

اثر تمپول به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت سنتتیک بر رویان‌های موش سوری در شرایط تنش اکسیداتیو

عباس احمدی*، رجبعلی صدرخانلو

- گروه بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

زمینه و هدف: استرس اکسیداتیو می‌تواند از دلایل توقف رشد جنین در خارج از رحم باشد که منجر به از بین رفتن در اثر نکروز یا مرگ برنامه‌ریزی شده می‌شود. در بدن مکانیسم‌های متعددی برای محافظت جنین در برابر ROS وجود دارد؛ ولی در شرایط آزمایشگاهی این سیستم دفاعی وجود ندارد و میزان تولید رادیکال‌های آزاد نیز بیشتر است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانتی تمپول به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت سینتتیک قابل نفوذ بر روند رشد رویان‌های موش سوری در شرایط کشت آزمایشگاهی در دو حالت طبیعی و تنش اکسیداتیو است.

روش بررسی: بعد از انجام لقاح آزمایشگاهی زیگوتها در محیط HTF حاوی 4 mg/ml BSA در گروه‌های مختلف کشت داده شدند. برای بررسی اثر استرس اکسیداتیو، زیگوتها به مدت یک ساعت در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف H_2O_2 کشت داده و بعد از شستشو به محیط کشت منتقل شدند و برای مطالعه اثر تمپول بر روند رشد جنین در شرایط تنش اکسیداتیو زیگوتها بعد از کشت در محیط کشت حاوی $10\ \mu\text{M}$ H_2O_2 ، در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف تمپول کشت داده شدند و اثر تمپول بر روند رشد جنینها با افزودن غلظت‌های مختلف آن به محیط کشت بدون تنش اکسیداتیو بررسی شد. داده‌ها توسط روش آماری مقایسه بین نسبتها و ANOVA مورد آنالیز قرار گرفت ($p < 0.05$).

نتایج: نتایج نشان داد که رشد جنینها پس از قرار گرفتن کوتاه مدت در معرض H_2O_2 به طور کاملاً معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت که در غلظت‌های بالا مشخص‌تر بود. تمپول به میزان کمی آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو را مهار نمود. در شرایط نرمال تمپول باعث بهبود روند رشد جنینی و کیفیت جنینها و سبب افزایش معنی‌دار درصد جنین‌های دوسلولی (از $91/78\%$ در گروه کنترل تا $96/99\%$ در محیط کشت حاوی غلظت $0/5\ \mu\text{M}$ تمپول)، درصد بلاستوسیستها (از $67/80\%$ در گروه کنترل تا $81/33\%$ در محیط کشت حاوی غلظت $0/5\ \mu\text{M}$ تمپول) و کاهش معنی‌دار توقف جنینی (از $32/19\%$ در گروه کنترل به $18/67\%$ در محیط کشت حاوی غلظت $0/5\ \mu\text{M}$ تمپول) و افزایش معنی‌دار میزان تسهیم و بهبود مورفولوژی جنین‌های کشت داده شده در مقایسه با گروه کنترل گردید. **نتیجه‌گیری:** رادیکال‌های آزاد اکسیژن از علل توقف رشد جنین‌های کشت آزمایشگاهی است. برای مقابله با اثرات سوء ROS در سیستم‌های کشت جنین از آنتی‌اکسیدان‌های گوناگونی می‌توان استفاده کرد. عدم نفوذپذیری مناسب این آنتی‌اکسیدانتها مانع عملکرد مناسب آنها می‌شود. این مطالعه نشان داد افزودن تمپول به عنوان یک آنتی-اکسیدانت سینتتیک قابل نفوذ باعث بهبود روند رشد جنین می‌شود. براساس یافته‌های این مطالعه افزودن آنتی-اکسیدانت‌های قابل نفوذ نظیر تمپول به محیط کشت‌های جنینی جهت جلوگیری از آسیبها در روند رشد جنین توصیه می‌شود.

* مسئول مکاتبه: عباس احمدی،
بخش علوم تشریح، دانشکده
دامپزشکی، دانشگاه ارومیه،
ارومیه، ایران، صندوق پستی:
۵۷۱۵۵-۱۱۷۷

رایا نامه:
abbasahmadi60@yahoo.com
دریافت: ۸۹/۵/۲۳
پذیرش: ۸۹/۶/۱۶

کلید واژگان: آنتی‌اکسیدانت سینتتیک، تمپول، تنش اکسیداتیو، رادیکال‌های آزاد اکسیژن، رشد جنین، زیگوت، موش سوری.

نحوه استناد به این مقاله: احمدی عباس، صدرخانلو رجبعلی. اثر تمپول به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت سنتتیک بر رویان‌های موش سوری در شرایط تنش اکسیداتیو. فصلنامه باروری و ناباروری: سال ۱۱ (۱۳۸۹)، شماره زمستان ۸۹، صفحات: ۲۴۹-۲۳۹.

زمینه و هدف

استرس اکسیداتیو در علم زیست شناسی به طور کلی برای بیان شرایطی به کار می‌رود که میزان اکسیدانها بالا باشد و یا میزان آنتی‌اکسیدانها در سلول کم باشد؛ این شرایط بگونه‌ای است که در آن غلظت رادیکال‌های آزاد اکسیژن بالاتر از سطوح بیولوژیک می‌باشد (۱،۲). تغییرات اکسیداتیوی اجزاء سلول در طی اثر رادیکال‌های آزاد اکسیژن یکی از فرآیندهای آسیب‌رسان بالقوه بسیار مخرب در عملکرد سلول است که ممکن است منجر به مرگ سلول از طریق نکروز یا مرگ برنامه‌ریزی شده گردد (۳،۴). در شرایط کشت آزمایشگاهی، غلظت اکسیژن در مقایسه با شرایط داخل بدن به مراتب بیشتر است و این امر سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در شرایط کشت آزمایشگاهی می‌شود (۵). رادیکال‌های آزاد اکسیژن در محیط کشت می‌توانند رشد جنینی، میزان آبستنی کلینیکی و سطح باروری را تحت‌تاثیر قرار دهند. در هر دو برنامه لقاح خارج رحمی (IVF)^۱ و تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)^۲، مشخص شد که بالا بردن غلظت ROS در محیط کشت در روز اول با کاهش میزان بارداری ارتباط دارد (۶). با رعایت این مسئله، در برنامه‌های لقاح آزمایشگاهی - انتقال جنین انسان، این نظریه وجود دارد که در حضور غلظت بالای اکسیژن در سیستم کشت آزمایشگاهی تعداد جنین‌های با کیفیت رشد خوب کم خواهد بود (۷-۸). Yoneda و همکاران اثرات افزایش غلظت اکسیژن و H_2O_2 را بر کیفیت جنین گزارش کرده و نشان دادند که کاهش سطح H_2O_2 در شرایط محیط کشت موجب بهبود کیفیت جنین در مرحله بلاستوسیست می‌شود (۹،۱۰). علاوه بر این، ارتباط مستقیم بین غلظت بالای پراکسید هیدروژن و بالا رفتن درجه فراگامتاسیون یا مرگ برنامه‌ریزی شده در جنین‌های موش نشان داده شده است (۸،۱۱). Wang و همکاران گزارش کردند که افزودن آنتی‌اکسیدانها نسبت تکوین بلاستوسیست را در جنین‌های موش بهبود می‌بخشد (۱۲). Catt و همکاران نشان دادند که استفاده از آنتی‌اکسیدان در محیط کشت باعث

