دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

بررسی فولیکول‌های آنترال تخمدانی برای تعیین غلظت اسید آلفا- لینولنیک موثر بر توانایی تکوین برون‌تنی اووسایت‌های بز

آرش وشکینی[۱]، عبدالله محمدی سنگ چشمه[۲]، علی‌اکبر خادم[۳]، علی اسدی الموتی[۴] و مهدی خدایی‌مطلق[۵]

۱، ۳ و ۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران
۲- استادیار، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، (نویسنده مسوول: amohammadis@ut.ac.ir)
۵- استادیار، گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اراک

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۱۸

چکیده

اسیدهای چرب غیراشباع با چند باند دوگانه فزون بر نقش انرژی‌زایی با تاثیر بر بافت‌های تولیدمثلی از جمله اثر بر فولیکول‌های تخمدان و جسم زرد و همین‌طور مهیا نمودن پیش‌سازهای سنتز ترکیباتی نظیر استروئیدها و پروستاگلاندین‌ها بر تولیدمثل موثر هستند. در این مطالعه اسید آلفا-لینولنیک (آلفالین) به محیط کشت بلوغ برون تنی اووسایت‌های بز افزوده شد تا اثر آن بر توانایی تکوین آنها بررسی شود. لذا، ابتدا مایع فولیکولی از فولیکول‌های کوچک و بزرگ تخمدان‌های بز جمع‌آوری شد تا مقدار آلفالین آنها به روش کروماتوگرافی گازی اندازه گیری شود. نتایج این آزمایش اولیه نشان داد که غلظت آلفالین از فولیکول‌های کوچک (۶۴/۶ میکرومولار) به فولیکول‌های بزرگ (۱۰۰/۶ میکرومولار) افزایش یافت (P<۰/۰۵). سپس با توجه به غلظت آلفالین در مایع فولیکولی فولیکول‌های کوچک و بزرگ، اووسایت‌ها در حضور غلظت های صفر (شاهد)، ۱۰ (آلفالین-۱۰)، ۵۰ (آلفالین-۵۰)، ۱۰۰ (آلفالین-۱۰۰) و ۲۰۰ (آلفالین-۲۰۰) میکرومولار کشت داده شدند. ۲۴ ساعت پس از بلوغ برون تنی، گسترش سلول‌های کومولوس اووسایت ها و راندمان رسیدن آنها به مرحله‌ی متافاز میوز-۲ بررسی شد. در ادامه اووسایت‌های تیماری از آلفالین که بیشترین بلوغ برون تنی را نشان داد به روش پارتنوژنز فعال شدند و درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست آنها با گروه شاهد مقایسه شد. داده‌ها در هر مرحله ثبت و به روش آزمون مقایسه‌ی میانگین‌ها و یا کای دو با استفاده از نرم‌افزار SAS آنالیز شدند. افزودن آلفالین به محیط کشت بلوغ برون‌تنی اووسایت‌ها اثری بر گسترش سلول‌های کومولوس نداشت (P>۰/۰۵) و تنها در بیشترین غلظت (آلفالین-۲۰۰) مقدار گسترش سلول‌های کومولوس را کاهش داد (P<۰/۰۵). درصد بلوغ برون تنی اووسایت‌ها در گروه آلفالین-۵۰ افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد (۶۸/۱٪ در مقابل ۵۷/۲٪). افزودن ۵۰ میکرومولار آلفالین به محیط کشت بلوغ برون تنی اووسایت‌ها همچنین درصد تسهیم (۶۵/۲٪) و تولید بلاستوسیست (۲۵/۱٪) را در مقایسه با گروه شاهد بهبود بخشید (به ترتیب ۵۲/۸٪ و ۱۶/۷٪، P<۰/۰۵). به طور کلی، نتایج این مطالعه‌ی نشان داد که افزودن غلظت مناسب آلفالین به محیط کشت بلوغ برون تنی می‌تواند راندمان بلوغ، درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست را در اووسایت‌های بز افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: اسید آلفا-لینولنیک، اووسایت، بلاستوسیست، بلوغ برون تنی، مایع فولیکولی

www.SID.ir

مقدمه

تغذیه یکی از عوامل تاثیرگذار بر موفقیت تولیدمثل در پستانداران می‌باشد و می‌تواند با تاثیر بر محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- تخمدان در تنظیم مسیرهای مربوط به رشد فولیکولی و تخمک‌ریزی نقش خود را ایفا نماید (۳).

تاکنون مطالعه های تغذیه‌ای گسترده‌ای با هدف بهبود عملکرد تولیدمثل بویژه در گاوهای شیری انجام شده است. مطالعه ارتباط بین بالانس منفی انرژی[1] و کاهش عملکرد تولیدمثل (۲)، بررسی ارتباط بین غلظت زیاد پروتئین جیره و کاهش بهره‌وری تولیدمثل (۴)، و مطالعه ارتباط بین افزودن انواع ویتامین‌ها به خوراک دام‌ها و بهبود عملکرد تولیدمثل آنها (۵)، مثال‌هایی از این دست هستند. یکی از محدودیت‌های اصلی در باروری نشخوارکنندگان مشکل بالانس منفی انرژی در اثر تولید شیر و مصرف مواد غذایی کمتر از حد مطلوب برای جبران انرژی مصرفی توسط این حیوانات می‌باشد (۲). بالانس منفی انرژی می‌تواند بر رشد فولیکول، بلوغ اووسایت و تغییر ترکیب مایع فولیکولی که تغییر اسیدهای چرب نیز شامل آن می‌شود، تاثیرگذار باشد (۶).

