مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هفتم، شماره بیست و پنجم - زمستان ۱۳۹۵

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی اثر اسانس رازیانه بر روی بلوغ هسته تخمک گاو

شیما حاجیان[۱]، محمد زندی[۲*]، میترا حیدری نصرآبادی[۱]

۱- گروه زیست شناسی؛ دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند

۲- سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: موفقیت تولید آزمایشگاهی رویان تا حدود زیادی وابسته به محیط کشت تخمک در زمان بلوغ آزمایشگاهی می باشد. رازیانه با دارا بودن ترکیب هایی مانند آنتول دارای خواص مشابه استروژن می باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر اسانس رازیانه بر روی بلوغ هسته تخمک گاو بود.

مواد و روش ها: به منظور انجام بلوغ آزمایشگاهی، مجموعه تخمک کومولوس (۷۷۲ عدد) از فولیکول هایی به قطر ۸-۲ میلی متر استحصال و در محیط کشت بلوغ M199 حاوی ٪ ۱۰ سرم جنین گاو، هورمون تحریک کننده فولیکولی (۵ μg/ml)، β-۱۷ استرادیول (۱ μg/ml)، سدیم پیروات (۰/۸۱ mM)، ٪ ۱۰ مایع فولیکولی گاو و جنتامایسین سولفات (۵۰ μg/ml) کشت داده شدند. به محیط های کشت بلوغ گروه های آزمایشی مقادیر ۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر اسانس رازیانه اضافه شد و در انکوباتور ۳۸/۵ درجه سانتی گراد، دی اکسید کربن ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد برای مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند.

یافته ها: نتایج نشان داد که میزان بلوغ تخمک ها در محیط های دارای اسانس رازیانه با غلظت های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر بر اساس توسعه سلول های کومولوس و وجود جسم قطبی در مقایسه با شاهد اختلاف معنی داری نداشت ($P>۰/۰۵$). در حالی که غلظت mg/ ۵۰ ml به طور معنی داری توسعه سلول های کومولوس و وجود جسم قطبی را نسبت به سایر گروه ها کاهش داد($P<۰/۰۵$) .

نتیجه گیری: یافته های این تحقیق نشان داد که اسانس رازیانه بر اساس توسعه سلول های کومولوس و وجود جسم قطبی باعث افزایش بلوغ هسته تخمک های گاو نشد. پیشنهاد می شود از فناوری لقاح آزمایشگاهی به منظور ارزیابی اثر اسانس رازیانه بر روی بلوغ هسته و سیتوپلاسم تخمک های گاو استفاده شود.

واژگان کلیدی: تخمک، رازیانه، سلول های کومولوس، جسم قطبی و گاو.

مقدمه:

در سال های اخیر پیشرفت های زیادی در فناوری های تولیدمثل رخ داده است و نشخوارکنندگان به عنوان مدل خوبی برای توسعه و تکمیل این فناوری ها مورد استفاده قرار گرفته اند. بلوغ و باروری آزمایشگاهی اووسیت، شبیه سازی، تزریق داخل سیتوپلاسم اسپرم، تولید رویان و انتقال آن به داخل رحم از جمله فناوری های رایج در تحقیق های کنونی می باشند. در این میان مرحله اصلی و پایه در موفقیت این فناوری ها بستگی به میزان موفقیت بلوغ آزمایشگاهی اووسیت دارد (۲۰). در این رابطه Crozet و همکاران (۱۹۸۷) توانستند با کمک بلوغ و باروری آزمایشگاهی اولین بره را تولید نمایند (۸). با پیشرفت فناوری در سال ۱۹۹۵ Campbell و همکاران تولید اولین بره را با استفاده از فناوری انتقال هسته و شبیه سازی گزارش نمودند (۶). اولین گوسفند حاصل از بلوغ و باروری برون تنی در ایران به نام رویانا در سال ۱۳۸۵ متولد شد (۱۲). هم چنین بلوغ و لقاح برون تنی تخمک ها در دام ها به منظور افزایش تولید و پیشرفت در تحقیق های علمی پایه، انتقال هسته، حذف ژن های معیوب و جایگزینی ژن های مطلوب، اضافه کردن ژن های مقاوم در برابر بیماری های خاص، ایجاد حیوانات تراریخت و شبیه سازی شده به کمک مهندسی ژنتیک صورت می گیرد (۱۱).