بهبود نسبت باروری و افزایش لانه‌گزینی می‌شود (۱۱). اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد توسط سیستم آنتی‌اکسیدان درون سلولی مانند گلوکاتینون، اسیدآسکوربیک و آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتینون پراکسیداز کنترل و یا مهار می‌گردد (۱۳). با این وجود به نظر می‌رسد که در شرایط کشت آزمایشگاهی جنین‌های پستانداران، میزان تولید این رادیکال‌های آزاد بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این جنینها می‌باشد؛ لذا به منظور غلبه بر این عدم تعادل اکسیدانی انواع آنتی‌اکسیدان‌های با منشا خارجی پیش‌بینی و ارائه گردیده‌اند (۱۴). از سوی دیگر به نظر می‌رسد که توان دفاع آنتی‌اکسیدانی جنین‌های آزمایشگاهی در مقاطع مختلف تکوین تا مرحله بلاستوسیست متفاوت باشد. گروهی از محققین معتقدند که ظرفیت اصلی آنتی‌اکسیدانی جنینها در مراحل اولیه تقسیمات زیگوت وابسته به ذخیره mRNA مادری به ارث رسیده درون تخمک می‌باشد و تدریجاً در مرحله فعالیت ژنوم جنینی (ZGA)^۳ است که ژنوم جنین قادر به فعالیت متقابل در مقابل اکسیدان‌های تولید شده درون سلول و یا محیط کشت می‌گردد. لذا به نظر می‌رسد که نیاز خاص جنین به آنتی‌اکسیدان‌های خارجی در مقاطع قبل و بعد از فعال شدن ژنوم زیگوت متفاوت باشد (۱۵).

اگرچه آنتی‌اکسیدان‌های با منشا خارجی نقش بسیار مهمی در تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌های زنده دارند، عدم نفوذپذیری سلول‌های زنده نسبت به اکثر این آنتی‌اکسیدانها مانع عملکرد مناسب آنها در حذف رادیکال‌های آزاد تولید شده در درون سلولها می‌شود (۱۴). لذا در دهه اخیر تلاش‌های زیادی در جهت تولید آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک قابل جذب و یا نفوذپذیر انجام پذیرفته است. تمپول (TEMPOL)^۴ یک ملکول کوچک قابل نفوذ به داخل سلولی سوپراکسید دیسموتازمیتیک است و باعث تقلیل آنیون سوپراکساید و پراکسی‌نیتريت ایجاد کننده آماس می‌گردد. ولی تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر توان این آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک در افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی جنین‌های

3- Zygote Genomic Activation

4- 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl

1- In vitro Fertilization

2- Intra Cytoplasmic Sperm Injection

تخمک‌گذاری معمولاً ۱۲-۱۰ ساعت بعد از تزریق hCG صورت می‌گیرد.

لقاح آزمایشگاهی: ابتدا برای تهیه اسپرم، موش نر را به روش جابجایی گردن کشته و بعد از جدا کردن بافت‌های همبندی اطراف دم اپیدیدیم را همراه با مقداری از کانال دفران از بیضه جدا کرده و در داخل پتری‌دیش ۶cm حاوی محیط کشت HTF حاوی BSA 4 mg/ml ، که قبلاً جهت تعادل در داخل انکوباتور قرار داده شده بود قرار داده و بعد از ایجاد چند برش در دم اپیدیدیم و فشار در کانال دفران برای خروج اسپرمها در داخل انکوباتور CO₂ گذاشته شد. بعد از ۰/۵ ساعت اسپرمها خارج و در محیط پخش شدند، سپس اسپرمها را شستشو داده و با استفاده از روش شناورسازی^۵ اسپرم‌های متحرک را جدا نموده و جهت ظرفیت‌یابی، اسپرمها به مدت یک ساعت در انکوباتور CO₂ با دمای 37°C قرار داده شدند (۱۶).

تخمک‌گیری و لقاح داخل آزمایشگاهی: ۱۲-۱۰ ساعت پس از تزریق hCG (صبح روز بعد) بعد از کشتن حیوان به روش جابجایی گردن، لوله‌های رحمی را جدا کرده و در داخل محیط کشت HTF حاوی BSA (Sigma, USA) 4 mg/ml و حاوی Hepes، ۳۷ درجه از قبل آماده شده قرار داده شد و با استفاده از روش‌های آنزیمی و مکانیکی^۱ تخمکها را از سلول‌های گرانولوزا جدا نموده و پس از شستشو تخمکها را به قطرات محیط لقاح در زیر روغن معدنی حاوی محیط کشت HTF حاوی BSA 4 mg/ml منتقل کرده و سپس اسپرمها را به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت، اضافه شد. عمل لقاح حدود ۶-۵ ساعت بعد از اضافه کردن اسپرم صورت می‌گیرد و بدین ترتیب زیگوت به دست آمد (۱۶).

گروه‌های آزمایشی: در ادامه تحقیق زیگوت‌های شستشو داده شده حاصل از لقاح آزمایشگاهی در محیط کشت HTF حاوی BSA 4 mg/ml به طور تصادفی در گروه‌های مختلف آزمایشی تقسیم گردید که بعد از شستشو در دو قطره از محیط کشت گروه مربوطه به تعداد ۲۰ جنین در داخل قطرات

آزمایشگاهی ارائه نگردیده است. لذا با توجه به اهمیت فوق‌العاده افزایش کیفیت و کمیت تولید جنین‌های آزمایشگاهی، مطالعه اخیر به عنوان اولین مطالعه در نوع خود، به بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی ماده تمپول به عنوان یک آنتی‌اکسیدان سنتتیک در طی کشت آزمایشگاهی جنین‌های موش سوری در شرایط تنش‌اکسیداتیو می‌پردازد.

