دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

تأثیر ژله رویال، ویتامین C و ویتامین E بر بیان ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در بلوغ برون تنی اووسایت بز

سعید حیدری[۱]، حمید دلدار[۲] و زربخت انصاری پیرسرایی[۳]

۱ و ۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری (نویسنده مسوول: h.deldar@sanru.ac.ir)
تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۲۶

چکیده

هدف از این پژوهش مقایسه بین توان آنتی‌اکسیدانی ژله رویال، ویتامین E و ویتامین C به صورت افزودنی، بر نرخ تکامل و بیان ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در بلوغ برون تنی اووسایت بز بود. برای تهیه اووسایت‌های بز، تخمدان‌ها بلافاصله بعد از کشتار، از لاشه دام جدا و درون فلاسک حاوی سرم فیزیولوژیک به آزمایشگاه منتقل شدند. کمپلکس اووسایت کومولوس از فولیکول‌های آنترال کوچک (۶-۲ میلی متر) تخمدان جدا شدند و در محیط بلوغ اووسایت که حاوی غلظت‌های مشخصی از ژله رویال، ویتامین E، ویتامین C و ویتامین E+ ویتامین C بود، کشت داده شدند. پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی، با شش تیمار آزمایشی شامل تیمارهای شاهد، ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال، ۲۰۰ میکرومول ویتامین E، ۱۰۰ میکرومول ویتامین C، ۲۰۰ میکرومول ویتامین E به همراه ۱۰۰ میکرومول ویتامین C و دی ام اس او (DMSO)[۱] در ده تکرار انجام شد. یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که افزودن ویتامین E و C و ترکیب آنها نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری نرخ بلوغ برون تنی را افزایش داد ولی افزودن ژله رویال به محیط کشت بلوغ اووسایت‌های بز، تفاوت معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد در افزایش نرخ بلوغ نشان نداد. همچنین با اضافه کردن دو ویتامین به صورت ترکیب، بیان نسبی ژن گلوتاتیون پراکسیداز به طور معنی‌داری افزایش یافت و ژن‌های سوپر اکسید دسموتاز و کاتالاز تحت تأثیر تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. می‌توان نتیجه‌گیری کرد که افزودن ویتامین‌های E به همراه ویتامین C نرخ بلوغ و توان آنتی‌اکسیدانی اووسایت را نسبت تیمار ژله رویال بیشتر افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: ژله رویال، ویتامین E، ویتامین C، بلوغ برون نتی، اووسایت بز

مقدمه

مشتقات اکسیژن واکنشگر (ROS)[۲] در محیط‌های برون‌تنی با توجه به غلظت اکسیژن در هوا بلوغ اووسایت را تحت تأثیر قرار داده و موجب به وجود آمدن محیطی نامطلوب برای رشد نمو اووسایت و رویان می‌شود (۳). از آنجایی که آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی در مایع فولیکولی، اویداکت و سلول‌های بدن در شرایط طبیعی درون بدن وجود دارند، هنگامی که اووسایت و رویان در شرایط برون‌تنی کشت داده شوند، این سیستم‌های دفاعی به خوبی کار نکرده و پژوهشگران مجبور هستند که از ترکیبات کمکی و افزودنی آنتی‌اکسیدانی برای هرچه بهتر کردن محیط کشت اووسایت و رویان استفاده کنند. آلفا-توکوفرول (شکل فعال ویتامین E) و اسید آسکوربیک (شکل فعال ویتامین C)، از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی رایج در شرایط آزمایشگاهی جهت بلوغ، لقاح و کشت آزمایشگاهی بوده که در غلظت‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. آلفا-توکوفرول یک آنتی‌اکسیدان محلول در چربی غالب سلول‌های حیوانی بوده که این سلول‌ها را از رادیکال‌های آزاد در شرایط تنی و برون‌تنی محافظت می‌کند (۶). اسید آسکوربیک یک ویتامین محلول در آب بوده که یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها در مایعات برون سلولی در نظر گرفته می‌شود (۷). ژله رویال ترکیبی است که از یک جفت غده مغزی زنبورهای کارگر پرستار به نام غده هیپوفارنژیال ترشح شده و به عنوان ضروری‌ترین ماده غذایی برای رشد ملکه در تمام طول عمر و نیز نوزادان زنبور در مراحل اولیه رشد، محسوب می‌شود (۲۰) و دارای ترکیباتی از جمله؛ آب، پروتئین‌ها، چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها، آمینواسید، ویتامین‌ها، آنزیم‌ها، هورمون، عناصر معدنی و آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی است (۱۹). پژوهش‌ها اثبات کردند که ژله رویال دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است و توانایی مقابله با رادیکال‌های آزاد را دارد (۱۱،۱۴) و نیز می‌تواند سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی درون سلولی را تقویت نماید (۱۷). ژله رویال دارای ترکیبات زیستی فراوان بوده و در پژوهش‌های پیشین (۱۷،۸،۲۲) نیز نشان داده شده است که روی نرخ بلوغ و تولید رویان برون‌تنی نقش بسزایی داشته و افزوده شدن آن به محیط تکامل اووسایت و رشد و نمو رویان موجب بهتر شدن شرایط رشد نمو رویان برون تنی می‌شود. از سوی دیگر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی ژله رویال در مدل‌های مختلف شرایط آزمایشگاهی تجربی روی حیوانات و محافظت آن در برابر تنش اکسیداتیو، ثابت شده است (۲). بر این اساس هدف از این پژوهش مقایسه بین افزودن ژله رویال، ویتامین E و ویتامین C به محیط تکامل اووسایت، و اندازه‌گیری بیان ژن‌های کد کننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در بلوغ برون‌تنی اووسایت بز بود.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی از شرکت سیگما (Sigma - Aldrich) و Gibco خریداری شدند. برای تهیه استوک‌های ژله رویال، ۱۰۰۰ میلی‌گرم ژله رویال خالص (تهیه شده از کندوهای شهرستان فیروزکوه) در ۱۰ میلی‌لیتر Medium 199 حل شد تا به غلظت ده درصد برسد. سپس در اندازه‌های ۱۰۰۰ میکرولیتری الیکوت، و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. برای بلوغ برون‌تنی اووسایت‌ها نیاز به اووسایت

