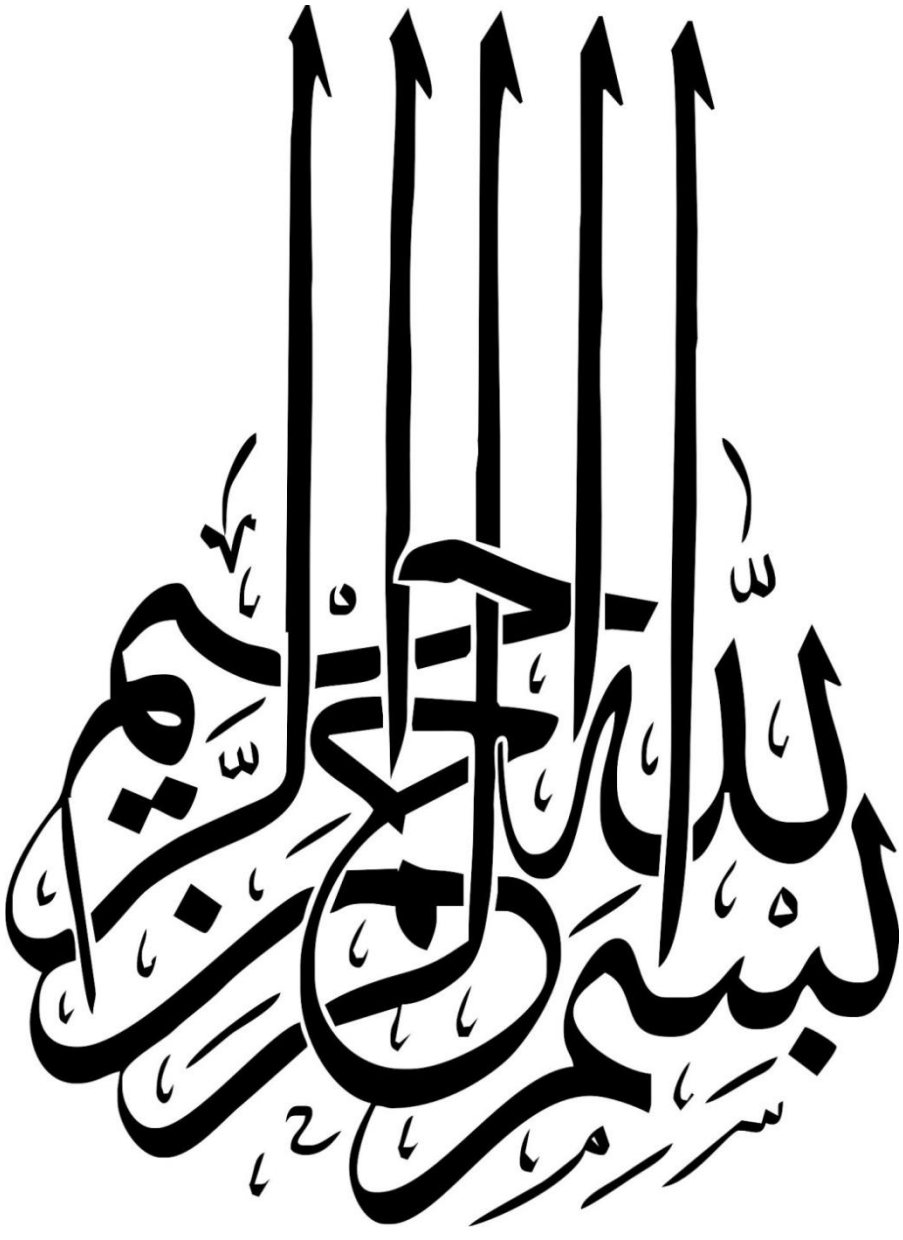
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
دانشکده علوم دامی و شیلات
گروه علوم دامی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد
گرایش فیزولوژی دام

عنوان:

تاثیر ژله رویال بر بلوغ برون تنی اووسایت‌های گوسفند

نگارنده:
محمد ولی اله پور امیری

استاد راهنما:
دکتر حمید دلدار

استاد مشاور:
دکتر زربخت انصاری پیرسرائی

بهمن ۱۳۹۱

ذلک فضل من الله و کفی بالله علیما

سوره نسا آیه ۷۰

چنین فضل از سوی یکتا خداست

که دانایی‌ش بس همه خلق راست

سپاس خداوندرا که نخستین موجود است و پیش از او هیچ نبود و آخرین موجود است و پس از او هیچ نباشد. (صحیفه سجادیه)

سپاسگزاری

از پدر و مادر و خواهرم که پشتیبان همیشگی ام هستند، سپاسگزارم.

