

اثر پراکسید هیدروژن و ملاتونین بر بلوغ هسته‌ای اووسیت در شرایط برون تنی

کاظم بیابانی^۱، احمد زارع شحنه^۱، حمید کهرام^۱، مهدی خدایی مطلق^{۲*}

۱- گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- دانشگاه اراک، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی، کدپستی: ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-motlagh@araku.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۲/۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۹/۲۷

چکیده

هدف: از این مطالعه بررسی اثر غلظت‌های مختلف ملاتونین در کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از هیدروژن پراکسید بر بلوغ هسته‌ای اووسیت‌های نابالغ گوسفند بود.

مواد و روش‌ها: تخمدان‌ها از کشتارگاه جمع آوری و استحصال اووسیت به روش استاندارد انجام گرفت، کشت اووسیت‌ها در الف: TCM199 به علاوه ۱۰ درصد FBS، ۵ میکرو گرم در میلی لیتر FSH، ۰/۰۱ واحد بین المللی در میلی لیتر LH، ۱۰۰ واحد بین المللی در میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ واحد بین المللی در میلی لیتر استرپتومایسین، ب: الف + $300 \text{H}_2\text{O}_2$ میکرو مولار با دمای ۳۸/۵ درجه سانتی گراد، پ: ب + ۱ میکرو مولار ملاتونین و ت: ب + ۱۰ میکرو مولار ملاتونین انجام شد.

نتایج: این مطالعه نشان داد که H_2O_2 ، بلوغ هسته‌ای را بطور معنی داری ($P < 0.05$) نسبت به گروه کنترل کاهش می‌دهد (۱۴/۷ در مقابل ۸۴/۹). ملاتونین با غلظت صفر، ۱ و ۱۰ میکرو مولار توانست هنگام تنش اکسیداتیو میزان اووسیت‌هایی که به متافاز-۲ می‌رسند را افزایش دهد (به ترتیب ۱۴/۷ در مقابل ۴۳/۲۹ و ۵۴/۱۲)، اما با افزایش غلظت ملاتونین از ۱ به ۱۰ میکرو مولار، تاثیر معنی داری روی بلوغ اووسیت‌ها نداشت.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که ملاتونین هنگام تنش اکسیداتیو بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌های گوسفند را بهبود می‌بخشد.

واژگان کلیدی: تنش اکسیداتیو، ملاتونین، اووسیت گوسفند

اثر پراکسید هیدروژن و ملاتونین بر بلوغ هسته ای اووسیت در ...

کاظم بیابانی و همکاران

مقدمه

افزایش می دهد (۱۰). از طرف دیگر ملاتونین لیپید را در غشا، پروتئین را در سیتوزول و DNA را در هسته از آسیب رادیکال های آزاد حمایت می کند (۱۱). ملاتونین از طریق افزایش آنزیم های اصلی آنتی اکسیدانت مانند گلوتاتیون ردوکتاز، گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز سبب کاهش رادیکال های آزاد یا ROS می شود و همچنین مولکول های مخالف تنش اکسیداتیو را افزایش می دهد. برخی از اثرات ملاتونین از طریق غشا میانجی گری می شود و احتمالاً گیرنده های غشایی و هسته ای در تسهیل اثرات آنتی اکسیدانتی ملاتونین درگیر می باشند بطوری که ملاتونین به راحتی از غشاهای بیولوژیک وارد سلول شده و تاثیر می گذارد (۱۲). پیشنهاد شده است که بافت های حساس مانند تخمدان، بیضه، مغز استخوان و لوله های گوارشی که در معرض تنش های اکسیداتیو قرار دارند می توانند به سرعت ملاتونین تولید نمایند (۱۳).

با تفاسیر به عمل آمده می توان انتظار داشت که ملاتونین هنگام تنش اکسیداتیو، اووسیت را از گامه ای بلوغ تا تبدیل شدن آن به رویان قابل انتقال، از تنش اکسیداتیو حفظ نموده و قابلیت رشد و نمو آن را بهبود بخشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر غلظت های مختلف ملاتونین در کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از هیدروژن پراکسید بر بلوغ هسته ای اووسیت های نابالغ گوسفند بود.