روش بررسی

مواد و تجهیزات: برای تهیه محیط کشت HTF PMSG (Sigma, USA)^۱، Folligon (Netherland)^۲ hCG، BSA (Folligon, Netherland)^۳، پتری‌دیش ۶cm (Falcon, USA)، روغن معدنی^۴ (Sigma, USA)، هیدروژن پراکسید (Sigma, USA) (H₂O₂)، تمپول (Sigma, USA) (USA)، پی‌پت پاستور بلند (Portugal, Normax)، لوله ۵ml و انکوباتور CO₂ (BD, Falcon, USA) ۱۰، استریومیکروسکوپ (Olympus, Japan)، میکروسکوپ اینورت (Olympus, Japan) مواد مورد نیاز می‌باشد.

برای انجام این مطالعه از موش‌های سوری نژاد NMRI ماده بارور جوان ۱۰-۶ هفته‌ای و نر ۱۲-۸ هفته که از موسسه پاستور تهیه و در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی بخش جنین‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه نگهداری می‌شدند استفاده شد که در شرایط استاندارد با دمای $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ، رطوبت ۶۰-۳۰٪ و با سیکل نوری، ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند. آب و غذا به صورت آزاد در دسترس بود.

این مطالعه روی جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی صورت گرفت که نیاز به تحریک تخمک‌گذاری دارد و به شرح زیر صورت گرفت:

تزریق ۷/۵ واحد هورمون PMSG به حجم ۰/۸ml و ۴۸-۶ ساعت بعد تزریق ۷/۵ واحد هورمون hCG به حجم ۰/۸ml به روش داخل صفاقی صورت گرفت. عمل

- 1- Pregnant Mare Serum Gonadotropine
- 2- Human Chorionic Gonadotropine
- 3- Bovine Serum Albumin
- 4- Mineral oil

5- Swim up
6- Dissecting

کیفیت جنینها و تعداد جنین‌های رشد کرده، درصد جنین‌های دوسلولی، میزان جنین‌های متوقف شده و درصد بلاستوسیست‌های ایجاد شده در طی ۱۲۰ ساعت در هر گروه مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین برای بررسی کیفیت رشد جنینی و میزان تسهیم^۱ بلاستوسیست‌های بدست آمده در گروه‌های مختلف، شمارش تعداد سلولی به ازای هر جنین با استفاده از روش air dry technique of Tarkowski صورت پذیرفت (۱۸).

لازم به ذکر است آزمایش‌های هر گروه در ۵ مرحله تکرار شد و مجموع نتایج حاصل از این ۵ مرحله مورد آنالیز آماری قرار گرفت. آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم افزار Minitab (Minitab Co., USA) و روش مقایسه نسبتها با $p < 0/05$ مورد آنالیز قرار گرفت و نتایج به صورت درصد در نمودارها و جدول مربوطه آورده شد و مقایسه تمایز و تعداد سلول‌های موجود به ازای هر جنین بین گروه‌های مختلف توسط نرم افزار SPSS (IBM Co. USA) ویرایش ۱۶ و روش آماری One way ANOVA و تست تعقیبی Tukey با $p < 0/05$ مورد مقایسه قرار گرفته و میانگین و انحراف معیار آنها به دست آمده و در نمودار مربوطه آورده شد.

نتایج

نتایج حاصل از افزودن غلظت‌های مختلف تمپول به محیط کشت در شرایط عادی و بدون تنش اکسیداتیو و مقایسه کیفیت رشد جنینها با گروه کنترل نشان داد، افزودن تمپول به محیط کشت باعث افزایش کیفیت رشد جنینها و مورفولوژی آنها شد (شکل ۱-ب). بررسی اثر تمپول بر درصد جنین‌های دو سلولی در مقایسه با گروه کنترل نشان داد در حضور تمپول در محیط کشت درصد جنین‌های دو سلولی در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشت که این افزایش از نظر آماری فقط در غلظت ۰/۵ میکرومول تمپول معنی دار بود (جدول ۱). مقایسه درصد بلاستوسیستها نشان داد، افزودن تمپول به محیط کشت جنینها باعث افزایش قابل توجه و کاملاً معنی دار درصد بلاستوسیستها در مقایسه با

۱۰۰ μl در زیر روغن معدنی کشت داده شدند. جهت ایجاد استرس اکسیداتیو در زیگوتها از افزودن غلظت‌های مختلف هیدروژن پراکسید (H_2O_2) به محیط کشت و انکوباسیون به مدت یک ساعت استفاده شد سپس زیگوتها به قطرات کشت گروه‌های مختلف منتقل شدند و در مراحل بعدی ارزیابی جنینها صورت گرفت.

گروه‌های آزمایشی مورد مطالعه

- گروه کنترل که زیگوتها تنها در محیط کشت HTF حاوی BSA 8 mg/ml کشت داده شدند.
- گروه‌هایی که زیگوتها جهت ایجاد تنش اکسیداتیو به مدت یک ساعت در محیط کشت حاوی غلظت‌های پراکسید هیدروژن 50 ، 100 ، $250 \mu\text{M}$ و $500 \mu\text{M}$ کشت داده شدند.
- گروه‌هایی که به محیط کشت غلظت‌های 10 ، 1 ، $0/5$ ، $0/2$ ، $0/1 \mu\text{M}$ تمپول اضافه شد.
- گروه‌هایی که زیگوتها ابتدا جهت ایجاد تنش اکسیداتیو در آنها به مدت ۱ ساعت در محیط کشت حاوی 10 میکرومول پراکسید هیدروژن کشت داده شده و در مرحله بعدی به محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های $0/2$ ، $0/1 \mu\text{M}$ تمپول منتقل شدند.

ارزیابی رشد جنینها: برای ارزیابی تاثیر تنش اکسیداتیو و اثر آنتی‌اکسیدان‌تی مواد مذکور در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست مراحل رشد جنینی مورد ارزیابی قرار گرفت، بررسی میزان تسهیم ۳۶ ساعت بعد از کشت صورت گرفته و در زیگوت‌های موجود در هر گروه، جنینها از نظر میزان فراگمانتاسیون و میزان طی مراحل رشد جنینی یا تعداد جنین‌های متوقف شده و مورفولوژی جنین‌های متوقف شده با توجه به فاکتورهای مختلفی نظیر لیز شدن جنینها و نکروتیک بودن آنها و فراگمانتاسیون و وجود وزیکول‌های سیتوپلاسمی مقایسه گردیدند. درجه بندی جنین‌های متوقف شده به شرح ذیل می‌باشد: درجه I جنین‌های دارای بلاستومرهای لیز، فراگمانته شدن و نکروتیک بودن کامل، درجه II جنین‌های با لیز و فراگمانته شدن در تعدادی از بلاستومرها، درجه III جنین‌های با تعداد کمی بلاستومرهای لیز و فراگمانته و ویزیکیول سیتوپلاسمی (۱۷).

