Research Paper

The Effect of Ubiquinone on Malondialdehyde Content of Mouse Preantral Follicles During in Vitro Culture

Roya Hedayati Kashka[1], *Saeed Zavareh[2], Taghi Lashkarbolouki[3]

1. MSc. Student, Department of Cellular and Molecular Biology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran.
3. Assistant Professor, Department of General Biology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran.

Citation: Hedayati Kashka R, Zavareh S, Lashkarbolouki T. [The Effect of Ubiquinone on Malondialdehyde Content of Mouse Preantral Follicles During in Vitro Culture (Persian)]. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences. 2016; 23(4):590-599.

doi:

Received: 19 May 2016

Accepted: 22 Aug. 2016

Keywords:
Ubiquinone, Preantral follicles, Lipid peroxidation

ABSTRACT

Backgrounds Oxidative stress is unavoidable during in vitro culture. The present study aimed to investigate the effect of ubiquinone as a potent antioxidant on lipid peroxidation and development rate of mice in vitro cultured preantral follicles.

Methods & Materials Preantral follicles were isolated mechanically from 14- to 16-day-old mice (n=123) and divided into control (n=78) and ubiquinone treated groups (n=45). Preantral follicles were cultured in the presence or absence (control) of 50 µM ubiquinone. Ovulation was induced at 12th day. The rates of growth, survival, antrum formation, ovulation, and MII oocytes were evaluated. Separately, malondialdehyde (MDA) as a biomarker of lipid peroxidation was assessed at different time points of 24, 48, 72, and 96 h. Statistical analysis was performed by Independent t test through using SPSS.

Results The growth and survival rate of ubiquinone treated preantral follicles was significantly higher than those of the control group. The rates of antrum formation, ovulation, and MII oocytes in the presence of ubiquinone were significantly higher than those of the control group. Whereas, MDA levels of ubiquinone treated preantral follicles was significantly lower compared with that of the control group.

Conclusion Supplemented culture medium with ubiquinone improves the development of preantral follicles by reducing the lipid peroxidation.

Corresponding Author:
Saeid Zavareh, PhD
Address: Department of Cellular and Molecular Biology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran.
Tel: +98 (23)35220237
E-mail: zavareh.s@du.ac.ir

بررسی تأثیر یوبیکوینون بر میزان مالون دی‌آلدئید فولیکول‌های پره‌آنترال موش سوری در کشت آزمایشگاهی

رویا هدایتی‌کشکا[۱]، *سعید زواره[۲] ، تقی لشکربلوکی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران.
۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران.
۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی عمومی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران.

تاریخ دریافت: ۳۰ اردیبهشت ۱۳۹۵
تاریخ پذیرش: ۱ شهریور ۱۳۹۵

چکیده

اهداف استرس اکسیداتیو در کشت آزمایشگاهی اجتناب‌ناپذیر است. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر یوبیکوینون به‌عنوان آنتی‌اکسیدانتی قوی بر پراکسیداسیون لیپیدی و نرخ تکوین فولیکول‌های پره‌آنترال موش سوری در شرایط کشت آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها در این پژوهش فولیکول‌های پره‌آنترال از تخمدان موش‌های ۱۴ تا ۱۶ روزه به روش مکانیکی جدا (n=۳۲۱) و به دو گروه کنترل (n=۷۸) و تیمارشده با یوبیکوینون (n=۵۴) تقسیم شدند. فولیکول‌های پره‌آنترال با حضور یا عدم حضور (کنترل) ۵۰ میکرومولار یوبیکوینون کشت و تخمک‌گذاری در روز دوازدهم کشت القا شد، سپس نرخ رشد، بقا، تشکیل حفره آنتروم، تخمک‌گذاری و تخمک MII ارزیابی شد. به‌طور جداگانه مالون دی‌آلدئید (MDA) به‌عنوان نشانگر زیستی پراکسیداسیون لیپیدی در شروع کشت، در ساعت‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ بررسی شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون t مستقل تجزیه‌وتحلیل شد.

یافته‌ها در این پژوهش نرخ بقا و رشد فولیکول‌های پره‌آنترال تیمارشده با یوبیکوینون به‌طور معناداری بیشتر از گروه کنترل بود. نرخ تشکیل حفره آنتروم و تخمک‌گذاری و تخمک‌های MII در حضور یوبیکوینون به‌طور معناداری نسبت به گروه کنترل بیشتر بود، درحالی‌که مقدار مالون دی‌آلدئید فولیکول‌های تیمارشده با یوبیکوینون در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معناداری کمتر بود.

نتیجه‌گیری محیط کشت غنی‌شده با یوبیکوینون، تکوین فولیکول‌های پره‌آنترال را با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی بهبود می‌دهد.

کلیدواژه‌ها:
یوبیکوینون، فولیکول‌های پره‌آنترال، پراکسیداسیون لیپیدی

مقدمه

فرایندهای تولید مثل و تکوین با تغییرات پویا در متابولیسم و مصرف انرژی همراه هستند که درنتیجه به میزان زیادی محصولات فرعی متابولیکی ازجمله رادیکال‌های آزاد تولید می‌شود. رادیکال‌های آزاد، اتم یا مولکول با یک الکترون جفت‌نشده هستند که با سرعت به مولکول‌های دیگر متصل شده و آن‌ها را ناپایدار می‌کنند و در سیستم زنده به مولکول‌های حیاتی آسیب وارد می‌کنند [۳-۱]. یکی از مهم‌ترین آن‌ها، گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS) است که مقدار محدود آن موجب بهبود عملکرد فیزیولوژیکی می‌شود، درحالی‌که تولید بیش از حد آن با ایجاد استرس اکسیداتیو منجر به آسیب سلولی می‌شود [۱،۳].

