بلوغ حاوی عصاره گل شقایق ۳۷
۳-٤-۲- تهیه محیط کشت و قطره گذاری جهت تشریح تخمدان ۳۸
۳-٤-۳- تهیه محیط کشت و قطره گذاری جهت لقاح خارج از بدن ۳۹
۳-٤-٤- تهیه محیط کشت و قطره گذاری جهت تکوین جنین ها ۳۹
۳-۵- بررسی اثر اضافه کردن عصاره به محیط کشت بلوغ ٤۰
۳-۵-۱- جمع آوری تخمک ٤۰
۳-۵-۲- لقاح خارج از بدن ٤٤
۳-۵-۳- تکوین جنین ها ٤٦
۳-٦- آزمایشات بررسی اثر عصاره گیاه شقایق بر عملکرد تخمدان ٤۸
۳-٦-۱- تیمار موش های ماده با دوز های مختلف عصاره گیاه شقایق ٤۸
۳-٦-۲- جمع آوری تخمک ها طی تحریک تخمک گذاری، لقاح خارج از بدن و تکوین ٤۹
۳-٦-۳- بررسی بلوغ تخمک، لقاح خارج از بدن و تکوین تخمک های تیمار شده با دوز مؤثر ۵۰

۳-٦-٤- بررسی کیفیت بلاستوسیست ها ٥١
۳-٦-٥- بررسی های بافت شناسی تخمک های تیمار شده با دوز موثر ٥٢
۳-٦-٥-١- رنگ امیزی تکه های بافتی ٥٢
۳-۷-تجزیه و تحلیل آماری داده ها ٥٣
فصل چهارم: نتایج ٥٤
٤-١-تاثیر اضافه کردن عصاره گیاه شقایق به محیط کشت بلوغ تخمک ٥٥
٤-١- ١- بلوغ تخمک ٥٥
٤-١-٢- لقاح خارج از بدن ٥٧
٤-١-٢- تکوین جنین ها در آزمایشگاه تا مرحله بلاستوسیست ٥٩
٤-٢- تزریق دوز های مختلف عصاره و اثر آنها بر عملکرد تخمدان ها ٦١
٤-٢- ١- تعداد تخمک ها و میزان لقاح خارج از بدن ٦١
٤-٢- ٢- درصد جنین ها طی مراحل تکوین ٦٢
٤-٢- ٣- بررسی تعداد سلول های بلاستوسیست ٦٣
٤-٢- ٤- بررسی بلوغ و تکوین تخمک تخمدان های تیمار شده با دوز مؤثر ٦٥
٤-٢- ٥- بررسی تعداد انواع فولیکول و میزان آپوپتوزیس ٦٧
٤-٢- ٦- بررسی کیفی میزان آپوپتوزیس ٧١
فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری ٧٣
٥-١- بررسی بلوغ تخمک در محیط کشت ٧٤
٥-٢- بررسی اثر عصاره گیاه شقایق بر تخمدان ها ٧٦
٥-٣- نتیجه گیری ٧٩
٥-٤- پیشنهادات ٨٠
فهرست منابع ٨٢

