تولیدات دامی
دوره ۲۲ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۹
صفحه‌های ۵۰۰-۴۹۱
DOI: 10.22059/jap.2020.290887.623456

مطالعه اثر غلظت‌های مختلف لیپوپلی‌ساکارید بر توانایی تکوین برون‌تنی و فراسنجه‌های محیط بلوغ تخمک گوسفند

سارا عطایی نظری[۱]، عبداله محمدی سنگ چشمه[۲*]، محمدرضا بختیاری زاده[۳]، علی اسدی الموتی[۲]، علی فولادی نشتا[۴]
۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران.
۲. استادیار، گروه علومی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران.
۳. دانشیار، گروه علومی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران.
۴. استاد، گروه دامپزشکی، رویال کمبریج، دانشگاه لندن، لندن، انگلیس.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۸/۱۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۱۱/۲۵

چکیده
هدف از این مطالعه، بررسی اثر غلظت‌های مختلف لیپوپلی‌ساکارید در محیط کشت بر بلوغ تخمک، توانایی تکوین تخمک و فراسنجه‌های مرتبط با محیط کشت بلوغ شامل گلوکز، پیروات، لاکتات و اسیدآمینه گلوتامین بود. تیمارهای آزمایشی شامل غلظت‌های صفر (شاهد)، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید در محیط کشت بلوغ تخمک بود. تخمک‌ها به‌همراه سلول‌های کومولوس اطراف آن در حضور غلظت‌های مختلف لیپوپلی‌ساکارید کشت داده شدند. پس از ۲٤ ساعت محیط کشت جمع‌آوری و درصد بلوغ تخمک‌ها، درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست محاسبه شد. درصد بلوغ تخمک در تیمار با سطح ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکارید پایین‌ترین بود (P<۰/۰۵). در بین فراسنجه‌های اندازه‌گیری‌شده، تنها غلظت گلوکز در پاسخ به سطوح افزایشی لیپوپلی‌ساکارید موجود در محیط کشت به‌صورت خطی کاهش یافت (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که تیمار ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید غلظت گلوکز پایین‌تری نسبت به تیمارهای دیگر داشت. درصد تسهیم در تیمار دارای ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید در مقایسه با بقیه تیمارها پایین‌تر بود (P<۰/۰۵). هم‌چنین سطوح ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکارید منجر به کاهش معنی‌دار درصد تولید بلاستوسیست در مقایسه با تیمار شاهد شد (P<۰/۰۵). براساس نتایج این پژوهش، لیپوپلی‌ساکارید اثرات منفی بر تکوین تخمک گوسفند دارد و اثرات آن احتمالاً از طریق تأثیر بر مسیرهای مرتبط با متابولیسم انرژی میانجی‌گری می‌گردد. به‌کارگیری برنامه‌های مدیریتی به‌منظور کنترل عوامل افزایش‌دهنده غلظت لیپوپلی‌ساکارید در دوره تولیدمثل می‌تواند از کاهش عملکرد تولیدمثلی دام جلوگیری کند.

کلیدواژه‌ها: بیماری‌های عفونی، تخمک، دیواره سلول باکتریایی، عملکرد تولیدمثلی، میش.

Effect of various concentrations of lipopolysaccharide on in vitro developmental competence of ovine oocyte and metabolites related to the maturation medium

Sara Ataei Nazari[1], Abdollah Mohammadi Sangcheshme[2*], Mohammad Reza Bakhtiarizadeh[3], Ali Assadi Alamouti[2], Ali Fouladi Nashta[4]
1. Ph.D. Candidate, Department of Animal Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Pakdasht, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Pakdasht, Iran.
3. Associate Professor, Department of Animal Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Pakdasht, Iran.
4. Professor, Department of Reproduction Genes and Development Group, Royal Veterinary College, Hawkshead Campus, Hatfield, UK.
Received: November 05, 2019 Accepted: February 14, 2020

Abstract
This study was conducted to evaluate the effect of various concentrations of lipopolysaccharide (LPS) in maturation medium on oocyte maturation, oocyte developmental competence and metabolites related to maturation medium including glucose, pyruvate, lactate and glutamine. The experimental treatments were 0 (control), 0.01, 0.1, 1 and 10 µg/ml of LPS in oocyte maturation medium. The cumulus oocytes complex (COC) were cultured with various concentrations of lipopolysaccharide. After 24 h of oocyte maturation, the medium was collected and the rates of oocyte maturation, cleaved oocyte and oocytes reached to blastocyst stage were analyzed. Oocyte maturation rate was lowest in the treatment with 10 µg/ml of LPS (P<0.05). Among the measured metabolites, only glucose concentration was linearly decreased in response to increasing levels of LPS in the maturation medium (P<0.05) as treatment with 10 µg/ml of LPS had lower glucose concentration comparing to other treatments. The percentage of oocyte cleavage was significantly lower in treatment with highest level of LPS compared to other treatments (P<0.05). In addition, the treatment with 1 and 10 µg/ml of LPS significantly reduced blastocyst rate compared to control group (P<0.05). According to results of this study, lipopolysaccharide could have detrimental effects on oocyte development and these influences seems to be mediated through pathways related to energy metabolism. Acquiring managerial approaches to control LPS enhancing agents during reproductive season could prevent animal's reproductive failure.

Keywords: Bacterial cell wall, Ewe, Infectious diseases, Oocytes, Reproductive function.

