



بررسی اثر آکالوئید هارمین بر روی بلوغ آزمایشگاهی اووسیت گاو

زهرا همتی، میترا حیدری نصرآبادی*، پروین خدارحمی

گروه زیست‌شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

*مستول مکاتبات: heydarimitra45@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۰۱

چکیده

بلوغ اووسیت‌ها در شرایط آزمایشگاهی تکنیکی است که می‌تواند باعث کاهش هزینه‌ها و از بین بردن اثرات جانبی استفاده از گنادوتروپین‌ها برای لقاح آزمایشگاهی شود. تحقیق و پژوهش در زمینه توسعه و بهبود شرایط کشت آزمایشگاهی برای بلوغ اووسیت انسانی بسیار سخت است. امروزه استفاده از مدل حیوانات اهلی پیشرفته‌ترین و عالی‌ترین سیستم را برای مطالعه در زمینه بلوغ فولیکول‌های نارس در آزمایشگاه فراهم کرده است. با توجه به ماده موثره و دیگر ترکیبات موجود در آکالوئید هارمین که دارای اثرات فارماکولوژیک متعدد از جمله ضد رادیکال آزاد، ضد التهاب و اثر بر سیستم ایمنی و غیره می‌باشد، بنابراین در این مطالعه اثرات آکالوئید هارمین بر میزان بلوغ تخمک‌های گاو مورد بررسی قرار می‌گیرد. در این مطالعه تخمک‌های اسپیره شده حداقل دارای سه لایه کومولوس از فولیکول‌های ۸-۲ میلی‌متری تخمدان‌های گاو اخذ از شده از کشتارگاه پس از سه مرتبه شستشو در محیط شستشو به محیط‌های بلوغ با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ و ۲/۵ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از آکالوئید هارمین در دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد دی‌اکسید کربن به مدت ۲۴-۲۲ ساعت انکوبه شدند. پس از گذشت زمان انکوباسیون کومولوس‌های اطراف تخمک‌ها برداشته شد و بابت آزاد شدن جسمک قطبی (بلوغ) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS برنامه ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان دهنده تاثیر مثبت آکالوئید هارمین در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است ($p < 0/05$) بدین صورت که میزان بلوغ گروه‌های تحت تیمار با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ و ۲/۵ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۵۹، ۸۵، ۷۲، ۶۵، ۶۴، ۳۴، ۳۷ و ۲۲ درصد می‌باشد که این در گروه کنترل ۵۶ و ۹۳ درصد بوده است. محیط بلوغ با اضافه کردن میزان ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آکالوئید هارمین موجب افزایش درصد بلوغ در اووسیت‌های گاو می‌شود که می‌توان از آن به عنوان مکمل در محیط‌های بلوغ اووسیت استفاده کرد.

کلمات کلیدی: تخمک گاو، بلوغ آزمایشگاهی، آکالوئید هارمین.

مقدمه

اووسیت‌های نابالغ می‌باشد که در مرحله پروفاز میوز یک متوقف شده‌اند (۱۴). توسعه همزمان هسته و سیتوپلاسم اووسیت به عنوان ملاک بلوغ مطرح است (۱۶). همچنین بلوغ آزمایشگاهی اووسیت منجر به تولید جنین ارزان و فراوان می‌شود (۱۲).

آگاهی از شرایط مطلوب برای بلوغ برون تنی اووسیت سبب تولید اووسیت‌های مناسب برای استفاده در برنامه‌های لقاح برون تنی (IVF) همانندسازی و تولید حیوانات تراریخت را فراهم می‌آورد. بنابراین یکی از مهمترین مرحله‌ها در تولید جنین آزمایشگاهی، بلوغ



اتصال به جایگاه آگونیست Inverse رسپتورهای GABA-A طیف وسیعی از اثرات آنتاگونیستی بر علیه بنزودیازپین ایجاد می‌کند که مهمترین آنها شامل القاء اضطراب، تحریک CNS و تشنج می‌باشد (۶). همچنین مطالعات مختلفی نشان داده است که هارمین یک مهار کننده مونوآمینوآکسیداز است و می‌تواند آن را به بطور برگشت پذیر مهار کرده و با افزایش میزان دوپامین در مغز باعث ایجاد آرامش و توهم و اثرات ضدافسردگی شود (۳). بر اساس تحقیقات انجام شده، نشان داده شده است که مولکول هارمین نه تنها می‌تواند بر سیکل رفتاری، اضطراب و ترس موثر باشد، بلکه قادر است لرزش‌های عضلانی را نیز تحریک کند (۱۰).