متغیرهای زیادی در بلوغ تخمک و فولیکول‌ها در شرایط کشت آزمایشگاهی (in vitro) تأثیر دارند [۶-۴، ۲، ۱]، ازجمله مهم‌ترین آن‌ها غلظت‌های بالای اکسیژن و به دنبال آن افزایش رادیکال‌های آزاد است [۷]. دست‌کاری گامت‌ها و جنین در محیط آزمایشگاهی طی روش‌های کمک تولیدمثلی خطر مواجه‌شدن سلول‌ها را با مقادیر زیاد و مخاطره‌آمیز گونه‌های واکنشگر اکسیژن و متعاقباً آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو افزایش خواهد داد [۵]. بهینه‌کردن شرایط کشت آزمایشگاهی به‌منظور پیشگیری از استرس اکسیداتیو، ازجمله نگرانی‌های اصلی در روش‌های کمک تولیدمثلی به‌شمار می‌رود. به‌همین‌منظور مطالعات و تلاش‌های گسترده‌ای در این زمینه انجام گرفته است [۶، ۸، ۹].

سلول‌ها در شرایط طبیعی با استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها، رادیکال‌های آزاد را غیرفعال می‌کنند. این آنتی‌اکسیدانت‌ها حتی در غلظت‌های نسبتاً کم به‌عنوان مهارکننده‌های فیزیولوژیکی مهم فرایند اکسیداسیون ایفای نقش می‌کنند [۱۰]. از این‌رو

* نویسنده مسئول:
دکتر سعید زواره
نشانی: دامغان، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی.
تلفن: ۳۵۲۲۰۲۳۷ (۲۳) ۹۸+
پست الکترونیکی: zavareh.s@du.ac.ir

به‌منظور بهینه‌کردن شرایط کشت و کاهش آسیب‌های ناشی از گونه‌های واکنشگر اکسیژنی، از آنتی‌اکسیدانت‌ها در محیط کشت استفاده شده است تا شرایط آزمایشگاهی را به شرایط طبیعی نزدیک‌تر کنند [۱۱]. در این بین به‌نظر می‌رسد کوانزیم Q_{10} با داشتن شرایط استثنائی و منحصربه‌فرد این قابلیت را داشته باشد و حضور آن در محیط کشت فولیکول‌ها آن‌ها را از گزند آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو در امان دارد [۱۲، ۱۳].

کوانزیم Q_{10} در تمام سلول‌های زنده بدن تولید می‌شود. کوانزیم Q_{10} ماده شبه‌ویتامین و حلال در چربی است که از نظر ساختاری شبیه ویتامین K است. این کوانزیم در بدن عملکردهای مختلفی دارد و به دو فرم اکسید (یوبیکوینون) و احیا (یوبیکوینول) وجود دارد که در مواقع لزوم به آسانی به یکدیگر تبدیل می‌شوند. یوبیکوینون در تولید انرژی داخل سلولی با انتقال الکترون‌ها در زنجیره انتقال الکترون میتوکندری‌ها و کمک به سنتز آدنوزینتری فسفات در غشای آن نقش حیاتی دارد. همچنین منجر به تثبیت غشای سلول، پیشگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و حفظ استحکام و عملکرد سلول میشود [۱۲-۱۵].

سلول‌ها به علت غلظت بالای اسیدهای چرب غیراشباع و سازوکارهای ترمیمی محدود به حمله‌های اکسیداسیونی (پراکسیداسیون لیپیدی) حساس‌اند که درنتیجه سیال‌بودن و تمامیت غشا از دست می‌رود [۱۶]. گونه‌های واکنشگر اکسیژنی طی پراکسیداسیون لیپیدی به غشای سلول و لیپوپروتئین‌ها آسیب وارد می‌کند که به‌نوبه خود عملکرد غشا و پروتئین را تحت تأثیر می‌گذارد [۳]. برای بررسی پراکسیداسیون لیپیدی و ارزیابی استرس اکسیداتیو، از اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدئید استفاده می‌شود. میزان تولید مالون دی‌آلدئید با شکست و تفکیک اسیدهای چرب غیراشباع متناسب است.

از این‌رو اندازه‌گیری مالون دی‌آلدئید شاخص مناسبی برای پراکسیداسیون لیپیدی است. در این روش، مالون دی‌آلدئید با تیوباربیتوریک اسید (TBA–MDA) در محیط اسیدی واکنش می‌دهد و رنگ صورتی ایجاد می‌شود که در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارای جذب بوده و شدت جذب به‌دست‌آمده متناسب با مالون دی‌آلدئید تولیدشده است [۱۷]. مشخص شده است که آنتی‌اکسیدانت‌ها غشای سلول را در برابر پراکسیداسیون لیپیدی محافظت می‌کند [۱۰، ۱۸، ۱۹]. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر یوبیکوینون بر وضعیت پراکسیداسیون لیپیدی و تکوین فولیکول‌های پره‌آنترال موش سوری طی کشت آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

تمام مواد مصرفی در آزمایش حاضر از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich, UK) خریداری شده است، به‌غیراز مواردی که در متن اشاره شده است. محیط‌های کشت نیز با آب دیونیزه (Mili-Q) ساخته شد.

حیوانات آزمایشگاهی

در این مطالعه تجربی از موش‌های ماده نژاد NMRI با سن تقریبی ۱۴ تا ۱۶ روز (تعداد ۸ سر) به دلیل داشتن تخمدان‌هایی فاقد بافت فیبروزه اضافی و تعداد زیاد فولیکول‌های پره‌آنترال استفاده شد. موش‌ها از مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی ایران تهیه و به محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی منتقل و در شرایط مناسب (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی، دمای ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ تا ۵۰درصد رطوبت و آب و غذای کافی) نگهداری شدند.