از استاد راهنما، آقای دکتر حمید دلدار به دلیل کمک ها و راهنمایی های ارزنده شان سپاسگزارم.

از راهنمایی های استاد مشاورم، آقای دکتر زربخت انصاری تشکر و قدردانی می نمایم.

همواره مرهون زحمات اساتیدی خواهم بود که در کلیه مراحل تحصیلی از آنها کسب علم نموده ام.

از کلیه عزیزانی که در اجرای این پژوهش یاریگرم بودند، متشکرم. دوستان، هم دوره ای ها و همکلاسی های مهربانی طی دوران تحصیل داشتم که یاد و خاطره شان را گرامی می دارم.

و در پایان...

با دست بوسی از پدر و مادرم

این پایان نامه را تقدیم می کنم به

همسر عزیزم

چکیده

پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر درصد های مختلف ژله رویال بر بلوغ برون تنی اووسایت گوسفند انجام شد. تخمدان گوسفند از کشتارگاه جمع آوری شد و تخمدان ها درون فلاسک دارای سرم فیزیولوژیک گرم (۳۵ درجه سانتی گراد) به آزمایشگاه منتقل شدند. کمپلکس اووسایت کومولوس از فولیکول های ۲ تا ۶ میلی متر به روش برش دادن جدا شدند و کمپلکس اووسایت کومولوس در محیط Medium 199 به همراه ۱۰ درصد FBS، ۰/۰۱ U/ml oLH، ۰/۰۱ U/ml oFSH، ۰/۲۲ میلی مولار پیرووات و ۲ میلی مولار گلوتامین به همراه درصد های مختلف ژله رویال کشت داده شدند . پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تیمار در درصد های تیمار بدون ژله رویال (شاهد)، ۰/۲۵ ، ۰/۵و ۱ درصد ژله رویال در چهار تکرار انجام شدند. کمپلکس های اووسایت کومولوس درون محیط کشت بلوغ برون تنی اووسایت قرار داده شدند و بعد از ۲۷ ساعت به بلوغ رسیدند. تاثیر درصدهای مختلف ژله رویال بر بیان نسبی ژن های BAX و BCL2 در اووسایت معنی دار نشد، ولی تاثیر آن بر بیان نسبی ژن BAX در سلول‌های کومولوس در ۰/۵، ۱ درصد ژله رویال معنی دار شد، در صورتی که بر بیان نسبی ژن BCL2 در سلول‌های کومولوس تاثیر معنی داری نداشت. هم چنین تاثیر ژله رویال بر بیان نسبی ژن های HAS2 و StAR در سلول‌های کومولوس درغلظت ۱ درصد معنی دار شد (P<۰/۰۵). یافته‌های این پژوهش نشان داد که افزایش درصد های مختلف ژله رویال به طور معنی داری نرخ بلوغ برون تنی اووسایت ها را از تیمار شاهد (۴۳/۹ درصد) به تیمار یک درصد (۷۹/۸) ژله رویال افزایش داد (P< ۰/۰۱). هم چنین افزایش ژله رویال به طور معنی داری (P< ۰/۰۵) بیان نسبی ژن‌های HAS2 و StAR را در سلول‌های کومولوس افزایش داد و بیان نسبی ژن BAX در سلول‌های کومولوس در ۰/۵، ۱ درصد ژله رویال را کاهش داد. در نتیجه افزودن ژله رویال به محیط کشت برون تنی اووسایت به طور چشمگیری نرخ بلوغ برون تنی اووسایت گوسفند را افزایش داده است.

