دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

ارزیابی اثر کامپفرول بر قابلیت تکوین برون‌تنی تخمک گوسفند در شرایط التهاب ناشی از لیپوپلی‌ساکارید

سپیده حیدری[۱]، عبدالله محمدی سنگ چشمه[۲]، اکرم عیدی[۳]، فاطمه کوهکن[۴] و اوا توردا[۵]

۱- دانشجوی دکتری سلولی- تکوینی جانوری، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
۲- استادیار فیزیولوژی، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت (نویسنده مسوول: amohammadis@ut.ac.ir)
۳- استاد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
۴- دکتری ژنتیک مولکولی، عضو هیات علمی گروه بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک، مرکز تحقیقات بن یاخته، تهران
۵- استاد فیزیولوژی جانوری، گروه بیوتکنولوژی و علوم تغذیه، دانشگاه اسلواکی، نیترا

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۲۳
صفحه: ۱۲۶ تا ۱۳۳

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: امروزه آندوتوکسمی یکی از مهم‌ترین علل ناباروری در حیوانات مختلف یا انسان در اثر عفونت‌های مختلف باکتریایی است که این روند ناشی از ورود لیپوپلی‌ساکارید موجود در دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی به داخل گردش خون می‌باشد. لیپوپلی‌ساکارید در فرآیندهای پاتوژنی که منجر به ورم پستانی و التهاب رحم می‌شود، دخالت دارد. مطالعه حاضر با هدف بررسی التهاب ناشی از لیپوپلی‌ساکارید و اثر محافظتی کامپفرول که یک فلاونوئید طبیعی است و دارای خواص ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد بر قابلیت تکوین برون‌تنی تخمک گوسفند انجام شد.

مواد و روش‌ها: برای این منظور تخمک‌ها در محیط کشت بلوغ در آزمایش اول با غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۰۱، ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکارید، در آزمایش دوم با غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار از کامپفرول و در آزمایش سوم با غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار از کامپفرول به همراه لیپوپلی‌ساکارید به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. بعد از بلوغ برون‌تنی، تخمک‌های بالغ شناسایی و با اسپرم انکوبه شده لقاح داده شدند و درصد تسهیم و بلاستوسیست بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج بدست آمده نشان داد غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکارید منجر به کاهش معنی‌دار درصد بلاستوسیست در مقایسه با گروه کنترل شد ($p<0/05$)، اما مکمل‌سازی محیط کشت بلوغ با غلظت‌های مختلف کامپفرول تأثیری بر درصد تسهیم و بلاستوسیست تخمک‌ها نشان نداد ($p>0/05$). به‌علاوه نتایج مربوط به غلظت‌های مختلف کامپفرول به همراه لیپوپلی‌ساکارید نشان می‌دهد که کامپفرول اثر معنی‌داری بر درصد تسهیم و بلاستوسیست تخمک‌ها در شرایط التهاب ناشی از لیپوپلی‌ساکارید ندارد ($p>0/05$).

نتیجه‌گیری: به‌طور خلاصه با توجه به داده‌های به‌دست آمده می‌توان نتیجه گرفت، لیپوپلی‌ساکارید وابسته به غلظت اثرات منفی بر تکوین تخمک گوسفند دارد و کامپفرول در بهبود این اثرات مؤثر نیست.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، بلاستوسیست، بیماری عفونی، عملکرد تولیدمثلی، گوسفند

مقدمه

به خوبی شناخته شده است که بیماری‌های التهابی با اختلال در باروری نشخوارکنندگان پس از زایمان همراه است (۲۰). اغلب اندام تولید مثلی دام، به‌علت کاهش سیستم ایمنی بعد از زایمان درگیر عفونت‌های باکتریایی شده که یک مشکل عمده در مدیریت تولیدمثل می‌باشد و موجب ضررهای اقتصادی هنگفتی به صنعت دامپروری می‌شود (۱۹). امروزه آندوتوکسمی یکی از مهمترین علل ناباروری در حیوانات مختلف یا انسان در اثر عفونت‌های مختلف باکتریایی است که این روند ناشی از ورود لیپوپلی‌ساکارید موجود در دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی به داخل گردش خون می‌باشد (۱۴). لیپوپلی‌ساکارید در مایع فولیکولی گاوهایی که اندومتریوزیس دارند، شناسایی شده است که نشان‌دهنده ارتباط بین التهاب رحم، تولید لیپوپلی‌ساکارید و عملکرد فولیکولی است که نه تنها موجب عفونت رحمی می‌شود بلکه با تجمع در مایع فولیکولی موجب کاهش رشد فولیکول، تسریع در پس رفتن فولیکول (آترزیا) و کاهش نرخ رشد و نمو تخمک می‌شود (۱۸). لیپوپلی‌ساکارید توسط گیرنده TLR4 در کمپلکس با گیرنده‌های MD2/CD14، در انواع سلول‌ها خصوصاً در منوسیت‌ها و ماکروفاژها شناخته می‌شود (۲۲)، که با یک پاسخ التهابی سبب راه‌اندزی سیگنالینگ‌های درون سلولی شده و منجر به فعال سازی NF-κB و MAPK گردیده و سبب رونویسی ژن‌های سایتوکین‌های پیش التهابی مانند IL1، TNFα و IL6 می‌شود (۲). گزارشاتی مبنی بر اثر لیپوپلی‌ساکارید و سایتوکین‌های مانند IL1 و TNFα بر مرگ فولیکولی (۱۲)، مهار تخمک‌گذاری (۱۰)، اختلال در میوز (۱۶) و کاهش رشد بلاستوسیست شده است (۲۸). علاوه بر التهاب‌زایی، لیپوپلی‌ساکارید مستقیما" بر وضعیت ردوکس درون سلولی تأثیر می‌گذارد و با افزایش ترشح فاکتورهای پیش از آپوپتوز باعث بروز آپوپتوز می‌شود (۳). تعداد زیادی مطالعات نشان داده است که افزودن لیپوپلی‌ساکارید به محیط بلوغ تخمک باعث ایجاد استرس اکسیداتیو، اختلال در میوز و کاهش تولید بلاستوسیست می‌شود (۱۷). مطالعات نشان می‌دهند که آنتی‌اکسیدان‌های MogrosidV و پروسیانیدین می‌توانند تولید رادیکال آزاد ناشی از لیپوپلی‌ساکارید را کاهش داده و باعث مهار آپوپتوز تخمک و سلول‌های کومولوس شوند (۱۱). بنابراین یک راه محافظت از تخمک‌ها از عوامل اکسیداتیو، مکمل نمودن محیط کشت با ترکیبات

