



تولیدات دامی

دوره ۲۲ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۹

صفحه‌های ۴۹۱-۵۰۰

DOI: 10.22059/jap.2020.290887.623456

مطالعه اثر غلظت‌های مختلف لیپوپلی ساکارید بر توانایی تکوین برون تنی و فراسنجه‌های محیط بلوغ تخمک گوسفند

سارا عطایی نظری^۱، عبدالله محمدی سنگ چشمه^{۲*}، محمدرضا بختیار زاده^۳، علی اسدی الموتی^۴، علی فولادی نشتا^۴

۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران.

۲. استادیار، گروه علمی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران.

۳. دانشیار، گروه علمی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران.

۴. استاد، گروه دامپزشکی، رویال کمبریج، دانشگاه لندن، لندن، انگلیس.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۱۱/۲۵

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۸/۱۴

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی اثر غلظت‌های مختلف لیپوپلی ساکارید در محیط کشت بر بلوغ تخمک، توانایی تکوین تخمک و فراسنجه‌های مرتبط با محیط کشت بلوغ شامل گلوکز، پیروات، لاکتات و اسید آمینه گلوتامین بود. تیمارهای آزمایشی شامل غلظت‌های صفر (شاهد)، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی ساکارید در محیط کشت تخمک بود. تخمک‌ها به همراه سلول‌های کومولوس اطراف آن در حضور غلظت‌های مختلف لیپوپلی ساکارید کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت محیط کشت جمع‌آوری و درصد بلوغ تخمک‌ها، درصد تسهیم و تولید بلاستوسیت محاسبه شد. درصد بلوغ تخمک در تیمار با سطح ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی ساکارید پایین‌ترین بود ($P < 0.05$). در بین فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده، تنها غلظت گلوکز در پاسخ به سطوح افزایشی لیپوپلی ساکارید موجود در محیط کشت به صورت خطی کاهش یافت ($P < 0.05$)، به طوری که تیمار ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی ساکارید غلظت گلوکز پایین‌تری نسبت به تیمارهای دیگر داشت. درصد تسهیم در تیمار دارای ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی ساکارید در مقایسه با بقیه تیمارها پایین‌تر بود ($P < 0.05$). هم‌چنین سطوح ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی ساکارید منجر به کاهش معنی‌دار درصد تولید بلاستوسیت در مقایسه با تیمار شاهد شد ($P < 0.05$). براساس نتایج این پژوهش، لیپوپلی ساکارید اثرات منفی بر تکوین تخمک گوسفند دارد و اثرات آن احتمالاً از طریق تأثیر بر مسیرهای مرتبط با متابولیسم انرژی میانجی‌گری می‌گردد. به‌کارگیری برنامه‌های مدیریتی به‌منظور کنترل عوامل افزایش‌دهنده غلظت لیپوپلی ساکارید در دوره تولیدمثل می‌تواند از کاهش عملکرد تولیدمثل دام جلوگیری کند.

کلیدواژه‌ها: بیماری‌های عفونی، تخمک، دیواره سلول باکتریایی، عملکرد تولیدمثل، میش.

Effect of various concentrations of lipopolysaccharide on in vitro developmental competence of ovine oocyte and metabolites related to the maturation medium

Sara Ataei Nazari¹, Abdollah Mohammadi Sangcheshme^{2*}, Mohammad Reza Bakhtiarzadeh³, Ali Assadi Alamouti², Ali Fouladi Nashta⁴

1. Ph.D. Candidate, Department of Animal Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Pakdasht, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Pakdasht, Iran.

3. Associate Professor, Department of Animal Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Pakdasht, Iran.

4. Professor, Department of Reproduction Genes and Development Group, Royal Veterinary College, Hawkshead Campus, Hatfield, UK.

Received: November 05, 2019

Accepted: February 14, 2020

Abstract

This study was conducted to evaluate the effect of various concentrations of lipopolysaccharide (LPS) in maturation medium on oocyte maturation, oocyte developmental competence and metabolites related to maturation medium including glucose, pyruvate, lactate and glutamine. The experimental treatments were 0 (control), 0.01, 0.1, 1 and 10 µg/ml of LPS in oocyte maturation medium. The cumulus oocytes complex (COC) were cultured with various concentrations of lipopolysaccharide. After 24 h of oocyte maturation, the medium was collected and the rates of oocyte maturation, cleaved oocyte and oocytes reached to blastocyst stage were analyzed. Oocyte maturation rate was lowest in the treatment with 10 µg/ml of LPS ($P < 0.05$). Among the measured metabolites, only glucose concentration was linearly decreased in response to increasing levels of LPS in the maturation medium ($P < 0.05$) as treatment with 10 µg/ml of LPS had lower glucose concentration comparing to other treatments. The percentage of oocyte cleavage was significantly lower in treatment with highest level of LPS compared to other treatments ($P < 0.05$). In addition, the treatment with 1 and 10 µg/ml of LPS significantly reduced blastocyst rate compared to control group ($P < 0.05$). According to results of this study, lipopolysaccharide could have detrimental effects on oocyte development and these influences seems to be mediated through pathways related to energy metabolism. Acquiring managerial approaches to control LPS enhancing agents during reproductive season could prevent animal's reproductive failure.

Keywords: Bacterial cell wall, Ewe, Infectious diseases, Oocytes, Reproductive function.

