Archive of SID

ORIGINAL ARTICLE

Protective Effect of Selenium-enriched Saccharomyces cerevisiae Cell Wall on In Vitro Fertilization in Adult Male Rats under Chronic Immobilization Stress

Sanaz Yousefi[1],
Gholamreza Najafi[2],
Vahid Nejati[3],
Amir Tukmechi[4]

[1] MSc Student in Embryology and Histology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
[3] Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine , Urmia University, Urmia, Iran

(Received August 1, 2015 Accepted October 19, 2015)

Abstract

Background and purpose: Stress is one of the decisive factors in infertility, which can interfere with spermatogenesis and reduce spermatozoa. Considering the immobilization stress-induced infertility disorders, this study aimed at examining the protective effect of selenium yeast cell wall (as an antioxidant) on in vitro fertilizing ability following immobilization stress in adult male rats.

Materials and methods: In an experimental study, 32 male adult rats were divided into 4 groups (n= 8 per group) including controls, stress, stress + cell wall of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) enriched with selenium (SECW) and a SECW group without inducing stress. To induce stress, the rats were immobilized in restraint device for 42 days 2hrs per day. The SECW (5×10^8 CFU/ml) +268µg/gr SE were orally administrated for 42 days. Afterwards, the sperm samples were collected for in-vitro fertilization (IVF). Moreover, malondialdehyde (MDA) concentration in testicular tissue was assessed in all groups.

Results: Immobilization stress significantly reduced the percentage of zygote, two-cell embryos, blastocyst, hatched embryos and increased MDA levels compared to the control group ($P < 0.05$). In the SECW+stress all parameters of fertilization and embryos development increased significantly ($P < 0.05$) except the percentage of zygote compared to the stress group. Administration of SECW+ stress, significantly decreased the level of MDA tissue compared to the stress group ($P < 0.05$).

Conclusion: Immobilization stress was proved to have harmful effects on fertility, therefore, SECW that has antioxidant compounds could inhibit oxygen free radicals thereby, increasing fertilization and fertility potential.

Keywords: Stress, *Saccharomyces cerevisiae*, Selenium, In vitro fertilization

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(133): 183-195 (Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۳۳ بهمن سال ۱۳۹۴ (۱۹۵-۱۸۳)

مطالعه اثر محافظتی دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) غنی شده با سلنیوم بر روی توان باروری آزمایشگاهی در رت‌های نر بالغ تحت استرس بی‌حرکتی مزمن

ساناز یوسفی[۱]
غلامرضا نجفی[۲]
وحید نجاتی[۳]
امیر توکمه چی[۴]

چکیده

سابقه و هدف: استرس یکی از عوامل تعیین‌کننده در ناباروری می‌باشد، که می‌تواند باعث اختلال در اسپرماتوژنز، کاهش اسپرماتوزوآ و عدم لقاح شود. با توجه به اختلالات ناباروری ناشی از استرس بی‌حرکتی، هدف از این مطالعه اثرات محافظتی دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس سرویزیه غنی شده با سلنیوم، به‌عنوان آنتی‌اکسیدان، بر روی توان باروری آزمایشگاهی متعاقب استرس بی‌حرکتی مزمن در رت‌های نر بالغ می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۳۲ رت نر بالغ به ۴ گروه ۸ تایی کنترل، استرس، استرس به همراه دیواره مخمر (ساکارومایسس سرویزیه) غنی شده با سلنیوم (SECW) و گروه SECW بدون القاء استرس تقسیم‌بندی شدند. استرس بی‌حرکتی با قرار دادن حیوانات در داخل دستگاه رست رینر روزی ۲ ساعت به مدت ۴۲ روز القاء شد. SECW با تراکم 5×10^{8} CFU/ml و دوز ۲۸۶µg/gr به صورت گاواژ تا ۴۲ روز تجویز شد. سپس نمونه‌های اسپرم برای لقاح داخل آزمایشگاهی استفاده شده و میزان مالون دی آلدئید (MDA) بیضه تمامی گروه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: استرس بی‌حرکتی در مقایسه با گروه کنترل به شکل معنی‌داری ($p<0/05$). باعث کاهش درصد زیگوت، جنین‌های دو سلولی، بلاستوسیست و هچ شده و افزایش سطح MDA شد. تجویز SECW به همراه استرس تمامی پارامترهای مرتبط با لقاح و رشد جنین‌ها را نسبت به گروه استرس افزایش داد که این افزایش به جز درصد زیگوت معنی‌دار ($p<0/05$). بوده است. هم‌چنین، تجویز SECW به همراه استرس، سطح MDA بافتی را در مقایسه با گروه استرس کاهش داد ($p<0/05$).

استنتاج: با توجه به اثرات تخریبی استرس بی‌حرکتی بر توان باروری، SECW به سبب دارا بودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد اکسیژن، می‌تواند موجب افزایش لقاح و توان باروری شود.

واژه های کلیدی: استرس، ساکارومایسس سرویزیه، سلنیوم، لقاح آزمایشگاهی

مقدمه

استرس تبدیل به بخش جدایی ناپذیر از وضعیت بشر در سراسر جهان شده است. به احتمال زیاد روبرو شدن افراد با استرس در زندگی، باعث آشفتگی تعادل فیزیولوژیکی و روانی می‌شود(۱).

مولف مسئول: غلامرضا نجفی–ارومیه: دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه E-mail: g.najafi2006@yahoo.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲. استادیار، گروه آناتومی و جنین شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۴. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۵/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۵/۱۹ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۷/۲۷