آنتی‌اکسیدان است (۱). به‌طورکلی برای درمان التهاب ناشی از لیپوپلی‌ساکارید از آنتی‌بیوتیک و آنتی‌اکسیدان استفاده می‌شود که این مواد می‌توانند نفوذ سلول‌های التهابی را مهار و بیان واسطه‌های التهابی را کاهش دهند (۱۵). کامپفرول یک فلاونوئید است که بطور طبیعی در انواع میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شود و دارای طیف گسترده ای از خواص دارویی از جمله اثر ضد التهابی، اثر آنتی‌اکسیدانی و اثرات ضد آپوپتیک می‌باشد (۲۱)، که رادیکال آزاد را از بین می‌برد و توانایی سلول‌ها را برای مقاومت استرس اکسیداتیو افزایش می‌دهد (۱۳). در التهاب ریوی حاد ناشی از لیپوپلی‌ساکارید مشخص شد که خاصیت ضد التهابی کامپفرول بیان سایتوکین‌ها را از طریق مهار مسیر NF-κB کاهش می‌دهد (۴). علاوه بر این گزارش شده است که کامپفرول ترشح IL1، TNFα و IL6 ناشی از لیپوپلی‌ساکارید را با مهار فعال‌سازی مسیر ۸۸MyD/۴TLR کاهش می‌دهد (۵). اگر چه عملکرد کامپفرول به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است، با این حال اینکه آیا کامپفرول می‌تواند تخمک‌های گوسفند را از نقایص تکوین تخمک در شرایط التهاب ناشی از لیپوپلی‌ساکارید نجات دهد مشخص نیست. از طرفی با توجه به اثرات مختلف کامپفرول بر سرکوب التهاب و این حقیقت که اثرات لیپوپلی‌ساکارید بر تکوین تخمک می‌تواند نقش مهمی در به کارگیری برنامه‌های مدیریتی به‌منظور کنترل عوامل افزایش‌دهنده لیپوپلی‌ساکارید در دوره تولیدمثل داشته باشد و از کاهش عملکرد تولید مثل دام جلوگیری کند، در این مطالعه تأثیر توأم لیپوپلی‌ساکارید و کامپفرول به‌عنوان هدف اصلی کار انتخاب گردید تا اثر متقابل آنها مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و بلوغ برون‌تنی تخمک‌ها (IVM):

تخمدان‌های گوسفند از کشتارگاه و از میش‌های بالغ بلافاصله پس از کشتار جمع‌آوری شدند و به محض رسیدن تخمدان‌ها به آزمایشگاه، چندین بار با سرم فیزیولوژیک گرم (۳۲-۳۷ درجه سانتی‌گراد) شسته شدند. سپس، مجموعه تخمک کومولوس به روش آسپیراسیون (مکشی) از فولیکول‌های آنترال کوچک (قطر سه تا هفت میلی متر) با استفاده از سرنگ ۱۰ سی‌سی جداسازی و در زیر استریومیکروسکوپ جمع‌آوری شدند. تخمک‌های با کیفیت انتخاب شدند (تخمک‌های حاوی حداقل سه لایه سلول کومولوس، سیتوپلاسم یکنواخت و رنگ قهوه‌ای تیره) و در گروه‌های ۱۰تایی به قطرات ۱۰۰ میکرولیتری از محیط بلوغ پایه شامل TCM-۱۹۹ (Tissue Culture Medium-199) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، ۲/۵ میکروگرم در لیتر هورمون لوتئینه، ۲/۵ میکروگرم در لیتر هورمون محرک فولیکول (FSH) و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بتا استرادیول منتقل شدند و به مدت ۲۴ ساعت در زیر روغن معدنی داخل انکوباتور با دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد گاز کربنیک در شرایط حداکثر رطوبت کشت داده شدند.

