DOI: 10.22055/IVJ.2020.223000.2240
DOR: 20.1001.1.17356873.1401.18.4.8.2

اثر عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن زوفایی بر بلوغ آزمایشگاهی اووسیت گوسفند

اسماعیل قبادی[۱]، علی‌اصغر مقدم[۲*]، طیبه محمدی[۳] و پیمان رحیمی‌فیلی[۴]

[۱] دانش آموخته دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
[۲] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
[۳] استادیار گروه علوم پایه و پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
[۴] استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۶ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۱۱

چکیده

بلوغ اووسیت و متعاقباً لقاح آن در آزمایشگاه از نقطه نظر تولید رویان حائز اهمیت زیادی است. با توجه به این که آنتی‌اکسیدان‌ها تخریب کننده‌ی رادیکال‌های آزاد هستند، می‌توانند بلوغ آزمایشگاهی اووسیت و کیفیت جنین را بهبود دهند. بنابراین، هدف از مطالعه‌ی حاضر ارزیابی اثرات عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه آویشن زوفایی روی بلوغ اووسیت گوسفند در آزمایشگاه است. مجموعه‌ی اووسیت-کومولوس استحصال شده از تخمدان میش به مدت ۲۴ ساعت در محیط بلوغ آزمایشگاهی HTCM غنی شده با FSH، LH ، FBS، سیستئامین، پیرووات سدیم و آنتی‌بیوتیک (گروه کنترل) و در محیط بلوغ آزمایشگاهی فوق بدون سیستئامین ولی غنی شده یا غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی آویشن زوفایی (µg/ml ۱: گروه ۱، µg/ml ۱۰: گروه ۲، µg/ml ۵۰: گروه ۳) کشت داده شدند. بلوغ آزمایشگاهی و آغاز مجدد میوز در تمام گروه‌های مورد آزمایش با تعیین میزان گسترش سلول‌های کومولوس و تعداد اووسیت‌های در مرحله متافاز تقسیم میوز II بررسی شدند. نتایج حاصل نشان داد که اووسیت‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ از نظر میزان گسترش کل سلول‌های کومولوس مشابه گروه کنترل بودند در حالی که گروه تیمار شده با غلظت ۱ از این نظر کمتر از گروه کنترل بودند. از نظر بلوغ هسته، گروه تیمار شده با غلظت ۵۰ مشابه گروه کنترل بود در حالی که گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱ و ۱۰ به طور معنی‌دار از گروه کنترل کمتر بودند. نتایج به دست آمده نشان داد که عصاره‌ی آویشن زوفایی به صورت وابسته به مقدار، اثر مثبتی روی بلوغ اووسیت گوسفند دارد. از این رو با افزایش غلظت عصاره میزان بلوغ اووسیت افزایش یافت که می‌تواند به سبب ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در آن باشد.

کلمات کلیدی: بلوغ آزمایشگاهی، اووسیت، گوسفند، آویشن زوفایی

مقدمه

استفاده از فن‌آوری‌های تولید مثل در پرورش دام، سبب افزایش بهره‌وری خواهد شد. در سال‌های اخیر پیشرفت-های زیادی در فن‌آوری‌های تولیدمثل دام رخ داده است و نشخوارکنندگان کوچک مدل خوبی برای توسعه و تکمیل این فن‌آوری‌ها می‌باشند. بلوغ آزمایشگاهی اووسیت، لقاح آزمایشگاهی، شبیه‌سازی، تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم،

*نویسنده مسئول : علی اصغر مقدم، دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
E-mail: moghaddam@razi.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

تولید جنین و انتقال آن به داخل رحم از جمله فن‌آوری‌های رایج در تحقیقات کنونی می‌باشند که موفقیت آن‌ها به میزان موفقیت بلوغ آزمایشگاهی اووسیت بستگی دارد (Wani et al. 1999). بلوغ آزمایشگاهی اووسیت یکی از راه‌های نوین برای به دست آوردن تخمک بالغ است. لزوم بالغ‌سازی تخمک‌ها در محیط آزمایشگاه به منظور کاهش مشکلات ناشی از سوپراوولاسیون در سال‌های اخیر مورد توجه متخصصین لقاح برون‌تنی قرار گرفته است (Hreinsson et al. 2003). تکنولوژی جدید نسبت به تکنیک باروری آزمایشگاهی سنتی که در گذشته انجام می‌شد، مزایای زیادی ازجمله کاهش هزینه‌های مصرف گنادوتروپین‌ها و آنالوگ‌های هورمون‌های آزاد کننده گنادوتروپین‌ها و حذف سندرم تحریک بیش از حد تخمدان را دارد (Jurema and Ogueira 2006). بهبود و افزایش کارایی بلوغ تخمک در آزمایشگاه به طور گسترده‌ای موجب پیشرفت در تکنیک‌های جدید تولید مثل شده است. بلوغ و لقاح برون‌تنی تخمک‌ها، در دام‌ها به منظور افزایش تولید و پیشرفت در تحقیقات علمی پایه، انتقال هسته، حذف ژن‌های معیوب و جایگزینی ژن‌های مطلوب، اضافه کردن ژن‌های مقاوم در برابر بیماری‌های خاص، ایجاد حیوانات تراریخت و ایجاد کلون به کمک مهندسی ژنتیک صورت می‌گیرد (Gordon 2005). از مزایای دیگر آن، تولید جنین ارزان و فراوان است (Nadi et al. 2002).

