



## تولیدات دامی

دوره ۱۶ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۳

صفحه‌های ۸۳-۷۵

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

جواد محمدمرادی<sup>۱</sup>، علی اکبر خادم<sup>۲</sup>، سید احمد حسینی<sup>۱</sup>، آرش وشکینی<sup>۱</sup>، علی اسدی الموتی<sup>۴</sup>، عبدالله محمدی سنگ چشمه<sup>۵\*</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی گروه علوم دام و طیور، 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 پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۹/۰۸

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۳/۰۴/۱۱

### چکیده

غلظت‌های صفر تا ۲۰۰ میکرومولار اسید آلفا-لینولنیک (آلفالین) برای مطالعه 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 ( $P < 0/05$ ). 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 ( $P < 0/05$ ). پس از لقاح برون‌تنی، درصد تسهیم و درصد تولید بلاستوسیست گروه ۵۰ میکرومولار آلفالین بیشتر از گروه شاهد بود ( $P < 0/05$ ). همچنین، بلاستوسیست‌های گروه ۵۰ میکرومولار آلفالین، سلول‌های بیشتر و آپوپتوز سلولی کمتری در مقایسه با گروه شاهد داشتند ( $P < 0/05$ ). 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.

## مقدمه

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 دربرگیرنده اووسایت احتمالاً به‌طور مستقیم بر محتوی اسیدهای چرب اووسایت و پتانسیل تکوینی آن اثر خواهد گذاشت (۱۷، ۱۸).

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

هدف از انجام پژوهش حاضر، ارزیابی اثر آلفالین بر توانایی بلوغ و تکوین اووسایت‌های بز بود. باتوجه به نرخ گسترده 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

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، استروئیدسازی 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-لینولئیک یا آلفالین (پیش‌ساز اسیدهای چرب ضروری امگا-۳) آثار متضادی بر درصد بلوغ و توانایی تکوین برون‌تنی اووسایت‌ها دارند. افزودن اسید آلفا-لینولئیک به محیط بلوغ برون‌تنی اووسایت‌های گاو درصد بلوغ و درصد تسهیم اووسایت‌های گاو را کاهش می‌دهد، درحالی‌که افزودن آلفالین به محیط بلوغ برون‌تنی اووسایت‌های گاو 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

## تولیدات دامی

اثر افزودن اسید آلفا-لینولیک به محیط کشت بلوغ برون تنی اووسایت بر توانایی تکوین و کیفیت رویان حاصل از پارتوژنز و ...

۲۰۰ (آلفالین-۲۰۰) میکرومولار آلفالین و بدون آلفالین (شاهد) قرار گرفتند. 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 در نهایت 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 درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد گاز کربنیک، ۵ درصد اکسیژن و ۹۰ درصد گاز نیتروژن در شرایط حداکثر رطوبت قرار گرفت.

پس از بلوغ برون تنی، 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 آلدئید ۴ درصد برای ۲۰ دقیقه ثابت شدند. اووسایت‌های ثابت شده سپس با قرار گرفتن 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 مرحله متافاز دو، اووسایت‌های بالغ در نظر 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.

دور ۱۸۰۰۰ و دمای ۴ درجه 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 درجه 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 برون تنی 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 درجه سانتی‌گراد) شستشو داده شدند و بافت‌های اضافه 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 برون تنی حاوی ۱۰ (آلفالین-۱۰)، ۵۰ (آلفالین-۵۰)، ۱۰۰ (آلفالین-۱۰۰) و

## تولیدات دامی

دوره ۱۶ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۳

محمدجواد مرادی، علی اکبر خادم، سید احمد حسینی، آرش وشکینی، علی اسدی الموتی، عبدالله محمدی سنگ چشمه

میکرولیتر در میلی لیتر اسیدهای آمینه غیر ضروری و ۲۰ میکرولیتر در میلی لیتر اسیدهای آمینه ضروری به مدت هشت روز کشت داده شدند. درصد تسهیم و درصد تولید بلاستوسیت به ترتیب سه و هشت روز پس از کشت محاسبه و ثبت شد.

