Archive of SID

نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۵ شماره ۴/ سال۱۳۹۴

شایستگی تکاملی تخمک های گاوی در ارتباط با سمت تخمدان، حضور جسم زرد و اندازه فولیکولی در شرایط برون‌تنی

حامد کرمی شبانکاره[۱] ، هادی حجاریان[۲] ، محمد حامد شهسواری*[۳] و صاحب فروتنی‌فر[۲]

تاریخ دریافت : ۹۳/۸/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹٤/۵/۲۸

[۱] استاد گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه
[۲] استادیار گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه
[۳] دانشجوی دکتری گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
*مسئول مکاتبه: Email: shahsavari_mohammadhamed@yahoo.com

چکیده

زمینه مطالعاتی: تناقض‌های بسیاری در رابطه با اثرات جسم زرد و فعالیت نابرابر دو سمت دستگاه تولید مثلی وجود دارد. **هدف**: هدف اول در این مطالعه بررسی شایستگی تکاملی تخمک‌های گاوی منشأ گرفته از تخمدان‌های راست و چپ واجد جسم زرد ($R.CL^+$-oocytes یا $L.CL^+$-oocytes) و فاقد جسم زرد ($R.CL^-$-oocytes یا $L.CL^-$-oocytes) با بکارگیری آزمون بریلیانت کرزیل بلو (BCB) به عنوان معیار انتخاب بوده است (آزمایش اول). **روش کار**: در آزمایش اول، تخمک‌های جمع‌آوری شده در معرض رنگ BCB قرار گرفته و سپس به دو دسته تخمک‌های در حال رشد (BCB^-) رشد یافته (BCB^+ ، شایسته‌تر) تقسیم شدند. سپس تمامی تخمک‌ها وارد فرآیند تولید برون‌تنی رویان (IVEP) شدند. **نتایج**: نتایج این آزمایش هیچ تفاوتی را در میزان رشد و نمو رویانی در اثر سمت تخمدان یا در اثر انتخاب با BCB نشان نداد. اگرچه در ارتباط با $R.CL^+$-oocytes ، یک عدم یکنواختی در شایستگی تکاملی تخمک‌ها وجود داشت و درصد تخمک‌های BCB^+ ، بزرگتر از گروه BCB^- بود (به ترتیب ۵۷٫۶٪ در برابر ٤۲٫٤٪). درصد تسهیم (کلیواژ) و بلاستوسیست حاصل از CL^+-oocytes نیز نسبت به این مقادیر در گروه CL^--oocytes کمتر بود. هدف دوم در این مطالعه بررسی عدم یکنواختی در شایستگی تکاملی تخمک‌ها در ارتباط با حضور یا عدم حضور جسم زرد و اندازه فولیکولی بود. پس از دسته‌بندی تخمدان‌ها بر اساس حضور یا عدم حضور جسم زرد، فولیکول‌های مورد نظر بر طبق قطر خود به سه گروه کوچک، متوسط و بزرگ تقسیم شدند و تخمک‌های بدست آمده در هر گروه وارد فرآیند IVEP گردیدند. نتایج نشان دادند که CL^+.B-oocytes به همان اندازه‌ای که CL^+.S-oocytes از اثرات منفی جسم زرد متأثر می‌شوند، تأثیر نخواهند پذیرفت. **نتیجه‌گیری نهایی**: بنابراین، این چنین می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است بتوان با استفاده از تخمک‌های منشأ گرفته از فولیکول‌های بزرگ تخمدان‌های فاقد جسم زرد، برخی مشکلات مربوط به IVEP گاوی را کاهش داد.

واژگان کلیدی: جسم زرد، بریلیانت کرزیل بلو، شایستگی تکاملی، تولید برون‌تنی رویان، اندازه فولیکول

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

عدم یکنواختی تخمک‌های استحصالی از فولیکول‌های در حال رشد به‌وسیله تکنیک برداشت تخمک و یا آسپیراسیون از تخمدان‌های دام‌های ماده کشتار شده، همچنان یک چالش بزرگ در موفقیت فرآیند بلوغ برون-تنی (IVM) بوده و موجب کاهش میزان رشد و نمو رویانی می‌گردد. این مشکلات ناشی از این واقعیت است که منشأ تخمک‌های استحصالی از تخمدان‌های حیوانات کشتارگاهی (مرحله سیکل فحلی، مرحله موج فولیکولی، منشأ تخمدان‌ها و غیره...) ناشناخته و یا غیریکنواخت بوده و بنابراین کیفیت تخمک‌ها متغیر خواهد بود (لانرگان و همکاران ۲۰۰۶ و کرمی-شبانکاره و میرشمسی ۲۰۱۲). جهت بهبود تولید برون‌تنی بلاستوسیست در نشخوارکنندگان عوامل دخیل در عدم یکنواختی موجود در شایستگی تکاملی تخمک‌ها از قبیل؛ مراحل مختلف رشد، پس‌روی و اندازه‌های مختلف فولیکولی به‌عنوان موضوع مورد مطالعه بسیاری از تحقیقات مدّ نظر بوده است (یون و همکاران ۲۰۰۱ و گینتر و هوفمن ۲۰۱٤). مطالعات گذشته عدم یکنواختی موجود در عملکرد اندام‌های تولیدمثلی را در گاوهای شیری در اثر تفاوت در فعالیت تخمدانی و به احتمال قوی‌تر به‌علت تفاوت‌های فیزیولوژیکی در بخش‌های مجرایی اندام‌های تولیدمثلی که خود در ارتباط با سمت آبستنی قبلی و بازیابی شاخ آبستن بعد از زایش است، تأیید نموده‌اند (جرس و همکاران ۲۰۱۱). این فعالیت نابرابر دو سمت سیستم تولیدمثلی ممکن است در اثر تفاوت در فعالیت تخمدان‌های راست و چپ در ارتباط با سمت تخمک‌گذاری قبلی (فوکودا و همکاران ۲۰۰٦)، تفاوت در شایستگی تکاملی تخمک‌های منشأ گرفته از این تخمدان‌ها (فوکودا و همکاران ۲۰۰۰) و یا تفاوت بین شاخ‌های راست و چپ رحم باشد (هیلان و همکاران ۲۰۰۹). وجود ارتباط بین تکامل اجسام زرد و رشد و نمو فولیکول‌ها (کانتررراس و همکاران ۲۰۰۸) دلیلی مستند در حمایت از وجود فاکتورهای دخیل در عدم یکنواختی شایستگی تکاملی تخمک‌ها است. علاوه براین، شبانکاره و همکاران (۲۰۱۳) پیشنهاد نموده‌اند که مایعات فولیکولی به‌دست آمده از فولیکول‌های مستقر بر روی تخمدان‌های گاوی فاقد جسم زرد جهت استفاده در بلوغ تخمک‌ها مناسب‌تر از مایعات بدست آمده از فولیکول‌های مستقر بر روی تخمدان‌های واجد جسم زرد می‌باشند. کلارک (۱۹۳٦) و کاسیدا و همکارانش (۱۹٤۸) تخمدان‌ها را از تلیسه‌های نابالغ در کشتارگاه جمع‌آوری کرده و پی بردند که ۷۳/۵ ٪ و ٦۰/۲ ٪ آنها به ترتیب دارای فولیکول‌های غالب و جسم زرد بر روی تخمدان راست می‌باشند. نشان داده شده است که الگوهای تخمک‌گذاری (از سمت مقابل یا هم‌سو) و تخمدان سمتی که رویان‌ها از آن استحصال شده‌اند، می‌تواند میزان آبستنی را پس از تلقیح داخل رحمی یا طی مراحل لقاح برون‌تنی متأثر سازد (فوکودا و همکاران ۲۰۰٦). همچنین، یک منبع دیگر برای ایجاد عدم یکنواختی در شایستگی تکاملی تخمک‌ها اندازه فولیکولی است که تخمک‌ها از آنها استحصال شده‌اند. در خوک و دیگر گونه‌ها نشان داده شده که کسب شایستگی میوزی و شایستگی تکاملی بعدی تخمک‌ها به‌طور مستقیمی در ارتباط با اندازه فولیکولی است (موتلیک و فولکا ۱۹۸٦ و یون و همکاران ۲۰۰۱). اگرچه معیارهای شکل‌شناسی ابزاری معقول برای تشخیص کیفیت تخمک‌ها بدست می-دهند، اما تنوع بسیاری در بین تخمک‌ها وجود داشته و معیارهای شکل‌شناسی به تنهایی قادر به تشخیص تخمک‌های مناسب برای رشد و نمو برون‌تنی تا رسیدن به مرحله بلاستوسیست نمی‌باشند (اوپیلا و همکاران ۲۰۰۸). در این رابطه برای انتخاب تخمک‌های رشد یافته از آزمون بریلیانت کرزیل بلو[۲](BCB) استفاده می‌شود. آزمون BCB بر اساس قابلیت آنزیم گلوکز-٦-فسفات دی هیدروژناز[۳](G6PDH) در تغییر رنگ ماده BCB