جداسازی فولیکول‌های پره‌آنترال

موش‌ها به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی قربانی و تخمدان‌ها با ایجاد شکاف طولی در سطح شکم خارج شدند. تخمدان‌ها پس از خارج‌شدن در قطره‌های ۲۰۰ میکرولیتری از محیط کشت α-MEM حاوی ۱۰درصد سرم جنین گاو (FBS)، ۲/۲ g/l سدیم‌بی‌کربنات، ۱۰۰ IU/ml پنی‌سیلین و ۷۵ µg/ml استرپتومایسین که با ۲۵ میلی‌مولار HEPES بافر شده بود، قرار داده شدند. سپس ۳۰ دقیقه در انکوباتور نگهداری شد تا به تعادل برسند. فولیکول‌های پره‌آنترال تخمدان‌ها به روش مکانیکی با استفاده از سوزن ۲۹G در استریو میکروسکوپ (Olympus, Japon) با بزرگ‌نمایی ۲۵ با سرنگ انسولین جدا شدند. پس از جداسازی، فولیکول‌های پره‌آنترال با قطر تقریبی ۱۴۰ تا ۱۶۰ میکرومتر که یک تخمک مرکزی و دو تا سه لایه سلول گرانولوزا و تکا داشتند، سالم تلقی شده (تصویر ۱-A) و برای کشت در شرایط آزمایشگاهی انتخاب و به طور تصادفی به دو گروه کنترل و تیمار با یوبیکوینون تقسیم شدند. آزمایش در دو مرحله انجام شد. ابتدا رشد و تکوین فولیکول‌های پره‌آنترال و سپس به صورت جداگانه تغییرات مالون دی‌آلدئید بررسی شد.

کشت فولیکول‌های پره‌آنترال

فولیکول‌ها درون پتری‌دیش سانتی‌متری حاوی قطرات ۲۵ میکرولیتری از محیط کشت α-MEM، ۵درصد سرم جنینی گاو (FBS)، همچنین حاوی ۰/۱ IU/ml هورمون محرک فولیکول انسانی (hFSH)، یک درصد انسولین و ترنسفرین و سلنیوم (ITS) و ۱۰ ng/ml فاکتور رشد اپیدرمی (FEG)، ۲/۲ g/l سدیم‌بی‌کربنات، ۱۰۰ IU/ml پنیسیلین، ۷۵ µg/ml استرپتومایسین و بر حسب گروه آزمایشی با و یا بدون ۵۰ میکرومولار یوبیکوینون کشت داده شد. محیط کشت فولیکول‌ها یک‌روز درمیان در کل دوره کشت با محیط کشت جدید تعویض شد.

اندازه‌گیری قطر فولیکول‌ها

قطر فولیکول‌ها در روزهای دوم و چهارم پس از شروع کشت با تعیین میانگین دو قطر عمودبرهم بر حسب میکرومتر با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ و با میکروسکوپ اینورت (Nikon) مجهز به

عدسی چشمی کالیبره‌شده اندازه‌گیری شد.

بررسی تغییرات مرفولوژیک و میزان بقا

طی دوره کشت میزان بقای فولیکول‌ها در روزهای ۲ ، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ بررسی شد و فولیکول‌های تیره فاقد تخمک و گروهی که رشد نداشتند به عنوان فولیکول دژنره محسوب شدند. به تشکیل حفره آنتروم توجه شد، به نحوی که در دوره کشت هر فضای مشاهده‌شده بین سلول‌های گرانولوزا به عنوان حفره آنتروم در نظر گرفته شد.

تخمک‌گذاری

القای تخمک‌گذاری در روز دوازدهم با تعویض محیط کشت فولیکول‌ها با محیط کشت حاوی ۱/۵ واحد در میلی‌لیتر گنادوتروپینکوریونیک انسانی (hCG) صورت گرفت. با گذشت ۱۶ تا ۴۸ ساعت میزان تخمک‌گذاری میکروسکوپ اینورت ارزیابی و نرخ تخمک‌گذاری و مراحل تکوینی تخمک‌های آزادشده (MI: تخمک متافاز یک و MII: تخمک متافاز دو) بررسی شد. تخمک‌های آزادشده بر اساس مورفولوژی طبقه‌بندی شدند. به این ترتیب که تخمک متافاز یک تخمکی و هسته ژرمینال وزیکول محو شده بود و تخمک متافاز دو تخمکی و اولین جسم قطبی آن مشخص بود.

بررسی تغییرات مالون دی‌آلدئید (MDA)

برای اندازه‌گیری مالون دی‌آلدئید ابتدا سوپرناتانت سلولی بر اساس روشی که پیشتر گفتیم، آماده شد [۲۰]. فولیکول‌های پره‌آنترال (۱۵ عدد برای هر تکرار) در زمان شروع کشت، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از شروع کشت در میکروتیوب‌های محتوی ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده (۱۰ میلی‌مولار Tris-HCL، ۲۰ میلی‌مولار EDTA و ۰/۲۵ V/V درصد تریتون) جمع‌آوری شد. سپس با استفاده از سونیکاتور با توان ۵۰ وات برای یک دقیقه هموژنیزه و با دور ۱۰۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی به عنوان سوپرناتانت سلولی برای اندازه‌گیری مالون دی‌آلدئید جدا شد.

ارزیابی تغییرات مالون دی‌آلدئید به‌عنوان نشانگر پراکسیداسیون لیپیدی طبق روش اکاوا و همکاران انجام شد [۱۷]. سوپرناتانت سلولی به مخلوط واکنش محتوی ۸/۱درصد سدیم دو دسیل سولفات، ۲۰درصد اسید استیک، ۰/۸درصد تیوباربیتوریک اسید و ۰/۷۶درصد بوتیل‌هیدروکسی‌تولوئن اضافه شد. مخلوط برای یک ساعت تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت دید. پس از سردشدن با دور ۲۰۰۰g برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و با اسپکتوفوتومتر جذب لایه رویی در طول موج ۵۲۳ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد با استفاده از تترامتوکسی‌پروپان رسم شد.

