دانشکده کشاورزی

گروه علوم دامی

پایان نامه

جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم دامی گرایش فیزیولوژی دام

عنوان

بررسی اثر ویتامین A (اسید رتینوئیک) بر بلوغ برون‌تنی اووسیت‌های کومولوس‌دار و بدون‌کومولوس گوسفند

استاد راهنما

دکتر حسین دقیق کیا

استاد مشاور

دکترصادق علیجانی

پژوهشگر

مرضیه خانی

زمستان 1389 **شماره**:

نام خانوادگی دانشجو: **خانی** نام : **مرضیه**

عنوان پایان نامه: **بررسی اثرویتامین A (اسید رتینوئیک) بر بلوغ برون‌تنی اووسیت‌های کومولوس‌دار و بدون‌کومولوس گوسفند**

استاد راهنما: **دکتر حسین دقیق کیا**

استاد مشاور : **دکتر صادق علیجانی**

مقطع تحصیلی:**کارشناسی ارشد** رشته : **علوم دامی** گرایش: **فیزیولوژی دام** دانشگاه: **تبریز**

دانشکده: کشاورزی تاریخ فارغ التحصیلی: تعداد صفحه: 83

کلید واژه: **اسید رتینوئیک، کومولوس، تخمک نابالغ، بلوغ برون تنی، گوسفند.**

چکیده. :ویتامین A برای فعالیت‌های تولید مثلی ضروری است. رتینوئیدها در عملکرد وقایع زود هنگام تولیدمثلی شامل رشد و توسعه فولیکولی، بلوغ تخمک و رشد وتوسعه رویانی تأثیرگذار می‌باشند. از طرفی اسید رتینوئیک سلول را در مقابل مرگ سلولی (آپوپتوزیس) القاء شده با تنش اکسیداتیو حفاظت می‌کند. به منظور مطالعه اثر اسید رتینوئیک بر بلوغ برون تنی اووسیت‌های با و بدون کومولوس گوسفند، 1203 تخمک کومولوس‌دار از فولیکول‌هائی با قطر 6-2 میلیمتر به روش آسپیره‌کردن در شرایط استاندارد گرفته شدند. حدود 603 تخمک به کمک آنزیم هیالورونیداز و عمل پیپتینگ بدون‌کومولوس شدند. اووسیت‌ها پس از ارزیابی در دو گروه با و بدون کومولوس درون محیط کشت HEPES-TCM-199 که با دو درصد سرم جنین گاوی، 0/2 میلی مولار سدیم پیروات و یک درصد پنی‌سیلین استرپتومایسین مکمل سازی شده بود، شستشو داده شدند. اسید رتینوئیک ال ترانس در دوزهای 0 ،1، 1/5 و 2 میکرومولار به محیط کشت بلوغ (TCM-199) که با 10 درصد سرم جنین گاوی،

100واحد بین المللی در میلی لیتر پنی‌سیلین، 100 میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین ، 0/01 واحد بین المللی در میلی لیتر هورمون LH و5 میکروگرم بر میلی لیتر هورمون FSH مکمل سازی شده بود، جهت بررسی هر دو گروه اضافه شدند. برای انجام فرایند بلوغ همه تیمارها به مدت 24 ساعت داخل انکوباتور با دمای 38/5 درجه سانتی‌گراد، 5 درصد گاز دی اکسیدکربن و رطوبت 95 درصد قرار داده شدند. پس از 24 ساعت کشت، پیشرفت بلوغ اووسیت‌های با و بدون کومولوس در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که درصد بلوغ اووسیت‌های با و بدون کومولوس در غلظت دو میکرومولار افزایش معنی-داری نسبت به گروه کنترل و یک میکرومولار داشت (P<0/05). همچنین در این تحقیق درصد بلوغ اووسیت‌های با کومولوس در مقایسه با اووسیت‌های بدون کومولوس در غلظت دو میکرومولار بالاتر بود (P<0/05).

فهرست مطالب

1-1 مقدمه 2

1-2 هدف از طرح مورد نظر و ضرورت انجام آن 6

2-1 فولیکول سازی 8

2-2 رشد فولیکول 8

2-2-1 رشد گروهی و انتخاب شدن فولیکول‌های تخمدانی 9

2-3 فولیکول 9

2-3-1 مایع فولیکولی 11

2-3-1-1 اعمال مایع فولیکولی 12

2-3-2 اووسیت 12

2-3-2-1 هسته یا ژرمینال وزیکول 12

2-3-2-2 سیتوپلاسم 13

2-3-2-3 زوناپلوسیدا 13

2-3-2-4 کورونا رادیاتا 14

2-3-2-5 کومولوس اووفروس 14

2-3-2-5-1 اثرات سلولهای کومولوس 14

2-3-2-6 لایه سلول‌های گرانولوزا 17

2-3-2-7 لایه سلول‌های تیکا 18

2-4 رشد و بلوغ اووسیت 18

2-5 کیفیت تخمک 18

2-5-1 بلوغ اووسیت در درون تخمدان 20

2-5-2 بلوغ هسته 20

-5-3 بلوغ سیتوپلاسم 21
2-5-4 متابولیسم تخمک 22
2-6 بلوغ اووسیت در آزمایشگاه 23
2-6-1 مفاهیم رایج در بلوغ برون‌تنی اووسیت‌های نابالغ گوسفند 23
2-7 محیط های کشت آزمایشگاهی 25
2-7-1 محیط کشت‌های ساده و پیچیده 26
2-7-2 محیط کشت **TCM-199** 26
2-8 گنادوتروپین ها 27
2-9 فاکتورهای رشد 29
2-9-1 فاکتور رشد میدیکین **(MK)** 30
2-10 سرم 30
2-11 انواع اکسیژن فعال **(ROS)** 31
2-11-1 تولید **ROS** در اووسیت‌ها و جنین‌ها 31
2-11-12 فاکتورهای خارجی القاء کننده تولید **ROS** 32
2-11-13 اثرات مخرب **ROS** روی رویان‌ها 33
2-12 آنتی‌اکسیدان‌ها 34
2-12-1 آنتی‌اکسیدان‌های داخلی 34
2-13 ساز و کار دفاعی آنتی‌اکسیدان‌ها بر علیه **ROS** 35
2-13-1 دفاع اولیه بر علیه **ROS** 35
2-13-1-1 سوپراکسیددیسموتاز 35
2-13-1-2 گلوتاتیون‌پراکسیداز 35
2-13-1-3 کاتالاز 35
2-13-2 دفاع ثانویه بر علیه **ROS** 36
2-13-2-1 گلوتاتیون در تخمک 36
2-14 اسیدرتینوئیک 37
2-14-1 رتینوئیدها 37
2-14-2 خصوصیات ساختمانی رتینوئیدها 38
2-14-2-1 ساختمان رتینوئیدها 38
2-14-3 ساخت اسیدرتینوئیک **(RA)** از رتینال 39
2-14-4 گیرنده‌های هسته‌ای و اسیدرتینوئیک 39
2-14-5 نقش ویتامین **A** در تولیدمثل 40
2-14-6 بیان **mRNA** و اسیدرتینوئیک 41
2-14-7 بلوغ تخمک و اسیدرتینوئیک 42
2-14-8 آسیب اکسیداتیو و اسیدرتینوئیک 43
فصل سوم: مواد و روش‌ها 45
3-1 تهیه محلول‌های ذخیره 46
3-1-1 سرم فیزیولوژی یا **NaCl** 0/9 درصد نرمال **(10X)** 46

