

Original Article

에이코사펜타인산이 돼지난포란의 체외 성숙에 미치는 영향

김강식¹, 박흠대^{2,*}

¹창원엘르메디 산부인과, ²대구대학교 생명공학과

Effects of Eicosapentaenoic Acid during In Vitro Maturation of Porcine Oocytes: Hormone Synthesis and Embryonic Developmental Potential

Kang-Sig Kim¹ and Hum-Dai Park^{2,*}

¹Ellemedi Obstetrics and Gynecology, Changwon 51191, Korea

²Department of Biotechnology, Daegu University, Gyeongsan 38454, Korea

Received September 10, 2019

Revised September 18, 2019

Accepted September 23, 2019

*Correspondence

Hum-Dai Park

E-mail: humdai@daegu.ac.kr

ORCID

<https://orcid.org/0000-0002-3721-9167>

ABSTRACT Among fatty acid families, the polyunsaturated fatty acids were demonstrated to be mediators in various reproductive processes as precursor of steroid hormone (via cholesterol) and prostaglandins (via arachidonic acid), and in the last decade, major research was focused on the effects of omega-6 and especially omega-3 fatty acid. Eicosapentaenoic acid, the longest members of omega-3 fatty acid family, can be produced by a series of desaturation and elongation reactions from shorter member such as α -Linolenic acid. However, very few studies have provided detailed descriptions of Eicosapentaenoic acid effects and mechanisms of action in mammalian oocytes. The purpose of this study was to evaluate the effect of Eicosapentaenoic acid supplementation on *in vitro* maturation and developmental potential of porcine oocytes. Various concentrations of Eicosapentaenoic acid was added into *in vitro* maturation medium, and we evaluated the degree of cumulus expansion, nuclear maturation rate, blastocysts quality, and levels of prostaglandin E2, 17 β -estradiol, progesterone in the spent medium. High doses (100 μ M) of Eicosapentaenoic acid supplementation significantly inhibited cumulus expansion and oocyte nuclear maturation, and prostaglandin E2 synthesis also significantly decreased compared with other groups ($p < 0.05$). Supplementation of 50 μ M Eicosapentaenoic acid showed higher quality blastocysts in terms of high cell numbers and low apoptosis when compared with other groups ($p < 0.05$), and synthesis ratio of E2/P4 also significantly increased compared with control group ($p < 0.05$). However, Supplementation of 100 μ M Eicosapentaenoic acid showed high apoptosis when compared with other groups ($p < 0.05$), and synthesis ratio of 17 β -estradiol/progesterone also significantly decreased compared with control group ($p < 0.05$). Our results indicated that supplementation with appropriate levels of Eicosapentaenoic acid beneficially affects the change of hormone synthesis for controlling oocyte maturation, leading to improved embryo quality. However, high doses of Eicosapentaenoic acid treatment results in detrimental effects.

Keywords: Eicosapentaenoic acid, porcine oocytes, prostaglandin, 17 β -estradiol/progesterone

서론

포유동물 난소 내 난포액 중에는 오메가-3와 오메가-6 계열의 다가불포화지방산이 풍부하게 함유되어 있으며, 동물들이 섭취하는 불포화지방산의 종류에 따라 난포액 내의 다가불포화 지방산의 조성도 변화된다(Bilby 등, 2006). 또한 이러한 변화는 프로스타글란딘(prostaglandin) 합성과 스테로이드호르몬 합성(steroidogenesis) 과정에 영향을 미치며, 이를 통해 직간접적으로 포유동물의 난자의 성숙 과정을 조절한다는 보고도 있다(Gulliver 등, 2012). 세포 외부로부터 흡수한 다가불포화지방산은 세포 내의 지방산 합성경로 중의 하나인 cyclooxygenase 합성경로를 통하여 프로스타글란딘을 생산한다(Abayasekara 등, 1999). 이 물질은 포유동물의 발정, 배란, 수정란의 발달, 분만 등과 같은 번식 과정에 중요한 작용을 가지고 있으며, 특히 포유동물의 체내 난자의 성숙에 매우 중요한 조절자 역할을 한다(Neal 등, 1975). 설치류(Eppig, 1981)와 소(Nuttinck 등, 2011)의 경우 프로스타글란딘은 체내에서 난구세포의 팽창과 난자 성숙을 조절하며, 특히 생쥐 난자의 체외 수정에 영향을 미친다고 하며(Viggiano 등, 1995), 이것은 Hizaki 등(1999)의 프로스타글란딘 수용체가 결손된 쥐에서 난구세포 팽창 실패와 수정 장애의 보고에서 증명되었다. 이러한 결과들은 프로스타글란딘이 난자의 성숙과 수정 과정에서 중요한 역할을 가지고 있다는 것을 시사한다. 한편 난포 형성 과정 중에서 혈액 내 LH (luteonizing hormone) 피크 전까지는 협막 세포(theca cells)에서 생산된 테스토스테론은 과립막 세포(granulosa cells)에서 아로마화(aromatization)에 의해 에스트로젠으로 변화되기 때문에 난포액에서 에스트로젠 농도는 높아지지만(Roberts 등, 1990), 혈액 내 LH 피크 후에는 협막 세포와 과립막 세포는 황체 세포(luteal cells)로 변화하기 때문에 에스트로젠 대신 프로게스테론을 생산하기 시작한다(Walsh 등, 2012). 이처럼 난자 성숙의 마지막 단계에서 에스트로젠과 프로게스테론의 농도가 급격히 변화하기 때문에 난포액 내에 존재하는 성 호르몬들은 난자의 운명을 결정짓는 중요한 요인 중의 하나이다(Hyttel 등, 1986). 아직까지 난포액 내의 에스트로젠과 프로게스테론의 농도와 난포란의 발달 능력과의 연관성에 관한 직접적인 연구 보고는 없지만, 성숙 과정에서 난포액 내의 호르몬의 적절한 균형은 난자의 성숙과 발달에 있어 매우 중요하다고 한다(Aardema 등, 2013). 그리고 동일한 크기의 난포에서 스테로이드 호르몬의 농도를 측정할 결과 건강한 난포에서는 에스트로젠 농도가 높았고, 퇴행 난포에서는 프로게스테론 내지는 협막 세포에서 분비하는 테스토스테론이나 안드로스테디온의 농도가 높았다고 한다(Ireland 등, 1983). 이러한 결과들은 난포액 내의 에스트로젠과 프로게스테론의 농도가 난자의 성숙 과정 조절에 중요한 역할을 가지고 있다는 것을 시사한다. 또한 불포화지방산을 섭취한 소의 난포액 내 에스트로젠의 농도가 증가하였고(Robinson 등, 2002), 특히 황체기 초기에 불포화지방산의 섭취는 난포액 내 프로게스테론의 농도가 감소하였다는 연구 결과(Gulliver 등,

2012)는 난소에서 스테로이드 호르몬 합성과 불포화지방산의 연관성을 잘 나타내고 있다.