غلظت پروتئین با استفاده از اسپکتوفوتومتر بر اساس روش لوری اندازه‌گیری شد [۲۱]. منحنی استاندارد با استفاده از آلبومین سرم گاوی رسم شد. علظت مالون دی‌آلدئید به صورت نانومولار در میلی‌گرم پروتئین نشان داده شد.

آنالیز آماری

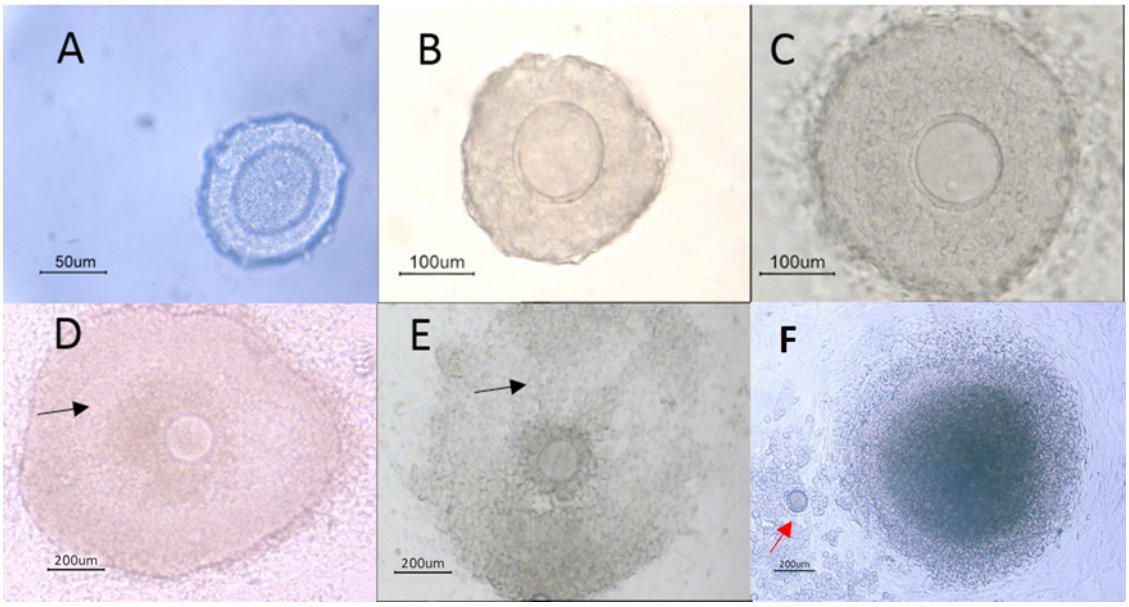
آنالیز آماری با استفاده از نسخه ۱۶ نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. به منظور مقایسه میزان رشد، نرخ بقا، تشکیل حفره آنتروم، تخمک‌گذاری فولیکول‌های پره‌آنترال، تخمک MI و MII و مقدار مالون دی‌آلدئید بین گروه کنترل و تیمار از آزمون t (تی‌استیودنت) مستقل استفاده شد و P<۰/۰۵ به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در روز دوم بعد از شروع کشت به دلیل رشد و تکثیر سلول‌های گرانولوزا، فولیکول‌ها به کف ظرف کشت چسبیده و بی‌حرکت شدند و قطرشان افزایش یافت. میزان تکثیر در روز چهارم کشت بیشتر شد، به‌طوری که شکل ظاهری فولیکول از حالت متقارن خارج و اندازه‌گیری قطر آن دشوار شد. از روز ششم تا هشتم حفره‌هایی در اطراف تخمک به وجود آمد که از روز دهم به هم پیوسته و حفره آنتروم به وجود آمد (تصویر شماره ۱).

تغییرات قطر فولیکول‌های پره‌آنترال در هر دو گروه طی روزهای دوم و چهارم بعد از کشت در تصویر ۲ آمده است. میانگین قطر فولیکول‌های پره‌آنترال در گروه کنترل و تیمار در شروع کشت (روز صفر) به ترتیب ۱۵۴/۰ و ۱۵۲/۱ میکرومتر بود که تفاوت معناداری را نشان نمی‌داد (P>۰/۰۵). در روز دوم کشت میانگین قطر فولیکول‌ها در گروه کنترل (۲۲۹/۲ میکرومتر) به‌طور معناداری کمتر از قطر فولیکول‌ها در گروه تیمار (۲۸۰/۵ میکرومتر) بود (P<۰/۰۵). میانگین قطر فولیکول‌ها در روز چهارم نیز در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری را نشان داد (P<۰/۰۵) (تصویر شماره ۲).

نرخ بقا، تشکیل حفره آنتروم، تخمک‌گذاری و مراحل تکوینی تخمک در گروه کنترل و تیمار در تصویر شماره ۳ آمده است. نرخ بقای فولیکول‌های پره‌آنترال کشت‌داده‌شده در حضور یوبیکوینون (۹۱/۱۱درصد) از لحاظ آماری نسبت به گروه کنترل (۷۵/۷۸درصد) به‌طور معناداری بیشتر بود (P<۰/۰۵). نرخ تشکیل حفره آنتروم نیز در دو گروه کنترل و فولیکول‌های کشت‌داده‌شده در حضور یوبیکوینون به ترتیب عبارت بودند از: ۶۲درصد و ۸۶درصد که تفاوت آماری معناداری بین این دو گروه مشاهده شد (P<۰/۰۵). میزان دستیابی به تخمک‌های بالغ MII در گروه کنترل و تیمار به ترتیب ۳۰/۶۷درصد و ۴۸/۸۹درصد بود. این میزان در دو گروه از لحاظ آماری تفاوت معناداری داشت (تصویر شماره ۴) (P<۰/۰۵).