برای بررسی آپتوتوز سلول‌های بلاستوسیت از تکنیک تانل براساس دستورالعمل‌های موجود استفاده شد (۴). ابتدا بلاستوسیت‌ها با محلول نمکی بافر فسفات حاوی ۰/۳ درصد پلی‌وینیل الکل شسته و سپس در محلول پارافمالدئید ۴ درصد در محلول نمکی بافر فسفات در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ثابت شدند. پس از شستشو با محلول نمکی بافر فسفات/ پلی‌وینیل الکل، به منظور افزایش نفوذپذیری زونا پلوسیدها، به مدت ۴۰ دقیقه در محلول ۰/۱ درصد تریتون ایکس ۱۰۰ قرار داده شدند. بلاستوسیت‌ها پس از شستشو با محلول نمکی بافر فسفات/ پلی‌وینیل الکل براساس دستورالعمل شرکت سازنده به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محلول تانل انکوبه شدند. به منظور اطمینان از عدم نشانه‌گذاری، تعدادی بلاستوسیت (کنترل منفی) فقط در محلول فلورسنت بدون آنزیم انکوبه شدند و تعدادی از بلاستوسیت‌ها (کنترل مثبت) نیز قبل از آنکوبه شدن در محلول تانل، در ۵۰ میکروگرم/ میلی لیتر محلول DNase به مدت یک ساعت انکوبه شدند. سپس، به منظور نشانه‌گذاری تمام هسته‌ها، بلاستوسیت‌ها با ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر پرویديوم دیدید به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشو در محلول نمکی بافر فسفات/ پلی‌وینیل الکل، بلاستوسیت‌ها در قطره‌ای ۲۰ میکرولیتری روی لام قرار گرفتند. 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 مقایسه درصد تسهیم و درصد تولید بلاستوسیت از

بدین منظور ۲۴ ساعت پس 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 Heps حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی و ۲/۵ میکرومولار یونوماپسین قرار گرفتند. 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 میلی لیتر اسیدهای آمینه غیر ضروری و ۲۰ میکرولیتر در میلی لیتر اسیدهای آمینه ضروری به مدت هشت روز در پلیت چهارخانه در انکوباتور با دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد گاز کربنیک، ۵ درصد اکسیژن و ۹۰ درصد گاز نیتروژن در شرایط حداکثر رطوبت کشت داده شدند. درصد تسهیم سه روز و درصد تولید بلاستوسیت 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 ۴ واحد بین‌المللی / میلی لیتر هپارین، ۲۰ میکرومولار پنی سیلین 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  $2 \times 10^6$  اسپرم در هر میلی لیتر 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

## تولیدات دامی

دوره ۱۶ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۳

اثر افزودن اسید آلفا-لینولنیک به محیط کشت بلوغ برون تنی اووسایت بر توانایی تکوین و کیفیت رویان حاصل از پارتنوژنز و ...

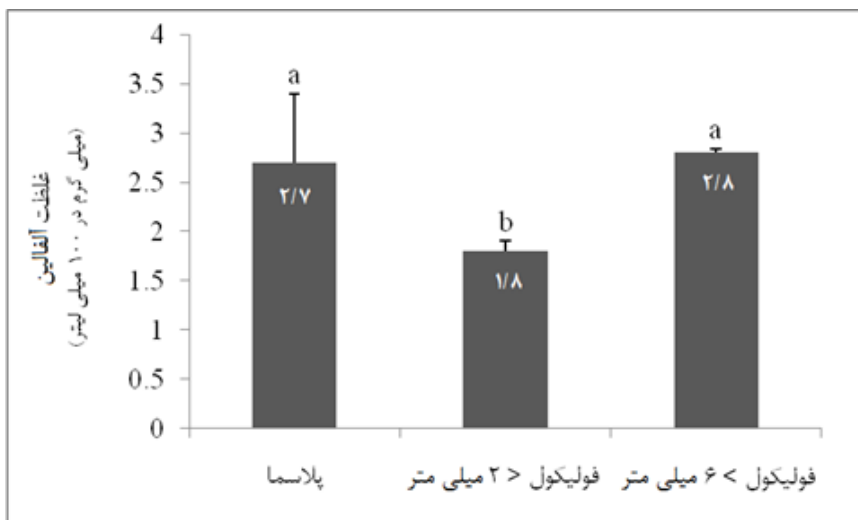
میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر) بود (شکل ۱). با وجود این، اختلاف غلظت آلفالین بین پلاسما و مایع فولیکولی فولیکول‌های بزرگ معنادار نبود.

