

Verbesserung der Eizellqualität durch Omega-3-Fettsäuren

Verlängerung der weiblichen Fortpflanzungslebensdauer und Verbesserung der Eizellqualität durch Omega-3-Fettsäuren in der Nahrung

Deepika Nehra, Hau D. Le, [...], and Mark Puder

Zusammenfassung

Frauen, die sich dem fortgeschrittenen mütterlichen Alter nähern, haben extrem schlechte Ergebnisse sowohl bei der natürlichen als auch bei der assistierten Fertilität. Darüber hinausnimmt die Inzidenz von Chromosomenanomalien (Abnormalitäten, Abweichungen) und Geburtsfehlern mit dem Alter zu. Bisher gibt es noch keine wirksame und praktische Strategie zur Verzögerung der Ovarialalterung oder zur Verbesserung der Eizellqualität. Wir zeigen, dass der lebenslange Verzehr einer Ernährung, die reich an Omega-3-Fettsäuren ist, die Reproduktionsfunktion der Maus bis ins fortgeschrittene mütterliche Alter verlängert, während eine Ernährung, die reich an Omega-6-Fettsäuren ist, mit einem sehr schlechten Reproduktionserfolg im fortgeschrittenen mütterlichen Alter assoziiert ist. Darüber hinaus ist selbst eine kurzfristige diätetische Behandlung mit einer an Omega-3-Fettsäuren reichen Ernährung, die zum Zeitpunkt des normalen altersbedingten raschen Rückgangs der Reproduktionsfunktion der Maus eingeleitet wird, mit einer verbesserten Eizellqualität verbunden, während eine kurzfristige diätetische Behandlung mit Omega-6-Fettsäuren zu einer sehr schlechten Eizellqualität führt. Daher können Omega-3-Fettsäuren einen wirksamen und praktischen Weg zur Verzögerung der ovariellen Alterung und zur Verbesserung der Eizellqualität im fortgeschrittenen mütterlichen Alter darstellen.

Einführung

Es ist bekannt, dass die Fruchtbarkeit bei Frauen nach dem 35. Lebensjahr rapide abnimmt (Schwartz & Mayaux, 1982), wobei die Fruchtbarkeit bis zum 45. Mit den Fortschritten in der medizinischen Versorgung hat sich die Lebenserwartung einer Frau im letzten Jahrhundert um bis zu 30 Jahre verlängert, während sich das Alter der Wechseljahre im gleichen Zeitraum um magere 3-4 Jahre verändert hat (Soules & Bremner, 1982). Damit ist eine Diskrepanz entstanden, bei der die reproduktive Lebensspanne von Frauen im Kontext der Gesamtlebensdauer auffallend kurz geworden ist, eine Diskrepanz, die heute ausgeprägter ist als je zuvor. Der moderne Trend, die Geburt von Kindern in dieser Ära erhöhter Lebenserwartung aufzuschieben, der vor allem in westlichen Gesellschaften zu beobachten ist, rückt den altersbedingten Rückgang der Fruchtbarkeit in den Vordergrund der wissenschaftlichen Herausforderungen im Bereich der Reproduktionsmedizin (Martin et al., 2010).

Biologisch gesehen wird das Alter, in dem die Menopause eintritt, durch den fortschreitenden Rückgang und die endgültige Erschöpfung der ovariellen eizellenhaltigen Follikelreserve bestimmt (Hansen, 1986; Faddy et al., 1992; Tilly, 2001), die mit der abnehmenden Qualität der Eizellen einhergeht, was sich in einer Zunahme von Chromosomen- und Spindelstörungen und mitochondrialen Funktionsstörungen äußert (Battaglia et al., 1996; Hunt & Hassold, 2008; Selesniemi et al., 2011). Diese Veränderungen tragen wesentlich zum extrem schlechten Erfolg der natürlichen und assistierten Fertilitätsversuche bei Frauen im fortgeschrittenen Fortpflanzungsalter und zur erhöhten Inzidenz von Chromosomenanomalien bei erfolgreicher Empfängnis bei (Navot et al., 1991b; van Kooij et al., 1996). Ähnlich wie beim Menschen zeigen Labornager eine altersbedingte Abnahme der ovariellen Follikelreserve, die etwa in der Hälfte ihrer chronologischen Lebensspanne zu einem Zustand natürlicher Infertilität führt (Gosden et al., 1983; Perez et al., 1999; Wu et al., 2005). Älter werdende weibliche Mäuse weisen viele der physiologischen Veränderungen auf, die bei postmenopausalen Frauen beobachtet werden, einschließlich des Verlusts der zyklischen Ovarialfunktion, was diese Tiere zu einem idealen in-vivo-Modell für die Untersuchung der Ovarialinsuffizienz macht. Leider muss trotz einschlägiger

Nagetier-Modellsysteme und vielversprechend vorgeschlagener Strategien zur Verlängerung der reproduktiven Lebensspanne der Frau (Perez et al., 1999, 2007; Selesniemi et al., 2008, 2009, 2011; Niikura et al., 2010) noch eine wirksame und realistische Strategie zur signifikanten Verzögerung der Ovarialalterung oder zur Verbesserung der Eizellqualität entwickelt werden.

Veränderungen in den Ernährungsmustern von Menschen im Laufe der Zeit können Einblicke in neue Wege zur Verzögerung der ovariellen Alterung geben. Anthropologische und ernährungswissenschaftliche Studien belegen eine bemerkenswerte Veränderung der menschlichen Ernährung in den letzten 100 Jahren, vor allem im Hinblick auf Art und Menge der aufgenommenen Fette (Eaton & Konner, 1985; Simopoulos, 1991, 2003, 2006, 2009, 2011). Diese Veränderungen manifestieren sich sowohl in einer absoluten als auch in einer relativen Veränderung des Verzehrs von Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren. Heute bietet die westliche Ernährung ein Verhältnis von Omega-6- zu Omega-3-Fettsäuren von bis zu 25:1, was in krassm Gegensatz zu dem 1:1-Verhältnis steht, das in der Vergangenheit vom Menschen konsumiert wurde (Simopoulos, 2006), wodurch ein Ernährungsumfeld geschaffen wird, das sich sehr von unseren Vorfahren unterscheidet und aus dem unsere genetische Konstitution ausgewählt wurde. Diese Veränderung ist besonders relevant, wenn man bedenkt, dass die Veränderung der Ernährungsgewohnheiten in den letzten 100 Jahren mit einem gleichzeitigen Abwärtstrend der Fruchtbarkeitsraten bei Frauen über 35 Jahren einhergeht (Baird et al., 2005).

Mit dieser Studie werden zwei Ziele verfolgt: (i) den Effekt einer Ernährung, die reich an Omega-3-Fettsäuren ist, auf die Reproduktionsfunktion der Maus und die Eizellqualität zu bewerten und (ii) festzustellen, ob eine Ernährung, die reich an Omega-3-Fettsäuren ist, für den langfristigen Verzehr sicher ist. Wir fanden heraus, dass der lebenslange Verzehr einer Ernährung, die reich an Omega-3-Fettsäuren ist, die Reproduktionsfunktion der Maus im fortgeschrittenen mütterlichen Alter aufrechterhält und dass die Einführung dieser Ernährung zum Zeitpunkt des normalen schnellen Rückgangs der Reproduktionsfunktion der Maus zu einer signifikanten Verbesserung der Eizellqualität führt. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass diese Omega-3-reiche Diät für den langfristigen Verzehr über mehrere Generationen hinweg sicher ist, ohne dass ein Mangel an essentiellen Fettsäuren nachgewiesen werden konnte. Diese Befunde haben tiefgreifende Auswirkungen sowohl auf die erfolgreiche natürliche als auch auf die assistierte Reproduktion im fortgeschrittenen mütterlichen Alter.

