دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

تاثیر اسیدلینولئیک کنژوگه بر بیان ژن‌های هدف درگیر در سوخت و ساز چربی اووسایت بالغ شده‌ی گوسفند در شرایط برون‌تنی

حمید دلدار[۱]، زربخت انصاری پیرسرایی[۲] و مریم رویان[۳]

۱- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: h.deldar@sanru.ac.ir)
۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- مدیریت شمال کشور، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران
تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۲۶
صفحه: ۱۰۰ تا ۱۰۷

چکیده

در این پژوهش تاثیر اسیدلینولئیک کنژوگه بر بیان ژن‌های هدف درگیر در سوخت و ساز چربی اووسایت بالغ شده‌ی گوسفند در شرایط برون‌تنی مورد بررسی قرارگرفت. بلوغ برون‌تنی اووسایت‌ها در چهار غلظت متفاوت شامل غلظت صفر (شاهد)، غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰و ۲۰۰ میکرومولار اسیدلینولئیک کنژوگه و در پنج تکرار انجام شد. پس از بلوغ برون‌تنی اووسایت‌ها، باروری برون‌تنی و رشد نمو رویان برای تمامی گروه‌های آزمایشی انجام و مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان‌داد که غلظت ۵۰ میکرومولار اسیدلینولئیک کنژوگه نسبت به تیمار شاهد، شمار اووسایت‌هایی را که گامه متافاز میوز ۲ رسیدند را به‌طور معنی‌دار افزایش داد (۱/۹٤ ± ۸۵/۳ درصد در مقابل ۳/۰٤ ± ٦۸ درصد). اما با افزایش غلظت اسیدلینولئیک کنژوگه درمحیط تکامل برون‌تنی اووسایت، نرخ تکامل برون‌تنی در غلظت ۲۰۰ میکرومول برابر ۱/٤۵ ± ۳۵/٦ درصد به‌دست آمد. بیشترین درصد نرخ کلیواژ و بلاستوسیست در غلظت ۵۰ میکرومول دیده شد، همچنین غلظت ۲۰۰ میکرو مول اسید لینولییک کنژوگه به‌طور معنی‌داری (p≤ ۰/۰۵) نرخ کلیواژو درصد بلاستوسیست را کاهش داد (۳۲/۸۷ و ۱۳/٦۹ درصد). غلظت ۵۰ میکرومولار اسید لینولییک کنژوگه افزایش معنی‌دار (p≤۰/۰۵) دو برابری و غلظت‌های زیاد اسیدلینولییک کنژوگه بیان نسبی ژن‌های پریلیپین۲ و لیپاز حساس به هورمون را نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌داری (p≤ ۰/۰۵) کاهش داد. از سوی دیگر بیان نسبی ژن کارنیتین پالمیتوییل ترانسفراز ۱ تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسیدلینولییک کنژوگه قرار نگرفت (p> ۰/۰۵). درنتیجه می‌توان گفت که غلظت‌های اندک اسیدلینولیک کنژوگه تاثیر مثبت اما غلظت‌های بیش از اندازه اسیدلینولئیک کنژوگه در محیط برون‌تنی بلوغ تخمک برای تکامل تخمک زیان‌بار بوده و موجب توقف بلوغ برون‌تنی اووسایت گوسفند و کاهش تولید رویان برون‌تنی شد.

واژه‌های کلیدی: اسیدلینولئیک کنژوگه، بلوغ برون تنی اووسایت، رشد و نمو رویان، سوخت و ساز چربی

