



اضافه کردن کوآنزیم Q10 به محیط بلوغ، از طریق بهبود عملکرد میتوکندریایی، شایستگی تکوینی تخمک گوسفند را ارتقا می دهد

حیدر نژاد، ع.؛ استاد حسینی، س.؛ روح الهی ورنوسفادرانی، ش.؛ جعفرپور، ف.؛ مقیمی خوراسگانی، ع.؛ تکتاز هفشجانی، ت.؛ نصر اصفهانی، م. ح.؛*

خلاصه

دست ورزی آزمایشگاهی گامت و جنین ها و همچنین سن بالای مادر می تواند تعادل بین ظرفیت آنتی اکسیدانی و رادیکال های آزاد را به نفع استرس اکسیداتیو جابجا کند. افزایش استرس اکسیداتیو می تواند باعث کاهش تولید انرژی و نقص در جدایی کروموزوم ها گردد و از این طریق تکوین رویان را به مخاطره بیندازد. اضافه کردن کوآنزیم Q10 (CoQ10) به محیط می تواند باعث ایجاد تعادل در تولید انرژی و کاهش استرس اکسیداتیو گردد. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر اضافه کردن CoQ10 به محیط بلوغ تخمک گوسفند بر تکوین رویان های حاصله بوده و همچنین آزمایش اثر این ماده بر سطوح گونه های فعال اکسیژن (ROS) و گلووتاتیون (GSH) داخل سلولی، فعالیت میتوکندریایی، تشکیل دوک تقسیم و بیان برخی ژن های مرتبط با آپوپتوز و فاکتورهای رشد مختص به تخمک در تخمک و سلول های کومولوس. در هر تکرار آزمایش، حداقل مقدار ۱۰۰ کمپلکس تخمک-کومولوس (COCs) برای هر گروه آزمایشی در معرض غلظت های ۰ تا ۵۰ میکرومولار CoQ10 بالغ شدند. برای هر آزمایش حداقل ۳ تکرار و حداکثر ۵ تکرار انجام پذیرفت. نتایج ما نشان داد که نرخ تکوین رویان ها تا مرحله بلاستوسیت و شکوفایی (Hatching) به طور معنی داری در غلظت ۳۰ میکرومولار CoQ10 افزایش می یابد. اضافه کردن ۳۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 به محیط بلوغ تخمک باعث بهبود پراکندگی میتوکندری ها و همچنین افزایش پتانسیل غشا آن ها در مقایسه با گروه کنترل شد. به علاوه، نتایج ما نشان داد که سطوح داخل سلولی ROS و GSH در گروه ۳۰ میکرومولار CoQ10 در مقایسه با گروه کنترل کاهش می یابد. علاوه بر این، درصد تخمک های دارای دوک تقسیم نامنظم، متعاقب درمان با CoQ10 کاهش یافت. در نهایت، میزان بیان نسبی ژن های *CASPASE3* و *BAX* در تخمک و سلول های کومولوس، متعاقب درمان با کوآنزیم Q10 به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت؛ درحالی که میزان بیان نسبی *GDF9* به طور معنی داری در سلول های کومولوس گروه درمان شده با CoQ10 افزایش یافت. در نتیجه اضافه کردن CoQ10 به محیط بلوغ باعث بهبود کیفیت COC ها و بهبود شایستگی تکوینی آن ها می شود.

کلمات کلیدی: کوآنزیم Q10، بلوغ آزمایشگاهی، استرس اکسیداتیو، شایستگی تکوینی، گوسفند

۱. گروه پژوهشی زیست فناوری تولید مثل، پژوهشکده زیست فناوری پژوهشگاه رویان، اصفهان، ایران.

۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

*نویسنده مسؤول: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org



مقدمه

(Guerin و همکاران، ۲۰۰۱). دست ورزی آزمایشگاهی^۵ گامت‌ها و رویان‌ها طی مراحل مختلف تکنیک‌های کمک باروری، حامل ریسک مواجهه آن‌ها با سطوح بالاتر از حد فیزیولوژیک گونه‌های فعال اکسیژن است. تحت شرایط فیزیولوژیک، آنتی اکسیدان‌ها و ROS در یک حالت متعادل قرار دارند. اگرچه، سن بالای مادر، عدم حضور فعالیت آنتی اکسیدانی مناسب و دست ورزی‌های آزمایشگاهی؛ اسپرم، تخمک و رویان را به طرف استرس اکسیداتیو هدایت می‌کند و نیاز به افزودن آنتی اکسیدان‌ها را در شرایط آزمایشگاهی ایجاد می‌کند (Agarwal و همکاران، ۲۰۰۶). کوآنزیم Q10 (CoQ10) یک انتقال دهنده الکترون حلال در چربی در غشا داخلی میتوکندری است که الکترون را از کمپلکس‌های I و II دریافت می‌کند و آن را به کمپلکس III می‌رساند. این ماده همچنین برای پایداری کمپلکس III ضروری است (Ocaña-Santos و همکاران، ۲۰۰۲) و برای تولید ATP و پایداری پتانسیل غشا میتوکندری، پروتون‌ها را به فضای بین دو غشا پمپاژ می‌کند (Mitchell، ۱۹۷۵). CoQ10 می‌تواند از آپوپتوز جلوگیری کند اما این توانایی وابسته به نوع سلول و مسیری است که از طریق آن آپوپتوز القا شده باشد (Kagan و همکاران، ۱۹۹۹). CoQ10 با توجه به توانا بودن در بهبود شرایط افزایش سن، جلوگیری از آپوپتوز، بهبود عملکرد میتوکندریایی و ارتقا تولید انرژی، گزینه مناسبی برای افزایش کیفیت تخمک و بهبود شایستگی تکوینی آن است. بنابراین هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر اضافه کردن کوآنزیم Q10 به محیط بلوغ تخمک گوسفند بر شایستگی تکوینی، کیفیت جنین‌های حاصله، عملکرد میتوکندریایی، سطوح ROS و GSH، تشکیل دوک تقسیم و بیان برخی ژن‌های مرتبط با آپوپتوز، فاکتورهای رشد مختص به تخمک و ژن *MITOFUSIN2* مرتبط با الحاق میتوکندری‌ها است.

مواد و روش کار

-مواد شیمیایی و محیط‌های کشت

به جز مواردی که به صورت جداگانه اعلام شده است، تمامی مواد شیمیایی و محیط‌های کشت به ترتیب از شرکت‌های (Sigma St)، (USA, MO, Louis, Gibco) و (USA, NY, Island Grand) خریداری شده‌اند.

-بیانیه اخلاقی

تمامی مراقبت‌های حیوانی توسط کمیته اخلاق پژوهشگاه رویان تایید شده است. تخمدان‌های گوسفند استفاده شده در این مطالعه از کشتارگاه محلی (فساران اصفهان) و با اجازه و هماهنگی مدیر کشتارگاه و شبکه‌ی دامپزشکی تهیه شده‌اند.

-تولید آزمایشگاهی رویان گوسفند

5 In vitro manipulation

تخمک که به عنوان یک «ماشین باز برنامه نویسی»^۱ عمل می‌کند، برای پردازش ژنوم جنس نر بهینه شده است و اجازه بازبرنامه نویسی اپی ژنتیکی، ضروری برای تکوین رویان، در هردو ژنوم پدری و مادری را می‌دهد. این توانایی همچنین به تخمک اجازه می‌دهد تا ژنوم یک سلول سوماتیک را نیز به این شکل باز برنامه نویسی کند. تغییر وضعیت^۲ کروماتین والدین پیش از یکی شدن پیش هسته‌ها^۳ اتفاق می‌افتد و به عنوان پیچیده‌ترین علمی شناخته می‌شود که یک تخمک باید برای تکوین مناسب آن را انجام دهد (Mclay و Clarke، ۲۰۰۳). این مهم تحت رهبری مادری و فاکتورهای باز برنامه نویسی تخمک اتفاق می‌افتد که طی پروسه بلوغ تخمک تولید می‌شوند و در این پدیده نقش محوری ایفا می‌کنند (Kikyo و Wolffe، ۲۰۰۰). بنابراین، شایستگی تکوینی به میزان زیادی وابسته به بلوغ تخمک است (Mermillod و همکاران، ۱۹۹۹) که این بلوغ تحت تاثیر تعداد زیادی فاکتورهای درونی و بیرونی شامل سن (Ge و همکاران، ۲۰۱۵)، پیش زمینه ژنتیکی (Sundarrajan و همکاران، ۱۹۹۹)، پروتوکل تحریک تخمک گذاری، عادت‌های غذایی (callaghan O و همکاران، ۲۰۰۰)، رفتارهای اجتماعی (Zenzes و همکاران، ۱۹۹۷) و فاکتورهای محیطی (Nandi و همکاران، ۲۰۱۰) است. بنابراین بلوغ تخمک تاثیر عمیقی بر شایستگی تکوینی دارد و ممکن است با استرس‌های متفاوتی روبرو شود که شمار زیادی از آن‌ها اثر خود را بواسطه‌ی تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) اعمال می‌کنند. تخمک‌ها و رویان‌ها منبع اصلی تولید ROS هستند، زیرا آن‌ها از اکسیژن برای تولید انرژی در مسیر فسفریلاسیون اکسیداتیو میتوکندریایی استفاده می‌کنند. عدم تعادل بین میزان تولید ROS و آنتی اکسیدان‌های درون زاد می‌تواند آغازگر حالت استرس اکسیداتیو باشد و بنابراین بازده تولید جنین‌ها را در آزمایشگاه کاهش می‌دهد (Mishra و همکاران، ۲۰۱۶). میتوکندری نه تنها نیروگاه تولید انرژی سلول است، بلکه مکان تولید گونه‌های فعال اکسیژن و مقابلا هدف اصلی آن‌ها است و نقش کلیدی در پدیده‌ی افزایش سن^۴ ایفا می‌کند. بنابراین برای ممانعت از روند افزایش سن، کاهش استرس اکسیداتیو و تقویت قوای آنتی اکسیدانی سلول ضروری است (Song و همکاران، ۲۰۱۶). استرس اکسیداتیوی که از جنین و یا محیط پیرامون آن نشأت می‌گیرد، باعث نقص در تکوین رویان می‌شود

- 1 Reprogramming machine
- 2 Remodeling
- 3 Syngamy
- 4 Aging process



تروفواکتودرم^{۱۵} (TE) به صورت جداگانه، رنگ آمیزی افتراقی بلاستوسیتها انجام شد. مطابق با آنچه که در مطالعه‌ی پیشین صورت گرفته (Shirazi و همکاران، ۲۰۰۹)، بلاستوسیت‌های روز ۷ جمع آوری شدند و در محلول PVA+PBS برای ۳ بار شست و شو شدند و نفوذپذیری غشا به مدت ۳۰ ثانیه در محیط HTCM حاوی BSA ۵ ml/mg و ۰/۵٪ X100-triton انجام شد. سپس بلاستوسیتها به مدت ۱۰ ثانیه در معرض مقدار ۳۰ ml/μg رنگ PI^{۱۶} قرار گرفتند. متعاقباً، بلاستوسیتها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C به محیط حاوی ۱۰ ml/mg رنگ Hoechst منتقل شدند. سپس بلاستوسیتها بر روی لام ثابت شدند و توسط میکروسکوپ فلئورسنت مورد مطالعه قرار گرفتند. ICM و TE به ترتیب بر اساس رنگ آبی و قرمز شناسایی می‌شوند. در نهایت، تعداد کلی سلول‌ها نیز ارزیابی شد.

