تولیدات دامی
دوره ۱۸ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۵
صفحه‌های ۸۷۶-۸۶۷

اثرات ژله رویال بر بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در بلوغ و تولید برون‌تنی رویان بز

سمیرا محمدی[۱]، حمید دلدار[۲*]، زربخت انصاری پیرسرایی[۳]، بهرام شهره[۴]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری – ایران
۲. استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری – ایران
۳. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری – ایران
۴. استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری – ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۴/۱۰/۰۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۵/۳۱

چکیده

اثر غلظت‌های مختلف ژله رویال به عنوان یک آنتی‌اکسیدان، بر بلوغ برون‌تنی تخمک بز در یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار (غلظت‌های صفر (شاهد)، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال) بررسی شد. تخمدان‌های بز از کشتارگاه جمع‌آوری و مجموعه اووسایت کومولوس بز از فولیکول‌های آنترال جدا شدند و در محیط Medium 199 به همراه غلظت‌های مختلف ژله رویال کشت داده شدند. اووسایت هاپس از ۲۴ ساعت به بلوغ رسیدند. نتایج نشان داد که افزایش غلظت ژله رویال به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) نرخ بلوغ برون‌تنی تخمک‌ها را از ۵۴ درصد (تیمار شاهد) به ۹۳ درصد (تیمار ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) افزایش داد. افزایش غلظت ژله رویال در محیط کشت بلوغ، موجب افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) نرخ کلیواژ از ۲/۶۴±۶۲/۵ درصد (تیمار شاهد) به ۳/۷۸±۸۵/۶ درصد (تیمار ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و نرخ تولید بلاستوسیت از ۲/۲۶±۱۵/۴ درصد (تیمار شاهد) به ۳/۴۲±۳۸/۶ درصد (تیمار ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) شد. با افزایش غلظت ژله رویال در محیط، بیان نسبی ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). براساس نتایج حاصل، افزودن ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ژله رویال در محیط بلوغ تخمک، موجب بهبود وضعیت اکسیداتیو، بلوغ هسته‌ای تخمک و رشد و نمو بلاستوسیست بز شد.

کلیدواژه‌ها: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، بلوغ برون‌تنی، تخمک بز، رشد و نمو رویان، ژله رویال

* نویسنده مسئول
Email:

مقدمه

بلوغ برون‌تنی تخمک بخشی از تکنیک‌های کمک باروری است و شامل فرآیندی است که طی آن اووسایت‌هایی که از فولیکول‌های آنترال جدا شده‌اند، در یک محیط کشت تعریف شده (محیط بلوغ)، به مدت ۲۴ ساعت بالغ شده تا توانایی لازم برای باروری را به‌دست آورند [۲۷]. بلوغ تخمک فرآیند بسیار پیچیده‌ای است که به عنوان دوره پیشرفت از اولین توقف میوزی (پروفاز – ۱) به دومین توقف میوزی (متافاز میوز– ۲) تعریف می‌شود و بلوغ هسته‌ای و بلوغ سیتوپلاسمی را دربرمی‌گیرد [۲۴]. عدم تکمیل بلوغ تخمک طی مراحل رشد از مشکلاتی است که بر سر راه موفقیت بلوغ برون‌تنی قرار دارد. محیط کشت یکی از عوامل مهم و تأثیرگذار بر بلوغ تخمک است [۲].

تراکم اکسیژن در دستگاه تناسلی ماده، در حدود یک سوم (۹–۳ درصد) مقدار اکسیژنی است که در شرایط استاندارد آزمایشگاهی وجود دارد. بنابراین، رویان‌هایی که در شرایط برون‌تنی با فشار زیاد اکسیژن (۲۰ درصد) رشد می‌یابند، بیشترین مقدار رادیکال‌های آزاد را تولید می‌کنند [۲]. بیشترین اثر تخریبی رادیکال‌های آزاد متوجه غشای سلولی و غشای اندامک‌های درون‌سلولی، مانند غشای میتوکندری است. آسیب به غشای فسفولیپیدی سلول منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و درنتیجه سبب آسیب به DNA سلول می‌شود. همچنین، رادیکال‌های آزاد باعث تخریب سایر اجزای سلولی مهم مانند پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها شده و موجب مرگ اووسایت‌های کشت داده شده می‌شوند [۱۸، ۲۰ و ۲۱]. رادیکال‌های آزاد در سلول، با سازوکارهای دفاعی آنزیمی از قبیل سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز و نیز به‌وسیله آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند برخی ویتامین‌ها و غیره از بین می‌روند [۴]. تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و مهار آن، عامل مهمی برای دستیابی به توانایی لقاح در شرایط برون‌تنی است. بنابراین، در این شرایط، ممکن است سازوکار دفاعی اووسایت برای حفاظت از خود در برابر رادیکال‌های آزاد، کافی نباشد [۲]. لذا، برای جلوگیری از اکسیداسیون و تخریبی که توسط غلظت‌های زیاد رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شود، می‌توان مولکول‌هایی با ویژگی آنتی‌اکسیدانی، به محیط کشت اضافه کرد [۲].

