

شایستگی تکاملی تخمک‌های گاو در ارتباط با سمت تخمدان، حضور جسم زرد و اندازه فولیکولی در شرایط برون‌تنی

حامد کریمی شبانکاره^۱، هادی حجاریان^۲، محمد حامد شهسواری^{۳*} و صاحب فروتنی^۲

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۲۸

^۱استاد گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه

^۲استادیار گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه

^۳دانشجوی دکتری گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

*مسئول مکاتبه: Email: shahsavari_mohammadhamed@yahoo.com

چکیده

زمینه مطالعاتی: تناقض‌های بسیاری در رابطه با اثرات جسم زرد و فعالیت نابرابر دو سمت دستگاه تولید مثلی وجود دارد. هدف: هدف اول در این مطالعه بررسی شایستگی تکاملی تخمک‌های گاو منشأ گرفته از تخمدان‌های راست و چپ واجد جسم زرد ($R.CL^+$ -oocytes یا $L.CL^+$ -oocytes) و فاقد جسم زرد ($R.CL^-$ -oocytes یا $L.CL^-$ -oocytes) با بکارگیری آزمون بریلیانت کرزیل بلو (BCB) به عنوان معیار انتخاب بوده است (آزمایش اول). روش کار: در آزمایش اول، تخمک‌های جمع‌آوری شده در معرض رنگ BCB قرار گرفته و سپس به دو دسته تخمک‌های در حال رشد (BCB^-) رشد یافته (BCB^+ ، شایسته‌تر) تقسیم شدند. سپس تمامی تخمک‌ها وارد فرآیند تولید برون‌تنی رویان (IVEP) شدند. نتایج: نتایج این آزمایش هیچ تفاوتی را در میزان رشد و نمو رویانی در اثر سمت تخمدان یا در اثر انتخاب با BCB نشان نداد. اگرچه در ارتباط با $R.CL^+$ -oocytes، یک عدم یکنواختی در شایستگی تکاملی تخمک‌ها وجود داشت و درصد تخمک‌های BCB^+ ، بزرگتر از گروه BCB^- بود (به ترتیب ۵۷٫۶٪ در برابر ۴۲٫۴٪). درصد تسهیم (کلیواژ) و بلاستوسیست حاصل از CL^+ -oocytes نیز نسبت به این مقادیر در گروه CL^- -oocytes کمتر بود. هدف دوم در این مطالعه بررسی عدم یکنواختی در شایستگی تکاملی تخمک‌ها در ارتباط با حضور یا عدم حضور جسم زرد و اندازه فولیکولی بود. پس از دسته‌بندی تخمدان‌ها بر اساس حضور یا عدم حضور جسم زرد، فولیکول‌های مورد نظر بر طبق قطر خود به سه گروه کوچک، متوسط و بزرگ تقسیم شدند و تخمک‌های بدست آمده در هر گروه وارد فرآیند IVEP گردیدند. نتایج نشان دادند که $CL^+.B$ -oocytes به همان اندازه‌ای که $CL^+.S$ -oocytes از اثرات منفی جسم زرد متأثر می‌شوند، تأثیر نخواهند پذیرفت. نتیجه‌گیری نهایی: بنابراین، این چنین می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است بتوان با استفاده از تخمک‌های منشأ گرفته از فولیکول‌های بزرگ تخمدان‌های فاقد جسم زرد، برخی مشکلات مربوط به IVEP گاو را کاهش داد.

واژگان کلیدی: جسم زرد، بریلیانت کرزیل بلو، شایستگی تکاملی، تولید برون‌تنی رویان، اندازه فولیکول

مقدمه

عدم یکنواختی تخمک‌های استحصالی از فولیکول‌های در حال رشد به‌وسیله تکنیک برداشت تخمک و یا آسپیراسیون از تخمدان‌های دام‌های ماده کشتار شده، همچنان یک چالش بزرگ در موفقیت فرآیند بلوغ برون-تنی (IVM) بوده و موجب کاهش میزان رشد و نمو رویانی می‌گردد. این مشکلات ناشی از این واقعیت است که منشأ تخمک‌های استحصالی از تخمدان‌های حیوانات کشتارگاهی (مرحله سیکل فحلی، مرحله موج فولیکولی، منشأ تخمدان‌ها و غیره...) ناشناخته و یا غیریکنواخت بوده و بنابراین کیفیت تخمک‌ها متغیر خواهد بود (لانرگان و همکاران ۲۰۰۶ و کرمی-شبانکاره و میرشمسی ۲۰۱۲). جهت بهبود تولید برون‌تنی بلاستوسیست در نشخوارکنندگان عوامل دخیل در عدم یکنواختی موجود در شایستگی تکاملی تخمک‌ها از قبیل: مراحل مختلف رشد، پس‌روی و اندازه‌های مختلف فولیکولی به‌عنوان موضوع مورد مطالعه بسیاری از تحقیقات مدّ نظر بوده است (یون و همکاران ۲۰۰۱ و گینتر و هوفمن ۲۰۱۴). مطالعات گذشته عدم یکنواختی موجود در عملکرد اندام‌های تولیدمثلی را در گاوهای شیری در اثر تفاوت در فعالیت تخمدانی و به احتمال قوی‌تر به‌علت تفاوت‌های فیزیولوژیکی در بخش‌های مجرای اندام‌های تولیدمثلی که خود در ارتباط با سمت آبستنی قبلی و بازیابی شاخ آبستن بعد از زایش است، تأیید نموده‌اند (جرس و همکاران ۲۰۱۱). این فعالیت نابرابر دو سمت سیستم تولیدمثلی ممکن است در اثر تفاوت در فعالیت تخمدان‌های راست و چپ در ارتباط با سمت تخمک‌گذاری قبلی (فوکودا و همکاران ۲۰۰۶)، تفاوت در شایستگی تکاملی تخمک‌های منشأ گرفته از این تخمدان‌ها (فوکودا و همکاران ۲۰۰۰) و یا تفاوت بین شاخ‌های راست و چپ رحم باشد (هیلان و همکاران ۲۰۰۹). وجود ارتباط بین تکامل اجسام زرد و رشد و نمو فولیکول‌ها (کانتراس و همکاران ۲۰۰۸) دلیلی

