دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

استفاده از ژله رویال به‌عنوان جایگزین سرم گاوی در کشت برون‌تنی رویان بز با تاکید بر بیان ژن‌های درگیر در مرگ سلولی

حمید دلدار

دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: h.deldar@sanru.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۹۷/۵/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۲۳
صفحه: ۷۶ تا ۸۴

چکیده

پژوهش حاضر به‌منظور بررسی استفاده از غلظت‌های متفاوت ژله رویال به‌عنوان جایگزین سرم در کشت برون‌تنی رویان بز با تاکید بر بیان ژن‌های درگیر در مرگ سلولی انجام شد. بلوغ برون‌تنی اووسایت در معرض غلظت‌های ۱۰ درصد FBS (محیط پایه)، ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال (بدون سرم)، ۵ درصد FBS + ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال، ۲/۵ درصد FBS + ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال و ۷/۵ درصد FBS + ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال انجام شد. پس از ۲۴ ساعت، اووسایت‌ها به مرحله متافاز میوز II (اووسایت بالغ) رسیدند و بیان نسبی ژن‌های مورد نظر در اووسایت نیز اندازه‌گیری شد. اووسایت‌های بالغ به صورت لقاح برون‌تنی و توسط اسپرم‌های بارور تلقیح و نرخ کلیواژ و نرخ بلاستوسیست نیز اندازه‌گیری شد. نتایج ما نشان داد که درصد بلوغ برون‌تنی، درصد کلیواژ و رویان برون‌تنی با افزایش تدریجی غلظت ژله رویال به‌طور معنی‌داری از تیمار شاهد بیشتر شد ($p < ۰/۰۵$)، به‌صورتی‌که تیمار دارای ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال، بیشترین درصد بلوغ برون‌تنی اووسایت بز(۹۱/۳۵ درصد)، بیشترین درصد کلیواژ (۸۳/۳۹ درصد)، و بیشترین درصد بلاستوسیست (۳۰/۱۸ درصد) را نسبت به گروه شاهد (۷۱/۳۱، ۶۲/۵۰ و ۲۱/۴۲ درصد؛ به‌ترتیب) دارا بود. افزایش غلظت ژله رویال و جایگزینی آن به‌جای FBS بیان نسبی ژن BCL2 را افزایش داد ($p < ۰/۰۵$) در حالیکه منجربه کاهش معنی‌داری بیان نسبی ژن BAX شد. نسبت BCL2/BAX نیز افزایش معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) متناسب با افزایش غلظت ژله رویال داشت. تفاوت معنی‌داری بین تیمارها در بیان نسبی ژن CASPASE3 دیده نشد. بر اساس یافته‌های این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که افزایش غلظت ژل رویال به جای سرم جنین گاو در محیط بلوغ برون‌تنی اووسایت توانست شرایط تکامل و تولید رویان برون‌تنی بز را بهبود دهد.

واژه‌های کلیدی: ژله رویال، سرم جنین گاوی، اووسایت بز، کشت برون تنی رویان

مقدمه

سرم جنین گاو (FBS) به‌طور گسترده برای محیط کشت استفاده می‌شود. زیرا به راحتی در دسترس است و به‌راحتی ذخیره می‌شود و شامل غلظت زیادی از فاکتورهای رشد است (۵). اگرچه ممکن است سرم گاوی از عوامل مفید برای محیط کشت برون‌تنی رویان، برای تهیه‌ی بسترهای انرژی به اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و یا فاکتورهای رشد باشد، ولی در عین حال ممکن است سمی نیز باشد. استفاده از سرم جنین گوساله (FCS) در یک محیط کشت ریان به‌عنوان یک ماده‌ی افزودنی قابلِ بحث، نشان داده شده است که سبب مهار تقسیمات کلیواژ اولیه و جلوگیری از سرعت بخشیدن به نمو رویان گاو می‌شود (۹،۴). با توجه به محدودیت های مطرح در تولید سرم جنین گوساله و مشکلات در واردات و قیمت زیاد این محصول و نیز احتمال آلودگی‌های ویروسی آن ضرورت استفاده از یک ماده‌ی جایگزین یا کاهش‌دهنده‌ی مصرف FCS احساس می‌شود (۶).

ژله رویال که به‌عنوان منبع مواد غذایی اصلی ملکه‌ی زنبور عسل است، توسط غدد هایپوفارنژیال زنبوران کارگر ترشح
می‌شود و با توجه به ترکیبات پیچیده‌ی آن مانند: آب (۶۷ درصد)، پروتئین‌ها (۱۳ درصد)، چربی‌ها (۵ درصد)، کربوهیدرات‌ها (۱۱ درصد)، املاح معدنی (یک درصد)، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها، آنزیم‌ها، هورمون‌ها (تستوسترون، پروژسترون، پرولاکتین و استرادیول) و آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی (۱۸،۱۳،۱۷)، علاوه بر خاصیت‌های نوروتروف، آنتی‌بیوتیک، تقویت‌کننده‌ی سیستم‌های ایمنی، ضدالتهابی و نقش در سیستم تولیدمثلی و باروری، دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز است (۱۵،۱۲). استفاده از سرم به‌عنوان یک مکمل در شرایط برون‌تنی محیط کشت بلوغ، برای اووسیت به نظر قابل بحث می‌رسد، زیرا انواع موادی که منابع مختلف سرم را شامل می‌شود، ممکن است حاوی اثرات مفید و یا مضر باشد. درحالی که غلظت‌های مختلفی از ژله رویال، زمانی که در ترکیب با مکمل‌های سرم به کار گرفته شد، دارای اثرات مفیدی روی بلوغ آزمایشگاهی دارد. هدف از این پژوهش استفاده از غلظت‌های متفاوت ژل رویال به‌عنوان جایگزین سرم جنین گاو در کشت برون‌تنی رویان بز با تاکید بر بیان ژن‌های درگیر در مرگ سلولی بود.