مواد و روش کار

این مطالعه از نوع تجربی است که بر روی تخمک‌های تخمدان گاو ذبح شده در کشتارگاه‌های استان قم انجام گرفته است. تخمک‌ها پس از مراحل شستشو در محیط کشت داده شدند. محیط کشت پایه برای بلوغ تخمک‌های جمع‌آوری شده TCM-199 (شرکت سیگما آلدریج) بوده که به صورت تجاری در دسترس می‌باشد و متداول‌ترین محیط کشت مورد استفاده در بلوغ تخمک پستانداران است. این محیط حاوی املاح مختلف، قندها، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و اسیدهای نوکلئیک باشد.

جمع‌آوری و کشت تخمک‌ها: تعداد ۲۵۰ تخمدان گوسفند بلافاصله پس از کشتار دام در کشتارگاه جمع‌آوری شده و حداکثر در مدت دو ساعت بعد از کشتار، در فلاسک حاوی سرم فیزیولوژی و آنتی-بیوتیک در دمای سرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل گردید. تخمدان‌ها چند بار با سرم فیزیولوژی استریل شستشو و تخمک‌ها به روش آسپیراسیون از فولیکول‌های سطح تخمدان تخلیه شده

لزوم بالغ‌سازی تخمک‌ها در محیط آزمایشگاهی به منظور کاهش مشکلات ناشی از فزون تحریکی تخمدان در سال‌های اخیر مورد توجه متخصصین لقاح برون تنی قرار گرفته است (۸) و بهبود و افزایش کارایی بلوغ تخمک در آزمایشگاه به طور گسترده ای موجب پیشرفت در تکنیک‌های جدید تولیدمثل شده است. همچنین بلوغ و لقاح برون تنی تخمک‌ها، در دام‌ها به منظور افزایش تولید و پیشرفت در تحقیقات علمی پایه، انتقال هسته، حذف ژن‌های معیوب و جایگزینی ژن‌های مطلوب، اضافه کردن ژن‌های مقاوم در برابر بیماری‌های خاص، ایجاد حیوانات تراریخت و ایجاد کلون به کمک مهندسی ژنتیک صورت می‌گیرد (۷).

تخمندان‌های کشتارگاهی یکی از معمول‌ترین منبع استحصال تخمک‌های مورد نیاز برای بلوغ و باروری برون تنی در شرایط آزمایشگاه می‌باشند و دارای دو مزیت ارزانی و فراوانی هستند (۱۵). آلکالوئیدهای گیاهی از جمله ترکیباتی هستند که روی سلول‌های سرطانی موثر می‌باشند. اسپند و مشتقات آن در طب سنتی ایران در درمان تومورهای جلدی به کار برده شده است و در بعضی از مقالات نیز اثرات سیتوتوکسیک و فعالیت ضدسرطانی آنها گزارش شده است که اغلب روی سلول‌های سرطانی غیرخونی بوده است (۲). آلکالوئیدهای β کربولین به عنوان ترکیبات طبیعی بافت‌های انسانی و مایعات بدن گزارش شده‌اند. انواع آنها اثرات بیوشیمیایی و رفتاری در حیوانات و انسان‌ها نشان می‌دهند (۲).

آلکالوئیدهای β کربولین با اتصال به بنزودیازپین، ایمیدوزالین، سروتونین و گیرنده‌های مخدر باعث مهار مونوآمینوآکسیدازها می‌شوند.