مستند در حمایت از وجود فاکتورهای دخیل در عدم یکنواختی شایستگی تکاملی تخمک‌ها است. علاوه بر این، شبانکاره و همکاران (۲۰۱۳) پیشنهاد نموده‌اند که مایعات فولیکولی به‌دست آمده از فولیکول‌های مستقر بر روی تخمدان‌های گاو فاقد جسم زرد جهت استفاده در بلوغ تخمک‌ها مناسب‌تر از مایعات بدست آمده از فولیکول‌های مستقر بر روی تخمدان‌های واجد جسم زرد می‌باشند. کلارک (۱۹۳۶) و کاسیدا و همکارانش (۱۹۴۸) تخمدان‌ها را از تلیسه‌های نابالغ در کشتارگاه جمع‌آوری کرده و پی بردند که ۷۳/۵٪ و ۶۰/۲٪ آنها به ترتیب دارای فولیکول‌های غالب و جسم زرد بر روی تخمدان راست می‌باشند. نشان داده شده است که الگوهای تخمک‌گذاری (از سمت مقابل یا هم‌سو) و تخمدان سمتی که رویان‌ها از آن استحصال شده‌اند، می‌تواند میزان آبستنی را پس از تلقیح داخل رحمی یا طی مراحل لقاح برون‌تنی متأثر سازد (فوکودا و همکاران ۲۰۰۶). همچنین، یک منبع دیگر برای ایجاد عدم یکنواختی در شایستگی تکاملی تخمک‌ها اندازه فولیکولی است که تخمک‌ها از آنها استحصال شده‌اند. در خوک و دیگر گونه‌ها نشان داده شده که کسب شایستگی میوزی و شایستگی تکاملی بعدی تخمک‌ها به‌طور مستقیمی در ارتباط با اندازه فولیکولی است (موتلیک و فولکا ۱۹۸۶ و یون و همکاران ۲۰۰۱). اگرچه معیارهای شکل‌شناسی ابزاری معقول برای تشخیص کیفیت تخمک‌ها بدست می‌دهند، اما تنوع بسیاری در بین تخمک‌ها وجود داشته و معیارهای شکل‌شناسی به تنهایی قادر به تشخیص تخمک‌های مناسب برای رشد و نمو برون‌تنی تا رسیدن به مرحله بلاستوسیست نمی‌باشند (اوپیلا و همکاران ۲۰۰۸). در این رابطه برای انتخاب تخمک‌های رشد یافته از آزمون بریلیانت کرزیل بلو^۲ (BCB) استفاده می‌شود. آزمون BCB بر اساس قابلیت آنزیم گلوکز-۶-فسفات دی‌هیدروژناز^۳ (G6PDH) در تغییر رنگ ماده BCB

^۲. Brilliant crystal blue (BCB)

^۳. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)

^۱. In vitro maturation (IVM)

استریتومایسین (50 mg/mL) بوده در دمای ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه انتقال داده شد (حداکثر طی دو ساعت بعد از کشتار). کمپلکس های تخمک-کومولوس^۲ (COCs) از فولیکول های تخمدانی آسپیره شدند. تنها تخمک هایی با چندین لایه سلول های کومولوس متراکم و اوپلاسم یک دست در این آزمایش استفاده شدند.

بلوغ برون تنی (IVM)

بعد از دسته بندی تخمدان ها و تخمک ها بر اساس تیمارهای مورد آزمایش، COCs سه بار در محیطی که آنها قرار بود کشته داده شوند، مورد شستشو قرار گرفتند. تخمک های مورد نظر در گروه هایی ۸ تا ۱۰ تایی به ریزقطره هایی با حجم ۵۰ میکرولیتر از محیط IVM که حاوی محیط پایه TCM 199 مکمل شده با 0.23 که حاوی 0.2 IU/ml از $p\text{-FSH}$ ، 1 mmol/L از سدیم پیروات، 0.2 IU/ml از $\beta 17$ ، 50 ng/ml از عامل رشد اپیدرمی (EGF)، 10% FCS (v/v) و 50 ng/ml از جنتامایسین می بود، انتقال داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 38.5 درجه سانتیگراد در انکوباتور CO_2 (۵٪ CO_2 در هوا، ۹۰ تا ۹۵٪ رطوبت نسبی) مورد انکوباسیون قرار گرفتند.

لقاح برون تنی (IVF)

منی منجمد شده یک گاو نر ثبت شده، یخ گشایی و برای انجام فرآیند swim-up آماده شد (پروش و همکاران ۱۹۸۶). بعد از طی IVM ، تخمک های بلوغ یافته دوبار در هر یک از محیط های شستشو و IVF مورد شستشو قرار گرفتند. سپس ۶ تا ۷ تخمک در هر قطره حاوی IVF-TALP با حجم $50 \mu\text{l}$ قرار داده شدند (پروش و همکاران ۱۹۸۶). برای تأمین غلظت نهایی، 1×10^6 اسپرماتوزوئید ظرفیت پذیر شده به قطرات حاوی تخمک ها اضافه شدند. سپس $2 \mu\text{l}$ مخلوط PHE (

از آبی به بی رنگ (G6PDH فعال: BCB^- ، G6PDH غیر فعال: BCB^+) است (رودریگز-گنزالز و همکاران ۲۰۰۲). بنابراین می توان تخمک ها را به گونه ای غیرتجاجمی با استفاده از رنگ آمیزی BCB به دو گروه تخمک های BCB^+ (تخمک های کاملاً رشد یافته و شایسته تر) و تخمک های BCB^- (تخمک های در حال رشد با شایستگی تکاملی کمتر) تفکیک کرد (میرشمسی و همکاران ۲۰۱۳).

تا به امروز بر اساس اطلاعات ما، گزارشاتی که اثرات جسم زرد و سمت تخمدان را با یکدیگر بر روی شایستگی تکاملی تخمک ها بررسی کرده باشند محدود بوده و تناقضات بسیاری در رابطه با اثرات مثبت و منفی جسم زرد و فعالیت دو سمت سیستم تولید مثلی وجود دارد. بنابراین، هدف اولیه از این مطالعه، بررسی شایستگی تکاملی تخمک های گاوی منشأ گرفته از تخمدان های راست و چپ واجد جسم زرد (R.CL^+ -oocytes یا L.CL^+ -oocytes) و فاقد جسم زرد (R.CL^- -oocytes یا L.CL^- -oocytes) با بکارگیری آزمون بریلیانت کرزیل بلو (BCB) به عنوان معیار انتخاب بوده است (آزمایش اول). هدف دوم در این مطالعه، بررسی دقیق تر اثرات جسم زرد و ارزیابی اثرات اندازه فولیکولی به عنوان یکی دیگر از عوامل مسبب عدم یکنواختی در شایستگی تکاملی تخمک ها در ارتباط با حضور یا عدم حضور جسم زرد بود.

مواد و روش ها

تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده به غیر از مواردی که نام برده شده، از شرکت سیگما تهیه شده است.

جمع آوری تخمک ها

تخمدان های مورد نظر از گاو هایی بالغ با محدوده سنی ۴ تا ۷ سال از نژاد هولشتاین استحصال گردید. تخمدان های جمع آوری شده به صورت غوطه ور در محلول نرمال سالین که واجد پنیسیلین (100 IU/ml) و

². Cumulus oocyte complexes (COCs)

³. In vitro maturation (IVM)

⁴. Epidermal growth factor (EGF)

⁵. In vitro fertilization (IVF)

¹. Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)