مواد و روش‌ها

تمامی ترکیبات و مواد استفاده شده از شرکت سیگما خریداری شدند. تخمدان‌های بز پس از جمع‌آوری از کشتارگاه صنعتی جمع‌آوری شدند و پس از جمع‌آوری، درون فلاسک آب در دمای ۳۳-۳۰ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شدند. تخمدان‌ها در سرم فیزیولوژیک که شامل ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسین در هر لیتر بود، شستشو شدند. کمپلکس اووسایت کومولوس از فولیکول‌های آنترال کوچک (۸-۲ میلی‌متر) تخمدان آسپیره

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.29252/rap.10.24.76]

شدند و کمپلکس‌هایی که سه لایه کومولوس یا بیشتر و سیتوپلاسم یکنواخت داشتند را انتخاب و وارد محیط کشت بلوغ اووسایت شدند. محیط کشت شامل TCM -199 به همراه ۲۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر hMG، ۱۰ درصد FCS، ۱۱ میکروگرم در میلی‌لیتر پیروات، ۲/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر سدیم بیکربنات، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و استرپتومایسین بود. درون هر پلیت ۶۰ میلی‌متری، نه قطره ۵۰ میکرولیتری از محیط کشت قرار داده شد که روی قطره‌ها را با روغن معدنی گرم پوشانده شدند. در هر قطره محیط کشت ۵۰ میکرولیتری، ۱۱-۹ کمپلکس اووسایت کومولوس قرار داده شد و سپس پلیت را درون انکوباتور با ۵ درصد CO_2، دارای ۹۸ درصد رطوبت نسبی در دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. پس از ۲۴ ساعت اووسایت‌ها به مرحله بلوغ رسیدند. اووسایت‌ها پس از ۲۴ ساعت از قطره‌های محیط کشت خارج شده و سپس وارد محیط SOF HEPES شدند و چندین بار با PBS شستشو شده، سپس برای اندازه‌گیری نرخ بلوغ اووسایت، سلول‌های کومولوس از اووسایت به وسیله‌ی آنزیم هیالورونیداز جدا شده و اووسایت‌های بدون کومولوس نیز سه بار با PBS شستشو شدند. سپس با رنگ فلورسنت DAPI رنگ‌آمیزی شد تا براساس دیدن جسم قطبی، نرخ اووسایت‌هایی که به مرحله متافاز میوزII (اووسایت‌های بالغ) رسیدند، مشخص شود. پس از ۲۴ ساعت از زمان بلوغ، اووسایت از قطره‌های بلوغ خارج شدند و پس از شستشو با محیط باروری برون‌تنی، درون قطره‌های باروری قرار گرفتند. از اسپرم بز نر برای لقاح برون‌تنی استفاده شد. اسپرم‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در محیط ظرفیت‌دار شدن (Capacitation) قرار گرفتند، سپس با تکنیک Swim Up، اسپرم‌های بارور برای لقاح برون‌تنی جدا شدند. تعداد ۲×۱۰^{۶} اسپرم در هر میلی‌لیتر توسط لام هیوسایتومتر درون قطره‌های باروری برون‌تنی قرار گرفتند. پس از ۲۴-۱۸ ساعت، زایگوت‌های احتمالی به درون قطره‌های CR_1 انتقال یافتند. زایگوت‌های احتمالی در محیط کشت برون‌تنی رویان که CR_1 بود، درون انکوباتور با ۵ درصد CO_2 با رطوبت نسبی ۹۸ درصد در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و یک روز در میان محیط تازه شد. نرخ کلیواژ در روز سوم پس از باروری و نرخ بلاستوسیست نیز شش روز پس از باروری اندازه‌گیری شدند. به‌منظور بررسی بیان نسبی ژن‌های دخیل در مانایی و مرگ سلولی (BCL2, BAX, CASPASE3) در هر تیمار آزمایشی از ۱۰۰ اووسایت بالغ شده دارای جسم قطبی استفاده شد. از کیت (RNeasy Micro Kit) و بر مبنای دستورالعمل شرکت سازنده (QIAGEN)، جداسازی RNA صورت گرفت. از کیت QuantiTec Reves Transcription (QIAGEN, 205311) و براساس پروتکل مربوطه، cDNA ساخته شد و برای بیان نسبی ژن‌های مورد نظر تا زمان انجام واکنش‌های Real Time PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس واکنش Real Time PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در دستگاه چرخه حرارتی با تابش نوری کوربت (Corbet) انجام شد. و برای هر یک از نمونه‌ها چرخه آستانه (C_T) در دستگاه Real Time PCR تعیین شد. بیان ژن YWHAZ به‌عنوان بیان ژن رفرنس مورد استفاده قرار گرفت و برای اندازه‌گیری بیان ژن از روش Livak استفاده شد. پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۵ تیمار و ۵ تکرار و در هر تکرار، ۲۰ مشاهده انجام شد. بهترین غلظت ژله رویال بر اساس پژوهش‌های پیشین، ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است (۲۴). بر همین اساس تیمارهای مختلف شامل غلظت‌های ۱۰ درصد FBS (محیط پایه)، ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال (بدون سرم)، ۵ درصد FBS + ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال، ۲/۵ درصد FBS + ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال و ۷/۵ درصد FBS + ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال بود. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. برای تجزیه داده‌ها از رویه GLM (General Linear Model) استفاده شد. هنگامی که F در آنالیز واریانس معنی‌دار شد، آزمون دانکن برای مقایسه میانگین تیمارهای مجزا به کار برده شد. معادله ریاضی مدل آماری به صورت $Yij = \mu + Ti + eij$ بود؛ که Yij: مقدار عددی تکرار jام از تیمار iام، μ: میانگین داده‌ها، Ti: اثر تیمار i و eij: اثر عوامل باقی‌مانده است.