- ارزیابی پراکندگی و توده‌ی نسبی میتوکندریایی

رنگ (Invitrogen) FM Green tracker Mito (USA, Oregon, Eugene, Probes Molecular) برای ارزیابی پراکندگی^{۱۷} و توده‌ی نسبی میتوکندریایی^{۱۸} تخمک مورد استفاده قرار گرفت (Santos-Marques و همکاران، ۲۰۰۳؛ Stojkovic و همکاران ۲۰۰۱). به طور خلاصه، تخمک‌ها از سلول‌های کومولوس عریان شدند^{۱۹} سپس به مدت ۳۰ دقیقه در محیط PBS حاوی غلظت ۲۰۰ nM رنگ Tracker Mito FM Green در دمای ۳۸/۵ درجه‌ی انکوباتور قرار گرفتند. سپس شست و شو شدند، در ریز قطره‌های PBS قرار گرفتند و تصاویر آن‌ها توسط میکروسکوپ معکوس فلئورسنت^{۲۰} مجهز به فیلتر ۵۲۰ نانومتر تهیه شد. به منظور ارزیابی توده میتوکندریایی، تصاویر بدست آمده توسط نرم افزار ImageJ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای تجزیه و تحلیل میزان پراکندگی میتوکندری‌ها در تخمک‌های بالغ، هر تصویر فلئورسنت توسط نرم افزار ImageJ به یک تصویر ۳ بعدی تبدیل شد. الگوهای مشاهده شده بر اساس مطالعه قبلی (Yang و همکاران، ۲۰۱۰) در ۳ دسته تقسیم بندی شدند: پراکندگی منتشر^{۲۱}، پراکندگی نیمه منتشر^{۲۲} و پراکندگی محدود.

- اندازه گیری پتانسیل غشا میتوکندری ۲۳ (MMP)

پتانسیل غشا میتوکندری توسط پراب مولکولی (Invitrogen) 1-JC

- 15 trophectoderm
- 16 Propidium Iodide
- 17 Mitochondrial distribution
- 18 Relative mitochondrial mass
- 19 Dissection or Denude
- 20 Inverted fluorescent microscope
- 21 Diffused distribution
- 22 Semi-diffused distribution
- 23 Mitochondrial membrane potential

کمپلکس‌های تخمک-کومولوس (COCs) توسط روشی که قبلاً شرح داده شده است (Pezhman و همکاران، ۲۰۱۷) از تخمدان‌ها اسپیره شدند. گروه‌های ۱۰ تایی COCها در قطره‌های ۵۰ میکرولیتری محیط TCM199 حاوی ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر IGF^۱، ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر EGF، ۰/۰۱ واحد بر میلی‌لیتر FSH، ۰/۰۱ واحد بر میلی‌لیتر LH، ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۱۷β-استرادیول و ۱۵٪ FBS^۲ در دمای ۳۸/۵°C و در شرایط ۵٪ CO₂ رطوبت حداکثری به مدت ۲۲ ساعت در محیط آزمایشگاه بالغ شدند. به علاوه، غلظت‌های مختلف CoQ10 (۰، ۱۵، ۳۰ و ۵۰ میکرومولار) به محیط بلوغ^۸ تخمک‌ها اضافه شد. COCهای بالغ تحت لقاح آزمایشگاهی^۹ با منی تازه گوسفند قرار گرفتند. منی تازه توسط واژن مصنوعی اخذ شد. اسپرم‌های پر تحرک توسط روش up Swim در محیط Capacitation و پس از ۴۵ دقیقه انکوباسیون جدا شدند. قسمت رویی محیط Capacitation برداشته شد و برای ۳ دقیقه در دور ۱۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. پلت اسپرم در ۱۰ میکرولیتر محیط (albumin s' Tyrode buffered HEPES) TALP (medium pyruvate lactate) قرار داده شد و به میزان ۱۰ ml/sperm × ۲۱۰۶ به قطره‌های ۵۰ میکرولیتری محیط لقاح^{۱۰} حاوی ۱۰ عدد COC تلقیح شد و تخمک‌ها برای ۱۸ ساعت در دمای ۳۸/۵°C، در شرایط ۵٪ CO₂ و رطوبت حداکثری انکوبه شدند. پس از ۱۸ ساعت، سلول‌های کومولوس از اطراف زایگوت‌های احتمالی حذف شدند و سپس آن‌ها برای انجام کشت آزمایشگاهی^{۱۱} به مدت ۷ روز در محیط (Bickland, Bioscience IVF) BO-IVC (Park Industrial TR11, Cornwall, Falmouth, Kingdom United, 4TA)، در دمای ۳۸/۵°C و در شرایط ۵٪ CO₂، ۵٪ O₂ و رطوبت حداکثری قرار گرفتند. تمامی قطره‌ها برای جلوگیری از تبخیر و کنترل PH تحت روغن معدنی^{۱۲} انکوبه شدند. در انتهای روز ۷، گروه‌ها از نظر نرخ بلاستوسیت و شکوفایی توسط استریومیکروسکوپ ارزیابی شدند. لازم به ذکر است که حداقل ۱۰۰ عدد COC در هر گروه قرار داده شد و برای هر آزمایش ۳ تا ۵ تکرار انجام شد.

- رنگ آمیزی افتراقی ۱۳

برای شناسایی توده سلول‌های درونی^{۱۴} (ICM) و سلول‌های

- 6 Fetal bovine serum
- 7 In vitro maturation
- 8 Maturation medium
- 9 In vitro fertilization
- 10 Fertilization medium
- 11 In vitro culture
- 12 Mineral oil
- 13 Differential staining
- 14 Inner cell mass



بتا توبولین ۲۶ قرار گرفتند و متعاقب آن با آنتی بادی ثانویه کونژوگه با FITC بزوی ضد IgG موش ۲۷ انکوبه شدند. پس از آن کروموزومها با استفاده از غلظت $10 \text{ ml}/\mu\text{g}$ رنگ Hoechst رنگ آمیزی شدند. پس از آن، تخمکها شست و شو داده شدند و روی لامهای شیشه‌ای ثابت شدند و تصاویر آنها با استفاده از میکروسکوپ فلئورسنت معکوس ثبت شد.

اندازه گیری میزان بیان ژن

بیان ژنهای مرتبط با آپوپتوز (*BCL2*, *BAX* and *CASPASE3*)، الحاق میتوکندری (*MFN2*) و فاکتورهای رشد مرتبط با تخمک (*GDF9* و *BMP15*) توسط آزمایش Real PCR time در تخمک و سلولهای کومولوس اندازه گیری شد. تعداد سلولهای کومولوس هر گروه شمارش شد و تا زمان استخراج RNA در 300 میکرولیتر محلول RLT lysis buffer حاوی 3 میکرولیتر بتامراکپتو اتانول در دمای -70 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. به علاوه تخمکها نیز در 30 میکرولیتر محلول RLT lysis buffer (هر گروه شامل حداقل 30 تخمک در هر تکرار آزمایش) تا زمان استخراج در دمای -70 درجه نگهداری شدند. RNA از تخمکها و سلولهای کومولوس به ترتیب توسط کیت RNeasy kit micro و kit mini RNeasy (QIAGEN) مطابق با دستور العمل شرکت سازنده استخراج شد. cDNA از روی mRNA توسط کیت synthesis cDNA strand First RevertAid (Scientific Fisher Thermo) kit مطابق با دستور العمل شرکت سازنده سنتز شد. PCR time Real با استفاده از نمونه‌های cDNA، پرایمرهای اختصاصی، رنگ Green Cyber و دستگاه 6000-RG انجام پذیرفت. ژن بتا اکتین 28 به عنوان ژن مرجع 29 انتخاب شد.

طرح کلی آزمایش

ما نرخ تکوین^{۲۰} رویانهای گوسفند را که تخمک آنها در معرض غلظت‌های مختلف CoQ10 (۰، ۱۵، ۳۰، ۵۰ میکرومولار) قرار داشتند را ثبت کردیم. کیفیت رویانهای حاصله توسط رنگ آمیزی افتراقی ارزیابی شد. معنی دار ترین غلظت جهت آزمون‌های بیشتر بر تخمک بالغ در مقایسه با گروه کنترل انتخاب شد. پس از بلوغ آزمایشگاهی، ما توده‌ی نسبی میتوکندری، پراکندگی و پتانسیل غشا میتوکندری، سطوح ROS و GSH و تشکیل دوک تقسیم در تخمک‌های بالغ شده در معرض 30 میکرومولار CoQ10 و گروه

26 primary mouse anti B-tubulin antibody

27 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG

28 β -Actin

29 Reference gene or Housekeeping gene

30 Developmental rate

که یک رنگ چربی دوست کاتیونیک است، اندازه گیری شد. در صورتی که پتانسیل غشا میتوکندری بالا باشد، ذرات رنگ مجتمع می‌شوند و فلئورسنت قرمز رنگ را ساطع می‌کنند و در صورتی که پتانسیل غشا میتوکندری پایین باشد ذرات رنگ به صورت مونومر باقی می‌مانند و فلئورسنت سبز رنگ را ساطع می‌کنند. پتانسیل غشا میتوکندری با اندازه گیری نسبت فلئورسنت قرمز به فلئورسنت سبز 24 در هر تخمک بدست آمد. برای این منظور، تخمک‌های بالغ عریان شدند (35 تا 40 تخمک در هر گروه و برای هر تکرار) و به مدت 30 دقیقه در دمای $37/5$ درجه‌ی انکوباتور در معرض غلظت $20 \text{ ml}/\mu\text{g}$ رنگ 1-JC قرار گرفتند. پس از شست و شو در محیط PVA+PBS، تخمکها در ریز قطره‌های این محیط قرار گرفتند و تصاویر آنها توسط میکروسکوپ معکوس فلئورسنت بدست آمد. کمی سازی نسبی شدت نور فلئورسنت توسط نرم افزار (ImageJ Health of Institutes National, Bethesda, Md, USA) و بر اساس روش توضیح داده شده در مطالعه قبلی (Igarashi و همکاران، ۲۰۱۶) انجام شد.