www.SID.ir

Archive of SID

عوامل استرس‌زا را می‌توان به ۳ دسته کلی تقسیم کرد: ۱- فیزیکی (محدودیت، شوک پا و ورزش)، ۲- روانی (انزوا، ترس و اضطراب یا سرخوردگی‌های روانی) ۳- متابولیکی (قرار گرفتن در معرض گرما، هیپوگلیسمی و خونریزی)(۲). استرس بی‌حرکتی یکی از روش‌های آسان و مناسب برای القا هر دو نوع استرس فیزیکی و روانی می‌باشد که در نتیجه آن حرکت محدود شده و در مدل‌های حیوانی قابل اجرا است(۳). در موجودات مختلف، بی‌حرکتی در دو شکل حاد و مزمن به عنوان استرسی تلقی می‌گردد که می‌تواند اثرات گوناگونی بر فیزیولوژی جانوران در حوزه‌های رشد، نمو و عملکرد فیزیولوژیک هیپوتالاموس، هیپوفیز،آدرنال و غده تیروئید داشته باشد(۴، ۵). این نوع استرس باعث از دست رفتن سیالیت غشای اسپرماتوزوآ می‌شود که برای حرکت اسپرم، امتزاج اسپرم و تخمک ضروری می‌باشد(۶). قرار گرفتن در معرض استرس‌های طولانی مدت، واکنش رادیکال‌های آزاد را القاءمی‌کند که به نوبه ی خود به تغییرات زیان‌آور در غشای پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و DNA منجر می‌شود(۷). هم‌چنین بر ترشح هورمون‌ها (مانند تستوسترون) تأثیر گذاشته، پراکسیداسیون لیپیدی را افزایش داده و هم چنین مواد آنتی‌اکسیدانی آندروژنی مانند گلوتاتیون (GSH) و ویتامین E را کاهش می‌دهد(۹،۸). ناباروری یکی از مهم‌ترین مشکلات نسل جوان است که به طور متوسط در ۱۵-۱۰ درصد زوجین وجود دارد(۱۰). حدود ۴۰ درصد از ناباروری‌ها به علت وجود مشکل در مردان است که می توان به مهم‌ترین آن ها از جمله تعداد کم اسپرم، عدم تحرک کافی اسپرم، اسپرم‌های ناهنجار و بسته شدن مجاری انتقال اسپرم اشاره کرد. با این حال باروری مردان تحت تأثیر غذا و مواد مغذی بهبود می‌یابد(۱۱). استرس یکی از عوامل تعیین‌کننده در ناباروری می‌باشد(۱۳،۱۲) که می‌تواند به دلیل اختلال در روند تولید اسپرم تحت تأثیر عوامل استرس‌زا ایجاد شود(۱۴). Mingoti و همکاران (۲۰۰۳) کاهش میزان لقاح به دلیل استرس در موش‌های تحت آزمایش را گزارش کردند(۱۵). استرس موجب کاهش تولید اسپرم و به دنبال آن کاهش در تعداد لایه‌های زایای بالغ در بیضه و هم‌چنین کاهش اسپرماتوزوآ و عدم لقاح می‌شود(۱۶). بنابراین، بررسی علل و عوامل ایجاد کننده ناباروری در مردان و چگونگی جلوگیری از ایجاد ناباروری در یک جامعه، به بیمارانی که از ناباروری رنج می‌برند، کمک‌کننده خواهد بود.

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده و مشخصی هستند که در صورت مصرف در انسان یا حیوان، با اثر بر فلور میکروبی بدن باعث اعمال اثرات مفید بر سلامتی میزبان می‌شوند(۱۸،۱۷). مخمرها به عنوان دسته‌ای از پروبیوتیک‌ها تقسیم‌بندی می‌شوند که ساکارومایسس سرویزیه، قارچ مخمری یوکاریوت و تک‌سلولی بوده و به عنوان یک مدل یوکاریوتی در زمینه‌های مختلف مثل زیست‌شناسی مولکولی، بیوتکنولوژی و علوم پزشکی به کار می‌رود. دیواره سلولی این مخمر از سه لایه اصلی و چهار ماکرومولکول عمده مانو پروتئین، بتا(۳-۱) گلوکان، بتا(۶-۱) گلوکان و کیتین ساخته شده که توسط پیوندهای کووالان به هم متصل شده‌اند(۱۹). دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس سرویزیه منبع غنی از آنزیم‌ها، نوکلئوتیدهای آزاد، ویتامین‌های گروه B و آمینواسیدها بوده و حاوی بتاگلوکان می‌باشد. بتاگلوکان یک آنتی‌اکسیدان قوی بوده و در تقویت سیستم ایمنی بدن بسیار مؤثراست(۲۰). سلنیوم ماده غذایی کمیاب و ضروری برای انسان‌ها و حیوانات است که یک آنتی‌اکسیدان قوی محسوب می‌شود و در عین حال به عنوان کوفاکتور آنزیم گلوتاتیون پر اکسیداز (GSH-PX) عمل می‌کند(۲۱). سلنیوم برای رشد و نمو طبیعی بیضه و اسپرماتوژنز در رت‌ها، موش های سوری و خوکچه ضروری است(۲۴-۲۲). هم‌چنین در ساخت سلنو پروتئین‌ها شرکت می‌کند که قسمت عمده‌ای از کپسول میتوکندری ناحیه میانی اسپرم را تشکیل داده است(۲۵). در بین اندام‌های تولیدمثلی، بیضه دارای

www.SID.ir

Archive of SID

بالاترین غلظت سلنیوم می‌باشد که مقدار آن حتی از کبد نیز بیش‌تر است. غلظت سلنیوم نشان‌دهنده نقش محافظتی این عنصر کمیاب و آنزیم‌های مرتبط با آن در طی اسپرماتوژنز می‌باشد(۲۶). کاهش غلظت سلنیوم احتمالاً اسپرماتوزوآ را نسبت به رادیکال‌های آزاد اکسیژن، آسیب‌پذیرتر می‌سازد(۲۱). استفاده از میکروارگانیسم‌ها، به عنوان ناقل ریزمغذی‌ها ایده‌ی جدیدی است که برای نخستین بار توسط Suhajda و همکاران در سال ۲۰۰۰ پیشنهاد شد. ساکارومایسس سرویزیه کاربرد فراوانی در صنایع غذایی داشته و غنی‌سازی آن با سلنیوم برای تکمیل جیره‌های غذایی بسیار مفید می‌باشد(۲۶). با در نظر گرفتن اثرات سوء استرس بی‌حرکتی بر توان باروری و نقش بسیار پیچیده پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از استرس اکسیداتیو در بافت بیضه، دیواره سلولی مخمر غنی شده با سلنیوم (SECW)[1] به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت. بنابراین در مطالعه حاضر سعی شد تا اثرات بهبود بخش SECW بر توان باروری، متعاقب القاء استرس بی‌حرکتی مورد ارزیابی قرار گیرد. در این راستا میزان مالون دی آلدئید (MDA) بافت بیضه به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از استرس اکسیداتیو نیز بررسی شد.