نتایج و بحث

در این پژوهش تعداد ۷۴۲ اووسایت نابالغ سالم از تخمدان بزهای کشتارگاهی جمع‌آوری شد و در پنج تیمار آزمایشی مورد بررسی قرار گرفت. گروه شاهد شامل ۱۴۴ اووسایت نابالغ، که به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت بلوغ کشت داده شده بودند، که در ۰±۷۱/۳۳٪ از این اووسایت‌ها بلوغ هسته‌ای دیده شد (جدول ۱). در تیمار ۷/۵ درصد FBS + ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RJ، از ۱۵۲ اووسایتی که کشت داده شدند، ۲/۳۷±۷۶/۵۶٪ اووسایت‌ها به مرحله‌ی بلوغ هسته‌ای رسیدند. از مجموع ۱۴۸ اووسایت نابالغ در تیمار ۵ درصد FBS + ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RJ، در ۲/۴۵ ±۷۲/۷۶٪ اووسایت‌ها بلوغ مشاهده شد و در تیمار ۲/۵ درصد FBS + ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RJ از ۱۴۵ اووسایت نابالغ، ۳/۸۵ ± ۸۴/۶۸٪ اووسایت‌ها به بلوغ رسیدند و از مجموع ۱۵۳ اووسایت نابالغ در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال (RJ)، ۳/۳۶ ±۹۱/۳۵٪ از اووسایت‌ها به مرحله‌ی بلوغ هسته‌ای رسیدند (جدول ۱).

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.29252/rap.10.24.76]

جدول ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف FBS و ژله رویال (RJ) بر تکامل برون‌تنی اووسایت بز
Table 1. Effect of different concentration of RJ and FBS on *in vitro* maturation of goat oocyte

تیمارها	شمار اووسایت	درصد تکامل برون‌تنی
شاهد (۱۰ درصد FBS)	۱۴۴	۷۱/۳۳^{c}
۷/۵ درصد FBS + ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RJ	۱۵۲	۷۶/۵۶^{c}
۵ درصد FBS + ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RJ	۱۴۸	۷۲/۷۶^{c}
۲/۵ درصد FBS + ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RJ	۱۴۵	۸۴/۶۸^{b}
۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RJ	۱۵۳	۹۱/۳۵^{a}

اعداد با حروف نامتشابه در هر ستون، داری اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است

لازم به ذکر است که در تیمارهای ۲/۵ درصد FBS + ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RJ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال (RJ)، افزایش معنی‌دار نرخ بلوغ برون‌تنی نسبت به تیمار شاهد در سطح ۰/۰۵ مشاهده شد. اما در تیمارهای ۷/۵ درصد FBS + ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RJ و ۵ درصد FBS + ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RJ نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. تاثیر غلظت‌های مختلف FBS و ژله رویال (RJ) بر نرخ کلیواژ و رویان برون‌تنی بز در جدول ۲ نشان داده شده است.

نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری در نرخ کلیواژ بین تیمارهای ۷/۵ درصد FBS + ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RJ و ۵ درصد FBS + ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RJ وجود ندارد اما این دو تیمار نسبت به تیمار شاهد تفاوت دارند.

جدول ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف FBS و ژله رویال (RJ) بر نرخ تهیه تسهیم و رویان برون‌تنی بز
Table 2. Effect of different concentration of RJ and FBS on cleavage rate and *in vitro* goat embryo

تیمارها	شمار اووسایت	درصد کلیواژ (تعداد)	درصد بلاستوسیست (تعداد)
شاهد (۱۰ درصد FBS)	۱۱۲	۶۲/۵^{d} (۷۰)	۲۱/۴۲^{c} (۲۴)
۷/۵ درصد FBS + ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RJ	۱۰۸	۶۷/۵۹^{c} (۷۳)	۲۵/۹۲^{b} (۲۸)
۵ درصد FBS + ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RJ	۱۱۴	۶۵/۷۸^{c} (۷۵)	۲۴/۵۶^{b} (۲۸)
۲/۵ درصد FBS + ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RJ	۱۱۱	۷۶/۵۷^{b} (۸۵)	۲۸/۸۲^{a} (۳۲)
۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RJ	۱۰۶	۸۳/۳۹^{a} (۸۹)	۳۰/۱۸^{a} (۳۲)

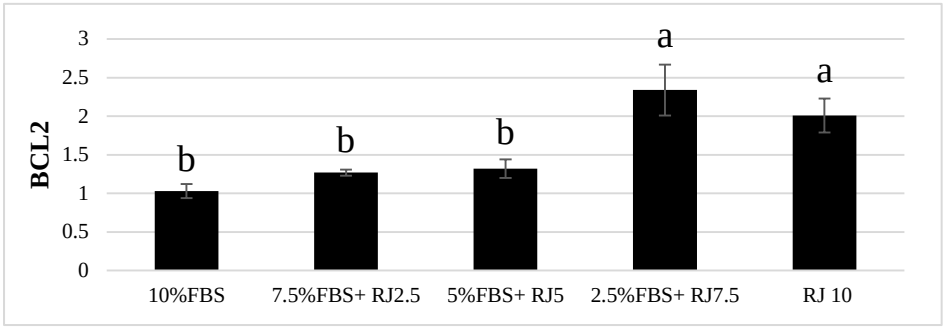
اعداد با حروف نامتشابه در هر ستون، داری اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ است

از لحاظ آماری بین تیمارهای ۲/۵ درصد FBS + ۷/۵ معنی‌داری میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RJ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال (RJ) تفاوت معنی‌داری در نرخ کلیواژ وجود دارد. به‌طوری که افزایش معنی‌دار نرخ کلیواژ در این تیمارها نسبت به تیمار شاهد در سطح ۰/۰۵ دیده شد (٪۷۶/۵۷ و ٪۸۳/۳۹ در مقابل ٪۶۲/۵). همچنین نتایج نشان داد که بین تیمارهای ۷/۵ درصد FBS + ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RJ و ۵ درصد FBS + ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RJ و همین‌طور
تیمارهای ۲/۵ درصد FBS + ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RJ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال (RJ) تفاوت معنی‌داری در نرخ بلاستوسیست وجود نداشت. اما افزایش نرخ بلاستوسیست در این تیمارها نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری دیده شد ($p<۰/۰۵$).

