Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 19:21 +0330 on Saturday November 18th 2017

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2013; 15(69): 13-20

Determination of the effect of heat stress and different concentrations of melatonin on in vitro maturation of immature ovine oocytes

Biabani K(M.Sc)[1], Zare Shahneh A(Ph.D)[1], Kohram H(Ph.D)[1], Khodaei Motlagh M(Ph.D)[2*]

1- Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Tehran University, Karaj, Iran
2- Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Arak University, Arak, Iran

Received: 11 Jun 2012, Accepted: 19 Sep 2012

Abstract

Background: Heat stress reduces reproductive performance in farm animals. The aim of this study was to determine the effect of heat stress and different concentrations of melatonin on nuclear maturation of ovine oocytes.

Materials and Methods: In this experimental study, ovary collection and oocyte recovery were carried out by standard methods. Oocytes culture was in A: TCM199+10% FBS, 5µg/ml FSH, 0.01IU/ml LH, 100 IU/ml penicillin, and 100 IU/ml streptomycin, B: A+heat stress at 40 C^0, and C and D:B+1 and 10 µM melatonin, respectively.

Results: Heat stress significantly ($P<0.05$) decreased nuclear maturation in the treatment group in comparison with the control group (60.60 vs. 84.89). Also, 1 and 10 µM melatonin could improve oocytes to reach metaphase-II stage (60.60 vs. 76.92, 78.82, respectively). However, increasing the melatonin dose from 1 to 10 µM did not alter oocytes maturation.

Conclusion: Overall, this study showed that melatonin improves ovine immature oocytes maturation during heat stress.

Keywords: Heat stress, melatonin, oocytes maturation

*Corresponding author:
Address: Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Arak University, Arak, Iran
Email: m-motlagh@araku.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 19:21 +0330 on Saturday November 18th 2017

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 15، شماره 9 (شماره پیاپی 69)، اسفند 1391، 20-14

تعیین اثر تنش گرمایی و ملاتونین بر بلوغ آزمایشگاهی اووسیت های نابالغ میش

کاظم بیابانی[1]، احمد زارع شحنه[2]، حمید کهرام[3]، مهدی خدایی مطلق[*4]

1- کارشناس ارشد فیزیولوژی دام، گروه علوم دامی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
2- استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
3- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
4- استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: 91/3/22 تاریخ پذیرش: 91/6/29

چکیده

زمینه و هدف: تنش گرمایی سبب کاهش عملکرد تولید مثلی در حیوانات مزرعه‌ای می‌شود. هدف از این مطالعه تعیین اثر تنش گرمایی و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بلوغ هسته‌ای اووسیت‌های نابالغ گوسفند می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، جمع‌آوری تخمدان و استحصال اووسیت به روش استاندارد بود، کشت اووسیت‌ها به چهار روش که در روش اول *TCM199* به علاوه 10 درصد *FBS*، *FSH* 5 پیکوگرم بر میلی‌لیتر، *LH* 0/01 واحد بین المللی بر میلی‌لیتر، 100 واحد بین المللی بر میلی‌لیتر پنی سیلین و 100واحد بین المللی بر میلی‌لیتر استرپتومایسین استفاده شد. روش دوم مشابه روش اول به اضافه تنش گرمایی با دمای40 درجه سانتیگراد و روش های سوم و چهارم نیز مشابه روش دوم به اضافه 1 و 10 میکرومولار ملاتونین انجام شد.

یافته‌ها: تنش گرمایی، بلوغ هسته‌ای را به طور معنی‌داری($p<0/025$) نسبت به گروه کنترل کاهش می‌دهد (60/60 در مقابل 84/89). 1 و 10 میکرومولار ملاتونین توانست هنگام تنش گرمایی میزان اووسیت‌هایی که به متافاز-2 می‌رسند را افزایش دهد(به ترتیب 60/60 در مقابل 76/92 و 78/82)، اما با افزایش غلظت ملاتونین از 1 به 10 میکرومولار، میزان بلوغ اووسیت‌ها تغییر نیافت.

نتیجه‌گیری: به طور کلی این مطالعه نشان داد که ملاتونین هنگام تنش گرمایی بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌های نابالغ گوسفند را بهبود می‌بخشد.