1- Dimethyl Sulfoxide
2- Reactive Oxygen Species

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]
[DOI: 10.29252/rap.9.21.73]

بود که از تخمدان‌های بز موجود در کشتارگاه صنعتی جمع آوری شدند و پس از جمع‌آوری، درون فلاسک آب در دمای ۳۰ تا ۳۳ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شد. تخمدان‌ها در سرم فیزیولوزیک که شامل ۱۰۰۰۰۰ واحد بین المللی پنی سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسین در هر لیتر است، شستشو شدند. کمپلکس اووسایت- کومولوس از فولیکول‌های آنترال کوچک (۲ تا ۶ میلی‌متر) تخمدان جدا شد و کمپلکس‌هایی که ۳ لایه کومولوس یا بیشتر و سیتوپلاسم یکنواخت داشتند را انتخاب و وارد محیط کشت بلوغ اووسایت شدند. قطره‌های محیط کشت با استفاده از محیط تکامل اووسایت استریل آماده شدند. در هر پلیت ۶۰×۱۵ میلی‌لیتری، ۱۰ قطره ۵۰ میکرولیتری از محیط کشت تکامل اووسایت گذاشته شده و روی قطره‌ها با ۱۰ میلی‌لیتر روغن معدنی پوشانیده شد. پلیت قطره‌های تکامل اووسایت به مدت ۲-۱ ساعت در انکوباتور دارای ۵ درصد CO_2، دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و با رطوبت ۹۸ درصد قرار داده شد. پس از شستشوی کمپلکس‌های اووسایت- کومولوس در محلول شستشوی SOF HEPES و شستشوی پایانی آنها (۴-۳ بار) در محیط تکامل استریل ۳۷ درجه سانتی‌گراد، انجام شد. هر ۱۱-۹ کمپلکس اووسایت کومولوس به درون ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت که با روغن معدنی پوشیده شده بود، انتقال یافتند و برای ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. اووسایت‌ها پس از ۲۴ ساعت از قطره‌های محیط کشت خارج شدند و سپس وارد محیط SOF HEPES شدند و سه بار با SOF شستشو شد. پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی، با ۶ تیمار آزمایشی شامل تیمارهای شاهد، ۱۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر ژله رویال، ۲۰۰ میکرو مول ویتامین E، ۱۰۰ میکرومول ویتامین C، ۲۰۰ میکرومول ویتامین E به همراه ۱۰۰ میکرومول ویتامین C و دی ام اس او (DMSO) به‌عنوان حلال ویتامین E در ۱۰ تکرار (۱۰ کمپلکس اووسایت کومولوس در هر تکرار) انجام شد. برای اندازه‌گیری نرخ بلوغ اووسایت، سلول‌های کومولوس از اووسایت به وسیله آنزیم هیالورونیداز جدا شده و اووسایت‌های بدون کومولوس نیز ۳ بار با SOF شستشو شدند و بر اساس دیدن جسم قطبی زیر استریو میکروسکوپ، نرخ اووسایت‌هایی که به مرحله متافاز میوز ۲ (اووسایت‌های بالغ) رسیدند، مشخص شد. به منظور بررسی بیان نسبی ژن‌های آنتی‌اکسیدانی درون سلولی، RNA کل، دست کم از ۵۰ اووسایت لخت شده از هر تیمار جدا شد. در ادامه از کیت RNeasy Micro Kit (QIAGEN, 74004) برای جداسازی RNA کل استفاده شد. برای ساخت cDNA، از کیت (QIAGEN, 205311) Quanti Tec Reves Transcription استفاده شد. برای واکنش Real Time PCR از کیت شرکت Fermentas در حجم‌های ۱۵ میکرولیتری و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) در دستگاه Real Time PCR انجام شد. غلظت آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش ۲ پیکومول در میکرولیتر بود. برای ایجاد منحنی استاندارد از سری رقت‌های با ضریب 10^{-1} به گونه‌ای استفاده شد که غلظت cDNA در آخرین استاندارد به مقدار 10^{-5} برابر کمتر از استاندارد نخست بود. برای اندازه‌گیری بیان نسبی ژن‌ها از روش لیواک استفاده شد. هر یک از نمونه‌ها چرخه آستانه (C_T) در دستگاه Real Time PCR تعیین شد و برای اندازه‌گیری بیان ژن‌ها از روش Livak استفاده شد. بیان ژن YWHAZ به عنوان بیان ژن مرجع مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱) و تیمار شاهد نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. برای تجزیه داده‌ها از رویه GLM (General Model Liner) استفاده شد. هنگامی که آنالیز داده‌ها معنی‌دار شد، آزمون دانکن برای مقایسه میانگین تیمارهای مجزا بکار برده شد. مدل آماری استفاده شده، طرح کاملا تصادفی ($Yij = \mu + Ti + eij$) بود که در این رابطه Y_{ij}، مقدار عددی تکرار jام از تیمار iام، μ میانگین داده، T_i، اثر تیمار iام و e_{ij}، اثر عوامل باقیمانده است. احتمال وجود داشتن تفاوت معنی‌دار در میانگین تیمارهای گوناگون با آزمون دانکن کوچکتر مساوی با ۵ درصد در نظر گرفته شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده برای بیان نسبی ژن‌ها

