تولیدات دامی
دوره ۱۶ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۳
صفحه‌های ۸۳-۷۵

اثر افزودن اسید آلفا-لینولنیک به محیط کشت بلوغ برون‌تنی اووسایت بر توانایی تکوین و کیفیت رویان حاصل از پارتنوژنز و لقاح برون‌تنی در بز

جواد محمدمرادی[۱]، علی‌اکبر خادم[۲]، سید احمد حسینی[۱]، آرش وشکینی[۳]، علی اسدی الموتی[۴]، عبدالله محمدی سنگ چشمه[۵]*

۱. دانشجوی کارشناسی گروه علوم دام وطیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
۲. دانشیار گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
۳. دانشجوی دکتری گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
۴. استادیار گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
۵. استادیار گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۳/۰۴/۱۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۹/۰۸

چکیده

غلظت‌های صفر تا ۲۰۰ میکرومولار اسید آلفا-لینولنیک (آلفالین) برای مطالعهٔ اثر این اسید چرب بر بلوغ هسته‌ای اووسایت‌ها تعیین شد. اووسایت‌های بز در حضور غلظت‌های صفر (شاهد)، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار آلفالین برای بلوغ کشت داده شدند. بیشترین درصد بلوغ برون‌تنی با افزودن ۵۰ میکرومولار آلفالین به محیط کشت اووسایت‌ها حاصل شد (P<۰/۰۵). پس از پارتنوژنز/ لقاح برون‌تنی اووسایت‌ها، درصد تسهیم و درصد تولید بلاستوسیست اووسایت‌ها نیز در روزهای سوم و هشتم پس از کشت ثبت شد. میزان آپوپتوز سلول‌های بلاستوسیست نیز ارزیابی شد. پس از پارتنوژنز، درصد تسهیم اووسایت‌هایی که محیط کشت آن‌ها حاوی ۵۰ میکرومولار آلفالین بود تفاوتی با شاهد نداشت، ولی درصد تولید بلاستوسیست‌ها در این گروه بالاتر بود (P<۰/۰۵). پس از لقاح برون‌تنی، درصد تسهیم و درصد تولید بلاستوسیست گروه ۵۰ میکرومولار آلفالین بیشتر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۵). همچنین، بلاستوسیست‌های گروه ۵۰ میکرومولار آلفالین، سلول‌های بیشتر و آپوپتوز سلولی کمتری در مقایسه با گروه شاهد داشتند (P<۰/۰۵). نتایج این پژوهش نشان داد که اضافه کردن ۵۰ میکرومولار آلفالین به محیط کشت بلوغ برون‌تنی اووسایت‌های بز راندمان بلوغ هسته‌ای، درصد تسهیم، درصد تولید بلاستوسیست و کیفیت آن‌ها را افزایش می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: آپوپتوز، اسید آلفا-لینولنیک، اووسایت بز، بلاستوسیست.

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

مقدمه

توازن منفی انرژی یکی از مشکلات شایع سوخت‌وسازی است که معمولاً پس از زایش در گاوهای پرتولید دیده می‌شود (۵). توازن منفی انرژی با ایجاد اختلال در سازوکارهای مرتبط با رشد فولیکول‌ها و بلوغ اووسایت‌ها و با تغییر ترکیب مایع فولیکولی سبب کاهش کیفیت اووسایت‌ها و افزایش مرگ اولیه رویان می‌شود و راندمان تولیدمثل را کاهش می‌دهد.