BSA (*mDPBS*) مورد شستشو قرار گرفتند. سپس تخمک‌های مورد نظر به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۸/۵ درجه سانتیگراد و هوای مرطوب در معرض ۲۶ μM رنگ *BCB* (*B-5388*) رقیق شده در *mDPBS* قرار گرفتند (کرمی-شبانکاره و میرشمسی ۲۰۱۲). به دنبال این مرحله، تخمک‌ها دوبار با *mDPBS* شستشو شده و تحت میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی $\times 50$) مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس رنگ سیتوپلاسم، تخمک‌های مورد نظر به دو دسته تقسیم‌بندی شدند؛ تخمک‌هایی با رنگ آبی سیتوپلاسم که BCB^+ $L.CL^+.BCB^+$ و $R.CL^+.BCB^+$ یا $R.CL^-.BCB^+$ یا $L.CL^+.BCB^+$ و *L.CL⁺.BCB⁺-oocytes*) محسوب شده و تخمک‌هایی بدون رنگ آبی سیتوپلاسم که BCB^- $R.CL^+.BCB^-$ و $L.CL^+.BCB^-$ یا $R.CL^-.BCB^-$ و *L.CL⁺.BCB⁻-oocytes* و *L.CL⁺.BCB⁻-oocytes* در نظر گرفته می‌شدند. بنابراین ۸۳ تخمک بر اساس منشأ خود در چهار گروه آزمایشی تقسیم شدند و درصد تخمک‌های انتخاب شده BCB^+ در آنها بررسی شد (جدول ۱). سپس این تخمک‌ها بر اساس منشأ خود و انتخاب *BCB* همانطور که ذکر گردید در ۹ گروه آزمایشی قرار داده شدند (BCB^+ $R.CL^+.BCB^+$ و $R.CL^-.BCB^+$ یا $L.CL^+.BCB^+$ و $R.CL^+.BCB^+$ BCB^- $L.CL^+.BCB^-$ و $R.CL^-.BCB^-$ یا $L.CL^+.BCB^-$ و *L.CL⁺.BCB⁻-oocytes* و *L.CL⁺.BCB⁻-oocytes*) و *Control-oocytes*). بعد از این تقسیم‌بندی، تخمک‌ها ۳ بار در محیطی که قرار بود در آن کشت داده شوند، مورد شستشو قرار گرفتند. پس از طی *IVM*، تخمک‌ها لقاح داده شده و زیگوت‌های مفروض همانگونه که توضیح داده شد، کشت داده شدند. در گروه کنترل (*C-* *oocytes*)، بدون انتخاب بر اساس سمت تخمدان، حضور یا عدم حضور جسم زرد و رنگ آمیزی *BCB*)، تخمک‌ها به‌طور مستقیم (بدون رنگ‌آمیزی *BCB*) کشت داده شدند.

آزمایش ۲: تخمدان‌هایی متفاوت با آزمایش اول جهت بررسی عدم یکنواختی در شایستگی تکاملی تخمک‌های

۲۰ μM پنیسیل‌آمین، ۱۰ *CM* هیپوتائورین و ۱ μM اپی-نفرین) به سوسپانسیون مورد نظر اضافه شد. تخمک‌ها و اسپرم‌های مورد نظر به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۸/۵ درجه سانتیگراد در هوایی با ۵٪ CO_2 و حداکثر رطوبت با یکدیگر مورد انکوباسیون قرار گرفتند.

کشت در شرایط برون‌تنی^۱ (*IVC*)

حدوداً ۱۸ ساعت پس از تلقیح تخمک‌ها، زیگوت‌های مفروض با عمل *Vortexing* آرام و دوبار شستشو در محیط *HEPES-TCM 199* حاوی ۴٪ *BSA* و یکبار در محیط $KSOM$ ^۲ (لاویتس و بیگرس ۱۹۹۳) از سلول‌های کومولوس عاری شدند. زیگوت‌های مفروض در گروه‌هایی ۲۵ تا ۳۰ عددی در قطراتی ۴۰۰ μL از محیط *KSOM* که با ۱ mg/mL *BSA* مکمل شده بود ($KSOM_1$) قرار داده شدند و روی آنها در مدت ۴۸ ساعت بعدی با روغن معدنی پوشانیده شد. قطرات کشت داده شده در فواصل ۴۸ ساعته طی روزهای باقی مانده با استفاده از محیط *KSOM* که حاوی ۵٪ *FCS* بوده ($KSOM_2$) باز پر و جایگزین می‌شدند. تسهیّمات و کلیواژ رویانی در روز دوم (روز *IVF* به عنوان روز صفر در نظر گرفته شد) و میزان تولید بلاستوسیست در روزهای ۶، ۷، ۸ و ۹ به صورت نسبی از کل تخمک‌ها یا نسبی از رویان‌های تسهیم یافته ثبت گردید.

طرح آزمایش

آزمایش ۱: هدف آزمایش ۱ بررسی شایستگی تکاملی تخمک‌های گاوی منشأ گرفته از تخمدان‌های راست و چپ واجد جسم زرد (*R.CL⁺-oocytes* یا *L.CL⁺-oocytes*) و فاقد جسم زرد (*R.CL⁻-oocytes* یا *L.CL⁻-oocytes*) با بکارگیری آزمون بریلیانت کرزیل‌بلو (*BCB*) به‌عنوان معیار انتخاب بود. بلافاصله پس از آنکه تخمک‌ها از تخمدان‌های راست و چپ واجد جسم زرد و فاقد جسم زرد استحصال گردیدند، ۳ بار در محیط *Dulbecco's PBS* اصلاح شده با اضافه نمودن ۰/۴٪

^۱. *In vitro* culture (IVC)

^۲. Potassium simplex optimization medium (KSOM)

هایی که به عنوان BCB^+ و یا BCB^- انتخاب شدند، وجود نداشت ($P > 0.05$). هرچند در مورد تخمک های گروه $R.CL^+ - oocytes$ درصد تخمک های BCB^+ ($R.CL^+ . BCB^+ - oocytes$) بیشتر ($P < 0.05$) از تخمک های BCB^- ($R.CL^+ . BCB^- - oocytes$) بود (به ترتیب ۵۷/۶٪ در برابر ۴۲/۴٪).

در جدول ۲ شایستگی تکاملی تخمک های گاوی منشأ گرفته از تخمدان های راست و چپ واجد جسم زرد ($R.CL^+ - oocytes$ یا $L.CL^+ - oocytes$) و فاقد جسم زرد ($R.CL^- - oocytes$ یا $L.CL^- - oocytes$) که در معرض رنگ BCB قرار داده شده اند، آورده شده است. اثر متقابل رنگ آمیزی BCB با منشأ تخمدانی (سمت تخمدان ها و حضور یا عدم حضور جسم زرد) (BCB^+ ، $R.CL^+ . BCB^+$ ، $R.CL^- . BCB^+$ ، $L.CL^+ . BCB^+$ ، $R.CL^+ . BCB^-$ ، $R.CL^- . BCB^-$ ، $L.CL^+ . BCB^-$ ، $L.CL^- . BCB^-$ ، $R.CL^+ . BCB^-$ ، $R.CL^- . BCB^-$ ، $L.CL^+ . BCB^-$ ، $L.CL^- . BCB^-$) هیچگونه اثری بر رشد و نمو رویانی نداشت ($P < 0.05$). علاوه بر این، هیچ تفاوتی در اثر سمت تخمدان (راست در برابر چپ) و یا انتخاب BCB (BCB^+ در برابر BCB^-) در رشد و نمو رویانی ثبت نگردید. هرچند که حضور یا عدم حضور جسم زرد (CL^- در برابر CL^+) موجب بروز تفاوت هایی معنی دار در میزان تسهیم (کلیواژ) و تولید بلاستوسیت گردید. درصد کلیواژ تخمک های $CL^+ - oocytes$ (۷۲/۵٪) کمتر ($P < 0.001$) از مقادیر آن در $CL^- - oocytes$ و $C - oocytes$ (به ترتیب ۸۳/۶٪ و ۸۲/۲٪) بود. به طور مشابه، درصد بلاستوسیت های تولید شده از تخمک های $CL^+ - oocytes$ از مقادیر آن در $CL^- - oocytes$ کمتر بود ($P < 0.001$). اگرچه هیچ تفاوت معنی داری در میزان تولید بلاستوسیت بین $CL^+ - oocytes$ و $C - oocytes$ مشاهده نشد (به ترتیب ۲۶/۷٪ و ۳۷/۵٪).

