

بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای نارس شتریک کوهانه در محیط هامز اف ۱۰ همراه با غلظتهای مختلف سرم گوساله جنینی

دکتر پرویز تاجیک*^۱ مهندس حمید رضا پویان^۲ دکتر احمد زارع شحنه^۳ دکتر حمید قاسم زاده نوا^۴ دکتر پژمان میرشکرایی^۱

دریافت مقاله: ۱۴ مهرماه ۱۳۸۳
پذیرش نهایی: ۴ تیرماه ۱۳۸۴

In vitro maturation of dromedary camel oocytes in Hams's F10 medium supplemented with different concentrations of fetal bovine serum

Tajik, P.¹, Puyan, M.R.², Zare-Shahneh, A.³, Ghasemzadeh-Nava, H.¹, Mirshokraei, P.¹

¹Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran. ²Graduated from Faculty of Agriculture, University of Tehran, Tehran-Iran. ³Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Tehran-Iran.

Objectives: To mature dromedary camel oocytes for using them in an IVF system.

Design: Interventional study.

Animals: Ovaries from dromedary camels in local slaughterhouses.

Procedure: Removing ovaries from camels in a local slaughterhouse, carrying them to the laboratory in warm saline solution, aspiration of follicles, isolation and transferring of oocytes into TCM-199 and Ham's F10 supplemented with 0-10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), culturing oocytes for up to 24h in a CO₂ incubator. After culture oocytes were denuded and put into PBS containing 0.1% hyaluronidase and passing through a fine pipette. Oocytes were then mounted onto slide glass and fixed and stained for evidence of maturation.

Statistical analysis: ANOVA and when a significance different was seen, Duncan's Multiple Range Test.

Results: When oocytes from fresh ovaries were culture in Ham's F10 without protein, only 17.65% of them reached to MII. However, significantly ($P < 0.05$) higher oocytes reached to MII in 5 and 10% FCS (36.84% and 33.33% for 5 and 10% FBS respectively), which were not dose dependent. When cool stored ovaries were used for oocyte maturation, 14.54% of oocytes reached to MII. In protein-free medium However, significantly ($P < 0.05$) higher oocytes reached to MII in 5 and 10% FCS (25.86% and 33.33% for 5 and 10% FBS respectively). Although increasing the protein increased the maturation rates, the difference was not significant.

Conclusion: Under the present condition it seems that cool stored ovaries could be used for in vitro maturation of camel oocytes. *J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 60,2:143-148,2005.*

Keywords: In vitro maturation, Dromedary camel, Ham's F10, FBS, Cool storage.

Corresponding author's email: ptajik@ut.ac.ir

هدف: انجام بلوغ آزمایشگاهی تخمک نارس شتریک کوهانه به منظور استفاده از آن در باروری آزمایشگاهی.

طرح: مطالعه مداخله ای.

حیوانات: تخمدان شترهای نحر در کشتارگاههای محلی.

روش: جمع آوری و انتقال تخمدانهای شترهای نحر شده در کشتارگاه در سرم فیزیولوژی استریل و در دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتیگراد و حاوی آنتی بیوتیک، مکش فولیکولها و جداسازی تخمکها و کشت آنها در محیط کشت سلول TC-199 و هامز اف ۱۰ دارای صفر تا ۱۰ درصد سرم گوساله جنینی توسط حرارت غیر فعال شده، کشت تخمکها به مدت ۴۸-۳۶ ساعت در انکوباتور با حرارت ۳۸/۵ درجه سانتیگراد و ۵ درصد گاز کربنیک، گرفتن سلولهای کومولوس، ثابت نمودن تخمکها و رنگ آمیزی آنها و سپس مطالعه آنها جهت ارزیابی میزان بلوغ تخمکها.

تجزیه و تحلیل آماری: آنالیز واریانس و در صورت وجود اختلاف معنا دار، استفاده از آزمون دانکن.

