تولیدات دامی
دوره ۲۱ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۸
صفحه‌های ۴۰۰-۳۹۳

اثر مکمل‌سازی محیط کشت با فولیک‌اسید بر بلوغ برون‌تنی تخمک‌های گاو

حجت باغ‌شاهی[۱]، سعید زین‌الدینی[۲*]، احمد زارع شحنه[۳]، سعید اسماعیل خانیان[۴]
۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۲. دانشیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۳. استاد، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۴. دانشیار، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش مقاله:۱۳۹۸/۰۳/۰۵

چکیده
اثر مکمل‌کردن محیط کشت با غلظت‌های مختلف فولیک‌اسید (ویتامین B_9) بر بلوغ برون‌تنی تخمک‌های گاو در قالب دو آزمایش بررسی شد. بهینه‌سازی محیط کشت بلوغ تخمک گاوی از راهبردهایی است که با اثر بر کیفیت بلوغ و باروری، در نهایت منجر به افزایش کیفیت رویان تولیدی گاو می‌شود. در آزمایش اول برای تعیین غلظت فولیک‌اسید و هموسیستئین، فولیکول‌ها به دو دسته کم‌تر و بیش‌تر از هشت میلی‌متر تقسیم‌بندی شدند. سپس غلظت فولیک‌اسید و هموسیستئین در هر دو گروه فولیکولی و هم‌چنین در محیط کشت تجاری اندازه‌گیری شد. در آزمایش دوم، بلافاصله پس از کشتار، تخمدان‌ها به آزمایشگاه منتقل و با آسپیره‌کردن کمپلکس‌های تخمک- کلوموس از فولیکول‌های دو تا هشت میلی‌متری استحصال شد. تخمک‌ها به‌طور تصادفی به چهار گروه تقسیم، و بر اساس نتایج آزمایش نخست، غلظت‌های مختلف فولیک‌اسید (صفر، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) به محیط کشت بلوغ اضافه شد. پس از گرم خانه‌گذاری تخمک‌ها، درصد تخمک‌های بالغ‌شده با استفاده از رنگ‌آمیزی هوخست تعیین شد. غلظت فولیک‌اسید و هموسیستئین در فولیکول‌های با قطر کم‌تر از هشت میلی‌متر، بیش‌تر از فولیکول‌های بزرگ‌تر از هشت میلی‌متر و هم‌چنین بیش‌تر از غلظت آن‌ها در محیط بلوغ بود. مکمل‌کردن محیط بلوغ با ۱۰۰ نانوگرم فولیک‌اسید/ میلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد، موجب افزایش درصد تخمک‌های مرحله متافاز دو شد ($P< ۰/۰۵$). نتایج نشان داد که افزودن فولیک‌اسید با توجه به غلظت فولیک‌اسید و هموسیستئین محیط کشت، بلوغ برون‌تنی تخمک‌های گاوی را بهبود می بخشد.

کلیدواژه‌ها: فولیک‌اسید، برون‌تنی، بلوغ تخمک، گاو، هموسیستئین.

Effect of folic acid addition to the medium on *in vitro* maturation of bovine oocytes

Hojjat Baghshahi[1], Saeed Zeinoaldini[2*], Ahmad Zare Shahneh[3], Saeid Esmaeilkhanian[4]
1. Ph.D. Candidate, Department of Animal Sciences, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2. Associate Professor, Department of Animal Sciences, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Professor, Department of Animal Sciences, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
4. Associate Professor, Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
Received: February 17, 2019 Accepted: May 26, 2019

Abstract
The effect of addition of different concentrations of folic acid (vitamin B_9) to the culture medium on *in vitro* maturation of bovine oocytes was investigated in two experiments. Optimization of bovine oocyte maturation medium is one of the strategies affecting quality of maturity and fertility, ultimately resulting in increasing the quality of produced bovine embryos. In the 1st experiment, to specify the concentrations of folic acid and homocysteine, ovarian follicles were divided into two categories including follicles with more or less than eight mm of diameter. Then, the concentrations were measured in both follicle groups as well as a commercial culture medium. In the second experiment, bovine ovaries were transferred to the laboratory immediately after slaughter and the cumulus-oocyte complexes were collected by aspiration from 2-8 mm diameter follicles. Oocytes were randomly divided into four groups and different levels of folic acid (0, 10, 100 and 1000 ng/ml) were added to maturation medium based on the results of the first experiment. Following incubation of oocytes, the percentage of mature oocytes was determined by Hoechst staining. The concentrations of folic acid and homocysteine in follicles with diameter of less than eight mm was higher than those with diameter of greater than eight mm, as well as the culture medium Supplementation of maturation medium with 100 ng/ml folic acid increased the percentage of metaphase-II oocytes compared to the control ($P <0.05$). Considering the concentrations of folic acid and homocysteine in the medium, results showed that the addition of folic acid improves in vitro maturation of bovine oocytes.