ژله رویال ترکیبی است که غده هیپوفارینژیال موجود در سرزنبورهای کارگر ترشح شده و به ضروری‌ترین ماده غذایی برای رشد ملکه در تمام طول عمر و نیز نوزادان زنبور در مراحل اولیه رشد، محسوب می‌شود [۲۶]. ژله رویال حاوی ترکیباتی نظیر آب، پروتئین‌ها، چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها، آمینواسید، نمک‌های معدنی، ویتامین‌ها، آنزیم‌ها، هورمون‌ها، مواد معدنی و آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی است [۲۵]. ژله رویال ویژگی‌های ضدالتهابی [۱۷]، فعالیت ضدباکتری [۶] و فعالیت تحریک تکثیر سلولی [۱۵] دارد. ژله رویال حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است و توانایی مقابله با رادیکال‌های آزاد را دارد [۸ و ۱۴]. ژله رویال سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی درون سلولی را تقویت می‌نماید [۳].

هدف از انجام پژوهش حاضر، ارزیابی تأثیر غلظت‌های مختلف ژله رویال به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی مؤثر، بر افزایش بازدهی بلوغ اووسایت، تولید رویان در شرایط آزمایشگاه و همچنین بیان نسبی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تخمک بز بود.

مواد و روش‌ها

تخمدان‌های بز از کشتارگاه گوشت شرق مازندران از ماده بزهای تازه کشتار شده جمع‌آوری شدند و به محض رسیدن تخمدان‌ها به آزمایشگاه، مجموعه تخمک کومولوس بز به روش برشی از فولیکول‌های آنترال کوچک (۲ تا ۶ میلی‌متر) تخمدان در محیط مایع اویداکت ساختگی

به همراه بافر هیپس جداسازی و جمع‌آوری شد. مجموعه-هایی که ۳ لایه کومولوس یا بیشتر باشند، در محیط کشت بلوغ درون قطره‌های ۵۰ میکرولیتری در پتری دیش‌های ۱۵ × ۶۰ قرار گرفته، با روغن معدنی و گرم پوشانیده شده و در انکوباتور قرار گرفتند. محیط کشت حاوی محیط کشت TCM-199 به همراه سدیم پیروات (۰/۱ mM)، سدیم بی‌کربنات (۲۵mM)، ۵ درصد سرم جنین گاوی، ۰/۰۱U/mL هورمون‌های LH و FSH گوسفندی بود. در هر قطره محیط کشت ۵۰ میکرولیتری، نهتا ۱۱ کمپلکس تخمک کومولوس درون انکوباتور با ۵ درصد CO_2، دارای ۹۸ درصد رطوبت نسبی در دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت اووسایت‌ها به مرحله بلوغ رسیدند [۲۷]. جهت آماده‌سازی ژله رویال، از کپسول‌های ۱۰۰۰ میلی‌گرمی ژله رویال محصول شرکت نیچرال لایف استرالیا استفاده شد. یک کپسول (۱۰۰۰ میلی‌گرم) ژله رویال در ۱۰ میلی‌لیتر TCM حل شد تا به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رسید. سپس، در حجم‌های ۱۰۰۰ میکرولیتری الیکوت و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تیمارهای آزمایشی محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف ژله رویال بودند که ژله رویال در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به محیط‌های بلوغ تخمک‌های بز افزوده شدند. برای اندازه‌گیری نرخ بلوغ تخمک، سلول‌های کومولوس از تخمک به‌وسیله آنزیم هیالورونیداز جدا و تخمک‌های بدون کومولوس نیز ۳ بار با محیط مایع اویداکت ساختگی شستشو شدند. براساس دیدن جسم قطبی، تعداد تخمک هایی که به مرحله متافاز میوز ۲ (تخمک‌های بالغ) رسیدند، مشخص شد و برحسب درصد گزارش شد.