فهرست مطالب

بخش نخست: مقدمه ۱

مقدمه ۲

هدف پژوهش ۴

بخش دوم: مروری بر پژوهش‌های پیشین ۵

۲-۱- فولیکول ۶

۲-۲- اووسایت ۶

۲-۲-۱- هسته یا ژرمینال وزیکول ۶

۲-۲-۲- سیتوپلاسم ۶

۲-۲-۳- زوناپلوسیدا ۷

۲-۲-۴- مایع فولیکولی ۷

۲-۲-۵- کورونا رادیاتا ۸

۲-۲-۶- کومولوس اووفروس ۸

۲-۲-۷- لایه سلول‌های گرانولوزا ۸

۲-۲-۸- لایه سلول‌های تکا ۹

۲-۳- اووژنز (تنظیم از سر گیری تقسیم‌های میوزی اووسایت) ۹

۲-۴- بلوغ اووسایت درون تخمدان ۱۰

۲-۵- بلوغ هسته ۱۰

۲-۶- بلوغ سیتوپلاسم ۱۱

۲-۷- ژله رویال ۱۲

۲-۸- ویژگی‌های ژله رویال و تاثیر آن بر موجودات زنده ۱۳

۲-۹- آپاپتوزیس ۱۵

۲-۱۰- ژن‌های BCL2 و BAX ۱۸

۲-۱۱- ژن استار (StAR) ۱۸

۲-۱۲- ژن HAS2 ..... ۲۰

بخش سوم: مواد و روش‌ها ۲۱
۳-۱- مواد ۲۲
۳-۱-۱- تخمدان ۲۲
۳-۱-۲- مواد لازم برای محیط کشت ۲۲
۳-۱-۳- هورمون ها ۲۲
۳-۱-۴- کیت ها ۲۲
۳-۱-۵- استوک های محلول برای تهیه محیط کشت ۲۲
۳-۱-۵-۱- استوک سدیم- پیرووات ۲۲
۳-۱-۵-۲- استوک آلانین- گلوتامین ۲۳
۳-۱-۵-۳- استوک اینسولین ترانسفرین سلنییوم (ITS) ۲۳
۳-۱-۵-۴- استوک D- گلوکز ۲۳
۳-۱-۵-۵- استوک HEPES ۲۳
۳-۱-۵-۶- تهیه سرم فیزیولوژیک ۲۳
۳-۱-۵-۷- استوک هیالورونیداز ۲۳
۳-۱-۵-۸- استوک سرم جنین گاوی (FBS) ۲۳
۳-۱-۵-۹- استوک FSH گوسفندی ۲۳
۳-۱-۵-۱۰- استوک LH گوسفندی ۲۴
۳-۱-۵-۱۱- استوک ژله رویال ۲۴
۳-۲- ترکیب محلول ها و محیط های گوناگون ۲۴
۳-۲-۱- محلول Synthetic Oviduct Fluid (SOF) Base 10X ۲۴
۳-۲-۲- محلول SOF HEPES ۲۴
۳-۲-۳- آماده کردن TCM برای محیط کشت تکامل اووسایت ۲۵
۳-۲-۴- محیط کشت تکامل اووسایت گوسفند ۲۶
۳-۲-۵- فسفات بافر سالین (PBS) ۲۶

۳-۲-۵-۱- محلول A ۲۶
۳-۲-۵-۲- محلول B ۲۷
۳-۳- روش‌ها ۲۷
۳-۳-۱- طراحی پژوهش ۲۷
۳-۳-۲- زمان و مکان انجام طرح آزمایشی ۲۷
۳-۳-۳- جمع‌آوری تخمدان ۲۷
۳-۳-۴- جمع‌آوری کمپلکس اووسایت-کومولوس ۲۷
۳-۳-۵- قطره گذاری محیط کشت ۲۸
۳-۳-۶- قرار دادن کمپلکس‌های اووسایت-کومولوس درون محیط کشت ۲۸
۳-۳-۷- ارزیابی بلوغ برون تنی اووسایت‌ها ۲۸
۳-۳-۸- روش های اندازه گیری بیان نسبی ژن ها با استفاده از یک ژن با بیان ثابت ۲۹
۳-۳-۸-۱- روش Livak یا $2^{-\Delta\Delta CT}$ ۳۰
۳-۴- روش جدا سازی RNA از اووسایت و سلول های کومولوس ۳۱
۳-۵- روش ساخت cDNA ۳۲
۳-۶- کیت QuantiFast SYBR Green PCR ۳۲
۳-۶-۱- واکنش Real Time PCR ۳۳
۳-۶-۲- آغازگرهای استفاده شده ۳۳
۳-۶-۳- واکنش‌های Real Time PCR ۳۴
۳-۶-۴- چرخه گرمایی در دستگاه Real Time PCR ۳۵
۳-۷- الکتروفورز فرآورده Real Time PCR ۳۵
۳-۸- روش اندازه‌گیری بیان نسبی ژن‌ها ۳۶
۳-۹- تجزیه آماری داده‌ها ۳۶
بخش چهارم: یافته‌ها ۳۷
۴-۱- یافته‌های آزمایش اول ۳۸
۴-۲- یافته‌های آزمایش دوم ۳۹