[1] . *In vitro* maturation (IVM)

[2] . Brilliant crysil blue (BCB)

[3] . Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)

www.SID.ir

Archive of SID

از آبی به بی رنگ (G6PDH فعال: BCB^- ، G6PDH غیر فعال: BCB^+) است (رودریگز-گنزالز و همکاران ۲۰۰۲). بنابراین می‌توان تخمک‌ها را به‌گونه‌ای غیرتهاجمی با استفاده از رنگ‌آمیزی BCB به دو گروه تخمک‌های BCB^+ (تخمک‌های کاملاً رشد یافته و شایسته‌تر) و تخمک‌های BCB^- (تخمک‌های در حال رشد با شایستگی تکاملی کمتر) تفکیک کرد (میرشمسی و همکاران ۲۰۱۳).

تا به امروز بر اساس اطلاعات ما، گزارشاتی که اثرات جسم زرد و سمت تخمدان را با یکدیگر بر روی شایستگی تکاملی تخمک‌ها بررسی کرده باشند محدود بوده و تناقضات بسیاری در رابطه با اثرات مثبت و منفی جسم زرد و فعالیت دو سمت سیستم تولید مثلی وجود دارد. بنابراین، هدف اولیه از این مطالعه، بررسی شایستگی تکاملی تخمک‌های گاوی منشأ گرفته از تخمدان‌های راست و چپ واجد جسم زرد ($R.CL^+$-oocytes یا $L.CL^+$-oocytes) و فاقد جسم زرد ($R.CL^-$-oocytes یا $L.CL^-$-oocytes) با بکارگیری آزمون بریلیانت کرزیل بلو (BCB) به عنوان معیار انتخاب بوده است (آزمایش اول). هدف دوم در این مطالعه، بررسی دقیق‌تر اثرات جسم زرد و ارزیابی اثرات اندازه فولیکولی به عنوان یکی دیگر از عوامل مسبب عدم یکنواختی در شایستگی تکاملی تخمک‌ها در ارتباط با حضور یا عدم حضور جسم زرد بود.

مواد و روش‌ها

تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده به‌غیر از مواردی که نام برده شده، از شرکت سیگما[1] تهیه شده است.

جمع‌آوری تخمک‌ها

تخمدان‌های مورد نظر از گاوهایی بالغ با محدوده سنی ٤ تا ٧ سال از نژاد هولشتاین استحصال گردید. تخمدان-های جمع‌آوری شده به‌صورت غوطه‌ور در محلول نرمال سالین که واجد پنیسیلین (۱۰۰ *IU/Ml*) و استرپتومایسین (۵۰ *mg/mL*) بوده در دمای ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه انتقال داده شد (حداکثر طی دو ساعت بعد از کشتار). کمپلکس‌های تخمک-کومولوس[2] (*COCs*) از فولیکول‌های تخمدانی آسپیره شدند. تنها تخمک‌هایی با چندین لایه سلول‌های کومولوس متراکم و اووپلاسم یک‌دست در این آزمایش استفاده شدند.

بلوغ برون‌تنی[3] (*IVM*)

بعد از دسته‌بندی تخمدان‌ها و تخمک‌ها بر اساس تیمارهای مورد آزمایش، *COCs* سه بار در محیطی که آنها قرار بود کشته داده شوند، مورد شستشو قرار گرفتند. تخمک‌های مورد نظر در گروه‌هایی ۸ تا ۱۰ تایی به ریزقطره‌هایی با حجم ۵۰ میکرولیتر از محیط *IVM* که حاوی محیط پایه *TCM 199* مکمل شده با ۰/۲۳ *mmol/L* از سدیم پیروات، ۰/۰۲ *IU/ml* از *p-FSH* ، ۱ *µg/ml* از استرادایول *17β* ، ۵۰ *ng/ml* از عامل رشد اپیدرمی (*EGF*[4]) ، ۱۰٪ *(v/v) FCS* و ۵۰ *µg/ml* از جنتامایسین می‌بود، انتقال داده شدند و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۸/۵ درجه سانتیگراد در انکوباتور CO_2 (۵٪ CO_2 در هوا، ۹۰ تا ۹۵٪ رطوبت نسبی) مورد انکوباسیون قرار گرفتند.

لقاح برون‌تنی[5] (*IVF*)

منی منجمد شده یک گاو نر ثبت شده، یخ‌گشایی و برای انجام فرآیند *swim-up* آماده شد (پریش و همکاران ١٩٨٦). بعد از طی IVM ، تخمک‌های بلوغ یافته دوبار در هر یک از محیط‌های شستشو و *IVF* مورد شستشو قرار گرفتند. سپس ٦ تا ٧ تخمک در هر قطره حاوی *IVF-TALP* با حجم ۵۰ µl قرار داده شدند (پریش و همکاران ١٩٨٦). برای تأمین غلظت نهایی، ۱×۱۰٦ اسپرماتوزوییید ظرفیت‌پذیر شده به قطرات حاوی تخمک‌ها اضافه شدند. سپس ۲ *µl* مخلوط *PHE* (

[1] . Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)

[2] . Cumulus oocyte complexes (COCs)
[3] . *In vitro* maturation (IVM)
[4] . Epidermal growth factor (EGF)
[5] . *In vitro* fertilization (IVF)

www.SID.ir

Archive of SID

۲۰ μM پنیسیل‌آمین، ۱۰ CM هیپوتائورین و ۱ μM اپی-نفرین) به سوسپانسیون مورد نظر اضافه شد. تخمک‌ها و اسپرم‌های مورد نظر به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۸/۵ درجه سانتیگراد در هوایی با ۵٪ CO_2 و حداکثر رطوبت با یکدیگر مورد انکوباسیون قرار گرفتند.