* نویسنده مسئول
Email: amohammadis@ut.ac.ir

مقدمه

باروری گاوهای شیری مدرن در دهه‌های اخیر کاهش چشم‌گیری یافته است، به گونه‌ای که بازدهی ضعیف تولیدمثل یک مشکل جهانی در صنعت گاو شیری محسوب می‌شود [۸]. کاهش کیفیت تخمک و رویان به‌عنوان دو عامل عمده در عدم موفقیت آبستنی نقش دارند. نشخوارکنندگان اغلب به‌منظور تأمین احتیاجات انرژی و تولید بیش‌تر شیر با جیره‌های غنی از کنسانتره تغذیه می‌شوند. اختلالات متابولیکی مانند اسیدوز تحت حاد شکمبه‌ای (Sub-Acute Ruminal Acidosis) با مصرف مقادیر زیاد کنسانتره قابل‌تخمیر و فیبر پایین علوفه در گاوها ایجاد می‌شود [۲٤]. تغذیه نشخوارکنندگان با غلات و کربوهیدرات‌هایی که قابلیت تجزیه‌پذیری بالایی دارند باعث کاهش pH شکمبه، لیزشدن دیواره سلولی باکتری‌ها و نفوذ لیپوپلی‌ساکارید به داخل گردش خون سیستمیک می‌شود [۱۱]. لیپوپلی‌ساکارید در غشای بیرونی باکتری‌های گرم منفی مانند *E.coli*، *Hemophilus*، *Neisseria* و *Shigella* وجـود دارد و موجب ایجاد پاسخ‌های ایمنی قوی در حیوانات می‌شود. وجود لیپوپلی‌ساکارید در مایع فولیکولی گاوهای دچار اندومتریتیس و ورم پستان نیز شناسایی شده است که نشان‌دهنده ارتباط بین عفونت رحم، تولید لیپوپلی‌ساکارید و تأخیر در از سرگیری فعالیت‌های فولیکولی تخمدان می‌باشد [۱۵].

در آزمایشی، افزودن لیپوپلی‌ساکارید و $PGF_{2\alpha}$ به محیط بلوغ تخمک اثرات منفی بر شایستگی بلوغ تخمک داشت [۱۸]. نشان داده شد که لیپوپلی‌ساکارید باعث افزایش درصد توقف میوز و اختلال در پیش‌روی تقسیم میوز در مرحله کیسه زایشی (Germinal Vesicle stage) در محیط برون‌تنی می‌شود [۳]. به‌علاوه افزودن لیپوپلی‌ساکارید به محیط کشت بلوغ تخمک گاو، موجب کاهش تولید بلاستوسیست شد [۱۸]. هم‌چنین لیپوپلی‌ساکارید سبب آسیب به بلوغ هسته‌ای تخمک‌های گاو از طریق مهار پیش‌روی میوز می‌شود. اگرچه لیپوپلی‌ساکارید اثری بر میزان DNA میتوکندریایی نداشت، اما باعث کاهش پتانسیل غشا در فعال‌سازی تخمک‌های بالغ شد. کاهش در پتانسیل غشای میتوکندری، نشانه اولیه از آپوپتوزیس (مرگ سلولی) است. نشان داده شده است که تخمک‌های بالغ‌شده در حضور لیپوپلی‌ساکارید در مقایسه با تخمک‌های گروه شاهد، تروفوبلاست‌هایی با سلول‌های کم‌تری دارند [۱۰].

علاوه بر التهاب‌زایی [۱۲]، متابولیسم انرژی سلولی نیز می‌تواند تحت تأثیر لیپوپلی‌ساکارید قرار گیرد. نشان داده شد که غلظت‌های افزایشی لیپوپلی‌ساکارید در محیط کشت سلول‌های هلا (HeLa) می‌تواند باعث افزایش سطح ATP داخل سلولی از طریق افزایش عملکرد میتوکندریایی و افزایش فعالیت آنزیم‌های گلایکولایتیک شود که این اثرات به افزایش سطوح نیتریک‌اکسید القاشده توسط لیپوپلی‌ساکارید ربط داده شده است [۲۰]. محیطی که در آن تخمک در طی بلوغ (چه در شرایط تنی و چه در شرایط برون‌تنی) قرار می‌گیرد، بر موفقیت لقاح و تکوین رویان پس از آن اثرگذار بوده و نشان‌دهنده وضعیت سوخت‌وساز داخل سلولی می‌باشد [۱۹].

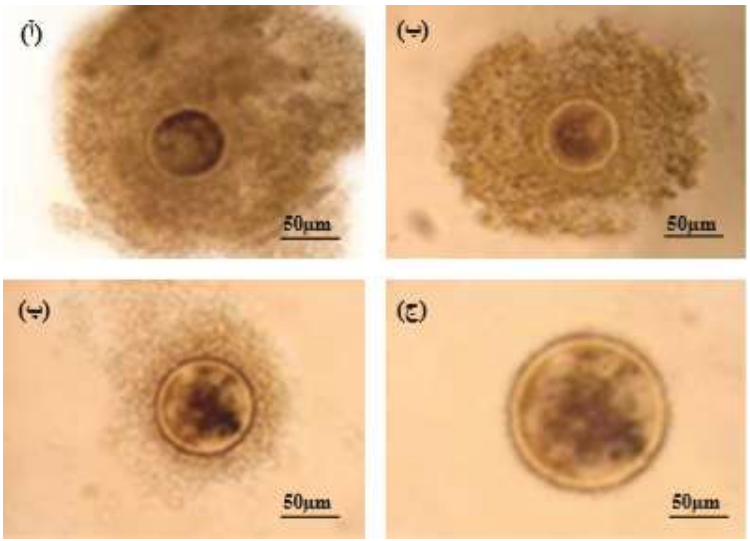
افزودن متابولیتی مانند گلوکز (به‌عنوان ماده‌ای مهم جهت تولید انرژی) در غلظت‌های مناسب به محیط کشت، منجر به بهبود بلوغ و تکوین به بلاستوسیست می‌شود. اسیدهای آمینه نیز به‌عنوان منبع انرژی، توسط تخمک به‌همراه سلول‌های کومولوس اطراف آن مصرف می‌شوند. بنابراین اندازه‌گیری غلظت متابولیت‌های مرتبط با متابولیسم انرژی موجود در محیط کشت بلوغ تخمک، می‌تواند به درک اثرگذاری لیپوپلی‌ساکارید از طریق مسیرهای وابسته به متابولیسم انرژی، کمک کند.