3-1-2 FSH (250X)..... 46
3-1-3 LH (250X) 46
3-1-4 FBS..... 47
3-1-5 آنتی‌بیوتیک Pen/Strep 20X 47
3-1-6 هیالورونیداز 47
3-1-7 اورسئین 1%..... 47
3-1-8 استئوگلیسرول 48
3-2 محیط کشت‌ها 48
3-2-1 محیط جمع‌آوری اووسیت OCM 48
3-2-2 تهیه محیط کشت برای بالغ کردن اووسیت‌ها 48
3-3 رقیق‌سازی اسیدرتینوئیک 49
3-3-1 تهیه محیط‌کشت حاوی 1 میکرومولار اسیدرتینوئیک..... 49
3-3-2 تهیه محیط‌کشت حاوی 1/5 میکرومولار اسیدرتینوئیک 49
3-3-3 تهیه محیط‌کشت حاوی 2 میکرومولار اسیدرتینوئیک..... 50
3-4 جمع‌آوری تخمدان، گرفتن اووسیت و کشت آنها 50
3-4-1 جمع‌آوری تخمدان 50
3-4-1-1 مواد و وسایل لازم..... 50
3-4-2 آسپیره فولیکول‌ها و گرفتن اووسیت 51
3-4-2-1 مواد و وسایل لازم..... 51
3-4-3 جستجوی اووسیت‌ها، جداسازی و انتخاب آنها برای کشت 52
3-4-3-1 مواد و وسایل لازم..... 52
3-4-4 انتخاب و شستشوی اووسیت‌ها..... 52
3-4-4-1 از بین بردن سلول های کومولوس 52
3-4-5 کشت دادن اووسیت‌ها..... 53
3-4-5-1 مواد و وسایل لازم..... 53
3-4-6 ارزیابی بلوغ اووسیت‌ها 53
3-4-6-1 ارزیابی میزان پراکندگی و موکوسی شدن کومولوس‌ها 53
3-4-6-2 ارزیابی بلوغ هسته‌ای 54
3-5 نحوه انجام آزمایش..... 54
3-5-1 نحوه انجام آزمایش اول 54
3-5-2 نحوه انجام آزمایش دوم 55
3-6 طرح آزمایشی و مدل آماری 56
3-7 آنالیز آماری 56
فصل چهارم: نتایج..... 57
4-1 نتایج به دست آمده از مراحل بلوغ اووسیت‌های با کومولوس 58
4-1-1 گروه یک میکرومولار اسیدرتینوئیک در مقایسه با گروه کنترل..... 58
4-1-2 گروه 1/5 میکرومولار اسیدرتینوئیک در مقایسه با گروه کنترل 58

3-1-4 گروه 2 میکرومولار اسیدرتینوئیک در مقایسه با گروه کنترل.....59
2-4 نتایج به دست آمده از مراحل بلوغ اووسیت‌های بدون کومولوس.....60
1-2-4 گروه یک میکرومولار اسیدرتینوئیک در مقایسه با گروه کنترل.....60
2-2-4 گروه 1/5 میکرومولار اسیدرتینوئیک در مقایسه با گروه کنترل 61
3-2-4 گروه دو میکرومولار اسیدرتینوئیک در مقایسه با گروه کنترل 61
3-4 نتایج حاصل از مقایسه بین دو گروه آزمایشی 63
فصل پنجم: بحث 64
1-5 بلوغ هسته‌ای 65
2-5 اثرسلول های کومولوس 71
3-5 پیشنهادات 75
فصل ششم: منابع 76

فهرست نمودار

1-4 مقایسه میانگین اووسیت‌های کومولوس‌دار و بدون‌کومولوس در فازهای مختلف رشد برون‌تنی 63

فهرست اشکال

1-2 فولیکول آنترال پستانداران 9
2-2 دیاگرام فولیکول‌سازی و رشد اووسیت و زمان بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی 10
3-2 ارتباط کمپلکس کومولوس – اووسیت 17
4-2 ناپدید شدن ژرمینال ویزیکول (GVBD) و B & C : مرحله ژرمینال ویزیکول (GV).....22
5-2 ساختمان اسیدرتینوئیک آل‌ترانس 38
1-4 مراحل رشد اووسیت کومولوس دار 60
2-4 اووسیت در گامه‌های مختلف رشد.....62

فهرست جداول

1-2 برخی از اجزاء و متابولیت‌های مایع فولیکولی که وظایف فیزیولوژیکی را بر عهده دارد 11
2-2 ویژگی‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، بیوفیزیکی و عصبی-هورمونی رشد و بلوغ فولیکولی 19
3-2 اجزاء و ترکیبات چند محیط کشت اووسیت به ویژه TCM 199 28
1-4 بلوغ هسته ای تخمک های نابالغ کومولوس‌دار گوسفند در غلظت‌های مختلف اسیدرتینوئیک آل ترانس 59
2-4 سطح معنی داری مراحل مختلف بلوغ هسته‌ای تخمک‌های نابالغ کومولوس‌دار گوسفند با تست والیس 60
3-4 میزان بلوغ اووسیت های نابالغ بدون کومولوس گوسفند پس از 24 ساعت کشت 62
3-4 سطح معنی داری مراحل مختلف بلوغ هسته‌ای تخمک‌های نابالغ بدون کومولوس گوسفند با تست والیس....63

1- مقدمه

گوسفند حدود 10 تا 12 هزار سال پیش توسط آریایی‌ها در دامنه کوه‌های زاگرس اهلی شده و جمعیت آن در کشور بر طبق آمار سال 1386 حدود 52 میلیون رأس است. نگهداری گوسفند و پرورش آن در بین گله‌داران عشایر ایران منبع اصلی درآمد محسوب می‌شود. استفاده از فناوری‌های تولیدمثل در پرورش دام سبب افزایش بهره‌وری خواهد شد. در سال‌های اخیر پیشرفت‌های زیادی در فناوری‌های تولیدمثل دام رخ داده است و نشخوارکنندگان کوچک مدل خوبی برای توسعه و تکمیل این فناوری‌ها می‌باشند. بلوغ و باروری آزمایشگاهی اووسیت، کلون کردن، تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم، تولید جنین و انتقال آن به داخل رحم از جمله فناوری‌های رایج در تحقیقات کنونی می‌باشند. موفقیت این تکنیک‌ها منوط به میزان موفقیت بلوغ آزمایشگاهی اووسیت دارد (وانی و همکاران، 1999).

بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌ها[1] برای اولین بار در سال 1953 توسط پینکوس[2] و انزمان[3] مطرح گردید. محققین مذکور توانستند بدون استفاده از هورمون، تقسیم میوز را در تخمک‌های فولیکول بالغ خرگوش فعال کنند و تخمک‌های نابالغ (**GV**)[4] را به مرحله **GVBD**[5] برسانند (گوردون، 1997) . بنابراین بلوغ و باروری آزمایشگاهی تخمک و کشت آن تا مرحله بلاستوسیت کمک زیادی به کشف بعضی از پدیده‌ها و مکانیسم‌های مربوطه نموده است. امروزه فناوری‌های تولیدمثلی در گونه‌های مختلف به ویژه نشخوارکنندگان به علت تولید تعداد زیادی رویان ارزان قیمت در خارج از بدن جهت کارهای تحقیقاتی یا انتقال جنین بسیار مورد توجه قرار گرفته است (حافظ و همکاران، 2000). تولید جنین با کمک تکنیک‌های بلوغ و باروری آزمایشگاهی پنج برابر ارزان‌تر از تکنیک سوپراوولاسیون می‌باشد (وانی و همکاران، 1999).