شرایط کشت اووسیت در طول بلوغ نقش مهمی در میزان و کیفیت تولید جنین بازی می‌کند. محیط‌های کشت اووسیت حاوی مواد شیمیایی، اسیدآمینه‌های مختلف، آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد بیولوژیکی و پروتئینی می‌باشند. تا کنون تغییرات متعددی در محیط کشت اووسیت صورت گرفته است و محققین اثر مواد مختلف را در محیط بلوغ مطالعه نموده‌اند. به نظر می‌رسد تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) و حذف آن‌ها از محیط، فاکتور مهمی در جهت کسب توانایی لقاح آزمایشگاهی باشد. موجودات زنده محافظت‌کننده‌های طبیعی به نام آنتی‌اکسیدان دارند که اثرات منفی رادیکال‌های آزاد اکسیژن را مهار می‌کنند. در طول کشت اووسیت و جنین در آزمایشگاه سطوح آنتی‌اکسیدان‌ها نسبت به داخل بدن پایین‌تر است، زیرا اووسیت‌ها از بدن دهنده جدا شدند و از آنتی‌اکسیدان‌های مادری محروم‌اند. دستکاری تخمک‌ها و جنین‌ها در طول بلوغ آزمایشگاهی و لقاح آزمایشگاهی، خطر مواجه شدن با سطوح بالایی از نمونه‌های فعال ROS را به همراه دارد، به گونه‌ای که آسپیره کردن تخمک، لقاح و کشت جنین در تراکم بالای اکسیژن می‌تواند مقادیر بالاتری از ROS را تولید کند. لذا در این شرایط ممکن است مکانیسم‌های دفاعی اووسیت برای حفاظت از ساختار ظریف آن کافی نباشد. به طوری که مشخص شده است مقادیر بالای ROS در مرحله‌ی تسهیم اولیه‌ی جنین‌های موش در آزمایشگاه در مقایسه با داخل بدن می‌تواند با توقف تکوین اولیه جنین ارتباط داشته باشد (Nasr-Esfahani 1991).

برای حفظ اووسیت‌ها و رویان‌های کشت شده از استرس اکسیداتیو، آنتی‌اکسیدان‌های مختلفی را به محیط کشت اضافه می‌کنند (Sovernigo et al. 2017). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که عصاره‌های گیاهی دارای اثرات آنتی‌اکسیداتیو در محیط آزمایشگاه هستند و اضافه کردن عصاره‌ی برخی گیاهان باعث بهبود بلوغ آزمایشگاهی اووسیت می‌شود (Alpinar et al. 2009).

آویشن زوفایی از خانواده‌ی نعناعیان Labiaceae با نام علمی *Thymbra spicata L.* و نام محلی ازبوئه (هزوه) از گیاهان بومی خودرو غرب ایران و نواحی جنوب شرقی آنتالیا و نواحی مدیترانه‌ای است. از زمان‌های قدیم استفاده از این گیاه به عنوان ضدعفونی کننده دستگاه تنفس، تونیک، برطرف کننده اسپاسم‌های عضلانی، خلط‌آور، دفع کننده انگل‌ها و اشتهاآور در بین مردم معمول بوده است (Ghasemipirbalouti et al. 2009, Akin et al. 2010). این گیاه منبعی غنی از فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و ایزوپرنوئیدها همچون تیمول و کارواکرول است (Wojdyto 2007). تحقیقات نشان داده است که گیاهان خانواده‌ی نعناعیان حاوی مقادیر زیادی آنتی‌اکسیدان و ترکیبات فنولی هستند (Menne et al. 2004). به طوری که

اثر ضدسرطانی گیاه آویشن زوفایی را ناشی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در آن دانسته‌اند (Sabzali et al. 2014). از این رو هدف مطالعه‌ی حاضر، بررسی اثر عصاره‌ی هیدروالکلی این گیاه روی بلوغ اووسیت گوسفند در آزمایشگاه می‌باشد.

مواد و روش کار

مطالعه‌ی حاضر از نوع تجربی بوده و طی مراحل زیر انجام گرفت.

عصاره‌گیری

عصاره‌گیری به روش خیساندن (قرار دادن مواد گیاهی درشت یا پودر **در** یک ظرف سربسته همراه با حلال **در** دمای اتاق برای بازه زمانی حداقلی سه روز همراه با هم زدن منظم) انجام شد و در نهایت، عصاره‌ی خشک شده تا زمان استفاده درون یخچال نگهداری شد. روزانه در زمان تیمار، هر کدام از غلظت‌های مورد نیاز (۱، ۱۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از استوک عصاره تهیه می‌شد.

آماده سازی محیط‌های استخراج، شستشو و بلوغ اووسیت

محیط‌های استخراج، شستشو و بلوغ به صورت روزانه آماده می‌شد. محیط‌های شستشو و بلوغ، قطره‌گذاری می‌شدند و توسط لایه‌ای از روغن معدنی پوشانده می‌شدند و در شرایط دمای ۳۸/۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۹۰ درصدرطوبت و ۵ درصد دی‌اکسید کربن حداقل به مدت ۲ ساعت قبل از کشت اووسیت‌ها انکوبه می‌شدند.

جمع آوری نمونه‌های تخمدان

با مراجعه‌ی روزانه به کشتارگاه صنعتی بیستون، بلافاصله پس از ذبح گوسفندان و باز شدن محوطه‌ی شکمی آن‌ها، تخمدان‌ها با دقت جدا و در محلول سرم فیزیولوژی حاوی آنتی‌بیوتیک نگهداری و در مدت کمتر از ۲ ساعت به آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی منتقل می‌شدند.

جمع‌آوری اووسیت‌ها از تخمدان

در آزمایشگاه، تخمدان‌ها شسته شدند. مجموعه اووسیت وکومولوس‌ها (COCs) از فولیکول‌های تخمدانی با قطر ۷-۳ میلی‌متر، استخراج شدند واووسیت‌هایی که دارای حداقل ۳ لایه کامل از سلول‌های کومولوس بودند و سیتوپلاسم همگن داشتند انتخاب (Figure 1) و پس از چند بار شستشو در قطرات محیط HTCM حاوی ۱۰ درصد FBS در قطرات محیط بلوغ مربوط به گروه‌های مورد مطالعه به شرح ذیل کشت و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند.

۱- گروه کنترل: محیط بلوغ معمول (TCM) آماده و به صورت قطرات ۵۰ میکرولیتری قطره‌گذاری شد.

۲- گروه تیمار ۱: به جای سیستئامین، عصاره‌ی آویشن زوفایی با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر به محیط بلوغ معمول اضافه و به صورت قطرات ۵۰ میکرولیتری قطره-گذاری شد.

۳- گروه تیمار ۲: به جای سیستئامین، عصاره‌ی آویشن زوفایی با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به محیط بلوغ اضافه و به صورت قطرات ۵۰ میکرولیتری قطره‌گذاری شد.