تاثیر غلظت‌های متفاوت FBS و ژل رویال بر بیان نسبی ژن BCL2 در نمودار ۱ نشان داده شده است. یافته‌ها نشان دادند که بیان نسبی ژن BCL2 در تیمارهای ۱۰ درصد ژله رویال و ۲/۵ درصد FBS + ۷/۵ درصد ژله رویال، افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار محیط پایه (۱۰ درصد FBS) و سایر تیمارهای آزمایشی داشته است.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

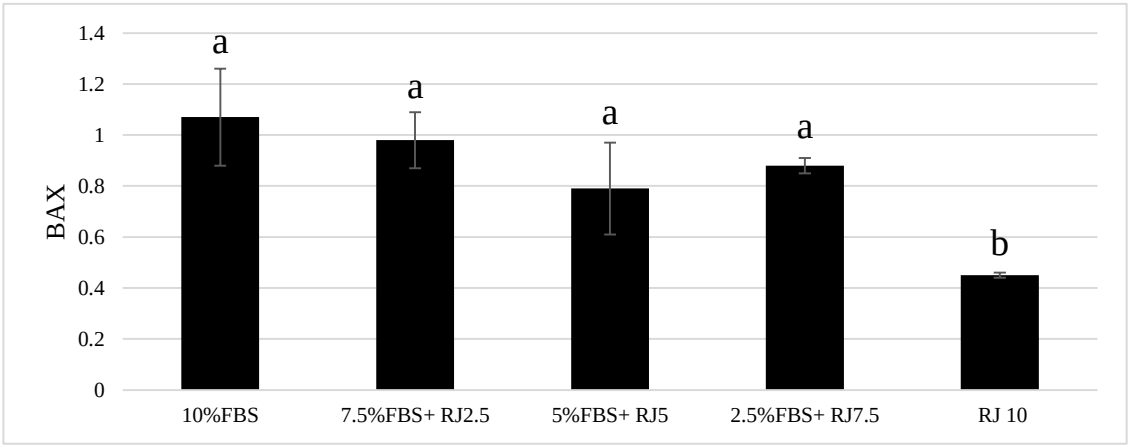
[DOI: 10.29252/rap.10.24.76]



شکل ۱- بیان نسبی ژن BCL2 در پاسخ به غلظت‌های متفاوت FBS و ژله رویال در محیط تکامل اووسایت بز. حروف نامشابه نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است

Figure 1. The relative gene expressions of BCL2 in response to different concentrations of RJ and FBS in *in vitro* goat maturation media. Bars with uncommon superscripts are different (P < 0.05)

تاثیر غلظت‌های متفاوت FBS و ژله رویال بر بیان نسبی ژن BAX در نمودار ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که اضافه کردن ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال به محیط کشت (تیمار بدون FBS) باعث کاهش معناداری در بیان نسبی ژن BAX شده است. از لحاظ آماری تفاوتی در بیان نسبی ژن BAX بین تیمارهای مختلف و تیمار دارای محیط پایه (۱۰ درصد FBS) مشاهده نشده است.



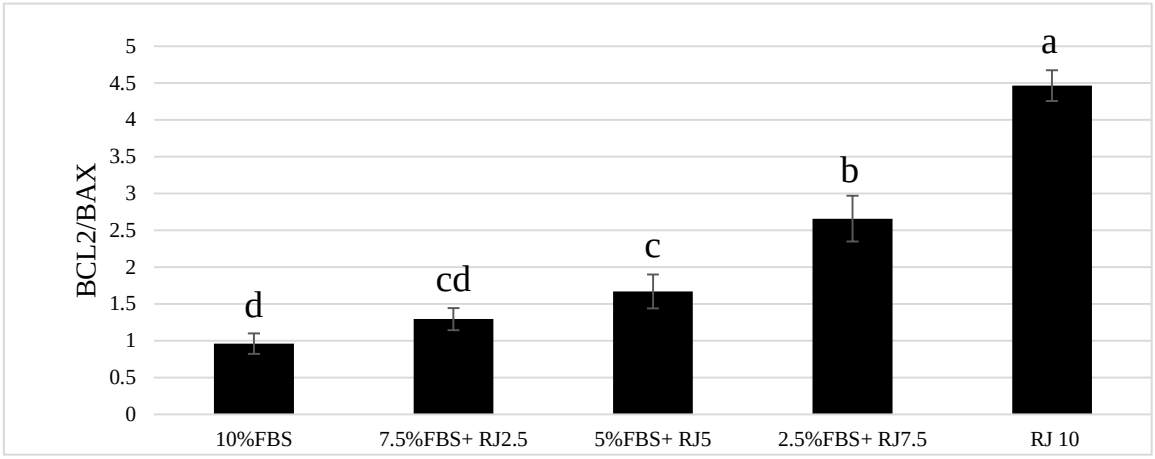
شکل ۲- بیان نسبی ژن BAX در پاسخ به غلظت‌های متفاوت FBS و ژله رویال در تولید رویان برون تنی بز. حروف نامشابه نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است

Figure 2. The relative gene expressions of BAX in response to different concentrations of RJ and FBS in *in vitro* goat maturation media. Bars with uncommon superscripts are different (p < 0.05)