اندازه گیری سطوح نسبی ROS و GSH

سطوح ROS و GSH مطابق روش‌های شرح داده شده در مطالعات پیشین (Mukherjee و همکاران، ۲۰۱۴؛ Córcoles-Nohales و همکاران، ۲۰۱۶) اندازه گیری شد. متعاقب بلوغ COCها در گروه‌های مختلف مورد مطالعه، تخمک‌های بالغ عریان شدند. متعاقباً تخمک‌های عریان برای اندازه گیری سطح ROS و GSH به مدت 20 دقیقه در دمای $37/5$ °C به ترتیب در معرض غلظت $10 \mu\text{M}$ از رنگ dihydrofluorescein dichloro- 7 (H2DCFDA, Sigma, D6883) و همچنین غلظت $10 \mu\text{M}$ از رنگ blue tracker Cell (CMF2HC) قرار گرفتند. پس از شست و شو، تخمکها در قطره‌های 10 میکرولیتری محیط PBS/PVA قرار داده شدند و توسط میکروسکوپ فلئورسنت معکوس (Japan, IX71, Olympus) مورد مطالعه قرار گرفتند. بلافاصله پس از مواجهه با رنگ، از تخمکها تصاویر فلئورسنت تهیه شد و شدت نور فلئورسنت توسط نرم افزار ImageJ کمی سازی شد. این آزمایش در 3 تکرار صورت پذیرفت و برای هر گروه در هر تکرار حداقل 30 تخمک بالغ مورد مطالعه قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آرایش دوک تقسیم

ارزیابی تشکیل دوک تقسیم در تخمک‌های بالغ بر اساس مطالعات قبلی (Asgari و همکاران، ۲۰۱۲؛ Hosseini و همکاران، ۲۰۱۲) صورت پذیرفت. به طور خلاصه، تخمک‌های عریان پس از ثابت شدن 25 و نفوذپذیری، در محیط حاوی آنتی بادی اولیه موشی ضد

24 Red/Green fluorescence ratio

25 Fixation



جدول ۱: توالی پرایمرها

Gene symbol	Forward primer set (5-3)	Reverse primer set (5'-3')	Annealing CTemp.
B-actin	5'-CCATCGGCAATGAGCGGT-3'	5'-CGTGTGGCGTAGAGGTC-3'	58
Bax	5'-AGCGAGTGTCTGAAGCG-3'	5'-CCCAGTTGAAGTTGCCGT-3'	60
BCL-2	5'-AGCATCACGGAGGAGGTAGAC-3'	5'-CTGGATGAGGGGTGTCTTC-3'	62
Mfn2	5'-GGGCAGGAAGATAGCACAGA-3'	5'-CAACAAGAAGGGAGGCAAGTC-3'	64

۳۰ میکرومولار CoQ10 ($67/59 \pm 8/83$) به طور معنی داری در مقایسه با گروه‌های کنترل ($25 \pm 12/5$) و ۵۰ میکرومولار ($14/81 \pm 14/81$) CoQ10 بالاتر بود (تصویر ۲).

تاثیر CoQ10 بر تعداد سلول‌های ICM و TE

برای ارزیابی کیفیت بلاستوسیت‌ها توسط رنگ آمیزی افتراقی، حداقل ۲۵ و حداکثر ۳۷ بلاستوسیت برای هر گروه بررسی شدند. بلاستوسیت‌های تولید شده در حضور ۱۵ ($5/25 \pm 55/66$) و ۳۰ میکرومولار ($71/83 \pm 7/08$) CoQ10 تعداد سلول‌های توده درونی بیشتری در مقایسه با گروه‌های کنترل ($3/30 \pm 24/33$) و ۵۰ میکرومولار ($35/83 \pm 2/79$) CoQ10 از خود به نمایش گذاشتند (تصویر ۳). تعداد سلول‌های تروفوکتودرم تنها در غلظت ۳۰ میکرومولار ($9/74 \pm 123/33$) CoQ10 به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل ($8/46 \pm 8/46$) بالاتر بود (تصویر ۳). تعداد کلی سلول‌ها^{۳۳} به طرز معنی داری در غلظت ۱۵ ($12/8 \pm 160/66$) و ۳۰ میکرومولار ($16/05 \pm 195/16$) CoQ10 در مقایسه با گروه کنترل ($11/49 \pm 104/33$) بالاتر بود (تصویر ۳).

کوآنزیم Q10 پراکندگی و توده نسبی میتوکندری‌ها را بهبود می‌بخشد

برای بررسی اثر CoQ10 بر توده و پراکندگی میتوکندری‌ها، رنگ آمیزی سلول‌های زنده توسط رنگ حیاتی tracker Mito FM Green برای ارزیابی پراکندگی (تصویر ۴-D۴) و توده نسبی میتوکندری‌ها (تصویر ۴-E) صورت پذیرفت. همانطور که در تصویر D۴ نشان داده شده است، میانگین درصد پراکندگی محدود، نیمه منتشر و منتشر برای گروه کنترل به ترتیب $3/28 \pm 26/13$ ، $2/28 \pm 40/85$ و $5/56 \pm 33/01$ درصد و برای گروه ۳۰ میکرومولار CoQ10 به ترتیب $2/48 \pm 13/19$ ، $3/33 \pm 28/81$ و $0/84 \pm 57/98$ درصد گزارش شد. مقایسه نتایج نشان داد که درصد پراکندگی منتشر به طرز معنی داری در گروه ۳۰ میکرومولار CoQ10 نسبت به گروه کنترل

کنترل را اندازه گیری و ارزیابی کردیم. در نهایت، ما بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز، فاکتورهای رشد مربوط به تخمک و ژن مرتبط با الحاق میتوکندری‌ها را در تخمک و سلول‌های کومولوس اطراف آن ارزیابی کردیم (تصویر ۱).

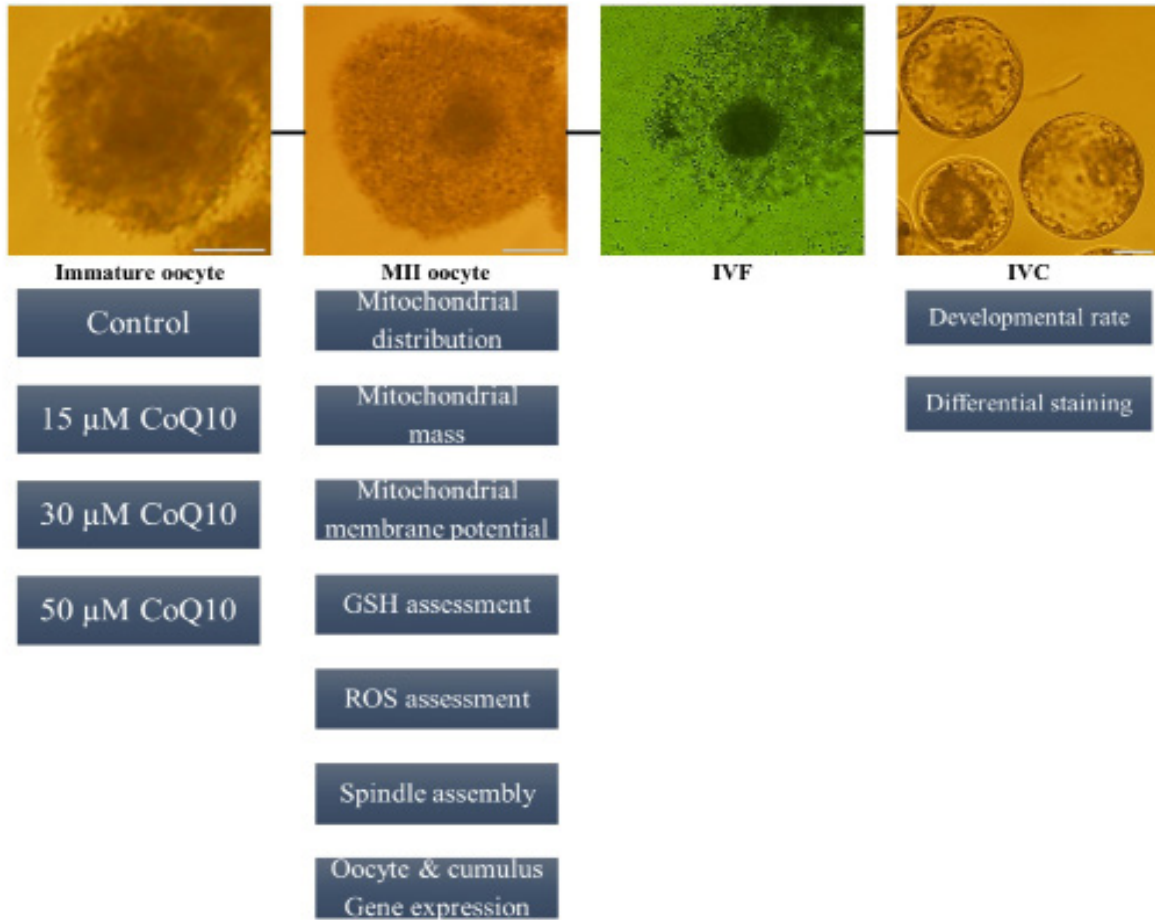
تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه، هر آزمایش ۳ تا ۵ بار تکرار شده است. داده‌های آزمایشگاهی به صورت «میانگین \pm خطای استاندارد از میانگین^{۳۱}» ارائه شده‌اند. پراکندگی نرمال داده‌ها و مساوی بودن واریانس‌ها به ترتیب توسط تست‌های Smirnov-Kolmogorov و Levene و tests بررسی شد. تمامی داده‌ها توسط نرم افزار SPSS16.0 (USA, NY, Somers, Corporation IBM) تجزیه و تحلیل شدند. داده‌های حاصل از نرخ تکوین و رنگ آمیزی افتراقی توسط آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA way-one) و متعاقب آن توسط آزمون LSD تجزیه و تحلیل شدند. دیگر داده‌ها توسط آزمون test T samples-independent تجزیه و تحلیل شدند. درصد دوک‌های تقسیم با کروموزوم‌های معیوب توسط آزمون مربع خای (square-chi) تجزیه و تحلیل شدند. اختلاف میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ معنی دار گزارش شد.