واژگان کلیدی: تنش گرمایی، ملاتونین، بلوغ اووسیت

***نویسنده مسئول**: اراک، دانشگاه اراک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم دامی
Email: m-motlagh@araku.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 19:21 +0330 on Saturday November 18th 2017

مقدمه

تنش گرمایی علت اصلی کاهش باروری گاوهای تلقیح شده در ماه‌های گرم تابستان است. فرایند تشکیل گامت‌ها به دما حساس بوده و اثر تنش گرمایی روی باروری ممکن است به دلیل اثر مستقیم دمای بالای تخمدان بر کیفیت اووسیت باشد(1، 2). لنز و همکاران در سال 1983 نشان دادند که کمپلکس اووسیت-کومولوس که در معرض تنش حرارتی قرار می‌گیرند پراکندگی سلول‌های کومولوس در آنها اتفاق نمی‌افتد و تنش در کاهش تولید هیالورونیک اسید موثر می‌باشد، عدم پراکنده شدن سلول‌های کومولوس اطراف اووسیت سبب کندی رسیدن اسپرم به اووسیت و کاهش باروری می‌گردد(3). تخمک‌هایی که در زمان بلوغ در معرض تنش حرارتی قرار گرفته‌اند پس از تلقیح در جایگزینی در رحم دچار مشکلات جدی می‌شوند و سقط قبل از لانه گزینی در آنها بیشتر اتفاق می‌افتد. گزارش شده است که تنش گرمایی پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. تنش گرمایی به مادر، سبب به هم ریخته شدن رشته‌های دوک متافاز میوز-2 و خروج اولین جسم قطبی در موش می‌شود(4، 5). تنش سبب تغییر شکل دوک‌های میوزی و در نتیجه افزایش زمان توقف در مرحله متافاز یک می‌شود که در نهایت با به هم ریختن فنوتیپ تخمک به پیر شدن آن منتهی می‌شود. دمای بالاتر از 43 درجه سانتی‌گراد بر اووسیت‌های موش سبب شوک حرارتی شدید شده و از بلوغ کامل اووسیت ممانعت می‌نماید که مکانیسم آن فعال نمودن مسیر پروتئین کیناز می‌باشد(6).

تنش گرمایی سبب تولید رادیکال‌های آزادی مثل آنیون پراکسید (O_2) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) نیز می‌شود که پیامد آن باعث القاء تنش اکسیداتیو به سلول شده و توانایی اووسیت و رویان برای ادامه حیات را کاهش می‌دهد(4، 7). این نوع رادیکال‌های آزاد سبب از کارافتادن میتوکندری‌ها، آسیب به *DNA*، *RNA* و پروتئین‌ها می‌شود(8). استفاده از فاکتور رشد شبه انسولین نوع 1 (Insulin-like Growth Factor1-IGF-1) برای رویان‌های کشت شده گاو در شرایط برون تنی اثرات تنش گرمایی را با جلوگیری از آپوپتوزیس کاهش داد(9). ملاتونین، مهم‌ترین هورمون غده صنوبری در ابتدا به عنوان هورمون موثر در فیزیولوژی تولید مثل، در حیواناتی که تولید مثل فصلی داشتند، شناسایی شد. اخیراً گزارش شده است که ملاتونین به طور مستقیم رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برد و به طور غیر مستقیم نیز با تحریک آنزیم‌های آنتی اکسیدان عمل می‌کند و در حذف رادیکال‌های پراکسید هیدروژن دو برابر قوی‌تر از ویتامین E عمل می‌کند(10، 11). به طور کلی ملاتونین بیوانرژتیک سلول را بهبود بخشیده، مکانیسم‌های ترمیم کننده ژنوم میتوکندری را فعال کرده و تولید *ATP* را افزایش می‌دهد(12). با بررسی‌های به عمل آمده می‌توان انتظار داشت، ملاتونین هنگام تنش گرمایی، اووسیت را از گامهٔ بلوغ تا تبدیل شدن آن به رویان قابل انتقال، از تنش گرمایی حفظ نموده و قابلیت رشد و نمو آن را بهبود بخشد. در این مطالعه به بررسی اثر تنش گرمایی، بر بلوغ برون تنی اووسیت‌های میش پرداخته شد و هم‌چنین تاثیر متقابل تنش حرارتی و افزودن غلظت‌های مختلف ملاتونین به محیط کشت بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، به منظور تهیه اووسیت‌های گوسفندی، تخمدان‌ها بلافاصله پس از کشتار از لاشه دام جدا و در درون فلاسک حاوی سرم فیزیولوژی به همراه 100 واحد بین المللی پنی سیلین و 100 واحد بین المللی استرپتومایسین در هر میلی‌لیتر و در دمای 35-30 درجه سانتی‌گراد در مدت کمتر از یک ساعت به آزمایشگاه منتقل شد. کمپلکس‌های کومولوس- اووسیت با روش آسپیره کردن از فولیکول‌های آنترال با قطر 6-2 میلی‌متر با استفاده از سرنگ با نیدل شماره 20 که به دستگاه ساکشن متصل بود، انجام شد. سپس در محیط کشت حاوی *H-TCM199*+10% *FBS*، 50 میکرو لیتر هپارین و 100 واحد بین المللی بر میلی‌لیتر پنی سیلین و 100 واحد بین المللی بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، جمع‌آوری شد. پس از ارزیابی،