بلوغ و باروری آزمایشگاهی تخمک و کشت آن تا مرحله بلاستوسیست کمک زیادی به کشف بعضی از پدیده ها و مکانیسم های مربوطه نموده است. امروزه فناوری های تولیدمثلی در گونه های مختلف به ویژه

نویسنده مسئول :

سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

پست الکترونیکی:mz1075@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۹/۰۴

تاریخ پذیرش:۱۳۹۴/۱۱/۱۹

نشخوارکنندگان به علت تولید تعداد زیادی رویان ارزان قیمت در خارج از بدن جهت کارهای تحقیق هایی یا انتقال رویان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. تولید رویان با کمک فناوری های بلوغ و باروری آزمایشگاهی پنج برابر ارزان تر از فناوری چند تخمک گذاری[1] می باشد (۲۲).

بلوغ آزمایشگاهی از مباحث نوپا در فناوری تولیدمثل انسان است و بر اساس آمار منتشر شده در سال ۲۰۰۶، ۳۰۰ نوزاد از طریق این فناوری به دنیا آمده است. در گذشته و قبل از استفاده از فناوری های بلوغ آزمایشگاهی اووسیت، با تزریق های مکرر گنادوتروپین ها و آنالوگ های آن سبب بلوغ اووسیت ها در درون تخمدان می شدند. سپس اووسیت های بالغ را استحصال نموده و باروری آزمایشگاهی اووسیت انجام می شد. فناوری جدید نسبت به فناوری باروری آزمایشگاهی سنتی که در گذشته انجام می گرفت از مزایای زیادی از جمله کاهش هزینه های مصرف گنادوتروپین ها و آنالوگ های GnRH و حذف سندروم تحریک بیش از حد تخمدان [2] (OHSS)برخوردار بود (۱۴).

چالش های موجود در روند کشف داروهای جدید، توجه روزافزونی را به سوی منابع طبیعی به عنوان مخازنی مناسب جهت استخراج و معرفی ترکیب های مؤثره با فعالیت های بیولوژیک متنوع جلب نموده است. کسب دانش در خصوص نوسان ها طبیعی هورمون های دخیل در تولیدمثل موجب شده است تا از تخمک پستانداران در رسیدن به کاربردهای هورمونی و کسب اطلاعات راجع به روندهای تولیدمثلی از جمله استفاده از استروژن های اگزوژن مانند فیتواستروژن ها که با تقلید از اثر ها استروئیدهای جنسی آندروژن باعث بهبود روند بلوغ اووسیت می گردند، استفاده شود (۱۶). یکی از این ترکیب های، گیاه رازیانه با نام علمی *Foeniculum vulgare*، از خانواده چتریان *Apiaceae* با نام انگلیسی Fennel می باشد (۱). ترکیب های مهم موجود در رازیانه شامل ۵۰ تا ۶۰ درصد آنتول، فنچون، پینن، کامفن و فلاندرن می باشند و از رازیانه به عنوان جایگزین استروژن های مصنوعی استفاده شده است (۲).

فیتواستروژن ها در بسیاری از غذاها وجود دارند و فعالیت بیولوژیکی آنها در مطالعه های متعددی که بر روی حیوانات انجام گرفته است، به اثبات رسیده است. فیتواستروژن ها شامل چندین گروه از ترکیب های شامل لیگنان ها، ایزوفلاونوئیدها، کوهستان ها و لاکتون های اسید رسورسیلیک می باشند. فیتواستروژن های مصرفی در غذای انسانی در گروه فلاونوئیدها قرار دارند (۳). فلاونوئیدها هم چنین دارای اثر ها آنتی اکسیدانت، آنتی موتاژنیک و ضدالتهاب نیز می باشند (۷، ۲۰). تأثیر مصرف فیتواستروژن ها از نظر ایجاد اثر ها رقابتی با استروژن های آندوژن برای اشغال گیرنده های محیطی و حفظ تعادل واکنش های ناخواسته حاصل از تغییرات غلظت هورمون های زنانگی و سلامت بافت های بدنی در قبل و بعد از دوران یائسگی نیز به اثبات رسیده است (۱۷، ۱۸).