۴-۲-۱- تاثیر درصدهای مختلف ژله رویال بر بیان نسبی ژن BAX در اووسایت ۳۹
۴-۲-۲- تاثیر درصدهای مختلف ژله رویال بر بیان نسبی ژن BCL2 در اووسایت ۴۰
۴-۲-۳- بیان نسبی ژن BCL2 نسبت به بیان نسبی ژن BAX در اووسایت ۴۱
۴-۲-۴- تاثیر درصدهای مختلف ژله رویال بر بیان نسبی ژن BAX درسلولهای کومولوس ۴۲
۴-۲-۵- تاثیر درصدهای مختلف ژله رویال بر بیان نسبی ژن BCL2 درسلولهای کومولوس ۴۳
۴-۲-۶- بیان نسبی ژن BCL2 نسبت به بیان نسبی ژن BAX در سلولهای کومولوس ۴۴
۴-۲-۷- تاثیر درصدهای مختلف ژله رویال بر بیان نسبی ژن HAS2 در سلولهای کومولوس ۴۵
۴-۲-۸- تاثیر درصدهای مختلف ژله رویال بر بیان نسبی ژن StAR درسلولهای کومولوس ۴۶
بخش پنجم: بحث ۳۷
۵-۱- تاثیر درصدهای مختلف ژله رویال بر بلوغ برون تنی اووسایت ۴۸
۵-۲- تاثیر درصدهای مختلف ژله رویال بر بیان نسبی ژنهای BCL2 و BAX در اووسایت و سلولهای کومولوس ۵۱
۵-۳- تاثیر درصدهای مختلف ژله رویال بر بیان نسبی ژن StAR و HAS2 در سلولهای کومولوس ۵۳
نتیجه گیری ۵۵
پیشنهادها ۵۶
منابع ۵۷

فهرست جدول‌ها

جدول ۳-۱- آغازگرهای استفاده شده برای بیان ژن‌ها ۳۳

جدول ۳-۲- شرایط دمایی آغازگرهای به کار رفته در اندازه‌گیری بیان ژن‌ها ۳۵

فهرست نگاره‌ها

نگاره ۲-۱ تاثیر افزودن LH به محیط کشت، بر بروز GVBD ۱۱

نگاره ۲-۲ مسیر خارجی آپاپتوزیس ۱۷

نگاره ۲-۳ مسیر درونی یا مسیر میتوکندریایی آپاپتوزیس ۱۷

نگاره ۳-۱- اووسایت دارای جسم قطبی ۲۹

نگاره ۳-۲- الکتروفورز فرآورده Real Time PCR ۳۵

فهرست نمودارها

نمودار ۴-۱- تاثیر درصدهای مختلف ژله رویال بر بلوغ برون تنی اووسایت‌های گوسفند ۳۸

نمودار ۴-۲- تاثیر درصدهای مختلف ژله رویال بر بیان نسبی ژن BAX در اووسایت ۳۹

نمودار ۴-۳- تاثیر درصدهای مختلف ژله رویال بر بیان نسبی ژن BCL2 در اووسایت ۴۰

نمودار۴-۴- بیان نسبی ژن BCL2 نسبت به بیان نسبی ژن BAX در اووسایت ۴۱

نمودار۴-۵- تاثیر درصدهای مختلف ژله رویال بر بیان نسبی ژن BAX درسلول های کومولوس ۴۲

نمودار۴-۶- تاثیر درصدهای مختلف ژله رویال بر بیان نسبی ژن BCL2 درسلول های کومولوس..... ۴۳

نمودار۴-۷- بیان نسبی ژن BCL2 نسبت به بیان نسبی ژن BAX در سلول‌های کومولوس ۴۴

نمودار ۴-۸- تاثیر درصدهای مختلف ژله رویال بر بیان نسبی ژن HAS2 درسلول‌های کومولوس..... ۴۵