Table 1. The seqvences primers seed for relative gene of expressions

ژن	آغازگر رفت و برگشت	شماره شناسایی	جفت باز
SOD	F:5′-CAC TTC GAG GCA AAG GGA GA-3′ R:5′-CCA AAC TGA TGG ACG TGG AA-3′	AB201469.1	۹۲
GPX	F:5-GGA TGA AAG TCC AGC CCA AG-3 R:5′-GAC CAT ACC GCT TCA CCA CA-3′	GU131344.1	۱۰۷
CAT	F:5′-CAA TGT TCT GAC GGT AGG GC-3′ R:5′-TTC GCC TTG GAG TAT CTG GT-3′	GQ204786	۱۷۷
YWHAZ	F:5′-TGT AGG AGC CCG TAG GTCATCT-3′ R:5′TTCTCTCTGTATTCTCGAGCCATCT-3′	AY970970	۱۱۵

SOD: superoxide dismutase; GPX: gluthation peroxidase; CAT: catalase; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta

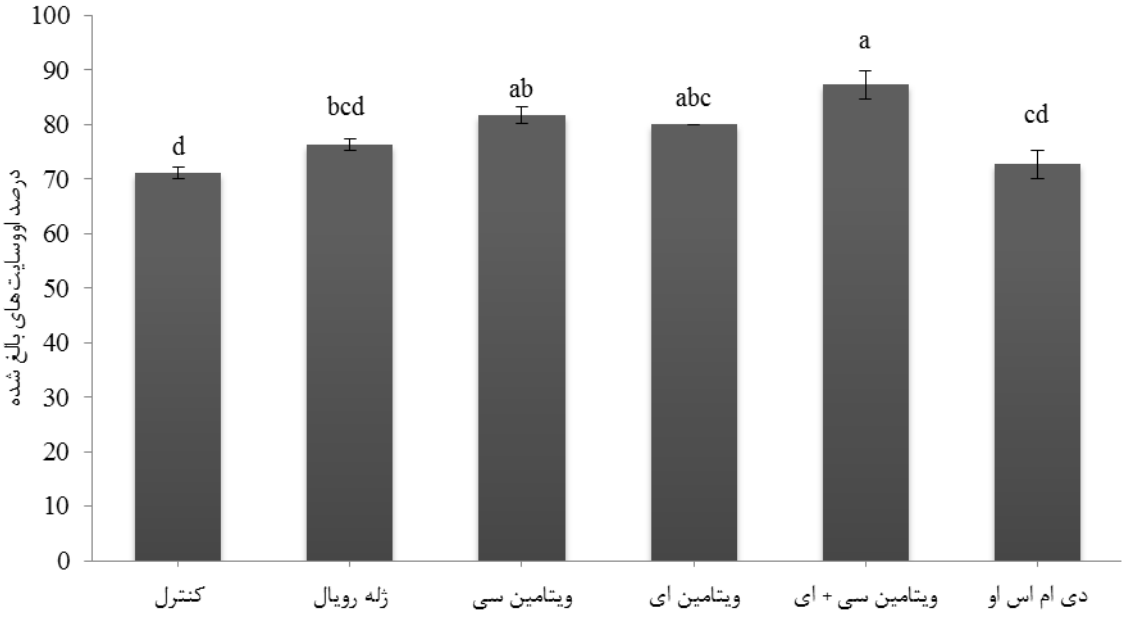
نتایج و بحث

یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان دادند که در تیمار شاهد ۱/۲۶±۷۱/۱ درصد اووسایت‌ها به گامه متافاز میوز ۲ رسیدند. در تیمار ژله رویال با غلظت۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۲/۵۵±۷۶/۲۶ درصد اووسایت‌ها به مرحله بلوغ هسته‌ای رسیدند. در تیمار ویتامین C با غلظت ۱۰۰ میکرومول، در ۲/۳۵± ۸۲/۸۲ درصد از اووسایت‌ها بلوغ مشاهده شد، در تیمار ویتامین E، با غلظت ۲۰۰ میکرومول، ۸۰ درصد اووسایت‌ها به بلوغ رسیدند. در تیمار مجموع ویتامین E و ویتامین C، ۴/۴۵±۸۷/۲۶ درصد اووسایت‌ها به مرحله بلوغ رسیدند و در تیمار دی ام اس او، در ۳/۳۱±۷۲/۶۵ درصد اووسایت‌ها، بلوغ دیده شد. یافته‌های حاصل از این پژوهش

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.73]

