

تولیات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۵

صفحه‌های ۶۱۳-۶۰۳

تأثیر اسیدهای چرب ژله رویال بر بیان ژن‌های درگیر در بتا اکسیداسیون در بلوغ برون تنی تخمک بز

مرجان اسماعیلی^۱، حمید دلدار^{۲*}، رزبخت انصاری پیر سرایی^۳ و عیسی دیرنده^۴

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲. استادیار، گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳. دانشیار، گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۴. استادیار، گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۵/۳۱

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۴/۱۰/۰۶

چکیده

تأثیر غلظت‌های مختلف اسیدهای چرب ژله رویال بر بلوغ برون تنی تخمک بز در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار در غلظت‌های بدون اسیدچرب ژله رویال، ۱۲۵ میکروگرم، ۲۵۰ میکروگرم، ۵۰۰ میکروگرم و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، اسیدچرب ژله رویال و ۵۰ میکرولیتر دی ام اس او، انجام شد. تخمدان‌های بز از کشتارگاه جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه منتقل شدند و مجموعه تخمک کومولوس در محیط Medium 199 در غلظت‌های مختلف اسیدهای چرب ژله رویال کشت داده شدند. نتایج نشان داد که افزایش غلظت اسیدهای چرب ژله رویال تا ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، نرخ بلوغ برون تنی تخمک‌ها را افزایش داد. اما افزایش غلظت اسیدهای چرب در محیط بلوغ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، کاهش معنی‌داری ($P < 0.05$) را در نرخ بلوغ برون تنی نسبت به تیمار شاهد نشان داد. افزایش غلظت اسیدهای چرب ژله رویال تا ۲۵۰ میکروگرم، به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) بیان نسبی ژن‌های PPAR α ، کارنیتین پالمیتویل ترانسفراز ۱، کارنیتین پالمیتویل ترانسفراز ۲ و اسیل کوا دهیدروژناز را افزایش داد. از طرف دیگر، بیان نسبی ژن‌ها در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$). می‌توان نتیجه‌گیری کرد که افزودن اسیدهای چرب ژله رویال به محیط بلوغ برون تنی تخمک وابسته به غلظت است و غلظت‌های زیاد اسیدهای چرب تأثیر بدی بر نرخ بلوغ و بیان ژن‌های درگیر در سوخت و ساز چربی تخمک بز داشت.

کلیدواژه‌ها: اسیدهای چرب ژله رویال، تخمک بز، بلوغ برون تنی، بیان ژن، سوخت و ساز چربی

مقدمه

است. اسیدهای چرب ژله رویال به صورت کوتاه، متوسط و بلند زنجیر وجود دارد [۲۸]. اسیدهای چرب متوسط زنجیر موجود در ژله رویال شامل ۱۰ - هیدروکسی ۲ - دکانویک اسید، ۳ و ۱۰ دی هیدروکسی دکانویک و سباسیک اسید است که در بین این اسیدهای چرب، ۱۰ - هیدروکسی ۲ - دکانویک اسید مهمترین اسید چرب است. اسیدهای چرب ژله رویال دارای ویژگی‌های رشددهنده سلول عصبی [۱۲]، ضدافسردگی [۱۳] و جلوگیری تورم مفاصل [۱۴] در انسان است. همچنین، این اسیدهای چرب متعادل‌کننده عملکرد گیرنده استروژن و واسطه سیگنالینگ استروژن نیز هستند [۱۹].

ورود اسیدچرب به مسیر اکسیداتیو با فعالیت آنزیم کارنیتین پالمیتویل ترانسفراز ۱ کنترل می‌شود. کارنیتین پالمیتویل ترانسفراز ۱ در غشای داخلی میتوکندری، اسیل کوآی بلند را به اسیل کارنیتین تبدیل می‌کند تا پس از عبور از غشای داخلی، به سیستم آنزیمی بتااکسیداسیون دسترسی یابد. اسیل کارنیتین تحت تأثیر کارنیتین پالمیتویل ترانسفراز ۲ در سمت درونی غشای داخلی میتوکندری با کوآنزیم آ واکتش داده و ضمن تشکیل مجدد اسیل کوآ در ماتریکس میتوکندری، کارنیتین آزاد می‌شود. اسیل کوآ دهیدروژناز هم آنزیم محدودکننده در مسیر بتااکسیداسیون است [۲]. در مطالعات زیادی بررسی شده که اسیدهای چرب به عنوان یکی از لیگاندهای طبیعی PPAR^۱ بوده [۱۷ و ۲۹] و از طرفی گزارش شده است که PPAR یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بتا-اکسیداسیون است و در تخمک نیز بیان می‌شود [۲۹]. به نظر می‌رسد که با اضافه کردن اسیدچرب به محیط کشت، مسیر بتااکسیداسیون تحریک شده و نمو تخمک افزایش یابد. براساس این فرضیه، هدف از انجام پژوهش حاضر،