ضمیمه **۹۶**
کلید واژه ها و اصطلاحات **۱۰۵**

فصل اول

مقدمه

امروزه تولید جنین خارج از بدن در پرورش حیوانات، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. تولید جنین در آزمایشگاه شامل بلوغ تخمک، لقاح و تکوین تخمک های لقاح یافته تا مرحله بلاستوسیست (کشت جنین) است. همه مراحل تکوین باید با موفقیت همراه شود تا جنین های حاصل شده منجر به تولد نوزادانی سالم شوند. میزان مورد انتظار بلاستوسیست ها بعد از بلوغ در آزمایشگاه ۳۰ تا ٤٠ درصد است. بطور کلی، مشکل اصلی تولید جنین در آزمایشگاه کاهش قابلیت زنده ماندن جنین ها درشرایط آزمایشگاهی یا خارج از بدن، نسبت به شرایط بدن است. برای بهبود کارایی تولید جنین درآزمایشگاه ، در حال حاضر تحقیقات بر تمام فاکتورهای اثر گذار طی جمع آوری گامت ها متمرکز است. بعلاوه بررسی واکنش گامت ها و جنین ها به سیستم های گوناگون کشت نیز مورد توجه است (۱۱۷). در پستانداران، جنین ها در آزمایشگاه طی مراحل بلوغ خارج از بدن، لقاح خارج از بدن یا تزریق اسپرم، داخل سیتوپلاسم نیز تولید می شوند. جنین های تولید شده در آزمایشگاه از نظر مورفولوژی، مدت زمان تکوین، مقاومت به دمای پایین، متابولیسم و بیان ژن با جنین هایی که در بدن تولید می شوند، بسیار متفاوت هستند (۱۰۷). یکی از عوامل مهم تاثیر گذار بر بلوغ تخمک محیط کشتی است که تخمک ها در آن بالغ شده و جنین ها در آن تکوین می یابند (٦٤). محیط کشتی که بلوغ تخمک در آن پیش می رود، بر توانایی تکوین جنین حاصل از آن تاثیر دارد (۱۱۷). غلظت اکسیژن در محیط های کشت آزمایشگاهی جنین و تخمک درمقایسه با شرایط طبیعی درون بدن بیشتر بوده و این سبب افزایش سطح رادیکال های آزاد می شود. رادیکال های آزادی همانند O^{2-} ازغشاءهای سلولی عبور کرده و باعث تغییراتی در لیپیدها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک می شوند و این اثرات زیانبار رادیکال های آزاد بر مراحل اولیه تکوین جنین های موش، همستر و گاو گزارش شده است (۱۳۰). آتیکن و همکاران (۱۹۹۳) اثرات زیانبار گونه های فعال اکسیژن را بر تولید مثل گزارش کردند. بعلاوه، تارین وهمکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که سطوح بالاتر گونه های فعال اکسیژن و میزان پایین تر آنتی اکسیدان ها در مایعات فولیکولی و مجرا های تولید مثلی، ممکن است تاثیر منفی بر باروری و تکوین جنین ها داشته باشد. جهت غلبه براثرات زیانبار رادیکال های آزاد، مولکول هایی با خاصیت آنتی اکسیداتیو را می توان به محیط کشت اضافه کرد (۷۵). جهت حمایت از سلول در مقابل رادیکال های آزاد، یک سیستم آنتی اکسیدانی شامل آنتی اکسیدان های آنزیمی در سطح

سیتوپلاسم، اندوتلیال و میتوکندری سلول قرار دارند (۷۷). اثرات بالقوه آنتی اکسیدانی پلی فنول های سبزیجات یا عصاره های تغلیظ شده آنها بطور وسیعی بر کشت سلول (۱۲)، حیوان زنده (۱۳۳)، و انسان (۹۱)، بررسی شده است.

فرضیه ها و اهداف

قرن ۲۱ آغاز تحولی در کاربرد زیست فناوری[1] در حیوانات اهلی است. تولید موش تراریخته[2] سر آغاز این تحول بوده است که با تولید گاو، گوسفند و خوک تراریخته، گسترش کاربرد اسپرم تعیین جنسیت شده در گاو، بوجود آمدن دالی گوسفند شبیه سازی شده و همچنین فراهم شدن امکانات تولید حیواناتی که از نظر ژنتیکی تغییر یافته اند، ادامه یافته است. با این حال توسعه و کاربرد موفق این فناوری ها به روش های اساسی تولید مثل همچون بلوغ خارج از بدن تخمک، لقاح خارج از بدن، کشت جنین و کشت پیشسازهای اسپرم (سلول های بنیادی اسپرماتوگنی) در آزمایشگاه وابسته است. تا زمانی که بهبود قابل توجهی در این تکنولوژی های تولید مثلی حاصل نشود، کاربرد روش های شبیه سازی و تولید حیوانات اهلی تراریخته همچنان محدود و گران خواهد بود (٦٢). با توجه به خواص انتی اکسیدانی گیاه شقایق، به نظر می رسد اضافه کردن این عصاره به محیط کشت می تواند موجب افزایش میزان بلوغ تخمک ها و همچنین افزایش میزان تکوین آنها تا مرحله بلاستوسیست در آزمایشگاه شود. همچنین تزریق عصاره به موش ماده می تواند موجب افزایش کیفیت تخمک ها شود ومیزان تکوین خارج از بدن را بالا برد. هدف اساسی این تحقیق بررسی اثر آنتی اکسیدانی عصاره گیاه شقایق بر بلوغ و تکوین تخمک های نارس موش در آزمایشگاه است. همچنین اثرات تزریق صفاقی عصاره به موش های ماده بر عملکرد تخمدان ها طی

[1] -Biotechnology
[2] -Transgenic

بررسی های بافت شناسی و همچنین تعداد تخمک های بدست آمده از موش های تیمار شده و توانایی آنها در بارور شدن و تکوین در شرایط خارج از بدن از اهداف بعدی این تحقیق می باشد.