نشان داد که اضافه کردن غلظت‌های مشخص ویتامین E و ویتامین C، به محیط کشت، نرخ بلوغ برون تنی اووسایت‌ها را به طور معنی‌داری ($p <$ ۰/۰۵) نسبت به گروه شاهد و حتی تیمار ژله رویال افزایش داد (شکل ۱). ولی با توجه به شکل ۱، افزودن ژله رویال به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان به محیط کشت بلوغ اووسایت‌های بز، تفاوت معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان نداد. بسیار مهم است که برای حفاظت اووسایت و رویان در شرایط برون تنی، با اضافه کردن آنتی‌اکسیدان به محیط کشت، شرایط بهینه برای بلوغ اووسایت و تولید رویان را فراهم کرد (۸). از بین بردن فرایند اکسیداسیون و یا کاهش آن یکی از عوامل مؤثر افزایش راندمان بلوغ برون تنی اووسایت و بهبود تولید رویان در شرایط برون تنی است (۱۷،۲۲). با توجه به اینکه افزودن دو ویتامین E و ویتامین C به صورت ترکیب به محیط بلوغ اووسایت‌ها، سبب افزایش نرخ بلوغ اووسایت شده و همچنین اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها از جمله ژله رویال داشته است، می‌توان به این قضیه پی برد که ژله رویال به خاطر دارا بودن مخلوطی از پروتین‌ها، چربی‌ها، ویتامین‌ها، هورمون‌ها و غیره موجود در ژله رویال که به صورت ترکیب و یک کمپلکس در کنار هم قرار گرفته و وارد محیط شده و احتمالا نتوانسته به اندازه ترکیبات خالص ویتامین‌های E، C روی بلوغ برون تنی اووسایت‌ها تأثیر گذار باشد.

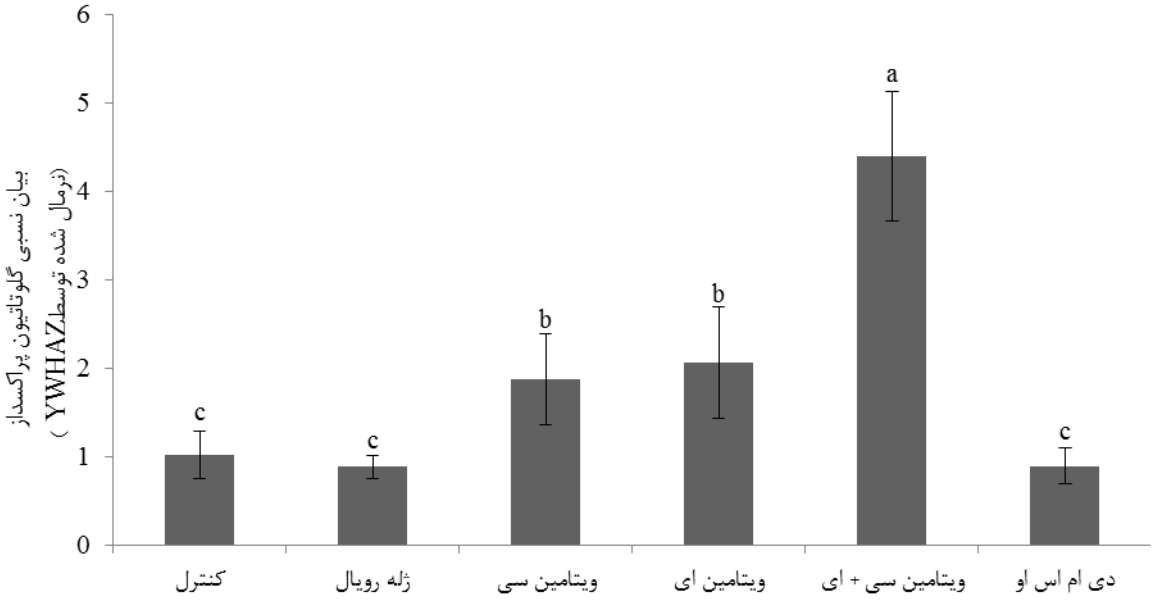


شکل ۱- تأثیر افزودن ویتامین‌های E، C و ژله رویال بر بلوغ برون تنی اووسایت بز
Figur 1. Effect of vitamin E, C and royal jelly on *in vitro* maturation of goat oocyte

