

بررسی تأثیر درمانی ملاتونین پس از ایجاد محرومیت غذایی بر روند مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و استرس اکسیداتیو در بیضه رت

شیوا نصیرایی مقدم^{۱*}، کاظم پریور^۲، ابوالحسن احمدیانی^۳، منصوره موحدین^۴، محمدرضا واعظ‌مهدوی^۵، مهرداد روغنی^۶، بهرتگ کاظمی‌نژاد^۷

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم- تحقیقات، تهران، ایران
- ۲- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم- تحقیقات، تهران، ایران
- ۳- استاد، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۴- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۵- استاد، مرکز تحقیقات کارآزمایی بالینی سنتی ایران، گروه پژوهشی عدالت در سلامت، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
- ۶- استاد، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
- ۷- استادیار، گروه آسیب‌شناسی، بیمارستان مدرس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۷۷۸۹۳۸۳۵، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی
Email: shiva_nasiraei@yahoo.com

پذیرش مقاله: ۹۱/۰۹/۲۲

دریافت مقاله: ۹۱/۰۷/۱۱

چکیده

هدف: اهداف این مطالعه ارزیابی اثرات محرومیت غذایی به عنوان یک استرس اجتماعی بر ساختار بیضه به علاوه بررسی اثر بهبود دهنده ملاتونین به عنوان ترکیبی آنتی اکسیدان بر آثار محرومیت غذایی بوده است.
مواد و روش‌ها: مطالعات بر روی ۴۲ سر رت نر انجام گردید که در ۷ گروه تقسیم شدند. گروه‌ها عبارتند از کنترل (C)، شم که سالین دریافت کردند، ملاتونین (M)، محرومیت غذایی به میزان یک سوم غذای معمول و دارای مواجهه (FD)، گروه محرومیت و جدا شده از سایر حیوانات (FDi)، گروه محروم با تزریق ملاتونین (FDM)، گروه محروم با جداسازی و تزریق ملاتونین (FDMi). پس از ۱۴ روز طول دوره آزمایشی بافت بیضه‌ها با دو روش ایمنوهیستوشیمی و تانل مورد ارزیابی با میکروسکوپ نوری قرار گرفت. ارزیابی بیوشیمیایی بیضه‌ها بر روی مقادیر دو ماده مالون دی آلدئید و گلوکاتایون انجام شد. جهت ارزیابی آماری از آزمون آنوای یک طرفه و توکی استفاده گردید. مرز معنی‌داری بین گروه‌ها $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج: نتایج گروه شم به علت تشابه با نتایج گروه کنترل، حذف شد. محرومیت با مواجهه موجب افزایش مالون دی آلدئید ($P < 0/01$) و کاهش گلوکاتایون بافتی ($P < 0/01$) و افزایش مرگ سلولی ($P < 0/01$) در بیضه شد. محرومیت در شرایط جدا شدگی تغییری در عوامل استرس اکسیداتیو نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد. ملاتونین موجب کاهش مرگ سلولی در گروه‌های دارای محرومیت ($P < 0/05$) و کاهش مقدار مالون دی آلدئید ($P < 0/05$) شد.
نتیجه‌گیری: محرومیت غذایی به همراه مواجهه موجب افزایش مرگ سلولی در بافت بیضه شده است اما محرومیت در شرایط جدا شدگی این اثر را ایجاد نکرد، این عوارض را می‌توان به احساس نابرابری در اثر مواجهه نسبت داد. با توجه به اثر ملاتونین بر شرایط محرومیت همراه با نابرابری، و کاهش مرگ سلولی، دخالت مکانیسم‌های استرس اکسیداتیو در استرس «محرومیت غذایی همراه با نابرابری» مورد تأکید قرار می‌گیرد.