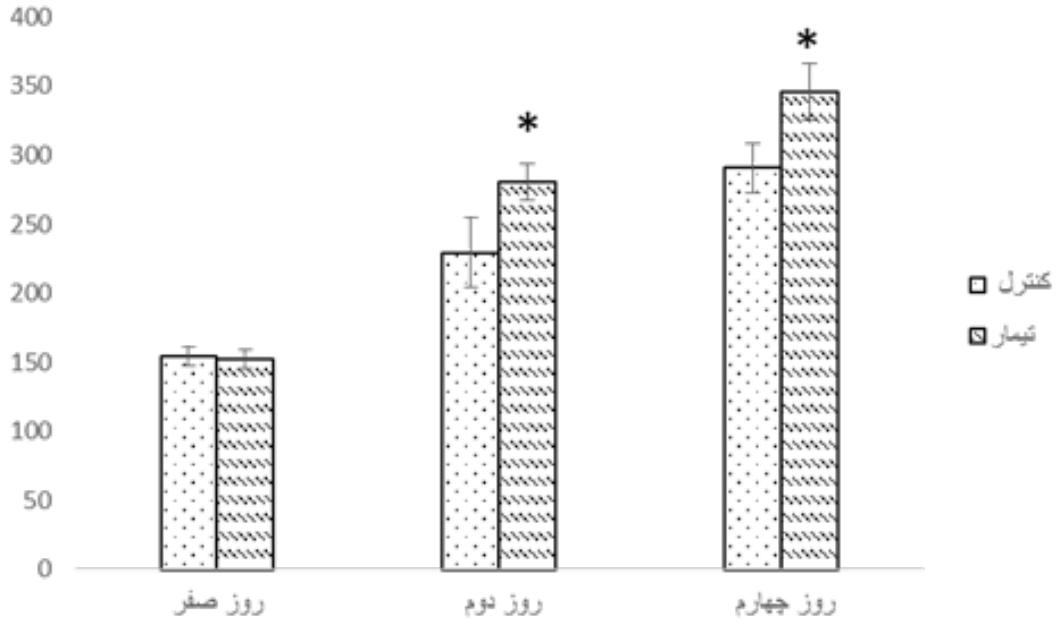
تصویر ۱. فولیکول پره‌آنترال در روزهای مختلف کشت آزمایشگاهی: A: روز اول، B: روز دوم، C: روزچهارم، D: روز هشتم، E: روز بیست‌ویکم و F: روز تخمک‌گذاری. پیکان مشکی نشان‌دهنده حفره آنتروم و پیکان قرمز نشان‌دهنده تخمک آزادشده است.

تغییرات مالون دی‌آلدئید (MDA)

در شروع کشت میزان مالون دی‌آلدئید در دو گروه تفاوت معناداری نداشت (P>۰/۰۵). در ساعت ۲۴، میزان مالون دی‌آلدئید در گروه تیمار با یوبیکوینون به‌طور معناداری کمتر از گروه کنترل بود (P<۰/۰۵). در ساعت‌های ۴۸ و ۷۲ و ۹۶ نیز میزان مالون دی‌آلدئید در گروه تیمار با یوبیکوینون به‌طور معناداری نسبت به گروه کنترل کمتر بود (P<۰/۰۵) (تصویر شماره ۵).

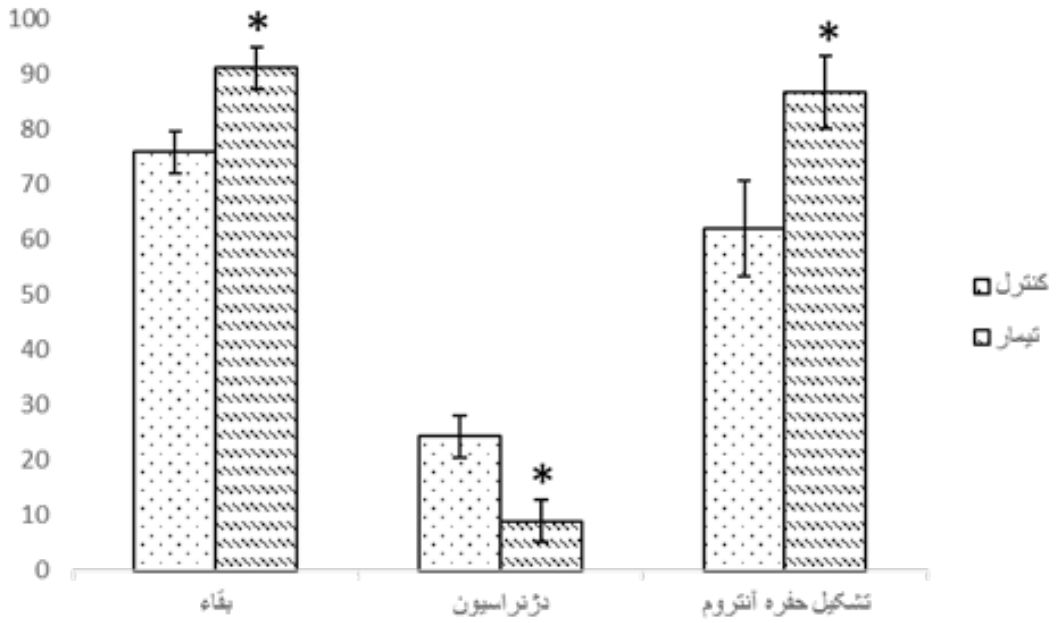
بحث

در تحقیق حاضر از غلظت ۵۰ میکرومولار یوبیکوینون به عنوان آنتی‌اکسیدانت در کشت فولیکول‌های پره‌آنترال موش استفاده شد و میزان رشد و تکوین فولیکول‌ها همراه با تغییرات پراکسیداسیون



تصویر ۲. قطر (میکرومتر) فولیکول‌های پره‌آنترال کشت در حضور یوبیکوینون (تیمار) یا بدون حضور آن (گروه کنترل).

* بیان‌کننده تفاوت معنادار با گروه کنترل است (P<۰/۰۵).

