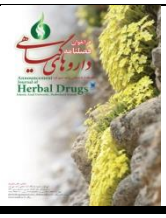


فصل‌نامه داروهای گیاهی

journal homepage: www.jhd.iaushk.ac.ir

اثرات وابسته به دوز عصاره ریشه کنگر بر از سرگیری میوز و بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نارس موش

مرضیه خدابنده[۱]، لیلا روحی[۱*]، عبدالله قاسمی پیربلوطی[۲]

۱. *گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران؛*

مسئول مکاتبات (**E-mail:** *Rouhi_59@yahoo.com*)

۲. *گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران؛*

شناسه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۲/۱۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۵/۲۰

نوع مقاله: علمی - پژوهشی

موضوع: گیاهان داروئی

کلید واژگان:

- ✓ *عصاره ریشه کنگر*
- ✓ *بلوغ آزمایشگاهی*
- ✓ *تخمک نارس*
- ✓ *آنتی اکسیدان*

چکیده

مقدمه و هدف: بلوغ آزمایشگاهی تخمک یک روش مناسب در جهت درمان ناباروری می باشد، که استفاده کلینیکی آن به واسطه موفقیت پایین با محدودیت مواجه می باشد. این مطالعه به منظور بررسی اثر عصاره آبی ریشه کنگر، به عنوان یک منبع آنتی اکسیدانی، بر میزان بلوغ تخمکها در شرایط آزمایشگاهی طراحی شد.

روش تحقیق: در این مطالعه آزمایشگاهی، تخمک های نارس از تخمدان موش های سوری نژاد NMRI (۴-۶ هفته‌ای) جمع آوری شدند. تخمکهای نارس به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت MEM-α کامل شده با ۵٪ FCS، ۷/۵ IUhCG/ ml، ۱۰۰mIUrFSH کشت داده شدند (گروه کنترل) و غلظت ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره (گروه ۱)، ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره (گروه ۲) و ۴۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره (گروه ۳) به محیط کشت بلوغ اضافه گردید. با استفاده از میکروسکوپ اینورت مراحل بلوغ آزمایشگاهی و از سر گیری میوز در تمام گروه ها بررسی شد.

نتایج و بحث: در گروه آزمایشی ۱ که تخمک ها در معرض ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از ریشه برگ کنگر بودند، میزان بلوغ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری را نشان دادند. در گروه آزمایشی ۲ که تخمک ها در معرض ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از عصاره بودند، میزان بلوغ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری را نشان می داد ($p<0/05$). در گروه آزمایشی ۳ که تخمک ها در معرض ۴۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از عصاره ریشه کنگر بودند نیز میزان بلوغ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p<0.05$).

توصیه کاربردی/ صنعتی: نتایج این تحقیق نشان داد که تاثیر عصاره آبی ریشه کنگر، دارای یک اثر مثبت وابسته به دوز در بلوغ تخمک می باشد، بطوریکه با افزایش میزان غلظت عصاره، میزان بلوغ تخمک های نارس نیز افزایش می یابد.

۱. مقدمه

بلوغ آزمایشگاهی (IVM: *In Vitro* Maturation) تخمک، یکی از راه‌های نوین برای به‌دست آوردن تخمک بالغ است. بلوغ کامل اووسیت‌ها هم به بلوغ هسته‌ای و هم بلوغ سیتوپلاسمی نیاز دارد. شرایط کشت اووسیت در طول IVM نقش مهمی را در میزان و