نتایج: هنگامی که تخمدانهای منتقل شده به آزمایشگاه بلافاصله مورد استفاده قرار گرفت، میزان بلوغ تخمکهای نارس شتریک کوهانه در محیط هامز اف ۱۰ بدون پروتئین کشت تنها ۱۷/۶۵ درصد بود در حالی که میزان بلوغ در محیطهای حاوی ۵ درصد و ۱۰ درصد پروتئین (به ترتیب ۳۷ و ۳۳ درصد) به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0.05$)، اما این افزایش ارتباط معنی داری با افزایش غلظت پروتئین نداشت. هنگامی که تخمدانها ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شده و بعدا مورد استفاده قرار گرفتند، میزان بلوغ تخمکها در محیط بدون پروتئین کشت تنها ۱۴/۵۴ درصد بود در حالی که میزان بلوغ در محیطهای حاوی ۵ درصد و ۱۰ درصد پروتئین (به ترتیب ۲۵/۸۶ و ۳۳/۳۳ درصد) به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0.05$)، در این آزمایش هر چند با افزایش غلظت سرم میزان بلوغ افزایش داشت ولی اختلاف آنها معنی دار نبود.

نتیجه گیری: در شرایط حاضر به نظر می رسد که بتوان تخمدانهای شتر را در سرمای ۴ درصد سانتیگراد نگهداری و سپس مورد استفاده قرار داد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، دوره ۶۰، شماره ۲، ۱۴۸-۱۴۳.

واژه های کلیدی: بلوغ آزمایشگاهی، شتریک کوهانه، محیط هامز اف ۱۰، سرم گوساله جنینی، نگهداری در سرما.

بلوغ آزمایشگاهی از پیش نیازهای باروری آزمایشگاهی می باشد. از طرف دیگر بلوغ آزمایشگاهی می تواند اوسیتتهای مورد نیاز انتقال هسته و همانند سازی را در اختیار قرار دهد. فن آوریهای تولیدمثلی در سالهای اخیر در گونه های مختلف،

۱) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۲) دانش آموزانه دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۳) گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران - ایران.

* نویسنده مسؤول: ptajik@ut.ac.ir

بخصوص نشخوارکنندگان بسیار مورد توجه قرار گرفته است، که علت آن تولید



مواد و روش کار

محیط مورد استفاده برای انتقال تخمدانها از کشتارگاه به آزمایشگاه سرم فیزیولوژی و محیط پایه مورد استفاده برای بلوغ تخمکها محیط هامزاف ۱۰ (ساخت شرکت Biochrom AG برلین آلمان) بود. از سرم گوساله جنینی (تولید شده توسط جهاد دانشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) به عنوان مکمل استفاده می شد. سرم گوساله جنینی قبلاً توسط حرارت ۵۶ درجه به مدت ۳۰ دقیقه غیر فعال، سپس توسط فیلتر میلی پور فیلتر شده، در ظرفهای مقاوم در برابر انجماد تقسیم شده و در برودت ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شده بود. در هر سی سی از محیطها ۱۰۰ واحد پنسیلین G و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین سولفات نیز استفاده می شد. تخمدانهای مورد استفاده در این تحقیق از شترهای نحر شده در کشتارگاههای جنوب تهران شامل کشتارگاههای لاهوتی، کهریزک و ورامین دریافت و بلافاصله پس از تمیز نمودن از الودگیهای احتمالی سطحی با محیط سرم فیزیولوژی استریل حاوی ۱۰۰ واحد پنسیلین G و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین سولفات شستشو شده و در دمای ۲۵-۳۰ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل می گشت. پس از انتقال به آزمایشگاه، تخمدانها به طور اتفاقی دودسته شده، یک دسته از سرم گرم خارج شده و روی یخ قرارداد و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می شد تا روز بعد مورد استفاده قرار گیرد. دسته دیگر با کمک سرسوزن ۱۹ متصل به سرنگ ۵ میلی لیتری، فولیکولهای مکش می گردید. تخمکهای به دست آمده در زیر لوپ به دقت مورد ارزیابی قرار گرفته و در پایان تخمکهای با سیتوپلاسم یکنواخت و حاوی سلولهای کومولوس اووفروس مناسب (بیش از ۴ لایه سلولهای کومولوس) انتخاب و ۴ بار در محیط کشت سلول هامزاف ۱۰ شستشو می گشت. این تخمکها که با دقت و طی درجه بندی خاص (جدول شماره ۱) انتخاب می شد به نام تخمکهای درجه ۱ (Q1) نامگذاری می شد. سپس هر ۱۰ تا ۱۵ عدد از تخمکهای حاوی سلولهای کومولوس اووفروس مناسب درون قطره های ۱۰۰ میکرو لیتری محیط کشت مذکور در ظروف کشت پلی استرن (۱۰×۳۰ میلیمتر) منتقل می گردید. این قطرات قبلاً تهیه و پس از پوشانیدن با پارافین اشباع حداقل ۳ ساعت در انکوباتور CO₂ قرار گرفت. حرارت داخلی انکوباتور ۳۹/۵ درجه و میزان آن ۵ درصد ثابت گردیده و رطوبت آن ۱۰۰ درصد بود. در مدت ۴۲ ساعت پس از کشت، تخمکها به کمک محلول PBS حاوی ۰/۱ درصد از هیالورونیداز و گذرانیدن از پیپت پاستور بسیار نازک شده (قطر داخلی آن کمی بیش از قطر تخمک بود) از سلولهای کومولوس عاری گشته و بین لام و لامل تثبیت گردید. لام حاوی تخمکها را بمدت ۴-۳ روز در محلول دارای ۷۵٪ الکل اتیلیک و ۲۵٪ اسید استیک قرار داده شد و سپس به کمک محلول ۱٪ اورسئین رنگ آمیزی و در زیر میکروسکپ فاز کنتراست جهت تعیین مراحل بلوغ مورد ارزیابی قرار می گرفت.