لقاح برون‌تنی تخمک‌ها (IVF): تخمک‌های بالغ شده پس از چندبار شستشو داخل محیط شستشو (HEPES TALP)، در گروه‌های ۵ تایی به داخل قطرات ۵۰ میکرولیتری از محیط لقاح (IVF-TALP) منتقل شدند. یک ساعت قبل از انتقال تخمک‌ها به محیط لقاح، اسپرم آماده می‌شود. به این صورت که قبل از لقاح برون‌تنی یک پایوت اسپرم داخل آب ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، پس از گذشت ۱ دقیقه محتوای پایوت داخل تیوب حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط شستشو اسپرم (SPERM-TALP) ریخته و به مدت ۵ دقیقه با ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از حذف قسمت بالایی رسوب، به آرامی ۲ میلی‌لیتر محیط شستشو اسپرم روی رسوب ریخته شد و با زاویه ۴۵ درجه داخل انکوباتور قرار گرفت و پس از گذشت ۱ ساعت ۱ میلی‌لیتر از سطح محیط به داخل میکروتیوب منتقل شد. سپس رقت ۱ میلیون اسپرم به ازای هر میلی‌لیتر محیط تهیه و ۵ میکرولیتر از آن در زیر میکروسکوپ به قطرات محیط لقاح که در هر قطره ۱۰ تخمک قرار دارد، افزوده شد. قطره‌ها در زیر روغن معدنی و ۹۰ درصد گاز نیتروژن با حداکثر رطوبت به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شدند.

کشت برون‌تنی رویان (IVC): پس از لقاح، زایگوت‌های احتمالی به مدت ۲ دقیقه داخل محیط شستشو (HEPES SOF) پیپتاژ و از سلول‌های کومولوس جدا شدند. سپس در گروه‌های ۱۰ تایی در قطرات ۵۰ میکرولیتری به محیط کشت جنینی (SOF) که با ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سرم آلبومین گاوی مکمل شده بود، منتقل و روی آن‌ها با روغن معدنی پوشانده شد و در شرایط ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد گاز کربنیک و ۵ درصد اکسیژن داخل انکوباتوربه مدت ۹ روز کشت داده شدند. درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست به ترتیب در روز ۳ و ۹ پس از کشت محاسبه و ثبت شد.

طراحی آزمایش

آزمایش اول: ارزیابی اثر افزودن لیپوپلی‌ساکارید در محیط کشت بلوغ بر درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست

در این آزمایش از غلظت‌های مختلف (صفر (کنترل)، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) لیپوپلی‌ساکارید طی بلوغ تخمک در شرایط برون‌تنی به منظور تعیین غلظت مؤثر لیپوپلی ساکارید با اثر مخرب بر قابلیت تکوین تخمک استفاده شد.

آزمایش دوم: ارزیابی اثر افزودن کامپفرول در محیط کشت بلوغ بر درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست

در این آزمایش از غلظت‌های مختلف (صفر (کنترل)، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار) کامپفرول در طی بلوغ تخمک در شرایط برون‌تنی به منظور تعیین غلظت مؤثر کامپفرول بر قابلیت تکوین تخمک استفاده شد.

آزمایش سوم: ارزیابی اثر افزودن کامپفرول در محیط کشت بلوغ در حضور حداقل غلظت مؤثر لیپوپلی‌ساکارید بر درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست

در این آزمایش از غلظت‌های مختلف (کنترل (بدون کامپفرول و لیپوپلی‌ساکارید)، صفر (بدون کامپفرول)، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار) کامپفرول به‌همراه حداقل غلظت مؤثر لیپوپلی‌ساکارید طی بلوغ تخمک در شرایط برون‌تنی به منظور تعیین غلظت مؤثر کامپفرول بر قابلیت تکوین تخمک در شرایط التهاب ناشی از لیپوپلی‌ساکارید استفاده شد.

آنالیز آماری

برای تعیین ارتباط بین متغیر مستقل (تیمارهای آزمایشی) و متغیرهای وابسته (درصد تسهیم و بلاستوسیست) از تابعیت لجستیک با مدل خطی تعمیم یافته GLM (Generalized Linear Model) با استفاده از نرم‌افزار آماری R (نسخه ۳/۱/۰) انجام شد و در تمامی موارد ($p < ۰/۰۵$) معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج و بحث

آزمایش اول: ارزیابی اثر افزودن لیپوپلی‌ساکارید در محیط کشت بلوغ بر درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست

تعداد ۷۳۳ عدد تخمک در ۱۰ تکرار داخل محیط بلوغ حاوی غلظت‌های صفر، ۰۱ /۰، ۱ /۰، ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید قرار گرفت. همان طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، بر اساس آنالیز آماری نتایج میزان درصد تسهیم در گروه تخمک‌های تیمار شده با لیپوپلی‌ساکارید در غلظت‌های ۰۱ /۰، ۱ /۰ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$)، اما میزان درصد تسهیم تیمار با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید تحت تأثیر قرار گرفت، به‌طوریکه درصد آن ۶۹/۱۲ ثبت شد و کاهش معنی‌داری ($p <۰/۰۵$) نسبت به گروه کنترل با میزان ۸۱/۹۲ درصد نشان داد. همان طور که از جدول ۱ بر می‌آید درصد تولید بلاستوسیست در گروه کنترل در مقایسه با تیمارهای ۰۱ /۰ و ۱ /۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید تفاوت معنی داری را نشان نمی‌دهد ($p>۰/۰۵$)، در مقابل با افزایش غلظت‌های لیپوپلی‌ساکارید به میزان ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید درصد تولید بلاستوسیست به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p <۰/۰۵$).