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 19:21 +0330 on Saturday November 18th 2017

فقط کمپلکس‌های کومولوس- اووسیت‌هایی که دارای سیتوپلاسم یکنواخت با سلول‌های پوشیده از کومولوس انتخاب شد و پس از 4 بار شستشو در محیط بدون هپارین، در قطره‌های 50 میکرولیتری از محیط کشت بلوغ در گروه‌های 10-8 تایی قرار و روی آنها با روغن معدنی پوشانده شد. سپس درون انکوباتوری که دمای آن 38/5 درجه سانتی‌گراد بوده و دارای 5 درصد گازکربنیک و هوای بسیار مرطوب بود به مدت 24 ساعت بالغ شدند. محیط بلوغ آزمایشگاهی حاوی *FBS* %10+*TCM199*، 5 پیکوگرم بر میلی‌لیتر *FSH*، 0/01 واحد بین المللی بر میلی‌لیتر *LH*، 100 واحد بین المللی بر میلی‌لیتر پنی سیلین و 100 واحد بین المللی بر میلی‌لیتر استرپتومایسین بود. گروه‌های آزمایشی نیز به این صورت بود: گروه1: کنترل، گروه 2: تنش گرمایی با دمای 40 درجه سانتی‌گراد برای مدت 24 ساعت، گروه 3: تنش گرمایی به اضافه 1 میکرومولار ملاتونین، گروه 4: تنش گرمایی به اضافه10 میکرومولار ملاتونین.

برای ارزیابی مرحله بلوغ هسته‌ای بعد از بلوغ، اووسیت‌ها با اسید استیک و اتانول به نسبت 3 به 1 بر روی اسلاید فیکس و با اورسئین 1 درصد رنگ آمیزی شد و سپس برای ارزیابی کروموزم‌های متافاز میوز-2 از میکروسکوپ اینورت استفاده شد. داده‌های به دست آمده پس از ارزیابی بلوغ هسته‌ای، با آزمون کای اسکوئر و با استفاده از روش ژن مد *(GENMOD)* در برنامه *SAS* نسخه 9/1 تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها

اثر تنش گرمایی و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بلوغ هسته‌ای اووسیت‌های نابالغ گوسفند، پس از 24 ساعت کشت در جدول یک نشان داده شده است.

در این مطالعه 408 تخمک نابالغ و سالم از تخمدان‌های کشتارگاهی گوسفندان جمع‌آوری گردید و در سه گروه آزمایشی و گروه شاهد ارزیابی شدند. در گروه شاهد از 139 تخمک نابالغ که به مدت 24 ساعت در انکوباتور co_2 دار کشت شد در 98/57 درصد از تخمک‌های نابالغ از سرگیری تقسیم میوز مشاهده شد، در حالی که در 1/43 درصد تخمک‌ها، پس از کشت هیچ‌گونه علائمی از آغاز میوز رویت نشد. از بین این میزان 6/47 درصد هسته شکسته شده بود(*Germinal Vesicle Break-Down*) و 7/19 درصد در مرحله بین بلوغ و هسته شکسته‌ها قرار داشتند و 84/9 درصد تخمک‌ها تا مرحله متافاز 2 پیشرفته و به مرحله بلوغ رسیده بودند. میزان بلوغ در گروه شاهد نسبت به تیمار یک از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد($p\leq0/05$)

در گروه آزمایشی اول 132 تخمک نارس سالم کشت شد که پس از گذشت 24 ساعت صد درصد تخمک‌ها مراحل رشد را آغاز نمودند و از سرگیری میوز در تمام تخمک‌های کشت شده رویت گردید، که 18/18 درصد آنها هسته شکسته بودند و 21/21 درصد در مرحله بین هسته شکسته و بالغ (مرحله میانی) متوقف شده بودند. هم‌چنین 60/6 درصد به مرحله متافاز 2 رسیده و بالغ شده بودند که از نظر آماری با تیمارهای دو، سه و گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بود(p=0/025).

