تولیدات دامی
دوره ۱۸ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۵
صفحه‌های ۶۱۳-۶۰۳

تأثیر اسیدهای چرب ژله رویال بر بیان ژن‌های درگیر در بتا اکسیداسیون در بلوغ برون‌تنی 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 وصول مقاله:۱۳۹۴/۱۰/۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۵/۳۱

چکیده

تأثیر غلظت‌های مختلف اسیدهای چرب ژله رویال بر بلوغ برون‌تنی 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 برون‌تنی تخمک‌ها را افزایش داد. اما افزایش غلظت اسیدهای چرب در محیط بلوغ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، کاهش معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) را در نرخ بلوغ برون‌تنی نسبت به تیمار شاهد نشان داد. افزایش غلظت اسیدهای چرب ژله رویال تا ۲۵۰ میکروگرم، به طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بیان نسبی ژن‌های PPARα، 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 ($P<۰/۰۵$). می‌توان نتیجه‌گیری کرد که افزودن اسیدهای چرب ژله رویال به محیط بلوغ برون‌تنی 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 برون‌تنی، بیان ژن، سوخت و ساز چربی

* نویسنده مسئول Email: address: h.deldar@sanru.ac.ir

مقدمه

مطالعات زیادی روی تـأثیر متابولیسـم کربوهیـدرات‌هـای مهـم، بـه‌ویـژه گلـوکزوپیروات، در تقسـیم میـوز و بلـوغ سیتوپلاسمی تخمک و تولید رویان صورت گرفته و توجـه بسیار اندکی به نقش متابولیسم چربی‌های درون‌سـلولی در تکامل تخمک شده است. چربی درون سلولی نقش مهمـی در نمو تخمک ایفا مـی‌کنـد [۲۳]. در سیتوپلاسـم تخمـک پستانداران، قطره‌های چربی فراوانی است که میان گونه‌هـا از نظر مقدار متفاوت است (در خوک خیلی زیـاد اسـت و بعـد گـاو و در مـوش خیلـی کـم اسـت) [۲۲ و ۲۴]. تری‌گلیسرید، چربی اصلی در تخمـک پسـتانداران بـوده و منبع انرژی قوی برای بلـوغ تخمـک و رشـد رویـان قبـل جایگزینی فراهم می‌کند [۲۶]. بلوغ میوزی تخمک نیازمنـد انرژی از منابع مختلف مانند گلوکز و اسید آمینـه و چربـی است [۲۵]. گلوکز به عنوان مهم‌ترین منبع انـرژی خـارجی است که به وسیله کومولوس عمـدتاً از طریـق گلیکـولیز و پنتـوز فسـفات متـابولیزه مـی‌شـود و بـرای تخمـک یـک سوبسترای اکسـیداتیو ماننـد پیـروات و لاکتـات را فـراهم می‌کند [۲۶]. منبع انرژی مهم دیگـر بـرای تخمـک، اسـید چرب است که انرژی بیشتری نسبت به گلـوکز دارد [۲۳]. اسید چرب آزاد در مایع فولیکولی و در منابع بـین سـلولی کمپلکس تخمک کومولوس وجـود دارد. محتـوای چربـی تخمک و ترکیب اسیدچرب بر کیفیت تخمک یعنی بلوغ و نمو آن تأثیرگذار است [۱۶]. درواقع شواهدی وجـود دارد که نشان داده افزایش فعالیت میتوکندری و بتااکسیداسـیون نقش مهمی در بهبود شایستگی نمو تخمک دارد [۲۷].

بـه‌طـورکلی، تـأثیر افـزودن یـک اسـیدچرب هماننـد لینولنیک اسید[۱]، لینولئیک اسید [۲۰] و اسـیدهای چـرب آزاد [۱۸] در تولید برون‌تنی رویان بررسی شده اسـت، امـا اثر افزودن مخلوطی از اسیدهای چـرب، اسـیدهای چـرب ژله رویال، در محیط بلوغ برون‌تنی تخمک بررسـی نشـده است. اسیدهای چرب ژله رویال به صورت کوتاه، متوسـط و بلند زنجیر وجـود دارد [۲۸]. اسـیدهای چـرب متوسـط زنجیر موجود در ژله رویال شـامل ۱۰ – هیدروکسـی ۲ – دکانوئیـک اسـید، ۳ و ۱۰ دی هیدروکسـی دکانوئیـک و سباسیک اسید است که در بین این اسیدهای چـرب، ۱۰ – هیدروکسی ۲ – دکانوئیک اسید مهمترین اسیدچرب است. اسیدهای چرب ژله رویال دارای ویژگـی‌هـای رشـددهنده سلول عصبی [۱۲]، ضدافسردگی [۱۳] و جلوگیرنده تـورم مفاصل [۱۴] در انسان است. همچنین، این اسیدهای چرب متعادل‌کننده عملکرد گیرنده استروژن و واسطه سـیگنالینگ استروژن نیز هستند [۱۹].