جدول ۱- اثر لیپوپلی‌ساکارید اضافه شده در محیط کشت بلوغ بر درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست

Table 1. The effect of added lipopolysaccharide in the maturation culture medium on the proportion of cleaved oocytes and the proportion of oocytes reaching the blastocyst stage

غلظت لیپوپلی‌ساکارید (میکروگرم در میلی‌لیتر)	تعداد تخمک‌های کشت داده شده	تعداد (درصد تسهیم)	نسبت شانس	P-valou	lsmeans ± SE	تعداد بلاستوسیست (درصد)	نسبت شانس	P-valou	lsmeans ± SE
۰ (کنترل)	۱۶۶	۱۳۶ (۸۱/۹۲)	-	-	۱/۵±۰/۲	۵۶(۳۳/۷۳)	-	-	۰/۶±۰/۱
۰/ ۰۱	۱۴۷	۱۱۸(۸۰/۲۷)	۰/۸۹	۰/۷۰	۱/۴±۰/۲	۴۹(۳۳/۳۳)	۰/۹۸	۰/۹۴	۰/۶±۰/۱
۰/ ۱	۱۴۵	۱۱۳(۷۷/۹۳)	۰/۷۷	۰/۳۷	۱/۲±۰/۲	۴۶(۳۱/۷۲)	۰/۹۱	۰/۷۰	۰/۷±۰/۱
۱	۱۲۶	۹۲(۷۳/۰۱)	۰/۵۹	۰/۰۶	۰/۹±۰/۲	۲۲(۱۷/۴۶)	۰/۴۱	*۰/۰۰۲	۱/۵±۰/۲
۱۰	۱۴۹	۱۰۳(۶۹/۱۲)	۰/۴۹	*۰/۰۰۸	۰/۸±۰/۱	۲۴(۱۶/۱۰)	۰/۳۷	*۰/۰۰۰۴	۱/۶±۰/۲

*: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$).

در مطالعه‌ی حاضر، براساس مطالعات گذشته و نتایج به دست آمده غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید کمترین غلظت مؤثر لیپوپلی‌ساکارید شناسایی شده است که توانایی تخمک‌ها را به مرحله بلاستوسیست کاهش می‌دهد. حداقل مقدار لیپوپلی‌ساکارید مورد نیاز بر کاهش رشد تخمک یا زایگوت‌ها به بلاستوسیست در مطالعه‌ی ما مشابه مواردی است که استورنگ و همکارنش (۲۹) گزارش کردند. مجموعه تخمک-کومولوس در حضور لیپوپلی‌ساکارید سطح فسفریلاسیون P38MAPK را تقویت می‌کنند و فعالیت NFKβ/ERK1 را افزایش داده و به دنبال آن سطح بیان سایتوکین‌های پیش التهابی مانند IL6 و TNFα را افزایش می‌دهند (۲۷). سایتوکین‌های پیش‌التهابی سطح اکسیژن داخل سلولی را افزایش می‌دهند و به عنوان یک پیام‌رسان ثانویه برخی از مسیرهای سیگنالینگ سلولی و بیان ژن را تغییر می‌دهند (۳۱). اگرچه غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکارید هیچ تأثیری بر نرخ تسهیم نداشت ولی به طور قابل توجهی قابلیت تکوین تخمک‌ها به بلاستوسیست را کاهش داد (۱۷). مطالعات انجام شده در رابطه با قابلیت تکوین گاو نشان می‌دهد با اینکه نرخ درصد تسهیم در غلظت‌های مختلف از لیپوپلی‌ساکارید نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشده است اما درصد بلاستوسیست در غلظت‌های مورد مطالعه در مقایسه با کنترل به‌طور چشمگیری کاهش یافته است (۲۳). به‌طور کلی لیپوپلی‌ساکارید گیرنده‌ی TLR4 را شناسایی می‌کند و با یک پاسخ التهابی سبب راه‌اندازی سیگنال‌های درون سلولی می‌شود که با افزایش میزان لیپوپلی‌ساکارید در محیط، تولید بلاستوسیست کاهش می‌یابد (۳۴). غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید سبب کاهش درصد تسهیم، تشکیل مورولا و بلاستوسیست در تخمک‌ها گردید (۹). علاوه بر این نشان داده شده است که به میزان ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از

از لیپوپلی‌ساکارید از رشد بلاستوسیست ممانعت به عمل می‌آورد و ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید به طور کامل سبب مهار تکوین جنین موش می‌شود (۲۴). غلظت ۱ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی ساکارید در محیط بلوغ تخمک باعث کاهش درصد بلوغ تخمک شد اما هیچ تأثیری بر نرخ تسهیم مشاهده نشد، همچنین مکمل‌سازی محیط جنینی با لیپوپلی‌ساکارید هیچ تأثیری بر درصد تولید بلاستوسیست نشان نداد (۲۴). به طور کلی لیپوپلی‌ساکارید اثرات مضر بر بازده تولید مثل دارد که در طی رشد فولیکول و تخمک کارایی تولیدمثل را تحت تأثیر قرار می دهد.

آزمایش دوم: ارزیابی اثر افزودن کامپفرول در محیط کشت بلوغ بر درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست

تعداد ۴۳۰ عدد تخمک در ۵ تکرار داخل محیط بلوغ حاوی غلظت‌های صفر ، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار کامپفرول قرار گرفت. همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، بر اساس آنالیز آماری نتایج نشان می‌دهد که بین درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست تیمارهای کامپفرول با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (p>۰/۰۵).