هدف از این مطالعه بررسی اثر اسانس رازیانه بر روی بلوغ هسته تخمک های گاو به منظور بهبود عملکرد محیط کشت بلوغ آزمایشگاهی تخمک بود.

مواد و روش ها:

به جز مواردی که در متن اشاره شده است، کلیه مواد شیمیایی و محیط های کشت از شرکت Sigma آمریکا و وسایل مصرفی پلاستیکی از شرکت Nunc دانمارک خریداری شدند.

روش تهیه اسانس:

تهیه اسانس به روش تقطیر با آب[3] توسط شرکت باریج اسانس انجام گرفت. در این روش به طور خلاصه مقدار ۱۰۰ گرم دانه رازیانه را با آسیاب برقی خرد کرده و به داخل بالن ژوژه دستگاه اسانس گیری ریخته و پس از اضافه کردن ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر، به مدت ۲ ساعت جریان تقطیر برقرار شد. پس از اتمام اسانس گیری، اسانس در شیشه رنگی تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد. بر اساس آزمایش های وزن سنجی و فعالیت نوری، اسانس رازیانه به دست آمده به ترتیب حاوی ۰/۹۶۰ گرم در میلی لیتر ماده خشک و ۷۷/۸ درصد حجمی/ حجمی آنیتول بود، که مقدار قابل قبول این ترکیب بین ۷۰ تا ۸۰ درصد می باشد.

بلوغ آزمایشگاهی تخمک:

در این مطالعه از غلظت های مختلف اسانس رازیانه (۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) در سه تکرار به منظور بهبود بلوغ آزمایشگاهی تخمک های گاو استفاده شد. بلوغ آزمایشگاهی تخمک ها با استفاده از روش Zandi و همکاران (۲۰۱۴) انجام گرفت (۲۳). به طور خلاصه تخمدان های گاو از کشتارگاه صنعتی میشم واقع در رباط کریم جمع آوری شدند و درون محلول نمکی فسفات بافری در دمای ۳۰ تا ۳۴ درجه سانتی گراد در مدت ۵ ساعت از کشتار به آزمایشگاه انتقال یافتند. به منظور استحصال مجموعه تخمک-کومولوس، فولیکول های با قطر ۲ تا ۸ میلی متر با استفاده از سرنگ ۱۰ میلی لیتری با سرسوزن سایز ۱۸ مکیده شدند. تخمک هایی که دارای بیش از سه لایه گرانولوزای فشرده و اووپلاسم یکنواخت بودند، به قطرات ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت بلوغ انتقال یافتند، به طوری که هر قطره حاوی ۲۰ تخمک بود. از محیط کشت TCM-199 به همـراه ٪ ۱۰ سرم جنین گاو (Gibco)، هورمون تحریک کننده فولیکولی (۵ μg/ ml)، ۱۷-β استرادیول (۱ μg/ml)، سدیم پیروات (۰/۸۱ mM)، ٪ ۱۰ مایع فولیکولی گاو و جنتامایسین سولفات (۵۰ μg/ml)به عنوان محیط کشت بلوغ تخمک استفاده شد. به منظور بررسی اثر رازیانه بر روی بلوغ آزمایشگاهی تخمک های گاو، از غلظت های ۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر در محیط کشت بلوغ استفاده شد. از ۱٪ DMSO به منظور حل شدن اسانس رازیانه در محیط کشت بلوغ استفاده شد. تخمک ها درون محیط کشت

1- Superovulation
2- Ovarian hyper stimulating syndrome
3- Hydrodistilation

بلوغ، تحت روغن معدنی و در دمای ۳۸/۵° C و ۵٪ دی اکسید کربن به مدت ۲۴ ساعت به بلوغ رسیدند.

