مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ٤، شماره ٢، تابستان ١٣٩٢، ٢٢٣-٢١٧

مطالعه اثر دو نوع سرم هترولوگوس بر قابلیت بلوغ و لقاح برون‌تنی اووسیت های گوسفند

مهدی خدایی مطلق .Ph.D [1*]، احمد زارع شحنه .Ph.D [2]، مرتضی دلیری .Ph.D [3]، حمید کهرام .Ph.D [2]، فرامرز قراگوزلو .Ph.D [4]، مهدی ژندی .Ph.D [2]، حمید دلدار .Ph.D [5]

١- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک
٢- گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
٣- گروه دام و آبزیان، پژوهشگاه ملی ژنتیک
۴- دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
۵- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ساری
پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-motlagh@araku.ac.ir

تاریخ دریافت: ١٣٩١/٨/٣٠ تاریخ پذیرش: ١٣٩١/١١/٢۴

چکیده

هدف: در این مطالعه اثر سرم مادیان و سرم جنین گاوی بر بلوغ و لقاح برون‌تنی اووسیت گوسفند مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی مجموعه اووسیت – کومولوس های پس از استحصال از تخمدان‌های جمع آوری شده از کشتارگاه بر اساس مورفولوژی انتخاب و در محیط کشت فاقد سرم شستشو شدند. اووسیت‌ها به طور تصادفی به ٣ گروه تقسیم شدند، گروه اول اووسیت ها (١٧٠عدد) در محیط TCM199 بدون سرم کشت شدند. اووسیت‌های گروه دوم (١۶٩ عدد) و سوم (١۶٧ عدد) به‌ترتیب در محیط‌های حاوی ١٠ درصد سرم مادیان و ١٠ درصد سرم جنین گاوی کشت شدند. بخشی از اووسیت‌ها پس از بلوغ جهت ارزیابی قابلیت بلوغ رنگ آمیزی شدند و بخشی دیگر جهت بررسی قابیلت لقاح بارور شدند

نتایج: میزان بلوغ اووسیت‌ها در محیط بدون سرم، سرم مادیان و سرم جنین گاوی به‌ترتیب ۵٩/٨٢، ٧٧/۵۵ و ٨٩/٢٧ درصد بود ($P<0/01$). میزان باروری در این محیط‌ها به ترتیب ١٩/٩١، ٣٩/۶۴ و ۵٠ درصد بود که در بین شاهد و سرم مادیان و سرم جنین گاوی تفاوت معنی داری وجود داشت ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که محیط کشت حاوی ده درصد سرم جنین گاوی دارای نرخ بلوغ و باروری بالاتری برای تخمک گوسفند نسبت به محیط کشت حاوی سرم مادیان است.

واژگان کلیدی: سرم مادیان، سرم جنین گاوی، بلوغ برون تنی اووسیت، گوسفند

مقدمه

آگاهی از شرایط مطلوب برای بلوغ برون‌تنی اووسیت سبب تولید اووسیت‌های مناسب برای استفاده در برنامه‌های لقاح برون‌تنی IVF (InVitro Fertilization)، همانندسازی و تولید حیوانات تراریخت را فراهم می‌آورد. بنابراین یکی از مهم‌ترین گامه‌ها در تولید جنین آزمایشگاهی، بلوغ اووسیت‌های نابالغ می‌باشد که در مرحله پروفاز میوز یک متوقف شده‌اند (۱). توسعه هم‌زمان هسته و سیتوپلاسم اووسیت به‌عنوان ملاک بلوغ مطرح است (۲). همچنین بلوغ آزمایشگاهی اووسیت منجر به تولید جنین ارزان و فراوان می‌شود (۳).

لزوم بالغ سازی تخمک‌ها در محیط آزمایشگاهی به منظور کاهش مشکلات ناشی از فزون تحریکی تخمدان در سال‌های اخیر مورد توجه متخصصین لقاح برون‌تنی قرار گرفته است (۴) و بهبود و افزایش کارایی بلوغ تخمک در آزمایشگاه به طور گسترده‌ای موجب پیشرفت در تکنیک‌های جدید تولید مثل شده است. همچنین بلوغ و لقاح برون‌تنی تخمک‌ها، در دام‌ها به‌منظور افزایش تولید و پیشرفت در تحقیقات علمی پایه، انتقال هسته، حذف ژن‌های معیوب و جایگزینی ژن‌های مطلوب، اضافه کردن ژن‌های مقاوم در برابر بیماری‌های خاص، ایجاد حیوانات تراریخت و ایجاد کلون به کمک مهندسی ژنتیک صورت می‌گیرد (۵).