مواد و روش ها

در مطالعه حاضر، تعداد ۳۲ سر رت نر بالغ با وزن متوسط ۱۵±۱۸۰ گرم، از مرکز حیوانات آزمایشگاهی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه تهیه شد و تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۳±۲۲ درجه سانتی گراد نگهداری و با ترکیبی از گندم، ذرت و پلیت تغذیه شدند. آب به‌صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار داده شد. در این مطالعه رت‌ها به طور تصادفی به ۴ گروه (۸ رت در هر گروه) زیر تقسیم شدند:

۱-گروه کنترل: در این گروه هیچ تیماری بر روی رت‌ها انجام نشده و تحت هیچ استرسی قرار نگرفتند.

۲- گروه استرس: در این گروه رت‌ها روزانه ۲ ساعت به مدت ۴۲ روز تحت استرس بی‌حرکتی قرار گرفتند.

۳- گروه SECW به همراه استرس: رت‌ها همزمان با القاء استرس، ۱ میلی‌لیتر SECW (با تراکم ۵×۱۰^{۸}CFU/ml) غنی شده با سلنیوم با دوز ۲۸۶µg/gr را به صورت گاواژ (خوراکی) دریافت می نمودند.

۴-گروه SECW بدون استرس: در این گروه رت‌ها بدون القاء استرس بی حرکتی تنها SECW با شرایط مشابه با گروه سوم دریافت نمودند. متعاقب ۴۲ روز، نمونه‌های اسپرم و بافت بیضه برداشته شد.

روش القای استرس بی‌حرکتی

برای القا استرس بی‌حرکتی از مهارکننده‌های مخصوص (دستگاه رست رینر) متناسب با اندازه رت‌ها، استفاده شد. به‌طوری که رت‌ها درون آن قابلیت حرکت را تا حد ممکن از دست می‌دهند. رت‌ها، روزانه به مدت ۲ ساعت درون این مهارکننده‌ها قرار گرفتند و تا حد امکان از تأثیر عوامل استرس‌زای دیگر مانند صدا، تغییرات نوری و دمایی جلوگیری به عمل آمد. پس از پایان استرس، حیوانات به قفس‌های خود برگردانده شدند(۲۷).

آماده‌سازی مخمر و غنی‌سازی با سلنیوم

مخمر مورد استفاده در این تحقیق از مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ های صنعتی ایران (PTCC۵۲۶۹) تهیه شد. هم چنین نمک سلنیت سدیم (Na_2SeO_3) از شرکت سیگما (آمریکا)تهیه گردید. غنی‌سازی مخمر بر اساس روش استاندارد Yin و همکاران (۲۰۱۰) انجام گرفت(۲۷). ابتدا محیط کشت مخمر YNB[2]، حاوی مخمر (۲ درصد) و K_2HPO_4

1. SECW =SeleniumCell Wall (Yeast cell wall enriched with selenium)

2. Yeast Nutrient broth

www.SID.ir

Archive of SID

(۱ درصد) تهیه و pH آن برابر با ۸/۵ تنظیم شد. پس از آن، به دو ظرف مجزای حاوی ml ۹۰ محیط کشت در شرایط استریل، ۱۰mg مخمر افزوده و اجازه داده شد تا مخمر در دمای ۲۷/۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور شیکردار رشد نماید. بعد از ۱۲ ساعت، مقدار ۹۰µl سلنیت سدیم با غلظت ۱۰mg/ml، به یکی از محیط‌های کشت اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت انکوباسیون در شرایط قبلی انجام گرفت(۲۹). جهت اندازه‌گیری میزان سلنیوم دیواره سلولی مخمر از روش جذب اتمی استفاده شد.

تهیه دیواره سلولی

جهت تهیه دیواره سلولی مخمر به طور خلاصه، ابتدا مخمر به صورت جداگانه در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در شرایط هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. پس از رشد، محیط کشت به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۵۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید و رسوب حاصل دو مرتبه با بافر فسفات ۰/۱ مولار و pH برابر ۶/۹ شستشو داده شد. رسوب به دست آمده به مدت یک شبانه‌روز در سرمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس مخمر به روش Freez-Thaw لیز شد. در مرحله بعد، عمل خرد کردن در کنار یخ، توسط دستگاه سونیکاتور (Tomy-Japan) انجام گرفت. در انتها نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردیدند. محلول رویی به عنوان عصاره سیتوپلاسمی جدا شده و رسوب حاصل نیز به عنوان دیواره سلولی جدا گردید. سپس دیواره‌ها به مدت یک شبانه‌روز داخل دستگاه انجماد خشک (Freeze drier) قرار داده شد تا خشک شوند(۲۹).

طرز تهیه محیط کشت اختصاصی برای جنین رت (mR1ECM, 1-cell rat embryos culture medium):

استوک A: کلرید سدیم ۴۲/۶ گرم، کلرید پتاسیم ۲۳۹/۰ گرم، گلوکز ۳۵۲/۱ گرم، پنی سیلین جی ۰/۰۷۵ گرم، استرپتومایسین ۰/۰۵۰ گرم، لاکتات سدیم ۱/۹ میلی‌لیتر را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب سه بار تقطیر، حل کرده و سپس با استفاده از فیلتر ۰/۲۰ فیلتر نموده و تحت عنوان استوک A در داخل یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

استوک B: برای تهیه آن کلرید کلسیم به میزان ۰/۲۹۴گرم و کلرید منیزیم ۰/۱۰۲ گرم را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل نموده و بعد از فیلتر کردن در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در داخل یک فلاسک محیط کشت، ۱۰ میلی‌لیتر از استوک A و ۱۰ میلی‌لیتر از استوک B را ریخته و به آن ۰/۲۱۰ گرم بی‌کربنات سدیم، ۰/۰۰۵ گرم پیرووات سدیم، ۰/۰۱۴۶ گرم گلوتامین آل، ۲ میلی‌لیتر اسیدهای آمینه ضروری و ۱ میلی‌لیتر اسیدهای آمینه غیرضروری اضافه نموده، سپس حجم آن را با استفاده از آب سه بار تقطیر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده و محیط را فیلتر و مورد استفاده قرار دادیم.

روش تهیه اسپرم

برای تهیه اسپرم، متعاقب آسان‌کشی رت‌های نر توسط کتامین، پوست ناحیه شکمی با اتانول ۷۰ درصد استریل گردید. پس از ایجاد برش در ناحیه شکم، دم اپیدیدیم از بیضه جدا شده و بعد از چند برش در آن، به اپندورف استریل حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت mR1CEM تخلیه، سپس به انکوباتور کشی سلولی با $5\ CO_2$ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. بعد از گذشت ۶۰ دقیقه، اسپرم‌ها استحصال شده در محیط کشت، برای لقاح تخمک‌ها استفاده گردید.