برای انجام باروری برون‌تنی، تخمک‌ها دو بار در محیط مایع اویداکت ساختگی شستشو شدند. سپس، گروه‌های ده‌تایی از تخمک‌های هر گروه در قطره‌های ۵۰ میکرولیتری از محیط مایع اویداکت ساختگی با چهار واحد بین‌المللی/ میلی‌لیتر هپارین، ۲۰ میکرومولار پنی‌سیلین آمین، ۱۰ میکرومولار هایپوتائورین، یک میکرومولار اپی نفرین و ۲ درصد (حجم/ حجم) سرم ماده بز فحل قرار داده شدند. سپس، پایوت‌های اسپرم منجمد شده بز یخ‌گشایی شدند و اسپرم‌های جدا شده یا غلظت ۲×۱۰^{۶} اسپرم در هر میلی‌لیتر به قطره‌های لقاح برون‌تنی اضافه شدند و قطره‌ها به مدت ۱۸ ساعت در شرایط ذکر شده در انکوباتور CO_2 قرار گرفتند. سپس، زایگوت‌های احتمالی از سلول‌های کومولوس جدا شدند و در محیط کشت CR_1 که شامل ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی، ۱۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر اسیدهای آمینه غیرضروری و ۲۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر اسیدهای آمینه ضروری بود، به مدت ۸ روز کشت داده شدند [۲]. درصد تسهیم و درصد تولید بلاستوسیست به ترتیب ۳ و ۸ روز پس از کشت محاسبه و ثبت شد. به منظور بررسی بیان نسبی ژن‌های آنتی‌اکسیدانی درون‌سلولی، RNA کل از ۵۰ تخمک لخت شده از هر تیمار جدا شد. برای جداسازی RNA از کیت (۷۴۰۰۴، کایا ژن) استفاده شد. برای ساخت cDNA از کیت QuantiTec Revers Transcription (۲۰۳۵۱۱، کایا ژن) استفاده شد.

واکنش ریل تایم پی سی آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) و کیت شرکت کایا ژن در دستگاه ریل تایم کوربت انجام شد. برای اندازه‌گیری بیان ژن‌ها از روش لیواک استفاده شد. از ژن *YWHAZ* به عنوان ژن نرمال‌سازی استفاده شد. برای استفاده بهینه از کیت، واکنش‌ها برای حجم ۲۵µL تنظیم شدند (مسترمیکس سایبرگرین به مقدار ۱۲/۵ میکرولیتر، جفت آغازگر اختصاصی هرکدام یک میکرولیتر، یک میکرولیتر cDNA و ۹/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر). واکنش‌ها برای هر نمونه

در ۳ تکرار انجام شدند. سپس، برای هر یک از نمونه‌ها چرخه آستانه (CT) در دستگاه Real Time PCR تعیین شد و برای اندازه‌گیری بیان ژن‌ها از روش لیواک استفاده شد [۳۳]. بیان ژن *YWHAZ* به عنوان بیان ژن مرجع مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار، در ۱۰ تکرار انجام شد. داده‌ها با استفاده از رویه مدل‌های خطی عمومی نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۱) در قالب مدل آماری ۱ تجزیه و میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند.

مدل (۱) $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$

در این رابطه، Y_{ij} مقدار عددی تکرار jام از تیمار iام، μ میانگین داده‌ها، T_i اثر تیمار i و e_{ij} اثر خطای آزمایش است.