فصل دوم

مروری بر مطالعات گذشته

تا کنون مطالعات زیادی بر یلوغ و تکوین تخمک های نارس انواع موجودات در آزمایشگاه انجام گرفته است. در این فصل عوامل موثر بر بلوغ و تکوین تخمک های نارس، خصوصاً اثرات گونه های فعال اکسیژن و تاثیر آنتی اکسیدان ها معرفی می شوند و بخشی از مطالعات گذشته و تاریخچه مربوط به بلوغ تخمک و عوامل تاثیر گذار بر میزان بلوغ و تکوین تخمک در شرایط خارج از بدن در آزمایشگاه، بیان خواهد شد.

۲-۱- رشد و بلوغ تخمک

۲-۱-۱- رشد تخمک

اووگنی[1] در تخمک های جنین پستانداران از طریق میتوز تکثیر شده و سپس وارد تقسیم میوز می شود اما در مرحله پروفاز[2] میوز اول متوقف می شود. تخمک تا زمانی که به اندازه کافی بالغ نشده باشد توان تکمیل میوز اول را ندارد (۸۳). مشخص شده است که اتصالات تخمک با سلول های سوماتیک گرانولوزا برای متابولیسم انرژی و نهایتاً رشد تخمک لازم است (۳۸). در طول دوره توقف، تخمک ها حدود صد برابر بزرگتر می شوند. این تغییرات رشد تخمک نامیده می شود. اندازه نهایی تخمک بستگی به گونه موجودات دارد. برای مثال اندازه تخمک بدون در نظر گیری زونا پلوسیدا[3] در موش بین ۱۰ تا ۷۵ میکرومتر متغیر است (۱۱۸). در گاو و خوک اندازه تخمک بین ۳۰ تا ۱۲۵میکرومتر متغییر است (۱۳۸، ۵۵). رشد تخمک با تکوین فولیکولی همراه است. کوچکترین تخمک ها توسط لایه ای از سلول

[1] -Ovogonia
[2] -Prophase
[3] -Zona pelucida

های گرانولوزای[1] مسطح احاطه شده اند. بروز تغییرات مورفولوژیکی در سلول های گرانولوزا (مکعبی شدن) اولین علامت آغاز ورود تخمک به مرحله رشد است (۱۱۸). فولیکول ها در این مرحله فولیکول های پرایمری (اولیه) نامیده می شوند. بعد از تغییرات مورفولوژیکی در سلول های گرانولوزا، فولیکول ها همراه با تکثیر فعال سلول های گرانولوزا تکوین می یابند. بعد از این مرحله فولیکول های اولیه یک لایه ای به فولیکول های ثانویه با چند لایه گرانولوزا تبدیل می شوند که با ادامه رشد به فولیکول های آنترال[2] یا حفره دار تبدیل می شوند. در این فولیکول ها حفره ای از مایع فولیکولی تشکیل شده است. در طول رشد تخمک زوناپلوسیدا تشکیل می شود. اندازه فولیکول در زمان رشد کامل تخمک در گونه های مختلف متفاوت است. تخمک های موش در مراحل اولیه فولیکول آنترال تقریبا بطور کامل رشد یافته اند (۵۲). در حالی که تخمک های گاو و خوک در مرحله اولیه فولیکول آنترال رشدشان کامل نشده است و باید تا مرحله انتهایی آنترال پیش روند و به قطر ۵ میلی متر برسند (٥٦، ٨٤). تکوین فولیکولی همراه با رشد تخمک، یک فرآیند طولانی است که بعد از آغاز رشد فولیکولی در موش حدود ۳ هفته (۱۰۲) و در گاو حدود٦ هفته طول می کشد (۷۰). در تخمدان پستانداران همه تخمک ها در یک زمان رشد نمی کنند. تنها جمعیت کوچکی از تخمک ها در فولیکول های اولیه شروع به رشد می کنند. با این حال تعداد زیادی از تخمک های باقی مانده بصورت ساکن بوده، و در انتظار شرایط لازم جهت از سرگیری رشد هستند. در هر دو تخمدان موش تقریبا ٤۰۰۰ فولیکول اولیه وجود دارد (۹۹) در تخمدان های گاو و گوسفند ۱۰۰۰۰۰ فولیکول اولیه وجود دارد (۹٦). در طول دوره طولانی رشد، تخمک پروتئین و mRNA مورد نیاز برای از سرگیری میوز و بلوغ بعد از آن را تولید و ذخیره می کند (۹٦).