هارمین به عنوان عمده‌ترین الکلوئید گیاه اسفند است که اولین بار توسط Gobel در سال ۱۸۴۱ از دانه و ریشه گیاه استخراج شد (۱۰). این آلکالوئید از طریق



نتایج

در مطالعه حاضر از ۲۵۰ تخمدان جمع آوری شده در مجموع تخمک حاصل و تعداد ۶۲۰ تخمک با کیفیت خوب دارای بیش از سه لایه سلول کومولوس انتخاب و در پنج 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. 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 تخمک‌ها از نظر پراکندگی سلول‌های کومولوس مورد ارزیابی قرار گرفتند. میزان بلوغ در گروه کنترل ۵۶/۹۳ درصد و در گروه تیمار با غلظت ۰/۵ $\mu\text{g/ml}$ درصد بلوغ ۵۹/۸۵ و در گروه ۱ $\mu\text{g/ml}$ درصد بلوغ ۷۲/۶۵ و در گروه ۲/۵ $\mu\text{g/ml}$ درصد بلوغ ۶۴/۳۴ و در گروه ۵ $\mu\text{g/ml}$ درصد بلوغ ۳۷/۲۲ مشاهده شد (جدول ۱).

بررسی بلوغ بر اساس پراکندگی سلول‌های کومولوس: در این تحقیق با توجه به ارتباط میزان پراکندگی کومولوس با بلوغ تخمک، تخمک‌ها پس از تیمار با توجه به تعداد لایه‌های کومولوس نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر طبق نمودارهای ۲، ۳ و ۴ در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در میزان پراکندگی کومولوس‌ها شاهد افزایش می‌باشیم و بیشترین میزان پراکندگی مربوط به غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد که با نتایج به دست آمده در مورد تشکیل جسم قطبی همخوانی دارد. با توجه به آنالیز داده‌ها فرضیه H_0 به این صورت است که هارمین با غلظت‌های مختلف تاثیری بر روی بلوغ ندارد و فرضیه H_1 عنوان می‌کند که هارمین بر روی بلوغ تاثیرگذار است. چون $p < 0/05$ می‌باشد پس هارمین بر روی بلوغ تاثیرگذار بوده است. در گروه تیمار شده با غلظت ۱ میکروگرم

و پس از انتقال به پتری دیش، توسط میکروسکوپ استریو جهت جمع‌آوری اووسیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت. تخمک‌های جمع‌آوری شده بر اساس تعداد لایه سلول‌های کومولوس اطرافشان دسته بندی شدند؛ دسته اول تخمک‌هایی که در اطرافشان چند لایه سلولی متراکم از سلول‌های کومولوس داشتند. دسته دوم، تخمک‌هایی که دو یا سه لایه از سلول‌های کومولوس را در اطراف خود داشتند و دسته سوم، تخمک‌های فاقد سلول‌های کومولوس بودند که به اصطلاح تخمک‌های لخت اطلاق می‌گردند.

در این مطالعه از میان ۱۲۰۰ تخمک جمع آوری شده، ۶۲۰ تخمک با کیفیت خوب و از دسته اول که حاوی بیش از سه لایه کومولوس متراکم به همراه سیتوپلاسم گرانوله یکنواخت بودند برای بلوغ آزمایشگاهی انتخاب شدند. محیط کشت بلوغ تخمک حاوی 10.5 μl Gentamicin, 100 μl FBS, TCM 199, 10 μl Na Pyruvate, 10 μl Estradiol, 4 μl FSH و 15 μl HCG می‌باشد. تخمک‌های جدا شده در دیش‌های حاوی قطرات ۱۰۰ میکرولیتر از محیط بلوغ پوشیده شده با روغن مینرال قرار داده سپس به مدت ۲۴-۲۲ ساعت در انکوباتور با دمای 38°C ، ۵٪ CO_2 و رطوبت ۹۵٪ جهت انجام مراحل بلوغ آزمایشگاهی، کشت داده شدند. پس از گذشت زمان ۲۴ ساعت تخمک‌ها از نظر تشکیل جسم قطبی و پراکندگی لایه‌های کومولوس مورد ارزیابی قرار گرفتند. تخمک‌ها در گروه کنترل و گروه‌های تیمار شامل دوزهای ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آلکالوئید هارمین که به محیط کشت بلوغ اووسیت اضافه شده است مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تحلیل آماری: نتایج به دست آمده در این تحقیق با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) تجزیه و تحلیل داده‌ها انجام گرفت و سطح آماری $p < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