مواد و روش ها

به منظور تهیه اووسیت های گوسفندی، تخمدان ها بلافاصله پس از کشتار از لاشه دام جدا و در درون فلاسک حاوی سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد نرمال به همراه ۱۰۰ واحد بین المللی پنی سیلین و ۱۰۰ واحد بین المللی استرپتومایسین در هر میلی لیتر و در دمای ۳۴-۳۰ درجه سانتی گراد در مدت کمتر از یک ساعت به آزمایشگاه منتقل شد. کمپلکس های کومولوس-اووسیت (Cumulus - Oocyte Complexes) با روش اسپیره کردن از فولیکول های آنترال با قطر ۶-۲ میلی متر با استفاده از سوزن ۲۰ گرم که به دستگاه مکش متصل بود انجام شد. سپس COC ها در محیط کشت H-TCM199+۱۰ درصد FBS، ۵۰ میکرو لیتر هپارین، ۱۰۰ واحد بین المللی در میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ واحد بین المللی در میلی لیتر استرپتومایسین بود جمع آوری شد. پس از ارزیابی، فقط COC هایی که دارای سیتوپلاسم یکنواخت با سلول های پوشیده از کومولوس بود انتخاب شد و پس از ۴ بار

عوامل مختلفی در محیط کشت مانند تعادل تغذیه ای و هورمونی و همچنین تنش های متنوع مثل اکسیداتیو، گرما و ... در بلوغ آزمایشگاهی تخمک اثرگذار می باشند (۱). کشت تخمک در محیط آزمایشگاهی به دلیل تغییر در شرایط رشد مانند افزایش نور، اکسیژن، غلظت بالای متابولیت ها و سوبستراها سبب افزایش تولید رادیکال های آزاد در طول مدت زمان متابولیسم هوازی تخمک می شوند و در نتیجه تنش اکسیداتیو افزایش می یابد. رادیکال های آزاد، اتم ها یا مولکول هایی هستند که به سبب دارا بودن یک یا چند الکترون جفت نشده، از فعالیت زیادی برخوردارند و به دلیل داشتن تک الکترون، هنگام گردش خون، می توانند به ماکرومولکول های حیاتی مانند لیپیدها، پروتئین ها، DNA جانداران و کربوهیدرات ها متصل شده و آسیب جبران ناپذیری وارد کنند (۲).

ROS (Reactive Oxygen Species) شامل هیدروژن پراکسید، یون اکسیژن و هیدروکسیل رادیکال می باشد (۳) که افزایش غلظت مولکول های ROS در محیط کشت سبب تنش اکسیداتیو شده و به غشای سلول و DNA آسیب زده و از طرفی سبب آپوپتوزیس خواهد شد (۴). رادیکال های آزاد سبب از کارافتادن میتوکندری ها، آسیب DNA و RNA و پروتئین ها می شود (۵). کاهش غلظت مولکول های ROS در محیط کشت جهت بلوغ تخمک ضروری می باشد (۶). سلول های کومولوس با فعالیت آنتی اکسیدانتی خود به کمک گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز سبب خنثی شدن آسیب های ناشی از تنش اکسیداسیون می شوند (۷).

یکی از راه های کاهش تنش اکسیداتیو در محیط کشت آزمایشگاهی بلوغ تخمک، استفاده از آنتی اکسیدانت ها می باشد. ملاتونین، مهم ترین هورمون غده صنوبری، در ابتدا به عنوان هورمون موثر در فیزیولوژی تولید مثل، در حیوان هایی که تولید مثل فصلی داشتند شناسایی شد. اخیراً گزارش شده است که ملاتونین بطور مستقیم رادیکال های آزاد را از بین می برد و بطور غیر مستقیم نیز با تحریک آنزیم های آنتی اکسیدانت، در از بین بردن رادیکال های پراکسید هیدروژن دو برابر قوی تر از ویتامین E عمل می کند (۸). ملاتونین در برخی مواقع ممکن است سبب ترمیم برخی از مولکول هایی که اکسیده شده شود (۹). بطور کلی ملاتونین بیوانژژیک سلول را بهبود بخشیده، مکانیسم های ترمیم کننده ژنوم میتوکندری را فعال کرده و تولید ATP را