آنالیز آماری

در تمام آزمایشها میزان باروری و باروری پلی اسپرمی بوسیله ANOVA مورد

تعداد زیادی رویان ارزان قیمت در خارج بدن جهت کارهای تحقیقاتی یا انتقال جنین می باشد (۳). باروری آزمایشگاهی تخمکهایی که از داخل اویدوکت گوسفند جمع آوری شده بودند، به دهه ۱۹۵۰ میلادی برمی گردد که Dautier و همکارانش در سال ۱۹۵۹ میلادی گزارشی در این زمینه ارائه دادند. تولد اولین بره از راه باروری آزمایشگاهی در سال ۱۹۸۵ میلادی در ژاپن گزارش شد تولد اولین بره از طریق بلوغ آزمایشگاهی تخمکها و سپس باروری آزمایشگاهی توسط Cheng و همکارانش و متعاقباً توسط Crozet و همکارانش گزارش شد (۱۰، ۱۲). تولد اولین بره از طریق انتقال هسته و همانندسازی غیر جنسی برای اولین بار در میان گونه های مختلف حیوانات توسط Campbell و همکارانش در سال ۱۹۹۵ میلادی گزارش شد (۶).

گزارشهایی وجود دارند مبنی بر اینکه با تجویز گنادوتروپینها به بره ها و بزغاله های جوان و سپس جمع آوری تخمک های آنها از راه لاپاراسکوپی، می توان تعداد زیادی بلاستوسیست در آزمایشگاه تولید نمود و با انتقال این رویانها موجب افزایش توان ژنتیکی گله و کاهش فاصله نسلی شد (۱۹، ۲۱). امروزه متداولترین روش جمع آوری تخمک، تخمدانهایی هستند که از حیوانات تازه کشتار شده در کشتارگاه به دست می آیند و منبع ارزان قیمتی هستند که برای تولید رویان در آزمایشگاه به کار گرفته می شوند. این تخمدانها به آزمایشگاه حمل شده و در آن جا تخمکها گرفته شده و در محیط های مختلف جهت بلوغ کشت می گردند. مدت زمان بلوغ تخمک در محیط آزمایشگاه در گونه های مختلف متفاوت است که بر اساس یافته های *In vivo* می باشد. بعنوان مثال این زمان در اغلب مطالعات در گاو ۲۴ ساعت (۱۳ و ۱۵)، در بز ۲۴-۲۷ ساعت (۱۹) در خوک ۳۶ تا ۴۸ ساعت (۱۴)، در اسب ۳۶ ساعت (۸) در نظر گرفته شده است. در گوسفند نیز در اغلب مطالعات انجام گرفته در *In vitro*، عدد ۲۴ ساعت یا ۲۴-۲۶ ساعت را در نظر گرفته اند (۹، ۱۲). با این وجود در نتایج حاصل از دو مطالعه جداگانه روی بیشترین درصد M-II در گوسفند اعداد ۲۷ ساعت و ۳۴ ساعت نیز ذکر شده است، البته در مطالعه آخر از تخمکهای حاصله از فولیکول های پری آنترال تخمدانهای بره جهت IVM استفاده شد (۲۲). چنین تفاوت هایی در نتایج مطالعات مختلف می تواند به دلیل تفاوت در شرایط محیط کشت، روشهای متفاوت و تفاوت در انتخاب فولیکول ها و تخمکها باشد (۳۰).