Keywords: Cow, Folic acid, Homocysteine, *in vitro*, Oocyte maturation

* نویسنده مسئول
Email: zeinoaldini@ut.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

تولید برون‌تنی رویان یکی از روش‌هایی است که به‌منظور تولید حیوانات با شایستگی ژنتیکی بالا مورد استفاده قرار می‌گیرد. اگرچه پژوهش‌های فراوانی با هدف بهبود شایستگی تکاملی تخمک و رویان‌های گاو انجام شده است [۲ و ۴]، هنوز کیفیت رویان‌های تولیدشده در شرایط برون‌تنی، نسبت به روش درون‌تنی پایین است [۱۸]. بسیاری از عوامل تنش‌زا، مانند ترکیبات محیط، شرایط کشت و یا عوامل درون‌تنی مانند کیفیت تخمک مورد استفاده بر شایستگی و کیفیت رویان‌های تولیدی اثرگذار است [۳]. لذا، همچنان تحقیقات برای دست‌یابی به شرایط بهینه تکامل تخمک‌های گاوی ضروری به‌نظر می‌رسد. بهینه‌سازی محیط کشت بلوغ تخمک از راهبردهایی است که با اثر بر کیفیت بلوغ و باروری، در نهایت بر کیفیت رویان تولیدی اثر می‌گذارد.

مزایای افزودن ویتامین‌ها به محیط کشت بلوغ تخمک و سامانه‌های کشت رویان پیش از لانه‌گزینی و تکامل رویانی را گزارش شده است [۵، ۱۵]. برای نمونه، افزودن ترکیبی از چند ویتامین محلول در آب به محیط بلوغ تخمک موجب بهبود تکامل رویان‌های بز شد [۵]. هم‌چنین، افزودن اسیدهای آمینه و گروهی از ویتامین‌های محلول در آب و فاکتورهای رشد، تکامل رویان‌های هامستر را از مرحله‌ی مرولا به بلاستوسیست‌های هچ‌شده بهبود بخشید [۱۵]. در این میان، فولیک‌اسید به‌دلیل نقشی که در تولید انرژی و هم‌چنین ساخت DNA، RNA و پروتئین‌ها دارد، کاندیدای مناسبی برای استفاده در محیط‌های بلوغ و کشت رویان است [۱۱]. گزارش شده است که بخش زیادی از نیاز تخمک به فولیک‌اسید برای مصرف در فرآیندهای انرژی‌زا و ساخت اسیدهای نوکلئیک در دوره پیش از لقاح می‌باشد [۱۹]. افزون بر این، فولیک‌اسید به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان، به‌طور مؤثری رادیکال‌های آزاد اکسیدکننده را خنثی و پاکسازی می‌کند و از این مسیر بر کیفیت تخمک و رویان تولیدی اثر می‌گذارد. با وجود این‌که فولیک‌اسید به‌عنوان یک ویتامین محلول در آب شناخته می‌شود، اما توانایی آن در کاهش پراکسیداسیون لیپیدها نیز به تأیید رسیده است [۱۴].