در گروه آزمایشی دوم از 52 تخمک نارس سالم کشت شده، پس از گذشت 24 ساعت هیچ کدام در مرحله نابالغ متوقف نشده بودند و از سرگیری میوز در صد درصد از تخمک‌های نابالغ رویت گردید که 7/69 درصد آنها هسته شکسته بود و 15/38 درصد در مرحله بین هسته شکسته و بالغ متوقف شده بودند. هم‌چنین 76/92 درصد به مرحله متافاز 2 رسیده و بالغ شده بودند که از نظر آماری با تیمارهای یک دارای اختلاف معنی‌داری بود(p<0/05) و با تیمار سه و شاهد دارای اختلاف معنی‌داری نبود.

در گروه آزمایشی سوم 85 تخمک نارس سالم کشت شد، پس از گذشت 24 ساعت 1/18درصد در مرحله نابالغ متوقف شده بودند و از سرگیری میوز در 98/82 درصد از تخمک‌های نابالغ رویت گردید که 7/06 درصد آنها هسته شکسته بود و 12/94

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 19:21 +0330 on Saturday November 18th 2017

درصد در مرحله میانی متوقف شده بودند هم‌چنین 78/82 درصد به مرحله متافاز 2 رسیده و بالغ شده بودند، که از نظر آماری با تیمار یک دارای اختلاف معنی‌داری بود($p<0/05$). و با تیمار دو و گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری نبود.

جدول 1. اثر تنش گرمایی و غلظت های مختلف ملاتونین بر بلوغ هسته ای اووسیت های نابالغ گوسفند، پس از 24 ساعت کشت

گروه‌ها	تعداد اووسیت نابالغ	دمای انکوباتور	دوز مصرفی ملاتونین (μM)	24 ساعت پس از کشت تعداد (درصد)			
				GV	GVBD	Intermediate	M-II
شاهد	139	C° 38/5	0	2(1/43±0/71)	9(6/47±0/34)	10(7/19±0/33)	118(84/9±0/24)
تیمار1	132	C°40	0	0	24(18/18±0/23)	28(21/21±0/21)	80(60/6±0/17)
تیمار2	52	C°40	1	0	4(7/69±0/52)	8(15/38±0/38)	40(76/92±0/32)
تیمار3	85	C°40	10	1(1/18±1/01)	6(7/06±0/42)	11(12/94±0/32)	67(78/82±0/26)
احتمال معنی‌داری	--	---	---	0/25	0/02	0/02	0/04

GV: اووسیت‌هایی که در مرحله کیسه‌ی زاینده هستند، GVBD: اووسیت‌هایی که در مرحله‌ی ناپدید شدن کیسه‌ی زاینده هستند، Inter: اووسیت‌هایی که در مرحله ی بینGVBD و M2 مانده‌اند و M-II: اووسیت‌هایی که در مرحله‌ی متافاز-2 قرار دارند. نتایج به صورت mean±SE در داخل پرانتز گزارش شده است.

تنش حرارتی پس از 24 ساعت کشت، بلوغ هسته‌ای اووسیت‌های گوسفند را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش داد($p=0/025$)(60/6 در مقابل 84/9). غلظت ملاتونین در سطوح 1 و 10 میکرومولار توانست هنگام تنش حرارتی بلوغ میوزی اووسیت‌های گوسفندی را بهبود بخشد (به ترتیب 60/6 در مقابل 76/92 و 78/82) و میزان اووسیت‌هایی را که به مرحله متافاز-2 می‌رسند را افزایش داد که از نظر آماری این تغییرات معنی‌دار بود($p<0/05$). هم‌چنین با افزایش غلظت ملاتونین از 1 به 10 میکرو مولار میزان بلوغ اووسیت تغییر نیافت.