گزارش‌های زیادی درخصوص اثرات لیپوپلی‌ساکارید بر عملکرد تولیدمثل گاوهای شیری وجود دارد [۲ و ۲۱]، اما گزارشی در مورد پاسخ تخمک میش به غلظت‌های افزایشی لیپوپلی‌ساکارید در محیط بلوغ وجود ندارد. مشخص‌شدن اثرات لیپوپلی‌ساکارید بر تکوین تخمک میش می‌تواند نقش به‌سزایی در به‌کارگیری استراتژی‌های کنترل‌کننده عوامل افزایش‌دهنده لیپوپلی‌ساکارید شامل کنسانتره بالا در جیره، عفونت رحم و ورم پستان در عملکرد تولیدمثلی میش و در پی آن اتخاذ راه‌کارهایی جهت جلوگیری و کنترل این عوامل و در نتیجه افزایش راندمان تولیدمثلی داشته باشد. بنابراین هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر افزودن لیپوپلی‌ساکارید به محیط کشت بلوغ بر بلوغ تخمک گوسفند، متابولیت‌های وابسته به متابولیسم انرژی و هم‌چنین درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست بود.

مواد و روش‌ها

تخمدان‌های گوسفند از کشتارگاه پوریای شرق و از میش‌های بالغ بلافاصله پس از کشتار تهیه و توسط فلاسک عایق حرارتی حاوی سرم فیزیولوژیک گرم (۳۷-۳۲ درجه سانتی‌گراد) در مدت کم‌تر از دو ساعت به آزمایشگاه انتقال داده شدند. نمونه‌ها چندین بار با سرم فیزیولوژیک ۳۷ درجه سانتی‌گراد شسته شدند. سپس، تخمک‌ها به‌همراه سلول‌های کومولوس اطراف آن از فولیکول‌های آنترال با قطر سه تا هفت میلی‌متر به‌روش آسپیره و با سرنگ ۱۰ سی‌سی استخراج شدند. تخمک‌های جمع‌آوری‌شده براساس تعداد لایه‌های سلول‌های کومولوس و همگن‌بودن سیتوپلاسم به گروه‌های بسیار خوب، خوب، نسبتاً خوب و ضعیف تقسیم‌بندی شدند (شکل ۱).

به‌منظور بررسی اثر لیپوپلی‌ساکارید اضافه‌شده در محیط کشت بر بلوغ هسته‌ای تخمک، بعد از استحصال و درجه‌بندی، تخمک‌هایی با کیفیت عالی و خوب انتخاب و ابتدا سه بار در محیط کشت HTCM-۱۹۹ (HEPES-buffered Tissue Culture Medium-199) شسته شدند.



شکل ۱. گروه‌بندی کیفیت سلول تخمک به‌همراه سلول‌های کومولوس اطراف آن. کلاس‌های آ تا ج به‌ترتیب کیفیت بسیار خوب، خوب، نسبتاً خوب و ضعیف را نشان می‌دهد.

سپس سه بار دیگر در محیط کشت TCM-۱۹۹ (Tissue Culture Medium-199) حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی، ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر هورمون لوتئینه (LH)، ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر هورمون محرک فولیکول (FSH) و یک میکروگرم در میلی‌لیتر بتااستردیول و غلظت‌های مختلف لیپوپلی‌ساکارید شامل صفر (بدون لیپوپلی‌ساکارید) و سطوح ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از محیط شست‌وشو داده شدند و در نهایت در گروه‌های ۱۰ تایی به قطره‌های ۱۰۰ میکرولیتری از همین محیط کشت (که در زیر روغن معدنی قرار داشتند) منتقل شدند. دیش حاوی تخمک‌ها به‌مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و پنج درصد گاز کربنیک در شرایط حداکثر رطوبت قرار گرفت.

پس از بلوغ برون‌تنی، گروهی از تخمک‌ها برای ارزیابی وضعیت هسته‌ای رنگ‌آمیزی شدند. ابتدا تخمک‌ها به یک میکروتیوپ حاوی محیط HTCM به‌همراه آنزیم هیالورونیداز ۰/۱ درصد (۱۰۰ واحد بین المللی در میلی‌لیتر) منتقل و از سلول‌های کومولوس اطراف خود جدا شدند. تخمک‌های عاری از کومولوس در قطره‌های حاوی رنگ هوخست (پنج میکروگرم در میلی‌لیتر) برای پنج دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. سپس تخمک‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Nikon, Tokyo, Japan) ارزیابی و براساس وضعیت هسته‌ای خود در یکی از گروه‌های ژرمینال وزیکول (Germinal Vesicle (GV))، ژرمینال وزیکول شکسته (Germinal Vesicle Breakdown (GVBD))، متافاز یک (Metaphase I (MI)) و متافاز دو (Metaphase II (MII)) قرار گرفتند.