اولین گوسفند حاصل از بلوغ و باروری برون‌تنی در ایران به‌نام رویانا در سال ۱۳۸۵ متولد شد. تخمدان‌های کشتارگاهی یکی از معمول ترین منبع استحصال تخمک‌های مورد نیاز برای بلوغ و باروری برون تنی در شرایط آزمایشگاه می‌باشند و دارای دو مزیت ارزانی و فراوانی هستند (۵).

محیط‌های کشت حاوی مواد شیمیایی، اسید آمینه‌های مختلف، آنتی بیوتیک‌ها ، مواد بیولوژیکی و پروتئینی می‌باشند و استفاده از محیط کشت‌های مختلف موجب نتایج متفاوتی در نتیجه کشت می‌شود. انواع مختلفی از سرم‌های خون به‌عنوان ماده مکمل به محیط کشت افزوده می‌شوند و نقش مهمی را در محیط کشت بازی می‌کنند، اما تا کنون نقش دقیق سرم در بهبود بلوغ و باروری اووسیت و مراحل تکاملی رویان به درستی شناخته نشده است. سرم حاوی پروتئین‌ها، پلی‌پپتیدها، هورمون‌ها، مواد غذایی و معدنی می‌باشد (۶). مشخص شده است که مولکول‌های درشت از جمله پروتئین‌ها و عوامل رشد موجود در سرم برای کشت تخمک ضروری می‌باشند و به‌همین دلیل سرم‌های مختلفی برای کشت تخمک مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۷ و ۸). گزارش‌های متفاوت و متناقضی از اثر انواع سرم‌های مورد استفاده در محیط کشت تخمک بیان شده است (۹ و ۱۰). حضور یک تا پنج درصد سرم در محیط کشت جهت ممانعت از سخت شدن زونا پلوسیدا و در نتیجه عدم نفوذ اسپرم به‌داخل اووسیت ضروری به نظر می‌رسد (۱۱). میزان سخت شدن زونا پلوسیدا قبل از لقاح در اووسیت‌ها همبستگی مثبت با عدم لقاح دارد، اما سخت شدن آن پس از لقاح سبب ممانعت از پلی‌اسپرمی می‌شود. سرم ها به دو شکل همولوگوس و هترولوگوس در محیط کشت افزوده می‌شوند، سرم همولوگ، تخمک و سرم از یک دام است اما سرم هترولوگ از دو دام مختلف است. سرم جنین گاوی مهم‌ترین سرم هترولوگوس در همه گونه ها غیر از گاو می‌باشد. وجود سرم در محیط کشت سبب تسهیل مصرف فاکتورهای رشد می‌شود (۱۲). مقایسه بین سرم فحلی حرارت دیده و حرارت ندیده در سطح ۲۰ درصد نشان داده است که استفاده از سرم دست نخورده باعث بهبود نرخ بلوغ اووسیت می‌شود، شاید کاهش میزان هورمون‌های LH و FSH در سرم حرارت داده شده یکی از علت‌های پایین بودن درصد بلوغ اووسیت باشد (۵) از سال ۱۹۶۰ محیط کشت تجاری TCM199 به‌عنوان مهم‌ترین و معمول‌ترین محیط کشت جنین پستانداران بود که اگرچه در حال حاضر هم بعضی از آزمایشگاه‌های تحقیقاتی تمایل به استفاده از این محیط کشت با افزودن سرم و سایر فاکتورهای رشد دارند ولی میزان تکوین بلاستوسیست‌های پستانداران در این محیط به‌ندرت بیش از ۳۰ تا ۴۰ درصد خواهد بود (۱۳). یکی از معمول‌ترین افزودنی‌ها، سرم جنین گاو است که مقالات متعددی در زمینه اثرات آن وجود دارد. سرم‌های طبیعی اثرشان بسیار بیشتر از پلاسما در تحریک رشد سلول می‌باشند که شاید ناشی از فعال شدن و رها شدن پلی‌پپتیدهای معینی در طول فرایند لخته شدن باشد (۱۴). از مزایای سرم جنین گوساله (FBS) این است که بسیاری از مواد لازم برای رشد و تکثیر سلول را دارا می‌باشد و مکمل رشد در بسیاری از گونه‌های حیوانی و انسان است. و هم‌چنین استفاده از این سرم سبب کاهش صرف زمان و تلاش برای فرموله کردن محیط کشت برای انواع سلول‌ها می شود.