ورود اسیدچرب به مسیر اکسـیداتیو بـا فعالیـت آنـزیم کارنیتین پالمیتوییل ترانسفراز۱ کنتـرل مـی‌شـود. کـارنیتین پالمیتوییل ترانسفراز۱ در غشای داخلی میتوکنـدری، اسـیل کوآی بلند را به آسیل کارنیتین تبدیل مـی کنـد تـا پـس از عبور از غشای داخلی، به سیسـتم آنزیمـی بتااکسیداسـیون دسترسـی یابـد. آسـیل کـارنیتین تحـت تـأثیر کـارنیتین پالمیتوییـل ترانسـفراز۲ در سـمت درونـی غشـای داخلـی میتوکندری با کوآنزیم آ واکنش داده و ضمن تشکیل مجدد آسیل کوآ در ماتریکس میتوکندری، کارنیتین آزاد می‌شـود. اسیل کـوا دهیـدروژناز هـم آنـزیم محدودکننـده در مسـیر بتااکسیداسیون است [۲]. در مطالعات زیادی بررسـی شـده کـه اسـیدهـای چـرب بـه عنـوان یکـی از لیگانـدهـای طبیعیPPAR[1] بوده [۱۷ و ۲۹] و از طرفـی گـزارش شـده است کـه PPAR یکـی از ژن‌هـای کلیـدی در مسـیر بتـا-اکسیداسیون است و در تخمک نیز بیان می‌شـود [۲۹]. بـه نظر می رسد که با اضافه کردن اسیدچرب به محیط کشت، مسیر بتااکسیداسیون تحریک شده و نمـو تخمـک افـزایش یابد. براساس این فرضیه، هدف از انجام پـژوهش حاضـر،

1. Peroxisome Prolifirator Activated Receptor

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 گیبکو 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 سی‌سی آب خالص حل شد. سپس - به آن ۸ سی‌سی 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 جداشده 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 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 هایتخمک- کومولوس در محلول اویداکت ساختگی به همراه بافر هیپس، شستشوی پایانی آن ها سه بار در محیط تکامل استریل ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد.

محلول اویداکت ساختگی به همراه بافر هیپس شدند و چندین بار شستشو شده، سپس برای اندازه گیری 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 قطره های محیط کشت خارج شده و سپس وارد سلول‌های کومولوس از تخمک به‌وسیله ی آنزیم هیالورونیداز جدا شدند.برای جداسازی RNAاز کیت (۷۴۰۰۴، کایا ژن)استفاده شد. برای ساخت cDNAاز 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.

جدول ۱. پروفایل اسیدهای چرب استخراج شده از ژله رویال

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

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) $Yij = \mu + Ti + eij$

در این رابطه، Yij مقدار عددی تکرار jامازتیمار iام، μ میانگین داده ها، Tiاثر تیمار i و eij اثر خطای آزمایش است.