افزودن فولیک‌اسید به محیط رویان‌های تک سلولی منجر به کاهش سطوح گونه‌های فعال اکسیژن در بلاستوسیست‌های موش می‌شود [۱۷]. هم‌چنین، افزودن فولیک‌اسید به محیط کشت بلوغ تخمک موجب کاهش آپوپتوزیس سلول‌های کومولوس و افزایش غلظت گلوتاتیون پراکسیداز در خوک می‌شود و در نهایت موجب افزایش نرخ تشکیل بلاستوسیست و بهبود رشد و تکامل رویانی می‌گردد [۱۶]. این در حالی است که کمبود فولات منجر به افزایش شایان توجه آپوپتوزیس در سلول‌های تخمدان هامستر چینی و سلول‌های هپاتوم G2 کبدی، لنفوسیت‌های T، ترفوبلاست‌ها و نیز گلبول‌های قرمز انسان می‌شود [۸]. از طرفی، فعالیت چرخه هموسیستئین- متیونین که منجر به تولید مجدد اسید آمینه ضروری متیونین از هموسیستئین می‌شود، وابسته به حضور فولیک‌اسید به‌عنوان کوفاکتور دهندهٔ گروه متیل است؛ به‌طوری‌که غلظت متیونین و هموسیستئین ارتباط معکوسی با یکدیگر دارند و فولیک‌اسید می‌تواند این توازن را تعدیل سازد. نشان داده شده است که با افزایش غلظت فولیک‌اسید، از غلظت هموسیستئین کاسته‌شده و غلظت متیونین افزایش پیدا می‌کند [۲۴]. مکمل‌کردن رژیم غذایی زن‌های تحت درمان لقاح برون‌تنی با فولیک‌اسید، موجب تحریک چرخه هموسیستئین- متیونین و کاهش شایان‌توجه غلظت هموسیستئین مایع فولیکولی می‌شود که در نتیجه با افزایش تولید متیونین، کیفیت و بلوغ تخمک را بهبود می‌بخشد [۷]. هم‌چنین، مکمل‌کردن جیره با فولیک‌اسید موجب تعدیل غلظت فولات و کاهش

Archive of SID
www.SID.ir

هموسیستئین مایع فولیکولی و در نهایت افزایش زنده‌مانی رویان شد [۶].

اغلب محیط‌های کشت بر اساس نوع آن به‌دلیل متفاوت بودن منشأ سرم جنین گاوی و ویتامین‌های موجود در آن، غلظت‌های متفاوتی از فولیک‌اسید را دارند. اندازه‌گیری سطح فولیک‌اسید در تعیین سطح مورد نیاز برای غنی‌سازی محیط و بهبود شرایط کشت ضروری به‌نظر می‌رسد. با توجه به موارد بیان‌شده و با فرض این‌که احتمالاً میزان فولیک‌اسید موجود در فولیکول‌های با قطر مناسب برای بلوغ آزمایشگاهی (دو تا هشت میلی‌متری) در مقایسه با فولیکول‌های آماده تخمک‌ریزی متفاوت باشد، این مطالعه f به‌منظور اندازه‌گیری سطح فولیک‌اسید در فولیکول‌های تخمدانی و محیط کشت و هم‌چنین تعیین سطح بهینه فولیک‌اسید موردنیاز برای بهبود بلوغ برون‌تنی تخمک‌های نابالغ گاو انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد مورداستفاده در این پژوهش، از شرکت سیگما- آلدریچ تهیه شد. برای اندازه‌گیری غلظت فولیک‌اسید و هموسیستئین، مایع فولیکولی از ۱۵ عدد تخمدان کشتارگاهی گاو استفاده شد. تخمدان‌های استخراج‌شده بلافاصله پس از کشتار گاو با نرمال سالین ۰/۹ درصد شست‌وشو داده شدند و به‌وسیله فلاسک‌های حاوی نرمال سالین ۰/۹ درصد و آنتی‌بیوتیک (۱۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین و استرپتومایسین در هر میلی‌لیتر) در دمای ۳۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد، طی یک ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. فولیکول‌ها با استفاده از کولیس به دو گروه با قطر کوچک‌تر از هشت میلی‌متر (مناسب برای کشت بلوغ برون‌تنی) و بزرگ‌تر از هشت میلی‌متر (فولیکول دارای شرایط تخمک‌ریزی) تقسیم‌بندی شدند [۱]. مایع فولیکولی از ۴۵ فولیکول با قطر دو تا هشت و ۴۵ فولیکول با قطر بزرگ‌تر از هشت میلی‌متر استحصال شد. پس از مخلوط‌کردن مایع فولیکولی هر گروه، نمونه‌ها با سرعت ۲۰۰۰ دور به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و تا زمان اندازه‌گیری غلظت فولیک‌اسید و هموسیستئین در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت فولیک‌اسید و هموسیستئین علاوه بر مایع فولیکولی در محیط بلوغ نیز با روش کمی لومینسانس و با استفاده از اتوآنالیزر Cobas e411 اندازه‌گیری شد. با توجه به نسبت فولیک‌اسید موجود در مایع فولیکولی و محیط کشت، سطوح مختلف فولیک‌اسید به‌منظور افزودن به محیط کشت تعیین شد.