Ergebnisse

Reproduktions- und Fruchtbarkeitsergebnisse in Langzeit-Ernährungsstudien

Eine dritte Diät, bei der das gesamte Fett als hydriertes Kokosnussöl (HCO: High-Corn-Oil [Hoch-Maiskeim-Öl]) verabreicht wurde, das einen Mangel an essentiellen Fettsäuren aufweist, wurde als Kontrolle für den Mangel an essentiellen Fettsäuren verwendet. Weitere Einzelheiten zu diesen drei isokalorischen (gleiche Anzahl Kalorien) Diäten sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

Zusammensetzung von experimentellen Diäten

	HCO	SOY	DHA
Kasein	501.2	501.2	501.2
L-Cystin	7.2	7.2	7.2
Saccharose	400	400	400
Maisstärke	1676.5	1676.5	1676.3
Dyetrose	589	589	589
Mineralien-Mischung #210050	29.4	29.4	29.4
Vitamin-Mix #310025	38.7	38.7	38.7
Hydriertes Kokosnussöl	360	0	284.4
Sojaöl	0	360	0
Docosahexaensäure (DHA)	0	0	72
Arachidonsäure (AA)	0	0	3.6
Gesamt	3602.0	3602.0	3601.8

*HCO: High-Corn-Oil (Hoch-Maiskeim-Öl)**Alle Werte wurden als kcal kg-1-Diät angegeben.*

Vor der Bewertung des Reproduktionspotenzials im fortgeschrittenen mütterlichen Alter wurden Zuchtversuche durchgeführt, um das Reproduktionspotenzial der Tiere mit diesen Futtermitteln während der normalen reproduktiven Lebensspanne der Mäuse zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden adulte weibliche Mäuse nach dem Zufallsprinzip einer der drei verschiedenen isokalorischen Diäten (HCO, SOY, DHA) zugeteilt. Nach einer vierwöchigen Futterbehandlung wurden Zuchtversuche mit dieser F0-Generation begonnen, wobei die nachfolgenden Tiergenerationen das gleiche Futter erhielten und die Zuchtversuche mit jeder nachfolgenden Generation fortgesetzt wurden, wenn die Weibchen die Fortpflanzungsreife erreichten. Die Wurfgröße und Lebensfähigkeit der Tiere der F1-Generation (geboren von F0-Müttern) in jeder der experimentellen Futtergruppen unterschied sich nicht. Tiere mit der SOY-Diät wurden auf die F3-Generation und Tiere mit der DHA-Diät auf die F6-

Generation gezüchtet, woraufhin weitere Zuchtversuche abgebrochen wurden. Bemerkenswert ist, dass Tiere mit HCO-Diät trotz fortgesetzter Zuchtversuche nicht in der Lage waren, sich über die F1-Generation hinaus erfolgreich fortzupflanzen, was wahrscheinlich auf einen schweren Mangel an essentiellen Fettsäuren zurückzuführen ist, definiert als ein Trien/Tetraen (T:T)-Verhältnis von $> 0,2$ im Serumfettsäureprofil (Tabelle S1). Aufeinanderfolgende Generationen von Tieren mit DHA-Diät hatten weiterhin Wurfgrößen innerhalb des erwarteten Bereichs mit einer bemerkenswerten Verbesserung der Überlebensrate der Nachkommen in späteren Generationen, von 75% in der F1-Generation auf 95% in der F5-Generation und 100% in der F6-Generation.

Nachdem die Fähigkeit der Tiere mit Omega-3- und Omega-6-reichen Futtermitteln, sich innerhalb der normalen weiblichen Fortpflanzungslebensdauer erfolgreich fortzupflanzen, bestätigt worden war, wurden die Tiere mit diesen Futtermitteln anschließend auf ihre Fähigkeit getestet, sich im fortgeschrittenen mütterlichen Alter (> 10 Monate) fortzupflanzen. Alle Tiere mit omega-3-reichem Futter ($N = 7$) konnten sich mit durchschnittlich $3,3 \pm 0,3$ Würfen/Tier im Alter von 10 bis 15 Monaten erfolgreich fortzupflanzen.

Obwohl der durchschnittliche Wurf bei Müttern im fortgeschrittenen mütterlichen Alter (> 10 Monate) kleiner war ($4,4 \pm 1,9$ Nachkommen/Wurf) im Vergleich zu jüngeren Kohorten von Tieren ($6,0 \pm 2,7$ Nachkommen/Wurf), die das gleiche Futter erhielten ($P = 0,10$), war das Gesamtüberleben der Nachkommen von Müttern im fortgeschrittenen mütterlichen Alter mit 89% bemerkenswert hoch. Im krassen Gegensatz dazu hatte keines der 10 alten Tiere, die mit der Omega-6-reichen Nahrung ernährt wurden, lebensfähige Würfe. Als weiterer Vergleichspunkt wurden auch Zuchtversuche im Alter von 10 Monaten mit Tieren initiiert, die mit einem Standard-Nagetierfutter im Labor gefüttert wurden ($N = 7$). Der Fortpflanzungserfolg dieser Tiere stand ebenfalls in krassm Gegensatz zu den Tieren mit Omega-3-reicher Nahrung, wobei nur zwei Tiere jeweils einen lebensfähigen Wurf hatten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der bemerkenswerte Anstieg der Omega-6-Fettsäuren in der menschlichen Nahrung in den letzten 100 Jahren den Reproduktionserfolg von Frauen im fortgeschrittenen mütterlichen Alter tatsächlich beeinträchtigen könnte (Eaton & Konner, 1985; Simopoulos, 2003, 2006, 2009, 2011).

Eizellenqualität in Studien zur akuten diätetischen Behandlung

Da wir verstanden haben, dass der lebenslange Verzehr einer Diät mit einem hohen Verhältnis von Omega-3- zu Omega-6-Fettsäuren keine sehr praktische Strategie zur Verlängerung der natürlichen reproduktiven Lebensspanne ist, konzentrierten wir uns als nächstes auf ein Modell der Akutdiätbehandlung. Da die Eizellqualität als wichtigster Faktor für den Schwangerschaftserfolg von Frauen im fortgeschrittenen Fortpflanzungsalter anerkannt ist (Navot et al., 1991a,b), zielten wir darauf ab, den Effekt einer akuten diätetischen Behandlung auf die Eizellqualität im fortgeschrittenen mütterlichen Alter zu bestimmen.

Sechsenddreißig 10 Monate alte jungfräuliche weibliche Mäuse, die bis zum Alter von 10 Monaten mit einem Standard-Labor-Nagetierfutter (CHOW) gefüttert wurden, wurden nach dem Zufallsprinzip jeder der drei verschiedenen Futtergruppen zugeordnet ($N = 12$ CHOW, $N = 12$ SOY, $N = 12$ DHA). (Der Begriff „Standard Chow“ bezeichnet im Allgemeinen eine Vielzahl von Futtermitteln auf Getreide- oder Getreidebasis, oder kurz „Chows“, die aus Zutaten wie Sojabohnenmehl, gemahlenem Mais, Fischmehl und tierischen Nebenprodukten hergestellt werden.) Ein Tier, das das SOY-Futter erhielt, musste in Woche 10 der diätetischen Behandlung wegen einer schweren Dermatitis eingeschläfert werden. Die übrigen 35 Tiere überlebten, um die 12-wöchige Diätbehandlung abzuschließen, und wurden im Alter von 13 Monaten eingeschläfert. Es gab keine Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der durchschnittlich aufgenommenen Kalorien oder des durchschnittlichen wöchentlichen Körpergewichts der Tiere. Die akute diätetische Behandlung führte in keiner Diätgruppe zur Entwicklung eines biochemischen Mangels an essentiellen Fettsäuren.