بحث

علی‌رغم پیشرفت‌های زیاد در تکنولوژی تولید مثلی، کاهش کیفیت اووسیت به عنوان یک مشکل در ناباروری حیوانات ماده باقی مانده است. تنش گرمایی در سلول و بافت تنش اکسیداتیو را افزایش می‌دهد و با تولید آنیون سوپراکسید و هیدروژن پراکسید همراه است(4).

تنش گرمایی سبب افزایش درصد تخمک‌های متوقف شده در مرحله *GVBD* شد (18/18 درصد)، که از نظر آماری نسبت به گروه کنترل و تیمار سه دارای اثر معنی‌داری بود که احتمالاً طبق مطالعات سین و همکاران تنش با ایجاد آشفتگی در *RNA* اووسیت سبب توقف فعالیت‌ها در مرحله *GVBD* می‌شود(6).

غلظت داخل فولیکولی ملاتونین در فولیکول‌های بالغ نسبت به فولیکول‌های کوچک آترزیی شده بیشتر است که در فولیکول‌های پیش از تخمک‌ریزی تقریباً 3 برابر بیشتر از سطح سرمی آن است. ملاتونین به عنوان یک آنتی اکسیدان نقش اساسی در حمایت از اووسیت در مقابل مواد فعال اکسیژنی(Reactive Oxygen Substance-ROS) و تنش حرارتی دارد. ملاتونین آسیب *DNA* و پروتئین میتوکندری‌ها را کاهش می‌دهد و فعالیت زنجیره انتقال الکترون را بهبود می‌بخشد. ملاتونین ممکن است به طور مستقیم از آسیب به میتوکندری در اووسیت جلوگیری کند که منجر به بهبود کیفیت اووسیت می‌شود(13).

تخمک بالغ پستانداران در مرحله متافاز دو آزاد می شود و تا زمان ورود اسپرم به داخل تخمک تحرکات لازم برای رهایی از این توقف و آزادسازی جسم قطبی به عنوان ادامه میوز صورت می‌پذیرد. در این مطالعه مشخص شد که ملاتونین با غلظت 1 و 10 میکرومول بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز را در تخمک‌های نارس

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 19:21 +0330 on Saturday November 18th 2017

گوسفند افزایش می‌دهد؛ به این ترتیب که میزان بلوغ آزمایشگاهی در گروه‌های آزمایشی دو و سه نسبت به گروه یک که فاقد این ماده هستند، افزایش قابل توجهی را نشان داد که شاید ملاتونین با اثر بر تشکیل دوک‌ها سبب پیشرفت بلوغ شده باشد، تنش حرارتی با تغییر بلوغ هسته سبب توقف تخمک در مرحله متافاز یک می‌شود و جسم قطبی از آن خارج نمی‌شود(5).

ملاتونین نقش مهمی را در حفاظت سلول از آسیب تنش حرارتی دارد که به واسطه افزایش آنزیم‌هایی مانند گلوتاتیون ردوکتاز، گلوکز 6 فسفات دهیدروژناز میزان رادیکال‌های آزاد یا مواد فعال اکسیژن را کاهش می‌دهد.

احتمالاً ملاتونین از عوامل کلیدی موثر در کاهش پراکسیدهای داخل سلولی که در اثر تنش حرارتی تولید می‌شود می‌باشد در این مطالعه نیز مشخص شد که با اضافه کردن ملاتونین به عنوان یک آنتی اکسیدان به محیط کشت بلوغ تخمک‌های نارس گوسفند، بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز افزایش یافت و با افزایش غلظت ملاتونین در محیط کشت اثرات منفی تنش اکسیداتیو و حرارتی کاهش یافت.

در شرایط مناسب و عاری از تنش ژن‌های آنتی اکسیدانی به خوبی بیان شده و مانع اثرات منفی عوامل اکسیداسیونی می‌شوند(5). اما در اثر تنش حرارتی با افزایش مواد اکسیدانی در سلول و کاهش غلظت آنتی اکسیدان‌ها عامل مهمی در آغاز مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌باشند. تنش حرارتی سبب ایجاد آنوپلوئیدی در کروموزوم‌های اووسیت در میوز یک می‌شود و به دنبال آن ناهنجاری‌های ژنتیکی و رشدی ایجاد می‌گردد هم‌چنین اثرات زیان آور افزایش دما در اسکلت سلولی و دوک‌های میوزی گزارش شده است(5، 14).