در آزمایش دوم، به‌منظور مطالعه اثر مکمل‌کردن سطوح مختلف فولیک‌اسید در محیط بلوغ برون‌تنی تخمک‌های گاو، پس از شست‌وشوی تخمدان‌های کشتارگاهی با نرمال سالین ۰/۹ درصد با شرایط شرح‌داده‌شده در بخش پیشین، تخمدان‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه پس از شست‌وشوی مجدد (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) کمپلکس‌های کومولوس- تخمک (COCs) همراه با مایع فولیکولی با استفاده از سوزن نمره ۱۸ متصل به پمپ خلأ از فولیکول‌های تخمدانی دو تا هشت میلی‌متری آسپیره شدند. سپس برای ته‌نشین‌شدن COCs، مخلوط استحصال‌شده به‌مدت پنج دقیقه درون بن‌ماری نگهداری شد. تنها تخمک‌های دارای چند لایه متراکم از سلول‌های کومولوس و دارای اووپلاسم یکنواخت در فرآیند بلوغ مورد استفاده قرار گرفتند. برای حذف سلول‌های باقی‌مانده، COCs سه بار با محیط شست‌وشوی تخمک (OWM) شست‌وشو داده شدند. سپس تخمک‌های موردنظر به پتری‌دیش‌های حاوی ریزقطره‌هایی با حجم ۵۰ میکرولیتر از محیط بلوغ مکمل‌شده با سطوح ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و یا صفر (شاهد) نانوگرمبر میلی‌لیتر فولیک‌اسید (شماره کاتالوگ F7876) انتقال و توسط روغن معدنی پوشانده شدند. تخمک‌های هر گروه ابتدا در

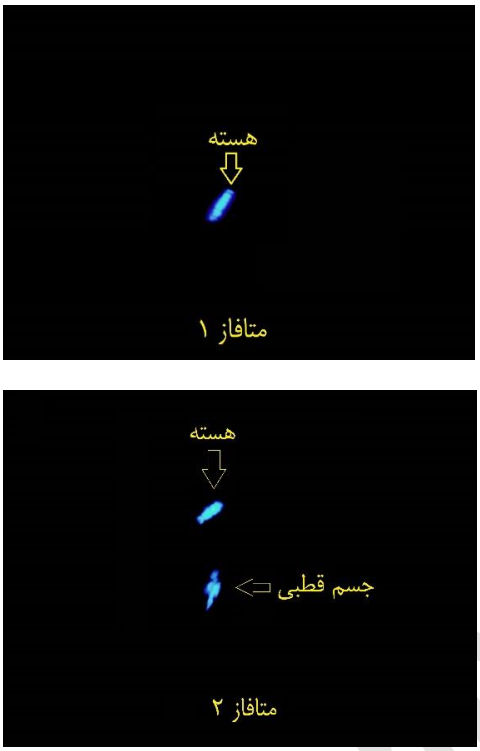
Archive of SID
www.SID.ir

قطره‌های محیط بلوغ گروه مربوطه شست‌وشو داده شدند و سپس در گروه‌هایی هشت تا ۱۰ تایی به‌مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری (CO_2= پنج درصد، رطوبت نسبی= ۹۰ درصد، دما= ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد) شدند.

محیط مورد استفاده برای شست‌وشوی تخمک‌ها بر پایه محیط کشت بافت-۱۹۹ (Tissue Culture Medium 199) غنی‌سازی‌شده با $NaHCO_3$ (۴/۱۶ میلی‌مولار)، HEPES (۹/۹۸ میلی‌مولار)، آلانیل-گلوتامین (یک میلی‌مولار)، سرم جنین گاوی (دو درصد)، هپارین (دو واحد در میلی‌لیتر)، پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد/ میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۰/۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) بود. هم‌چنین محیط کشت مورد استفاده برای بلوغ تخمک‌ها بر پایه محیط کشت TCM-199 غنی‌سازی‌شده با سرم جنین گاوی (۱۰ درصد)، استرادیول-۱۷ بتا (دو میکروگرم در میلی‌لیتر)، هورمون محرک فولیکول (FSH؛ ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، سدیم پیروات (۲۲ میکروگرم در میلی‌لیتر)، جنتامایسین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، آلانیل- گلوتامین (یک میلی‌مولار) بود.