در گذشته و قبل از استفاده از تکنیک‌های بلوغ آزمایشگاهی اووسیت، با تزریقات مکرر گنادوتروپین‌ها و آنالوگ‌های آن سبب بلوغ اووسیت‌ها در درون تخمدان می‌شدند. سپس اووسیت‌های بالغ را استحصال نموده و باروری آزمایشگاهی اووسیت انجام می‌شد. تکنولوژی جدید نسبت به تکنیک باروری آزمایشگاهی سنتی که در گذشته انجام می‌شد، مزایای زیادی از جمله کاهش هزینه‌های مصرف گنادوتروپین‌ها و آنالوگ‌های **GnRH** و حذف سندرم تحریک بیش از حد تخمدان (این سندرم در اثر حساسیت بیش از حد تخمدان به تزریقات گنادوتروپین‌ها ایجاد می‌شود) را دارد (جورما و همکاران، 2006).

تاکنون تغییرات متعددی در محیط کشت اووسیت صورت گرفته است و محققین اثر مواد مختلف را در محیط بلوغ مطالعه نموده‌اند. در میان این مواد می‌توان به اسیدرتینوئیک به عنوان یک آنتی اکسیدان و فاکتور محرک رشد در محیط کشت اشاره کرد.

---

[1]- In vitro maturation (IVM)

[2]- **Pincus**

[3]- Enzman

4- Germinal Viscle (GV)

5- Germinal Viscle Breakdown (GVBD)

بلوغ آزمایشگاهی اووسیت[5]، فرایندی است که در طی آن اووسیت‌های پوشیده با سلول‌های کومولوس[6] برای بالغ شدن، در محیط‌های فیزیولوژی ویژه‌ای قرار داده می‌شوند (ضمیری، 1385). بلوغ اووسیتی که قادر به باروری و تولید رویان می‌باشد، شامل سه مرحله تکاملی است (گینسبرگ و همکاران، 1990).

1. بلوغ هسته‌ای که خود شامل سه مرحله است (گینسبرگ و همکاران، 1990- ضمیری، 1385).

- از سرگیری و انجام تقسیم اول میوز که در مرحله پروفاز میوز-1[7] متوقف شده است.
- ادامه تقسیمات تا مرحله متافاز میوز-2 (خروج اولین جسم‌قطبی) و توقف در این مرحله.
- ادامه بلوغ اووسیت و خروج دومین جسم‌قطبی بعد از ورود اسپرم به داخل اووسیت می‌باشد.

2. بلوغ اپی‌ژنتیکی:

- پدیده‌ای است پایدار و با تغییرات موروثی کروماتین که بر بیان ژن بدون تغییر در ترتیب **DNA**، تاثیر می‌گذارد (گینسبرگ و همکاران، 1990).

3. بلوغ سیتوپلاسمی

- عموماً به عنوان فرایندهایی شناخته می‌شود که هنگام رشد و نمو اووسیت، در سیتوپلاسم اووسیت اتفاق می‌افتد و برای لقاح، رشد و نمو اوّلیه رویان ضروری است (گینسبرگ و همکاران، 1990- ضمیری، 1385).

مطالعات نشان می‌دهند حداکثر میزان 40 تا 50 درصد تخم‌ها در آزمایشگاه به مرحله بلاستوسیست می‌رسند. در نتیجه سعی می‌شود محیط کشت بلوغ آزمایشگاهی به گونه‌ای تنظیم شود که از کاهش قابلیت رشد و نمو اووسیت تا حد امکان ممانعت به عمل آید. هرگونه تغییر در محیط کشت بلوغ آزمایشگاهی، رشد و نمو جنین، شمار سلول‌های بلاستوسیست و میزان مرگ خود به خودی سلول[8] را تحت تاثیر قرار می‌دهد (واستون، 2007).

متابولیت‌های اضافه شده به محیط کشت، مانند گلوکز، پیروات، اسیدهای‌آمینه و همچنین اکسیژن، اثرات متفاوتی بر بلوغ و توانایی اووسیت برای تبدیل شدن به رویان دارند. تغییرات در این فاکتورها ممکن است منجر به بهبود بلوغ آزمایشگاهی اووسیت شده و باعث تولید بیشتر رویان گردد (ساتون و همکاران، 2003).

غلظت اکسیژن در دستگاه تناسلی حیوان ماده حدود یک سوم غلظت اکسیژنی است که در شرایط استاندارد در محیط بلوغ آزمایشگاهی اووسیت وجود دارد (ریتر و همکاران، 1995). هنگام تولید انرژی در زنجیره‌ی تنفسی در میتوکندری، به طور طبیعی رادیکال‌های آزاد از نوع اکسیژن[9] مثل آنیون سوپراکسید ($O^{\bullet}_2^-$)، تولید می‌شود (ریتر و همکاران، 1995). برخی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن، مثل آنیون سوپراکسید ($O^{\bullet}_2^-$) در دام بیشتر از محیط‌های کشت آزمایشگاهی تولید می‌شود، درحالی که پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال‌های هیدروکسیل ($OH^{\bullet}$) در شرایط آزمایشگاهی بیشتر تولید می‌شود. پراکسیدهیدروژن، به عنوان مولکول اکسیدکننده قوی می‌باشد، که متوقف‌کننده سیکل

---

[5]- In vitro oocyte maturation

[6]- Cumulus oocyte complexes

[7]- Dictyate

[1]- Apoptosis

[2]- Reactive Oxygen Species (ROS)

سلولی و وادارکننده مرگ برنامه‌ریزی سلولی در سلول‌های سوماتیک کشت شده شناخته شده است. این مولکول‌ها اکسیدکننده قوی هستند که قادرند با هر مولکولی وارد واکنش شده و منجر به تغییرات ساختاری و وظیفه‌ای آن‌ها شوند. آن‌ها می‌توانند به غشاهای سلول‌ها و **DNA**، صدمه‌زده و در مرگ سلول نقش داشته‌باشند (چوبه و همکاران، 2005). رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول با مکانیسم‌های دفاعی آنزیمی از قبیل سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز، کاتالاز و همچنین به وسیله آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند برخی ویتامین‌ها و غیره، از بین می‌روند. میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن و آنتی‌اکسیدان در شرایط فیزیولوژیکی و در یک نسبت ثابت حفظ می‌شوند. در صورت تغییر به سمت تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، منجر به تنش اکسیداتیو می‌شود (آدریانز و همکاران، 2006).

به نظر می‌رسد تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و حذف آنها از محیط، فاکتور مهمی جهت کسب توانایی برای لقاح آزمایشگاهی باشد. لذا در این شرایط ممکن است مکانیسم‌های دفاعی اووسیت برای حفاظت از ساختار ظریف آن کافی نباشد. برای حفظ اووسیت‌ها و رویان‌های کشت شده از تنش اکسیداتیو، آنتی‌اکسیدان‌های مختلفی را به محیط کشت اضافه می‌کنند (ریتر و همکاران، 1995).