مطالعات زیادی روی تأثیر متابولیسم کربوهیدرات‌های مهم، به‌ویژه گلوکز و پیرووات، در تقسیم میوز و بلوغ سیتوپلاسمی تخمک و تولید رویان صورت گرفته و توجه بسیار اندکی به نقش متابولیسم چربی‌های درون‌سلولی در تکامل تخمک شده است. چربی درون سلولی نقش مهمی در نمو تخمک ایفا می‌کند [۲۳]. در سیتوپلاسم تخمک پستانداران، قطره‌های چربی فراوانی است که میان گونه‌ها از نظر مقدار متفاوت است (در خوک خیلی زیاد است و بعد گاو و در موش خیلی کم است) [۲۲ و ۲۴]. تری‌گلیسرید، چربی اصلی در تخمک پستانداران بوده و منبع انرژی قوی برای بلوغ تخمک و رشد رویان قبل جایگزینی فراهم می‌کند [۲۶]. بلوغ میوزی تخمک نیازمند انرژی از منابع مختلف مانند گلوکز و اسید آمینه و چربی است [۲۵]. گلوکز به عنوان مهم‌ترین منبع انرژی خارجی است که به وسیله کومولوس عمدتاً از طریق گلیکولیز و پنتوز فسفات متابولیزه می‌شود و برای تخمک یک سوسترای اکسیداتیو مانند پیرووات و لاکتات را فراهم می‌کند [۲۶]. منبع انرژی مهم دیگر برای تخمک، اسید چرب است که انرژی بیشتری نسبت به گلوکز دارد [۲۳]. اسید چرب آزاد در مایع فولیکولی و در منابع بین سلولی کمپلکس تخمک کومولوس وجود دارد. محتوای چربی تخمک و ترکیب اسیدچرب بر کیفیت تخمک یعنی بلوغ و نمو آن تأثیرگذار است [۱۶]. در واقع شواهدی وجود دارد که نشان داده افزایش فعالیت میتوکندری و بتااکسیداسیون نقش مهمی در بهبود شایستگی نمو تخمک دارد [۲۷].

به‌طور کلی، تأثیر افزودن یک اسیدچرب همانند لینولنیک اسید [۱]، لینولنیک اسید [۲۰] و اسیدهای چرب آزاد [۱۸] در تولید برون‌تنی رویان بررسی شده است، اما اثر افزودن مخلوطی از اسیدهای چرب، اسیدهای چرب ژله رویال، در محیط بلوغ برون‌تنی تخمک بررسی نشده

1. Peroxisome Prolifirator Activated Receptor

تولیدات دائمی

تأثیر اسیدهای چرب ژله رویال بر بیان ژن‌های درگیر در بتا اکسیداسیون در بلوغ برون‌تنی تخمک بز

۳۰ تا ۳۳ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شدند. مجموعه اووسایت کومولوس از فولیکول‌های آنترال کوچک (دو تا هشت میلی‌متر) تخمدان آسپیره و مجموعه‌هایی که سه لایه کومولوس یا بیشتر و سیتوپلاسم یکنواخت داشتند، انتخاب و وارد محیط کشت بلوغ تخمک شدند [۱]. قطره‌های محیط کشت با استفاده از محیط تکامل تخمک استریل آماده شدند. در هر پلت ۶۰ × ۱۵ میلی‌لیتری نه قطره ۵۰ میکرولیتری از محیط کشت تکامل تخمک گذاشته شده و روی قطره‌ها با روغن معدنی پوشانیده شد. پلیت قطره‌های تکامل تخمک به مدت ۲-۱ ساعت در انکوباتور دارای پنج درصد CO₂، دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و با رطوبت ۹۸ درصد قرار داده شد. پس از شستشوی مجموعه های تخمک - کومولوس در محلول اویداکت ساختگی به همراه بافر هیپس، شستشوی پایانی آن‌ها سه بار در محیط تکامل استریل ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

محلول اویداکت ساختگی به همراه بافر هیپس شدند و چندین بار شستشو شده، سپس برای اندازه‌گیری نرخ بلوغ تخمک، هر ده کمپلکس تخمک - کومولوس به درون ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت که با روغن معدنی پوشیده شده بود انتقال یافتند و برای ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. تخمک‌ها پس از ۲۴ ساعت از قطره‌های محیط کشت خارج شده و سپس وارد سلول‌های کومولوس از تخمک به وسیله ی آنزیم هیالورونیداز جدا شدند. برای جداسازی RNA از کیت (۷۴۰۰۴، کایا ژن) استفاده شد. برای ساخت cDNA از کیت QuantiTec Revers Transcription (۲۰۳۵۱۱، کایا ژن) استفاده شد. واکنش ریل تایم پی سی آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۲) و کیت شرکت کایا ژن در دستگاه ریل تایم کوربت انجام شد.

بررسی افزودن اسیدهای چرب موجود در ژله رویال در محیط بلوغ برون‌تنی تخمک و تأثیر آن بر بیان ژن‌های درگیر در بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب در طی بلوغ برون‌تنی تخمک بز بود.