برای ارزیابی وضعیت بلوغ هسته‌ای و وجود جسم قطبی، تعداد ۶۰ تخمک از هر گروه آزمایشی پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری، با استفاده از آنزیم هیالورونیداز ۰/۱ درصد (۱۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر) از سلول‌های کومولوس جدا و سپس با پارافرمالدئید چهار درصد به‌مدت ۳۰ دقیقه تثبیت شدند. هسته تخمک‌های تثبیت‌شده با قراردادن در رنگ هوخست (پنج میکروگرم/ میلی‌لیتر) به‌مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند و پس از شست‌وشو، با قرار دادن بر روی لام و زیر میکروسکوپ فلورسنت، وضعیت بلوغ هسته‌ای تخمک‌های هر گروه مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۱).

تخمک‌هایی که در مرحله تکوینی ژرمینال وزیکول، شکست ژرمینال وزیکول (GVBD) یا متافاز یک قرار داشتند، به‌عنوان تخمک‌های نابالغ متافاز یک و در صورت مشاهده جسم قطبی اولیه و کروموزوم‌های موجود در هسته، به‌عنوان تخمک‌های بالغ‌شده مرحله متافاز دو در نظر گرفته شدند (شکل ۱). درصد بلوغ با تقسیم تخمک‌های بالغ به کل تخمک‌های کشت داده شده محاسبه شد.



شکل ۱. وضعیت بلوغ هسته‌ای تخمک‌های گاوی بالغ‌شده در محیط بلوغ مکمل شده با سطوح صفر، ۱۰، ۱۰۰ و یا ۱۰۰۰ نانوگرم/ میلی‌لیتر فولیک‌اسید
(متافاز ۱= نابالغ؛ متافاز ۲ = بالغ شده)

داده‌های مربوط به تخمک‌های بلوغ‌یافته به مرحله متافاز با رویه Genmod نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۴) به‌صورت رگرسیون لجستیک تجزیه شدند (رابطه ۱). تفاوت معنی‌دار در سطح $P<0/05$ در نظر گرفته شد.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$ رابطه ۱)

در این رابطه، Y_{ij}، مشاهده jام تیمار iام؛ μ، میانگین جامعه؛ T_i، اثر تیمار iام و e_{ij}، اثر باقیمانده بود.

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج و بحث

غلظت فولیک‌اسید و هموسیستئین در محیط بلوغ و هم‌چنین غلظت آن در گروه‌های فولیکولی مورد مطالعه در جدول ۱ خلاصه شده است. غلظت فولیک‌اسید در هر دو گروه فولیکولی بیش‌تر از محیط کشت بود. بیش‌ترین غلظت فولیک‌اسید و هموسیستئین به‌ترتیب با ۱۴/۵ نانوگرم/ میلی‌لیتر و ۱۰/۸ میکرومول/ لیتر مربوط به فولیکول‌های با قطر کم‌تر از هشت میلی‌متر بود. محیط بلوغ به‌ترتیب با ۲/۳ نانوگرم/ میلی‌لیتر و کم‌تر از پنج میکرومول/ لیتر کم‌ترین غلظت فولیک‌اسید و هموسیستئین را داشت (جدول ۱). با توجه به این نتایج، اگرچه میزان هموسیستئین محیط بلوغ اندک است اما میزان فولیک‌اسید آن نیز در مقایسه با محیط طبیعی پیرامون تخمک پایین‌تر می‌باشد که شاید منجر به کاهش بلوغ بهینه تخمک شود. پژوهش حاضر نشان داد که فولیکول‌های با قطر کم‌تر از هشت میلی‌متر دارای بیش‌ترین غلظت فولیک‌اسید بودند که نشان‌دهنده بهینه‌بودن فولیکول‌های با قطر کم‌تر از هشت میلی‌متر جهت بلوغ آزمایشگاهی است؛ هرچند که میزان هموسیستئین نیز در این گروه بیش‌ترین غلظت را نشان داد اما احتمالاً این اثر منفی را بتوان با افزودن فولیک‌اسید بیش‌تر جبران کرد.

وضعیت بلوغ هسته‌ای تخمک‌های گاوی در گروه‌های مختلف تیماری در جدول ۲ نشان داده شده است. مکمل‌کردن ۱۰۰ نانوگرم فولیک‌اسید/ میلی‌لیتر به محیط کشت نسبت به گروه شاهد موجب افزایش درصد تخمک‌هایی شد که در مرحله متافاز دو (تخمک‌های بالغ‌شده) قرار داشتند ($P<0/05$). هم‌چنین، افزودن ۱۰۰ نانوگرم فولیک‌اسید/ میلی‌لیتر به محیط کشت درصد تخمک‌هایی که در مرحله متافاز یک (تخمک‌های نابالغ) قرار داشتند را نسبت به گروه شاهد کاهش داد ($P<0/05$). درصد تخمک‌های با مرحله متافاز دو و متافاز یک که با ۱۰۰۰ نانوگرم/ میلی‌لیتر فولیک‌اسید مکمل شده بودند، نسبت به گروه شاهد تفاوت نداشت.

