مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید صدوقی یزد
دوره پانزدهم ، شماره اول ، بهار ۱۳۸۶، صفحات ۷۳-۶۸

استفاده از سرم موش صحرایی تهیه شده در مرحله استروس برای بلوغ آزمایشگاهی تخمک های گاو

غلامعلی جلودار*[1]، سیده سارا هاشمی[2]، امین الله بهاء الدینی[3]، علی رضا رفعتی[4]

چکیده

مقدمه: لزوم بالغ سازی تخمک ها در محیط آزمایشگاهی به منظور بهبود شرایط باروری آزمایشگاهی(IVF) در دهه اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است. معمولاً در محیط های کشت که به این منظور تهیه می شود از مکمل های هورمونی استفاده می گردد که تهیه آنها مشکل و بسیار گران است. استفاده از سرم موش صحرایی ماده در مرحله ی استروس که غنی از هورمون ها می باشد می تواند علاوه بر افزایش احتمال بالغ سازی، هزینه های مربوط را نیز کاهش دهد.

روش بررسی: این مطالعه از نوع تجربی به منظور بررسی امکان استفاده از سرم موش صحرایی تهیه شده در مرحله استروس RSS (Rat Strus Serum) به جای سرم جنینی گاو(FBS) ومقایسه اثر آنها در محیط کشت جهت بالغ سازی تخمک های گاو انجام گردید. برای این منظور تعداد ۱۷۸۹ تخمک از تخمدان های گاو های ذبح شده طی یک سال در کشتار گاه جدا و پس از انجام مراحل شستشو، در سه محیط مختلف کشت داده شدند. محیط کشت کنترل حاوی TCM-199، آنتی بیوتیک، HCG و مایع فولیکولی (تهیه شده از فولیکول های قابل مشاهده بر روی تخمدان) و محیط های کشت دوم وسوم علاوه بر مواد مذکور به ترتیب حاویFBS یا RSS بود. سرم موش صحرایی پس از تشخیص مرحله استروس با خونگیری از قلب و انجام مراحل غیر فعال سازی، تهیه و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان استفاده نگهداری گردید. پس ازکشت تخمک ها به مدت ۲۴ ساعت درانکوباتور ۳۸/۵ درجه سانتیگراد، ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد، میزان بلوغ تخمک ها با توجه به پراکندگی سلول های کومولوس یا رنگ آمیزی استواورسئین و مشاهده جسم قطبی با میکروسکوپ نوری تعیین گردید.

نتایج: اطلاعات به دست آمده توسط آزمون مربع کای مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن هر دو نوع سرم به طور معنی داری ($P<0.001$) بلوغ تخمک ها را در مقایسه با محیط کنترل افزایش می دهد (۹۰/۲٪ در محیط حاوی سرم در برابر ۷۸/۷٪ در محیط کنترل). همچنین در نتایج حاصل تفاوت معنی داری بین دو محیط حاوی سرم مشاهده نگردید (۸۶/۶٪ در محیط حاوی FBS در برابر ۹۰/۲٪ در محیط RSS).

نتیجه گیری: RSS بر بالغ سازی تخمک گاو اثرات مثبت داشته و می تواند به جای FBS جهت بالغ سازی تخمک گاو مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: بلوغ آزمایشگاهی تخمک، سرم موش صحرایی، تخمک های گاو

مقدمه

با توجه به مشکلاتی که فزون تحریکی تخمدان برای جمع آوری تخمکهای اضافی ایجاد می نماید، لزوم بالغ سازی تخمک ها در محیط آزمایشگاهی به منظور کاهش این مشکلات و بهبود شرایط لقاح آزمایشگاهی(IVF) در دهه اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است[(1)]. بهبود و افزایش کارایی این تکنولوژی به طور گسترده‌ای موجب پیشرفت در بیوتکنولوژی تولید مثل شده است. از طرف دیگر باروری و بلوغ آزمایشگاهی تخمک ها، در انسان

۱*- نویسنده مسئول: استادیار بخش فیزیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز
تلفن : ۲۲۸۶۹۵۰ داخلی ۸۷۵۷ ، همراه: ۰۹۱۷۳۱۶۱۱۹۴
Email: Jelodar@shirazu.ac.ir
۲- کارشناس ارشد بیولوژی (گرایش فیزیولوژی)
۳- استادیار بخش فیزیولوژی دانشکده علوم، دانشگاه شیراز
۴- دامپزشک، مسئول فنی کشتارگاه شیراز
تاریخ دریافت: ۱۳۸۵/۳/۲۲ تاریخ پذیرش:۱۳۸۵/۱۱/۱۲