Doch selbst nach dieser relativ kurzen Zeit der diätetischen Behandlung war das Omega-6/omega-3-Fettsäure-Serumverhältnis in der DHA-Diätgruppe signifikant höher als in den CHOW- und SOY-Diätgruppen.

Die Eizellenausbeute nach hormoneller Stimulation sowie der Reifungsstatus und die Qualität der Eizellen wurden bei den 35 weiblichen Mäusen, die bis zum Alter von 13 Monaten überlebten, untersucht. Insgesamt wurden 53 Eizellen von CHOW-gefütterten Tieren entnommen, verglichen mit 23 bzw. 25 für die SOY- und DHA-Diätgruppen. Bei der Bewertung des Reifungsstatus der Eizellen wurde festgestellt, dass ein größerer Prozentsatz der Eizellen, die von Tieren mit DHA-Diät entnommen wurden (44%), voll ausgereift waren (MII-Stadium) und den befruchtungskompetenten Eizellenpool darstellten, im Vergleich zu Eizellen von Tieren mit CHOW- (13%) und SOY-Diät (35%) ($P = 0,01$). Zudem waren nur 12% der Eizellen von Tieren mit DHA-Diät atretisch, verglichen mit 39% bzw. 35% der Eizellen von Tieren mit SOY- und CHOW-Diät ($P = 0,09$). Ebenso zeigte die Follikelzählung in den Eierstöcken, dass die Anzahl der primordialen und der gesamten nicht atretischen Follikel in den Eierstöcken von Tieren mit SOY-Diät im Vergleich zu Tieren mit DHA-Diät signifikant niedriger war.

Die Qualität der voll ausgereiften Eizellen (MII-Stadium), die von Tieren in jeder der drei Diätgruppen entnommen wurden, wurde bewertet. Vollreife Eizellen wurden für diese Analyse ausgewählt, weil in diesem Reifestadium altersbedingte Defekte in den Eizellen deutlich erkennbar sind und weil diese Eizellen den befruchtungskompetenten Eizellenpool darstellen. Die Qualität der Eizellen wurde durch Beurteilung des mitochondrialen Färbemusters und der Spindelintegrität bewertet, wobei die einzelnen Eizellen nach dem Zufallsprinzip jedem dieser Endpunkte zugeordnet wurden. Die mitochondriale Aggregation wurde mit der Abnahme der Oozytequalität mit fortgeschrittenem mütterlichen Alter in Verbindung gebracht, und eine gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung der Mitochondrien ohne Aggregation ist ein Hinweis auf eine Eizelle guter Qualität (Tarin et al., 2001). Die konfokale Analyse der Mitochondrien ergab, dass die Mitochondrien zwar ein gleichmäßiges zytoplasmatisches Verteilungsmuster in 6/6 (100%) MII-Oozyten von Tieren mit DHA-Diät aufwiesen, dass jedoch in den Oozyten von Tieren der anderen Diätgruppen eine ausgedehnte mitochondriale Aggregation auftrat, wobei 1/3 (33%) MII-Oozyten von Tieren mit SOY-Diät und 0/4 (0%) MII-Oozyten von Tieren mit CHOW-Diät als normal eingestuft wurden ($P = 0,006$). In ähnlicher Weise ergab die konfokale Analyse der α -Tubulin- und DNA-Verteilung, dass die meiotischen Spindeln in 4/5 (80%) MII-Oozyten von DHA-Tieren in Form und Größe regelmäßig waren und eine ausgeprägte Mikrotubuli-Morphologie aufwiesen. Im Gegensatz dazu wiesen 0/5 (0%) und 2/3 (66%) MII-Oozyten von SOY- bzw. CHOW-gefütterten Tieren normale meiotische Spindeln auf ($P = 0,03$).

Bewertung der Sicherheit

Die an Omega-3-Fettsäuren reiche Ernährung, die in dieser Studie mit den positiven Auswirkungen auf die Fortpflanzung assoziiert wurde, lieferte 2% der Gesamtkalorien in Form der Omega-3-Fettsäure DHA. Wichtig ist, dass diese Nahrung keine der traditionellen essentiellen Fettsäuren, ALA und LA (Burr & Burr, 1973), enthält, sondern eher nachgeschaltete Moleküle in den Omega-3- und Omega-6-Fettsäurewegen (DHA und AA). Daher wollten wir feststellen, ob Tiere, die unsere omega-3-reiche Nahrung erhielten, biochemische oder klinische Anzeichen eines Mangels an essentiellen Fettsäuren entwickelten. Klinisch führt ein Mangel an essentiellen Fettsäuren zu einer Beeinträchtigung von Wachstum, Reproduktion und Laktation (Burr & Burr, 1973). Da wir bereits die Fähigkeit von Tieren mit Omega-3-reichem Futter bestätigt haben, sich über mehrere Generationen hinweg erfolgreich fortzupflanzen und zu laktieren, haben wir uns nun auf Wachstumsmuster als zusätzlichen klinischen Indikator für einen Mangel an essentiellen Fettsäuren und auf Serumfettsäureprofile konzentriert, um den biochemischen Mangel an essentiellen Fettsäuren zu bewerten. Schließlich wurde eine histologische Bewertung aller wichtigen Organsysteme durchgeführt.

Fettsäure-Profil

Weder in den SOY- (F1- oder F2-Generation) noch in den DHA- (F1-, F2- oder F5-Generation) Futtergruppen gab es Hinweise auf einen biochemischen Mangel an essentiellen Fettsäuren. Im Gegensatz dazu wiesen alle Tiere in der HCO-Fütterung einen Nachweis eines biochemischen Mangels an essentiellen Fettsäuren auf, wobei das T/T-Verhältnis im Serum konstant erhöht war. Diese Befunde können durch die Met-Säure (20:3n-9; Omega-9-Fettsäure) bestätigt werden, da bei einem Mangel an

essentiellen Fettsäuren eine relative Überproduktion von Met-Säure vorliegt. Der Anteil der Met-Säure am Gesamtfettsäuregehalt in der HCO-Gruppe F1 betrug $9,37 \pm 1,00\%$, verglichen mit nur $0,12 \pm 0,04\%$ in der SOY-Gruppe F1 und $0,02 \pm 0,04\%$ in der DHA-Gruppe F1.

Bewertung der Sicherheit der Omega-3-reichen Ernährung mit Fettsäureprofilen und Wachstum. (A-D) Serumfettsäureprofile über mehrere Generationen (N = 4, 5, 5, 5, 5, 4, 15 für die Gruppen F1 HCO, F1 SOY, F2 SOY, F1 DHA, F2 DHA und F5 DHA). (A) ...

Die diätetischen Behandlungen veränderten die Fettsäureprofile des Serums signifikant, was zu einem niedrigeren Omega-6/omega-3-Fettsäureverhältnis in der DHA-Gruppe im Vergleich zu den SOY- und HCO-Gruppen führte. Interessanterweise war das Omega-6/omega-3-Fettsäureverhältnis im Serum in der SOY-Gruppe ($3,98 \pm 0,48$ für F1 und $3,62 \pm 0,12$ für F2) dem Verhältnis sehr ähnlich, das für Menschen berichtet wurde, die eine typische westliche Ernährung ($4,72 \pm 0,19$) zu sich nahmen (Ambring et al., 2006), was darauf hinweist, dass diese experimentelle Ernährung die Omega-6- und Omega-3-Fettsäureverteilung im Serum, wie sie in westlichen Gesellschaften zu beobachten ist, wirksam imitiert.