최근에는 난자의 성숙과 발달에 영향을 미치는 난포 내의 환경 변화에 다가불포화지방산의 중요한 기능과 역할을 밝히기 위한 연구가 시작되었으며, 특히 α -리놀렌산 또는 리놀레산과 같은 특정 불포화지방산에 대한 연구가 행해지고 있다(Moallem 등, 2013). 다가불포화지방산 중 특히 오메가-3 지방산은 탄소 사슬의 끝에서 세 번째 탄소 원자에 첫 번째 이중 결합을 하고 있으며, α -리놀렌산(α -Linolenic acid, ALA: C18:3), 에이코사펜타인산(Eicosapentaenoic acid, EPA: C20:5), 도코사헥사인산(Docosahexaenoic acid, DHA: C22:6) 등이 있다(Scorletti와 Byrne, 2013). 그리고 오메가-6 지방산은 탄소사슬의 끝에서 여섯 번째 탄소 원자에 첫 번째 이중 결합을 하고 있으며, 대표적으로 리놀레산(Linoleic acid, LA: C18:2)이 있다. 특히 ALA와 LA는 체내에서 합성할 수 없기 때문에 섭취를 통해 공급되어야 하기 때문에 필수지방산이라고 부른다(Wiktorowska-Owczarek 등, 2015). EPA와 DHA는 ALA의 신장(elongation)과 불포화(desaturation)를 통해 체내에서 전환이 가능하지만 효소(특히 elongase와 desaturase) 부족으로 전환이 제한적이기에 “조건부 필수” 지방산으로 분류하기도 한다. 이러한 지방산들은 그 종류와 양에 따라 난포의 발달, 난자의 성숙과 발달에 있어서 서로 다른 효과를 가지고 있으며(Gulliver 등, 2012), 특히 최근에 ALA에 대한 긍정적인 결과가 여러 연구에서 보고되고 있다. ALA의 체내 효과에 있어서 CHilds 등(2008)은 혈장과 난포액에 존재하며, 난자 발달에 긍정적인 영향을 미친다고 보고하였다. Veshkini 등(2015)은 난포의 크기가 커질수록 농도가 증가하기 때문에 난포의 성장과 난자의 성숙 과정에 필수적이라고 보고하였다. 그리고 ALA의 체외 배양 효과에 있어서 Gulliver 등(2012)은 소와 양의 경우 GV (germinal vesicle)단계에서 감수분열을 조절한다고 보고하였고, Marei 등(2009)은 소 난포란을 이용하여 체외 성숙을 증가, 배반포로의 체외 발달율과 품질이 향상되었으며, 체외 성숙 후 체외 성숙 배양액 내 prostaglandin E2 (PGE2)의 농도가 대조군에 비해 증가하였다고 한다. Ghaffarilaleh 등(2014)은 양 난포란 유래 체외 생산 배반포의 총 세포 수가 증가하였으며, 아포토시스(Apoptosis)율이 낮았고, 체외 성숙 후 체외 성숙 배양액 내 에스트로젠이 감소하는 대신 프로게스테론의 증가하였다고 한다. 한편 더욱 긴 사슬의 오메가-3 지방산인 EPA와 DHA는 ALA보다 더 강한 생리적인 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, EPA와 DHA가 풍부한 생선기름을 통한 사료 공급시 ALA와 유사하게 포유동물의 난포형성 과정과 난자성숙 및 수정란의 발달에 있어 효과적이라는 보고가 있다(Moallem 등, 2013). DHA 경우 소 난자의 체외 성숙시 소량의 첨가는 성숙과 수정란의 체외 발달에 있어서 효과적이지만, 고농도의 DHA 첨가는 오히려 난포란 내의 지방 및 스테로이드 대사를 파괴시켜 그 품질을 저하시킨다고 한다(Oseikria 등, 2016). 한편 프로스타글란딘 합성의 직접적인 전구체인 EPA의 경우 아직까지 포유동물의 난자의 체외 성숙에

대한 효과 및 작용 기전에 대한 연구 보고는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 도축되는 돼지의 난포란을 회수하여 체외 성숙, 체외 수정, 체외 배양을 통한 배반포의 체외 생산을 제고와 더불어 체외 생산된 배반포의 품질 향상을 위하여 체외 성숙용 배양액에 EPA의 첨가 효과를 검토하였다. EPA의 영향은 난포란의 체외 성숙 과정에서 나타나는 난구세포의 팽창, 난자 핵 성숙을, 배반포로의 체외 발달율과 배반포의 품질 등으로 조사하였으며, 특히 이들 물질들이 첨가된 배양액에서 난포란을 체외 성숙시켰던 후 소위 conditioned medium 내의 PGE2의 농도, 에스트로겐과 프로게스테론의 농도를 조사하였다.

재료 및 방법

기초 배양액

별도의 언급이 없는 모든 화학 물질과 시약은 Sigma Chemical Co (United Kingdom)에서 구입하였다.

본 연구에 사용된 각종 배양액의 조성은 다음과 같다. 미성숙 난포란의 회수 및 세척 배양액은 10 mM HEPES와 3.0 mg/mL bovine serum albumin (BSA)이 첨가된 HEPES buffered Tyrode's medium (TL-HEPES)용액이며, 체외 성숙 배양액은 0.57 mM cysteine, 3.0 mg/mL BSA, 2.5 mM β -mercaptoethanol, 10 ng/mL estradiol-17 β , 10 ng/mL epidermal growth factor가 첨가된 North Carolina State University 23 (NCSU 23) 용액이며(Petters 등, 1993), 여기에 10 IU/mL human chorionic gonadotropin, 10 IU/mL pregnant mare serum gonadotropin을 첨가(IVM I 용액) 또는 미 첨가(IVM II 용액)하여 사용하였다. 체외 수정 배양액은 1.0 mg/mL BSA, 2.5 mM caffeine sodium benzoate가 첨가된 modified Tris buffered medium (mTBM) 용액을 사용하였고(Abeydeera와 Day, 1997), 정자처리 용액은 1.0 mg/mL BSA와 75 mg/mL penicillin G, 25 mg/mL gentamycin이 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, Gibco BRL, Grand Island) 용액을 사용하였다. 수정된 배의 체외 배양 배양액은 3.0 mg/mL BSA가 첨가된 porcine zygotes medium (PZM3) 용액을 사용하였다(Yoshioka 등, 2002). 모든 배양액의 삼투압은 270-290 mOsm, pH는 7.2-7.4로 조정하였으며, 0.20 μ m Millipore filter (Sartorius, Germany)로 여과 후 4°C로 냉장보관 하였으며, 모든 배양액은 사용하기 24시간 전부터 전 배양하여 사용하였다. 또한 모든 배양액의 미세소적은 mineral oil을 피복하여 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 최소한 4시간 이상 평형시킨 후 사용하였다.

