جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

# مقایسه اثر غلظتهای مختلف سرم جنین گاو و سرم میش فحل بر بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای گوسفند

دکتر حمید قاسم‌زاده‌نوا[1]، دکتر پرویز تاجیک*[1] دکتر محمود بلورچی[1]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه‌تهران، دوره ۵۵ ، شماره ۱، ۳۲-۲۹، (۱۳۷۹)

**هدف از این بررسی ارزیابی اثر غلظتهای مختلف سرم جنین گاو و سرم میش فحل بر بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای گوسفند بود. تخمدانهای گوسفندان از دامهای ذبح شده در کشتارگاه گرفته شده و به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه تخمکهای موجود در داخل فولیکولهای تخمدان با استفاده از سرنگ و روش مکش گرفته شده و پس از ۴ بار شستشو در محیط کشت سلولی TC-199 حاوی مقادیر معینی از دو نوع سرم به نامهای سرم جنین گاو (Fetal calf serum) و سرم میش فحل (Estrous sheep serum) کشت داده شد. پس از کشت به‌مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۸/۵ درجه سانتیگراد و فشار ۵ درصدازگاز $Co_2$ در هوای مرطوب، تخمکها از سلولهای کومولوس عاری گشته و بین لام و لامل قرار داده شده و جهت ثابت شدن در مخلوط اسید استیک و اتانول قرار داده شدند. تخمکها پس از مدت لازم توسط استواورسئین رنگ‌آمیزی شده و جهت مشاهده نشانه‌های بلوغ توسط میکروسکپ فاز کنتراست مورد ارزیابی قرار گرفتند. اطلاعات به دست آمده توسط آزمون مربع کای مورد ارزیابی قرار گرفته و نتایج آزمایش نشان داد که افزودن سرم به‌طور معنی‌داری($P<0/001$) بلوغ تخمکها را افزایش می‌دهد. نتایج حاصل از کشت تخمک در محیط حاوی سرم میش فحل با سرم جنین گاو قابل مقایسه می‌باشد.**

**واژه‌های کلیدی:** گوسفند، بلوغ تخمک، سرم میش فحل، سرم جنین گاو.

فناوریهای تولید مثلی همچون بلوغ ، باروری و کشت آزمایشگاهی (In Vitro Maturation, Fertilization, Culture (IVM/IVF/IVC)) در سالهای اخیر در گونه‌های مختلف، بخصوص نشخوار کنندگان بسیار مورد توجه قرار گرفته است، که علت آن تولید تعداد زیادی رویان ارزانقیمت در خارج بدن جهت کارهای تحقیقاتی یا انتقال جنین می‌باشد(۱).

با توجه به این که جهت باروری آزمایشگاهی و یا انتقال هسته و تولید مثل غیرجنسی به هر حال می‌بایستی مرحله خاصی از تخمک (متافاز II) در دست باشد، لازم است تا جهت انجام آنها، مرحله بلوغ تخمک در آزمایشگاه طی شود. بدین ترتیب، بلوغ آزمایشگاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌گردد.

امروزه متداولترین روش جمع‌آوری تخمک، تخمدانهایی هستند که از حیوانات تازه کشتار شده در کشتارگاه به‌دست می‌آیند و منبع ارزانقیمتی هستند که برای تولید رویان در آزمایشگاه به کار گرفته می‌شوند. البته در این مورد تحقیق روی دام بستگی به ذائقه غذایی مردم منطقه دارد. مثلاً در اروپا گاو و اسب، در آمریکا و ژاپن گاو و خوک و در ایران گوسفند بیشترین کشتار را به خود اختصاص می‌دهد. لذا در این کشورها تخمدان دام کشتاری منبع بسیار ارزانقیمتی را در اختیار محققین می‌گذارد.