روش تخمک گیری و لقاح داخل آزمایشگاهی

ابتدا به هرکدام از رت‌های ماده بالغ، ۲۵ واحد بین‌المللی گنادوتروپین سرم مادیان آبستن[1](PMSG) به شکل داخل صفاقی تزریق گردید. ۵۴ ساعت بعد از تزریق PMSG به هر موش صحرایی، ۱۵ واحد بین المللی

1. Pregnant serum gonadotropin (PMSG)

www.SID.ir

Archive of SID

هورمون HCG، به شکل داخل صفاقی تزریق شد. متعاقب۱۲ الی ۱۴ ساعت، رت‌ها- به روشی که در بالا اشاره شد- آسان‌کشی شدند. اویداکت به همراه قسمت کوچکی از شاخ رحم به محیط کشت mR1CEM انتقال یافت. تخمک‌ها از آمپول اویداکت برداشته شدند و پس از شست وشو با محیط mR1CEM، به قطرات لقاح ۵۰۰ میکرولیتری در زیر روغن معدنی حاوی محیط کشت mR1CEM منتقل شدند. سپس اسپرم‌هایی که مرحله ظرفیت‌یابی را طی نموده بودند، به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت به قطرات محیط کشت افزوده شد. عمل لقاح حدود ۴ تا ۶ساعت پس از اضافه کردن اسپرم‌ها با مشاهده دو پیش هسته نر و ماده مورد ارزیابی قرار گرفت. زیگوت‌ها بعد از شست و شو، به محیط کشت تازه‌ای منتقل شد و ۲۴ ساعت بعد از لقاح، درصد جنین‌های دو سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس در روزهای ۴ و ۵، درصد بلاستوسیست‌ها و جنین‌های هچ شده ارزیابی شد.

اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدئید (MDA) در بافت بیضه

جهت تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدی، مقدار تولید MDA در بافت بیضه با استفاده از واکنش اسید تیوباربی توریک (TBA) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. برای این منظور ۰/۳-۰/۲گرم از نمونه‌ها در کلرید پتاسیم خنک (mM150)، هموژن شد و سپس ترکیب حاصل در ۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. ۰/۵ میلی‌لیتر از ماده رویی با ۳ میلی‌لیتر اسید فسفریک (V/V%1) مخلوط شده، پس از مخلوط شدن توسط ورتکس، ۱ میلی‌لیتر TBA 6.7 g/L به نمونه‌ها اضافه شد. نمونه ها برای مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته، سپس در یخ سرد شدند. پس از افزودن ۳ میلی‌لیتر انبوتانول، نمونه‌ها مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مقدار جذب ماده رویی به وسیله اسپکتوفتومتری در ۵۳۲ نانومتر بر اساس منحنی کالیبراسیون استاندارد MDA محاسبه گردید و میزان پروتئین نمونه‌ها نیز بر اساس روش لوری مورد اندازه‌گیری قرار گرفت و در نهایت مقدار MDA بافت بیضه به‌صورت نانومول در هر میلی‌گرم پروتئین بیان شد(۳۱،۳۰).

روش آماری

در این تحقیق از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد. داده‌ها توسط آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست دانکن مورد تحلیل و تجزیه قرار گرفتند. هم‌چنین اختلاف میانگین داده‌ها در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

یافته ها

بررسی قابلیت باروری آزمایشگاهی

درصد جنین‌های لقاح یافته

جدول شماره ۱، درصد زیگوت‌های حاصل از لقاح در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که درصد لقاح در گروهی که تحت تأثیر استرس قرار گرفته بود، کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل و SECW نشان داد ($p<0/05$). در حالی که درصد لقاح در گروه استرس به همراه SECW افزایش یافته ولی هیچ گونه تفاوت معنی‌داری با گروه استرس نداشت ($p<0/05$) و هیچ گونه تفاوت معنی‌داری بین گروه SECW بدون استرس با گروه کنترل مشاهده نشد ($p<0/05$).

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین پارامترهای درصد زیگوت، درصد جنین‌های دو سلولی، درصد بلاستوسیست‌ها، درصد جنین‌های هچ شده در گروه‌های مورد مطالعه در رت های نر بالغ

گروه های مورد مطالعه	درصد زیگوت	درصد جنین‌های دو سلولی	درصد بلاستوسیست ها	درصد جنین‌های هچ شده
کنترل	۸۷/۴۵±۱/۲۵ a	۸۵/۴۴±۳/۴۴ a	۷۱/۶۱±۰/۸۸ a	۷۱/۹۸±۳/۰۲ a
SECW	۸۴/۹۵±۱/۰۸ a	۸۵/۸۸±۰/۶۴ a	۷۲/۹۴±۳/۷۱ a	۷۰/۸۹±۱/۳۳ a
استرس	۷۲/۵۱±۸ b	۶۳/۲۱±۲/۶۹ b	۵۵/۹۱±۰/۷۴ b	۵۱/۶۵±۴/۶ b
به همراه استرس SECW	۷۶/۵۰±۱/۵ b	۷۵/۲۷±۰/۹۲ c	۶۷/۲۹±۱/۶۷ a	۶۵/۱۴±۱/۵۱ a

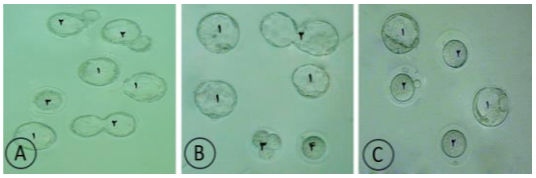
حروف لاتین غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار مابین گروه‌ها در هرستون می‌باشد ($p<0/05$). داده ها بر حسب Mean ± SD نشان داده شده اند.

www.SID.ir

Archive of SID

درصد جنین‌های دو سلولی حاصل از زیگوت‌ها

درجدول شماره۱، درصد جنین‌های دو سلولی حاصل از زیگوت‌ها در گروه‌های مختلف نشان داده شده است. نتایج این مطالعه نشان داده که در گروه استرس، درصد جنین های دو سلولی کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه‌های کنترل و SECW (p<۰/۰۵) از خود نشان می‌دهد. در گروه استرس به همراه SECW افزایش معنی داری در درصد جنین‌های دو سلولی در مقایسه با گروه استرس وجود دارد (p<۰/۰۵) و هیچ گونه تفاوت معنی داری بین گروه SECW بدون استرس با گروه کنترل مشاهده نشد (p<۰/۰۵) (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: (A) گروه کنترل: سه جنین در مرحله بلاستوسیست (۱)، سه جنین در حال هچ (۲) و یک تخمک بارور نشده (۳) دیده می‌شود. تصویر (B): گروهSECW همراه با استرس: سه جنین در مرحله بلاستوسیست (۱)، یک جنین در حال هچ (۲)، یک جنین متوقف شده (۳) و یک تخمک بارور نشده (۴) دیده می‌شود. تصویر (C): گروه استرس: دو جنین در مرحله بلاستوسیست (۱) و سه تخمک (۲) بارور نشده دیده می‌شود (بزرگ نمایی ×۲۰۰).