تیمار آلفالین-۵۰ (۶۸/۱ درصد) در مقایسه با گروه شاهد (۵۷/۲ درصد) بیشترین درصد بلوغ برون تنی اووسایت‌های بزرگ را داشت، در حالی که تیمار آلفالین-۲۰۰ (۴۱/۶ درصد) کمترین درصد بلوغ را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ( $P < 0/05$ ) (شکل ۲).

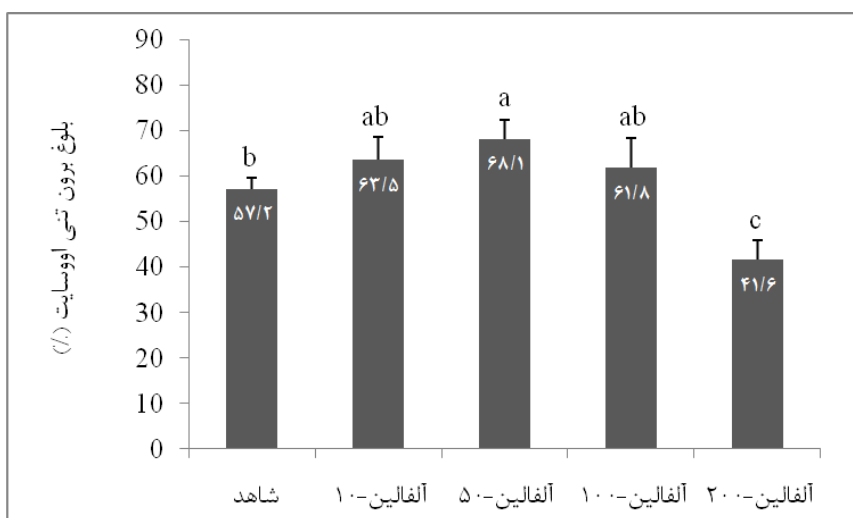
آزمون کای دو استفاده شد. برای مقایسه اختلاف تعداد کل سلول‌های بلاستوسیست و تعداد سلول‌های آپوتوز بلاستوسیست‌ها نیز بین دو گروه از آزمون t استفاده شد.

### نتایج

غلظت آلفالین مایع فولیکولی فولیکول‌های کوچک (۱/۸ میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر) به طور معناداری ( $P < 0/05$ ) کمتر از غلظت آلفالین در پلاسما (۲/۷ میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر) و مایع فولیکولی فولیکول‌های بزرگ (۲/۸ میلی



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



شکل ۲. اثر غلظت‌های مختلف آلفالین بر بلوغ هسته‌ای اووسایت‌های بزرگ در شرایط برون تنی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین)

## تولیدات دامی

دوره ۱۶ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۳

محمدجواد مرادی، علی اکبر خادم، سید احمد حسینی، آرش وشکینی، علی اسدی الموتی، عبدالله محمدی سنگ چشمه

جدول ۱. اثر آلفالین بر تکوین اووسایت های بز پس از پارتنوزن و لقاح برون تنی

تکوین رویان						گروه ها
تعداد اووسیت		تسهیم تعداد (%)		بلاستوسیت تعداد (%)		
پارتنوزن	لقاح	پارتنوزن	لقاح	پارتنوزن	لقاح	
۲۶۹	۱۰۴	۱۴۲ (۵۲/۸)	۵۸ (۵۵/۸) <sup>b</sup>	۶۵ (۱۶/۷) <sup>b</sup>	۱۴ (۱۳/۵) <sup>b</sup>	شاهد
۲۸۷	۱۱۳	۱۸۷ (۶۵/۲)	۷۷ (۶۸/۱) <sup>a</sup>	۷۲ (۲۵/۱) <sup>a</sup>	۲۹ (۲۵/۷) <sup>a</sup>	آلفالین-۵۰

a, b: تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنادار است ( $P < 0/05$ ).

جدول ۲. اثر آلفالین بر کیفیت بلاستوسیت های بز پس از لقاح برون تنی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد)

تعداد بلاستوسیت		کیفیت رویان		گروه ها
تعداد کل سلول های بلاستوسیت	تعداد سلول های آپوتوز بلاستوسیت	تعداد کل سلول های بلاستوسیت	تعداد سلول های آپوتوز بلاستوسیت	
۱۸		$110/8 \pm 4/6^a$	$4/2 \pm 2/0^a$	شاهد
۲۱		$115/2 \pm 8/0^b$	$3/1 \pm 1/2^b$	آلفالین-۵۰

a, b: تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنادار است ( $P < 0/05$ ).