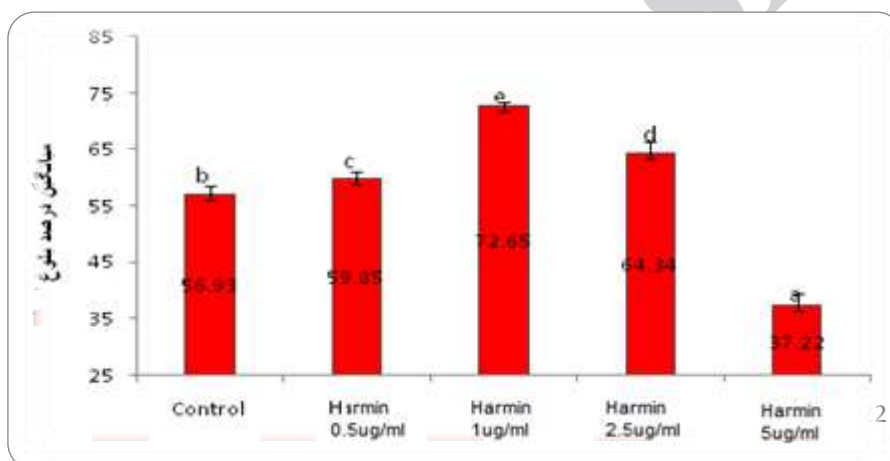


کومولوس‌های اطراف تخمک باز شده (شکل ۳) و نسبت به گروه کنترل تعداد بیشتری از تخمک‌ها جسم قطبی خود را آزاد کردند (شکل‌های ۴ و ۵)

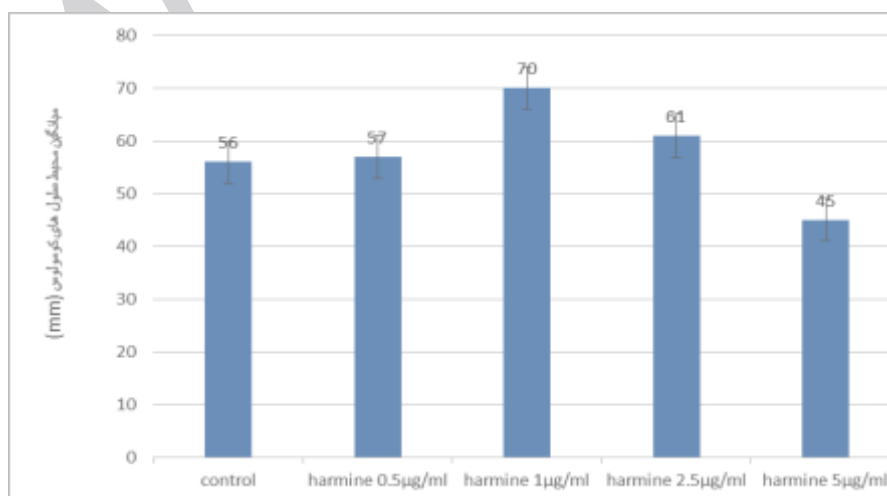
بر میلی‌لیتر پس از برداشتن کومولوس‌های اطراف تخمک شاهد این مطلب بودیم (شکل‌های ۱ و ۲) که تخمک‌های تیمار شده در این غلظت با حداقل سه لایه کومولوس و سیتوپلاسم یکنواخت بخوبی

جدول ۱- درصد بلوغ در گروه‌ها

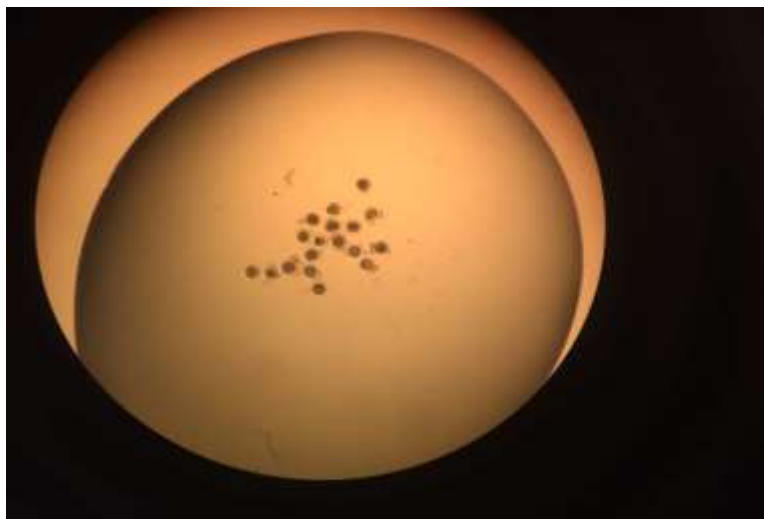
گروه‌ها	کل تخمک‌ها	تخمک‌های بالغ	E.P (%)	درصد
کنترل	۱۳۲	۷۸	۷۴ (۵۶)	۵۶/۹۳
هارمین ۰/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر	۱۳۷	۸۲	۷۹ (۵۷)	۵۹/۸۵
هارمین ۱ میکروگرم/میلی‌لیتر	۱۲۸	۹۳	۹۰ (۷۰)	۷۲/۶۵
هارمین ۲/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر	۱۲۹	۸۳	۷۹ (۶۱)	۶۴/۳۴
هارمین ۵ میکروگرم/میلی‌لیتر	۱۳۷	۵۱	۶۲ (۴۵)	۳۷/۲۲