با توجه به این که تاکنون هیچ پژوهشی در خصوص اثر سرم مادیان بر بلوغ و باروری آزمایشگاهی اووسیت گوسفند انجام نشده است لذا این پژوهش با هدف قیاس سرم مادیان با سرم

جنین گاوی که به‌عنوان سرم هترولوگوس رایج در محیط کشت استفاده می‌شود بر روی بلوغ و لقاح برون‌تنی اووسیت گوسفند انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی است که برروی تخمک‌های تخمدان گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه کرج راک و طی یک سال انجام گرفته. تخمک‌ها پس از مراحل شستشو در محیط کشت داده شدند. محیط کشت پایه برای بلوغ تخمک‌های جمع آوری شده TCM- 199 (شرکت گیبکو) بوده که به صورت تجاری در دسترس می‌باشد و متداول‌ترین محیط کشت مورد استفاده در بلوغ تخمک پستانداران است. این محیط حاوی املاح مختلف، قندها، اسیدهای امینه، ویتامین ها و اسیدهای نوکلئیک باشد.

تهیه سرم مادیان: خون مادیان از سیاهرگ وداج ۲ راس اسب سالم در فصل جفت‌گیری پس از انجام توشه رکتال و سونوگرافی و اطمینان از فعال بودن تخمدان‌ها در مرحله دی‌استروس جمع آوری شد. سرم طبق دستورالعمل تفکیک شد (۱۵ و ۱۶).

جمع آوری و کشت تخمک‌ها: تعداد ۲۰۰ تخمدان گوسفند بلافاصله پس از کشتار دام در کشتارگاه کرج راک جمع آوری شده و حداکثر در مدت ۲ ساعت بعد از کشتار، در فلاسک حاوی سرم فیزیولوژی و آنتی بیوتیک در دمای سرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل گردید.

تخمدان‌ها چند بار با سرم فیزیولوژی استریل شستشو و تخمک‌ها به روش برشی با اسکالپل از فولیکول‌های سطح تخمدان تخلیه شده و پس از انتقال به پتری دیش، توسط میکروسکوپ استریو جهت جمع آوری اووسیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

تخمک‌های جمع‌آوری شده براساس تعداد لایه سلول‌های کومولوس اطرافشان دسته بندی شدند؛ دسته اول تخمک‌هایی که در اطرافشان چند لایه سلولی متراکم از سلول‌های کومولوس داشتند. دسته دوم، تخمک‌هایی که دو یا سه لایه از سلول‌های کومولوس را در اطراف خود داشتند و دسته سوم، تخمک‌های فاقد سلول‌های کومولوس بودند که به اصطلاح تخمک های لخت اطلاق می‌گردند. در این مطالعه از میان ۱۱۵۲ تخمک جمع آوری شده، ۵۰۶ تخمک با کیفیت خوب (و از دسته اول که حاوی بیش از سه لایه کومولوس متراکم به همراه سیتوپلاسم گرانوله یکنواخت بودند) برای بلوغ آزمایشگاهی انتخاب شدند.

محیط کشت پایه شستشو شامل مواد TCM199 (Gibco cat. No. 31100-027) و ۲۵ میلی‌مول $NaHCO_3$ ۵۰ میکروگرم پنی سیلین- استروپتومایسین (Gibco cat. No.15140-148) ۵ میلی‌مول سدیم پیرووات_(Sigma cat. No 4625) بود. محیط کشت شامل TCM199 به همراه آنتی بیوتیک و سدیم پیرووات LH و FSH که در گروه شاهد و دو تیمار دارای سطوح ۱۰ درصد سرم حرارت دیده مادیان و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی بود. تخمک‌ها درون قطره‌های ۵۰ میکرولیتری محیط کشت درون انکوباتور حاوی پنج درصد CO2 رطوبت ۹۵ درصد قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت سلول‌های اووسیت‌های کشت شده از انکوباتور خارج شده و بر اساس میزان پراکنده شدن سلول‌های کومولوس در سه گروه مختلف طبقه بندی شدند: گروه اول سلول‌های کومولوس به طور کامل پراکنده شدند. گروه دوم سلول‌های کومولوس نسبتا پراکنده شدند و گروه سوم سلول‌های کومولوس پراکنده نشدند.