Wachstum

Das Gewicht der Tiere wurde für Tiere der F1-Generation bei jeder der experimentellen Fütterungen (HCO, SOY und DHA) überwacht und mit dem Gewicht altersgleicher Tiere bei einem Standard-Labornagerfutter verglichen, um einen Referenzpunkt zu erhalten. Es gab keine Unterschiede in den Wachstumsmustern der SOY- und DHA-Tiere von der Entwöhnung bis zum Erwachsenenalter im Vergleich zu den mit Nagerfutter gefütterten Tieren des Standardlaboratoriums. Tiere mit HCO-Diät hatten eine Wachstumsverzögerung, die sich in durchweg niedrigeren Wochengewichten als die Tiere mit den anderen Diäten zeigte, ein Unterschied, der bei den männlichen Tieren stärker ausgeprägt war als bei den weiblichen. Aufeinanderfolgende Generationen von Tieren mit dem DHA-Futter wurden beobachtet, um normale Wachstumsmuster in späteren Tiergenerationen sicherzustellen, und unter diesen wurden keine Unterschiede im Wachstum der Tiere der Generationen F2 und F5 im Vergleich zur Generation F1 festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass selbst der lebenslange Verzehr dieser an Omega-3-Fettsäuren reichen Nahrung über mehrere Generationen hinweg nicht mit einer nachteiligen Auswirkung des Wachstums verbunden ist.

Histologie (Gewebelehre)

Hämotoxylin- und Eosin-gefärbte Objektträger aus Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz und Oberschenkelknochen von insgesamt 15 erwachsenen Tieren der F5-Generation wurden von einem Nagetierpathologen untersucht. Diese wurden mit Hämotoxylin- und Eosin-gefärbten Objektträgern der gleichen Organe von 5 altersentsprechenden Tieren auf einem Standard-Nagetierfutter verglichen. Bei der Untersuchung der Gehirn-, Herz-, Leber-, Nieren- und Femurproben wurden keine Anomalien festgestellt. Drei der 15 Lungenproben von Tieren mit DHA-Diät wiesen leichte emphysematöse Veränderungen auf, die möglicherweise auf ein Trauma während der Ernte und Konservierung zurückzuführen waren. Zusätzlich wiesen vier Tiere mit DHA-Diät eine milde extramedulläre Hämatopoese in der Milz auf, ein unspezifischer Befund bei der Labormaus.

Diskussion

Die Menschen erfreuen sich einer zunehmenden altersbedingten Langlebigkeit als Folge der unglaublichen Fortschritte, die im letzten Jahrhundert in der Medizin und im öffentlichen Gesundheitswesen erzielt wurden. Leider hat die weibliche Fortpflanzungsachse nicht so viel Glück gehabt. Ohne praktikable Strategien zur Verzögerung des altersbedingten Rückgangs der Fruchtbarkeit altert die weibliche Fortpflanzungsachse im Vergleich zu anderen Organsystemen weiterhin sehr schnell, was dazu führt, dass die normale Funktion der Eierstöcke relativ früh im Leben eingestellt wird (Richardson et al., 1987; Faddy et al., 1992).

Zudem werden Schwangerschaften, die bei älteren Frauen erfolgreich verlaufen, von einer viel höheren Inzidenz von Chromosomenanomalien geplagt. Eine der bekanntesten Folgen einer

Schwangerschaft im fortgeschrittenen mütterlichen Alter ist der dramatische Anstieg der Inzidenz der Trisomie 21, von der 30% aller klinischen Schwangerschaften bei Frauen in den Vierzigern betroffen sind, verglichen mit nur 2% der klinischen Schwangerschaften bei Frauen in den Zwanzigern (Hassold & Chiu, 1985; Hassold & Hunt, 2009). Daher müssen Strategien, die auf die Verlängerung der reproduktiven Lebensspanne von Frauen ausgerichtet sind, die Verschlechterung der Eizellqualität berücksichtigen, die bekanntermaßen mit zunehmendem Alter auftritt, ein Faktor, der anerkanntermaßen die wichtigste Determinante für den Erfolg von Schwangerschaften bei Frauen im fortgeschrittenen reproduktiven Alter ist (Navot et al., 1991a,b).

Hier liefern wir den Nachweis, dass Omega-3-Fettsäuren in der Nahrung nicht nur die reproduktive Lebensspanne verlängern, sondern in einem Mausmodell auch zu einer bemerkenswerten Verbesserung der Eizellqualität führen. Diese Befunde haben tiefgreifende potenzielle Auswirkungen sowohl auf die erfolgreiche natürliche als auch auf die assistierte Reproduktion im fortgeschrittenen mütterlichen Alter.

Ausgehend von der Erkenntnis, dass die Veränderung der menschlichen Ernährungsgewohnheiten in den letzten 100 Jahren hin zu einem sehr hohen Verhältnis von Omega-6- zu Omega-3-Fettsäuren mit einem gleichzeitigen Abwärtstrend der Fruchtbarkeitsraten von Frauen über 35 Jahren in den westlichen Gesellschaften einhergeht (Baird et al., 2005), haben wir versucht, den Einfluss einer Ernährung, die reich an Omega-3-Fettsäuren ist, auf den Reproduktionserfolg im fortgeschrittenen mütterlichen Alter zu bestimmen. Auf der Grundlage der Ergebnisse der aktuellen Studie haben wir nun Beweise dafür, dass Mäuse mit einer Omega-3-Fettsäuren-reichen Ernährung in der Lage sind, sich erfolgreich weit über die normale erwartete reproduktive Lebensspanne dieser Tiere hinaus zu vermehren. Obwohl der durchschnittliche Wurf bei Müttern im fortgeschrittenen mütterlichen Alter (> 10 Monate) mit omega-3-reicher Nahrung im Vergleich zu jüngeren Tierkohorten ($6,0 \pm 2,7$ Nachkommen/Wurf) mit derselben Nahrung etwas kleiner war ($4,4 \pm 1,9$ Nachkommen/Wurf), war die Überlebensrate der Nachkommen, die bei Müttern im fortgeschrittenen mütterlichen Alter geboren wurden, mit 89% bemerkenswert hoch. Im krassen Gegensatz dazu hatten gealterte Tiere (> 10 Monate), die mit einem Standard-Labor-Nagerfutter oder einer Omega-6-Fettsäuren-reichen Nahrung (die so konzipiert war, dass sie die typische westliche Ernährung imitierte) gehalten wurden, einen extrem schlechten Reproduktionserfolg. Dies sind auffällige Befunde, die darauf hindeuten, dass, wenn dies auf den Menschen zutrifft, der Anstieg der Omega-6-Fettsäuren in der menschlichen Ernährung in den letzten 100 Jahren tatsächlich dem Reproduktionserfolg von Frauen im fortgeschrittenen mütterlichen Alter abträglich sein könnte.

Doch selbst angesichts des in jüngster Zeit zunehmenden Verbrauchs von Fischölergänzungsmitteln in den westlichen Gesellschaften ist der lebenslange Verzehr einer Ernährung mit einem sehr hohen Verhältnis von Omega-3- zu Omega-6-Fettsäuren keine praktikable Strategie zur Verlängerung der natürlichen reproduktiven Lebensspanne. Eine klinisch relevantere Strategie würde Ernährungsumstellungen einschließen, die Frauen, die das Kinderkriegen hinauszögern wollen, zum Zeitpunkt oder unmittelbar vor dem vermuteten Zeitpunkt des natürlichen Rückgangs der reproduktiven Fruchtbarkeit einleiten könnten. Unsere Daten in einem Mausmodell deuten darauf hin, dass die Einführung einer Ernährung, die reich an Omega-3-Fettsäuren ist, zum Zeitpunkt des erwarteten raschen Rückgangs der natürlichen Fruchtbarkeit zu einer bemerkenswerten Verbesserung der Eizellqualität führt, gemessen an der mitochondrialen Dynamik und der Struktur des Spindelapparates. Diese Ergebnisse sind besonders wichtig, da die Eizellqualität als wichtigster Einzelfaktor für die Bestimmung des Schwangerschaftserfolgs bei Frauen im fortgeschrittenen reproduktiven Alter anerkannt ist (Navot et al., 1991a,b).