کشت در شرایط برون‌تنی[1](IVC)

حدوداً ۱۸ ساعت پس از تلقیح تخمک‌ها، زایگوت‌های مفروض با عمل *Vortexing* آرام و دوبار شستشو در محیط *HEPES-TCM 199* حاوی ٤٪ *BSA* و یکبار در محیط *KSOM*[2] (لاویتس و بیگرس ۱۹۹۳) از سلول-های کومولوس عاری شدند. زایگوت‌های مفروض در گروهایی ۲۵ تا ۳۰ عددی در قطراتی ٤۰۰ µL از محیط *KSOM* که با ۱ *mg/mL* از *BSA* مکمل شده بود ($KSOM_1$) قرار داده شدند و روی آنها در مدت ٤۸ ساعت بعدی با روغن معدنی پوشانیده شد. قطرات کشت داده شده در فواصل ٤۸ ساعته طی روزهای باقی مانده با استفاده از محیط *KSOM* که حاوی ۵٪ *FCS* بوده ($KSOM_2$) باز پر و جایگزین می‌شدند. تسهیمات و کلیواژ رویانی در روز دوم (روز *IVF* به عنوان روز صفر در نظر گرفته شد) و میزان تولید بلاستوسیست در روزهای ٦، ۷، ۸ و ۹ به صورت نسبتی از کل تخمک‌ها یا نسبتی از رویان‌های تسهیم یافته ثبت گردید.

طرح آزمایش

آزمایش ۱ : هدف آزمایش ۱ بررسی شایستگی تکاملی تخمک‌های گاوی منشأ گرفته از تخمدان‌های راست و چپ واجد جسم زرد ($R.CL^{+}$-*oocytes* یا $L.CL^{+}$-*oocytes*) و فاقد جسم زرد ($R.CL^{-}$-*oocytes* یا $L.CL^{-}$-*oocytes*) با بکارگیری آزمون بریلیانت کرزیل‌بلو (*BCB*) به‌عنوان معیار انتخاب بود. بلافاصله پس از آنکه تخمک‌ها ازتخمدان‌های راست و چپ واجد جسم زرد و فاقد جسم زرد استحصال گردیدند، ۳ بار در محیط *Dulbecco's PBS* اصلاح شده با اضافه نمودن ۰/٤ ٪ *BSA* (*mDPBS*) مورد شستشو قرار گرفتند. سپس تخمک‌های مورد نظر به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۸/۵ درجه سانتیگراد و هوای مرطوب در معرض ۲٦ μM رنگ *BCB (B-5388)* رقیق شده در *mDPBS* قرار گرفتند (کرمی-شبانکاره و میرشمسی ۲۰۱۲). به‌دنبال این مرحله، تخمک‌ها دوبار با *mDPBS* شستشو شده و تحت میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ×50) مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس رنگ سیتوپلاسم، تخمک-های مورد نظر به دو دسته تقسیم‌بندی شدند؛ تخمک-هایی با رنگ آبی سیتوپلاسم که BCB^{+} (-$R.CL^{+}.BCB^{+}$ و -$R.CL^{-}.BCB^{+}$ یا -$L.CL^{+}.BCB^{+}$ و -$L.CL^{-}.BCB^{+}$-*oocytes*) محسوب شده و تخمک‌هایی بدون رنگ آبی سیتوپلاسم که BCB^{-} (-$R.CL^{+}.BCB^{-}$ و -$R.CL^{-}.BCB^{-}$ یا -$L.CL^{+}.BCB^{-}$ و -$L.CL^{-}.BCB^{-}$-*oocytes*) در نظر گرفته می‌شدند. بنابراین ۸۸۳ تخمک بر اساس منشأ خود در چهار گروه آزمایشی تقسیم شدند و درصد تخمک‌های انتخاب شده BCB^{+} در آنها بررسی شد (جدول ۱). سپس این تخمک‌ها بر اساس منشأ خود و انتخاب *BCB* همانطور که ذکر گردید در ۹ گروه آزمایشی قرار داده شدند (***BCB***$^{+}$-$R.CL^{+}.BCB^{+}$ و -$R.CL^{-}.BCB^{+}$ یا -$L.CL^{+}.BCB^{+}$ و $L.CL^{-}.BCB^{+}$ ***BCB***$^{-}$ -$R.CL^{+}.BCB^{-}$ و $R.CL^{-}$ -BCB^{-}. یا -$L.CL^{+}.BCB^{-}$ و $L.CL^{-}.BCB^{-}$-*oocytes* و *Control-oocytes*). بعد از این تقسیم‌بندی، تخمک‌ها ۳ بار در محیطی که قرار بود در آن کشت داده شوند، مورد شستشو قرار گرفتند. پس از طی *IVM* ، تخمک‌ها لقاح داده شده و زایگوت‌های مفروض همانگونه که توضیح داده شد، کشت داده شدند. در گروه کنترل (*C-oocytes* ، بدون انتخاب بر اساس سمت تخمدان، حضور یا عدم حضور جسم زرد و رنگ آمیزی*BCB*) ، تخمک-ها به‌طور مستقیم (بدون رنگ‌آمیزی *BCB*) کشت داده شدند.

آزمایش ۲ : تخمدان‌هایی متفاوت با آزمایش اول جهت بررسی عدم یکنواختی در شایستگی تکاملی تخمک‌های

[1] . *In vitro* culture (IVC)
[2] . Potassium simplex optimization medium (KSOM)

www.SID.ir

Archive of SID

منشأ گرفته از اندازه‌های مختلف فولیکولی تخمدان‌های واجد جسم زرد (*CL^+-oocytes*) یا فاقد جسم زرد (*CL^--oocytes*) به سه گروه تخمدان‌های *CL^+*، *CL^-* و گروه کنترل تقسیم‌بندی شدند. بعد از دسته‌بندی تخمدان‌ها بر اساس حضور یا عدم حضور جسم زرد، فولیکول‌های تخمدانی بر اساس قطر خود به سه گروه کوچک (*S*: ۶-۳ میلی‌متر)، متوسط (*M*: ۹-۶ میلی‌متر) و بزرگ (*B*: ۲۰-۱۰ میلی‌متر) (شبانکاره و همکاران ۲۰۱۳) تقسیم شدند. در مرحله بعدی تخمک‌های موجود در هر یک از این دسته‌جات فولیکولی مورد آسپیراسیون قرار گرفتند. بنابراین ۱۳۳۰ تخمک بر اساس منشأ خود در ۷ گروه آزمایشی (*CL^+.S-*، *CL^+.M-*، *CL^+.B-* و *CL^-.S-*، *CL^-.M-*، *CL^-.B-oocytes* و *C-oocytes*) قرار گرفتند و شایستگی تکاملی آنها پس از طی مراحل تولید آزمایشگاهی رویان بررسی شد. در گروه کنترل (*C-oocytes* ، بدون انتخاب بر اساس حضور یا عدم حضور جسم زرد و اندازه فولیکولی) ، تخمک‌ها به‌طور مستقیم کشت داده شدند.

تحلیل آماری

داده‌های مورد نظر جمع‌آوری شده و مقادیر درصدی آن با *arcsine* اصلاح گردید. آنالیز واریانس با بکارگیری عملکرد *aov* از بسته *Stats* از نرم افزار *R*[4] انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون *Tukey HSD* انجام گرفت و تفاوت‌هایی با احتمال P = 0.05 یا کمتر معنی‌دار محسوب شدند.

نتایج

آزمایش اول: جدول ۱ ارتباط بین منشأ تخمک‌ها و انتخاب تخمک‌ها با استفاده از آزمون *BCB* را نشان می‌دهد. در گروه *$R.CL^-$-oocytes* ، *$L.CL^+$-oocytes* و *$L.CL^-$-oocytes* ، تفاوت معنی‌داری در درصد تخمک‌هایی که به عنوان *BCB^+* و یا *BCB^-* انتخاب شدند، وجود نداشت (*$P > 0.05$*). هرچند در مورد تخمک‌های گروه *$R.CL^+$-oocytes*، درصد تخمک‌های *BCB^+* (*$R.CL^+.BCB^+$-oocytes*) بیشتر (*$P< 0.05$*) از تخمک‌های *BCB^-* (*$R.CL^+.BCB^-$-oocytes*) بود (به ترتیب ۵۷/۶٪ در برابر ۴۲/۴٪).

