Archive of SID

Assessment of protective effect of ethyl pyruvate on sperm parameters, and trend of embryological development after in vitro fertilization (IVF) in phenylhydrazine treated mice

Mozaffari A.A., PhD[1], Shahrooz R., PhD[2], Ahmadi A., PhD[3], Maleki H., PhD[4], Mardani K., PhD[5]

1. PhD Comparative histology, Sina Hospital, Kurdistan University of Medical Sciences, Kamyaran, Iran (Corresponding Author), Tel:+98-87-35534077, Mozafari_49@yahoo.com
2. Associate Professor at Histology and Science Department, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran.
3. Assistant Professor at Anatomy and Embryology Science Department, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran.
4. Professor at Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran.
5. Associate Professor at Epidemiology, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:08 +0430 on Wednesday June 7th 2017

ABSTRACT

Background and Aim: Oxidative stress can lead to change in the sperm parameters and cessation of embryological development This study aimed to assess the protective effect of ethylpyruvate (EP) on sperm parameters and trend of in vitro fertilization under oxidative stress conditions produced by phenyl hydrazine (PHZ) induced hemolytic anemia in mice.

Material and Method: 40 NMRI mice with the age range of 8-10 weeks and mean weight of 26±2gr, were randomly divided into four equally groups. The control group received normal saline (0. 1 ml/day, IP). Group2 (PHZ group) was treated with initial dose of PHZ (8mg/100gr/b. w, IP) followed by 6mg/100gr/b. w, IP, every 48hr. Group3, (Group PHZ+EP) received the same dose of PHZ and EP (40mg/kg/daily/IP). Ethyl pyruvate group received only EP (40mg/kg/daily, IP). Treatment period took 35 days. Then, after euthanasia the sperm were collected from caudal region of epididymis and examined for sperm count, sperm viability, motility and morphology. Testis tissue MDA and serum testosterone levels of all experimental groups were also evaluated.

Result: In this study, in PHZ group we found a considerable reduction in the mean percentage of the number of the sperms with damaged DNA and abnormal morphology compared to the control group. After administration of antioxidant these parameters improved significantly ($p<0.05$). In PHZ group we found significant decrease in the percentage of fertility, blastocysts, and the number of arrested embryos in comparison to the control group, which after administration of ethylpyruvate these parameters improved significantly.

Conclusion: Treatment of the mice with PHZ led to improvement of the sperm parameters and trend of embryological development.

Key words: Ethyl pyruvate, Phenylhydrazine, Sperm parameters, Stress oxidative, Mice.

Received: May 23, 2015 **Accepted:** Dec 10, 2016

www.SID.ir

Archive of SID

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و دوم / فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶/۲۴-۱۱

ارزیابی تاثیر محافظتی اتیل پیروات بر پارامترهای اسپرم و روند رشد جنین های حاصل از لقاح آزمایشگاهی (IVF) در موش های سوری تحت درمان با فنیل هیدرازین

علی اکبر مظفری[1]، رسول شهروز[2]، عباس احمدی[3]، حسن ملکی نژاد[4]، کریم مردانی[5]

۱. دکترای بافت شناسی مقایسه ای، بیمارستان سینا کامیاران، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، کامیاران، ایران (مولف مسوول)، تلفن ثابت: ۰۸۷-۳۵۵۳۲۰۷۷

Mozafari_49@yahoo.com

۲. دانشیار گروه علوم پایه، بخش بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۳.استادیار گروه علوم پایه، بخش آناتومی وجنین شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۴. استاد گروه علوم پایه، بخش فارماکولوژی وسم شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۵. دانشیار گروه اپیدمیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: استرس اکسیداتیو می تواند از دلایل تغییر در پارامتر اسپرم وتوقف رشد جنین از رحم باشد که منجر به از بین رفتن در اثر نکروز یا مرگ برنامه ریزی شده می شود. هدف از این مطالعه بررسی اثرات محافظتی اتیل پیروات Ethylpyruvate (EP) بر پارامتر های اسپرم و روند لقاح داخل آزمایشگاهی در شرایط تنش اکسیداتیو حاصل از کمخونی همولیتیک القاء شده توسط فنیل هیدرازین Phenylhydrazine (PHZ) می باشد.

روش بررسی: دراین مطالعه تجربی تعداد ۴۰ قطعه موش سوری نر بطور تصادفی به چهار گروه تقسیم گردیدند.گروه کنترل سرم فیزیولوژی(۰/۱ml,IP) دریافت نمود.گروه PHZ، PHZ با دوز Amg/100gr/b.w برای بار اول و دوز mg/100gr/b.w ۶ هر ۴۸ ساعت یک بار،درگروه PHZ+EP، اتیل پیروات با دوز۴۰mg/kg,IP و فنیل هیدرازین با دوز مشابه گروه PHZ تزریق شد و درگروه چهارم فقط اتیل پیروات با دوز مشابه گروه PHZ+EP تجویز شد. جهت انجام لقاح داخل آزمایشگاهی In Vitro Fertilization (IVF) ۴۰ قطعه موش سوری ماده برای استحصال تخمک استفاده گردید. ۳۵ روز پس از شروع دوره درمان موشهای نرآسان کشی شده و اسپرم آنها استحصال و پارامترهای اسپرم بررسی گردید و برای هرگروه درمانی نر یک گروه ماده به همان تعداد در نظر گرفته شد. برای گرفتن تخمک از آنها، تحریک تخمک گذاری با استفاده PMSG و HCG انجام شد، حیوانات پس از بیهوشی آسان کشی شدند و پس ازاستحصال تخمک و انجام لقاح با اسپرم در محیط کشت HTFM+4mgBSA نگهداری شدند، تخمک های لقاح یافته به مدت ۱۲۰ ساعت انکوبه شدند و مراحل رشد جنینی در این مدت مورد بررسی قرار گرفت ، آنالیز آماری داده ها توسط نرم افزار نرم افزارSPSS ویرایش ۱۶و پس از کنترل نرمالیتی توزیع داده ها با آزمون آنالیز واریانس یکطرفه مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت و برای مقایسه درصد باروری از نرم افزار minitab و روش 2proportion استفاده شد.

نتایج: میانگین درصد اسپرمهای با DNA آسیب دیده، اسپرم با عدم بلوغ هسته ای، اسپرم با مورفولوژی غیر طبیعی درگروه PHZ نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری پیدا نمود، که با تجویز آنتی اکسیدانت این شاخص ها به طور معنی داری بهبودپیدا نمودند (P<۰/۰۵). در گروه PHZ، میانگین درصد لقاح، بلاستوسیت، و تعداد جنین های متوقف شده نسبت به گروه کنترل کاهش قابل ملاحظه ای نشان داده، که با تجویز اتیل پیروات این پارامترها به طور قابل ملاحظه ای بهبود پیدا نمودند(P<۰/۰۵).