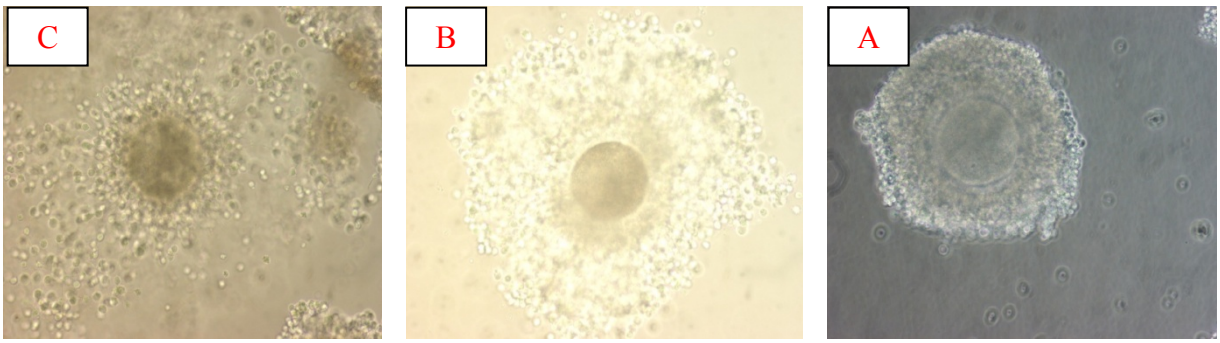
از هر دسته از اووسیت‌ها پس از کشت به صورت تصادفی کومولوس اطراف آن‌ها با TCM199 حاوی یک درصد هیالورونیداز زدوده شد و در زیر میکروسکوپ جهت تعیین مراحل رشد و بلوغ مورد ارزیابی قرار گرفتند. در گروه اول بیش از ۹۵ درصد از اووسیت‌های رنگ شده مراحل بلوغ را به طور کامل طی کرده و در مرحله متافاز میوز دو بودند، در حالی‌که در گروه دوم و سوم این عدد بسیار پایین بود. بنابراین حدود ۹۵ درصد از اووسیت‌های گروه اول به عنوان اووسیت‌های بالغ در نظر گرفته شدند و در مراحل بعدی ملاک بلوغ پراکنده شدن کامل سلول های کومولوس در نظر گرفته شد و پس از ۲۴ ساعت کشت، اووسیت‌ها (در محیط کشت بلوغ) شستشو شده و به درون قطرات محیط باروری شامل: تی. ال. بیس ۱۰ میلی‌لیتر، هپارین ۱۰۰میلی‌لیتر، سدیم پیرووات ۱/۱۲ میلی‌گرم، بی‌کربنات سدیم ۲۰ میلی‌گرم و آلبومین سرم گاوی ۶۰ میلی‌گرم منتقل شدند. در این مرحله اسپرم‌های ظرفیت‌دار شده (در محیط .TL). Sperm قطرات افزوده شدند و پس از ۲۴ ساعت کشت، اووسیت مابین لام و لامل فیکس شده و مورد بررسی قرار گرفت. حضور دو پرونوکلئوس در درون اووسیت نشان از بارور شدنشان بود و مورد شمارش قرار گرفتند.

آنالیز آماری: داده‌ها به وسیله نرم افزار SAS با رویه GLM آنالیز شدند و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون توکی انجام شد.

نتایج

در مطالعه حاضر از ۲۰۰ تخمدان جمع‌آوری شده در مجموع ۱۱۵۲ تخمک حاصل و تعداد ۵۰۶ تخمک با کیفیت خوب (دارای بیش از سه لایه سلول کومولوس) انتخاب و در سه محیط مختلف، کشت داده شد. میزان بلوغ تخمک‌ها با استفاده از میزان پراکندگی سلول‌های کومولوس و مشاهده جسم قطبی مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. محیط‌های کشت حاوی تخمک ۲۴ ساعت در انکوباتور در شرایطی که توضیح داده شد قرار گرفته و پس از آن با استفاده از میکروسکوپ نوری تخمک‌ها از نظر پراکندگی سلول‌های کومولوس (شکل ۱) مورد ارزیابی قرار گرفتند. همان‌طور که در جدول ۱ آمده است میزان بلوغ اووسیت‌ها در محیط عاری از سرم، سرم مادیان و سرم جنین گاوی به ترتیب ۵۹/۸۲، ۷۷/۵۵ و ۸۹/۲۷ درصد بود که دارای تفاوت معنی داری بودند (P<۰/۰۱).