رتینوئیدها به عنوان یکی از عوامل آنتی‌اکسیدانی باعث افزایش عملکرد فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در سلول می‌شوند (لیوینگستون و همکاران، 2004). تحقیقات بسیاری در تکنیک‌های مصنوعی تولیدمثلی بر روی گاو نشان می‌دهد که - اسیدرتینوئیک و متابولیت‌هایش علاوه بر تأثیر روی رشد فولیکولار تخمدان، بر روی بلوغ اووسیت‌ها و رشد جنین اولیه هم موثر می‌باشد (موریس و همکاران، 1999).

رتینول و متابولیت‌هایش مخصوصاً اسید رتینوئیک نقش مهمی در کنترل وقایع سلولی دارند. همچنین گزارش شده - است که رتینول درصد بلاستوسیست‌های حاصل از چند تخمک‌گذاری گاو و گوسفند را افزایش می دهد (لاورنس و همکاران، 2004).

ترسی لیوینگستون[10] (2004) نشان داد افزودن 5 میکرومولار رتینول به محیط بلوغ، رشد جنین اووسیت‌های گاو را بهبود می‌بخشد. این چنین پیشرفت معناداری در رشد بلاستوسیست‌ها با افزودن 5 میکرومولار رتینول تحت شرایط اتمسفریک، به دلیل اثر سودمند آنتی‌اکسیدان در جریان رشد جنین می باشد. اسیدرتینوئیک ممکن است بلوغ سیتوپلاسمیک اووسیت‌های گاو را از طریق اثرات تعدیل کننده بر روی بیان ژن گیرنده‌های گنادوتروپین، سیکلواکسیژناز2، نیتریک‌اسید در سلول‌های کومولوس- گرانولوزا ترفیع دهد .

میدیکین[11] فاکتور رشدی است که در مایع فولیکولی گاو نسبتاً زیاد است و افزودن آن به محیط‌کشت **IVM** باعث افزایش تولید بلاستوسیست می‌شود. اخیراً نشان داده شده که آل‌ترانس اسیدرتینوئیک، میزان **mRNA** میدیکین را در سلول‌های گرانولوزای کشت شده افزایش می‌دهد. در طی **IVM**، بلوغ سیتوپلاسمی اووسیت[12] با میزان آپوپتوزیس سلول‌های کومولوس ارتباط دارد. میدیکین از آپوپتوزیس سلول‌های کومولوس در محیط‌کشت جلوگیری می‌کند. اسیدرتینوئیک ممکن است بلوغ سیتوپلاسمی اووسیت را از طریق تولید میدیکین در سلول‌های کومولوس افزایش دهد

[10] -tersi livingeston
[11] -Midikin
[12]- Oocyte cytoplasmic maturation

(ایکیدا و همکاران، 2005). با توجه به مطالب بالا اسیدرتینوئیک می‌تواند برای حفظ اووسیت از آسیب رادیکال‌های آزاد تولید شده در فرایندهای متابولیسمی داخل سلولی، و همچنین تولید فاکتورهای رشد در سلول‌های کومولوس مفید باشد.

2-1 هدف از طرح مورد نظر و ضرورت انجام آن

افزایش راندمان تولید محصولات حیوانی می‌تواند سبب بهبود اقتصادی برای مصرف‌کننده و تولیدکننده شود. می‌توان با تغییراتی در محیط کشت آزمایشگاهی اووسیت، به طور مثال استفاده از انواع مختف فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها بر کیفیت بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌ها، رشد و نمو جنین، تعداد بلاستوسیست‌ها و میزان مرگ و میر سلولی اثر گذاشت و چگونگی این تاثیرات را در طی مراحل مختلف آزمایش مورد بررسی قرار داد. وجود عوامل اکسیدکننده مثل انواع اکسیژن واکنشی در محیط کشت سبب ایجاد اختلال در فرایندهای رشد و تمایز سلول‌ها می‌شوند. بنابراین استفاده از مواد ضداکسیدانی در محیط کشت بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌ها می‌تواند در جلوگیری از اثرات زیان‌آور اکسیدکننده‌ها موثر باشد. وجود سلول‌های کومولوس در طی آزمایش خود یک عامل حفاظتی در برابر اکسیداسیون سلولی است و حضور این سلول‌ها برای رسیدن به بازده بالاتر موثر است. در صورت عدم حضور سلول-های کومولوس در اطراف اووسیت، شاید بتوان با مقدارهای مناسبی از اسید رتینوئیک که به عنوان آنتی‌اکسیدانی موثر، در محیط درون تنی و در محیط آزمایشگاهی عمل می‌کند، برای افزایش بازدهی بلوغ اووسیت‌ها استفاده کرد. بنابراین بهبود شرایط محیط کشت آزمایشگاهی اووسیت‌ها و به دست‌آوردن اووسیت‌های بالغ و با کیفیت بهتر، مهمترین اهداف این تحقیق می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی تاثیرات دوزهای مختلف اسید رتینوئیک را بر بلوغ تخمک‌های نابالغ کومولوس‌دار و بدون کومولوس گوسفند می باشد.

2-1 فولیکول سازی

برخی از فولیکول‌های ابتدایی که در طول زندگی جنینی و یا بلافاصله بعد از زایمان به وجود می‌آیند، در محل ذخیره خود شروع به رشد و نمو می‌کنند. رشد این فولیکول تا پایان زندگی حیوان و یا دست کم تا تحلیل رفتن ذخیره

فولیکول‌ها ادامه می‌یابد. هرگاه فولیکولی از این منبع ذخیره آزاد شود، مراحل رشد و تکامل خود را تا مرحله تخمک‌گذاری و یا تحلیل فولیکولی ادامه می‌دهد. فرایند فوق برای اکثریت فولیکول‌های تخمدانی صادق است. بزرگترین فولیکول، مسئول ترشح بیشترین مقدار استروژن توسط تخمدان در زمان فحلی می‌باشد. در پیک LH، ترشح استروژن توسط فولیکول گراف کاهش ناگهانی پیدا می‌کند (ضمیری، 1385).

در گوسفند یک یا دو فولیکول بزرگ به مراتب بیشتر از فولیکول‌های کوچک استروژن ترشح کرده و گنادوتروپین‌های بیشتری نیز به سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های بزرگتر متصل می‌شود. در خوک تجمع فولیکول‌های تخمک‌گذار در خلال مرحله فولیکولی صورت می‌گیرد. از این رو رشد فولیکول‌های بزرگتر مانع از رشد فولیکول‌های کوچکتر نخواهد شد و این فولیکول‌ها به رشد و تکامل خود ادامه خواهند داد (گردون، 2003).

رشد فولیکول تا مرحله حفره‌دار شدن، به گنادوتروپین‌ها وابسته نمی‌باشد. در ماده‌هایی که هیپیوفیزشان برداشته شده است، رشد فولیکول تا مرحله حفره‌دار شدن به صورت کم و بیش طبیعی ادامه پیدا می‌کند. از سوی دیگر، شکل‌گیری حفره و رشد نهایی آن به طور کلی وابسته به حضور LH و FSH می‌باشد (ضمیری، 1385).