بدین منظور محیطهای کشت حاوی مواد شیمیایی، اسید آمینه‌های مختلف، آنتی‌بیوتیکها، و مواد بیولوژیکی و پروتئینی (که وجود آن بسیار برای کشت ضروری است). مورد استفاده قرار گرفته است. از جمله مواد پروتئینی مورد استفاده در سرمها را می‌توان نام برد. انواع مختلفی از سرمهای خون که توسط حرارت غیرفعال شده‌اند ((Heat Inactivated (Treated)) و به عنوان یک ماده افزودنی به محیط کشت اضافه می‌شوند، نقش مهمی را در سیستم کشت بازی می‌کنند، لیکن تاکنون نقش دقیق سرم در بهبود بلوغ و باروری تخمک و مراحل تکاملی رویان به‌درستی شناخته نشده است(۱۵). این امر نشان می‌دهد که عوامل ناشناخته‌ای با منشأ سرمی وجود دارند که در کشت تخمک مفید هستند (۱۸). ظاهراً یک سری مولکولهای درشت مثل پروتئینها و همچنین عوامل رشد در آنها وجود دارند که برای کشت تخمک ضروری هستند (۱۵ و ۱۶).

گزارشهای متعددی مبنی در مقایسه تاثیر انواع سرمها و غلظتهای مختلف آنها بر عملکرد محیط کشت تخمک در گونه‌های مختلف وجود دارد (۱۹، ۱۶، ۱۴، ۱۳، ۱۰، ۶ و ۳). به عنوان مثال، درنتایج حاصل از مطالعه Nakanishi و همکارانش که از غلظتهای مختلف سرم جنین گاو (FCS) برای بلوغ تخمک خوک درآزمایشگاه استفاده کرده‌بودند، آمده‌است که غلظت ۱۵ درصد آن از جهت IVM بهتراز غلظتهای پایین‌تر این نوع سرم بوده است. همچنین نتایج حاصل از محیط کشت حاوی سرم بچه خوک تازه متولد شده ((Neonatal Pig Serum (NPS)) بهتر از FCS بوده است (۱۳). با وجودی که در بعضی از مطالعات در محیط کشت تخمک علاوه بر سرم فحلی، از بعضی هورمونها نیز استفاده می‌شود اما مطالعاتی وجود دارند که نشان می‌دهند اضافه کردن هورمونهای مختلف مثل گنادوتروپینها و استرادیول نه تنها تاثیر مثبتی در IVMFC ندارند بلکه ممکن است اثر منفی نیز داشته باشند. در همین زمینه مطالعه‌ای، میزان مراحل اولیه تقسیم رویان در گروه بالغ شده تحت شرایط حضور سرم گاو فحل (ECS) را ۷۵/۵ درصد و در گروه تحت شرایط FCS به همراه هورمون LH و استرادیول را ۲۷/۳ درصد گزارش کرده است.

هدف از این تحقیق: ۱- مقایسه میزان بلوغ تخمکهای گوسفند (IVM) در محیط کنترل پایه (TCM-199) فاقد سرم و ۲- محیط پایه با غلظتهای مختلف FCS و سرم گوسفند فحل (ESS) بوده است.

## مواد و روش کار

محیط پایه مورد استفاده برای بلوغ تخمکهای جمع‌آوری شده، ((TCM-199 (Gibco Co. Ltd.) با نمک، EARL بوده است که به‌صورت تجارتی در دسترس می‌باشد و متداولترین محیط پایه مورد استفاده در بلوغ تخمک پستانداران می‌باشد. این محیط حاوی املاح مختلف، قندها، اسیدهای آمینه، ویتامینها، اسیدهای نوکلئیک و سایر موادی است که جزئیات کامل آن مشخص می‌باشند (۸). در این مطالعه دو نوع سرم FCS و ESS نیز به‌عنوان مواد افزودنی به محیط کشت پایه مورد استفاده قرار گرفت. FCS از جهاد دانشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد و جهت تهیه ESS، خونگیری از تعدادی میش فحل انجام گرفت. لازم به ذکر است که از ۲۰ رأس میش که در فصل تولیدمثل به آنها $PGF_2\alpha$ تزریق شد، ۷ رأس که از لحاظ فحلی (کنترل شده بوسیله قوچ فحل یاب) همزمان شدند و در اوج زمان فحلی (حدود ۱۴-۱۲ ساعت پس از شروع علایم فحلی) خونگیری (هر کدام حدود ۲۰ سی‌سی) از آنها به‌عمل آمد. پس از آن لوله‌های حاوی خون را به آزمایشگاه منتقل کرده و پس از لخته شدن، سرم آنها جدا شد. جهت انجام عمل غیرفعال ساختن اجزای سرم که در آزمایشگاههای کشت رویان مرسوم است، سرمها به‌مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۵۶ درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس به وسیله فیلتر ۰/۲۲ میکرون میلی‌پور (Millipore Co.) استریل و در لوله‌های استریل با حجم دو میلی‌لیتر بسته‌بندی شده و در فریزر ۲۰ - درجه سانتیگراد قرار داده می‌شد تا در زمان نیاز