جدول ۱. غلظت فولیک‌اسید و هموسیستئین اندازه‌گیری‌شده در محیط بلوغ تجاری و در مایع فولیکولیِ فولیکول‌های حاصل از تخمدان‌های کشتارگاهی گاو[1]

ترکیب اندازه‌گیری‌شده	محیط بلوغ	قطر فولیکول	
		کوچک‌تر از هشت میلی‌متر	بزرگ‌تر از هشت میلی‌متر
فولیک‌اسید (نانوگرم درمیلی‌لیتر)	۲/۳	۱۴/۵	۱۱/۹
هموسیستئین (میکرومول در لیتر)	< ۵	۱۰/۸	۶/۶

۱. تعداد تخمدان‌های مورداستفاده ۱۵ عدد و تعداد فولیکول‌های آسپیره‌شده در هر دسته فولیکولی (قطر کم‌تر و یا بیش‌تر از هشت میلی‌متر) ۴۵ عدد بود.

جدول ۲. تأثیر مکمل‌کردن سطوح مختلف فولیک‌اسید در محیط کشت بر بلوغ برون‌تنی تخمک‌های گاو± انحراف استاندارد

وضعیت هسته	سطوح فولیک‌اسید (نانوگرم در میلی‌لیتر)			
	صفر (شاهد)	۱۰	۱۰۰	۱۰۰۰
تعداد تخمک	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰
متافاز دو	۸۱/۰±۷۱/۸۸^{b}	۶۶/۰±۷۳/۲۵^{ab}	۰۷۵±۹۰/۲۳^{a}	۷۸/۰±۷۹/۸۶^{ab}
متافاز یک	۸۲/۰±۲۸/۱۱^{a}	۰۹/۱±۲۶/۷۴^{ab}	۹۱/۰±۹/۷۶^{b}	۵۰/۱±۲۰/۱۳^{ab}

a-b: تفاوت میانگین‌های دارای بندواژه‌های متفاوت در هر ردیف معنی‌دار است ($P< 0/05$).

Archive of SID
www.SID.ir

فولیک‌اسید به‌عنوان یک ماده با اثرات مختلف توانست در سطح ۱۰۰ نانوگرم/ میلی‌لیتر بلوغ تخمک‌ها را به متافاز دو افزایش دهد و درصد تخمک‌های نابالغ متافاز یک را کاهش دهد. اگرچه غلظت فولیک‌اسید در محیط بلوغ تخمک شش برابر کم‌تر از غلظت آن در فولیکول‌های بالغ بود، اما یکسان کردن میزان فولیک‌اسید این دو محیط (با افزودن ۱۰ نانوگرم فولیک‌اسید/ میلی‌لیتر محیط بلوغ) بر بلوغ برون‌تنی اثری نداشت. این در حالی بود که افزودن ۱۰۰ نانوگرم/ فولیک‌اسید/ میلی‌لیتر محیط کشت موجب فراهمی شرایط بهینه‌تری برای رشد تخمک‌ها نسبت به گروه شاهد شد. این یافته‌ها به‌خوبی اثرات مثبت مکمل‌کردن فولیک‌اسید را در دوز مشخص نشان می‌دهد. احتمالاً در سطح ۱۰ نانوگرم فولیک‌اسید/ میلی‌لیتر، غلظت فولیک‌اسید محیط کشت به حدی نرسیده است که اثرات مثبت خود را بروز دهد، اما عدم مشاهده اثرات مثبت فولیک‌اسید در دوز ۱۰۰۰ نانوگرم/ میلی‌لیتر محیط کشت را می‌توان به اثرات منفی دوز زیاد فولیک‌اسید بر تخمک در حال رشد نسبت داد.