جدول ۱ . آغازگرهای استفاده شده برای بیان نسبی ژن‌ها

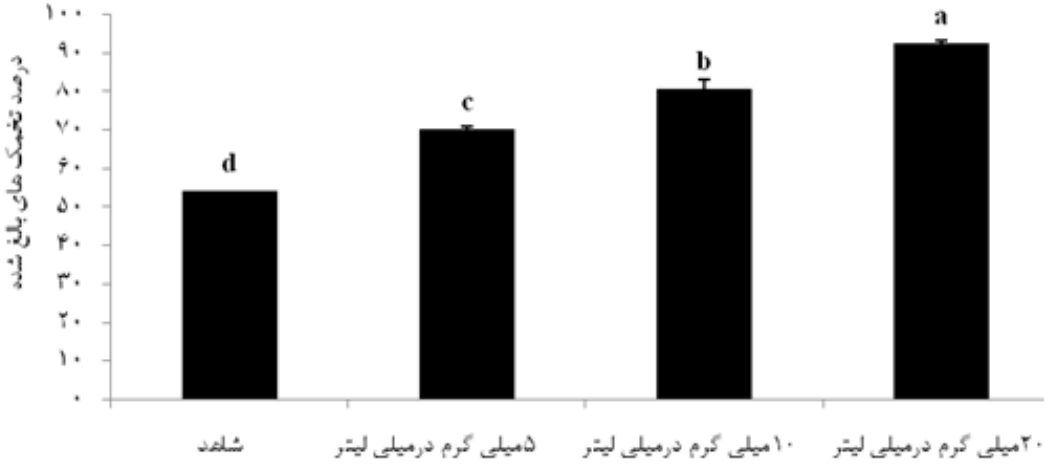
ژن‌ها	آغازگر رفت و برگشت	شماره شناسایی	جفت باز
SOD	F:5´-CAC TTC GAG GCA AAG GGA GA-3´ R:5´-CCA AAC TGA TGG ACG TGG AA-3´	AB201469.1	۹۲
GPX	F:5- GGA TGA AAG TCC AGC CCA AG-3 R:5´-GAC CAT ACC GCT TCA CCA CA-3´	GU131344.1	۱۰۷
CAT	F:5´-CAA TGT TCT GAC GGT AGG GC-3´ R:5´-TTC GCC TTG GAG TAT CTG GT-3´	GQ204786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

نتایج و بحث

افزایش غلظت‌های مختلف ژله رویال نرخ بلوغ برون‌تنی تخمک‌ها را از ۵۴ درصد در تیمار شاهد، به ۰/۵±۹۳ درصد در تیمار ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ژله رویال افزایش داد (P<۰/۰۵) (شکل ۱). همچنین، افزایش غلظت ژله رویال موجب افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) نرخ کلیواژ از ۲/۶۴±۶۲/۵ درصد (تیمار شاهد) به ۳/۷۸±۸۵/۶ درصد (تیمار ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و نیز افزایش نرخ بلاستوسیت از ۲/۲۶±۱۵/۴ درصد (تیمار شاهد) به ۳/۴۲±۳۸/۶ درصد (تیمار ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) شد (جدول ۲). نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های پیشین هم‌خوانی دارد که مشخص شد افزودن ژله رویال به محیط بلوغ برون‌تنی اووسایت منجر به افزایش نرخ بلوغ اووسایت شده است [۲۳].

افزایش نرخ بلوغ و باروری تخمک توسط ژله رویال را می‌توان به برخی از ترکیبات ژله رویال مانند گونادوتروپین‌ها نسبت داد که می‌توانند سنتز DNA و RNA تحریک نموده موجب افزایش تقسیم سلولی شوند [۱]. ژله رویال دارای ویتامین A، E، C و D و نیز مجموعه ویتامین‌های گروه B به‌ویژه B_1، B_2، B_6، B_{12}، بیوتین، اسیدفولیک، اسیدپانتوتنیک و اینوزیتول است [۱۶]. افزودن ویتامین‌ها به محیط کشت تخمک، موجب افزایش بیان گیرنده‌های گنادوتروپین و آنزیم نیتریک اکسایدسنتاز در سلول‌های کومولوسوگرانولوزا شده و از این راه توانسته

بلوغ سیتوپلاسمی و بلوغ هسته‌ای تخمک را افزایش دهد و رشدونمو آن را پس از باروری حمایت کند [۵، ۱۰ و ۳۲]. بنابراین، می‌توان تأثیر ژله رویال بر افزایش نرخ بلوغ و باروری تخمک را به ویتامین‌های موجود در آن هم نسبت داد. ژله رویال دارای ۷ تا ۱۸ درصد کربوهیدرات است که از جمله این کربوهیدرات‌ها می‌توان به گلوکز، فروکتوز و ساکارز اشاره کرد [۲۹]. افزودن گلوکز به محیط بلوغ تخمک گاو، موجب از سرگیری میوز و بهبود نرخ بلوغ شده، همچنین موجب افزایش نرخ بلاستوسیست نیز می‌شود [۱۸]. بنابراین، احتمال دارد که کربوهیدرات موجود در ژله رویال نیز بر بهبود نرخ بلوغ نقش مهمی را ایفا کند. ژله رویال منبعی بسیار کامل و غنی از پروتئین و ۸ نوع اسیدآمینه ضروری است [۱۶].