نمودار۴-۹- تاثیر درصدهای مختلف ژله رویال بر بیان نسبی ژن StAR درسلول‌های کومولوس ۴۶

بخش نخست

مقدمه

مقدمه

تولید رویان آزمایشگاهی فرآیندی چند مرحله ای است که شامل بلوغ اووسایت، لقاح اووسایت و کشت رویان است. این فن‌آوری، پتانسیل بسیار زیادی برای تولید رویان حیوانات اهلی و همچنین در راستای تحقیق و جستجو در زمینه تولید حیوانات تراریخته و کلونینگ رویان دارد (۱۰). استفاده از این تکنیک باعث افزایش شدت انتخاب بین افراد گله، کاهش فاصله بین نسلی، استفاده از حیوانات حذفی و ذبح شده برای بازیابی ذخیره ژنتیکی شده و از آنجا که با این روش تعداد زیادی اووسایت به دست می‌آید، باعث تولید انبوه می‌شود. تولید و انتخاب رویان یک فن آوری کارآمد است که امکان انجام آزمایش های دقیق به منظور بررسی مشکلات ژنتیکی، سلول شناسی، مشکلات تولید مثلی، ایمنی شناسی، تکامل، فیزیولوژی و بیوشیمی تولید مثل را فراهم می کند. امروزه تولید رویان یا از طریق تخمک ریزی چند تایی ماده‌های برتر و تلقیح مصنوعی و سپس جمع آوری رویان ها انجام می شود و یا این که از راه بالغ کردن، لقاح و کشت برون تنی اووسایت‌ها طی سه برنامه ی بیولوژیکی IVM[1]، IVF[2] و IVP[3] تولید، انتقال و یا منجمد می شود. فنون مربوط به جمع‌آوری اووسایت و رویان از کشتارگاه و یا از راه جراحی حیوانات دهنده، امروزه به وسیله فنون غیر تهاجمی به کمک اولتراسونوگرافی و به دست آوردن اووسایت از حیوان زنده[4] و حتی از حیوانات جوان از راه مهبل و لاپاراسکوپی جایگزین شده است. اووسایت‌هایی که به این طریق تهیه می‌شوند طی فرایند تولید برون تنی رویان، تا مرحله بلاستوسیت پیش رفته و سپس به حیوانات گیرنده‌ی[5] آماده، انتقال داه می‌شوند و یا این که طی فرایند انجماد رویان، منجمد و سپس در برنامه‌های آتی مانند تولید داروهای نوترکیب استفاده می‌شوند(۱۱). اگرچه تکنیک لقاح برون تنی در سال های اخیر پیشرفت چشمگیری داشته است اما همواره موانعی در راه داشته است. با بررسی دقیق‌تر و پژوهش در این رابطه می‌توان بسیاری از این موانع را برداشت تا استفاده از این تکنیک به یک مقبولیت مطلوب و تجاری دست پیدا کند

روش‌های کشت مختلفی به منظور رشد فولیکول ها و تولید اووسایت‌های کاملا بهینه با قدرت باروری، پایه-ریزی شده است. آنچه در همه شیوه‌های کشت مشابه است وجود منابع غذایی، الکترولیت‌ها، اسیدهای آمینه و سایر عوامل مورد نیاز برای رشد فولیکول ها و دیگری حذف همه تولیدات زائد مانند آمونیاک از محیط است که ممکن است تجمع پیدا کرده و برای رشد فولیکول ها مضر باشد (۹۵) . امروزه ثابت شده که رادیکال‌های آزاد در ایجاد بیماری‌هایی مانند سرطان، لوپوس، پارکینسون، آلزایمر، بیماری‌های قلبی-عروقی، نواقص جنینی و مادرزادی و سقط جنین نقش دارند (۴۶). کاهش غلظت رادیکال‌های آزاد در محیط کشت رویان می‌تواند راهی برای بهبود توانایی تکوینی فولیکول‌ها و اووسایت‌های کشت شده در آزمایشگاه و

[1] . In Vitro Maturation
[2] . In Vitro Fertilization
[3] . In Vitro Production
[4] . Ovum Pick Up
[5] . Recipient

به دنبال آن داشتن جنین‌های با کیفیت خوب باشد. یکی از روش‌های مقابله با رادیکال‌های آزاد، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها است (۱۷). رادیکال آزاد به اتم یا مولکولی اطلاق می شود که به دلیل داشتن اوربیتال نیمه پر با سایر اتم‌ها یا مولکول‌های آزاد یا غیر آزاد با مولکول‌های حیاتی بدن از جمله لیپیدها، پروتئین‌ها، قندها و DNA واکنش می‌دهند و آنها را اکسید می‌نماید (۴۶). رادیکال‌های آزاد مسئول پراکسیداسیون لیپیدی اسیدهای چرب غیر اشباع غشای سلولی هستند که منجر به صدمه و مرگ سلولی می شوند و آنتی اکسیدان‌ها به منظور کاهش این تغییرات آسیب رسان استفاده شده اند (۱۱۳).