مقدمه

باروری گاوهای شیری مدرن در دهه‌های اخیر کاهش چشم‌گیری یافته است، به گونه‌ای که بازدهی ضعیف تولیدمثل یک مشکل جهانی در صنعت گاو شیری محسوب می‌شود [۸]. کاهش کیفیت تخمک و رویان به‌عنوان دو عامل عمده در عدم موفقیت آبستنی نقش دارند. نشخوارکنندگان اغلب به‌منظور تأمین احتیاجات انرژی و تولید بیش‌تر شیر با جیره‌های غنی از کنسانتره تغذیه می‌شوند. اختلالات متابولیکی مانند اسیدوز تحت حاد شکمبه‌ای (Sub-Acute Ruminant Acidosis) با مصرف مقادیر زیاد کنسانتره قابل‌تخمیر و فیبر پایین علوفه در گاوها ایجاد می‌شود [۲۴]. تغذیه نشخوارکنندگان با غلات و کربوهیدرات‌هایی که قابلیت تجزیه‌پذیری بالایی دارند باعث کاهش pH شکمبه، لیزشدن دیواره سلولی باکتری‌ها و نفوذ لیپوپلی‌ساکارید به داخل گردش خون سیستمیک می‌شود [۱۱].

لیپوپلی‌ساکارید در غشای بیرونی باکتری‌های گرم منفی مانند *Shigella*، *Neisseria*، *Hemophilus*، *E.coli* وجود دارد و موجب ایجاد پاسخ‌های ایمنی قوی در حیوانات می‌شود. وجود لیپوپلی‌ساکارید در مایع فولیکولی گاوهای دچار اندومتريتيس و ورم پستان نیز شناسایی شده است که نشان‌دهنده ارتباط بین عفونت رحم، تولید لیپوپلی‌ساکارید و تأخیر در از سرگیری فعالیت‌های فولیکولی تخمدان می‌باشد [۱۵].

در آزمایشی، افزودن لیپوپلی‌ساکارید و $PGF_{2\alpha}$ به محیط بلوغ تخمک اثرات منفی بر شایستگی بلوغ تخمک داشت [۱۸]. نشان داده شد که لیپوپلی‌ساکارید باعث افزایش درصد توقف میوز و اختلال در پیش‌روی تقسیم میوز در مرحله کیسه زایشی (Germinal Vesicle stage) در محیط برون‌تنی می‌شود [۳]. به‌علاوه افزودن لیپوپلی‌ساکارید به محیط کشت بلوغ تخمک گاو، موجب

کاهش تولید بلاستوسیت شد [۱۸]. هم‌چنین لیپوپلی‌ساکارید سبب آسیب به بلوغ هسته‌ای تخمک‌های گاو از طریق مهار پیش‌روی میوز می‌شود. اگرچه لیپوپلی‌ساکارید اثری بر میزان DNA میتوکندریایی نداشت، اما باعث کاهش پتانسیل غشا در فعال‌سازی تخمک‌های بالغ شد. کاهش در پتانسیل غشای میتوکندری، نشانه اولیه از آپوپتوزیس (مرگ سلولی) است. نشان داده شده است که تخمک‌های بالغ‌شده در حضور لیپوپلی‌ساکارید در مقایسه با تخمک‌های گروه شاهد، تروفوبلاست‌هایی با سلول‌های کم‌تری دارند [۱۰].

علاوه بر التهاب‌زایی [۱۲]، متابولیسم انرژی سلولی نیز می‌تواند تحت تأثیر لیپوپلی‌ساکارید قرار گیرد. نشان داده شد که غلظت‌های افزایشی لیپوپلی‌ساکارید در محیط کشت سلول‌های هلا (HeLa) می‌تواند باعث افزایش سطح ATP داخل سلولی از طریق افزایش عملکرد میتوکندریایی و افزایش فعالیت آنزیم‌های گلايکولياتيك شود که این اثرات به افزایش سطوح نیتریک‌اکسید القاشده توسط لیپوپلی‌ساکارید ربط داده شده است [۲۰]. محیطی که در آن تخمک در طی بلوغ (چه در شرایط تنی و چه در شرایط برون‌تنی) قرار می‌گیرد، بر موفقیت لقاح و تکوین رویان پس از آن اثرگذار بوده و نشان‌دهنده وضعیت سوخت‌وساز داخل سلولی می‌باشد [۱۹].

افزودن متابولیتی مانند گلوکز (به‌عنوان ماده‌ای مهم جهت تولید انرژی) در غلظت‌های مناسب به محیط کشت، منجر به بهبود بلوغ و تکوین به بلاستوسیت می‌شود. اسیدهای آمینه نیز به‌عنوان منبع انرژی، توسط تخمک به‌همراه سلول‌های کومولوس اطراف آن مصرف می‌شوند. بنابراین اندازه‌گیری غلظت متابولیت‌های مرتبط با متابولیسم انرژی موجود در محیط کشت بلوغ تخمک، می‌تواند به درک اثرگذاری لیپوپلی‌ساکارید از طریق مسیرهای وابسته به متابولیسم انرژی، کمک کند.