کلیدواژگان: مرگ سلولی، محرومیت غذایی، نابرابری، ملاتونین، بیضه

تأثیر محرومیت غذایی بر مرگ سلولی

پی در پی و منظم تشکیل شده و طی آن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (Spermatogonia) تقسیم و تمایز می‌یابد که حاصل آن ایجاد اسپرم فعال است [۱۱]. این فرایند پیچیده که در بافت پوششی منی‌ساز بیضه پستانداران اتفاق می‌افتد [۸]، از زمان بلوغ شروع شده و در این بافت به عنوان بافت تجدید شونده تا آخر عمر ادامه پیدا می‌کند [۱۲، ۱۳]. گانگ (Gong) و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که ترکیبات القا کننده استرس اکسیداتیو نظیر نانی فنول (Nonylphenol) با افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژنی (Reactive Oxygen species: ROS) باعث کاهش پتانسیل غشای میتوکندری و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در سلول‌های سرتولی (Sertoli Cells) موجود در بافت بیضه شده و بر این بافت اثر تخریبی می‌گذارد [۱۴]. مشخص شده که مواد آنتی‌اکسیدان می‌تواند آثار احتمالی استرس اکسیداتیو را کاهش دهد [۱۴-۱۸]. از جمله مواد درون‌ریز (Endogenous) که طی مطالعات متعدد در انسان و حیوان به عنوان آنتی‌اکسیدان قوی معرفی شده، هورمون ملاتونین [Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine)] مترشحه از غده پینه‌آل (Pineal Gland) است [۱۹، ۲۰]. ملاتونین یک ایندولامین (Indolamine) است که اولین بار در غده پینه‌آل کشف شد و علاوه بر این که امروزه به طور مصنوعی تهیه شده، از برخی بافت‌های دیگر نیز جدا سازی شده است. ملاتونین در تنظیم مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده دخالت دارد و در صورت استفاده از موادی با منشأ خارجی (Exogenous) با تحریک واسطه‌ها، رفتار ضد مرگ سلولی (Anti apoptotic) نشان می‌دهد [۲۱-۲۳]. ملاتونین با حداکثر ترشح در شب، موجب ایجاد چرخه سیرکادین (Circadin Cycle) شده و بر تنظیم فیزیولوژیک بافت‌های مختلف ترشحی نظیر پانکراس اثر می‌گذارد. این اثر با تغییر در غلظت کلسیم داخل سلولی ایجاد می‌شود [۲۴].

اثر ملاتونین روی رادیکال‌های آزاد و اکسیدان‌ها نیز مورد مطالعه قرار گرفته و مشخص شده که ملاتونین به عنوان یک زباله‌گرد (Scavenger) دارای آثار محافظت کننده عصبی (Neuroprotective) بر نوروهای آسیب دیده

مقدمه

مطالعات نشان داده که محیط اجتماعی دارای نابرابری، آثار زیستی پایداری در اندام‌های مختلف از خود به جا می‌گذارد. پیدایش رادیکال‌های آزاد اکسیژنی در اثر استرس اکسیداتیو (Oxidative Stress) به عنوان پایه‌ای برای تبیین مکانیسم‌های ایجاد کننده آسیب‌های زیستی و بافتی، ناشی از نابرابری‌های اجتماعی (Social Inequalities) پیشنهاد شده است [۱-۳]. استرس اکسیداتیو همچنین به عنوان عاملی در ایجاد مشکلات ناباروری در مردان شناخته شده و با مطالعه روی مردان عقیم مشاهده شده که حضور رادیکال‌های آزاد به عنوان عوامل استرس اکسیداتیو در مایع منی افزایش می‌یابد [۵، ۶]. همچنین محققان بالا بودن عوامل اکسیدان با داشتن اثر مخرب بر عملکرد اسپرم، در ناباروری مؤثر دانسته‌اند [۷].

در مطالعات انسانی و حیوانی مشخص شده که بالا بودن فرآورده‌های بیوشیمیایی ناشی از استرس اکسیداتیو منجر به تخریب بافتی و افزایش مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) در سلول اسپرماتوزوئید می‌شود [۶، ۸]. به علاوه مطالعات انسانی نشان داده که در مردان نابارور دارای واریکوسل (Varicocele) افزایش سطح اکسیدان‌هایی نظیر مالون دی آلدئید (Malondialdehyde) و نیتریک اکساید و کاهش فعالیت آنزیم‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدان نظیر سوپر اکساید دیسموتاز (Superoxid Dismutase: SOD)، کاتالاز (Catalase)، گلوکوتاتیون پراکسیداز (Glutathion Peroxidase) و آسکوربیک اسید (Ascorbic acid)، دیده می‌شود [۹]. با توجه به این‌که استرس اکسیداتیو بر کیفیت اسپرم و در ناباروری مردان دخیل دانسته شده، احتمال دارد که این عامل با ایجاد اختلال در DNA موجود در اسپرم، بر رشد و نمو تخم حاصل مؤثر بوده و منجر به نقص در سلول تخم یا سقط شود [۴]. به علاوه استرس اکسیداتیو با تأثیر بر مراحل اسپرمیوزن (Spermiogenesis) و حذف ناقص سیتوپلاسم سلول‌های زاینده بر عملکرد و فعالیت طبیعی اسپرم نیز مؤثر است [۱۰]. اسپرم‌زایی فرایندی پیچیده است که از تعداد زیادی مراحل