شکل ۱ . تأثیر غلظت‌های مختلف ژله رویال بر بلوغ برون‌تنی تخمک بز

a-c: تفاوت اعداد با حروف نامتشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

جدول ۲ . تأثیر افزودن ژله رویال در محیط بلوغ برون‌تنی تخمک بر رشدونمو رویان بز

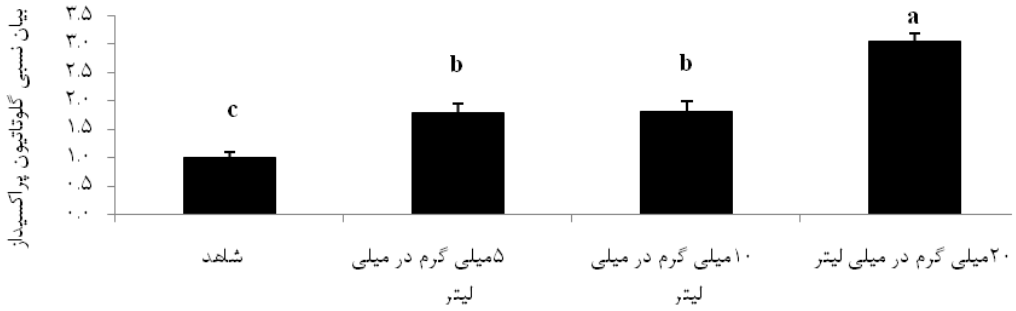
تیمارها	تعداد تخمک	درصد رشد و نمو رویان	
		تسهیم (کلیواژ)	بلاستوسیست
شاهد	۱۳۲	۶۲/۵ ± ۲/۶۴[c]	۱۵/۴ ± ۲/۲۶[c]
۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	۱۲۵	۶۵/۹ ± ۲/۲۵[c]	۱۷/۷ ± ۲/۱۲[c]
۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	۱۱۸	۷۶/۸ ± ۲/۴۶[b]	۲۵/۴ ± ۱/۵۴[b]
۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	۱۲۰	۸۵/۶ ± ۳/۷۸[a]	۳۸/۶ ± ۳/۴۲[a]

a-c: تفاوت اعداد با حروف نامتشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

حضور اسیدهای آمینه، به‌ویژه اسیدهای آمینه ضروری، در محیط بلوغ اووسایت، برای بلوغ سیتوپلاسمی تخمک و رشدونمو آن در مراحل بعدی مفید است. بنابراین، احتمال دارد که افزودن ژله رویال به محیط بلوغ به دلیل اسیدهای آمینه موجود در آن موجب بهبود نرخ بلوغ شده باشد [۲۸].

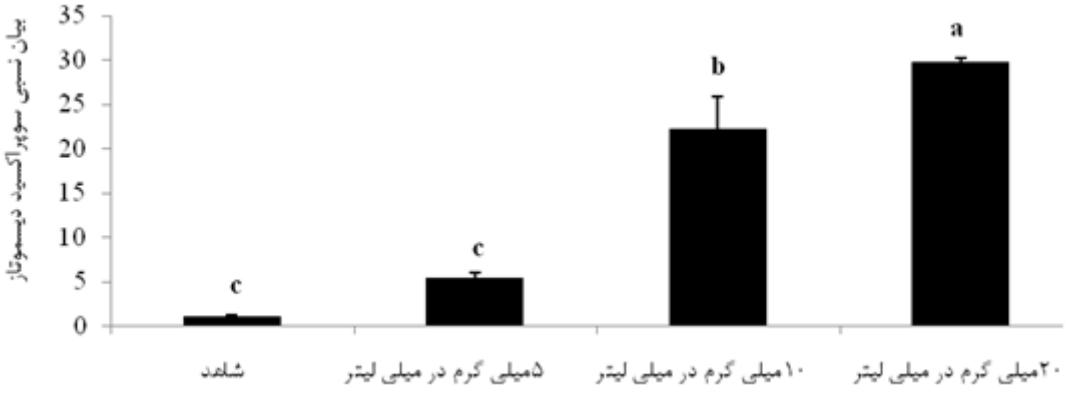
افزودن آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی به محیط کشت تخمک، موجب بهبود نرخ بلوغ و نرخ بلاستوسیست می‌شود [۲]. با بررسی ویژگی و ساختار پپتیدهای آنتی‌اکسیداتیو موجود در پروتئین ژله رویال مشخص شد که که دی‌پپتیدهایی که در کربوکسیل پایانی خود دارای آمینواسید تیروزین هستند، دارای ویژگی آنتی‌اکسیدانی هستند که با دادن اتم هیدروژن گروه هیدروکسیل خود به رادیکال‌های آزاد، باعث اتلاف آن‌ها می‌شوند [۸]. بنابراین، یکی از دلایل بهبود نرخ بلوغ و باروری تخمک‌ها را می‌توان به ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن نسبت داد. همچنین تأثیر ژله رویال بر رشد و بهبود نرخ بلوغ و باروری تخمک‌ها را می‌توان به فعالیت تکثیر سلولی [۱۵] و فعالیت ضدباکتری [۶] آن نیز نسبت داد.