توليدات دامی

مطالعه اثر غلظت‌های مختلف لیپوپلی ساکارید بر توانایی تکوین برون‌تنی و فراسنجه‌های محیط بلوغ تخمک گوسفند

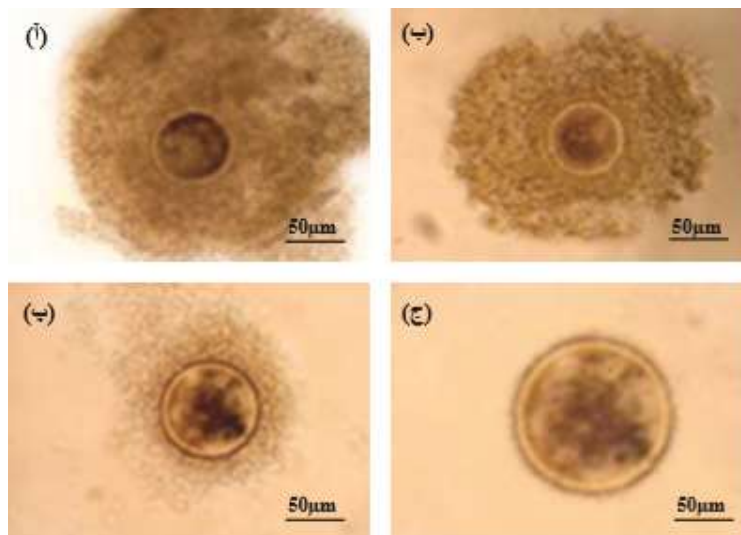
میش‌های بالغ بلافاصله پس از کشتار تهیه و توسط فلاسک عایق حرارتی حاوی سرم فیزیولوژیک گرم (۳۷-۳۲ درجه سانتی‌گراد) در مدت کم‌تر از دو ساعت به آزمایشگاه انتقال داده شدند. نمونه‌ها چندین بار با سرم فیزیولوژیک ۳۷ درجه سانتی‌گراد شسته شدند. سپس، تخمک‌ها به‌همراه سلول‌های کومولوس اطراف آن از فولیکول‌های آنترال با قطر سه تا هفت میلی‌متر به‌روش آسپیره و با سرنگ ۱۰ سی‌سی استخراج شدند. تخمک‌های جمع‌آوری‌شده براساس تعداد لایه‌های سلول‌های کومولوس و همگن‌بودن سیتوپلاسم به گروه‌های بسیار خوب، خوب، نسبتاً خوب و ضعیف تقسیم‌بندی شدند (شکل ۱).

به‌منظور بررسی اثر لیپوپلی ساکارید اضافه‌شده در محیط کشت بر بلوغ هسته‌ای تخمک، بعد از استحصال و درجه‌بندی، تخمک‌هایی با کیفیت عالی و خوب انتخاب و ابتدا سه بار در محیط کشت HTCM-۱۹۹ (HEPES-) buffered Tissue Culture Medium-199 شسته شدند.

گزارش‌های زیادی درخصوص اثرات لیپوپلی ساکارید بر عملکرد تولیدمثل گاوهای شیری وجود دارد [۲ و ۲۱]، اما گزارشی در مورد پاسخ تخمک‌ها به غلظت‌های افزایشی لیپوپلی ساکارید در محیط بلوغ وجود ندارد. مشخص شدن اثرات لیپوپلی ساکارید بر تکوین تخمک‌ها می‌تواند نقش به‌سزایی در به‌کارگیری استراتژی‌های کنترل‌کننده عوامل افزایش‌دهنده لیپوپلی ساکارید شامل کنساتره بالا در جیره، عفونت رحم و ورم پستان در عملکرد تولیدمثلی میش و در پی آن اتخاذ راه‌کارهایی جهت جلوگیری و کنترل این عوامل و در نتیجه افزایش راندمان تولیدمثلی داشته باشد. بنابراین هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر افزودن لیپوپلی ساکارید به محیط کشت بلوغ بر بلوغ تخمک گوسفند، متابولیت‌های وابسته به متابولیسم انرژی و هم‌چنین درصد تسهیم و تولید بلاستوسیت بود.

مواد و روش‌ها

تخمک‌های گوسفند از کشتارگاه پوریای شرق و از



شکل ۱. گروه‌بندی کیفیت سلول تخمک به‌همراه سلول‌های کومولوس اطراف آن. کلاس‌های آ تا ج به ترتیب کیفیت بسیار خوب، خوب، نسبتاً خوب و ضعیف را نشان می‌دهد.

تولیدات دایمی

دوره ۲۲ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۹

تمام ناخالصی‌ها آن با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد حذف شد. نمونه‌های به دست آمده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای اندازه‌گیری متابولیت‌هایی مانند گلوکز، پیروات، لاکتات و گلوتامین نگهداری شدند. گلوکز و لاکتات با استفاده از کیت پارس‌آزمون ۹۷۰۰۷ و بر اساس آزمایشات فتومتریک اندازه‌گیری شدند. پیروات با روش آنزیمی و به کمک کیت GRINER ۷۰۳۱۵۰۰ اندازه‌گیری شد. مقدار گلوتامین با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد.

هم‌چنین به منظور بررسی تأثیر افزودن لیپوپلی‌ساکارید موجود در محیط بلوغ بر درصد تسهیم و تولید بلاستوسیت، پس از بلوغ برون‌تنی، تخمک‌ها از محیط بلوغ برداشته و به یک میکروتیوپ محتوی محیط HTCМ و آنزیم هیالورونیداز ۰/۱ درصد منتقل و از سلول‌های کومولوس اطراف خود جدا شدند. سپس، تخمک‌های عاری از کومولوس در محیط HTCМ-۱۹۹ حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی شسته شدند و در ۲/۵ میکرومولار یونومایسین رقیق شده در محیط HTCМ-۱۹۹ حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی به مدت پنج دقیقه قرار داده شدند. پس از این مرحله، تخمک‌ها در قطره‌های حاوی دو میلی مولار ۶-DMAP رقیق شده در محیط CR1aa فعال شدند. پس از فعال شدن تخمک‌ها در شرایط برون‌تنی، گروه‌های ۱۵ تا ۲۰ سلول تخمک در ۳۰ میکرولیتر CR1aa حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی، دو درصد اسیدهای آمینه ضروری و یک درصد اسیدهای آمینه غیرضروری به مدت نه روز در داخل انکوباتور ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد، با پنج درصد گاز کربنیک، پنج درصد اکسیژن و ۹۰ درصد گاز نیتروژن کشت داده شدند. درصد تسهیم و تولید بلاستوسیت در روز سه و نه پس از کشت ارزیابی شد.