Archive of SID

www.SID.ir

کیفیت تولید جنین بازی می‌کند (Wongsrikeao, 2006). توان زیستی اووسیت بوسیله تاثیرات استرس‌های دمایی، غلظت اکسیژن و گلوکز کاهش می‌یابد (Banwell, 2007). شرایط کشت *In vitro* نسبت به شرایط *In vivo* غلظت اکسیژن بیشتری را دارد. گونه‌های اکسیژن فعال (ROS: Reactive oxygen species) از جمله آنیونهای سوپراکسید ($O_2^{\bullet -}$)، رادیکالهای هیدروکسیل ($OH^{\bullet}$) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) از طریق مسیرهای شیمیایی نرمال در سلول تولید می‌شوند که همگی قادرند با غشاء، اسیدهای نوکلئیک، آنزیمها و دیگر مولکولهای کوچک واکنش دهند (Domej *et al.*, 2014). ارگانیسم‌های زنده محافظت کننده‌های طبیعی به نام آنتی-اکسیدانت دارند که اثرات منفی ROS را مهار می‌کنند. این آنتی-اکسیدانها شامل آنزیمهایی از قبیل سوپر اکسید دیسموتاز که $O2^{\bullet -}$ را حذف می‌کند، گلوتاتیون پراکسیداز که H2O2 را به H20 و O2 تبدیل می‌کند (Venkat Ratnam *et al.*, 2006). به هر حال در طول کشت اووسیت و جنین در *In vitro* سطوح آنتی اکسیدانها نسبت به *In vivo* پایین‌تر است زیرا اووسیت‌ها از بدن دهنده جدا شدند و از آنتی اکسیدانهای مادری بهره نمی‌برند. دستکاری تخمکها و جنینها در طول بلوغ آزمایشگاهی و لقاح آزمایشگاهی، خطر مواجه شدن با سطوح بالایی از نمونه‌های فعال ROS را به همراه دارد، به گونه‌ای که آسپیره کردن تخمک، لقاح و کشت جنین در تراکم بالای اکسیژن می‌تواند مقادیر بالاتری از رادیکال‌های آزاد را تولید کند. مقادیر بالای $O2^{\bullet -}$ وH2O2 در مرحله تسهیم اولیه جنین‌های موش در محیط آزمایشگاه (*In Vitro*) در مقایسه با محیط بدن (*In Vivo*) تشخیص داده شده است که می‌تواند با توقف تکوین اولیه در محیط آزمایشگاه ارتباط داشته باشد (Nasr-Esfahani *et al.*, 1991; Pfeifer *et al.*, 2012). تعادل بین تولید انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن و به دام انداختن آن‌ها، عامل مهمی برای به‌دست آوردن توانایی لقاح در آزمایشگاه است (De Lamirande, 1997). بنابراین اضافه کردن آنتی اکسیدان‌ها به محیط کشت ممکن است برای بلوغ آزمایشگاهی تخمک مهم باشد. مواد آنتی اکسیداتیو از عملکرد رادیکالهای آزاد جلوگیری می‌کنند (Aruoma, 2003) . مطالعات قبلی نشان دادند که مواد آنتی اکسیداتیو از جمله اتیلن دی‌آمین ترا استیک-اسید (EDTA) (Gardner *et al.*, 2000)، ویتامین C و ویتامین E (Vermeiden, 1995) در طول کشت *In vitro* ظرفیت تکوین جنین را افزایش می‌دهند. در تحقیقات نشان داده است که خصوصیات درمانی گیاهان ناشی از مواد شیمیایی آنها است که دارای اثرات آنتی‌اکسیداتیو هستند. چندین مطالعه نشان دادند که عصاره-های گیاهی دارای خصوصیات آنتی‌اکسیداتیو در محیط آزمایشگاه هستند (Nehir, 2004; Alpinar, 2009; Golkar-Narenji, 2010; Tavana, 2012a). خصوصیات آنتی اکسیداتیو ریشه کنگر در مطالعات قبلی گزارش شده است (Azeez, 2012). در این مطالعه تاثیر عصاره آبی ریشه کنگر بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش ها

۲-۱. تهیه عصاره ریشه کنگر (*Gundelia Tournefortii*)

ریشه گیاه کنگر به مقدار ۲/۵ کیلوگرم تهیه شد، بعد از شستشو در سایه خشک گردید ریشه خشک گیاه کنگر توسط آسیاب مکانیکی به صورت پودر در آمد. ۲۰۰ گرم از ماده خشک گیاه را داخل ظرف درب دار ریخته و به مقدار ۸-۷ برابر آن حلال اتانول ۷۰٪ اضافه کرده و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در آون در دمای ۵۰-۴۵ درجه قرار داده شد. سپس نمونه را برداشته و آن را صاف کرده و با استفاده از دستگاه روتاری حلال از عصاره جدا شد. عصاره ها قبل از استفاده در محیط کشت بلوغ تخمک، توسط فیلتر سر سرنگی ۰/۲ میکرومتر، فیلتر شدند (Golkar-Narenji *et al.*, 2010).