تاکنون سیستمهای بسیار متفاوتی از محیط کشت را برای بلوغ تخمک های پستانداران به کار گرفته اند که در بعضی موارد حتی نتایج حاصل از یک مطالعه، کاملاً متفاوت از مطالعات دیگر است. اثرات متفاوتی از اضافه نمودن سرم گاو یا گوسفند فحل ECS و ESS (۱۷، ۱۶)، سرم جنین گاو (FCS)، (۲) مایع فولیکولی (۴، ۷)، سلول های گرانولوزا (۲۹، ۱۸)، هورمونهای FSH، LH و استرادیول ۱۷بتا (۱۱) و فاکتورهای رشد (۲۰)، به محیط کشت بلوغ تخمک در گونه های مختلف دیده شده است.

در مورد بلوغ تخمکهای نارس شتر کار زیادی صورت نگرفته است. Bou و همکاران، بلوغ تخمکهای لاما و شتر یک کوهانه را در محیط TCM-199 همراه هورمون، سرم، پیرووات و آنتی بیوتیک انجام داده اند (۵).



جدول ۳- اثر غلظتهای مختلف FCS بر بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای شتر که ۲۴ ساعت پس از کشتار از تخمدان کشیده شده‌اند.

*موقعیت تخمک پس از کشت								میزان پروتئین
DO	M-II	A-I	M-I	CGV	GVBD	GV	تعداد تخمک	
۱۵	۸(۱۴/۵۴)a	۴	۶	۸	۵	۹	۵۵	۰
۱۲	۱۵(۲۵/۸۶)ab	۸	۹	۵	۳	۶	۵۸	%۵
۱۳	۱۸(۳۳/۳۳)b	۹	۱۰	۲	۱	۱	۵۴	%۱۰

*موقعیت‌ها: GV=وزیکول ژریمینال، GVBD=از بین رفتن غشای وزیکول، CGV=وزیکول ژریمینال متراکم، M-I=متافاز اول، A-I=آنافاز اول، M-II=متافاز دوم و بالاخره DO=تخمک دژنره شده. a-b دارای اختلاف معنی دار در ستون ($P < 0/05$).

شده در محیط فاقد پروتئین تعداد ۹ تخمک در مرحله وزیکول ژریمینال باقی مانده و ۱۵ عدد دژنره شدند. از باقیمانده تخمکها ۸ عدد (۱۴/۵۴ درصد) بالغ شدند و بقیه (۲۳ عدد) در میان راه بلوغ بودند. هنگامی که محیط کشت حاوی ۵ درصد از سرم گوساله جنینی بود، از ۵۸ عدد تخمک کشت شده ۶ عدد در مرحله ابتدایی متوقف مانده. ۱۲ عدد نیز دژنره شدند. میزان تخمکهای بالغ شده در این گروه ۱۸ عدد (۲۵/۸۶ درصد) بود که اختلاف معنی داری با میزان بلوغ در گروه فتقد پروتئین نداشت. در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم گوساله جنینی از تعداد ۵۴ تخمک نابالغ، تنها ۱ تخمک در مرحله ابتدایی متوقف شد در حالی که ۱۳ عدد دژنره گشت. در این محیط تعداد ۱۸ عدد تخمک (۳۳/۳۳ درصد) بالغ شد که با میزان بلوغ در گروه بدون پروتئین اختلاف معنی دار ($P < 0/05$) داشته ولی اختلاف آن با گروه دارای ۵ درصد سرم گوساله جنینی معنی دار نبود.