۱) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
*) مکاتبات و تقاضای کپی مقاله.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



از آنـها استفاده شود. محیط انتقالی تخمدانها از کشتارگاه به آزمایشگاه (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)) یا سرم فیزیولوژی نرمال (Normal saline) بود.

تخمدان میشها از دوکشتارگاه اطراف تهران (زیاران و قائم‌شهریار) بلافاصله پس از کشتار جمع‌آوری گردید و داخل فلاسک محتوی سرم فیزیولوژی یا PBS گرم (حدود ۳۷ درجه سانتیگراد) قرار می‌گرفت. تخمدانها در عرض مدت ۳-۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل می‌شد و سپس به‌مدت ۳ تا ۴ بار آنها را با سرم فیزیولوژی یا PBS گرم (حدود ۳۷ درجه سانتیگراد) شستشو می‌گردید تا میزان آلودگی میکروبی موجود باز هم کاهش یابد. پس از آن فولیکولهای آنترال قابل رؤیت در سطح تخمدان (تا قطر ۶ میلی‌متر) را با سر سوزن نمره ۱۸ به همراه سرنگ ۵ سی‌سی مورد مکش قرار می‌گرفت و تخمکهای جمع‌آوری شده براساس تعداد لایه‌های کومولوس موجود به ۳ درجه تقسیم می‌شد:

۱ - تخمکهای درجه ۱ = حاوی بیش از سه لایه سلولهای کومولوس.

۲ - تخمکهای درجه ۲ = حاوی ۲ - ۱ لایه سلولهای کومولوس.

۳ - تخمکهای درجه ۳ = فاقد سلولهای کومولوس.

در این مطالعه، بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای گوسفند در محیط TCM-199 حاوی دو نوع سرم FCS و ESS با غلظتهای مختلف مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. آماده سازی محیطها بدین شکل انجام می‌گرفت که به محیط TCM-199 با ۰/۲۲ درصد بی‌کربنات سدیم بافر شده بود، غلظتهای مشخصی از FCS یا ESS (صفر درصد به‌عنوان محیط شاهد، ۱۰ درصد، ۱۵ درصد و ۲۰درصد) اضافه شد. پس از فیلتر کردن محیطهای کشت مذکور، قطرات کوچک ۵۰ میکرولیتری از هر کدام در قوطی‌های پتری‌استریل قرار داده شد و پس از پوشاندن سطح قطرات با پارافین استریل (Merk Co.)، ظروف مذکور به مدت حدود دو ساعت قبل از انتقال تخمکها به داخل آنها در انکوباتور (۳۹ درجه سانتیگراد، با سیستم ۵ درصد از گاز $Co_2$ در هوا، با رطوبت بالا) قرار می‌گرفت. علاوه بر محیط کشت، محیط شستشوی تخمکها نیز با قطرات ۳۰۰ میکرولیتری از محیط کنترل یا محیط حاوی ۱۰ درصد از FCS یا ESS به‌روش فوق تهیه و در انکوباتور قرار داده شد. در این تجربه فقط تخمکهای با کیفیت خوب (حاوی بیش از سه لایه کومولوس متراکم (Compact (unexpanded) cumulus) به همراه سیتوپلاسم گرانوله یکنواخت) برای بلوغ آزمایشگاهی انتخاب می‌شدند که پس از ۶ - ۴ بار شستشو در محیط شستشوی تخمک، ۵ تا ۱۰ عدد از آنها را داخل قطرات کوچک ۵۰ میکرولیتری موجود در محیط کشت منتقل می‌شد. ارزیابی بلوغ تخمکها پس از ۲۴ تا ۲۶ ساعت انجام می‌گرفت. پس از طی این مدت، کومولوسهای اطراف هر تخمک را زیر لوپ به کمک هیالورونیداز رقیق شده با PBS با عمل عبور مکرر از پیپت نازک با مکش و دمیدن، از تخمک جدا می‌شد و سپس تخمکهای فاقد کومولوس بین لام و لامل ثابت می‌گردید. لامها به مدت ۳-۲ روز در مایع ثابت‌کننده (اتانول و اسید استیک با نسبت ۳:۱) قرار می‌گرفت و پس از طی این مدت، تخمکهای زیر لامل را با رنگ استوارسئین یک درصد رنگ‌آمیزی نموده و سپس توسط میکروسکوپ فاز کنتراست، مراحل مختلف بلوغ تخمک مورد ارزیابی قرار می‌گرفت.