بیست‌وچهار ساعت پس از بلوغ، به‌منظور اندازه‌گیری غلظت متابولیت‌های موجود در محیط بلوغ تحت تأثیر سطوح افزایشی لیپوپلی‌ساکارید، محیط بلوغ جمع‌آوری و تمام ناخالصی‌ها آن با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد حذف شد. نمونه‌های به‌دست‌آمده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای اندازه‌گیری متابولیت‌هایی مانند گلوکز، پیروات، لاکتات و گلوتامین نگهداری شدند. گلوکز و لاکتات با استفاده از کیت پارس‌آزمون ۹۷۰۰۷ و بر اساس آزمایشات فتومتریک اندازه‌گیری شدند. پیروات با روش آنزیمی و به‌کمک کیت GRINER ۷۰۳۱۵۰۰ اندازه‌گیری شد. مقدار گلوتامین با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد.

هم‌چنین به‌منظور بررسی تأثیر افزودن لیپوپلی‌ساکارید موجود در محیط بلوغ بر درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست، پس از بلوغ برون‌تنی، تخمک‌ها از محیط بلوغ برداشته و به یک میکروتیوپ محتوی محیط HTCM و آنزیم هیالورونیداز ۰/۱ درصد منتقل و از سلول‌های کومولوس اطراف خود جدا شدند. سپس، تخمک‌های عاری از کومولوس در محیط HTCM-۱۹۹ حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی شسته شدند و در ۲/۵ میکرومولار یونومایسین رقیق‌شده در محیط HTCM-۱۹۹ حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی به‌مدت پنج دقیقه قرار داده شدند. پس از این مرحله، تخمک‌ها در قطره‌های حاوی دو میلی مولار ٦-DMAP رقیق‌شده در محیط CR1aa فعال شدند. پس از فعال‌شدن تخمک‌ها در شرایط برون‌تنی، گروه‌های ۱۵ تا ۲۰ سلول تخمک در ۳۰ میکرولیتر CR1aa حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی، دو درصد اسیدهای آمینه ضروری و یک درصد اسیدهای آمینه غیرضروری به‌مدت نه روز در داخل انکوباتور ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد، با پنج درصد گاز کربنیک، پنج درصد اکسیژن و ۹۰ درصد گاز نیتروژن کشت داده شدند. درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست در روز سه و نه پس از کشت ارزیابی شد.

ارتباط بین تیمارهای آزمایشی و درصد بلوغ، تسهیم و بلاستوسیست با استفاده از تابعیت لجستیک رویه مدل خطی تعمیم‌یافته (GLM) با نرم‌افزار آماری R (نسخه ۳/۱/۰) بررسی شد (رابطه ۱). میزان اثرگذاری تیمارها براساس نسبت شانس (Odds Ratio; OD) گزارش گردید.

$$y = p + e$$ (رابطه ۱)

$$\text{logit(p)} = \text{Log e}\frac{p}{1-p} = X\beta \Rightarrow \text{Exp}(X\beta)/(1+\text{Exp}(X\beta))$$

در این رابطه، y و p، به‌ترتیب بیانگر مقدار واقعی متغیر پاسخ (وقوع و یا عدم وقوع بلوغ، تسهیم و بلاستوسیست) و احتمال برآورد شدن وقوع آن‌ها است. هم‌چنین نماد EXP، مربوط به عدد نپری (برابر با ۲/۷۱۸۲۸)، x، ماتریس ضرایب و β، بردار سازه‌های گنجانده‌شده در مدل است.

هم‌چنین داده‌های مربوط به متابولیت‌های موجود در محیط، با استفاده نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۳) رویه GLM برای مدل (۲) تجزیه و اثر سطوح افزایشی لیپوپلی‌ساکارید در سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ به‌کمک مقایسه‌های متعامد یا ارتوگونال (Contrasts) بررسی شد.

$$Y_{ij} = \mu + A_i + e_{ij}$$ (رابطه ۲)

در این رابطه، Y_{ij}، مشاهده مربوط به سطح i ام فاکتور Aدر تکرار j؛ μ، میانگین جامعه برای صفت موردنظر؛ A_i، سطح i ام فاکتور A و e_{ij}، اشتباه باقی‌مانده می‌باشد.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش مربوط به بررسی درصد بلوغ هسته‌ای تخمک در جدول (۱) نشان داده شده است. اثر لیپوپلی‌ساکارید بر درصد بلوغ معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). به‌طوری‌که شانس رسیدن به مرحله MII در محیط حاوی ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید، کم‌تر از محیط شاهد و محیط‌های حاوی ۰/۰۱ و ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید بود.