۲-۲. بررسی خاصیت آنتی اکسیدان عصاره

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان عصاره ریشه کنگر توسط روش DPPH اندازه‌گیری گردید. این روش مطابق مطالعات قبلی انجام شد (Ogasawara, 2007). مقدار ۰/۰۱ گرم از عصاره را در ا سی سی از حلال اتانول حل شد و از آن رقت های مختلف تهیه گردید. سپس مقدار ۰/۱۳ گرم DPPH (یک ترکیب شیمیایی که از رادیکالهای آزاد تشکیل شده است) در CC ۵۰۰ اتانول ۹۸٪ (Merck) حل گردید. مقدار CC ۳/۹ از آن را با ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های مختلف عصاره ترکیب کرده و بعد از نیم ساعت با دستگاه اسپکتروفوتومتر (WLICO، بازار مشترک) در طول موج ۵۱۷ نانومتر، عدد جذبی نمونه ها خوانده شد عصاره ها قبل از استفاده در محیط کشت بلوغ تخمک توسط فیلتر سر سرنگی ۰/۲ میکرومتر فیلتر شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

۲-۳. تهیه تخمکهای نارس

در این تحقیق از موش‌های سوری نژاد NMRI ۴-۶ هفته‌ای با وزن تقریبی ۲۰-۲۵ گرم تهیه شده از انستیتو رازی کرج (ایران) استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد ۲±۲۰ درجه سانتیگراد و سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و دسترسی کافی به غذای فشرده و آب لوله‌کشی تصفیه شده، درون قفس‌های استاندارد نگهداری شدند. موش‌های ماده با قطع نخاع کشته شده و تخمدان آن‌ها در شرایط استریل خارج شدند. سپس تخمدان‌ها به داخل قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت MEM-α (Gibco- USA) حاوی ۵٪ FCS در زیر مینرال اویل (جهت جلوگیری از انتقال آلودگی) منتقل شدند. سپس چربی‌های اضافی اطراف تخمدان حذف و با استفاده از سرنگ‌های انسولین تشریح شده و تخمک‌های نارس و حاوی وزیکول زاینده (GV: Germinal Vesicle) همراه با سلول‌های گرانولوزا جدا شدند. سپس با روش پیپت کردن، سلولهای گرانولوزای اطراف آن برداشته شد. تخمکهای نارس هسته دار (GV) با سیتوپلاسم روشن و زونا پلوسیدا (ZP: Zona Plucida) یکنواخت برای چهار گروه انتخاب شدند.

۲-۴. بلوغ تخمک‌ها

گروه کنترل: ۱۰۰ تخمک نارس از موش‌ها گرفته شده و در محیط MEM-α حاوی ۵٪ FCS قرار داده شد. گروه آزمایشی یک: ۱۰۰ تخمک نارس در محیط MEM-α حاوی ۵٪ FCS، ml ۷/۵ IUhCG/ ml، ۱۰۰mIUrFSH و ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره ریشه کنگر قرار داده شد. گروه آزمایشی دو: ۱۰۰ تخمک نارس در محیط MEM-α حاوی ۵٪ FCS، ۷/۵ IUhCG/ ml، mIUrFSH ۱۰۰ و ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره ریشه کنگر قرار داده شد. گروه آزمایشی سه: ۱۰۰ تخمک نارس در محیط MEM-α حاوی ۵٪ FCS، ۷/۵ IUhCG/ ml، ۱۰۰mIUrFSH و ۴۰ میکروگرم/میلی-لیتر عصاره ریشه کنگر قرار داده شد. تخمک‌های هر گروه به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با CO2 ۵٪ قرار داده شدند و سپس با میکروسکوپ معکوس، مراحل بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز در تمام گروهها بررسی شد. تخمکهای با هسته شکسته شده به عنوان با نشانه شروع تقسیم میوز و بدون هسته (GVBD: Germinal Vesicle Break Down) و تخمکهای دارای جسمک قطبی به عنوان تخمکهای بالغ یا MII (Metaphase II) شناسایی گردیدند.