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-06-26]

جهت درمان برخی از ناباروریها و در دامها به منظور افزایش تولید و پیشرفت در تحقیقات علمی پایه، انتقال هسته، حذف ژنهای معیوب و جایگزینی ژنهای مطلوب (اصلاح‌نژاد)، اضافه کردن ژنهای مقاوم در برابر بیماریهای خاص، ایجاد حیوانات ترانس ژنیک و ایجاد کلون به کمک مهندسی ژنتیک صورت می گیرد[۲].

امروزه متداول ترین منبع جمع آوری تخمک های مورد نیاز برای تولید رویان در شرایط آزمایشگاهی، استفاده از تخمدان های حیوانات تازه کشتار شده می باشد که منبع مناسب و ارزان قیمتی برای این منظورمی باشند[۲]. بدین منظور محیط های کشت حاوی مواد شیمیایی، اسید آمینه های مختلف، آنتی بیوتیکها ، مواد بیولوژیکی و پروتئینی (که وجود آنها برای کشت ضروری است) مورد استفاده قرار گرفته و بکاربردن محیط های مختلف کشت برای این منظور نتایج متفاوتی به دست آورده است[۸-۳]. معمولاً در محیط های کشت از مکمل های هورمونی استفاده می گردد که تهیه آنها مشکل و بسیار گران است. استفاده از سرم موش صحرایی ماده در مرحله ی استروس که غنی از هورمون ها می باشد می تواند علاوه بر افزایش احتمال بالغ سازی، هزینه های مربوط را نیز کاهش دهد. انواع مختلفی از سرمهای خون به عنوان ماده مکمل به محیط کشت افزوده می شوند و نقش مهمی را در محیط کشت بازی می کنند. لیکن تا کنون نقش دقیق سرم در بهبود بلوغ و باروری تخمک و مراحل تکاملی رویان به درستی شناخته نشده است. مشخص شده است که مولکولهای درشت از جمله پروتئین ها و عوامل رشد موجود در سرم برای کشت تخمک ضروری می باشند و به همین دلیل سرم های مختلفی برای کشت تخمک مورد استفاده قرار گرفته اند[۱۰-۸]. گزارش های مختلف بیانگرنتایج متفاوت و بعضاً متناقص از اثر انواع سرم های مورد استفاده در محیط کشت تخمک می باشد[۱۱]. لذا این تحقیق با اهداف زیر انجام گردید :

۱- بررسی تأثیر مایع فولیکولی(FF) به تنهایی به محیط کشت (به عنوان گروه کنترل) بر بلوغ مناسب تخمک ها.

۲- بررسی تأثیر سرم موش صحرایی تهیه شده در مرحله استروس (RSS) به محیط کشت کنترل بر بهبود بالغ سازی تخمک در شرایط آزمایشگاهی

۳- مقایسه اثرافزودن RSS تهیه شده در آزمایشگاه با FBS تجاری (Sigma) به محیط کشت بر بالغ سازی تخمک در شرایط آزمایشگاهی.

روش بررسی

این مطالعه از نوع تجربی است که بر روی ۱۷۸۹ تخمک از تخمدان گاوهای ذبح شده در کشتارگاه شیراز و طی یک سال انجام گرفته و تخمک ها پس از مراحل شستشو در سه محیط مختلف کشت داده شده اند. محیط کشت پایه برای بلوغ تخمک های جمع آوری شده TCM-199 (ساخت Sigma) بوده که به صورت تجاری در دسترس می باشد، و متداول ترین محیط کشت مورد استفاده در بلوغ تخمک پستانداران می باشد. این محیط حاوی املاح مختلف، قندها، اسیدهای امینه، ویتامین ها، اسیدهای نوکلئیک و سایر موادی است که جزییات آن مشخص می باشد[۱۲]. در این مطالعه مایع فولیکولی و RSS به ترتیبی که توضیح داده می شود در آزمایشگاه تهیه و اثر افزودن هر کدام از آنها به محیط کشت با FBS (ساختSigma) که به صورت تجاری در دسترس می باشد، مقایسه گردید.