در جدول ۲ شایستگی تکاملی تخمک‌های گاوی منشأ گرفته از تخمدان‌های راست و چپ واجد جسم زرد (*$R.CL^+$-oocytes* یا *$L.CL^+$-oocytes*) و فاقد جسم زرد (*$R.CL^-$-oocytes* یا *$L.CL^-$-oocytes*) که در معرض رنگ *BCB* قرار داده شده‌اند، آورده شده است. اثر متقابل رنگ‌آمیزی *BCB* با منشأ تخمدانی (سمت تخمدان‌ها و حضور یا عدم حضور جسم زرد) (***BCB^+***: *$R.CL^+.BCB^+$-* و *$R.CL^-.BCB^+$-* یا *$L.CL^+.BCB^+$-* و *$L.CL^-.BCB^+$-* ؛ ***BCB^-*** *$R.CL^+.BCB^-$-* و *$R.CL^-$ $.BCB^-$-* یا *$L.CL^+.BCB^-$-* و *$L.CL^-.BCB^-$-oocytes*) هیچگونه اثری بر رشد و نمو رویانی نداشت (*$P < 0.05$*. علاوه براین، هیچ تفاوتی در اثر سمت تخمدان (راست در برابر چپ) و یا انتخاب *BCB* (*BCB^+* در برابر *BCB^-*) در رشد و نمو رویانی ثبت نگردید. هرچند که حضور یا عدم حضور جسم زرد (*CL^-*در برابر *CL^+*) موجب بروز تفاوت‌هایی معنی‌دار در میزان تسهیم (کلیواژ) و تولید بلاستوسیست گردید. درصد کلیواژ تخمک‌های *CL^+-oocytes* (۷۲/۵٪) کمتر (*$P< 0.001$*) از مقادیر آن در *CL^--oocytes* و *C-oocytes* (به ترتیب ۸۳/۶٪ و ۸۲/۲٪) بود. به‌طور مشابه، درصد بلاستوسیست‌های تولید شده از تخمک‌های *CL^+-oocytes* از مقادیر آن در *CL^--oocytes* کمتر بود ($P< 0.001$). اگرچه هیچ تفاوت معنی‌داری در میزان تولید بلاستوسیست بین *CL^+-oocytes* و *C-oocytes* مشاهده نشد (به ترتیب ۲۶/۷٪ و ۳۷/۵٪).

[1] . Small (S)
[2] . Medium (M)
[3] . Large or Big (B)
[4] . Software statistical package R version 2.15.2

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- ارتباط بین سمت تخمدان، حضور یا عدم حضور جسم زرد و انتخاب تخمک‌ها با استفاده از آزمون BCB (تعداد تکرار=۷)

صفت	دسته‌بندی تخمک‌ها	$^{1}L.CL^{-}$		$^{1}L.CL^{+}$		$^{2}R.CL^{-}$		$^{2}R.CL^{+}$	
		n	%	n	%	n	%	n	%
درصد تخمک-های انتخاب شده	BCB^{+}	۱۱۸	۱/۲^{a}±۵٤/٦	۸۱	۰/۸^{a}±۵۲/۹	۱۲۳	۱/٤^{a}±۵۱/۹	۹۵	۱/۲^{a}±۵۷/۶
	BCB^{-}	۹۸	۱/۰^{a}±۵٤/٤	۷۲	۰/۷^{a}±٤۷/۱	۱۱٤	۱/۲^{a}±٤۸/۱	۷۰	۰/۸^{b}±۴۲/۴

^{abc} حروف متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار است ($P< 0.05$).

^{1} $L.CL^{-}$ و $L.CL^{+}$: به ترتیب تخمدان چپ فاقد یا واجد جسم زرد.

^{2} $R.CL^{-}$ و $R.CL^{+}$: به ترتیب تخمدان راست فاقد یا واجد جسم زرد.

جدول ۲- استفاده از آزمون BCB به عنوان معیار انتخاب شایستگی تکاملی تخمک‌های گاوی منشأ گرفته از تخمدان‌های چپ و راست واجد یا فاقد جسم زرد (تعداد تکرار=۷)

صفات تیمارها	تعدادتخمک	نرخ بلوغ تخمک	نرخ تسهیم	نرخ تولید بلاستوسیست به ازای تخمک	نرخ تولید بلاستوسیست به ازای کلیواژ
^{1}C	112	۸۸/۲ ± ۹/٤^{a}	۸۲/۲ ± ٤/۷^{a}	۳۷/۵ ± ۵/٦^{a}	٤٦/۲ ± ۷/۳^{a}
^{1}R	402	۹۰/۲ ± ۳/۷^{a}	۸۰/۲ ± ۳/۱^{a}	۳۷/۲ ± ۳/۲^{a}	٤۵/۸ ± ۳/۳^{a}
^{1}L	369	۸٦/۰ ± ۲/۹^{a}	۷٦/۵ ± ۲/۵^{a}	۳۰/۰ ± ۲/۱^{a}	۳۹/٦ ± ۲/۷^{a}
C	112	۸۸/۲ ± ۹/٤^{a}	۸۲/۲ ± ٤/۷^{a}	۳۷/۵ ± ۵/٦^{ab}	٤٦/۲ ± ۷/۳^{a}
$^{2}CL^{+}$	318	۸۵/۸ ± ۳/٤^{a}	۷۲/۵ ± ۲/٤^{b}	۲٦/۷ ± ۲/۰^{b}	۳۷/۰ ± ۲/٦^{a}
$^{2}CL^{-}$	453	۹۰/۳ ± ۳/٤^{a}	۸۳/٦ ± ۲/۲^{a}	٤۰/۳ ± ۲/۸^{a}	٤۸/۳ ± ۳/۱^{a}
C	112	۸۸/۲ ± ۹/٤^{a}	۸۲/۲ ± ٤/۷^{a}	۳۷/۵ ± ۵/٦^{a}	٤٦/۲ ± ۷/۳^{a}
BCB^{+}	417	۹۰/۰ ± ۳/۵^{a}	۸۰/۳ ± ۲/۹^{a}	۳۵/٤ ± ۳/۰^{a}	٤۳/٦ ± ۳/۲^{a}
BCB^{-}	354	۸٦/۲ ± ۳/۲^{a}	۷٦/۳ ± ۲/۸^{a}	۳۱/۹ ± ۲/٦^{a}	٤۱/۸ ± ۳/۰^{a}

^{abc} حروف متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.001$).

^{۱} C ، R و L: به ترتیب تخمدان‌های گروه کنترل، راست و چپ.

^{۲} CL^{+} و CL^{-}: به ترتیب تخمدان‌های واجد یا فاقد جسم زرد.