۲-۵. آنالیز آماری

در تحقیق حاضر، داده‌ها ابتدا به وسیله آزمون آماری ANOVA یکطرفه و سپس به وسیله آزمون توکی و با استفاده از نرم افزار SPSS 13 مورد تجزیه و تحلیل نهایی قرار گرفت و تفاوت نتایج بین گروه‌های مختلف با حداقل p<۰/۰۵ معنی‌دار، تلقی گردید.

۳. نتایج و بحث

۳-۱. آنالیز DPPH

نتایج حاصل نشان داد که طبق شکل ۱، با افزایش میزان غلظت عصاره ریشه کنگر، میزان درصد مهار کنندگی DPPH افزایش می یابد. مطالعات قبلی نشان دادند که گیاه کنگر دارای ترکیبات فنولی از قبیل Quercetin است، که این ماده دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد و به عنوان مهارکننده‌های رادیکالهای آزاد عمل می‌کند (Apak, 2007).

۳-۲. بلوغ آزمایشگاهی تخمک

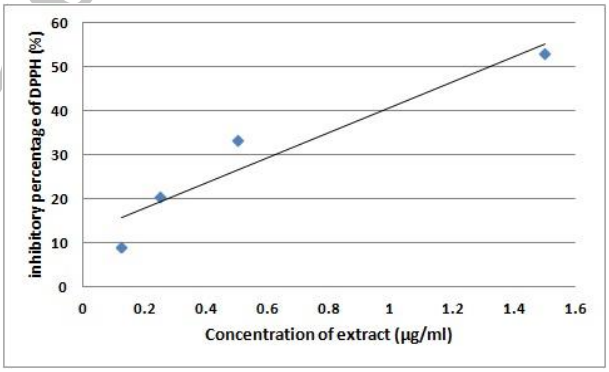
در شکل ۲ مراحل مختلف بلوغ تخمک نشان داده شده است. در مطالعه حاضر تخمک‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت بلوغ حاوی غلظتهای مختلف عصاره ریشه کنگر قرار گرفتند. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، در گروه کنترل در ۲۳ درصد تخمک ها، نشانی از شروع علائم میوز دیده نشد. و در ۶۷ درصد تخمکهای نارس از سرگیری میوز مشاهده شد. در حالیکه در گروه آزمایشی ۱، که تخمکها در معرض غلظت ۱۰ میکروگرم/میلی لیتر از عصاره کنگر بودند، ۱۸ درصد آنها میوز را آغاز نکردند ولی ۸۲ درصد میوز را از سر گرفتند که از این بین تنها ۱۱ درصد در مرحله GVBD متوقف شدند و بقیه تا مرحله MII پیش رفتند که آماده لقاح هستند که نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (P value<0.05). در گروه آزمایشی ۲ ۱۱ درصد تخمکها میوز را آغاز نکردند ولی ۸۹ درصد میوز را از سر گرفتند که از این بین تنها ۱۰ درصد در مرحله GVBD متوقف شدند و بقیه تا مرحله MII پیش

Archive of SID
www.SID.ir

رفتند که آماده لقاح هستند که نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی-داری را نشان دادند (P value <0.01). مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که در گروه آزمایشی ۳، که تخمکها در معرض غلظت ۴۰ میکروگرم/میلی لیتر از عصاره ریشه کنگر بودند، میزان از سرگیری میوز نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری را نشان داد (۹۳ درصد) (P value <0.05) (شکل ۳). بهبود در بلوغ تخمک ممکن است ناشی از اثرات آنتی اکسیدانی عصاره ریشه کنگر باشد که رادیکالهای آزاد را در محیط کشت بلوغ، مهار می‌کند.