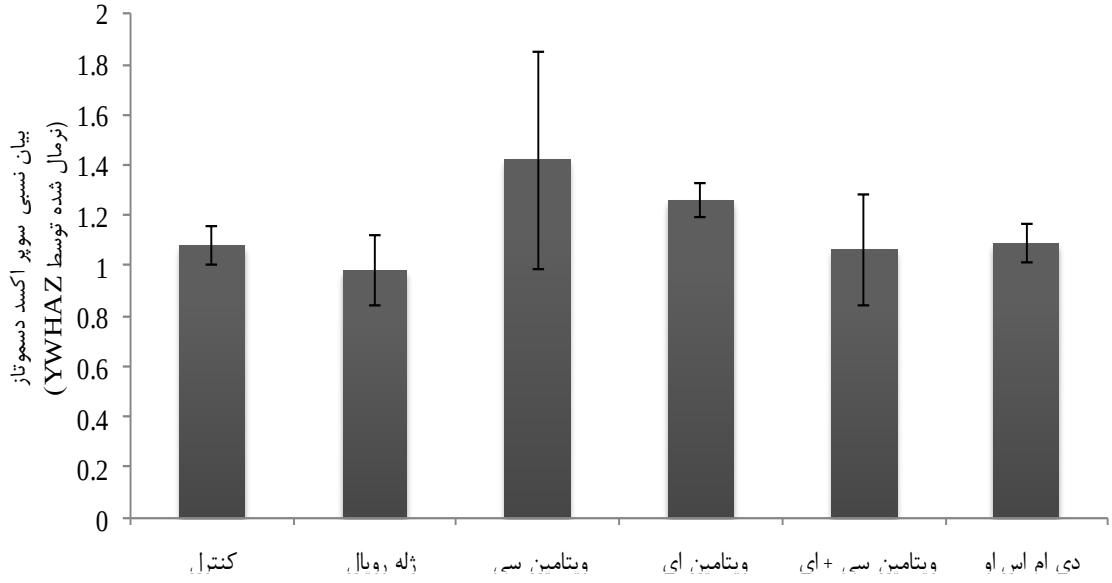
از طرفی دیگر به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی ژله رویال، افزودن آن باعث بهبود نرخ بلوغ اووسایت نسبت به تیمار شاهد شده است ولی این اختلاف به صورت معنی‌دار نبوده است. با این وجود، ولی‌الله‌پور و همکاران (۲۲) نشان دادند که افزودن ژله رویال به محیط کشت برون‌تنی اووسایت، به طور چشمگیری نرخ بلوغ اووسایت گوسفند را افزایش داده است. در پژوهشی دیگر، استفاده از ژله رویال با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر موجب افزایش نرخ بلوغ برون تنی اووسایت بز و کاهش رادیکال‌های آزاد شد (۱۷،۸). همچنین مشاهده شد که افزودن ژله رویال به محیط کشت برون‌تنی اووسایت گوسفند، به‌طور معنی‌داری موجب افزایش نرخ بلوغ و نرخ لقاح برون‌تنی و بیان نسبی ژن‌های کلیدی مسیرگلایکولایسیز و پنتوز فسفات در سلول‌های کومولوس گوسفند می‌شود (۱۷). اثر آنتی‌اکسیدانی از ژله رویال و دیگر محصولات زنبور عسل توسط سنجش توانایی‌های مهار رادیکال سوپر اکسید مشاهده شده است (۱۲). ژله رویال، ویتامینC و ویتامین E با خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و توقف فرایند اکسیداسیون، سبب افزایش نرخ بلوغ و همچنین افزایش بیان برخی از ژن‌های کد کننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در بلوغ برون تنی اووسایت بز شدند (شکل ۲). رادیکال‌های آزاد باعث تخریب عناصر سلولی مهم مانند DNA، پروتئین و کربوهیدرات‌ها می‌شوند و از این راه به عملکرد مناسب سلول آسیب می‌رسانند. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد رادیکال‌های آزاد، بلوغ برون تنی اووسایت‌ها را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند و باعث کاهش نرخ بلوغ اووسایت می‌شوند، هچنین می‌توانند چرخه سلولی اووسایت را متوقف کرده و موجب مرگ اووسایت‌های کشت داده شده شوند (۶). یافته‌های بیان نسبی ژن‌های آنتی‌اکسیدانی درون سلولی نشان دادند که بیان نسبی ژن گلوتاتیون پراکسیداز (شکل ۲) به طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت ($p<$۰/۰۵)، اما بیان نسبی ژن‌های کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند (شکل‌های ۳ و ۴). در این پژوهش دیده شد که بیان نسبی ژن گلوتاتیون پراکسیداز در تیمار ویتامین C و E تفاوت چهار برابری نسبت به تیمار ژله رویال نشان داد.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]
[DOI: 10.29252/rap.9.21.73]