1- Cleavage rate

جدول ۱. مقایسه گروه‌های مختلف از نظر درصد جنین‌های دوسلولی (۳۶ ساعت بعد از کشت زیگوتها) و بلاستوسیست (۱۲۰ ساعت بعد از کشت زیگوتها) و میانگین تعداد سلولها به ازای هر جنین در شرایط نرمال (بدون تنش اکسیداتیو).

گروه‌های آزمایشی	تعداد کل جنینها در هر گروه	جنین دو سلولی (تعداد درصد)	بلاستوسیست (تعداد درصد)	تعداد سلول به ازای هر جنین (میانگین ± انحراف معیار)
کنترل تعداد (%)	۱۴۶	۱۳۴ (۹۱/۷۸)	۹۹ (۶۷/۸۰)	۸۶/۶۰ ± ۱/۵۱
تمپول ۰/۱ μM	۱۷۰	۱۵۶ (۹۱/۷۶)	۱۱۵ (۶۷/۶۵)	۸۸/۳۰ ± ۱/۴۰
تمپول ۰/۲ μM	۱۷۵	۱۶۶ (۹۴/۸۵)	۱۳۹ (۷۹/۴۳) a	۹۵/۶۵ ± ۱/۴۰ a
تمپول ۰/۵ μM	۱۶۶	۱۶۱ (۹۶/۹۹) a	۱۳۵ (۸۱/۳۳) a	۹۶/۳۳ ± ۱/۹۸ a
تمپول ۱ μM	۱۵۹	۱۵۰ (۹۴/۳۳)	۱۲۸ (۸۰/۵۰) a	۹۳/۹۶ ± ۱/۶۱ a
تمپول ۱۰ μM	۱۷۴	۱۶۴ (۹۴/۲۵)	۱۴۰ (۸۰/۴۶) a	۹۴/۳۲ ± ۱/۷۸ a

معنی‌دار بودن گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل با a نشان داده شده است (p < ۰/۰۵)

درصد جنین‌های متوقف شده نشان داد که افزودن غلظت‌های مختلف تمپول باعث کاهش کاملاً معنی‌دار تعداد جنین‌های متوقف شده در مقایسه با گروه کنترل می‌شود و جنین‌های متوقف شده در حضور تمپول اکثراً از درجه III با لیز و فراگمانتاسیون کم در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد و این کاهش توقف جنین و درجه توقف جنینی از نظر آماری کاملاً معنی‌دار بوده که نشان می‌دهد افزودن تمپول سبب کاهش میزان لیز و فراگمانته شدن شده است (جدول ۳).

گروه کنترل شده است و این افزایش در غلظت‌های ۰/۲ μM، ۰/۵، ۱ و ۱۰ تمپول کاملاً قابل توجه بوده و از نظر آماری معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج حاصل از شمارش سلولها به ازای هر جنین نشان داد افزودن تمپول سبب افزایش کاملاً معنی‌دار تعداد سلولها به ازای هر جنین در مقایسه با گروه کنترل می‌شود که این نشان دهنده تاثیر مثبت افزودن تمپول بعنوان یک آنتی‌اکسیدانت به محیط کشت جنینی روی افزایش کیفیت رشد جنینها و تسهیم بوده است (جدول ۱). مقایسه

جدول ۲. مقایسه گروه‌های مختلف از نظر درصد جنین‌های دو سلولی (۳۶ ساعت بعد از کشت زیگوتها) و بلاستوسیست (۱۲۰ ساعت بعد از کشت زیگوتها) و میانگین تعداد سلولها به ازای هر جنین در شرایط تنش اکسیداتیو

گروه‌های آزمایشی	تعداد کل جنینها در هر گروه	جنین دو سلولی (تعداد درصد)	بلاستوسیست (تعداد درصد)	تعداد سلول به ازای هر جنین (M ± SD)
کنترل تعداد (%)	۱۴۶	۱۳۴ (۹۱/۷۸)	۹۹ (۶۷/۸۰)	۸۶/۶۰ ± ۱/۵۱
آب اکسیژنه ۰ μM	۱۴۳	۱۰۸ (۷۵/۵۲) a	۵۴ (۳۷/۷۶) a	۷۹/۹۰ ± ۱/۹۹ a
آب اکسیژنه ۱۰ μM	۱۷۲	۵۴ (۳۱/۳۹) a	۲۶ (۱۵/۱۲) a	۷۴/۵۰ ± ۱/۲۸ a
آب اکسیژنه ۲۵ μM	۱۵۵	۱۵ (۹/۶۸) a	۲ (۱/۹۳) a	۶۷/۲۳ ± ۲/۶۰ a
آب اکسیژنه ۵۰ μM	۱۵۸	۴ (۲/۵۲) a	۰ a	۰ a
آب اکسیژنه ۱۰ μM + تمپول ۰/۱ μM	۱۶۱	۵۱ (۳۱/۶۸)	۲۶ (۱۶/۱۵)	۷۸/۳۸ ± ۰/۹۹
آب اکسیژنه ۱۰ μM + تمپول ۰/۲ μM	۱۶۵	۵۳ (۳۲/۱۲)	۲۵ (۱۵/۱۵)	۸۰/۱۶ ± ۱/۲۶
آب اکسیژنه ۱۰ μM + تمپول ۰/۵ μM	۱۷۲	۵۷ (۳۳/۱۴)	۲۸ (۱۶/۲۸)	۷۹/۹۰ ± ۰/۹۱
آب اکسیژنه ۱۰ μM + تمپول ۱ μM	۱۶۴	۴۹ (۲۹/۸۸)	۲۳ (۱۴/۰۲)	۷۹/۳۵ ± ۱/۴۱
آب اکسیژنه ۱۰ μM + تمپول ۱۰ μM	۱۷۳	۵۵ (۳۱/۷۹)	۲۷ (۱۵/۶۱)	۷۹/۱۲ ± ۱/۰۷

معنی‌دار بودن گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل با a و در مقایسه با گروه تنش اکسیداتیو حاوی آب اکسیژنه غلظت ۱۰ μM با b (که تفاوت معنی‌داری وجود نداشت) نشان داده شده است (p < ۰/۰۵)

جدول ۳. مقایسه گروه‌های مختلف از نظر درصد و درجه توقف جنینی در شرایط کشت جنین‌های موش در شرایط بدون تنش اکسیداتیو (طی ۱۲۰ ساعت)