Mit fortgeschrittenem Alter wird der meiotische Zellzyklus der Eizelle anfällig für Fehler der chromosomalen Segregation, was zu einem viel höheren Anteil an Aneuploidie in Eizellen führt, die von älteren Frauen ovuliert werden (Hunt, 1998; Hassold & Hunt, 2009). Strategien zur Verbesserung der Qualität von Eizellen in alten Tiermodellen sind begrenzt. Es hat sich gezeigt, dass eine chronische antioxidative Behandlung den negativen Auswirkungen des Alterns der Frau auf die Qualität der Eizellen

entgegenwirkt (Tarin et al., 2002a); es konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, dass diese Behandlung den Reproduktionserfolg verbessert, und die klinische Anwendung ist aufgrund sehr signifikanter negativer Auswirkungen auf die Funktion von Eierstock und Gebärmutter nicht durchführbar (Tarin et al., 2002b).

Es hat sich gezeigt, dass eine beginnende Kalorienrestriktion bei Erwachsenen die Funktion der weiblichen Reproduktionsachse bei Mäusen bis ins hohe chronologische Alter aufrechterhält, wobei die Hälfte der kalorienrestriktiven Tiere sechs Monate lang fruchtbar bleibt, nachdem die Kontrolltiere einen Fruchtbarkeitsverlust erlitten haben, mit einer 73%igen Überlebensrate für Welpen, die von diesen Müttern im hohen mütterlichen Alter geboren wurden (Selesniemi et al., 2008). Diese Strategie der Kalorienrestriktion verbessert nachweislich auch die Qualität der Eizellen (Selesniemi et al., 2011), obwohl die klinische Anwendung aufgrund der zu erwartenden schädlichen Gesundheitseffekte im Zusammenhang mit der sehr strengen Kalorienrestriktion, die zum Erreichen dieser positiven Effekte erforderlich ist, begrenzt bleibt. Unsere Daten deuten darauf hin, dass Omega-3-Fettsäuren in der Nahrung vor der altersbedingten Verschlechterung der Eizellqualität schützen können und somit Frauen im fortgeschrittenen Fortpflanzungsalter eine Möglichkeit bieten, erfolgreich lebensfähige Nachkommen zu zeugen und zur Welt zu bringen. Darüber hinaus kann das Potenzial zur Verbesserung der Eizellqualität und damit zur Senkung der Aneuploidie-Rate bei Frauen im fortgeschrittenen Fortpflanzungsalter tiefgreifende Auswirkungen auf chromosomale Störungen wie das Down-Syndrom haben.

Sicherlich muss anerkannt werden, dass die an Omega-3-Fettsäuren reiche Ernährung, die in dieser Studie mit den vorteilhaften Reproduktionseffekten in Verbindung gebracht wurde, 2% der Gesamtkalorien in Form der Omega-3-Fettsäure DHA lieferte. Dies ist zwar nicht mit einer einzigen täglichen Fischöl-Nahrungsergänzung zu erreichen, stellt jedoch ein Supplementierungsniveau dar, das klinisch erreicht werden kann. Frühere Studien deuten darauf hin, dass selbst sehr hohe Dosen der Omega-3-Fettsäuren DHA und Eicosapentaensäure (EPA; 20:5n-3) gut verträglich sind und sowohl pädiatrischen als auch erwachsenen Patienten sicher verabreicht werden können (Lloyd-Still et al., 2006; Sorgi et al., 2007; Gura et al., 2008). Unsere Daten konzentrieren sich auf DHA als die interessierende Omega-3-Fettsäure, und obwohl unklar bleibt, ob andere Omega-3-Fettsäuren eine ähnliche Wirkung haben würden, liefern wir starke Hinweise darauf, dass DHA sicherlich einen positiven Einfluss auf die Fortpflanzungsfunktion der weiblichen Maus hat. Darüber hinaus ist allgemein anerkannt, dass die positiven Auswirkungen von Omega-3-Fettsäuren in der Nahrung sowohl durch das Verhältnis von Omega-3- zu Omega-6-Fettsäuren in der Nahrung als auch durch die absoluten Dosen dieser Fettsäuren bestimmt werden (Simopoulos, 2002). Daher würde die parallele klinische Anwendung unserer Arbeit zusätzlich zur Begrenzung des Omega-6-Fettsäuregehalts in der Nahrung pharmakologische Dosen von Omega-3-Fettsäuren erfordern.

Zusätzlich zu den positiven Auswirkungen von Omega-3-Fettsäuren auf die Reproduktionsfunktion der Maus liefern wir Hinweise darauf, dass DHA und AA allein eine ausreichende Fettquelle für die Aufrechterhaltung des Lebens und die Vorbeugung eines Mangels an essentiellen Fettsäuren sein können. Vor etwa 80 Jahren wurden ALA und LA von Burr und Burr als die essentiellen Fettsäuren bestimmt, die für eine gesunde Haut und erfolgreiches Wachstum, Reproduktion und Laktation notwendig sind (Burr & Burr, 1973). DHA und AA sind nachgeschaltete Moleküle in den Omega-3- bzw. Omega-6-Fettsäurewegen, die als kritische Metaboliten mit wichtigen Rollen in zahlreichen physiologischen und biochemischen Prozessen identifiziert wurden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine Nahrung, die ein Verhältnis von 20:1 von DHA/AA enthält, für die langfristige Aufnahme sicher ist, ohne nennenswerte nachteilige Auswirkungen auf die Gesundheit in einem Mausmodell. Tiere, die über sechs Generationen mit dieser Nahrung gefüttert wurden, wiesen durchweg sehr niedrige T/T-Verhältnisse und Metsäurespiegel auf, was auf das Fehlen eines biochemischen Mangels an essentiellen Fettsäuren schließen lässt. Noch wichtiger war, dass diese Tiere keinen Nachweis eines klinischen Mangels an essentiellen Fettsäuren mit Aufrechterhaltung der Hautgesundheit und normalem Wachstum, normaler Reproduktion und Laktation aufwiesen.

Die genauen Mechanismen, über die die Omega-3-Fettsäure DHA einen positiven Einfluss auf die