با افزودن چربی‌ها و اسیدهای چرب به جیره آثار نامطلوب توازن منفی انرژی کاهش و عملکرد تولیدمثلی حیوانات تا حدی افزایش می‌یابد (۱۶، ۲۱، ۲۲). اسیدهای چرب با تعدیل تولید پروستاگلاندین‌ها، استروییدسازی و سوخت‌وساز کلسترول آثار مثبتی بر سازوکارهای مرتبط با فرایندهای تولیدمثل دارند (۱، ۶، ۹). اسیدهای چرب مختلف آثار مشابهی بر بلوغ برون‌تنی اووسایت‌ها، همچنین بر تکوین رویان‌های حاصل از آن‌ها ندارند. برای مثال، اسیدهای چرب اشباع بلوغ و توانایی تکوین اووسایت‌ها را کاهش می‌دهند، در حالی که اسیدهای چرب غیراشباع، بلوغ و تکوین برون‌تنی اووسایت‌ها را بهبود می‌بخشند (۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵). اسید آلفا- لینولئیک (پیش‌ساز اسیدهای چرب ضروری امگا-۶) و اسید آلفا- لینولنیک یا آلفالین (پیش‌ساز اسیدهای چرب ضروری امگا-۳) آثار متضادی بر درصد بلوغ و توانایی تکوین برون‌تنی اووسایت‌ها دارند. افزودن اسید آلفا- لینولنیک به محیط بلوغ برون‌تنی اووسایت‌های گاو درصد بلوغ و درصد تسهیم اووسایت‌های گاو را کاهش می‌دهد، درحالی‌که افزودن آلفالین به محیط بلوغ برون‌تنی اووسایت‌های گاوی درصد بلوغ، تسهیم و تولید بلاستوسیست را افزایش می‌دهد و کیفیت بلاستوسیست‌های حاصل را نیز بهبود می‌بخشد (۱۳). در همین رابطه، نتایج دیگر تحقیقات نشان داد افزودن ۵۰ میکرومولار آلفالین به محیط کشت، بلوغ هسته‌ای اووسایت‌های بز را در شرایط برون‌تنی بهبود می‌بخشد (۲۳).

مایع فولیکولی ترکیبات مورد نیاز اووسایت‌ها را طی روند تکامل تأمین می‌کند (۱۷). نتایج تحقیقات روی پروفایل اسیدهای چرب موجود در اووسایت نشان داد محتوی اسیدهای چرب اووسایت کاملاً پویاست و به ریزمحیطی که در آن واقع شده است وابستگی زیادی دارد (۱۹). لذا، هر گونه تغییر در محتوی ریزمحیط دربرگیرندهٔ اووسایت احتمالاً به‌طور مستقیم بر محتوی اسیدهای چرب اووسایت و پتانسیل تکوینی آن اثر خواهد گذاشت (۱۷، ۱۸).

تجزیهٔ پروفایل اسیدهای چرب مایع فولیکول نشان داده است که غلظت آلفالین از فولیکول‌های کوچک به بزرگ به طور معناداری افزایش می‌یابد (۳). بر همین اساس شاید بتوان نتیجه گرفت که آلفالین به عنوان سوبسترای مورد نیاز در تعدادی از مسیرهای بیوشیمیایی پیچیدهٔ بلوغ، نقش ویژه‌ای دارد و نیاز به آن در هنگام رشد فولیکول افزایش می‌یابد (۷، ۱۱). با وجود این، یافته‌های موجود هنوز به طور کامل تأییدکنندهٔ این فرضیه‌ها نیستند و هنوز منابع کافی برای اثبات آثار مفید آلفالین بر اووسایت به ویژه در بز وجود ندارد.

هدف از انجام پژوهش حاضر، ارزیابی اثر آلفالین بر توانایی بلوغ و تکوین اووسایت‌های بز بود. باتوجه به نرخ گستردهٔ بیوهیدروژناسیون شکمبه‌ای اسیدهای چرب غیراشباع، در این مطالعه بلوغ و تکوین اووسایت‌ها در شرایط برون‌تنی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های خون از بزهای ماده در لوله‌های تحت خلأ حاوی هپارین جمع‌آوری شد. سپس، پلاسمای خون با استفاده از سانتریفوژ نمونه‌های خون به مدت ۲۰ دقیقه در

دور ۱۸۰۰۰ و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد جدا شد. برای جمع‌آوری مایع فولیکولی، فولیکول‌های تخمدان به دو گروه فولیکول‌های کوچک‌تر از ۲ میلی‌متر و فولیکول‌های بزرگ‌تر از ۶ میلی‌متر دسته‌بندی شدند. از هر گروه فولیکول، میزان ۱ میلی‌لیتر مایع فولیکولی به روش آسپیره جمع‌آوری شد. نمونه‌ها سپس در دور ۱۰۰۰۰ و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند تا مایع فولیکولی از سلول‌ها و بافت‌های فولیکولی جدا شود. سپس، غلظت آلفالین در نمونه‌های مایع فولیکولی با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی در انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی اندازه‌گیری شد. ترکیب اسیدهای چرب نمونه‌ها روی گاز کروماتوگراف (مدل HP) در مقایسه با زمان ابقای آن‌ها با استاندارد متیل استر اسیدهای چرب تعیین شد (۲۰).