تعداد کل جنینهای متوقف شده	درجه III	درجه II	درجه I	تعداد کل جنینها در هر گروه	گروه‌های آزمایشی
۴۷(۳۲/۱۹)	۳۲(۲۱/۹۱)	۱۱(۷/۵۳)	۴(۲/۷۴)	۱۴۶	کنترل
۵۵ (۳۲/۳۵)	۴۷ (۲۷/۶۵)	۶ (۳/۵۳)	۲ (۱/۱۸)	۱۷۰	تمپول ۰/۱μM
۳۶ (۲۰/۵۷) a	(۱۸/۸۶) a ۳۳	۱ (۰/۵۷) a	۲ (۱/۱۴)	۱۷۵	تمپول ۰/۲μM
۳۱ (۱۸/۶۷) a	۳۰ (۱۸/۰۷)	۱(۰/۶) a	۰ (۰)	۱۶۶	تمپول ۰/۵μM
۳۱ (۱۹/۵۰) a	۳۱ (۱۹/۵۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۱۵۹	تمپول ۱μM
۳۴ (۱۹/۵۴) a	۲۹ (۱۶/۶۷)	۲ (۱/۱۵) a	۳ (۱/۷۲)	۱۷۴	تمپول ۱۰μM

تمامی داده‌ها مثل گروه کنترل بصورت تعداد (درصد نسبت به کل جنینها در هر گروه) آورده شده است. ، معنی‌دار بودن گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل با a نشان داده شده است (p<۰/۰۵)

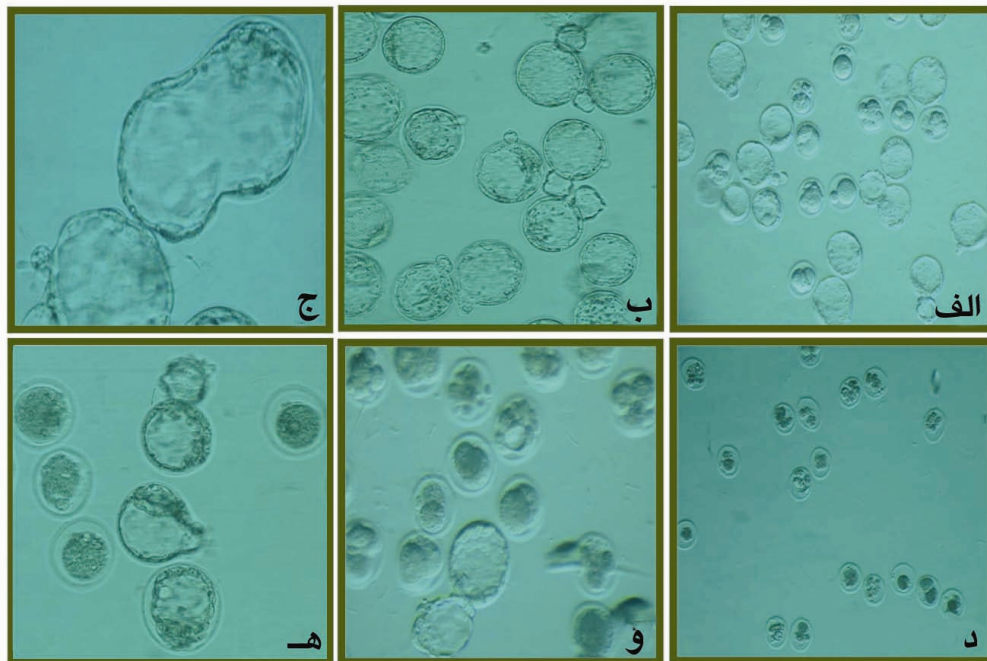
که اکثرآ از درجه I و تعدادی از درجه II با میزان لیز و فراگمانتاسیون بالا با رشد بسیار کم بودند، به طوریکه در غلظت ۵۰ μM درصد زیادی از جنینها در مرحله یک سلولی متوقف، لیز و فراگمانته بودند (جدول ۴). تنها درصد خیلی کمی از آنها تا مراحل اولیه تقسیم پیشرفت داشتند و به مراحل بالاتر تقسیم و رشد جنینی پیش نرفته بودند (شکل ۱-د).

نتایج حاصل از قرار دادن جنینها در معرض غلظت‌های مختلف آب اکسیژنه سبب ایجاد توقف در جنینها در مرحله یک سلولی و دو سلولی شد که این توقف در غلظت‌های پایین (۵ و ۱۰) اکثرآ از درجه II یا III با میزان لیز و فراگمانتاسیون کم بود (شکل ۱-و). در غلظت‌های بالای آب اکسیژنه (۲۵ و ۵۰ μM) میزان بالای توقف جنینی مشاهده شد

جدول ۴. مقایسه گروه‌های مختلف از نظر درصد و درجه بندی توقف جنینی در شرایط کشت جنینهای موش بوسیله قرار دادن در غلظت‌های مختلف آب اکسیژنه و بررسی اثر تمپول در شرایط تنش اکسیداتیو

تعداد کل جنینهای متوقف شده	درجه III	درجه II	درجه I	تعداد کل جنینها در هر گروه	گروه‌های آزمایشی
۴۷(۳۲/۱۹)	۳۲(۲۱/۹۱)	۱۱(۷/۵۳)	۴(۲/۷۴)	۱۴۶	کنترل تعداد (%)
۸۹ (۶۲/۲۳) a	۱۰ (۶/۹۹) a	۵۵ (۳۸/۴۶) a	۲۴ (۱۶/۷۸) a	۱۴۳	آب اکسیژنه ۵ μM
۱۴۶ (۸۴/۸۸) a	۹ (۵/۲۳) a	۳۷ (۲۱/۵۱) a	۱۰۰ (۵۸/۱۴) a	۱۷۲	آب اکسیژنه ۱۰ μM
۱۵۲ (۹۸/۰۶) a	۰ a	۱۴ (۹/۰۳) a	۱۳۸ (۸۹/۰۳) a	۱۵۵	آب اکسیژنه ۲۵ μM
۱۵۸ (۱۰۰) a	۰ a	۴ (۲/۵۳) a	۱۵۴ (۹۷/۴۷) a	۱۵۸	آب اکسیژنه ۵۰ μM
۱۳۵ (۸۳/۸۵)	۰ (۰) b	۴۸ (۲۹/۸۱)	۸۷ (۵۴/۰۴)	۱۶۱	آب اکسیژنه ۱۰ μM + تمپول ۰/۱μM
۱۴۰ (۸۴/۸۵)	۵ (۳/۰۳)	۲۸(۱۶/۹۷)	۱۰۷ (۶۴/۸۵)	۱۶۵	آب اکسیژنه ۱۰ μM + تمپول ۰/۲μM
۱۴۴ (۸۳/۷۲)	۱۲ (۶/۹۸)	۲۱ (۱۲/۲۱) b	۱۱۱ (۶۴/۵۳)	۱۷۲	آب اکسیژنه ۱۰ μM + تمپول ۰/۵μM
۱۴۱ (۸۵/۹۸)	۹ (۵/۴۹)	۲۵ (۱۵/۲۴)	۱۰۷ (۱۵/۲۴)	۱۶۴	آب اکسیژنه ۱۰ μM + تمپول ۱μM
۱۴۶ (۸۴/۳۹)	۶ (۳/۴۷)	۴۱ (۲۳/۷۰)	۹۹ (۵۷/۲۳)	۱۷۳	آب اکسیژنه ۱۰ μM + تمپول ۱۰μM