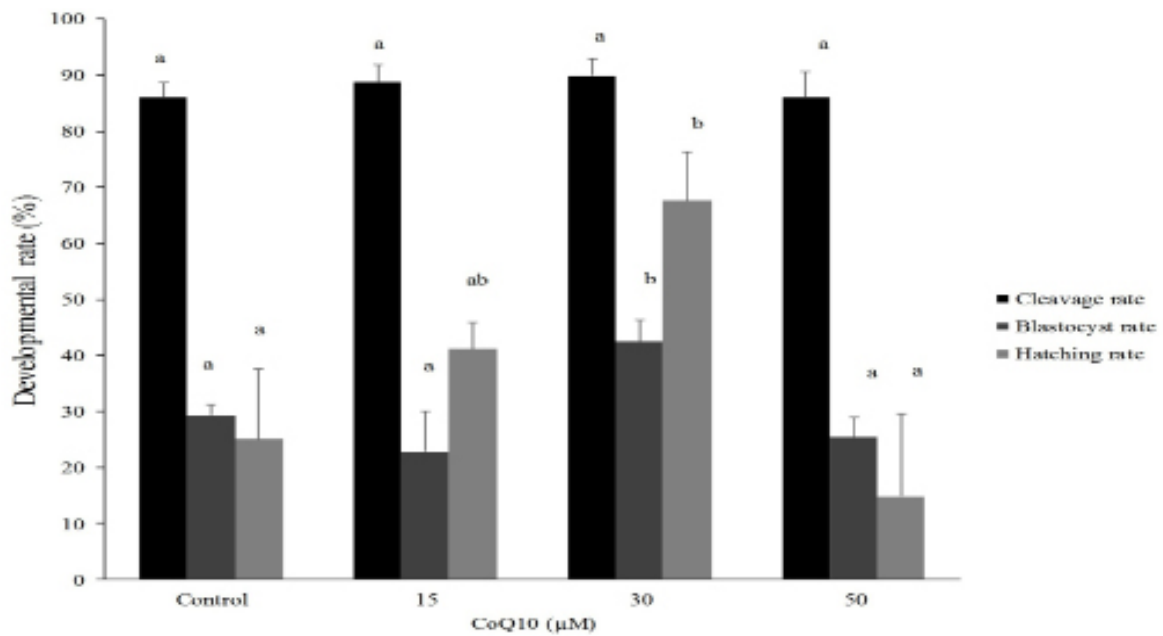
نتایج

-تاثیر CoQ10 بر نرخ بلاستوسیت و شکوفایی

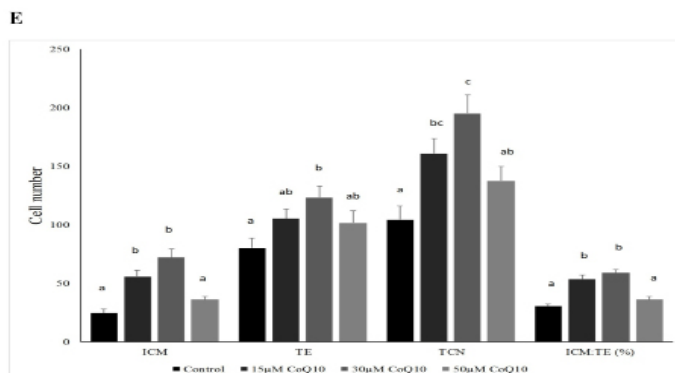
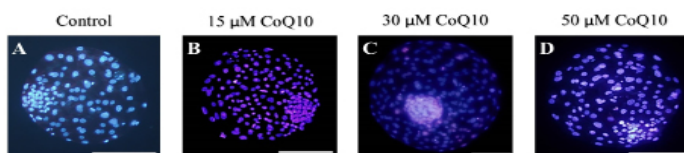
برای بررسی تاثیر CoQ10 بر نرخ بلاستوسیت و شکوفایی، حداقل تعداد ۱۰۰ COC در هر تکرار در محیط بلوغ آزمایشگاهی در معرض غلظت‌های مختلف CoQ10 (۰، ۱۵، ۳۰ و ۵۰ میکرومولار) قرار گرفتند. سپس برای هر گروه لقاح آزمایشگاهی و کشت آزمایشگاهی انجام شد. نرخ بلاستوسیت به طور معنی داری در گروه ۳۰ میکرومولار CoQ10 ($42/36 \pm 3/99$) در مقایسه با گروه‌های کنترل ($1/83 \pm 29/43$)، ۱۵ ($22/78 \pm 7/25$) و ۵۰ میکرومولار CoQ10 ($3/57 \pm 25/38$) بالاتر بود (تصویر ۲). علاوه بر این، نرخ شکوفایی در گروه



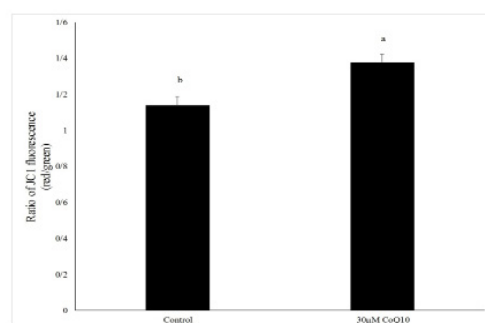
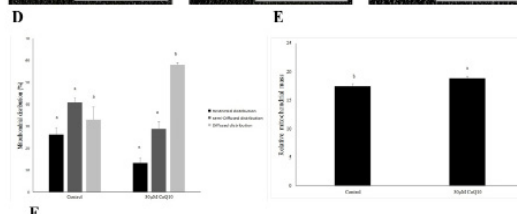
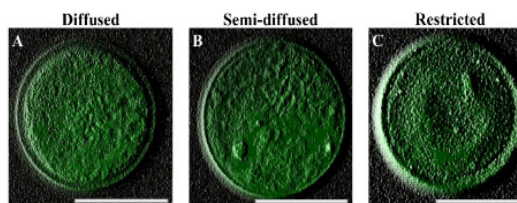
تصویر ۱: طرح کلی آزمایش



تصویر ۲: نرخ تسهیم، بلاستوسیست و شکوفایی رویان‌های گوسفند پس از تیمار COC های نابالغ با غلظت‌های مختلف (۰، ۱۵، ۳۰ و ۵۰ میکرومولار) کوآنزیم Q10. تعداد کلی ۵۱۲، ۵۲۲، ۵۰۷ و ۵۱۳ در COC در ۵ تکرار به ترتیب برای غلظت‌های ۰، ۱۵، ۳۰ و ۵۰ میکرومولار CoQ10 مورد آزمایش قرار گرفت. ستون‌هایی که حروف متفاوت بر روی آن‌ها قرار داده شده است از نظر آماری معنی دار ($P < 0.05$) گزارش شده اند.



تصویر ۳: تصاویر فلئورسنت رویان‌های گوسفند در رنگ آمیزی افتراقی برای گروه‌های (A) کنترل، (B) ۱۵ میکرومولار، (C) ۳۰ میکرومولار و (D) ۵۰ میکرومولار (CoQ10). کیفیت جنین‌های حاصله به صورت تعداد سلول‌های توده درونی (ICM)، تروفواکتودرم (TE)، تعداد کلی سلول‌ها (TCN) و نسبت تعداد سلول‌های توده سلول‌های درونی به تروفواکتودرم (ICM:TE). مجموع ۳۲، ۲۸، ۳۷ و ۲۵ بلاستوسیست به ترتیب برای گروه‌های ۰، ۱۵، ۳۰ و ۵۰ میکرومولار CoQ10 مورد آزمایش قرار گرفت. خط مقیاس برابر با ۲۰۰ میکرومتر است. ستون‌های با حداقل یک حرف مشترک از نظر آماری معنی دار نیستند.



تصویر ۴: تصاویر فلئورسنت ۳ بعدی ارائه شده از الگوهای مختلف پراکندگی میتوکندریایی: (A) منتشر، (B) نیمه منتشر و (C) محدود در تخمک‌های بالغ گوسفند. (D) نسبت الگوهای پراکندگی میتوکندریایی در گروه‌های کنترل و ۳۰ میکرومولار (CoQ10). توده‌ی نسبی میتوکندریایی مشخص شده توسط رنگ Mito tracker green FM در تخمک‌های بالغ گروه‌های کنترل و ۳۰ میکرومولار کوآنزیم Q10. نسبت فلئورسنت قرمز به سبز ارزیابی شده توسط پراب مولکولی JC-۱ در تخمک‌های بالغ گروه‌های کنترل و ۳۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 به منظور اندازه‌گیری پتانسیل غشا درونی میتوکندری. به منظور ارزیابی پراکندگی توده نسبی میتوکندریایی، تعداد کلی ۲۴۳ و ۲۵۲ تخمک در ۳ تکرار به ترتیب برای گروه‌های کنترل و ۳۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای ارزیابی پتانسیل غشا میتوکندری، مجموع ۱۱ و ۱۱۵ تخمک در ۳ تکرار به ترتیب برای گروه‌های کنترل و ۳۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 مورد بررسی قرار گرفتند. خط مقیاس برابر با ۲۰۰ میکرومتر است. ستون‌های دارای حروف متفاوت، از نظر آماری معنی دار گزارش شدند ($P < 0.05$).