جدول ۱. اثر لیپوپلی‌ساکارید اضافه‌شده در محیط کشت بلوغ بر وضعیت هسته‌ای تخمک‌های میش[۱]

تیمارهای آزمایشی	تعداد تخمک‌های کشت داده‌شده	تعداد GV[۲] (درصد)	تعداد GVBD[۳] (درصد)	تعداد MI[۴] (درصد)	تعداد MII[۵] (درصد)	نسبت شانس MII
شاهد	۱۷۷	۲ (۱/۱۲)	۱۹ (۱۰/۷۳)	۱٤ (۷/۹۰)	۱٤۲[a] (۸۰/۲۲)	–
۰/۰۱	۱٤٦	۵ (۳/٤۲)	۱۵ (۱۰/۲۷)	۸ (۵/٤۷)	۱۱۸[a] (۸۰/۸۲)	۱/۰۳
۰/۱	۱٤۲	٤ (۲/۸۱)	۱٦ (۱۱/۲٦)	۷ (٤/۹۲)	۱۱۵[a] (۸۰/۹۸)	۱/۰٤
۱	۱۵۲	٦ (۳/۹٤)	۱۷ (۱۱/۱۸)	۲۱ (۱۳/۸۱)	۱۰۸[ab] (۷۱/۰۵)	۰/٦۱
۱۰	۱۲۳	۵ (٤/۰٦)	۲۲ (۱۷/۸۸)	۱۲ (۹/۷۵)	۸٤[b] (٦۸/۲۹)	۰/۵۳
خطای استاندارد میانگین		۰/٤٦	۰/۲٤	۰/۳۰	۰/۱۹	

۱. داده‌ها میانگینی از ۷ تکرار می‌باشند.

۲. ژرمینال وزیکول (Germinal Vesicle (GV))، ۳. ژرمینال وزیکول شکسته (Germinal Vesicle Breakdown (GVBD))، ٤. متافاز یک (Metaphase I (MI))، ۵. متافاز دو (Metaphase II (MII))

a-b: تفاوت میانگین‌ها با حروف نامشابه در هر ستون، معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

غلظت لیپوپلی ساکارید در مایع فولیکولی گاوهای مبتلا به آندومتریت، بین ۰/۰۰٤ تا ۰/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر است. نشان داده شده است که تزریق ۱۰ میکروگرم اندوتوکسین (لیپوپلی ساکارید) به‌منظور القای ورم پستان در گاو و پس از آن بررسی تخمک‌ها در شرایط برون‌تنی لیپوپلی‌ساکارید بلوغ هسته‌ای تخمک را مختل می‌کند [۱]. در آزمایشی افزودن غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکارید به محیط بلوغ سبب تغییر در وضعیت هسته‌ای تخمک‌ها شد، به‌عبارتی درصد تخمک‌هایی که به مرحله MII می‌رسند را کاهش داد، اما غلظت ۰/۰۰۱ میکروگرم در میلی‌لیتر هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد نداشت [۱۰]. غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید با تأثیر بر چرخه سلولی، استرس اکسیداتیو و تغییرات اِپی‌ژنتیکی مانع بلوغ تخمک گاو می‌شود و هم‌چنین درصد خروج اولین جسم قطبی را کاهش می‌دهد [۲۲].

گزارش شد که سلول‌های تکا و گرانولوزای فولیکول در تخمدان سبب بیان مجموعه گیرنده Toll-like (TLR4) receptor 4 می‌شود و با تولید پاسخ‌های التهابی به لیپوپلی‌ساکارید پاسخ می‌دهد [۱۳]. پژوهش‌های انجام‌شده نشان می‌دهد که سلول‌های گرانولوزای گاوی در پاسخ به لیپوپلی‌ساکارید از طریق مسیر TLR4 سبب آغاز یکسری پاسخ‌های التهابی می‌شوند و تکوین تخمک را مختل می‌کنند [۳]. تزریق سه میلی‌گرم لیپوپلی‌ساکارید به‌ازای هر کیلوگرم وزن موش سبب شد تا درصد تخمک‌هایی که به مرحله متافاز دو می‌رسند کاهش یابد [۱٦].

در بین متابولیت‌های مرتبط با متابولیسم انرژی در محیط بلوغ تخمک، غلظت گلوکز تحت تأثیر سطوح مختلف لیپوپلی‌ساکارید در محیط کشت بلوغ قرار گرفت (جدول ۲)، به‌گونه‌ای که با افزایش سطح لیپوپلی‌ساکارید، غلظت گلوکز در محیط کشت حاوی ۱۰ میکروگرم بر لیتر لیپوپلی ساکارید نسبت به‌دیگر تیمارهای آزمایشی به‌صورت خطی کاهش یافت (P<۰/۰۵). غلظت‌های پیروات، لاکتات و گلوتامین بین سطوح مختلف لیپوپلی‌ساکارید هیچ تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند.

در مطالعه‌ای، افزودن سطوح افزایشی لیپوپلی‌ساکارید به محیط کشت سلول‌های هلا، فعالیت آنزیم‌های درگیر در گلایکولیز را افزایش داد و سبب افزایش گلایکولیز برای تولید ATP بیش‌تر داخل سلول شد [۲۰]، که با کاهش گلوکز محیط کشت در مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. محیط موردنیاز برای کشت تخمک و سلول‌های کومولوس اطراف آن، در دو شرایط تنی و برون‌تنی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد و تأثیر زیادی بر موفقیت لقاح و تکوین رویان پس از آن دارد [۱۹].