آزمایش ۲: جدول ۳ شایستگی تکاملی تخمک‌های منشأ گرفته از اندازه‌های مختلف فولیکولی تخمدان‌های واجد جسم زرد (*CL^{+}-oocytes*) و فاقد جسم زرد (*CL^{-}-oocytes*) را نمایش می‌دهد. در این آزمایش اندازه فولیکولی، درصد تخمک‌های اکسپند یافته را متأثر نمود؛ بطوریکه تخمک‌های استحصالی از فولیکول‌های کوچک (*S-oocytes*) دارای کمترین میزان بلوغ تخمک میان دیگر گروه‌ها بودند. اثر متقابل جسم زرد با اندازه فولیکولی درصد تولید بلاستوسیست به ازای تخمک و به ازای رویان‌های کلیواژ یافته را متأثر ساخت (*$P < 0.001$*). درصد تولید بلاستوسیست از تخمک‌های *CL^{+}.S-oocytes* در بین دیگر گروه‌ها کمترین میزان بود (۳۰/۸٪). هرچندکه، هیچ تفاوت معنی‌داری (*$P> 0.05$*) در درصد بلاستوسیست‌های تولیدی از تخمک‌های منشأ

www.SID.ir

Archive of SID

گرفته از اندازه‌های مختلف فولیکولی تخمدان‌های فاقد جسم زرد (*CL⁻.S*، *CL⁻.M* و *CL⁻.B*) مشاهده نگردید. درصد بلاستوسیست‌های تولیدی از *CL⁻.M-oocytes* و *CL⁻.B-oocytes* بیشتر از آن مقادیر در *CL⁺.S-oocytes* و *CL⁺.M-oocytes* بود (P< 0.001). این درحالی بود که هیچ تفاوت معنی داری در میزان تولید بلاستوسیست بین تخمک‌های C-*oocytes* ، *CL-.S-oocytes* و *CL+.B-oocytes* وجود نداشت. همچنین در این مطالعه، اثر متقابل جسم زرد در اندازه فولیکولی میزان اکسپنشن و کلیواژ را متأثر نساخت.

جدول ۳ – شایستگی تکاملی تخمک‌های گاوی منشأ گرفته از اندازه‌های مختلف فولیکولی تخمدان‌های واجد یا فاقد جسم زرد (تعداد تکرار=۶)

گروه‌ها	صفات	تعداد تخمک	نرخ بلوغ تخمک	نرخ تسهیم	نرخ تولید بلاستوسیست به ازای تخمک	نرخ تولید بلاستوسیست به ازای کلیواژ
اثر جسم زرد (اثر اصلی)	C[۱]	۲۵۱	۸۹/۲ ± ۶/۱	۸۴/۳ ± ۳/۰	۳۵/۰ ± ۰/۸	۴۰/۰ ± ۰/۷
	CL⁻[۱]	۵۳۱	۸۹/۸± ۳/۱	۸۴/۲ ± ۴/۷	۴۰/۲ ± ۳/۶	۴۵/۷ ± ۴/۹
	CL⁺[۱]	۵۴۸	۸۵/۱ ± ۳/۲	۷۸/۳ ± ۲/۸	۳۱/۴ ± ۳/۴	۳۸/۶ ± ۴/۲
اثر اندازه فولیکول (اثر اصلی)	C	۲۵۱	۸۹/۲ ± ۶/۱ [a]	۸۴/۳ ± ۳/۰	۳۵/۰ ± ۰/۸	۴۰/۰ ± ۰/۷
	S[۲]	۴۳۴	۷۲/۱± ۳/۶[b]	۷۹/۱ ± ۲/۷	۳۰/۸ ± ۳/۸	۳۶/۲ ± ۴/۹
	M[۲]	۴۹۴	۸۱/۳ ± ۲/۴[a]	۸۴/۴± ۲/۳	۳۸/۳ ± ۳/۲	۴۱/۰ ± ۳/۹
	B[۲]	۱۵۰	۹۰/۰ ± ۳/۲[a]	۸۰/۵ ± ۶/۵	۴۱/۳ ± ۵/۴	۴۶/۸ ± ۷/۶
اثر متقابل جسم زرد و اندازه فولیکولی	C	۲۵۱	۸۹/۲ ± ۶/۱	۸۴/۳ ± ۳/۰	۳۵/۰± ۰/۸[b]	۴۰/۰± ۰/۷[ab]
	CL⁻.S[۳]	۲۱۷	۸۴/۸ ± ۵/۱	۸۱/۹ ± ۴/۹	۳۶/۹ ± ۴/۰[ab]	۳۹/۹ ± ۵/۴[ab]
	CL⁻.M[۳]	۲۳۶	۸۸/۰ ± ۲/۱	۸۶/۵± ۲/۶	۳۸/۷ ± ۵/۳[a]	۴۳/۶ ± ۶/۴[a]
	CL⁻.B[۳]	۷۸	۹۰/۴ ± ۴/۸	۸۴/۱ ± ۱۲/۵	۴۰/۴ ± ۸/۹[a]	۴۶/۱ ± ۱۳/۱[a]
	CL⁺.S[۴]	۲۱۸	۸۲/۴ ± ۲/۸	۷۶/۱ ± ۲/۴	۳۰/۸ ± ۶/۷[c]	۳۶/۸ ± ۸/۶[b]
	CL⁺.M[۴]	۲۵۸	۸۳/۲ ± ۳/۵	۸۲/۰± ۳/۱	۳۳/۶ ± ۳/۷[bc]	۳۸/۸ ± ۴/۷[b]
	CL⁺.B[۴]	۷۲	۸۶/۱ ± ۶/۹	۷۶/۶ ± ۵/۵	۳۵/۱ ± ۶/۷[b]	۴۰/۷ ± ۸/۹[ab]

[abc] حروف متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار است (P < 0.001).

[۱] C ، CL^+ و CL^-: به ترتیب تخمدان‌های گروه کنترل، واجد یا فاقد جسم زرد.

[۲] S ، M و B: به ترتیب تخمک‌های منشأ گرفته از فولیکول‌های کوچک، متوسط و بزرگ.

[۳] $CL^-.S$ ، $CL^-.M$ و $CL^-.B$: به‌ترتیب تخمک‌های منشأ گرفته از فولیکول‌های کوچک، متوسط و بزرگ تخمدان‌های فاقد جسم زرد.

[۴] $CL^+.S$ ، $CL^+.M$ و $CL^+.B$: به‌ترتیب تخمک‌های منشأ گرفته از فولیکول‌های کوچک، متوسط و بزرگ تخمدان‌های واجد جسم زرد.

بحث

در بسیاری از گونه‌های پستانداران (موش‌خرما؛ فریتزچ و همکاران ۲۰۰۰، انسان؛ فوکودا و همکاران ۲۰۰۰ و گوسفند؛ شبانکاره و همکاران ۲۰۰۹) عملکرد نابرابر دو سمت سیستم تولیدمثلی گزارش شده است و از وجود تناقضاتی در مورد اثرات مثبت و منفی جسم زرد بر

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت سیستم تولید مثلی شواهدی به‌دست داده است. بر اساس یافته‌های ما ، این بررسی اولین مطالعه در نوع خود بوده که اقدام به ارزیابی اثرات این دو عامل (سمت تخمدان و حضور جسم زرد) با یکدیگر بر شایستگی تکاملی تخمک‌های گاوی نموده است.