افزایش مقدار چربی جیره در جیره‌هایی با انرژی زیاد، شدت بالانس منفی انرژی را خواهد کاست و شواهد اخیر از تاثیر مثبت افزودن چربی در خوراک دام‌ها و تاثیر مثبت آن بر باروری حمایت می‌کند (۸). همچنین نشان داده شده است که محافظت چربی‌ها در مقابل بیوهیدروژناسیون شکمبه‌ای اثرات مفیدی بر متابولیسم انرژی و عملکرد تخمدان‌ها خواهد داشت (۹). **فزون** بر افزایش ذخیره انرژی، اسیدهای چرب، به عنوان پیش‌ساز چربی‌ها، با تعدیل تولید پروستاگلاندین‌ها، استروئیدسازی[2]، حفظ ویژگی‌های غشای سلولی و متابولیسم کلسترول بر تولیدمثل موثر هستند (۱۰). بنابراین، اثرات مثبت افزودن چربی به جیره‌ی نشخوارکنندگان می‌تواند فراتر از بهبود دسترسی انرژی، به دلیل اثر خاص اسیدهای چرب بر سازوکارهای یاد شده باشد.

مطالعات اخیر تاثیر اسیدهای چرب غیراشباع با چند باند دوگانه[3] به ویژه اسیدهای چرب متعلق به خانواده‌ی امگا-۳ و خانواده‌ی امگا-۶ را بر توانایی تکوین اووسایت نشان داده‌اند. اسیدهای چرب غیراشباع با چند باند دوگانه به علت ساختار ویژه‌ی خود دارای اهمیت زیادی می‌باشند. در این راستا نتایج مطالعه های متعدد نشان داده است که این اسیدهای چرب می‌توانند بر عملکرد تولیدمثلی و باروری نشخوارکنندگان موثر باشند (۱۳). با این حال در بسیاری از مطالعه‌های انجام شده در گونه‌های مختلف، نتایج ضد و نقیضی در این رابطه گزارش شده است (۱۸،۱۷).

به دلیل انواع متعدد اسیدهای چرب و نیز تعداد زیاد مسیرهایی که اسیدهای چرب غیراشباع با چند باند دوگانه در آنها دخیل هستند، مطالعه‌های انجام شده تنها قادر به تمرکز روی بخش محدودی از این جنبه‌ها بوده‌اند و سوالات زیادی در ارتباط با اثرات

1- Negative energy balance (NEB) 2- Steroidogenesis 3- Polyunsaturated fatty acid (PUFA)

Archive of SID

www.SID.ir

متقابل این اسیدهای چرب بر تخمدان، فولیکول و اووسایت بی‌پاسخ مانده است.

اخیراً با پیشرفت فن آوری‌های تولید برون‌تنی رویان، مطالعه‌های مرتبط با تغذیه و تاثیر عوامل تغذیه‌ای بر توانایی تکوین اووسایت‌های جمع آوری شده از حیواناتی که به عنوان دهنده اووسایت[1] مورد استفاده قرار می‌گیرند، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این رابطه نشان داده شده است که تغذیه‌ی با اسیدهای چرب غیراشباع با چند باند دوگانه بر راندمان بلوغ برون‌تنی اووسایت‌ها اثر می گذارد، به طوری که این اثر با تغذیه اسید لینولئیک منفی و با تغذیه اسید لینولنیک مثبت گزارش شده است (۱۸).

بنابراین مطالعه‌ی حاضر طراحی شد تا اثر افزودن اسید آلفا- لینولنیک (آلفالین) بر بلوغ برون‌تنی اووسایت‌های بز و متعاقب آن بر راندمان تکوین آنها پس از پارتنوژنز[2] ارزیابی شود. اما پیش از آن برای تعیین غلظت فیزیولوژیک آلفالین در مایع فولیکولی، غلظت این اسید چرب با بررسی فولیکول‌های کوچک و بزرگ تخمدان به دست آمد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری مایع فولیکولی برای تعیین غلظت اسیدهای چرب

به منظور استفاده از محدوده غلظتی موثر آلفالین در محیط کشت بلوغ برون‌تنی اووسایت‌ها، غلظت اسیدهای چرب فولیکول‌های آنترال به ویژه غلظت آلفالین مایع فولیکولی تخمدان بز با در نظر داشتن اثر اندازه فولیکول‌ها، در آزمایشگاه تغذیه دانشگاه شهید بهشتی اندازه‌گیری شد. به این منظور تخمدان‌های بز از کشتارگاه پوریای شرق واقع در جاده خاوران تهران جمع‌آوری شدند و در محلول سرم فیزیولوژیک گرم (۳۲-۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد) حداکثر تا ۲ ساعت پس از کشتار به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از انتقال، فولیکول‌های آنترال روی تخمدان به ۲ گروه فولیکول‌های کوچکتر از ۲ میلی‌متر و فولیکول‌های بزرگتر از ۶ میلی‌متر دسته‌بندی شدند. از هر گروه از فولیکول‌ها مقدار ۱ میلی‌لیتر مایع فولیکولی بوسیله‌ی سرنگ ۱۰ و روش آسپیراسیون جمع آوری شد. سپس نمونه‌ها در دور ۱۰۰۰۰ و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع فولیکولی از پلت تشکیل شده در زیر مایع که دارای سلول‌ها و بافت‌های فولیکولی بود جدا شد و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش‌های مربوطه فریز شد (۱۶).

تفکیک‌سازی کروماتوگرافی گازی

غلظت آلفالین در نمونه‌های مایع فولیکولی با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی در انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذائی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی اندازه‌گیری شد. ترکیب اسیدهای چرب نمونه‌ها روی یک گاز کروماتوگراف (مدل HP) با مقایسه با زمان ابقای آنها با استاندارد متیل استر اسیدهای چرب تعیین شد (۱۹).