سپس سه بار دیگر در محیط کشت TCM-۱۹۹ (Tissue Culture Medium-199) حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی، ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر هورمون لوتئینه (LH)، ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر هورمون محرک فولیکول (FSH) و یک میکروگرم در میلی‌لیتر بتا‌استرادیول و غلظت‌های مختلف لیپوپلی‌ساکارید شامل صفر (بدون لیپوپلی‌ساکارید) و سطوح ۰/۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از محیط شست‌وشو داده شدند و در نهایت در گروه‌های ۱۰ تایی به قطره‌های ۱۰۰ میکرولیتری از همین محیط کشت (که در زیر روغن معدنی قرار داشتند) منتقل شدند. دیش حاوی تخمک‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و پنج درصد گاز کربنیک در شرایط حداکثر رطوبت قرار گرفت.

پس از بلوغ برون‌تنی، گروهی از تخمک‌ها برای ارزیابی وضعیت هسته‌ای رنگ‌آمیزی شدند. ابتدا تخمک‌ها به یک میکروتیوپ حاوی محیط HTCМ به همراه آنزیم هیالورونیداز ۰/۱ درصد (۱۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر) منتقل و از سلول‌های کومولوس اطراف خود جدا شدند. تخمک‌های عاری از کومولوس در قطره‌های حاوی رنگ هوخست (پنج میکروگرم در میلی‌لیتر) برای پنج دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. سپس تخمک‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Nikon, Tokyo, Japan) ارزیابی و براساس وضعیت هسته‌ای خود در یکی از گروه‌های ژرمینال و زیکول (GV) Germinal Vesicle، ژرمینال و زیکول شکسته (GVBD) Germinal Vesicle Breakdown، متافاز یک (MI) Metaphase I و متافاز دو (Metaphase II) قرار گرفتند.

بیست و چهار ساعت پس از بلوغ، به منظور اندازه‌گیری غلظت متابولیت‌های موجود در محیط بلوغ تحت تأثیر سطوح افزایشی لیپوپلی‌ساکارید، محیط بلوغ جمع‌آوری و

تولیدات دایمی

مطالعه اثر غلظت‌های مختلف لیپوپلی ساکارید بر توانایی تکوین برون‌تنی و فراسنجه‌های محیط بلوغ تخمک گوسفند

GLM برای مدل (۲) تجزیه و اثر سطوح افزایشی لیپوپلی ساکارید در سطح معنی‌داری $P < 0/05$ به کمک مقایسه‌های متعامد یا ارتوگونال (Contrasts) بررسی شد.

$$Y_{ij} = \mu + A_i + e_{ij} \quad (\text{رابطه ۲})$$

در این رابطه، Y_{ij} ، مشاهده مربوط به سطح i ام فاکتور A در تکرار j ؛ μ ، میانگین جامعه برای صفت مورد نظر؛ A_i ، سطح i ام فاکتور A و e_{ij} ، اشتباه باقی‌مانده می‌باشد.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش مربوط به بررسی درصد بلوغ هسته‌ای تخمک در جدول (۱) نشان داده شده است. اثر لیپوپلی ساکارید بر درصد بلوغ معنی‌دار بود ($P < 0/05$). به طوری که شانس رسیدن به مرحله MII در محیط حاوی ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی ساکارید، کم‌تر از محیط شاهد و محیط‌های حاوی ۰/۱ و ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی ساکارید بود.

ارتباط بین تیمارهای آزمایشی و درصد بلوغ، تسهیم و بلاستوسیسست با استفاده از تابعیت لجستیک رویه مدل خطی تعمیم‌یافته (GLM) با نرم‌افزار آماری R (نسخه ۳/۱/۰) بررسی شد (رابطه ۱). میزان اثرگذاری تیمارها بر اساس نسبت شانس (Odds Ratio; OD) گزارش گردید.

$$y = p + e \quad (\text{رابطه ۱})$$

$$\text{logit}(p) = \text{Log} e \frac{p}{1-p} = X\beta \Rightarrow \text{Exp}(X\beta) / (1 + \text{Exp}(X\beta))$$

در این رابطه، y و p ، به ترتیب بیانگر مقدار واقعی متغیر پاسخ (وقوع) و یا عدم وقوع بلوغ، تسهیم و بلاستوسیسست) و احتمال برآورد شدن وقوع آن‌ها است. همچنین نماد EXP، مربوط به عدد نپری (برابر با ۲/۷۱۸۲۸)، x ، ماتریس ضرایب و β ، بردار سازه‌های گنجانده‌شده در مدل است.