مواد و روشها

ترکیبات و مواد استفاده شده از شرکت‌های سیگما و گیگکو خریداری شدند. این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار و ۱۰ تکرار انجام شد. براساس غلظت اسیدچرب‌های بلند زنجیر مایع فولیکولی گاو، غلظت‌های اسیدچرب ژله رویال در محیط کشت بلوغ برون‌تنی تخمک تعیین شدند. تیمارهای آزمایشی شامل تیمار بدون اسیدچرب ژله رویال، ۱۲۵ میکروگرم، ۲۵۰ میکروگرم، ۵۰۰ میکروگرم و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محیط کشت، اسیدچرب ژله رویال و تیمار ۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر، دی ام اس او به عنوان حلال اسیدهای چرب بودند. به منظور جداسازی اسیدهای چرب ژله رویال، یک گرم ژله رویال در ۲۵ سی سی آب خالص حل شد. سپس - به آن ۸ سی سی دی اتیل اتر اضافه کرده و در حمام اولتراسونیک در دمای ۴۰ درجه به مدت ۱۵ دقیقه قرار دادیم تا حل شود. دو فاز جدا شده، سپس برای چند بار با دور ۳۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع بالایی جمع‌آوری شد که شامل اسیدچرب بود. جهت جلوگیری از پراکسیداسیون اسیدهای چرب، محلول جدا شده زیر گاز نیتروژن برده شد تا تمام دی اتیل اتر بخار شود و اسیدهای چرب به صورت خالص جدا شوند و بلافاصله به دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. اسیدهای چرب ژله رویال به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جداسازی شدند و درصد هریک از اسیدهای چرب در جدول ۱ نشان داده شده است. تخمدان‌های بز از کشتارگاه صنعتی گوشت شرق مازندران جمع‌آوری و درون فلاسک آب در دمای

تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۵

مرجان اسماعیلی، حمید دلدار، رزبخت انصاری پیر سرایی و عیسی دیرنده

جدول ۱. پروفایل اسیدهای چرب استخراج شده از ژله رویال

| اسید های چرب (برحسب تعداد کربن و پیوند دوگانه) | مقدار (درصد) |
|---|-----------------|
| C4:0 | ۰/۹۰۷ |
| C6:0 | ۱/۶۷۱ |
| C8:0 | ۳/۸۵۸ |
| C10:0 | ۱/۸۳۵ |
| C11:0 | ۱/۲۲۴ |
| C12:0 | ۲/۲۳۷ |
| C13:0 | ۰ |
| C14:0 | ۲/۹۳۳ |
| C14:1 | ۰ |
| C15:0 | ۳۲/۲۷۷ |
| C15:1 | ۰ |
| C16:0 | ۱۲/۸۶۷ |
| C16:1 | ۰ |
| C17:0 | ۰/۷۲۰ |
| C17:1 | ۱/۷۶۳ |
| C18:0 | ۱۶/۳۸۳ |
| C18:1n9t | ۳/۱۵۲ |
| C18:1n9c | ۱۱/۰۳۷ |
| C18:2n6c | ۲/۹۴۶ |
| C18:3n6 | ۲/۰۸۹ |
| C20:0 | ۰ |
| C20:1 | ۲/۰۸۹ |

برای اندازه گیری بیان ژن‌ها از روش لیواک استفاده شد. از ژن *YWHAZ* به عنوان ژن نرمال سازی استفاده شد. داده‌ها با استفاده از رویه مدل های خطی عمومی نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۱) در قالب مدل آماری ۱ تجزیه و میانگین ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد مقایسه شدند.

مدل (۱) $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$
 در این رابطه، Y_{ij} مقدار عددی تکرار آزمایش تیمار i ام، μ میانگین داده ها، T_i اثر تیمار i و e_{ij} اثر خطای آزمایش است.

تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۵

تأثیر اسیدهای چرب ژله رویال بر بیان ژن‌های درگیر در بتا اکسیداسیون در بلوغ برون‌تنی تخمک بز

جدول ۲. آغازگرهای استفاده شده برای بیان نسبی ژن‌ها

| ژن‌ها | آغازگر رفت | آغازگر برگشت | شماره بانک ژن | جفت باز |
|-------------------------------|----------------------|-------------------------|---------------|---------|
| <i>PPAR α</i> | CTGGCTACCACTACGGTGCC | AGCCGAATCGTTCCTAAAGA | BT020756 | ۸۳ |
| کارنتین پالمیتویل ترانسفراز ۱ | GCTGGCTGGTTGGTTATG | GCGAAAGAAGAAGATGCCCA | XM_005701592 | ۱۹۷ |
| کارنتین پالمیتویل ترانسفراز ۲ | GCTGGTGAGTGGTGGCAACA | CAAAGTGGATGGCAGCAGTG | XM_005678396 | ۱۹۱ |
| آسیل کوآ دهیدروژناز | TCGCCCAGGTATCTAAGTCC | CACAGACGGGTATGGAAACA | XM_005693484 | ۹۷ |
| <i>YWHAZ</i> | TGTAGGACCCGTAGTCACT | TTCTCTGTATTCTCGAGCCATCT | AY970970 | ۱۱۵ |