درصد جنین‌های مرحله بلاستوسیست

همان‌طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، درصد بلاستوسیست‌ها درگروه استرس کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل و SECW نشان داد (p<۰/۰۵). درحالی‌که در گروه استرس به همراه SECW درصد بلاستوسیت‌ها در مقایسه با گروه استرس افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد (p<۰/۰۵) و هیچ گونه تفاوت معنی داری بین گروه SECW بدون استرس با گروه کنترل مشاهده نشد (p<۰/۰۵).

درصد بلاستوسیست‌های هچ شده

در این مطالعه مشخص گردید که درصد بلاستوسیست‌های هچ شده در گروه دریافت کننده استرس کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل و SECW نشان داد (p<۰/۰۵). در گروه استرس به همراه SECW درصد جنین‌های هچ شده افزایش یافته و اختلاف معنی‌داری را با گروه استرس نشان می‌دهد (P<۰/۰۵) و هیچ گونه تفاوت معنی‌داری بین گروه SECW بدون استرس با گروه کنترل مشاهده نشد (p<۰/۰۵).

تغییرات بیوشیمیایی MDA بافتی در بافت بیضه

نتایج بیوشیمیایی این مطالعه در جدول شماره ۲ نشان می‌دهد که استرس در سطح معنی‌داری (p<۰/۰۵) باعث افزایش میزان MDA بافتی نسبت به سایر گروه‌ها گردید و تجویز SECW در گروه SECW همراه با استرس این افزایش را در سطح قابل ملاحظه‌ای (p<۰/۰۵) نسبت به گروه استرس کاهش داد، در صورتی که این کاهش نسبت به گروه کنترل تغییرات معنی‌داری (p<۰/۰۵) نشان نداد. قابل ذکر است که افزایش اندکی در MDA گروه SECW بدون استرس نسبت به گروه کنترل مشاهده شد که از لحاظ آماری معنی‌دار (p<۰/۰۵) بوده است.

جدول شماره ۲: میانگین MDA بافت بیضه در گروه های مختلف

گروه‌ها	MDA(nmol/mg protein)
کنترل	۵/۲۷±۳/۹۰ [a]
SECW	۱۴/۲±۹/۱۶
استرس	۸۷/۵ ±۹/۹۰
SECW به همراه استرس	۲۳/۰۳±۶/۱۹

حروف لاتین غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ما بین گروه‌ها در هر ستون می‌باشد (P<۰/۰۵). تمامی داده ها بر اساس Mean±SD بیان شده اند.

بحث

عوامل مختلفی در ناباروری مردان دخیل است که بیش‌تر عوامل مربوط به کیفیت اسپرم می‌باشد(۳۳،۳۲). استرس یکی از عوامل تعیین کننده در ناباروری می‌باشد(۱۴-۱۲) که به دلیل اختلال اسپرماتوژنز تحت

www.SID.ir

Archive of SID

تأثیر عوامل استرس‌زا ایجاد می‌شود(۱۵). مطالعات متعدد نشان می‌دهد که استرس ممکن است از طریق تأثیر بر غدد تناسلی موجب ناباروری شود(۳۴).

Tilbrook و همکارانش (۲۰۰۰) نشان دادند که استرس مزمن، ترشح گونادوتروپین‌ها را متوقف کرده، بنابراین تولیدمثل را مهار می‌کند(۳۵). مشاهدات مطالعه حاضر نیز در راستای مطالعات قبل نشان داد که استرس بی‌حرکتی، میزان لقاح‌پذیری اسپرم‌ها را کاهش می‌دهد. استرس بی‌حرکتی باعث از دست رفتن سیالیت غشای اسپرماتوزوا می‌شود که سلامت غشاء اسپرم ها به منظور حفظ تحرک پذیری، امتزاج اسپرم و در نهایت باروری تخمک ضروری هستند(۶). RAI و همکارانش در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که استرس بی‌حرکتی با ایجاد اختلال در اسپرماتوژنز و پتانسیل آندوکرینی بیضه، توان باروری را کاهش می‌دهد(۳۶). دلیل سرکوب اسپرماتوژنز ممکن است ناشی از القاء اختلال محور هیپوتالاموس- هیپوفیز به وسیله استرس بی‌حرکتی باشد که موجب کاهش سطوح تستوسترون در سرم می‌شود(۳۷). هورمون مذکور نقش فیزیولوژیک مهمی را در حفظ و تداوم روند اسپرماتوژنز ایفا می‌کند و در ضمن سطوح پایین تستوسترون، در نهایت موجب کاهش شمار اسپرم می‌شود(۳۸). بنا به گفته Fahim و همکارانش (۲۰۰۸) استرس بی‌حرکتی با ایجاد اختلال در پتانسیل آنتی اکسیدانی بافت بیضه بروز استرس اکسیداتیو را باعث می‌شود(۳۹).