## بحث

در این پژوهش، غلظت آلفالین در فولیکول های کوچک کمتر از غلظت آن در فولیکول های بزرگ بود که با نتایج دیگر تحقیقات مطابقت دارد (۳). فعالیت سوخت و سازی سلول های فولیکول آنترال تأثیر زیادی بر ترکیب محتوای آن دارد و احتمالاً در روند بلوغ آن ها اثر می گذارد. با توجه به نتایج حاصل از آزمایش اول، میانگین غلظت آلفالین در فولیکول های کوچک  $1/8$  میلی گرم در  $100$  میلی لیتر مایع فولیکولی ( $64/6$  میکرومولار) و در فولیکول های بزرگ  $2/8$  میلی گرم در  $100$  میلی لیتر مایع فولیکولی ( $100/6$  میکرومولار) برآورد شد. با توجه به این محدوده غلظت فیزیولوژیک طبیعی، برای آزمایش دوم غلظت های صفر،  $10$ ،  $50$ ،  $100$  و  $200$  میکرومولار آلفالین در محیط کشت بلوغ قرار گرفت و اثر این اسید چرب بر بلوغ برون تنی

تفاوت درصد تسهیم پس از پارتنوزن اووسایت ها بین گروه آلفالین-۵۰ ( $52/8$  درصد) و گروه شاهد ( $65/2$  درصد) معنادار نبود (جدول ۱). با این حال، بلاستوسیت های حاصل از گروه آلفالین-۵۰ ( $25/1$  درصد) به طور معناداری در روز هشتم، بیشتر از گروه شاهد ( $16/7$  درصد) بود ( $P < 0/05$ ). درصد تسهیم ( $68/1$  درصد) و درصد بلاستوسیت ( $25/7$  درصد) پس از لقاح برون تنی در گروه آلفالین-۵۰ بیش از گروه شاهد (به ترتیب  $55/8$  و  $13/5$  درصد) بود ( $P < 0/05$ ). تعداد سلول ها در بلاستوسیت های گروه آلفالین-۵۰ ( $115/2$ ) بیشتر از گروه شاهد ( $110/8$ ) ( $P < 0/05$ ) بود و بلاستوسیت های حاصل از این گروه سلول های آپوتوز کمتری ( $3/1$ ) در مقایسه با گروه شاهد ( $4/2$  سلول) داشتند ( $P < 0/05$ ).

## تولیدات دامی

دوره ۱۶ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۳

اثر افزودن اسید آلفا-لینولنیک به محیط کشت بلوغ برون تنی اووسایت بر توانایی تکوین و کیفیت رویان حاصل از پارتنوژنز و ...

درصد تسهیم اووسایت‌های گاوی ایجاد نکرده است (۲). لازم به ذکر است در مطالعه 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 برون تنی به محیط کشت اضافه شود.

آلفالین همچنین به طور معناداری درصد سلول‌های آپوپتوز را در بلاستوسیت‌های 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 بلاستوسیت‌ها را شاید بتوان به حذف گونه‌های فعال اکسیژن توسط آلفالین نسبت داد که با اکسید شدن زودتر خود مانع اکسایش ترکیبات حیاتی اووسایت‌ها می‌شوند.

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

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله 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.

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 برون تنی 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 مطالعه اثر این اسید چرب بر تکوین برون تنی 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 بلاستوسیت را نسبت به گروه شاهد افزایش داد. در این آزمایش، پس از لقاح برون تنی اووسیت‌ها نیز هم درصد تسهیم و هم درصد تولید بلاستوسیت 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 برون تنی اووسایت‌های گاو، تکوین برون تنی آن‌ها را بهبود می‌بخشد (۱۳). بهبود تکوین برون تنی را می‌توان به آثار مثبت آلفالین بر اووسایت‌ها در دوره بلوغ نسبت داد که در نهایت به تکوین بهتر اووسایت‌ها نیز منجر می‌شود. احتمالاً، آلفالین با افزایش سریع غلظت cAMPi در اووسایت‌ها، فسفریله شدن 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- مرکاپتوتانول در محیط کشت رویان، بهبودی در

### تولیدات دامی

دوره ۱۶ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۳

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



اثر افزودن اسید آلفا-لینولنیک به محیط کشت بلوغ برون تنی اووسایت بر توانایی تکوین و کیفیت رویان حاصل از پارتنوژنز و ...

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