همچنین داده‌های مربوط به متابولیت‌های موجود در محیط، با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۳) رویه

جدول ۱. اثر لیپوپلی ساکارید اضافه‌شده در محیط کشت بلوغ بر وضعیت هسته‌ای تخمک‌های میش^۱

تیمارهای آزمایشی	تعداد تخمک‌های کشت داده‌شده	تعداد GV ^۲ (درصد)	تعداد GVBD ^۳ (درصد)	تعداد MI ^۱ (درصد)	تعداد MII ^۲ (درصد)	نسبت شانس MII
شاهد	۱۷۷	۲ (۱/۱۲)	۱۹ (۱۰/۷۳)	۱۴ (۷/۹۰)	۱۴۳ ^a (۸۰/۲۲)	-
۰/۰۱	۱۴۶	۵ (۳/۴۲)	۱۵ (۱۰/۲۷)	۸ (۵/۴۷)	۱۱۸ ^a (۸۰/۸۲)	۱/۰۳
۰/۱	۱۴۲	۴ (۲/۸۱)	۱۶ (۱۱/۲۶)	۷ (۴/۹۲)	۱۱۵ ^a (۸۰/۹۸)	۱/۰۴
۱	۱۵۲	۶ (۳/۹۴)	۱۷ (۱۱/۱۸)	۲۱ (۱۳/۸۱)	۱۰۸ ^{ab} (۷۱/۰۵)	۰/۶۱
۱۰	۱۲۳	۵ (۴/۰۶)	۲۲ (۱۷/۸۸)	۱۲ (۹/۷۵)	۸۴ ^b (۶۸/۲۹)	۰/۵۳
	خطای استاندارد میانگین	۰/۴۶	۰/۲۴	۰/۳۰	۰/۱۹	

۱. داده‌ها میانگینی از ۷ تکرار می‌باشند.

۲. ژرمینال وزیکول (GV) Germinal Vesicle، ۳. ژرمینال وزیکول شکسته (GVBD) Germinal Vesicle Breakdown، ۴. متافاز یک (MI) Metaphase I، ۵. متافاز دو

((MII) Metaphase II)

a-b: تفاوت میانگین‌ها با حروف نامشابه در هر ستون، معنی‌دار است ($P < 0/05$).

تولیدات دامی

دوره ۲۲ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۹

پاسخ‌های التهابی می‌شوند و تکوین تخمک را مختل می‌کنند [۳]. تزریق سه میلی‌گرم لیپوپلی‌ساکارید به‌ازای هر کیلوگرم وزن موش سبب شد تا درصد تخمک‌هایی که به مرحله متافاز دو می‌رسند کاهش یابد [۱۶].

در بین متابولیت‌های مرتبط با متابولیسم انرژی در محیط بلوغ تخمک، غلظت گلوکز تحت تأثیر سطوح مختلف لیپوپلی‌ساکارید در محیط کشت بلوغ قرار گرفت (جدول ۲)، به‌گونه‌ای که با افزایش سطح لیپوپلی‌ساکارید، غلظت گلوکز در محیط کشت حاوی ۱۰ میکروگرم بر لیتر لیپوپلی‌ساکارید نسبت به دیگر تیمارهای آزمایشی به‌صورت خطی کاهش یافت ($P < 0.05$). غلظت‌های پیروات، لاکتات و گلوتامین بین سطوح مختلف لیپوپلی‌ساکارید هیچ تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند.

در مطالعه‌ای، افزودن سطوح افزایشی لیپوپلی‌ساکارید به محیط کشت سلول‌های هلا، فعالیت آنزیم‌های درگیر در گلائیکولیز را افزایش داد و سبب افزایش گلائیکولیز برای تولید ATP بیش‌تر داخل سلول شد [۲۰]، که با کاهش گلوکز محیط کشت در مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. محیط موردنیاز برای کشت تخمک و سلول‌های کومولوس اطراف آن، در دو شرایط تنی و برون‌تنی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد و تأثیر زیادی بر موفقیت لقاح و تکوین رویان پس از آن دارد [۱۹].

غلظت لیپوپلی‌ساکارید در مایع فولیکولی گاوهای مبتلا به آندومتریس، بین ۰/۰۰۴ تا ۰/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر است. نشان داده شده است که تزریق ۱۰ میکروگرم اندوتوکسین (لیپوپلی‌ساکارید) به‌منظور القای ورم پستان در گاو و پس از آن بررسی تخمک‌ها در شرایط برون‌تنی لیپوپلی‌ساکارید بلوغ هسته‌ای تخمک را مختل می‌کند [۱]. در آزمایشی افزودن غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکارید به محیط بلوغ سبب تغییر در وضعیت هسته‌ای تخمک‌ها شد، به‌عبارتی درصد تخمک‌هایی که به مرحله MII می‌رسند را کاهش داد، اما غلظت ۰/۰۰۱ میکروگرم در میلی‌لیتر هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد نداشت [۱۰]. غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید با تأثیر بر چرخه سلولی، استرس اکسیداتیو و تغییرات اپی‌ژنتیکی مانع بلوغ تخمک گاو می‌شود و هم‌چنین درصد خروج اولین جسم قطبی را کاهش می‌دهد [۲۲].

گزارش شد که سلول‌های تکا و گرانولوزای فولیکول در تخمدان سبب بیان مجموعه گیرنده Toll-like (TLR4) receptor 4 می‌شود و با تولید پاسخ‌های التهابی به لیپوپلی‌ساکارید پاسخ می‌دهد [۱۳]. پژوهش‌های انجام‌شده نشان می‌دهد که سلول‌های گرانولوزای گاو در پاسخ به لیپوپلی‌ساکارید از طریق مسیر TLR4 سبب آغاز یکسری

جدول ۲. اثر لیپوپلی‌ساکارید اضافه‌شده در محیط کشت بلوغ بر غلظت گلوکز، پیروات، لاکتات و گلوتامین در محیط کشت^۱

پارامترهای محیط کشت	تیمارهای آزمایشی				۱۰	۱	۰/۱	۰/۰۱	کنترل
	خطای استاندارد میانگین‌ها	سطح معنی‌داری خطی	سطح معنی‌داری دوم	سطح معنی‌داری سوم					
گلوکز (پیکومول)	۱/۳۴	۰/۰۰۵	۰/۵۹	۰/۳۲	۸۲/۵ ^b	۸۲/۴ ^b	۸۳/۴۱ ^{ab}	۸۵/۱۶ ^a	۸۵/۵ ^a
پیروات (پیکومول)	۰/۰۸	۰/۵۹	۰/۷۸	۱	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۲۸	۰/۲۶
لاکتات (پیکومول)	۸/۰۰۲	۰/۸۲	۰/۹۷	۱	۴۱/۴۳	۴۱/۱۱	۴۰/۴۵	۴۰/۴۵	۴۰/۱
گلوتامین (پیکومول)	۳۸/۳۴	۰/۱۹	۰/۴۰	۰/۹۶	۵۰۹	۵۰۲	۵۱۱	۵۲۰/۳۳	۵۴۹

۱. داده‌ها میانگینی از ۳ تکرار می‌باشند.

a-b: تفاوت میانگین‌ها با حروف نامشابه در هر ستون، معنی‌دار است ($P < 0.05$).