بحث

تاکنون نقش دقیق سرم در بهبود بلوغ تخمک پستاران به روشنی مشخص نشده است (۲۳). ظاهراً عوامل ناشناخته‌ای با منشاء سرمی وجود دارند که در محیط کشت بلوغ تخمک راتسهیل می‌کنند (۲۴). Abdoon در سال ۲۰۰۱ میزان بلوغ تخمکهای شتریک کوهانه را در محیط کشت پایه CR1aa با اضافه نمودن ۱۰ درصد سرم شتر (که به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۵۶ درجه سانتیگراد حرارت دیده بود) و ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر FSH با طول زمان ۳۶ ساعت در گرماخانه قرار دادن ۵/۸۵ درصد و با ۴۸ ساعت کشت ۷۲/۵ درصد گزارش نمود (۱). Torner و همکاران در سال ۲۰۰۳ میزان بلوغ تخمکهای شتریک کوهانه اخذ شده از شتر غیر آبستن را در ۴۲ ساعت پس از کشت ۵۱/۲ درصد و در ۴۸ ساعت پس از کشت ۴۵/۶ درصد گزارش دادند (۲۸). محیط مورد استفاده ایشان TCM-199 و پروتئین مورد استفاده سرم گاو نرو میزان آن ۲۰ درصد بوده است. هنگامی که در همین محیط تخمکهای گرفته شده از شتر آبستن را کشت دادند، تا ساعت ۴۲ پس از کشت ۵۸/۸ از تخمکها بالغ شد، در حالی که میزان بلوغ در ساعت ۴۸ پس از کشت ۴۰ درصد بود. میزان بلوغ در آزمایش ما بین ۳۳ تا ۳۶ درصد برای ۱۰ و ۵ درصد افزودن سرم گوساله جنینی بود که کمتر از Torner و همکاران است، در حالی که زمان قرار گرفتن تخمکهای نارس شتریک کوهانه در تجربه ما ۴۲ ساعت بود.

جدول ۱- دسته بندی تخمکهای استحصال شده شتریک کوهانه جهت انتخاب و استفاده از آنها در بلوغ آزمایشگاهی.

نامگذاری	Q1	Q2	Q3	Q4
چگونگی	دارای ۵ لایه کومولوس یا بیشتر	دارای ۳-۵ لایه کومولوس	داری ۲-۱ لایه کومولوس	فاقد کومولوس در تمام یا قسمتی از سطح

ارزیابی قرار گرفت. در صورت مشاهده اثر معنا دار، گروهها به وسیله تست Duncan تجزیه و تحلیل می‌گردید.

نتایج

جدول ۲ اثر غلظتهای مختلف سرم گوساله جنینی را بر بلوغ تخمکهای نارس شتریک کوهانه در محیط هامزاف ۱۰ نشان می‌دهد. از ۵۱ تخمک کشت شده در محیط بدون پروتئین تعداد ۸ عدد در همان مرحله وزیکول ژریمینال باقی ماندند در حالی که تعداد ۹ تخمک (۱۷/۶۵ درصد) بالغ شدند. در این میان ۹ تخمک دژنره شده و بقیه (۲۵ تخمک) در میان راه بلوغ بودند. در محیط حاوی ۵ درصد سرم گوساله جنینی، از ۵۷ تخمک کشت شده تنها ۵ تخمک در مرحله وزیکول ژریمینال باقی مانده در حالی که تعداد ۲۱ تخمک در این گروه بالغ (M-II) شدند (۳۶/۸۴ درصد) و این میزان رسیدن تخمکها به مرحله بلوغ به طور معنی داری ($P < 0/05$) بیش از گروه بدون پروتئین بود. در گروه کشت حاوی ۱۰ درصد سرم گوساله جنینی از ۴۸ تخمک نارس کشت شده ۸ تخمک در مرحله وزیکول متوقف مانده و ۸ تخمک نیز دژنره شدند. در این گروه تعداد ۱۶ تخمک به مرحله بلوغ رسیدند (۳۳/۳۳ درصد) که این میزان نیز به طور معنی داری ($P < 0/05$) از گروه کنترل بیشتر بود. جالب اینکه با وجود افزایش غلظت سرم در این گروه میزان بلوغ کمتر از گروه ۵ درصد سرم گوساله جنینی بود هر چند اختلاف معنی داری با آن نداشت.