[1] -Granulosa
[2] -Antral

۲-۱-۲- بلوغ تخمک

بلوغ تخمک را می توان به دو بخش بلوغ هسته ای و سیتوپلاسمی تقسیم کرد. پینکوس و انزمن (۱۹۳۵) اولین کسانی بودند که بلوغ هسته تخمک های آزاد شده از فولیکول های حفره دار را گزارش کردند. بلوغ هسته تخمک می تواند بدلیل حذف عوامل باز دارنده و وجود القا- گران مثبت باشد (۱۰۵). از سرگیری تقسیم میوز با تجزیه وزیکول ژرمینال[1] (GVBD) تراکم کروموزوم ها و شکل گیری دوک تقسیم تشخیص داده می شود. سپس تخمک ها به سمت پروفاز II پیش می روند. تخمک ها در مرحله پروفازII تا زمانی که بوسیله اسپرم فعال شوند، یا دچار بکرزایی[2] شوند، متوقف می شوند(٤٩). مراحل بلوغ تخمک در شکل ۱-۱ نشان داده شده است.

GV GVBD MII

شکل ۱-۱. مراحل بلوغ تخمک. GV: تخمک مرحله وزیکول ژرمینال. GVBD: تخمک مرحله تجزیه وزیکول ژرمینال. MII: تخمک مرحله متافازی.

[1] - Germinal vesicle break down
[2] -Partenogenesis

۲-۱-۳- توقف و از سرگیری میوز طی بلوغ تخمک

تقسیم تخمک های پستانداران در مرحله دیپلوتن[1] پروفاز میوز اول یا مرحله وزیکول ژرمینال متوقف می شود (٤٩). با تاثیر گنادوتروپین[2] بر سلول های فولیکولی در تخمدان پروژسترون[3] ترشح شده و بدین ترتیب پروژسترون با تاثیر مستقیم بر تخمک سبب از سرگیری میوز می شود. بطور مشابه پروژسترون در محیط آزمایشگاه هم موجب از سرگیری میوز می شود (۱۳۳). از سر گیری میوز در بسیاری از گونه ها مثل ستاره دریایی ، دوزیستان ، خوک ، گاو، موش صحرایی و موش خانگی توسط cAMP[4] متوقف می شود. cAMP ممکن است توسط سلول های کومولوس و طی تبادلات بین سلولی از طریق اتصالات درز دار[5] تامین شود. در شرایط بدن، افزایش ناگهانی گنادوتروپین موجب آغاز بلوغ تخمک و پارگی فولیکول می شود (۱۳۳) درتخمک گاو در زمان میوز خود به خودی اضافه کردن cAMP موجب توقف میوز در متافاز I می شود. این اثرات در هر مرحله ای از بلوغ، دائمی می باشند و برگشت ناپذیر هستند. اولین مرحله لازم برای تحریک بلوغ تخمک تحت تاثیر پروژسترون است که موجب کاهش در میزان cAMP می شود. با این وجود بررسی ها نشان داده اند که کاهش در سطوح cAMP همیشه برای بلوغ تخمک لازم نیست. به نظر می رسد که تخمک دارای واکنش های زنجیره ای است که مستقل از نقش cAMP می تواند موجب بلوغ تخمک شود. گزارشات درباره تغییرات cAMP در پاسخ به پروژسترون متفاوت است. اما بیشترگزارشات ۲۰ درصد کاهش (در هر دقیقه) در میزان cAMP بعد از قرار گیری در معرض پروژسترون نشان می دهند (۳۱). مکانیسمی که طی آن پروژسترون موجب کاهش در cAMP می شود هنوز مشخص نشده است (۱۳۳). عوامل دیگری که باعث می شود تخمک در حالت توقف میوزی بماند باز دارنده های فولیکولی هستند. افزایش ناگهانی گنادوتروپین یا اینکه باعث کاهش در میزان عوامل باز دارنده میوز در فولیکول ها می شود، یا اینکه با تحریک شروع میوز بر باز دارنده ها غلبه می کند

---

[1] -Diploten
[2] -Gonadotropin
[3] -Progestron
[4] - Cyclic adenosine monophosphate
[5] - Gap junctions