돼지 난포란의 회수 및 체외 성숙(IVM: *in vitro* maturation)

경상북도 경산시 대평동에 소재한 경신산업과 대구광역시 김천동에 소재한 신흥산업에서 도축된 돼지로부터 난소를 적출하여 75 μ g/mL penicillin G가 첨가된 0.9% 생리식염수(25-30°C)가 들어있는 보온병에 담아 도축 후 2시간 이내에 실험실로 운반하

였다. 운반된 난소는 상기 용액으로 3-4회 세척하여 난소의 혈액과 이물질을 제거한 후, 18 gauge-needle이 부착된 주사기를 이용하여 직경 3-5 mm의 가시 난포로부터 난포액을 흡입함으로써 난포란을 회수하였다. 회수한 난포란을 실체현미경($\times 80$, Olympus, Japan)하에서 난구세포의 부착이 조밀하며, 세포질이 균일한 것만을 선별하여 실험에 제공하였다. 선별된 난포란을 TL-HEPES 용액으로 2-3회 세척 후 체외 성숙 IVM I 용액이 500 μ L씩 분주된 4 well dish (NUNC, Roskilde, Denmark)에 각각 50-60개의 미성숙 난포란을 넣고, 38.5°C, 5% CO₂ 배양기에서 22시간 동안 배양시킨 후, 재차 체외 성숙 IVM II 용액에서 추가적으로 22시간 동안 배양함으로써 체외 성숙을 유도하였다.

체외 수정(IVF: *in vitro* fertilization)

본 연구에 사용된 정액은 액상정액으로 충청북도 충주시 노은면 소재 다비 인공수정센터에서 제작된 희석정액을 이용하였으며, 17°C에 보관하여 3-5일 동안 사용하였다. 정액과 PBS 용액을 동일 비율로 희석하여 14 mL Conical tube (BD Science Falcon, California, USA)에 넣고 1,500 rpm에서 3분간 원심분리하여 상층액을 제거하는 과정을 3회 실시하여 세정하였다. 원심분리 후 하층부의 정자기에 2 mL의 PBS 용액을 넣어 38.5°C, 5% CO₂ 배양기에서 15분간 swim up하였다. 양호한 운동성을 가진 정자를 회수하여 1,500 rpm에서 3분간 원심분리를 실시한 후, 침전된 정자는 mTBM 용액으로 희석하였다. 정자 농도는 3×10^6 sperm/mL이 되도록 조절하였다. 체외 성숙을 유도한 후 형태적으로 난구세포가 확장된 난포란만을 선별하여 0.1% hyaluronidase가 첨가된 TL-HEPES 용액에서 pipetting 함으로써 난구세포를 제거한 후 mTBM 용액으로 2-3회 세척하였다. 그리고 mineral oil로 피복된 48 μ L의 mTBM 용액에 15개씩의 난포란을 넣고, 상기에서 준비된 정자 2 μ L (최종 정자농도 1.2×10^5 sperm/mL)를 첨가하여 38.5°C, 5% CO₂ 배양기에 6시간동안 배양함으로써 체외 수정을 유도하였다.

체외 배양(IVC: *in vitro* culture)

체외 수정된 난자를 체외 배양액으로 4-5회 pipetting함으로써 정자를 포함한 불순물을 제거한 후 다시 PZM3 용액으로 2-3회 세척하였다. 세척된 수정란은 미리 준비한 50 μ L의 PZM3 용액에 30개씩 넣어 38.5°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다(day 1). 체외 배양 2일째(day 2)에 수정란의 분할율, 체외 배양 6일째(day 6)에 배반포로의 체외 발달율을 관찰하였다.

난구세포의 팽창 정도와 핵 성숙

44시간 동안 성숙된 난포란을 실체현미경 하에서 관찰하여 난구세포의 팽창 정도에 따라 완전 팽창(난구 세포 전체가 팽창), 부분 팽창(난포란의 바깥 부분만 팽창), 팽창하지 않음으로 구분하였다. 그리고 핵 성숙 단계를 조사하기 위해 44시간 동안 성숙된 난포란은 0.1% hyaluronidase가 첨가된 TL-HEPES 용액에

서 pipetting 함으로써 난구세포를 제거한 후 상기 용액으로 2-3회 세척하여 슬라이드 글라스 위로 옮긴 후 1:3의 비율로 혼합된 acetic acid와 ethanol 용액에서 3일간 고정시켰다(Marei 등, 2009). 고정된 샘플은 0.1% acetic orcein으로 5분간 염색하고 glycerol, acetic acid, 증류수가 1:1:3의 비율로 혼합된 용액에서 2-3회 세척한 뒤 위상차 현미경(400×, Leica, Solms, Germany)에서 핵의 상태를 관찰하였다.

체외 성숙 배양액 내의 PGE2 농도 조사

돼지 난포란의 체외 성숙에 사용된 배양액은 수집하여 -20°C 냉장고에 보관하였고, 배양액의 PGE2 농도를 측정하기 위해서 dextran coated charcoal assay 방법(Marei 등, 2009)을 사용하였다. 보관된 샘플은 anti-PGE2 serum (from Dr. N.L. Poyser; University of Edinburgh, United Kingdom)과 혼합한 뒤, tritiated tracer (5, 6, 8, 11, 12, 14, 15 (n)-3H]-PGE2; Amersham International, United Kingdom)를 사용해 두 배로 희석한다. 그리고 4°C에서 24시간 보관 후 0.4% dextran (T-70; Amersham Pharmacia Biotech, Sweden)과 중화된 2% charcoal이 포함된 dextran-coated charcoal 현탁액을 첨가한다. 그리고 4°C에서 10분간 보관한 뒤 2,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 후 상층액을 제거하고 4 mL의 scintillant (Ultima Gold; Packard Bioscience BV, United Kingdom)가 포함된 scintillation vials에서 2분간 섬광계수를 측정한다. PGE2의 농도는 반로그도표를 이용하여 측정한다. 이 방법의 검출 범위는 2 pg/mL부터이며, 오차범위는 3.5%-6.3%이다.

체외 성숙 배양액 내의 E2와 P4 농도 조사

돼지 난포란의 체외 성숙 과정에서 난구세포가 분비한 E2와 P4의 농도를 조사하기 위해서 enzyme immunoassay kits (Estradiol ELISA Kit 402110 and Ultra Progesterone ELISA Kit 402310, respectively; Neogen Corporation, USA)를 사용하여 제조사에서 제공한 방법으로 진행하였다(Maya-Soriano 등, 2013). 이 방법의 검출 범위는 0.03-0.2 ng/mL부터이며, 오차범위는 3.2%-3.8%이다.

체외 생산된 배반포의 품질 조사(TUNEL assay: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nickend labeling assay)

본 실험에 사용된 TUNEL assay kit는 In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescent (Roche Diagnostics GmbH, Germany) 1번과 2번을 사용하였으며, 1:9의 비율로 혼합하였다. 체외 수정 후 6일째 생산된 배반포를 0.1% polyvinyl alcohol (PVA)이 첨가된 PBS (PVA-PBS) 용액으로 3회 세척 후 4% paraformaldehyde가 첨가된 PBS 용액에 침지시켜 4°C에서 1시간 동안 고정시켰다. 고정된 배반포를 PVA-PBS 용액으로 3회 세척하여 0.1% Triton X-100이 첨가된 PBS 용액에 다시 침지시켜 4°C에서 30분간 냉장보관하였다. 그리고 PVA-PBS 용액으로 3회 세척하여 TUNEL assay kit를 혼합한 용액에 침지시켜 38.5°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 동안 배양 후 PVA-PBS 용액으로 3회 세척하였다. 그 후 2-(4-Amidinophenyl)-6-indole carbamide dihydrochloride (DAPI)가 첨가된 10 μL mounting 용액으로 고정된 배반포를 형광현미경(×400, Olympus, Japan)으로 배반포의 총 세포 수와 apoptosis 세포 수를 확인하였다.