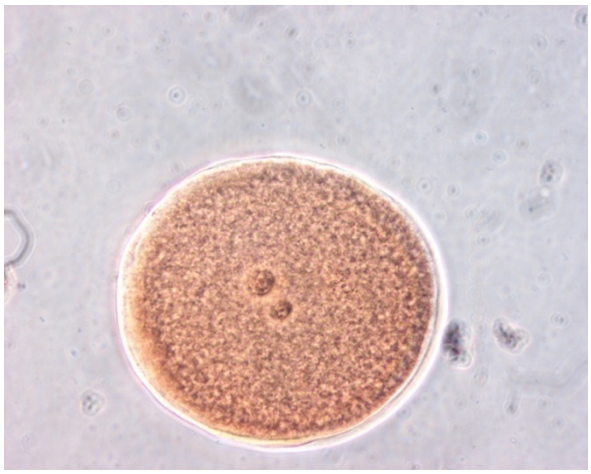
میزان باروری در این محیط‌ها (جدول و شکل ۲) به ترتیب ۱۹/۹۱، ۳۹/۶۴ و ۵۰ درصد بود که در بین شاهد و سرم مادیان و سرم جنین گاوی تفاوت معنی داری داشت (P<۰/۰۵).



شکل ۱: پراکنده شدن سلول‌های کومولوس از اطراف اووسیت: بدون پراکندگی (A) پراکندگی متوسط (B) و پراکندگی کامل (C).

جدول۱: مقایسه اثر سرم مادیان و سرم جنین گاوی بر بلوغ اووسیت های گوسفند در محیط TCM-199

نوع سرم	تعداد کل اووسیت	بالغ شده	سطح احتمال
بدون سرم	۱۷۰	۵۹/۸۲±۲/۱۲	۰/۰۱
سرم مادیان	۱۶۹	۷۷/۵۵±۲/۱۲	۰/۰۱
سرم جنین گاوی	۱۶۷	۸۹/۲۷±۲/۱۲	۰/۰۱



شکل ۲: اووسیت بارور شده که پرونوکلئوس‌های آن به وضوح قابل مشاهده هستند.

جدول۲: مقایسه اثر سرم مادیان و سرم جنین گاوی بر باروری اووسیت های گوسفند در محیط TCM-199

نوع سرم	تعداد کل اووسیت	بارور شده	سطح احتمال
بدون سرم	۱۰۲	۱۹/۹۱±۲/۶۸	۰/۰۵
سرم مادیان	۱۳۱	۳۹/۶۴±۲/۶۸	۰/۰۵
سرم جنین گاوی	۱۴۹	۵۱±۲/۶۸	۰/۰۵

بحث

در این تحقیق پراکندگی سلول‌های کومولوس به‌عنوان فاکتوری برای تعیین بلوغ تخمک‌ها در نظر گرفته شد. سلول‌های کومولوس در اثر افزایش ترشح گنادوتروبین قبل از تخمک‌گذاری پراکندگی پیدا می‌کنند و شکاف‌های اتصالی بین سلول‌های کومولوس مجاور و بین سلول‌های کومولوس و تخمک شکسته می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن سرم مادیان همانند سرم جنینی گاو بر بلوغ تخمک‌های گوسفند موثر بود و افزودن هر دو سرم هترولوگوس به‌صورت دو تیمار جداگانه اثراتی بهتر از گروه کنترل ایجاد نمود.

بسیاری از محققین افزودن سرم را به‌عنوان یک ماده مکمل به محیط کشت تخمک، سبب بهبودکیفیت این محیط‌ها می‌دانند. مشخص شده است که مولکول‌های درشت موجود در سرم برای کشت تخمک ضروری می‌باشند و به همین دلیل سرم‌هایی مختلفی از جمله سرم گوسفند، سرم گوساله جنینی، سرم گاومیش فحل و سرم بز فحل در محیط کشت تخمک مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۳ و ۱۷). سرم حاوی انواع مختلفی از مواد از جمله هورمون‌ها، عوامل رشد، ویتامین ها، مواد شلاته کننده، یون‌های فلز سنگین، پپتیدها، پروتئین‌ها و یک سری از مولکول‌های مشخص و نامشخص است (۱۷ و ۱۸). با این وجود مواد موثر این سرم‌ها هنوز ناشناخته مانده‌اند و نقش دقیق سرم در حمایت از بلوغ و باروری تخمک به درستی شناخته نشده است، هر چند که محققین بر این باورند که پروتئین‌ها و عوامل رشد موجود در سرم در موفقیت کشت آزمایشگاهی سهیم هستند. گزارش‌های مختلف بیانگر نتایج متفاوت و بعضا متناقض از اثر انواع سرم‌های مورد استفاده در محیط کشت تخمک می‌باشد. گزارش تاجیک و اسفندآبادی (۱۰) تاثیر محیط های کشت مختلف بر بالغ سازی تخمک‌های بز نشان داد که بلوغ تخمک‌ها در محیط‌های حاوی سرم میش فحل (FBS) و سرم جنین گاو اختلاف معنی‌داری نداشت اما در سرم بز فحل (ESS) در مقایسه با محیط بدون سرم میزان بلوغ به طور معنی‌داری افزایش یافت. نتایج حاصل از این تحقیق نیز نشان داد که میزان بلوغ تخمک در گروه کنترل (بدون سرم) در مقایسه با گروه‌های حاوی سرم از نظر آماری به طور معنی‌داری کمتر بوده است.