تمامی داده‌ها مثل گروه کنترل بصورت تعداد (درصد نسبت به کل جنینها در هر گروه) آورده شده است. معنی‌دار بودن گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل با a و در مقایسه با گروه تنش اکسیداتیو حاوی غلظت ۱۰ میکرومول آب اکسیژنه با b نشان داده شده است (p<۰/۰۵)



شکل ۱. تصاویر مربوط به جنینها در گروه‌های مختلف مورد مطالعه: الف- گروه کنترل تمایز درصدی از جنینها به بلاستوسیست بعد از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون و درصدی از جنینها که در مراحل مختلف رشد متوقف شده‌اند، ب- گروه حاوی تمپول، درصد بالایی از جنینها به بلاستوسیست اکسپند و از زونا خارج شده تمایز یافته‌اند، ج- بلاستوسیست در مرحله خروج از زونا را نشان می‌دهد، د- گروه تنش اکسیداتیو (حاوی $50 \mu M$ آب اکسیژنه)، جنینها در مراحل اولیه رشد متوقف شده و درجات بالایی از لیز و فراگمانتاسیون را نشان می‌دهند، و- گروه تنش اکسیداتیو (حاوی $10 \mu M$ آب اکسیژنه)، تعداد کمی از جنینها به مرحله بلاستوسیست رسیده و از لحاظ مورفولوژی مناسب نمی‌باشند و سایر جنینها در مراحل اولیه رشد متوقف شده و دچار لیز و فراگمانتاسیون شده هستند، ه- گروه تمپول در شرایط تنش اکسیداتیو، تعدادی از جنینها به مرحله بلاستوسیست تمایز یافته‌اند و سایر جنینها متوقف شده با لیز و فراگمانتاسیون کم در آنها.

مورفولوژی طبیعی نبودند (تصویر ۱- و).

نتایج حاصل از شمارش سلولی نشان داد که میانگین تعداد سلولها به ازای هر جنین در گروه‌هایی که جنینها در معرض غلظت‌های مختلف آب اکسیژنه قرار گرفته بودند کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌داد و این کاهش با افزایش غلظت آب اکسیژنه بیشتر می‌شد (جدول ۲). مطالعه اثر افزودن تمپول به محیط کشت جنینی در شرایط تنش اکسیداتیو با قرار دادن آنها به مدت یک ساعت در معرض $10 \mu M$ آب اکسیژنه در محیط کشت و در ادامه، کشت آنها در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف تمپول نشان داد که تمپول تا حدودی موجب مهار آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو گردیده و باعث افزایش درصد جنین‌های دو سلولی، در مقایسه با گروه تنش اکسیداتیو شده است؛ ولی این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۲). مقایسه درصد بلاستوسیستها نشان داد افزودن تمپول سبب

مقایسه درصد جنین‌های دو سلولی ایجاد شده که نشان دهنده شروع تسهیم است نشان داد در گروه‌هایی که تنش اکسیداتیو توسط افزودن غلظت‌های مختلف آب اکسیژنه ایجاد شده بود کاهش کاملاً معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل وجود دارد و این کاهش در گروه‌های با غلظت‌های بالای آب اکسیژنه کاملاً محسوس بود به طوری که در غلظت $25 \mu M$ تنها $9/68\%$ و در غلظت $50 \mu M$ تنها $2/53\%$ جنینها تا مرحله دوسلولی و بالاتر پیش رفته بودند (جدول ۲). مقایسه درصد بلاستوسیستها با گروه کنترل نشان داد پس از قرار گرفتن جنینها در معرض استرس اکسیداتیو درصد بلاستوسیستها به میزان قابل توجه و کاملاً معنی‌داری کاهش پیدا کرده بود. به خصوص در غلظت‌های بالا که این کاهش بسیار بالا بود، به طوری که در غلظت $50 \mu M$ هیچگونه بلاستوسیستی ایجاد نشد (جدول ۲) و بلاستوسیست‌های ایجاد شده در غلظت‌های پایین‌تر آب اکسیژنه نیز از لحاظ

رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توانند در طول آماده کردن اسپرم در محیط کشت تولید شوند و یا ممکن است در داخل جنین افزایش یابند و یا می‌توانند در کشت داخل آزمایشگاهی ایجاد گردند (۷). افزایش در میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن بر روی غشاء سلول، DNA و میتوکندریها موثر است و به نظر می‌رسد این تاثیر به عنوان واسطه‌ای باشد تا آبشار آپوپتوزی را از تنظیم خارج کند (۱۹). شواهد فراوان نشان می‌دهد که سطوح بالای آب اکسیژنه بسته به غلظت آن سبب مرگ برنامه‌ریزی شده و نکروز در گونه‌های مختلف سلول‌های سوماتیک می‌شود (۲۲-۲۰، ۷).

نتایج این مطالعه نشان داد که توان رشد جنین در مراحل اولیه پیش از لانه‌گزینی پس از قرار گرفتن کوتاه مدت در معرض رادیکال‌های آزاد اکسیژن به شدت کاهش یافته است. نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر با نتایج حاصل از سایر مطالعات صورت گرفته در این زمینه مطابقت دارد. همچنین مشخص شد که دزهای بالای رادیکال‌های آزاد اکسیژن در محیط کشت تأثیرات بیشتری را سبب می‌شوند و از یک حد آستانه غلظت به بالا تاثیر کامل بوده و مانع رشد جنین و یا سبب حالت‌های غیر طبیعی شدید می‌شود که نشانگر وابسته به غلظت بودن رشد جنین در ارتباط با رادیکال‌های آزاد می‌باشد. به طوری که در این مطالعه مشاهده شد قرار دادن جنینها به مدت یک ساعت قبل از کشت در محیط حاوی غلظت‌های مختلف آب اکسیژنه باعث ایجاد آسیب در جنین‌های پیش از لانه‌گزینی گردیده است به طوری که جنین‌هایی که در معرض غلظت $50 \mu M$ آب اکسیژنه قرار گرفتند اکثر جنینها فاقد قدرت تسهیم و رشد بودند و تنها درصد خیلی کمی از آنها تا مراحل اولیه رشد جنینی پیش رفته و دچار لیز و فراگمانته شدن شده بودند (تصویر ۱-D). ولی در غلظت‌های پایین آب اکسیژنه ($5 \mu M$) تأثیرات کمتر بوده و باعث کاهش تسهیم و رشد جنینها و کاهش کیفیت جنینها و مورفولوژی آنها شد؛ هر چند که درصدی از این جنینها تا مرحله بلاستوسیست پیش رفتند؛ ولی در مقایسه با گروه کنترل این درصد خیلی پایین بوده و بلاستوسیست‌های حاصله از نظر مورفولوژی نیز حالت غیر طبیعی را نشان دادند (تصویر ۱-و).

