بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای نارس شتر یک 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[۱] دکتر پژمان میرشکرایی[۱]

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

هدف: انجام بلوغ آزمایشگاهی تخمک نارس شتر یک 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 ودر دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتیگراد و حاوی آنتی بیوتیک، مکش فولیکول ها 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 حرات 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 شتر یک 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 در صد پروتئین (به ترتیب ۳۷ و ۳۳ درصد) به طور معنی داری افزایش یافت (P<۰/۰۵)، 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 در صد و ۱۰ درصد پروتئین (به ترتیب ۲۵/۸۶ و ۳۳/۳۳ درصد) به طور معنی داری افزایش یافت (P<۰/۰۵)، در این آزمایش هر چند با افزایش غلظت سرم میزان بلوغ افزایش داشت ولی اختلاف آنها معنی دار نبود.

نتیجه گیری: درشرایط حاضر به نظر می رسد که بتوان تخمدانهای شتر را درسرمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری وسپس مورد استفاده قرار داد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، دوره ۶۰، شماره ۲، ۱۴۸-۱۴۳.

واژه‌های کلیدی: بلوغ آزمایشگاهی، شتریک کوهانه، محیط هامز اف ۱۰، سرم گوساله جنینی. نگهداری درسرما.

بلوغ آزمایشگاهی از پیش نیازهای باروری آزمایشگاهی می باشد. از طرف دیگر بلوغ آزمایشگاهی می تواند اووسیتهای مورد نیاز انتقال هسته و همانند سازی را دراختیار قرار دهد. فن آوریهای تولیدمثلی درسالهای اخیر در گونه های مختلف، بخصوص نشخوارکنندگان بسیار مورد توجه قرار گرفته است، که علت آن تولید

۱) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) دانش آموخته دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۳) گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران - ایران.
*) نویسنده مسؤول: ptajik@ut.ac.ir

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]

[1]Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran. [2]Graduated from Faculty of Agriculture, University of Tehran, Tehran-Iran. [3]Department 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 varies 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 CO_2 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

تعداد زیادی رویان ارزان قیمت در خارج بدن جهت کارهای تحقیقاتی یا انتقال جنین می‌باشد (۳). باروری آزمایشگاهی تخمک‌هایی که ازداخل اویدوکت گوسفند جمع آوری شده بودند، به دهه ۱۹۵۰ میلادی برمی‌گردد که Dauzier 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 (۱۲، ۱۰). تولد اولین بره از طریق انتقال هسته و همانندسازی غیرجنسی برای اولین بار در میان گونه‌های مختلف حیوانات توسط Campbell و همکارانش در سال ۱۹۹۵ میلادی گزارش شد (۶).

گزارشهایی وجود دارند مبنی بر اینکه با تجویز گنادوتروپینها به بره‌ها و بزغاله‌های جوان و سپس جمع آوری تخمک‌های آنها از راه لاپاراسکوپی، می‌توان تعداد زیادی بلاستوسیست در آزمایشگاه تولیدنمود و باانتقال این رویانهاموجب افزایش توان ژنتیکی گله و کاهش فاصله نسلی شد (۲۱، ۱۹).

امروزه متداولترین روش جمع آوری تخمک، تخمدانهایی هستند که از حیوانات تازه کشتار شده در کشتارگاه به دست می‌آیند و منبع ارزان قیمتی هستند که برای تولید رویان در آزمایشگاه به کار گرفته می‌شوند. این تخمدانها به آزمایشگاه حمل شده و در آن جا تخمک‌ها گرفته شده و در محیط های مختلف جهت بلوغ کشت می‌گردند. مدت زمان بلوغ تخمک در محیط آزمایشگاه در گونه‌های مختلف متفاوت است که براساس یافته‌های In vivo می‌باشد. بعنوان مثال این زمان در اغلب مطالعات در گاو ۲۴ ساعت (۱۳ و ۱۵۰)، 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 گرفته‌اند (۱۲، ۹). 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 تفاوت‌هایی در نتایج مطالعات مختلف می‌تواند 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 تخمک‌های پستانداران به کار گرفته‌اند 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 (۷، ۴)، سلول‌های گرانولوزا (۲۹، ۱۸)، هورمونهای FSH، LH و استرادیول ۱۷بتا (۱۱) و فاکتورهای رشد (۲۰)، به محیط کشت بلوغ تخمک در گونه‌های 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، پیروات و آنتی بیوتیک انجام داده‌اند (۵).