با افزایش غلظت ژله رویال در محیط بلوغ تخمک، بیان نسبی ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز، نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت (شکل‌های ۲، ۳ و ۴). ژله رویال بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در موش‌های تحت درمان با داروی سیس پلاتین را تحت تأثیر قرار داد [۱۴]. همچنین نتایج پژوهش حاضر با نتایج دیگر تحقیقات که تأثیر ژله رویال بر بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را به ترتیب در سلول مخمر و خرگوش‌هایی که طناب نخاعی آنها دچار آسیب شده بود بررسی کردند، هم‌خوانی دارد [۳ و ۱۱]. از سوی دیگر، پپتیدهای ژله رویال می‌توانند پراکسیداسیون لیپیدها را هم در شرایط برون‌تنی و هم در شرایط درون‌تنی مهار کنند [۹]. ال-آرژینینموجود در ژله رویال می‌تواند استرساکسیداتیو در کبد و مغز را کاهش دهد، ژله رویال دارای اسیدهای آمینه از جمله اسیداسپارتیک، ال‌آرژینینسیستئین، سیستین، والین، ایزولوسین و غیره است [۳۰]. سیستین و سیستئین در سنتز گلوتاتیون مورد استفاده قرار می‌گیرند. گلوتاتیون یک آنتی‌اکسیدان سلولی مؤثر است که رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برد [۱۳]. همچنین آمینواسیدهای آزاد مانند گلیسین، اسیداسپارتیک و والینیز به عنوان پیش‌ساز گلوتاتیون شناخته شده‌اند [۱۳]. 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 [۱۲].



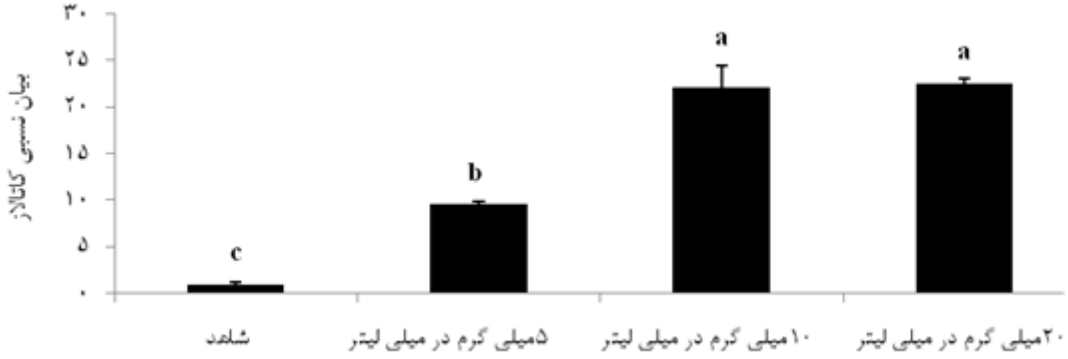
شکل ۲ . تأثیر غلظت‌های مختلف ژله رویال بر بیان نسبی ژن گلوتاتیون پراکسیداز در تخمک بز

a-c: تفاوت اعداد با حروف نامتشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).



شکل ۳ . تأثیر غلظت‌های مختلف ژله رویال بر بیان نسبی ژن سوپراکسید دیسموتاز در تخمک بز

a-c: **تفاوت اعداد با حروف نامتشابه در هر ستون، معنی‌دار است (P<۰/۰۵).**



شکل ۴ . تأثیر غلظت‌های مختلف ژله رویال بر بیان نسبی ژن کاتالاز در تخمک بز

a-c: **تفاوت اعداد با حروف نامتشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).**