۴- گروه تیمار ۳: به جای سیستئامین، عصاره‌ی آویشن زوفایی با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به محیط بلوغ اضافه و به صورت قطرات ۵۰ میکرولیتری قطره‌گذاری شد.

پس از ۲۴ ساعت، وضعیت گسترش سلول‌های کومولوس همراه اووسیت ارزیابی شد. بر اساس میزان گسترش سلول‌های کومولوس، اووسیت‌ها به سه درجه‌ی ۱ ، ۲ و ۳ تقسیم شدند و تعداد اووسیت‌های هر درجه شمارش و ثبت گردید. همچنین، از اووسیت‌ها عکسبرداری صورت گرفت.

رنگ‌آمیزی اووسیت‌ها

به منظور تعیین وضعیت بلوغ هسته اووسیت‌ها، ابتدا سلول‌های کومولوس از اووسیت جدا شدند و به قطرات محیط HTCM منتقل و شسته شدند. سپس به محلول فیکساتیو منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند تا تثبیت شوند. اووسیت‌های تثبیت شده توسط رنگ استواورسئین ۱ درصد رنگ‌آمیزی شدند و توسط میکروسکوپ نوری معمولی (Olympus) مشاهده، بررسی و عکس‌برداری شدند. در تصاویر ثبت شده، وضعیت بلوغ هسته‌ای اووسیت‌ها بررسی شد و اووسیت‌ها بر اساس مراحل تقسیم میوز II شمارش و دسته‌بندی شدند. در این آزمایش برای هر یک از گروه‌های کنترل و گروه‌های تیمار یافته با غلظت‌های ۱ و ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۵ تکرار و برای هر گروه ۲۵ اووسیت عکس‌برداری شد.

صفات کمی مورد بررسی در این مطالعه، درصد گسترش سلول‌های کومولوس همراه اووسیت و درصد مراحل تقسیم میوز بود. برای هر صفت، شمارش اووسیت‌ها انجام گرفت و به درصد تبدیل شد و با کمک برنامه‌ی آماری SPSS برای هر گروه به صورت میانگین Mean ± SEM ارائه شدند. سپس با کمک آزمون آماری One Way ANOVA و پس آزمون LSD مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. اختلاف داده‌ها در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه، عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه آویشن زوفایی در غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به محیط بلوغ اووسیت‌ها اضافه شد تا اثر آن روی وضعیت بلوغ اووسیت‌ها مورد بررسی قرار گیرد. بدین صورت که ۲۴ ساعت بعد از کشت اووسیت‌ها در محیط بلوغ در گروه-های مورد مطالعه، ابتدا درصد گسترش سلول‌های کومولوس اطراف اووسیت مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های کومولوس در اووسیت‌های نابالغ به صورت فشرده و متراکم آرایش یافته‌اند در حالی که در اووسیت‌های بالغ از حالت فشرده خارج شدند و به صورت گسترش یافته در آمده‌اند (Figure 1).

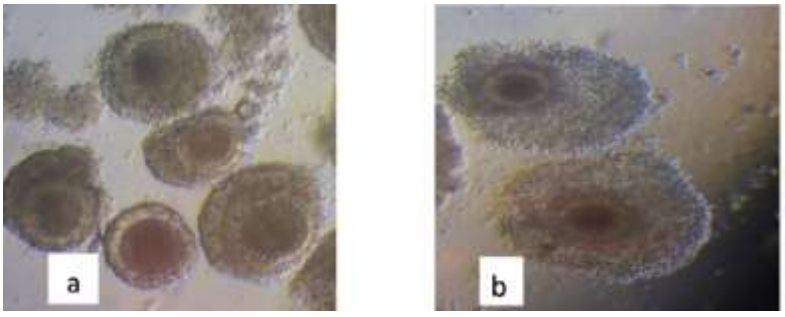

Figure 1. Cumulus cells expansion in (a) immature & (b) mature oocytes (20×).

همان گونه که در Teble 1 نشان داده شده است، میانگین درصد گسترش درجه ۱ سلول‌های کومولوس در گروه‌های تیمار ۱ و ۲ به ترتیب (۴۷/۸۲±۰/۹۷) و (۵۰/۵۷±۱/۳۶) بود که در مقایسه با گروه کنترل (۶۲/۱۴±۱/۰۹) کاهش یافت (P<۰/۰۵)، اما در گروه تیمار ۳ (۵۹/۳۲±۱/۹۰) درصد بود که با گروه کنترل فاقد تفاوت معنی‌دار بود (P>۰/۰۵). علاوه بر این، این شاخص در گروه تیمار ۳ بیشتر از گروه‌های تیمار ۱ و ۲ بود (P<۰/۰۵). درصد گسترش درجه ۲ سلول‌های کومولوس در گروه تیمار ۲ (۳۶/۷۸±۱/۸۴) بود که بیشتر از سایر گروه‌ها بود (P<۰/۰۵). این شاخص در گروه‌های تیمار ۱ و ۳ به ترتیب (۲۷/۹۲±۰/۹۱) و (۲۹/۸۳±۰/۵۳) درصد بود که با گروه کنترل فاقد تفاوت معنی‌دار بود (P>۰/۰۵).

درصد گسترش درجه ۳ سلول‌های کومولوس در گروه تیمار ۱ (۰/۹۱ ± ۲۴/۴۴) بود که بیشتر از سایر گروه‌ها بود (P<۰/۰۵). این شاخص در گروه‌های تیمار ۲ و ۳ به ترتیب (۱/۲۳±۱۲/۶۵) و (۲/۲۴±۱۰/۸۴) درصد بود که با گروه کنترل فاقد تفاوت معنی‌دار بود (P>۰/۰۵).

Teble 1. Effect of different concentrations of *Thymbra spicata* extract on expansion degree of cumulus cells 24 hours after culture in maturation medium

Parameter Treatment group	Total number of Oocytes	Degree 1expansion no. of oocytes(%) (Mean ±SEM)	Degree 2expansion no. of oocytes(%) (Mean ±SEM)	Degree 3expansion no. of oocytes(%) (Mean ±SEM)
Control	101	63 (62.14±1.09)	31 (30.84±1.41)	7 (7.35±2.25)
T1(1µg/ml)	107	51 (47.82±0.97)	30 (27.92±0.91)	26 (24.44±0.91)
T2 (10µg/ml)	103	52 (50.57±1.36)	38 (36.78±1.84)	13 (12.65±1.23)
T3 (50µg/ml)	104	62 (59.32±1.90)	31 (29.83±0.53)	11 (10.84±2.24)

Values in columns with different superscripts (a, b) differ significantly (p < 0.05).