**آنالیز آماری:** نتایج بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای گوسفند در غلظتهای مختلف این دو نوع سرم با روش آماری مربع کای مورد ارزیابی قرار گرفت.

## نتایج

جدول ۱ میزان بلوغ کامل تخمکها در غلظتهای مختلف FCS را نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود میزان بلوغ تخمکهای گوسفند در محیطهای حاوی ۱۰ درصد، ۱۵ درصد و ۲۰ درصد از FCS بترتیب ۷۰ درصد، ۶۸ درصد و ۶۱ درصد بوده است و اختلاف معنی‌داری در این سه گروه مشاهده نشد ($P>0/05$). میزان بلوغ تخمک در گروه شاهد (فاقد FCS)، ۲ درصد بوده است که با گروه‌های حاوی FCS تفاوت معنی‌داری داشته است ($P<0/001$). چنین وضعیتی در مورد غلظتهای مختلف ESS (جدول ۲) نیز مشاهده شد، به طوری که میزان بلوغ تخمک در غلظتهای ۱۰ درصد، ۱۵ درصد و ۲۰ درصد به ترتیب ۸۲ درصد، ۸۱ درصد و ۷۲ درصد بوده است که اختلاف معنی‌داری نیز در گروه‌های مختلف مذکور مشاهده نشد ($P>0/05$). اما میزان بلوغ تخمک در گروه شاهد (فاقد ESS) ۲ درصد بوده است که با محیطهای حاوی غلظتهای مختلف ESS تفاوت معنی‌داری داشته است ($P<0/001$).

**جدول ۱** - اثر غلظتهای مختلف سرم جنین گاو در بلوغ آزمایشگاهی تخمک گوسفند*

| وضعیت تخمک / غلظت سرم | وزیکول جرمینال | وزیکول متراکم | متافاز اول | آنافاز اول | متافاز دوم (٪) | دژنره شده یا نامشخص | جمع کل |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۰ | ۱۶۷ | ۲۰ | ۹ | ۷ | ۵(۲)[a] | ۰ | ۲۰۸ |
| ٪۱۰ | ۲۵ | ۷ | ۱۵ | ۴ | ۱۱۷(۷۰)[b] | ۴ | ۱۶۸ |
| ٪۱۵ | ۲۲ | ۱۳ | ۹ | ۲ | ۹۵(۶۸)[b] | ۰ | ۱۴۱ |
| ٪۲۰ | ۳۱ | ۱۹ | ۱۷ | ۹ | ۱۲۱(۶۱)[b] | ۳ | ۲۰۰ |

* آزمایش سه تکرار داشته است، a-b اختلاف معنی‌دار است ($P<0/001$).