1- Oocyte donor

2- Parthenogenetic activation

Archive of SID

www.SID.ir

جمع آوری اووسایت‌ها و رتبه‌بندی آنها

بلافاصله پس از انتقال تخمدان‌ها به آزمایشگاه، تخمدان‌ها چندین بار با محلول سرم فیزیولوژیک گرم (۳۲-۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد) شستشو داده شدند و بافت‌های اضافه‌ی آنها برداشته شد. سپس اووسایت‌ها با استفاده از روش برش برش دادن جمع‌آوری و بر اساس ریخت شناسی خود (۲۱) به صورت زیر رتبه‌بندی شدند:

(الف) کیفیت بسیار خوب: اووسایت‌های با بیش از ۴ لایه سلول کومولوس فشرده و سیتوپلاسم همگن.

(ب) کیفیت خوب: اووسایت‌های با حداقل ۲ تا ۴ لایه سلول کومولوس فشرده و سیتوپلاسم همگن.

(ج) کیفیت نسبتا خوب: اووسایت‌های با ۱ لایه سلول کومولوس فشرده و سیتوپلاسم همگن.

(د) کیفیت ضعیف: اووسایت‌های بدون سلول کومولوس، با لایه‌ی ناقص سلول‌های کومولوس و یا کومولوس‌های پخش شده با سیتوپلاسم غیرهمگن. پس از جمع‌آوری و رتبه‌بندی، فقط اووسایت‌های با کیفیت بسیار خوب و خوب برای انجام کلیه آزمایش‌ها انتخاب شدند.

بلوغ برون تنی اووسایت‌ها

برای بلوغ برون‌تنی، اووسایت‌ها ۳ بار در محیط کشت TCM+Hepes و ۳ بار هم در محیط کشت M-199 دارای ۲۵ میلی‌مولار NaHCO3، ۰/۶٪ fatty acid-free BSA، ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر FSH، ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر LH، ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر 17β-estradiol، ۲۰ نانوگرم در میلی لیتر EGF شستشو داده شدند و در پایان در گروه‌های ۱۰ تایی در قطره‌های ۱۰۰ میکرولیتری از همین محیط کشت (که در زیر روغن معدنی قرار داشت) منتقل شدند. سپس پلیت دارای اووسایت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۸/۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2، ۵ درصد O_2 و ۹۰ درصد N_2 در شرایط حداکثر رطوبت قرار گرفت.

ارزیابی گسترش سلول‌های کومولوس

۲۴ ساعت پس از بلوغ برون‌تنی، اووسایت‌ها از انکوباتور خارج شدند و پراکندگی سلول‌های کومولوس آنها در زیر میکروسکوپ لوپ ارزیابی و به سه دسته گسترده، تاحدی گسترده، و یا ناگسترده تقسیم‌بندی شد.

ارزیابی بلوغ هسته‌ای اووسایت ها پس از بلوغ برون‌تنی

پس از بلوغ برون‌تنی، گروهی از اووسایت‌ها برای ارزیابی وضعیت هسته‌ای و آزاد شدن جسم قطبی[1] رنگ‌آمیزی شدند. ابتدا اووسایت‌ها با کمک آنزیم هیالورونیداز ۰/۱٪ (۱۰۰ واحد بین المللی در میلی لیتر) از سلول‌های کومولوس جدا شدند[2] و سپس با پارافرمالدئید ۴٪ برای ۲۰ دقیقه تثبیت شدند. هسته اووسایت‌های تثبیت شده سپس با قرار گرفتن در رنگ هوخست[3] (۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) برای ۷ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. اووسایت‌های رنگ آمیزی شده دوباره شستشو شدند، روی لام قرار گرفتند و به وسیله میکروسکوپ فلورسنت برای تعیین وضعیت هسته‌ای ارزیابی شدند (شکل ۱).

1- Polar body 2- Denudation 3- Hoechst

Archive of SID

www.SID.ir

اووسایت‌ها بر اساس وضعیت هسته‌ای خود در یکی از ۴ گروه زیر قرار گرفتند:
۱) مرحله‌ی GV[1] (شکل ۱. الف)
۲) مرحله‌ی GVBD[2] (شکل ۱. ب)
۳) مرحله‌ی MI[3] (شکل ۱. ج)
۴) مرحله‌ی MII[4] (شکل ۱. د)

اووسایت‌های مراحل GV، GVBD و MI به عنوان اووسایت‌های نابالغ و اووسایت‌های مرحله MII به عنوان اووسایت‌های بالغ در نظر گرفته شدند و درصد بلوغ با تقسیم اووسایت‌های بالغ به کل اووسایت‌های کشت داده شده محاسبه شد.

پارتنوژنز اووسایت و کشت رویان

۲۴ ساعت پس از از شروع بلوغ برون تنی، گروهی از اووسایت‌ها با کمک آنزیم هیالورونیداز ۰/۱٪ (۱۰۰ واحد بین المللی در میلی لیتر) از سلول‌های کومولوس اطراف خود جدا شدند. اووسایت‌ها سپس در محیط کشت TCM-Hepes دارای ۱۰ درصد FBS و ۲/۵ میکرومولار یونومایسین به مدت ۱ دقیقه قرار داده شدند. پس از این اووسایت‌ها در محیط کشت CR1 دارای ۱۰ درصد FBS و ۲ میلی‌مولار ۶- دی متیل آمینو پورین برای مدت ۳ ساعت فعال شدند و در محیط CR1 دارای ۱۰ درصد FBS، ۱۰ میکرولیتر در میلی لیتر اسیدهای آمینه غیرضروری و ۲۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر اسیدهای آمینه ضروری برای مدت ۸ روز در پلیت چهارخانه در انکوباتور با دمای ۳۸/۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2، ۵ درصد O_2 و ۹۰ درصد N_2 در شرایط حداکثر رطوبت کشت داده شدند. درصد تسهیم ۳ روز پس از کشت و درصد تولید بلاستوسیست در روز ۸ پس از کشت، محاسبه و ثبت شد.

