

DISS. ETH NO. 25867

**Investigating fatty acid metabolism in mammals, with specific emphasis on
the female reproductive organs**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

VLADIMIR MILOJEVIĆ

Master of Animal Production, Agriculture Faculty, University of Novi Sad, Serbia

Born on 25th January 1984 in Subotica, Serbia

Citizen of Serbia

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Michael Kreuzer, examiner
Dr. Katrin Giller, co-examiner
Prof. Dr. Annette Zeyner, co-examiner

2019

Summary

Modern animal husbandry and management account for intensive use of animals for obtaining high quality products. This extreme pressure for maximal performance is often accompanied by metabolic challenges, which can consequently manifest in different health issues and suboptimal reproductive performance. Early embryo loss is of particular interest since it is still one of the major drawbacks in achieving high fertility rates and thereby improving particular breeding programs. The environment for fertilization and early embryo development within the reproductive tract is commonly known as histotroph and it is characterized by the oviduct (OF) and the uterine (UF) fluid. Thus, knowledge about their composition is of foremost importance. Fatty acids (FA) as an integral part of the histotroph serve as one of the principal energy supplies for the growing embryo. The main goal of the doctoral thesis was to obtain information about the FA composition and metabolism of the female reproductive organs and fluids in order to understand their specific characteristics and needs as one basis for improving fertility in domestic animals.

In a first study, we investigated the FA profile in plasma and reproductive fluids (OF and UF) in ten mares, using gas chromatography combined with mass spectrophotometry (GC-MS). Overall, the FA composition of the three matrices was specific, whereas we observed differences between early and late luteal stage only in the OF, with increased concentrations of particular FA known for their beneficial impact on embryo development evident during the early luteal phase. Therefore, besides transudation from plasma, we suggest specific FA synthesis pathways or selective transport mechanisms or both in the oviduct and the uterus. This is the first time that the mare histotroph was described with regard to FA composition and the obtained results provide a basis for future research.

The impact of environmental factors on the onset of specific biological and molecular mechanisms, same as the effect of different nutritional strategies, in reproductive tissues and histotroph was seldom studied until now. To address this aspect, we investigated in a second study, involving 24 ewes, the influence of dietary supply with feed additives rich in phenolic compounds (i.e. grape seed and *Acacia mearnsii* extract; 13 g/kg diet; either alone or in combination) on the FA profiles in the reproductive tissues, fluids and plasma, using GC and GC-MS. The FA profile of uterus and oviduct lipids remained widely unaffected by the diet, which was different from liver, muscle, and adipose tissue lipids. Still, the FA profiles of the lipids of the reproductive fluids were affected by the diet, and this effect was more pronounced in the UF compared to OF. Moreover, the observed high proportions of specific FA emphasize

their importance for the growing embryo and its mother during the periconceptional period that includes the phase of early embryo development. The gene expression of the respective tissues was investigated in relation to possible differences caused by the dietary supplementation with phenolic compounds. Effects were very limited which might have been related to the observed non-significant differences in plasma total phenol concentrations. These findings suggest a limited effect of phenol-rich plant extracts on the FA composition of the reproductive tissues and fluids, but the observed changes are still encouraging in showing that maternal nutrition can modify the environment of the developing embryo to some extent.

Finally, in a third study, we investigated the effects of a hormonal challenge (i.e. leptin and oxytocin) in an equine oviduct epithelial cell culture model (EOEC, 48h). High amounts of circulating leptin are linked to obesity, but it was also shown that leptin expression in adipocyte cells might change as consequence of polyphenol extract supplementation. We hypothesized that leptin might as well affect the prostanoid signalling pathway in EOEC, thereby affecting muscular contraction or relaxation in relation to embryo transport. The expression of a broad panel of 27 genes was tested, and for the first time we identified leptin receptor mRNA transcripts in EOEC, using the Fluidigm platform. Our model might serve as an approach for future studies, because of the attained explant morphology and a stable expression of genes related to cell functionality. In addition, we confirmed the prostaglandin E₂ and prostaglandin F_{2α} synthesis in EOEC using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), but did not observe the hypothesized increase in their synthesis due to leptin stimulation. Expression of genes was affected by stimulation time, and lower expression of certain genes was observed. These results could be explained by the sampled material, and more specifically by the cycle stage of mares. So far, an effect of leptin as an obesity-related hormone on EOEC could not be confirmed by the present study, and an optimization of the protocol is necessary.