نسبت بیان نسبی BCL2/BAX در پاسخ به غلظت‌های متفاوت FBS و ژله رویال در نمودار ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد اضافه کردن ژله رویال به محیط کشت پایه باعث افزایش معنی‌داری در نسبت بیان BCL2/BAX در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال، تیمار ۲/۵ درصد FBS+ ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال و تیمار دارای ۵ درصد FBS + ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال، نسبت به تیمار ۱۰ درصد FBS شده است.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.29252/rap.10.24.76]

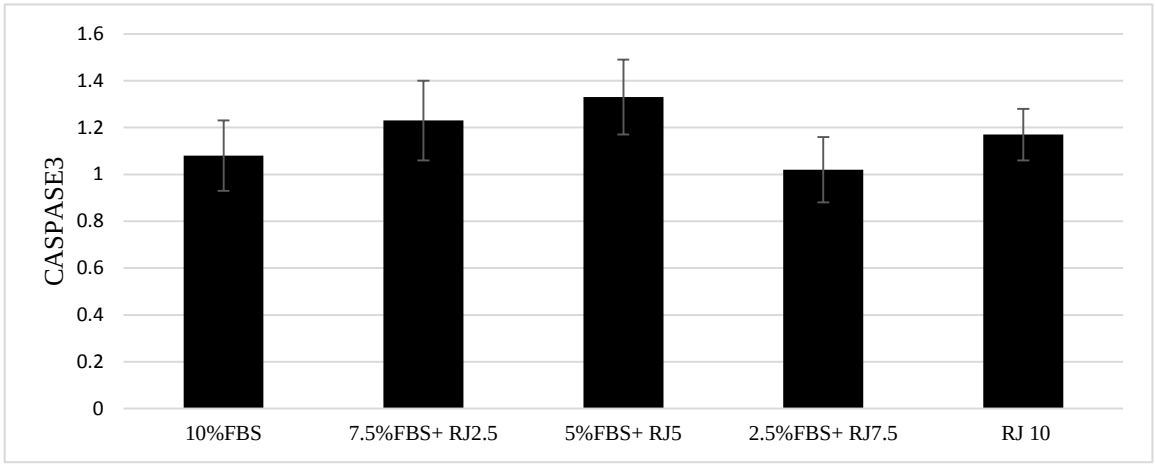


شکل ۳- نسبت بیان BCL2/BAX در پاسخ به غلظت‌های متفاوت FBS و ژله رویال در تولید رویان برون تنی بز. حروف نامشابه نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است

Figure 3. The relative gene expressions of BCL2/BAX in response to different concentrations of RJ and FBS in *in vitro* goat maturation media. Bars with uncommon superscripts are different ($p < 0.05$)

از لحاظ آماری اختلاف معناداری بین تیمار ۷/۵ درصد FBS + ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال با تیمار ۱۰ درصد FBS و تیمار دارای ۵ درصد FBS + ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال دیده نشد.

بیان نسبی ژن CASPASE3 در پاسخ به غلظت‌های متفاوت FBS و ژله رویال در نمودار ۴ نشان داده شده است. از لحاظ آماری تفاوتی بین تیمارهای متفاوت در بیان نسبی ژن CASPASE3 دیده نشد.



شکل ۴- بیان نسبی ژن CASPASE3 در پاسخ به غلظت‌های متفاوت FBS و ژله رویال در تولید رویان برون تنی بز

Figure 4. The relative gene expressions of CASPASE3 in response to different concentrations of RJ and FBS in *in vitro* goat maturation media

در این پژوهش تاثیر غلظت‌های متفاوت FBS و ژله رویال (RJ) بر نرخ بلوغ برون‌تنی اووسایت‌های بز، نرخ کلیواژ و رویان برون‌تنی بز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تیمار دارای ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال، بیشترین درصد بلوغ برون‌تنی اووسایت بز، بیشترین درصد کلیواژ، و بیشترین درصد بلاستوسیست را دارا بود. هم‌چنین درصد بلوغ برون‌تنی، درصد کلیواژ و رویان برون‌تنی در تیمارهایی که در آن‌ها همراه با FBS، از ژل رویال نیز استفاده شده است، به‌طور معنی‌داری از تیمار شاهد (محیط پایه) بیشتر بوده است، به‌طوریکه در بین تمام تیمارهای آزمایشی، کمترین درصد بلوغ برون‌تنی اووسایت بز، درصد کلیواژ، و درصد بلاستوسیست مربوط به تیمار شاهد بوده است. نتایج اونال و همکاران (۱۹) نشان داد که جایگزینی ژله رویال به جای سرم گوساله به‌عنوان منبع مناسب‌تر بیولوژیک برای بلوغ برون تنی اووسایت است. اونال و همکاران (۱۹)، گزارش کردند که اووسایت‌های بالغ شده در محیط کشت مکمل شده با ۱/۲۵ و ۰/۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال دارای وضعیت باروری بهتری بودند. پژوهش ولی الله پور و همکاران (۲۱)، نشان داد که افزودن ژله رویال به محیط کشت برون تنی اووسایت به طور

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.29252/rap.10.24.76]

چشمگیری نرخ بلوغ اووسایت گوسفندهای دالاق را افزایش داد. همچنین مشاهده شده که افزودن ژله رویال به محیط کشت برون تنی اووسایت گوسفند، به طور معنی‌داری باعث افزایش نرخ بلوغ و نرخ لقاح برون تنی و بیان نسبی ژن‌های کلیدی مسیر گلایکولایسیز و پنتوز فسفات در سلول‌های کومولوس گوسفند می‌شود (۲۴،۱).