برای ارزیابی اثر آلفالین بر بلوغ برون‌تنی اووسایت‌ها و توانایی تکوین و کیفیت رویان‌های حاصل از آن‌ها، اووسایت‌ها از تخمدان بزهای تازه کشتار شده جمع‌آوری شد. به همین منظور، پس از انتقال به آزمایشگاه، تخمدان‌ها بلافاصله چندین بار در محلول سرم فیزیولوژیک (۳۷-۳۲ درجهٔ سانتی‌گراد) شستشو داده شدند و بافت‌های اضافهٔ آن‌ها حذف شد. سپس، اووسایت‌ها با استفاده از روش برش تخمدان جمع‌آوری و براساس مورفولوژی خود رتبه‌بندی شدند. اووسایت‌های جمع‌آوری شده براساس تعداد لایه‌های سلول‌های کومولوس و همگن بودن سیتوپلاسم به گروه‌های بسیار خوب، خوب، نسبتاً خوب و ضعیف رتبه‌بندی شدند. فقط اووسایت‌های با کیفیت بسیار خوب و خوب برای انجام آزمایش‌ها انتخاب شدند (۲۴).

براساس نتایج حاصل از آزمایش نخست، اووسایت‌ها به طور تصادفی در محیط بلوغ برون‌تنی حاوی ۱۰ (آلفالین-۱۰)، ۵۰ (آلفالین-۵۰)، ۱۰۰ (آلفالین-۱۰۰) و ۲۰۰ (آلفالین-۲۰۰) میکرومولار آلفالین و بدون آلفالین (شاهد) قرارگرفتند. پیش از این، اووسایت‌های هر گروه سه بار در محیط کشت TCM+Hepes و سه بار هم در محیط کشت TCM-199 حاوی ۲۵ میلی‌مولار بی‌کربنات سدیم، ۰/۶ درصد آلبومین سرم گاوی فاقد اسید چرب، ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر FSH، ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر LH، ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر ۱۷- بتا استرادیول، ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمی شستشو داده شدند و درنهایت در گروه‌های ده‌تایی به قطره‌های ۱۰۰ میکرولیتری از همین محیط کشت(که در زیر روغن معدنی قرار داشتند) منتقل شدند. پلیت حاوی اووسایت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۸/۵ درجهٔ سانتی‌گراد و ۵ درصد گاز کربنیک ، ۵ درصد اکسیژن و ۹۰ درصد گاز نیتروژن در شرایط حداکثر رطوبت قرارگرفت.

پس از بلوغ برون‌تنی، گروهی از اووسایت‌ها برای ارزیابی وضعیت هسته‌ای و آزاد شدن جسم قطبی رنگ‌آمیزی شدند. ابتدا اووسایت‌ها با کمک آنزیم هیالورونیداز ۰/۱ درصد (۱۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر) از سلول‌های کومولوس جدا شدند. سپس با پارافرم آلدهید ۴ درصد برای ۲۰ دقیقه ثابت شدند. اووسایت‌های ثابت شده سپس با قرارگرفتن در رنگ هوخست (۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) برای پنج دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. اووسایت‌های رنگ‌آمیزی شده پس از شستشو روی لام منتقل و با میکروسکوپ فلورسنت برای تعیین وضعیت هسته‌ای ارزیابی شدند. اووسایت‌های با وضعیت هسته‌ای مرحلهٔ متافاز دو، اووسایت‌های بالغ درنظر گرفته شدند و درصد بلوغ با تقسیم اووسایت‌های بالغ به کل اووسایت‌های کشت داده شده محاسبه شد.

براساس نتایج حاصل از آزمایش قبل، گروه دیگری از اووسایت‌ها در حضور مؤثرترین غلظت آلفالین بالغ شدند تا با گروه شاهد برای ارزیابی توانایی تکوین مقایسه شوند.