نتایج و بحث

با توجه به شکل ۱، با افزایش غلظت اسیدچرب ژله رویال تا غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر نرخ بلوغ تخمک نسبت به گروه شاهد افزایش یافت اما با افزایش غلظت اسیدهای چرب تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، نرخ بلوغ تخمک نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت. تخمک پستانداران چربی درون سلولی زیادی دارد که میان گونه‌ها از نظر مقدار متفاوت است. تری گلیسرید چربی اصلی در اووسیت پستانداران است و منبع انرژی قوی برای بلوغ اووسیت و رشد رویان پیش از جایگزینی محسوب می‌شود [۲۳]. اکسیداسیون اسید چرب، منبع ATP لازم برای بلوغ تخمک و نمو رویان را فراهم می‌کند و با فعال شدن این مسیر، نرخ بلوغ و نمو تخمک بهبود خواهد یافت [۷ و ۳۰]. اسیدهای چرب تأثیر زیادی بر بهبود عملکرد تولیدمثلی دارند این امر در مورد اسیدچرب غیراشباع امگا۳ و امگا۶ ثابت شده است. در نتیجه کشت تخمک گاو با اسید اولئیک، ذخیره چربی در قطره‌های چربی افزایش یافته و منجر به بهبود نمو تخمک شد [۳]. اضافه کردن آلفا لینولنیک اسید به محیط کشت بلوغ برون تنی بز در غلظت ۵۰ میکرومولار سبب افزایش نرخ بلوغ و درصد تولید بلاستوسیت و کیفیت رویان شد [۱]. کشت تخمک گاو با اسید لینولنیک کنژوگه در طول بلوغ با دخالت بر سوخت و ساز چربی سبب بهبود شایستگی نمو

تخمک گاو شده تا رویان‌هایی با کیفیت بالاتر نمو پیدا کنند [۱۸]. کشت مجموعه تخمک کومولوس گاو با لینولنیک اسید در غلظت ۵۰ میکرومولار، سبب افزایش درصد تخمک‌های رسیده به متافاز میوز دوو بهبود نرخ بلوغ شد ولی در غلظت‌های بالاتر نتایج به دست آمده برعکس بود [۲۳]. اضافه کردن لینولنیک اسید در غلظت‌های ۴۳ میکرومولار، با افزایش محتوای چربی خنثی ذخیره شده در قطره‌های چربی، سبب بهبود کیفیت تخمک شد [۶]. همچنین افزودن اسیدچرب به محیط کشت بلوغ در غلظت ۵۰ تا ۲۰۰ میکرومولار، بلوغ برون تنی تخمک را به طور معنی‌داری کاهش داد. کشت تخمک در محیط کشت دارای ۱۰۰ میکرومولار اسید لینولنیک نرخ بلوغ را به طور معنی‌داری کاهش داد، بر این اساس احتمال دارد که حضور اسید لینولنیک در غلظت‌های زیاد پیش از گامه ازبین رفتن غشای هسته تخمک، سبب توقف بلوغ هسته‌ای تخمک شود [۲۰].

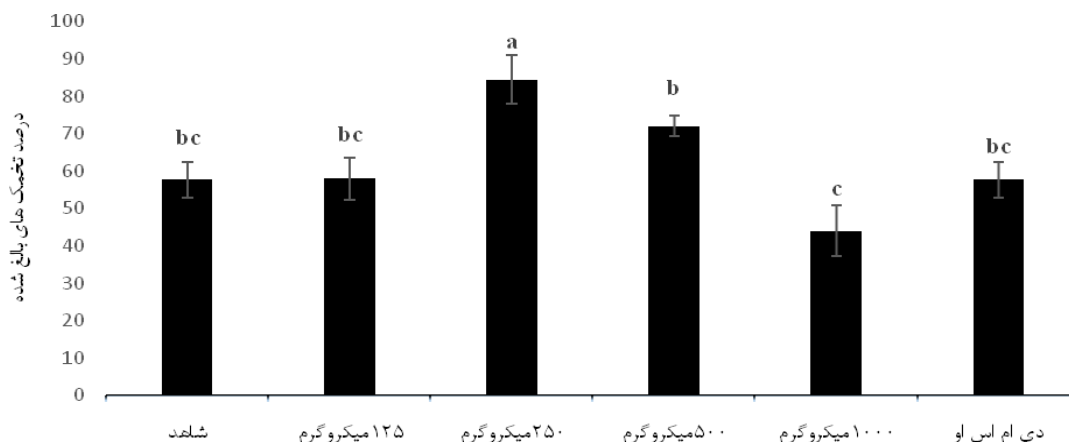
اثر اسیدهای چرب بر بلوغ برون تنی تخمک می‌تواند از دو مسیر پیام‌رسانی^۱ MAP کینازو مسیر ساخت پروستاگلاندین ای دو انجام شود. بلوغ تخمک‌ها بعد از تحرک گنادوتروپین‌ها به طور عمده به افزایش غلظت cAMP در سلول‌های کومولوس وابسته است.

1. Mitogen-activated protein kinases

تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۵

مرجان اسماعیلی، حمید دلدار، رزبخت انصاری پیر سرایی و عیسی دیرنده



شکل ۱. تأثیر غلظت های مختلف اسیدهای چرب ژله رویال بر درصد تخمک های بالغ شده بز. تفاوت اعداد با حروف نامتشابه در هر ستون، معنی دار است ($P < 0.05$).

می شود [۲۰]. در نتیجه میتوان گفت گرچه حضور اسیدهای چرب به عنوان افزایش دهنده باروری در نشخوارکنندگان هستند اما غلظت های بیش از اندازه آن ها در محیط بلوغ برون تنی تخمک زیان بار بوده و موجب کاهش نرخ بلوغ برون تنی تخمک خواهد شد.