صفات مورد مطالعه:

به منظور ارزیابی اثر رازیانه بر روی بلوغ آزمایشگاهی تخمک های گاو، صفات توسعه سلول های کومولوس و مشاهده اولین جسم قطبی با استفاده از میکروسکوپ اینورت و هم چنین رنگ آمیزی تخمک های نابالغ مورد بررسی قرار گرفتند. برای مشاهده جسم قطبی، سلول های کومولوس اطراف تخمک ها با استفاده از ۰/۵ mg/ml آنزیم هیالورونیداز و انجام پیپتینگ برداشته شدند. تخمک های بدون جسم قطبی برای ارزیابی GV، GVBD، متافاز-۱ و متافاز-۲ فیکس و رنگ آمیزی شد. برای این منظور اووسیت های بدون کومولوس، ابتدا برای مدت ۱۵ دقیقه درون محلول ۱٪ سدیم سیترات در دمای ۳۸/۵° C نگهداری شدند، سپس به کمک چسب آکواریوم بر روی لام فیکس شده و پس از غوطه ور ساختن لام در محلول فیکس، درون یخچال با دمای ۴° C برای مدت حداقل ۴۸ ساعت نگهداری شدند. محلول فیکس توسط ۱ حجم اسید استیک و ۳ حجم اتانل مطلق تهیه شد. پس از ۴۸ ساعت لام ها خارج و با اورسئین ۱٪ رنگ آمیزی شده و به دنبال آن با استئوگلیسرول شستشو داده شدند و با استفاده از میکروسکوپ اینورت با بزرگ نمایی X۴۰۰ مشاهده شدند.

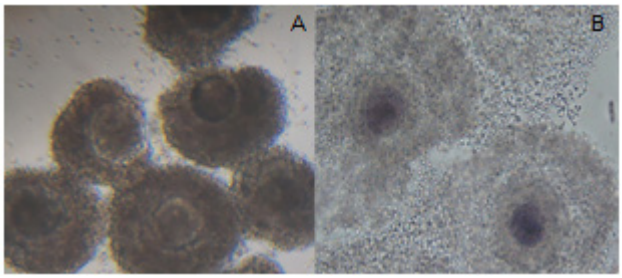
آنالیز آماری:

تجزیه داده ها با استفاده از نرم افزار آماری(SPSS ۱۶) و رویه ANO-VA انجام گرفت. به منظور مقایسه میانگین ها از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. نتایج به صورت میانگین ± میانگین انحراف معیار نمایش داده شدند.

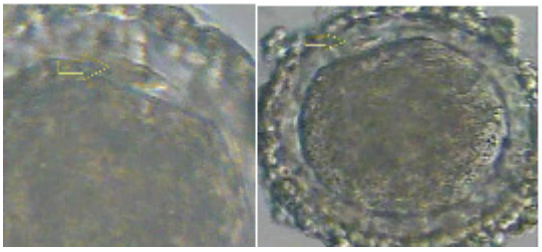
نتایج:

در مطالعه حاضر از ۲۴۰ تخمدان جمع آوری شده در مجموع ۷۷۲ تخمک استحصال و تعداد ۴۲۰ تخمک با کیفیت خوب (دارای بیش از سه لایه سلول کومولوس و سیتوپلاسم یکنواخت) انتخاب و کشت داده شدند. میزان بلوغ تخمک ها با استفاده از میزان پراکندگی سلول های کومولوس و مشاهده جسم قطبی مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت (اشکال ۱ و ۲). نتایج نشان داد غلظت های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر از اسانس رازیانه اختلاف معنی داری بر روی توسعه سلول های کومولوس و هم چنین وجود جسم قطبی نداشت، در حالی که ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر از اسانس رازیانه به طور معنی داری توسعه سلول های کومولوس و وجود جسم قطبی را کاهش داد ($P < ۰/۰۵$) (اشکال ۳ و ۴).

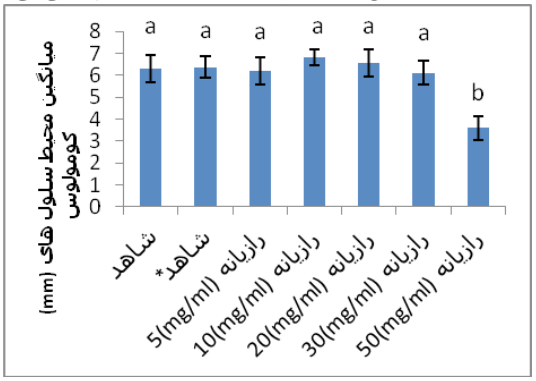
در این مطالعه با توجه به وجود قطرات چربی اطراف هسته سلول های نشخوارکنندگان مراحل مختلف تقسیم میوز در تخمک های فاقد جسم قطبی با استفاده از روش رنگ آمیزی قابل مشاهده نبود (شکل ۵).