مقدمه

لیپید درون سلولی نقش مهمی در نمو اووسایت ایفا می‌کند (۲۳،۷،۲۱،۲۲). در سیتوپلاسم اووسایت پستانداران، قطرات لیپیدی فراوانی است که میان گونه‌ها از نظر مقدار متفاوت است (در خوک خیلی زیاد است و بعد نشخوارکنندگان و در موش خیلی کم است) (۲۲،۱۸). تری‌گلیسرید لیپید اصلی در اووسایت پستانداران بوده و منبع انرژی قوی برای بلوغ اووسایت و رشد رویان قبل جایگزینی فراهم می‌کند (۳). مشخص شده است که اسیدهای چرب با پیوندهای دوگانه نقش به‌سزایی در رشد و نمو تخمک و رویان دارند و اسید لینولئیک فراوان‌ترین اسید چرب مایع فولیکولی می‌باشد که حدود ۳۰ درصد از کل اسیدهای چرب مایع فولیکولی را تشکیل می‌دهد (۱). در پژوهش‌های زیادی تایید شده که اکسیداسیون اسیدچرب، منبع ATP لازم برای بلوغ اووسایت و نمو رویان است (۲۲،۳،۷). مهار بتا اکسیداسیون نیز بر شروع تقسیمات میوزی اثر گذاشته و از رشد و نمو رویان و اووسایت در موش، گاو و خوک جلوگیری می‌کند (۲۱،۵،۹،۱۱). ثابت شده‌است که افزودن اسیدهای چرب به محیط کشت بلوغ اووسایت نشخوارکنندگان موجب بهترشدن رشد، نمو اووسایت و تولید رویان باکیفیت شده‌است (۱۹،۱۳). اسیدهای چرب تاثیر به‌سزایی بر افزایش عملکرد تولید مثلی دارند و این تاثیرات به خصوص در اسیدچرب غیراشباع نوع امگا۳ و امگا۶ ثابت شده است (۱۴). کاهش باروری گاوهای هلشتاین طی ماه‌های تابستان به دلیل پایین‌بودن محتوای اسیدلینولئیک غشاء اووسایت‌هاست (۲۵). همچنین کشت کمپلکس اووسایت کومولوس گاو با اسید چرب لینولنیک‌اسید البته در غلظت ۵۰µM سبب افزایش درصد اووسایت‌های رسیده به متافاز ۲ و افزایش درصد رویان تقسیم‌شده و نرخ بلاستوسیت‌شده، همچنین بر اثرات مهارکننده‌ی بلوغ اووسایت غلبه کرده و سبب افزایش نرخ بلوغ می‌شود (۱۵). لیپاز حساس به هورمون (HSL) یک لیپاز خنثی درون‌سلولی است که تجزیه چربی‌ها را بر عهده دارد و دی‌گلیسریدها سوبسترای اصلی آن هستند. لیپاز حساس به هورمون به عنوان یک آنزیم محدودکننده برای تجزیه چربی‌ها است. این آنزیم در اووسایت‌ها و سلول‌های تیکا و گرانولوزا و فولیکول‌های بالغ، وجود دارد و بیان آن در طول پس‌روی فولیکولی کاهش می‌یابد (۴). پریلیپین ۲ به‌عنوان یک پروتین تنظیمی قطره‌های چربی در طول بلوغ اووسایت هستند. الیس و همکاران (۶) نیز گزارش کرده‌اند که ژن‌های CPT1 و CPT2 در سلول‌های گرانولوزا و هم‌چنین بخش‌های دیگر تخمدانی مانند جسم زرد، فولیکول، سلول کومولوس و اووسایت نابالغ گاو بیان شده است. این مطالعات نشان می‌دهد

که اکسیداسیون اسیدچرب در اووسایت بیشتر از سلول‌های کومولوس اتفاق می‌افتد. حال سوال این است که آیا افزودن اسید لینولیئک کنژوگه به عنوان یک آنتی‌اکسیدان می‌تواند بر سوخت و ساخت اسیدهای‌چرب اووسایت تاثیر داشته باشد و مسیر مصرف چربی‌ها در سلول‌های کومولوس را فعال کند؟ از طرفی آیا فعال‌شدن این مسیر تحت تاثیر این اسیدچرب می‌تواند بر رشد و نمو رویان تاثیر گذار باشد؟

مواد و روش‌ها

برای تهیه‌ی کمپلکس اووسایت کومولوس، تخمدان‌های میش از کشتارگاه صنعتی جمع‌آوری و پس از آن، درون فلاسک آب در دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد به همراه ۱۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین به آزمایشگاه منتقل شدند. کمپلکس اووسایت کومولوس در محیط TCM-HEPES از درون فولیکول‌های تخمدان به‌وسیله برش دادن جدا و کمپلکس‌هایی که سه لایه کومولوس یا بیشتر داشتند، با سه بار شستشو وارد محیط کشت بلوغ اووسایت شدند. کشت اووسایت‌ها در محیط کشت شامل TCM-199[1] به همراه ۲۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر hMG[2]، ۱۰ درصدFCS[3]، ۱۱ میکروگرم در میلی‌لیتر پیروات، ۲/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر سدیم بیکربنات، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و استرپتومایسین انجام شد. درون هر پلیت ۶۰ میلی متری، نه قطره ۵۰ میکرولیتری از محیط کشت قرار داده‌شد که روی قطره‌ها با روغن معدنی گرم پوشانده شدند. در هر قطره محیط کشت ۵۰ میکرولیتری، ۱۱-۹ کمپلکس اووسایت کومولوس قرار داده‌شد. و درون انکوباتوری با ۵ درصد CO2، دارای ۹۸ درصد رطوبت نسبی در دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد فرآیند بلوغ را سپری نمودند. پس از ۲۴ ساعت اووسایت‌ها به مرحله بلوغ رسیدند. اووسایت‌های بالغ شده، در قطرات محیط لقاح برون‌تنی حاوی هپارین همراه با اسپرم‌های ذوب‌شده از یک قوچ برای انجام لقاح برای مدت ۲۰-۱۸ ساعت در شرایط اتمسفری ۵ درصد CO2 و حداکثر رطوبت قرار گرفتند. پس از انجام لقاح برون‌تنی، برای جداکردن سلول‌های کومولوس و اسپرم‌های اضافی، زایگوت‌های احتمالی به مدت ۳ دقیقه ورتکس شدند. پس از ورتکس‌کردن و شستشوی زایگوت‌های احتمالی در محیط کشت، زایگوت‌ها برای مدت شش روز و در شرایط اتمسفری بلوغ برون‌تنی درون انکوباتور CO2، کشت داده شدند. به منظور بررسی بیان نسبی ژن‌های پریلیپین۲، لیپاز حساس به هورمون، کارنیتین پالمیتوییل ترانسفراز۱، RNA کل، از کومولوس دست کم ۵۰ اووسایت لخت شده در هر تیمار جدا شد. از کیت (RNeasy Micro Kit) و بر مبنای دستورالعمل شرکت سازنده (QIAGEN)، جداسازی RNA کومولوس‌ها، صورت گرفت. از کیت QuantiTec Reves Transcription (QIAGEN, 205311) و براساس پروتکل مربوطه، cDNA ساخته شد و برای بیان نسبی ژن‌های موردنظر تا زمان انجام واکنش‌های Real Time PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.سپس واکنش Real Time PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در دستگاه چرخه حرارتی با تابش نوری کوربت (Corbet) انجام شد. و برای هر یک از نمونه‌ها چرخه آستانه (C_T) در دستگاه Real Time PCR تعیین شد. بیان ژن *YWHAZ* به عنوان بیان ژن رفرنس مورد استفاده قرار گرفت و برای اندازه‌گیری بیان ژن از روش Livak استفاده شد. آنالیز آماری داده‌ها بااستفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. برای تجزیه داده‌ها از رویه GLM استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها نیز با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تیمار، در ۵ تکرار انجام شد. معادله ریاضی مدل آماری به صورت $Yij = \mu + Ti + eij$ بود؛ که Yij: مقدار عددی تکرار j ام از تیمار i ام، μ: میانگین داده‌ها، Ti: اثر تیمار i و eij: اثر عوامل باقی‌مانده است.