تکنیک تولید برون تنی رویان گوسفند هنوز رضایت بخش نیست (۲۰ و ۱۱۹) و یکی از دلایل اصلی ناکافی بودن اطلاعات در ارتباط با شرایط کشت اووسایت برای بلوغ برون تنی است (۲۰ و ۶۷). بلوغ مناسب اووسایت‌ها وابسته به حضور مواد مغذی در اطراف سلول کومولوس و تنظیم عملکرد طی این فرآیند است (۸۰).

یافته‌های کشت در شرایط آزمایشگاهی در غلظت زیاد اکسیژن نسبت به محیط بدن انجام می شود که در نتیجه منجر به افزایش مقدار ROS[1] می شود یعنی آنیون سوپر اکسید، هیدروژن پراکسید، رادیکال های آزاد که نقش آن ها در سیستم زنده در حال بررسی است (۷۸). به همین دلیل ترکیبات آنتی اکسیدانی به محیط کشت اضافه می شود تا تاثیر این ترکیبات اکسید کننده خنثی شود . ژله رویال یک ماده آنتی اکسیدان است که مقاومت بدن را در برابر اثرات جانبی و زیان آور شیمی درمانی و اشعه درمانی افزایش می‌دهد و باعث بازسازی سلول ها و افزایش قدرت سیستم ایمنی می شود و حتی خاصیت ضد توموری دارد. و همچنین توانایی مقابله با رادیکال های آزاد مثل آنیون ها، رادیکال های سوپر اکسید و رادیکال های هیدروکسیل را دارد (۱۰۲). ژله رویال ماده‌ای غلیظ و لیمویی رنگ است که از غدد هایپوفارنژیال زنبورهای کارگر تراوش می‌شود و تنها غذای ملکه زنبور عسل است. ژله رویال دارای ویژگی های زیادی بوده و دارای طعم ترش و گس و یک منبع غذایی عالی است. بیوشیمی‌دانان بر این باورند که ژله رویال ترکیبی بسیار کامل از مواد مغذی است.

پژوهش‌های انجام شده درباره ژله رویال به ویژه در زمینه اثر آنتی اکسیدانی آن بسیار اندک است . ما سعی داریم در این پژوهش تاثیر ژله رویال را بر بلوغ برون تنی اووسایت بررسی نماییم و اینکه آیا ژله رویال قابلیت اضافه شدن به محیط کشت به عنوان یک ترکیب موثر بر بلوغ اووسایت را دارد؟

1.Reactive oxygen species

هدف پژوهش

هدف از انجام پژوهش حاضر دستیابی به مناسب ترین درصد از ژله رویال در محیط کشت برای به‌دست آوردن درصد بیشتری از اووسایت‌های بالغ شده با کیفیت مطلوب در شرایط برون تنی است.

بخش دوم

مروری بر

پژوهش های پیشین

۲-۱- فولیکول

یک فولیکول آنترال دارای اووسایت، سلول های گرانولوزا، تیکای درونی و بیرونی است و آنتروم آن دارای مایع فولیکولی و عروق خونی است.

۲-۲- اووسایت

اووسایت موجود در این فولیکول ها از لحاظ فیزیکی به حد نهایی رشد خود رسیده و دارای بخش‌های مختلفی است:

۲-۲-۱- هسته یا ژرمینال وزیکول

قطر هسته یا ژرمینال وزیکول به تدریج در اووسایت‌های در حال رشد تا اووسایت‌های کاملا رشد یافته در حال افزایش است. همگام با این وضعیت، در ویژگی‌های فراساختاری هسته و اجرام خارج هسته تغییرات پیش رونده‌ای ایجاد می شود، زمانی که رشد هسته کامل شده باشد کروماتین موجود در آن ظاهر متراکم - تری به خود می‌گیرد (۲۶).