جدول ۱. تاثیر عصاره ریشه کنگر بر میزان بلوغ آزمایشگاهی تخمک.

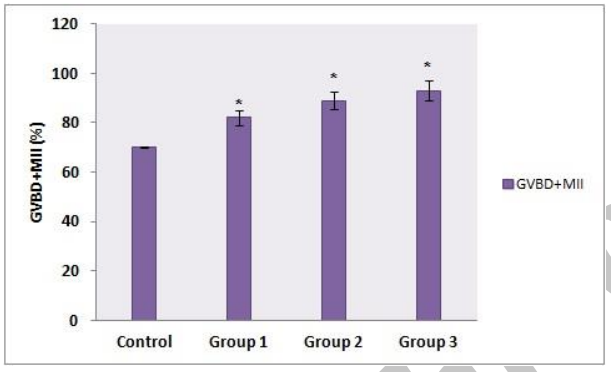
گروه	GV %	GVBD %	MII %	GVBD+MII %
کنترل	۲۳	۲۰	۴۷	۶۷
گروه ۱	۱۸	۱۱	۷۱	۸۲
گروه ۲	۱۱	۱۰	۷۹	۸۹
گروه ۳	۷	۹	۸۴	۹۳



شکل ۱. درصد مهاری DPPH بوسیله غلظتهای مختلف عصاره ریشه کنگر

Wang و همکاران (۱۹۹۲) گزارش دادند تکوین جنین‌های گاو به بلاستوسیت در اکسیژن ۵ درصد بیشتر از اکسیژن ۱۰ درصد است (Wang, 1992). بنابراین به نظر می‌رسد که غلظت بالای اکسیژن از رسیدن جنینهای گاو به مرحله بلاستوسیت جلوگیری می‌کند. غلظت بالای اکسیژن در طی کشت آزمایشگاهی بدلیل افزایش ROS در سیتوپلاسم جنین‌های در حال تکوین، توانایی تکوین را کاهش می-دهد (Kwon, 1999). فعالیت اکسیدازی وابسته به غلظت O_2 محیطی دارد و غلظت مناسب اکسیژن برای فعالیت این اکسیدازها در محیط کشت بیشتر از آن‌هایی است که در بدن قرار دارند (Halliwell, 2009).

شکل ۲. مراحل مختلف بلوغ اووسیت. (بزرگنمایی: ۱۰۰ ×)



شکل ۳. از سرگیری میوز و بلوغ اووسیت‌ها در گروه‌های آزمایشی. * = معنی دار در مقایسه با گروه کنترل.

مقدار H_2O_2 در جنین‌های کشت شده تحت فشار اکسیژن ۲۰ درصد بالاست که اکسیدازها تحت این شرایط به مقدار بالاتری تولید می‌شوند. در بسیاری سلول‌ها، سیستم‌های آنتی‌اکسیدان کارآمد می-توانند فشار اکسیداتیو را توسط به دام انداختن ROS تضعیف کنند. گلوتاتیون یک ترکیب سولفیدریل غیر پروتئینی مهم در سلول‌های پستانداران است و نقش مهمی را در حفاظت سلول از آسیب اکسیداتیو دارد. ساخته شدن گلوتاتیون در طی بلوغ تخمک گزارش شده است (Miyamura, 1995). همچنین مطالعات نشان دادند که اضافه کردن سیستئامین، بتامرکاپتواتانول و سیستئین به محیط کشت بلوغ تخمک گاو و خوک محتوی گلوتاتیون داخل سلولی را بعد از بلوغ افزایش می‌دهند و تکوین و کیفیت جنین را بهبود می‌دهد (De Mutos, 2000). بنابراین بهبود در میزان بلوغ تخمک در تحقیق