نتایج و بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که غلظت‌های مختلف اسید لینولییک کنژوگه بر تکامل برون‌تنی، رشد و نمو رویان تا گامه بلاستوسیست و بیان ژن‌های مرتبط با متابولیسم چربی در اووسایت تاثیر معنی‌دار داشته به‌طوری که در غلظت‌های کم (تا ۵۰ میکرومول) تاثیری مثبت و در غلظت‌های زیاد (۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول) تاثیری نامطلوب و دور از انتظار در فرآیند تکامل برون‌تنی اووسایت گوسفند داشته است. در بررسی تکامل برون‌تنی اووسایت و تعیین نرخ بلوغ برون‌تنی اووسایت گوسفند در غلظت‌های مختلف اسیدلینولییک کنژوگه، از ۶۱۶ کمپلکس اووسایت–کومولوس در تیمارهای مختلف استفاده شد (جدول ۱). غلظت ۵۰ میکرومولار اسیدلینولییک کنژوگه نسبت به تیمار شاهد شمار اووسایت‌هایی را که گامه متافاز میوز ۲ رسیدند را به طور معنی‌دار ($p\leq$ ۰/۰۵) افزایش دهد (۱/۹۴ ± ۸۵/۳ در مقابل ۳/۰۴ ± ۶۸). اما با افزایش غلظت اسیدلینولییک کنژوگه از ۵۰ به ۱۰۰ یا ۲۰۰ میکرومول در محیط تکامل برون‌تنی اووسایت شاهد کاهش نرخ تکامل برون‌تنی اووسایت بودیم به‌طوری که در غلظت ۱۰۰، درصد تکامل برابر ۱/۷۰ ± ۶۲ و در غلظت ۲۰۰ میکرومول درصدی برابر ۱/۴۵ ± ۳۵/۶ به‌دست آمد که تقریبا نصف تیمار شاهد بود ($p\leq$ ۰/۰۵). این یافته‌ها نشان دادند که غلظت‌های زیاد اسیدلینولییک کنژوگه با ایجاد توقف در گامه‌های GVBD و متافاز میوز-۱ (جدول ۱) منجر به کاهش رسیدن اووسایت‌ها به گامه متافاز میوز ۲ شدند و نرخ تکامل اووسایت را نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت.

1- TissueCulture Medium 2- Human Menopausal Gonadotrophins 3- Fetal Calf Serum

جدول ۱- تکامل برون تنی اووسایت‌های گوسفند در غلظت‌های مختلف اسید لینولییک کنژوگه

Table 1. Maturation of sheep oocyte in diferent concentrations of conjugated linoleic acid

اسید لینولیک کنژوگه (میکرومول)	شمار اووسایت	گامه‌های مختلف تقسیم میتوز (درصد)			
		GV	GVBD	MI	MII
صفر	۱۴۶	۴/۳±۰/۲۴^{a}	۱۲/۶±۰/۸۷^{b}	۱۶±۰/۸۷^{c}	۶۸±۳/۰۴^{b}
۵۰	۱۵۲	۳/۶±۰/۳۱^{a}	۳±۰/۷۳^{d}	۸±۰/۵۲^{d}	۸۵/۳±۱/۹۴^{a}
۱۰۰	۱۵۷	۵/۶±۰/۴۲^{a}	۹±۰/۶۰^{c}	۲۳/۳±۰/۶۲^{b}	۶۲±۱/۷۰^{b}
۲۰۰	۱۶۱	۱۱/۶±۰/۴۴^{b}	۲۱/۶±۰/۳۳^{a}	۴۱±۰/۴۴^{a}	۳۵/۶±۱/۴۵^{c}

اعداد با حروف نامتشابه در هر ستون، داری اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ است. GV: گامه جرمینال ویزیکل؛ GVBD: خارج شدن از گامه جرمینال ویزیکل؛ MI: گامه متافاز میوز MI۱ : گامه متافاز میوز ۲.