در آزمایش اول، حضور یا عدم حضور جسم زرد (CL^- در برابر CL^+) موجب بروز تفاوت‌هایی معنی‌دار در میزان تسهیم (کلیواژ) و تولید بلاستوسیست گردید به‌طوری‌که درصد کلیواژ و تولید بلاستوسیست از CL^+-*oocytes* کمتر از آن مقادیر در گروه CL^--*oocytes* بود (جدول۲). این نتایج در راستای مطالعات صورت گرفته در انسان بوده که گزارش نموده‌اند که فولیکول‌های غالبی که در سمت مقابل تخمک‌گذاری قبلی وجود دارند (CL^--*ovary*) از سلامت بیشتری نسبت به فولیکول‌هایی برخوردار بوده که در همان سمت تخمک‌گذاری قبلی (CL^+-*ovary*) واقع شده‌اند و موجب نتایج بهتری پس از طی مراحل *IVF* شده‌اند (فوکودا و همکاران ۱۹۹٦). علاوه‌براین، نتایج مطالعات گذشته در نشخوارکنندگان مبین آن بوده که تعداد متوسط تخمک‌های با کیفیت از تخمدان‌های فاقد جسم زرد در مقایسه با تخمدان‌های واجد جسم زرد، بیشتر بوده و از آنها می‌توان به‌طور مؤثری جهت اهداف *IVF* بهره جست (کومار و همکاران ۲۰۰٤ و جمیل و همکاران ۲۰۰۸). در مطالعه‌ای دیگر بر روی گاوها، نشان داده شد که اگرچه نرخ کلیواژ تخمک‌های استحصالی از تخمدان‌های فاقد جسم زرد نسبت به تخمدان‌های واجد جسم زرد بالاتر بوده است، اما میزان تولید بلاستوسیست روندی معکوس را نشان داده است (بوئدینو و همکاران ۱۹۹۵). نتایج مطالعه حاضر با برخی مطالعات گذشته (بوئدینو و همکاران ۱۹۹۵ و پیرستانی و همکاران ۲۰۱۰) در گاوها که میزان تولید بلاستوسیست بیشتری را از تخمک‌های استحصالی از تخمدان‌های موجود در فاز لوتئال یا تخمدان‌های واجد جسم زرد در مقایسه با تخمدان‌های موجود در فاز فولیکولی یا تخمدان‌های فاقد جسم زرد، گزارش نموده‌اند، در تناقض می‌باشد که احتمالاً به‌علت غلظت بالاتر پروژسترون در گردش خون و تجدید مداوم رشد فولیکولی بوده است (تیلور و راجاماهندران ۱۹۹٤).

نتایج مطالعه حاضر در رابطه با انتخاب تخمک‌ها با استفاده از آزمون *BCB* از وجود عدم یکنواختی در شایستگی تکاملی تخمک‌های گروه $R.CL^{\pm}$-*oocytes* شواهدی به‌دست داد، به‌طوری‌که درصد تخمک‌هایی که به عنوان BCB^+ (کاملاً رشد یافته و دارای شایستگی تکاملی بالاتر) شناخته شدند، از تخمک‌های BCB^- بیشتر بود (به ترتیب $R.CL^{\pm}.BCB^+$-*oocytes* و $R.CL^{\pm}.BCB^-$-*oocytes*). همانطور که قبلاً ذکر شد؛ بوئدینو و همکارانش (۱۹۹۵) نیز از وجود برخی تناقضات در رابطه با آثار مثبت و منفی جسم زرد بر کیفیت تخمک‌ها شواهدی را به‌دست داده‌اند. اینچنین به‌نظر می‌رسد که عوامل دیگری نیز همچون مراحل مختلف رشد و پس‌روی و اندازه‌های مختلف فولیکولی که با رنگ‌آمیزی *BCB* قابل تشخیص می‌باشند، در عدم یکنواختی در شایستگی تکاملی تخمک‌ها تأثیرگذار می‌باشند (کرمی–شبانکاره و میرشمسی ۲۰۱۲ و میرشمسی و شبانکاره ۲۰۱۲ و میرشمسی و همکاران ۲۰۱۳). برای پاسخ به این سوال در رابطه با منبع و عامل عدم یکنواختی شایستگی تکاملی تخمک‌ها که در آزمایش اول مشاهده شد، و همچنین مطالعه دقیق‌تر اثرات جسم زرد، آزمایش دوم طراحی و اجرا گردید. نتایج آزمایش دوم نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان تولید بلاستوسیست بین تخمک‌های منشأ گرفته از اندازه‌های مختلف فولیکولی تخمدان‌های واجد جسم زرد (CL^+.*S*-*oocytes* و CL^+.*B*-*oocytes*) وجود دارد و بنابراین مشاهدات ثبت شده در آزمایش اول (جدول ۱) را که از وجود عدم یکنواختی در شایستگی تکاملی تخمک‌های $R.CL^{\pm}$-*oocytes* شواهدی به‌دست داده بود، تأیید کرد. علاوه‌براین، *S*-*oocytes* و CL^+.*S*-*oocytes* به‌ترتیب دارای کمترین میزان اکسپنشن و تولید بلاستوسیست میان گروه‌ها بودند. اگرچه درصد تولید بلاستوسیست از CL^-

www.SID.ir

Archive of SID

M-oocytes. و *CL^-.B-oocytes* بیشتر از آن مقادیر در *CL^+.S-oocytes* و *CL^+.M-oocytes* بود، اما هیچ تفاوت معنی‌داری در رابطه با تولید بلاستوسیست بین *C-oocytes* ، *CL^-.S-oocytes* و *CL^+.B-oocytes* وجود نداشت. این نتایج مشاهدات آزمایش اول را که در آن درصد کلیواژ و تولید بلاستوسیست از *CL^+-oocytes* کمتر از آن مقادیر در *CL^--oocytes* بود، تأیید کرد. اگرچه همچنین نشان داده شد که در شایستگی تکاملی تخمک‌های منشأ گرفته از تخمدان‌های واجد جسم زرد (*$CL^\pm$-oocytes*) عدم یکنواختی وجود داشته، به‌طوری‌که تخمک‌های منشأ گرفته از فولیکول‌های بزرگ تخمدان‌های واجد جسم زرد (*CL^+.B-oocytes*) دارای درصد تولید بلاستوسیست به ازای تخمک بالاتری نسبت به فولیکول‌های کوچک (*CL^+.S-oocytes*) بودند . این نتایج در توافق با مطالعات گذشته بوده که گزارش نموده‌اند؛ اندازه (بکر–وان وودنبرگ و همکاران ۲۰۰۶) و کیفیت فولیکول مبدأ (بلوندین و سیرارد ۱۹۹۴) ظرفیت تکاملی تخمک‌های گاوی را متأثر می‌سازند. همچنین در گاو (لکواره و همکاران ۲۰۰۵) ، بز (کروزت و همکاران ۱۹۹۵) و گوسفند (کوگنی و همکاران ۱۹۹۸) تخمک‌های منشأ گرفته از فولیکول‌های بزرگ در مقایسه با فولیکول‌های کوچک در شرایط برون‌تنی از رشد و نمو رویانی بالاتری برخوردار بوده‌اند.