نتیجه گیری: این مطالعه نشان دادکه استفاده از اتیل پیروات باعث بهبودی شاخصهای اسپرم و روند رشد جنین در شرایط آزمایشگاهی شده لذا برای بهبودی پارامترهای های فوق استفاده از اتیل پیروات توصیه می شود.

واژگان کلیدی: اتیل پیروات، فنیل هیدرازین، کیفیت اسپرم، لقاح داخل آزمایشگاهی، موش سوری

وصول مقاله: ۹۴/۳/۲ اصلاحیه نهایی: ۹۵/۷/۱۹ پذیرش: ۹۵/۹/۲۰

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:08 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:08 +0430 on Wednesday June 7th 2017

مقدمه

مطالعات مختلف نشان داده اند که فنیل هیدرازین باعث صدمات اکسیداتیو به گلبول قرمز بوسیله افزایش تشکیل گونه فعال اکسیژن Reactive oxygen (ROS) species می شود (۱). فنیل هیدرازین نخستین بار به عنوان داروی تب بر استفاده شد، ولی عمل سمی آن روی گلبول های قرمز باعث القاء صدمات اکسیداتیو به هموگلوبین، پروتئین و فسفولیپیدهای غشاء گلبول قرمز انسان و هیپوکسی حاصله موجب تولید فعال اکسیژن (ROS)گردید (۲). افزایش (ROS) در مایع منی باعث اثرمنفی روی عملکرد اسپرم، مخصوصا" چسبندگی اسپرم-اووسیت و ناباروری می شود (۳). در مطالعه انجام شده با PHZ مشاهده گردید که هیدرازین ظرفیت تولید رادیکال آنیون سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن را دارد که عامل پراکسیداسیون لیپید و تشکیل اجسام هینز در گلبول های قرمز می باشد، بنابراین فنیل هیدرازین باعث القاء سمیت و استرس اکسیداتیو در گلبول قرمز می گردد(۴). تولید بیش از حد (ROS) در مایع منی بوسیله لکوسیت ها به همان اندازه که توسط اسپرم های غیر طبیعی تولید می شود، می تواند عامل ناباروری شود. میزان (ROS) در مایع فولیکولی ممکنست بعنوان شاخص برای پیشگویی میزان موفقیتIVF یا باروری داخل آزمایشگاهی استفاده شود(۵). استرس اکسیداتیو دارای اثر مخرب روی تکامل جنین است، (ROS) ممکنست از متابولیسم جنین یا از محیط اطراف ناشی شود. (ROS) نه تنها باعث تغییر بیشتر مولکولهای سلول می شود بلکه باعث القاء توقف و یاکندی در تکامل اولیه جنین نیز می شود، سطح بالای (ROS) وآپوپتوز در جنینهای فراگمانته شده در مقایسه با جنینهای غیر فراگمانته دیده شده است (۶). افزودن آنتی اکسیدانت هایی نظیر ویتامین E وC به محیط کشت، میزان تکوین بلاستوسیت در جنین های موش را بهبود می بخشند و موجب بهبود نسبت باوری و افزایش لانه گزینی می شود(۷). رایکالهای آزاد اکسیژن در محیط کشت می توانند رشد جنینی، میزان آبستنی کلینیکی و سطح باروری را تحت تاثیر قرار دهند. در هر دو برنامه لقاح خارج رحمی (IVF) و تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)، مشخص شد که بالا بردن غلظت (ROS) در محیط کشت در روز اول با کاهش میزان باروری ارتباط دارد(۸). Yoneda و همکاران اثرات افزایش غلظت اکسیژن و H_2o_2را برکیفیت جنین گزارش کرده و نشان دادندکه کاهش سطح H_2o_2در شرایط محیط کشت موجب بهبود کیفیت جنین در مرحله بلاستوسیست می شود (۹). اتیل پیروات به عنوان تجزیه کننده و پاک کننده گونه فعال اکسیژن (ROS) و عامل محافظت کننده سلول و دارای قدرت ضد التهابی است(۱۰). پیروات یک آنتی اکسیدانت داخلی و پاک کننده رادیکالهای آزاد می باشد، سدیم پیروات پاک کننده H_2O_2 از طریق واکنش غیر آنزیمی (دفسفریلاسیون اکسیداتیو) که تولید استات، آب، ودی اکسید کربن می نماید. پیروات سدیم که باعث سرکوب H_2O_2 شده که خود پراکسید هیدروژن عامل پراکسیداسیون لیپید سلولهای کلیه شده و نیز از آزاد شدن کروم سیتوزولی (یک مارکر صدمه سلولی) بوسیله سلولهای اپیتلیال در معرض H_2O_2 می شود (۱۱). دریک مطالعه گزارش شده است که اتیل پیروات دارای اثری کافی در پاک نمودن گونه فعال اکسیژن (ROS) در سلول بوده و نیز دارای خاصیت ضد التهابی و محافظت سلول است (۱۲). پیروات همچنین برای از بین بردن (ROS) درسلول عمل نموده و یک عامل ضد التهاب می باشد (۱۳).

تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر توان اتیل پیروات به عنوان آنتی اکسیدانهای سنتتیک در کاهش اثرات استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز فنیل هیدرازین بر روی پارامترهای اسپرم و رشد جنین های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی ارائه نگردیده است. لذا با توجه به اهمیت فوق العاده

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش کیفیت وکمیت تولید اسپرم و جنین های آزمایشگاهی، مطالعه اخیر به عنوان اولین مطالعه در شرایط استرس اکسیداتیو، به بررسی اثرات آنتی اکسیدانتی اتیل پیروات در مقابله با تنش اکسیداتیو می پردازد.

روش بررسی

حیوانات: در مطالعه تجربی حاضر جهت ارزیابی قدرت باروری موشهای سوری تحت تاثیر استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز فنیل هیدرازین و نقش حفاظتی اتیل پیروات در جلوگیری از اثرات سوء آن بر روند لقاح و رشد جنین های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی، از ۴۰ قطعه موش سوری نر نژادNMRI، ۸-۶ هفته ای که بطور تصادفی به چهارگروه تقسیم شده و به مدت ۳۵روز با داروی فنیل هیدرازین تحت درمان بودند، استفاده شد. حیوانات درشرایط استاندارد با دمای ۲۲±۲°C، رطوبت۶۰-۳۰ درصد و با سیکل نوری ۱۴ساعت روشنایی و۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند.آب و غذا بصورت آزاد در دسترس بود.