جدول ۲. آغازگرهای استفاده شده برای بیان نسبی ژن ها

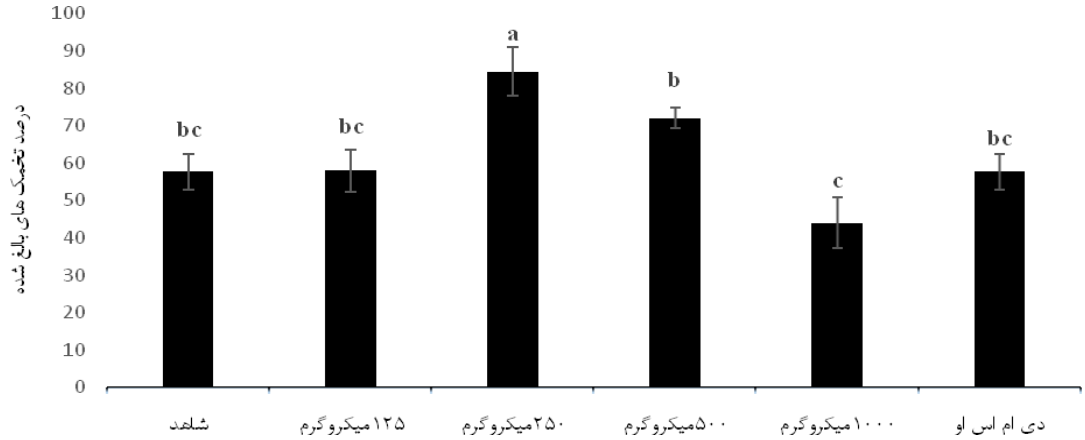
ژن ها	آغازگر رفت	آغازگر برگشت	شماره بانک ژن	جفت باز
PPAR α	CTGGCTACCACTACGGTGTCC	AGCCGAATCGTTCTCCTAAAGA	BT020756	۸۳
کارنیتین پالمیتوییل ترانسفراز ۱	GCTGGCTGGTTGTGGTTATG	GCGAAAGAAGAAGATGCCCA	XM_005701592	۱۹۷
کارنیتین پالمیتوییل ترانسفراز ۲	GCTGGTGAGTGGTGGCAACA	CAAAGTGGATGGCAGCAGTG	XM_005678396	۱۹۱
آسیل کوآ دهیدروژناز	TCGCCCAGGTATCTAAGTCC	CACAGACGGGTATGGAAACA	XM_005693484	۹۷
YWHAZ	TGTAGGAGCCCGTAGGTCATCT	TTCTCTCTGTATTCTCGAGCCATCT	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 شاهدکاهش یافت. تخمک پستانداران چربی درون سلولی زیادی دارد که میان گونه ها 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 می کندو با فعال شدن این مسیر، نرخ بلوغ و نمو تخمک بهبود خواهد یافت [۷و ۳۰]. اسیدهای چرب تأثیر زیادی بر بهبود عملکرد تولیدمثلی دارند این امر در مورد اسیدچرب غیراشباع امگا۳ و امگا۶ ثابت شده است. در نتیجه‌ی کشت تخمک گاو با اسید اولئیک، ذخیره چربی در قطره‌های چربی افزایش یافتهو 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 بلاستوسیست و کیفیت رویان شد [۱]. کشت تخمک گاو با اسید لینولئیک کنژوگه در طول بلوغ با دخالت بر سوخت و ساز چربی سبب بهبود شایستگی نمو تخمک گاو شده تا رویان هایی 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 غلظت های بالاتر نتایج به دست آمده برعکس بود [۲۳]. اضافه کردن لینولئیک اسید در غلظت هاینه و 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 معنی داری کاهش داد. کشت تخمک در محیط کشت دارای ۱۰۰ میکرومولار اسید لینولئیک نرخ بلوغ را به طور معنی داری کاهش داد، بر این اساس احتمال دارد که حضور اسید لینولئیک در غلظت های زیاد پیش از گامه ازبین رفتن غشای هسته تخمک،سبب توقف بلوغ هسته ای تخمک شود [۲۰]

اثر اسیدهای چرب بر بلوغ برون تنی تخمک می تواند از دو مسیر پیام رسانی MAP[1] کینازو مسیر ساخت پروستاگلاندین ای دو انجام شود.بلوغ تخمک ها بعد از تحرک گنادوتروپین ها به طور عمده به افزایش غلظت cAMPدر سلول های کومولوس وابسته است.