منشأ گرفته از اندازه های مختلف فولیکولی تخمدان های واجد جسم زرد ($CL^+ - oocytes$) یا فاقد جسم زرد ($CL^- - oocytes$) به سه گروه تخمدان های CL^- ، CL^+ و گروه کنترل تقسیم بندی شدند. بعد از دسته بندی تخمدان ها بر اساس حضور یا عدم حضور جسم زرد، فولیکول های تخمدانی بر اساس قطر خود به سه گروه کوچک (S : ۳-۶ میلی متر)، متوسط (M : ۶-۹ میلی متر) و بزرگ (B : ۱۰-۲۰ میلی متر) (شبانکاره و همکاران ۲۰۱۳) تقسیم شدند. در مرحله بعدی تخمک های موجود در هر یک از این دسته جات فولیکولی مورد اسپیراسیون قرار گرفتند. بنابراین ۱۳۳۰ تخمک بر اساس منشأ خود در ۷ گروه آزمایشی ($CL^- . S$ ، $CL^+ . M$ ، $CL^+ . S$ ، $CL^- . B$ ، $CL^+ . B$ ، $CL^- . C$ ، $CL^+ . C$) قرار گرفتند و شایستگی تکاملی آنها پس از طی مراحل تولید آزمایشگاهی رویان بررسی شد. در گروه کنترل ($C - oocytes$) بدون انتخاب بر اساس حضور یا عدم حضور جسم زرد و اندازه فولیکولی، تخمک ها به طور مستقیم کشت داده شدند.

تحلیل آماری

داده های مورد نظر جمع آوری شده و مقادیر درصدی آن با $arcsine$ اصلاح گردید. آنالیز واریانس با بکارگیری عملکرد aov از بسته $Stats$ از نرم افزار R^4 انجام گرفت. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون $Tukey HSD$ انجام گرفت و تفاوت هایی با احتمال $P = 0.05$ یا کمتر معنی دار محسوب شدند.

نتایج

آزمایش اول: جدول ۱ ارتباط بین منشأ تخمک ها و انتخاب تخمک ها با استفاده از آزمون BCB را نشان می دهد. در گروه $R.CL^- - oocytes$ ، $L.CL^+ - oocytes$ و $L.CL^- - oocytes$ ، تفاوت معنی داری در درصد تخمک -

1. Small (S)

2. Medium (M)

3. Large or Big (B)

4. Software statistical package R version 2.15.2

جدول ۱- ارتباط بین سمت تخمدان، حضور یا عدم حضور جسم زرد و انتخاب تخمک‌ها با استفاده از آزمون BCB (تعداد تکرار=۷)

² R.CL ⁺		² R.CL ⁻		¹ L.CL ⁺		¹ L.CL ⁻		دسته‌بندی تخمک‌ها	صفت
%	n	%	n	%	n	%	n		
۱/۲ ^a ±۵۷/۶	۹۵	۱/۴ ^a ±۵۱/۹	۱۲۳	۰/۸ ^a ±۵۲/۹	۸۱	۱/۲ ^a ±۵۴/۶	۱۱۸	BCB ⁺	درصد تخمک-
۰/۸ ^b ±۴۲/۴	۷۰	۱/۲ ^a ±۴۸/۱	۱۱۴	۰/۷ ^a ±۴۷/۱	۷۲	۱/۰ ^a ±۵۴/۴	۹۸	BCB ⁻	های انتخاب شده

abc حروف متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار است (P < 0.05).

¹ L.CL⁺ و L.CL⁻: به ترتیب تخمدان چپ فاقد یا واجد جسم زرد.

² R.CL⁺ و R.CL⁻: به ترتیب تخمدان راست فاقد یا واجد جسم زرد.

جدول ۲- استفاده از آزمون BCB به عنوان معیار انتخاب شایستگی تکاملی تخمک‌های گاوی منشأ گرفته از تخمدان‌های چپ و راست واجد یا فاقد جسم زرد (تعداد تکرار=۷)

صفت	تعداد تخمک	نرخ بلوغ تخمک	نرخ تسهیم	نرخ تولید بلاستوسیت به ازای تخمک	نرخ تولید بلاستوسیت به ازای کلیواژ
C	112	۸۸/۲ ± ۹/۴ ^a	۸۲/۲ ± ۴/۷ ^a	۳۷/۵ ± ۵/۶ ^a	۴۶/۲ ± ۷/۳ ^a
R	402	۹۰/۲ ± ۳/۷ ^a	۸۰/۲ ± ۳/۱ ^a	۳۷/۲ ± ۳/۳ ^a	۴۵/۸ ± ۳/۳ ^a
L	369	۸۶/۰ ± ۲/۹ ^a	۷۶/۵ ± ۲/۵ ^a	۳۰/۰ ± ۲/۱ ^a	۳۹/۶ ± ۲/۷ ^a
C	112	۸۸/۲ ± ۹/۴ ^a	۸۲/۲ ± ۴/۷ ^a	۳۷/۵ ± ۵/۶ ^{ab}	۴۶/۲ ± ۷/۳ ^a
CL ⁺	318	۸۵/۸ ± ۳/۴ ^a	۷۲/۵ ± ۲/۴ ^b	۲۶/۷ ± ۲/۰ ^b	۳۷/۰ ± ۲/۶ ^a
CL ⁻	453	۹۰/۳ ± ۳/۴ ^a	۸۳/۶ ± ۲/۳ ^a	۴۰/۳ ± ۲/۸ ^a	۴۸/۳ ± ۳/۱ ^a
C	112	۸۸/۲ ± ۹/۴ ^a	۸۲/۲ ± ۴/۷ ^a	۳۷/۵ ± ۵/۶ ^a	۴۶/۲ ± ۷/۳ ^a
BCB ⁺	417	۹۰/۰ ± ۳/۵ ^a	۸۰/۳ ± ۲/۹ ^a	۳۵/۴ ± ۳/۰ ^a	۴۳/۶ ± ۳/۳ ^a
BCB ⁻	354	۸۶/۲ ± ۳/۳ ^a	۷۶/۳ ± ۲/۸ ^a	۳۱/۹ ± ۲/۶ ^a	۴۱/۸ ± ۳/۰ ^a

abc حروف متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار است (P < 0.001).

¹ C، R و L: به ترتیب تخمدان‌های گروه کنترل، راست و چپ.

² CL⁺ و CL⁻: به ترتیب تخمدان‌های واجد یا فاقد جسم زرد.

گروه‌ها بودند. اثر متقابل جسم زرد با اندازه فولیکولی درصد تولید بلاستوسیت به ازای تخمک و به ازای رویان‌های کلیواژ یافته را متأثر ساخت (P < 0.001). درصد تولید بلاستوسیت از تخمک‌های S-CL⁺ در بین دیگر گروه‌ها کمترین میزان بود (P > 0.05). هرچندکه، هیچ تفاوت معنی‌داری (P > 0.05) در درصد بلاستوسیت‌های تولیدی از تخمک‌های منشأ

آزمایش ۲: جدول ۳ شایستگی تکاملی تخمک‌های منشأ گرفته از اندازه‌های مختلف فولیکولی تخمدان‌های واجد جسم زرد (CL⁺-oocytes) و فاقد جسم زرد (CL⁻-oocytes) را نمایش می‌دهد. در این آزمایش اندازه فولیکولی، درصد تخمک‌های اکسپند یافته را متأثر نمود؛ بطوریکه تخمک‌های استحصالی از فولیکول‌های کوچک (S-oocytes) دارای کمترین میزان بلوغ تخمک میان دیگر

درحالی بود که هیچ تفاوت معنی داری در میزان تولید بلاستوسیسیت بین تخمک های $CL-S-$ ، $C-oocytes$ و $CL+B-oocytes$ وجود نداشت. همچنین در این مطالعه، اثر متقابل جسم زرد در اندازه فولیکولی میزان اکسپنشن و کلیواژ را متأثر نداشت.