گروه بندی و تجهیزات: حیوانات به چهار گروه مساوی تقسیم شدند، که عبارتند از:

۱- گروه کنترل که سرم فیزیولوژی (ml/day, ۰/۱IP) دریافت نمودند.

۲- گروهPHZ، فنیل هیدرازین phenylhydrazine (PHZ) ساخت شرکت سیگمای امریکا (Sigma, USA) با دوز Amg/ 100gr/b.w, IP برای بار اول، و دوزmg/100g b.w, IP، هر ۴۸ ساعت یک بار، به مدت ۳۵ روز تزریق شد(۱۴).

۳- گروه PHZ+EP، فنیل هیدرازین با دوز مشابه گروه PHZ به همراه اتیل پیروات با دوز (mg/kg/day, ۴۰IP) تزریق شد (۱۵).

۴- گروه EP، فقط اتیل پیروات با دوز مشابه گروه سوم تجویز شد.

لقاح آزمایشگاهی: مرحله اول ازکار برای انجامIVF، ابتدا برای تهیه اسپرم، موش سوری نرا پس از ۳۵ روز مدت درمان با روش جابجایی مهره گردن آسان کشی شدند. سپس پوست ناحیه شکمی با اتانول ۷۰ درصد استریل و پس از ایجاد برش در ناحیه شکم و جدا کردن بافت های همبندی، بافت های اطراف دم اپیدیدیم همرا با مقداری ازکانال دفران از بیضه جدا و داخل پتریدیش ۶cm حاوی محیط کشتHTF (Sigma,USA) دارای mg/ml BSA ۴ که قبلا"جهت دما درداخل انکوباتورقرار داده شده بود منتقل شد و بعداز ایجاد چند برش در دم اپیدیدیم و فشاردرکانال دفران برای خروج اسپرم ها، پتری دیش ها در داخل انکوباتور CO_2 گذاشته شد. بعد از گذشت ۰/۵ساعت اسپرم ها خارج و در محیط پخش شدند، از این اسپرمها برای بررسی پارامترهای اسپرم استفاده شد. سپس اسپرم ها شستشو داده شدند و با استفاده از روش شناورسازی، اسپرم های متحرک جدا و جهت ظرفیت یابی، به مدت یک ساعت در انکوباتور CO_2 با دمای۳۷°C قرار داده شدند(۱۶). جهت انجام IVF برای هرگروه درمانی نر یک گروه ماده به همان تعداد در نظر گرفته شد. برای گرفتن تخمک از آنها، به تحریک تخمک گذاری موشهای ماده مورد نیاز بود که۷۲ ساعت قبل از IVF و تشریح، به موشهای ماده ۷/۵(IU) واحد ازهورمون PMSG (ساخت شرکت Folligon، هلند) به حجم ۰/۱ میلیمتر و ۴۸ ساعت بعد تزریق ۷/۵ (IU) واحد از هورمون HCG (ساخت شرکت، Folligon, Netherland) انجام شد.

ارزیابی میزان آسیب رشته DNA اسپرم: برای ارزیابی هر گونه شکستگی در دو رشته ی DNA اسپرم موش ها، رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج انجام گرفت. در صورتی که DNA اسپرم دچار شکستگی شده باشد متعاقب

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:08 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

رنگ‌آمیزی، DNA در طیفی از رنگ زرد تا قرمز فلوئورسنت بستگی به میزان آسیب، نمایان می‌شود. DNA سالم به رنگ سبز دیده می‌شود. در این روش پس از سه بار شستشوی نمونه اسپرم با بافر PBS و حذف مایع رویی، رسوب حاصل به کمک بافر PBS به غلظت نهایی رسانده شد. اسمیرهای مورد نظر از محیط کشت حاوی اسپرم تهیه شد و پس از خشک شدن آن در محیط آزمایشگاه به مدت ۳۰ دقیقه در داخل ظرف حاوی استون- اتانل به نسبت ۱:۱ قرار گرفت.

پس از خشک شدن لام ها در مجاورت هوا، لام های فوق به مدت هفت دقیقه در ظرف حاوی محلول رنگ آکریدین اورنج قرار گرفت و پس از خشک شدن نهایی توسط میکروسکوپ ایمونوفلوئورسنت و عدسی X۱۰۰ بررسی شد و نتایج حاصل به صورت درصد بیان گردید(۱۷).

ارزیابی بلوغ هسته اسپرم: برای این منظور از رنگ‌آمیزی آنیلین بلو استفاده شد. اساس آنالیز بر این نکته استوار است که در طی مرحله اسپرمیوژنز (Spermiogenesis) پروتامین بجای هیستون درکروماتین هسته قرار می گیرد که این جایگزینی در تراکم و پایداری اسپرم بسیار اهمیت دارد. در این رنگ‌آمیزی، اسپرم های نابالغ به دلیل هیستون زیاد به رنگ آبی تیره مایل به خاکستری در آمده و اسپرم های بالغ از رنگ پذیری کم تری بر خوردار هستند. همانند روش ذکر شده در فوق، پس از تثبیت نمونه اسپرم در محلول اتانول- استون و خشک شدن در مجاورت هوا، لام ها به مدت هفت دقیقه در محلول حاوی رنگ آنیلین بلو قرار گرفته و پس از خشک شدن در مجاورت هوا با میکروسکوپ نوری و درشت نمایی ×۴۰ بررسی شدند (۱۸).

ارزیابی مورفولوژیک اسپرم ها: برای ارزیابی مورفولوژیک اسپرم ها از رنگ‌آمیزی آنیلین بلو استفاده شد. به این شکل که اسپرم هایی که دارای ظاهر غیر طبیعی بودند، شمارش و نتایج بر اساس درصد بیان شد. برای ارزیابی دقیق تر و هم چنین تشخیص بقایای سیتوپلاسمیک که نشان از عدم بلوغ مورفولوژیک اسپرم ها دارد. رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین نیز استفاده قرار شد. آن دسته از اسپرم ها یی که حاوی بقایای سیتوپلاسمی بودند به عنوان اسپرم های نابالغ (از لحاظ مورفولوژیک) در نظر گرفته شدند(۱۹).