طرح آزمایش‌ها

آزمایش ۱: تعیین غلظت اسیدهای چرب مایع فولیکولی

نمونه‌های مایع فولیکولی از فولیکول‌های بزرگ (< ۶ میلی‌متر) و کوچک (< ۲ میلی‌متر) گرفته شد و برای تعیین ترکیب اسیدهای چرب به روش تفکیک‌سازی کروماتوگرافی گازی به آزمایشگاه فرستاده شد. سپس مقادیر اسیدهای چرب به دست آمده شامل مقدار آلفالین فولیکول‌های بزرگ و کوچک با هم مقایسه شد.

آزمایش ۲: اثر آلفالین بر گسترش سلول‌های کومولوس اووسایت‌های بز

برای مطالعه تاثیر آلفالین بر گسترش سلول‌های کومولوس، با توجه به نتایج حاصل از آزمایش ۱، اووسایت‌ها در حضور غلظت‌های ۱۰ (آلفالین-۱۰)، ۵۰ (آلفالین-۵۰)، ۱۰۰ (آلفالین-۱۰۰) و ۲۰۰ (آلفالین-۲۰۰) مایکرومولار آلفالین در محیط بلوغ برون‌تنی قرار گرفتند. یک گروه از اووسایت‌ها هم در محیط کشت بلوغ فاقد آلفالین، به‌عنوان گروه شاهد کشت داده شدند.

۲۴ ساعت پس از کشت بلوغ، گسترش سلول‌های کومولوس اووسایت‌ها به سه دسته گسترده، تاحدی گسترده و یا ناگسترده رتبه‌بندی شد.

1- Germinal vesicle
2- Germinal vesicle break down
3- Metaphase-I
4- Metaphase-II

Archive of SID

www.SID.ir

آزمایش ۳: اثر آلفالین بر بلوغ برون‌تنی اووسایت‌های بز

برای مطالعه تاثیر آلفالین بر بلوغ برون تنی، اووسایت‌های تیمارهای آلفالین-۱۰، آلفالین-۵۰، آلفالین-۱۰۰ و آلفالین-۲۰۰ و همچنین اووسایت‌های گروه شاهد پس کشت بلوغ، از سلول‌های کومولوس اطراف خود جدا شدند و با رنگ هوخست رنگ‌آمیزی شدند و در زیر میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند.

آزمایش ۴: اثر آلفالین بر قابلیت تکوین اووسایت‌های بز

بر اساس نتایج حاصل از آزمایش ۳، اووسایت‌های تیماری که بهترین درصد بلوغ برون تنی را نشان داد، به همراه اووسایت‌های گروه شاهد، از سلول‌های کومولوس اطراف خود جدا شدند و به روش پارتنوژنز فعال شدند تا اثر آلفالین بر قابلیت تکوین اووسایت‌های بز مورد ارزیابی قرار گیرد. در روز ۳ و روز ۸ پس از پارتنوژنز به ترتیب درصد تسهیم و درصد تولید بلاستوسیست محاسبه و ثبت شد.

آنالیز آماری

داده‌های مربوط به غلظت اسیدهای چرب با استفاده از نرم‌افزار SAS و رویه‌ی آماری General Linear Model و آزمون مقایسه‌ی میانگین‌ها آنالیز شدند. برای مقایسه درصد بلـوغ، درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست نیز از آزمون کای دو[1] استفاده شد. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

آزمایش ۱: تعیین غلظت اسیدهای چرب مایع فولیکولی

۲۳ اسید چرب در مایع فولیکولی قابل تمایز بود که از بین آنها، ۲۰ اسید چرب قابل اندازه‌گیری بود که شامل طیفی از اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع با یک پیوند دوگانه و خانواده‌ی اسیدهای چرب غیراشباع امگا-۳ و امگا-۶ بود (جدول ۱). مقایسه‌ی اسیدهای چرب مایع فولیکولی فولیکول‌های بزرگ و کوچک نشان داد که غلظت آلفالین به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) از ۱/۸ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر در فولیکول‌های کوچک به ۲/۸ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر در فولیکول‌های بزرگ افزایـش یـافت.

آزمایش ۲: اثر آلفالین بر گسترش سلول های کومولوس اووسایت‌های بز

جدول ۲ نتایج مربوط به گسترش سلول‌های کومولوس اووسایت‌های تیمارهای مختلف آلفالین (۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) را پس از ۲۴ ساعت کشت بلوغ در مقایسه با گروه شاهد نشان می‌دهد. تاثیر غلظت‌های مختلف آلفالین در غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ بـر گسـترش سلول‌هـای کومولوس معنی‌دار ($p>۰/۰۵$) نبود و تنها در غلظت ۲۰۰ میکرومولار آلفالین فراوانی اووسایت‌های با کومولوس گسترده به طـور مـعنـی‌داری ($p<۰/۰۵$) در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت (۴۰/۷٪ در مقابل ۶۰٪) و بر خلاف آن فراوانی

1- Chi-square

Archive of SID

www.SID.ir

اووسایت‌های با کومولوس ناگسترده در مقایسه با گروه شاهد به طـور مـعنـی‌داری ($p<۰/۰۵$) افزایش یافت (۳۸/۹٪ در مقابل ۵/۷٪، $p<۰/۰۵$).