نتایج

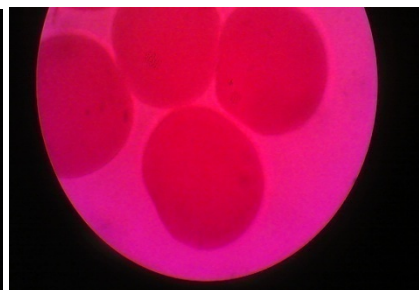
اثر تنش اکسیداتیو و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بلوغ هسته‌ای اووسیت‌های نابالغ گوسفند، پس از ۲۷ ساعت کشت در جدول و شکل ۱ نشان داده شده است. در این مطالعه ۴۴۷ تخمک نابالغ و سالم از تخمدان‌های کشتارگاهی گوسفندان جمع آوری گردید و در سه گروه آزمایشی و گروه شاهد ارزیابی شدند. در گروه شاهد از ۱۳۹ تخمک نابالغ که به مدت ۲۷ ساعت در انکوباتور کشت شد ۹۸/۵۷ درصد از تخمک‌های نابالغ از سرگیری تقسیم میوز مشاهده شد. در حالیکه در ۱/۴۳ درصد تخمک‌ها، پس از کشت هیچگونه علائمی از آغاز میوز رویت نشد که از نظر آماری نسبت به گروه‌های آزمایشی یک، دو و سه دارای اختلاف معنی‌داری بود ($P < 0.05$). از بین این میزان ۶/۴۷ درصد هسته شکسته شده بود (GVBD) و ۷/۱۹ درصد در مرحله بین بلوغ و هسته شکسته‌ها قرار داشت و ۸۴/۹ درصد تخمک‌ها تا مرحله متافاز ۲ پیشرفته و به مرحله بلوغ رسیده بودند.

شستشو در محیط بدون هیپن، در قطره‌های ۵۰ میکرولیتری از محیط کشت بلوغ در گروه‌های ۱۰-۸ تایی قرار داده شد و روی آن‌ها با روغن معدنی پوشانده شد. سپس درون انکوباتوری که دمای آن ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد بوده و دارای ۵ درصد گاز کربنیک و هوای بسیار مرطوب بود به مدت ۲۷ ساعت بالغ شدند. محیط بلوغ آزمایشگاهی TCM199+۱۰ درصد FBS، ۵ میکرو گرم در میلی لیتر FSH، ۰/۰۱ واحد بین المللی در میلی لیتر LH، ۱۰۰ واحد بین المللی در میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ واحد بین المللی در میلی لیتر استرپتومایسین بود. گروه‌های آزمایشی نیز به این صورت بود: گروه ۱: تنش اکسیداتیو (H_2O_2 ، ۳۰۰ میکرومولار)، گروه ۲: تنش اکسیداتیو + ۱ میکرومولار ملاتونین، گروه ۳: تنش اکسیداتیو + ۱۰ میکرومولار ملاتونین، گروه ۴: کنترل.

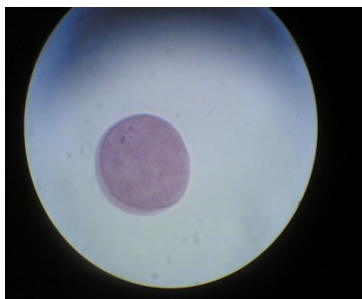
برای ارزیابی مرحله بلوغ هسته‌ای، بعد از بلوغ، اووسیت‌ها با اسید استیک و اتانول به نسبت ۱ به ۳ بر روی اسلاید فیکس و با اورسئین ۱ درصد رنگ آمیزی شد و سپس برای ارزیابی کروموزم‌های متافاز میوز-۲، از میکروسکوپ اینورت با بزرگ نمایی X ۴۰۰ استفاده شد. داده‌های بدست آمده پس از ارزیابی بلوغ هسته‌ای، با آزمون کای اسکوار و با استفاده از رویه GENMOD در برنامه SAS ۹/۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.