تهیه سرم موش صحرایی: جهت تهیه RSS پس از تشخیص مرحله استروس با کمک گسترش واژنی در موشها، خونگیری از قلب انجام و پس از مراحل غیر فعال سازی سرم‌ها (قرار دادن در بن ماری ۵۶ درجه ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه)و استریل نمودن آن‌ها توسط فیلتر ۰/۲۲ میکرونی، در لوله‌های اپندرف ۱/۵ میلی‌لیتری بسته‌بندی شده و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

تهیه مایع فولیکولی: برای این منظور ۱۵۰ تخمدان از گاوهای تازه کشتار شده تهیه و پس از انتقال به آزمایشگاه، با کمک سرنگ، مایع فولیکولی از فولیکول‌های قابل مشاهده جدا گردید. مایع فولیکولی جدا شده، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ و پس از فیلتر کردن(۰/۲۲ میکرون) در دمای ۲۰- درجه ی سانتی‌گراد تا زمان استفاده فریز گردید.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-06-26]

جمع آوری و کشت تخمک ها: تعداد ۵۷۴ تخمدان گاو بلافاصله پس از کشتار دام در مجتمع صنعتی گوشت فارس و کشتارگاه صنعتی دام مهارلو جمع‌آوری شده وحداکثر در مدت ۳-۲ ساعت بعد از کشتار، در فلاسک حاوی سرم فیزیولوژی و آنتی بیوتیک در دمای سرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه تخمدان ها چند بار با سرم فیزیولوژی استریل شستشو و به روش مکش (**aspiration**) با سرنگ مایع فولیکولی از فولیکول های سطح تخمدان تخلیه نموده و پس ار انتقال به پتری دیش، توسط میکروسکوپ استریو جهت جمع آوری اووسیت ها مورد بررسی قرار گرفت.

تخمک‌های جمع آوری شده به سه دسته تقسیم شدند؛ دسته اول تخمک‌هایی که در اطرافشان چند لایه سلولی متراکم از سلول های کومولوس داشتند(درجه خوب) دسته دوم، تخمک‌هایی که دو یا سه لایه از سلول های کومولوس را در اطراف خود داشتند (نسبتاً خوب) و دسته سوم، تخمک‌های فاقد سلول های کومولوس یاتخمک‌های لخت (بد) .

در این آزمایش تعداد۱۷۸۹ تخمک با کیفیت خوب (حاوی بیش از سه لایه کومولوس متراکم به همراه سیتوپلاسم گرانوله یکنواخت) از میان ۲۶۹۶ تخمک جمع آوری شده برای بلوغ آزمایشگاهی انتخاب شدند. پس از ۴ بار شستشو ، هر ۵ تا۱۰ تخمک درقطره‌های ۱۰۰ میکرولیتری از محیط‌های کشت زیر به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با حرارت داخلی ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و میزان ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد نگهداری شدند.

محیط کشت اول (کنترل) شامل TCM-199، ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین جی و ۱۰۰ میکروگرم استروپتومایسین در هر صد میلی‌لیتر ، ۵ درصد مایع فولیکولی و ۰/۷۵ واحد گنادوتروپین جفتی انسانی (**HCG**) در هر میلی‌لیتربود. به محیط کشت دوم و سوم علاوه بر مواد فوق به ترتیب۱۰ درصد **RSS** و یا **FBS** اضافه گردید. این محیط ها دوبار به طور جداگانه توسط فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل شدند . 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 تخمک ها از نظر پراکندگی سلول های کومولوس مورد ارزیابی قرار گرفتند. به منظور بررسی وجود جسم قطبی ، سلول های کومولوس اطراف هر تخمک در زیر لوپ به کمک آنزیم هیالورونیداز و با مکش و دمیدن مکرر با پیپت دهانه نازک از تخمک ها جدا کرده و تخمک های فاقد کومولوس بین لام و لامل ثابت گردید. لام ها به مدت ۲-۳ روز در مایع ثابت کننده (محلول اسید استیک-اتانول به نسبت ۱ به ۳) قرار گرفته و سپس با رنگ استو-اورسئین یک درصد رنگ آمیزی، و بلافاصله در زیر میکروسکوپ نوری از نظر وجود جسم قطبی مورد مطالعه قرارگرفتند.