کشت سلول یا بافت به‌طور معمول نیازمند استفاده از محصولات مشتق شده از حیوانات یا سرم به‌عنوان اجزا محیط کشت است، مانند FBS، که ترکیبی از بیومولکول‌هایی است که باعث رشد و تکثیر سلول‌ها می‌شود. به‌دلیل اینکه FBS غنی از فاکتورهای رشد است و میزان کمی گاماگلوبولین دارد به‌عنوان یک مکمل استاندارد برای محیط کشت سلولی شناخته می‌شود (۱۱). اگرچه ممکن است سرم گاوی از عوامل مفید برای محیط کشت برون‌تنی رویان، برای تهیه‌ی بسترهای انرژی به اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و یا فاکتورهای رشد باشد، ولی در عین حال ممکن است سمی نیز باشد. استفاده از سرم جنین گوساله (FCS) در یک محیط کشت رویان به‌عنوان یک ماده‌ی قابل بحث افزودنی، نشان داده شده است که سبب مهار تقسیمات کلیواژ اولیه و جلوگیری از سرعت بخشیدن به نمو رویان گاو می‌شود (۱۰،۴). استفاده از FBS علاوه بر ایجاد تفاوت بین دسته‌ها، احتمال آلودگی با ویروس‌ها، مایکوپلاسماها و پریون‌ها را نیز در پی دارد (۱۱). با توجه به محدودیت‌های مطرح در تولید سرم جنین گوساله و مشکلات در واردات و قیمت زیاد این محصول و نیز احتمال آلودگی‌های ویروسی آن، ضرورت استفاده از یک ماده‌ی جایگزین یا کاهش‌دهنده‌ی مصرف FCS احساس می‌شود (۶). در پژوهشی نشان داده شده که سرم می‌تواند اثرات نامطلوبی بر رشد و نمو رویان در غلظت‌های مختلفی داشته باشد که عبارتند از: تشکیل بلاستوسیل‌های زودرس، تجزیه‌ی چربی‌ها، ایجاد ساختار غیرطبیعی میتوکندری، اختلال در سوخت و ساز بدن، همکاری در ایجاد بره‌های غیر طبیعی بزرگ در گوسفند (۸). استفاده از سرم به‌عنوان یک مکمل در شرایط برون‌تنی محیط کشت بلوغ، برای اووسایت به نظر قابل بحث می‌رسد، زیرا انواع موادی که منابع مختلف سرم را شامل می‌شود، ممکن است حاوی اثرات مفید و یا مضر باشد. درحالی‌که غلظت‌های مختلفی از ژله رویال، زمانی که در ترکیب با مکمل‌های سرم به‌کار گرفته شد، دارای اثرات مفیدی روی بلوغ آزمایشگاهی دارد.

ژله رویال دارای مقادیر زیادی از پروتئین‌های عمده ژله رویال (MRJPs) است، که بیانگر فعالیت فاکتور رشد در چندین لاین سلول‌های انسانی و حیوانی است (۱۴،۵). به‌طور قابل ملاحظه‌ای حدود ۵۰ درصد از وزن خشک ژله رویال از پروتئین‌ها ساخته شده است، که ۸۰ تا ۹۰ درصد آن مربوط به MRJPsها است (۲۱). در پژوهش‌های انجام شده در چندین لاین سلولی مربوط به حشرات، انسان، و موش‌ها، توجه ویژه‌ای به استفاده از ژله رویال یا پروتئین‌های ژله رویال به‌عنوان جایگزین FBS در کشت سلول پرداخته شده است. بیشتر شواهد نشان داده است که MRJPsها، و به‌ویژه MRJPs1، از عوامل اصلی فعال در رشد و نمو لارو زنبورعسل، و سلول‌های حیوانی و انسانی است (۲۱).

در طی سال‌ها پژوهش روی ژله رویال، اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آپاپتوسیزی ژله رویال مشخص شد. باتوجه به فعالیت‌های بیولوژیکی ژله رویال در مدل‌های تجربی شرایط برون‌تنی در حیوانات آزمایشگاهی، تاثیر غلظت‌های متفاوت FBS و ژله رویال بر بیان نسبی ژن‌های BCL2، BAX، BCL2/BAX و CASPASE3 در تولید رویان برون‌تنی بز نیز بررسی شد.

پروتئین‌های خانواده BCL2 (B-cell lymphoma 2) گروهی از پروتئین‌ها هستند که شامل فاکتورهای مهارکننده‌های آپاپتوسیزی (BCL2 و BCL-XL) و پروتئین‌های القاکننده‌ها (BID، BAX، BAK، و BAD) می‌شود (۲۳). حساسیت سلول به آپاپتوسیز به تعادل فاکتورهای مهارکننده و القاکننده آپاپتوسیز خانواده BCL2 بستگی دارد و نسبت این دو گروه تعیین‌کننده بقا یا مرگ سلول‌اند.

پژوهش انجام شده نشان داد با افزایش غلظت ژله رویال و جایگزینی آن به‌جای FBS بیان نسبی ژن BCL2 افزایش پیدا کرد. به‌طوریکه تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال و تیمار ۲/۵ درصد FBS + ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها را نشان دادند. هم‌چنین در مورد نسبت BCL2/BAX نیز افزایش معنی‌داری متناسب با افزایش غلظت ژله رویال مشاهده شده است. در حالیکه استفاده از ژله رویال به جای FBS در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث کاهش معنی‌داری در بیان نسبی ژن BAX شده است. ولی تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای غلظت‌های متفاوت FBS و ژله رویال در بیان نسبی ژن CASPASE3 با تیمار محیط پایه دیده نشده است. CASPASE3 از جمله کاسپیزهای اجرایی است که در مسیرهای داخلی و خارجی آپاپتوسیز نقش مهمی دارد. فعال شدن این مولکول با تاثیر روی سوبستراهای خود باعث القای آپاپتوسیز می‌شود. بیشترین بیان ژن BCL2 در اووسایت و رویان‌هایی با کیفیت بالا دیده می‌شود. در مقابل بیشترین بیان ژن BAX در اووسایت‌های لخت شده مشاهده می‌شود. این بدان معنی است که نسبت BCL2/BAX می‌تواند به‌عنوان معیاری برای سنجش تمایل اووسایت و یا رویان به سمت بقا یا آپاپتوسیز استفاده شود (۷).