شیوا نصیرایی مقدم و همکاران

از ایسکمی بر منطقه CA1 در هیپوکامپ (Hippocampus) و قشر مخ است [۲۲]. به علاوه مشخص شده که ملاتونین در رت‌ها نیز به عنوان زباله‌گرد عمل کرده و در صورت مصرف، قبل از تابش اشعه رونتگن (Roentgen Ray) از صدمات و تخریب‌های حاصل از تابش بر بافت زاینده بیضه جلوگیری می‌نماید [۲۳].

در مطالعات حیوانی روی گوسفند، بررسی مقادیر ملاتونین در فصول مختلف سال نشان داده است که ترشح ملاتونین موجب تنظیم کیفیت هورمونی می‌شود و بر باروری حیوان مؤثر است [۲۴، ۲۵]. در مطالعه حیوانی دیگر نشان داده شده که اثر نفروتوکسیسیته (Neuphrotoxicity) ملاتونین القای استرس اکسیداتیو توسط متوترکسات (Methotrexate) در رت‌ها را کاهش می‌دهد [۲۶]. ملاتونین اثر التهابی و اکسیداتیو لیبو پلی ساکاریدها را کاهش می‌دهد و این اثر مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدان و ضد مرگ سلولی آن است [۲۷].

در بررسی بافتی و بیوشیمیایی که بر بیضه رت در مدل استرس روانی انجام شد، نشان داده شده که تزریق ملاتونین موجب کاهش اثر مخرب این نوع استرس روانی می‌شود [۲۸]. در مطالعه حاضر محرومیت غذایی و نیز نابرابری در دریافت غذا به عنوان دو نوع استرس اجتماعی بر باروری موش صحرایی (رت) نر آزمایش شد و نشانگرهای بیوشیمیایی و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده استرس اکسیداتیو در این مدل استرسی اندازه‌گیری شد. به دنبال آن اثر درمانی ملاتونین به عنوان آنتی‌اکسیدان بر روند فوق بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۴۲ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (Wistar) در محدوده وزنی 190 ± 20 گرم و در حدود سن ۲ ماهگی از مرکز تهیه و توزیع حیوانات در دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهیه و به طور تصادفی انتخاب شدند و هر گروه در قفس‌های ۶ تایی، در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی بر طبق استاندارد مرکز تحقیقات علوم اعصاب

دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که با استاندارد هلسینکی (Helsinki Standard) رفتار با حیوانات منطبق است، نگهداری شدند.

حیوانات به شرح زیر در ۷ گروه قرار گرفتند:

- ۱- گروه کنترل،
 - ۲- گروه شم (Sham) (دارای تزریق سالیین (Saline) به عنوان حلال ملاتونین)،
 - ۳- گروه دارای محرومیت غذایی به مقدار $1/3$ معمول و دارای مواجهه (به صورتی که قادر به مشاهده غذا خوردن دیگران یا استشمام بوی غذای سایرین بودند). (گروه FD)،
 - ۴- گروه دارای محرومیت ولی جدا از سایر حیوانات [گروه جدا شدگی (Isolate)؛ محرومیت غذایی بدون احساس نابرابری] (گروه FDi)،
 - ۵- گروه دارای محرومیت همراه با مواجهه (احساس نابرابری) و تزریق ملاتونین (با دوز ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) (گروه FDM) [۳۳، ۳۴]،
 - ۶- گروه دارای محرومیت غذایی که در شرایط جدا شدگی قرار داشتند و تزریق ملاتونین دریافت کردند.
 - ۷- گروهی که فقط دارای تزریق ملاتونین بودند (شاهد مثبت) (گروه M).
- زمان انجام آزمایش‌ها با توجه به مطالعات گذشته و مؤثر بودن این طول دوره برای بروز آثار بافت‌شناسی و بیوشیمیایی و رفتاری استرس محرومیت غذایی و نابرابری اجتماعی [۱]، [۲]، ۱۴ روز تعیین شد و پس از این دوره کلیه حیوانات پس از بیهوشی کشته شده و بیضه‌های آنان خارج شد.