جدول ۲. اثر لیپوپلی‌ساکارید اضافه‌شده در محیط کشت بلوغ برغلظت گلوکز، پیروات، لاکتات و گلوتامین در محیط کشت[۱]

پارامترهای محیط کشت	تیمارهای آزمایشی					خطای استاندارد میانگین‌ها	سطح معنی‌داری خطی	سطح معنی‌داری درجه دوم	سطح معنی‌داری درجه سوم
	کنترل	۰/۰۱	۰/۱	۱	۱۰				
گلوکز (پیکومول)	۸۵/۵[a]	۸۵/۱٦[a]	۸۳/٤۱[ab]	۸۲/٤[b]	۸۲/۵[b]	۱/۳٤	۰/۰۰۵	۰/۵۹	۰/۳۲
پیروات (پیکومول)	۰/۲٦	۰/۲۸	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۰۸	۰/۵۹	۰/۷۸	۱
لاکتات (پیکومول)	٤۰/۱	٤۰/٤۵	٤۰/٤۵	٤۱/۱۱	٤۱/٤۳	۸/۰۰۲	۰/۸۲	۰/۹۷	۱
گلوتامین (پیکومول)	۵٤۹	۵۲۰/۳۳	۵۱۱	۵۰۲	۵۰۹	۳۸/۳٤	۰/۱۹	۰/٤۰	۰/۹٦

۱. داده‌ها میانگینی از ۳ تکرار می‌باشند.

a-b: تفاوت میانگین‌ها با حروف نامشابه در هر ستون، معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

طبیعت پویا و سریع مرحله پایانی بلوغ تخمک، نیاز تخمک و سلول‌های کومولوس به متابولیت‌هایی نظیر اسیدهای چرب، اسیدهای آمینه، الکترولیت‌ها، پورین‌ها و پریمیدین‌ها را موجب می‌شود.

در این مطالعه، با افزایش سطح لیپوپلی‌ساکارید غلظت گلوکز کاهش و غلظت لاکتات افزایش پیدا کرد. گلوکز یک سوبسترای مهم انرژی می‌باشد و افزودن آن به محیط کشت به میزان بهینه باعث بهبود فرآیند بلوغ و تکوین بلاستوسیست می‌شود [۲۳]. پژوهش‌ها نشان می‌دهد، گلوکز در تخمک از طریق چهار مسیر متابولیزه می‌شود و سوبستراهای تولیدشده در این مسیرها بر بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک اثر می‌گذارند. گلایکولیز مهم‌ترین مسیر متابولیسم گلوکز هست. مصرف گلوکز موجود در محیط بلوغ تخمک، در چرخه گلایکولیز منجر به تولید ATP و سوبستراهایی مانند پیروات برای تولید انرژی بیش‌تر می‌شود. از طرفی، با متابولیزه‌شدن بیش‌تر پیروات در مسیر تری‌کربوکسیلیک اسید (TCA) و به‌دنبال آن فسفوریلاسیون اکسیداتیو، انرژی بیش‌تری تولید خواهد شد. به‌علت همبستگی مثبتی که بین مصرف گلوکز و تولید لاکتات وجود دارد، با رشد فولیکول، نیاز به انرژی افزایش‌یافته و کاهش قابلیت دسترسی به اکسیژن، منجر به افزایش گلایکولیز و افزایش تولید لاکتات می‌شود.

مسیر دیگر، مسیر پنتوز فسفات (PPP) است که با تولید نیکوتین‌آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات (NADPH) از اکسیدشدن گلوتاتیون جلوگیری می‌کند [۱۹]. متابولیسم گلوکز از طریق مسیر پنتوز فسفات به تنظیم بلوغ میوزی تخمک کمک می‌کند [۵].

سلول‌های کومولوس در جریان یافتن اسیدهای آمینه به درون سلول تخمک نقش مهمی دارند، از طرفی اسیدهای آمینه توسط سلول‌های کومولوس به‌عنوان یک منبع انرژی برای تخمک مورداستفاده قرار می‌گیرند [٤]. گلوتاتیون داخل سیتوپلاسمی برای گسترش سلول‌های کومولوس بسیار ضروری است. گلوتاتیون یک تری‌پپتیدتیول شامل سیستین، پرولین و گلوتامین است و عامل کاهش‌دهنده و جذب‌کننده‌ای است که سلول‌ها را در مقابل رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند. سنتز گلوتاتیون به سطوح اسید آمینه بسیار ناپایدار سیستئین که به‌راحتی به سیستین اکسید می‌شود، وابسته است. در مطالعه حاضر، سایر متابولیت‌های مطالعه‌شده، تحت تأثیر لیپوپلی‌ساکارید قرار نگرفتند. بنابراین به‌نظر می‌رسد که احتمالاً اثرات لیپوپلی‌ساکارید بر شایستگی تکوین تخمک از طریق مسیرهای مرتبط با انرژی و فراهمی سوبستراهای انرژی میانجی‌گری می‌گردد.

تفاوت معنی‌داری بین درصد تسهیم تخمک در محیط شاهد با محیط‌های حاوی ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده نشد (جدول ۳). افزودن ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید به‌طور معنی‌داری درصد تسهیم نسبت به محیط شاهد و یا محیط‌های حاوی ۰/۰۱، ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوساکارید کاهش داد ($P<۰/۰۵$).

تفاوتی در درصد تولید بلاستوسیست در محیط شاهد و محیط‌های حاوی ۰/۰۱ و ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکارید مشاهده نشد (جدول ٤). با افزایش سطح لیپوپلی‌ساکارید به یک و ۱۰ میکروگرم در محیط کشت، درصد بلاستوسیست‌ها و در نتیجه نسبت شانس درصد تولید بلاستوسیست کاهش یافت ($P<۰/۰۵$).