بر اساس Figure 2، درصد گسترش درجه کل سلول‌های کومولوس در گروه تیمار ۱ نسبت به سایر گروه‌ها کاهش یافته بود (P<۰/۰۵). ولی بین سایر گروه‌ها تفاوت معنی-داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

اووسیت‌های بالغ رنگ‌آمیزی شده توسط استواورسئین برای تعیین وضعیت بلوغ هسته‌ای مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند تا مراحل تقسیم میوز شامل GV، GVBD، آنافاز I و متافاز II در آن‌ها تعیین شود (Figure 3).

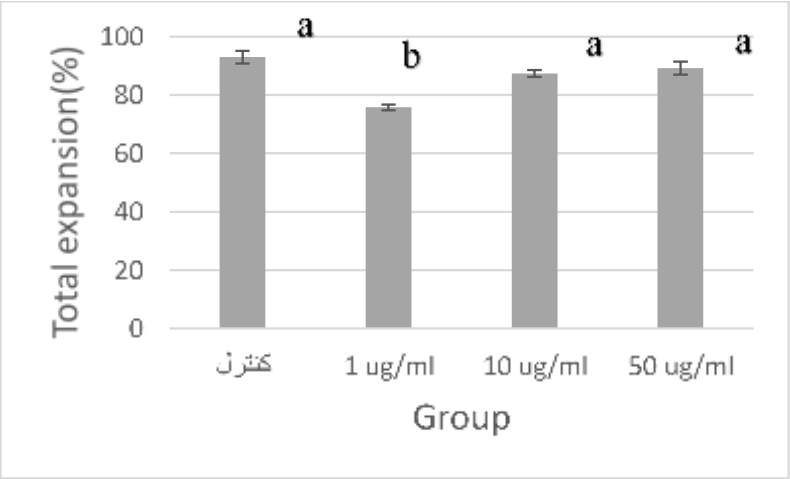

Figure 2. Effect of different concentrations of *Thymbra spicata* extract on total expansion percent of cumulus cells 24 hours after culture in maturation medium.
Values in columns with different superscripts (a, b) differ significantly (p< 0.05).

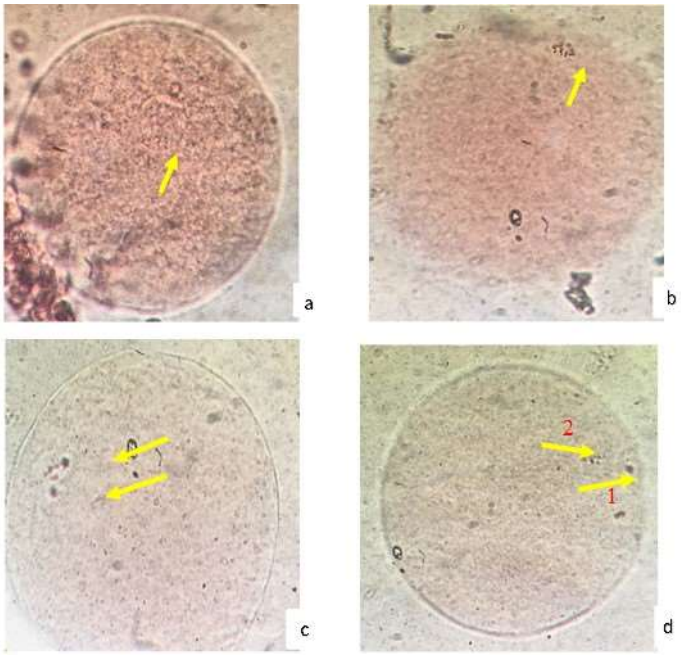

Figure 3. Chromosomal status of oocyte nucleous in different phases of meiosis division (Aceto-orcein staining, 40×). (a) GV,(B) GVBD, (C) Anaphase I, (d) Metaphase II.(1st polar body(1) , secondary oocyte chromosomes in metaphase II (2)).

بر اساس نتایج ارائه شده در Table 2، درصد اووسیت-هایی که توانسته بودند تا مرحله متافاز II پیشرفت کنند در گروه‌های تیمار ۲ و ۳ مشابه گروه کنترل بود (P<۰/۰۵) اما درصد آن‌ها در گروه تیمار ۱ از گروه کنترل کمتر بود (P<۰/۰۵). بین گروه‌های تیمار ۱ و ۲ از این نظر تفاوتی مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

Table 2. Effect of different concentrations of *Thymbria spicata* extract on percent of oocytes in different phases of meiosis24 hours after culture in maturation medium.

Parameter Treatment group	Total number of Oocytes	No. of GV oocytes (%)	No. of GVBD oocytes (%)	No. of AnaI oocytes (%)	No. of MII oocytes (%)	No. of deg. oocytes (%)
Control	25	2 (8 ±4.89)^{a}	1 (4 ±4) ^{a}	0 (0)^{a}	21 (84 ±7.48)^{a}	1 (4 ±4) ^{a}
T1(1µg/ml)	25	3 (12 ±4.89) ^{a}	1 (4 ±4) ^{a}	0 (0)^{a}	15 (60 ±6.32)^{b}	6 (24 ±4)^{b}
T2 (10µg/ml)	25	1 (4 ±4) ^{a}	1 (4 ±4) ^{a}	1 (4 ±4) ^{a}	19 (76 ±4)^{ab}	3 (12 ±4.89)^{ab}
T3 (50µg/ml)	25	2 (8 ±4.89) ^{a}	1 (4 ±4) ^{a}	0 (0)^{a}	20 (80 ±6.32)^{a}	2 (8 ±4.89) ^{a}

Values in columns with different superscripts (a, b) differ significantly (p < 0.05).GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown; M-I, metaphase-I; M-II, metaphase-II.