تولیدات دامی

دوره ۲۲ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۹

مطالعه اثر غلظت‌های مختلف لیپوپولی‌ساکارید بر توانایی تکوین برون‌تنی و فراسنجه‌های محیط بلوغ تخمک گوسفند

گلوکوتایون داخل سیتوپلاسمی برای گسترش سلول‌های کومولوس بسیار ضروری است. گلوکوتایون یک تری‌پتیدتیول شامل سیستین، پرولین و گلوتامین است و عامل کاهش‌دهنده و جذب‌کننده‌ای است که سلول‌ها را در مقابل رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند. سنتز گلوکوتایون به سطوح اسید آمینه بسیار ناپایدار سیستین که به راحتی به سیستین اکسید می‌شود، وابسته است. در مطالعه حاضر، سایر متابولیت‌های مطالعه‌شده، تحت تأثیر لیپوپولی‌ساکارید قرار نگرفتند. بنابراین به نظر می‌رسد که احتمالاً اثرات لیپوپولی‌ساکارید بر شایستگی تکوین تخمک از طریق مسیرهای مرتبط با انرژی و فراهمی سوبستراهای انرژی میانجی‌گری می‌گردد.

تفاوت معنی‌داری بین درصد تسهیم تخمک در محیط شاهد با محیط‌های حاوی ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده نشد (جدول ۳). افزودن ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپولی‌ساکارید به‌طور معنی‌داری درصد تسهیم نسبت به محیط شاهد و یا محیط‌های حاوی ۰/۰۱، ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوساکارید کاهش داد ($P < 0/05$).

تفاوتی در درصد تولید بلاستوسیست در محیط شاهد و محیط‌های حاوی ۰/۰۱ و ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپولی‌ساکارید مشاهده نشد (جدول ۴). با افزایش سطح لیپوپولی‌ساکارید به یک و ۱۰ میکروگرم در محیط کشت، درصد بلاستوسیست‌ها و در نتیجه نسبت شانس درصد تولید بلاستوسیست کاهش یافت ($P < 0/05$).

در بررسی قابلیت تکوین تخمک‌های گاوی در محیط‌هایی با ۰/۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپولی‌ساکارید، درصد تسهیم تحت تأثیر لیپوپولی‌ساکارید قرار نگرفت، ولی درصد بلاستوسیست در محیط‌های حاوی لیپوساکارید به‌طور چشم‌گیری کاهش یافت [۱۰]، که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد.

طبیعت پویا و سریع مرحله پایانی بلوغ تخمک، نیاز تخمک و سلول‌های کومولوس به متابولیت‌هایی نظیر اسیدهای چرب، اسیدهای آمینه، الکترولیت‌ها، پورین‌ها و پریمیدین‌ها را موجب می‌شود.

در این مطالعه، با افزایش سطح لیپوپولی‌ساکارید غلظت گلوکز کاهش و غلظت لاکتات افزایش پیدا کرد. گلوکز یک سوبسترای مهم انرژی می‌باشد و افزودن آن به محیط کشت به میزان بهینه باعث بهبود فرآیند بلوغ و تکوین بلاستوسیست می‌شود [۲۳]. پژوهش‌ها نشان می‌دهد، گلوکز در تخمک از طریق چهار مسیر متابولیزه می‌شود و سوبستراهای تولیدشده در این مسیرها بر بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک اثر می‌گذارند. گلائیکولیز مهم‌ترین مسیر متابولیسم گلوکز هست. مصرف گلوکز موجود در محیط بلوغ تخمک، در چرخه گلائیکولیز منجر به تولید ATP و سوبستراهایی مانند پیرووات برای تولید انرژی بیش‌تر می‌شود. از طرفی، با متابولیزه‌شدن بیش‌تر پیرووات در مسیر تری‌کربوکسیلیک اسید (TCA) و به‌دنبال آن فسفوریلاسیون اکسیداتیو، انرژی بیش‌تری تولید خواهد شد. به‌علت همبستگی مثبتی که بین مصرف گلوکز و تولید لاکتات وجود دارد، با رشد فولیکول، نیاز به انرژی افزایش‌یافته و کاهش قابلیت دسترسی به اکسیژن، منجر به افزایش گلائیکولیز و افزایش تولید لاکتات می‌شود.

مسیر دیگر، مسیر پنتوز فسفات (PPP) است که با تولید نیکوتین‌آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات (NADPH) از اکسیدشدن گلوکوتایون جلوگیری می‌کند [۱۹]. متابولیسم گلوکز از طریق مسیر پنتوز فسفات به تنظیم بلوغ میوزی تخمک کمک می‌کند [۵].

سلول‌های کومولوس در جریان یافتن اسیدهای آمینه به درون سلول تخمک نقش مهمی دارند، از طرفی اسیدهای آمینه توسط سلول‌های کومولوس به‌عنوان یک منبع انرژی برای تخمک مورداستفاده قرار می‌گیرند [۴].