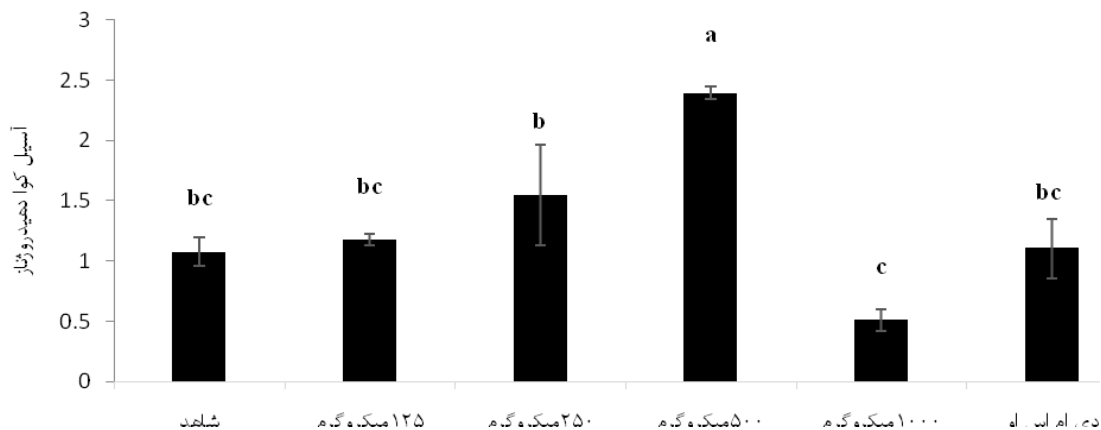
اثر غلظت های مختلف اسیدهای چرب ژله رویال بر بیان نسبی ژن های $PPAR\alpha$ ، کارنیتین پالمیتویل ترانسفراز ۱، کارنیتین پالمیتویل ترانسفراز ۲ و اسیل کوا دهیدروژناز در تخمک معنی دار بود. البته در مورد اسیل کوا دهیدروژناز (شکل ۲) تیمار با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به تیمار کنترل افزایش معنی داری ($P < 0.05$) داشت. غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به تیمار کنترل توانست بیان نسبی ژن های $PPAR\alpha$ ، کارنیتین پالمیتویل ترانسفراز ۱ و کارنیتین پالمیتویل ترانسفراز ۲ (به ترتیب شکل های ۳، ۴ و ۵) را افزایش دهد ($P < 0.05$) ولی با افزایش غلظت اسید های چرب ژله رویال در محیط کشت بلوغ تا غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، همه ژن ها نسبت به تیمار ۲۵۰ میکروگرم کاهش معنی داری ($P < 0.05$) را نشان دادند.

مسیری که گنادوتروپین ها طی تقسیم میوز بر بلوغ تخمک تأثیر کرده و موجب پخش شدن سلول های کومولوس خواهد شد، از طریق مسیر پیام رسانی MAP کیناز میانجی گری می شود. [۱۵]. پروستاگلاندین ای دواز طریق گیرنده های خود در سلول های کومولوس عمل می کنند و سبب تحریک پخش شدن سلول های کومولوس شده و واسطه ای در بلوغ تخمک محسوب می شود. در واقع کشت کمپلکس تخمک کومولوس با لینولینیک اسید سبب افزایش غلظت پروستاگلاندین ای دودر محیط کشت، افزایش غلظت cAMP درون سلولی بعد از ۳ ساعت بلوغ و افزایش فسفریله شدن MAP کیناز در طول ۶ ساعت اول بلوغ شد [۱۵]. همچنین لینولینیک اسید بر اثرات مهارکننده ی بلوغ تخمک غلبه کرده و سبب بهبود نرخ بلوغ می شود [۶]. از طرفی کشت کمپلکس اووسیت کومولوس با لینولینیک اسید در غلظت ۱۰۰ میکرومولار، سبب کاهش غلظت cAMP درون سلولی بعد از شش تا ۲۴ ساعت از بلوغ، کاهش فسفریله شدن MAP کیناز و افزایش غلظت پروستاگلاندین ای دومی شود. در نتیجه مکمل لینولینیک اسید در غلظت بالا سبب تغییر در مکانیسم مولکولی تنظیم کننده بلوغ تخمک و در نتیجه مهار پیشرفت میوزی

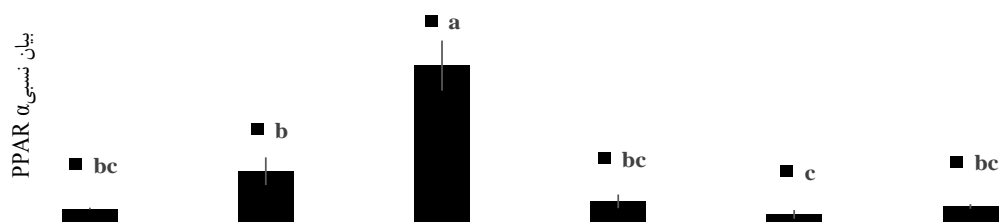
تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۵