در مطالعه حاضر میزان MDA بافتی اندازه‌گیری شد. مشاهدات نشان دادند که استرس بی‌حرکتی در سطح وسیعی میزان MDA بافتی را افزایش داد. بنابراین، شرایط استرس‌زا با تولید مقادیر زیادی رادیکال آزاد باعث ایجاد عدم تعادل درسیستم اکسیدان و آنتی‌اکسیدان سلول‌ها و بافت‌ها می‌شود(۴۱،۴۰). انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن که در اثر القاء استرس ایجاد می‌شود: شامل آنیون سوپر اکسید (o_2)، رادیکال هیدروکسیل (OH) و مشتقات غیر رادیکالی از اکسیژن مانند پر اکسید هیدروژن بوده که به شدت ناپایدارند و به طور سریع و غیرتخصصی با مولکول‌های زیستی واکنش نشان داده و منجر به ایجاد توسعه انواع آسیب‌های سلولی از جمله پراکسیداسیون غشاء پلاسمایی، اکسیداسیون اسید آمینه، نکروتیک آپوپتوزیس و نکروزیس می‌شوند که خود در نهایت منجر به کاهش قابلیت زنده ماندن و تکوین جنین‌های آزمایشگاهی می‌گردد(۴۳،۴۲). شواهد فراوانی بر نقش جدی استرس اکسیداتیو در ناباروری مردان دلالت دارند. مطالعات، سطح بالای رادیکال‌های آزاد را در ۴۰-۲۵ درصد مردان نابارور گزارش داده‌اند(۴۴). اما برخلاف یافته‌های مربوط در گروه استرس، در گروه SECW همراه با استرس، میزان MDA بافتی در سطح معنی‌داری کاهش یافته بود. با در نظر گرفتن موارد اشاره شده در بالا می‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که تجویز SECW همراه با استرس در حقیقت با افزایش توان آنتی‌اکسیدانی بافت بیضه، میزان پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش داده است. بدین‌ترتیب با حفظ سیالیت غشاء در اسپرم‌ها قادر بوده است تا میزان لقاح پذیری اسپرم‌ها را بالا ببرد.

در نهایت رادیکال‌های آزاد شده در اثر استرس، از دلایل مهم پایین بودن درصد تولید جنین در شرایط آزمایشگاهی بیان شده است و تصور می‌شود که رادیکال‌های آزاد اکسیژن در توقف تقسیم میوزی تخمک(۴۵) و توقف جنینی و مرگ سلولی دخالت دارند(۴۶). هم‌چنین توقف تکوین جنین‌های دو سلولی در جنین موش همراه با افزایش پر اکسیداسیون لیپیدها مشاهده می‌گردد(۴۷). در مطالعه حاضر نشان داده شد که همزمان با افزایش پراکسیداسیون لیپیدی (که با بالا بودن MDA نشان داده شد)، درصد جنین‌های دو سلولی، بلاستوسیست‌ها و جنین‌های هچ شده در گروه استرس در مقایسه با گروه SECW همراه با استرس کاهش یافته بود. در همین راستا، مشخص شده است که تجویز آنتی‌اکسیدان‌ها نه تنها می‌توانند باعث بهبود پارامترهای کیفی و کمی اسپرم شود، بلکه می‌تواند به طور چشم‌گیری مانع آسیب DNA اسپرم‌ها گردد(۴۸). اثرات

www.SID.ir

Archive of SID

تخریبی رادیکال‌های آزاد توسط سیستم آنتی‌اکسیدان درون سلولی مانند گلوتاتیون، اسید آسکوربیک و آنزیم‌هایی مانند سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز کنترل و یا مهار می‌گردد(۴۹). بررسی‌های آزمایشگاهی صورت گرفته، نقش آنتی‌اکسیدان‌ها را در کاهش تولید ROS توسط اسپرم و بهبود توانایی تکامل جنین مورد تائید قرار داده‌اند(۵۰، ۵۱). هم‌چنین در مطالعات قبلی انجام شده مشخص گردید که افزودنی‌های غذایی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی، موجب افزایش کیفیت اسپرم و بهبود نتایج IVF می‌شود(۵۲) و تکوین بلاستوسیست را در جنین موش بهبود می‌بخشد(۵۳). بررسی‌های انجام شده نشان داد که دیواره مخمر ساکارومایسس سرویزیه از چهار ماکرومولکول عمده شامل مانو پروتئین، بتا (۳-۱) گلوکان، بتا (۶-۱) گلوکان و کیتین ساخته شده است(۱۹). گلوکان موجود در دیواره مخمر یکی از مهم‌ترین و قوی‌ترین آنتی اکسیدان‌های کاربردی می‌باشد(۵۴). در کنار این موضوع، این نکته به خوبی شناخته شده است که در ساختار مخمر ساکارومایسس سرویزیه، تعداد زیادی آنتی‌اکسیدان موجود است که عبارتند از تیوردوکسین، اسکوربات‌یک، اریترو اسکوربات و ازهمه مهم‌تر گلوتاتیون که به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی اثر حفاظتی ساکارومایسس سرویزیه را در برابر آسیب‌های حاصل از استرس اکسیداتیو افزایش می‌دهد(۵۷-۵۵).

نتایج حاصل از مطالعات Miezeliene و همکاران (۲۰۱۱) موفقیت آمیز بودن تغذیه با مخمر غنی‌شده با سلنیوم را نشان داد، به طوری که علاوه بر افزایش ایمنی و قدرت آنتی‌اکسیدانی موجود، میزان باروری و ضریب رشد را در جوجه‌های گوشتی یا مرغ ها افزیش می‌دهد(۵۸). با در نظر گرفتن این که دیواره مخمر ساکارومایسس سرویزیه و سلنیوم، آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی هستند، وجود آن‌ها برای عملکرد طبیعی بیضه و انجام فرآیند اسپرماتوژنز ضروری است(۵۹،۶۰). در این مطالعه دیواره مخمر ساکارومایسس سرویزیه با سلنیوم ادغام و غنی شد. در حقیقت سلنیوم به عنوان کوفاکتور آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-PX)، رادیکال‌های آزاد اکسیژن را کاهش می‌دهد و لذا انتظار می‌رود که در افزایش باروری مؤثر باشد(۲۱).

Kucuk و Sahin (۲۰۰۳)، به این نتیجه رسیدند که به دلیل اثرات ضد تنش سلنیوم، نیازمندی به آن در طول استرس افزایش می‌یابد(۶۱). در این راستا مشاهدات باروری آزمایشگاهی و بیوشیمیایی مطالعه حاضر نشان داد که تجویز SECW به همراه استرس باعث شد تا هم میزان پراکسیداسیون لیپیدی کاهش یابد و هم این که میزان لقاح و متعاقب آن میزان رشد جنینی افزایش یابد. بنابراین می‌توان این گونه برداشت کرد که تجویز آنتی‌اکسیدان‌ها به همراه استرس در سطح قابل ملاحظه‌ای بهبود بخش می‌باشد. این در حالی است که تجویز SECW بدون استرس، اندکی میزان MDA بافتی را افزایش داد ولی در میزان باروری و رشد جنین موثر نبود. با در نظر گرفتن این نکته که میزان اندک استرس اکسیداتیو (در سطح قابل تنظیم برای بافت بیضه در شرایط فیزیولوژیک) برای بهبود روند رشد و تکامل اسپرمی مفید است، تجویز آنتی‌اکسیدان‌های بالفعل موثر به فرد فیزیولوژیک می‌تواند اندکی استرس اکسیداتیو را با کاهش دادن فرایندهای فیزیولوژیک متابولیکی، افزایش دهد(۶۲). لذا در نهایت، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تجویز آنتی اکسیدان SECW به همراه استرس، مطلوب‌تر از مصرف آن به تنهایی در شرایط فیزیولوژیک می‌باشد و تجویز آنتی اکسیدان بیش از حد نیاز بدن با آسیب رساندن به بافت بیضه و کاهش فرآیندهای فیزیولوژیک متابولیکی موجب افزایش میزان استرس اکسیداتیو می‌گردد.