(٤٧، ١٢٨). در بدن تنها تعداد بسیار کمی از تخمک های رشد یافته می توانند وارد مرحله از سرگیری میوز شوند (٤٠). علاوه بر پروژسترون که یک عامل فیزیولوژیک القا کننده بلوغ تخمک است، هورمون های استروییدی گوناگون دیگر و انواع مختلف مشتقات دارویی و مواد شیمیایی هم می توانند موجب القا میوز شوند. مشخص شده است که تعداد زیادی از این القا کنندگان غیر هورمونی، در سطح سلول ها فعال هستند. از سرگیری میوز با افزایش قابل توجه در میزان آنزیم کیناز سیتوپلاسم تخمک همراه است. فعال سازی این کینازها نیاز به پروتئین سازی دارد. اجزای اصلی این فعال سازی آنزیمی را پیش برنده های میوز در تخمک می نامند (٧٦). آغاز بلوغ تحت تاثیر LH در بدن یا بطور خود به خودی در آزمایشگاه ممکن است به افزایش فعالیت متابولیکی تخمک بستگی داشته باشد. در تخمکی که در حال بلوغ است، میزان مصرف اکسیژن افزایش می یابد (٧٢). شواهد گوناگون موجب این فرضیه شده است که بالا رفتن Ca^{++} ممکن است برای تحریک بلوغ تخمک لازم و کافی باشد. عواملی که اثر بازدارندگی بر برداشت کلسیم دارند، اثرات بازدارندگی cAMP را تشدید می کنند در حالی که عوامل افزاینده میزان برداشت کلسیم، باعث کاهش اثرات بازدارندگی cAMP می شوند (١٠٦).

٢-١-٤- منبسط شدن سلول های گرانولوزا

وقتی در فولیکول آنتروم تشکیل می شود، لایه های گرانولوزا اتصالات نزدیکی با تخمک دارند و توده کومولوس را در اطراف تخمک تشکیل می دهند. توده کومولوس اطراف تخمک برخی از خواص فیزیولوژیک گرانولوزا که شامل اتصال به گنادوتروپین و ترشح استروییدها در حد کم است را در خود حفظ می کند. علاوه بر این، بخش هایی از مایع فولیکولی همچنان در سلول های کومولوس باقی می مانند که مانع بلوغ تخمک می شوند. این نشان می دهد که عوامل باز دارنده بلوغ نقش دوگانه دارند. یعنی هم سبب توقف بلوغ می شوند و هم سبب توقف عملکرد سلول های گرانولوزا می شوند.سلول های کومولوس در زمان افزایش ناگهانی گنادوتروپین و در مرحله قبل از تخمک گذاری منبسط می شوند و اتصالات درز دار بین سلول های کومولوس مجاور و همچنین بین سلول های کومولوس و تخمک از بین

می روند. در گاو انبساط کومولوس تحت تاثیر FSH شروع می شود. کندرویتن سولفات[1] (که نوعی گلیکوزآمینوگلیکان[2] است) توسط سلول های فولیکولی در پاسخ به FSH در تخمدان از فولیکول های تخمدانی ترشح می شود و در شرایط خارج از بدن در پاسخ به FSH از سلول های گرانولوزا ترشح می شود (۳۸) در شرایط بدن انبساط کومولوس ظرفیت دار شدن اسپرم و تکوین جنین را تسهیل می کند (۳۱، ٤٩).

۲-۱-۵- تجزیه وزیکول ژرمینال[3]

از سرگیری بلوغ هسته ای تخمک بعد از مرحله پروفاز با تشخیص تجزیه وزیکول ژرمینال، قابل تشخیص است (۱۰٦). مدت کمی پس از اثر استروییدها، هسته تخمک که جایی در مرکز تخمک قرار دارد به سطح مهاجرت می کند و شروع به ناپدید شدن می کند. حرکت هسته به سطح سبب جابه جایی رنگدانه ها می شود و در نهایت به جای هسته لکه ای سفید تشکیل شده که بوسیله لایه ای از رنگدانه ها مشخص می شود. لکه سفید اولین نشانه فعال شدن تخمک است. بعد از تجزیه غشا وزیکول ژرمینال، کروموزوم های متراکم توسط دوک میوز اول هم ردیف می شوند تا میوز اول تکمیل شود. تعیین زمان تجزیه وزیکول ژرمینال در تخمک های گرفته شده از ماده های مختلف متفاوت است. این ممکن است با شرایط نگهداری حیوانات مرتبط باشد (۱۳۳).