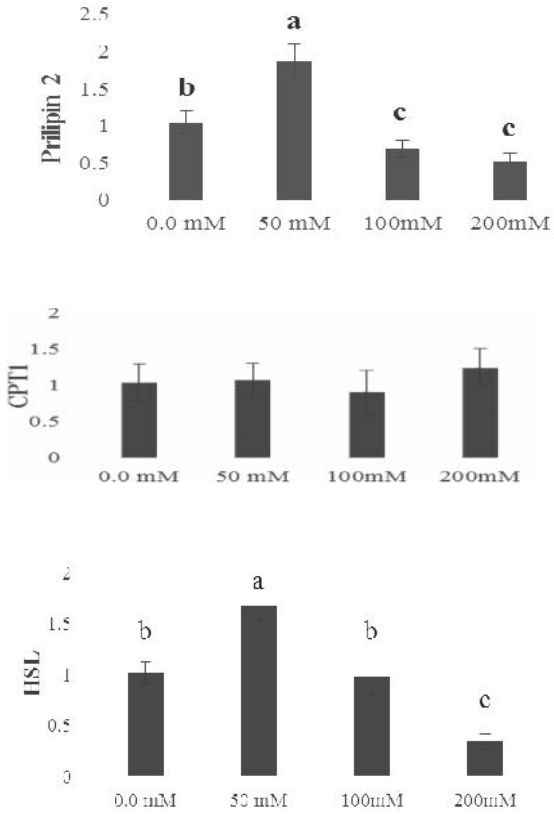
در ادامه آزمایش تکامل برون‌تنی اووسایت، تعداد ۵۶۳ اووسایت وارد آزمایش تولید برون‌تنی رویان شدند که در محیط تکامل برون‌تنی اووسایت از غلظت‌های مختلف اسیدلینولییک کنژوگه استفاده شده بود (جدول ۲). نتایج این پژوهش نشان داد که غلظت ۵۰ میکرومول اسیدلینولییک کنژوگه (۷۶/۹۲ درصد) بیشترین و غلظت ۲۰۰ میکرومولار اسیدلینولییک کنژوگه (۳۲/۸۷ درصد) کمترین درصد کلیواژ را نسبت به گروه شاهد (۶۷/۴۰ درصد) ایجاد کردند. درصد بلاستوسیست نیز در غلظت ۵۰ میکرو مولار اسید لینولییک کنژوگه (۳۶/۶۳ درصد) تفاوت معنی‌داری ($p\leq$ ۰/۰۵) با گروه شاهد داشت. این در حالی است که با افزایش غلظت اسیدلینولییک کنژوگه، درصد بلاستوسیست‌ها در غلظت ۲۰۰ میکرومولار (۱۳/۶۹ درصد) کاهش چشمگیر و معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت. در پایان تکامل اووسایت ها، بیان نسبی ژن‌های درگیر در متابولیسم چربی (پریلیپین۲، لیپاز حساس به هورمون، کارنیتین پالمیتوییل ترانسفراز۱) در اووسایت نیز در غلظت‌های مختلف اسیدلینولییک کنژوگه مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱). نتایج نشان داد که غلظت ۵۰ میکرومولار اسیدلینولییک کنژوگه افزایش معنی‌دار ($p\leq$ ۰/۰۵) دو برابری را در بیان نسبی ژن پریلیپین ۲ نسبت به تیمار شاهد ایجاد کرد. از سوی دیگر غلظت‌های زیاد اسیدلینولییک کنژوگه بیان نسبی ژن پریلیپین ۲ را به طور معنی‌داری ($p\leq$ ۰/۰۵) کاهش داد. همین اتفاق برای بیان نسبی ژن لیپاز حساس به هورمون رخ داد. غلظت های زیاد اسیدلینولییک کنژوگه کاهش چشمگیر و غلظت ۵۰ میکرومولار افزایش معنی‌داری ($p\leq$ ۰/۰۵) نسبت به گروه شاهد داشتند. از سوی دیگر بیان نسبی ژن کارنیتین پالمیتوییل ترانسفراز ۱ تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسیدلینولییک کنژوگه قرار نگرفت و هیچکدام از تیمارها نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌دار نداشتند ($p>$۰/۰۵).

جدول ۲- نرخ رویان برون‌تنی گوسفند در غلظت‌های مختلف اسید لینولییک کنژوگه

Table 2. *In vitro* embryonic development of sheep oocytes in diferent concentrations of conjugated linoleic acid

اسید لینولیک کنژوگه (میکرومول)	شمار اووسایت	درصد کلیواژ (تعداد)	درصد بلاستوسیست (تعداد)
صفر	۱۳۵	۶۷/۴۰^{b} (۹۱)	۲۹/۶۲^{b} (۴۰)
۵۰	۱۴۳	۷۶/۹۲^{a} (۱۱۰)	۳۶/۶۳^{a} (۵۲)
۱۰۰	۱۳۹	۵۳/۹۵^{c} (۷۵)	۲۴/۴۶^{b} (۳۴)
۲۰۰	۱۴۶	۳۲/۸۷^{c} (۴۸)	۱۳/۶۹^{c} (۲۰)

اعداد با حروف نامتشابه در هر ستون، داری اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ است.