مواد و روش کار

محیط مورداستفاده برای انتقال تخمدانها از کشتارگاه به آزمایشگاه سرم فیزیولوژی و محیط پایه مورد استفاده برای بلوغ تخمکها محیط هامز اف 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 می‌شد. سرم گوساله جنینی قبلا 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 بر ودت ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شده بود. در هر سی سی از محیطها ۱۰۰ واحد پنیسیلین G و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین سولفات نیز استفاده می‌شد. 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 پنیسیلین G و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین سولفات شستشو شده و در دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل می‌گشت. پس از انتقال به آزمایشگاه، تخمدانها به طور اتفاقی دو دسته شده، یک دسته از سرم گرم خارج شده و روی یخ قرارداده و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شد 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 هامز اف ۱۰ شستشو می‌گشت. این تخمکها که با دقت و طی درجه بندی خاص (جدول شماره ۱) انتخاب می‌شد به نام تخمکهای درجه ۱ (Q1) نامگذاری می‌شد. سپس هر ۱۰ تا ۱۵ عدد از تخمکهای حاوی سلولهای کومولوس اووفروس مناسب درون قطره های ۱۰۰ میکرولیتری محیط کشت مذکور در ظروف کشت پلی استرن (۱۰×۳۰ میلیمتر) منتقل می‌گردید. این قطرات قبلا تهیه و پس از پوشانیدن با پارافین اشباع حداقل ۳ ساعت در انکوباتور CO_2 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 می‌گرفت.

آنالیزآماری

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

جدول ۱ـ دسته بندی تخمکهای استحصال شده شتر یک کوهانه جهت انتخاب و استفاده از آنها در بلوغ آزمایشگاهی.

نامگذاری	Q1	Q2	Q3	Q4
چگونگی	دارای ۵ لایه کومولوس یا بیشتر	دارای ۵-۳ 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 نخمکهای نارس شتر یک کوهانه در محیط هامز اف ۱۰ نشان می‌دهد. از ۵۱ تخمک کشت شده در محیط بدون پروتئین تعداد ۸ عدد در همان مرحله وزیکول ژرمینال باقی مانند 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 ژرمینال 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 معنی‌داری (P<۰/۰۵) بیش از گروه بدون پروتئین بود. در گروه کشت حاوی ۱۰ درصد سرم گوساله جنینی از ۴۸ تخمک نارس کشت شده ۸ تخمک در محله 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 معنی‌داری (P<۰/۰۵) از گروه کنترل بیشتر بود. جالب اینکه با وجود افزایش غلظت سرم در این گروه میزان بلوغ کمتر از گروه ۵٪ سرم گوساله جنینی بود هر چند اختلاف معنی‌داری 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 هامز اف ۱۰ همراه غلظتهای مختلف سرم گوساله جنینی کشت شدند، از ۵۵ تخمک نابالغ کشت

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

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

*موقعیت‌ها: GV= وزیکول ژرمینال، GVBD= از بین رفتن غشای وزیکول، CGV= وزیکول ژرمینال متراکم، M-I= متافاز اول، A-I= آنافاز اول، M-II= متافاز دوم و بالاخره DO= تخمک دژنره شده. a-b دارای اختلاف معنی‌دار در ستون (P<۰/۰۵)

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

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

*موقعیت‌ها: GV= وزیکول ژرمینال، GVBD= از بین رفتن غشای وزیکول، CGV= وزیکول ژرمینال متراکم، M-I= متافاز اول، A-I= آنافاز اول، M-II= متافاز دوم و بالاخره DO= تخمک دژنره شده. a-b دارای اختلاف معنی‌دار در ستون (P<۰/۰۵).