تولیدات دامی

دوره ۲۲ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۹

سارا عطایی نظری، عبدالله محمدی سنگ چشمه، محمدرضا بختیاری زاده، علی اسدی الموتی، علی فولادی نشتا

جدول ۳. اثر لیپوپلی ساکارید اضافه شده در محیط کشت بلوغ بر درصد تسهیم تخمک^۱

نسبت	تعداد	تعداد تخمک‌های	تیمارهای آزمایشی
شانس	(درصد تسهیم)	کشت داده شده	
-	۸۶ (۷۰/۴۹) ^{ab}	۱۲۲	شاهد
۱/۲	۹۲ (۷۴/۱۹) ^a	۱۲۴	۰/۰۱
۱/۱۲	۸۶ (۷۲/۸۸) ^a	۱۱۸	۰/۱
۰/۶۳	۷۴ (۶۰/۱۶) ^{bc}	۱۲۳	۱
۰/۵۵	۷۱ (۵۶/۸) ^{cd}	۱۲۵	۱۰
-	۰/۱۸	-	خطای استاندارد میانگین

۱. داده‌ها میانگینی از ۸ تکرار می‌باشند.

a-d: تفاوت میانگین‌ها با حروف نامشابه در هر ستون، معنی دار است (P<۰/۰۵).

جدول ۴. اثر لیپوپلی ساکارید اضافه شده در محیط کشت تخمک بر تولید بلاستوسیست^۱

نسبت	تعداد	تعداد تخمک‌های	تیمارهای آزمایشی
شانس	(درصد بلاستوسیست)	کشت داده شده	
-	۳۳ (۲۷/۰۴) ^a	۱۲۲	شاهد
۱/۱۲	۳۶ (۲۹/۰۳) ^a	۱۲۴	۰/۰۱
۱/۰۴	۳۰ (۲۵/۴۲) ^{ab}	۱۱۸	۰/۱
۰/۵۰	۲۰ (۱۶/۲۶) ^b	۱۲۳	۱
۰/۴۸	۲۰ (۱۶/۰۰) ^b	۱۲۵	۱۰
-	۰/۲۴	-	خطای استاندارد میانگین

۱. داده‌ها میانگینی از ۸ تکرار می‌باشند.

a-d: تفاوت میانگین‌ها با حروف نامشابه در هر ستون، معنی دار است (P<۰/۰۵).

تکوین تخمک‌ها در شرایط برون‌تنی می‌شود [۱۴]. غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی ساکارید سبب کاهش درصد تسهیم، تشکیل مورولا و بلاستوسیست در تخمک‌های گاوی می‌گردد [۹]. در آزمایشی افزودن ۰/۱ و یک میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی ساکارید به محیط کشت بلوغ سبب کاهش درصد تولید بلاستوسیست‌های گاوی شد، اما هیچ‌گونه تأثیری بر درصد تسهیم نداشتند [۱۸].

در آزمایشی، لیپوپلی ساکارید به میزان ۵۰ میکروگرم

لیپوپلی ساکارید معمولاً گیرنده TLR4 را شناسایی می‌کند و با ایجاد یک پاسخ التهابی، سیگنال درون سلولی را فعال می‌کند. گیرنده‌های TLR4 یکی از اصلی‌ترین گیرنده‌ها در سیستم ایمنی ذاتی می‌باشند و مهم‌ترین وظیفه آن‌ها شناسایی مولکول‌های همراه پاتوژن می‌باشد. این گیرنده‌ها پس از فعال شدن، سبب تولید سایتوکاین‌ها و کموکاین‌های التهابی و همچنین پاسخ‌های آنتی‌ویروسی می‌شوند [۷].

تزریق لیپوپلی ساکارید به گاوها، سبب کاهش قابلیت

تولیدات دامی

دوره ۲۲ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۹

مطالعه اثر غلظت‌های مختلف لیپوپلی ساکارید بر توانایی تکوین برون‌تنی و فراسنجه‌های محیط بلوغ تخمک گوسفند

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی محترم مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع

1. Asaf S, Leitner G, Furman O, Lavon Y, Kalo D and Wolfenson D (2014) Effects of Escherichia coli-and Staphylococcus aureus-induced mastitis in lactating cows on oocyte developmental competence. *Reproduction*. 147(1): 33-43.
2. Bromfield JJ and Sheldon IM (2013) Lipopolysaccharide reduces the primordial follicle pool in the bovine ovarian cortex ex vivo and in the murine ovary in vivo. *Biology of Reproduction*. 88(4): 98, 1-9.
3. Bromfield JJ and Sheldon IM (2011) Lipopolysaccharide initiates inflammation in bovine granulosa cells via the TLR4 pathway and perturbs oocyte meiotic progression in vitro. *Endocrinology*. 152(12): 5029-40.
4. Colonna R and Mangia F (1983) Mechanisms of amino acid uptake in cumulus-enclosed mouse oocytes. *Biology of reproduction*. 28(4): 797-803.
5. Downs SM and Utecht AM (1999) Metabolism of radiolabeled glucose by mouse oocytes and oocyte-cumulus cell complexes. *Biology of reproduction*. 60(6): 1446-52.
6. Dubin N, Bornstein D and Gong Y (1995) Use of endotoxin as a positive (toxic) control in the mouse embryo assay. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 12(2): 147-52.
7. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH and Hwang D (2001) Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *Journal of Biological Chemistry*. 276(20): 16683-9.
8. Lucy M (2001) Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *Journal of dairy science*. 84(6): 1277-93.
9. Magata F, Horiuchi M, Miyamoto A and Shimizu T (2014) Lipopolysaccharide (LPS) inhibits steroid production in theca cells of bovine follicles in vitro: distinct effect of LPS on theca cell function in pre-and post-selection follicles. *Journal of Reproduction and Development*. 2013-124.