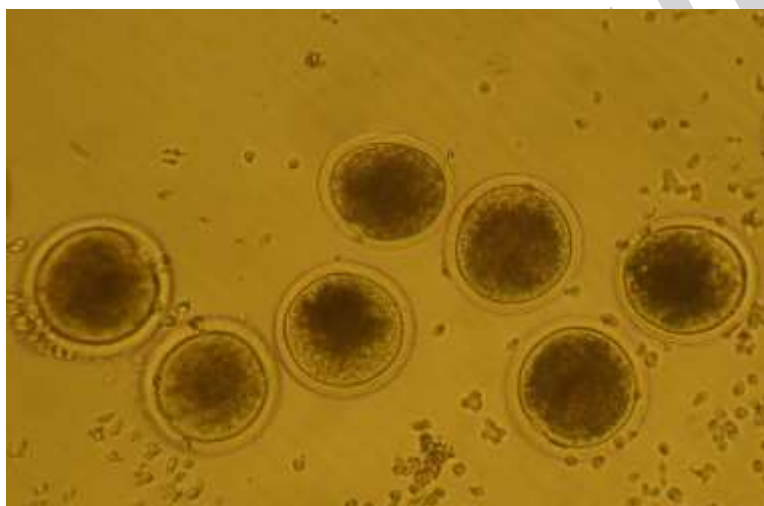
نمودار ۱- بیشترین بلوغ در گروه هارمین ۱ میکروگرم/میلی‌لیتر مشاهده شده است.



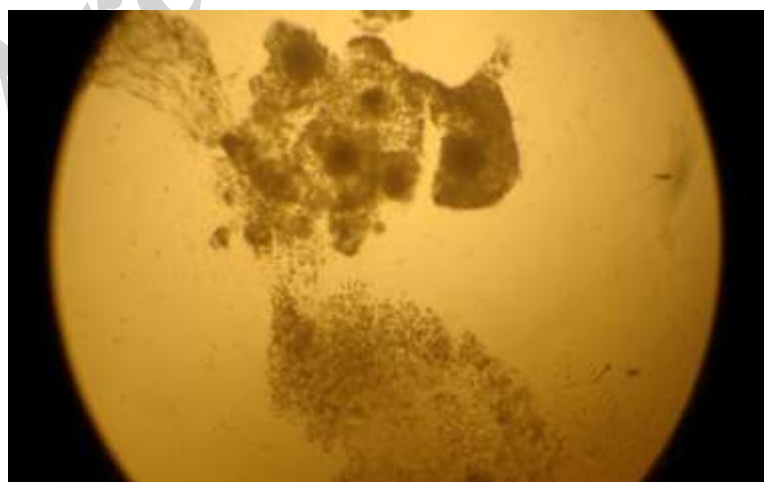
نمودار ۲- درصد باز شدن کومولوس تخمک‌ها نسبت به تعداد کل هر گروه