بهبود فرمولاسیون محیط کشت منجر به افزایش توانایی حفظ رویان‌های پستانداران در محیط برون‌تنی و پیش از دوره لانه‌گزینی می‌شود [۹]. سامانه کشت و ترکیبات استفاده‌شده در آن می‌توانند بر کیفیت رویان اثر بگذارند، درحالی‌که کیفیت تخمک به‌عنوان عامل تعیین‌کننده اصلی عملکرد بلاستوسیست در نظر گرفته می‌شود [۲۱]. با این حال، محیط کشتی که رویان‌ها تا پیش از لانه‌گزینی در معرض آن قرار دارند، نقش مهمی در تعیین کیفیت بلاستوسیست ایفا می‌کند [۲۰]. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان هموسیستئین و فولیک‌اسید در محیط بلوغ تخمک کم‌تر از مایع فولیکولی بود که نشان از نیاز به افزودن فولیک‌اسید در محیط بلوغ، در مقایسه با محیط طبیعی تخمک داشت. با این وجود، به‌دلیل این‌که بسته‌های سرم جنین گاوی و محیط TCM-199 ممکن است دارای غلظت‌های متفاوتی از فولیک‌اسید و هموسیستئین باشند [۲۲] و افزودن بالاتر از حد نیاز منجر به اثرات منفی بر بلوغ برون‌تنی تخمک می‌شود، ضروری است پیش از مکمل‌سازی این ترکیب، میزان آن در محیط کشت مورد استفاده سنجیده شود. نشان داده شده است که فولیک‌اسید با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند اثرات تنش‌زای محیط برون‌تنی را بر تخمک کاهش دهد و از این مسیر موجب بلوغ و تکوین بهتر تخمک‌ها شود. هم‌چنین، هم‌راستا با یافته‌های این پژوهش، افزودن فولیک‌اسید به محیط رویان‌های تک‌سلولی موش، به‌دلیل اثر آنتی‌اکسیدانی آن، تولید گونه‌های فعال اکسیژن را در بلاستوسیست‌های موش کاهش داد [۱۷]. فولیک‌اسید با فسفریلاسیون پروتئین‌های دخیل در عوامل تسریع‌کننده مرحله متافاز و فعال‌نمودن مسیرهای پروتئین کیناز القاکننده میتوز موجب تسهیل بلوغ تخمک‌های موش می‌شود [۱۳]. هم‌چنین، نشان داده شده است که افزودن فولیک‌اسید به محیط بلوغ تخمک موجب افزایش تولید رویان از تخمک‌های درجه سه می‌شود [۱۰]. با این وجود، برخی پژوهش‌ها اثرات متناقضی از فولیک‌اسید را گزارش کرده‌اند. برای نمونه، افزودن فولیک‌اسید به محیط بلوغ بر پایه مایع اویداکتی سنتتیک (SOF) تغییر یافته، موجب کاهش بلوغ تخمک‌های گاوی شد [۲۳]. در مطالعه دیگری، مکمل‌کردن محیط کشت رویان بر پایه SOF با فولیک‌اسید اثری بر تولید رویان نداشت، ولی موجب تسریع مرحله تکامل رویان‌های شش روزه شد [۱۲]. اختلاف این دو مطالعه با پژوهش حاضر ممکن است ناشی از اختلاف غلظت فولیک‌اسید، تفاوت در نوع و اجزای محیط و هم‌چنین تفاوت در مرحله افزودن فولیک‌اسید باشد.

در کل، نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت

Archive of SID
www.SID.ir

فولیک‌اسید در فولیکول‌های با قطر بزرگ و کوچک متفاوت می‌باشد و بهتر است افزودن فولیک‌اسید در محیط براساس غلظت آن و هم‌چنین غلظت هموسیستئین در محیط کشت باشد. در این آزمایش مشاهده شد که غلظت ۱۰۰ نانوگرم/ میلی‌لیتر توانست بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های گاوی را بهبود ببخشد.

منابع

۱. قجقی ش، صمدی ف و حسنی س (۱۳۹۲) مقایسه ترکیبات بیوشیمیایی سرم خون و مایع فولیکولی تخمدان در فولیکول‌های با اندازه‌های متفاوت در گاوهای شیری. پژوهش‌های تولیدات دامی. ۴(۷): ۱۰۶-۱۲۳.