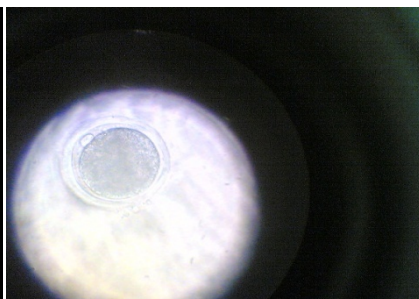
GV



GVBD



Intermediate



مرحله متافاز ۲

شکل ۱: GV مرحله ایست که پس از طی مدت زمان کشت هیچگونه تغییری در هسته آن دیده نمی شود. مرحله GVBD که در این حالت غشای اطراف هسته شکسته شده است ولی به مرحله بلوغ نهایی نرسیده است. Intermediate مرحله ای است مابین هسته شکسته و بلوغ کامل و مرحله متافاز دو زمانی است که بلوغ اووسیت رخ داده و جسم قطبی در آن قابل مشاهده است.

جدول ۱: اثر تنش اکسیداتیو و غلظت های مختلف ملاتونین بر بلوغ هسته ای اووسیت های نابالغ گوسفند، پس از ۲۷ ساعت کشت

گروه‌ها	اووسیت نابالغ	H ₂ O ₂ (میکرو مولار)	ملاتونین (میکرو مولار)	GV	GVBD	Intermediate	M-II
شاهد	۱۳۹	۰	۰	۲(۱/۴۳±۰/۷۱) ^a	۹(۶/۴۷±۰/۳۴) ^a	۱۰(۷/۱۹±۰/۳۳) ^a	۱۱۸(۸۴/۹±۰/۲۴) ^a
تیمار ۱	۱۰۲	۳۰۰	۰	۵۵(۵۳/۹۴±۰/۲) ^c	۲۰(۱۹/۶±۰/۲۵) ^b	۱۲(۱۱/۷۶±۰/۲۱) ^a	۱۵(۱۴/۷±۰/۲۸) ^c
تیمار ۲	۹۷	۳۰۰	۱	۶(۶/۲±۰/۴۲) ^{ab}	۹(۹/۲۷±۰/۳۵) ^a	۴۰(۴۱/۲۴±۰/۲۱) ^b	۴۲(۴۳/۲۹±۰/۲) ^b
تیمار ۳	۱۰۹	۳۰۰	۱۰	۷(۶/۴۲±۰/۳۹) ^b	۱۱(۱۰/۰۹±۰/۳۲) ^{ab}	۳۲(۲۹/۳۶±۰/۲۱) ^b	۵۹(۵۴/۱۲±۰/۱۹) ^b

c,b,a: اختلاف معنی داری بین تیمارها را در هر ستون در سطح ۵ درصد ($\alpha=0/05$) نشان می‌دهد. GV: اووسیت‌هایی که در مرحله کیسه‌ی زاینده هستند. GVBD: اووسیت‌هایی که در مرحله‌ی ناپدید شدن کیسه‌ی زاینده هستند. Intermediate: اووسیت‌هایی که در مرحله‌ی بین GVBD و M-II مانده‌اند و M-II: اووسیت‌هایی که در مرحله‌ی متافاز-۲ قرار دارند. نتایج به صورت Means±S.E در داخل پرانتز گزارش شده است.

تیمارهای یک و گروه شاهد دارای اختلاف معنی داری بود ($P<0/05$) و با تیمار دو دارای اختلاف معنی داری نداشت.