بحث

بلوغ اووسیت برای تولید موفقیت‌آمیز جنین در آزمایشگاه ضروری است (Zhu et al. 2008) و تا کنون مطالعات زیادی با هدف بهبود کیفی این فرایند انجام شده است (Lee et al. 2014). در مطالعه‌ی حاضر، اثر عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه آویشن زوفایی روی بلوغ اووسیت گوسفند در آزمایشگاه بررسی شد. در این مطالعه، گسترش

سلول‌های کومولوس به عنوان یکی از فاکتورهای مؤثر برای تعیین بلوغ هسته تخمک‌ها در نظر گرفته شد. سلول‌های کومولوس در اثر افزایش ترشح گنادوتروپین‌ها قبل از تخمک‌گذاری پراکندگی پیدا می‌کنند و شکاف‌های اتصالی بین سلول‌های کومولوس مجاور و بین سلول‌های کومولوس و تخمک شکسته می‌شود (Gordon 2003). بررسی نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که بین غلظت‌های استفاده شده عصاره، بیشترین درصد گسترش درجه ۱ مربوط به گروه تیمار ۳ بود که با گروه کنترل فاقد تفاوت معنی‌دار بود و کمترین درصد مربوط به گروه تیمار ۱ بود که به صورت معنی‌داری از گروه کنترل و گروه تیمار ۳ کمتر بود.

مقایسه‌ی درصد گسترش کل (مجموع گسترش درجه ۱ و ۲) بین گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد که بیشترین درصد گسترش کل سلول‌های کومولوس در گروه کنترل مشاهده شد و پس از آن گروه‌های تیمار ۳ و ۲ قرار داشتند که فاقد تفاوت معنی‌دار با آن بودند. در این درجه‌بندی، گسترش کل به عنوان معیار کلی برای تعیین وضعیت بلوغ اووسیت است. احتمال به بلوغ رسیدن اووسیت‌هایی که سلول‌های کومولوس همراه آن‌ها کامل گسترش یافتند (درجه ۱) و یا به میزان متوسط گسترش یافتند (درجه ۲) زیاد است. حال آن که در اووسیت‌هایی که گسترش سلول-های کومولوس کم می‌باشد شانس بالغ بودن کاهش می‌یابد (Son et al. 2017). از این یافته می‌توان چنین استنباط کرد که عصاره‌ی آویشن زوفایی در غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر توانسته است اثر مثبتی روی گسترش سلول‌های کومولوس و در نتیجه بلوغ اووسیت داشته باشد و از این نظر اثر آن با سیستئامین (آنتی‌اکسیدان به کار رفته در گروه کنترل) می‌تواند قابل مقایسه باشد. ولی عصاره با غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر نتوانست گسترش مناسب بلوغ اووسیت را ایجاد کند. چنین به نظر می‌رسد که اثر عصاره وابسته به غلظت باشد به این معنی که با افزایش غلظت اثرگذاری آن بیشتر شده است. سلول‌های کومولوس در طول IVM یا با ترشح فاکتورهایی که شایستگی تکوین را تحریک می‌کنند یا با حذف مهارکننده‌های موجود در محیط بلوغ اووسیت، تکوین اووسیت را افزایش می‌دهند (Hashimoto et al. 1998). علاوه بر این، این سلول‌ها ممکن است در طول بلوغ اووسیت، تنش اکسیداتیو ناشی از متابولیسم فعال اووسیت را در مجاورت آن کاهش دهند. در مطالعه‌ی Hajian و همکاران (۱۳۹۵) غلظت بالای رازیانه (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) باعث مهار توسعه سلول-های کومولوس در اووسیت‌های گاو شد در حالی که در غلظت‌های کمتر، از این نظر اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل مشاهده نشد. همچنین Rajabi و همکاران (۲۰۱۳) نیز نتیجه‌ای مشابه با مطالعه Hajian و همکاران در رابطه با اثر عصاره‌ی شقایق دریایی روی بلوغ اووسیت گوسفند گزارش کردند. Son و همکاران (۲۰۱۷) اثر غلظت‌های صعودی فاکتور رشد فیبروبلاستی ۱۰(FGF-10) را روی بلوغ اووسیت‌های خوک مورد بررسی قرار دادند و اعلام نمودند که این فاکتور توانست به صورت وابسته به غلظت باعث بهبود گسترش سلول‌های کومولوس و بلوغ اووسیت شود.

اووسیت پستانداران در زمان تولد در پروفاز اولین تقسیم میوز متوقف می‌شود ولازم است قبل از لقاح موفق، فرآیند میوز آن‌ها از سر گرفته و تکمیل شود. شایستگی میوزی، توانایی اووسیت‌ها برای شروع دوباره و تکمیل میوز، در طی رشد فولیکولی و اووسیت به دست می‌آید و با یک-سری از تغییرات در هسته و سیتوپلاسم اووسیت همراه می‌شود. بلوغ اووسیت شامل شروع مجدد میوز از مرحله‌ی پروفاز I در اووسیت مرحله‌ی وزیکول زایا تا خروج اولین جسم قطبی و متافاز II است. زمانی که تقسیم میوز از سر گرفته می‌شود، اووسیت متوقف شده در مرحله‌ی وزیکول زایا (GV) به ترتیب دستخوش مراحل GVBD، متافاز I، آنافاز I، تلوفاز I و متافاز II می‌شود. اووسیت در مرحله‌ی متافاز II یک اووسیت بالغ کامل و آماده برای لقاح است (Landim and Maziero 2014). از این رو در مطالعه‌ی حاضر، معیار دیگر برای بلوغ هسته‌ای اووسیت، رسیدن به مرحله‌ی متافاز II بود. بر این اساس، بیشترین درصد