통계 처리

본 연구에서 각 처리 구는 최소한 4회 이상 반복 실시하였다. 실험 결과에 대한 통계학적 분석은 ANOVA와 χ^2 -test를 이용하여 실시하였으며, 5% 수준에서 유의차를 검정하였다.

결 과

체외 성숙시 EPA 첨가가 난포란의 난구세포 팽창에 미치는 효과

체외 성숙 배양액에 다양한 농도의 EPA 첨가가 돼지 난포란의 난구세포 팽창에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 1과 같다. 체외 성숙 44시간 후 난구세포의 팽창이 관찰되지 않은 난포란은 대조군에서 2.5% (5/200)이었으며, 10 μM, 50 μM 및 100 μM 첨가군에서 각각 3.0% (6/200), 2.0% (4/200) 및 2.0% (4/200)로서 비슷한 경향이였다. 그리고 부분적인 난구세포의 팽창을 보인 난포란은 대조군에서 17.5% (35/200)이었으며, 10 μM, 50 μM 및 100 μM 첨가군에서 각각 17.5% (35/200), 17.0%

Table 1. Effect of EPA concentrations added to the IVM medium on cumulus cell expansion of porcine oocyte 44 hours after IVM

Concentration of EPA	No. of oocytes	No (%) of not cumulus expanded oocytes	No (%) of partially expanded oocytes	No (%) of fully expanded oocytes
Control	200	5 (2.5) ^a	35 (17.5) ^a	160 (80.0) ^a
10 μM	200	6 (3.0)	35 (17.5) ^a	159 (79.5) ^a
50 μM	200	4 (2.0)	34 (17.0) ^a	162 (81.0) ^a
100 μM	200	4 (2.0)	41 (20.5) ^b	155 (77.5) ^b

^{a,b}: Within a column, values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

EPA; eicosapentaenoic acid.

(34/200) 및 20.5% (41/200)로서, 100 μ M 첨가군은 각각의 다른 군보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 난구세포가 완전히 팽창된 난포란은 대조군에서 80.0% (160/200)이었으며, 10 μ M, 50 μ M 및 100 μ M 첨가군에서 각각 79.5% (159/200), 81.0% (162/200) 및 77.5% (155/200)로서, 100 μ M 첨가군은 각각의 다른 군보다 유의하게 낮았다($p < 0.05$).

체의 성숙시 EPA 첨가가 난포란의 핵 성숙에 미치는 효과

체의 성숙 배양액에 다양한 농도의 EPA 첨가가 돼지 난포란의 핵 성숙에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 2와 같다. 핵 성숙의 평가를 위해 체외 성숙 44시간 후 염색을 통해 metaphase II(MII) 단계로 발달한 난포란의 수를 측정하였다. MII 단계로 발달한 난포란의 수는 대조군에서 90.5% (181/200)이었으며, 10 μ M, 50 μ M 및 100 μ M 첨가군에서 각각 91.5% (183/200), 88.0% (176/200) 및 82.5% (165/200)로서, 100 μ M 첨가군은 각각의 다른 군보다 유의하게 낮았다($p < 0.05$).

체의 성숙시 EPA 첨가가 PGE2 합성에 미치는 효과

체의 성숙 배양액에 다양한 농도의 EPA 첨가가 돼지 난포란의 PGE2 합성에 미치는 효과를 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. 체외 성숙 44시간 후 체외 성숙 배양액 내의 PGE2 농도를 난포란 100 개당 분비량을 평균하여 측정하였다. PGE2의 평균 농도는 대조군에서 1201.8 ± 167 pg/mL이었으며, 10 μ M, 50 μ M 및 100 μ M 첨가군에서 각각 1110.9 ± 219 pg/mL, 993.4 ± 201 pg/mL 및 625.7 ± 144 pg/mL로서, EPA 첨가 농도 의존적으로 감소하는 경향이였으며 특히, 100 μ M 첨가군은 다른 군보다 유의하게 낮았다($p < 0.05$).

Table 2. Effect of EPA concentrations added to the IVM medium on nuclear stages of porcine oocytes 44 hours after IVM

Concentration of EPA	No. of oocytes	No (%). of developed to MII stage oocytes
Control	200	181 (90.5) ^a
10 μ M	200	183 (91.5) ^a
50 μ M	200	176 (88.0) ^a
100 μ M	200	165 (82.5) ^b

^{a,b}: Within a column, values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

EPA: eicosapentaenoic acid.

소하는 경향이였으며 특히, 100 μ M 첨가군은 다른 군보다 유의하게 낮았다($p < 0.05$).

체의 성숙시 EPA 첨가가 체외 수정 후 난 분할율과 배반포로의 체외 발달에 미치는 효과

체의 성숙 배양액에 다양한 농도의 EPA 첨가가 체외 성숙 후 돼지 난포란의 난 분할율과 배반포로의 체외 발달에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 3과 같다. 난 분할율은 체외 수정 48시간 후 4세포기 이상 발생한 수정란 수를 측정하였고, 체외 배양 후 6일째에 배반포로 배 발생율을 조사하였다. 난분할율의 경우 대조군에서 82.1% (279/340)이었으며, 10 μ M, 50 μ M 및 100 μ M 첨가군에서 각각 81.1% (284/350), 80.1% (278/347) 및 82.0% (283/345)로서, 서로 비슷한 경향이였다. 그리고 배반포로의 체외 발달율의 경우도 대조군에서 29.7% (83/279)이었으며, 10 μ M, 50 μ M 및 100 μ M 첨가군에서 각각 31.7% (90/284), 34.1% (95/278) 및 30.0% (85/283)로서, 역시 서로 비슷한 경향이였다.

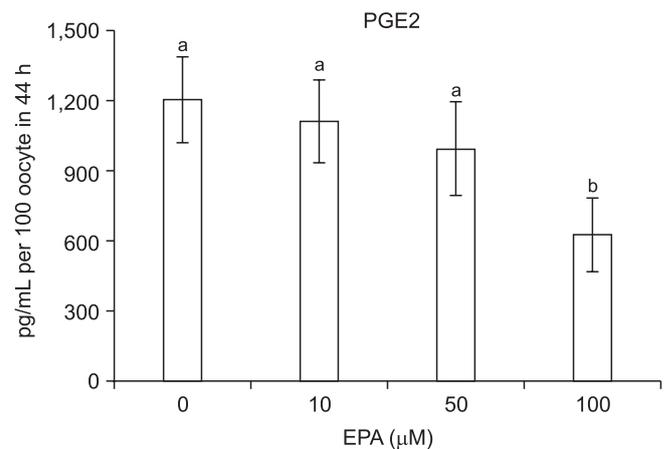


Fig. 1. Effect of EPA concentration added to IVM media on PGE2 synthesis. Results are presented as the mean \pm SEM of four replicates. Different superscript letters indicate significant differences among experimental groups ($p < 0.05$). EPA; eicosapentaenoic acid, SEM; standard error of the mean.