2-2 رشد فولیکول

در رشد و بلوغ فولیکول مجموعه‌ای از تغییرات و دگرگونی‌های پی‌درپی درون سلولی و مولکولی در بخش‌های مختلف فولیکول مشاهده می‌شود که عبارتند از: اووسیت، گرانولوزا و تیکا. این موارد تحت کنترل عوامل داخل تخمدانی، عوامل داخل فولیکولی و عوامل هورمونی می‌باشد که نهایتاً منجر به ترشح اندروژن و استروژن خواهد شد (عمدتا استرادیول). رشد فولیکول که شامل تکثیر و تمایز سلول‌های گرانولوزا و سلول‌های تیکا می‌باشد، تحت کنترل هورمونی بوده و نهایتاً منجر به افزایش قدرت فولیکول‌ها در تولید استرادیول و واکنش به گنادوتروپین‌ها خواهد شد. میزان تولید استرادیول تعیین می‌نماید که کدام فولیکول گیرنده‌های LH را که برای تخمک‌ریزی و تشکیل جسم زرد ضروری است کسب نماید. بروز هر گونه مشکل در واکنش سلول‌های گرانولوزا و تیکا به گنادوتروپین‌ها، منجر به توقف رشد فولیکولی گردیده و پس روی آن‌ها را سبب خواهد شد (ضمیری، 1385).

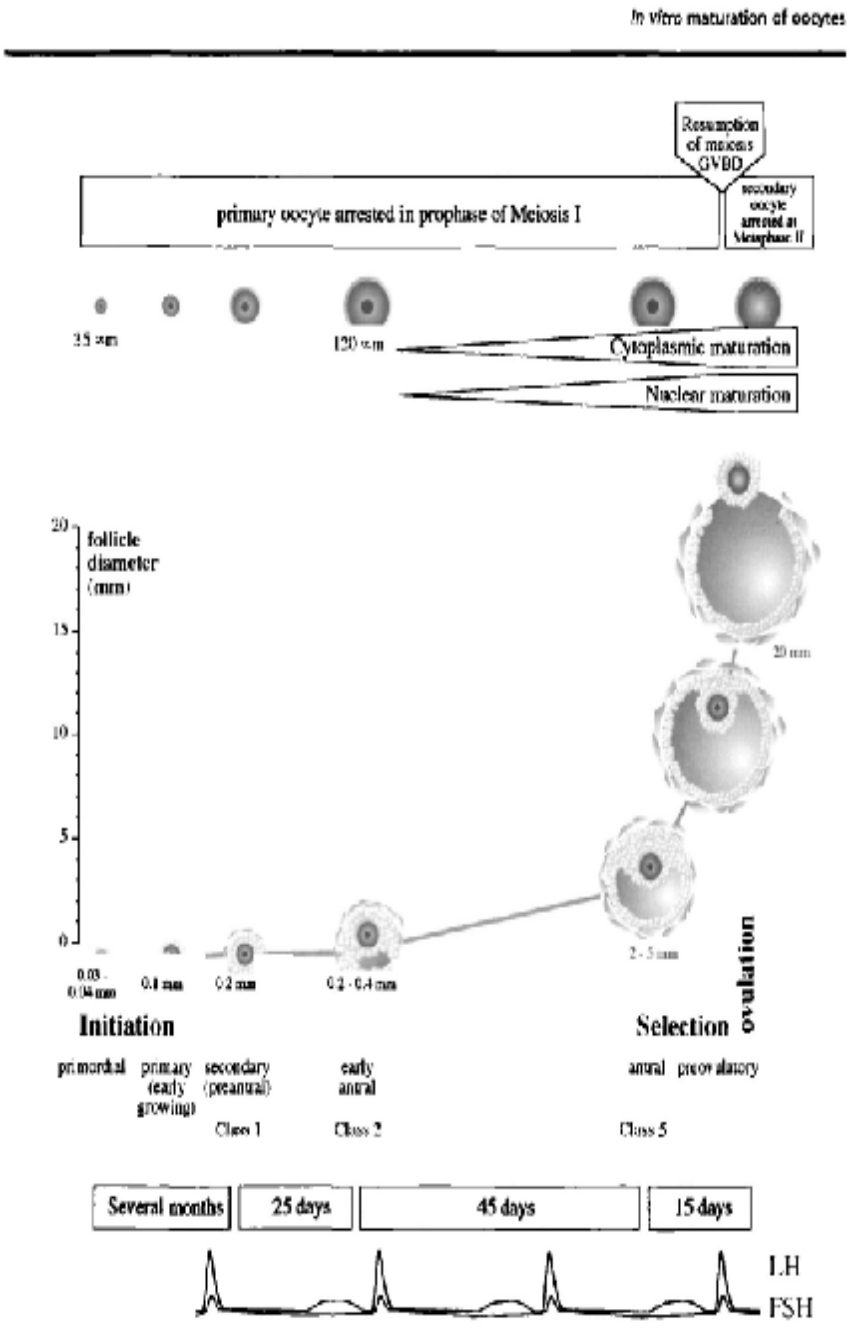
2-2-1 رشد گروهی و انتخاب شدن فولیکول‌های تخمدانی

فولیکول تخمدان واحد فیزیولوژیکی متعادلی است که ساختمان و نقش آن به عوامل خارج سلولی نظیر گنادوتروپین‌ها و سیستم پیچیده‌ی ارتباط داخل فولیکولی بستگی دارد.

در گوسفند تمامی فولیکول‌های سالم با قطر دو میلی‌متر به صورت گروهی رشد می‌کنند و زمانی که فولیکول‌های برتر انتخاب شدند، رشد سایر فولیکول‌ها متوقف می‌شود. رشد گروهی در نژادهای گوسفند متفاوت است. رشد گروهی فولیکول‌ها در گوسفند بورولا، نسبت به گوسفند نژاد مرینو مدت زمان بیشتری طول می‌کشد و شدت انتخاب فولیکول‌های برتر تخمک‌گذار پایین می‌باشد. فولیکولی که انتخاب می‌شود، می‌تواند تا زمان رسیدن به پیک LH منتظر بماند (گردون، 2003).

3-2 فولیکول

یک فولیکول آنترال دارای اووسیت، سلول‌های گرانولوزا، تیکای داخلی ، تیکای بیرونی و آنتروم حاوی مایع فولیکولی و عروق خونی می باشد (ضمیری، 1385).



شکل (2-2) : دیاگرام فولیکول‌سازی و رشد اووسیت و زمان بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی (گردون، 2003).

2-3-1 مایع فولیکولی

مایع فولیکولی عمدتا از پلاسمای خون مجاور فولیکول منشأ می‌گیرد و به صورت تراوش از غشای فولیکول در حفره داخل فولیکول انباشته می‌شود.

ترکیب شیمیایی مایع فولیکولی شامل سرم تراوش شده‌ای است که ترکیب آن به دلیل فعالیت‌های متابولیکی فولیکول تغییر پیدا می‌کند و حاوی موادی نظیر استروئیدها و گلیکوپروتئین‌ها می‌باشد و توسط سلول‌های جداره‌ای فولیکولی ساخته می‌شوند. در جریان رشد فولیکول بین سرم و مایع فولیکولی تعادل برقرار می‌شود. غلظت متابولیت‌های در هر دو بخش مشابه هستند. غلظت این متابولیت‌ها مشابه ترشحات اویداکتی می‌باشد. مایع از ترکیبات متعددی تشکیل یافته است که از لحاظ فیزیولوژیکی اهمیت ویژه‌ای دارند و غلظت بیشتر آن‌ها مشابه با غلظت سرم خون است (جدول 2-1) (گردون، 2003).