گرفته از اندازه های مختلف فولیکولی تخمدان های فاقد جسم زرد ($CL-S$ ، $CL-M$ و $CL-B$) مشاهده نگردید. درصد بلاستوسیسیت های تولیدی از $CL-M-oocytes$ و $CL+B-oocytes$ بیشتر از آن مقادیر در $CL-S+$ $CL-M-oocytes$ و $oocytes$ بود ($P < 0.001$). این

جدول ۳ - شایستگی تکاملی تخمک های گاوی منشأ گرفته از اندازه های مختلف فولیکولی تخمدان های واجد یا فاقد جسم زرد (تعداد تکرار=۶)

گروه ها	صفات	تعداد تخمک	نرخ بلوغ تخمک	نرخ تسهیم	نرخ تولید بلاستوسیسیت به ازای تخمک	نرخ تولید بلاستوسیسیت به ازای کلیواژ
اثر جسم زرد (اثر اصلی)	1C	۲۵۱	$۸۹/۲ \pm ۶/۱$	$۸۴/۳ \pm ۳/۰$	$۳۵/۰ \pm ۰/۸$	$۴۰/۰ \pm ۰/۷$
	$^1CL-$	۵۳۱	$۸۹/۸ \pm ۳/۱$	$۸۴/۲ \pm ۴/۷$	$۴۰/۲ \pm ۳/۶$	$۴۵/۷ \pm ۴/۹$
	$^1CL+$	۵۴۸	$۸۵/۱ \pm ۳/۲$	$۷۸/۳ \pm ۲/۸$	$۳۱/۴ \pm ۳/۴$	$۳۸/۶ \pm ۴/۲$
اثر اندازه فولیکول (اثر اصلی)	C	۲۵۱	$۸۹/۲ \pm ۶/۱^a$	$۸۴/۳ \pm ۳/۰$	$۳۵/۰ \pm ۰/۸$	$۴۰/۰ \pm ۰/۷$
	2S	۴۳۴	$۷۲/۱ \pm ۳/۶^b$	$۷۹/۱ \pm ۲/۷$	$۳۰/۸ \pm ۳/۸$	$۳۶/۲ \pm ۴/۹$
	2M	۴۹۴	$۸۱/۳ \pm ۲/۴^a$	$۸۴/۴ \pm ۲/۳$	$۲۸/۳ \pm ۳/۲$	$۴۱/۰ \pm ۳/۹$
	2B	۱۵۰	$۹۰/۰ \pm ۳/۳^a$	$۸۰/۵ \pm ۶/۵$	$۴۱/۳ \pm ۵/۴$	$۴۶/۸ \pm ۷/۶$
اثر متقابل جسم زرد و اندازه فولیکولی	C	۲۵۱	$۸۹/۲ \pm ۶/۱$	$۸۴/۳ \pm ۳/۰$	$۳۵/۰ \pm ۰/۸^b$	$۴۰/۰ \pm ۰/۷^{ab}$
	^2CL-S	۲۱۷	$۸۴/۸ \pm ۵/۱$	$۸۱/۹ \pm ۴/۹$	$۳۶/۹ \pm ۴/۰^{ab}$	$۳۹/۹ \pm ۵/۴^{ab}$
	^2CL-M	۲۳۶	$۸۸/۰ \pm ۲/۱$	$۸۶/۵ \pm ۲/۶$	$۳۸/۷ \pm ۵/۳^a$	$۴۳/۶ \pm ۶/۴^a$
	^2CL-B	۷۸	$۹۰/۴ \pm ۴/۸$	$۸۴/۱ \pm ۱۲/۵$	$۴۰/۴ \pm ۸/۹^a$	$۴۶/۱ \pm ۱۳/۱^a$
	^2CL+S	۲۱۸	$۸۲/۴ \pm ۲/۸$	$۷۶/۱ \pm ۲/۴$	$۳۰/۸ \pm ۶/۷^c$	$۳۶/۸ \pm ۸/۶^b$
	^2CL+M	۲۵۸	$۸۳/۲ \pm ۳/۵$	$۸۲/۰ \pm ۳/۱$	$۳۳/۶ \pm ۳/۷^{bc}$	$۳۸/۸ \pm ۴/۷^b$
	^2CL+B	۷۲	$۸۶/۱ \pm ۶/۹$	$۷۶/۶ \pm ۵/۵$	$۳۵/۱ \pm ۶/۷^b$	$۴۰/۷ \pm ۸/۹^{ab}$

^{abc} حروف متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار است ($P < 0.001$).

^۱ C ، $CL+$ و $CL-$: به ترتیب تخمدان های گروه کنترل، واجد یا فاقد جسم زرد.

^۲ S ، M و B : به ترتیب تخمک های منشأ گرفته از فولیکول های کوچک، متوسط و بزرگ.

^۳ $CL-S$ ، $CL-M$ و $CL-B$: به ترتیب تخمک های منشأ گرفته از فولیکول های کوچک، متوسط و بزرگ تخمدان های فاقد جسم زرد.

^۴ $CL+S$ ، $CL+M$ و $CL+B$: به ترتیب تخمک های منشأ گرفته از فولیکول های کوچک، متوسط و بزرگ تخمدان های واجد جسم زرد.

بحث

گوسفند؛ شبانکاره و همکاران (۲۰۰۹) عملکرد ناپرابر دو سمت سیستم تولیدمثلی گزارش شده است و از وجود تناقضاتی در مورد اثرات مثبت و منفی جسم زرد بر

در بسیاری از گونه های پستانداران (موش خرما؛ فریتزچ و همکاران ۲۰۰۰، انسان؛ فوکودا و همکاران ۲۰۰۰ و

می‌باشد که احتمالاً به علت غلظت بالاتر پروژسترون در گردش خون و تجدید مداوم رشد فولیکولی بوده است (تیلور و راجاماندران ۱۹۹۴).