Table 3. Effect of EPA concentration added to the IVM medium on cleavage and blastocyst development at 6 days after insemination

Concentration of EPA	No. of oocytes	No (%). of cleaved oocytes	No (%). of developed to blastocyst embryos from cleaved oocytes
Control	340	279 (82.1)	83 (29.7)
10 μ M	350	284 (81.1)	90 (31.7)
50 μ M	347	278 (80.1)	95 (34.1)
100 μ M	345	283 (82.0)	85 (30.0)

EPA: eicosapentaenoic acid.

체의 성숙시 EPA 첨가가 체외 생산된 배반포의 품질에 미치는 효과

체의 성숙 배양액에 다양한 농도의 EPA 첨가가 돼지 난포란 유래 체외 생산된 배반포의 품질에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 4와 같다. 체외 배양 6일 후 생산된 배반포의 염색을 통해 총 세포수와 apoptosis 세포 수를 측정하였다. 체외 생산된 배반포의 총 세포수의 경우 대조군에서 40.8 ± 3.2 개이었으며, 10 μ M, 50 μ M 및 100 μ M 첨가군에서 각각 41.9 ± 3.8 개, 45.4 ± 3.8 개, 39.5 ± 3.6 개

3.9개 및 39.5 ± 3.6 개로서, 특히 50 μ M 첨가군은 다른 군보다 유의하게 많았다($p < 0.05$). 한편 apoptosis 세포 수의 경우 대조군에서 1.4 ± 0.9 개이었으며, 10 μ M, 50 μ M 및 100 μ M 첨가군에서 각각 1.4 ± 1.1 개, 0.9 ± 0.8 개 및 1.9 ± 0.7 개로서, 특히 50 μ M 첨가군은 다른 군보다 유의하게 적었고($p < 0.05$), 100 μ M 첨가군은 다른 군보다 유의하게 많았다($p < 0.05$).

Table 4. Effect of EPA concentrations added to the IVM medium on blastocyst quality assessed by the number of total cells and apoptotic cells

Concentration of EPA	No. of examined blastocyst embryos	No. (means) of total cells in blastocyst embryos	No. (means) of apoptotic cells in blastocyst embryos
Control	100	40.8 ± 3.2^a	1.4 ± 0.9^a
10 μ M	100	41.9 ± 3.8^a	1.4 ± 1.1^a
50 μ M	100	45.4 ± 3.9^b	0.9 ± 0.8^b
100 μ M	100	39.5 ± 3.6^a	1.9 ± 0.7^c

Results are presented as the mean \pm SEM of seven replicates. Different superscript letters indicate significant differences among experimental groups ($p < 0.05$).

EPA; eicosapentaenoic acid, SEM; standard error of the mean.

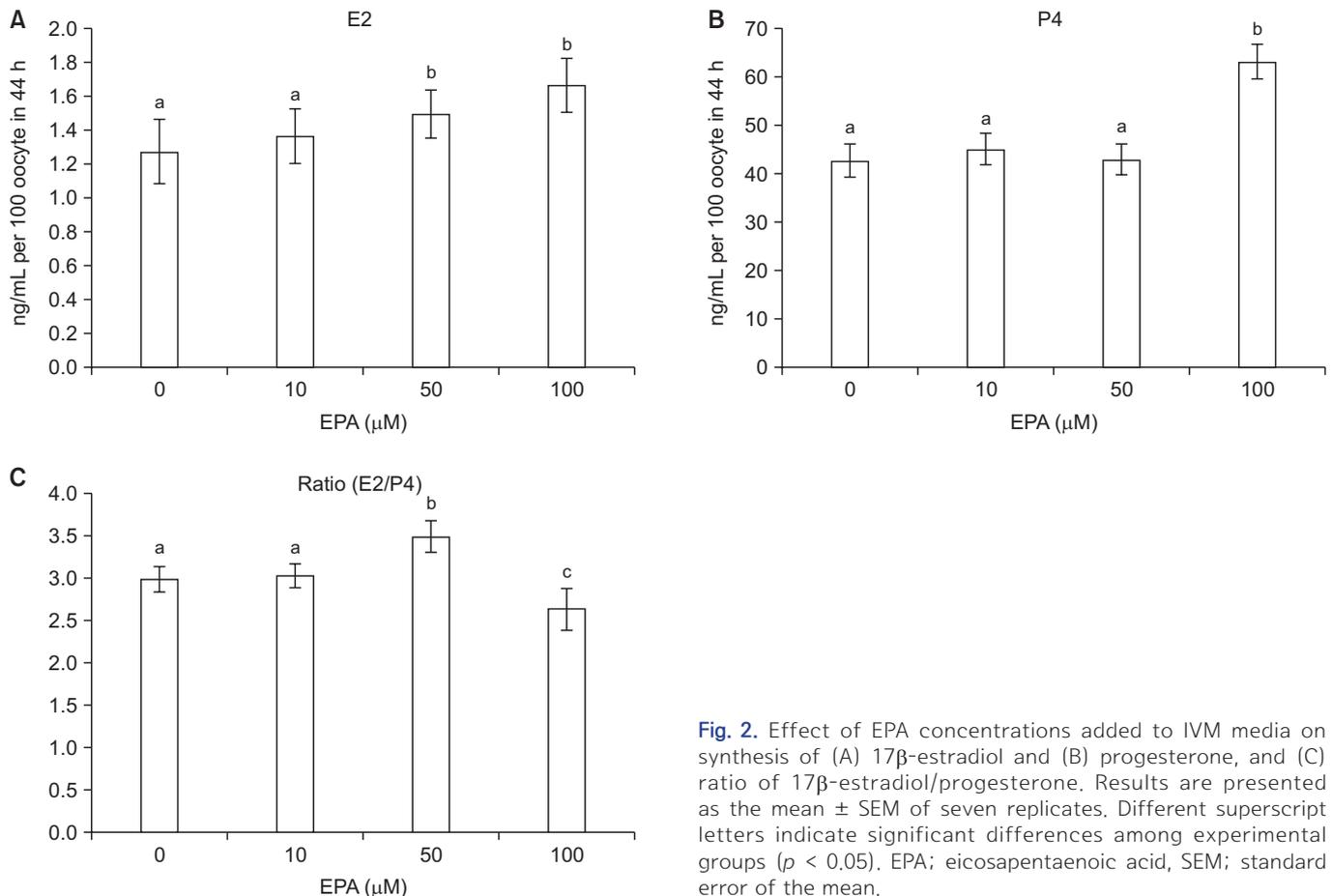


Fig. 2. Effect of EPA concentrations added to IVM media on synthesis of (A) 17β -estradiol and (B) progesterone, and (C) ratio of 17β -estradiol/progesterone. Results are presented as the mean \pm SEM of seven replicates. Different superscript letters indicate significant differences among experimental groups ($p < 0.05$). EPA; eicosapentaenoic acid, SEM; standard error of the mean.