جدول2-1 برخی از اجزاء و متابولیت‌های مایع فولیکولی که وظایف فیزیولوژیکی را بر عهده دارد .

اجزای بیوشیمیایی	ترکیبات
پروتئین‌ها	**آلبومین‌ها، گلبولین‌ها، IgA، IgM، فیبرینوژن، لیپوپروتئین‌ها، پپتیدها**
اسیدهای آمینه	**Asn ،Gly ،Ala ،Gln ،Thr ،Asp**
آنزیم‌ها	**داخل سلولی/ خارج سلولی**
کربوهیدرات‌ها	**گلوکز، فروکتوز، فوکوز، گالاکتوز و مانوز**
گنادتروپین‌ها	**FSH، LH / پرولاکتین**
استروئیدها	**کلسترول، اندروژن‌ها، پروژستین‌ها و استروژن‌ها**
پروستاگلاندین‌ها	**PGE ، $PGF_{2\alpha}$**
عناصر/املاح	**سدیم، پتاسیم، منیزیم، روی، مس، کلسیم، گوگرد، کلرفسفات غیرآلی و فسفر**
گلیکوپروتئین‌ها	**گلوکز آمین، گالاکتوزامین، اسید هیالورونیک، هپارین و پلاسمینوژن**
ایمونوگلبولین‌ها	**IgG، ایمونوگلبولین غالب است. IgA نسبت به IgG در مرتبه دوم قرار دارد. با بزرگ شدن فولیکول‌ها تا اندازه قبل از تخمک‌گذاری، غلظت IgG در مایع افزایش می‌یابد.**

2-3-1-1 اعمال مایع فولیکولی

مایع فولیکولی از لحاظ بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و متابولیکی در بلوغ هسته و سیتوپلاسم اووسیت نقش اساسی ایفاء می‌کند. مایع فولیکولی در طول چرخه‌ی فحلی دچار تغییرات چشم‌گیری می‌شود و اعمال متعددی انجام می‌دهد که عبارتند از:

- **تنظیم اعمال سلول‌های گرانولوزا و تحریک رشد فولیکولی و استروئیدسازی**
- **بلوغ اووسیت، تخمک‌ریزی و انتقال تخمک به لوله رحمی**
- **آماده سازی فولیکول برای تشکیل جسم زرد بعدی**
- **عوامل بازدارنده و محرک موجود در مایع چرخه فولیکولی را تنظیم می‌کنند.**

حجم مایعی که به هنگام تخمک‌ریزی آزاد می‌شود از اهمیت خاصی برخوردار است، زیرا همراه با ترشحات لوله رحمی، محیط مناسبی را برای متابولیسم و ظرفیت‌پذیری اسپرم و رشد اولیه رویان فراهم می‌کند. فولیکول‌های سالم درشت توسط مقدار زیاد استرادیول و مقدار نسبتاً کم تستوسترون مشخص می‌شوند. وقتی فولیکول‌های درشت تحلیل می‌روند، سطح استرادیول نسبت به تستوسترون کمتر است (گردون، 2003).

2-3-2 اووسیت

اووسیت موجود در این فولیکول‌ها از لحاظ فیزیکی به حد نهایی رشد خود رسیده و حاوی بخش های مختلفی است که عبارت‌اند از (ضمیری، 1385).

2-3-2-1 هسته یا ژرمینال وزیکول

قطر هسته یا ژرمینال وزیکول به تدریج در اووسیت‌های در حال رشد تا اووسیت‌های کاملا رشد یافته در حال افزایش است. همراه با این وضعیت فراساختاری هسته و اجرام خارج هسته تغییرات پیش‌رونده‌ای ایجاد می‌شود، زمانی که رشد هسته کامل شده باشد، کروماتین موجود در آن ظاهر متراکم‌تری به خود می‌گیرد (ضمیری، 1385).

2-3-2-2 سیتوپلاسم

سیتوپلاسم حاوی اجزای مختلفی است که از جمله می‌توان به میتوکندری، دستگاه گلژی و گرانول‌های قشری (کورتیکال) اشاره نمود. گرانول‌های قشری، اجزای کوچک و کروی متصل به غشاء هستند که در ناحیه قشری اووسیت‌های بارور نشده وجود دارند. مشخص شده است که این اجزا از دستگاه گلژی منشاء گرفته‌اند، با این وجود شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد، اجسام چند حفره‌ای و شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار نیز در این میان سهمی دارند. قبل از زمان تخمک‌ریزی و در زمان لقاح، به همراه رشد اووسیت، تشکیل و تجمع گرانول‌های قشری در حال افزایش است. این اجزاء در زمان لقاح به غشاء پلاسمایی متصل می‌شوند و با آزاد کردن محتویات خود (شامل پروتئیناز) به

داخل فضای پیش ویتلینی خارج سیتوپلاسمی، موجب تغییر در خواص عملی لایه شفاف (زوناپلوسیدا) می‌شوند (گردون، 2003).

2-3-2-3 زوناپلوسیدا

زونا پلوسیدا لایه شفاف و نسبتاً ضخیم خارج سلولی از جنس گلیکوپروتئین است که اطراف تمامی اووسیت‌ها و رویان‌های اولیه را احاطه می‌کند و آن‌ها را از صدمات فیزیکی محافظت می‌نماید. ترکیب پروتئینی آن توسط اووسیت‌های در حال رشد ساخته و ترشح می‌شود. ضخامت این لایه در گونه‌های مختلف متفاوت است. به عنوان مثال قطر آن در جانوران کیسه‌دار حدود یک تا دو میکرومتر و در بعضی گونه‌های دیگر بسیار ضخیم است (در خوک، 16 میکرومتر). سطح خارجی آن یک ساختمان اسفنجی شکل روزنه‌دار است که احتمالا این حالت ناشی از زوائد سلول‌های فولیکولی است که در طی رشد اووسیت از لایه شفاف عبور کرده و تا سطح اووسیت امتداد پیدا می‌کنند. در مقابل، سطح داخلی لایه شفاف دارای ظاهری کاملا دانه‌دانه یا میکروتوبولار است. ظاهر اسفنجی شکل لایه شفاف ممکن است، منعکس کننده بلوغ لایه شفاف اووسیت و قابلیت نفوذپذیری اسپرم به آن باشد. زوناپلوسیدا اووسیت‌های موش، همستر، انسان، خرگوش، رت و اسب حاوی سه خانواده از مولکول‌های گلیکوپروتئینی هستند که به نام‌های ZP_1، ZP_2 و ZP_3 هستند که قادرند به گیرنده‌های خاصی در سطح اسپرماتوزوئید متصل شوند تا عبور اسپرم از این سد امکان‌پذیر گردد (وانی، 2002). یافته‌های پیشین حاکی از آن است که امکان عبور ویروس‌های بسیار کوچک از این سد وجود دارد اما امکان عبور عوامل باکتریایی یا خارجی از سد زوناپلوسیدا وجود ندارد (استنبک و همکاران، 2001). اما مطالعات نشان می‌دهد که نقش‌های پیشنهادی در مورد زوناپلوسیدا به عنوان یک محافظ در برابر باکتری‌های مهاجم و لوکوسیت‌ها یا تهاجم ایمنی غیرمحتمل است، چرا که مولکول‌های بزرگی مثل ایمونوگلوبولین‌ها و حتی ذرات ویروس، مخمر و سلول‌های فولیکولی به راحتی می‌توانند از آن عبور کنند (خطیر و همکاران، 1997).