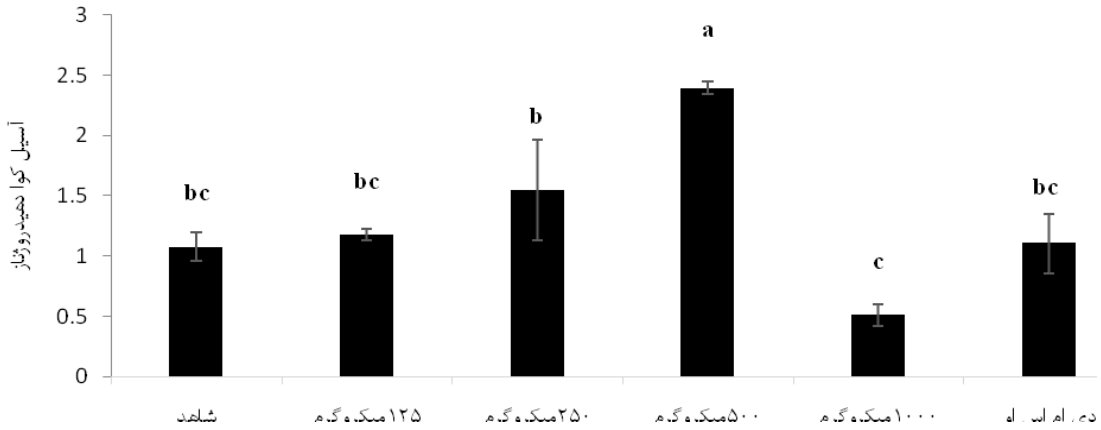
1. Mitogen-activated protein kinases



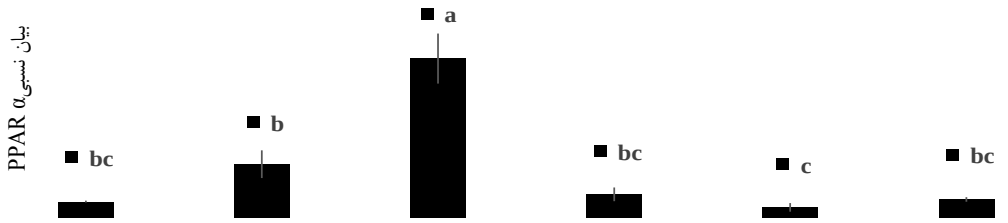
شکل ۱. تأثیر غلظت های مختلف اسیدهای چرب ژله رویال بر درصد تخمک های بالغ شده بز. [a-c]: تفاوت اعداد با حروف نامتشابه در هر ستون، معنی دار است ($P<۰/۰۵$).

مسیری که گنادوتروپین ها طی تقسیم میوز بر بلوغ تخمک تاثیر کرده و موجب پخش شدن سلول های کومولوس خواهد شد، از طریق مسیر پیام رسانی MAP کیناز میانجی‌گری می‌شود.[۱۵]. پروستاگلاندین ای دواز طریقگیرنده های خود در سلول های کومولوس عمل می‌کنند و سبب تحریک پخش شدنسلول های کومولوس شده و واسطه ای در بلوغ تخمکمحسوب می شود.در واقع کشت کمپلکس تخمک کومولوس با لینولنیک اسید سبب افزایش غلظت پروستاگلاندین ای دودر محیط کشت، افزایش غلظت cAMPدرون سلولی بعد از ۳ ساعت بلوغ و افزایش فسفریله شدن MAP کینازدر طول ۶ ساعت اول بلوغ شد[۱۵]. همچنین لینولنیک اسید بر اثرات مهارکننده ی بلوغ تخمک غلبه کرده و سبب بهبود نرخ بلوغ می شود[۶].از طرفی کشت کمپلکس اووسیت کومولوس با لینولئیک اسید در غلظت ۱۰۰میکرومولار، سبب کاهش غلظت cAMPدرون سلولی بعد از شش تا ۲۴ ساعت از بلوغ، کاهش فسفریله شدنMAPکیناز وافزایش غلظت روستاگلاندین ای دومی شود. در نتیجه مکمل لینولئیک اسید در غلظت بالا سبب تغییر در مکانیسم مولکولی تنظیم کننده بلوغ تخمک و در نتیجه مهار پیشرفت میوزی می‌شود [۲۰].در نتیجه میتوان گفت گرچه حضور اسیدهای چرب به عنوان افزایش دهنده باروری در نشخوارکنندگان هستند اما غلظت‌های بیش از اندازه آن ها در محیط بلوغ برون تنی تخمک زیان بار بوده و موجب کاهش نرخ بلوغ برون‌تنی تخمک خواهد شد.