2. Balboula A, Yamanaka K, Sakatani M, Hegab A, Zaabel S and Takahashi M (2010) Intracellular cathepsin B activity is inversely correlated with the quality and developmental competence of bovine preimplantation embryos. Molecular Reproduction and Development **77**(12): 1031-1039.
3. Balboula A, Yamanaka K, Sakatani M, Kawahara M, Hegab A, Zaabel S and Takahashi M (2013) Cathepsin B activity has a crucial role in the developmental competence of bovine COCs exposed to heat-shock during in vitro maturation. Reproduction: REP-13-0179.
4. Beaujean N (2015) Epigenetics, embryo quality and developmental potential. Reproduction, Fertility and Development 27(1): 53-62.
5. Bormann CL, Ongeri EM and Krisher RL (2003) The effect of vitamins during maturation of caprine oocytes on subsequent developmental potential in vitro. Theriogenology 59(5): 1373-1380.
6. Boxmeer JC, Brouns RM, Lindemans J, Steegers EA, Martini E, Macklon NS and Steegers-Theunissen RP (2008) Preconception folic acid treatment affects the microenvironment of the maturing oocyte in humans. Fertility and Sterility 89(6): 1766-1770.
7. Brouns R, Martini E, Lindemans J, Eijkemans R, De Jonge R, Macklon N and Steegers-Theunissen R (2003) Follicular folate and cobalamin status and fertilization rate and pregnancy after human ovarian hyperstimulation. TFO 2: 51-52.
8. Ebisch IMW, Thomas CMG, Peters WHM, Braat DDM and Steegers-Theunissen RPM (2006) The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. Human reproduction update 13(2)163-174.
9. Farin P, Crosier A and Farin C (2001) Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. Theriogenology 55(1): 151-170.
10. Gennari Verruma C, Mioranza A, Miranda Furtado CL, Vila RA, Ramos ES and Lõbo RB (2016) In vitro production of bovine embryos: partial replacement of fetal calf serum by bovine serum albumin on in vitro culture and addition of folic acid on oocytes maturation. Proceedings of the 30th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE). 480 (Abst.).
11. Graulet B, Matte J, Desrochers A, Doepel L, Palin MF and Girard C (2007) Effects of dietary supplements of folic acid and vitamin B12 on metabolism of dairy cows in early lactation. Journal of Dairy Science. 90(7): 3442-3455.
12. Guimarães ALS and Dode MAN (2016) Effect of various concentrations of folic acid on in vitro culture of bovine embryos. Proceedings of the 30th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE). 604 (Abst.)
13. Huang X, Gao S, Xia W, Hou S and Wu K (2013) Folic acid facilitates in vitro maturation of mouse and Xenopus laevis oocytes. British Journal of Nutrition 109(8): 1389-1395.
14. Joshi R, Adhikari S, Patro B, Chattopadhyay S and Mukherjee T (2001) Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. Free Radical Biology and Medicine 30(12): 1390-1399.
15. Kane MT, Carney EW and Bavister BD (1986) Vitamins and amino acids stimulate hamster blastocysts to hatch in vitro. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology 239(3): 429-432.
16. Kim ES, Seo JS, Eum JH, Lim JE, Kim DH, Yoon TK and Lee DR (2009) The effect of folic acid on in vitro maturation and subsequent embryonic development of porcine immature oocytes. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research 76(2): 120-121.
17. Koyama H, Ikeda S, Sugimoto M and Kume S (2012) Effects of folic acid on the development and oxidative stress of mouse embryos exposed to heat stress. Reproduction in Domestic Animals 47(6): 921-927.

Archive of SID
www.SID.ir

18. Lim KT, Jang G, Ko KH, Lee WW, Park HJ, Kim JJ, Lee SH, Hwang WS, Lee BC and Kang SK (2007) Improved in vitro bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. Theriogenology 67(2): 293-302.
19. O'Neill C (1998) Endogenous folic acid is essential for normal development of preimplantation embryos. Human Reproduction (Oxford, England) 13(5): 1312-1316.
20. Pereira DC, Dode MAN and Rumpf R (2005) Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. Theriogenology 63(4): 1131-1141.
21. Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP and Lonergan P (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. Molecular Reproduction and Development 61(2): 234-248.
22. Sung LY, Du F, Xu J, Chang W, Nedambale TL, Zhang J, Jiang S, Tian XC and Yang X (2004) The differential requirement of albumin and sodium citrate on the development of in vitro produced bovine embryos. Reproduction Nutrition Development 44(6): 551-564.
23. Tawatao KM, Manaois II FV, Ocampo LC and Ocampo MB (2015) Folic acid supplementation for bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. Journal of Agricultural Technology 11(8): 2401-2409.
24. Van den Veyver IB (2002) Genetic effects of methylation diets. Annual review of nutrition 22(1): 255-282.

Archive of SID

www.SID.ir