بر روی تخمدان‌های گاوی گیرنده‌هایی برای دو هورمون استروژن و پروژسترون یافت شده‌اند (بریشا و همکاران ۲۰۰۲). در واقع عدم وجود اثرات غالبیت فولیکولی در خلال فاز جسم زرد فعال شواهدی مبنی بر حمایت از فرضیه آدام (۱۹۹۹) در رابطه با وجود اثرات ممانعتی پروژسترون مترشحه از جسم زرد بر طول عمر فولیکول‌های غالب در گوسفندان، ارائه می‌دهد. مکانیسم سیستمیکی که پروژسترون به‌واسطه آن از رشد فولیکولی ممانعت می‌نماید از طریق سرکوب ضربان‌های ترشحی هورمون *LH* بوده که برای ادامه رشد فولیکول‌های بزرگ ضروری می‌باشد (فلین و همکاران ۱۹۹۹). پروژسترون همچنین ممکن است هم در تخمدان‌های واجد جسم زرد و هم فاقد جسم زرد اثراتی موضعی را مستقل از تغییرات ترشح گونادوتروپین‌ها اعمال نماید (بارتلوسکی و همکاران ۲۰۰۱). کانتررراس–سولیس و همکارانش (۲۰۰۸) نه‌تنها از وجود یک اثر سیستمیک از جانب جسم زرد بر دینامیک فولیکولی گوسفندان شواهدی بدست دادند، اثراتی داخل تخمدانی را نیز ثبت کردند که موجب یک کاهش معنی‌دار در رشد فولیکول‌هایی می‌گردد که بر روی تخمدان واجد جسم زرد وجود دارند (بارتلوسکی و همکاران ۲۰۰۱). همچنین نتایج این مطالعات از وجود یک عامل ممانعتی که از جسم زرد آزاد شده شواهدی به‌دست داده‌اند (کانتررراس–سولیس و همکارانش ۲۰۰۸). اینهیبین که از جسم زرد بزها و گاوها ترشح (سانقا و همکاران ۲۰۰۲) و به‌داخل ورید تخمدانی میش تخلیه می‌شود (تسونیس و همکاران ۱۹۸۸) قادر است تا رشد فولیکولی را متأثر سازد (کمپبل و همکاران ۱۹۹۱). در مطالعه حاضر به‌نظر می‌رسد که تمامی *CL^+-oocytes* توسط اثرات منفی جسم زرد متأثر نشده‌اند و شاهد وجود یک عدم یکنواختی در شایستگی تکاملی تخمک‌های *CL^+-oocytes* بوده که خود ناشی از اثر اندازه فولیکولی می‌باشد. این‌طور به‌نظر می‌رسد که *CL^+.B-oocytes* به اندازه‌ای که *CL^+.S-oocytes* از اثرات منفی جسم زرد متأثر شده‌اند، تحت تأثیر قرار نگرفته‌اند. یک دلیل احتمالی برای این رخداد آن است که همچنانکه قطر فولیکول به حدود ۲ میلی‌متر (فولیکول کوچک) افزایش می‌یابد و قطر تخمک از ۱۱۰ میکرون به ۱۲۰ میکرون می‌رسد، شایستگی تکاملی کسب شده و اکثر تخمک‌ها قادر به لقاح و رشد و نمو رویانی می‌گردند (هیتل و همکاران ۱۹۹۷). بنابراین می‌توان این چنین فرض کرد که جسم زرد غالباً اثرات منفی خود را بر روی رشد فولیکول‌های درحال رشد کوچک اعمال می‌دارد و نه فولیکول‌های بزرگ رشد یافته. از سویی دیگر، شبانکاره و همکاران (۲۰۱۳) بیان نموده‌اند که مایعات فولیکولی استحصال شده از

www.SID.ir

Archive of SID

فولیکولهای موجود بر روی تخمدان‌های گاوی فاقد جسم زرد جهت استفاده در بلوغ تخمک‌ها مناسب‌تر از این مایعات در تخمدان‌های واجد جسم زرد می‌باشد. این ترکیب بیوشیمیایی متفاوت مایعات فولیکولی ممکن است دلیلی بر تفاوت در درصد کلیواژ و میزان تولید بلاستوسیست از تخمک‌های *CL^--oocytes* و *CL^+-oocytes* در مطالعه حاضر باشد. علاوه‌براین شبانکاره و همکارانش (۲۰۱۳) گزارش نمودند که مقدار گلوکز موجود در مایع فولیکولی استحصال شده از فولیکول-های بزرگ به‌طور معنی‌داری در مقایسه با فولیکول‌های متوسط و کوچک در تخمدان‌های فاقد جسم زرد، بیشتر است. بنابراین این‌طور به‌نظر می‌رسد که برهم‌کنش حضور یا عدم حضور جسم زرد با اندازه فولیکولی آنچنان‌که در این مطالعه مشاهده شد، بر شایستگی تکاملی و کیفیت تخمک‌ها مؤثر است.

نتایج حاصل از این مطالعه برون‌تنی به‌طور واضح نشان داد که جسم زرد تأثیری منفی بر شایستگی تکاملی تخمک‌های گاوی اعمال می‌دارد. اگرچه تمامی *CL^+-oocytes* توسط اثرات منفی جسم زرد متأثر نشده‌اند و شاهد وجود یک عدم یکنواختی در شایستگی تکاملی تخمک‌های *CL^+-oocytes* بوده که خود ناشی از اثر اندازه فولیکولی می‌باشد. بطور کلی هدف اصلی در این مطالعه افزایش راندمان تولید رویان در شرایط برون‌تنی با اعمال انتخابی مؤثر در زمان استحصال تخمدان‌ها و تخمک‌ها بوده است. به‌عبارتی دیگر، جمع‌آوری تخمدان‌ها و تخمک‌ها بر اساس حضور یا عدم حضور جسم زرد و اندازه‌های مختلف فولیکولی می‌تواند در تولید تجاری رویان‌های گاو در شرایط برون‌تنی مفید واقع گردد.

منابع مورد استفاده

Acosta TJ and Miyamoto A, 2004. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. Anim Reprod Sci 82:127-40.

Adams G, 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. J Reprod Fertil Supplement 54:17.

Bartlewski PM, Beard AP and Rawlings NC, 2001. Ultrasonographic study of the effects of the corpus luteum on antral follicular development in unilaterally ovulating western white-faced ewes. Anim Reprod Sci 65:231-44.

Beker-van Woudenberg AR, Zeinstra EC, Roelen BA, Colenbrander B and Bevers MM, 2006. Developmental competence of bovine oocytes after specific inhibition of MPF kinase activity: effect of estradiol supplementation and follicle size. Anim Reprod Sci 92:231-40.

Berisha B, Pfaffl MW and Schams D, 2002. Expression of estrogen and progesterone receptors in the bovine ovary during estrous cycle and pregnancy. Endocrine 17:207-14.

Blondin P and Sirard MA, 1994. The influence of oocyte and follicular morphology on developmental competence in superovulated heifers. Theriogenology 41:164.

Boediono A, Rajamahendran R, Saha S, Sumantri C and Suzuki T, 1995. Effect of the presence of a CL in the ovary on oocyte number, cleavage rate and blastocyst production in vitro in cattle. 1995. Theriogenology 43:169-169.

Campbell B, Picton H, Mann G, McNeilly A and Baird D, 1991. Effect of steroid-and inhibin-free ovine follicular fluid on ovarian follicles and ovarian hormone secretion. J Reprod Fertil 93:81-96.

Casida L, Heizer E and Barrett G, 1948. Most calves develop in right horn. Annual report of the director, Wisconsin Agr Exp Sta Ann, Rpt, Bul 480:59.

Clark C, 1936. Does the right ovary of the bovine function more frequently than the left. J Am Vet Med Assoc 88:62-5.

Cognie Y, Benoit F, Poulin N, Khatir H and Driancourt M, 1998. Effect of follicle size and of the FecB Booroola gene on oocyte function in sheep. J Reprod Fertil 112:379-86.

www.SID.ir

Archive of SID

Contreras-Solis I, Diaz T, Lopez G, Caigua A, Lopez-Sebastian A and Gonzalez-Bulnes A, 2008. Systemic and intraovarian effects of corpus luteum on follicular dynamics during estrous cycle in hair breed sheep. Anim Reprod Sci 104:47-55.

Crozet N, Ahmed-Ali M and Dubos M, 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. J Reprod Fertil 103:293-8.

Flynn J, Duffy P, Boland M and Evans A, 1999. Effect of synchronisation of oestrus using a progestagen sponge on ovarian follicular dynamics and luteinising hormone pulse frequency in sheep. J Reprod Fertil Abstr Ser p. 39.