**جدول ۲** - اثر غلظتهای مختلف سرم میش فحل در بلوغ آزمایشگاهی تخمک گوسفند*

| وضعیت تخمک / غلظت سرم | وزیکول جرمینال | وزیکول متراکم | متافاز اول | آنافاز اول | متافاز دوم (%) | دژنره شده یا نامشخص | جمع کل |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۰ | ۱۶۷ | ۲۰ | ۹ | ۷ | ۵(۲)[a] | ۰ | ۲۰۸ |
| ٪۱۰ | ۲۰ | ۵ | ۷ | ۱ | ۱۶۳(۸۲)[b] | ۲ | ۱۹۸ |
| ٪۱۵ | ۱۳ | ۸ | ۸ | ۰ | ۱۲۳(۸۱)[b] | ۰ | ۱۵۲ |
| ٪۲۰ | ۲۱ | ۸ | ۱۳ | ۳ | ۱۲۰(۷۲)[b] | ۲ | ۱۶۷ |

* - آزمایش سه تکرار داشته است، a-b اختلاف معنی‌دار است ($P<0/001$).

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



## بحث

سرم حاوی انواع مختلفی از مواد منجمله هورمونها، عوامل رشد، ویتامینها، مواد شلاته کننده یونهای فلزی سنگین، پپتیدها، پروتئینها و یک سری از مولکولهای مشخص و نامشخص دیگری می‌باشد (۹). ترکیبات موجود در سرم خون در مراحل مختلف سیکل استروس دائم 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 در بلوغ تخمک باشد. شاید به همین دلیل است که در گزارشهای مختلف، نتایج متفاوت و بعضاً متناقض از انواع سرمهای مورد استفاده در محیط کشت تخمک به چشم می‌خورد. علت استفاده وسیع از FCS و رجحان آن بر سایر انواع سرمها توسط بسیاری از محققین بر این گمان استوار است که FCS حاوی بعضی از مواد محرک رشد ناشناخته است که در سرم حیوانات بالغ وجود ندارد و یا اینکه سرم جنینی فاقد اجزایی همچون هورمونها و ایمونوگلوبولین‌هایی است که در سرم حیوانات بالغ وجود دارند و ظاهراً این اجزاء سرمی موجب تأخیر در تکامل سلولها در آزمایشگاه می‌شوند (۱۶). همچنین بسیاری از محققین ترجیح می‌دهند تا از سرم حیوانات فحل در سیستمهای کشت تخمک استفاده کنند که این حالت به‌دلیل از سرگیری میوز و بلوغ تخمک در زمان فحلی حیوان می‌باشد.