www.SID.ir

حاضر به نظر می‌رسد با اثر عصاره ریشه کنگر بر سطوح گلوتاتیون در تخمک‌های MII ارتباط دارد. در مطالعه‌ای Wang و هم‌کارانش نشان دادند که اضافه کردن غلظت‌های مختلف پلی‌فنول‌های چایی سبز به عنوان آنتی‌اکسیدان به محیط کشت جنین، تشکیل بلاستوسیست را افزایش می‌دهد (Wang, 2007). Choe و هم‌کاران، تاثیر همزمان ۲ آنتی اکسیدان بتامرکاپتواتانول و گلوتاتیون را بر میزان بلوغ اووسیت و تکوین جنین خوک بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که هم میزان بلوغ تخمک و هم تشکیل بلاستوسیست‌های جنینی و هم‌چنین تعداد سلول‌ها در هر بلاستوسیست تحت تاثیر آنتی اکسیدان‌ها، افزایش می یابد (Choe, 2010). در سال ۲۰۱۰ محققان تاثیر گل شقایق (*Papaver rhoeas*) را به عنوان منبعی از آنتی‌اکسیدان‌ها، بر رشد و بلوغ آزمایشگاهی و قابلیت تکاملی تخمک های نارس موش مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که غلظت‌های پایین عصاره سبب بهبود میزان بلوغ تخمک و تشکیل بلاستوسیست در مقایسه با گروه کنترل می‌شود اما افزایش معنی‌داری نمی‌یابد. در حالیکه غلظت‌های بالاتر سبب افزایش معنی‌داری در میزان بلوغ تخمک نسبت به کنترل شده بود (Golkar-Narenji, 2010). Tavana و هم‌کاران (۲۰۱۲) تاثیرات عصاره آبی زعفران (*Crocus sativus* L.) را بر بلوغ آزمایشگاهی و تکامل جنین در تخمک های نارس موش مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آشکار کرد میزان بلوغ در همه گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف زعفران نسبت به کنترل به طور معنی داری بالاتر بود ولی میزان لقاح اووسیت در غلظت‌های پایین نسبت به گروه کنترل بالاتر بود که این یافته ها را به دارا بودن محتوی بالای آنتی اکسیدانی گیاه زعفران نسبت دادند (Tavana, 2012b).

بنابراین بر اساس بررسی‌های به عمل آمده مطالعه حاضر برای اولین بار اثر مفید استفاده از عصاره ریشه کنگر در پیشبرد بلوغ آزمایشگاهی تخمک، مشخص کرد. نتایج حاصل از این تحقیق و مطالعات گذشته نشان می‌دهد که اضافه کردن عصاره‌های گیاهی به محیط کشت بلوغ به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، ایمن‌تر بوده و اثرات جانبی کمتری دارد.

۴. نتیجه گیری

استفاده از محیط کشت بلوغ تخمک کامل شده با آنتی‌اکسیدان-هایی از قبیل عصاره کنگر، ممکن است بتواند به افزایش تعداد بلاستوسیست‌های حاصل شده از بلوغ آزمایشگاهی کمک کند. به طور کلی عصاره ریشه کنگر می‌تواند با یک روش وابسته به دوز سبب افزایش میزان بلوغ آزمایشگاهی تخمک نارس موش کوچک آزمایشگاهی شود.

۵. منابع

Alpinar, K., Kolak, U., Guclu, K., Aras, C., Altun, M., Celi, S.E., Berker, K.I., Bektasoglu, B., Apak, R. 2009. Antioxidant capacities of some food plants wildly grown in Ayvalik of Turkey. *Food Sci Technol Res.*, 15: 59-64.

Apak, R., Demirata, B. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules.*, 12: 1496-1547.

Aruoma. 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. Mutat Res 523, 9-20.

Azeez, O.H. 2012. Effect of Gundelia tournefortii on some biochemical parameters in dexamethasone-induced hyperglycemic and hyperlipidemic mice. Iraqi Journal of Veterinary Sciences 26, 73-79.

Banwell, K.M., Russell, D.L., Kind, K.L., Thompson J.G. 2007. Oxygen concentration during mouse oocyte in vitro maturation affects embryo and fetal development. *Hum Reprod*., 22: 2768-2775.