weibliche Fortpflanzungsachse hat, müssen noch vollständig aufgeklärt werden. Die vorliegende Studie stellt einen ersten Schritt auf diesem Weg dar, indem sie klar aufzeigt, dass die Aufnahme einer an Omega-3-Fettsäuren reichen Ernährung den Reproduktionserfolg im fortgeschrittenen mütterlichen Alter tatsächlich verbessert. Wir liefern auch Belege dafür, dass die Qualität der Eizellen bei Tieren, die eine Omega-3-reiche Nahrung zu sich nehmen, verbessert wird; die spezifischen molekularen Mechanismen, über die diese Verbesserung vermittelt wird, müssen jedoch noch bestimmt werden. Künftige Studien sollten nicht nur durchgeführt werden, um den Einfluss der Omega-3-Fettsäuren in der Nahrung auf die Eizellqualität besser zu verstehen, sondern auch um die potenziellen Auswirkungen auf die Gebärmutter/ das Endometrium besser zu verstehen, die sich auch positiv auf die Reproduktionsfunktion auswirken können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Studie einen auffallend positiven Effekt einer an Omega-3-Fettsäuren reichen Ernährung auf den Reproduktionserfolg und die Qualität der Eizellen in einem Alter, das normalerweise mit schlechten Reproduktionsparametern in Verbindung gebracht wird, aufgedeckt hat. Eine Ernährung, die reich an Omega-3-Fettsäuren ist und 2,1% der Gesamtkalorien im Verhältnis 20:1 von DHA/AA enthält, erwies sich als sicher für den Verzehr über mehrere Generationen hinweg und mit einer bemerkenswerten Verbesserung der natürlichen Fruchtbarkeit im fortgeschrittenen Alter. Am klinisch relevantesten sind die Befunde, die darauf hindeuten, dass die akute diätetische Behandlung von Tieren während der Zeit des natürlich auftretenden steilen Rückgangs des Reproduktionspotenzials zu einer verbesserten Eizellqualität führt, gemessen an der Struktur des Spindelapparates und der mitochondrialen Dynamik. Wenn diese Daten von Mäusen auf den Menschen übertragbar sind, kann die Aufnahme einer Nahrung, die reich an Omega-3-Fettsäuren und begrenzt an Omega-6-Fettsäuren ist, die natürliche Abnahme der Eizellqualität, die mit dem Alter auftritt, verzögern und damit möglicherweise eine weiterhin erfolgreiche Reproduktion und verringerte Aneuploidieraten ermöglichen.

Experimentelle Verfahren

Alle Tierhaltungs- und Versuchsverfahren wurden vom Ausschuss für institutionelle Tierpflege und -nutzung des Kinderkrankenhauses Boston überprüft und genehmigt. Alle Tiere wurden auf Papierchip-Einstreu in einem Barriereraum mit geregelter Temperatur ($21\text{ °C} \pm 1,6\text{ °C}$), Luftfeuchtigkeit ($45\% \pm 10\%$) und einem abwechselnden 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus mit ad libitum Zugang zu Wasser und Studienfutter untergebracht.

Langzeit-Ernährungsstudien (Reproduktion und Fruchtbarkeit)

Animal Virgin C57BL/6 erwachsene weibliche Mäuse und erwachsene männliche C57BL/6 Mäuse wurden von den Jackson Laboratories (#000664; Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) gewonnen. Die männliche Fruchtbarkeit wurde vor den Zuchtversuchen bestätigt, und es wurden keine Männchen, die älter als 6 Monate waren, für Zuchtversuche verwendet.

Fütterungsplan

Ausgewachsene weibliche Tiere wurden randomisiert einer von drei verschiedenen Futtergruppen zugeteilt, die jeweils 10% der Gesamtkalorien in Form von Fett enthielten, das als Sojaöl (SOY; #110990, Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA), hydriertes Kokosnussöl (HCO; #102328, Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA) oder in einem Verhältnis von 20:1 aus DHA/AA (DHA; #102536, Dyets Inc.) bereitgestellt wurde. Die detaillierte Zusammensetzung der einzelnen Diäten ist in Tabelle 1 dargestellt.

Die ursprünglichen Tiere wurden als F0-Generation bezeichnet, und diese Tiere blieben vor Beginn der Zuchtversuche vier Wochen lang auf ihren jeweiligen Futtermitteln. Die nachfolgenden Tiergenerationen erhielten ihr ganzes Leben lang dieselbe Nahrung wie ihre Mutter. Die Männchen wurden zwischen den Käfigen gewechselt, so dass kein Männchen länger als 1 Woche eine bestimmte Nahrung zu sich nahm.

Züchtungsversuche

Nach einer 4-wöchigen Diätbehandlung wurden Zuchtversuche mit F0-Tieren in jeder der Diätgruppen begonnen. Die Nachkommen wurden als F1-Generation bezeichnet. Nach Erreichen der Fortpflanzungsreife wurden die F1-Tiere gezüchtet, um eine F2-Generation zu erzeugen, und die anschließenden Zuchtversuche wurden bis zur F3-Generation für die SOY-Tiere und zur F6-Generation für die DHA-Tiere fortgesetzt. Tiere, die die HCO-Diät erhielten, waren nicht in der Lage, erfolgreich über die F1-Generation hinaus zu züchten. Die Gesamtzahl der pro Wurf abgegebenen Nachkommen und die Zahl der abgegebenen Nachkommen, die lebensfähig waren (bis zur Entwöhnung überlebten), wurden für jede Trächtigkeit getrennt aufgezeichnet. Die Nachkommen, die nicht überlebten, wurden entweder bei der Geburt tot aufgefunden oder starben sehr kurz danach. Alle lebensfähigen Nachkommen durften bis zur Entwöhnung (21. Tag nach der Geburt) bei der Mutter bleiben; zu diesem Zeitpunkt wurden die Nachkommen aus den Käfigen entfernt, um spätere Paarungsversuche mit der Mutter zu ermöglichen. Alle männlichen Nachkommen wurden eingeschläfert, und eine Untergruppe von zufällig ausgewählten Weibchen aus jeder Generation wurde für die weitere Zucht behalten.

Zuchtversuche im fortgeschrittenen Fortpflanzungsalter der Mäuse, definiert als Alter > 10 Monate, wurden mit einer Untergruppe von weiblichen F2- und F3-Tieren in den Nahrungsgruppen SOY (N = 10) und DHA (N = 7) fortgesetzt. Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurden gleichzeitig mit Zuchtversuchen an altersgleichen weiblichen Tieren mit einem Nagerfutter aus dem Standardlabor (CHOW; National Institute on Aging, Bethesda, MD, USA) begonnen. Die Zuchtversuche wurden genau wie oben beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, dass lebensfähige Nachkommen bis zum 14. Tag nach der Geburt bei der Mutter verbleiben durften, woraufhin die Nachkommen eingeschläfert und die anschließenden Paarungsversuche mit der Mutter fortgesetzt wurden. Die Zuchtversuche wurden auf diese Weise fortgesetzt, bis die Mutter 15 Monate alt war.

Studien zur akuten diätetischen Behandlung (Qualität der Eizellen)

Tiere

Jungfräuliche weibliche C57BL/6-Mäuse wurden vom National Institute on Aging (NIA, Bethesda, MD, USA) im Alter von 10 Monaten gewonnen. Diese Tiere wurden von der Geburt bis zum Zeitpunkt des Kaufs mit NIH-31-Standardlabor-Nagetierfutter gefüttert.

Fütterungsplan

Weibliche Tiere wurden nach dem Zufallsprinzip einer von drei verschiedenen Futtergruppen zugeordnet (N = 12/Gruppe): CHOW, SOY und DHA. Die verzehrte Futtermenge und das Wachstum jedes Tieres wurden wöchentlich überwacht. Alle Tiere erhielten die Versuchsnahrung bis zur Euthanasie im Alter von 13 Monaten, was einer 12-wöchigen diätetischen Behandlung entspricht.

Fettsäure-Profile

Serumfettsäureprofile wurden an fünf repräsentativen Serumproben von Tieren in jeder der Nahrungsgruppen durchgeführt. Die Gesamtfettsäuren wurden nach der modifizierten Folch-Methode extrahiert (Folch et al., 1957). Die Fettsäureanalyse wurde mit einem Hewlett-Packard 6890N-Gaschromatographen (GMI Inc., Ramsey, MN, USA) durchgeführt, der an ein HP-5975B-Massenspektrometer mit Supelcowax SP-10-Kapillarsäule gekoppelt war (GMI Inc.). Die Fettsäurekonzentrationen (nmol mL⁻¹-Serum) wurden durch proportionalen Vergleich der Peakflächen mit der Fläche des internen 17:0-Standards berechnet.