شکل ۱- بیان نسبی ژن‌ها درگیر در سوخت و ساز چربی اووسایت (پریلیپین۲، لیپاز حساس به هورمون (HSL)، کارنیتین پالمیتوییل ترانسفراز۱(CPT1)) در غلظت های متفاوت اسید لینولییک کنژوگه (میکرومول). اعداد مختلف با حروف نامتشابه در هر ستون، داری اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

Figure 1. The relative gene expressions related to lipid metabolism in oocyte in diferent concentrations of conjugated linoleic acid.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که غلظت‌های مختلف اسیدلینولییک کنژوگه بر تکامل برون‌تنی، رشد و نمو رویان تا گامه بلاستوسیست و بیان ژن‌های مرتبط با متابولیسم چربی در اووسایت تاثیر معنی‌دار داشت. غلظت ۵۰ میکرومولار اسیدلینولییک کنژوگه نسبت به تیمار شاهد به خوبی توانست شمار اووسایت‌هایی را که گامه متافاز میوز ۲ رسیدند را به طور معنی‌دار ($p\leq$ ۰/۰۵) افزایش دهد (۱/۹۴ ± ۸۵/۳ در مقابل ۳/۰۴ ± ۶۸). اسیدهای چرب تاثیر شگفت‌انگیزی بر افزایش عملکرد تولید مثلی دارند و این تاثیرات به خصوص در اسیدچرب غیر اشباع نوع امگا۳ و امگا۶ ثابت شده است (۱۴). کاهش باروری گاوهای هولشتاین طی ماه‌های تابستان به دلیل پایین‌بودن محتوای اسیدلینولئیک غشاء اووسایت‌ها می باشد، در حالی که محتوای اسیدلینولنیک چندان تغییر فصلی ندارد (۲۵). مشابه نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، کشت کمپلکس اووسیت کومولوس گاو با اسیدچرب اسیدلینولنیک، البته در غلظت ۵۰µM سبب افزایش درصد اووسایت‌های رسیده به متافاز ۲ و افزایش درصد رویان تقسیم شده و نرخ بلاستوسیت شده، همچنین بر اثرات مهارکننده‌ی بلوغ اووسایت غلبه کرده و سبب بهبود نرخ بلوغ می‌شود (۱۵). پژوهش‌های اندکی تاثیر اسید لینولییک کنژوکه را بر بلوغ و تولید برون تنی رویان پستانداران بررسی کردند به همین خاطر مجبور هستیم که تاثیر سایر اسیدهای چرب مشابه با اسید لینولییک کنژوگه همانند اسید لینولییک و اسید لینولنیک را بر رشد و نمو رویان در نظر بگیریم. لینولئیک اسید، اسید چرب غالب در مایع فولیکولی گاو بوده، کشت کمپلکس اووسیت کومولوس با آن به طور واضحی سبب مهار گسترش کومولوس و به دنبال آن مهار نمو اووسیت به مرحله متافاز ۲ میوزی و کم شدن درصد رویان و بلاستوسیت تقسیم شده می‌شود (البته در غلظت ۱۰۰µM)، در نتیجه مکمل لینولئیک اسید در غلظت بالا سبب تغییر در مکانیسم مولکولی تنظیم‌کننده بلوغ اووسیت و در نتیجه مهار پیشرفت میوزی شد (۱۶). در آزمایش حاضر، با افزایش غلظت اسید لینولییک کنژوگه از ۵۰ به ۱۰۰ یا ۲۰۰ میکرومول درمحیط تکامل برون تنی اووسایت شاهد کاهش نرخ تکامل برون تنی اووسایت بودیم به طوری که در غلظت ۱۰۰، درصد تکامل برابر ۱/۷۰±۶۲ و در غلظت ۲۰۰ میکرومول درصدی برابر