شکل ۱- نمایی از تخمک‌های دایسکت شده در قطره ۵۰ میکرولیتری زیر روغن مینرال



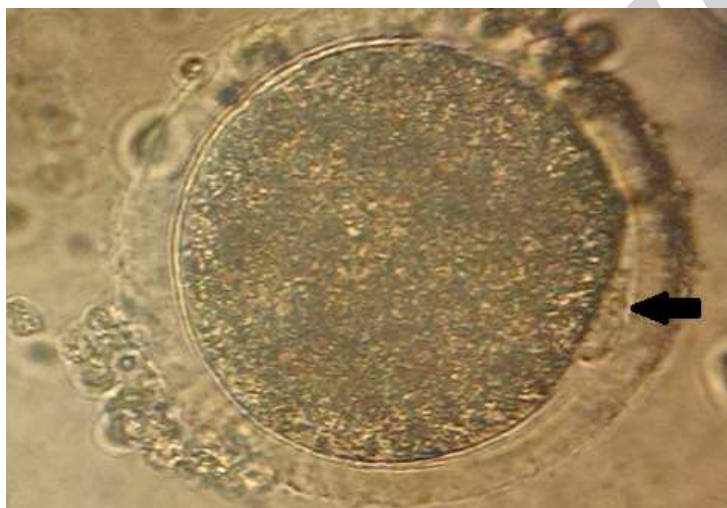
شکل ۲- شمایی از چند تخمک بالغ که کومولوس‌های اطراف تخمک‌ها برداشته شده و جسم قطبی آزاد شده



شکل ۳- پراکندگی و باز شدن کومولوس‌های اطراف تخمک



شکل ۴- وجود جسم قطبی در تخمک بالغ گاو

شکل ۵- وجود جسم قطبی در تخمک گاو با بزرگنمایی $\times 40$

بحث

میزان بلوغ و کشت تخمک و رویان‌های گاوی همخوانی دارد. اما در غلظت‌های کمتر از ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشتر تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده نگردید که این امر می‌تواند مربوط به منابع انرژی و ظرفیت‌های استفاده سلول‌های تخمک و همچنین میزان توکسیتی ماده اضافه شده در غلظت‌های بالاتر از ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر باشد. تعداد زیادی از گزارش وجود دارد که نشان می‌دهد گنادوتروپین‌ها، استروئیدها و فاکتورهای سلولی همگی در فراهم کردن شرایط حیاتی برای تخمک در

در این تحقیق ما اثر آکالوئید هارمین را بر روی بلوغ آزمایشگاهی اووسیت گاو در چهار غلظت انتخابی (۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مورد آزمایش قرار دادیم. پس از بررسی اثر غلظت‌های مختلف بر روی بلوغ تخمک گاو نشان داده شد که محیط کشت تیمار شده با غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان بلوغ تخمک‌های گاوی را در شرایط یکسان نسبت به گروه کنترل بطور معنی‌داری افزایش داده است ($p < 0/05$) که این نتیجه با گزارش‌های محققان دیگر در رابطه با اثرات آنتی اکسیدان‌ها بر



گرفتند که حضور سلول‌های کومولوس کامل و صدمه ندیده، برای حداقل ۱۲ ساعت از ۲۴ ساعت دوره کشت در TCM-199 تکمیل شده با FCS ۱۰٪ ضروری است. همچنین ممکن است بیان شود که سلول‌های کومولوس می‌توانند نقش کوتاهی پس از تخمک‌گذاری در اطمینان از پاره شدن تخمک داشته باشند. در فولیکول‌های گاوی زمانی که تخمکی برای تخمک‌گذاری انتخاب می‌شود، سلول‌های کومولوس نقش مهمی را در رشد تخمک و تمایز آن به وسیله تامین کردن سلول‌های نابالغ با مواد مغذی و کنترل هر دو بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک ایفا می‌کند. نقش متقابل پیچیده‌ای بین تخمک‌ها و سلول‌های کومولوس در طی فولیکوژنز وجود دارد که از طریق هورمون‌ها و فاکتورهای رشد انجام می‌شود. سلول‌های کومولوسی که بین یکدیگر و تخمک گاو از روش کانال متصل می‌شوند، سطوحی از منبع میوزی cAMP که در تخمک به وسیله انتقال cAMP به تخمک به وسیله تنظیم تولید و هیدرولیز cAMP توسط تخمک و یا شاید ترکیب کردن هر دو مکانیسم برقرار می‌کنند. آلکالوئیدهای β کربولین به عنوان ترکیبات طبیعی بافت‌های انسانی و مایعات بدن گزارش شده‌اند. انواع آنها اثرات بیوشیمیایی و رفتاری در حیوانات و انسان‌ها نشان می‌دهند (۲). آلکالوئیدهای β کربولین با اتصال به بنزودیازپین، ایمیدوزالین، سروتونین و گیرنده‌های مخدر باعث مهار مونوآمینو اکسیدان‌ها می‌شوند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۴ توسط مارتین و همکارانش صورت گرفت، اثر هارمین را بر روی سلول‌های تومور انسانی بررسی شد و نتیجه گرفتند که پس از اثر این آلکالوئید بر روس سلول‌های Hela، واکنش شدن عمیق سیتوپلاسمی اتفاق افتاد، که به نوعی مرگ سلولی نکروتیک تکامل یافته را نشان می‌داد (۱۳).