سطوح درون سلولی ROS و GSH در تخمک‌های بالغ گروه‌های مورد مطالعه به ترتیب توسط رنگ‌های Cell و H2DCFDA و blue tracker اندازه گیری شد. میانگین سطح نسبی ROS در گروه‌های کنترل و ۳۰ میکرومولار CoQ10 به ترتیب 0.48 ± 0.10 و 1.71 ± 0.10 گزارش شد که به طور معنی داری در گروه ۳۰ میکرومولار پایین تر است (تصویر C۵-A۵). میانگین سطح نسبی GSH در گروه‌های کنترل و ۳۰ میکرومولار CoQ10 به ترتیب 0.20 ± 0.34 و 0.17 ± 0.58 گزارش شد که به طور معنی داری در گروه ۳۰ میکرومولار پایین تر است (تصویر F۵-D۵).

کوانزیم Q10 صف آرایی کروموزوم‌ها را بهبود می‌دهد

رنگ آمیزی ایمنی شناختی^{۳۳} توسط آنتی بادی‌ها و همچنین رنگ آمیزی Hoechst برای ارزیابی صف آرایی کروموزوم‌ها در تخمک‌های بالغ انجام شد. همانطور که در تصویر ۶ نشان داده شده

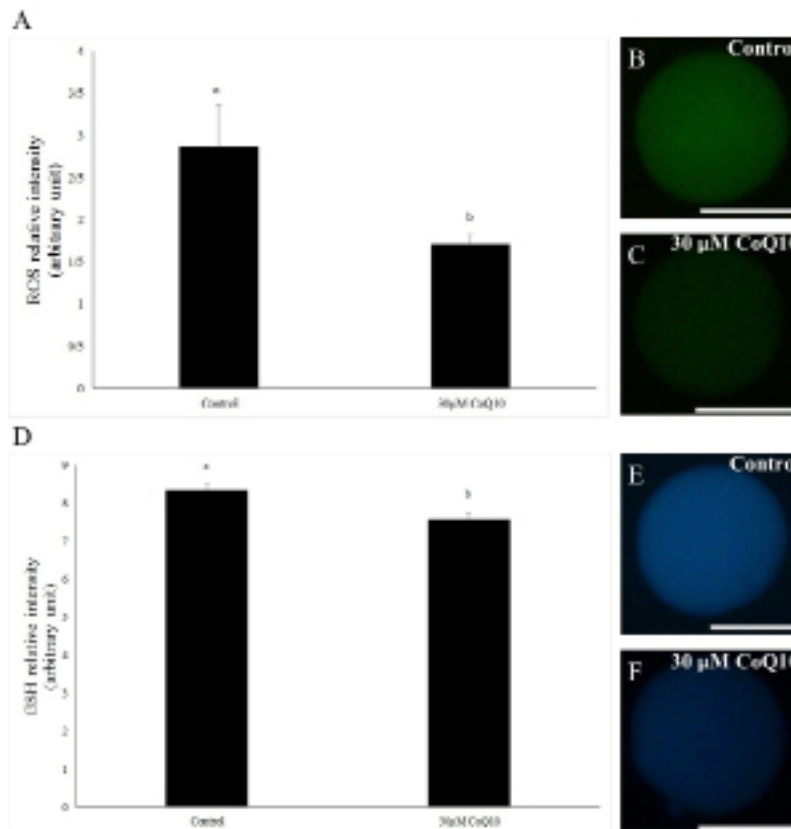
33 Immunostaining

بالاتر است. بعلاوه، همانطور که در تصویر E۴ نشان داده شده است، میانگین توده نسبی میتوکندریایی به طرز معنی داری در گروه ۳۰ میکرومولار CoQ10 در مقایسه با گروه کنترل بالاتر است.

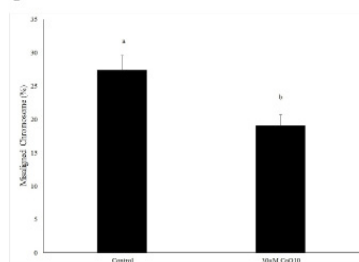
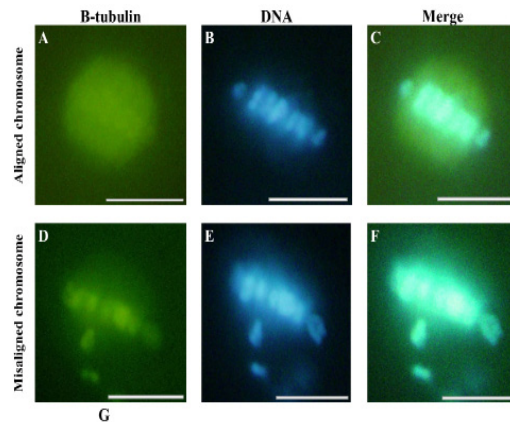
کوانزیم Q10 پتانسیل غشا داخلی میتوکندری را بالا می‌برد

پتانسیل غشا داخلی میتوکندری توسط پراب مولکولی 1-JC در تخمک‌های بالغ گروه‌های ۳۰ میکرومولار CoQ10 و گروه کنترل اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که پتانسیل غشا داخلی میتوکندری در گروه ۳۰ میکرومولار CoQ10 به طرز معنی داری نسبت به گروه کنترل بالاتر است (تصویر F۴).

اثر کوانزیم Q10 بر سطوح نسبی ROS و GSH



تصویر ۵: (A) سطوح نسبی ROS در تخمک‌های گوسفند بالغ شده در حضور و عدم حضور غلظت ۳۰ میکرومولار (B) CoQ10. (C) تصاویر فلئورسنت از میزان ROS به ترتیب در تخمک‌های بالغ گروه کنترل و ۳۰ میکرومولار کوانزیم Q10. (D) سطوح نسبی GSH در تخمک‌های گوسفند بالغ شده در حضور و عدم حضور غلظت ۳۰ میکرومولار (E) CoQ10. (F) تصاویر فلئورسنت از میزان محتوی GSH به ترتیب در تخمک‌های بالغ گروه کنترل و ۳۰ میکرومولار CoQ10. مجموع ۱۱۵ و ۱۲۳ تخمک در ۳ تکرار به ترتیب برای گروه‌های کنترل و ۳۰ میکرومولار کوانزیم Q10 مورد ارزیابی قرار گرفتند. خط مقیاس برابر با ۲۰۰ میکرومتر است. ستون‌هایی که حروف متفاوت بر روی آن‌ها قرار داده شده است از نظر آماری معنی دار ($P < 0.05$) گزارش شده اند.



تصویر (A-C) سازماندهی منظم و (D-F) نامنظم کروموزوم‌های مشاهده شده در تخمک‌های بالغ گوسفند مشخص شده توسط رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی. درصد کروموزوم‌های معیوب در گروه‌های کنترل و ۳۰ میکرومولار کوآنزیم Q10. مجموع ۳۰۲ و ۳۱۰ تخمک در ۳ تکرار به ترتیب برای گروه‌های کنترل و ۳۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 مورد بررسی قرار گرفتند. خط مقیاس برابر با ۵۰ میکرومتر است. ستون‌های دارای حروف متفاوت، از نظر آماری معنی دار گزارش شدند ($P < 0.05$).

H₂O₂ در اسپرم، تا آنجاییکه به حرکت اسپرم صدمه نزند، می‌تواند با جلوگیری از عمل flop-flip ۳۵ پروتئین‌های ACE/HSPA2/PDIA6 موجود در غشا، که برای ظرفیت پذیری اسپرم مناسباند، از الحاق اسپرم و تخمک جلوگیری کند (Bromfield و همکاران، ۲۰۱۵). همچنین نشان داده شده که اضافه کردن بیش از حد آنتی اکسیدان‌ها می‌تواند اثر کاهشی داشته باشد و از روند فیزیولوژیک تولید مثل جلوگیری کند (Stojkovic و همکاران، ۱۹۹۹). بنابراین القا تعادل در حالت اکسیداتیو، برای تکوین طبیعی رویان ابتدایی ۳۶ یک پیش نیاز است. با توجه به نقش CoQ10 به عنوان جزئی از زنجیره انتقال الکترون، این ماده نقش مهمی در پایداری تولید انرژی مورد نیاز برای عملکرد طبیعی سلول ایفا کرده (Bergamini و همکاران، ۲۰۱۲) و همچنین به عنوان یک رفتگر ۳۷ قدرتمند رادیکال‌های آزاد و ROS عمل می‌کند (Bentinger و همکاران، ۲۰۰۷). بنابراین CoQ10 بر اساس خصوصیاتش تا به امروز به عنوان مکمل برای افزایش کیفیت تخمک‌ها و بنابراین نرخ بارداری ۳۸ در زوج‌های نابارور، به خصوص در آن‌هایی که سن بالا دارند، استفاده می‌شده (Gat و همکاران، ۲۰۱۵؛ Xu و همکاران، ۲۰۱۸). با وجود اینکه استفاده از

۳۵ حرکت پروتئین‌ها و لیپیدها در دو سوی داخلی و خارجی غشا

36 Early embryonic development

37 Scavenger

38 Pregnancy rate

است، درصد دوک‌های تقسیم معیوب در گروه کنترل به طور معنی داری نسبت به گروه ۳۰ میکرومولار CoQ10 بالاتر گزارش شد.