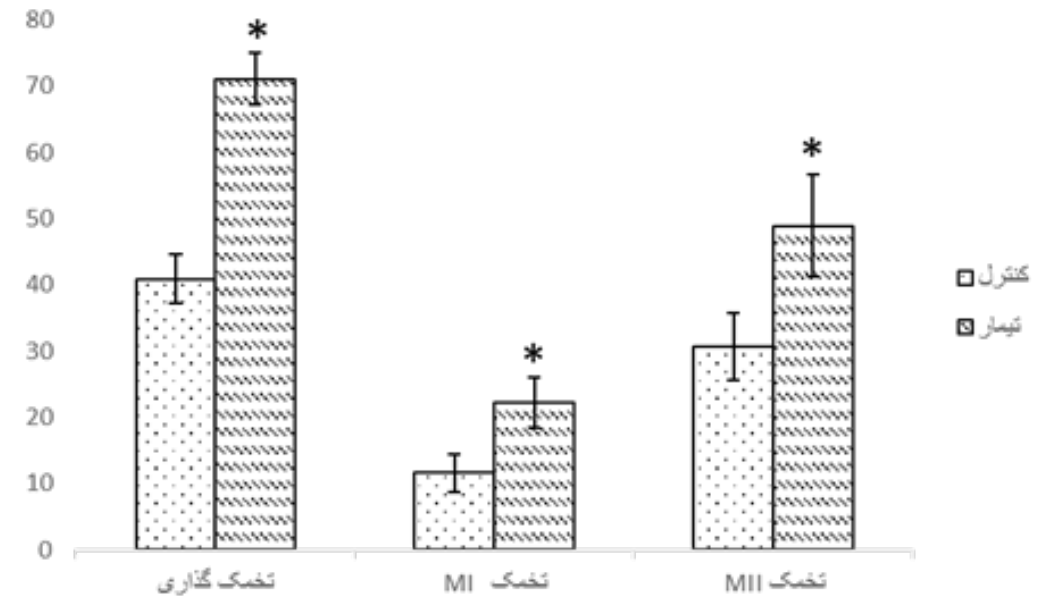


تصویر ۳. نرخ بلوغ فولیکول‌های پره‌آنترال کشت‌شده در حضور یوبیکوینون (تیمار) یا بدون حضور آن (گروه کنترل).

*: بیان‌کننده تفاوت معنادار با گروه کنترل است (P<۰/۰۵).

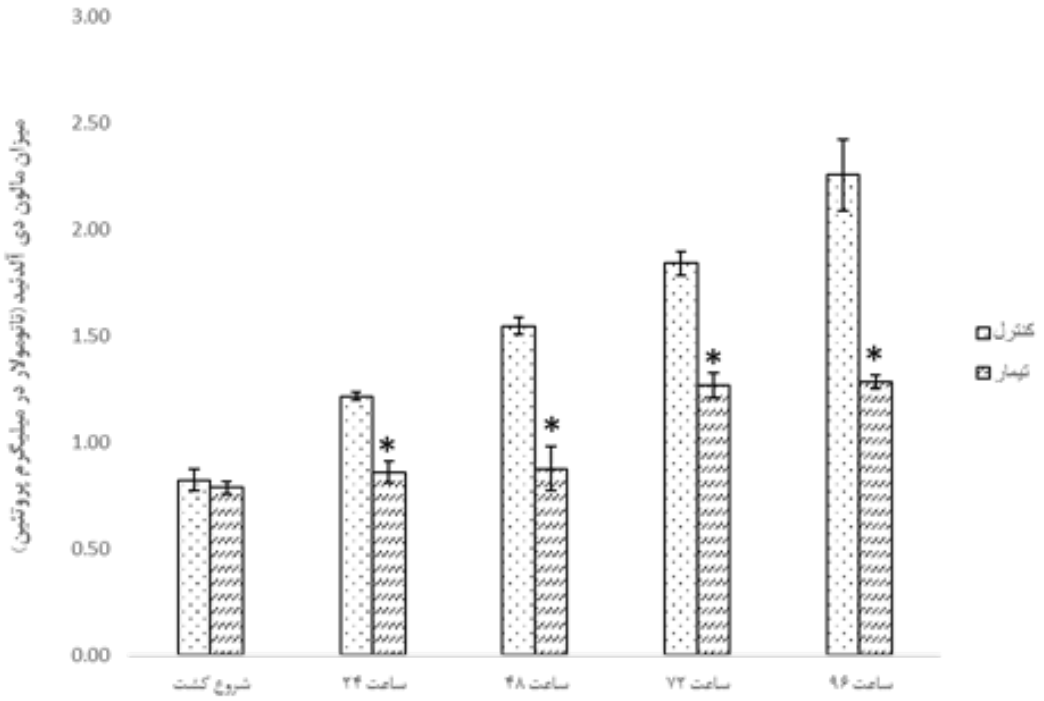
لیپیدی بررسی شد. سلول‌ها طی کشت آزمایشگاهی نسبت به شرایط in vivo با غلظت‌های بالاتر اکسیژن و به دنبال آن افزایش رادیکال‌های آزاد ازجمله گونه‌های واکنشگر اکسیژنی (ROS) مواجه هستند [۵] که منجر به تغییر ویژگی‌های غشا و پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود و درنهایت تمام غشا و اسکلت سلولی تخریب خواهد شد.

حضورنداشتن سیستم آنتی‌اکسیدانتی در شرایط کشت آزمایشگاهی و به دنبال آن شکل‌گیری استرس اکسیداتیو می‌تواند دلیلی منطقی برای اضافه‌کردن آنتی‌اکسیدان‌های مختلف به محیط کشت سلول باشد. از مشخصه‌های یک آنتی‌اکسیدانت توانمند می‌توان به توانایی حذف رادیکال‌های آزاد، میان‌کنش با دیگر آنتی‌اکسیدانت‌ها، فعالیت کیلت فلزات و مهم‌تر از همه



تصویر ۴ . نرخ تخمک‌گذاری فولیکول‌های پره‌آنترال کشت‌شده در حضور یوبیکوینون (تیمار) یا بدون حضور آن (گروه کنترل).