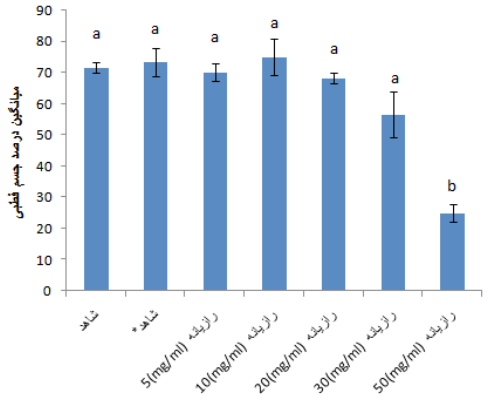
شکل ۱- میزان پراکندگی سلول های کومولوس از اطراف تخمک پس از بلوغ (A) عدم پراکندگی سلول های کومولوس پس از بلوغ (B) پراکندگی کامل سلول های کومولوس پس از بلوغ



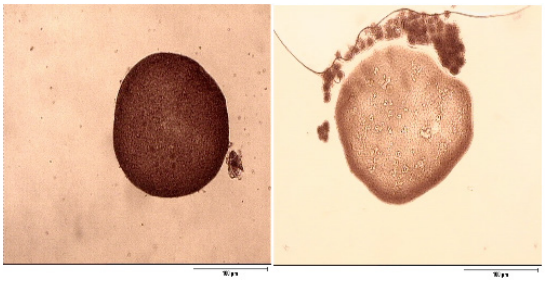
شکل ۲- تخمک های بلوغ یافته گاو (پیکان نشان دهنده جسم قطبی می باشد)



شکل ۳- اثر غلظت های مختلف رازیانه بر روی توسعه سلول های کومولوس پس از بلوغ تخمک، * شاهد حاوی یک درصد DMSO می باشد. a,b:حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد می باشد.



شکل ۴- اثر غلظت های مختلف رازیانه بر روی مشاهده جسم قطبی، * شاهد حاوی یک درصد DMSO می باشد. a,b:حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد می باشد.



شکل ۵- رنگ آمیزی تخمک های بدون جسم قطبی

بحث:

در این تحقیق پراکندگی سلول های کومولوس به عنوان یکی از فاکتورهای مؤثر برای تعیین بلوغ هسته تخمک ها در نظر گرفته شد. نتایج این تحقیق نشان داد رازیانه در غلظت های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر اختلاف معنی داری بر توسعه سلول های کومولوس با شاهد نداشت (P<۰/۰۵) در حالی که در غلظت ۵۰ mg/ml به طور معنی داری توسعه سلول های کومولوس کاهش یافت (P > ۰/۰۵). سلول های کومولوس در اثر افزایش ترشح گنادوتروپین ها قبل از تخمک گذاری پراکندگی پیدا می کنند و شکاف های اتصالی بین سلول های کومولوس مجاور و بین سلول های کومولوس و تخمک شکسته می شود (۱۰).

در این پژوهش به جز غلظت بالای رازیانه که اثر بازدارنده بر توسعه سلول های کومولوس داشت، پراکندگی سلول های کومولوس تحت تأثیر رازیانه قرار نگرفت. نتایج مشابهی توسط Rajabi و همکاران (۲۰۱۳) زمانی که از عصاره گیاه شقایق سیاه بر روی بلوغ آزمایشگاهی تخمک گوسفند استفاده کردند، گزارش شده است (۲۱). بنابراین شاید بتوان گفت غلظت های استفاده شده در این پژوهش به جز غلظت ۵۰ mg/ml اثر بازدارندهای بر عملکرد سلول های کومولوس نداشته است. با این وجود ممکن است غلظت های کمتر از ۵۰ mg/ml رازیانه بر روی بلوغ تخمک موثر باشند، اما معیار توسعه سلول های کمولوس پتانسیل لازم را در بروز آن نداشته باشند. بخشی از اهمیت سلول های گرانولوزا و سلول های کومولوس تخمک، در رشد فولیکول است. سلول های کومولوس هم چنین نقش حیاتی در طول بلوغ میوز در شرایط برون تنی دارد. در زمان از سرگیری میوز، زوائد سیتوپلاسمی سلول های کومولوس شروع به فاصله گرفتن از تخمک می کنند و در تخمک متافاز ۱ کمابیش اتصال های ارتباطاتی قطع شده است. تولید قابل توجه هیالورونیک اسید توسط سلول های کومولوس منجر به پراکندگی سلول های کومولوس می شود. هر چند در طول این فاز سلول های کومولوس هم چون قبل با تخمک در ارتباط هستند و برداشتن سلول های کومولوس قبل از لقاح برون تنی حتی اگر هم کشتی با سلول های کومولوس هم وجود داشته باشد، توانایی تکامل رویان را کاهش می دهد (۱۳).