در میلی‌لیتر در محیط کشت بلوغ، از تولید بلاستوسیست جلوگیری نموده و ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی ساکارید به‌طور کامل سبب مهار تکوین رویان موش گردید [۶]. تجمع لیپوپلی ساکارید در مایع فولیکولی باعث آسیب به تولید استروئید در فولیکول‌ها می‌شود که ممکن است یکی از مکانیسم‌های درگیر در ناباروری در گاوهای دچار التهاب رحم باشد [۱۷]. کاهش درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست پس از لقاح در پاسخ به افزایش سطح لیپوپلی ساکارید در محیط کشت حاکی از اثرات مخرب لیپوپلی ساکارید در حصول شایستگی تکوین رویان می‌باشد.

اثرات منفی حاصل از افزایش سطح لیپوپلی ساکارید در بیماری‌هایی مانند اسیدوز شکمبه‌ای، بیماری‌های عفونی مانند اندومتریوت و ورم پستان مثل در مطالعات قبلی به اثبات رسیده است. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان می‌دهد، شایستگی تکوین تخمک‌های میش نیز تحت تأثیر اثرات منفی غلظت‌های افزایش‌یافته لیپوپلی ساکارید قرار می‌گیرد. در نتیجه براساس نتایج حاصل از این پژوهش و مطالعات قبلی به‌کارگیری برنامه‌های مدیریتی به‌منظور کنترل عوامل افزایش‌دهنده غلظت لیپوپلی ساکارید در بدن در فصل تولیدمثلی میش می‌تواند از کاهش عملکرد تولیدمثلی دام در نتیجه غلظت‌های بالای لیپوپلی ساکارید جلوگیری کند. وجود تفاوت معنی‌دار در غلظت متابولیت‌های محیط کشت بلوغ در تیمارهای با سطوح مختلف لیپوپلی ساکارید حاکی از این امر است که اثرات منفی لیپوپلی ساکارید می‌تواند از طریق اثر بر متابولیسم انرژی میانجی‌گری گردد. هرچند به‌منظور مشخص کردن مسیر متابولیسمی اثرگذار در این امر نیاز به مطالعات بیشتر جهت اندازه‌گیری متابولیت‌های حساس‌تر و یا آنالیز بیان ژن آنزیم‌های درگیر در مسیرهای متابولیسم انرژی می‌باشد.

تولیدات دامی

دوره ۲۲ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۹

10. Magata F and Shimizu T (2017) Effect of lipopolysaccharide on developmental competence of oocytes. *Reproductive Toxicology*. 71: 1-7.
11. Mani V (2012) Understanding intestinal lipopolysaccharide permeability and associated inflammation.
12. Mogensen TH, (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews*. 22(2): 240-73.
13. Richards JS, Liu Z and Shimada M (2008) Immune-like mechanisms in ovulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 19(6): 191-6.
14. Roth Z, Asaf S, Furman O, Lavon Y, Kalo D and Wolfenson D (2016) Subclinical mastitis disrupts oocyte cytoplasmic maturation in association with reduced developmental competence and impaired gene expression in preimplantation bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*. 28(11): 1653-62.
15. Sheldon IM, Cronin JG, Pospiech M and Turner ML (2018) Symposium review: Mechanisms linking metabolic stress with innate immunity in the endometrium. *Journal of dairy science*. 101(4): 3655-64.
16. Shepel E, Grushka N, Makogon N, Sribna V, Pavlovych S and Yanchii R (2018) Changes in DNA integrity and gene expression in ovarian follicular cells of lipopolysaccharide-treated female mice. *Pharmacological Reports*. 70(6): 1146-9.
17. Shimizu T, Miyauchi K, Shirasuna K, Bollwein H, Magata F and Murayama C (2012) Effects of lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) on estradiol production in bovine granulosa cells from small and large follicles. *Toxicology In Vitro*. 26(7): 1134-42.
18. Soto P, Natzke R and Hansen P (2003) Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F2 α , and the nitric oxide generator, sodium nitroprusside dihydrate, on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *American Journal of Reproductive Immunology*. 50(3): 263-72.
19. Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB and Thompson JG (2010) The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction*. 139(4): 685-95.
20. Zhang R, Ji J, Blaženović I, Pi F, Wang T and Zhang Y (2018) Investigation into Cellular Glycolysis for the Mechanism Study of Energy Metabolism Disorder Triggered by Lipopolysaccharide. *Toxins*. 10(11): 441.
21. Zhao S, Pang Y, Zhao X, Du W, Hao H and Zhu H (2019) Detrimental effects of lipopolysaccharides on maturation of bovine oocytes. *Asian-Australasian journal of animal sciences*. 32(8): 1112.
22. Zhao SJ, Pang YW, Zhao XM, Du WH, Hao HS and Zhu HB (2017) Effects of lipopolysaccharide on maturation of bovine oocyte in vitro and its possible mechanisms. *Oncotarget*. 8(3): 4656.
23. Zheng P, Bavister BD and Ji W (2001) Energy substrate requirement for in vitro maturation of oocytes from unstimulated adult rhesus monkeys. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. 58(3): 348-55.
24. Yang W and Beauchemin K (2006) Effects of physically effective fiber on chewing activity and ruminal pH of dairy cows fed diets based on barley silage. *Journal of Dairy Science*. 89(1): 217-28.