مطالعات بسیار محدودی در مورد اثر سرمهای مختلف اضافه شده به محیط کشت روی مراحل مختلف بلوغ، باروری و تکامل بعدی تخمک وجود دارد. به عنوان مثال، عده‌ای تأثیر بهتر اضافه کردن FCS به محیط کشت تخمک گاو را در مقایسه با آلبومین سرم گاو ((Bovin Serum Albumin (BSA)) روی بلوغ تخمک گزارش کرده‌اند (۱۴). Fukui تأثیر بهتر FCS را در مقایسه با ECS روی باروری تخمکهای گاو گزارش کرده و احتمال می‌دهد که این تفاوت ناشی از محموله (Lot) تجارتی سرم باشد (۶). عده دیگری از محققین تفاوتی از این جهت بین سرم حیوان فحل و سایر سرمها مشاهده نکرده‌اند (۱۷، ۱۶ و ۱۱). اما بعضی از محققین تأثیر بهتر سرم حیوانات فحل را در مقایسه با سایر سرمها (از جمله FCS) در محیط کشت بلوغ، باروری و تکامل رویان ذکر کرده‌اند (۱۷ و ۲۰). با وجودی که در اکثر مطالعات انجام شده جهت بلوغ تخمکهای گوسفند در آزمایشگاه از غلظتهای ۱۰ تا ۲۰ درصد سرمهای مختلفی همچون FCS استفاده شده است اما تاکنون گزارش منتشر شده‌ای مبنی بر مقایسه دو نوع سرم FCS و ESS با غلظتهای مختلف روی بلوغ تخمکهای میش در شرایط آزمایشگاهی وجود ندارند و تنها چند گزارش در مورد تأثیر سرمهای مختلف روی بلوغ تخمک گاو، خوک و بیز منتشر شده است (۲۱ و ۱۳، ۳). بررسی موجود نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین غلظتهای مختلف یک نوع سرم (۱۰ درصد، ۱۵ درصد و ۲۰ درصد) روی بلوغ هسته تخمکهای میش وجود ندارد. بنابراین به نظر می‌رسد که با توجه به محموله سرمهای مورد استفاده و تحت شرایط موجود در آزمایشگاه ما از لحاظ اقتصادی استفاده از سرمهای FCS یا ESS با غلظت ۱۰ درصد برای بلوغ تخمکهای گوسفند مناسب باشد. همچنین با مقایسه غلظتهای مختلف ESS با FCS با وجودی که تفاوت معنی‌داری بین این دو نوع سرم از نظر بلوغ هسته تخمک مشاهده نشد. اما غلظتهای مختلف ESS در مقایسه با FCS تأثیر بهتری روی بلوغ هسته داشته‌اند. علت این وضعیت شاید وجود مولکولهایی در سرم حیوان فحل و همزمانی آن با بلوغ تخمک در In vivo باشد که، اغلب محققین عوامل رشد و هورمونها را بیشتر در این مسئله دخیل می‌دانند. بنابراین به‌نظر می‌رسد که ESS حداقل روی بلوغ تخمک تأثیر بهتری داشته باشد و در آینده می‌توان با استفاده از ESS در مورد مراحل بعدی رشد تخمک تا مرحله بلاستوسیست مطالعات بیشتری انجام داد. به‌طور کلی این آزمایش نشان می‌دهد که وجود سرم برای بلوغ تخمکها در شرایط آزمایشگاهی لازم است.

## تشکر و قدردانی

این مقاله از طرح تحقیقاتی شماره ۲۱۸/۱/۲۱۳ مصوب دانشگاه تهران استخراج شده است. نویسندگان بدین وسیله کمال تشکر خود را از مسئولین محترم دانشگاه تهران و دانشکده دامپزشکی جهت تصویب و در اختیار قرار دادن بودجه طرح مذکور اعلام می‌دارند.

## منابع

۱. شمس‌اسفندآبادی، ن . مطالعه‌ای در مورد جمع‌آوری و بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای فولیکولی بزان بومی ایران پایان‌نامه تخصصی شماره ۶۱، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۷۶).

2. Bavister, B.D., Rose-Hellekant, T.A. and Pinyopummintr, T.Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine oocytes into morulae and blastocysts in defined culture media. Theriogenology, 37, 1: 127-145, (1992).

3. Campbell, K., McWhir, J., Ritchie, B. and Wilmut, I. Production of live lambs following nuclear transfer of cultured embryonic disc cells. Theriogenology, 43: 181 (abst.), (1995).

4. Choi, S.H., Yang, B.C., Kim, I.H., Son, D.C., Lee, H.J., Lee, K.W., Park, M.K., Kim, K.N. and Chung, Y.C. Effects of serum on in vitro maturation of korean native cattle oocytes. Theriogenology, 47, 1:187 (abst.), (1997).

5. Croston, D. and Pollott, G. Planned sheep production. 2nd. ed. Blackwell Scientific publications. London, pp: 17-32, (1995).

6. Crozet, N., Huneau, D., Desmedet, V., Theron, M-C., Szollosi, D., Torres, S. and Sevellec, C. In vitro fertilization with normal development in the sheep. Gamete Research, 16: 159-170, (1987).

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

8. Grupen, C.G., Nagashima, H. and Nottle, M.B. Asynchronous meiotic progression in porcine oocytes matured in vitro: A cause of polyspermic fertilization. Reprod. Fertil. Dev. 9: 187-191, (1977).