جدول ۱- اسیدهای چرب مایع فولیکولی فولیکول‌های کوچک و بزرگ تخمدان بز

اسیدهای چرب	فولیکول‌های کوچک (< ۲ میلی‌متر)	فولیکول های بزرگ (> ۶ میلی‌متر)	*P-value*
C14:0	۰/۵ ± ۰/۱	۳/۳ ± ۰/۴	۰/۰۲
C14:1	۰/۸*	۰/۷*	-
C15:0	۰/۵ ± ۰/۱	۰/۴ ± ۰/۱	NS
C16:0	۱۳/۳ ± ۲/۵	۲۴/۷ ± ۱/۳	NS
C16:1	۰/۹ ± ۰/۱	۱/۶ ± ۰/۱	۰/۰۲
C17:0	۱/۶ ± ۰/۲	۱/۰ ± ۰/۲	NS
C17:1	۰/۴ ± ۰/۱	۰/۴ ± ۰/۱	NS
C18:0	۱۰/۰ ± ۰/۸	۱۴/۸ ± ۰/۲	۰/۰۲
C18:1n9c	۱۷/۸ ± ۲/۵	۲۱/۴ ± ۰/۵	NS
C18:1n11c	۱/۹ ± ۰/۱	۱/۶ ± ۰/۰	۰/۰۳
C19:0 IS	ND	ND	-
C18:2n6c	۱۶/۲ ± ۰/۷	۱۶/۴ ± ۲/۲	NS
C20:0	۰/۷ ± ۰/۰	۰/۶ ± ۰/۱	NS
C18:3n6	۰/۲ ± ۰/۰	۰/۲ ± ۰/۰	NS
C20:1	۰/۵ ± ۰/۱	ND	-
C18:3n3	۱/۸ ± ۰/۱	۲/۸ ± ۰/۰	۰/۰۰۷
C22:0	ND	ND	-
C20:3n6	۰/۳ ± ۰/۰	۰/۵ ± ۰/۱	NS
C22:1n9	۱۶/۸ ± ۱/۹	۱۶/۹ ± ¼	NS
AA-C20:4n6	۴/۵ ± ۰/۲	۴/۳ ± ۰/۲	NS
EPA-C20:5n3	۱/۲ ± ۰/۰	۱/۰ ± ۰/۱	NS
C24:1	ND	ND	-
DHA-C22:6n3	۱/۱ ± ۰/۰	۱/۲ ± ۰/۱	NS
n-6:n-3	۵/۱ ± ۰/۲	۴/۳ ± ۰/۳	NS

داده‌ها به صورت میانگین (میلی‌گرم/ ۱۰۰ میلی لیتر) ± خطای استاندارد میانگین بیان شده‌اند.

ND: مقدار اسید چرب اندازه‌گیری نشده است.

*: اطلاعات فقط مربوط به یک نمونه است.

جدول ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف اسید آلفا- لینولنیک بر پراکندگی سلول‌های کومولوس اووسایت‌های بز پس از بلوغ برون تنی

		پراکندگی سلول‌های کومولوس تعداد (٪)		
تیمار	تعداد	گسترده	تاحدی گسترده	تاگسترده
شاهد	۱۷۵	۱۰۵ (۶۰)^{a}	۶۰ (۳۴/۳)^{a}	۱۰ (۵/۷)^{b}
آلفالین-۱۰	۱۰۴	۶۸ (۶۵/۴)^{a}	۳۰ (۲۸/۸)^{ab}	۶ (۵/۸)^{b}
آلفالین-۵۰	۱۸۲	۱۲۵ (۶۸/۷)^{a}	۵۱ (۲۸)^{ab}	۶ (۳/۳)^{b}
آلفالین-۱۰۰	۱۳۱	۸۵ (۶۴/۹)^{a}	۴۱ (۳۱/۳)^{ab}	۵ (۳/۸)^{b}
آلفالین-۲۰۰	۱۱۳	۴۶ (۴۰/۷)^{b}	۲۳ (۲۰/۴)^{b}	۴۴ (۳۸/۹۳)^{a}

$^{a, b}$حروف نامتشابه در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ است.

Archive of SID

www.SID.ir

آزمایش ۳: اثر آلفالین بر بلوغ برون‌تنی اووسایت‌های بز

اطلاعات مربوط اثر آلفالین بر بلوغ برون تنی اووسایت‌های بز در جدول ۳ آورده شده است. همانطور که نتایج نشان می‌دهد اووسایت های تیمار ۵۰ میکرومولار آلفالین به طـور معنـی‌داری ($p<۰/۰۵$) اووسایت‌های بالغ بیشتری نسبت به گروه شاهد داشتند (۶۸/۱٪ در مقابل ۵۷/۲٪).

پایین‌ترین درصد بلوغ مربوط به تیمار ۲۰۰ مـیکرومولار آلفالین بود و اووسایت‌های این تیمار به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) درصد بلوغ کمتری را در مقایسه با گروه شاهد داشتند (۴۱/۶٪ در مقابل ۵۷/۲٪).

جدول ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف اسید آلفا- لینولنیک بر بلوغ هسته‌ای اووسایت‌های بز پس از بلوغ برون‌تنی

تیمار	تعداد	وضعیت هسته‌ای تعداد (٪)			
		GV	GVBD	MI	MII
شاهد	۱۷۳	۷ (۴)^{a}	۲۵ (۱۴/۵)^{ab}	۴۲ (۲۴/۳)^{ab}	۹۹ (۵۷/۲)^{b}
آلفالین- ۱۰	۱۰۴	۰ (۰)^{b}	۷ (۶/۷)^{b}	۳۱ (۲۹/۸)^{ab}	۶۶ (۶۳/۵)^{ab}
آلفالین- ۵۰	۱۸۲	۰ (۰)^{b}	۲۱ (۱۱/۶)^{ab}	۳۷ (۲۰/۳)^{b}	۱۲۴ (۶۸/۱)^{a}
آلفالین- ۱۰۰	۱۳۱	۰ (۰)^{b}	۱۳ (۹/۹)^{ab}	۳۷ (۲۸/۲)^{ab}	۸۱ (۶۱/۸)^{ab}
آلفالین- ۲۰۰	۱۱۳	۱۰ (۸/۹)^{a}	۲۰ (۱۷/۷)^{a}	۳۶ (۳۱/۹)^{a}	۴۷ (۴۱/۶)^{c}

a, b, c: حروف نامتشابه در هر ستون، دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ هستند.