تخمک گیری و لقاح داخل آزمایشگاهی: ۱۲-۱۰ ساعت پس از تزریق HCG (صبح روز بعد) بعد از آسان کشی حیوان به روش جابجایی گردن، لوله های رحمی را جدا کرده و در داخل محیط کشت HTF(sigma,USA) دارای ۴mg/ml BSA، ۳۷درجه از قبل آماده شده قرارداده شد و با روش های آنزیمی و مکانیکی تخمکها را ازسلولهای گرانولوزا جدا نموده و پس از شستشو تخمکها را به قطرات محیط لقاح در زیر روغن معدنی حاوی محیط کشت HTF حاوی ۴ mg/ml BSA منتقل کرده و سپس اسپرمها را به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی لیتر محیط کشت، اضافه شد. عمل لقاح حدود ۶-۵ ساعت بعد از اضافه کردن اسپرم صورت می گیرد و بدین ترتیب زیگوت به دست آمد. در ادامه تحقیق زیگوت های شستشو داده شده حاصل از لقاح آزمایشگاهی در محیط کشت HTF حاوی ۴mg/ml BSA، بعدازشستشو در دو قطره از محیط کشت به تعداد۲۰ جنین درداخل قطرات µl۱۰۰ در زیر روغن معدنی کشت داده شدند و در مراحل بعدی ارزیابی جنینها صورت گرفت. زیگوتهای حاصله از همه گروهها، در محیط کشت HTF به مدت ۱۲۰ساعت کشت داده شدند. برای بررسی تنش اکسیداتیو ناشی از تجویز فنیل هیدرازین و اثر آنتی اکسیدانتی اتیل پیروات در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست، مراحل رشد جنینی در این مدت مورد بررسی قرار گرفت، زیگوت های موجود در هرگروه جنین ها از نظر میزان فراگمانتاسیون، طی کردن مراحل رشد جنینی و تعداد جنین های متوقف شده با هم

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:08 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

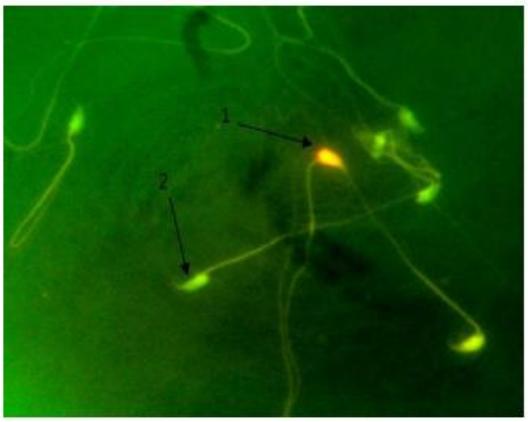
Archive of SID

مقایسه شدند. تیپ بندی جنین های متوقف شده با توجه به فاکتورهای مختلفی نظیر لیز شدن جنین ها، نکروتیک بودن آنها، فراگمانتاسیون و وجود وزیکولهای سیتوپلاسمیک صورت گرفت و به این ترتیب، تیپ I جنینهای با لیز، فراگمانته شدن و نکروتیک بودن کامل، تیپII جنینهای با لیز، فراگمانته شدن درتعدادی ازبلاستومرها، تیپIII جنینهای با تعداد کمی بلاستومرهای لیز و فراگمانته و وزیکولهای سیتوپلاسمیک بود (۵). کیفیت جنین ها، تعداد جنین های رشد کرده، درصد شکافتگی با بررسی درصد جنین های دو سلولی، میزان جنین های متوقف شده و درصد بلاستوسیست های حاصله در طی ۱۲۰ساعت انکوباسیون در هر گروه مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج حاصل با استفاده از نرم افزارSPSS ویرایش ۱۶و پس از کنترل نرمالیتی توزیع داده ها با آزمون آنالیز واریانس یکطرفه مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت. برای مقایسه درصد لقاح، دو سلولی، بلاستوسیت، و متوقف شده ازآنالیز آماری داده توسط نرم افزارminitab روش 2proportion و در سطح معنی دارP<۰/۰۵ انجام گرفت و نتایج بصورت تعداد در جداول مربوطه آورده شده است.

نتایج

مطالعه اسپرم توسط رنگ آمیزی آکریدین اورنج نشان داد که اسپرم های با DNA آسیب دیده بسته به شدت آسیب، سر آن به رنگ زرد مایل به قرمز مشاهده گردید، ولی سر اسپرم های سالم به رنگ سبز مشاهده گردید (تصویر ۱). بررسی نتایج نشان دادکه میانگین درصد اسپرم های با DNA آسیب دیده درگروه PHZ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری پیدا نمود(P<۰/۰۵). در حالی که میانگین درصد اسپرم های با DNA آسیب دیده درگروه (PHZ+EP) نسبت به گروه PHZ به طور معنی دار کاهش پیدا نمود (P<۰/۰۵)، تجویز آنتی اکسیدانت EP به تنهایی تقریبا مثل گروه کنترل بوده و با آن گروه فاقد اختلاف معنی دار بودند(جدول ۱).



تصویر۱: اسپرماتوزوئیدهای با DNA صدمه دیده به رنگ قرمز واسپرماتوزوئید های با DNA سالم به رنگ سبز مشاهده می شوند (رنگ آمیزی آکریدین-اورنج ، ×۱۰۰۰).

همچنین در این مطالعه نشان داده شد که سر اسپرم های نابالغ با رنگ آمیزی آنیلین بلو آبی و سر اسپرم های سالم به رنگ آبی رنگ پریده مشاهده شدند (تصویر ۲). در بررسی میزان عدم بلوغ هسته ای در گروه PHZ ((۳۰/۵±۱/۳۲) در مقایسه با گروه کنترل (۲/۷۵±۰/۶۲) افزایش معنی داری پیدا نموده بودکه با تجویز آنتی اکسیدانت درگروه

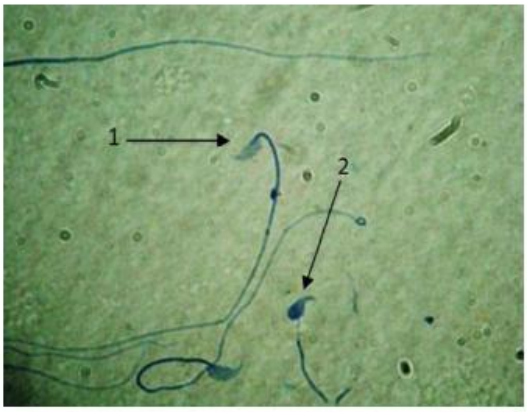
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:08 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

(PHZ+EP) و مقدارهسته های نابالغ کم شده بود ولی باین حال هنوز دارای اختلاف معنی دار با گروههای کنترل و PHZ بود (P<۰/۰۵). با این وجود در گروههایی که فقط EP تجویز شده بود با گروه کنترل فاقد اختلاف معنی دار بودند(جدول شماره ۱).

مقایسه میانگین درصد اسپرم با مورفولوژی غیر طبیعی در گروه PHZ (۴۴±۱/۰۸) در مقایسه با گروه کنترل (۴/۰۴± ۲۴/۵) نشانگر افزایش معنی دار می باشد (P<۰/۰۵) (تصویر ۳). در صورتی که با تجویز اتیل پیروات در گروه (PHZ+EP) (۳۹/۷۵±۱/۹۵) تا اندازه ای کاهش نشان داد ولی با گروه کنترل دارای اختلاف معنی دار بود (P<۰/۰۵). در گروه دریافت کننده EP (۳۰/۲۵±۰/۸۵) به تنهایی میانگین درصد اسپرم های با موفولوژی غیر طبیعی با گروه کنترل فاقد اختلاف معنی دار بود (جدول ۱).