체의 성숙시 EPA 첨가가 E2와 P4의 합성 및 그 비율에 미치는 효과

체의 성숙 배양액에 다양한 농도의 EPA 첨가가 돼지 난포란의 E2와 P4의 합성 및 비율에 미치는 효과를 검토한 결과는 Fig. 2과 같다. 체외 성숙 44시간 후 체외 성숙 배양액 내의 E2와 P4의 농도를 난포란 100개당 분비량을 측정하였다. E2의 평균 농도는 대조군에서 1.27 ± 0.19 ng/mL이었으며, 10 μ M, 50 μ M 및 100 μ M 첨가군에서 각각 1.36 ± 0.16 ng/mL, 1.49 ± 0.14 ng/mL 및 1.66 ± 0.16 ng/mL로서, 특히 50 μ M과 100 μ M 첨가군은 다른 군보다 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). P4의 평균 농도는 대조군에는 42.7 ± 3.4 ng/mL이었으며, 10 μ M, 50 μ M 및 100 μ M 첨가군에서 각각 45.0 ± 3.2 ng/mL, 42.9 ± 3.1 ng/mL 및 62.9 ± 3.6 ng/mL로서, 특히 100 μ M 첨가군은 다른 군보다 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 체외 성숙 후 체외 성숙 배양액의 E2에 대한 P4의 농도 비율은 대조군에서 2.98 ± 0.15 이었으며, 10 μ M, 50 μ M 및 100 μ M 첨가군에서 각각 3.02 ± 0.14 , 3.48 ± 0.18 및 2.63 ± 0.25 로서, 50 μ M 첨가군은 다른 군보다 유의하게 높았고($p < 0.05$), 100 μ M 첨가군은 다른 군보다 유의하게 낮았다($p < 0.05$).

고찰

다가불포화지방산은 스테로이드 호르몬(콜레스테롤을 통해)과 프로스타글란딘(아라키돈산을 통해)의 전구체로서 포유동물의 발정, 배란, 수정란의 발달, 분만 등과 같은 번식 과정에서 중요한 조절자 기능을 하는 것으로 밝혀졌고, 지난 10년간 연구는 주로 오메가-3 지방산의 역할을 밝히는데 집중되었다. 다가불포화지방산이 직간접적으로 포유동물의 난자의 성숙 과정을 조절한다는 보고(Gulliver 등, 2012) 이후, 현재까지 오메가-3 ALA나 오메가-6 LA와 같은 다가불포화지방산의 체외 성숙 배양액의 첨가 연구가 보고되고 있으나 아직까지 포유동물의 난자에 대한 효과 및 작용 기전에 대한 연구 보고는 매우 부족한 실정이다. EPA는 포유동물 생체 내로 섭취된 ALA가 Elongase, desaturase 등의 효소 작용을 통해 DHA를 합성해가는 과정에서 만들어지는 중간 산물이며(Wang 등, 2005), Petit 등(2004)은 ALA의 사료 공급은 다른 오메가-3지방산을 제외한 EPA의 조성만을 증가시킨다고 보고했다. 이러한 보고는 돼지 난포란의 체외 성숙 배양액에 EPA를 첨가가 앞에서 보고한 ALA 첨가 결과와 유사할 수 있다는 가설을 제시한다. 아직까지 포유동물 난포란의 체외 성숙 배양액에 EPA를 첨가하여 연구 보고된 적은 없는 실정이다. 이에 본 연구에서는 돼지 난포란의 체외 성숙 배양액에 불포화 지방산 중에서 EPA를 첨가하였을 때 난포란의 성숙과 관련된 것 중 난구세포의 팽창, 핵 성숙율, 배반포로의 체외 발달 및 그 품질, 그리고 체외 성숙 후 배양액 내의 PGE2의 농도, 에스트로겐과 프로게스테론의 농도 등 여러 가지 변화들을 조사, 검토하여 최종적으로 돼지 난포란으로부터 배반포의 체외 생산성 제고와 더불어 체외 생산된 배반포의

품질 향상을 위한 최적의 체외 성숙 배양 체계를 확립하고자 한다.

먼저 본 연구(Table 1과 Table 2)에서 10 μ M과 50 μ M EPA 첨가군에서는 난구세포 팽창 및 핵 성숙율에 변화가 관찰되지 않았지만, 100 μ M EPA 첨가군에서는 팽창의 억제 및 핵 성숙율의 감소가 관찰되었다. 이러한 결과는 적정 농도 이상의 EPA 첨가는 오히려 돼지 난포란의 체외 성숙을 저해시킨다는 것을 나타낸다. Ghaffarilaleh 등(2014)은 양 난포란의 체외 성숙 배양액에 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M의 ALA 첨가 실험에서 고농도인 200 μ M 첨가군에서 난구세포의 팽창이 억제 및 핵 성숙율이 감소하였다고 보고하였고, Marei 등(2009)은 소 난포란의 체외 성숙 배양액에 상기 농도의 ALA 첨가군 중에서 50 μ M 첨가군에서의 핵 성숙율은 증가하였지만, 고농도인 100 μ M 첨가군과 200 μ M 첨가군에서는 양 난포란의 경우와 비슷한 경향이라고 보고하였다. 이러한 연구 보고들은 특정 농도 이상의 EPA 첨가는 난포란의 난구세포 팽창의 억제 및 핵 성숙율 감소 효과를 나타낸다는 본 연구의 결과와 유사하다.

생화학적 측면에서 아라키돈산, Dihomo- γ -linolenic acid, EPA와 같은 20개의 탄소로 구성된 지방산은 세포 내의 지방산 합성경로인 cyclooxygenase 합성 경로와 lipoxygenase 합성 경로를 통하여 에이코사노이드 관련 물질인 프로스타글란딘(prostaglandin), 트롬복산(thromboxanes), 류코트리엔(leukotrienes), 리폭신(lipoxins) 등의 직접적인 원료가 되며, 합성된 에이코사노이드 관련 물질들은 소량으로도 생체 내에서 강력한 생리작용을 가지고 있기 때문에 호르몬으로 분류되기도 한다(Soberman와 Christmas, 2003). 특히 프로스타글란딘 합성의 경우 DGLA는 PGF1 α 또는 PGE1과 같은 1-시리즈 PG 합성을 위한 전구물질, AA는 PGF2 α 또는 PGE2와 같은 2-시리즈의 PG 합성을 위한 전구물질, EPA는 PGF3 α 또는 PGE3와 같은 3-시리즈 PG 합성을 위한 전구물질이 된다(Sargent, 1997). 어떠한 경로를 통해서든지 합성된 프로스타글란딘은 생체에서 대단히 중요한 기능을 가지고 있으며, 그 중간 산물인 PGE2는 주로 체내의 난소 과립막 세포(granulosa cells)에서 분비되며 주로 난구세포의 팽창과 난자 성숙을 조절한다고 한다(Nuttinck 등, 2011). 본 연구(Fig. 1)에서 돼지 난포란의 체외 성숙 후 체외 성숙 배양액에서 PGE2의 농도를 조사한 결과 모든 EPA 첨가군에서는 대조군보다 감소하였고, 첨가 농도가 높아질수록 감소하는 경향이였다. 세포 외부로부터 흡수한 다가불포화지방산은 세포 내에 존재하는 제한적인 양의 효소(특히 desaturase, cyclooxygenase 등)를 사용하여 1-, 2-, 3-시리즈 PG의 합성이 경쟁적으로 이루어진다는 연구 보고(Lands, 1992)는 3-시리즈 PG의 전구물질인 EPA의 적정 농도 이상의 첨가가 2-시리즈인 PGE2의 분비를 저해한다는 본 연구의 결과를 뒷받침한다. 또한 이러한 결과는 돼지 난포란의 체외 성숙 과정에 적정 농도 이상의 EPA 첨가에 의한 적정 농도 이하의 PGE2 분비 감소가 난구세포 팽창 억제와 핵 성숙 억제와 연관성이 있다는 것을 의미한다. 그리고 인간과 쥐의 melanoma 세포

의 체외 배양액에 높은 농도의 지방산을 첨가했을 때 세포막의 투과성 감소 및 DNA 파편화(fragmentation)가 증가한다는 보고(Andrade 등, 2005)와 마찬가지로 난포란의 체외 성숙에 있어서 EPA의 고농도 첨가는 PGE2 분비를 감소시킬 뿐만 아니라 그 자체의 독성 때문에 난구세포 팽창의 억제 및 핵 성숙을 감소시키는 또 다른 원인이 될 수 있다는 것을 암시한다.