In conclusion, we were able to describe the characteristic FA profile of the reproductive fluids in both the horse and the sheep, and of reproductive organs in ewes, thereby contributing to research and animal husbandry practices by filling the gap of knowledge about species-specific FA profiles. Moreover, the observed changes in the OF and the UF composition are in accordance with the suggested dynamic modulation of the histotroph. Together, the results are indicative for a possible improvement of the environment for the oocyte and the growing embryo, both in *in vivo* and *in vitro* conditions. In addition, the tested diet supplementation with phenolic compounds in sheep proved as a promising strategy to modify the FA composition of important tissues and fluids, thereby encouraging scientific efforts to improve

the reproductive parameters via dietary interventions. Finally, the EOEC culture proved to be a promising model for a range of experiments concerning the exploration of different biological mechanism in the oviduct of mares. The influence of obesity via high leptin concentrations on the oviduct muscle contraction and relaxation remains to be demonstrated in the horse. The results of this doctoral project serve as a comprehensive source of information concerning the histotroph composition in general and the effects of dietary supplementation with phenolic compounds in particular. Ultimately, the results represent the frame for further studies within the field of reproductive physiology and nutrition of domestic female animals in the periconceptual period.

Zusammenfassung

Moderne Tierhaltung und modernes Tiermanagement führen zu einer intensiven Nutzung der Tiere zur Gewinnung qualitativ hochwertiger Produkte. Die geforderte maximale Leistung wird oft von metabolischen Herausforderungen begleitet, die zu verschiedenen gesundheitlichen Problemen und suboptimalen Fortpflanzungsleistungen führen können. Der frühe Embryonenverlust ist von besonderer Bedeutung, da er immer noch einer der größten Hindernisse für die Erreichung hoher Fruchtbarkeitsraten ist und damit der Optimierung spezifischer Zuchtprogramme entgegenwirkt. Das Milieu, in dem sowohl die Befruchtung als auch die frühe Embryonalentwicklung im Reproduktionstrakt stattfinden, wird auch als Histirotrophe bezeichnet und durch von Eileiter (OF) und Uterus (UF) sezernierte Flüssigkeiten gekennzeichnet. Daher ist die Kenntnis über die Zusammensetzung dieser Flüssigkeiten von grösster Bedeutung. Fettsäuren (FS) als integraler Bestandteil der Histirotrophe dienen als einer der Hauptenergielieferanten für den sich entwickelnden Embryo. Das Hauptziel der vorliegenden Doktorarbeit bestand darin, Informationen über die FS-Zusammensetzung und den Stoffwechsel der Reproduktionsorgane und -flüssigkeiten zu erhalten, um deren spezifische Bedürfnisse bzw. Merkmale als Grundlage für die Verbesserung der Fertilität von Haustieren zu verstehen.

In der ersten Studie untersuchten wir das FS-Profil im Plasma und den Reproduktionsflüssigkeiten (OF und UF) von zehn Stuten unter Verwendung von Gaschromatographie kombiniert mit Massenspektrometrie (GC-MS). Insgesamt zeigte sich eine spezifische FS-Zusammensetzung der drei untersuchten Flüssigkeiten, wobei wir Änderungen der FS-Zusammensetzung zwischen der frühen und späten Lutealphase nur in der OF beobachten konnten. Dabei zeigten sich während der frühen Lutealphase erhöhte Konzentrationen spezifischer FS, welche bekannt dafür sind, sich positiv auf die Embryonalentwicklung auszuwirken. Daher nehmen wir an, dass es in Eileiter und Uterus spezifische FS Synthesewege und/oder selektive Transportmechanismen gibt. Diese Studie beschreibt zum ersten Mal die Histirotrophe der Stute in Bezug auf seine FS-Zusammensetzung und die daraus resultierenden Ergebnisse bieten somit eine Basis für die zukünftige Forschung.