اووسیت‌هایی که به مرحله‌ی متافاز II رسیده بودند به ترتیب مربوط به گروه کنترل، تیمار ۳ و تیمار ۲ بود که تفاوت بین آن‌ها معنی‌دار نبود و در گروه تیمار ۱ کم‌ترین درصد اووسیت‌های مرحله‌ی متافاز II مشاهده شد. این نتیجه نشان می‌دهد که استفاده از غلظت مناسب عصاره برای اثرگذاری بهینه لازم است و نشان دهنده‌ی اثر وابسته به غلظت عصاره است همچنان که khodabandeh و همکاران (۱۳۹۴) اعلام نمودند که عصاره‌ی ریشه‌ی کنگر دارای اثر مثبت وابسته به غلظت روی بلوغ تخمک می‌باشد. در هنگام IVM و کشت جنین‌ها در آزمایشگاه رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید می‌شوند که با دیگر مولکول‌های سیتوپلاسمی واکنش شدید نشان می‌دهند و باعث آسیب سلولی می‌شوند (Uday et al. 1999). سلول‌های پستانداران از جمله تخمک‌ها و رویان‌های اولیه‌ی آن‌ها، چندین سازوکار را برای حفاظت در مقابل گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) و حفظ کردن تعادل مناسب در واکنش‌های ردوکس اتخاذ کرده‌اند (Guerin et al. 2001). با این حال، به نظر می‌رسد که جنین‌ها در آزمایشگاه در معرض فشار اکسیداتیو قرار می‌گیرند و ساز و کارهای دفاعی آن‌ها برای حفاظت از ساختمان‌های سلولی ظریفشان کارایی ندارد. فشار اکسیداتیو باعث قطعه قطعه شدن DNA و موتاسیون می‌شود که توانایی جنین را کاهش می‌دهد. از این رو، با توجه به آسیب‌های وارده به سلول و برای حفاظت تخمک ها، اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌ها به محیط کشت ضروری به نظر می‌رسد (Compoti 1989). نشان داده شده است که افزودن آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند بتا مرکاپتواتانول، سیستئامین، گلوتاتیون و ملاتونین به محیط بلوغ اووسیت اثر مثبتی روی مراحل بعدی تکوین رویان موش دارد (Eimani et al. 2005, Eimani et al. 2006, Salimi et al. 2014). غلظت بهینه‌ی آنتی‌اکسیدان‌ها همانند ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه به حذف رادیکال‌های آزاد کمک می‌کند (Kitagawa et al. 2004).

گیاهان به عنوان منبعی اصلی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مورد توجه هستند (Vijaya et al. 2010). گیاه آویشن زوفایی از خانواده‌ی نعناعیان است و همانند سایر گیاهان این خانواده، منبعی غنی از فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و ایزوپرنوئیدها همچون تیمول و کارواکرول است (Wojdyto 2004). تحقیقات قبلی نشان داده است که گیاهان خانواده‌ی نعناعیان حاوی مقادیر زیادی آنتی‌اکسیدان و ترکیبات فنولی هستند (Menne et al. 2004). به طوری که اثر ضد سرطانی گیاه آویشن زوفایی را ناشی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در آن دانسته‌اند (Sabzali etal. 2014). گفته شده است آویشن کوهی خاصیت آنتی‌اکسیدان قوی دارد (Faleiro et al. 2005). همچنین، Alaee و همکاران (۲۰۱۶) اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی نعناع را روی بلوغ اووسیت در موش سوری بررسی کردند و اعلام نمودند که اثرات خفیفی روی بلوغ آزمایشگاهی اووسیت داشت. با این حال، اعلام نمودند که غلظت‌های بیش‌تر این عصاره ممکن است بلوغ اووسیت را بهبود بخشد (Alaee et al. 2016). Banihosseini و همکاران (۲۰۱۸) اثر غلظت‌های مختلف کوئرستین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان گیاهی بر استرس اکسیداتیو داخل سیتوپلاسمی را در خلال بلوغ و لقاح آزمایشگاهی اووسیت موش بررسی کردند و بیان نمودند که کوئرستین قادر است به صورت وابسته به غلظت بلوغ هسته و تکوین رویان را از طریق کاهش استرس اکسیداتیو داخل سلولی در اووسیت بالغ بهبود بخشد. Barakat و همکاران (۲۰۱۴) اثر غلظت های مختلف برگ چای سبز را روی بلوغ هسته‌ای و تکوین رویان بعد از لقاح آزمایشگاهی اووسیت گوسفند بررسی کردند و بیان داشتند که افزودن عصاره به محیط کشت با غلظت مشخص، بلوغ اووسیت‌ها و تکوین آن‌ها به بلاستوسیست را به صورت معنی‌دار افزایش می‌دهد. برگ چای سبز سرشار از ترکیبات پلی فنولی است که از جمله آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی با اثر قوی هستند.

Tavana و همکاران (۲۰۱۲) اثرات عصاره‌ی آبی زعفران را روی بلوغ، لقاح و تکوین رویان در اووسیت‌های موش در آزمایشگاه را بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که زعفران در غلظت‌های کم در مقایسه با غلظت‌های بیشتر

اثر بیش‌تری دارند و اعلام نمودند که افزودن مقادیر مناسب عصاره‌های طبیعی بلوغ اووسیت و تکوین رویان در آزمایشگاه را بهبود می‌دهد. در مطالعه‌ای که توسط Zabihi و همکاران انجام شده است، افزودن رسوراترول (آنتی-اکسیدان) در غلظت ۰/۵ میکرومول به محیط کشت بلوغ اووسیت گوسفند باعث افزایش درصد اووسیت‌های رسیده به مرحله‌ی متافاز II شد در حالی که در غلظت‌های بالا اثر منفی داشت. Abedi و همکاران (۲۰۱۴) با مطالعه‌ی اثر عصاره‌ی برگ‌های کنگر روی بلوغ آزمایشگاهی اووسیت موش گزارش کردند که عصاره قادر بود به صورت وابسته به غلظت میزان بلوغ اووسیت‌ها را افزایش دهد. آن‌ها بیان کردند که بهبود در میزان بلوغ اووسیت‌ها به واسطه‌ی اثر آنتی‌اکسیدان عصاره است به طوری که عصاره در تمام غلظت‌ها توانست در مقایسه با گروه کنترل میزان بلوغ اووسیت‌ها را افزایش دهد. لازم به ذکر است که تفاوت مطالعه‌ی آن‌ها با مطالعه‌ی ما اضافه نکردن آنتی‌اکسیدان به محیط بلوغ گروه کنترل بود. چنین تصور می‌شود که اثرات آنتی‌اکسیدان پلی‌فنول‌های عصاره‌ی برگ کنگر به توانایی آن‌ها در تحریک دفاع آنتی‌اکسیدانی از طریق فاکتورهای رونویسی تنظیم شونده توسط ردوکس و همچنین تنظیم چرخه‌ی سلولی وابسته به پروتئین کیناز فعال کننده‌ی میوز مرتبط باشد. همچنین در مطالعه‌ی دیگری گزارش شده است که افزودن غلظت بهینه‌ی عصاره‌ی خشخاش زراعی به محیط بلوغ اووسیت‌ها باعث بهبود بلوغ اووسیت و تکوین بعدی رویان می‌شود (Golkar-Narenji et al. 2010). Wang و همکاران در مطالعه‌ی مشابه دیگری بیان کردند که افزودن غلظت‌های مناسب پلی‌فنول‌های چای سبز به عنوان آنتی‌اکسیدان به محیط بلوغ اووسیت‌های گاوی باعث افزایش تکوین بلاستوسیست می‌شود.

در مجموع، بر اساس نتیجه‌ی حاصل از این مطالعه و همچنین مطالعات مشابه می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که افزودن غلظت مناسب عصاره‌های گیاهی به محیط بلوغ اووسیت به سبب محتوای آنتی‌اکسیدانی که دارند می‌تواند میزان بلوغ اووسیتی را افزایش دهد که به نوبه خود می‌تواند باعث بهبود مراحل بعدی تکوین جنین می‌شود. از آن جایی که بلوغ هسته‌ای اووسیت عامل مهمی در تعیین بلوغ اووسیت نابالغ و متعاقباً بر روند رشد و نمو تکوین جنینی است، غلظت‌های عصاره‌ی به کار رفته شده در این مطالعه برای تعیین اثر افزایشی این ماده بر بلوغ هسته‌ای نیاز به بررسی بیش‌تر در آینده دارند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه رازی کرمانشاه کمال تشکر را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع مالی

هزینه‌های این تحقیق از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه رازی کرمانشاه تأمین شده است.

منابع

Abedi, A., Rouhi, L., & Ghasemi Pirbalouti, A. (2014). Effect of *GundeliaTournefortii*leaves extract on in immature mouse oocytes. 2: 84-89.

Akin, M., Oguz, D., & Saracocoglu, H. (2010). Antibacterial activity of essential oil from thymbra spiata var. spicata L. and teucrimpolium (stapf Brig). *Int J Pharm Appl Sci*, 1(1), 56-58

Alaee, S., Rezaee, S., & Ziaei, GH. (2016). Evaluation of the Effects of MenthaSpicata Extract on In-Vitro Maturation of Mouse Oocytes. *Journal of Advanced Medical Sciences and Applied Technologies (JAMSAT)*, 2(2), 200-203.

Alpinar, K., Ozyurek, M., Kolak, U., Guclu, K., Aras, C., Altun, M., et al. (2009). Antioxidant capacities of some food plants wildly grown in Ayvalik of Turkey. *Food SciTechnol Res*, 5, 59–64.

Banihosseini, SZ. GhaffariNovin, M., Nazarian, H., Piryaei, A., Parvardeh, S., & Eini, F. (*2018)*. Quercetin improves developmental competenceof mouse oocytes by reducing oxidative stress during*in vitro* maturation*Ann. Anim. Sci, 18,1 87–198 DOI: 10.1515/aoas-2017-0029*.

Barakat, IAH. Al-Himaidi, AR., & Rad, AM. (2014) .Antioxidant Effect of Green Tea Leaves Extract on in vitro Productionof Sheep Embryos.Pakistan J. Zool, 46(1), 167-175.

Compoti, M. (1989). Three models of free radical induced cell injury. *Chemico Biological Intractions*, 72, 1-56.

Eimani, H., Hassani, F., Haeri Rohani, S., Nasr Esfahani, M.H., Rezazadeh, M., & Dalman, A. (2005). Effect of cysteamine on in vitro maturation, resumption of miosis and embryo development of immature mouse oocytes. *Yakhteh*, 7(1), 1-6.

Eimani, H., Hassani, F., Nasresfahani, M.H., Dalman, A., Shahverdi, A.H., & Eftekhari Yazdi, P. (2006). Effect of B-Mercaptoethanol with and without Bso (Dl-Buthionine Sulfoximine) on resumption of meiosis, iin vitro maturation and embryo development of immature mouse oocytes. *Yachted*, 7(4), 236-241.

Faleiro, L., Miguel, G., Gomes, S., et al. (2005). Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from thymbra capitata L (cav.) and origanum vulgare L. *J Agric Food Chem*, 53(21),8162-8.

Ghasemipirbalouti, A., Bahmani, M., & Avijgan, M. (2009). Anti –candida activity of some of the Iranian medicinal plants. *Electronic J Biol*, 5(4), 85-88.

Golkar-Narenji, A., Eimani, H., Samadi, F., Hasani, S., Shahverdi, A., & Eftekhari-Yazdi, P. (2010). Effect of Papaver rhoeas extract on in vitro maturation and developmental competence of immature mouse oocytes. *Reproductive Medicine and Biology*, 9(4), 211-215.

Gordon, I. (2003). Laboratory production of cattle embryos. 2nd edition. *CAB International publishing,Wallingford.*

Guerin, P., El Mouatassim, S., & Menezo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction. Update*, 7, 175–189.

Hajian, S. & Haidari Nasrabadi, M. (2017). Effect of Fennel essence on nuclear maturation of bovine oocyte. *NCMBJ*, 7(25), 27-32.

Hreinsson, JR., Friden, B., & Levkov, L. (2003). RecombinantLH is equally effective as recombinant hCGinpromoting oocyte maturation in clinical invitromaturationprogramme: a randomized study. *Hum.Repro*, 18, 2131-2136.

Hashimoto, S., Saeki, K., Nagao, Y., Minami, N., Yamada, M., & Utsumi, K. (1998). Effects of cumulus cell density during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, 49, 1451-1463.

Jurema, M.W., & Ogueira, N. (2006). In vitro maturation of human oocytes for assisted reproduction. *Fertility and sterility*, 86, 1277-1291.

Khodabandeh, M.. Roohi, L.. & Ghasemi Pirbalooti, A. (2016). Dose dependent effects of *Gundeliatournefortii* root extract on meiosis restart and in vitro maturation of mouse immature oocytes. *Herbal drugs*, 6(3), 161-166.