تصویر ۲: اسپرماتوزوئید با هسته بالغ آبی کم رنگ(۱) و اسپرماتوزوئیدهای با هسته نابالغ آبی پررنگ(۲) مشخص شده اند، (رنگ آمیزی آنیلین بلو، ×۴۰۰).

تصویر شماره ۳: اسپرم با مورفولوژی طبیعی(۱) و اسپرم با مورفولوژی غیر طبیعی(۲)، (رنگ آمیزی آنوزین-نگروزین،×۴۰۰)

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:08 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: نتایج حاصل از مطالعه برخی از پارامترهای کیفیت اسپرم که در نتایج IVFممکن است دخالت داشته باشند

گروه	درصداسپرم با DNAصدمه دیده	درصداسپرم باعدم بلوغ هسته	درصداسپرم بامورفولوژی غیر طبیعی
Control	۱/۲۵±۰/۳۷	۲/۷۵±۰/۶۲	۲۴/۵±۱/۰۴
PHZ	a۳۳±۲/۱۹	a۳۰/۵±۱/۳۲	a۴۳±۱/۰۸
PHZ+EP	ab۲۷/۷۵±۲/۱۳	ab۸/۵±۱/۰۴	b۳۹/۷۵±۱/۶۵
EP	bc۴±۱/۸۰	bc۳/۲۵±۰/۷۵	ab۳۰/۲۵±۰/۸۵

حروف a, b, c به ترتیب نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه های Con, PHZ,PHZ+ EP می باشند.

نتایج مربوط به توان باروری آزمایشگاهی و رشد جنینها در گروه های مختلف در جدول ۲ بطور کامل گزارش شده است.

جدول ۲: نتایج حاصل از بررسی کیفیت اووسیت و لقاح داخل آزمایشگاهی وروند رشد جنینی در گروه های مختلف مورد مطالعه.

گروه ها	تعداد کل اووسیت	لقاح	دوسلولی	بلاستوسیت	متوقف شده	تیپ ۱	تیپ۲	تیپ۳
control	۱۷۵	۱۵۹ ٪۹۰/۸۶	۱۳۳ ٪۸۳/۲۸	۱۰۸ ٪۶۷/۹۲	۵۱ ٪۳۲/۰۷	۲ ٪۱/۲۵	۶ ٪۳/۷۷	۳۳ ٪۲۷/۰۴
PHZ	۱۳۲	a ۹۳ ٪۷۰/۴۵	a ۶۶ ٪۷۰/۹۷	a ۳۳ ٪۳۵/۴۸	a ۶۰ ٪۶۴/۵۲	a ۹ ٪۹/۶۷	۶ ٪۶/۴۵	a ۴۵ ٪۴۸/۳۹
PHZ+EP	۱۲۱	ab ۹۷ ٪۸۰/۱۶	a ۷۴ ٪۷۶/۲۹	a ۳۵ ٪۳۶/۰۸	a ۶۲ ٪۷۴/۲۳	a ۵ ٪۹/۲۷	۴ ٪۸/۲۵	a ۵۳ ٪۵۶/۷
EP	۱۳۷	b ۱۳۶ ٪۹۲/۵۲	abc ۱۳۰ ٪۹۵/۵۹	bc ۹۴ ٪۶۹/۱۱	bc ۴۲ ٪۳۰/۸۸	b ۳ ٪۲/۲۱	۱۰ ٪۷/۳۵	bc ۲۹ ٪۲۱/۳۲

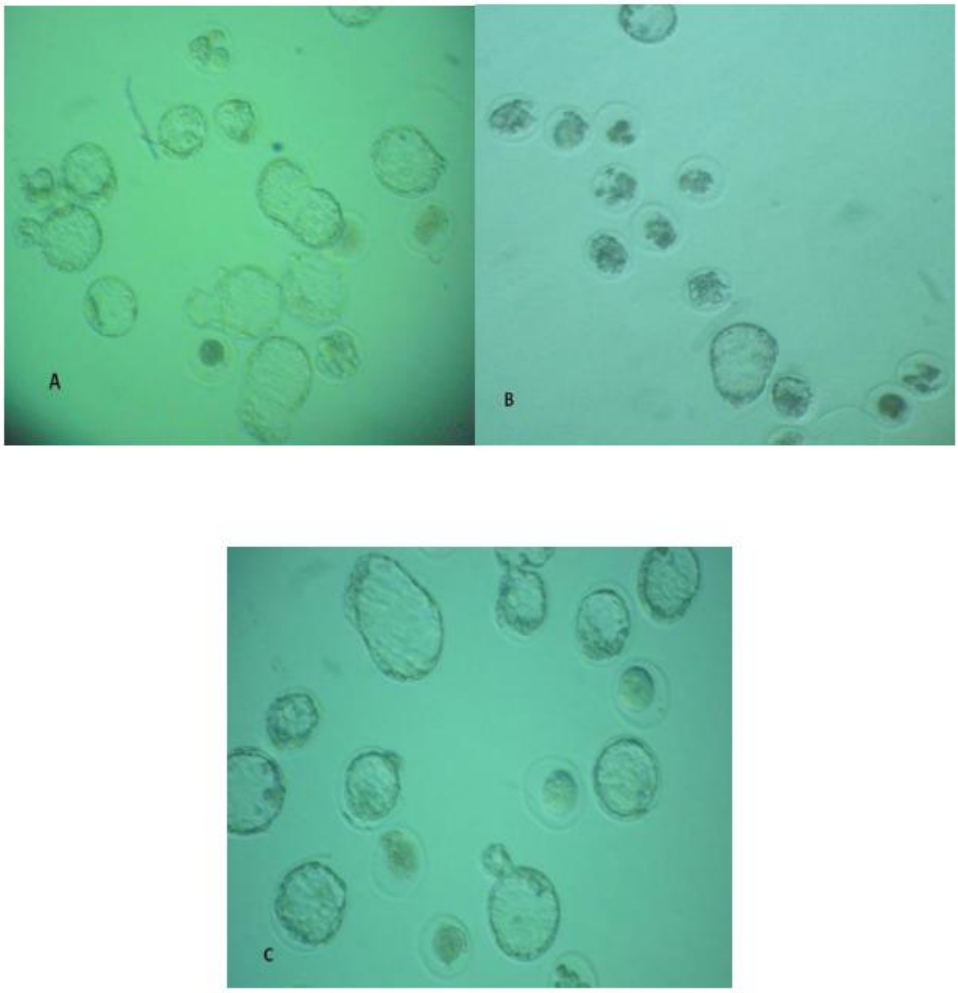
حروف a, b, c به ترتیب نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه های Con, PHZ,PHZ+ EP می باشند

بررسی جنین هایی که پس از ۱۲۰ ساعت به مراحل مختلف رشد رسیده بودند مشخص کرد که استرس اکسیداتیو(PHZ) در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش رشد درتمام مراحل مختلف رشد شده در حالی که اتیل پیروات باعث بهبودی تمام پارامترهای فوق شده است(تصویر ۴).