Die Beeinflussung spezifische biologischer und molekularer Mechanismen durch Umweltfaktoren und damit auch durch verschiedene Fütterungsstrategien in Reproduktionsgeweben und Histirotrophe wurde bisher nur selten untersucht. Um diesem Aspekt zu begegnen untersuchten wir in einer zweiten Studie an 24 Mutterschafen den Einfluss von phenolreichen Futtermittelzusatzstoffen (Extrakte aus Traubenkernen und *Akazie*

mearnsii; 13 g/kg Futter, entweder allein oder in Kombination) auf die FS-Profile in Reproduktionsgeweben, Flüssigkeiten und Plasma unter Verwendung von GC und GC-MS. Die FS-Profile der Lipide von Uterus und Eileiter blieben weitestgehend unbeeinflusst von der Diät, aber die FS-Zusammensetzung von Leber, Muskel und Fettgewebe war unterschiedlich. Die FS-Profile der Histiotrophen wurden durch die Ernährung beeinflusst wobei dieser Effekt in der UF stärker ausgeprägt war als in der OF. Darüber hinaus verdeutlichen die beobachteten hohen Anteile spezifischer FS ihre Bedeutung für den wachsenden Embryo und dessen Mutter während der perikonzeptionellen Periode, die auch die Phase der frühen Embryonalentwicklung umfasst. Die Genexpression der jeweiligen Gewebe wurde im Hinblick auf mögliche Änderungen durch die phenolischen Substanzen untersucht. Die Effekte waren sehr begrenzt, was sich möglicherweise durch fehlende signifikante Unterschiede in den Gesamtphenolkonzentrationen im Plasma begründen lässt. Diese Ergebnisse deuten auf eine sehr begrenzte Wirkung von phenolreichen Pflanzenextrakten auf die FS-Zusammensetzung von Reproduktionsgeweben und deren Flüssigkeiten hin. Die beobachteten Veränderungen sind jedoch immer noch vielversprechend, da sie zeigen, dass die Ernährung der Mutter die Umgebung des sich entwickelnden Embryos bis zu einem gewissen Grad beeinflussen kann.

Schließlich untersuchten wir in einer dritten Studie die Auswirkungen einer Hormonstimulation (mit Leptin und Oxytocin) auf ein Zellkulturmodell für Eileiterepithelzellen vom Pferd (EOEC, 48h). Hohe Mengen an zirkulierendem Leptin werden mit Fettleibigkeit assoziiert, aber es wurde ebenso gezeigt, dass sich die Leptinexpression als Folge einer Polyphenol-Supplementierung ändern kann. Wir stellten die Hypothese auf, dass Leptin auch den Prostanoid-Signalweg in EOEC beeinflussen könnte, wodurch die für den Embryonentransport benötigte Muskelkontraktion oder -entspannung beeinflusst wird. Die Expression eines breiten Spektrums von 27 Genen wurde getestet. Zum ersten Mal identifizierten wir Leptinrezeptor-mRNA-Transkripte in EOEC mithilfe der Fluidigm Plattform. Unser Modell könnte aufgrund der erzielten Explantationsmorphologie und der stabilen Expression von Genen im Zusammenhang mit der Zellfunktionalität als Ansatz für zukünftige Studien dienen. Darüber hinaus konnten wir die Prostaglandin E₂ und Prostaglandin F_{2α} Synthese in EOEC mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zwar bestätigen, den vermuteten Anstieg ihrer Synthese aufgrund der Stimulation mit Leptin konnten wir allerdings nicht beobachten. Die Expression der Gene wurde aber durch die Dauer der Stimulation beeinflusst und es wurde eine verminderte Expression verschiedener Gene beobachtet. Diese Ergebnisse könnten durch das gewonnene Probenmaterial und insbesondere durch die Zyklusphase der Stute erklärt werden. In der vorliegenden Studie konnte eine