در این تحقیق سرم مادیان مورد استفاده قرار گرفت و در مقایسه با گروه کنترل اثرات مثبتی بر بلوغ تخمک‌ها ایجاد نمود. ترکیبات موجود در سرم در مراحل مختلف سیکل استروس، دایم در حال تغییر هستند و حتی مشخص شده است که در زمان‌های مختلف مرحله فحلی هم اجزای مولکولی سرم همگام با تغییرات اندوکرینی متغیر هستند. امکان دارد که دریافت و مورد استفاده قرار دادن انواع خاصی از مواد موجود در سرم توسط تخمک در زمان خاصی که با روند طبیعی بلوغ و باروری آنها هم‌خوانی دارد از ضروریات بسیار مهم بلوغ تخمک باشد. شاید به همین دلیل است که گزارش‌های مختلف، نتایج متفاوت و بعضا متناقض از انواع سرم‌های مورد استفاده درمحیط کشت تخمک به چشم می‌خورد. برخی از پژوهشگران استفاده از سرم گوساله جنینی (FCS) را بر سایر انواع سرم‌ها ترجیح می‌دهند. اغلب این محققین اعتقاد دارند برخی مواد محرک رشد ناشناخته است که در سرم حیوانات بالغ وجود ندارد یا این سرم فاقد اجزایی همچون هورمون‌ها و ایمونوگلوبین‌هایی است که وجود آن‌ها درسرم حیوانات بالغ موجب تاخیر در تکامل سلول‌ها در آزم ایشگاه می‌شوند. برخی دیگر استفاده از سرم حیوانات فحل را به‌دلیل از سرگیری میوز و بلوغ تخمک در زمان فحلی در محیط کشت تخمک توصیه می‌کنند (۱۹).

روا و همکاران (۱) با افزودن ده درصد سرم میش فحل و مایع فولیکولی به محیط کشت، نرخ بلوغ ۸۶ و ۷۶ درصد را گزارش کردند که در مقایسه با سرم مادیان درصد بلوغ بالاتر است. تاجیک و شمس اسفندآبادی (۱۰) با افزودن سه سطح ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد سرم فحلی میش به محیط کشت در بلوغ اووسیت بز تفاوت معنی‌داری در نرخ بلوغ اووسیت مشاهده نکردند. نتایج آزمایش خارچی و همکاران (۱۷) با نتایج آزمایش حاضر تفاوت داشت. در مطالعه آنها با افزایش سطوح سرم بز فحل به محیط

کشت اووسیت بز افزایش معنی‌داری در بلوغ اووسیت مشاهده شد. افزودن سرم انسانی به محیط کشت اووسیت گوسفند در مقایسه با سرم گوسفندی نتایج بهتری بر بلوغ داشت. سرم روز ۱۶ چرخه فحلی گوسفند نسبت به سرم سایر روزهای چرخه فحلی (روزهای غیرفحلی) و آبستنی تاثیر زیادی بر بلوغ اووسیت‌های گوسفند داشته است (۱).

سرم جنین گاوی نسبت به سرم حرارت دیده مادیان دارای عمل‌کرد بهتری بر بلوغ اووسیت داشت، شاید به دلیل ساختار خاص میکروسکوپی جفت در گاو (اپیتلیوکوریال) که از عوامل مهم در اثرات مثبت سرم جنین گاوی در محیط‌های کشت سلولی می‌باشد زیرا با توجه به فاصله شش لایه مابین مادر و جنین سبب ممانعت از عبور ایمونوگلوبولین ها از خون مادر به جنین می‌شود و ایمونوگلوبولین‌های مورد نیاز جنین در ساعات اولیه پس از تولد از طریق مصرف آغوز جذب سیستم گوارش گوساله می‌گردد. در سرم جنین گاو فاکتورهای فعال کننده آبشار کمپلمان (ایمونوگلوبولین‌ها) حضور ندارند، لذا سرم جنین گاوی به‌عنوان سرم هترولوگوس عمومی در کشت اووسیت همه گونه‌ها با موفقیت به کار گرفته شده است. از طرف دیگر ایزوله بودن فضای زندگی جنین نسبت به دام‌های بزرگسال دارای سرم عاری از هر نوع آنتی بادی و عوامل مضر می باشد. همچنین به‌دلیل این‌که جنین در مراحل رشد واقع شده است سرم آن حاوی فاکتورهای متعدد رشد می باشد که می تواند رشد و بلوغ اووسیت را تسریع نماید (۲۰).