در ارتباط با مشاهده جسم قطبی در تخمک های بالغ شده، نتایج نشان داد غلظت های ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر رازیانه اثر معنی داری در مقایسه با شاهد نداشت. در حالی که غلظت ۵۰ mg/ml رازیانه به طور معنی داری درصد تخمک های بالغ را کاهش داد. بنابراین در نتیجه استفاده از غلظت بالای رازیانه، نه تنها بلوغ تخمک به طور غیر مستقیم از طریق توسعه سلول های کومولوس تحت تاثیر قرار می گیرد، بلکه باعث متوقف شدن تقسیم های میوزی در نتیجه کاهش رهایی جسم قطبی نیز می گردد. با توجه به اینکه سایر غلظت های رازیانه اختلاف معنی داری با شاهد در خصوص رهایی جسم قطبی نداشتند، در نتیجه اسانس رازیانه قادر به افزایش بلوغ هسته تخمک های گاو نمی باشد، اگرچه ممکن است بر روی بلوغ سیتوپلاسمی آن ها موثر باشد. در تحقیقی که توسط Malini در سال ۱۹۸۵ بر روی موش صحرایی صورت گرفت، نشان داد تجویز خوراکی رازیانه به مدت ۱۰ روز در مقادیر کم باعث ایجاد سیکل قاعدگی، در مقادیر متوسط باعث افزایش وزن غدد جنسی و در مقادیر بالا، موجب رشد مجازی، اندومتریوم و واژن گردید (۱۷). هم چنین Degani و همکاران (۱۹۹۴) نشان دادند استروئیدها باعث رشد فولیکول ها و پیشبرد مراحل تخمدانی می گردند (۹). مطالعه ای که در سال ۲۰۱۱ توسط Khazaei و همکاران بر روی موش انجام شد، نشان داد استفاده از مقادیر ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره ی الکلی رازیانه در ۶ روز باعث افزایش تعداد فولیکول ها می گردد (۱۵).

بیش تر پژوهش های انجام شده در خصوص اثر رازیانه بر روی باروری جنس ماده به تجویز خوراکی و یا اثر ها آن روی فولیکوژنز پرداخته اند و مطالعه های محدودی که اثر رازیانه را بر روی تخمک به اثبات می رسانند در خصوص جلوگیری از اثر ها مخرب پرتوهای غیر یونیزه بر روی تخمک موش (۴،۵) و یا بهبود بلوغ تخمک در گونه ای از ماهی را می توان اشاره کرد(۱۸). بنابر این بر اساس مطالعه های ما تحقیق حاضر به عنوان اولین مطالعه در خصوص اثر اسانس رازیانه بر روی بلوغ تخمک گوسفند بود.

نتیجه گیری:

نتایج نشان داد، اختلاف معنی داری در ارتباط با استفاده از غلظت های مختلف رازیانه بر روی توسعه سلول های کومولوس و مشاهده جسم قطبی که نشان دهنده بلوغ هسته تخمک می باشند، مشاهده نشد، اگر چه غلظت بالای آن به طور معنی داری بلوغ هسته تخمک های گاو را کاهش داد. پیشنهاد می شود با استفاده از فناوری لقاح آزمایشگاهی و بررسی درصد زایگوت های احتمالی، مرولا و بلاستوسیت، اثر رازیانه بر روی بلوغ سیتوپلاسمی تخمک های گاو نیز مورد مطالعه قرار گیرد.

سپاسگزاری:

بدینوسیله از ریاست محترم دانشکده و مدیر محترم گروه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند و پرسنل محترم سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران که با در اختیار گذاشتن آزمایشگاه ها و هم چنین همکاری صمیمانه ایشان که امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند تشکر و قدردانی می گردد.