Wirkung von Leptin auf EOEC nicht bestätigt werden. Eine Optimierung des Protokolls ist notwendig.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir das charakteristische FS-Profil der Histirotrophe beim Pferd und beim Schaf, sowie auch das der Reproduktionsorgane beim Schaf beschreiben konnten. Diese Ergebnisse leisten durch das Schliessen der Wissenslücke in Bezug auf speziesspezifische Unterschiede im FS-Profil einen Beitrag sowohl für die Forschung als auch für die Tierhaltungspraxis. Darüber hinaus bestätigen die beobachteten Änderungen der OF- und UF-Zusammensetzung die vermutete dynamische Modulation der Histirotrophen. Insgesamt sind die Ergebnisse ein Indikator für eine mögliche Milieu-Optimierung von Eizelle und wachsendem Embryo sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Außerdem erwies sich die getestete Supplementation mit phenolreichen Extrakten bei Schafen als vielversprechende Strategie zur Modifikation der Lipidzusammensetzung wichtiger Gewebe und Flüssigkeiten, was eine weiterführende Forschung in Hinblick auf eine mögliche Verbesserung von Reproduktionsparametern durch Fütterungsinterventionen bestärkt. Die EOEC-Kultur stellt ein vielversprechendes Modell für eine Reihe von Experimenten zur Erforschung verschiedener biologischer Mechanismen im Eileiter von Stuten dar. Der potentielle Einfluss einer erhöhten Leptinkonzentration auf Muskelkontraktion oder -entspannung im Eileiters bei Stuten muss erfordert weitere Untersuchungen. Die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit dienen als umfassende Informationsquelle über die Zusammensetzung von Histirotrophe im Allgemeinen und die Auswirkungen der Nahrungsergänzung mit phenolischen Substanzen im Speziellen. Letztendlich bilden die Ergebnisse den Rahmen für weitere Studien auf dem Gebiet der Reproduktionsphysiologie und der Ernährung von weiblichen Haustieren in der perikonzeptionalen Periode.

Résumé

L'élevage moderne repose sur l'utilisation intensive des animaux visant à l'obtention de produits de haute qualité. Cette pression extrême en faveur d'une performance maximale s'accompagne souvent de défis métaboliques, qui peuvent se manifester par différents problèmes de santé et des performances reproductives qui ne sont pas optimales. L'avortement précoce doit être étudié en particulier, car il s'agit de l'une des principales entraves à l'obtention de taux élevés de fécondité, et donc à l'amélioration de programmes particuliers de sélection. L'environnement pour la fertilisation et le développement embryonnaire précoce dans le tractus génital, communément connu sous le nom d'histotrophe, est caractérisé par les fluides oviducte (FO) et utérin (FU). C'est pourquoi la connaissance de leur composition est de la plus haute importance. Les acides gras (AG) en tant que partie intégrante de l'histotrophe constituent l'une des principales sources d'énergie pour l'embryon en croissance. L'objectif principal de la thèse de doctorat était donc d'obtenir des informations sur la composition en AG des tissus et des fluides reproductifs et sur leur métabolisme ; ceci afin de comprendre leurs caractéristiques et leurs besoins spécifiques pour tenter d'améliorer la fertilité des animaux domestiques.

Dans une première étude, nous avons analysé le profil en AG du plasma et des fluides reproductifs (FO et FU) de dix juments, par chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (GC-MS). Globalement, la composition en AG était spécifique à chacune des trois matrices. Seuls des changements entre la période lutéale précoce et tardive ont pu être observés, avec, en début de période lutéale, une concentration accrue d'AG connus pour leur impact bénéfique sur le développement embryonnaire. Par conséquent, nous suggérons l'existence, dans l'oviducte et l'utérus, soit de voies particulières de synthèse des AG, soit de mécanismes de transport sélectif, soit les deux. Il s'agit de la première description de la composition en AG de l'histotrophe de la jument, et les résultats obtenus fournissent une base pour la recherche future.

Dans les tissus reproductifs et l'histotrophe, l'impact des facteurs environnementaux sur l'apparition de mécanismes biologiques et moléculaires spécifiques n'a été que rarement étudié jusqu'à présent, tout comme celui de stratégies nutritionnelles différentes. Afin de traiter cet aspect, nous avons cherché, dans une deuxième étude portant sur 24 brebis, l'influence de la supplémentation avec des additifs riches en composés phénoliques (de l'extrait de pépins de raisin et d'*Acacia mearnsii*; 13 g/kg d'aliments; seuls ou combinés) sur les profils en AG dans les tissus et fluides reproductifs, et le plasma, en utilisant les GC et GC-MS. Le régime alimentaire n'a pas modifié le profil en AG des lipides de l'utérus et de l'oviducte,