جدول ۲- اثر کامپفرول اضافه شده در محیط کشت بلوغ بر درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست

Table 2. The effect of added Kaempferol in the maturation culture medium on the proportion of cleaved oocytes and the proportion of oocytes reaching the blastocyst stage

غلظت کامپفرول (میکرومولار)	تعداد تخمک‌های کشت داده شده	تعداد (درصد تسهیم)	نسبت شانس	P-valou	lsmeans ± SE	تعداد (درصد بلاستوسیست)	نسبت شانس	P-valou	lsmeans ± SE
۰ (کنترل)	۱۰۵	۶۷(۶۳/۸)	-	-	۰/۵±۰/۲	۱۴(۱۳/۳۳)	-	-	۱/۸±۰/۲
۰/ ۱	۱۰۵	۶۲(۵۹/۰)	۰/۸	۰/۸	۰/۳ ±۰/۱	۱۲(۱۱/۴۲)	۰/۸	۰/۹	۰/۱±۰/۴
۱	۱۱۵	۶۴(۵۵/۶)	۰/۷	۰/۶	۰/۲±۰/۱	۱۱(۹/۵۶)	۰/۶	۰/۸	۰/۳±۰/۴
۱۰	۱۰۵	۵۷(۵۴/۰)	۰/۶	۰/۴	۰/۱±۰/۱	۹(۸/۵۷)	۰/۶	۰/۶	۰/۴±۰/۴

*: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

نتایج حاصل حاکی از آن بود که مکمل‌سازی محیط بلوغ با غلظت‌های مختلف کامپفرول هیچ تأثیری بر قابلیت تکوین تخمک گوسفند ندارد. برخی از اثرات کامپفرول با فعال شدن فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز (PI3K) ایجاد می‌شود که یک مسیر سیگنالینگ مهم در کنترل بقا و رشد سلول می‌باشد (۶). از آنجایی که تشکیل آنتروم برای رشد فولیکول‌ها ضروری است، گزارش شده است که کامپفرول تشکیل آنتروم فولیکول‌های ثانویه گوسفند را از طریق فعالیت فیتواستروژنیک ترویج می‌دهد و به وسیله مسیر سیگنالینگ PI3K/ AKT باعث فعال شدن و تکثیر سلولی فولیکول‌های ثانویه گوسفند می‌شود (۲۶). علاوه بر این، مکمل نمودن محیط بلوغ تخمک با کامپفرول، باعث افزایش بلوغ تخمک‌های خوک و درصد مورولا می‌شود (۲۵). مطالعات نشان داده‌اند که افزودن غلظت مناسب کامپفرول به محیط کشت تخمک خوک نه تنها تعداد بلاستوسیست را افزایش می‌دهد بلکه رشد جنین‌های اولیه را با تنظیم فاکتورهای رشد مرتبط افزایش می‌دهد (۳۳). کامپفرول می‌تواند به عنوان آنتی‌اکسیدان برای جنین‌های در حال رشد عمل کند تا سطح گلوتاتیون داخل سلولی را افزایش دهد و تولید رادیکال‌های آزاد را مهار کند (۳۰). اگرچه غلظت ۰/۱ میلی‌مولار از کامپفرول در محیط کشت جنینی خوک هیچ تأثیری بر نرخ تسهیم نداشت ولی به طور قابل توجهی شایستگی تکوین تخمک‌ها به بلاستوسیست را با کاهش استرس اکسیداتیو و آپوپتوز افزایش داد (۳۲). سانتوس و همکاران (۲۵) در طی مطالعه بر روی تخمک خوک نشان دادند که کامپفرول بسته به غلظت و نوع سلول ممکن است اثرات محافظت از سلول یا سمیت سلولی را به‌ترتیب با غلظت‌های ۱۰ و۱۰۰ میکرومولار داشته باشد. بنابراین طبق مطالعه حاضر و مطالعات گذشته می‌توان نتیجه گرفت اثر مفید کامپفرول به نوع سلول و غلظت آن بستگی دارد و از طرفی میزان موفقیت بلوغ برون‌تنی تخمک وابسته به نوع گونه است و در گونه‌های مختلف متفاوت است.

آزمایش سوم: ارزیابی اثر افزودن کامپفرول در محیط کشت بلوغ در حضور حداقل غلظت مؤثر لیپوپلی‌ساکارید بر درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست

تعداد ۶۰۶ عدد تخمک در ۷ تکرار داخل محیط بلوغ حاوی غلظت‌های کنترل (بدون کامپفرول و لیپوپلی‌ساکارید)، صفر (بدون کامپفرول و حاوی لیپوپلی‌ساکارید)، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار کامپفرول به‌همراه حداقل غلظت مؤثر لیپوپلی‌ساکارید (۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) قرار گرفت. همان طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، بر اساس آنالیز آماری نتایج نشان می‌دهد که بین درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست تیمارهای کامپفرول با گروه کنترل در التهاب ناشی از لیپوپلی‌ساکارید تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (p>۰/۰۵)، اما از نظر بررسی درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست تیمار لیپوپلی‌ساکارید به‌همراه غلظت‌های مختلف کامپفرول نسبت به گروه کنترل به‌صورت معنی دار کاهش یافتند (p <۰/۰۵).

در این آزمایش هدف اصلی ما از تأثیر توأم کامپفرول با لیپوپلی‌ساکارید در تخمک برای ارزیابی اثر مفید کامپفرول بر حداقل غلظت مؤثر لیپوپلی‌ساکارید بود که اگر کامپفرول اثرات التهابی لیپوپلی‌ساکارید را در طی تکوین تخمک بهبود می‌بخشد کدام غلظت از کامپفرول این اثر را کاهش می‌دهد. در مطالعه حاضر نه تنها کامپفرول اثر مفیدی بر تکوین تخمک نداشت، بلکه لیپوپلی‌ساکارید در محیط بلوغ همراه با کامپفرول باعث کاهش معنی دار تکوین جنین گوسفند شد.