آزمایش ۴: اثر آلفالین بر قابلیت تکوین اووسایت‌های بز

تیمار ۵۰ میکرومولار آلفالین نه تنها درصد تسهیم را بهبود بخشید بلکه این اثر مثبت در درصد تولید بلاستوسیست هم مشاهده شد (جدول ۴). تیمار ۵۰ میکرومولار آلفالین به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) درصد تسهیم را از ۵۲/۸٪ در گروه شاهد به ۶۵/۲٪ در گروه آلفالین- ۵۰ افزایش داد و درصد تولید بلاستوسیست نیز (۲۵/۱٪) در این گروه از گروه شاهد (۱۶/۷٪) بیشتر بود ($p<۰/۰۵$).

در این مطالعه، در ۲۳ اسید چرب در مایع فولیکولی بز قابل شناسایی، اندازه‌گیری و بیان عددی بود. از این تعداد، اسیدهای چرب عمده‌ی مایع فولیکولی بز شامل اسید لینولئیک، اسید اولئیک، اسید استئاریک، اسید پالمتیک، اسید آراشیدونیک و اسید لینولنیک بودند. نتایج مشابه در ترکیب مایع فولیکولی گاو مشاهده شد به طوری که بندر و همکاران (۶) گزارش کردند چه در گاو و چه در تلیسه، اسیدهای چرب غالب در مایع فولیکولی فولیکول‌های پیش از تخمک ریزی شامل اسید لینولئیک، اسید اولئیک، اسید استئاریک، اسید پالمتیک و اسید لینولنیک می‌باشند. نسبت اسیدهای چرب خانـوادهی امگا-۳/ امگا-۶ در مـایع فـولیـکولی فولیکول‌هـای بـزرگ و کوچک بـز نشان داد که این نسبت از فولیکول‌های کوچک به بزرگ کاهش یافت. افزون بر این غلظت اسیـدهـای چـرب خـانـوادهی ω-3 در مایع فولیکولی فولیکول‌های کوچک و بزرگ متفاوت بود. کاهش

Archive of SID

www.SID.ir

نسبت اسیدهای چرب خانوادهی امگا-۳/ امگا-۶ به دنبال رشد فولیکول در گاو، احتمالاً از افزایش نیاز اووسایت به خانوادهی امگا-۳ حکایت دارد، البته همین روند در تلیسهها هم مشاهده شد.

با توجه به نتایج متناقض به دست آمده در پی استفاده از منابع اسیدهای چرب خانوادهی امگا-۳ بر راندمان باروری (۱۳) چایلدز و همکاران (۱۴) پیشنهاد کردند که برای مطالعه اثر اسیدهای چرب خانوادهی امگا-۳، هر یک از آنها باید به طور جداگانه با در مد نظر قرار دادن طول زنجیره، درجهی اشباعیت و غلظت مناسب مورد بررسی قرار گیرند.

با توجه به نتایج حاصل از آزمایش ۱ و با تبدیل غلظت آلفالین از میلی گرم/۱۰۰ میلیلیتر به مولار، غلظت این اسید چرب در فولیکولهای کوچک و بزرگ به ترتیب حدود ۶۴/۶ و ۱۰۰/۶ میکرومولار خواهد شد. لذا در این مطالعه برای الگو برداری از شرایط فیزیولوژیک، غلظتهای ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ مایکرومولار آلفالین در کنار غلظت صفر (شاهد) مورد استفاده قرار گرفت. استفاده از غلظتهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار آلفالین در محیط کشت بلوغ برون‌تنی اووسایت‌ها اثری بر گسترش سلول‌های کومولوس پس از بلوغ نداشت در حالی که غلظت ۲۰۰ مایکرومولار آلفالین فراوانی اووسایت‌های با سلول‌های کومولوس گسترده را کاهش داد. این نتایج با نتایج کویرال کاستل (۱۵) که گزارش کرد کشت سلول‌های گرانولوزای بز با غلظت‌های مختلف آلفالین از ۰ تا ۵۰۰ میکرومولار نتایج متفاوتی روی نرخ زنده‌مانی آنها دارد همسو است. در مطالعه کویرال کاستل نشان داده شد که غلظت‌های بیشتر از ۱۰۰ میکرومولار آلفالین زنده‌مانی سلول‌های گرانولوزا را پس از ۲۴ ساعت کشت کاهش می‌دهد در حالی که غلظت‌های کمتر از ۱۰۰ میکرومولار آلفالین اثری در زنده‌مانی سلول‌های گرانولوزا ندارد (۱۵).

در این مطالعه آلفالین در غلظت ۵۰ میکرومولار بلوغ هسته‌ای اووسایت‌ها را در مقایسه با گروه شاهد افزایش داد، در حالی که غلظت‌های بیشتر (۱۰۰ میکرومولار) تاثیر مثبتی بر بلوغ هسته‌ای اووسایت‌ها بز نداشت و حتی در بیشترین غلظت (۲۰۰ میکرومولار) این اثر منفی بود. این نتایج با یافته‌های ماری و همکاران (۱۸) که نشان دادند آلفالین در غلظت ۵۰ میکرومولار بلوغ هسته‌ای اووسایت‌های گاو را بهبود می بخشد همخوانی دارد.