본 연구(Table 3과 Table 4)의 결과로부터 모든 EPA 첨가군에서 난포란의 배반포로의 체외 발달율은 비슷한 경향이었으나, 50 μ M EPA 첨가군에서 배반포의 총 세포 수는 유의하게 많았으며, 또한 apoptosis 세포 수는 유의하게 적었다. 반면 100 μ M EPA 첨가군에서 apoptosis 세포 수는 유의하게 많았다. ALA 첨가 시, 난포란 유래 배반포로의 체외 발달율은 양(Ghaffarilaleh 등, 2014)의 경우 본 연구와 유사하게 차이가 없었으나 소(Marei 등, 2009)의 경우 50 μ M의 ALA를 첨가했을 때 증가하였다고 한다. 그러나 체외 생산된 배반포의 품질에 있어서 상기의 두 연구에서는 본 연구의 결과와 유사하였다. 또한 본 연구(Fig. 2)에서 돼지 난포란의 체외 성숙 후 체외 성숙 배양액에서 E2와 P4의 농도를 조사한 결과 E2는 EPA 첨가 농도 의존적으로 증가하는 경향이었으며 P4는 100 μ M 첨가군에서 유의적으로 높게 나타났다. 또한 P4에 대한 E2의 비율을 조사한 결과 50 μ M 첨가군에서 대조군에 비하여 높게 나타났으며(3.48 ± 0.18 vs. 2.98 ± 0.25 , respectively; $p < 0.05$), 100 μ M 첨가군에서 대조군에 비하여 낮게 나타났다(2.63 ± 0.25 vs. 2.98 ± 0.25 , respectively; $p < 0.05$). 또한 본 연구결과에서 고품질(많은 세포수, 적은 apoptosis 수)의 배반포가 많이 생산된 50 μ M EPA 첨가군에서 체외 성숙 배양액 내의 P4에 대한 E2의 농도 비율이 대조군에 비해 유의하게 높았고, 저품질(많은 apoptosis 수)의 배반포가 많이 생산된 100 μ M EPA 첨가군에서 P4에 대한 E2의 농도 비율은 유의하게 낮았다(Fig. 2). 이러한 결과는 기본적으로 EPA가 돼지 난포란의 체외 성숙 과정에서 E2와 P4의 분비에 영향을 미치며 이러한 분비 변화와 배반포의 품질적인 측면과의 연관 가능성이 있음을 암시한다.

난자의 성숙은 수정 후 배아의 발달과 품질을 결정하는 매우 중요한 과정이며, 적절한 E2와 P4와 같은 성 호르몬과 앞에서 언급한 에이코사노이드의 분비는 이 과정의 조절에 필수적이다. E2는 난포의 성장에 필수적이지만(Lubahn 등, 1993), 소 난포란의 체외 성숙 과정에 높은 농도의 E2는 감수 분열의 진행이 억제 및 비정상적인 핵의 성숙과정을 나타내었다(Beker-van Woudenberg 등, 2004). P4 역시 난포의 발달과 배란에 중요한 물질이지만(Lydon 등, 1995), 소(Siqueira 등, 2012)와 돼지(Yamashita 등, 2003) 난포란의 체외 성숙 과정에 첨가하였을 때 감수분열의 재개를 촉진시켰다. Wathes 등(2007)은 체외 성숙 배양액 내의 P4의 증가는 난자의 발달에 부정적인 영향을 주고 그 결과 품질이 나쁜 배아를 생산한다고 보고했으며, Modina 등(2014)은 난포액 내의 E2/P4의 비율이 건강한 난포와 퇴행 난포를 구분하는 중요한 표지라고 보고했다. 이러한 일련의 결과들은 EPA 첨가에 의한 난자 성숙시 난포액 내의 E2와 P4의 비율 변화가 난포란의 성숙과 수

정란의 발달 및 그 품질과 매우 밀접한 연관성이 있다는 본 연구의 결론을 뒷받침해 준다.

결론

돼지 난포란의 체외 성숙시 적정농도의 EPA의 첨가는 배반포의 품질을 향상(전체 세포수의 증가, apoptosis 세포수의 감소)시켰으며, 적정 농도 이상의 첨가는 난자의 난구세포의 팽창 및 핵 성숙을 억제하였고, 또한 품질을 저하시켰다. 체외 성숙 과정에서 야기되는 분자적 변화 중 하나의 지표로서 난포란의 체외 성숙 후 체외 성숙 배양액 내의 PGE2, E2, P4의 분비 농도의 변화를 검토한 결과 PGE2는 EPA 첨가 농도에 비례하여 감소하였고, P4에 대한 E2의 비율은 50 μ M EPA 첨가군에서 높게 100 μ M EPA 첨가군에서 낮게 나타났다. 결론적으로 돼지 난포란의 체외 성숙시 EPA의 첨가는 PGE2, E2, P4의 분비 농도의 변화를 야기하며 이러한 변화는 난구세포의 팽창, 난자의 핵성숙과 생산된 배반포의 품질에 영향을 준다. 기존의 보고된 각종 지방산들의 연구결과와 유사하게 EPA도 난포란의 성숙, 수정란의 체외 생산 등에 많은 영향들의 미친다는 것을 알 수 있다. 따라서 앞으로 난자의 체외 배양 체계의 확립에 첨가물질로서 EPA를 포함하여 지방산의 연구는 더욱 진행되어야 할 것이며, 이러한 연구 결과들은 나아가서 적절한 균형 잡힌 식단 또는 약리학적 제제로부터 지방산의 공급을 통한 가축의 육종과 이와 연관된 기초 연구에 활용되어질 수 있을 것으로 기대한다.

CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ACKNOWLEDGEMENTS

이 논문은 2017학년도 대구대학교 학술연구비지원(혹은 일부지원)에 의한 논문임.