ترکیبات فنلی به عنوان آنتی‌اکسیدان شناخته می‌شوند و با انتقال الکترون و یا اتم هیدروژن خود به رادیکال‌ها، باعث پایدار شدن مولکول‌های رادیکال آزاد می‌شوند [۱۹ و ۲۵]. ژله رویال نیز دارای ترکیبات فنلی است که بیشتر ترکیب اتفلاونوئیدی است و غلظت آن به عوامل مختلفی از جمله گونه‌های گیاهی استفاده شده توسط زنبور عسل، سلامت گیاه، فصل، عوامل محیطی و غیرهوابسته است [۲۵]. 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 [۲۲]. اسیدهای چرب و استرول‌های استخراج شده از ژله رویال همانند استرادایول ۱۷-بتا عمل می‌کنند [۳۴ و ۳۵]، اما باتوجه به ماهیت استرول‌ها و اسیدهای چرب به نظر نمی‌رسد که این ترکیبات در محیط آبی حل شوند و بر نتایج پژوهش حاضر تأثیرگذار باشند. گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز به منظور عملکرد رشدی تخمک موردنیاز هستند و نیز در کاهش تنش اکسیداتیو در تخمک نقش اساسی دارند [۳۱]. ارتباط مستقیمی بین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش بلوغ

سیتوپلاسمی و هسته‌ای تخمک و درنتیجه بهبود نرخ بلاستوسیست وجود دارد [۷ و ۳۱] که این یافته‌ها هم راستا با یافته‌های پژوهش کنونی است. لذا، پژوهش‌های تکمیلی در مورد تأثیر اجزای ژله رویال بر تولید رویان برون‌تنی ضروری است. باتوجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر، افزودن ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر غلظت ژله رویال در محیط کشت بلوغ اووسایت‌ها توانست بیان نسبی ژن‌های آنتی‌اکسیدانی تخمک و درنتیجه افزایش نرخ بلوغ تخمک و بهبود نرخ کلیواژ و بلاستوسیت را موجب شود.

منابع

1. Abd-Allah and Saber Mohamed (2012) Effect of Royal Jelly on viability and *in vitro* Maturation of Egyptian sheep oocytes in serum supplemented Medium. British Journal of Pharmacology Toxicology**.** 3: 29-32.

2. Ali AA, Bilodeau JF and Sirard MA (2003) Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development.Theriogenology**.** 59: 939-949.

3. Aslan A, Cemek M, Buyukokuroglu ME, Altunbas K, Bas O and Yurumez Y (2012) Royal jelly can diminish secondary neuronal damage after experimental spinal cord injury in rabbits. Food and Chemical Toxicology. 50: 2554-2559.

4. Bolojan L (2012) Characterization of free radicals in biomedical andbiopharmaceutical systems. Ph.D. Thesis, University of Cluj-Napoca. Pp. 1-30.

5. Bormann CL, Ongeri EM and Krisher RL (2003) The effect of vitamins during maturation of caprine oocytes on subsequent developmental potential in vitro. Theriogenology. 59: 1373-1380.

6. Boukraa L, Niar A, Benbarek H and Benhanifia M (2008) Additive action of royal jelly and honey against Staphylococcus aureus. Medicinal Food**.** 11: 190-192.

7. Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC and Beconi MT (2001) Antioxidant Enzyme Activity and Oxidative Stress in Bovine Oocyte *in vitro* Maturation. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life. 51: 57-64.

8. Guo H, Kouzuma Y and Yonekura M (2008a) Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. Food Chemistry. 113: 238-245.

9. Guo H, Ekusa A, Iwai K, Yonekura M, Takahata Y and Morimatsu F (2008b) Royal Jelly peptides inhibit lipid peroxidation *in vitro* and *in vivo*. Journal of Nutritional ScienceVitaminol. 54: 191-195.

10. Ikeda S, Kitagawa M, Imai H and Yamada M (2005) The roles of vitamin A for cytoplasmic maturation of bovine oocytes. Journal of Reproduction and Development. 51: 23-3.

11. Jamnik P, Goranovic D and Raspor P (2007) Antioxidative action of royal jelly in the yeast cell. Experimental Gerontology. 42: 594-600.

12. Kamakura M, Maebuchi M, Ozasa S, Komori M, Ogawa T, Sakaki T and Moriyama T (2005) Influence of royal jelly on mouse hepatic gene expression and safety assessment with a DNA microarray. NutritionalScienceand Vitaminology. 51: 148-155.

13. Kanbur M, Eraslan G, Beyaz L, Silici S, Liman BC, Altınordulu S and Atasever A (2009) The effects of royal jelly on liver damage induced by paracetamol in mice. Experimental and ToxicologicPathology. 61: 123-132.