آنالیز آماری: میانگین بلوغ تخمکها در گروه های مختلف با استفاده از نرم‌افزار **SPSS** و آزمون آماری (**Chi-square**) در سطح (**P**<۰/۰۵) از نظر آماری تجزیه و تحلیل گردید.

نتایج

در مطالعه حاضر از ۵۷۴ تخمدان جمع آوری شده در مجموع ۲۶۹۶ تخمک حاصل و تعداد ۱۷۸۹ تخمک با کیفیت خوب 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.

در محیط کشت کنترل ۵۰۲ و در محیط کشت دوم(حاوی RSS) و سوم(حاوی FBS) به ترتیب ۶۳۱ و ۶۵۶ تخمک تخمک کشت داده شد. از این تعداد به ترتیب ۳۹۵ تخمک در محیط کنترل ، ۵۶۹ و ۵۶۸ تخمک در محیط کشت دوم و سوم بالغ شدند. بنابراین درصد بلوغ تخمکها در محیط کنترل، دوم و سوم به ترتیب ۷/ ۷۸، ۹۰/۲ و ۸۶/۶ بود. اطلاعات مربوط به تعداد و درصد بلوغ و عدم بلوغ تخمک ها به تفکیک در جدول (۱) مشاهده می شود. مقایسه آماری این بررسی نشان داد که بین میانگین میزان بلوغ تخمک و محیطهای کشت به طور معنی داری تفاوت وجود دارد (**P**<۰/۰۰۰۱). همچنین بین هر یک از گروههای**FBS** و **RSS** با گروه کنترل تفاوت معنی داری مشاهده گردید (به ترتیب**P**<۰/۰۰۰۵ و **P**<۰/ ۰۰۰۱) . میزان بلوغ تخمکها در محیطهای حاوی سرم **FBS** با **RSS** از نظر آماری تفاوت معنی داری نشان نداد(P=۰/۰۵۵).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-06-26]

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-06-26]

جدول(۱): مقایسه میزان بلوغ تخمک های گاو در محیط های مختلف

محیط کشت	تعداد تخمک های بالغ (درصد)	تعداد تخمک های نا بالغ(درصد)	تعداد کل تخمک
کنترل	۳۹۵(۷۸/۷)	۱۰۷(۲۱/۳)	۵۰۲
حاوی RSS	۵۶۹ (۹۰/۲) *	۶۲ (۹/۸)	۶۳۱
حاوی FBS	۵۶۸ (۸۶/۶) *	۸۸ (۱۳/۴)	۶۵۶
جمع	۱۵۳۲ (۸۵/۶)	۲۵۷ (۱۴/۳)	۱۷۸۹

* با استفاده از آزمون مربع کای، اختلاف معنی دار با گروه کنترل نشان داد(P<۰/ ۰۰۰۱)

بحث

در این تحقیق پراکندگی سلول های کومولوس به عنوان فاکتوری برای تعیین بلوغ تخمکها در نظر گرفته شد. سلول های کومولوس در اثر افزایش ترشح گنادوتروبین قبل از تخمک گذاری پراکندگی پیدا می کنند و شکاف های اتصالی بین سلو ل های کومولوس مجاور و بین سلول های کومولوس و تخمک شکسته می شود. وجود حالت پراکندگی در سلول‌های کومولوس اطراف تخمک ها رابطه قوی با بلوغ هسته‌ای تخمک دارد[۱۳،۱۴].

نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن سرم موش صحرایی همانند سرم جنینی گاو بر بلوغ تخمک های گاو مؤثر بود و افزودن هر دو سرم اثراتی بهتر از مایع فولیکولی ایجاد نمود. مطالعات متعددی در مورد تأثیر غلظت‌های مختلف مایع فولیکولی در بهبود بلوغ آزمایشگاهی تخمک گاو و خوک صورت گرفته است[۱۵-۱۷]. همچنین مایع فولیکولی رقیق شده به عنوان جایگزین مناسبی برای سرم در بلوغ آزمایشگاهی جنین اسب[۱۸] گاومیش[۱۹]، خوک[۱۶] و بز[۱۰] مورد استفاده قرار گرفته است. نتیجه کلی حاصل از این تحقیقات را می‌توان به صورت زیر خلاصه کرد:

۱- میزان بلوغ تخمک در مایع فولیکولی بستگی به سیکل استروس دارد.