شده در محیط فاقد پروتئین تعداد ۹ تخمک در مرحله وزیکول ژرمینال 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 معنی‌داری 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 حالی‌که 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 معنی‌دار (P<۰/۰۵) داشته ولی اختلاف آن با گروه دارای ۵ درصد سرم گوساله جنینی معنی‌دار نبود.

بحث

تاکنون نقش دقیق سرم در بهبود بلوغ تخمک پستاران به روشنی مشخص نشده است (۲۳). ظاهرا عوامل ناشناخته ای با منشاء سرمی وجود دارند، که در محیط کشت بلوغ تخمک را تسهیل می‌کنند (۲۴). Abdoon در سال ۲۰۰۱ میزان بلوغ تخمکهای شتر یک کوهانه را در محیط کشت پایه CRlaa 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 گرمخانه قرار دادن ۸۵/۵ درصد و با ۴۸ ساعت کشت ۷۲/۵ درصد گزارش نمود (۱). **Torner** و همکاران در سال ۲۰۰۳ میزان بلوغ تحمکهای شتر یک 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 نر و 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 حالی‌که میزن بلوغ در ساعت ۴۸ پس از کشت ۴۰ درصد بود. میزان بلوغ در آزمایش ما بین ۳۳ تا ۳۶ درصد برای ۱۰ و ۵ در صد افزودن سرم گوساله جنینی بود که کمتر از Torner و همکاران است، در حالی که زمان قرار گرفتن تخمکهای نارس شتر یک کوهانه در تجربه ما ۴۲ ساعت بود.

با توجه به اینکه افزودن میزان سرم از ۵ درصد به ۱۰ درصد میزان بلوغ را از ۳۶ به ۳۳ درصد کاهش داده است، به نظر می‌رسد 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 یا دژنره شده بودند. ظاهرا این محقق هیچ یک از تخمک‌ها را در بین مراحل دسته بندی نکرده است. با این فرض ۳۷ 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 می‌باشد. مشابه این امر در گزارش Torner و همکاران نیز وجود دارد. هرچند ایشان میزان بلوغ را پس از ۴۲ ساعت ۵۸/۹ درصد گزارش نموده‌اند 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 در این مورد گزارش Torner و همکاران حاکی از ۴/۹ 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 می‌رسد و ما و دیگران از آزمایش آن عاجز هستیم، به نظر می‌رسد اختلاف در وضعیت جغرافیایی، ژنتیکی و تغذیه ای شترهایی باشد که نحر می‌گردند. 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 موقعیت‌های 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 برودت 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 می‌توان آنها را برای بلوغ تخمک مورد استفاده قرار داد یا خیر. با توجه به مشابهت میزان بلوغ در مورد دو آزمایش به نظر می‌رسد 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. هرچند که این امر توسط محقق دیگری مورد آزمایش قرار نگرفته است، ولی به نظر می‌رسد تولید پروتئین که توسط سلولهای کومولوس صورت می‌گیرد (۲۵) توانسته باشد در امر بلوغ تخمکهای نارس شتر در آزمایش حاضر موثر باشد. اما بهر حال به نظر می‌رسد این میزان پروتئین بسیار ناکافی بوده باشد. هرچند در باروری آزمایشگاهی تخمکهای گاو با استفاده از همین میزان پروتئین میزان باروری مطلوبی به دست آمده است (۲۷، ۲۶).

اینکه آیا تخمکهای بالغ شده در شرایط حاضر را می‌توان برای باروری آزمایشگاهی مورد استفاده قرار داد یا خیر به درستی مشخص نشده است. بهر حال آزمایشهای تکمیلی لازم است تا به این سئوال 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 می‌دانند 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 بودجه‌های چاپ و تکثیر تشکر می‌شود.

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 Radziewic, 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.

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. Keskintepe, 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 prepuberal 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.