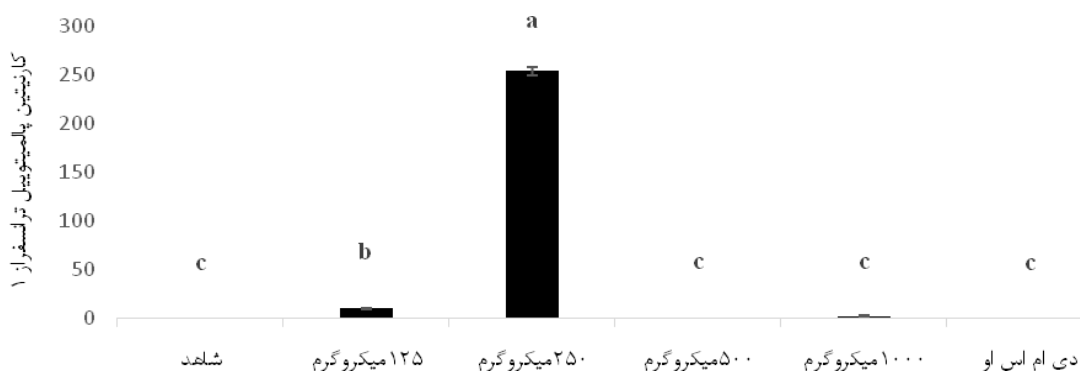
تأثیر اسیدهای چرب ژله رویال بر بیان ژن‌های درگیر در بتا اکسیداسیون در بلوغ برون‌تنی تخمک بز



شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف اسیدهای چرب ژله رویال بر بیان نسبی ژن آسیل کوا دهیدروژناز در تخمک بز. ^{a-c}: تفاوت اعداد با حروف نامتشابه در هر ستون، معنی دار است ($P < 0.05$).



شکل ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف اسیدهای چرب ژله رویال بر بیان نسبی ژن PPAR α در تخمک بز. ^{a-c}: تفاوت اعداد با حروف نامتشابه در هر ستون، معنی دار است ($P < 0.05$).

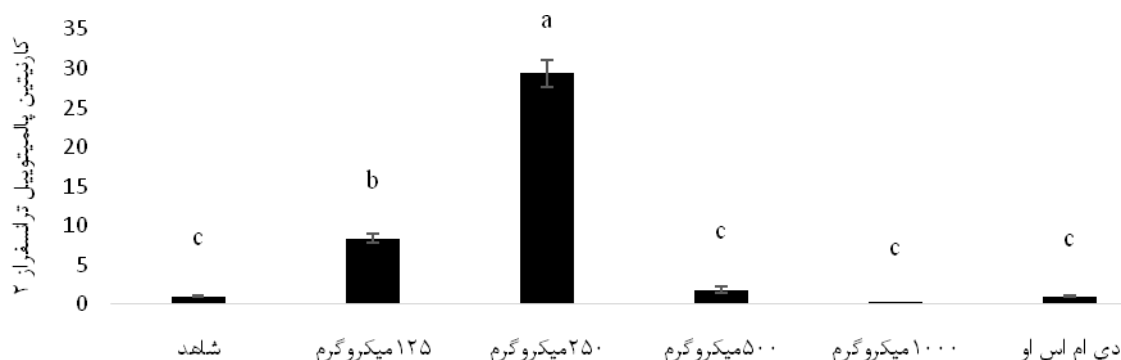


شکل ۴. تأثیر غلظت‌های مختلف اسیدهای چرب ژله رویال بر بیان نسبی ژن کارنتین پالمیتویل ترانسفراز ۱ در تخمک بز. ^{a-c}: تفاوت اعداد با حروف نامتشابه در هر ستون، معنی دار است ($P < 0.05$).

تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۵

مرجان اسماعیلی، حمید دلدار، رزیخت انصاری پیر سرایی و عیسی دیرنده



شکل ۵. تأثیر غلظت های مختلف اسیدهای چرب ژله رویال بر بیان نسبی ژن کارتینین پالمیتوئیل ترانسفراز ۲ در تخمک بز.^{a-c}: تفاوت اعداد با حروف نامتشابه در هر ستون، معنی دار است ($P < 0/05$).

کوا دهیدراتاز در تخمک و کومولوس انسان شناسایی شده است [۲۱]. گزارش شده است که ژن های کارتینین پالمیتوئیل ترانسفراز ۱ و کارتینین پالمیتوئیل ترانسفراز ۲ در سلول های گرانولوزا و هم چنین بخش های دیگر تخمدانی مانند جسم زرد، فولیکول، سلول کومولوس و تخمک نابالغ گاو بیان شده است. این مطالعات نشان می دهد که اکسیداسیون اسیدچرب در تخمک بیشتر از سلول های کومولوس اتفاق می افتد [۸]. با توجه به پژوهش های پیشین و نتایج پژوهش حاضر می توان نتیجه گیری کرد که اسید های چرب تا غلظت ۲۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر توانست بیان ژن ها را افزایش دهد و غلظت های زیاد احتمالاً تاثیرات نامطلوب بر بیان ژن ها و بلوغ برون تنی تخمک دارد.