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:08 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۴: (A) گروه کنترل، تمایز درصدی از جنین ها به بلاستوسیست با کیفیت مناسب بعد از ۱۲۰ساعت انکوباسیون ودرصدی از جنین ها که درمراحل مختلف رشد متوقف شده اند (۴۰۰×)، (B) گروه PHZ، درصد کمی از جنین ها به مرحله بلاستوسیست رسیده وبلاستوسیست های حاصله کیفیت مناسبی از نظر مورفولوژی ندارند ودرصد بالایی ازجنین ها متوقف شده اند وجنین های متوقف شده دارای لیزوفراگماتاسیون زیاد می باشند (۴۰۰×)، (C) گروه درمان شده با اتیل پیروات بعلاوه فنیل هیدرازین که درمقایسه با گروه PHZ درصدی از جنین ها به مرحله بلاستوسیست رسیده وبلاستوسیست های حاصله کیفیت مناسبی از نظر مورفولوژی دارند ودرصد کمی ازجنین ها متوقف شده اند(۴۰۰×).

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:08 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

فنیل هیدرازین علاوه بر ایجاد استرس اکسیداتیو و رادیکالهای آزاد، پراکسیداسیون چربی ها و تخریب اکسیداتیو اسپکترین غشای سلولی را نیز، موجب خواهد شد(۲۰). بنابراین استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز فنیل هیدرازین موجب اختلال درپیوستنز چربی ها و بالا رفتن میانگین درصداسپرم های با هسته نابالغ و یا با DNA شکسته گردیده است(۲۱). درمجموع می توان نتیجه گرفت که آنمی همولیتیک ناشی ازتجویز فنیل هیدرازین بر پارامترهای مختلف اسپرم تاثیر منفی دارد و این تاثیر ناشی از ایجاد استرس اکسیداتیو است، چراکه کروسین به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی(۲۲)، قادر به خنثی کردن برخی از اثرات هیپوکسی و استرس اکسیداتیو بر فعالیتها متابولیکی موش سوری است(۲۳).

درمطالعه حاضر در گروه کنترل شم (PHZ) درصد DNA صدمه دیده بطور قابل توجهی افزایش پیدا نموده بودکه با تجویز اتیل پیروات مقدارDNA صدمه دیده کاهش پیدا نموده بود به طوریکه درگروه اتیل پیروات تنها مقدار DNA صدمه دیده در حدگروه کنترل بود ویافته های حاصل از این تحقیق با مطالعات بالا همخوانی دارد.

تغییرات هسته در جهت متراکم شدن کروماتین و جایگزینی پروتامین بجای هیستون در مرحله اسپرمیوژنز اتفاق می افتدکه پیوستنز چربی ها در این مرحله دارای اهمیت بالایی است(۲۴). بنابراین استرس اکسیداتیو ناشی از فنیل هیدرازین موجب اختلال در پیوستنز چربی ها و بالا رفتن میانگین درصد اسپرم های با هسته نا بالغ و یا با DNA شکسته گردیده است(۲۵). آسیب دیدگی DNA اسپرم از طریق ناکافی و نامناسب بودن فشردگی و پیچیدگی DNA در طی بلوغ اسپرم بوجود می‌آید(۲۶). میزان عدم بلوغ هسته ای در گروه PHZ نسبت گروه کنترل افزایش را نشان داد درحالیکه در گروه PHZ+EP میزان عدم بلوغ هسته ای کمتر شده بطوریکه در گروه اتیل پیروات تنها این میزان در حد گروه کنترل می باشد، بنابراین یافته های حاصل از این تحقیق با کارهای گذشته مطابقت دارد چرا که استرس اکسیداتیو ناشی هیپوکسی القاء شده ناشی از تجویز فنیل هیدرازین باعث آزاد شدن رادیکالهای آزاد شده و اختلال در پیوستنز چربی ها و بالا رفتن میانگین درصد اسپرم های با هسته نابالغ شده که این موضوع باعث اثر مخرب بر روی مراحل تکامل اسپرم و تولید اسپرم های با هسته نابالغ شده ولی با تجویز اتیل پیروات از تعداد اسپرم های نابالغ کاسته شده و توان باروری را نیزافزایش یافت.

در لوله های منی سازی که میزان استرس اکسیداتیو افزایش می یابد، سلولهای زایگر و سرتولی دچار آسیب یا اختلال هستند (۲۷). اختلال درعملکرد سلول های سرتولی و به تبع آن اختلال در روند اسپرمیوژنز، مکانیسم حذف سیتوپلاسم اضافی اسپرم را مختل می کند که در این حالت اسپرم های جدا شده دارای سیتوپلاسم اضافی بوده و از لحاظ مورفولوژیک غیر طبیعی و نابالغ هستند (۲۸). بین میزان گونه های فعال اکسیژن(ROS) با میزان تولید اسپرم های غیر طبیعی ارتباط مستقیمی وجود دارد(۲۹).

میانگین درصد اسپرم با مورفولوژی غیر طبیعی در گروه PHZ در مقایسه باگروه کنترل نشانگر افزایش معنی دار بود که با تجویز آنتی اکسیدانت درگروه PHZ+EP مقدار اسپرم های با مورفولوژی غیر طبیعی کاهش پیدا نموده بطوریکه در گروه اتیل پیروات تنها، این مقدار تقریبا در حد گروه کنترل بود. یافته حاصل از این تحقیق در راستای مطالعات بالا و تایید کننده تحقیقات بالا می باشد.

انکوباسیون گامتها درIVF باعث تولید رادیکالهای آزاد فراوان درپیرامون زیگوت در حال رشد گردیده و موجب به مخاطره افتادن میزان زنده ماندن جنین ها می شود، ملاتونین به عنوان یک عامل آنتی اکسیدانتی رادیکالهای آزاد را حذف نموده و موجب بالارفتن درصد زنده ماندن جنین

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:08 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

های در حال رشد گردیده است(۳۰). در یک مطالعه دیگر مشخص گردید که افزودنی های غذایی با خاصیت آنتی اکسیدانتی موجب افزایش کیفیت اسپرم و بهبود نتایج IVFگردید (۳۱).