تنش حرارتی قبل از لقاح تخمک سبب کاهش باروری شده است که برخی از این ناباروری‌ها ممکن است انعکاسی از آسیب به مرحله رشد و نمو بوده باشد. گزارشاتی در مورد نرخ باروری تخمک‌های آزمایشگاهی وجود دارد، که نشان می‌دهد تخمک‌های فصل تابستان دارای نرخ باروری کمتری در آزمایشگاه نسبت به تخمک‌های فصل زمستان می‌باشد. تنش حرارتی با کاهش تولید استروئید در فولیکول سبب تغییر روند رشد و توسعه آن می‌شود. اختلال در روند تولید استروئید در فولیکول باعث آسیب به روند رشد تخمک می‌گردد. علاوه بر این تنش حرارتی رشد فولیکول غالب را کند می‌نماید و سبب رشد ناقص فولیکول‌های غالب شده و از طرفی موجب افزایش رشد فولیکول‌های مغلوب می‌گردد لذا در این صورت تخمک ریزی از یک فولیکول پیر رخ می‌دهد که تخمک آن دارای قدرت رشد کندی می‌باشد.

اووسیت‌ها برخلاف سایر سلول‌ها هنگام تخمک‌ریزی از نظر رونویسی غیرفعال می‌شوند و پتانسیل سنتز پروتئین شوک حرارتی 70 کیلو دالتونی (Heat shock protein 70 kDa=HSP70) در پاسخ به شوک حرارتی را ندارند و اندازه تخمک به عنوان محدودکننده تولید پتانسیل سنتز پروتئین شوک حرارتی 70 کیلو دالتونی می‌باشد. افزایش دما ممکن است اثرات زیان آوری بر رشد تخمک، ساخت پروتئین یا تشکیل عوامل موثر در رونویسی در مراحل بعدی رشد و توسعه جنین گردد. احتمالاً تنش حرارتی سبب کاهش 30 تا 50 درصد سنتز پروتئین‌های داخل سلولی می‌شود که با کاهش فعالیت ریبوزوم‌ها کاهش سنتز پروتئین‌ها رخ می‌دهد و با تغییرات در سطح مولکولی مانع حصول جنین‌های مناسب در مراحل پس از لقاح خواهد شد(15).

در طول زمان تنش حرارتی آپوپتوزیس نیز با سرعت زیادی سبب نابودی اووسیت‌ها می‌شود(9). ملاتونین با تاثیر مستقیم از وارد شدن آسیب به میتوکندری تخمک‌ها ممانعت نماید و سبب افزایش کیفیت تخمک گردد، که از اثرات ضد آپوپتوزی ملاتونین بر انواع سلول‌های مختلف ناشی می‌شود(4، 16).

نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار محیط کشت با ملاتونین، میزان بلوغ را در مقایسه با گروه تنش حرارتی (بدون افزودن ملاتونین) افزایش می‌دهد که با نتایج وازکوز

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 19:21 +0330 on Saturday November 18th 2017

و همکاران تاثیر مثبت ملاتونین بر بلوغ تخمک‌های گوسفند را گزارش نمودند مطابقت می‌نماید(13).

مطالعات زیادی اهمیت میتوکندری‌ها را در فرایندهای بلوغ، لقاح اووسیت و رشد و نمو اولیه رویان اثبات کرده‌اند(17). ملاتونین به شدت چربی‌دوست بوده و از غشاء سلول به آسانی عبور می‌کند و می‌تواند به درون اندامک‌های سلولی مثل میتوکندری برسد. علاوه بر آن ملاتونین با غشاء دو لایه لیپیدی واکنش برقرار نموده و باعث پایداری غشاهای درونی میتوکندری شده و در نتیجه ممکن است باعث بهبود عملکرد زنجیره تنفسی در میتوکندری شود. در مطالعه‌ای نشان داده شد ملاتونین در غلظت 10 تا 50 میکرومولار بلوغ هسته‌ای و میزان رویان های قابل انتقال گاو میش را هنگام تولید آزمایشگاهی رویان افزایش می‌دهد(18). ملاتونین سطوح پراکسید هیدروژن میتوکندری‌ها را کاهش داده و هموستازی گلوتاتیون را حفظ کرده و عملکرد میتوکندری را هنگام تنش اکسیداتیو بهبود می‌بخشد(12). بنابراین تاثیر مثبت ملاتونین بر بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌های گوسفند هنگام تنش گرمایی احتمالاً می‌تواند به این دلیل باشد که تنش گرمایی سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود و ملاتونین با زدون آنها از سلول، از وارد آمدن آسیب به غشاءسلول، میتوکندری، رشته‌های دوک، ژنوم و پروتئین‌های اووسیت، بلوغ آن را هنگام تنش گرمایی بهبود می‌بخشد.