۲-۲-۲- سیتوپلاسم

سیتوپلاسم دارای اجزای مختلفی است که از جمله می توان به میتوکندری، دستگاه گلژی و گرانول های قشری (کورتیکال) اشاره نمود. گرانول‌های قشری، اجزای کوچک و کروی متصل به غشا هستند که در ناحیه قشری اووسایت‌های بارور نشده وجود دارند. مشخص شده است که این اجزا از دستگاه گلژی منشا گرفته‌اند، با این وجود شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد، اجسام چند حفره‌ای[1] و شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار نیز در این میان سهمی دارند. قبل از زمان تخمک ریزی و در زمان لقاح، به همراه رشد اووسایت، تشکیل و تجمع گرانول‌های قشری در حال افزایش است. این اجزا در زمان لقاح به غشا، پلاسمایی متصل می شوند و با آزاد کردن محتویات خود (شامل پروتئیناز) به درون فضای خارج سیتوپلاسمی، موجب تغییر در ویژگی‌های عملی لایه شفاف (زوناپلوسیدا) می‌شوند (۲۶).

[1]- Multivesicular bodies

۲-۲-۳- زوناپلوسیدا[1]

لایه شفاف یک پوشش شفاف و به نسبت ضخیم خارج سلولی از جنس گلیکوپروتئین است که اطراف تمامی اووسایت‌ها و رویان های اولیه[2] را احاطه می کند و آن ها را از صدمات فیزیکی محافظت می کند. ترکیب پروتئینی آن توسط اووسایت‌های در حال رشد ساخته و تراوش می‌شود. ضخامت این لا یه در گونه های مختلف متفاوت است به عنوان مثال قطر آن در جانوران کیسه دار حدود ۱ تا ۲ میکرومتر و بعضی گونه‌های دیگر بسیار ضخیم است (در خوک، ۱۶ میکرومتر). سطح خارجی آن یک ساختمان اسفنجی شکل روزنه دار است که احتمالا این حالت ناشی از زوائد سلول‌های فولیکولی است که طی رشد اووسایت از لایه شفاف عبور کرده و تا سطح اووسایت امتداد دارند. در مقابل، سطح درونی لایه شفاف دارای ظاهری کاملا دانه دانه یا میکروتوبول‌دار است. ظاهر اسفنجی شکل لایه شفاف ممکن است منعکس کننده بلوغ لایه شفاف اووسایت و قابلیت نفوذ پذیری اسپرم به آن باشد . لایه شفاف اووسایت‌های موش، همستر، انسان، خرگوش، موش صحرایی و اسب دارای سه خانواده از مولکول های گلیکوپروتئینی به نام های ZP_1، ZP_2، ZP_3 هستند که قادرند به گیرنده‌های خاصی در سطح اسپرماتوزوئید متصل شوند تا عبور اسپرم از این سد امکان پذیر شود (۱۱۸). یافته‌های قدیمی‌تر حاکی از آن است که امکان عبور ویروس‌های بسیار کوچک از این سد وجود دارد ولی امکان عبور عوامل باکتریایی یا خارجی از سد لایه شفاف وجود ندارد (۱۱۰). اما پژوهش نشان داد که نقش‌های پیشنهادی در مورد لایه شفاف به عنوان یک محافظ در برابر باکتری های مهاجم و لوکوسیت ها یا تهاجم ایمنی غیر محتمل است، چرا که مولکول‌های بزرگی مثل ایمونوگلوبین‌ها و حتی ذرات ویروس، مخمر و سلول‌های فولیکولی به راحتی می‌توانند از آن عبور کنند (۶۲).

۲-۲-۴- مایع فولیکولی

منشا مایع فولیکولی، تراوش پلاسمای خون به درون حفره فولیکولی است. این مایع دارای ترکیبات مختلف استروئیدها، گلوکزآمینوگلیکان ها، اینهیبین[3]، آنزیم های گوناگون و عوامل رشد مختلف (مانند IGF-1[4] و TGF-α[5]) است که در تنظیم بلوغ هسته و سیتوپلاسم اووسایت نقش دارند (۲۶).

---

[1] - zona pellucida
[2] - Early embryos
[3] - inhibin
[4] - Insulin- like growth factor 1
[5] - Transforming growth factor- alpha