۳۵/۶±۱/۴۵ به دست آمد که تقریبا نصف تیمار شاهد بود! از طرف دیگر در غلظت ۲۰۰ میکرومول اسید لینولییک کنژوگه ۴۱ درصد اووسایت‌ها در گامه متافاز میوز–۱ متوقف شدند در حالی که این توقف در غلظت ۵۰ میکرو مولار تنها ۸ درصد بود یعنی نصف تیمار شاهد (جدول ۱). یافته‌های ما نشان دادند که غلظت‌های زیاد اسید لینولییک کنژوگه با ایجاد توقف در گامه‌های GVBD و متافاز میوز–۱ منجر به کاهش رسیدن اووسایت‌ها به گامه متافاز میوز ۲ شدند و نرخ تکامل اووسایت را نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش دادند مشابه نتایج ما افزایش غلظت اسید لینولئیک‌کنژوگه تا غلظت ۱۰۰ میکرومولار موجب دژنره شدن تخمک‌ها و کاهش نرخ بلوغ تخمک شده است (۱۶،۱۵). افزودن اسید لینولئیک در همه غلظت‌ها (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول)، سبب افزایش تجمع تری آسیل گلیسرول در قطرات لیپیدی سیتوپلاسمی و در نتیجه با افزایش محتوای لیپیدی خنثی ذخیره شده در قطرات لیپیدی، سبب بهبود کیفیت اووسایت شد؛ همچنین با جهت‌یابی به سمت مسیر ساخت تری آسیل گلیسرول و افزایش درجه‌ی غیراشباع فسفولیپیدهای غشاء، اووسایت از اثرات سمی حاصل از لیپید محافظت می‌شد (۲). لینولئیک اسید و آلفا– لینولنیک اسید بر پخش شدن و فعالیت میتوکندریایی در اووسیت گاو موثر بوده به این صورت که، لینولئیک اسید سبب تاخیر در دوباره پخش شدن میتوکندری از اطراف شده، و موجب کاهش درصد اووسیت با میتوکندریایی دور هسته‌ای و افزایش غلظت ROS می‌شود که با کم شدن نرخ بلوغ هسته‌ای مرتبط است. آلفا– لینولنیک اسید هیچ اثری بر پخش شدن میتوکندریایی نداشته و سبب کاهش غلظت ROS و در نتیجه افزایش نرخ بلوغ هسته‌ای شد. پس آلفا– لینولنیک اسید را می‌توان به عنوان یک افزودنی برای سیستم IVF[1] که سبب بهبود بلوغ اووسیت می‌شود در نظر گرفت (۱۷). مشخص شده است که اسید های چرب با پیوندهای دوگانه نقش به‌سزایی در رشد و نمو تخمک و رویان دارند. اسید لینولئیک فراوان‌ترین اسید چرب مایع فولیکولی می‌باشد که حدود ۳۰ درصد از کل اسیدهای چرب مایع فولیکولی را تشکیل می‌دهد. پژوهش‌های پیشین نشان دادند که غلظت‌های زیاد اسید لینولئیک بلوغ هسته تخمک گاو را متوقف می‌کند و آن را در گامه GV نگه می‌دارد (۱۶) و از طرفی نشان داده شده است که تخمک کشت داده شده در محیط کشتی که دارای ۱۰۰ میکرومولار اسید لینولئیک بود نرخ بلوغ تخمک را به طور معنی‌داری کاهش داد و بر این اساس مشخص شده است که حضور اسید لینولئیک در غلظت‌های زیاد پیش از گامه GVBD موجب توقف بلوغ هسته تخمک می‌شود. پژوهش‌های پیشین نشان دادند که اگر اسید لینولئیک بعد از مرحله GVBD به محیط کشت اضافه شود، مهار بلوغ هسته‌ای اووسایت برگشت‌پذیر می‌شود. در این حالت اسید لینولئیک هیچ تاثیری بر بلوغ اووسایت نداشت (۱۵). این یافته‌ها نشان می‌دهد که، احتمال دارد اسید لینولئیک در مراحل اولیه کشت قبل از GVBD اثر سمی داشته و در مراحل بعدی تا مرحله MII در تنظیم بلوغ هسته‌ای اثر غیر سمی نشان دهد (۱۶).

یافته‌های به‌دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که غلظت‌های مختلف اسیدهای چرب ژل رویال بر بیان نسبی ژن‌های کارنیتین پالمیتویل ترانسفراز ۱ (CPT1)، لیپاز حساس به هورمون (HSL) و پریلیپین ۲ در اووسایت تاثیرگذار بودند. غلظت‌های زیاد اسید لینولییک کنژوگه کاهش چشمگیر و غلظت ۵۰ میکرومولار افزایش معنی‌داری ($p\leq$ ۰/۰۵) نسبت به گروه شاهد داشتند. در راستای نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر، کشت اووسایت گاو و خوک با مهارکننده CPT1 نیز بر نمو رویان اثر می‌گذارد و سبب کاهش نمو رویان می‌شود (۲۱). نتایج پژوهش ما هم نشان داد که غلظت‌های زیاد اسید چرب موجب کاهش چشمگیر بیان آنزیم‌های درگیر در متابولیسم چربی در اووسایت شده که منجر به کاهش نرخ بلوغ برون تنی اووسایت شده است. به روشنی درک شده است که CPT1 در COC موش در مرحله بلوغ قبل از تخمک‌ریزی در شرایط درون‌تنی بیان می‌شود (۱۲). الیس و همکاران (۶) نیز گزارش کرده‌اند که ژن‌های CPT1 و CPT2 در سلول‌های گرانولوزا و هم‌چنین بخش‌های دیگر تخمدانی مانند جسم زرد، فولیکول، سلول کومولوس و اووسایت نابالغ گاو بیان شده است. این مطالعات نشان می‌دهد که اکسیداسیون اسیدچرب در اووسایت بیشتر از سلول‌های کومولوس اتفاق می‌افتد. با توجه به پژوهش‌های پیشین و نتایج پژوهش حاضر می‌توان نتیجه‌گیری کرد که اسید چرب تا غلظت ۵۰ میکرومول توانست بیان ژن‌ها را افزایش دهد و غلظت‌های زیاد احتمالا تاثیرات نامطلوب بر بیان ژن‌ها و بلوغ برون‌تنی اووسایت داشت. افزایش تجزیه چربی‌ها سبب توانایی اووسایت برای رشد می‌شود (۲۲،۱۰،۲۰) که این موضوع نشان‌دهنده اهمیت تجزیه چربی‌های درون‌سلولی در گونه‌های اهلی است (۸،۷). از سوی‌دیگر نشان داده شده است که با مهار تجزیه چربی‌ها، رشد و تعداد سلول‌های رویان کاهش می‌یابد (۲۲). پریلیپین در اووسایت نقش تنظیم‌کننده ذخیره‌های چربی اووسایت قبل از تخمک‌ریزی را بر عهده دارد و این نشان‌دهنده جنبه مهم بلوغ سیتوپلاسمی اووسایت است (۲۴). پریلیپین ۲ به‌عنوان یک پروتین تنظیمی قطره‌های چربی در طول بلوغ اووسایت هستند. در اووسایت پستانداران یک سری ذخیره‌های چربی درون‌سلولی وجود دارد که برای نمو رویان ضروری است و در خوک و گاو این ذخیره‌ها در طول بلوغ و همزمان با انجام تجزیه چربی‌ها کاهش می‌یابد و منجر به تامین انرژی لازم برای نمو رویان قبل از لانه‌گزینی می‌شود (۲۴). لیپاز حساس به هورمون (HSL) یک لیپاز خنثی درون‌سلولی است که تجزیه چربی‌ها را بر عهده دارد و دی‌گلیسریدها سوبسترای اصلی آن هستند. لیپاز حساس به هورمون به عنوان یک آنزیم محدودکننده برای تجزیه چربی‌ها است. این آنزیم در اووسایت‌ها و سلول‌های تیکا و گرانولوزا و فولیکول‌های بالغ، وجود دارد و بیان آن در طول پس‌روی فولیکولی کاهش می‌یابد (۵). پس می‌توان گفت که کاهش بیان ژن‌های درگیر در متابولیسم چربی منجر به کاهش تکامل برون‌تنی اووسایت و کاهش رشد و نمو رویان خواهد شد که همین نتیجه در پژوهش ما نیز به چشم می‌خورد.