در نهایت، با جمع‌بندی یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان چنین نتیجه گرفت که استرس بی‌حرکتی مزمن با القاء آسیب در سطح اسپرماتوژنز و از طریق بر هم

www.SID.ir

Archive of SID

زدن تعادل اکسیداسیون- احیاء، موجب بروز استرس اکسیداتیو می‌گردد. در نهایت بدین ترتیب، آسیب‌های وارده به بافت بیضه و سلول‌های رده اسپرماتوژنز را افزایش داده و میزان باروری، لقاح و تولید جنین را کاهش می‌دهد. این در حالی است که SECW به سبب دارا بودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و در نتیجه قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد اکسیژن، اختلال ایجاد شده در اسپرماتوژنز تحت تاثیر استرس را بهبود بخشید و در نتیجه توان باروری را افزایش داد.

References

1. Kulkarni MP, Juvekar AR. Attenuation of acute and chronic restraint stress induced perturbations in experimental animals by Nelumbo nucifera Gaertn. Indian J Pharm Sci 2008; 70(3): 327-332.
2. Pacak K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin IJ, Goldstein D. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: A test of Selye's doctrine of nonspecificity. Am J Physiol 1998; 275(4 Pt 2): 1247-1255.
3. Sahin E, Gumuslu S. Stress-dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and anti-oxidants in peripheral tissues of rats: Comparison of three stress models (immobilization, cold and immobilization-cold). Clin Exp Pharmacol Physiol 2007; 34(5-6): 425-431.
4. Turakulov IaKh, Burikhanov RB. Role of norepinephrine in the regulation of thyroid gland functional activity in rabbits. Probl Endokrinol (Mosk) 1993; 39(4): 45-48.
5. Aguilera G, Kiss A, Sunar-Akbasak B. Hyperreninemic hypoaldosteronism after chronic stress in the rat. J Clin Invest 1995; 96(3): 1512-1519.
6. Choudhary R, Chawala VK, Soni ND, Kumar J, Vyas RK. Oxidative stress and role of antioxidants in male infertility. Pak J Physiol 2010; 6(2): 54-59.
7. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 2002; 82(1): 47-95.
8. Sharma KK, Mediratta PK, Reeta KH, Mahajan P. Effect of L-arginine on restraint stress induced modulation of immune responses in rats and mice. Pharmacol Res 2004; 49(5): 455-460.
9. Kurihara H, Fukami H, Asami S, Toyoda Y, Nakai M, Shibata H, et al. Effects of oolong tea on plasma antioxidative capacity in mice loaded with restraint stress assessed using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. Biol Pharm Bull 2004; 27(7): 1093-1098.
10. Shukla KK, Mahdi AA, Ahmad MK, Jaiswar SP, Shankwar SN, Tiwari SC. Mucuna pruriens Reduces Stress and Improves the Quality of Semen in Infertile Men. Evid Based Complement Alternat Med 2010; 7(1): 137-144.
11. Ali E.Al-Sanafi, Safaa.A. Mohssin, Senan M. Abdulla. Effect of Royal Jelly on male Infertility. TQMJ 2007; 1(1): 1-12.
12. Kumar S, Kumari A, Murarka S. Lifestyle factors in deteriorating male reproductive health. Indian J Exp Biol 2009; 47(8): 615-624.
13. Sharpe RM. Lifestyle and environmental contribution to male infertility. Br Med Bull 2000; 56(3): 630-642.
14. Cordelli E, Fresegna AM, Leter G, Eleuteri P, Spano M, Villani P. Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation. Radiat Res 2003; 160(4): 443-451.

www.SID.ir

Archive of SID

15. Mingoti GZ, Pereira RN, Monteiro CM. Fertility of male adult rats submitted to forced swimming stress. Braz J Med Biol Res 2003; 36(5): 677-681.
16. Rai J, Pandey SN, Srivastava RK. Effect of immobilization stress on spermatogenesis of Albino rats. J Anat Soc India 2003; 52(1): 55-57.
17. Potemina TE. Impairment of spermatogenesis in male rats during stress. Bull Exp Biol 2008; 145(6): 700-702.
18. Irianto A, Austine B. Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Disease 2002; 25(11): 633-642.
19. Klis FM, Boorsma A, De Groot PW. Cell wall construction in Saccharomyces cerevisiae. Yeast 2006; 23(3): 185–202.
20. Klis FM, Mol P, Helingwerf K, Brul S. Dynamics of cell wall structure in Saccharomyces cerevisiae. FEMS Microbiol Rev 2002; 26(3): 239-256.
21. Shamberger RJ. Biological interactions of selenium with other substances (chapter 5). In: Biochemistry of selenium. Shamberger RJ, (ed). New Yord: Plenum Press; 1983. p. 125-166.
22. Behne D, Weiler H, Kyriakopoulos A. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. J Reprod Fertil 1996; 106(2): 291-297.
23. Hanan A. Saleh A. Effects of selenium supplementation on the structure of the testis of adult albino rat subjected to experimentally-induced chronic renal failure histological and biochemical study. The Egyptian Journal of Histology 2007; 30(2): 383-396.
24. Mohammadi Sh, Movahedin M, Mowla SJ. Antioxidant Effects of Selenium on Sperm Parameters and Testicular Structure in Young and Aged Mice. JRI 2008; 9(3): 229-237.
25. Olson GE, Winfrey VP, Hill KE, Burk RF. Sequential development of flagellar defects in spermatids and epididymal spermatozoa of selenium-dificient rats. Reproduction 2004; 127(3): 335-342.
26. Suhajda A, Hegoczki J, Janzs óB, Pais I, Vereczkey G. Preparation of selenium yeasts I. Preparation of selenium-enriched Saccharomyces cerevisiae. J Trace Elem Med Biol 2000; 14(1): 43-47.
27. Mozafar A, Keshavarz M, Zareian P, Johary H, Kargarjahromi H, Hoseini S.The Effect of Immobilization Stress on the HPG axis (hypothalamic-pituitary-gonad) hormones and the number of spermatogonia. JFUMS 2013; 3(3): 280-284 (Persian).
28. Yin H, Fan G, Gu Zh. Optimization of culture parameters of selenium-enriched yeast (Saccharomyces cerevisiae) by response surface methodology (RSM). LWT-Food Science and Technology 2010; 43(4): 666-669.
29. Dadrass M, Nejati V, Tukmechi A, Hobbenaghi R. The Protective Effect of Cell Wall and Cytoplasmic Fraction of Selenium Enriched Yeast on 1, 2-Dimethylhydrazine-induced Damage in Liver. Res Mol Med 2014; 2(1): 39-45.
30. Niehaus WG Jr, Samuelsson B. Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation. Eur J Biochem 1968; 6(1): 126-130.
31. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193(1): 265-275.
32. Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effect of male age on semen quality and Fertility: A