بدین منظور ۲۴ ساعت پس از از شروع بلوغ برون‌تنی، اووسایت‌ها با کمک آنزیم هیالورونیداز ۰/۱ درصد از سلول‌های کومولوس اطراف خود جدا شدند. سپس، اووسایت‌ها به مدت یک دقیقه در محیط کشت TCM-Hepes حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی و ۲/۵ میکرومولار یونومایسین قرارگرفتند. پس از این مرحله، اووسایت‌ها در محیط کشت CR1 حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی و ۲ میلی‌مولار ۶- دی متیل آمینو پورین به مدت سه ساعت فعال شدند و در محیط CR1 حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی، ۱۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر اسیدهای آمینهٔ غیرضروری و ۲۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر اسیدهای آمینه ضروری به مدت هشت روز در پلیت چهارخانه در انکوباتور با دمای ۳۸/۵ درجهٔ سانتی‌گراد و ۵ درصد گازکربنیک، ۵ درصد اکسیژن و ۹۰ درصد گاز نیتروژن در شرایط حداکثر رطوبت کشت داده شدند. درصد تسهیم سه روز و درصد تولید بلاستوسیست هشت روز پس از کشت محاسبه و ثبت شد.

برای انجام لقاح برون‌تنی، اووسایت‌ها دو بار در محیط HEPES-buffered SOF شسته شدند. سپس، گروه‌های ده‌تایی از اووسایت‌های هر گروه در قطره‌های ۵۰ میکرولیتری از محیط SOF با ٤ واحد بین‌المللی/ میلی‌لیتر هپارین، ۲۰ میکرومولار پنی‌سیلین آمین، ۱۰ میکرومولار هایپوتائورین، ۱ میکرومولار اپی‌نفرین و ۲ درصد (حجم/ حجم) سرم میش فحل قرار داده شدند. سپس، پایوت‌های اسپرم منجمد یخ‌گشایی شدند و اسپرم‌های با تحرک بالا با روش شناورسازی جدا شدند. سپس، اسپرم‌های جدا شده با غلظت 2×10^{6} اسپرم در هر میلی‌لیتر به قطره‌های لقاح برون‌تنی اضافه شدند و قطره‌ها به مدت ۱۸ ساعت در شرایط ذکر شده در بالا انکوبه شدند. سپس زایگوت‌های احتمالی کاملاً عاری از سلول‌های کومولوس شدند و در محیط CR1 حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی، ۱۰ میکرولیتر در میلی لیتر اسیدهای آمینه غیرضروری و ۲۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر اسیدهای آمینه ضروری به مدت هشت روز کشت داده شدند. درصد تسهیم و درصد تولید بلاستوسیست به ترتیب سه و هشت روز پس از کشت محاسبه و ثبت شد.

برای بررسی آپوپتوز سلول‌های بلاستوسیست از تکنیک تانل براساس دستورالعمل‌های موجود استفاده شد (۴). ابتدا بلاستوسیست‌ها با محلول نمکی بافر فسفات حاوی ۰/۳ درصد پلی‌وینیل الکل شسته و سپس در محلول پارافرمالدئید ۴ درصد در محلول نمکی بافر فسفات در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد ثابت شدند. پس از شستشو با محلول نمکی بافر فسفات/ پلی‌وینیل الکل، به منظور افزایش نفوذپذیری زونا پلوسیدا، به مدت ۴۰ دقیقه در محلول ۰/۱ درصد تریتون ایکس۱۰۰ قرار داده شدند. بلاستوسیست‌ها پس از شستشو با محلول نمکی بافر فسفات/ پلی‌وینیل الکل براساس دستورالعمل شرکت سازنده به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در محلول تانل انکوبه شدند. به منظور اطمینان از عدم نشانه‌گذاری، تعدادی بلاستوسیست (کنترل منفی) فقط در محلول فلورسنت بدون آنزیم انکوبه شدند و تعدادی از بلاستوسیست‌ها (کنترل مثبت) نیز قبل از آنکوبه‌شدن در محلول تانل، در ۵۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر محلول DNase به مدت یک ساعت انکوبه شدند. سپس، به منظور نشانه‌گذاری تمام هسته‌ها، بلاستوسیست‌ها با ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پروپیدیوم یدید به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشو در محلول نمکی بافر فسفات/ پلی‌وینیل الکل، بلاستوسیست‌ها در قطره‌ای ۲۰ میکرولیتری روی لام قرارگرفتند. لبه‌های لام با لاک ناخن ثابت شد و سپس لام‌ها زیر میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند.