۲- مایع فولیکولی غیر رقیق شده‌ی حاصل از فولیکول های بزرگ بهتر از مایع فولیکولی حاصل از فولیکول های کوچک و متوسط برای بالغ سازی تخمک مؤثر است.

۳- رشد کامل جنین تا مرحله بلاستوسیت با حضور مایع فولیکولی رقیق شده طی بلوغ آزمایشگاهی تخمک حمایت می‌شود گرچه مایع فولیکولی مزیتی بر سرم رقیق شده ندارد[۲۰].

بسیاری از محققین افزودن سرم را به عنوان یک ماده مکمل به محیط کشت تخمک، سبب بهبودکیفیت این محیط ها می دانند. مشخص شده است که مولکولهای درشت موجود در سرم برای کشت تخمک ضروری می باشند و به همین دلیل سرم های مختلفی از جمله سرم گوساله جنینی (FCS)، سرم گوسفند فحل(ESS)، سرم بز فحل(EGS) و سرم گاومیش فحل برای کشت تخمک مورد استفاده قرار گرفته اند[۱۰،۱۳]. سرم حاوی انواع مختلفی ازمواد از جمله هورمون ها، عوامل رشد، ویتامین ها، مواد شلاته کننده، یونهای فلز سنگین، پپتیدها، پروتئین ها و یک سری از مولکول های مشخص و نامشخص است[۶،۱۰]. با این وجود مواد مؤثر این سرم ها هنوز ناشناخته مانده اند و نقش دقیق سرم در حمایت از بلوغ و باروری تخمک به درستی شناخته نشده است. هر چند که محققین بر این باورند که پروتئین ها و عوامل رشد موجود در سرم در موفقیت کشت آزمایشگاهی سهیم هستند. گزارشهای مختلف بیانگر نتایج متفاوت و بعضاً متناقض از اثر انواع سرم های مورد استفاده در محیط کشت تخمک می باشد. Totey و همکاران (۱۹۹۳) اثر غلظت ۱۰ درصد FCS را در محیط کشت (TCM-199) بر بلوغ تخمک های گاومیش بررسی کرده و مشاهده کردند که میزان بلوغ تخمک با اضافه کردنE2، FSH، LH به همراه FCS افزایش می یابد ولی اضافه کردن هر یک به تنهایی و یا با هم اثری بر میزان باروری تخمک نداشت[۲۱]. گزارش تاجیک و اسفندآبادی (۲۰۰۳) تأثیر محیط‌های کشت مختلف بر بالغ‌سازی تخمک‌های بز نشان داد که بلوغ تخمک ها در محیط های حاوی سرم جنین گاو (FBS)، سرم میش فحل (ESS) و سرم بز فحل (GSS) اختلاف معنی‌داری نداشت اما در

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-06-26]

مقایسه با محیط بدون سرم میزان بلوغ به طور معنی‌داری افزایش یافت[۱۰]. نتایج حاصل از این تحقیق نیز نشان داد که میزان بلوغ تخمک در گروه کنترل(فاقد سرم) در مقایسه با گروههای حاوی سرم از نظر آماری به طورمعنی داری کمتر بوده است.

در این تحقیق سرم موش صحرایی در مرحله استروس 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 بعضاً متناقض از انواع سرم های مورد استفاده درمحیط کشت تخمک به چشم می خورد.

برخی از پژوهشگران استفاده ازFCS را بر سایر انواع سرم ها ترجیح می دهند. اغلب این محققین اعتقاد دارند FCS حاوی برخی مواد محرک رشد ناشناخته است که در سرم حیوانات بالغ وجود ندارد یا این سرم فاقد اجزایی همچون هورمون ها و ایمونوگلوبین هایی است که وجود آنها در سرم حیوانات بالغ موجب تأخیر در تکامل سلول ها در آزمایشگاه می شوند[۸].

برخی دیگر استفاده از سرم حیوانات فحل را به دلیل از سرگیری میوز و بلوغ تخمک در زمان فحلی در محیط کشت تخمک توصیه می کنند[۸].