طی بلوغ در گاو زنده مشارکت می‌کنند. تخمک‌های نابالغ گاو توسط چندین لایه محکم و بهم چسبیده از سلول‌های کومولوس احاطه شده‌اند که فاکتورهای مغذی را فراهم می‌کنند و بلوغ سیتوپلاسمی و هسته‌ای تخمک را کنترل می‌کنند. اثر متقابل پیچیده‌ای بین تخمک و سلول‌های کومولوس در طی رشد فولیکول وجود دارد که توسط فاکتورها و هورمون‌ها حمایت می‌شود. سلول‌های کومولوس به وسیله‌ی یک شبکه‌ی پیچیده‌ی شامل کانال‌های غشایی نفوذپذیر که به عنوان اتصالات سوراخدار شناخته شده‌اند، با هم ارتباط برقرار می‌کنند در حالی که لایه‌های داخلی‌تر سلول‌ها (کرونا رادیاتا) گسترش فرآیندهای سیتوپلاسمی از طریق زوناپلوسیدا به شکل اتصالات شکافدار با تخمک ایجاد می‌کنند. اهمیت این فرایندها با شناخت نفوذپذیری غشای تخمک در برابر متابولیت‌های گوناگون با وزن مولکولی پایین که تنها از طریق سلول‌های کرونا است افزایش پیدا می‌کند. سلول‌های کومولوس به سلول‌های گرانولوزا متصل شده‌اند اگرچه به طور فیزیکی آنها به وسیله غشای پایه از هم جدا می‌شوند. عقیده بر این است که با وجود این غشاء، مواد تولید شده توسط سلول‌های تکا راه خود را به سمت سلول‌های فولیکولار و در نهایت به تخمک پیدا می‌کنند. به خوبی واضح است که سلول‌های تکا می‌توانند نقش حمایتی را برای تخمک در طی بلوغ توسط ترشح تولیداتی که به خوبی مشخص نیست ایفا کنند. نتیجه‌ی آزمایش‌های بسیاری نشان می‌دهد که حضور سلول‌های کومولوس در طی بلوغ برای کسب شایستگی تکاملی در بلوغ آزمایشگاهی حیاتی است. در مطالعه‌ای که توسط Chian و Niwa در سال ۱۹۹۴ انجام شد مشخص گردید که سلول‌های کومولوس در طی تمام دوره IVM برای رسیدن به بلوغ سیتوپلاسمی نرمال ضروری هستند (۴) نتیجه



تقدیر و تشکر

بدین وسیله نویسندگان، مراتب تشکر و قدردانی خود را از دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند و مرکز فوق تخصصی نابرابوری جهاد دانشگاهی استان قم اعلام می‌دارند.

منابع

1. Aitken R.J., Harkiss D., Buckingham D., 1993. Relationship between iron catalysed lipid peroxidation potential a human sperm function. *Journal of reproduction and fertility*, 98: 257-65.
2. Bouayad N., Rharrabe K., Lamhamdi M., Nourouti N.G., Sayah F., 2011. Dietary effects of harmine, a β -carboline alkaloid, on development, energy reserves and a amylase activity of *Plodia interpunctella* Hübner [Lepidoptera: Pyralidae]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(1): 73-80.
3. Callaway J.C, McKenna D.J., Grob C.S., Brito G.S., Raymon L.P., Poland R.E., Andrade E.N., Andrade E.O., Mash D.C., 1999. Pharmacokinetics of hoasca alkaloids in healthy humans. *Journal of Ethnopharmacology*, 65: 243-256.
4. Chian R.C., Niwa K., Sirard M.A., 1994. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes In vitro. *Theriogenology*. 41: 1499-1508.
5. Comporti M., 1986. Three models of free radical induced cell injury. *Chemico-Biological Interactions*, 72: 472-7.
6. Fuentes J.A., Longo V.G., 1971. An investigation on the central effects of harmine, harmaline and related beta-carbolines. *Neuropharmacology*, 10(1):15-23.
7. Gordon I., 2005. Reproductive technology in farm animals, CABI publication.
8. Hreinsson J.R., Friden B., Levkov L., Recombinant L.H., 2003. Is equally effective as recombinant hCG in promoting oocyte maturation in clinical In vitro