کامپفرول دارای خواص بیولوژیکی متعددی از جمله فعالیت‌های ضد اکسیداتیو و ضد التهابی است (۸). با توجه به اینکه مسیرهای سیگنالینگ MAPK NF-κB اغلب درگیر فرآیندهای التهابی ناشی از لیپوپلی‌ساکارید هستند، مطالعات زیادی نشان داده اند که کامپفرول با کاهش بیان سایتوکین‌های پیش التهابی TNF-α، IL-1β و IL-6 از طریق مهار فعال سازی مسیرهای NF-kB و MAPK آسیب التهابی ناشی از لیپوپلی ساکارید را کاهش می‌دهد (۷).

جدول ۳- اثر کامپفرول اضافه شده در محیط کشت بلوغ در حضور۱ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید بر درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست

Table 3. The effect of added Kaempferol in the maturation culture medium in the presence 1 µg/ml of lipopolysaccharide on the proportion of cleaved oocytes and the proportion of oocytes reaching the blastocyst stage

غلظت کامپفرول (میکرومولار)	تعداد تخمک‌های کشت داده شده	تعداد (درصد تسهیم)	نسبت شانس	P-valou	lsmeans ± SE	تعداد (درصد بلاستوسیست)	نسبت شانس	P-valou	lsmeans ± SE
کنترل	۱۲۲	۹۰(۷۳/۷۷)	-	-	۱/۰±۰/۲	۳۸(۳۱/۱۴)	-	-	۰/۷±۰/۱
۰	۱۲۰	۵۹(۴۹/۱۶)	۰/۳	۰/۰۰۱*	۰/۰۳ ±۰/۱	۱۹(۱۵/۸۳)	۰/۴	۰/۰۴	۱/۶±۰/۲
۰/ ۱	۱۲۴	۶۴(۵۱/۶۱)	۰/۳	۰/۰۰۳*	۰/۰۶±۰/۱	۲۰(۱۶/۱۲)	۰/۴	۰/۰۴*	۱/۶±۰/۲
۱	۱۱۸	۶۰(۵۰/۸۴)	۰/۳	۰/۰۰۲*	۰/۰۳±۰/۱	۱۸(۱۵/۲۵)	۰/۳	۰/۰۳*	۱/۷±۰/۲
۱۰	۱۲۲	۶۲(۵۰/۸۱)	۰/۳	۰/۰۰۲*	۰/۰۳±۰/۱	۱۹(۱۵/۵۷)	۰/۴	۰/۰۳*	۱/۶±۰/۲