منابع:

۱- زرگری، ع. گیاهان دارویی. مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران، جلد دوم، ۱۳۷۵، ۱۱۳
2- Albert P. Fennel and anise as estrogenicagents. J. Ethnopharmacol, 1980; 2: 337-344.
3- Anthony MS, Clarkson TB, Weddle DI. Effects of soy protein phytoestrogens on cardiovascular risk factors in rhesus monkeys. J Nutr, 1995; 125: 803-804.
4- Asghari A, Montaseri A, Afshin Khaki A. A study of the protective effects of vitamin e and fennel extract on mitochondria changes in mice ovary due to electromagnetic field exposure. Crescent J Med Biol Sci, 2015; 2: 10-13.
5- Asghari A, Montaseri A, Afshin Khaki A. An ultrastructural study of the antioxidant effects of vitamin E and fennel extract on zona pellucida cell changes of rat ovaries under non-ionizing 50hz electromagnetic fields. Crescent J Med Biol Sci, 2015; 2: 37-41.
6-Campbell K, Mcwhir J, Ritchie B, Wilmut I. Production of live lambs following nuclear transfer of cultured embryonic disc sells. Theriogenology, 1995; 43: 181.
7-Chadwich LR, Pauli GF Farasworth NR. The pharmacignosy of Humulus lupulus L. (hops) with and emphasis on estrogenic properties. Phytomedicine, 2006; 13: 119-131.
8-Crozet N, Huneau D, Desmedet V, Teron MC, Szollosi D, Torres S, Sevellec C. In vitro fertilization with normal development in the sheep. Gamete Res, 1987; 16: 159-170.
9-Degani GEJ, Gal V. In vitro biosynthesis of steroids in ovary of asyncronic Tricogaster tricopterus. Biochem physiol, 1994; 109: 715-723.
10-Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. Second edition, CABI International publishing, Wallingford. 2003.
11-Gordon I. Reproductive technology in farm animals. CABI publication, 2005.
12-Gosden R, Smith BJ. Oxygen concentration gradient across the ovarian follicular epithelium: model, predictions and implications. Hum Reprod, 1986; 1: 65-68.
13-Hashimoto S, Saeki K, Nagao Y, Minami N, Yamada M, Utsumi K. Effects of cumulus cell density during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. Theriogenology, 1998; 49: 1451-1463.
14-Jurema MW, ogueira D. In vitro maturation of human oocytes for assisted reproduction. Fertil Steril, 2006; 86: 1277-1291.
15-Khazaei M, Montaseri A, Khazaei MR, Khanahmadi M. Study of Foeniculum vulgare effect on folliculogenesis in female mice. Int J Fertil Steril, 2011; 5: 122-127.
16-Mack G, Segner H. Morphological development of the gonads in zebra fish. J. fish biology, 2003; 4: 895-906.
17-Malini T. Effects of Foeniculum vulgare mill seed extracts on the genital organs of male and female rat. Indian J physiol pharmacol, 1985; 29: 21-26.
18-Naji T, Hosseinzadeh Sahafi H, Sanaie T, Amaninezhad P. The effects of foeniculum vulgare on the growth and maturation of oocytes in female three spot gourami (trichogaster trichopterus). J Aquatic Anim Fish, 2013; 4: 52-58.
19-Nielsen ILF, Williamson G. Review of the factors bioavailability of soy isoflavones in humans. Nutrition and Cancer, 2007; 57, 1-10.
20-Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. J Niatu Produ, 2000; 63: 1035-1042.
21-Rajabi R, Motamedi R, Roostaei M, Mehr A, Motamedi R. Effect of papaver rhpeas L. Extract on in vitro maturation of sheep oocytes. Small Rumin Res, 2013; 114: 146-151.
22-Wani N, Wani G, Al-Saigh MN. Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for in vitro naturation and in vitro fertilization procedures in sheep. Small Rumin Res, 1999; 34: 71-76.
23-Zandi M, Muzaffar M, Shah SM, Kaushik R, Singh MK, Palta P, Singla SK, Manik RS, Chauhan MS. WNT3A signalling pathway in buffalo (Bubalus bubalis) embryonic stem cells. Reprod Fertil Dev, 2014; 26: 551-61