افزایش درصد بلاستوسیستها در شرایط تنش اکسیداتیو می‌شود ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد (جدول ۲). مقایسه نتایج حاصل از شمارش سلولی نشان داد، تمپول سبب افزایش تعداد سلولها به ازای هر جنین در شرایط تنش اکسیداتیو شده است (جدول ۲) و بیانگر این است که تمپول سبب بهبود کیفیت رشد و میزان تسهیم در جنین‌های کشت داده شده در شرایط تنش اکسیداتیو شده و تا حدودی توانسته آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو را کاهش دهد. بررسی جنین‌های متوقف شده نشان داد، تمپول باعث کاهش درصد جنین‌های متوقف شده گردید؛ ولی این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود. مطالعه درجه جنین‌های متوقف شده براساس میزان لیز و فراگمانتاسیون آنها نشان داد، میزان لیز و فراگمانتاسیون جنین‌های متوقف شده در شرایط تنش اکسیداتیو در حضور تمپول کاهش معنی‌داری را داشت (جدول ۴). بررسی مورفولوژی بلاستوسیستها نشان داد افزودن تمپول هم در شرایط تنش اکسیداتیو و هم در شرایط بدون تنش اکسیداتیو سبب بهبود مورفولوژی بلاستوسیست‌های ایجاد شده گردید (شکل ۱-ه).

بحث

تنش اکسیداتیو در نتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی در یک سلول ایجاد می‌شود. انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن شامل آنیون سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال هیدروکسیل ($OH\cdot$) و مشتقات غیررادیکالی از اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2) بوده که به شدت ناپایدارند و به طور سریع و غیراختصاصی با مولکول‌های زیستی واکنش نشان داده و منجر به ایجاد و توسعه انواع آسیب‌های سلولی از جمله پراکسیداسیون غشاء پلاسمایی، اکسیداسیون اسیدهای آمینه و نوکلئیک، آپوپتوزیس و نکروز می‌شوند که خود در نهایت منجر به کاهش قدرت زیست‌پذیری و تکوین جنین‌های آزمایشگاهی می‌گردد (۱۹، ۲۰). رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توانند هم از منابع داخل سلولی نظیر گامتها و یا از منابع خارج سلولی و فاکتورهای محیطی تولید شوند به عنوان مثال در روند انجام روش‌های کمک باروری (ART)

غشاء سلول که عملکردی مشابه SOD دارد (۲۳). در مطالعه‌ای که توسط Garner و همکاران صورت گرفت نشان داد که افزودن تمپول به مایع منی گاو سبب افزایش میزان بقا و قدرت زیست‌پذیری اسپرم در شرایط نگهداری آن در محیط داخل آزمایشگاه می‌شود (۲۴). در مطالعه دیگری که توسط Lindenmann و همکاران صورت گرفت نشان داد که افزودن تمپول به عنوان یک نیتروکسید قابل نفوذ از غشاء سلول که عملکردی مشابه SOD دارد سبب افزایش بقا و حرکت در اسپرم‌های منجمد شده گاو می‌شود (۲۵). در مطالعه‌ای که روی نگهداری اسپرم بوقلمون در شرایط محیط آزمایشگاهی صورت گرفت نشان داد که افزودن تمپول بقای اسپرم را افزایش می‌دهد (۲۶).

در مطالعه‌ای که توسط Mara و همکاران صورت گرفت نشان داد که نمونه‌های اسپرمی قوچ که به آنها تمپول افزوده شده بود و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۱۵ °C نگهداری شده بودند میزان حرکت و کیفیت حرکت بهتری (از نظر نوع حرکت)، در مقایسه با گروه کنترل داشته‌اند و همچنین نشان داد که با اضافه کردن تمپول به محیط کشت اسپرم، میزان باروری و تعداد بلاستوسیتها افزایش یافت (۲۷).

در شرایط کشت آزمایشگاهی جنینها میزان تولید رادیکال‌های آزاد بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آنها می‌باشد؛ لذا به منظور غلبه بر این عدم تعادل اکسیدانی از انواع آنتی‌اکسیدان‌های با منشأ خارجی استفاده می‌شود که به علت نفوذپذیری کم سلول‌های زنده به اکثر این آنتی‌اکسیدانها، مانع عملکرد مناسب آنها در از بین بردن رادیکال‌های آزاد تولید شده در درون جنین می‌شود به این منظور در این پژوهش از آنتی‌اکسیدان سنتتیک تمپول جهت حذف رادیکال‌های آزاد تولید شده در داخل سلول استفاده شد که نفوذپذیری بیشتری به داخل سلول داشت و نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزودن تمپول به عنوان آنتی‌اکسیدانتی سنتتیک با قابلیت نفوذپذیری بالا به داخل سلول توانسته در شرایط طبیعی بدون شرایط تنش اکسیداتیو باعث بهبود و افزایش کیفیت جنین، افزایش درصد جنین‌های دو سلولی که بیانگر شروع تسهیم در جنین است،

اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد توسط سیستم آنتی‌اکسیدان درون سلولی مانند گلوکاتیون، اسید آسکوربیک و آنزیم‌هایی مانند سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز و گلوکاتیون پراکسیداز (GPX) کنترل و یا مهار می‌گردد (۱۳). با این وجود به نظر می‌رسد که در شرایط کشت آزمایشگاهی جنین‌های پستانداران، میزان تولید این رادیکال‌های آزاد بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی جنینها می‌باشد. لذا به منظور غلبه بر این عدم تعادل اکسیدانی انواع آنتی‌اکسیدان‌های با منشأ خارجی پیش‌بینی و ارائه گردیده‌اند (۱۴). از سوی دیگر به نظر می‌رسد که توان دفاع آنتی‌اکسیدانی جنین‌های آزمایشگاهی در مقاطع مختلف تکوین تا مرحله‌ی بلاستوسیت متفاوت باشد. گروهی از محققین معتقدند که ظرفیت اصلی آنتی‌اکسیدانی جنینها در مراحل اولیه تقسیمات زیگوت وابسته به ذخیره mRNA مادری به ارث رسیده درون تخمک است و تدریجاً در مرحله فعالیت ژنوم جنینی است که ژنوم جنین قادر به فعالیت متقابل در مقابل اکسیدان‌های تولید شده درون سلول و یا محیط کشت می‌باشد. لذا به نظر می‌رسد که نیاز خاص جنین به آنتی‌اکسیدان‌های خارجی در مقاطع قبل و بعد از ZGA متفاوت باشد (۱۵).