تنش اکسیداتیو پس از ۲۷ ساعت کشت، بلوغ هسته‌ای اووسیت‌های گوسفند را بطور معنی داری ($P<0/05$) نسبت به گروه کنترل کاهش داد (۱۴/۷ در مقابل ۸۴/۹). غلظت ملاتونین در سطوح ۱ و ۱۰ میکرومولار توانست هنگام تنش اکسیداتیو بلوغ میوزی اووسیت‌های گوسفندی را بطور معنی داری بهبود بخشد (به ترتیب ۱۴/۷ در مقابل ۴۳/۲۹ و ۵۴/۱۲) و میزان اووسیت‌هایی را که به مرحله متافاز-۲ می‌رسند را افزایش دهد ($P<0/05$). اما با افزایش غلظت ملاتونین از ۱ به ۱۰ میکرو مولار میزان بلوغ اووسیت تغییر نیافت. علی‌رغم پیشرفت‌های زیاد در تکنولوژی تولید مثلی، کاهش کیفیت اووسیت به عنوان یک مشکل در ناباروری حیوانات ماده باقی مانده است.

بحث

ROS بویژه H₂O₂، در طول فرایند تخمک‌ریزی در داخل فولیکول تولید می‌شود. استفاده از پراکسید هیدروژن به میزان ۱۰۰ میکرو مولار، موجب مرگ سلولی اووسیت‌های همستر و تخمک موش در محیط کشت *in vitro* شد (۱۴ و ۱۵). غلظت داخل فولیکولی ملاتونین در فولیکول‌های بالغ نسبت به فولیکول‌های کوچک‌ترزی شده بیشتر است که در فولیکول‌های پیش از تخمک‌ریزی تقریباً ۳ برابر بیشتر از سطح سرمی آن است. ملاتونین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت نقش اساسی در حمایت از اووسیت در مقابل ROS دارد. ملاتونین آسیب DNA و پروتئین میتوکندری‌ها را کاهش می‌دهد و فعالیت زنجیره انتقال الکترون را بهبود می‌بخشد. ملاتونین

میزان بلوغ در گروه شاهد نسبت به تیمارهای یک، دو و سه از نظر آماری دارای اختلاف معنی داری می‌باشد ($P<0/05$).

در گروه آزمایشی اول ۱۰۲ تخمک نارس سالم کشت شد که پس از گذشت ۲۷ ساعت در ۵۳/۹۴ درصد از تخمک‌ها هیچ تغییری مشاهده نشد و از سرگیری میوز در ۴۶/۰۶ درصد از تخمک‌های نابالغ رویت گردید که ۱۹/۶ درصد آنها هسته شکسته بود و ۱۱/۷۶ درصد در مرحله بین هسته شکسته و بالغ (مرحله میانی) متوقف شده بودند همچنین ۱۴/۷ درصد به مرحله متافاز ۲ رسیده و بالغ شده بودند که از نظر آماری با تیمارهای دو، سه و گروه شاهد دارای اختلاف معنی داری بود ($P<0/05$).

در گروه آزمایشی دوم از ۹۷ تخمک نارس سالم کشت شده، پس از گذشت ۲۷ ساعت ۶/۲ درصد در مرحله نابالغ متوقف شده بودند و از سرگیری میوز در ۹۳/۰۸ درصد از تخمک‌های نابالغ رویت گردید که ۹/۲۷ درصد آنها هسته شکسته بود و ۴۱/۲۴ درصد در مرحله بین هسته شکسته و بالغ متوقف شده بودند. همچنین ۴۳/۲۹ درصد به مرحله متافاز ۲ رسیده و بالغ شده بودند که از نظر آماری با تیمارهای یک و گروه شاهد دارای اختلاف معنی داری بود ($P<0/05$) و با تیمار سه دارای اختلاف معنی داری نداشت.

در گروه آزمایشی سوم ۱۰۹ تخمک نارس سالم کشت شد. پس از گذشت ۲۷ ساعت ۶/۴۲ درصد در مرحله نابالغ متوقف شده بودند و از سرگیری میوز در ۹۳/۵۸ درصد از تخمک‌های نابالغ رویت گردید که ۱۰/۰۹ درصد آنها هسته شکسته بود و ۲۹/۳۶ درصد در مرحله میانی متوقف شده بودند همچنین ۵۴/۱۲ درصد به مرحله متافاز ۲ رسیده و بالغ شده که از نظر آماری با

نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار محیط کشت با ملاتونین میزان بلوغ را در مقایسه با گروه شاهد افزایش می‌دهد که با نتایج وازکوز و همکاران (۲۲) تاثیر مثبت ملاتونین بر بلوغ تخمک‌های گوسفند را گزارش نمودند مطابقت می‌نماید.