Eizellenentnahme

Mäuse (N = 12 CHOW, N = 11 SOY, N = 12 DHA) wurden mit einer intraperitonealen Injektion von trächtigen Stutenserumgonadotropin (PMSG, 10IU; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), gefolgt von humanem Choriongonadotropin (hCG, 10IU; Sigma-Aldrich) 48 h später superovuliert. Die Eizellen wurden 15-16 h nach der hCG-Injektion durch Punktion der Eileiter mit einer Insulinspritze aus den Eileitern entnommen. Die entnommenen Eizellen wurden durch eine kurze Inkubation mit 80 IE mL⁻¹

Hyaluronidase (Sigma-Aldrich) von Cumuluszellen befreit, gefolgt von drei Waschungen mit menschlicher Tubenflüssigkeit (HTF) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA), ergänzt mit 0,4% BSA (Fraktion V, fettsäurefrei; Sigma-Aldrich). Die Eizellen wurden gezählt und unter Verwendung eines Hoffman-Lichtmikroskops als reife Metaphase II (MII; Vorhandensein des ersten Polkörpers im perivitellinen Raum), als Reifungsstillstand (Zerfall der Keimblase ohne Polkörperextrusion oder intakte Keimblase) oder als tot (kondensiertes, fragmentiertes Zytoplasma) klassifiziert. Die Eizellen aus den drei Diätgruppen wurden parallel analysiert.

Mitochondriale Analyse

Eine Untergruppe reifer (MII) Eizellen aus jeder Diätgruppe wurde von adhärennten somatischen Zellen (Cumulus) befreit und in HTF-Medium, das mit 0,4% BSA und 200 nM MitoTracker Red CMRox (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) supplementiert war, für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Eizellen wurden gewaschen und in angesäuerter Tyrode-Lösung (Irvine Scientific) inkubiert, gewaschen, fixiert und erneut gewaschen, gefolgt von einer Inkubation in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS; Sigma-Aldrich) mit 0,5% BSA, 0,05% Tween-20 (Sigma-Aldrich), und 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) für 1 h. Anschließend wurden die Eizellen mit Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) montiert und von zwei unabhängigen geschulten Beobachtern konfokal mikroskopisch analysiert. Eizellen mit einer gleichmäßigen zytoplasmatischen Verteilung der aktiven Mitochondrien wurden als normal bewertet.

Analyse von DNA und Spindelapparaten

Eine Untergruppe reifer (MII) Eizellen aus jeder Diätgruppe wurde in PBS mit 0,5% BSA gewaschen und kurz in angesäuerter Tyrode-Lösung inkubiert, um die Zona pellucida aufzuweichen und zu entfernen. Die Eizellen wurden dann gewaschen und in 2,0% neutralgepuffertem Paraformaldehyd mit 0,5% BSA fixiert. Die Permeabilisierung und Blockierung erfolgte durch Inkubation der Oozyten in einer Maus-Blockierungslösung (Vector Laboratories), die mit 0,5% BSA, 0,1% Triton X, 0,05% Tween-20 und 5% normalem Ziegen Serum ergänzt wurde (Vector Laboratories). Die Eizellen wurden gewaschen und über Nacht in einer 1:200-Verdünnung von Maus-Anti- α -Tubulin-Antikörper (Sigma-Aldrich) in PBS mit 0,5% BSA inkubiert, gewaschen und mit einer 1:250-Verdünnung von Ziegen-Anti-Maus-IgG, konjugiert mit Alexa Fluor-488, inkubiert (Life Technologies). Nach dem Waschen wurden die Eizellen mit Vectashield, das Propidiumiodid enthält, montiert (Vector Laboratories) und konfokal mikroskopisch analysiert. Für die Spindelanalyse wurden Oozyten mit tonnenförmigen bipolaren Spindeln, die ausgeprägte und gut organisierte Mikrotubuli-Fasern sowie straff ausgerichtete Chromosomen auf der Metaphasenplatte aufweisen, wie üblich geritzt. Die Eizellen aus den drei Gruppen wurden parallel analysiert.

Ovarialfollikel zählt

Die Eierstöcke wurden fixiert, in Paraffin eingebettet, seriell geschnitten (8 μ m) und der Reihe nach auf Glas-Objektträgern ausgerichtet. Die Schnitte wurden dann mit Hämotoxylin und Pikriummethylblau angefärbt und in jedem zweiten Schnitt mit zufälligem Start, wie zuvor beschrieben, auf die Anzahl der nicht-atretischen primären, primären und kleinen präantralen Follikel analysiert (Morita et al., 1999). Nur diejenigen Follikel, die eine Eizelle mit einem deutlich sichtbaren Zellkern enthielten, wurden ausgewertet. Da bei diesem Verfahren die Hälfte des gesamten Ovarialvolumens beprobt wird, wurde die Gesamtzahl der Follikel pro Ovar geschätzt, indem die kumulativen Zählungen für jedes Ovar mit einem Korrekturfaktor von 2 multipliziert wurden. Alle Zählungen wurden von einem verblindeten Studienarzt durchgeführt.

Bewertung der Sicherheit

Fettsäure-Profile

Serumfettsäureprofile wurden an Serumproben von zufällig ausgewählten Tieren erstellt. Es wurden repräsentative Proben ausgewählt, um verschiedene Generationen von Tieren mit HCO-, SOY- und DHA-Futtermitteln zu repräsentieren. Das Serum wurde von den folgenden repräsentativen Tieren entnommen: F1 HCO (n = 4), F1 SOY (n = 5), F2 SOY (N = 5), F1 DHA (N = 5), F2 DHA (N = 4), F5

DHA (N = 15), und die Fettsäureextraktion und -analyse wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Wachstum

Das Wachstum der repräsentativen Würfe, die von Muttertieren geboren wurden, wurde bei jeder der Diäten im Langzeit-Diät-Arm der Studie mit Seriengewichten vom Absetzen bis zum Erwachsenenalter beobachtet. Es wurden repräsentative und nach dem Zufallsprinzip ausgewählte F1-Würfe in den SOY- und HCO-Gruppen und F1-, F2- und F5-Würfe in der DHA-Gruppe beobachtet. In ähnlicher Weise wurden auch die Gewichte von Würfen überwacht, die von Muttertieren auf einem Standard-Laborfutter (CHOW) geboren wurden, um einen zusätzlichen Bezugspunkt zu schaffen.

Histologische Analyse

Fünfzehn erwachsene Tiere der F5-Generation, die DHA-Futter erhielten, wurden zur histologischen Analyse der Organsysteme eingeschläfert. Von jedem dieser Tiere wurden Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz und Röhrenknochen (Oberschenkelknochen) entnommen, in 10% Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und mit Hämotoxylin und Eosin angefärbt. Die Vergleichsproben wurden von 5 altersgleichen C57BL/6-Mäusen auf einem Standard-Labornagerfutter gewonnen. Alle Objektträger wurden von einem Nagetierpathologen begutachtet und aufgrund des histologischen Erscheinungsbildes entweder als normal oder abnormal klassifiziert. Es wurden Details zu allen bemerkenswerten Anomalien aufgezeichnet.

Statistische Auswertung

Alle kontinuierlichen Variablen werden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Kontinuierliche Variablen wurden mit dem Student's t-Test oder, wenn die Daten nicht normalverteilt waren, mit dem Mann-Whitney U-Test analysiert. Kontinuierliche Variablen von mehr als drei unabhängigen Gruppen wurden mit der Kruskal-Wallis-Einweg-Varianzanalyse analysiert. Kategoriale Variablen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test analysiert. Die Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen 5%-Alpha-Niveau bewertet. Alle statistischen Analysen wurden mit der GRAPHPAD Prism-Software (Version 4.0; San Diego, CA, USA) durchgeführt.