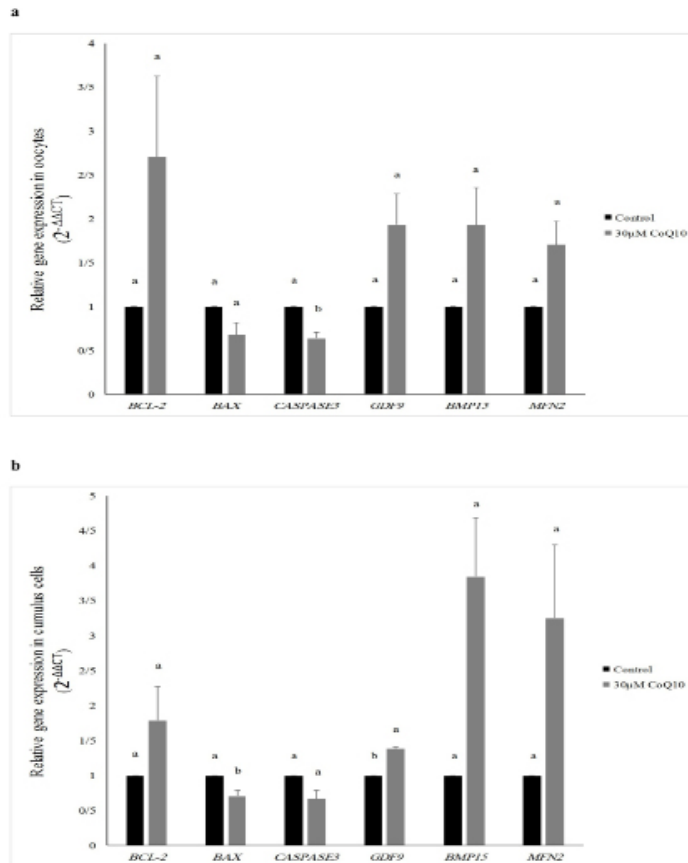
اثر کوآنزیم Q10 بر بیان ژن‌های آپوپتوزی و فاکتورهای رشد مرتبط با تخمک

از میان ژن‌های آپوپتوزی (*CASPASE3 and BAX, BCL2*)، فاکتورهای رشد مرتبط با تخمک (*BMP15* و *GDF9*) و ژن الحاق میتوکندری (*MFN2*)، تنها بیان *CASPASE3* در تخمک‌های گروه ۳۰ میکرومولار CoQ10 به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل پایین‌تر بود. در سلول‌های کومولوس، بیان ژن *BAX* به عنوان یک مارکر آپوپتوزی در گروه ۳۰ میکرومولار CoQ10 به طرز معنی داری نسبت به گروه کنترل پایین‌تر بود. بعلاوه، بیان *GDF9* نیز به طور معنی داری در گروه تیمار شده با CoQ10 بالاتر بود (تصویر ۷).

بحث

ROS به دلیل نقش فیزیولوژیکش در بسیاری از فرآیندهای سلولی مثل ظرفیت پذیری ۳۴، واکنش آکروزومی و الحاق اسپرم و تخمک، به عنوان یک شمشیر دو لبه در نظر گرفته می‌شود (Jin و Yang، ۲۰۱۷). بنابراین، افزایش یا کاهش بیش از اندازه تولید آن می‌تواند مانع این فرآیندهای سلولی شود (Chandel و Hamanaka، ۲۰۱۰). در این باره، الیزابت و همکاران نشان دادند که کمی افزایش مقدار

34 Capacitation



تصویر ۷: بیان نسبی ژن‌های آپوپتوزی (BCL2, BAX and CASPASE3)، فاکتورهای رشد مختص به تخمک (GDF9 و BMP15) و ژن MFN2 در (A) تخمک‌های بالغ و (B) سلول‌های کومولوس اطراف آن‌ها. مجموع ۱۶۹ و ۱۸۳ COC در ۳ تکرار به ترتیب برای گروه‌های کنترل و ۳۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 مورد ارزیابی قرار گرفتند. ستون‌های دارای حروف متفاوت، از نظر آماری معنی دار گزارش شدند ($P < 0.05$).

بیش از حد آنتی اکسیدان‌ها اثر سمی برجای می‌گذارد (Stojkovic و همکاران، ۱۹۹۹). اثرات مشابهی توسط Roth و Gendelman در سال ۲۰۱۲ گزارش شد که همچنین مشاهده کردند اضافه کردن ۵۰ میکرومولار و ۱۰۰ میکرومولار CoQ10 به محیط بلوغ تخمک گاو اثر سو بر نرخ شکل‌گیری رویان‌ها می‌گذارد که متاثر از فصل نیز می‌باشد و نشان می‌دهد که هر استرس اکسیداتیو خاص به مقدار معینی از آنتی اکسیدان (CoQ10) احتیاج دارد (Roth و Gendelman، ۲۰۱۲). بنابراین، این نتایج نشان داد آگاهی از فرآیند مولکولی اثر کوآنزیم Q10 می‌تواند مارکرهایی را نشان دهد که به ما در آینده برای پیدا کردن مقدار مناسب CoQ10 به عنوان مکمل برای زوج‌های نابارور و اضافه کردن مقدار صحیح در محیط‌های کشت آزمایشگاهی به خصوص محیط بلوغ تخمک، که اثرات مهمی بر شایستگی تکوینی دارد، کمک کند.

برای ارزیابی مکانیسم مولکولی عمل آنتی اکسیدان CoQ10، ما در ابتدا پراکندگی میتوکندری‌ها، توده نسبی میتوکندری‌ها و عملکرد آن‌ها

CoQ10 به عنوان مکمل، کیفیت تخمک‌ها و باروری خانم‌ها را بهبود می‌بخشد، تعداد مطالعات آزمایشگاهی در این باره محدود است و واضح است که در این زمینه جای تحقیق بسیار وجود دارد؛ به خصوص برای مشخص ساختن فرآیند مولکولی که اضافه کردن CoQ10 از طریق آن اثر خود را برجای می‌گذارد و اینکه آیا استفاده بیش از حد آن می‌تواند اثر مضر بر جای گذارد یا خیر. بنابراین، این مطالعه برای ارزیابی نقش اضافه کردن کوآنزیم Q10 در محیط بلوغ تخمک گوسفند بر شایستگی تکوینی طراحی شد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اضافه کردن CoQ10 به محیط بلوغ تخمک در محدوده غلظت ۱۵ تا ۳۰ میکرومولار شایستگی تکوینی را افزایش می‌دهد که در قالب ایجاد بلاستوسیست، نرخ شکوفایی و بعلاوه کیفیت رویان‌ها ارزیابی شد. با این حال اثر برجسته در غلظت ۳۰ میکرومولار مشاهده شد. جالب توجه است خاطر نشان کنیم که اضافه کردن مقدار بیشتر CoQ10 (۵۰ میکرومولار) به محیط بلوغ، پارامترهای ذکر شده را کاهش داد که بیان می‌دارد اضافه کردن



سنین بالا ممکن است با عملکرد تحت بهینه ۴۰ ماشین میتوکندریایی ارتباط داشته باشد (Bartmann و همکاران، ۲۰۰۴) و به همین خاطر تقویت میتوکندریایی پیشنهاد شده و اخیراً در انسان پیاده سازی شده است (Herbert و Turnbull، ۲۰۱۸). بعلاوه مطالعات اخیر پیشنهاد می‌کند که اضافه کردن آنتی اکسیدان‌ها به خصوص CoQ10 به عنوان مکمل ممکن است بازده سیکل‌های ART41، به خصوص کیفیت جنین و نرخ بارداری را بهبود بخشد (Cheraghi و همکاران، ۲۰۱۶؛ Luddi و همکاران، ۲۰۱۶؛ Nashivochnikova و همکاران، ۲۰۱۵؛ Safarinejad، ۲۰۱۲).

عملکرد میتوکندریایی کاهش یافته عمدتاً با کاهش کارایی زنجیره انتقال الکترون ارتباط دارد که در نتیجه باعث افزایش تولید ROS می‌شود. ROS افزایش یافته، خود باعث کاهش توانایی میتوکندری در تولید ATP می‌شود که در نتیجه باعث افزایش تولید ROS می‌شود، بنابراین یک سیکل معیوب القا می‌شود که در نهایت به آپوپتوز ختم می‌شود (Indo و همکاران، ۲۰۰۷؛ Raha و Robinson، ۲۰۰۱). بنابراین ما سطوح ROS را با استفاده از رنگ آمیزی H2DCFDA اندازه گیری کردیم و نتایج نشان داد که ROS بیشتری در گروه تیمار نشده تولید می‌شود و بیان می‌دارد که تولید رادیکال‌های آزاد ممکن است تا حدودی مسئول شایستگی تکوینی پایین تخمک‌های بالغ شده در آزمایشگاه باشد. نتایج این مطالعه منطبق با مطالعات دیگر است که بیان می‌دارند افزایش تولید ROS می‌تواند با فراهم کردن آنتی اکسیدان‌های مختلف مثل آلفا لیپوئیک اسید (Talebi و همکاران، ۲۰۱۲)، N-استیل سیستئین (Ciftci و همکاران، ۲۰۰۹)، ویتامین C (Hu و همکاران، ۲۰۱۲)، ویتامین E و ملاتونین (Tamura و همکاران، ۲۰۰۸) جبران شود. بعلاوه، همچنین ما ۳ ژن مارکر آپوپتوزی (*BAX*، *BCL2* و *CASPASE3*) را مورد ارزیابی قرار دادیم. بین این مارکرها، بیان ژن *CASPASE3* به طور معنی داری در تخمک‌های بالغ شده در محیط دارای غلظت ۳۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 نسبت به گروه کنترل پایین‌تر بود. درحالی‌که *BAX* به عنوان یک مارکر پیش آپوپتوزی ۴۲ در سلول‌های کومولوس اطراف تخمک کاهش یافته بود. مجموع این داده‌ها پیشنهاد می‌کند که آپوپتوز تا حدی خاص می‌تواند توسط فراهم آوری آنتی اکسیدان‌ها کاهش یابد و این استوار بر مطالعات قبلی در این زمینه است (Cui و همکاران، ۲۰۱۷؛ He و همکاران، ۲۰۱۸؛ Rossig و همکاران، ۲۰۰۱؛ Tagami و همکاران، ۱۹۹۸).

یک دلیل برای افزایش سطوح ROS به کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی تخمک ارتباط دارد. در این رابطه ما سطوح GSH را اندازه

را با 1-JC و FM Green tracker Mito ارزیابی کردیم. نتایج رنگ آمیزی با tracker Mito نشان داد الگوی منتشر پراکندگی میتوکندریایی و همچنین توده‌ی میتوکندریایی در تخمک‌ها متعاقب تیمار با غلظت ۳۰ میکرومولار CoQ10 افزایش یافت. بعلاوه، نتایج رنگ آمیزی با 1-JC نیز پیشنهاد می‌کند، پس از تیمار با ۳۰ میکرومولار CoQ10، پتانسیل غشا میتوکندری بهبود می‌یابد. نتایج مشابه توسط پژوهشگران دیگر گزارش شده است (Abdulhasan و همکاران، ۲۰۱۷؛ Roth و Gendelman، ۲۰۱۲؛ Liang و همکاران، ۲۰۱۷).