گلوتاتیون پراکسداز یک آنزیم آنتی‌اکسیدان سلولی مؤثر است که رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برد؛ پژوهشی گزارش کرد که مصرف خوراکی ژله رویال موجب کاهش بیان ژن آنزیم سیتوکروم P450 (CYP4A14) می‌شود و از این راه موجب افزایش بیان ژن آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز می‌شود (۱۳). گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز به منظور عملکرد رشدی اووسایت مورد نیاز هستند و نیز در کاهش تنش اکسیداتیو در اووسایت نقش اساسی دارند، یافته‌های دیگر نشان داد که ارتباط مستقیمی بین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش بلوغ سیتوپلاسمی و هسته‌ای اووسایت نیز وجود دارد (۶).



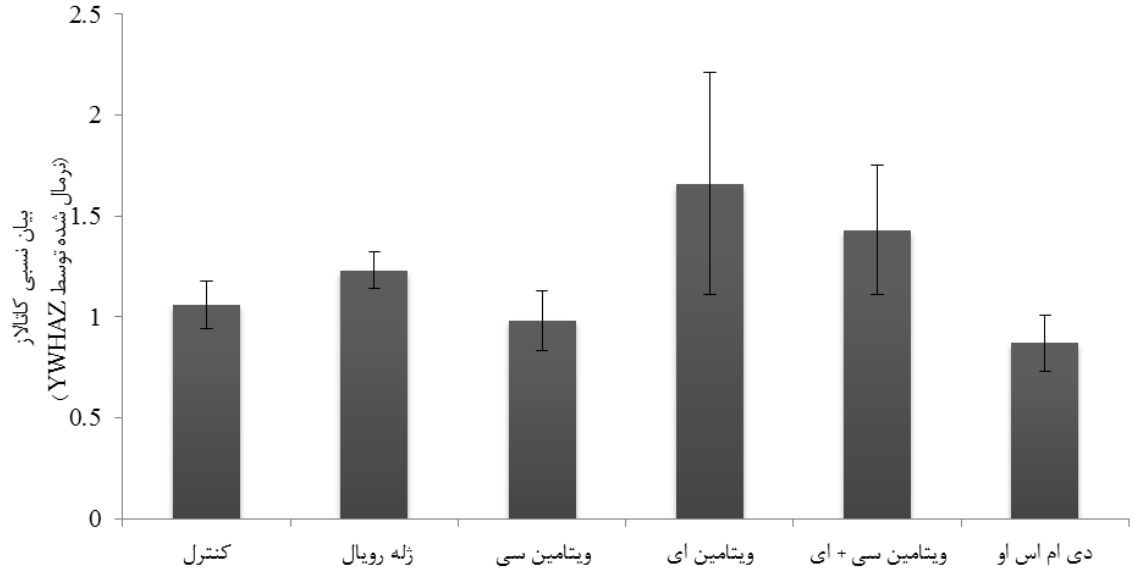
شکل ۲- تأثیر افزودن ویتامین‌های E، C و ژله رویال بر بیان نسبی ژن گلوتاتیون پراکسیداز در اووسایت بز
Figure 2. Effect of vitamin E, C and royal jelly on gluthation prtoxidase relative gene expression in goat oocyte



شکل ۳- تأثیر افزودن ویتامین‌های E، C و ژله رویال بر بیان نسبی ژن سوپراکسیددسموتاز در اووسایت بز
Figure 3. Effect of vitamin E, C and royal jelly on superoxide dismutase relative gene expression in goat oocyte

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.73]



شکل ۴- تأثیر افزودن ویتامین‌های E، C و ژله رویال بر بیان نسبی ژن کاتالاز در اووسایت بز
Figure 4. Effect of vitamin E, C and royal jelly on catalase relative gene expression in goat oocyte