Fritzsche P, Riek M and Gattermann R, 2000. Effects of social stress on behavior and corpus luteum in female golden hamsters (Mesocricetus auratus). Physiol Behav 68:625-30.

Fukuda M, Fukuda K, Andersen CY and Byskov AG, 1996. Ovary and Ovulation: Contralateral selection of dominant follicle favours pre-embryo development. Hum Reprod 11:1958-62.

Fukuda M, Fukuda K, Andersen CY and Byskov AG, 2006. Ovulation jumping from the left to the right ovary in two successive cycles may increase the chances of pregnancy during intrauterine insemination and/or in vitro fertilization natural cycles. Fertil Steril 85:514-7.

Fukuda M, Fukuda K, Andersen CY and Byskov AG, 2000. Right-sided ovulation favours pregnancy more than left-sided ovulation. Hum Reprod 15:1921-6.

Gereš D, Ževrnja B, Žubčić D, Zobel R, Vulić B and Staklarević N, 2011. Asymmetrical functional activities of ovaries and tubular part of reproductive organs of dairy cows. Veterinarski arhiv 81:187-98.

Ginther O and Hoffman M, 2014. Intraovarian effect of dominant follicle and corpus luteum on number of follicles during a follicular wave in heifers. Theriogenology 82:169-75.

Hylan D, Giraldo AM, Carter JA, Gentry GT, Bondioli KR and Godke RA, 2009. Sex ratio of bovine embryos and calves originating from the left and right ovaries. Biol Reprod 81:933-8.

Hyttel P, Fair T, Callesen H and Greve T, 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology 47:23-32.

Jamil H, Samad HA, Qureshi ZI, Rehman NU and Lodhi LA, 2008. Harvesting and evaluation of riverine buffalo follicular oocytes. Turk. J. Vet. Anim. Sci 32: 25-30.

Karami-Shabankareh H and Mirshamsi SM, 2012. Selection of developmentally competent sheep oocytes using the brilliant cresyl blue test and the relationship to follicle size and oocyte diameter. Small Ruminant Res 105:244-9.

Kumar N, Paramasivan S, Sood P and Singh M, 2004. Micrometry of different category oocytes recovered from goat ovaries. Indian J Anim Sci 74:259–260.

Lawitts JA and Biggers JD, 1993. Culture of preimplantation embryos. Methods Enzymol 225:153-64.

Lequarre AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I and Dalbiès-Tran R, 2005. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. Theriogenology 63:841-59.

Lonergan P, Fair T, Corcoran D and Evans A, 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. Theriogenology 65:137-52.

Mirshamsi S, KaramiShabankareh H, Ahmadi-Hamedani M, Soltani L, Hajarian H and Abdolmohammadi A, 2013. Combination of oocyte and zygote selection bybrilliant cresyl blue (BCB) test enhanced prediction of developmental potential to the blastocyst in cattle. Anim Reprod Sci 136: 245–251.

Mirshamsi S and Shabankareh HK, 2012. Selection of developmentally competent sheep zygotes using the Brilliant Cresyl Blue (BCB) test, after IVF. Small Ruminant Res 105:250-4.

Motlik J and Fulka J, 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. Theriogenology 25:87-96.

Opiela J, Kątska-Książkiewicz L, Lipiński D, Słomski R, Bzowska M and Ryńska B, 2008. Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. Theriogenology 69:546-55.

www.SID.ir

Archive of SID

Parrish J, Susko-Parrish J, Leibfried-Rutledge M, Critser E, Eyestone W and First N, 1986. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology 25:591-600.

Pirestrani A, Morteza S, Hajian M, Forouzanfar M, Moulavi F and Avedi P, 2010. Effect of ovarian cyclic status on in vitro embryo production in cattle. Int J Fertil Steril 4:172-5.

Rodrıguez-González E, Lopez-Bejar M, Velilla E and Paramio M, 2002. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. Theriogenology 57:1397-409.

Sangha G, Sharma R and Guraya S, 2002. Biology of corpus luteum in small ruminants. Small Ruminant Research 43:53-64.

Shabankareh HK, Habibizad J and Torki M, 2009. Corpus luteum function following single and double ovulation during estrous cycle in Sanjabi ewes. Anim Reprod Sci 114:362-9.

Shabankareh HK, Kor NM and Hajarian H, 2013. The influence of the corpus luteum on metabolites composition of follicular fluid from different sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. Anim Reprod Sci 140:109-14.

Taylor C and Rajamahendran R, 1994. Effect of mid-luteal phase progesterone levels on the first wave dominant follicle in cattle. Can J Anim Sci 74:281-5.

Tsonis C, Baird D, Campbell B, Leask R and Scaramuzzi R, 1988. The sheep corpus luteum secretes inhibin. J Endocrinol 116:R3-R5.

Yoon KW, Shin TY, Park JI, Roh S, Lim JM and Lee BC, 2001. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. Reprod Fertil Dev 12:133-9.

www.SID.ir

Archive of SID

In vitro developmental competence of bovine oocytes in relation to side of ovaries, presence of corpus luteum and follicle size

H Karami Shabankareh[1], H Hajarian[2], MH Shahsavari[3*] and S Foroutanifar[2]

Received: November 19, 2014 Accepted: August 19, 2015

[1]Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Razi, Kermanshah, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Razi, Kermanshah, Iran
[3] PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: email: shahsavari_mohammadhamed@yahoo.com

Abstract

BACKGROUND: There are many discrepancies about positive or negative effects of corpus luteum (CL) and unequal activity of sides of the reproductive system. **OBJECTIVES:** the initial aim of this study was to assess the developmental competence of bovine oocytes originating from right or left ovaries bearing a CL (R.CL$^+$-oocytes or L.CL$^+$-oocytes) or not bearing a CL (R.CL$^-$-oocytes or L.CL$^-$-oocytes) using the brilliant cresyl blue (BCB) test as a selection criterion (experiment 1). **METHODS:** In experiment 1, collected oocytes exposed to BCB and separated as growing (BCB$^-$) and grown oocytes (BCB$^+$, more competent). Then, all of the oocytes were subjected to the *in vitro* embryo production (IVEP) processes. **RESULTS:** Results of this experiment showed no differences in the embryonic development due to effects of side of ovaries (i.e., right vs. left) or BCB selection (i.e., BCB$^+$ vs. BCB$^-$). However, in case of R.CL$^+$-oocytes, there was a heterogeneity in the developmental competence of oocytes and the percentage of oocytes classified as BCB$^+$ was greater ($P< 0. 05$) than that of BCB$^-$ (57.6% versus 42.4%, respectively). Furthermore, the percentages of cleavage and blastocyst obtained of CL$^+$-oocytes were lower than those of CL$^-$-oocytes ($P< 0.001$). The second objective was to evaluate heterogeneity in the developmental potential of oocytes in relation to presence or absence of CL and follicle size. After ovarian classification based on presence or absence of CL, sample follicles were placed in three groups according to their diameter, i.e., small, medium and large or big and collected oocytes in each group subjected to the IVEP processes. Results showed that CL$^+$.B-oocytes were not influenced by negative effects of CL as much as CL$^+$.S-oocytes did. **CONCLUSIONS:** Therefore, it can be concluded that using oocytes originating from large follicles of ovaries not bearing a CL may decrease problems associated with IVEP of bovine embryos.

Keywords: Corpus luteum, Brilliant cresyl blue, Developmental potential, *In vitro* embryo production, Follicle size.

www.SID.ir