در بررسی قابلیت تکوین تخمک‌های گاوی در محیط‌هایی با ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکارید، درصد تسهیم تحت تأثیر لیپویلی ساکارید قرار نگرفت، ولی درصد بلاستوسیست در محیط‌های حاوی لیپوساکارید به‌طور چشم‌گیری کاهش یافت [۱۰]، که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد.

جدول ۳. اثر لیپوپلی‌ساکارید اضافه‌شده در محیط کشت بلوغ بر درصد تسهیم تخمک[۱]

تیمارهای آزمایشی	تعداد تخمک‌های کشت داده‌شده	تعداد (درصد تسهیم)	نسبت شانس
شاهد	۱۲۲	۸٦ (۷۰/٤۹) [ab]	-
۰/۰۱	۱۲٤	۹۲ (۷٤/۱۹) [a]	۱/۲
۰/۱	۱۱۸	۸٦ (۷۲/۸۸) [a]	۱/۱۲
۱	۱۲۳	۷٤ (٦۰/۱٦) [bc]	۰/٦۳
۱۰	۱۲۵	۷۱ (۵٦/۸) [cd]	۰/۵۵
خطای استاندارد میانگین	–	۰/۱۸	–

۱. داده‌ها میانگینی از ۸ تکرار می‌باشند.

a-d: تفاوت میانگین‌ها با حروف نامشابه در هر ستون، معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

جدول ٤. اثر لیپوپلی‌ساکارید اضافه‌شده در محیط کشت تخمک بر تولید بلاستوسیست [۱]

تیمارهای آزمایشی	تعداد تخمک‌های کشت داده‌شده	تعداد (درصد بلاستوسیست)	نسبت شانس
شاهد	۱۲۲	۳۳ (۲۷/۰٤) [a]	-
۰/۰۱	۱۲٤	۳٦ (۲۹/۰۳)[a]	۱/۱۲
۰/۱	۱۱۸	۳۰ (۲۵/٤۲)[ab]	۱/۰٤
۱	۱۲۳	۲۰ (۱٦/۲٦)[b]	۰/۵۰
۱۰	۱۲۵	۲۰ (۱٦/۰۰)[b]	۰/٤۸
خطای استاندارد میانگین	–	۰/۲٤	–

۱. داده‌ها میانگینی از ۸ تکرار می‌باشند.

a-d: تفاوت میانگین‌ها با حروف نامشابه در هر ستون، معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

لیپوپلی‌ساکارید معمولاً گیرنده TLR4 را شناسایی می‌کند و با ایجاد یک پاسخ التهابی، سیگنال درون‌سلولی را فعال می‌کند. گیرنده‌های TLR4 یکی از اصلی‌ترین گیرنده‌ها در سیستم ایمنی ذاتی می‌باشند و مهم‌ترین وظیفه آن‌ها شناسایی مولکول‌های همراه پاتوژن می‌باشد. این گیرنده‌ها پس از فعال‌شدن، سبب تولید سایتوکاین‌ها و کموکاین‌های التهابی و هم‌چنین پاسخ‌های آنتی‌ویروسی می‌شوند [۷].

تزریق لیپوپلی‌ساکارید به گاوها، سبب کاهش قابلیت تکوین تخمک‌ها در شرایط برون‌تنی می‌شود [١٤]. غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکارید سبب کاهش درصد تسهیم، تشکیل مورولا و بلاستوسیست در تخمک‌های گاوی می‌گردد [۹]. در آزمایشی افزودن ۰/۱ و یک میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید به محیط کشت بلوغ سبب کاهش درصد تولید بلاستوسیست‌های گاوی شد، اما هیچ‌گونه تأثیری بر درصد تسهیم نداشتند [۱۸].

در آزمایشی، لیپوپلی‌ساکارید به میزان ۵۰ میکروگرم

در میلی‌لیتر در محیط کشت بلوغ، از تولید بلاستوسیست جلوگیری نموده و ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید به‌طور کامل سبب مهار تکوین رویان موش گردید [٦]. تجمع لیپوپلی‌ساکارید در مایع فولیکولی باعث آسیب به تولید استروئید در فولیکول‌ها می‌شود که ممکن است یکی از مکانیسم‌های درگیر در ناباروری در گاوهای دچار التهاب رحم باشد [۱۷]. کاهش درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست پس از لقاح در پاسخ به افزایش سطح لیپوپلی‌ساکارید در محیط کشت حاکی از اثرات مخرب لیپوپلی‌ساکارید در حصول شایستگی تکوین رویان می‌باشد.

اثرات منفی حاصل از افزایش سطح لیپوپلی‌ساکارید در بیماری‌هایی مانند اسیدوز شکمبه‌ای، بیماری‌های عفونی مانند اندومتریت و ورم پستان مثل در مطالعات قبلی به اثبات رسیده است. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان می‌دهد، شایستگی تکوین تخمک‌های میش نیز تحت تأثیر اثرات منفی غلظت‌های افزایش‌یافته لیپوپلی‌ساکارید قرار می‌گیرد. در نتیجه براساس نتایج حاصل از این پژوهش و مطالعات قبلی به‌کارگیری برنامه‌های مدیریتی به‌منظور کنترل عوامل افزایش‌دهنده غلظت لیپوپلی‌ساکارید در بدن در فصل تولیدمثلی میش می‌تواند از کاهش عملکرد تولیدمثلی دام در نتیجه غلظت‌های بالای لیپوپلی‌ساکارید جلوگیری کند. وجود تفاوت معنی‌دار در غلظت متابولیت‌های محیط کشت بلوغ در تیمارهای با سطوح مختلف لیپوپلی‌ساکارید حاکی از این امر است که اثرات منفی لیپوپلی‌ساکارید می‌تواند از طریق اثر بر متابولیسم انرژی میانجی‌گری گردد. هرچند به‌منظور مشخص‌کردن مسیر متابولیسمی اثرگذار در این امر نیاز به مطالعات بیش‌تر جهت اندازه‌گیری متابولیت‌های حساس‌تر و یا آنالیز بیان ژن آنزیم‌های درگیر در مسیرهای متابولیسم انرژی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی محترم مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع