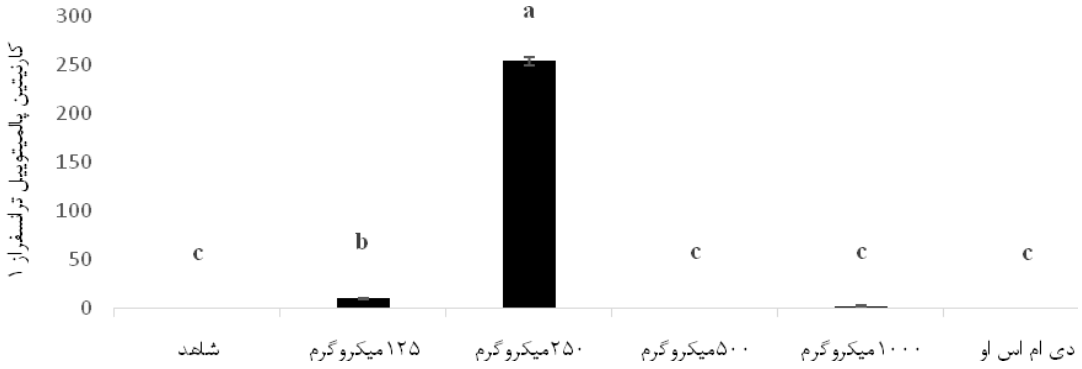
اثر غلظت های مختلف اسیدهای چرب ژله رویال بر بیان نسبی ژن های PPARα، کارنیتین پالمیتوییل ترانسفراز۱، کارنیتین پالمیتوییل ترانسفراز۲و اسید کوا دهیدروژناز در تخمکمعنی داربود.البته در مورد اسید کوا دهیدروژناز (شکل ۲) تیمار با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به تیمار کنترل افزایش معنی داری($P<۰/۰۵$) داشت.غلظت ۲۵۰میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به تیمار کنترل توانست بیان نسبی ژن های PPARα، کارنیتین پالمیتوییل ترانسفراز۱و کارنیتین پالمیتوییل ترانسفراز۲(به ترتیب شکل‌های ۳، ۴ و ۵) را افزایش دهد ($P<۰/۰۵$)ولی با افزایش علظت 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 ($P<۰/۰۵$)را نشان دادند.



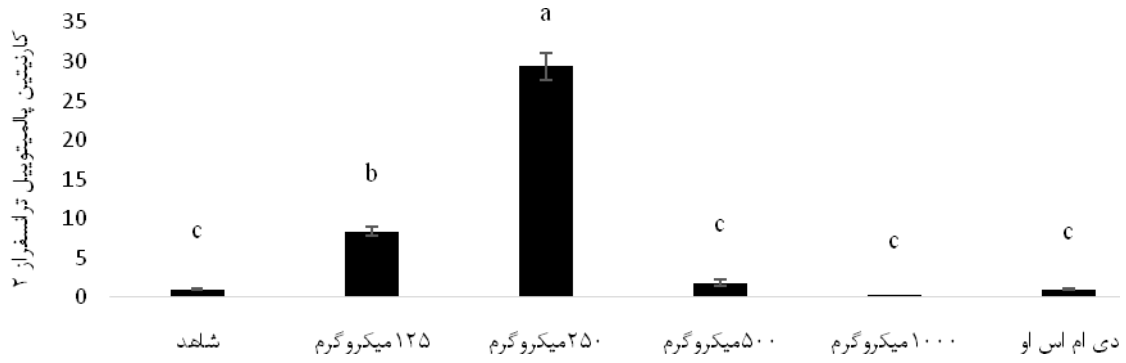
شکل ۲ . تاثیر غلظت های مختلف اسیدهای چرب ژله رویال بر بیان نسبی ژن آسیل کوا دهیدروژناز در تخمک بز.[a-c]**: تفاوت اعداد با حروف نامتشابه در هر ستون، معنی دار است (*P*<۰/۰۵).**



شکل۳ . تأثیر غلظت های 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*<۰/۰۵).**



شکل ۴ . تأثیر غلظت های مختلف اسیدهای چرب ژله رویال بر بیان نسبی ژن کارنیتین پالمیتویل ترانسفراز۱در تخمک بز.[a-c]**: تفاوت اعداد با حروف نامتشابه در هر ستون، معنی دار است (*P*<۰/۰۵).**



شکل ۵ . تأثیر غلظت های مختلف اسیدهای چرب ژله رویال بر بیان نسبی ژن کارنیتین پالمیتوییل ترانسفراز۲در تخمک بز.[a-c]**: تفاوت اعداد با حروف نامتشابه در هر ستون، معنی دار است (**$P<۰/۰۵$**).**