نتایج مطالعه حاضر در رابطه با انتخاب تخمک‌ها با استفاده از آزمون BCB از وجود عدم یکنواختی در شایستگی تکاملی تخمک‌های گروه $R.CL^+oocytes$ شواهدی به دست داد، به طوری که درصد تخمک‌هایی که به عنوان BCB^+ (کاملاً رشد یافته و دارای شایستگی تکاملی بالاتر) شناخته شدند، از تخمک‌های BCB^- بیشتر بود (به ترتیب $R.CL^+.BCB^+oocytes$ و $R.CL^+.BCB^-oocytes$). همانطور که قبلاً ذکر شد؛ بوئدینو و همکارانش (۱۹۹۵) نیز از وجود برخی تناقضات در رابطه با آثار مثبت و منفی جسم زرد بر کیفیت تخمک‌ها شواهدی را به دست داده‌اند. اینچنین به نظر می‌رسد که عوامل دیگری نیز همچون مراحل مختلف رشد و پس‌روی و اندازه‌های مختلف فولیکولی که با رنگ‌آمیزی BCB قابل تشخیص می‌باشند، در عدم یکنواختی در شایستگی تکاملی تخمک‌ها تأثیرگذار می‌باشند (کرمی-شبانکاره و میرشمسی ۲۰۱۲ و میرشمسی و شبانکاره ۲۰۱۲ و میرشمسی و همکاران ۲۰۱۳). برای پاسخ به این سوال در رابطه با منبع و عامل عدم یکنواختی شایستگی تکاملی تخمک‌ها که در آزمایش اول مشاهده شد، و همچنین مطالعه دقیق‌تر اثرات جسم زرد، آزمایش دوم طراحی و اجرا گردید. نتایج آزمایش دوم نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان تولید بلاستوسیست بین تخمک‌های منشأ گرفته از اندازه‌های مختلف فولیکولی تخمدان‌های واجد جسم زرد ($CL^+.S-$ و $CL^+.B-oocytes$) وجود دارد و بنابراین مشاهدات ثبت شده در آزمایش اول (جدول ۱) را که از وجود عدم یکنواختی در شایستگی تکاملی تخمک‌های $R.CL^+oocytes$ شواهدی به دست داده بود، تأیید کرد. علاوه بر این، $S-oocytes$ و $CL^+.S-oocytes$ به ترتیب دارای کمترین میزان اکسپنشن و تولید بلاستوسیست میان گروه‌ها بودند. اگرچه درصد تولید بلاستوسیست از CL^-

فعالیت سیستم تولید مثلی شواهدی به دست داده است. بر اساس یافته‌های ما، این بررسی اولین مطالعه در نوع خود بوده که اقدام به ارزیابی اثرات این دو عامل (سمت تخمدان و حضور جسم زرد) با یکدیگر بر شایستگی تکاملی تخمک‌های گاوی نموده است.

در آزمایش اول، حضور یا عدم حضور جسم زرد (CL^- در برابر CL^+) موجب بروز تفاوت‌هایی معنی‌دار در میزان تسهیم (کلیواژ) و تولید بلاستوسیست گردید به طوری که درصد کلیواژ و تولید بلاستوسیست از $CL^+oocytes$ کمتر از آن مقادیر در گروه $CL^-oocytes$ بود (جدول ۲). این نتایج در راستای مطالعات صورت گرفته در انسان بوده که گزارش نموده‌اند که فولیکول‌های غالبی که در سمت مقابل تخمک‌گذاری قبلی وجود دارند (CL^-ovary) از سلامت بیشتری نسبت به فولیکول‌هایی برخوردار بوده که در همان سمت تخمک‌گذاری قبلی (CL^+ovary) واقع شده‌اند و موجب نتایج بهتری پس از طی مراحل IVF شده‌اند (فوکودا و همکاران ۱۹۹۶). علاوه بر این، نتایج مطالعات گذشته در نشخوارکنندگان مبین آن بوده که تعداد متوسط تخمک‌های با کیفیت از تخمدان‌های فاقد جسم زرد در مقایسه با تخمدان‌های واجد جسم زرد، بیشتر بوده و از آنها می‌توان به طور مؤثری جهت اهداف IVF بهره جست (کومار و همکاران ۲۰۰۴ و جمیل و همکاران ۲۰۰۸). در مطالعه‌ای دیگر بر روی گاوها، نشان داده شد که اگرچه نرخ کلیواژ تخمک‌های استحصالی از تخمدان‌های فاقد جسم زرد نسبت به تخمدان‌های واجد جسم زرد بالاتر بوده است، اما میزان تولید بلاستوسیست روندی معکوس را نشان داده است (بوئدینو و همکاران ۱۹۹۵). نتایج مطالعه حاضر با برخی مطالعات گذشته (بوئدینو و همکاران ۱۹۹۵ و پیرستانی و همکاران ۲۰۱۰) در گاوها که میزان تولید بلاستوسیست بیشتری را از تخمک‌های استحصالی از تخمدان‌های موجود در فاز لوتئال یا تخمدان‌های واجد جسم زرد در مقایسه با تخمدان‌های موجود در فاز فولیکولی یا تخمدان‌های فاقد جسم زرد، گزارش نموده‌اند، در تناقض

پروژسترون همچنین ممکن است هم در تخمدان‌های واجد جسم زرد و هم فاقد جسم زرد اثراتی موضعی را مستقل از تغییرات ترشح گونادوتروپین‌ها اعمال نماید (بارتلوسکی و همکاران ۲۰۰۱). کانتراس-سولیس و همکارانش (۲۰۰۸) نه تنها از وجود یک اثر سیستمیک از جانب جسم زرد بر دینامیک فولیکولی گوسفندان شواهدی بدست دادند، اثراتی داخل تخمدانی را نیز ثبت کردند که موجب یک کاهش معنی‌دار در رشد فولیکول-هایی می‌گردد که بر روی تخمدان واجد جسم زرد وجود دارند (بارتلوسکی و همکاران ۲۰۰۱). همچنین نتایج این مطالعات از وجود یک عامل ممانعتی که از جسم زرد آزاد شده شواهدی به دست داده‌اند (کانتراس-سولیس و همکارانش ۲۰۰۸). اینهیبین که از جسم زرد بزها و گاوها ترشح (سانقا و همکاران ۲۰۰۲) و به داخل ورید تخمدانی میشو تخلیه می‌شود (تسونیس و همکاران ۱۹۸۸) قادر است تا رشد فولیکولی را متأثر سازد (کمپیل و همکاران ۱۹۹۱). در مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که تمامی CL^+ -oocytes توسط اثرات منفی جسم زرد متأثر نشده‌اند و شاهد وجود یک عدم یکنواختی در شایستگی تکاملی تخمک‌های CL^+ -oocytes بوده که خود ناشی از اثر اندازه فولیکولی می‌باشد. این‌طور به نظر می‌رسد که CL^+ -B-oocytes به اندازه‌ای که CL^+ -S-oocytes از اثرات منفی جسم زرد متأثر شده‌اند، تحت تأثیر قرار نگرفته‌اند. یک دلیل احتمالی برای این رخداد آن است که همچنانکه قطر فولیکول به حدود ۲ میلی‌متر (فولیکول کوچک) افزایش می‌یابد و قطر تخمک از ۱۱۰ میکرون به ۱۲۰ میکرون می‌رسد، شایستگی تکاملی کسب شده و اکثر تخمک‌ها قادر به لقاح و رشد و نمو رویانی می‌گردند (هیتل و همکاران ۱۹۹۷). بنابراین می‌توان این چنین فرض کرد که جسم زرد غالباً اثرات منفی خود را بر روی رشد فولیکول‌های درحال رشد کوچک اعمال می‌دارد و نه فولیکول‌های بزرگ رشد یافته. از سویی دیگر، شبانکاره و همکاران (۲۰۱۳) بیان نموده‌اند که مایعات فولیکولی استحصال شده از