اثر آلکالوئید هارمین بر سرطان سینه نیز مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است. در تحقیقی که در سال ۲۰۱۳ توسط ژائو و همکاران انجام گرفت نشان داده شد که هارمین تکثیر سلول‌های MCF-7 را از طریق مهار فعالیت تلومراز را کاهش می‌دهد. این عمل از طریق تسریع فرایند پیری به وسیله افزایش بیان عناصر در مسیر p53/p21 انجام می‌شود (۱۷).

به نظر می‌رسد جنین‌هایی که در آزمایشگاه کشت داده می‌شوند در معرض رادیکال‌های آزاد اکسیژن قرار می‌گیرند که مکانیسم دفاعی شان برای حفاظت از ساختمان‌های سلولی ظریف کافی نیست. اثرات مضر این رادیکال‌های آزاد باعث از بین رفتن عملکرد میتوکندری و آسیب به DNA و RNA و پروتئین می‌شود (۵) و همچنین اتصال اسپرم - تخمک را مهار می‌کند (۱).

برای حفاظت تخمک‌ها و جنین‌ها از فشار اکسیداتیو در طی کشت، اضافه کردن انواع آنتی‌اکسیدان‌ها به محیط کشت توصیه می‌شود؛ برای مثال اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌های آنزیم خارج سلولی از قبیل سوپراکسید دسموتاز (SOD) کاتالاز یا آنتی‌اکسیدان‌های قابل متابولیسم به محیط کشت پیشنهاد شده است (۱۱).

نتیجه‌گیری

نتایج نشان می‌دهد که هارمین در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محیط کشت تجاری TCM-199 بعلاوه سرم جنین گاوی اثر مثبت بر بلوغ آزمایشگاهی اووسیت نابالغ گاو و همین‌طور پراکنندگی سلول‌های کومولوس دارد و با توجه به این نکته که هارمین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی فراوان می‌باشد، می‌توان از این آلکالوئید بعنوان فاکتوری موثر و کارآمد در محیط‌های کشت و بلوغ تخمک بکار برد.



13. Pérez Martín J.M., Labrador V., Fernández Freire P., Molero M.L., Hazen M.J., 2004. Ultrastructural changes induced in HeLa cells after phototoxic treatment with harmine. *Journal of Applied Toxicology*, 24(3): 197-201.
14. Roa B.S., Naidu K.S., Amarnath D., Vagdevi R., 2002. In vitro maturation of sheep oocytes in different media during breeding and non-breeding seasons. *Small Rumin Research*, 43: 31-36.
15. Saeki K., Hoshi M., Leibfried L., First N.L., 1991. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biology Reproduction*, 44: 256-260.
16. Sun Q., Nagai T., 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journal of Reproduction and Development*, 49: 347-359.
17. Zhao L., Wink M., 2013. The carboline alkaloid harmine inhibits telomerase activity of MCF-7 cells by down-regulating hTERT mRNA expression accompanied by an accelerated senescent phenotype. *Journal of Life and Environmental Sciences* 1:e174; DOI 10.7717/peerj.174
9. Ishida J., Wang H.K., Bastow K.F., Huc Q., Lee K.H., 1999. Anti-tumor agents (201) cytotoxicity of Harmine and B-Carboline analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9(23): 3319-3324.
10. Kartal M., Alton M.L., Kurusu S, 2003 HPLC method for the analysis of harmol, harmalol, harmine and harmalin in the seeds of peganum harmala L. *Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 2: 263-269
11. Meister A., 1983. Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220: 472-7.
12. Nadi S., Ravindranatha B.M., Gupta P.S.P., Sarma P.V. 2002. Timing of sequential changes in cumulus cells and first polar body extrusion during In vitro maturation of buffalo oocytes. *Theriogenology*, 57: 1151 - 1159.