* بیان‌کننده تفاوت معنادار با گروه کنترل است (P<۰/۰۵).



تصویر ۵. تغییرات میزان مالون دی‌آلدئید در گروه کنترل و تیمار با یوبیکوینون در طول دوره کشت آزمایشگاهی.

* بیان‌کننده تفاوت معنادار با گروه کنترل است (P<۰/۰۵).

توانایی جبران آسیب‌های اکسیداتیو اشاره کرد. یوبیکوینون با داشتن تمام این صفات [۱۲، ۲۲، ۲۳] دلیل اصلی انتخاب آن برای پیشبرد رشد فولیکول‌ها در این مطالعه بود.

نتایج مطالعه حاضر بیان‌کننده افزایش میزان بقا و تکوین فولیکول‌های پره‌آنترال جداشده از تخمدان به موازات کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در حضور یوبیکوینون در مقایسه با گروه کنترل بود. یوبیکوینون به عنوان یک انتیاکسیدان عمل کرده و با محدودکردن پراکسیداسیون چربی، رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برد و نقش مهمی در پایداری غشا و سیال‌بودن آن دارد. بررسی‌ها نشان داده است یوبیکوینون کیفیت تخمک و جنین را در زنان نابارور بهبود می‌بخشد [۲۳].

نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر را می‌توان تا حدودی به اثر یوبیکوینون در پاک‌سازی ROS و ممانعت از آسیب اکسداتیو نسبت داد که می‌تواند منجر به تحریک رشد سلول شود، چرا که مشخص شده است افزایش میزان تولید ROS در سلول‌های گرانولوزا اثر مخربی روی لقاح تخمک و کیفیت جنین و نسبت لانه‌گزینی خواهد داشت. همچنین مشخص شده است سلول‌های زاینده در مقایسه با سولهای سوماتیک حساسیت بیشتری به بالارفتن سطح ROS و استرس اکسیداتیو نشان می‌دهند. به‌طوری‌که افزایش سطح ROS موجب کم‌شدن نسبت تکوین جنین و تشکیل بلاستوسیت‌ها خواهد شد [۲۴]. از طرف دیگر یوبیکوینون یک کوفاکتور ضروری در زنجیره انتقال الکترون است که نقش آنتی‌اکسیدانتی آن به عنوان مهارکننده پراکسیداسیون چربی در مطالعات مختلفی به اثبات رسیده است. یوبیکوینون پراکسیداسیون چربی‌های غشای سلولی و لیپیدهای لیپوپروتئین‌ها را مهار می‌کند [۱۵، ۲۵].

مطالعات دیگران تأثیر مثبت آنتی‌اکسیدانت‌های متفاوت را در محیط کشت نشان داده‌اند. در این راستا، موری در کشت فولیکول‌های موش از آسکوربیک اسید استفاده کرد و بیان داشت که شانس بقا به دنبال کاهش دژنراسیون و قطعه‌قطعه‌شدن DNA در این فولیکول‌ها بیشتر می‌شود [۸]. عبداللهی و همکاران در مطالعه‌ای پس از انجماد بافت تخمدان و کشت فولیکول‌های جداشده در حضور آنتی‌اکسیدانت سدیم سیلینت، کاهش میزان گونه‌های واکنشگر اکسیژنی را نشان دادند که موجب بهبود شرایط کشت شد [۲۶]. پاپیس و همکاران نشان دادند ملاتونین تکوین جنین گاوی را در محیطی با غلظت بالای اکسیژن و رادیکال‌های اکسیژنی بهبود می‌بخشد [۲۷].

گنجی و همکاران نشان دادند ملاتونین سطوح ROS را در تخمک کاهش داده و سبب افزایش نرخ بلوغ تخمک‌ها می‌شود [۲۸]. حاتمی و همکاران نیز اثر آنتی‌اکسیدانی آلفالیپوییک اسید (ALA) را بر تکوین فولیکول‌های انجمادی بررسی کردند و نشان دادند آلفالیپوییک اسید می‌تواند میزان بقا و تشکیل حفره آنتروم و تخمک‌های MII فولیکول‌های پره‌آنترال را بعد از

کشت آزمایشگاهی طولانی‌مدت بهبود بخشد [۲۰,۲۹]. طالبی و همکاران در مطالعه‌ای مشابه از توانمندی‌های آلفالیپوییک اسید برای بهینه‌کردن شرایط کشت آزمایشگاهی فولیکول‌های پره‌آنترال استفاده کردند و نشان دادند حضور این آنتی‌اکسیدانت می‌تواند تا حد مناسبی میزان گونه‌های واکنشگر اکسیژنی را کاهش داده و درمقابل ظرفیت آنتی‌اکسیدانت کل را در فولیکول‌های کشت‌شده ارتقا بخشد [۲۴].

یافته‌های تحقیق حاضر در تأیید مطالعات انجام‌شده نشان داد حضور یک آنتی‌اکسیدانت توانمند در محیط کشت فولیکول‌های پره‌آنترال، شرایط کشت را بهبود می‌بخشد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر، یوبیکوینون با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی منجر به بهبود شرایط کشت و افزایش نرخ رشد و تکوین فولیکول‌های پره‌آنترال موش سوری می‌شود. به منظور درک بهتر عملکرد یوبیکوینون، پیشنهاد می‌شود بررسی‌های بیشتری در ارتباط با اثر یوبیکوینون بر عملکرد میتوکندری و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی ازجمله سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و غیره، انجام شود تا ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کلو مسیرهای آپوپتوزی طی دوره کشت آزمایشگاهی فولیکول‌های پره‌آنترال مشخص شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد خانم رویا هدایتی کشکا گرفته شده است که در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه جامع دامغان اجرا شد. بدین‌وسیله از زحمات آقای کوشا، کارشناس آزمایشگاه، قدردانی می‌شود.