استفاده ازسرم موش در مرحله استروس به علت کوتاه بودن طول دوره استروس، دسترسی آسان و این نکته که در هر سیکل جنسی چندین تخمک آزاد می کند و احتمالاً محتوی مقدار قابل توجهی هورمون ها، پروتئین ها و عوامل رشد می باشد برای کشت آزمایشگاهی و بالغ سازی تخمک مناسب به نظر می رسد.

نتیجه گیری

این تحقیق نشان دهنده نیاز به افزودن سرم به محیط کشت بلوغ تخمک و امکان استفاده از سرم موش صحرایی تهیه شده در مرحله استروس به جای FBS با اثرات مشابه جهت بالغ سازی تخمک می باشد.

References

1- Hreinsson, J. Rosenlund, B.Friden,B. Levkov,L. ***Recombinant LH is equally effective as recombinant hCG in promoting oocyte maturation in clinical in-vitro maturation programme: a randomized study.*** Hum. Repro. 2003: 18, 2131-2136**.**

2- Gordon, Ian. ***Reproductive technology in farm animals.*** 1st Ed. CABI publication. 2005: 108-128.

3- Ball, G.D, M.L. Leibfried, R.L. Ax and N.L. First. Symposium: ***Embryo development and manipulation.*** J. Dairy Sci , 1984: 67, 2775-2785.

4- Bevers, M.M., S.J. Dieleman, R. Vanden Hurk and F. Izadyar. ***Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine.*** Theriogenology, 1997: 47, 13-22.

5- Choi, Y.H, E.M. Carnevale, G.E. Seidel and E.L. Squires**.** ***Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199.*** Theriogenology, 2000: 56, 661-670

6- Hafez, E.S.E. ***Reproduction in Farm Animals.*** 7th Ed, Wolters kluwer company, Philadelphia, 2000 U.S.A : 68-159

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-06-26]

7- Monniaux, D, P. Monget, N. Besnard, C. Huet and C. Pisselet. ***Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants.*** Theriogenology, 1997: 47, 3-12.

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

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

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

11- Fukui, Y, H. Ono. ***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.

12- Boone, W.R, S.S. Shapiro. ***Quality control in the vitro fertilization laboratory.*** Theriogenology. 1990: 33, 23-50.

13- Dos, S.K., M.S. Chauhan, P. Palta and O.S. Tomer. ***Influence of cumulus cells on in vitro maturation of denuded buffalo oocytes.*** Vet. Rec. 1997, 141. 522-523

14- Sutton, M.L, R.B. Gilchrist and J.G. Thompson. ***Effects of in vivo and in vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity.*** Human Reprod. 2003: Vol. 9, No. 1. 35-48.

15- Khatir, H. C. Carolan, P. Lonergan , P. Mermillod. ***Characterization of calf follicular fluid and its ability to support cytopasmic maturation of cow and calf oocytes.*** J. Reprod. and Fertil. 1997, 41, 267-275.

16- Grupn, C.G, H. Nagashima, M.B. Nottel. ***Asynchronous meiotic progression in porcine oocytes matured in vitro: A cause of polyspermic fertilization.*** Reprod. Fertil. 1993: Dev. 9, 187-191.

17- Avery, B, L. Strobech, T. Jacobsen, I.B. Bogh , T. Greve. ***In vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes in undiluted follicular fluid: effect on nuclear maturation, pronuclear formation and embryo development.*** Theriogenology, 2003: 59, 987-999.

18- Aguilar, J.J, G.L. Woods, M.H. Miragaya, L.M. Olsen ,D.K. Vanderwall. ***Effect of Homologous preovulatory follicular fluid In vitro maturation of Equine cumulus-oocyte complexes.*** Theriogenology, 2001: Vol. 56, pp. 745-758

19- Jelodar, G.A, O.P. Dahanda , P.S. Yadav and Inderjeet Singh. ***Buffalo oocytes maturation, fertilization and development in vitro in conventional media with supplement or in buffalo follicular fluid.*** Indian Buffalo .J. 2003: 1,1-4.

20- Driancourt, M.A. and B. Thuel. ***Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid.*** A Review. Reprod. Nutri. Dev. 1998: Vol. 38: 345-362

21- Totey, S.M, C.H. Pawshe, G.P. Singh. ***In vitro maturation and fertilization of buffalo oocytes (Bubalus bubalis): Effects of Media, Hormones and sera.*** Theriogenology, 1993: 39, 1153-1171.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-06-26]