14. Karadeniz A, Simsek N, Karakus E, Yildirim S, Kara A, Can I, Kisa F, Emre H and Turkeli M (2011) Royal Jelly Modulates Oxidative Stress and Apoptosis in Liver and Kidneys of Rats Treated with Cisplatin. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2011, 10 pages.

15. Kimura M, Kimura Y, Tsumura K, Okihara K, Sugimoto H, Yamada H and Yonekura M (2003) 350-kDa royal jelly glycoprotein (apisin), which stimulates proliferation of human monocytes, bears the beta 1-3galactosylated Nglycan: Analysis of the N-glycosylation site. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 67: 2055-2058.

16. Kodai T, Umebayashi K, Nakatani T, Ishiyama K and Noda N (2007) Compositions of royal jelly II.Organic acid glycosides and sterols of the royal jellyof honeybees. Apis mellifera. 55: 1528-1531.

17. Kohno K, Okamoto I, Sano O, Arai N, Iwaki K, Ikeda M and Kurimoto M (2004) Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 68: 138-145.

18. Krishnamurthy P and Wadhwani A (2012) Antioxidant Enzymes and Human Health, In: El-Missiry, MA. (ed.), 2012. Antioxidant Enzyme, Published by InTech. Chapter 1. Pp. 1-16.

19. Kucuk M, Kolayli S, Karaoglu S, Ulusoy E, Baltaci C and Candan F (2007) Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. Food Chemistry. 100: 526-534.

20. Lamina S, Ezema CHI, Theresa AI and Anthonia EU (2013) Effects of free radicals and antioxidants on exercise performance. Journal of Medical Science. 2: 83-91.

21. Mates JM (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology. 153: 83-104.

22. Martos M, Navajas YR, Lopez JF and Alvarez JAP (2008) Functional properties of honey, propolis, and royal jelly, Journal of Food Science. 73: 117-124.

23. Mazangi HR, Deldar H, Kashan NE and Mohammadi-Sangcheshmeh A (2015) 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: 241-241.

24. Motlagh MK, Shahneh AZ, Daliri M, Kohram H and Ghragozlou F (2008) *In vitro* maturation of sheep oocytes in different concentrations of mare serum. African Journal of Biotechnology. **7**: 3380-3382.

25. Pavel CI, Marghitas LAO, Bobis DS, Dezmirian A, Sapcaliu I, Radoi and Madas MN (2011) Biological activities of royal jelly. Animal Science and Biotechnology. 44: 108-118.

26. Pourmoradian S, Mahdavi R, Mobasseri M, Faramarzi E and Mobasseri M (2012) Effects of royal Jelly supplementation on body weight and dietary intake in type 2 diabetic females. Health Promotion Perspectives. 2: 231-235.

27. Rahman ANMA, Abdullah RB and Wan-Khadijah WE (2008) *In vitro* maturation of oocytes with special reference to goat: A review. Biotechnology. 7: 599-611.

28. Rezaei N and Chian RC (2005) Effects of essential and non-essential amino acids on *in vitro* maturation, fertilization and development of immature bovine oocyte. Reproductive Medicine. 3: 36-41.

29. Sabatin AG, Marcazzan G, Caboni MF, Bogdanov S and Muradian LB (2009) Quality and standardization of royal jelly**.** Journalof Agri-Food and Applied Sciences. 1: 1-6.

30. Tatemoto H, Muto N, Sunagawa I and Nakada T (2004) Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. Biology of Reproduction. 71: 1150-1157.

31. Vahedi AV, Zeinoaldini S, Kohram H and Farahavar A (2009) Effects retinoic acid on nuclear maturation of bovine oocytes *in vitro*. African Journal of Biotechnology. 8: 3974-3978.

32. Whitaker BD (2007) Oxidative stress mechanisms within the developing porcine oocyte and the effects of Antioxidant supplementation. Ph.D. Thesis, Faculty of the Virginia Polytechnic. Pp. 1-82.

33. Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\ \Delta CT}$ method. Methods. 25: 402-408.

34. Kridli RT, Husein MQ and Humphrey WD (2003) Effect of royal jelly and GnRH on the estrussyn chronization and pregnancy rate in ewes using intravaginal sponges. Small Ruminant Research. 49: 25-30.

35. Mishima S, Suzuki KM, Isohama Y, Kuratsu N, Araki Y, Inoue M and et al. (2005) Royal jelly has estrogeniceffects *in vitro* and *in vivo*. Journal of Ethnopharmacology. 101: 215-220.