بلوغ بهینه اووسایت لازمه تکوین مناسب رویان است. تجمع پروتئین و RNA در طول بلوغ اووسایت برای فعال‌سازی مناسب ژنوم رویان امری ضروری است (۲۰). بهترین گروه تیماری از لحاظ آماری (آلفالین-۵۰) درصد تسهیم و درصد تولید بلاستوسیست را در مقایسه با گروه شاهد افزایش داد. این نتایج با نتایج ماری و همکاران (۱۸) که نشان دادند آلفالین در غلظت ۵۰ میکرومولار درصد تسهیم و درصد تولید بلاستوسیت اووسایت‌های گاو را بهبود بخشید، در مطابقت دارد. اگرچه، در مطالعه‌ای دیگر ال- دارویچ و همکاران (۱) با استفاده از غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار آلفالین به همراه بتا- مرکاپتانول[1] در محیط کشت رویان (mSOF)[2] تفاوتی در درصد تسهیم

1- β-mercaptoethanol

2- Modified synthetic oviduct fluid

Archive of SID

www.SID.ir

و درصد تولید بلاستوسیست مشاهده نکردند و آلفالین تنها توانست زنده‌مانی رویان‌ها را پس از فرآیند انجماد- یخ گشایی افزایش دهد. این نتایج شاید به دلیل تاخیر صورت گرفته در استفاده از آلفالین باشد، زیرا همانطور که بحث شد افزودن آلفالین به محیط بلوغ برون‌تنی احتمالا موثرتر از زمانی خواهد بود که به محیط کشت رویان افزوده شود.

اثرات سودمند افزودن آلفالین را احتمالا بتوان مرتبط با افزایش سنتز PGE2، افزایش غلظت‌های cAMPi و افزایش فسفریلاسیون MAPK1 و MAPK3 در کمپلکس‌های اووسایت کومولوس عنوان کرد (۱۸).

به عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان اینگونه بیان نمود که افزودن آلفالین به مقدار ۵۰ میکرومولار در محیط کشت بلوغ برون‌تنی می‌تواند بلوغ هسته‌ای را در اووسایت‌های بز افزایش دهد و درصد تسهیم و تولید بلاستوسیست را بهبود بخشد، بنابراین، تامین غلظت مناسب آلفالین احتمالا می‌تواند بر راندمان تولیدمثلی بز نیز موثر باشد هرچند این فرضیه نیازمند پژوهش‌های بیشتری در شرایط درون تنی است.

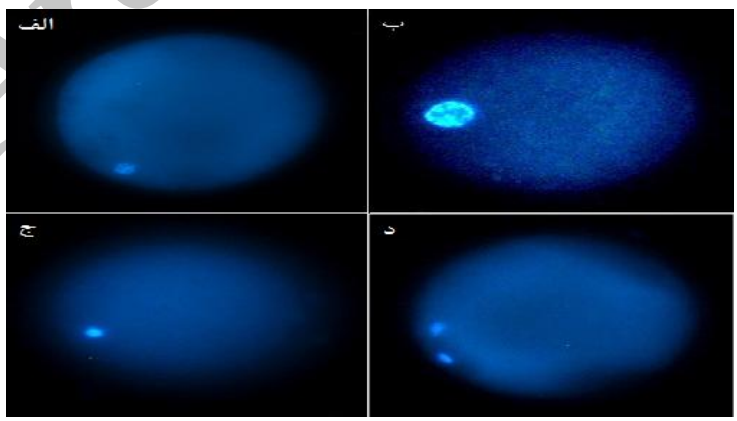
تشکر و قدردانی

از حمایت مادی و معنوی ریاست و مدیریت پژوهشی مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته در انجام این طرح پژوهشی تشکر و قدردانی می‌شود.

جدول ۴- تاثیر اسید آلفا-لینولنیک بر تکوین اووسایت های بز پس از پارتنوژنز در شرایط برون تنی

تیمار	تعداد	تکوین رویانی تعداد (٪)	
		تسهیم	بلاستوسیست
شاهد	۲۶۹	۱۴۲ (۵۲/۸)[b]	۴۵ (۱۶/۷)[b]
آلفالین-۵۰	۲۸۷	۱۸۷ (۶۵/۲)[a]	۷۲ (۲۵/۱)[a]

[a, b]حروف نامتشابه در هر ستون، دارای اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ هستند.



شکل ۱- بلوغ هسته‌ای اووسایت‌های بز در شرایط برون تنی. اووسایت‌ها به وسیله رنگ هوخست رنگ آمیزی و بر اساس وضعیت هسته خود در یکی از چهار دسته (الف) GV، (ب) GVBD، (ج) MI، (د) MII قرار گرفتند.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1. Al Darwich, A., C. Perreau, M.H. Petit, P. Papillier, J. Dupont, D. Guillaume, P. Mermillod and F. Guignot. 2010. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPKalpha phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 93(1-2): 30-36.
2. Amsterdam, A., Y. Koch, M.E. Lieberman and H.R. Lindner. 1975. Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. Journal of Cell Biology, 67(3): 894-900.
3. Bao, B., M.G. Thomas, M.K. Griffith, R.C. Burghardt and G.L. Williams. 1995. Steroidogenic activity, insulin-like growth factor-I production, and proliferation of granulosa and theca cells obtained from dominant preovulatory and nonovulatory follicles during the bovine estrous cycle: effects of low-density and high-density lipoproteins. Biology of Reproduction, 53(6): 1271-1279.
4. Beam, S.W. and W.R. Butler. 1999. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. Journal of reproduction and fertility Suppl, 54: 411-424.
5. Beam, T.M., T.C. Jenkins, P.J. Moate, R.A. Kohn and D.L. Palmquist. 2000. Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. Journal of Dairy Science, 83(11): 2564-2573.
6. Bender, K., S. Walsh, A.C. Evans, T. Fair and L. Brennan. 2010. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. Reproduction, 139(6): 1047-1055.
7. Bilby, T.R., T. Jenkins, C.R. Staples and W.W. Thatcher. 2006a. Pregnancy, bovine somatotropin and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: III. Fatty acid distribution. Journal of Dairy Science, 89(9): 3386-3399.
8. Bilby, T.R., A. Sozzi, M.M. Lopez, F.T. Silvestre, A.D. Ealy, C.R. Staples and W.W. Thatcher. 2006b. Pregnancy, bovine somatotropin and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: I. Ovarian, conceptus and growth hormone-insulin-like growth factor system responses. Journal of Dairy Science, 89(9): 3360-3374.
9. Boland, M.P., P. Lonergan and D. O'Callaghan. 2001. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology and oocyte and embryo development. Theriogenology, 55(6): 1323-1340.
10. Brown, M.S. and J.L. Goldstein. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science, 232(4746): 34-47.
11. Burke, J.M., D.J. Carroll, K.E. Rowe, W.W. Thatcher and F. Stormshak. 1996. Intravascular infusion of lipid into ewes stimulates production of progesterone and prostaglandin. Biology of Reproduction, 55(1): 169-175.
12. Butler, W.R. and R.D. Smith. 1989. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. Journal of Dairy Science, 72(3): 767-783.
13. Childs, S., A.A. Hennessy, J.M. Sreenan, D.C. Wathes, Z. Cheng, C. Stanton, M.G. Diskin and D.A. Kenny. 2008. Effect of level of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on systemic and tissue fatty acid concentrations and on selected reproductive variables in cattle. Theriogenology, 70(4): 595-611.