بررسی‌های بافتی

از هر رت بیضه راست برای عملیات بافتی جدا شد و در محلول بوئن (Boin's) به مدت ۲۰ ساعت قرار گرفت. پس از پردازش بافتی و قرارگیری در قالب‌های پارافینی، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرومتر از آن‌ها تهیه شد. لام‌های حاوی برش بافتی به دو روش عمومی [هماتوکسیلین-ائوزین

تأثیر محرومیت غذایی بر مرگ سلولی

و استرپتاویدین (Streptavidin) (Abcam، آمریکا) نیز به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. انکوباسیون با محلول رنگ‌زای (Chromogen) دی‌آمینو بنزیدین (Diaminobenzidine tetra hydrochloride hydrate) (Sigma، آمریکا) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت و شستشوها با محلول بافر PBS با pH=۷/۴ انجام شد. به منظور رنگ‌آمیزی زمینه (Counter Staining) از هماتوکسیلین و به صورت یک ضربه (چند ثانیه) استفاده شد.

ب) رنگ‌آمیزی تانل

در این روش نیز از لام‌های چسب‌دار با پلی‌ال-لایزین (Poly-L-Lysine) و حاوی برش‌های ۵ میکرومتری استفاده شد. برای انجام کار از کیت تانل (In situ cell Death Detection Kit, POD) (Roche، آلمان) استفاده شد و مراحل کار بر طبق شرکت سازنده به شرح زیر انجام شد:

- دپارافینه کردن نمونه‌ها و آب‌دهی در الکل‌های نزولی به ترتیب از ۱۰۰، ۹۰، ۸۰، ۷۰ درجه

- انکوباسیون بافت‌ها در پراکسید هیدروژن رقیق شده با متانول به میزان ۱۰ درصد برای غیر فعال‌سازی پراکسید هیدروژن درون بافتی،

- انکوباسیون با محلول پروتئیناز K (Proteinase K) (Roche، آلمان) رقیق شده در بافر PBS، با غلظت ۱ میلی‌گرم در هر ۱۰ میلی‌لیتر به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

- انکوباسیون با آنزیم In situ cell Death Detection رقیق شده با حلال اختصاصی به میزان ۵۰/۵۰۰ به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

- انکوباسیون با کانورتر POD (Converter POD, HRP) به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

- انکوباسیون با محلول کروموژن دی‌آمینو بنزیدین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

- قرارگیری در رنگ هماتوکسیلین (به عنوان رنگ زمینه به مدت ۱۰ ثانیه)

(Hematoxylin-Eosin) [به منظور ارزیابی بافت و اختصاصی [ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry)] برای ارزیابی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده رنگ‌آمیزی شد.

تعداد سلول‌ها با استفاده از میدان دید مدرج [گراتیکول (Graticule)] و در عدسی شیئی ۱۰۰ شمارش شد. به این صورت که در هر حیوان ۲۰ میدان و در هر گروه حدود ۱۲۰ میدان مشاهده شمارش شد. دقت شد که تعداد مقاطع مورد بررسی در هر حیوان و هر گروه برابر باشد. در هر میدان مشاهده مجاری منی‌ساز گرد یا نزدیک به گرد به شکل تصادفی انتخاب شد و مجموع انواع سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید موجود در این لوله‌ها شمارش شد. مقادیر هر گروه به صورت میانگین \pm انحراف معیار برای نقاط مرگ سلولی [کاسپاز ۳ یا تانل (Tunel) مثبت] شمارش شده برای سلول‌ها نشان داده شد.

رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی برای ارزیابی مرگ

سلولی برنامه‌ریزی شده

الف) رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بر علیه آنتی‌ژن کاسپاز ۳

پس از دپارافینه کردن لام‌ها در محلول گزیلول (Xylol)، آب‌دهی در الکل‌های نزولی به ترتیب از ۱۰۰، ۹۰، ۸۰، ۷۰ درجه انجام شد. سپس لام‌ها پس از قرارگیری در بافر سترات با pH=۶ در دستگاه میکروویو به مدت ۱۰ دقیقه زیر نقطه جوش قرار گرفته و مرحله بازیابی آنتی‌ژنی (Antigen Retrieval) را گذراندند. انکوباسیون (Incubation) بافت‌ها در پراکسید هیدروژن رقیق شده با متانول به میزان ۱۰ درصد انجام شد. انکوباسیون با محلول NGS (Normal Gout Serum) به مدت یک ساعت و سپس اضافه کردن آنتی‌بادی کاسپاز ۳ (Caspase 3) (Rabbit Polyclonal Antibody) (Cell Signaling Technology) (Co، آمریکا) رقیق شده با PBS (Phosphate Buffered Saline) به میزان ۱/۱۰۰ (۱ حجم آنتی‌بادی + ۵ حجم NGS + ۹۵ حجم PBS) صورت گرفت. آنتی‌بادی ثانویه با بیوتین (Biotin) (Abcam) به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

- مراحل آب‌گیری در الکل‌های افزایشی ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درجه
- قرارگیری در گزیلول در دو مرحله حداقل ۱۵ دقیقه
- چسباندن لامل
- پس از خشک شدن لام‌ها مشاهده بافت‌ها با میکروسکوپ نوری
- (محلول شستشو در تمام مراحل PBS با pH=۷/۴ بود.)

بررسی‌های بیوشیمیایی

- بیضه چپ هر رت برای بررسی‌های بیوشیمیایی جدا شد و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و پس از یکنواخت‌سازی در دستگاه هموژنایزر (Homogenizer) استفاده شد.
- آزمون‌های بیوشیمیایی برای اندازه‌گیری مالون دی‌آلدید و گلوتاتیون (Glutathion) بافتی انجام شد.

مراحل انجام آزمون‌های آنزیمی

مالون دی‌آلدید

- بافت‌ها پس از مراحل یکنواخت‌سازی روی یخ و با استفاده از بافر تریس اسید کلریدریک، مرحله سانتریفوژ (به مدت ۳ دقیقه و در ۱۶۰۰۰ دور در دقیقه) را در شرایط زیر و در حجم ۰/۲ میلی‌مول طی کردند.
- محلول ۰/۲ میلی‌مولار در لیتر تریس-HCl (Tris-HCl) در دستگاه Ultra-TurraxT25 Basic Homogenizer (IKA) Labortechnik، آلمان یکنواخت‌سازی شد.
- سپس جذب نوری گروه‌های آزمایشی در ۵۰۳ نانومتر (Spectrophotometer) (Ependorf، آلمان) خوانده شد و نتایج در جداول استاندارد منعکس شد.

آنزیم گلوتاتیون

- مقادیر گلوتاتیون پس از مراحل یکنواخت‌سازی بافتی روی یخ و با استفاده از حجم کل پروتئین بافتی محاسبه شد. به این

صورت که پس از اندازه‌گیری کل پروتئین بافتی [به روش بردفورد (Bradford)]، مقدار هر نمونه از مقادیر کل پروتئین موجود در آن کسر شد و مابه‌التفاوت آن‌ها با آب حجم‌سازی شد و سپس محلول DTNP (-2-Dithiobis, 5,5'-nitrobenzoic acid) (Sigma، آمریکا) به عنوان شناساگر گلوتاتیون، به هر یک از نمونه‌ها اضافه شد. سپس جذب نوری در طول موج ۴۰۵ (Spectrophotometer) (Ependorf، آلمان) مشاهده شد و برای مقادیر گلوتاتیون موجود بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر ثبت و در جداول استاندارد درج شد. تمام مراحل به صورت ۳ بار تکرار انجام شد.

بررسی آماری

از روش آماری آنوای یک طرفه (One way ANOVA) و آزمون توکی (Tukey) برای بررسی تفاوت بین گروهی و درون گروهی استفاده شد و مرز معنی‌داری $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

در آغاز دوره آزمایشی رت‌ها توزین شدند که در محدوده 20 ± 190 گرم بودند و بعد از انجام آزمایش مجدداً رت‌ها وزن شدند که وزن آن‌ها در جدول ۱ آمده است. این نتایج نشان می‌دهد در گروه‌های دارای محرومیت، کاهش وزن معنی‌دار رخ داده ولی بین گروه‌های مختلف دارای محرومیت، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

نتایج مشاهده شده در دو بخش رنگ‌آمیزی عمومی (شکل ۱) و رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی بافتی به منظور بررسی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در دو بخش ایمنوهیستوشیمی و تانل نشان می‌دهد که:

اثر فعالیت کاسپاز ۳ به صورت کلی ایجاد رنگ قهوه‌ای در سطح سیتوپلاسم بود (شکل ۲) در حالی که روش تانل نقاط محدود قهوه‌ای در هسته (شکل ۳) که نشانگر فشرده‌سازی

تأثیر محرومیت غذایی بر مرگ سلولی

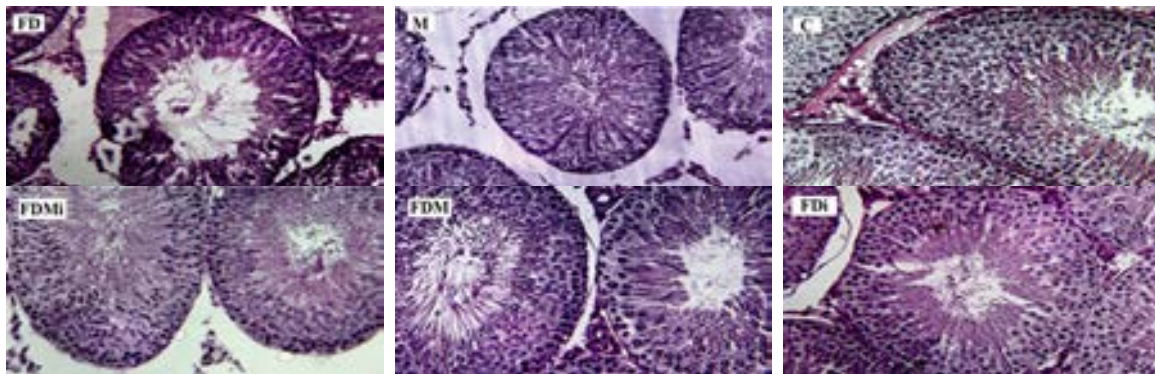
رنگ آمیزی همزمان با هماتوکسیلین (رنگ زمینه) یا پس زمینه بافتی اجتناب ناپذیر نسبت به کروموزن (DAB) است. شمارش در تعداد ۱۰۰ میدان مشاهده و با بزرگنمایی $\times 400$ برای هر گروه انجام شد.

کروماتین است را به طور پراکنده نشان می دهد. در مطالعه حاضر سلول های حاوی سیتوپلاسم های تغییر رنگ یافته در روش ایمنوهیستوشیمی و سلول های با هسته متراکم شده در روش تانل شمارش شد. سایر رنگ های تیره به علت

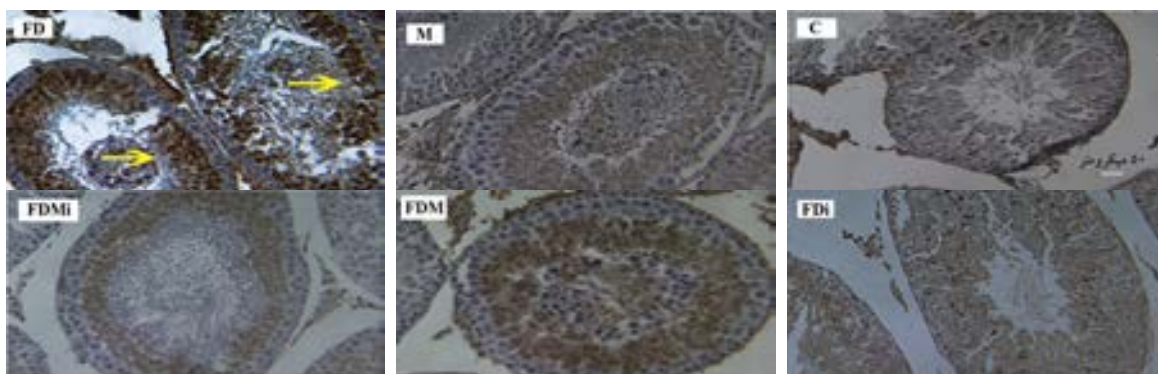
جدول ۱ وزن بدن و وزن بیضه بر حسب گرم پس از ۱۴ روز دوره آزمایش