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، ایکوزاپنتانوییک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید و آلفا لینولنیک اسید جیره ای بر سوخت وساز چربی کبدی در موش اثر گذاشته و سبب کاهش غلظت تری گلیسرید سرم و فسفولیپید، کاهش تری گلیسرید کبدی، کاهش فعالیت آنزیم سنتز اسیدچربسیتوزولی و افزایش فعالیتکارنیتین پالمیتوییل ترانسفراز۱ در میتوکندری می شود [۱۴].در راستای نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر، کشت تخمک گاو و خوک با مهار کنندهکارنیتین پالمیتوییل ترانسفراز۱ 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 کارنیتین پالمیتوییل ترانسفراز۱ در مجموعه تخمک کومولوسموش در مرحله بلوغ قبل از تخمک ریزی در شرایط درون تنی بیان می شود[۷ و ۱۱]. اخیرا نیز آنزیم‌های آسیل کوا سنتاتاز، آسیل کوا دهیدروژناز و انوییل کوآ دهیدراتاز در تخمک و کومولوس انسان شناسایی شده است[۲۱]. گزارش شده است که ژن های کارنیتین پالمیتوییل ترانسفراز۱و کارنیتین پالمیتوییل ترانسفراز۲در سلول های گرانولوزا و هم‌چنین بخش‌های دیگر تخمدانی مانند جسم زرد، فولیکول، سلول کومولوس و تخمک نابالغ گاو بیان شده است. این مطالعات نشان می دهد که اکسیداسیون اسیدچرب در تخمکبیشتر از سلول های کومولوس اتفاق می افتد[۸]. با توجه به پژوهش های پیشین و نتایج پژوهش حاضر می توان نتیجه‌گیری کرد که اسید های چرب تا غلظت ۲۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر توانست بیان ژن ها را افزایش دهد و غلظت های زیاد احتمالا تاثیرات نامطلوب بر بیان ژن ها و بلوغ برون تنی تخمک دارد.

گیرنده‌های هسته ایPPAR گروهی از گیرنده‌ها هستند که سه ایزومر آلفا، بتا/دلتا و گاما دارند و با چسبیدن به لیگاندهایطبیعی مانند اسیدچرب چندگانه غیر اشباع و یا لیگاند های دیگر فعال می شوند. همچنین در بخش‌های 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

لیگاندهای طبیعیPPARبوده [۱۷و ۲۹] و از طرفی گزارش شده که کرد PPARیکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بتااکسیداسیون است و در تخمک نیز بیان می شود[۹]. اسیدهای چرب امگا۳ و امگا۶ با تحریکPPARαسبب افزایش اکسیداسیون چربی می شود [۹] در بز شیری، مکمل روغن نارگیل که شامل اسیدهای چرب ۱۶ و ۱۸ کربنه است سبب افزایش بیان ژن PPARα و ژن های کبدی مرتبط و افزایش سطح mRNA آن‌ها در کبد شد[۵]. هم چنین فعال شدن PPARαدر شرایط درون‌تنی سبب افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب در کبد بز شد[۵]

هم راستا با یافته های پژوهش حاضر، مشخص شده است که افزایش مسیرهای کاتابولیسم چربی در تخمک سبب افزایش نرخ بلوغ و بلاستوسیست رویان شده است[۷و ۳۰]. همچنین تحریک مسیر بتا اکسیداسیون توانسته است نرخ بلوغ تخمک و شایستگی نمو آن را افزایش دهد [۷و۳۰]. 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 بتااکسیداسیون را افزایش دهد. افزایش غلظت اسید های چرب ژله رویال تا غلظت ۲۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر نه تنها بیان نسبی ژن PPARαبلکه بیان نسبی سایر ژن های 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.

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. ۸۳-۷۵

۲. نیاورانی ا ر (۱۳۹۲) بیوشیمی هارپر. تالیف پیتر. کنلی، دیوید. بندر، انتونی. ویل، رابرت. مورای، ویکتور. رادول. ویراست ۲۹. انتشارات اشارت. ص ۲۵۴-۲۶۳.

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'OrtoVand 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 Loor JJ (2013)Functional Role of PPARs in Ruminants: Potential Targets for Fine-Tuning Metabolism during Growth and Lactation. PPAR Research28 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

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-Inducible Depression-LikeMouseModel. 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 oocytesWithout 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 infollicular fluid of dairy cows and their effect on developmentalcapacity of bovine oocytes in vitro. Reproduction 130: 485–495.

19. Moutsatsou P, Papoutsi 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

20. Marei WF,Wathes DC and Fouladi-Nashta AA (2010) Impact oflinoleic acid on bovine oocyte maturationand 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 b 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 enery 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 cellssupport 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 tandardization 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.