References

[1] Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. Reproductive Biology & Endocrinology. 2005; 3:28. doi: 10.1186/1477-7827-3-28

[2] Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. Fertility and Sterility. 2006; 86(3):503-12. PMID: 16860798

[3] Ashok Shinde JG, Pankaja Naik. Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: A review. Journal of Dental & Allied Sciences. 2012; 1(2):63-72. doi: 10.4103/2277-4696.159144

[4] Nasr-Esfahani MH, Aitken JR, Johnson MH. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo. Development. 1990; 109(2):501-07. PMID: 2401209

[5] Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. Current Opinion in Obstetrics and Gynecology. 2006; 18(3):325-32. doi: 10.1097/01.gco.0000193003.58158.4e

[6] Combelles CM, Gupta S, Agarwal A. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? Reproductive Biomedicine Online. 2009; 18(6):864-80. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60038-7

[7] Gupta S, Malhotra N, Sharma D, Chandra A, Ashok A. Oxidative stress and its role in female infertility and assisted reproduction: clinical implications. International Journal of Fertility & Sterility. 2009; 2(4):147-64.

[8] Murray AA, Swales AK, Smith RE, Molinek MD, Hillier SG, Spears N. Follicular growth and oocyte competence in the in vitro cultured mouse follicle: effects of gonadotrophins and steroids. Molecular Human Reproduction. 2008; 14(2):75-83. doi: 10.1093/molehr/gam092

[9] Gupta S, Sekhon L, Kim Y, Agarwal A. The role of oxidative stress and antioxidants in assisted reproduction. Current Women's Health Reviews. 2010; 6(3):227-38. doi: 10.2174/157340410792007046

[10] Halliwell B. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. Biomedical Journal. 2014; 37(3):99-105. doi: 10.4103/2319-4170.128725

[11] Zavareh S, Talebi A, Hasanzadeh H. Amending in vitro culture condition to overcome oxidative stress in assisted reproduction techniques (ART). Journal of Paramedical Sciences. 2015; 6(2):135-48.

[12] Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q10. Journal of the American College of Nutrition. 2001; 20(6):591-98. doi: 10.1080/07315724.2001.10719063

[13] Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2004; 1660(1–2):171-99. doi: 10.1016/j.bbamem.2003.11.012

[14] Ahmadvand H, Mabuchi H, Nohara A, Kobayahi J, Kawashiri MA. Effects of Coenzyme Q10 on LDL Oxidation In vitro. Acta Medica Iranica. 2013; 51(1):12-18.

[15] Littarru GP, Tiano L. Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: Recent developments. Molecular Biotechnology. 2007; 37(1):31-37. doi: 10.1007/s12033-007-0052-y

[16] Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in

equine spermatozoa. Journal of Andrology. 2003; 24(4):621-28. doi: 10.1002/j.1939-4640.2003.tb02714.x

[17] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry. 1979; 95(2):351-58. doi: 10.1016/0003-2697(79)90738-3

[18] Halliwell B. The antioxidant paradox. Lancet. 2000; 355(9210):1179-180. doi: 10.1016/s0140-6736(00)02075-4

[19] Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? British Journal of Pharmacology. 2004; 142(2):231-55. doi: 10.1038/sj.bjp.0705776

[20] Hatami S, Zavareh S, Salehnia M, Lashkar Bolouki T, Karimi I. Comparison of oxidative status of mouse pre-antral follicles derived from vitrified whole ovarian tissue and vitrified pre-antral follicles in the presence of alpha lipoic acid. Journal of Obstetrics & Gynaecology Research. 2014; 40(6):1680-688. doi: 10.1111/jog.12394

[21] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biology Chemistry. 1951; 193(1):265-75. PMID: 14907713

[22] Hosseinzadeh E, Zavareh S, Lashkarboluki T. Coenzyme Q10 improves developmental competence of mice pre-antral follicle derived from vitrified ovary. Journal of Paramedical Sciences. 2015; 6(2):65-71.

[23] Turi A, Giannubilo SR, Brugè F, Principi F, Battistoni S, Santoni F, et al. Coenzyme Q10 content in follicular fluid and its relationship with oocyte fertilization and embryo grading. Archives of Gynecology and Obstetrics. 2012; 285(4):1173-176. doi: 10.1007/s00404-011-2169-2

[24] Talebi A, Zavareh S, Kashani MH, Lashgarbluki T, Karimi I. The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. Journal of Assisted Reproduction & Genetics. 2012; 29(2):175-83. doi: 10.1007/s10815-011-9706-6

[25] Alleva R, Tomassetti M, Battino M, Curatola G, Littarru G, Folkers K. Role of CoQ10 in preventing peroxidation of LDL subfraction. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1995; 92(2):9388-391. doi: 10.1073/pnas.92.20.9388

[26] Abedelahi A, Salehnia M, Allameh A, Davoodi D. Sodium selenite improves the in vitro follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxide activity. Human Reproduction. 2010; 25(4):977-85. doi: 10.1093/humrep/deq002

[27] Papis K, Poleszczuk O, Wenta-Muchalska E, Modlinski JA. Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration. Journal of Pineal Research. 2007; 43(4):321-26. doi: 10.1111/j.1600-079x.2007.00479.x

[28] Ganji R, Nabiuni M, Faraji R. Development of Mouse Preantral Follicle after In Vitro Culture in A Medium Containing Melatonin. Cell. 2015; 16(4):546-53. PMCID: PMC4297493

[29] Hatami S, Zavareh S, Salehnia M, Lashkarbolouki T, Ghorbanian MT, Karimi I. The impact of alpha lipoic acid on developmental competence of mouse vitrified pre-antral follicles in comparison to those isolated from vitrified ovaries. Iranian Journal of Reproductive Medicine. 2014; 12(1):57-64. PMCID: PMC4009583