2-3-2-4 کورونا رادیاتا

در طی اووژنز سلول‌های فولیکولی که بلافاصله در اطراف زوناپلوسیدا اووسیت در حال رشد قرار می‌گیرند به نام کورونا رادیاتا خوانده می‌شوند که زوائد نازک خود را از طریق زوناپلوسیدا به سطح اووسیت می‌رسانند. در بسیاری از گونه‌ها، این زوائد با شروع مجدد تقسیم میوز از زوناپلوسیدا خارج می‌شوند. اما در بعضی گونه‌ها از جمله خرگوش، خارج شدن این زوائد حتی پس از تخمک‌ریزی به طور ناقص انجام می‌شود. به همین دلیل است که در این گونه به راحتی می‌توان سلول‌های کورنا را از سلول‌های کومولوس اووفروس سست شده اطراف آن متمایز نمود (گردون، 2003).

2-3-2-5 کومولوس اووفروس

کومولوس متشکل از سلول‌ها و ماده زمینه بین سلولی است. سلول‌های موجود در این لایه با تجمع تدریجی مایع فولیکولی از لایه سلول‌های گرانولوزا جدا می‌شود و لایه مستقلی را تشکیل می‌دهد. اصلی‌ترین قسمت ماده زمینه این

لایه، هیالورونیک است. ماده زمینه طی از سرگیری مجدد میوز توسط سلول‌های کومولوس ترشح می‌شود. این حالت موجب پراکندگی سریع کومولوس قبل از تخمک‌ریزی می‌شود که یکی از نشانه‌های ظاهری روند بلوغ اووسیت تا مرحله متافاز دو در شرایط برون تنی است (گردون، 2003).

2-3-2-5-1 اثرات سلول‌های کومولوس

عوامل ترشح شده از اووسیت توانایی رشد و نمو اووسیت را افزایش می‌دهند. ظرفیت یک اووسیت بالغ جهت رشد و نمو از ابتدایی‌ترین مراحل زندگی، لقاح، تکامل رویان در مرحله‌ی نزدیک به جایگزینی و جایگزینی، به عنوان توانایی رشد و نمو اووسیت تعریف می‌شود. این ظرفیت معیاری از کیفیت ذاتی اووسیت به شمار می‌رود. اووسیت به تدریج و به طور مداوم، توانایی رشد و نمو را در طی فرایند رشد و نمو فولیکول به دست می‌آورد. این امر همراه با رشد اووسیت و تمایز سلول‌های سوماتیک همراه شده با اووسیت، صورت می‌گیرد. تعداد زیادی از عوامل در طی رشد ونمو فولیکولی بر شایستگی اووسیت اثر می‌گذارند (کریشر، 2004).

1- **اووسیت‌هایی که از فولیکول‌های بزرگ حاصل شده باشند، شایستگی بیشتری نسبت به اووسیت‌هایی که از فولیکول‌های کوچک مشتق شده‌اند، را دارند.**

2- **فولیکول غالب شایستگی رشد و نمو بیشتری دارد.**

3- **تحریک هورمونی رشد و نمو فولیکول، آشکارا شایستگی اووسیت را بهبود می‌بخشد.**

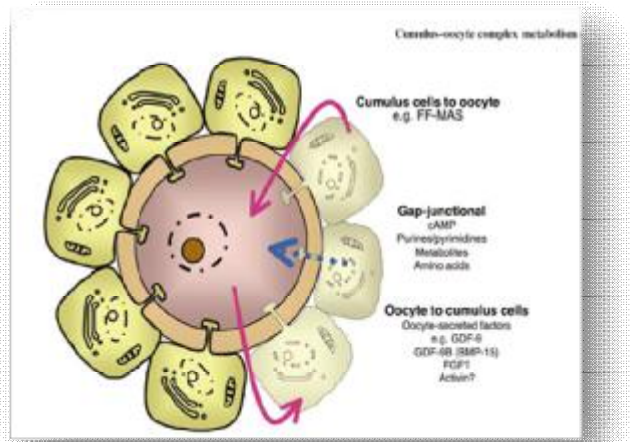
4- **ارتباط بین اووسیت و سلول‌های کومولوسی که آن را در بر گرفته‌اند، برای رشد و نمو یک اووسیت کامل ضروری است.**

به طور قابل توجهی اووسیت‌هایی که در شرایط آزمایشگاهی به بلوغ رسیده‌اند، شایستگی کمتری نسبت به اووسیت‌های بلوغ یافته در شرایط درون‌تنی دارند، این امر به علت نامناسب بودن شرایط محیطی جهت حمایت کردن بلوغ اووسیت کامل می‌باشد. اووسیت‌ها و سلول‌های کومولوس سوماتیکی همراه آنها ارتباطی نزدیک از ابتدایی‌ترین مراحل رشد و نمو فولیکولی برقرار می‌کنند و این جفت‌شدگی برای سالم باقی ماندن اووسیت و تکامل سلول کومولوس ضروری است. به علاوه اووسیت به سلول‌های کومولوس جهت فراهم کردن مواد غذایی و تنظیم پیام‌هایی که برای ارتقا بخشیدن به بلوغ هسته‌ای اووسیت و سیتوپلاسمی ضروری هستند و در نتیجه برای کسب توانایی رشد و نمو، وابسته می‌باشد. در حالی که فولیکول رشد می‌کند و آنتروم شکل می‌گیرد، اووسیت و عوامل رشد پاراکراین ترشح شده از آن نقش مهمی را در تنظیم تمایز سلول گرانولوزا ایفا می‌کنند که سبب تفکیک سلول‌های گرانولوزا به دو نوع سلول متمایز شامل سلول‌های کومولوس و سلول‌های دیواره‌ی گرانولوزا می‌شوند. این دو نوع سلول از نظر فنوتیپی و عملکردی کاملاً از هم مجزا می‌شوند. مشخص شده است که عوامل ترشح شده از اووسیت عملکرد سلول‌های کومولوس احاطه کننده‌شان را کنترل می‌کند که شامل ارتقاء رشد سلول، جلوگیری از مرگ، جلوگیری از تشکیل جسم زرد از طریق تنظیم استروئیدسازی، بازداری از ساخت و کاهش بیان گیرنده هورمون ایجاد کننده جسم زرد می‌باشند (ایپیگ، 2001).

دو خصوصیت کاملاً مشخص عملکرد سلول‌های کومولوس را از سلول‌های دیواره‌ی گرانولوزا متمایز می‌سازد. اولین خصوصیت به ظرفیت بالای سلول‌های کومولوس برای فرایند تکثیر مربوط می‌شود و دومین خصوصیت شامل ظرفیت پایین این سلول‌ها جهت استروئیدسازی است. در آزمایشی مشخص شد که چنانچه اووسیت را از مجموعه‌ی کومولوس- اووسیت توسط فرایند اووسیت برداری حذف کنیم، سلول‌های کومولوس به طور خود به خودی دستخوش تبدیل سریع به فنوتیپ سلول‌های دیواره‌ی گرانولوزا می‌گردند. در واقع ظرفیت تکثیر خود را کاهش داده و به طور کاملاً مشخص فرایند استروئیدسازی خود را افزایش می‌دهند (حافظ و همکاران، 2000). مهم‌ترین موارد در سلول‌های کومولوسی که به دنبال اووسیت‌برداری مشاهده می‌شود، از دست رفتن توانایی برای ساخت **DNA** در پاسخ به تحریک **IGF-I** و افزایش در تولید پروژسترون در ترکیب با حضور **IGF-I** و **FSH** می‌باشد. هر دو این پاسخ‌ها بیشترین خصوصیت از سلول‌های دیواره‌ی گرانولوزا را دارا می‌باشند (لی‌رانگ و همکاران، 2000).