*: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

در محیط بلوغ برون‌تنی فولیکول‌های ثانویه گاو از غلظت ۱ میلی‌مولار کامپفرول به‌عنوان تنها آنتی‌اکسیدان موجود در محیط پایه به مدت ۱۲ روز در مطالعه‌ی استفاده کردند که باعث حفظ بقای فولیکول، از سرگیری میوز، بهبود تشکیل آنتروم و فعالیت میتوکندری شد (۲۵). به طور خلاصه، داده‌های ارائه شده در اینجا نشان دادند که لیپوپلی‌ساکارید اثرات مضری بر توانایی قابلیت تکوین تخمک‌ها را نشان می‌دهد. اگرچه درصد تسهیم تخمک پس از لقاح تحت تأثیر لیپوپلی ساکارید قرار نگرفت اما کاهش درصد تولید بلاستوسیست در پاسخ به لیپوپلی ساکارید در محیط کشت بلوغ حاکی از اثرات مخرب لیپوپلی ساکارید در تکوین جنین می‌باشد. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد، قابلیت تکوین تخمک‌های گوسفند تحت تأثیر اثرات مفید غلظت‌های کامپفرول در التهاب ناشی از لیپوپلی ساکارید قرار نمی‌گیرند. با توجه به نتایج به دست آمده ما و مطالعات قبلی می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً غلظت‌های کامپفرول در مطالعه ما کافی نبوده است، بنابراین اثر مفید کامپفرول به غلظت و نوع سلول بستگی دارد که در این صورت احتمالاً با خواص آنتی‌اکسیدانی قوی خود سطح رادیکال‌های آزاد ایجاد شده ناشی از لیپوپلی ساکارید را کاهش می‌دهد و همچنین با خواص ضد التهابی از طریق ایجاد اختلال در سیگنالینگ NFKβ دربهبود التهاب در طی تکوین تخمک مؤثر خواهد بود. بنابراین از کامپفرول می‌توان به‌عنوان یک محصول طبیعی در کاهش برخی از علائم التهاب استفاده کرد. هر چند در این امر نیاز به مطالعات بیشتری جهت تعیین غلظت مناسب کامپفرول در طی بلوغ تخمک می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی محترم مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته در انجام این طرح پژوهشی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Ali, A.A., J.F. Bilodeau and M.A. Sirard. 2003. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. Theriogenology, 59(3-4): 939-949.
2. Ataei Nazari, S., A. Mohammadi Sangcheshme, A. fzalzadeh, M.R. Bakhtiarizadeh, A. Assadi Alamouti and A. Fouladi Nashta. 2020. Evaluating the sheep oocyte in vitro developmental competence and expression of microrRNAs in cumulus cells in response to inflammatory effects induced by lipopolysaccharide. Rap, 12(31) :118-125. (In Persion).
3. Bromfield, J.J. and I.M. Sheldon. 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.
4. Cao, R., K. Fu, X. Lv, W. Li and N. Zhang. 2014. Protective effects of kaempferol on lipopolysaccharide-induced mastitis in mice. Inflammation, 37(5): 1453-1458.
5. Cheng, X., Y.L. Yang, H. Yang, Y.H. Wang and G.H. Du. 2018. Kaempferol alleviates LPS-induced neuroinflammation and BBB dysfunction in mice via inhibiting HMGB1 release and down-regulating TLR4/MyD88 pathway. International Immunopharmacology, 29: 35-56.
6. Choi, E.M. 2011. Kaempferol protects MC3T3-E1 cells through antioxidant effect and regulation of mitochondrial function. Food and Chemical Toxicology, 49(8): 1800-1805.
7. Cui, S., J. Tang, S. Wang and L. Li. 2019. Kaempferol protects lipopolysaccharide-induced inflammatory injury in human aortic endothelial cells (HAECs) by regulation of miR-203. Biomedicine & Pharmacotherapy, 115: 108888.
8. Devi, K.P., D.S. Malar, S.F. Nabavi, A. Sureda, J. Xiao, S.M. Nabavi and M. Daglia. 2015. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. Pharmacological Research, 99: 1-10.
9. Dubin, N.H., D.R. Bornstein and Y. Gong. 1995. Use of endotoxin as a positive (toxic) control in the mouse embryo assay. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 12(2): 147-152.
10. Fock, R.A., M.A.R. Vinolo, V.D.M.S. Rocha, L.C. de Sá Rocha and P. Borelli. 2007. Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF-α in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. Cytokine, 40(2): 105-114.
11. Gao, W., Y. Jin, J. Hao, S. Huang, D. Wang, F. Quan, W. Ren, J. Zhang, M. Zhang and X. Lu. 2021. Procyanidin B1 promotes in vitro maturation of pig oocytes by reducing oxidative stress. Molecular Reproduction and Development, 88(1): 55-66.
12. Kaipia, A.N., S.Y. Chun, K. Eisenhauer and A. Hsueh. 1996. Tumor necrosis factor-alpha and its second messenger, ceramide, stimulate apoptosis in cultured ovarian follicles. Endocrinology, 137(11): 4864-4870.
13. Kampkötter, A., C.G. Nkwonkam, R.F. Zurawski, C. Timpel, Y. Chovolou, W. Wätjen and R. Kahl. 2007. Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism Caenorhabditis elegans. Archives of Toxicology, 81(12): 849-858.
14. Lavon, Y., G. Leitner, E. Klipper, U. Moallem, R. Meidan and D. Wolfenson. 2011. Subclinical, chronic intramammary infection lowers steroid concentrations and gene expression in bovine preovulatory follicles. Domestic Animal Endocrinology, 40(2): 98-109.
15. Lee, J.C., G.S. Cho, H.J. Kim, J.H. Lim, Y.K. Oh, W. Nam, J.H. Chung and W.K. Kim. 2005. Accelerated cerebral ischemic injury by activated macrophages/microglia after lipopolysaccharide microinjection into rat corpus callosum. Glia, 50(2): 168-181.
16. Ma, C.H., L.Y. Yan, J. Qiao, W. Sha, L. Li, Y. Chen and Q.Y. Sun. 2010. Effects of tumor necrosis factor-alpha on porcine oocyte meiosis progression, spindle organization, and chromosome alignment. Fertility and Sterility, 93(3): 920-926.
17. Magata, F. and T. Shimizu. 2017. Effect of lipopolysaccharide on developmental competence of oocytes. Reproductive Toxicology, 71: 1-7.
18. Mhatre, M.V., J.A. Potter, C.J. Lockwood, G. Krikun and V.M. Abrahams. 2016. Thrombin augments LPS- induced human endometrial endothelial cell inflammation via PAR1 activation. American Journal of Reproductive Immunology, 76(1): 29-37.
19. Motola, S., M. Popliker and A. Tsafriri. 2007. Are steroids obligatory mediators of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin-triggered resumption of meiosis in mammals?. Endocrinology, 148(9): 4458-4465.
20. Najafi, M., G. Rahimi-Mianji, Y. Guo, N. Jhamat, G. Andersson, P. Humblot and E. Bangcom-Rudlof . 2018. Differential gene expression analysis in bovine endometrial epithelial cells following by E. Coli LPS challenge. Research On Animal Production (Scientific and Research), 8(18): 121-130 (In Persion).
21. Park, M.Y., H.J. Kwon and M.K Sung. 2009. Evaluation of aloin and aloe-emodin as anti-inflammatory agents in aloe by using murine macrophages. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 73(4): 828-832.

22. Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M.Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos and M. Freudenberg. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science, 282(5396): 2085-2088.
23. Rallabhandi, P., A. Awomoyi, K.E. Thomas, A. Phalipon, Y. Fujimoto, K. Fukase, S. Kusumoto, N. Qureshi, M.B Sztein and S.N. Vogel. 2008. Differential activation of human TLR4 by Escherichia coli and Shigella flexneri 2a lipopolysaccharide: combined effects of lipid A acylation state and TLR4 polymorphisms on signaling. The Journal of Immunology, 180(2): 1139-1147.
24. Rincón, J.A.A., P.C. Gindri, B. Mion, F.G. de Ávila, A.A. Barbosa, A.S. Maffi, J. Pradiee, R.G. Mondadori, M.N. Correa, P.L.M. Cantarelli and A. Schneider. 2019. Early embryonic development of bovine oocytes challenged with LPS in vitro or in vivo. Reproduction, 158(5): 453-463.
25. Santos J, Lins T, Barberino R, Menezes V, Gouveia B, Matos M. 2019. Kaempferol promotes primordial follicle activation through the phosphatidylinositol 3- kinase/protein kinase B signaling pathway and reduces DNA fragmentation of sheep preantral follicles cultured in vitro. Molecular Reproduction and Development, 86(3): 319-329.
26. Santos, J.M., T.l. Lins, R.S. Barberino, V.G. Menezes, B.B. Gouveia and M.H. Matos. 2019. Kaempferol can be used as the single antioxidant in the in vitro culture medium, stimulating sheep secondary follicle development through the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. Theriogenology, 136: 86-94.
27. Shimada, M., I. Hernandez-Gonzalez, I. Gonzalez-Robayna and J.S. Richards. 2006. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. Molecular Endocrinology, 20(6): 1352-1365.
28. Soto, P., R.P. Natzke and P.J. Hansen. 2003. Actions of tumor necrosis factor-α on oocyte maturation and embryonic development in cattle 1. American Journal of Reproductive Immunology, 50(5): 380-388.
29. Storeng, R.I.T.S.A and B.E.R.I.T Johne. 1987. Toxic effects of lipopolysaccharide from Bacteroides intermedius and Escherichia coli assessed in the pre-implantation mouse embryo culture system. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B: Microbiology, 95(1-6): 135-139.
30. Wang, Z., C. Figueiredo-Pereira, C. Oudot, H.L.A. Vieira and C. Brenner. 2017. Mitochondrion: a common organelle for distinct cell deaths?. International Review of Cell and Molecular Biology, 331:245-287.
31. Weinberg, F., R. Hamanaka, W.W. Wheaton, S. Weinberg, J. Joseph, M. Lopez, B. Kalyanaraman, G.M. Mutlu, G.S. Budinger and N.S. chandel e. 2010. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(19): 8788-8793.
32. Yao, X., H. Jiang, Y. NanXu, X. Piao, Q. Gao and N.H. Kim. 2019. Kaempferol attenuates mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by H 2 O 2 during porcine embryonic development. Theriogenology, 135: 174-180.
33. Zhao, Y., Y. Xu, Y. Li, Q. Jin, J. Sun, E. Zhiqiang and Q. Gao. 2020. Supplementation of kaempferol to in vitro maturation medium regulates oxidative stress and enhances subsequent embryonic development in vitro. Zygote, 28(1): 59-64.
34. Zhou, R., Y. Miao, Y. Li, X. Li, J. Xi and Z. Zhang. 2019. MicroRNA-150 promote apoptosis of ovine ovarian granulosa cells by targeting STAR gene. Theriogenology,127: 66-71.

Evaluating the Effect of Kaempferol on the Sheep Oocyte *In Vitro* Developmental Competence in Response to Inflammatory Effects Induced by Lipopolysaccharide

Sepideh Heidari[1], Abdollah Mohammadi-Sangcheshmeh[2], Akram Eidi[3], Fatemeh Kouhkan[4] and Eva Tvrdá[5]

1- Ph.D. Student, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Animal and Poultry Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran, (Corresponding Autor: amohammadis@ut.ac.ir)
3- Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4- Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran
5- Professor of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Nitra, Slovakia
Received: 28 July, 2021 Accepted: 14 Agusut, 2021

Extended Abstract

Introduction and Objective: Nowadays, endotoxemia is considered as one of the fundamental causes of infertility in different animals or humans due to various bacterial infections because of the entry of lipopolysaccharide (LPS) in the membrane of the gram-negative bacteria's wall into the blood. This study aimed to evaluate the inflammation caused by LPS and the protective effect of kaempferol (KAE), which is a natural flavonoid with anti-inflammatory and antioxidant properties on oocytes developmental competence.

Material and Methods: For this purpose in oocyte maturation medium, in the first experiment with concentrations of 0, 0.1, 0.1, 1 and 10µg/ml of LPS, in the second experiment with concentrations of 0, 0.1, 1 and 10 µM of KAE and in the third experiment with concentrations of 0, 0.1, 1 and 10 µM of KAE with LPS were cultured for 24 hours. After in vitro maturation, mature oocytes were identified and fertilized with incubated sperm, and the rates of cleaved oocyte and oocytes reached to blastocyst stage were analyzed.

Results: The treatment with 1 and 10 µg/ml of LPS significantly reduced blastocyst rate compared to the control group ($p<0.05$), but supplementation of oocyte maturation medium with different concentrations of KAE had no effect on the rates of cleaved oocyte and oocytes reached to blastocyst stage ($p>0.05$). In addition, the results of different concentrations of KAE with LPS show that KAE did not has no significant effect on the rates of cleaved and blastocyst oocyte inflammatory conditions caused by lipopolysaccharide ($p>0.05$).

Conclusion: In summary, the data presented here have shown that LPS exhibits detrimental effects on sheep oocyte development in a dose-dependent manner and KAE is not effective in ameliorating these effects.

Keywords: Antioxidant, Blastocyst, Infectious disease, Sheep, Reproductive function