میزان باروری در محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی بالاتر از محیط کشت حاوی سرم مادیان می‌باشد. یکی دیگر از دلایل احتمالی در این تفاوت را می‌توان به میزان زیاد پروتئین فیتوئین در سرم جنین گاوی نسبت داد. در حیوانات بزرگسال میزان فیتوئین کمتر از حیوانات نابالغ و به‌خصوص جنین می‌باشد. هنگام بلوغ اووسیت گرانول‌های غشایی، پروتئازهایی آزاد می‌نماید که این پروتئازها با تاثیر بر اجزای مولکول‌های گلیکوپروتئینی غشا زونا پلوسیدا سبب فسفریلاسیون ZP_2 به ZP_{2f} می‌شود که پس از این فسفریلاسیون زونا پلوسیدا سخت می‌شود. فیتوئین گلیکوپروتئین اصلی سرم بوده که ۴۵ درصد بخش پروتئینی سرم را به خود اختصاص داده است که با فعالیت آنتی پروتئازیش سبب ممانعت از فسفریلاسیون ZP_2 می‌شود(۲۱) همان‌طور که قبلا عنوان شد فیتوئین سرم جنین گاوی بیش از فیتوئین دام‌های بزرگسال بوده و لذا سخت شدن زونا پلوسیدا در محیط حاوی سرم جنین گاوی نسبت به سرم مادیان حرارت دیده کمتر اتفاق می‌افتد بنابراین میزان باروری بالاتری مشاهده می‌شود. در محیط بدون سرم میزان باروری بسیار پایین بود که احتمالا عدم حضور سرم در این محیط سبب سخت شدن زوناپلوسیدا شده و از نفوذ اسپرم به داخل اووسیت ممانعت شده و میزان باروری کاهش یافته است (۲۰).

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که وجود سرم در محیط کشت بلوغ و باروری تخمک ضروری است و استفاده از سرم مادیان در محیط کشت باروری و بلوغ تخمک، نمی‌تواند جایگزین مناسبی برای سرم جنین گاوی باشد.

منابع

1. Roa BS, Naidu KS, Amarnath D, Vagdevi R, et al. In vitro maturation of sheep oocytes in different media during breeding and non-breeding seasons. Smal. Rumin. Research. 2002; 43: 31-36.

2. Sun Q, Nagai T. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. J. of Reprod and Develop. 2003; 49: 347-359.

3. Nadi S, Ravindranatha BM, Gupta PSP, Sarma PV. Timing of sequential changes in cumulus cells and first polar body extrusion during in vitro maturation of buffalo oocytes." Theriogenology 2002; 57: 1151 – 1159.

4. Hreinsson JR, Friden B, Levkov L. Recombinant LH is equally effective as recombinant hCG in promoting oocyte maturation in clinical invitro maturation programme: a randomized study. Hum. Repro, 2003; 18: 2131-2136.

5. Gordon I. Reproductive technology in farm animals, CABI publication. 2005.

6. Saeki K, Hoshi M, Leibfried L, First NL. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in seum-free medium. Biol Reprod 1991;44: 256-260.

7. Sanbuissho A, Threlfall WR. The effect of estrouse cow serum on the in vitro maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. Theriogenology, 1989; 31: 693-699.

8. Takagi Y. Development of bovine oocytes matured, fertilized and cultured in a serum-free, chemically defined medium. Theriogenology, 1991; 35: 1197- 1205.

9. Fukui Y, Ono H. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in-vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. Reprod. Fertil.1989; 86: 501-506.

10. Tajik P, Shams Esfandabadi E. In vitro maturation of caprine oocytes in different culture media. Smal. Rumin. Research. 2003; 47: 155-158.