نتیجه گیری

بطور کلی این پژوهش نشان داد که تنش اکسیداتیو سبب اثرات سمی در بلوغ آزمایشگاهی اووسیت شده و جنبه ممانعت کنندگی در بلوغ اووسیت دارد. از طرفی ملاتونین بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌های نابالغ گوسفند را هنگام تنش اکسیداتیو بهبود می‌بخشد. بهبود بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌های گوسفند هنگام تنش اکسیداتیو در این پژوهش را شاید بتوان به اثرات مفید و چندگانه ملاتونین ارتباط داد.

منابع

1. Abdelahi M, Salehnia A, Allameh A, Davoodi D. Sodium selenite improves the in vitro follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxidase Activity. *Human Reproduction*. 2010; 25(4): 977-985.
2. Hallwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys*. 1990; 280,1-3.
3. Jung-Taek K, Ok-Jae K, Dae-Kee K, Hee-Jung P, et al. Effects of melatonin on in vitro maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. *J. Pineal Res*. 2009; 46: 22-28.
4. Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AA, et al. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril* 2004; 82: 593-600.
5. Peter CKL, Adashi Ey, *The Ovary* Second Edition Elsevier Inc. 2004; 113-130.
6. Morado SA, Cetica PD, Beconi MT, Dalvit GC. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. *Reprod Fertil Dev*. 2009; 21: 608-614.
7. Combelles CM, Gupta S, Agarwal A. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? *Reprod Biomed Online*. 2009; 18: 864-880.
8. Pieri C, Marra M, Moroni R, Recchioni. M, et al. Melatonin: a peroxy radical Scavenger More effective than vitamin E. *Life Sci*. 1994; 55: 271-276.

ممکن است بطور مستقیم از آسیب به میتوکندری در اووسیت جلوگیری کند که منجر به بهبود کیفیت اووسیت می‌شود (۱۶). نتایج این مطالعه اثرات مضر H_2O_2 را روی بلوغ اووسیت گوسفند تایید کرد و ملاتونین اثرات مضر H_2O_2 را خنثی می‌کند که با یافته‌های تامورا و همکارانش (۱۶) مطابقت داشت.

تخمک بالغ پستانداران در مرحله متافاز II آزاد می‌شود 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 ۱ و ۱۰ میکرومولار بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز را در تخمک‌های نارس 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.

ملاتونین نقش مهمی را در حفاظت سلول از آسیب اکسیداتیو دارد که بواسطه افزایش آنزیم‌های مانند گلوکاتایون ردوکتاز، گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز، میزان رادیکال‌های آزاد یا ROS را کاهش می‌دهد.

احتمالاً ملاتونین از عوامل کلیدی موثر در کاهش پراکسیدهای داخل سلولی است. در این مطالعه نیز مشخص شد که اضافه کردن ملاتونین به عنوان یک آنتی اکسیدانت 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 کاهش یافت.

ملاتونین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و آنزیم‌های سطوح سلولی تاثیر می‌گذارد از طرفی ممکن است ملاتونین با تاثیر مستقیم از وارد شدن آسیب به میتوکندری تخمک‌ها ممانعت نماید و سبب افزایش کیفیت تخمک گردد (۱۷) که از اثرات ضد آپوپتوزی ملاتونین بر انواع سلول‌های مختلف ناشی می‌شود (۱۸ و ۱۹).

برخی مطالعات نشان داده‌اند که ملاتونین نرخ زنده مانی جنین و میزان باروری آزمایشگاهی را افزایش دهد (۲۰). ملاتونین، فعالیت تخمدان و فولیکول سازی را توسعه می‌دهد (۲۱) متابولیت‌های ملاتونین، رادیکال‌های آزاد را حذف می‌کنند و در افزایش تولید برخی از آنزیم آنتی اکسیدانتی نقش فراوانی ایفا می‌نماید (۲۲).