M -oocytes و CL^- -B-oocytes بیشتر از آن مقادیر در CL^+ -S-oocytes و CL^+ -M-oocytes بود، اما هیچ تفاوت معنی‌داری در رابطه با تولید بلاستوسیست بین CL^+ -B-oocytes و CL^- -S-oocytes ، C-oocytes وجود نداشت. این نتایج مشاهدات آزمایش اول را که در آن درصد کلیواژ و تولید بلاستوسیست از CL^+ -oocytes کمتر از آن مقادیر در CL^- -oocytes بود، تأیید کرد. اگرچه همچنین نشان داده شد که در شایستگی تکاملی تخمک‌های منشأ گرفته از تخمدان‌های واجد جسم زرد (CL^+ -oocytes) عدم یکنواختی وجود داشته، به طوری که تخمک‌های منشأ گرفته از فولیکول‌های بزرگ تخمدان‌های واجد جسم زرد (CL^+ -B-oocytes) دارای درصد تولید بلاستوسیست به ازای تخمک بالاتری نسبت به فولیکول‌های کوچک (CL^+ -S-oocytes) بودند. این نتایج در توافق با مطالعات گذشته بوده که گزارش نموده‌اند؛ اندازه (بکر-وان و وودنبرگ و همکاران ۲۰۰۶) و کیفیت فولیکول مبدأ (بلوندین و سیرارد ۱۹۹۴) ظرفیت تکاملی تخمک‌های گاوی را متأثر می‌سازند. همچنین در گاو (لکواره و همکاران ۲۰۰۵)، بز (کروزت و همکاران ۱۹۹۵) و گوسفند (کوگنی و همکاران ۱۹۹۸) تخمک‌های منشأ گرفته از فولیکول‌های بزرگ در مقایسه با فولیکول‌های کوچک در شرایط برون تنی از رشد و نمو رویانی بالاتری برخوردار بوده‌اند.

بر روی تخمدان‌های گاوی گیرنده‌هایی برای دو هورمون استروژن و پروژسترون یافت شده‌اند (بریشا و همکاران ۲۰۰۲). در واقع عدم وجود اثرات غالبیت فولیکولی در خلال فاز جسم زرد فعال شواهدی مبنی بر حمایت از فرضیه آدام (۱۹۹۹) در رابطه با وجود اثرات ممانعتی پروژسترون مترشحه از جسم زرد بر طول عمر فولیکول‌های غالب در گوسفندان، ارائه می‌دهد. مکانیسم سیستمیکی که پروژسترون به واسطه آن از رشد فولیکولی ممانعت می‌نماید از طریق سرکوب ضربان‌های ترشحی هورمون LH بوده که برای ادامه رشد فولیکول-های بزرگ ضروری می‌باشد (فلین و همکاران ۱۹۹۹).

نتایج حاصل از این مطالعه برون‌تنی به‌طور واضح نشان داد که جسم زرد تأثیری منفی بر شایستگی تکاملی تخمک‌های گاوی اعمال می‌دارد. اگرچه تمامی CL^+ *oocytes* توسط اثرات منفی جسم زرد متأثر نشده‌اند و شاهد وجود یک عدم یکنواختی در شایستگی تکاملی تخمک‌های CL^+ -*oocytes* بوده که خود ناشی از اثر اندازه فولیکولی می‌باشد. بطور کلی هدف اصلی در این مطالعه افزایش راندمان تولید رویان در شرایط برون‌تنی با اعمال انتخابی مؤثر در زمان استحصال تخمدان‌ها و تخمک‌ها بوده است. به‌عبارتی دیگر، جمع‌آوری تخمدان‌ها و تخمک‌ها بر اساس حضور یا عدم حضور جسم زرد و اندازه‌های مختلف فولیکولی می‌تواند در تولید تجاری رویان‌های گاو در شرایط برون‌تنی مفید واقع گردد.

فولیکولهای موجود بر روی تخمدان‌های گاوی فاقد جسم زرد جهت استفاده در بلوغ تخمک‌ها مناسب‌تر از این مایعات در تخمدان‌های واجد جسم زرد می‌باشد. این ترکیب بیوشیمیایی متفاوت مایعات فولیکولی ممکن است دلیلی بر تفاوت در درصد کلیواژ و میزان تولید بلاستوسیست از تخمک‌های CL^+ و CL^- -*oocytes* در مطالعه حاضر باشد. علاوه‌براین شبانکاره و همکارانش (۲۰۱۳) گزارش نمودند که مقدار گلوکز موجود در مایع فولیکولی استحصال شده از فولیکول‌های بزرگ به‌طور معنی‌داری در مقایسه با فولیکول‌های متوسط و کوچک در تخمدان‌های فاقد جسم زرد، بیشتر است. بنابراین این‌طور به‌نظر می‌رسد که برهم‌کنش حضور یا عدم حضور جسم زرد با اندازه فولیکولی آنچنان‌که در این مطالعه مشاهده شد، بر شایستگی تکاملی و کیفیت تخمک‌ها مؤثر است.

منابع مورد استفاده

- Acosta TJ and Miyamoto A, 2004. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim Reprod Sci* 82:127-40.
- Adams G, 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil Supplement* 54:17.
- Bartlewski PM, Beard AP and Rawlings NC, 2001. Ultrasonographic study of the effects of the corpus luteum on antral follicular development in unilaterally ovulating western white-faced ewes. *Anim Reprod Sci* 65:231-44.
- Beker-van Woudenberg AR, Zeinstra EC, Roelen BA, Colenbrander B and Bevers MM, 2006. Developmental competence of bovine oocytes after specific inhibition of MPF kinase activity: effect of estradiol supplementation and follicle size. *Anim Reprod Sci* 92:231-40.
- Berisha B, Pfaffl MW and Schams D, 2002. Expression of estrogen and progesterone receptors in the bovine ovary during estrous cycle and pregnancy. *Endocrine* 17:207-14.
- Blondin P and Sirard MA, 1994. The influence of oocyte and follicular morphology on developmental competence in superovulated heifers. *Theriogenology* 41:164.
- Boediono A, Rajamahendran R, Saha S, Sumantri C and Suzuki T, 1995. Effect of the presence of a CL in the ovary on oocyte number, cleavage rate and blastocyst production in vitro in cattle. 1995. *Theriogenology* 43:169-169.
- Campbell B, Picton H, Mann G, McNeilly A and Baird D, 1991. Effect of steroid-and inhibin-free ovine follicular fluid on ovarian follicles and ovarian hormone secretion. *J Reprod Fertil* 93:81-96.
- Casida L, Heizer E and Barrett G, 1948. Most calves develop in right horn. Annual report of the director, Wisconsin Agr Exp Sta Ann, Rpt, Bul 480:59.
- Clark C, 1936. Does the right ovary of the bovine function more frequently than the left. *J Am Vet Med Assoc* 88:62-5.
- Cognie Y, Benoit F, Poulin N, Khatir H and Driancourt M, 1998. Effect of follicle size and of the FecB Booroola gene on oocyte function in sheep. *J Reprod Fertil* 112:379-86.