11. Wani NA. In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes." Small Ruminant Research. 2002; 44: 90 – 95.

12. Palasz AT, Thundathil J, Verralland RE, Mapletoft RJ. The effect of macromolecular supplementation on the surface tension of TCM-199 and the utilization of growth factors by bovine oocytes and embryos in culture. Anim Reprod Sci. 2000; 58: 229 – 240.

13. Moulavi FHS, Ashtiani SK, Shahverdi A, et al. Can Vero cell co-culture improve in-vitro maturation of bovine oocytes?" Reprod Biomed. 2006; 13(3): 404-411.

14. Gospodarowicz, D, Ill CR. Do plasma and serum have different abilities to promote cell growth? Proc. Natl. Acad. Sci. 1980;. 77(5): 2726-2730.

15. Balk SD, Levine SP, Young LL, LaFleur MM, et al. Mitogenic factors present in serum but not in plasma. Proc Natl Acad Sci. 1981; 78(9): 5656-5660.

16. Willis P, Caudal AB, Fayrer-Hosken RA. Equine oocyte in vitro maturation : influences of sera, time, and hormones. Molecular Reproduction and Development 1991; 30: 360 – 368.

17. Kharche SD, Sharma GT, Majumdar AC, In vitro maturation and fertilization of goat oocytes vitrified at germinal vesicle stage. Small Ruminant. Smal. Rumin. Research. 2005; 57: 81–84.

18. Gordon I. controlled reproduction in sheep and goats., CAB International publishing, Wallingford. 1997.

19. Isachenko VV, Ostashko FI, Isachenko EF, Soler C, et al. Effect of heat-inactived and non-inactivated estrous cow sera on maturation of bovine oocyte " J.of Endocrin 1994; (supplement) 140: 212.

20. Allen CS, Richard MS, Gregory SK, Frederick RT, et al. Fetuin Inhibits Zona Pellucida Hardening and Conversion of ZP2 to ZPZ during Spontaneous Mouse Oocyte Maturation In Vitro in the Absence of Serum. Biol Reprod. 1990; 43: 891-897.

21. Vanderhyden BC, Armstrong DT. Role of cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. Biol Reprod. 1989; 40: 720-728.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2013; 4(2): 217-223

Original Article

Effect of Two Heterologous Sera on Meiotic and Fertilization Capacity of the Ovine Oocytes *In Vitro*

Khodaei Motlagh M. Ph.D.[1*], Zareh Shahne A. Ph.D.[2], Daliri M. Ph.D.[3], Kohram H. Ph.D.[2], Gharegozloo F. Ph.D.[4], Zhandi M. Ph.D.[2], Deldar H. Ph.D.[5]

1. Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Arak University, Arak
2. Department of Animal Sciences, Faculty of Agricultural Sciences & Engineering, College of Agriculture & Natural Resources ،University of Tehran, Karaj, Iran.
3. Department of Animal and Marine Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology
4. Department of Obstetrics and Genital Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran
5. Department of Animal Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

*Email corresponding author: m-motlagh@araku.ac.ir

Received: 20 Nov. 2012 Accepted: 12 Feb. 2013

Abstract

Aim: The aim of this study was to investigate the effece of mare serum and fetal bovine serum (FBS) on meiotic and fertilization capacity of sheep oocytes in vitro

Material and Methods: Cumulus Oocyte Complexes (COCs) were recovered from ovaries using slicing method. COC's were washed three time in maturation medium without any serum supplementation. The COC's were randomly divided into three groups. Group 1 (n = 170) COC's were fresh control and cultured in maturation medium without serum supplementation. Group 2 (n = 169) COC's were cultured in maturation medium supplemented with 10% mare serum. Group 3 (n = 167) COC's were cultured in maturation medium supplemented with 10% FBS. Cumulus expansion was the index of oocyte maturation. To fertilize the mature oocytes, 24 h after maturation oocytes were transferred to the fertilization medium and then sperm was added to the fertilization medium. Twenty four hours post-fertilization, oocytes were denuded mechanically by gentle pipeting, fixed in a mixture of acetic acid and alcohol, stained for 10 min with 1% (w/v) orcein in 45% acetic acid and examined for their fertilization potential.

Results: The rate of oocyte maturation in groups 1, 2 and 3 were 59/82%, 77/55% and 89/27%, respectively. The rate of fertilization in three groups was 19/19%, 39/64% and 50%, respectively. Significant difference was observed between three groups ($p < 0.05$).

Conclusion: The results showed that the medium contain 10% percent fetal bovine have higher in vitro maturation and fertilization of oocyte rates than mare serum and the control groups.

Keywords: Mare serum, FBS, In vitro oocyte maturation , sheep