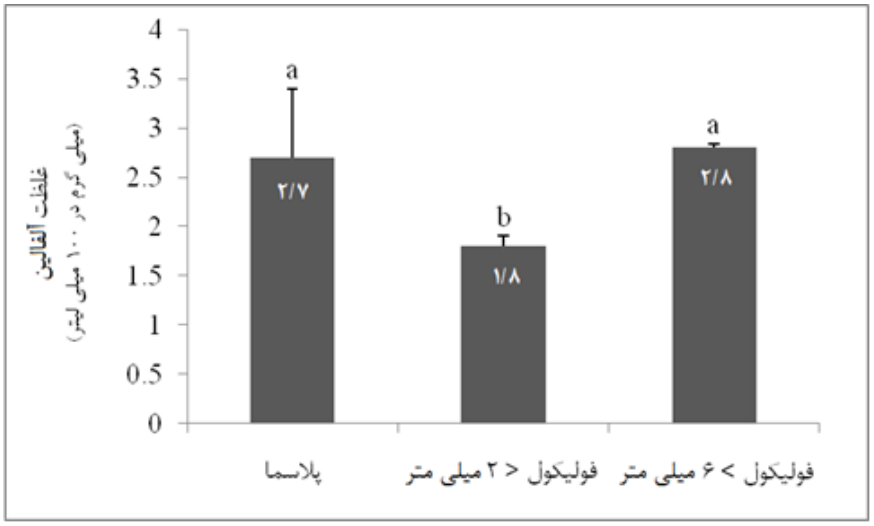
غلظت آلفالین بین گروه‌ها و درصد بلوغ اووسایت‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن مقایسه شد. برای مقایسهٔ درصد تسهیم و درصد تولید بلاستوسیست از

آزمون کای دو استفاده شد. برای مقایسهٔ اختلاف تعداد کل سلول‌های بلاستوسیست و تعداد سلول‌های آپوپتوز بلاستوسیست‌ها نیز بین دو گروه از آزمون t استفاده شد.

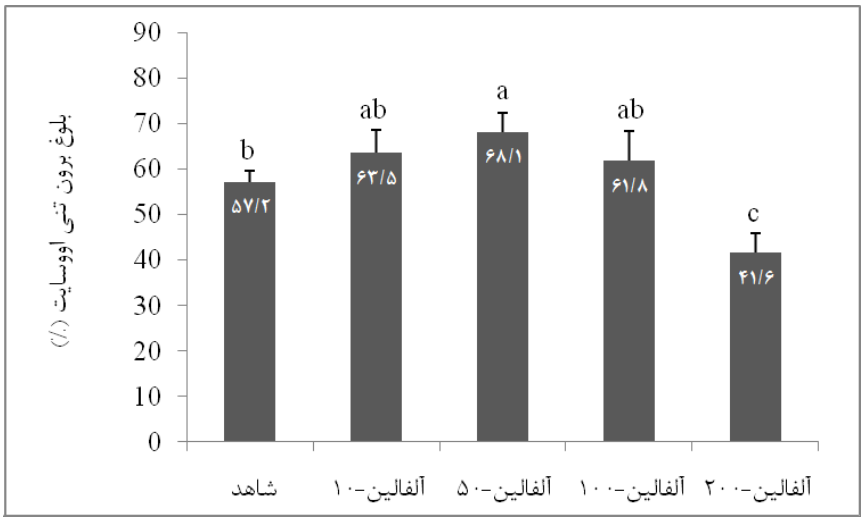
نتایج

غلظت آلفالین مایع فولیکولی فولیکول‌های کوچک (۱/۸ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) به طور معناداری (P<۰/۰۵) کمتر از غلظت آلفالین در پلاسما (۲/۷ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و مایع فولیکولی فولیکول‌های بزرگ (۲/۸ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) بود (شکل ۱). با وجود این، اختلاف غلظت آلفالین بین پلاسما و مایع فولیکولی فولیکول‌های بزرگ معنادار نبود.