ORCID

Kang-Sig Kim: <https://orcid.org/0000-0003-2363-9248>

Hum-Dai Park: <https://orcid.org/0000-0002-3721-9167>

REFERENCES

- Aardema H, Roelen BA, van Tol HT, Oei CH, Gadella BM, Vos PL. 2013. Follicular 17 β -estradiol and progesterone concentrations and degree of cumulus cell expansion as predictors of in vivo-matured oocyte developmental competence in

- superstimulated heifers. *Theriogenology*. 80:576-583.
- Abayasekara DR, Wathes DC. 1999. Effects of altering dietary fatty acid composition on PG synthesis and fertility. *PGs Leukot Essent Fatty Acids*. 61:275-287.
- Abeydeera LR, Day BN. 1997. In vitro penetration of pig oocytes in a modified tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology*. 48:537-544.
- Andrade LN, de Lima TM, Curi R, Castrucci AM. 2005. Toxicity of fatty acids on murine and human melanoma cell lines. *Toxicol. In Vitro*. 19:553-560.
- Beker-van Woudenberg AR, van Tol HT, Roelen BA, Colenbrander B, Bevers MM. 2004. Estradiol and its membrane-impermeable conjugate (estradiol-bovine serum albumin) during in vitro maturation of bovine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation, cytoskeleton, and embryo quality. *Biol Reprod*. 70:1465-1474.
- Bilby TR, Jenkins T, Staples CR, Thatcher WW. 2006. Pregnancy, bovine somatotropin, and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: III. Fatty acid distribution. *J. Dairy Sci*. 89:3386-3399.
- Childs S, Hennessy AA, Sreenan JM, Wathes DC, Cheng Z, Stanton C, Diskin MG, Kenny DA. 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*. 70:595-611.
- Eppig JJ. 1981. PG E2 stimulates cumulus expansion and hyaluronic acid synthesis by cumuli oophori isolated from mice. *Biol. Reprod*. 25:191-195.
- Ghaffarilaleh V, Fouladi-Nashta A, Paramio MT. 2014. Effect of α -linolenic acid on oocyte maturation and embryo development of prepubertal sheep oocytes. *Theriogenology* 82:686-696.
- Gulliver CE, Friend MA, King BJ, Clayton EH. 2012. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reproduction of sheep and cattle. *Anim. Reprod. Sci*. 131:9-22.
- Hizaki H, Segi E, Sugimoto Y, Hirose M, Saji T, Ushikubi F, Matsuoka T, Noda Y, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S, Ichikawa A. 1999. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the PG E receptor subtype EP(2). *Proc. Natl. Acad. Sci*. 96:10501-10506.
- Hyttel P, Callesen H, Greve T. 1986. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *J. Reprod. Fertil*. 76:645-656.
- Ireland JJ, Roche JF. 1983. Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. *J. Anim. Sci*. 57:157-167.
- Lands WE. 1992. Biochemistry and physiology of n-3 fatty acids. *FASEB J*. 6:2530-2536.
- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. 1993. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 90:11162-11166.
- Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery Jr CA, et al. 1995. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev*. 9:2266-2278.
- Marei WF, Wathes DC, Fouladi-Nashta AA. 2009. The effect of linolenic Acid on bovine oocyte maturation and development. *Biol. Reprod*. 81:1064-1072.
- Maya-Soriano MJ, López-Gatius F, Andreu-Vázquez C, López-Béjar M. 2013. Bovine oocytes show a higher tolerance to heat shock in the warm compared with the cold season of the year. *Theriogenology*. 79:299-305.
- Moallem U, Shafran A, Zachut M, Dekel I, Portnick Y, Arieli A. 2013. Dietary α -linolenic acid from flaxseed oil improved folliculogenesis and IVF performance in dairy cows, similar to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil. *Reproduction*. 146:603-614.
- Modina SC, Tessaro I, Lodde V, Franciosi F, Corbani D, Luciano AM. 2014. Reductions in the number of mid-sized antral follicles are associated with markers of premature ovarian senescence in dairy cows. *Reprod. Fertil. Dev*. 26:235-244.
- Neal P, Baker TG, McNatty KP, Scaramuzzi RJ. 1975. Influence of PGs and human chorionic gonadotrophin on progesterone concentration and oocyte maturation in mouse ovarian follicles maintained in organ culture. *J. Endocrinol*. 65:19-25.
- Nuttinck F, Gall L, Ruffini S, Laffont L, Clement L, Reinaud P. 2011. PTGS2-related PGE₂ affects oocyte MAPK phosphorylation and meiosis progression in cattle: late effects on early embryonic development. *Biol. Reprod*. 84:1248-1257.
- Oseikria M, Elis S, Maillard V, Corbin E, Uzbekova S. 2016. N-3 polyunsaturated fatty acid DHA during IVM affected oocyte developmental competence in cattle. *Theriogenology* 85:1625-1634.
- Petit HV, Germiquet C, Lebel D. 2004. Effect of feeding whole, unprocessed sunflower seeds and flaxseed on milk production, milk composition, and PG secretion in dairy cows. *J. Dairy Sci*. 87:3889-3898.
- Petters RM, Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. [Review]. *J. Reprod. Fertil. Suppl*. 48:61-73.
- Roberts AJ, Skinner MK. 1990. Estrogen regulation of thecal cell steroidogenesis and differentiation: thecal cell-granulosa cell interactions. *Endocrinology*. 127:2918-2929.
- Robinson R, Pushpakumara P, Cheng Z, Peters A, Abayasekara D, Wathes D. 2002. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. *Reproduction*. 124:119-131.
- Sargent JR. 1997. Fish oils and human diet. *Br. J. Nutr*. 78:5-13.
- Scorletti E, Byrne CD. 2013. "Omega-3 fatty acids, hepatic lipid metabolism, and nonalcoholic fatty liver disease". *Annual Review of Nutrition*. 33:231-248.
- Siqueira LC, Barreta MH, Gasperin B, Bohrer R, Santos JT, Buratini Jr J, et al. 2012. Angiotensin II, progesterone, and prostaglandins are sequential steps in the pathway to bovine oocyte nuclear maturation. *Theriogenology* 77:1779-1187.
- Soberman RJ, Christmas P. 2003. "The organization and consequences of eicosanoid signaling". *J. Clin. Invest*. 111:1107-

- 1113.
- Veshkini A, Asadi H, Khadem AA, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Khazabi S, Aminafshar M, Deldar H, Soleimani M, Cinar MU. 2015. Effect of Linolenic acid during in vitro maturation of ovine oocytes: embryonic developmental potential and mRNA abundances of genes involved in apoptosis. *J. Assist. Reprod. Genet.* 32:653-659.
- Viggiano JM, Herrero MB, Cebal E, Boquet MG, de Gimeno MF. 1995. PG synthesis by cumulus-oocyte complexes: effects on in vitro fertilization in mice. *PGs Leukot Essent Fatty Acids.* 53:261-265.
- Walsh SW, Mehta JP, McGettigan PA, Browne JA, Forde N, Alibrahim RM, Mulligan FJ, Loftus B, Crowe MA, Matthews D, Diskin M, Mihm M, Evans AC. 2012. Effect of the metabolic environment at key stages of follicle development in cattle: focus on steroid biosynthesis. *Physiol. Genomics.* 44:504-517.
- Wang Y, Botolin D, Christian B, Busik J, Xu J, Jump DB. 2005. Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases. *J. Lipid Res.* 46:706-715.
- Wiktorowska-Owczarek A, Berezińska M, Nowak JZ. 2015. PU-FAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv. Clin. Exp. Med.* 24:931-941.
- Yamashita Y, Shimada M, Okazaki T, Maeda T, Terada T. 2003. Production of progesterone from de novo-synthesized cholesterol in cumulus cells and its physiological role during meiotic resumption of porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 68:1193-1198.
- Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IM, Iwamura S. 2002. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol. Reprod.* 66:112-119.