ویتامین E به‌عنوان یک ماده محلول در چربی بوده که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. مشخص شده که ویتامین E نقش مهمی در پیشگیری از تولید چربی و واکنش تنش اکسیداتیو به وسیله مهار رادیکال‌های آزاد دارد (۱). پژوهش الحسن و همکاران (۷)، به تأثیر سلنیوم و ویتامین E که به‌عنوان یک اثر آنتی‌اکسیدانی مفید بر روی لقاح و رشد و نمو اولیه مصنوعی اووسایت بالغ بود، گزارش کردند که ویتامین E به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی توانایی دارد از آسیب‌های سلولی به وسیله نگهداری گروه سولفیدریل، پروتئین‌های متصل شونده به غشا و از بین بردن رادیکال‌های آزاد جلوگیری کند (۷). آسکوربات یک آنتی‌اکسیدان قوی بوده که مقاومت لیپوپروتئین‌ها را در برابر اکسیداسیون ناشی از یون‌های فلزی افزایش می‌دهد. در پژوهشی، اسید آسکوربیک، DNA را در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند (۶،۱۳). اسید آسکوربیک مانع آسیب DNA شده و بنابراین نقش حیاتی آنتی‌اکسیدانی در حفاظت از گامت و رویان بازی می‌کند (۲۲). فزون بر این، آسکوربات، در غلظت‌های فیزیولوژیک، موجب آزاد شدن هایپوتائورین و تائورین توسط سلول‌های اپیتلیال لوله رحمی می‌شود (۲۲). ویژگی آنتی‌اکسیدانی اسید آسکوربیک این است که رادیکال‌های آزاد اکسیژن مانند سوپراکسیدآنیون (O_2)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) را غیر فعال می‌کند و از این راه از بافت‌ها محافظت می‌نماید و افزایش‌دهنده درصد فولیکول‌هایی است که یکپارچگی غشای پایه را حفظ می‌کنند (۳). تولید H_2O_2 ناشی از ROS، آماده سازی محیط مکمل اسپرم، به طور قابل توجهی توسط ویتامین C به همراه ویتامین E کاهش می‌یابد (۱۰). درمان ترکیبی با ۴۰۰ میلی‌گرم گلوتاتیون و ۲۰۰ میلی‌گرم ویتامین C و ۲۰۰ میلی‌گرم ویتامین E به مدت ۲ ماه غلظت اسپرم را به طور قابل توجهی بهبود داد و آسیب اکسیداتیو DNA را کاهش داد (۱۶). اولسن و همکاران (۱۸)، محیط کشتی برای رشد رویان گاو با ترکیب ۱۰۰ میکرومولار ویتامین E و ۱۰۰ میکرومولار ویتامین C تهیه کردند که باعث بهبود رشد رویان و افزایش شمار بلاستوسیست به دست آمده شد. مارتوز و همکاران (۱۶) نشان دادند که اسیدهای آلی موجود در ژله رویال، مانند اسید گلوکونیک، اسید مالیک و اسید سیتریک، موجب افزایش اثر فلاونوئیدها شده و از این راه موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شوند. گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز به منظور عملکرد رشدی اووسایت مورد نیاز هستند و نیز در کاهش تنش اکسیداتیو در اووسایت نقش اساسی دارند (۱۶). یافته‌ها نشان داد که ارتباط مستقیمی بین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش بلوغ سیتوپلاسمی و هسته‌ای اووسایت، و در نتیجه بهبود نرخ بلاستوسیست، وجود دارد (۴).

یافته‌های آزمایش حاضر نشان داد که افزودن ترکیب ویتامین‌های C و E نسبت به تیمار ژله رویال توانسته از نرخ بلوغ اووسایت‌ها بهتر حمایت کند. همین اثر در بیان نسبی ژن گلوتاتیون پراکسی‌داز نیز دیده شد. احتمالا این تأثیرها به استفاده خالص ترکیبات ویتامینی نسبت به ژله رویال بر می‌گردد که نتایج بهتری را نسبت به ژله رویال ایجاد کردند. استفاده از بخش‌های مختلف محلول در آب یا محلول در چربی و یا خالص‌سازی ترکیباتی پروتینی ژله رویال و استفاده از آن‌ها در فرایند تولید برون تنی رویان در پژوهش‌های آینده اجتناب‌ناپذیر است.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]
[DOI: 10.29252/rap.9.21.73]