تیمار آلفالین-۵۰ (۶۸/۱ درصد) در مقایسه با گروه شاهد (۵۷/۲ درصد) بیشترین درصد بلوغ برون‌تنی اووسایت‌های بز را داشت، در حالی که تیمار آلفالین-۲۰۰ (۴۱/۶ درصد) کمترین درصد بلوغ را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد (P<۰/۰۵) (شکل ۲).



شکل ۱. غلظت آلفالین در پلاسما، فولیکول‌های کوچک و بزرگ تخمدان بز (میانگین ± خطای استاندارد میانگین)



شکل ۲. اثر غلظت‌های مختلف آلفالین بر بلوغ هسته‌ای اووسایت‌های بز در شرایط برون‌تنی (میانگین ± خطای استاندارد میانگین)

جدول ۱. اثر آلفالین بر تکوین اووسایت‌های بز پس از پارتنوژنز و لقاح برون‌تنی

گروه‌ها	تعداد اووسیت		تکوین رویان			
			تسهیم تعداد (٪)		بلاستوسیست تعداد (٪)	
	پارتنوژنز	لقاح	پارتنوژنز	لقاح	پارتنوژنز	لقاح
شاهد	۲۶۹	۱۰۴	۱۴۲ (۵۲/۸)	۵۸ (۵۵/۸)[b]	۶۵ (۱۶/۷)[b]	۱۴ (۱۳/۵)[b]
آلفالین-۵۰	۲۸۷	۱۱۳	۱۸۷ (۶۵/۲)	۷۷ (۶۸/۱)[a]	۷۲ (۲۵/۱)[a]	۲۹ (۲۵/۷)[a]

a, b: تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنادار است (P<۰/۰۵).

جدول ۲. اثر آلفالین بر کیفیت بلاستوسیست‌های بز پس از لقاح برون‌تنی (میانگین ± خطای استاندارد)

گروه‌ها	تعداد بلاستوسیست	کیفیت رویان	
		تعداد کل سلول‌های بلاستوسیست	تعداد سلول‌های آپوپتوز بلاستوسیست
شاهد	۱۸	۱۱۰/۸ ± ۴/۶[a]	۴/۲ ± ۲/۰[a]
آلفالین-۵۰	۲۱	۱۱۵/۲ ± ۸/۰[b]	۳/۱ ± ۱/۲[b]

a, b: تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنادار است (P<۰/۰۵).

تفاوت درصد تسهیم پس از پارتنوژنز اووسایت‌ها بین گروه آلفالین-۵۰ (۵۲/۸ درصد) و گروه شاهد (۶۵/۲ درصد) معنادار نبود (جدول ۱). با این حال، بلاستوسیست‌های حاصل از گروه آلفالین-۵۰ (۲۵/۱ درصد) به طور معناداری در روز هشتم، بیشتر از گروه شاهد (۱۶/۷ درصد) بود (P<۰/۰۵). درصد تسهیم (۶۸/۱ درصد) و درصد بلاستوسیست (۲۵/۷ درصد) پس از لقاح برون‌تنی در گروه آلفالین-۵۰ بیش از گروه شاهد (به ترتیب ۵۵/۸ و ۱۳/۵ درصد) بود (P<۰/۰۵).

تعداد سلول‌ها در بلاستوسیست‌های گروه آلفالین-۵۰ (۱۱۵/۲) بیشتر از گروه شاهد (۱۱۰/۸) (P<۰/۰۵) بود و بلاستوسیست‌های حاصل از این گروه سلول‌های آپوپتوز کمتری (۳/۱) در مقایسه با گروه شاهد (۴/۲ سلول) داشتند (P<۰/۰۵).

بحث

در این پژوهش، غلظت آلفالین در فولیکول‌های کوچک کمتر از غلظت آن در فولیکول‌های بزرگ بود که با نتایج دیگر تحقیقات مطابقت دارد (۳). فعالیت سوخت‌وسازی سلول‌های فولیکول آنترال تأثیر زیادی بر ترکیب محتوای آن دارد و احتمالاً در روند بلوغ آن‌ها اثر می‌گذارد. باتوجه به نتایج حاصل از آزمایش اول، میانگین غلظت آلفالین در فولیکول‌های کوچک ۱/۸ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر مایع فولیکولی (۶۴/۶ میکرومولار) و در فولیکول‌های بزرگ ۲/۸ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر مایع فولیکولی (۱۰۰/۶ میکرومولار) برآورد شد. با توجه به این محدوده غلظت فیزیولوژیک طبیعی، برای آزمایش دوم غلظت‌های صفر، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار آلفالین در محیط کشت بلوغ قرارگرفت و اثر این اسید چرب بر بلوغ برون‌تنی