1- In Vitro Fertizationl

بر اساس یافته‌های این پژوهش نشان داده شد که اسید لینولییک کنژوگه در غلظت ۵۰ میکرومولار تاثیر مطلوب و قابل توجهی بر بلوغ برون‌تنی اووسایت و تولید برون تنی رویان گوسفند داشت. اما با افزایش غلظت اسید چرب در محیط بلوغ برون تنی اووسایت (غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار)، نرخ بلوغ و رشد و نمو رویان به شدت نسبت به تیمار شاهد کاهش نشان داد. این نشان می‌دهد که غلظت‌های زیاد اسید چرب در محیط کشت برون‌تنی اووسایت تاثیر نامطلوبی بر کیفیت اووسایت و تولید رویان بی‌کیفیت دارد. از سوی دیگر و هم راستا با رشد و نمو اووسایت و رویان بیان ژن‌های درگیر در متابولیسم چربی نیز تحت تاثیر غلظت‌های زیاد اسید چرب محیط قرار گرفتند وکاهش چشمگیری نسبت به تیمار شاهد داشتند.

تشکر و قدرانی

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در حمایت مالی و فراهم آوردن هزینه‌های طرح پژوهشی با شماره ۰۳-۱۳۹۴-۰۳۰ سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Aardema, H., P.A.L. M. Vos, F. Lolicato, B.A.J. Roelen, H.M. Knijn, A.B. Vaandrager, J.B. Helms, and B.M. Gadella. 2011. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. Biology Of Reproduction, 85: 62-69.
2. Carro, M., J. Buschiazzo, G.L. Ríos, G.M. Oresti and R.H. Alberio. 2013. Linoleic acid stimulates neutral lipid accumulation in lipid droplets of maturing bovine oocytes. Theriogenology, 79: 687-694.
3. Cetica, P., L. Pintos, G. Dalvit and M. Beconi and M. 2002. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. Reproduction, 124: 675-681.
4. Dunning, K.R., K. Cashman, D.L. Russell, J.G. Thompson, R.J. Norman and R.L. Robker. 2010. Beta oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence. Biology Of Reproduction, 83: 909-918.
5. Dunning, K.R., D.L. Russell and R.L. Robker. 2014. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and beta-oxidation. Reproduction, 148: 15-27.
6. Elis, S., A. Desmarchais, V. Maillard, S. Uzbekova, Ph. Monget and J. Dupont. 2015. Cell proliferation and progesterone synthesis depend on lipid metabolism in bovine granulosa cells. Theriogenology, 83: 840-853.
7. Ferguson, E.M. and H.J. Leese. 1999. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. Reproduction, 116, 373-378.
8. Ferguson, E.M. and H.J. Leese. 2006. A potential role for tryglyceride as an energy sources during bovine oocyte maturation and early embryo development. Molecular Reproduction and Development, 73: 1195-1201.
9. Leese, H.J. and E.M. Ferguson. 1999. Embryo metabolism. In: Jansen R, Mortimer D(eds). Towards Reproductive Certainty. New York: Parthenon, 360-366.
10. Ferreira, E.M., A.A. Vireque, P.R. Adona, F.V. Meirelles, R.A. Ferriani and P.A.A.S Navarro. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. Theriogenology, 71: 836-848.
11. Flynn, T.J. and N. Hillman. 1980. The metabolism of exogenous fatty acids by preimplantation mouse embryos developing in vitro. Journal of embryology and experimental morphology, 56: 157-168.
12. Gentile, L., M. Monti, V. Sebastiano, V. Merico, R. Nicolai, M. Calvani, S. Garagna, C.A. Redi and M. Zuccotti. 2004. Single-cell quantitative RT-PCR analysis of Cpt1b and Cpt2 gene expression in mouse antral oocytes and in preimplantation embryos. Cytogenetic and Genome Research, 105: 215-221.
13. Lapa, M., C.C. Marques, S.P. Alves, M.I. Vasques, M.C. Baptista, I. Carvalhais, M.S. Pereira, A.E.M. Horta1, R.J.B. Bessa and R.M. Pereira. 2011. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on Bovine Oocyte Competence and Fatty Acid Composition. Reproduction in Domestic Animals, 46: 904-910.
14. Leroy, J.L.M.R., R.G. Sturmey, V. Van Hoeck, J. De Bie, P.J. McKeegan and P.E.J. Bols. 2013. Dietary lipid supplementation on cow reproductive performance and oocyte and embryo viability: a real benefit? Animal reproduction, 3: 258-267.
15. 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: 1064-1072.
16. 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: 979-988.
17. Marei, W.F., D.C. Wathes and A.A. Fouladi-Nashta. 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.