1. Asaf S, Leitner G, Furman O, Lavon Y, Kalo D and Wolfenson D (2014) Effects of Escherichia coli-and Staphylococcus aureus-induced mastitis in lactating cows on oocyte developmental competence. Reproduction. 147(1): 33-43.
2. Bromfield JJ and Sheldon IM (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.
3. Bromfield JJ and Sheldon IM (2011) Lipopolysaccharide initiates inflammation in bovine granulosa cells via the TLR4 pathway and perturbs oocyte meiotic progression in vitro. Endocrinology. 152(12): 5029-40.
4. Colonna R and Mangia F (1983) Mechanisms of amino acid uptake in cumulus-enclosed mouse oocytes. Biology of reproduction. 28(4): 797-803.
5. Downs SM and Utecht AM (1999) Metabolism of radiolabeled glucose by mouse oocytes and oocyte-cumulus cell complexes. Biology of reproduction. 60(6): 1446-52.
6. Dubin N, Bornstein D and Gong Y (1995) Use of endotoxin as a positive (toxic) control in the mouse embryo assay. Journal of assisted reproduction and genetics. 12(2): 147-52.
7. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH and Hwang D (2001) Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. Journal of Biological Chemistry. 276(20): 16683-9.
8. Lucy M (2001) Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? Journal of dairy science. 84(6): 1277-93.
9. Magata F, Horiuchi M, Miyamoto A and Shimizu T (2014) Lipopolysaccharide (LPS) inhibits steroid production in theca cells of bovine follicles in vitro: distinct effect of LPS on theca cell function in pre-and post-selection follicles. Journal of Reproduction and Development. 2013-124.

10. Magata F and Shimizu T (2017) Effect of lipopolysaccharide on developmental competence of oocytes. Reproductive Toxicology. 71: 1-7.
11. Mani V (2012) Understanding intestinal lipopolysaccharide permeability and associated inflammation.
12. Mogensen TH, (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. Clinical microbiology reviews. 22(2): 240-73.
13. Richards JS, Liu Z and Shimada M (2008) Immune-like mechanisms in ovulation. Trends in Endocrinology & Metabolism. 19(6): 191-6.
14. Roth Z, Asaf S, Furman O, Lavon Y, Kalo D and Wolfenson D (2016) Subclinical mastitis disrupts oocyte cytoplasmic maturation in association with reduced developmental competence and impaired gene expression in preimplantation bovine embryos. Reproduction, Fertility and Development. 28(11): 1653-62.
15. Sheldon IM, Cronin JG, Pospiech M and Turner ML (2018) Symposium review: Mechanisms linking metabolic stress with innate immunity in the endometrium. Journal of dairy science. 101(4): 3655-64.
16. Shepel E, Grushka N, Makogon N, Sribna V, Pavlovych S and Yanchii R (2018) Changes in DNA integrity and gene expression in ovarian follicular cells of lipopolysaccharide-treated female mice. Pharmacological Reports. 70(6): 1146-9.
17. Shimizu T, Miyauchi K, Shirasuna K, Bollwein H, Magata F and Murayama C (2012) Effects of lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) on estradiol production in bovine granulosa cells from small and large follicles. Toxicology In Vitro. 26(7): 1134-42.
18. Soto P, Natzke R and Hansen P (2003) Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F2α, and the nitric oxide generator, sodium nitroprusside dihydrate, on oocyte maturation and embryonic development in cattle. American Journal of Reproductive Immunology. 50(3): 263-72.
19. Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB and Thompson JG (2010) The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. Reproduction. 139(4): 685-95.
20. Zhang R, Ji J, Blaženović I, Pi F, Wang T and Zhang Y (2018) Investigation into Cellular Glycolysis for the Mechanism Study of Energy Metabolism Disorder Triggered by Lipopolysaccharide. Toxins. 10(11): 441.
21. Zhao S, Pang Y, Zhao X, Du W, Hao H and Zhu H (2019) Detrimental effects of lipopolysaccharides on maturation of bovine oocytes. Asian-Australasian journal of animal sciences. 32(8): 1112.
22. Zhao SJ, Pang YW, Zhao XM, Du WH, Hao HS and Zhu HB (2017) Effects of lipopolysaccharide on maturation of bovine oocyte in vitro and its possible mechanisms. Oncotarget. 8(3): 4656.
23. Zheng P, Bavister BD and Ji W (2001) Energy substrate requirement for in vitro maturation of oocytes from unstimulated adult rhesus monkeys. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research. 58(3): 348-55.
24. Yang W and Beauchemin K (2006) Effects of physically effective fiber on chewing activity and ruminal pH of dairy cows fed diets based on barley silage. Journal of Dairy Science. 89(1): 217-28.