نتایج به‌دست آمده از این پژوهش با پژوهش انجام شده توسط مزنگی و همکاران ۲۰۱۴ همسو است که مشاهده کردند غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال در محیط کشت اووسایت بز، باعث کاهش معنی‌داری در بیان ژن BAX نسبت به تیمار شاهد شده است، درحالیکه در غلظت مشابه از ژله رویال، بیان ژن BCL2 نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد. هم‌چنین بیان ژن p53 نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد، گرچه این میزان افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. هم‌چنین پژوهش ولی الله پور و همکاران (۲۱) نشان داد اضافه کردن ژله رویال به محیط کشت تکامل اووسایت باعث افزایش بیان ژن BCL2

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.29252/rap.10.24.76]

می‌شود. نسبت BCL2 به BAX نیز با اضافه کردن ژله رویال در محیط کشت نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد. این افزایش بیان می‌تواند به‌علت فعالیت آنتی‌اکسیدانی ژله رویال باشد. ژله رویال دارای ترکیبات پلی‌فنلی است، این ترکیبات به‌عنوان آنتی‌اکسیدان شناخته می‌شوند و با انتقال الکترون و یا اتم هیدروژن خود به رادیکال‌ها، باعث پایدار شدن مولکول‌های رادیکال آزاد می‌شوند. با افزایش غلظت ژله رویال در محیط بلوغ اووسایت، بیان نسبی ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز، نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت (۲). به‌تازگی شواهدی نشان دادند که تولید گونه‌های اکسیژن فعال در سلول‌ها نقش اساسی در شروع مرگ سلولی آپاپتوسیزی ایفا می‌کند. گاردنر و لن (۱۰) گزارش کردند رویان‌ها در مرحله پیش از جایگزینی به شرایطی که منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود به شدت حساس‌اند و میزان گلوتاتیون در آن‌ها به‌طور چشمگیری تغییر می‌کند. وجود مقدار زیاد *BCL2* در میتوکندری سلول‌ها نشان می‌دهد که مکانیسم BCL2 با مکانیسم تنفسی و واکنش‌های اکسیداسیون/ احیا مرتبط است.

اثر چندین پروتئین، پپتید و هورمون در ژله رویال باعث می‌شود بیان ژن‌های وابسته به آپاپتوسیز در سلول‌های کومولوس و رویانی گوسفند بهبود پیدا کند. آپاپتوسیز در سلول‌های گرانولوزای اووسایت می‌تواند باعث ایجاد اثرات منفی در توانایی بارور شدن اووسایت‌ها، نرخ باروری و انتقال جنین در شرایط آزمایشگاهی شود، افزایش آپاپتوسیز در سلول‌های گرانولوزا باعث تولید اووسایت‌هایی با کیفیت کمتر و در نهایت رویان‌های ضعیف‌تری می‌شود (۱۹). از آن‌جا که BCL2 یک ژن آنتی‌آپاپتوسیزی است که بقا سلول را حمایت می‌کند، درحالیکه BAX القاکننده آپاپتوسیز است و باعث پیشبرد مرگ سلولی می‌شود، می‌توان نتیجه گرفت ژله رویال با افزایش بیان نسبی ژن‌های مهارکننده آپاپتوسیز و کاهش بیان نسبی ژن‌های القاکننده آپاپتوسیز، باعث بهتر شدن شرایط تولید برون‌تنی رویان بز شده است.

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، دیده شد که با افزایش غلظت ژله رویال در محیط تکامل برون تنی و رشد و نمو رویان درصد اووسایت‌های بالغ شده و بلاستوسیست‌های تشکیل شده افزایش معنی‌داری با سایر تیمارهای آزمایشی داشتند. همچنین همین موضوع در بیان نسبی ژن‌های درگیر در مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نیز دیده شد. بر این اساس می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ترکیبات ژله رویال نسبت به سرم جنین گاوی دارای تاثیرگذارتری بهتری بر تولید برون‌تنی رویان بز بوده است. کاوش در نوع ترکیبات و پروتئین‌های حیاتی ژله رویال و تاثیرگذاری آن‌ها در تولید برون‌تنی رویان در پژوهش‌های آینده اجتناب‌ناپذیر است.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه علوم کشاورزی ومنابع طبیعی ساری در حمایت مالی و فراهم آوردن هزینه های این پژوهش سپاسگزاری می شود.

منابع

1. Eshtiyaghi, M., H. Deldar, Z. Ansari Pisaraie and B. Shohreh. 2014. Effect of royal jelly on glucose metabolism in *in vitro* maturation and fertilization of sheep oocyte: glycolysis and penthose phosphate pathway. 6th Iranian Animal Science Congress, Tabriz, Iran, 1-4.
2. Mohamadi, S., H. Deldar, Z. Ansari Pisaraie and B. Shohreh. 2016. Effect of royal jelly on genes encoding antioxidant enzymes in in vitro embryo production of goat. Animal Production, 18: 867-876.
3. Valioallahpor Amiri, M., H. Deldar and Z. Ansari pisaraie. 2012. Role pf royal jelly on in vitro maturation of sheep oocyte. International congress on reservation of genetic resources of Zel and Dalagh sheep. Gonbad, Iran, 527-531.
4. Bavister, B.D. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. Human Reproduction Update, 1: 91-148.
5. Chen, D., X.X. Xin, H.C. Qian, Z.Y. Yu and L.R. Shen. 2016. Evaluation of the major royal jelly proteins as an alternative to fetal bovine serum in culturing human cell lines. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology), 17(6): 476-483.
6. Fakhr, M., M. Mirzaei, A. Rafei, S. Armat and M. Mojtahedian. 2012. Comparative evaluation of hydatid cyst fluid and fetal bovine serum (fbs) in culture medium of rat fibroblast cells. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences, 22: 222-230.
7. Gaddiner, C. and D.J. Reed. 1994. Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the pre-implantation mouse embryo. Biology of Reproduction, 51: 1307-1314.
8. Gardner, D.K. 1994. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. Cell Biology International, 18: 1163-1179.
9. Gardner, D.K. 1999. Development of serum-free culture systems for the ruminant embryo and subsequent assessment of embryo viability.In: Proceedings 5th International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants, pp: 461-475.
10. Gardner, D.K. and M. Lane. 1997. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. Human Reproduction Update, 3: 367-382.
11. Gstraunthaler, G. 2003. Alternatives to the use of fetal bovine serum: Serum-free cell culture. Altex., 20: 275-281.
12. Guo, H., Y. Kouzuma and M. Yonekura, 2008a. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. Food Chemistry, 113: 238-245.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.29252/rap.10.24.76]