contrairement à celui des lipides du foie, des muscles et des tissus adipeux. Le profil en AG des lipides des fluides reproductifs a quant à lui été affecté par le régime, et cet effet a été plus prononcé dans le FU que dans le FO. De plus, les proportions accrues d'AG spécifiques observées soulignent l'importance de ces derniers pour la croissance de l'embryon et pour sa mère pendant la période périconceptionnelle, incluant la phase de développement embryonnaire précoce. L'expression des gènes des tissus respectifs a ensuite été étudiée en relation avec d'éventuels changements causés par les extraits phénoliques. Les effets ont été très limités, ce qui pourrait être lié aux changements non significatifs observés dans les concentrations plasmatiques totales de phénols. Ces résultats suggèrent un effet limité des extraits de plantes riches en phénols sur la composition en AG des tissus et fluides reproductifs, mais les changements observés sont encourageants et suggèrent que la nutrition maternelle peut modifier, dans une certaine mesure, l'environnement de l'embryon pendant sa croissance.

Enfin, dans un troisième essai, nous avons étudié les effets d'un défi hormonal (leptine et ocytocine), à l'aide d'un modèle de culture de cellules épithéliales d'oviducte équin (EOEC, 48h). L'obésité est habituellement liée à de hauts niveaux de leptine en circulation, mais il a également été démontré que l'expression de la leptine pouvait changer en fonction de la supplémentation en polyphénol. Nous avons émis l'hypothèse que la leptine pourrait tout aussi bien affecter la voie de signalisation des prostanoïdes dans les EOEC, affectant ainsi la contraction / relaxation musculaire en relation avec le transport des embryons. L'expression d'un large panel de 27 gènes a été testée et, pour la première fois, nous avons identifié les transcrits d'ARNm du récepteur de la leptine dans l'EOEC, à l'aide de la plateforme Fluidigm. Notre modèle pourrait servir d'approche pour de futures études, en raison du maintien de la morphologie de l'explants et d'une expression stable des gènes liés à la fonctionnalité cellulaire. En outre, nous avons confirmé la synthèse de Prostaglandine E₂ et de Prostaglandine F_{2α} dans l'EOEC en utilisant la méthode immuno-enzymatique (ELISA), mais n'avons pas observé l'augmentation hypothétique de leur synthèse due à la stimulation de la leptine. L'expression des gènes était influencée par le temps de stimulation et une diminution de la régulation de certains gènes a été observée au cours du temps. Ces résultats pourraient être expliqués par le matériel échantillonné, et plus précisément par la phase de cycle des juments. A ce jour, un effet de la leptine comme une hormone associée à l'obésité sur EOEC n'a pas pu être confirmé par l'étude, et une optimisation du protocole est nécessaire.

En conclusion, nous avons pu décrire le profil caractéristique des AG des fluides reproductifs du cheval et du mouton, ainsi que celui des AG des organes reproductifs chez les ovins, contribuant à la recherche et au développement des pratiques d'élevage en comblant le

manque de connaissances sur les valeurs de cette gamme d'espèces spécifique. De plus, les changements observés dans la composition du FO et du FU sont conformes à la modulation dynamique suggérée de l'histotrophe. Dans leur ensemble, les résultats sont indicatifs pour l'optimisation de l'environnement pour l'ovocyte et l'embryon en croissance, à la fois dans des conditions *in vivo* et *in vitro*. En outre, le régime testant la supplémentation avec des extraits phénoliques chez le mouton semble une stratégie prometteuse pour la modification du stockage des AG des tissus importants et des fluides, favorisant ainsi les efforts scientifiques visant à améliorer les paramètres de reproduction par des interventions alimentaires. Enfin, la culture EOEC s'est avérée être un modèle prometteur pour une série d'expériences concernant l'exploration des différents mécanismes biologiques dans l'oviducte des juments. L'influence de l'obésité sur la contraction et relaxation des muscles de l'oviducte, habituellement associée à des concentrations en leptine élevées, reste à démontrer chez le cheval. Les résultats de ce travail de doctorat servent donc de source d'informations, d'une part sur la composition de l'histotrophe en général, et, d'autre part, sur les effets de la supplémentation alimentaire avec des extraits phénoliques en particulier. Finalement, ces résultats pourront venir soutenir de futures études en rapport avec la physiologie de la reproduction et de la nutrition des animaux domestiques, particulièrement celle des femelles en période périconceptionnelle.