مکانیسم‌های دفاعی متعددی در جنین و محیط پیرامونی احاطه کننده آن وجود دارد. در بدن^۱ به نظر می‌رسد تخمک و جنین در برابر استرس اکسیداتیو بواسطه پاک‌کننده‌های اکسیژنی موجود در مایعات فولیکولی و اویدوکت محافظت می‌شوند. اگرچه علل بسیار مختلفی برای کیفیت پائین روند تولید آزمایشگاهی جنین گزارش گردیده است به نظر می‌رسد که تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)، به عنوان یکی از علل اصلی توقف رشد جنین‌های کشت داده شده در آزمایشگاه است. بر اساس گزارش‌های موجود ROS می‌توانند، باعث توقف میوزی در تخمک، مهار تکوین جنین و مرگ سلولی شوند. برای مقابله با اثرات سوء ROS در سیستم کشت جنینی تا کنون از آنتی‌اکسیدان‌های گوناگونی استفاده شده است (۴، ۱۳). نتایج حاصل از مطالعات اخیر نشان داد که تمپول به عنوان یک نیتروکسید قابل نفوذ از

1- In vivo

که آسیب‌های جنینی حاصل از قرار دادن جنینها در غلظت 10mM آب اکسیژنه اندازه‌ای بوده است که اثر آنتی‌اکسیدانتی تمپول نتوانسته است این آسیبها را جبران نماید. تاثیرات آنتی‌اکسیدانتی تمپول در شرایط عادی و بدون تنش اکسیداتیو مشخص‌تر و معنی‌دارتر از شرایط تنش اکسیداتیو بوده است. بنابراین افزودن تمپول جهت بهبود روند رشد جنین و جلوگیری از اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد اکسیژن به محیط کشت‌های جنینی توصیه می‌شود.

نتیجه گیری

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد افزودن تمپول به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت سینتیک به محیط کشت جنینی سبب بهبود روند رشد جنینها در شرایط کشت داخل آزمایشگاهی می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمام عزیزانی که در انجام این تحقیق ما را یاری نموده‌اند به ویژه جناب آقای دکتر آراز رابری و خانمها دکتر سحر غفاری، دکتر سمیرا ابراهیم‌زاده و دکتر کیانا کارگر کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

- Gonzalez-Flecha B, Reides C, Cutrin JC, Llesuy SF, Boveris A. Oxidative stress produced by suprahepatic occlusion and reperfusion. *Hepatology*. 1993;18(4):881-9.
- Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem*. 2001;8(7):851-62.
- Sarafian TA, Bredesen DE. Is apoptosis mediated by reactive oxygen species? *Free Radic Res*. 1994;21(1):1-8.
- Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod*. 1998;13(4):998-1002.
- Luvoni GC, Keskinetepe L, Brackett BG. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. *Mol Reprod Dev*. 1996;43(4):437-43.
- Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AA, Sharma RK, Worley SE, et al. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril*. 2004;82(3):593-600.
- Goto Y, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T. Oxidative stress on mouse embryo development in vitro. *Free Radic Biol Med*. 1992;13(1):47-53.
- Goyanes VJ, Ron-Corzo A, Costas E, Maneiro E. Morphometric categorization of the human oocyte and early conceptus. *Hum Reprod*. 1990;5(5):613-8.
- Yoneda A, Suzuki K, Mori T, Ueda J, Watanabe T. Effects of delipidation and oxygen concentration on in vitro development of porcine embryos. *J Reprod Dev*. 2004;50(3):287-95.
- Carbone MC, Tatone C, Delle Monache S, Marci R, Caserta D, Colonna R, et al. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod*. 2003;9(11):639-43.

11. Catt JW, Henman M. Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Hum Reprod.* 2000; 15 Suppl 2:199-206.
12. Wang X, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil Steril.* 2002;78(6):1272-7.
13. Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update.* 2001;7(2):175-89.
14. Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology.* 2003;59(3-4):939-49.
15. Meirelles FV, Caetano AR, Watanabe YF, Ripamonte P, Carambula SF, Merighe GK, et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-83:13-20.
16. Nagy A, Gestsenstion M, Vintersten K, Behringer R. *Manipulating the mouse embryo.* 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2000; p. 565-98.
17. Cebal E, Carrasco I, Vantman D, Smith R. Preimplantation embryotoxicity after mouse embryo exposition to reactive oxygen species. *Biocell.* 2007; 31(1):51-9.
18. Tarkowski AK. An Air-Drying Method for Chromosome Preparations from Mouse Eggs. *Cytogenetics.* 1966;5(6):394-400.
19. Chaudière J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol.* 1999;37(9-10):949-62.
20. Szeto HH. Cell-permeable, mitochondrial-targeted, peptide antioxidants. *AAPS J.* 2006;8(2):E277-83.
21. Forrest VJ, Kang YH, McClain DE, Robinson DH, Ramakrishnan N. Oxidative stress-induced apoptosis prevented by Trolox. *Free Radic Biol Med.* 1994;16(6):675-84.
22. Tada-Oikawa S, Oikawa S, Kawanishi M, Yamada M, Kawanishi S. Generation of hydrogen peroxide precedes loss of mitochondrial membrane potential during DNA alkylation-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 1999;442(1):65-9.
23. Mitchell JB, Samuni A, Krishna MC, DeGraff WG, Ahn MS, Samuni U, et al. Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics. *Biochemistry.* 1990;29(11):2802-7.
24. Garner DL, Thomas CA, Gravance CG, Marshall CE, DeJarnette JM, Allen CH. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology.* 2001;56(1):31-40.
25. Lindemann CB, Kanous K. The cyclic nitroxide free radical, 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPOL), is effective in prolonging the motility of bull sperm in vitro. *Biol Reprod.* 1991;44(suppl 1):117.
26. Donoghue AM, Donoghue DJ. Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poult Sci.* 1997;76(10):1440-5.
27. Mara L, Accardo C, Pilichi S, Dattena M, Chessa F, Chessa B, et al. Benefits of TEMPOL on ram semen motility and in vitro fertility: a preliminary study. *Theriogenology.* 2005;63(8):2243-53.
28. Li J, Foote RH, Liu Z, Giles JR. Development of rabbit zygotes into blastocysts in defined protein-free medium and offspring born following culture and embryo transfer. *Theriogenology.* 1997;47(5): 1103-13.