یکی از وظایف اصلی میتوکندری علاوه بر پایداری انرژی سلول، نقش آن در جدایی صحیح کروموزوم‌ها است که به دنبال فعال شدن تخمک توسط اسپرم و طی تقسیمات میتوزی اتفاق می‌افتد (Eichenlaub-Ritter و همکاران، ۲۰۰۴). بنابراین برای ارزیابی بیشتر نقش CoQ10 به عنوان مکمل در صف آرایی کروموزوم‌ها، صحت تشکیل دوک تقسیم در تخمک‌های بالغ در حضور و عدم حضور غلظت ۳۰ میکرومولار CoQ10 بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که اضافه کردن CoQ10 به محیط بلوغ به طور واضح درصد تخمک‌های دارای دوک معیوب را کاهش می‌دهد. نتایج مطالعات اخیر پیشنهاد می‌کند پروتئین Mitofusin2 موجود در دیواره خارجی میتوکندری، نقشی اساسی در پراکندگی میتوکندری‌ها از طریق میکروتوبول‌ها ایفا می‌کند (Misko و همکاران، ۲۰۱۰). از بین بردن اثر این ژن ۳۹ با نقص در تشکیل دوک تقسیم همراه می‌شود (Zhang و همکاران، ۲۰۱۶). عملکرد اصلی Mitofusin2 ایجاد تعادل بین الحاق و انفصال میتوکندری‌ها و القا تشکیل شبکه‌ای برای پراکندگی منظم میتوکندری‌ها است تا سلول به پراکندگی انرژی مورد نیاز خود دست یابد (Kawalec و همکاران، ۲۰۱۶). با توجه به دگرگون شدن پراکندگی میتوکندری‌ها و هتروژن شدن آن‌ها در گروه کنترل و این حقیقت که این پارامترها با استفاده از کوآنزیم Q10 به عنوان مکمل در محیط بلوغ بهبود یافته‌اند، ما سطح بیان نسبی ژن Mitofusin2 را اندازه گیری کردیم. نتایج نشان داد که تفاوتی در سطح بیان این ژن در تخمک‌های دو گروه مورد مطالعه وجود نداشت. با وجود اینکه سطح بیان ژن Mitofusin2 در سلول‌های کومولوس متعاقب تیمار با CoQ10 به مقدار زیادی نسبت به گروه کنترل بالاتر بود، اما این تفاوت از نظر آماری معنی دار نشد. بنابراین این نتایج بیان می‌دارد که استفاده از CoQ10 به عنوان مکمل در محیط بلوغ ممکن است ظرفیت میتوکندریایی سلول‌های کومولوس، که نقش مهمی در حمایت از تکوین تخمک و شایستگی تکوینی آن ایفا می‌کنند، را بهبود بخشد. درواقع شواهد اخیر پیشنهاد می‌کند که افزایش نرخ آنتوپلوئیدی در

40 Suboptimal

41 Assisted reproductive technologies

42 Pro-apoptotic

39 Gene knockdown



و سلول‌های کومولوس اطراف آن ایفا می‌کنند، می‌تواند یک توضیح برای کیفیت بالاتر تخمک‌های مواجهه یافته با کوآنزیم Q10 باشد که به صورت نرخ بالای تکوین در رویان‌های حاصله نمود پیدا کرده است. در نتیجه ۴۳، نتایج ما نشان می‌دهد که استفاده از CoQ10 به عنوان مکمل در محیط بلوغ می‌تواند ظرفیت تکوین تخمک‌های بالغ شده در شرایط آزمایشگاه ۴۴ و احتمالاً شرایط بدن ۴۵ را بهبود دهد و این از طریق بهبود پراکندگی و میزان توده میتوکندری‌ها حاصل می‌شود. این ماده همچنین از طریق کاهش ROS باعث بهبود عملکرد میتوکندری می‌شود که می‌تواند باعث افزایش تولید ATP مورد نیاز برای تفکیک صحیح کروموزوم‌ها در دوک میتوزی شود. بنابراین، این داده‌ها استفاده از CoQ10 را به عنوان مکمل در شرایط آزمایشگاهی و شرایط بدنی و بخصوص در مواجهه با سن بالا پیشنهاد می‌کنند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از زحمات و کمک‌های پرسنل پژوهشگاه رویان نهایت تشکر و قدردانی را بعمل آورند.

تضاد منافع

تمامی نویسندگان اعلان می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافی در این کار ندارند.

43 In conclusion

44 In vitro

45 In vivo

گیری کردیم که ظرفیت آنتی اکسیدانی اصلی تخمک است. بر خلاف انتظار، ما یک کاهش سطح GSH را در تخمک‌های تیمار شده با غلظت ۳۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 مشاهده کردیم. چند توضیح ممکن است برای این مشاهدات وجود داشته باشد. اول، بهبود عملکرد میتوکندری ممکن است فرصت بهبود عملکرد ماشین ترمیم را برای سلول فراهم آورده باشد و این به استفاده بیشتر از GSH نیاز دارد؛ بنابراین کاهش سطح GSH ممکن است به افزایش ظرفیت ترمیم تخمک‌های مواجهه یافته با CoQ10 مرتبط باشد. دوم، افزایش ROS ممکن است القا کننده‌ی تولید GSH بیشتر باشد و بنابراین کاهش سطح GSH ممکن است به کاهش سطوح ROS مرتبط باشد. در واقع مطالعه‌ای در گذشته نشان داده که اگر سلول در معرض H2O2 اگزوزن قرار گیرد، سطوح GSH درون سلولی در آن زیاد می‌شود (Xianyan و همکاران، ۲۰۰۸). در نهایت، آنتی اکسیدان‌ها مثل N-استیل سیستئین یا آلفا لیپوئیک اسید، پیش سازهای مستقیم GSH هستند در صورتی که CoQ10 ممکن است این قابلیت را نداشته باشد.

دو مارکر مهم کیفیت تخمک، GDF9 و BMP15 هستند (Wu و همکاران، ۲۰۰۷؛ Zhang و همکاران، ۲۰۰۵). نتایج ما نشان داد که بیان این مارکرها در تخمک‌های مواجهه یافته با CoQ10 یک افزایش بیان غیر معنی دار را از خود نشان می‌دهد اما بیان GDF9 به طور معنی دار در سلول‌های کومولوس آن‌ها افزایش می‌یابد. با توجه به اینکه این رونوشت‌ها نقش مهمی در واسطه‌گری تعاملات بین تخمک



منابع

- Abdulhasan**, M., Li, Q., Dai, J., Abu-Soud, H., Puscheck, E., Rappolee, D. 2017. CoQ10 increases mitochondrial mass and polarization, ATP and Oct4 potency levels, and bovine oocyte MII during IVM while decreasing AMPK activity and oocyte death. *Journal of assisted reproduction and genetics*. **34(12)**,1595-1607.
- Agarwal**, A., Said, T.M., Bedaiwy, M.A., Banerjee, J., Alvarez, J.G. 2006. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertility and sterility*. **86(3)**,503-512.
- Asgari**, V., Hosseini, S., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Azhdari, Z., Mosaie, M., Nasr-Esfahani, M. 2012. Specific activation requirements of *in vitro*-matured sheep oocytes following vitrification-warming. *Molecular reproduction and development*. **79(7)**,434-444.
- Bartmann**, A.K., Romao, G.S., da Silveira Ramos, E., Ferriani, R.A. 2004. Why do older women have poor implantation rates? A possible role of the mitochondria. *Journal of assisted reproduction and genetics*. **21(3)**,79-83.
- Bentinger**, M., Brismar, K., Dallner, G. 2007. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*. **7**,S41-S50.
- Bergamini**, C., Moruzzi, N., Sblendido, A., Lenaz, G., Fato, R. 2012. A water soluble CoQ10 formulation improves intracellular distribution and promotes mitochondrial respiration in cultured cells. *PloS one*. **7(3)**,e33712.
- Bromfield**, E.G., McLaughlin, E.A., Aitken, R.J., Nixon, B. 2015. Heat Shock Protein member A2 forms a stable complex with angiotensin converting enzyme and protein disulfide isomerase A6 in human spermatozoa. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. **22(2)**,93-109.
- Cheraghi**, E., Mehranjani, M.S., Shariatzadeh, M.A., Esfahani, M.H., Ebrahimi, Z. 2016. N-Acetylcysteine improves oocyte and embryo quality in polycystic ovary syndrome patients undergoing intracytoplasmic sperm injection: an alternative to metformin. *Reproduction, fertility, and development*. **28(6)**,723-731.
- Ciftci**, H., Verit, A., Savas, M., Yeni, E., Erel, O. 2009. Effects of N-acetylcysteine on semen parameters and oxidative/antioxidant status. *Urology*. **74(1)**,73-76.
- Cui**, Y., Ren, L., Li, B., Fang, J., Zhai, Y., He, X., Du, E., Miao, Y., Hua, J., Peng, S. 2017. Melatonin Relieves Busulfan-Induced Spermatogonial Stem Cell Apoptosis of Mouse Testis by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. **44(6)**,2407-2421.
- Eichenlaub-Ritter**, U., Vogt, E., Yin, H., Gosden, R. 2004. Spindles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. *Reproductive biomedicine online*. **8(1)**,45-58.
- Gat**, I., Mejia, S.B., Balakier, H., Librach, C., Claessens, A., Ryan, E. 2015. The use of coenzyme Q10 and DHEA during COH and IVF cycles in patients with decreased ovarian reserve (DOR). *Fertility and Sterility*. **104(3)**,e325.
- Ge**, Z-J., Schatten, H., Zhang, C-L., Sun, Q-Y. 2015. Oocyte ageing and epigenetics. *Reproduction*. **149(3)**,R103-R114.
- Gendelman**, M., Roth, Z. 2012. Incorporation of coenzyme Q10 into bovine oocytes improves mitochondrial features and alleviates the effects of summer thermal stress on developmental competence. *Biology of reproduction*. **87(5)**,118.
- Guerin**, P., El Mouatassim, S., Menezo, Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human reproduction update*. **7(2)**,175-189.
- Hamanaka**, R.B., Chandel, N.S. 2010. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular



- signaling and dictate biological outcomes. Trends in biochemical sciences. **35(9)**,505-513.
- He, R., Cui, M., Lin, H., Zhao, L., Wang, J., Chen, S., Shao, Z.** 2018. Melatonin resists oxidative stress-induced apoptosis in nucleus pulposus cells. Life Sci. **199**,122-130.
- Herbert, M., Turnbull, D.** 2018. Progress in mitochondrial replacement therapies. Nat Rev Mol Cell Biol. **19(2)**,71-72.
- Hosseini, S., Asgari, V., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Piryaee, A., Najarasl, M., Nasr-Esfahani, M.** 2012. Potential applications of sheep oocytes as affected by vitrification and *in vitro* aging. Theriogenology. **77(9)**,1741-1753.
- Hu, J., Cheng, D., Gao, X., Bao, J., Ma, X., Wang, H.** 2012. Vitamin C enhances the *in vitro* development of porcine pre-implantation embryos by reducing oxidative stress. Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene. **47(6)**,873-879.
- Igarashi, H., Takahashi, T., Abe, H., Nakano, H., Nakajima, O., Nagase, S.** 2016. Poor embryo development in post-ovulatory *in vivo*-aged mouse oocytes is associated with mitochondrial dysfunction, but mitochondrial transfer from somatic cells is not sufficient for rejuvenation. Human Reproduction. **31(10)**,2331-2338.
- Indo, H.P., Davidson, M., Yen, H-C., Suenaga, S., Tomita, K., Nishii, T., Higuchi, M., Koga, Y., Ozawa, T., Majima, H.J.** 2007. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. Mitochondrion. **7(1)**,106-118.
- Jin, S-K., Yang, W-X.** 2017. Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? Oncotarget. **8(2)**,3600.
- Kagan, T., Davis, C., Lin, L., Zakeri, Z.** 1999. Coenzyme Q10 can in some circumstances block apoptosis, and this effect is mediated through mitochondria. Annals of the New York Academy of Sciences. **887(1)**,31-47.
- Kawalec, M., Beręsewicz, M., Zabłocki, K., Zabłocka, B.** 2016. Mitofusin 2 and mitochondrial dynamics in norm and pathology. Postępy biochemii. **62(2)**,149-157.
- Kikyo, N., Wolffe, A.P.** 2000. Reprogramming nuclei: insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryons. J Cell Sci. **113(1)**,11-20.
- Liang, S., Niu, Y.J., Shin, K-T., Cui, X-S.** 2017. Protective Effects of Coenzyme Q10 on Developmental Competence of Porcine Early Embryos. Microscopy and Microanalysis. **23(4)**,849-858.
- Luddi, A., Capaldo, A., Focarelli, R., Gori, M., Morgante, G., Piomboni, P., De Leo, V.** 2016. Antioxidants reduce oxidative stress in follicular fluid of aged women undergoing IVF. Reproductive biology and endocrinology : RB&E. **14(1)**,57.
- Marques-Santos, L.F., Oliveira, J.G., Maia, R.C., Rumjanek, V.M.** 2003. Mitotracker green is a P-glycoprotein substrate. Bioscience reports. **23(4)**,199-212.
- McLay, D.W., Clarke, H.J.** 2003. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. Reproduction. **125(5)**,625-633.
- Mermillod, P., Oussaid, B., Cognie, Y.** 1999. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. Journal of reproduction and fertility Supplement. **54**,449-460.
- Mishra, A., Reddy, I., Gupta, P., Mondal, S.** 2016. l-carnitine Mediated Reduction in Oxidative Stress and Alteration in Transcript Level of Antioxidant Enzymes in Sheep Embryos Produced *In Vitro*. Reproduction in Domestic Animals. **51(2)**,311-321.
- Misko, A., Jiang, S., Wegorzewska, I., Milbrandt, J., Baloh, R.H.** 2010. Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. Journal of Neuroscience. **30(12)**,4232-4240.



- Mitchell, P. 1975. The protonmotive Q cycle: a general formulation. FEBS letters. **59(2)**,137-139.
- Mukherjee, A., Malik, H., Saha, A.P., Dubey, A., Singhal, D.K., Boateng, S., Saugandhika, S., Kumar, S., De, S., Guha, S.K. 2014. Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. Journal of assisted reproduction and genetics. **31(2)**,229-239.
- Nandi, S., Gupta, P., Selvaraju, S., Roy, S., Ravindra, J. 2010. Effects of exposure to heavy metals on viability, maturation, fertilization, and embryonic development of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes *in vitro*. Archives of environmental contamination and toxicology. **58(1)**,194-204.
- Nashivochnikova, N.A., Krupin, V.N., Selivanova, S.A. 2015. [ANTIOXIDANT THERAPY FOR INFERTILE COUPLES]. Urologiia. (Moscow, Russia : 1999)**(3)**,71-72, 74.
- Nohales-Córcoles, M., Sevillano-Almerich, G., Di Emidio, G., Tatone, C., Cobo, A., Dumollard, R., De los Santos Molina, M. 2016. Impact of vitrification on the mitochondrial activity and redox homeostasis of human oocyte. Human Reproduction. **31(8)**,1850-1858.
- O'callaghan, D., Yaakub, H., Hyttel, P., Spicer, L., Boland, M. 2000. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. Journal of reproduction and fertility. **118(2)**,303-313.
- Pezhman, M., Hosseini, S., Ostadhosseini, S., Varnosfaderani, S.R., Sefid, F., Nasr-Esfahani, M. 2017. Cathepsin B inhibitor improves developmental competency and cryo-tolerance of *in vitro* ovine embryos. BMC developmental biology. **17(1)**,10.
- Raha, S., Robinson, B.H. 2001. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. American Journal of Medical Genetics. Part A **106(1)**,62-70.
- Rossig, L., Hoffmann, J., Hugel, B., Mallat, Z., Haase, A., Freyssinet, J.M., Tedgui, A., Aicher, A., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. 2001. Vitamin C inhibits endothelial cell apoptosis in congestive heart failure. Circulation. **104(18)**,2182-2187.
- Safarinejad, M.R. 2012. The effect of coenzyme Q(1)(0) supplementation on partner pregnancy rate in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia: an open-label prospective study. Int Urol Nephrol. **44(3)**,689-700.
- Santos-Ocaña, C., Do, T.Q., Padilla, S., Navas, P., Clarke, C.F. 2002. Uptake of Exogenous Coenzyme Q and Transport to Mitochondria Is Required for bc 1 Complex Stability in Yeastcoq Mutants. Journal of Biological Chemistry. **277(13)**,10973-10981.
- Shirazi, A., Bahiraei, A., Ahmadi, E., Nazari, H., Heidari, B., Borjian, S. 2009. The effect of the duration of *in vitro* maturation (IVM) on parthenogenetic development of ovine oocytes. Avicenna journal of medical biotechnology. **1(3)**,181.
- Song, C., Peng, W., Yin, S., Zhao, J., Fu, B., Zhang, J., Mao, T., Wu, H., Zhang, Y. 2016. Melatonin improves age-induced fertility decline and attenuates ovarian mitochondrial oxidative stress in mice. Scientific Reports. **6**.
- Stojkovic, M., Machado, S.A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Gonçalves, P.B., Wolf, E. 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. Biology of reproduction. **64(3)**,904-909.
- Stojkovic, M., Westesen, K., Zakhartchenko, V., Stojkovic, P., Boxhammer, K., Wolf, E. 1999. Coenzyme Q10 in submicron-sized dispersion improves development, hatching, cell proliferation, and adenosine triphosphate content of *in vitro*-produced bovine embryos. Biology of reproduction. **61(2)**,541-547.



- Sundarrajan, C., Liao, W-X., Roy, A., Ng, S.** 1999. Association of oestrogen receptor gene polymorphisms with outcome of ovarian stimulation in patients undergoing IVF. *Molecular human reproduction*. **5(9)**,797-802.
- Tagami, M., Yamagata, K., Ikeda, K., Nara, Y., Fujino, H., Kubota, A., Numano, F., Yamori, Y.** 1998. Vitamin E prevents apoptosis in cortical neurons during hypoxia and oxygen reperfusion. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. **78(11)**,1415-1429.
- Talebi, A., Zavareh, S., Kashani, M.H., Lashgarbluki, T., Karimi, I.** 2012. The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. *J Assist Reprod Genet*. **29(2)**,175-183.
- Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., Taketani, T., Matsuoka, A., Yamagata, Y., Shimamura, K., Morioka, H., Ishikawa, H., Reiter, R.J., Sugino, N.** 2008. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of pineal research*. **44(3)**,280-287.
- Wu, Y-T., Tang, L., Cai, J., Lu, X-E., Xu, J., Zhu, X-M., Luo, Q., Huang, H-F.** 2007. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. *Human Reproduction*. **22(6)**,1526-1531.
- Xiyanan, L., Wenyan, Z., Zhi, Z., Jian, C., Du, G.** 2008. Effect of H₂O₂ stress on glutathione production by *Candida utilis*. *Sheng wu gong cheng xue bao= Chinese journal of biotechnology*. **24(6)**,1046-1050.
- Xu, Y., Nisenblat, V., Lu, C., Li, R., Qiao, J., Zhen, X., Wang, S.** 2018. Pretreatment with coenzyme Q10 improves ovarian response and embryo quality in low-prognosis young women with decreased ovarian reserve: a randomized controlled trial. *Reproductive Biology and Endocrinology*. **16(1)**,29.
- Yang, C-R., Miao, D-Q., Zhang, Q-H., Guo, L., Tong, J-S., Wei, Y., Huang, X., Hou, Y., Schatten, H., Liu, Z.** 2010. Short-term preservation of porcine oocytes in ambient temperature: novel approaches. *PloS one*. **5(12)**,e14242.
- Zenzes, M.T., Reed, T.E., Casper, R.F.** 1997. Effects of cigarette smoking and age on the maturation of human oocytes. *Human reproduction (Oxford, England)*. **12(8)**,1736-1741.
- Zhang, J-H., Zhang, T., Gao, S-H., Wang, K., Yang, X-Y., Mo, F-F., Yu, N., An, T., Li, Y-F., Hu, J-W.** 2016. Mitofusin-2 is required for mouse oocyte meiotic maturation. *Scientific reports*. **6**.
- Zhang, X., Jafari, N., Barnes, R.B., Confino, E., Milad, M., Kazer, R.R.** 2005. Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality. *Fertility and sterility*. **83(4)**,1169-1179.