تعداد زیادی از اتصالات شکافدار کوچک بین سلول‌های کومولوس و اووسیت قبل از تخمک‌گذاری وجود دارند. اتصالات شکافدار بر روی سطح اووسیت توسط فرایندهای سلول کومولوس که از زوناپلوسیدا عبور و با سیتوپلاسم اووسیت تماس پیدا می‌کنند، شکل می‌گیرند. ارتباط یونی بین کومولوس و اووسیت با نزدیک شدن زمان تخمک‌گذاری کاهش می‌یابد. ارتباط سلولی مشخصه‌ای از مجموعه‌ی کومولوس- اووسیت است، که در زمان تخمک‌گذاری پایان می‌یابد. به پایان رسیدن ارتباط بین سلول‌های کومولوس و اووسیت، ساز و کاری برای تنظیم بلوغ اووسیت در طی رشد و نمو فولیکولی قبل از تخمک‌گذاری را فراهم می‌کند. سلول‌های گرانولوزایی که در اطراف اووسیت قرار دارند به عنوان کومولوس اوفروس شناخته می‌شوند. سلول‌های کومولوس چندین عامل متابولیکی و تغذیه‌ای را برای اووسیت پیش تخمک‌گذار فراهم می‌کنند. کومولوس‌ها به شدت برای متابولیسم اووسیت اهمیت دارند و به علاوه عوامل ویژه‌ی اثرگذار بر بلوغ اووسیت را توسط ارتباطات درون سلولی به اووسیت انتقال می‌دهند. مشخص شده‌است که اووسیت‌ها تا زمانی که هنوز به کومولوس متصل هستند اندازه‌ی خود را افزایش می‌دهند، اما رشد آن‌ها به محض حذف شدن کومولوس‌ها متوقف می‌شود (گیلولا و همکاران، 1978).

ظرفیت اووسیت‌های پستانداران برای بالغ شدن در شرایط آزمایشگاهی به فعالیت تخمدان، رشد فولیکولی و حضور و عدم حضور سلول‌های کومولوس مربوط می‌شود. وجود سلول‌های کومولوس برای انتقال انرژی جهت حمایت کردن از بلوغ اووسیت در موش، خوک و گاو ضروری است. در برخی از آزمایشات نشان داده شده است که درصد از بین رفتن اووسیت‌های کشت داده شده بدون کومولوس، در طی زمان کشت بالاتر از اووسیت‌های کشت داده شده همراه با سلول‌های کومولوس می‌باشد. مشخص شده است که حضور سلول‌های کومولوس احاطه‌کننده‌ی اووسیت برای بلوغ برون‌تنی تا رسیدن به متافاز دو نسبت به فعالیت فولیکول و اندازه‌ی فولیکول مهم‌تر است (فوکی و همکاران 1980).



شکل(2-3) : ارتباط کمپلکس کومولوس- اووسیت. ارتباط بین اووسیت و سلول‌های کومولوس برای بلوغ نرمال اووسیت ضروری است. فاکتورهایی

که از طریق کانال‌های ارتباطی به درون اووسیت راه می‌یابند عبارتند از: عوامل موثر بر فعال کننده میوز، **cAMP**، پورین‌ها و پریمیدین-ها، متابولیت‌ها، امینواسیدها، فاکتوررشد تمایزی یا **DGF-9** و**DGF-9B** ، **BMP-15** ، **FGF** و اکتیوین (گردون، 2003).

2-3-2-6 لایه سلول‌های گرانولوزا

تعداد سلول‌های گرانولوزا با رشد فولیکولی با تقسیم میتوز افزایش می‌یابند که احتمالا این حالت در پاسخ به استرادیول یا عوامل داخل تخمدانی ایجاد می‌شود. زمانی که فولیکول به رشد خود ادامه می‌دهد، یک کاهش پیش‌رونده در فعالیت میتوزی سلول‌های گرانولوزا دیده می‌شود و یک حالت تغییر وضعیت از تقسیم به طرف تمایز سلولی دیده می‌شود. در مورد تقسیم و تمایز سلولی، سازوکارها و تنظیم‌کننده‌های اندوکرینی و اتوکرینی یا پاراکرینی نقش دارند. در مرحله قبل از تخمک‌ریزی، سلول‌های گرانولوزا از لحاظ ظاهری و عملکردشان در داخل فولیکول از هم متمایز می‌شوند. سلول‌هایی که در مجاورت غشاء پایه (لایه بین سلول‌های گرانولوزا و لایه تیکا) قرار دارند و به نام گرانولوزای جداری خوانده می‌شوند، از نظر شکل ظاهری طویل شده و در این زمان دارای میزان زیادی گیرنده‌های LH هستند. اما داخلی‌ترین لایه سلول‌های گرانولوزا که جدار حفره فولیکولی را می‌پوشانند و هم‌چنین سلول‌های کومولوس اطراف اووسیت حاوی تعداد بسیار کمی گیرنده‌های LH در فولیکول‌های انترال بزرگ هستند و فعالیت استروئیدسازی اندکی دارند. فزون بر این فعالیت میتوزی، لایه‌های مختلف سلول‌های گرانولوزا با هم متفاوت است. به طوری که از طرف غشاء پایه به طرف سلول‌های داخلی‌تر، فعالیت میتوزی این سلول‌ها نیز افزایش می‌یابد. این مشاهدت اکی از تفاوت و تمایز در داخل فولیکول است و این در حالی است که ریشه‌های این تفاوت‌های ظاهری و عملی هنوز دقیقا مشخص نشده‌اند (وانی، 2002).

2-3-2-7 لایه سلول‌های تیکا

این لایه شامل دو قسمت است: لایه داخلی تکا و لایه خارجی تکا. سلول‌های لایه داخلی تکا فقط توسط هورمون LH تحریک می‌شوند و گیرنده‌های این هورمون در زمان شروع تشکیل سلول‌های تکا روی آن‌ها ظاهر می‌شوند. این لایه مسئول ساخت یک سری از هورمون‌ها از جمله پروژسترون، اندروژن، پروستاگلاندین‌ها و هم‌چنین یک سری از عوامل رشد است که در بلوغ اووسیت و تخمک‌ریزی اهمیت دارند. لایه‌های متحدالمرکز لایه خارجی تکا، حاوی سلول‌های عضلانی صاف هستند که توسط پایانه‌های عصبی خودکار عصب‌دهی شده‌اند و در تخمک‌ریزی اهمیت دارند (خدایی، 1386).

2-4 رشد و بلوغ اووسیت

زمانی که فولیکول ابتدایی از منبع ذخیره آزاد می‌شود، رشد فولیکول و اووسیت آن آغاز می‌گردد. با تشکیل حفره، رشد اووسیت تقریباً کامل می‌شود. در تمام طول این فرایند سلولی، سلول‌های کومولوس داخلی، برای مهیا نمودن زمینه رشد اووسیت فعالانه وارد عمل می‌شوند، ضمن این‌که با غشاء سلولی اووسیت ارتباط نزدیکی برقرار می‌کنند. به هنگام