در آزمایش دیگر که در آن تخمکها ابتدا ۲۴ ساعت در یخچال (در سرمای ۴ درجه سانتیگراد) نگهداری شده و سپس جهت بلوغ در محیط هامزاف ۱۰ همراه غلظتهای مختلف سرم گوساله جنینی کشت شدند، از ۵۵ تخمک نابالغ کشت

جدول ۲- اثر غلظتهای مختلف FCS بر بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای شتر که تا ۳ ساعت پس از کشتار از تخمدان کشیده شده‌اند.

*موقعیت تخمک پس از کشت								میزان پروتئین
DO	M-II	A-I	M-I	CGV	GVBD	GV	تعداد تخمک	
۹	۹(۱۷/۶۵)a	۵	۷	۹	۴	۸	۵۱	۰
۱۵	۲۱(۳۶/۸۴)b	۷	۵	۳	۱	۵	۵۷	%۵
۸	۱۶(۳۳/۳۳)b	۴	۵	۳	۴	۸	۴۸	%۱۰

*موقعیت‌ها: GV=وزیکول ژریمینال، GVBD=از بین رفتن غشای وزیکول، CGV=وزیکول ژریمینال متراکم، M-I=متافاز اول، A-I=آنافاز اول، M-II=متافاز دوم و بالاخره DO=تخمک دژنره شده. a-b دارای اختلاف معنی دار در ستون ($P < 0/05$).



بهر حال آزمایشهای تکمیلی لازم است تا به این سؤال و سئوالهای دیگری که در این مورد مطرح است پاسخ گویند.

تشکر و قدردانی

انجام این آزمایش با استفاده از تسهیلات تعیین شده در طرح تحقیقاتی شماره ۲۱۸/۳/۵۰۳ انجام شده است. نویسندگان بر خود لازم می دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و معاونت پژوهشی وقت دانشکده که این طرح را تصویب نموده کمال تشکر را اعلام دارد. همچنین از قطب علوم درمانگاهی به جهت تامین بخشی از بودجه های چاپ و تکثیر تشکر می شود.

References

1. Abdoon, A.S.S. (2001): Factors affecting follicular population, oocyte yield and quality in camels (*Camelus dromedarius*) ovary with special reference to maturation time in vitro. *Animal Reproduction Science* 66: 71-79
2. Baldassarre, H., Furnus, C.C., de Matos, D.G. and Pessi, H. (1996): In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: Alternative gonadotropin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology*, 45: 707-717.
3. Bavister, B.D., Rose-Hellekant, T.A. and Pinyopummintr, T. (1992): Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine oocytes into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*, 37: 127-145.
4. Brown, B.W. and Radziewicz, T. (1997): Follicular fluid used in culture media to produce sheep embryos. *Theriogenology*, 47: 275 (abst.).
5. Bou, S.G., Pang, Y.F., Zhang, S.L. and Xue, X.X. (1993): Preliminary study on in vitro fertilization in the domestic camels. (*Camelus dromedaries*). *Chinese J. Zool.*, 28:35-37.
6. Campbell, K., McWhir, J., Ritchie, B. and Wilmut, I. (1995): Production of live lambs following nuclear transfer of cultured embryonic disc cells. *Theriogenology*, 43: 181 (abst.).
7. Chauhan, M.S., Palta, P., Das, S.K., Katiyar, P.K. and Madan, M.L. (1997): Replacement of serum and hormone additives with follicular fluid in the IVM medium: Effects on maturation, fertilization and subsequent development of buffalo oocytes in vitro.