Archive of SID

www.SID.ir

14. Coyral-Castel, S., C. Rame, A. Fatet and J. Dupont. 2010. Effects of unsaturated fatty acids on progesterone secretion and selected protein kinases in goat granulosa cells. Domestic Animal Endocrinology, 38(4): 272-283.
15. Hess, B.W., G.E. Moss and D.C. Rule. 2008. A decade of developments in the area of fat supplementation research with beef cattle and sheep. Journal of Animal Science, 86(14 Suppl): E188-204.
16. Marei, W.F., D.C. Wathes and A.A. Fouladi-Nashta. 2009. The effect of linolenic Acid on bovine oocyte maturation and development. Biology of Reproduction, 81(6): 1064-1072.
17. Marei, W.F., D.C. Wathes and A.A. Fouladi-Nashta. 2010. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. Reproduction, 139(6): 979-988.
18. O'Fallon, J.V., J.R. Busboom, M.L. Nelson and C.T. Gaskins. 2007. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: application to wet meat tissues, oils and feedstuffs. Journal of Animal Science, 85(6): 1511-1521.
19. Scollan, N., J.F. Hocquette, K. Nuernberg, D. Dannenberger, I. Richardson and A. Moloney. 2006. Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. Meat Science, 74(1): 17-33.
20. Thompson, J.G., D.K. Gardner, P.A. Pugh, W.H. McMillan and H.R. Tervit. 1995. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. Biology of Reproduction, 53(6): 1385-1391.

Archive of SID

www.SID.ir

Investigation of Antral Follicles to Determine the Effective Concentration of Alfa-Linolenic Acid on *In Vitro* Developmental Competence of Goat Oocytes

Arash Veshkini[1], Abdollah Mohammadi-Sangcheshmeh[2], Ali Akbar Khadem[3], Ali Asadi Almouti[4] and Mahdi Khodaei Motlagh[5]

1, 3 and 4- M.Sc. Student, Associate Professor and Assistant Professor, College of Aburaihan, University of Tehran
2- Assistant Professor, College of Aburaihan, University of Tehran
(Correspondence author: amohammadis@ut.ac.ir)
5- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University
Received: July 16, 2013 Accepted: November 9, 2013

Abstract

Besides their role in making energy, polyunsaturated fatty acids can affect on ovarian follicles and corpus luteum by providing the precursors required for the synthesis of signaling molecules such as steroids and prostaglandins. The effects of α-linolenic acid (ALA) on developmental competence of oocytes in goats were evaluated in this study. Initially, ALA content of follicular fluid of small and large follicles was determined using GC–mass chromatography. Our results indicated that the ALA concentration was in a range of 64.6 to 100.6 µM for small and large follicles, respectively. Then, based on preliminary results, goat oocytes were matured in presence of 0 (Control), 10 (ALA-10), 50 (ALA-50), 100 (ALA-100) and 200 (ALA-200) µM of ALA. Twenty four hours after *in vitro* maturation (IVM), oocytes in each group were evaluated for their cumulus cell expansion and also for their maturation rate. Furthermore, matured oocytes were treated for parthenogenetic activation and the cleavage and blastocyst rates of control and ALA-treated group were recorded at day 3 and 8 post-activation. Data from each stage were recorded and analyzed via Compare Means Test and/or chi-square analysis using SAS software. Supplementation of maturation media with different concentration of ALA had no effect on cumulus cell expansion except in the highest concentration (ALA-200) that decreased the cumulus cell expansion ($P<0.05$). Our findings indicated that maturation rate was higher ($P<0.05$) in ALA-50 group as compared with the control group (68.1% *vs.* 58.2%). Moreover, supplementation of maturation medium with 50 µM ALA improved the cleavage rate (65.2% *vs.* 52.8%) and blastocyst rate (25.1% *vs.* 16.7%) as compared with the control group ($P<0.05$). Collectively, our results showed that treatment of maturation medium with optimum concentration of ALA had a beneficial effect on oocyte maturation by increasing the maturation rate and this in turn, can stimulate the embryonic development.

Keywords: Alfa-Linolenic Acid, Blastocyst, Follicular Fluid, *In Vitro* Maturation, Oocyte

Archive of SID

www.SID.ir