نتیجه‌گیری

تنش حرارتی سبب اثرات مضر در بلوغ برون تنی اووسیت شده و جنبه مهار کنندگی در بلوغ اووسیت دارد و از طرفی ملاتونین بلوغ آزمایشگاهی اووسیت های نابالغ گوسفند را هنگام تنش حرارتی بهبود می‌بخشد و بهبود بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌های گوسفند هنگام تنش حرارتی در این آزمایش را شاید بتوان به اثرات مفید و چندگانه ملاتونین ارتباط داد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران به دلیل تامین اعتبار این طرح تحقیقاتی با شماره 7108011/1/02 تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

1. Al-Katanani Y, Paula-Lopes F, Hansen P. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. Journal of dairy science. 2002;85(2):390-6.
2. Rensis FD, Scaramuzzi RJ. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow-a review. Theriogenology. 2003; 60(6): 1139-51.
3. Lenz R, Ball G, Leibfried M, Ax R, First N. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. Biology of reproduction. 1983;29(1):173-9.
4. Ju JC, Jiang S, Tseng JK, Parks JE, Yang X. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. Theriogenology. 2005;64(8):1677-89.
5. Torres-Júnior JRS, Pires M, De Sa W, Ferreira AM, Viana JHM, Camargo LSA, et al. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in Bos indicus cattle. Theriogenology. 2008;69(2):155-66.
6. LaRosa C, Downs SM. Meiotic induction by heat stress in mouse oocytes: Involvement of AMP-activated protein kinase and MAPK family members. Biology of reproduction. 2007; 76(3):476-86.
7. Biabani K, Zare Shahneh A, Kohram H, Khodaei Motlagh M. Effect of stress oxidative (H2O2) and different concentrations of melatonin on in vitro maturation of immature ovine oocytes. Journal of cell and tissue (in press).[Persian]
8. Peter J. Effect of stress oxidative (H2O2) and different concentrations of melatonin on in vitro maturation of immature ovine oocytes. Phil. Trans. R. Soc. B. 2009; 364: 3341-50.
9. Hansen P. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 19:21 +0330 on Saturday November 18th 2017

embryonic survival in dairy cattle during heat stress. Theriogenology.2007;68:S242-S9.
10. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. Life sciences. 1994; 55(15):PL271-PL6.
11. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, et al. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. Journal of pineal research. 2007;18(1):1-11.
12. Karbownik M, Reiter RJ. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 2008; 225(1):9-22.
13. Vázquez M, Abecia J, Forcada F, Casao A. Effects of exogenous melatonin on in vivo embryo viability and oocyte competence of undernourished ewes after weaning during the seasonal anestrus. Theriogenology. 2010; 74(4): 618-26.
14. Peter CKL, Adashi Ey. The Ovary. 2 ed: Elsevier Inc; 2004.p.113-30.
15. Payton RR, RispoliI LA, Saxton AM, Edwards JL. Impact of Heat Stress Exposure During Meiotic Maturation on Oocyte, Surrounding Cumulus Cell, and Embryo RNA Populations. Journal of Reproduction and Development. 2011; 57(4):481-91.
16. Juknat AA, Mendez MVA, Quaglino A, Fameli CI, Mena M, Kotler ML. Melatonin prevents hydrogen peroxide-induced Bax expression in cultured rat astrocytes. Journal of pineal research. 2004; 38(2):84-92.
17. Spikings EC, Alderson J, John JCS. Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. Biology of reproduction. 2007; 76(2):327-35.
18. Manjunatha B, Devaraj M, Gupta P, Ravindra J, Nandi S. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo in vitro embryo development. Reproduction in Domestic Animals. 2008; 44(1):12-6.