باتوجه به اینکه افزودن میزان سرم از ۵ درصد به ۱۰ درصد میزان بلوغ را از ۳۶ به ۳۳ درصد کاهش داده است، به نظر می رسد که افزایش سرم اثر ممانعتی در بلوغ تخمکهای شتر یک کوهانه داشته باشد. نکته قابل توجه این است که چگونه علی رغم گزارش میزان بلوغ بالای تخمک شتر توسط Abdoon بار دیگر Torner و همکاران محیط دیگری را برای کشت انتخاب نمودند. شاید یکی از علل آن این باشد که در مطالعه Abdoon حتی ۲۴ ساعت پس از کشت تخمکها تمام تخمکها یا در مرحله GV بوده یا در مرحله MII و یادآور شده بودند. ظاهراً این محقق هیچ یک از تخمکها را در بین مراحل دسته بندی نکرده است. با این فرض ۲۷ عدد از ۵۷ تخمک کشت شده جدول ۲ در محیط حاوی ۵ درصد سرم (۶۴/۹ درصد) از مرحله GV گذشته و این میزان برای محیط حاوی ۱۰ درصد سرم (۶۶/۶ درصد) مشابه این امر در گزارش Torner و همکاران نیز وجود دارد. هر چند ایشان میزان بلوغ را پس از ۴۲ ساعت ۵۸/۹ درصد گزارش نموده اند ولی منظور ایشان از بلوغ قرار داشتن بین مراحل تلوفاز اول و متافاز دوم بوده است. در حالی که در گزارش ما تنها متافاز ۲ مورد نظر بوده است در این مورد گزارش Torner و همکاران حاکی از ۴۲/۹ درصد در ۴۲ ساعت و ۲۶/۱ درصد در ۴۸ ساعت است که از میزان بلوغ تخمکها در گزارش ما (حدود ۳۳ درصد) کمتر است. مسئله دیگر که بسیار مهم به نظر می رسد و ما و دیگران از آزمایش آن عاجز هستیم، به نظر می رسد اختلاف در وضعیت جغرافیایی، ژنتیکی و تغذیه ای شترهایی باشد که نحر می گردند. بهر حال باید یاد آور شد که شترهای موجود در کشتارگاههای محل برداشت تخمدان در آزمایش حاضر طیف وسیعی از شترهای حمل شده از نواحی جنوب کشور و کشورهای همسایه بوده و از لحاظ تغذیه ای و وضعیت بدنی در موقعیت های مختلفی قرار داشتند.

در تحقیق حاضر اختلاف معنی داری در میزان بلوغ تخمکهایی که بلافاصله پس از انتقال به آزمایشگاه مراحل استحصال و کشت آنها انجام شده بود با میزان بلوغ تخمکهایی که ۲۴ ساعت در پرودت ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شده بودند یافت نشد. تحقیق حاضر که گزارشی مشابه آن وجود ندارد به این منظور صورت گرفت که مشخص شود در صورتی که تخمدانها از شهرهای دیگر ارسال شوند آیا می توان آنها را برای بلوغ تخمک مورد استفاده قرار داد یا خیر. با توجه به مشابهت میزان بلوغ در مورد دو آزمایش به نظر می رسد که بتوان تخمدانها را از شهرهای اطراف جمع آوری و در مورد بلوغ آنها آزمایش نمود.

در این آزمایش ۱۸-۱۵ درصد از تخمکهایی که در محیط بدون پروتئین کشت شده بودند به مرحله متافاز ۲ رسیدند. هر چند که این امر توسط محقق دیگری مورد آزمایش قرار نگرفته است، ولی به نظر می رسد تولید پروتئین که توسط سلولهای کومولوس صورت می گیرد (۲۵) توانسته باشد در امر بلوغ تخمکهای نارس شتر در آزمایش حاضر موثر باشد. اما بهر حال به نظر می رسد این میزان پروتئین بسیار ناکافی بوده باشد. هر چند در باروری آزمایشگاهی تخمکهای گاو با استفاده از همین میزان پروتئین میزان باروری مطلوبی به دست آمده است (۲۶، ۲۷).

اینکه آیا تخمکهای بالغ شده در شرایط حاضر را می توان برای باروری آزمایشگاهی مورد استفاده قرار داد یا خیر به درستی مشخص نشده است.