وقتی که (ROS) بیشتراز توان آنتی اکسیدانتی بدن تولید شود استرس اکسیداتیو ایجادمی شود، این تنش اکسیداتیو بوسیله پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشاء و تغییر بیشتر مولکولها مانند لیپیدها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک به جنین صدمه می رساند(۳۲)، نتیجه جنین تغییراتی شامل تغییر میتوکندری، توقف سلول جنینی، تخلیه آدنوزین تری فسفات، وآپوپتوز(مرگ برنامه ریزی سلول) است(۳۳). توقف جنین های دوسلولی مشاهده شده در موش سوری همراه با بالا رفتن میزان ROS می باشد(۳۴).

باروری داخل آزمایشگاهی (IVF) و دیگرتکنیکهای کمکی باروری(Asssisted reproductive technologies(ART درحیوانات مزرعه که دارای توانای تولید تعداد زیادی زاد و ولد هستند، انجام می شود. استرس اکسیداتیو فاکتور بزرگی است که روی تمام نسلهای قابل زنده ماندن جنین ها اثر می گذارد (۳۵). تولید رادیکالهای آزاد بوسیله فرآیند های داخل سلولی مانند متابولیسم داخلی سلولی و فاکتورهای خارجی مانند افزودن ماده شیمیایی به محیط کشت، هیپوکسی و یا در معرض قرار گرفتن نور و غیره عامل صدمات اکسیداتیو به گامت و جنین می باشد. سیستم دفاعی ذاتی آنتی اکسیدانتی در جنین برای محافظت جنین در مقابل سطح بالای استرس اکسیداتیو در باروری داخل آزمایشگاهی به مقدارکافی وجود ندارد. صدمه اکسیداتیو بوسیله پرواکسیدانها وگونه فعال اکسیژن (ROS) به گامت و جنین در طول باروری داخل آزمایشگاهی گاو و خوک(۳۶) به اثبات رسیده است.

درنمونه های گاوی در رابطه با فرآیند تولید جنین آزمایشگاهی رضایتبخش نیست و۴۰-۳۰ درصد بلاستوسیت ها به روز هفت نمی رسند. تولید گونه فعال اکسیژن (ROS) عامل اصلی درصد پایین تولید جنین داخل آزمایشگاهی (IVF) است. گونه فعال اکسیژن (ROS) در توقف تقسیمات میوزی اووسیت، توقف سلولهای جنینی و مرگ سلول دخالت دارد (۳۷). (ROS)با گونه فعال اکسیژن باعث نقص درتکامل جنین داخل آزمایشگاهی می شود (۳۸). اثرات مخرب (ROS) در طول بلوغ اووسیت ممکنست باعث تغییر تکامل جنین بشود (۳۹). یک عمل احتمالی برای پیروات، محافظت ازجنین درمقابل استرس اکسیداتیو است، گزارش شده که پیروات از پراکسید که باعث القاء صدمه به جنین گاوی در محیط آزمایشگاهی می‌شود، پیشگیری می‌کند (۴۰)، و از اسپرم در مقابل اثرات مخرب (ROS) محافظت می کند (۴۱).

پیروات از اجزاء مواد حد واسط در باروری داخل آزمایشگاهی (IVF) است و آن تکامل اووسیت های بارور (زیگوت) را به بلاستوسیت در باروری داخل آزمایشگاهی تسریع می نماید (۴۲). پیروات همچنین از اجزاء ضروری برای زیگوت موش سوری برای نخستین تقسیم کلیواژی و تبدیل به مرحله دوسلولی بوده، و به مقدار زیاد بوسیله سلولهای کومولوسی در فولیکول های رشد یافته تخمدان تولید می شود. پیرووات علاوه پراکسیداسیون و تبدیل به لاکتات، دارای دو عملکرد در مراحل اولیه رشد جنین انسان است، نخست به عنوان پاک کننده رادیکالهای آزاد بوسیله توانایی واکنش با پروکسید هیدروژن است چنین عملی برای پیروات در سلولهای سوماتیک ثابت شده و برای مرحله اولیه جنینی پستانداران نیز بوسیله Leese پیشنهاد شده است (۴۳).

نتایج حاصل از بررسی کیفیت اووسیت و لقاح داخل آزمایشگاهی و روند رشد جنینی در گروه های مختلف مورد مطالعه نشان می دهد که میزان لقاح، مرحله دو سلولی، بلاستوسیت و متوقف شده در گروه کنترل شم بطور معنی

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:08 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

داری نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا نموده که با تجویز آنتی اکسیدانت اتیل پیروات توام با فنیل هیدرازین این میزان افزایش پیدا نموده و بهتر شده ولی هنوز دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل می باشد، درصورتیکه در گروهی که تنها از اتیل پیروات استفاده شده است میزان مارکرهای فوق بهتر شده ولی با گروه کنترل شم دارای اختلاف معنی دار می باشد.

مطلبی که در تمام تحقیقات بالا دیده شد این بودکه درشرایط استرس اکسیداتیو، تولید گونه فعال اکسیژن (ROS) افزایش می یابدکه خود عامل اصلی پراکسیداسیون فسفولیپیدها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک سلولهای اووسیت و اسپرم و در نتیجه کاهش میزان لقاح، مرحله دو سلولی، بلاستوسیت و افزایش متوقف شده در گروه های در معرض آن بوده است که با تجویز آنتی اکسیدانت اثرات مخرب ROS روی پارمترهای فوق کاسته شده و میزان لقاح، دو سلولی و بلاستوسیت افزایش پیدا نموده و میزان متوقف شده ها کاهش پیدا نمود که نتایج حاصل از تحقیقات بالا، یافته حاصل از این تحقیق را تایید می کنند.

نتیجه گیری

نتایج حاصل نشان داد که اتیل پیروات دستگاه تولید مثل موش سوری را از آسیب های ناشی از استرس اکسیداتیو محافظت و باعث افزایش کیفیت سلولهای جنسی و میزان لقاح شود ولی در بهبود روند رشد جنین های داخل آزمایشگاهی و کاهش توقف در مراحل مختلف رشد جنینی دارای اثر مختصری بود.

تشکر وقدر دانی

بدینوسیله از دوستان عزیز آقایان دکتر علی کریمی ودکتر حجت عنبرا که در انجام این پروژه همکاری داشته اند تشکروقدر دانی می گردد.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:08 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:08 +0430 on Wednesday June 7th 2017

Referances

1.Clemens MR, Remmer H. Phenylhyrazine-induced lipid peroxidation of redblood cells: in vitro and invivo monitoring by the production of volatile hydrocarbons. Biochem Pharmacol 1984; 33:1715-1718 .