13. Inoue, T. 1986. The use and utilization of royal jelly and the evaluation of the medical efficacy of royal jelly in Japan.Proc. XXXthInternat.Congr.Apicult., Nagoya, Apimondia, 444-447.
14. Marghitaş, L.A. 2008. Produseleapicolesiprincipalelelorinsuşiriterapeutice In: Albinelesiproduselelor. Ceres, Bucharest, pp: 280-378.
15. Mazangi, H.R., H. Deldar, N.E. Kashan and A. Mohammadi-Sangcheshmeh. 2014. Royal jelly treatment during oocyte maturation improves in vitro meiotic competence of goat oocytes by influencing intracellular glutathione synthesis and apoptosis gene expression. Reproduction, Fertility and Development, 27: 241.
16. Nagai, T. and R. Inoue. 2004. Preparation and the functional properties of water and alkaline extract of royal jelly. Food Chemistry, 84: 181-186.
17. Nagai, T.R., R. Inoue, N. Suzuki and T. Nagashima. 2006. Antioxidant properties of enzymatic hydrolysates from royal jelly. Journal of Medicinal Food, 9: 363-367.
18. Nakahara, K., H. Saito, T. Saito, M. Ito, N. Ohta, T. Takahashi and M. Hiroi. 1997. The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in in vitro fertilization programs. Fertility and Sterility, 68: 312-7.
19. Onal, A.G., M. Kuran, I. Tapki, E. Sirin and O. Gorgulu. 2005. Honey bee royal jelly: an alternative source to serum for in vitro maturation of ovine oocytes. European Association for Animal Production-56th Annual Meeting, Uppsala, 283.
20. Schmitzová, J., J. Klaudiny, S. Albert, W. Schröder, W. Schreckengost, J. Hanes, J. Júdová and J. Simúth. 1998. A family of major royal jelly proteins of the honeybee Apis mellifera L. Cellular and Molecular Life Sciences, 54(9): 1020-1030.
21. Valiollahpoor Amiri, M., H. Deldar and Z. Asari Pirsaraei. 2015. Impact of supplementary royl jelly on in vitro maturation of sheep oocytes: genes involved in apoptosis and embryonic development. System Biology in Reproductive Medicine, 62: 31-38.
22. Zhang, G.M., C.H. Gu, Y.L. Zhan, H.Y. Sun, W.P. Qian and Z.R. Zhou. 2013. Age-associated changes in gene expression of goat oocytes. Theriogenology, 80:328-336.
23. Eshtiaghi M., H. Deldar, Z. Ansari Pirsaraei and B. Shohre. 2016. Royal jelly may improve the metabolism of glucose and redox state of ovine oocytes matured in vitro and embryonic development following in vitro fertilization, Theriogenology, 86: 2210-2221.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.29252/rap.10.24.76]

The use of Royal Jelly as a Replacement of Fetal Bovine Serum in *In Vitro* Production of Goat Embryo with Emphasis on Apoptosis Related Genes

Hamid Deldar

Associate Professor of Animal Sciences Department, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, (Corresponding Author: hamiddeldar@gmail.com)
Recived: July 15, 2018 Accepted: October 15, 2018

Abstract

The present study was conducted to investigate the effect of different concentrations of royal jelly as a fetal bovine serum replacement on *in vitro* embryo production of goat oocytes and the gene expression involved in apoptosis. *In vitro* maturation (IVM) of oocyte was performed in the presence of control (10% FBS), 10 mg/ml RJ (without FBS), 5% FBS and 5 mg/ml RJ, 2.5% FBS and 7.5 mg/ml RJ, 7.5% FBS and 2.5 mg/ml RJ. Nuclear statusof matured oocyte and mRNA abundance of selected genes were evaluated following 24 h of IVM. Following the IVM, fertilization and embryo culture were carried out in all groups and embryonic development was examined. Our data suggested that the number of oocytes at metaphase II stage, cleavage and blastocyst stage of the embryo were gradually increased followed by the dose of royal jelly gradually increased in the maturation medium. The addition of 10 mg/ml royal jelly to the maturation media was significantly increased ($P < 0.05$) maturation rate (91.35%) of goat oocyte, cleavage (83.39%) and blastocyst formation (30.18%) compared with the control groups (71.31%, 62.50% and 21.42%, respectively). By increasing of royal jelly concentrations, the mRNA transcript of the BCL2 gene was increased, while transcript abundance of BAX was significantly decreased. BCL2/BAX ratio has also been significantly increased ($P < 0.05$) by increasing of royal jelly concentrations in the maturation media. However, relative gene expression of CASPAS3 gene was not significantly different between treatments. It seems that the gradual increase of royal jelly as a replacement of FBS in the maturation media had a desirable effect on oocyte maturation and the embryo development condition of caprine oocyte.

Keywords: Caprine Oocyte, Fetal Bovine Serum, *In Vitro* Embryo Production, Royal Jelly

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.29252/rap.10.24.76]