- Theriogenology, 48: 461-469.
8. Cognie, Y., Crozet, N., Guerin, Y., Poulin, N., Bezard, J., Duchamp, G., Magistrini, M. and Palmer, E. (1992): In vitro fertilization in sheep, goats and horses. *Annales-de-Zootechrie*. 41: 3-4.
 9. Cox, J.F. (1991): Effect of the cumulus on in vitro fertilization of in vitro matured cow and sheep oocytes. *Theriogenology*, 35, 1: 191 (abst.).
 10. Crozet, N., Huneau, D., Desmedet, V., Theron, M-C., Szollosi, D., Torres, S. and Sevellec, C. (1987): In vitro fertilization with normal development in the sheep. *Gamete Research*, 16: 159-170.
 11. Funahashi, H. and Day, B.N. (1993): Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 98: 179-185.
 12. Grupen, C.G., Nagashima, H. and Nottle, M.B. (1993): Asynchronous meiotic progression in porcine oocytes matured in vitro: A cause of polyspermic fertilization. *Reprod. Fertil. Dev.* 9: 187-191.
 13. Hynes, A.C., Streenan, J. M. and Kane, M.T. (1996): Modulation of the effects of FSH, androstendione, epidermal growth factor (EGF) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on bovine granulosa cells by GCIF, a growth -inhibitory factor of low molecular mass from bovine follicular fluid. *J. Reprod. Fert.*, 108, 193-197.
 14. Ka, H-H., Sawai, K., Wang, W-H., Im, K-S. and Niwa, K. (1997): Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated in vitro. *Biol. Reprod.*, 57: 1478-1483.
 15. Keskinetepe, L. and Brackett, B.G. (1996): In vitro developmental competence of in vitro matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol. Reprod.*, 55: 333-339.
 16. Larocca, C., Kmaid, S. and Calvo, J. (1993): Effect of follicular fluid and estrus cow serum on maturation, fertilization and development of the bovine oocytes in vitro. *Theriogenology*, 39: 253 (abst.).
 17. Lu, K.H., Gordon, I. and McGovern, H. (1998): Factors affecting in vitro development of in vitro fertilized (IVF) cattle eggs in relation to follicle size in donor ovary and time of transfer to sheep oviduct. 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Dublin, Ireland. June, Vol. 3, paper No. 340.
 18. Mogas, T., Palomo, M.J., Izquierdo, M.D. and Paramio, M.T. (1997): Developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from prepubertal and adult goats. *Theriogenology*, 47: 1189-1203.
 19. Mogas, T., Palomo, M.J., Izquierdo, M.D. and Paramio, M.T. (1997): Morphological events during in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 48: 815-829.
 20. Monniaux, D., Monget, P., Besnard, N., Huet, C. and Pisselet, C. (1997): Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology*, 47: 3-12.
 21. O'Brien, J.K., Catt, S.L., Ireland, K.A., Maxwell, W.M.C. and Evans, G. (1997): In vitro and in vivo developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. *Theriogenology*, 47: 1433-1443.
 22. Pugh, P.A., Tervit, H.R., Thompson, J.G.E. (1991): Parthenogenetic activation of sheep oocytes by electric current. *Theriogenology*, 35, 1: 260 (abst.).
 23. Sanbuissho, A. and Threlfall, W.R. (1989): The effects of estrus cow serum on the in vitro maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. *Theriogenology*, 31: 693-699.
 24. Schellander, K., Fuhrer, F., Brackett, B.G., Korb, H. and Schleger, W. (1990): In vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrus cow serum. *Theriogenology*, 33: 477-485.
 25. Sullivan, R., Duchesne, C., Fahmy, N., Morin, N. and Dionne, P. (1990): Protein synthesis and acrosome reaction-inducing activity of human cumulus cells. *Human Reprod*, 5:830-834.
 26. Tajik, P., Niwa, K., Murase, T. (1993): Effects of different protein supplements in fertilization medium on in vitro penetration of cumulus-intact and cumulus-free bovine oocytes matured in culture. *Theriogenology*, 40:949-958.
 27. Tajik, P., Wang, W.H., Okuda, K., Niwa, K. (1994): In vitro fertilization of bovine oocytes in a chemically defined, protein-free medium varying the



- bicarbonate concentration. *Biol. Reprod.*, 50:1231-1237.
28. Torner, H., Heleil, B., Alma, H., Ghoneimc, I.M., Srsend, V., Kanitza, W., Tuchscherera, A., and Fattouh, E.M. (2003): Changes in cumulus-oocyte complexes of pregnant and non-pregnant camels (*Camelus dromedarius*) during maturation in vitro. *Theriogenology* 60: 977-987.
29. Wahid, H., Monaghan, P. and Gordon, I. (1992): In vitro maturation (IVM) of sheep follicular oocyte. *J. Reprod. Fert.*, 89: 52 (abst.).
30. Yadav, B.R., Katiyar, P.K., Chauhan, M.S. and Madan, M.L. (1997): Chromosome configuration during in vitro maturation of goat, sheep and buffalo oocytes. *Theriogenology*, 47: 943-951.