Literatur

1. Ambring A, Johansson M, Axelsen M, Gan L, Strandvik B, Friberg P. Mediterranean-inspired diet lowers the ratio of serum phospholipid n-6 to n-3 fatty acids, the number of leukocytes and platelets, and vascular endothelial growth factor in healthy subjects. *Am J Clin Nutr.* 2006;83:575–581. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Baird DT, Collins J, Egozcue J, Evers LH, Gianaroli L, Leridon H, Sunde A, Templeton A, Van Steirteghem A, Cohen J, Crosignani PG, Devroey P, Diedrich K, Fauser BC, Fraser L, Glasier A, Liebaers I, Mautone G, Penney G, Tarlatzis B. Fertility and ageing. *Hum Reprod Update.* 2005;11:261–276. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod.* 1996;11:2217–2222. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Burr GO, Burr MM. Nutrition classics from *The Journal of Biological Chemistry* 82:345–67, 1929 A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *Nutr Rev.* 1973;31:248–249. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Eaton SB, Konner M. Paleolithic nutrition A consideration of its nature and current implications. *N Engl J Med.* 1985;312:283–289. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod.* 1992;7:1342–1346. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
7. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226:497–509. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

8. Gosden RG, Laing SC, Felicio LS, Nelson JF, Finch CE. Imminent oocyte exhaustion and reduced follicular recruitment mark the transition to acyclicity in aging C57BL/6J mice. *Biol Reprod.* 1983;28:255–260. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Gura KM, Lee S, Valim C, Zhou J, Kim S, Modi BP, Arsenault DA, Strijbosch RA, Lopes S, Duggan C, Puder M. Safety and efficacy of a fish-oil-based fat emulsion in the treatment of parenteral nutrition-associated liver disease. *Pediatrics.* 2008;121:e678–e686. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
10. Hansen JP. Older maternal age and pregnancy outcome: a review of the literature. *Obstet Gynecol Surv.* 1986;41:726–742. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
11. Hassold T, Chiu D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet.* 1985;70:11–17. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
12. Hassold T, Hunt P. Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew. *Curr Opin Pediatr.* 2009;21:703–708. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
13. Hunt PA. The control of mammalian female meiosis: factors that influence chromosome segregation. *J Assist Reprod Genet.* 1998;15:246–252. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
14. Hunt PA, Hassold TJ. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends Genet.* 2008;24:86–93. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
15. van Kooij RJ, Looman CW, Habbema JD, Dorland M, te Velde ER. Age-dependent decrease in embryo implantation rate after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1996;66:769–775. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
16. Le HD, Meisel JA, de Meijer VE, Fallon EM, Gura KM, Nose V, Bistrrian BR, Puder M. Docosahexaenoic acid and arachidonic acid prevent essential fatty acid deficiency and hepatic steatosis. *J Parenter Enteral Nutr.* 2012;36:431–441. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
17. Lloyd-Still JD, Powers CA, Hoffman DR, Boyd-Trull K, Lester LA, Benisek DC, Arterburn LM. Bioavailability and safety of a high dose of docosahexaenoic acid triacylglycerol of algal origin in cystic fibrosis patients: a randomized, controlled study. 2006;22:36–46. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
18. Martin JA, Hamilton BE, Sutton PD, Ventura SJ, Mathews TJ, Kirmeyer S, Osterman MJ. Births: final data for 2007. *Natl Vital Stat Rep.* 2010;58:1–85. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
19. Morita Y, Perez GI, Maravei DV, Tilly KI, Tilly JL. Targeted expression of Bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy-induced oocyte apoptosis in vitro. *Mol Endocrinol.* 1999;13:841–850. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
20. Navot D, Bergh PA, Williams M, Garrisi GJ, Guzman I, Sandler B, Fox J, Schreiner-Engel P, Hofmann GE, Grunfeld L. An insight into early reproductive processes through the in vivo model of ovum donation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991a;72:408–414. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
21. Navot D, Bergh PA, Williams MA, Garrisi GJ, Guzman I, Sandler B, Grunfeld L. Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. 1991b;337:1375–1377. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
22. Niikura Y, Niikura T, Wang N, Satirapod C, Tilly JL. Systemic signals in aged males exert potent rejuvenating effects on the ovarian follicle reserve in mammalian females. *Aging (Albany NY)* 2010;2:999–1003. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
23. Perez GI, Robles R, Knudson CM, Flaws JA, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-Nat Genet. 1999;21:200–203. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
24. Perez GI, Jurisicova A, Wise L, Lipina T, Kanisek M, Bechard A, Takai Y, Hunt P, Roder J, Grynepas M, Tilly JL. Absence of the proapoptotic Bax protein extends fertility and alleviates age-related health complications in female mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:5229–5234. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

25. Richardson SJ, Senikas V, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;65:1231–1237. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
26. Schwartz D, Mayaux MJ. Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands. *Federation CECOS N Engl J Med.* 1982;306:404–406. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
27. Selesniemi K, Lee HJ, Tilly JL. Moderate caloric restriction initiated in rodents during adulthood sustains function of the female reproductive axis into advanced chronological age. *Aging Cell.* 2008;7:622–629. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
28. Selesniemi K, Lee HJ, Niikura T, Tilly JL. Young adult donor bone marrow infusions into female mice postpone age-related reproductive failure and improve offspring survival. *Aging (Albany NY)* 2009;1:49–57. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
29. Selesniemi K, Lee HJ, Muhlhauser A, Tilly JL. Prevention of maternal aging-associated oocyte aneuploidy and meiotic spindle defects in mice by dietary and genetic strategies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108:12319–12324. [[PMC free article](#)][[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
30. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr.* 1991;54:438–463. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
31. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother.* 2002;56:365–379. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
32. Simopoulos AP. Importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids: evolutionary aspects. *World Rev Nutr Diet.* 2003;92:1–22. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
33. Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother.* 2006;60:502–507. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
34. Simopoulos AP. Evolutionary aspects of the dietary omega-6:omega-3 fatty acid ratio: medical implications. *World Rev Nutr Diet.* 2009;100:1–21. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
35. Simopoulos AP. Importance of the omega-6/omega-3 balance in health and disease: evolutionary aspects of diet. *World Rev Nutr Diet.* 2011;102:10–21. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
36. Sorgi PJ, Hallowell EM, Hutchins HL, Sears B. Effects of an open-label pilot study with high-dose EPA/DHA concentrates on plasma phospholipids and behavior in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Nutr J.* 2007;6:16. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
37. Soules MR, Bremner WJ. The menopause and climacteric: endocrinologic basis and associated symptomatology. *J Am Geriatr Soc.* 1982;30:547–561. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
38. Tarin JJ, Perez-Albala S, Cano A. Cellular and morphological traits of oocytes retrieved from aging mice after exogenous ovarian stimulation. *Biol Reprod.* 2001;65:141–150. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
39. Tarin JJ, Perez-Albala S, Cano A. Oral antioxidants counteract the negative effects of female aging on oocyte quantity and quality in the mouse. *Mol Reprod Dev.* 2002a;61:385–397. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
40. Tarin JJ, Perez-Albala S, Pertusa JF, Cano A. Oral administration of pharmacological doses of vitamins C and E reduces reproductive fitness and impairs the ovarian and uterine functions of female mice. 2002b;57:1539–1550. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
41. Tilly JL. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:838–848. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
42. Ventura SJ, Abma JC, Mosher WD, Henshaw S. Estimated pregnancy rates for the United States 1990–2000: an update. *Natl Vital Stat Rep.* 2004;52:1–9. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
43. Wu JM, Zelinski MB, Ingram DK, Ottinger MA. Ovarian aging and menopause: current theories, hypotheses, and research models. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005;230:818–828. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]