اووسایت‌های بز مطالعه شد. نتایج نشان داد که در مقایسه با گروه شاهد (محیط کشت بدون آلفالین) تیمار آلفالین-۵۰ بیشترین درصد بلوغ و تیمار آلفالین-۲۰۰ کمترین درصد بلوغ را حاصل کرد. تأثیر غلظت ۵۰ میکرومولار آلفالین در افزایش درصد بلوغ اووسایت‌ها در این آزمایش با یافته‌های پیشین در گاو مطابقت دارد و نشان می‌دهد که این غلظت مناسب‌ترین غلظت آلفالین برای بلوغ برون‌تنی اووسایت‌های بز نیز هست (۱۳). در گوسفندهای نابالغ، افزایش غلظت آلفالین تا ۱۰۰ میکرومولار نیز بر بلوغ اووسایت‌ها مؤثر است (۱۰).

باتوجه به نتایج حاصل از آزمایش دوم، تیمار آلفالین-۵۰ برای مطالعهٔ اثر این اسید چرب بر تکوین برون‌تنی اووسایت‌های بز انتخاب شد. پس از پارتنوژنز اووسایت‌ها، درصد تسهیم گروه آلفالین-۵۰ در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معناداری نشان نداد. با وجود این، گروه آلفالین-۵۰ به طور معناداری درصد تولید بلاستوسیست را نسبت به گروه شاهد افزایش داد. در این آزمایش، پس از لقاح برون‌تنی اووسیت‌ها نیز هم درصد تسهیم و هم درصد تولید بلاستوسیست در اثر افزودن ۵۰ میکرومولار آلفالین به محیط کشت افزایش یافت. همسو با نتایج حاضر، گزارش شده است که افزودن آلفالین به محیط کشت بلوغ برون‌تنی اووسایت‌های گاو، تکوین برون‌تنی آن‌ها را بهبود می‌بخشد (۱۳). بهبود تکوین برون‌تنی را می‌توان به آثار مثبت آلفالین بر اووسایت‌ها در دورهٔ بلوغ نسبت داد که در نهایت به تکوین بهتر اووسایت‌ها نیز منجر می‌شود. احتمالاً، آلفالین با افزایش سریع غلظت cAMPi در اووسایت‌ها، فسفریله‌شدن MAPK1 و MAPK3 در آن‌ها را افزایش می‌دهد و باعث افزایش درصد اووسیت‌های بالغ می‌شود (۱۳). در تضاد با این نتایج، افزودن آلفالین به همراه بتا- مرکاپتوئتانول در محیط کشت رویان، بهبودی در درصد تسهیم اووسایت‌های گاوی ایجاد نکرده است (۲). لازم به ذکر است در مطالعهٔ مذکور، آلفالین پس از زمان کشت بلوغ و طی کشت رویان به محیط افزوده شده بود. لذا، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که آثار مثبت آلفالین زمانی بروز خواهد کرد که این اسید چرب در زمان بلوغ برون‌تنی به محیط کشت اضافه شود.

آلفالین همچنین به طور معناداری درصد سلول‌های آپوپتوز را در بلاستوسیست‌های حاصل کاهش داد. همسو با این نتایج، افزودن آلفالین در محیط کشت اووسایت‌های گاو، کیفیت رویان‌های حاصل را از طریق کاهش تعداد سلول‌های آپوپتوز بهبود بخشیده است (۱۳). کاهش سلول‌های آپوپتوز بلاستوسیست‌ها را شاید بتوان به حذف گونه‌های فعال اکسیژن توسط آلفالین نسبت داد که با اکسید شدن زودتر خود مانع اکسایش ترکیبات حیاتی اووسایت‌ها می‌شوند.

براساس نتایج حاصل از تحقیق حاضر، افزودن ۵۰ میکرو مولار آلفالین به محیط کشت بلوغ برون‌تنی اووسایت‌های بز، بلوغ هسته‌ای آن‌ها را افزایش می‌دهد و قابلیت تکوین پس از پارتنوژنز/ لقاح برون‌تنی، همچنین کیفیت رویان‌های حاصل را بهبود می‌بخشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از ریاست و معاونت پژوهشی محترم مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته قدردانی می‌شود.