گیرنده های هسته ای PPAR گروهی از گیرنده ها هستند که سه ایزومر آلفا، بتا/دلتا و گاما دارند و با چسبیدن به لیگاند های طبیعی مانند اسیدچرب چندگانه غیر اشباع و یا لیگاند های دیگر فعال می شوند. همچنین در بخش های مختلفی از سیستم تولید مثلی مانند هیپوتالاموس، هیپوفیز، تخمدان، رحم و بیضه بیان می شوند [۱۰]. در مطالعات زیادی بررسی شده که اسیدهای چرب به عنوان یکی از

درباره تاثیر اسید های چرب افزوده شده در محیط کشت بلوغ برون تنی تخمک بر متابولیسم اسیدهای چرب ارائه نشده است. اسیدهای چرب از جمله، ایکوزاپنتانویک اسید و دوکوزاهگزانویک اسید و آلفا لینولنیک اسید جیره ای بر سوخت و ساز چربی کبدی در موش اثر گذاشته و سبب کاهش غلظت تری گلیسرید سرم و فسفولیپید، کاهش تری گلیسرید کبدی، کاهش فعالیت آنزیم سنتز اسیدچرب سیتوزولی و افزایش فعالیت کارتینین پالمیتوئیل ترانسفراز ۱ در میتوکندری می شود [۱۴]. در راستای نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر، کشت تخمک گاو و خوک با مهار کننده کارتینین پالمیتوئیل ترانسفراز ۱ نیز بر نمو رویان اثر می گذارد و سبب کاهش نمو رویان می شود [۳۰]. نتایج این پژوهش هم نشان داد که غلظت های زیاد اسید چرب موجب کاهش چشمگیر بیان آنزیم های درگیر در متابولیسم چربی در تخمک شده که منجر به کاهش نرخ بلوغ برون تنی تخمک شده است. به روشنی درک شده است که کارتینین پالمیتوئیل ترانسفراز ۱ در مجموعه تخمک کومولوس موش در مرحله بلوغ قبل از تخمک ریزی در شرایط درون تنی بیان می شود [۷ و ۱۱]. اخیراً نیز آنزیم های آسپیل کوا سنتتاز، آسپیل کوا دهیدروژناز و انوییل

تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۵

تأثیر اسیدهای چرب ژله رویال بر بیان ژن‌های درگیر در بتا اکسیداسیون در بلوغ برون‌تنی تخمک بز

منابع

۱. مراد یم ج، خادم ع، حسینی ا، وشکینی آ، اسدی الموتی ع، و محمدی سنگ چشمه ع (۱۳۹۳) اثر افزودن اسیدآلفا - لینولنیک به محیط کشت بلوغ برون‌تنی تخمک بر توانایی تکوین و کیفیت رویان حاصل از پارتنوژنز و لقاح برون‌تنی در بز. تولیدات دامی. صص. ۷۵-۸۳.
۲. نیاورانی ا ر (۱۳۹۲) بیوشیمی هارپر. تالیف پیتر. کنلی، دیوید. بندر، اتونی. ویل، رابرت. مورای، ویکتور. رادول. ویراست ۲۹. انتشارات اشارت. صص ۲۶۳-۲۵۴.
3. Aardema H, Vos PL, Lolicato F, Roelen BAJ, Knijn HM, Vaandrager AB, Helms JB and Gadella BM (2011) Oleic Acid Prevents Detrimental Effects of Saturated Fatty Acids on Bovine Oocyte Developmental Competence. *Biology of Reproduction* 85: 62-69
4. Agazzi A, Invernizzi G, Campagnoli A, Ferroni M, Fanelli A, Cattaneo D, Galmozzi A, Crestani M, Dell'Orto Vand Savoini G (2010) Effect of different dietary fats on hepatic gene expression in transition dairy goats. *Small Ruminant Research* 93: 31-40
5. Bionaz, M, Chen Sh, Khan MJ and Looor JJ (2013) Functional Role of PPARs in Ruminants: Potential Targets for Fine-Tuning Metabolism during Growth and Lactation. *PPAR Research* 28 pages
6. Carro M, Buschiazzo J, Ríos GL, Oresti GM and Alberio RH (2013) Linoleic acid stimulates neutral lipid accumulation in lipid droplets of maturing bovine oocytes. *Theriogenology* 79: 687-694

لیگندهای طبیعی PPAR بوده [۱۷ و ۲۹] و از طرفی گزارش شده که کرد PPAR یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بتا اکسیداسیون است و در تخمک نیز بیان می شود [۹]. اسیدهای چرب امگا ۳ و امگا ۶ با تحریک PPAR α سبب افزایش اکسیداسیون چربی می شود [۹] در بز شیر، مکمل روغن نارگیل که شامل اسیدهای چرب ۱۶ و ۱۸ کربنه است سبب افزایش بیان ژن PPAR α و ژن‌های کبدی مرتبط و افزایش سطح mRNA آن‌ها در کبد شد [۵]. هم چنین فعال شدن PPAR α در شرایط درون‌تنی سبب افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب در کبد بز شد [۵]. هم راستا با یافته‌های پژوهش حاضر، مشخص شده است که افزایش مسیرهای کاتابولیزم چربی در تخمک سبب افزایش نرخ بلوغ و بلاستوسیت رویان شده است [۳۰ و ۷]. همچنین تحریک مسیر بتا اکسیداسیون توانسته است نرخ بلوغ تخمک و شایستگی نمو آن را افزایش دهد [۳۰ و ۷]. پژوهش حاضر نشان داد که تاثیر اسیدهای چرب بر بلوغ برون‌تنی تخمک و بیان ژن‌های درگیر در سوخت و ساز چربی وابسته به دوز است و می‌تواند فعالیت مسیر بتا اکسیداسیون را افزایش دهد. افزایش غلظت اسیدهای چرب ژله رویال تا غلظت ۲۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر نه تنها بیان نسبی ژن PPAR α بلکه بیان نسبی سایر ژن‌های درگیر در متابولیسم چربی در تخمک را افزایش داد که منجر به افزایش نرخ بلوغ برون تنی تخمک بز شد. این درحالی بود غلظت های زیاد اسید چرب در این پژوهش تاثیرات نامطلوب در بیان نسبی ژن های بررسی شده و نرخ بلوغ برون تنی تخمک داشت. هنوز تاثیرات اسید های چرب بر تولید مثل و باروری دام های اهلی به خوبی درک نشده است و بر این اساس پژوهش های آینده برای روشن شدن مکانیسم های احتمالی آن ضروری به نظر می رسد.

تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۵

7. Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ and Robker RL (2010) Beta-Oxidation Is Essential for Mouse Oocyte Developmental Competence and Early Embryo Development. *Biology Of Reproduction* 83: 909–918
8. Elis S, Desmarchais A, Maillard V, Uzbekova S, Monget Ph and Dupont J (2015) Cell proliferation and progesterone synthesis depend on lipid metabolism in bovine granulosa cells. *Theriogenology* 83: 840–853
9. Ebrahimi M, Rajion MA, Yong Meng G, Soleimani Farjam A, Oskoueian E and Jafari S (2015) Diet high in α -linolenic acid up-regulate PPAR- α gene expression in the liver of goats. *Electronic Journal of Biotechnology*.
10. Froment P, Gizard F, Defever D, Staels B, Dupont J and Monget P (2006) Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition. *Journal of Endocrinology* 189: 199–209.
11. Gentile L, Monti M, Sebastiano V, Merico V, Nicolai R, Calvani M, Garagna S, Redi CA and Zuccotti M (2004) Single-cell quantitative RT-PCR analysis of CPT1 and CPT2 gene expression in mouse antral oocytes and in preimplantation embryos. *Cytogenetic and Genome Research* 105: 215–221.
12. Hattori N, Nomoto H, Fukumitsu H, Mishima S and Furukawa SH (2007) Royal jelly and its unique fatty acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, promote neurogenesis by neural stem/progenitor cells in vitro. *Biomedical Research* 28: 261-266
13. Ito S, Nitta Y, Fukumitsu H, Soumiya H, Ikeno K, Nakamura T and Furukawa SH (2011) Antidepressant-Like Activity of 10-Hydroxy-Trans-2-Decenoic Acid, a Unique Unsaturated Fatty Acid of Royal Jelly, in Stress-Inducibile Depression-Like Mouse Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012: 1-6
14. Ikeda I, Cha JY, Yanagita T, Nakatani N, Oogami K, Imaizumi K and Yazawa K (1998) Effects of dietary alpha-linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on hepatic lipogenesis and beta-oxidation in rats. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* 62: 675-80
15. Kubelka M, Motlík J, Schultz RM and Pavlok A (2000) Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes without influencing chromosome condensation activity. *Biology of Reproduction* 62: 292-302
16. Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M and Fukui Y (2001) Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction* 122: 131–138
17. Krey G, Braissant O, L'Horset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker M and Wahli M (1997) Fatty Acids, Eicosanoids, and Hypolipidemic Agents Identified as Ligands of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors by Coactivator-Dependent Receptor Ligand Assay. *Molecular Endocrinology* 11: 779–791
18. Leroy JLMR, 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: 485–495.
19. Moutsatsou P, Papoutsis Z, Kassi E, Heldring N, Zhao CH, Tsiapara A, Melliou E, Chrousos GP, Chinou I, Karshikoff A, Nilsson L and Dahlman-Wright K (2010) Fatty Acids Derived from Royal Jelly Are Modulators of Estrogen Receptor Functions. *Plos one* 5: 15594

تأثیر اسیدهای چرب ژله رویال بر بیان ژنهای درگیر در بتا اکسیداسیون در بلوغ برون تنی تخمک بز

20. Marei WF, Wathes DC and Fouladi-Nashta AA (2010) Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. *Reproduction* 139: 979-988.
21. Montjean D, Entezami F, Lichtblau I, Belloc S, Gurgan T and Menezo Y (2012) Carnitine content in the follicular fluid and expression of the enzymes involved in β oxidation in oocytes and cumulus cells. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 29: 1221-1225.
22. McEvoy T G, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS and Speake BK (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 .
23. Sturmey RG, Reis A, Leese HJ and McEvoy TG (2009) Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reproduction of Domestic Animals* 44: 50-58.
24. Sturmey RG and Leese HJ (2003) Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction* 126: 197-204.
25. Sanchez-Lazo L, Brisard D, Elis S, Maillard V, Uzbekov R, Labas V, Desmarchais A, Papillier P, Monget Ph and Uzbekova S (2014) Fatty acid synthesis and oxidation in cumulus cell support oocyte maturation in bovine. *Molecular Endocrinology* 28: 1502-21.
26. Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG (2010) The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction*. 139: 685-695.
27. Songsase N (2012) Energy Metabolism Regulating Mammalian Oocyte Maturation. In: *Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity*. Andrew Swan. Chapter 9. 173-186.
28. Sabatini AG, Marcazzan GL, Caboni MF, Bogdanov S and Muradian LBA (2009) Quality and standardization of Royal Jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 1: 1-6.
29. Schoonjans K, Staels B and Auwerx J (1996) The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1302: 93-109.
30. Sturmey RG, O'Toole PJ and Leese HJ (2006) Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial lipid association in the porcine oocyte. *Reproduction* 132: 829-837.