9. Hafez, E.S.E. Reproduction in farm animals (6th. ed.). Lea and Febiger, Philadelphia, pp: 114-114, (1993).

10. Keskintepe, L. and Brackett, B.G. In vitro developmental competence of in vitro matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. Biol. Reprod., 55: 333-339, (1996).

11. Larocca, C., Kmaid, S. and Calvo, J. Effect of follicular fluid

and estrous cow serum on maturation, fertilization and development of the bovine oocytes in vitro. Theriogenology, 39: 253 (abst.), (1993).

**12.** Lorenzo, P.L., Illera, M.J., Illera, J.C. and Illera, M. Role of EGF, IGF-I, Sera and cumulus cells on maturation in vitro of bovine oocytes. Theriogenology, 44: 109-118, (1995).

**13.** Lynch, J.J., Hinch, G.N. and Adams, D.B. The behaviour of sheep: Biological principles and implications for production. First ed. International Wallingford and CSIRO. UK and Australia, pp: 1-7, C.A.B. (1992).

**14.** Nakanishi, Y., Uto, Y., Goto, K. and Ogawa, K. The effect of different media and serum supplements upon porcine oocyte maturation. Theriogenology, 33, 1: 291 (abst.), (1990).

**15.** Saeki, K., Hoshi, M., Leibfried-Rutledge, M.L. and First, N.L. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum free medium. Biol. Reprod., 44: 256-260, (1991).

**16.** Sanbuissho, A. and Threlfall, W.R. The effects of estrous of cow serum on the in vitro maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. Theriogenology, 31: 693-699, (1989).

**17.** Sanbuissho, A. and Threlfall, W.R. The influence of serum and gonadotropin on in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. Theriogenology, 34, 2: 341-348, (1990).

**18.** Schellander, K., Fuhrer, F., Brackett, B.G., Korb, H. and Schleger, W. In vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrus cow serum. Theriogenology, 33, 2: 477-485, (1990).

**19.** Stock, A.E., Woodruff, T.K. and Smith, L.C. Effect of inhibin A and activin A during in vitro maturation of bovine oocytes in hormone and serum-free medium. Biol. Reprod., 56: 1559-1564, (1997).

**20.** Watson, A.J., Watson, P.H., Warnes, D., Walker, S.K., Armstrong, D.T. and Seamark, R.F. Preimplantation development of in vitro-matured and in vitro-fertilized ovine zygotes: Comparison between coculture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmospher. Biol. Reprod., 50: 715-724, (1994).

**21.** Xu, K.P., Greve, T., Callesen, H. and Hyttel, P. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. J. Reprod. Fert. 81: 501-504, (1987).

## Effect of different concentrations of fetal calf serum and estrous sheep serum on ovine oocytes maturation in vitro

**Ghasemzadeh-Nava, H.[1], Tajik, P.[1*], Bolourchi, M.[1]**

[1]*Department of Clinical Sciences Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran-Iran.* [*] *Corespondence and reprint request.*

The aime of this study was to assess the effects of different concentrations of fetal calf serum and estrous sheep serum on in vitro maturation of ovine oocytes. Ovine ovaries were isolated from a local slaughter house and transported to the laboratory. Oocytes were aspirated from the folicles and washed 4 times in TCM-199 with or without different concentrations (10, 15 and 20%) of heat inactivated fetal calf serum (FCS) or estrous sheep serum (ESS), and cultured in TCM-199 under paraffin oil. After 24 h culture for maturation, oocytes were denuded from cumulus cells and were mounted on slide glass, fixed, stained and observed under a phase contrast microscope for evidence of maturation, Very few oocytes were matured in the medium without each serum. However maturation rates were significantly increased ($P<0.001$) when the media were supplemented with sera. The results of the present study shows that the maturation in ESS medium is comparable to FCS.

**Key words:** Sheep, Oocyte maturation, Estrous sheep serum, Fetal calf serum.