- Contreras-Solis I, Diaz T, Lopez G, Caigua A, Lopez-Sebastian A and Gonzalez-Bulnes A, 2008. Systemic and intraovarian effects of corpus luteum on follicular dynamics during estrous cycle in hair breed sheep. *Anim Reprod Sci* 104:47-55.
- Crozet N, Ahmed-Ali M and Dubos M, 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. *J Reprod Fertil* 103:293-8.
- Flynn J, Duffy P, Boland M and Evans A, 1999. Effect of synchronisation of oestrus using a progestagen sponge on ovarian follicular dynamics and luteinising hormone pulse frequency in sheep. *J Reprod Fertil Abstr Ser p.* 39.
- Fritzsche P, Riek M and Gattermann R, 2000. Effects of social stress on behavior and corpus luteum in female golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Physiol Behav* 68:625-30.
- Fukuda M, Fukuda K, Andersen CY and Byskov AG, 1996. Ovary and Ovulation: Contralateral selection of dominant follicle favours pre-embryo development. *Hum Reprod* 11:1958-62.
- Fukuda M, Fukuda K, Andersen CY and Byskov AG, 2006. Ovulation jumping from the left to the right ovary in two successive cycles may increase the chances of pregnancy during intrauterine insemination and/or in vitro fertilization natural cycles. *Fertil Steril* 85:514-7.
- Fukuda M, Fukuda K, Andersen CY and Byskov AG, 2000. Right-sided ovulation favours pregnancy more than left-sided ovulation. *Hum Reprod* 15:1921-6.
- Gereš D, Ževrnja B, Žubčić D, Zobel R, Vulić B and Staklarević N, 2011. Asymmetrical functional activities of ovaries and tubular part of reproductive organs of dairy cows. *Veterinarski arhiv* 81:187-98.
- Ginther O and Hoffman M, 2014. Intraovarian effect of dominant follicle and corpus luteum on number of follicles during a follicular wave in heifers. *Theriogenology* 82:169-75.
- Hylan D, Giraldo AM, Carter JA, Gentry GT, Bondioli KR and Godke RA, 2009. Sex ratio of bovine embryos and calves originating from the left and right ovaries. *Biol Reprod* 81:933-8.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H and Greve T, 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47:23-32.
- Jamil H, Samad HA, Qureshi ZI, Rehman NU and Lodhi LA, 2008. Harvesting and evaluation of riverine buffalo follicular oocytes. *Turk. J. Vet. Anim. Sci* 32: 25-30.
- Karami-Shabankareh H and Mirshamsi SM, 2012. Selection of developmentally competent sheep oocytes using the brilliant cresyl blue test and the relationship to follicle size and oocyte diameter. *Small Ruminant Res* 105:244-9.
- Kumar N, Paramasivan S, Sood P and Singh M, 2004. Micrometry of different category oocytes recovered from goat ovaries. *Indian J Anim Sci* 74:259-260.
- Lawitts JA and Biggers JD, 1993. Culture of preimplantation embryos. *Methods Enzymol* 225:153-64.
- Lequarre AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I and Dalbiès-Tran R, 2005. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 63:841-59.
- Loneragan P, Fair T, Corcoran D and Evans A, 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 65:137-52.
- Mirshamsi S, KaramiShabankareh H, Ahmadi-Hamedani M, Soltani L, Hajarain H and Abdolmohammadi A, 2013. Combination of oocyte and zygote selection by brilliant cresyl blue (BCB) test enhanced prediction of developmental potential to the blastocyst in cattle. *Anim Reprod Sci* 136: 245-251.
- Mirshamsi S and Shabankareh HK, 2012. Selection of developmentally competent sheep zygotes using the Brilliant Cresyl Blue (BCB) test, after IVF. *Small Ruminant Res* 105:250-4.
- Motlik J and Fulka J, 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* 25:87-96.
- Opiela J, Kańska-Książkiewicz L, Lipiński D, Słomski R, Bzowska M and Ryńska B, 2008. Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. *Theriogenology* 69:546-55.

- Parrish J, Susko-Parrish J, Leibfried-Rutledge M, Critser E, Eyestone W and First N, 1986. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25:591-600.
- Pirestrani A, Morteza S, Hajian M, Forouzanfar M, Moulavi F and Avedi P, 2010. Effect of ovarian cyclic status on in vitro embryo production in cattle. *Int J Fertil Steril* 4:172-5.
- Rodriguez-González E, Lopez-Bejar M, Velilla E and Paramio M, 2002. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* 57:1397-409.
- Sangha G, Sharma R and Guraya S, 2002. Biology of corpus luteum in small ruminants. *Small Ruminant Research* 43:53-64.
- Shabankareh HK, Habibizad J and Torki M, 2009. Corpus luteum function following single and double ovulation during estrous cycle in Sanjabi ewes. *Anim Reprod Sci* 114:362-9.
- Shabankareh HK, Kor NM and Hajarian H, 2013. The influence of the corpus luteum on metabolites composition of follicular fluid from different sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 140:109-14.
- Taylor C and Rajamahendran R, 1994. Effect of mid-luteal phase progesterone levels on the first wave dominant follicle in cattle. *Can J Anim Sci* 74:281-5.
- Tsonis C, Baird D, Campbell B, Leask R and Scaramuzzi R, 1988. The sheep corpus luteum secretes inhibin. *J Endocrinol* 116:R3-R5.
- Yoon KW, Shin TY, Park JI, Roh S, Lim JM and Lee BC, 2001. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. *Reprod Fertil Dev* 12:133-9.

***In vitro* developmental competence of bovine oocytes in relation to side of ovaries, presence of corpus luteum and follicle size**

H Karami Shabankareh¹, H Hajarian², MH Shahsavari^{3*} and S Foroutanifar²

Received: November 19, 2014 Accepted: August 19, 2015

¹Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Razi, Kermanshah, Iran

²Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Razi, Kermanshah, Iran

³ PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Corresponding author: email: shahsavari_mohammadhamed@yahoo.com

Abstract

BACKGROUND: There are many discrepancies about positive or negative effects of corpus luteum (CL) and unequal activity of sides of the reproductive system. **OBJECTIVES:** the initial aim of this study was to assess the developmental competence of bovine oocytes originating from right or left ovaries bearing a CL (R.CL⁺-oocytes or L.CL⁺-oocytes) or not bearing a CL (R.CL⁻-oocytes or L.CL⁻-oocytes) using the brilliant cresyl blue (BCB) test as a selection criterion (experiment 1). **METHODS:** In experiment 1, collected oocytes exposed to BCB and separated as growing (BCB⁻) and grown oocytes (BCB⁺, more competent). Then, all of the oocytes were subjected to the *in vitro* embryo production (IVEP) processes. **RESULTS:** Results of this experiment showed no differences in the embryonic development due to effects of side of ovaries (i.e., right vs. left) or BCB selection (i.e., BCB⁺ vs. BCB⁻). However, in case of R.CL⁺-oocytes, there was a heterogeneity in the developmental competence of oocytes and the percentage of oocytes classified as BCB⁺ was greater ($P < 0.05$) than that of BCB⁻ (57.6% versus 42.4%, respectively). Furthermore, the percentages of cleavage and blastocyst obtained of CL⁺-oocytes were lower than those of CL⁻-oocytes ($P < 0.001$). The second objective was to evaluate heterogeneity in the developmental potential of oocytes in relation to presence or absence of CL and follicle size. After ovarian classification based on presence or absence of CL, sample follicles were placed in three groups according to their diameter, i.e., small, medium and large or big and collected oocytes in each group subjected to the IVEP processes. Results showed that CL⁺.B-oocytes were not influenced by negative effects of CL as much as CL⁺.S-oocytes did. **CONCLUSIONS:** Therefore, it can be concluded that using oocytes originating from large follicles of ovaries not bearing a CL may decrease problems associated with IVEP of bovine embryos.

Keywords: Corpus luteum, Brilliant cresyl blue, Developmental potential, *In vitro* embryo production, Follicle size.