---

[1] - Chondroitin sulfate
[2] - Glycosaminoglycan
[3]-Germinal vesicle breakdown

۲-۲- بلوغ تخمک خارج از بدن[1]

اووژنزیس[2] پستانداران معمولا بر پایه بلوغ تخمک ها از مرحله وزیکول ژرمینال [3] تا کامل شدن تقسیم میوز همراه با آزاد شدن اولین جسم قطبی است (٧٤). مراحل مهم تحقیقات درمورد بلوغ خارج از بدن تخمک ، شامل کشف پینکوس و انزمن (۱۹۳۵) است مبنی بر اینکه آزادسازی تخمک های نارس خرگوش که در فولیکول ها تحت تاثیر عوامل باز دارنده بوده اند، موجب آغاز بلوغ تخمک ها می شود. از مراحل مهم دیگر در مطالعات بلوغ خارج از بدن تخمک، شامل تشخیص دمای اپتیمم ۳۹ درجه سانتیگراد بعنوان بهترین دما برای بلوغ تخمک گاو (٦٧)، تولد گوساله های زنده حاصل از بلوغ خارج از بدن و لقاح خارج از بدن تخمک های گاو (٦٩) می باشد. همچنین تولد نوزادهای زنده موش بعد از تکوین کامل تخمک های نخستین یا پرایموردیال[4] تا تشکیل جنین های حاصل از لقاح خارج از بدن و انتقال آنها به مادرهای گیرنده که در آزمایشگاه اپیگ انجام شد مرحله مهمی بود. بطوری که طی روش اپیگ، هر تخمدان با استفاده از آنزیم از هم گسیخته شد سپس تخمک ها در محیط کشت بالغ شدند و لقاح یافتند و در نهایت، جنین ها در مرحله دو سلولی به اویداکت منتقل شدند (۳۷). تهیه تخمک با کیفیت یکی از عوامل مهم تعیین کننده توانایی تکوین جنین های تولید شده بعد از لقاح خارج از بدن است (٦٣). مشخص شده است که جنین های حاصل از تخمک های بالغ شده در آزمایشگاه بعد از لقاح خارج از بدن نسبت به جنین های حاصل از تخمک های بالغ شده در بدن توانایی کمتری در تکوین دارند (١٠٤). با این حال استفاده از تخمک های حاصل از بلوغ خارج از بدن بدست آوردن شمار زیادی تخمک را با هزینه کمتر امکان پذیر می کند. بسیاری از عوامل همچون هم-کشتی تخمک با سلول های گرانولوزا و نوع محیط کشت بر بلوغ هسته ای و سیتوپلاسمی تخمک در آزمایشگاه اثر دارند (۳). با این حال توانایی بلوغ و تکوین جنین تا بلاستوسیست در تخمک هایی که در محیط کشت بدون مکمل بالغ شده اند، نسبت به

---

[1] -*In vitro* maturation
[2] -Oogenesis
[3] -Germinal vesicle
[4] -Prymordial

تخمک هایی که در محیط کشت مکمل شده با مواد شیمیایی همچون اسیدهای آمینه و آنتی اکسیدان ها بالغ شده اند، کمتر است (۵۱).

۲-۲-۱- محیط کشت بلوغ تخمک

محیط کشت های معمول برای بلوغ تخمک در موش و انسان معمولا MEMα[1] یا TCM[2] است که با سایر مواد همچون سرم، هورمون ها و آنتی اکسیدان ها ترکیب می شود (٦٢).

۲-۲-۱-۱- اضافه کردن سرم به محیط کشت بلوغ تخمک

در سال ۱۹۸۰ و اوایل سال ۱۹۹۰ تیمار با سرم گاوی (سرم جنینی گاو)[3] در بلوغ خارج از بدن تخمک بکار گرفته شد (٤٥). برای جلوگیری از سخت شدن زونا پلوسیدا اضافه کردن ۵-۱ درصد سرم به محیط کشت لازم دانسته شده است. سرم اضافه شده به محیط کشت تخمک منبعی از آلبومین جهت تعادل اسمولاریته را تامین می کند. همچنین بعنوان یک تمیز کننده محیط از رادیکال های آزاد عمل می کند (۳٤).

[1] -Minimum essential medium
[2] -Tissue culture medium
[3] -Fetal bovine serum