Choe, C., Kim, E.J., Cho, S.R., Kim, H.J., Choi, S.H., Han, M.H., Han, J., Son, D.S., Kang, D. 2010. Synergistic effects of glutathione and β-mercaptoethanol treatment during n vitro maturation of porcine oocytes on early embryonic development in a culture system supplemented with L-cysteine. *J Reprod Dev*., 56: 575-58.

De Lamirande., Zini, A., Kodam, H., Gagnon, C. 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod*., 2: 48-54.

De Mutos, D.G. 2000. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development. Effect of β-Mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Threnology*., 53: 761- 771.

Archive of SID
www.SID.ir

Tavan, S., Azarnia, M., Shahverdi, A.H., Eftekhari-Yazdi, P. 2012a. Effects of Saffron (Crocus sativus L.) Aqueous Extract on In vitro Maturation, Fertilization and Embryo Development of Mouse Oocytes. *Cell Journal(Yakhteh.,)* 13: 259-264.

Tavana, S., Azarni, M., Shahverdi, A.H., Eftekhari-Yazdi, P. 2012b. Effects of Saffron (Crocus sativus L.) Aqueous Extract on In vitro Maturation, Fertilization and Embryo Development of Mouse Oocytes. *Cell Journal (Yakhteh).*, 13: 259-264.

Vermeiden, J.P. 1995. Antioxidants in IVF culture media. *Hum Reprod*., 10: 696-697.

Wang, W.L., LU, K.H., Polge, C. 1992. The effect of gas phase on the in vitro development of bovine embryos drived from in vitro maturation and fertilization of ovarian oocytes. *Theriogenology*., 37: 320.

Wang, Z.G., Xu, Z.R. 2007. Effect of supplementation of green tea polyphenols on the developmental competence of bovine oocytes in vitro. *Braz J Med Biol Res*., 40: 1079-1089.

Wongsrikeao, P., Taniguchi, M. 2006. Effects of hexoses on in vitro oocyte maturation and embryo development in pigs. *Theriogenology*., 65: 332-343.

Golkar-Narenji, A., Samadi, F., Hasani, S., Shahverdi, A.H., Eftekhari-Yazdi, P., Kamalinejad, M. 2010. Effect of Papaver rhoeas extract on in vitro maturation and developmental competence of immature mouse oocytes. *Reprod Med Biol*., 9: 211-215.

Halliwell, B. 2009. Superoxide dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates. FEBS Lett 92, 321-326.

Domej, W., Oettl, K. and Renner, W. 2014. Oxidative stress and free radicals in COPD--implications and relevance for treatment. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 9:1207-24.

Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwa Jw, Sahana DK, Ravikumar MNV. 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and theapy:A pharmaceutical perspective. 113(3): 189-207.

Kwon, H.C. 1999. Effect of low oxygen condition on the generation of reactive oxygen species and the development in mouse embryos cultured in vitro. *J obstet Gynaecal Res.,* 25: 359-366.

Miyamura, M., Hamano, S. 1995. Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. *Theriogenology*., 43: 282.

Nasr-Esfahani, M.H. 1991. The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured in vitro. *Development.*, 113: 551-560.

Pfeifer, N., Baston-Büst, D.M., Hirchenhain, J., Friebe-Hoffmann, U., Rein, D.T., Krüssel, J.S., Hess, A.P. 2012. Selection of the in vitro culture media influences mRNA expression of Hedgehog genes, Il-6, and important genes regarding reactive oxygen species in single murine preimplantation embryos. 2012:479315. doi: 10.1100/2012/479315

Gardner, D.K., Lane, M.W., Lane, M. 2000. EDTA stimulates cleavage stage bovine embryo development in culture but inhibits blastocyst development and differentiation., 57(3): 256-61.

Nehir, S.E. 2004. Radical scavenging and iron-chelating activities of some greens used as traditional dishes in Mediterranean diet. *Int J Food Sci Nutr*., 55: 67-74.

Ogasawara, M. & Suzuki, H. 2007. Differential Effects of Antioxidants on the In Vitro Invasion, Growth and Lung Metastasis of Murine Colon Cancer Cells. *Biol Pharm Bull*., 30: 200-204.

Archive of SID

www.SID.ir