2.O Augusto KL, Kunze OPR, De Montellano N. Phenylprotoporphyrin IX formation in the hemoglobinphenylhydrazine reaction: Evidence for a protein stabilized iron-phenylintermediate. J Biol Chem 1982; 257: 6231 – 6241.

3.Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. J Reprod Fertil 1987; 81:459–469.

4.Jain SK , Hochstein P. Generation of superoxide radicals by hydrazine: Its role in phenylhydarzine – induced hemolytic anaemia. Biochemica et Biophysica Acta (BBA) 1979; 586:128-136.

5.Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil Steril 2003 ;79:829-43.

6.Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum Reprod Update 2001; 7:175-89.

7.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. Fertility and Sterility 2002 ; 78: 1272-7.

8.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; 82:593-600.

9.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; 50:287-95.

10.Kao KK, Fink MP. The biochemical basis for the anti-inflammatory and cytoprotective actions of ethyl pyruvate and related compounds. Biochem Pharmacol 2010; 80: 151–159.

11.Salahudeen AK, Clark EC, Nath KA. Hydrogen peroxide induced renal injury: A protective role for pyruvate in vitro and in vivo. J Clin Invest 1991; 88:1886-1893.

12.Wang Q, van Hoecke M, Tang XN, Lee H, Zheng Z, Swanson RA et al. Pyruvate protects against experimental stroke via an anti-inflammatory mechanism. Neurobiol Dis 2009; 36: 223–231.

13.Das UN. Pyruvate is an endogenous antiinflammatory and anti-oxidant molecule. Med Sci Monit 2006 ; 12: 79-84.

14.Gorustovich AA, Steimetz T, giglio MJ, Guglielmotti MB. A histomorphometric study of alveolar bone modeling and remodeling under experimental anemia and polycythaemia in rats.Arch Oral Biol 2006;51:246-51.

15.MP Fink. Ethylpyruvate: A novel anti-inflammatory Agent Crit Care Med 2003;31:S51-56

16.Hedrich H. The laboratory mouse: handbook of experimental animals.2nd ed.New York: Academic Press 2006;P.439-446.

17.Talebi AR, Sarcheshmeh AA, Khalili MA, Tabibnejad N . Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. Alcohol 2011; 45:403- 409 .

www.SID.ir

Archive of SID

18.Sadeghi MR, Hodjat M, Lakpour N, Arefi S, Amirjannati N, Modarresi T. Effects of sperm chromatin integrity on fertilization rate and embryo quality following intracytoplasmic sperm injection. Avicenna Journal of Medical Biotechnology 2009; 1:173.

19.**Narayana K, D'Souza UJ, Seetharama**-Rao K. Ribavirin-induced sperm shape abnormalities in Wistar rat. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 2002;513:193-196.

20.Rezvanfar M, Sadrkhanlou R,hmadi A, Shojaei-Sadee H, Rezvanfar M, Mohammadirad A,and et al. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. Human and Experimental Toxicology Toxicology 2008;27: 901-10.

21.Mousavi SH,Tayarani NZ, Parsaee H. Protective effect of saffron extract and crocin on reactive oxygen species mediated high glucose-induced -induced toxicity in PC12 cells. Cellular and Molecular Neurobiology 2010; 30: 185-191.

22.Farias JG, Bustos-**Obrego´n E, Bucare JL, Quiroz E, Reyes JG. Effects of chronic** hypobaric hypoxia on testis histology and round spermatid oxidative metabolism. Andrologia 2005; 37: 47-52.

23.Halliwell B, Gutteridge JMC. The chemistry of oxygen radicals and other derived species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, eds. Free radicals in biology and medicine.2nd ed. Oxford:Clarendon press 1989.p.48:22-85

24.Komljenovic D, Sanhoff RT,Tiegler A, Heid H, Just WW, Gorgas K. Disruption of blood-testis barrier dynamics in either-lipid-deficient mice .Cell and tissue 2009; 337: 281-299

25.Rezvanfar M, Sadrkhanlou R, Ahmadi A, Shojaei-Sadee H, Rezvanfar M, Mohammadirad A and et al. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. Human and Experimental Toxicology 2008 ;27: 901-910.

26.Sailer BL, Jost LK, evenson DP. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay 1995; 16:80-87.

27.Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. American Journal of Reproductive and Immunology 2008; 59:2-11.

28.Suzuki N, Sofikitis N .Protective effects of antioxidants on testicular functions of varicocelized rats. Yonago Acta Medica 1999; 42:87-94.

29.Iwasaki A, Gagnon C. Formation of oxygen reactive species in spermatozoa of infertile patients. Fertil Steril 1992; 57: 409-416.

30.Wirleitner B, Vanderzwalmen P, Stecher A, Spitzer D, Schuff M, Schwerda D, et al. Dietary supplementation of antioxidants improves semen quality of IVF patients in terms of motility, sperm count, and nuclear vacuolization. Int J Vitam Nutr Res 2012; 82(6): 391-8.

31.Berger J. Phenylhydrazine haematotoxicity. Journal of Applied Biomedicine 2007; 5:125–130.

32.Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. Free Radicals Biol Med 1999;26:463-71

33.Nasr-Esfahani MH, Aitken R.J , Johnson MH. Hydrogen peroxide level in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo. Development 1990a;۱۰۹: 501-507.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:08 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

34.Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum Reprod Update. 2001 Mar-Apr ;7:175-89.
35.Silva PFN, Gadella BM, Colenbrander B, Roelen BAJ. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage. Theriogenology 2007 ;67: 609-19.
36.Conaghan J, Handyside AH, Winston RML, Leese HJ. Effects of pyruvate and glucose on the development of human pre-implantation embryos in vitro. J Reprod Fertil 1993; 99: 87-95.
37.Hashimoto S, Minami N, Yamada M, Imai H. Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. Mol Reprod Dev 2000; 56: 520-26.
38.Marques A, Santos P, Antunes G, Chaveiro, and F. Moreira da Silva.Effect of alpha-tocopherolon in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. Can J Anim Sci 2008; 88: 463-7
39.Blondin P, Coenen K, Sirard MA .The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. J Androl 1997; 18: 454-60.
40.Morales H, Tilquin P, Rees JF, Massip A, Dessy F & Van Langendonckt A. Pyruvate prevents peroxide-induced injury of in vitro pre-implantation bovine embryos. Molecular Reproduction and Development 1999;52:149-157.
41.De Lamirande E , Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. Journal of Andrology 1992;13:379-386.
42.Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. Proc Natl Acad Sci USA 1967; 58:560-567.
43.Leese HJ, Barton AM. Production of pyruvate by isolated mouse cumulus cells. J Exp Zool 1985; 234:231-236.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:08 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir