

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., PhD¹, Shahrooz R., PhD², Ahmadi A., PhD³, Maleki H., PhD⁴, Mardani K., PhD⁵

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.

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

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^۱، رسول شهروز^۲، عباس احمدی^۳، حسن ملکی نژاد^۴، کریم مردانی^۵

۱. دکترای بافت شناسی مقایسه ای، بیمارستان سینا کامیاران، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، کامیاران، ایران (مؤلف مسؤل)، تلفن ثابت: ۰۸۷-۳۵۵۳۴۰۷۷،

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 و جنین شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۴. استاد گروه علوم پایه، بخش فارماکولوژی و سم 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 و توقف 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 (EP) بر پارامترهای 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: در این مطالعه تجربی تعداد ۴۰ قطعه موش سوری نر بطور تصادفی به چهار گروه تقسیم گردیدند. گروه کنترل سرم فیزیولوژی (IP، ۱ml/۰) دریافت نمود. گروه PHZ، PHZ با دوز ۸mg/100gr/b.w برای بار اول و دوز ۶ mg/100gr/b.w هر ۶ ساعت یک بار، در گروه PHZ+EP، اتیل پیروات با دوز ۴۰mg/kg، IP و فنیل هیدرازین با دوز مشابه گروه PHZ تزریق شد و در گروه چهارم فقط اتیل پیروات با دوز مشابه گروه PHZ+EP تجویز شد. جهت انجام لقاح داخل آزمایشگاهی (IVF) ۴۰ قطعه موش سوری ماده برای استحصال تخمک استفاده گردید. ۳۵ روز پس از شروع دوره درمان موشهای نر آسان کشتی شده و اسپرم آنها استحصال و پارامترهای اسپرم بررسی گردید و برای هر گروه 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 کشتی شدند و پس از استحصال 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 SPSS ویرایش ۱۶ و 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 در گروه PHZ نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری پیدا نمود، که با تجویز آنتی اکسیدانت این شاخص ها به طور معنی داری بهبود پیدا نمودند ($P < 0.05$). در گروه PHZ، میانگین درصد لقاح، بلاستوسیت، و تعداد جنین های متوقف شده نسبت به گروه کنترل کاهش قابل ملاحظه ای نشان داد، که با تجویز اتیل پیروات این پارامترها به طور قابل ملاحظه ای بهبود پیدا نمودند ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که 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

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 اثر منفی روی عملکرد اسپرم، مخصوصاً "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 موفقیت IVF 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 یا کندی در تکامل اولیه جنین نیز می شود، سطح بالای (ROS) و آپوپتوز در جنینهای فراگمانته شده در مقایسه با جنینهای غیر فراگمانته دیده شده است (۶). افزودن آنتی اکسیدانت هایی نظیر ویتامین E و C به محیط کشت، میزان تکوین بلاستوسیت در جنین های موش را بهبود می بخشد 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_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 بلاستوسیت می شود (۹). اتیل پیرووات به عنوان تجزیه کننده و پاک کننده گونه فعال اکسیژن (ROS) و عامل محافظت کننده سلول و دارای قدرت ضد التهابی است (۱۰). پیرووات یک آنتی اکسیدانت داخلی و پاک کننده رادیکالهای آزاد می باشد، سدیم پیرووات پاک کننده H_2O_2 از طریق واکنش غیر آنزیمی (دفسفریلاسیون اکسیداتیو) که تولید استات، آب، و دی اکسید کربن می نماید. پیرووات 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). در یک مطالعه گزارش شده است که اتیل پیرووات دارای اثری کافی در پاک نمودن گونه فعال اکسیژن (ROS) در سلول بوده و نیز دارای خاصیت ضد التهابی و محافظت سلول است (۱۲). پیرووات همچنین برای از بین بردن (ROS) در سلول عمل نموده و یک عامل ضد التهاب می باشد (۱۳).

تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر توان اتیل پیرووات 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

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

لقاح آزمایشگاهی: مرحله اول ازکار برای انجام IVF، ابتدا برای تهیه اسپرم، موش سوری نر را 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 از کانال دفران از بیضه جدا و داخل پتریدیش ۶cm حاوی محیط کشت HTF (Sigma, USA) دارای mg/ml BSA ۴ که قبلاً جهت دما در داخل انکوباتور قرار داده شده بود منتقل شد و بعد از ایجاد چند برش در دم اپیدیدیم و فشاردر کانال دفران برای خروج اسپرم ها، پتری دیش ها در داخل انکوباتور CO₂ گذاشته شد. بعد از گذشت ۰/۵ ساعت 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 CO₂ با دمای ۳۷°C قرار داده شدند (۱۶). جهت انجام IVF برای هر گروه 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 که ۷۲ ساعت قبل از IVF و تشریح، به موشهای ماده ۷/۵ IU) واحد از هورمون PMSG (ساخت شرکت Folligon، هلند) به حجم ۰/۱ میلیتر 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، رنگ آمیزی آکریدین اورنج انجام گرفت. در صورتی که DNA اسپرم دچار شکستگی شده باشد متعاقب

افزایش کیفیت و کمیت تولید اسپرم و جنین های آزمایشگاهی، مطالعه اخیر به عنوان اولین مطالعه در شرایط استرس اکسیداتیو، به بررسی اثرات آنتی اکسیداتی اتیل پیرووات 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 پیرووات در جلوگیری از اثرات سوء آن بر روند لقاح و رشد جنین های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی، از ۴۰ قطعه موش سوری نر نژاد NMRI، ۶-۸ هفته ای که بطور تصادفی به چهارگروه تقسیم شده و به مدت ۳۵ روز با داروی فنیل هیدرازین تحت درمان بودند، استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد با دمای ۲۲±۲°C، رطوبت ۶۰-۳۰ درصد و با سیکل نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ 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, IP/۱۰) دریافت نمودند.
- ۲- گروه PHZ، فنیل هیدرازین phenylhydrazine (PHZ) ساخت شرکت سیگمای امریکا (Sigma, USA) با دوز IP mg/100gr/b.w، برای بار اول، و دوز IP mg/100g b.w، 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 پیرووات با دوز (mg/kg/day, IP/۴۰) تزریق شد (۱۵).

رنگ آمیزی، 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 لام‌ها در مجاورت هوا، لام‌های 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 ۱۰۰X بررسی شد و نتایج حاصل به صورت درصد بیان گردید (۱۷).

ارزیابی بلوغ هسته اسپرم: برای این منظور از رنگ آمیزی آنیلین بلو استفاده شد. اساس آنالیز بر این نکته استوار است که در طی مرحله اسپرمیوژنز (Spermiogenesis) پروتئین بجای هیستون در کروماتین هسته قرار می‌گیرد که این جایگزینی در تراکم و پایداری اسپرم بسیار اهمیت دارد. در این رنگ آمیزی، اسپرم‌های نابالغ به دلیل هیستون زیاد به رنگ آبی تیره مایل به خاکستری درآمده و اسپرم‌های بالغ از رنگ پذیری کم تری برخوردار هستند. همانند روش ذکر شده در فوق، پس از تثبیت نمونه اسپرم در محلول اتانول- استون و خشک شدن در مجاورت هوا، لام‌ها 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 ۴۰x بررسی شدند (۱۸).

ارزیابی مورفولوژیک اسپرم‌ها: برای ارزیابی مورفولوژیک اسپرم‌ها از رنگ آمیزی آنیلین بلو استفاده شد. به این شکل که اسپرم‌هایی 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 اسپرم‌ها دارد. رنگ آمیزی اتوزین-نگروزین نیز استفاده قرار شد. آن دسته از اسپرم‌ها یی که حاوی بقایای سیتوپلاسمی بودند به عنوان اسپرم‌های 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، لوله‌های رحمی را جدا کرده و در داخل محیط کشت HTF (sigma, USA) دارای 4mg/ml BSA ، ۳۷درجه از قبل آماده شده قرارداد شد و با روش‌های آنزیمی و مکانیکی 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 4mg/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 می‌گیرد و بدین ترتیب زیگوت به دست آمد. در ادامه تحقیق زیگوت‌های شستشو داده شده حاصل از لقاح آزمایشگاهی در محیط کشت HTF

حاوی 4mg/ml BSA ، بعداز شستشو در دو قطره از محیط کشت به تعداد ۲۰ جنین در داخل قطرات $100\mu\text{l}$ 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 ۱۲۰ ساعت کشت داده شدند. برای بررسی تنش اکسیداتیو ناشی از تجویز فیل هیدرازین و اثر آنتی اکسیدانتی اتیل پیروات در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست، مراحل رشد جنینی در این مدت مورد بررسی قرار گرفت، زیگوت‌های موجود در هر گروه جنین‌ها از نظر میزان فراگمانتاسیون، طی کردن مراحل رشد جنینی و تعداد جنین‌های متوقف شده با هم

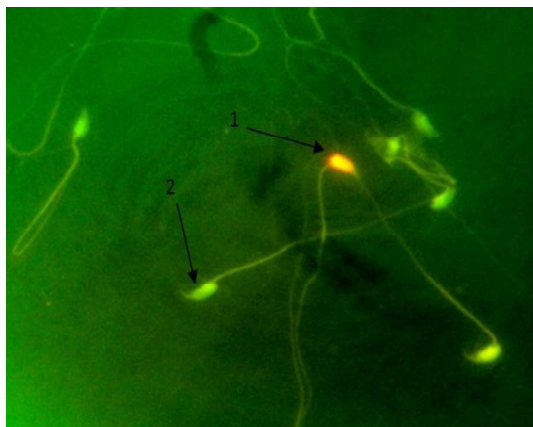
در سطح معنی دار $P < 0.05$ انجام گرفت و نتایج بصورت تعداد در جداول مربوطه آورده شده است.

نتایج

مطالعه اسپرم توسط رنگ آمیزی آکریدین 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 داد که میانگین درصد اسپرم های با DNA آسیب دیده در گروه PHZ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری پیدا نمود ($P < 0.05$). در حالی که میانگین درصد اسپرم های با DNA آسیب دیده در گروه (PHZ+EP) نسبت به گروه PHZ به طور معنی دار کاهش پیدا نمود ($P < 0.05$)، تجویز آنتی اکسیدانت EP به تنهایی تقریباً مثل گروه کنترل بوده و با آن گروه فاقد اختلاف معنی دار بودند (جدول ۱).

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، تیپ II جنینهای با لیز، فراگمانته شدن در تعدادی از بلاستومرها، تیپ III 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 ۱۲۰ ساعت انکوباسیون در هر گروه مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ و 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 از آنالیز آماری داده توسط نرم افزار minitab روش 2proportion و



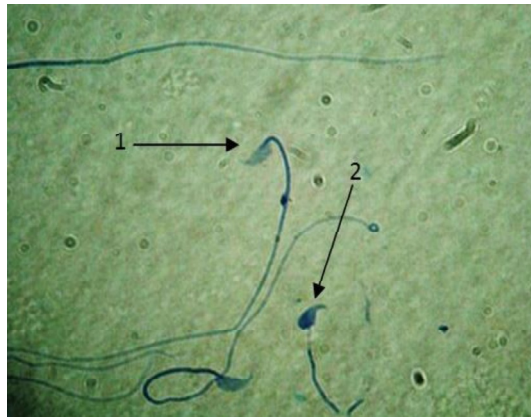
تصویر ۱: اسپرماتوزوئیدهای با DNA صدمه دیده به رنگ قرمز و اسپرماتوزوئید های با DNA سالم به رنگ سبز مشاهده می شوند (رنگ آمیزی آکریدین-اورنج، $1000\times$).

میزان عدم بلوغ هسته ای در گروه PHZ ($30/5 \pm 1/32$) در مقایسه با گروه کنترل ($2/75 \pm 0/62$) افزایش معنی داری پیدا نموده بود که با تجویز آنتی اکسیدانت در گروه

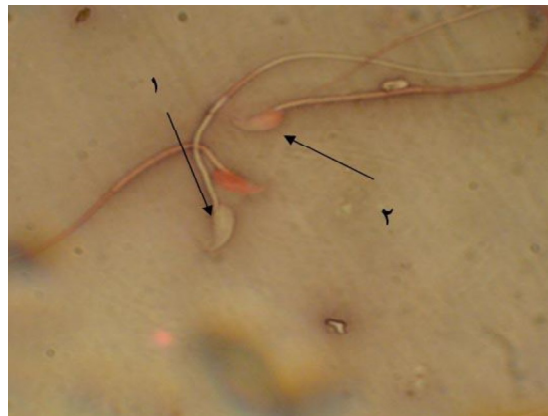
همچنین در این مطالعه نشان داده شد که سر اسپرم های نابالغ با رنگ آمیزی آنیلین بلو آبی و سر اسپرم های سالم به رنگ آبی رنگ پریده مشاهده شدند (تصویر ۲). در بررسی

(تصویر ۳). در صورتی که با تجویز اتیل پیروات در گروه (PHZ+EP) $(39/75 \pm 1/65)$ تا اندازه ای کاهش نشان داد ولی با گروه کنترل دارای اختلاف معنی دار بود $(P < 0/05)$. در گروه دریافت کننده EP $(30/25 \pm 0/85)$ به تنهایی میانگین درصد اسپرم های با مورفولوژی غیر طبیعی با گروه کنترل فاقد اختلاف معنی دار بود (جدول ۱).

(PHZ+EP) و مقدار هسته های نابالغ کم شده بود ولی باین حال هنوز دارای اختلاف معنی دار با گروههای کنترل و PHZ بود $(P < 0/05)$. 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 $(44 \pm 1/08)$ در مقایسه با گروه کنترل $(1/04 \pm 24/5)$ نشانگر افزایش معنی دار می باشد $(P < 0/05)$



تصویر ۲: اسپرماتوزونید با هسته بالغ آبی کم رنگ (۱) و اسپرماتوزونیدهای با هسته نابالغ آبی پررنگ (۲) مشخص شده اند، (رنگ آمیزی آبلین بلو، $400\times$).



تصویر شماره ۳: اسپرم با مورفولوژی طبیعی (۱) و اسپرم با مورفولوژی غیر طبیعی (۲)، (رنگ آمیزی آنوزین-نگروزین، $400\times$)

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

گروه	درصد اسپرم با DNA صدمه دیده	درصد اسپرم با عدم بلوغ هسته	درصد اسپرم با مورفولوژی غیر طبیعی
Control	1/25±0/47	2/75±0/62	24/5±1/04
PHZ	a33±2/19	a30/5±1/32	a44±1/08
PHZ+EP	ab27/75±2/13	ab8/5±1/04	b39/75±1/65
EP	bcr±1/80	bc3/25±0/75	abr30/25±0/85

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.

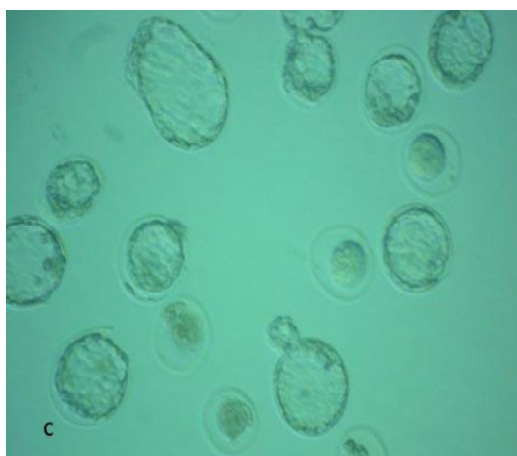
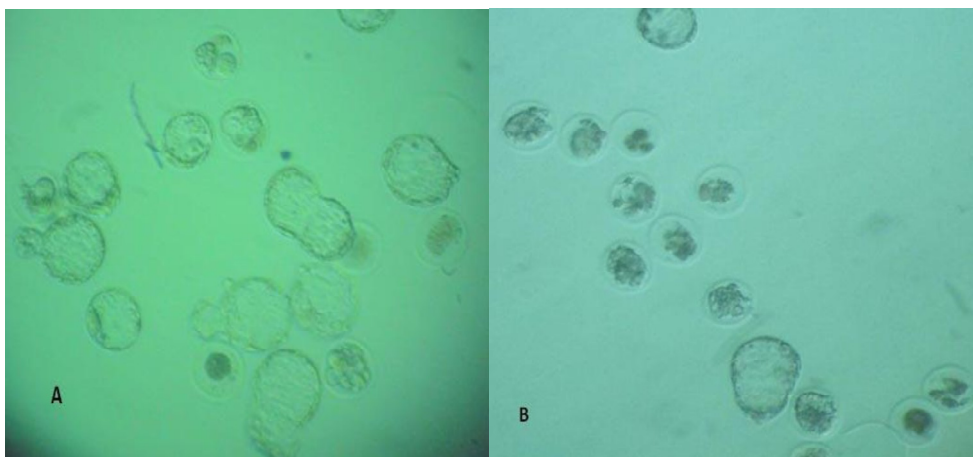
جدول ۲: نتایج حاصل از بررسی کیفیت اووسیت و لقاح داخل آزمایشگاهی و روند رشد جنینی در گروه های مختلف مورد مطالعه.

گروه ها	تعداد کل اووسیت	لقاح	دوسلولی	بلاستوسیت	متوقف شده	تیپ ۱	تیپ ۲	تیپ ۳
control	۱۷۵	۱۵۹	۱۳۴	۱۰۸	۵۱	۲	۶	۴۳
		٪۹۰/۸۶	٪۸۴/۲۸	٪۶۷/۹۲	٪۳۲/۰۷	٪۱/۲۵	٪۳/۷۷	٪۲۷/۰۴
PHZ	۱۳۲	a	a	a	a	a	۶	a
		٪۷۰/۴۵	٪۷۰/۹۷	٪۳۵/۴۸	٪۶۴/۵۲	٪۹/۶۷	٪۶/۴۵	٪۴۵/۳۹
PHZ+EP	۱۲۱	ab	a	a	a	a	۴	a
		٪۸۰/۱۶	٪۷۶/۲۹	٪۳۶/۰۸	٪۷۴/۲۳	٪۹/۲۷	٪۸/۲۵	٪۵۶/۷
EP	۱۴۷	b	abc	bc	bc	b	۱۰	bc
		٪۹۲/۵۲	٪۹۵/۵۹	٪۶۹/۱۱	٪۳۰/۸۸	٪۲/۲۱	٪۷/۳۵	٪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 در تمام مراحل مختلف رشد شده در حالی که اتیل پیرووات باعث بهبودی تمام پارامترهای فوق شده است (تصویر ۴).



تصویر ۴: (A) گروه کنترل، تمایز درصدی از جنین‌ها به بلاستوسیست با کیفیت مناسب بعد از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون و درصدی از جنین‌ها که در مراحل مختلف رشد متوقف شده‌اند (۴۰۰×)، (B) گروه PHZ، درصد کمی از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیده و بلاستوسیست‌های حاصله کیفیت مناسبی از نظر مورفولوژی ندارند و درصد بالایی از جنین‌ها متوقف شده‌اند و جنین‌های متوقف شده دارای لیوفراگماتاسیون زیاد می‌باشند (۴۰۰×)، (C) گروه درمان شده با اتیل پیروات علاوه فنیل هیدرازین که در مقایسه با گروه PHZ درصدی از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیده و بلاستوسیست‌های حاصله کیفیت مناسبی از نظر مورفولوژی دارند و درصد کمی از جنین‌ها متوقف شده‌اند (۴۰۰×).

بحث

فنیل هیدرازین علاوه بر ایجاد استرس اکسیداتیو و رادیکالهای آزاد، پراکسیداسیون چربی ها و تخریب اکسیداتیو اسپکتترین غشای سلولی را نیز، موجب خواهد شد (۲۰). بنابراین استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز فنیل هیدرازین موجب اختلال در بیوسنتز چربی ها و بالا رفتن میانگین درصد اسپرم های با هسته نابالغ و یا با DNA شکسته گردیده است (۲۱). در مجموع می توان نتیجه گرفت که آنتی همولیتیک ناشی از تجویز فنیل هیدرازین بر پارامترهای مختلف اسپرم تاثیر منفی دارد و این تاثیر ناشی از ایجاد استرس اکسیداتیو است، چراکه کروماتین 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).

در مطالعه حاضر در گروه کنترل شم (PHZ) درصد DNA صدمه دیده بطور قابل توجهی افزایش پیدا نموده بود که با تجویز اتیل پیرووات مقدار DNA صدمه دیده کاهش پیدا نموده بود به طوریکه در گروه اتیل پیرووات تنها مقدار DNA صدمه دیده در حد گروه کنترل بود و یافته 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 افتد که بیوسنتز چربی ها در این مرحله دارای اهمیت بالایی است (۲۴). بنابراین استرس اکسیداتیو ناشی از فنیل هیدرازین موجب اختلال در بیوسنتز چربی ها و بالا رفتن میانگین درصد اسپرم های با هسته نابالغ 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 می آید (۲۶). میزان عدم بلوغ هسته ای در گروه PHZ نسبت گروه کنترل افزایش را نشان داد در حالیکه در گروه PHZ+EP میزان عدم بلوغ هسته ای

کمتر شده بطوریکه در گروه اتیل پیرووات 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 بیوسنتز 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 پیرووات از تعداد اسپرم های نابالغ کاسته شده و توان باروری را نیز افزایش یافت.

در لوله های منی سازی که میزان استرس اکسیداتیو افزایش می یابد، سلولهای زایگر و سرتولی دچار آسیب یا اختلال هستند (۲۷). اختلال در عملکرد 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 با گروه کنترل نشانگر افزایش معنی دار بود که با تجویز آنتی اکسیدانت در گروه PHZ+EP مقدار اسپرم های با مورفولوژی غیر طبیعی کاهش پیدا نموده بطوریکه در گروه اتیل پیرووات تنها، این مقدار تقریباً در حد گروه کنترل بود. یافته حاصل از این تحقیق در راستای مطالعات بالا و تایید کننده تحقیقات بالا می باشد.

انکوباسیون گامتها در IVF باعث تولید رادیکالهای آزاد فراوان در پیرامون 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

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) یا گونه فعال اکسیژن باعث نقص در تکامل جنین داخل آزمایشگاهی می شود (۳۸). اثرات مخرب (ROS) در طول بلوغ اووسیت ممکنست باعث تغییر تکامل جنین بشود (۳۹). یک عمل احتمالی برای پیرووات، محافظت از جنین در مقابل استرس اکسیداتیو است، گزارش شده که پیرووات از پراکسید که باعث القاء صدمه به جنین گاوی در محیط آزمایشگاهی می شود، پیشگیری می کند (۴۰)، و از اسپرم در مقابل اثرات مخرب (ROS) محافظت می کند (۴۱).

پیرووات 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). پیرووات 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 پیرووات 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

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

وقتی که (ROS) بیشتر از توان آنتی اکسیداتیو بدن تولید شود استرس اکسیداتیو ایجاد می 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 چنین تغییراتی شامل تغییر میتوکندری، توقف سلول جنینی، تخلیه آدنوزین تری فسفات، و آپوپتوز (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 دیگر تکنیکهای کمکی باروری (Assisted reproductive technologies (ART در حیوانات 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 اکسیداتیو در جنین برای محافظت جنین در مقابل سطح بالای استرس اکسیداتیو در باروری داخل آزمایشگاهی به مقدار کافی وجود ندارد. صدمه اکسیداتیو بوسیله پرواکسیدانها و گونه فعال اکسیژن (ROS) به گامت و جنین در طول باروری داخل آزمایشگاهی گاو و خوک (۳۶) به اثبات رسیده است.

در نمونه های گاوی در رابطه با فرآیند تولید جنین آزمایشگاهی رضایتبخش نیست و ۳۰-۴۰ درصد بلاستوسیت

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، در صورتیکه 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 بود که در شرایط استرس اکسیداتیو، تولید گونه فعال اکسیژن (ROS) افزایش می یابد که 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 و قدر دانی

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

References

1. Clemens MR, Remmer H. Phenylhydrazine-induced lipid peroxidation of redblood cells: in vitro and in vivo 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 phenylhydrazine – 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. 2nded. 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 .

- 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, 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: 901-10.
- 21.Mousavi SH, Tayarani NZ, Parsaee H. Protective effect of saffron extract and crocin on reactive oxygen species mediated high glucose-induced toxicity in PC12 cells. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2010; 30: 185-191.
- 22.Farias JG, Bustos-Obregon 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 varicocele 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; 109: 501-507.

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-tocopherol on 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 Langendonck 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.