منابع

1. Asadi, E., M. Jahanshahi and M.J. Golalipour. 2012. Effect of Vitamin E on Oocytes Apoptosis in Nicotine-Treated Mice. Iranian Journal of Basic Medical Science, 3: 880-884.
2. Aslan, A., M. Cemek, M.E. Buyukokuroglu, K. Altunbas, O. Bas and Y. Yurumez. 2012. Royal jelly can diminish secondary neuronal damage after experimental spinal cord injury in rabbits. Food and Chemical Toxicology, 50: 2554-2559.
3. Barzegari Firozabadi, F. 2001. Effect of in vitro ascorbic acid and FSH on oocyte maturation and mouse follicles. Scientific Journal of Medical University shahid sadoghi yazd, 19: 586-597.
4. Cetica, P.L. and G. Pintos. 2002. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. Reproduction, 124: 675-681.
5. Chow, C.K. 1991. Vitamin E and oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine, 11: 215-232.
6. Donnelly, E.T., N. McClure and S.E. Lewis. 1999. The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. Mutagenesis, 14: 505-512.
7. Elhassan, Y.M. and R.W. Wright. 1995. The effect of selenium and vitamin E addition on cleavage rate of IVM/IVF bovine oocytes. Theriogenology, 43: 206-273.
8. Eshtiyaghi, M., H. Deldar and Z. Ansari pirsaraei. 2016. Royal jelly may improve the metabolism of glucose and redox state of ovin oocytes matured in vitro and emdryonic development following in vitro fertilization. Theriogenology, 86: 2210-2221.
9. Fraga, C.G., P.A. Motchnik and M.K. Shigenaga. 1991. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. Proceedings of the National Academy of Sciences, 88: 11003-11006.
10. Guerin, P. and Y. Menezo. 1995. Hypotaurine and taurine in gamete and embryo environments: de novo synthesis via the cysteine sulfinic acid pathway in oviduct cells. Zygote, 3: 333-343.
11. Guo, H., Y. Kouzuma and M. Yonekura. 2008. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. Food Chemistry, 113: 238-245.
12. Jamnik, P., D. Goranovic and P. Raspor. 2007. Antioxidative action of royal jelly in the yeast cell. Experimental Gerontology, 42: 594-600.
13. Kamakura, M., M. Maebuchi., S. Ozasa and T. Ogawa. 2005. Influence of royal jelly on mouse hepatic gene expression and safety assessment with a DNA microarray. Nutritional Science and Vitaminology, 51: 148-155.
14. Karadeniz, A., N. Simsek, E. Karakus, S. Yildirim, A. Kara, I. Can, F. Kisa, H. Emre and M. Turkeli. 2011. Royal Jelly Modulates Oxidative Stress and Apoptosis in Liver and Kidneys of Rats Treated with Cisplatin. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 10 pp.
15. Kodama, H., R. Yamaguchi, J. Fukuda, H. Kasai and T. Tanaka. 1997. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. Fertility and Sterility, 68: 519-524.
16. Martos, M., Y.R. Navajas, J.F. Lopez and J.A.P. Alvarez. 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. Journal of Food Science, 73: 117-124.
17. Mohammadi, S., H. Deldar and Z. Ansari pirsaraei. 2015. Effect of royal jelly on genes expression of antioxidant enzymes in in vitro maturation of goat oocytes. Master's thesis at Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources,
18. Olson, S.E. and G.E. Seidel. 2000. Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. Biology of Reproduction, 62: 248-252.
19. Pavel, C.L., L.A.O. Marghitas, D.S. Bobis, A. Dezmirian, I. Sapcaliu and M.N. Madas. 2011. Biological activities of royal jelly. Animal Science and Biotechnology, 44: 108-118.
20. Pourmoradian, S., R. Mahdavi, M. Mobasseri, E. Faramarzi and M. Mobasseri. 2012. Effects of royal Jelly supplementation on body weight and dietary intake in type 2 diabetic females. Health Promotion Perspectives, 2: 231-235.
21. Shariatzade, S., M. Soleymani Mehranjani, A. Hamta and M. Ghandizade. 2012. Study the effect of vitamin E on the structure and number of ovarian follicles during ovarian development in rats treated with sodium arsenite (sterological examination). Arak University of Medical Sciences Scientific Journal, 15: 54-64.
22. Valiollahpoor Amiri, M., H. Deldar and Z. Ansari Pirsaraei. 2016. Impact of supplementary royal jelly on in vitro maturation of sheep oocytes: genes involved in apoptpsis and embryonic development. System Biology in Reproductive Medicine, 62: 31-38.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.73]

Effect of Royal Jelly, Vitamin C and Vitamin E on Genes Expression of Antioxidant Enzymes in *in vitro* Maturation of Goat Oocytes

Saeed Heydari[1], Hamid Deldar[2] and Zarbakht Ansari Pirsaraei[3]

1 and 3- Graduate Student and Associate Professor, Department of Animal Science, Sari Agricultural Sciences and Naural Resources University
2- Associate Professor, Department of Animal Science, Sari Agricultural Sciences and Naural Resources University
(Corresponding author: h.deldar@sanru.ac.ir)
Received: February 14, 2018 Accepted: May 16, 2018

Abstract

The purpose of this study was to compare the antioxidant ability of royal jelly, vitamin E and vitamin C as additives to the maturation media on *in vitro* maturation of goat oocyte. To prepare goat oocytes, ovaries collected from local slaughterhouse were transported to the laboratory into the flask containing warm saline (30-34^{o}C) in less than an hour. Cumulus oocyte complexs were removed from small antral follicles (2-6 mm) with slicing method, and were transferred to IVM medium. Cumulus oocyte complexs were put in maturation medium for 24 hours, and were reached to metaphase meiosis II (nuclear maturation). This study was performed in a completely randomized design, with six treatments included control, 10 mg/mL royal jelly, 200 µM of vitamin E, 100 µM of vitamin C, 200 µM of vitamin E + 100 µM of vitamin C and DMSO (as a solvent of vit E) in ten replicates. The results of this study showed that addition of royal jelly, vitamin E and vitamin C to the maturation medium, increased *in vitro* maturation rate of goat oocyte in comparison of control group. Supplementation of vitamin E, vitamin C and their combination significantly increased the oocyte meiotic maturation rate (87.26% ± 4.45) compared with the royal jelly (76.26% ± 2.55) and the control group (71.1% ± 1.26). Also, the addition of vitamin E + vitamin C combination was significantly increased relative gene expression of glutathione peroxidase but the superoxide dismutase and catalase were not affected by the treatment groups. In conclusion, the combination of vitamin C and vitamin E improved maturation rate and redox status of oocyte during *in vitro* maturation.

Keywords: Goat Oocytes, In vitro maturation, Royal Jelly, Vitamin E, Vitamin C

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.73]