9. Luther JS, Redmer DA, Reynolds LP, Choi JT, et al. Ovarian follicular development and oocyte quality in anestrous ewes treated with melatonin, a Controlled Internal Drug Release (CIDR) device and follicle stimulating hormone. *Theriogenology*. 2005; 63(8): 2136-46.
10. Malgorzata K, Reiter RJ. Effect of melatonin in protection against cellular damage caused by Ionizing radiation. *P.S.E.B.M.* 2000; 225: 9-22.
11. Reiter RJ. Melatonin and human reproduction. *Ann Med*. 1998; 30:103-108.
12. Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2003; 17: 273-285.
13. Russel J, Reiter SD, Paredest A, Ahmet K, et al. Melatonin combats molecular terrorism at the mitochondrial level *Interdisc Toxicol*. 2008; 1(2): 137-149.
14. Bladier C, Wolvetang EJ, Huchinson P, de Hann JB, et al. Response of a primary human fibroblast cell line to H₂O₂: Senescence-like growth arrest or apoptosis? *Cell Growth Differ*. 1997; 8: 589-598.
15. Chan PJ, Calinisan JH, Corselli JU, Patton WC, et al. Updating quality control assays in the assisted reproductive technologies laboratory with a cryopreserved hamster oocyte DNA cytogenotoxicity assay. *J. Assi Rep and Gen*. 2001; 18: 129-134.
16. Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J. Pineal Res*. 2007; 44: 280-287.
17. Hiroshi T, Akihisa T, Ichiro M. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res*. 2008; 44(3): 280-343.
18. Ju JC, Jiang S, Tseng JK, Parks JE, et al. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology*. 2005; 64: 1677-1689.
19. Juknat AA, Mendez Mdel V, Quagliano A, Fameli CI. Melatonin prevents hydrogen peroxide-induced Bax expression in cultured rat astrocytes. *J Pineal Res*. 2005; 38(2): 84-92.
20. Valasi F, Tsiligianni T, Papanikolaou T, Dimitriadis I, et al. Melatonin improves the developmental competence of sheep oocytes. *Reprod Domest Anim*. 2006; 41:341.
21. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, et al. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res*. 2007; 42(1): 28-42.
22. Vazquez MI, Abecia JA, Forcada F, Casao A. Effects of exogenous melatonin on in vivo embryo viability and oocyte competence of undernourished ewes after weaning during the seasonal anestrous. *Theriogenology*. 2010; 74(4): 618-26.

Effect of H₂O₂ and Melatonin on *In vitro* Oocyte Maturation

Biabani K¹, Zare Shahneh A¹, Kohram H¹, Khodaei Motlagh M^{2*}

1. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture University of Tehran, Tehran, Iran

2. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Arak University, Arak 38156-8-8349. Iran

* Email corresponding author: m-motlagh@araku.ac.ir

Received: 18 Dec. 2011

Accepted: 24 Feb. 2012

Abstract

Aim: The aim of this study was to determine the effect of stress oxidative (H₂O₂) and different concentrations of melatonin on nuclear maturation of immature oocytes in sheep.

Material and Methods: Ovary collection and oocyte recovery was carried out by standard method. Oocytes culture was in the following conditions: A: TCM199+10% FBS, 5µg/ml FSH, 0.01IU/ml LH, 100 IU/ml penicillin and 100 IU/ml streptomycin, B: A + H₂O₂ (300 µM) at 38/5 C°, C: B + 1 µM melatonin and D: B + 10µM melatonin.

Results: This study showed that H₂O₂ significantly (P<0.05) decreases nuclear maturation in compare to control (14.7 vs. 84.9). 0, 1 and 10 µM melatonin could improve oocytes to reach to metaphase-II stage (respectively 14.7 vs. 43.29, 54.12). But increasing melatonin dose from 1 to 10 µM, did not have any significant effect on oocytes maturation.

Conclusion: The results of this study showed that melatonin improves sheep oocytes maturation during oxidative stress.

Keywords: Stress oxidative, Melatonin, Sheep oocyte