www.SID.ir

Archive of SID

review of the literature. Fertil Steril 2001; 75(2): 237-248.

33. Gharagozloo P, Aitken RJ. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. Hum Reprod 2011; 26(7): 1628-1640.
34. Rai D, Bhatia G, Palit G, Pal R, Singh S, Singh HK. Adaptogenic effect of Bacopa monniera (Brahmi). Pharmacol Biochem Behav 2003; 75(4): 823-830.
35. Tilbrook AJ, Turner AI, Clarke IJ. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. Rev Reprod 2000; 5(2): 105-113.
36. Rai J, Pandey SN, Srivastava RK. Testosterone hormone level in albino rats following restraint stress of long duration. Journal of the Anatomical Society of India 2004; 53(1): 17-19.
37. Khandve B, Gujar V, Bokariya P, Tarnekar A, Shende M. Deranged Spermatogenesis of Adult Swiss Albino Mice as Effect of Immobilisation Stress -Histological Study. Iosr Journal of Pharmacy 2013; 3(2): 7-10.
38. Zhang Q, Bai Q, Yuan Y, Liu P, Qiao J. Assessment of seminal estradiol and testosterone levels as predictors of human spermatogenesis. J Androl 2010; 31(2): 215-220.
39. Atif F, Yousuf S, Agrawal SK. Restraint stress-induced oxidative damage and its amelioration with selenium. Eur J Pharmacol 2008; 600(1-3): 59–63.
40. Shariatzadeh MA, Keikha L. Evaluation of the Protective Effect of Nigella Sativa Oil on Testicular Tissue and Sperm Parameters in Adult NMRI Mice with Para-nonylphenol. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2015; 23(2): 1927-1944 (Persian).
41. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. Curr Med Chem 2001; 8(7): 851-862.
42. Chaudiere J, Ferrari-Lliou R. Intracellular antioxidant: from chemical to biochemical mechanism. Food Chem Toxicol 1999; 37(9-10): 949-962.
43. Szeto HH. Cell-permeable, Mitochondrial-targeted, Peptide Antioxidants. AAPS J 2006; 8(2): 277-283.
44. Nakamura K, Sheps S, Arck PC. Stress and reproductive failure: past notions, present insights and future directions. J Assist Reprod Genet 2008; 25(2-3): 47-62.
45. Hashimoto S, Minami N, Yamada M, Imai H. Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the development competence of bovine oocyte after in vitro fertilization: Relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. Mol Reprod Dev 2000; 56(4): 520-526.
46. Nasr-Esfahani M, Aitken RJ, Johnson MH. The effect of iron and iron chelactors on the in-vitro block to development of the mouse preimplantation embryo: BAT6 a new medium for improved culture of mouse embryos in vitro. Hum Reprod 1990; 5(8): 997-1003.
47. Zarghami N, Rahbani M, Noroozzadeh J, Deldar Y, Noori M, Ghafari M. Oxidative DNA damage in sperm samples of infertile men. Journal reproduction &infertility 2002; 11: 56-74 (Persian).
48. 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): 175-189.
49. Tatemoto H, Ootaki K, Shigeta K, Muto N. Enhancement of developmental competence after in vitro fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O-

www.SID.ir

Archive of SID

alphaglucoside during in vitro maturation. Biol Reprod 2001; 65(6): 1800-1806.

50. Esfandiari N, Falcone T, Agarwal A, Attaran M, Nelson DR, Sharma RK. Protein supplementation and the incidence of apoptosis and oxidative stress in mouse embryos. Obstet Gynecol 2005; 105(3): 653-660.
51. 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): 391-398.
52. 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): 1272-1277.
53. Kofuji K, Aoki A, Tsubaki K, Konishi M, Isobe T, Murata Y. Antioxidant activity of β-Glucan. ISRN Pharm 2012; 2012: 125864.
54. Hassan HMM. Antioxidant and Immunostimulating Activities of yeast (Sacharomyces cerevisiae) Autolysates. World Applied Sciences Journal 2011; 15(8): 1110-1119.
55. Caeme- Harel O, Storz G. Roles of the glutathione-and thioredoxin-dependent reduction systems in the Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae responses to oxidative stress. Annu Rev Microbiol 2000; 54: 439-461.
56. Spickett CM, Smirnoff N, Pitt AR. The biosynthesis of erthroascorbate in saccharomyces cerevisiae and its role as an antioxidant. Free Radic Biol Med 2000; 28(2): 183-192.
57. Miezeliene A, Alencikiene G, Gruzauskas R, Barstys T. The effect of dietary selenium supplementation on meat quality of broiler chickens. BASE 2011; 15(S1): 61-69.
58. Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, Hauser R. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. Fertil Steril 2010; 93(7): 2222-2231.
59. Kehr S, Malinouski M, Finney L, Vogt S, Labunskyy VM, Kasaikina MV,et al. X-ray fluorescence microscopy reveals the role of selenium in spermatogenesis. J Mol Biol 2009; 389 (5): 808-818.
60. Sahin K, Kucuk O. Heat stress and dietary vitamin supplementation of poultry diets. Nutrition Abstracts Reviews Series B: Livestock Feeds and Feeding 2003; 73(7): 41-50.
61. Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du plessis SS.Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm functions. Indian J Exp Biol 2010; 48(5): 425-435.

www.SID.ir