منابع

1. Abayasekara DR and Wathes DC (1999) Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 61: 275-287.

2. Al Darwich A, Perreau C, Petit MH, Papillier P, Dupont J, Guillaume D, Mermillod P and Guignot F (2010) Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPKalpha phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 93: 30-36.

3. Bender K, Walsh S, Evans AC, Fair T and Brennan L (2010) Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. Reproduction. 139: 1047-1055.

4. Brison DR and Schultz RM (1997) Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. Biology of Reproduction. 56: 1088-1096.

5. Butler WR and Smith RD (1989) Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. Journal of Dairy Science. 72: 767-783.

6. Cribier S, Morrot G and Zachowski A (1993) Dynamics of the membrane lipid phase. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 48(1): 27-32.

7. Demeyer D and Doreau M (1999) Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. Proceedings of the Nutrition Society. 58: 593-607.

8. Fouladi-Nashta AA, Gutierrez CG, Gong JG, Garnsworthy PC and Webb R (2007) Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. Biology of reproduction.77: 9-17.

9. Funston RN (2004) Fat supplementation and reproduction in beef females. Journal of Animal Science. 82: 154-161.

10. Ghaffarilaleh V, Fouladi-Nashta A and Paramio MT (2014) Effect of alpha-linolenic acid on oocyte maturation and embryo development of prepubertal sheep oocytes. Theriogenology. 82: 686-696.

11. Gulliver CE, Friend MA, King BJ and Clayton EH (2012) The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reproduction of sheep and cattle. Animal Reproduction Science. 131: 9-22.

12. Leroy JL, Vanholder T, Mateusen B, Christophe A, Opsomer G, de Kruif A, Genicot G and Van Soom A (2005) Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes *in vitro*. Reproduction. 130: 485-95.

13. Marei WF, Wathes DC and Fouladi-Nashta AA (2009) The effect of linolenic Acid on bovine oocyte maturation and development. Biology of Reproduction. 81: 1064-72.

14. Marei WF, Wathes DC and Fouladi-Nashta AA (2010) Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. Reproduction. 139: 979-988.

15. Marei WF, Wathes DC and Fouladi-Nashta AA (2012) Differential effects of linoleic and alpha-linolenic fatty acids on spatial and temporal mitochondrial distribution and activity in bovine oocytes. Reproduction, Fertility and Development. 24: 679-690.

16. Mattos R, Staples CR and Thatcher WW (2000) Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. Reviews of Reproduction. 5: 38-45.

17. McKeegan PJ and Sturmey RG (2012) The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. Reproduction, Fertility and Development. 24: 59-67.

18. Nafiye Y, Sevtap K, Muammer D, Emre O, Senol K and Leyla M (2010) The effect of serum and intrafollicular insulin resistance parameters and homocysteine levels of

nonobese, nonhyperandrogenemic polycystic ovary syndrome patients on *in vitro* fertilization outcome. Fertility and Sterility. 93: 1864-1869.

19. 19 . Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG and Nottle MB (1995) Cryopreservation of porcine embryos. Nature. 374: 416.

20. O'Fallon JV, Busboom JR, Nelson ML and Gaskins CT (2007) A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. Journal of Animal Science. 85: 1511-1521.

21. Robinson RS, Pushpakumara PG, Cheng Z, Peters AR, Abayasekara DR and Wathes DC (2002) Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. Reproduction. 124:119-31.

22. Staples CR, Burke JM and Thatcher WW (1998) Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. Journal of Dairy Science. 81: 856-871.

23. Thangavelu G, Colazo MG, Ambrose DJ, Oba M, Okine EK and Dyck MK (2007) Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein cows. Theriogenology. 68: 949-957.

24. Veshkini A, Khadem A-A, Soleimani M, Jahanbin R, Salehi M, Alamouti A, Salehi A, Schellander K, Hoelker M, and Mohammadi-Sangcheshmeh A (2012) Exogenous linolenic acid in oocyte maturation media promotes nuclear maturation and parthenogenetic preimplantation embryonic development in the goat. Reproduction, Fertility and Development. 25: 280.