Landim-Alvarenga و FC. & Maziero, RRD. (2014). Control of oocyte maturation. *Anim. Reprod,*. 11(3), 150-158.

Lee, SE. Kim, EY. Choi, HY. Moon, JJ. Park, MJ. Lee, JB., et al. (2014). Rapamycin Rescues the Poor Developmental Capacity of Aged Porcine Oocytes. *Asian-Australas J Anim Sci*, 27(5), 635–647.

Menne, LI., Sapinho, D., & De bree, A. (2004). Consumption of foods rich in flavonoids is related to a decreased cardiovascular risk in apparently Healthy French women. *J Nutr*, 134 (4), 923-926.

Nadi, S., Ravindranatha, BM., Gupta, PSP. & Sarma, PV. (2002). Timing of sequential changes in cumulus cellsand first polar body extrusion during in vitromaturation of buffalo oocytes." *Theriogenology*, 57, 1151–1159.

Nasr-Esfahani, MH. (1991). The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured in vitro. *Development*, 113,551-560.

Sabzali, S.. Rostam zad, A.. Panahi, J.. Havasian, M.. Haghani, K.. & Bkhtiary, S. (2014). Investigation on the Inhibitory effects of hydro-alcoholic extract of Thymbra spicata on the growth of lung cancer cell line SK-Mes-1. *Sjimu*, 22(4), 153-158.

Salimi, M., Salehi, M., Masteri Farahani, R., Dehghani, M., Abadi, M., Novin, MG. Nourozian, M., & Hosseini, A., 2014. The Effect of Melatonin on Maturation, Glutathione Level and Expression of H MGB1 Gene in Brilliant Cresyl Blue (BCB) Stained Immature Oocyte. *Cell J*, 15(4), 294-301.

Son, YJ. Lee, SE. Hyun, H., Shin, MY. Park, YG. et al. (2017). Fibroblast growth factor 10 markedly improves in vitro maturation of porcine cumulus-oocyte complexes. *Mol. Reprod. De*, 84, 67–75.

Sovernigo, Adona, PR., Monzani, PS., Guemra , S., Barros, FDA., Lopes, FG., & Leal, CVL. (2017). Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reprod Dom Anim*, 52,561–569.

Tavana, S., Eimani, H., Azarnia, M., Shahverdi, A., & EftekhariYazdi, P. (2012). Effects of Saffron (*Crocus sativus L.*) Aqueous Extract on *In vitro* Maturation, Fertilization and Embryo Development of Mouse Oocytes. *Cell Journal (Yakhteh), 13(4), 259-264.*

Uday, B., Dipak, D., & Ranajit, K. (1999). Reactiv oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Current Sien,*. 77, 658-666.

Wang, X., Falcone, T., Attaran, M., Goldberg, JM., Agarwal, A., & Sharma, RK. 2002. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil Steril*, 78(6), 1272-7.

Wani, N., Wani, G., & Al-Saigh, MN. (1999). Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for in vitro naturation and in vitro fertilization procedures in sheep. *Small Rumin Res*, 34, 71-76.

Wojdyto, A. (2007). Antioxidant activity and phenolic compound in 32 selected herbs. *J food Chem*, 105, 940-949.

Zabihi, A., Shabankareh, HK. Hajarian, H., & Foroutanifar, S. (2019). Resveratrol addition to in vitro maturation and in vitro culture media enhances developmental competence of sheep embryos. *Domest Anim Endocrinol*, 68, 25-31.

Zhu, G., Guo, B., Pan, D., Mu, Y., & Feng, S. (2008). Expression of bone morphogenetic proteins and receptors in porcine cumulus oocyte complexes during in vitro maturation. *Anim reprod sci*, 104, 275-283.

Received: 16.03.2020
Accepted: 31.05.2020

Vol. 18, No. 4, Winter, 2023 **Original Article**

DOI: 10.22055/IVJ.2020.223000.2240
DOR: 20.1001.1.17356873.1401.18.4.8.2

The effect of hydroalcoholic extract of *Thymbra spicata* on in- vitro maturation of ovine oocyte

Esmail Ghobadi[1], Aliasghar Moghadam[2*], Tayebeh Mohammadi[3] and Peyman Rahimi Faili[4]

[1]DVM Graduated, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran
[2] Associated Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Basic and Pathobiological Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran

Received: 16.03.2020 Accepted: 31.05.2020

Abstract

In vitro maturation (IVM) of oocytes and subsequently, in vitro fertilization (IVF) for the generation of embryos in the laboratory have important values. Considering that antioxidants are known as effective free radicals scavenger, it is possible to improve the in vitro oocyte maturation and the fetal quality. Therefore, the aim of this study is to evaluate the effect of *Thymbra spicata* hydroalcoholic extract as a source of antioxidant on in-vitro sheep oocyte maturation. Cumulus oocyte complexes (COCs) were collected from ewe ovaries and were cultured for 24 hours in maturation medium in TCM supplemented with FSH, LH, FBS, cysteamine, pyruvate sodium and antibiotics (control group) and in maturation medium without cysteamine (as an antioxidant) supplemented with different doses of *Thymbra spicata* hydroalcoholic extract (1mg/ml: group 1, 10 mg/ml: group 2, 50 mg/ml: group 3) as an antioxidant. In-vitro maturation stages and resumption of meiotic was assessed by determination of cumulus cells mass expansion and number of oocytes in metaphase II stage of meiotic division in all groups. Cumulus cells mass expansion was similar between control, 2 and 3 groups. However, in group 1 was lower than control group. Nuclear maturation was similar between control and group 3 and both of them were different with groups 1 and 2. The results of this study showed that the *Thymbra spicata* hydro alcoholic extract, has a positive effect on oocyte maturation that is doses dependent. So with increasing concentration of *Thymbra spicata* hydroalcoholic extract, the rate of maturation immature oocytes is increased. Generally, we conclude that addition of appropriate amounts of natural extracts such as Thymbra spicata to maturation medium improves oocytes maturation.

Key words: In vitro maturation (IVM), Oocyte, Sheep, *Thymbra spicata*

[*] **Corresponding Author**: Aliasghar Moghadam, Associated Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran
E-mail: moghaddam@razi.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).