18. McEvoy, T.G., G.D. Coull, P.J. Broadbent, J.S. Hutchinson and B.K. Speake. 2000. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. Journal of Reproduction and Fertility, 118: 163-170.
19. Pereira, R.M., M.C. Baptista, M.I. Vasques, A.E.M. Horta, P.V. Portugal, R.J.B. Bessa, E. Chagas and J. Silva. 2007. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). Animal Reproduction Science, 98: 293-301.
20. Sirard, M.A., F. Richard, P. Blondin and C. Robert. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. Theriogenology, 65: 126-136.
21. Sturmey, R.G., P.J. O'Toole and H.J. Leese. 2006. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial lipid association in the porcine oocyte. Reproduction, 132: 829-837.
22. Sturmey, R.G. and H.J. Leese. 2003. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. Reproduction, 126: 197-204.
23. Sturmey, R.G., A. Reis, H.J. Leese and T.G. McEvoy. 2009. Role of fatty acids in enery provision during oocyte maturation and early embryo development. Reproduction of Domestic Animals, 44: 50-58.
24. Yang, X., K.R. Dunning, L.L.Wu, T.R. YHickey, R.J. Norman, D.L. Russell, X. Liang and R.L. Robker. 2010. Identification of Perilipin-2 as a lipid droplet protein regulated in oocytes during maturation. Reproduction, Fertility and Development, 22: 1262-1271.
25. Zeron, Y., A. Ocheretny, O. Kedar, A. Borochov, D. Sklan and A. Arav. 2001. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. Reproduction, 121: 447-454.

Effect of Conjugated Linoleic Acid On Gene Expressions Involved in Lipid Metabolism in *In Vitro* Matured Sheep Oocytes

Hamid Deldar[1], Zarbakht Ansari Pirsaraei[2] and Maryam Royan[3]

1- Associate Professor, Department of Animal Science, Sari Agricultural Sciences and Naural Sciences University (Corresponding Author: h.deldar@sanru.ac.ir)
2- Associate Professor, Department of Animal Science, Sari Agricultural Sciences and Naural Sciences University
3- North Region Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, IRAN
Received: April 10, 2018 Accepted: May 16, 2018

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of different concentrations of conjugated linoleic acid (CLA) on *in vitro* maturation (IVM) and lipid metabolism-related genes in oocytes. *In vitro* maturation of oocyte was performed in the presence of control (0.0), 50, 100, and 200 µM CLA. Nuclear status and mRNA abundance of selected genes were evaluated following 24 h of IVM. Following the IVM, fertilization and embryo culture were carried out in all groups and embryonic development was examined. The addition of 50 µM CLA to the maturation media yielded a higher number of oocytes at MII stage in comparison to the control group (85.3 ±1.94 versus 68.0±3.04). Higher concentration of CLA (200 µM) was significantly decreased (P<0.05) the maturation rate of oocyte (35.6±1.45). Cleavage, and blastocyte rate were higher in the 50 µM CLA group in comparison to the control one. Also, the 200 µM CLA were significantly decreased the cleavage and blastocyst rate (32.87 and 13.69, respectively). The relative expression of perilipin-2 and hormone sensitive lipase were significantly increased following the addition of 50 µM CLA to the maturation media. Higher concentrations of CLA were significantly dropped the mRNA abundance of both perilipin-2 and hormone sensitive lipase gene in the oocyte. The CPT-1 mRNA abundance was not influenced by the addition of different concentrations of CLA to the maturation media. It seems that the 50 µM CLA yielded a higher number of embryo in comparison to the higher concentration of CLA and excessive concentrations of CLA had undesirable effect on oocyte maturation and embryo development of ovine oocyte.

Keywords: Conjugated linoleic acid, *in vitro* maturation, Embryo development, Lipid metabolism