M	FDMi	FDM	FDi	FD	C
۲۴۸/۶۷±۹/۲۴	۲۰۵/۳۸±۱۳/۴۸ ^{***#}	۱۷۸/۸۳±۲۷/۷۷ ^{***}	۱۷۶/۳۹±۶/۸۹ ^{***}	۱۹۰±۱۳/۰۷ ^{***}	۲۷۰/۱۶±۳۵/۱۷
۱/۴۱±۰/۳۱	۱/۴۰±۰/۲۹	۱/۳۵±۰/۲۸	۱/۲۶±۰/۱۷	۱/۲۷±۰/۲۲	۱/۴۶±۰/۲۳

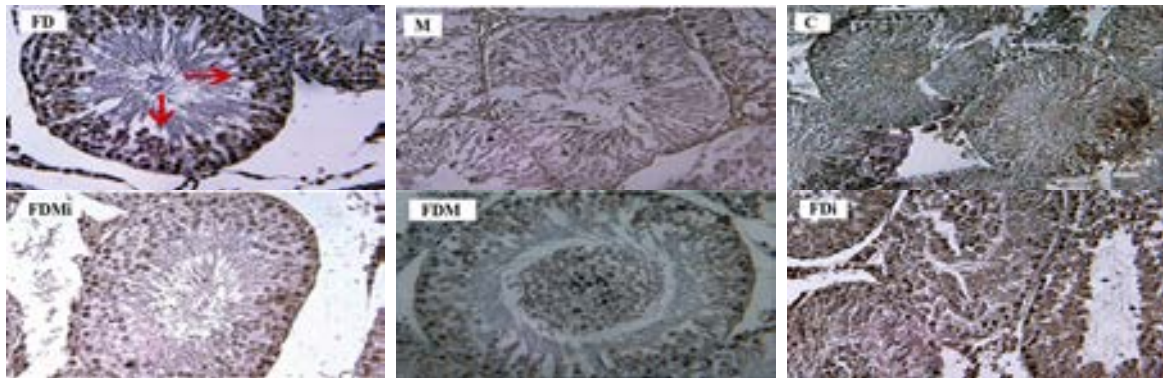
نتایج مندرج در جدول به صورت میانگین \pm انحراف معیار است. معنی داری بین گروه کنترل با سایر گروه ها برای ۶ رت در هر گروه با (*) و تفاوت بین گروه محرومیت با گروه های دارای تیمار با (#) مشخص شده است. # به معنای مرز معنی داری در حد $P < 0/05$ و *** به معنای مرز معنی داری در حد $P < 0/001$ است. C: گروه کنترل، FD: گروه دارای محرومیت غذایی، FDi: گروه دارای محرومیت غذایی و با شرایط جداسازی، FDM: گروه دارای محرومیت غذایی و با تزریق ملاتونین، FDMi: گروه دارای محرومیت غذایی و با تزریق ملاتونین و با شرایط جداسازی، M: گروه دارای تزریق ملاتونین



شکل ۱ برش عرضی از بیضه، رنگ آمیزی عمومی (هماتوکسیلین-انوزین)، ضخامت ۵ میکرومتر، بزرگنمایی $\times 400$: C: گروه کنترل، FD: گروه دارای محرومیت غذایی به همراه مواجهه، FDi: گروه دارای محرومیت غذایی و با شرایط جداسازی، FDM: گروه دارای محرومیت غذایی و با تزریق ملاتونین، FDMi: گروه دارای محرومیت غذایی و با تزریق ملاتونین و با شرایط جداسازی، M: گروه دارای تزریق ملاتونین به عنوان کنترل مثبت

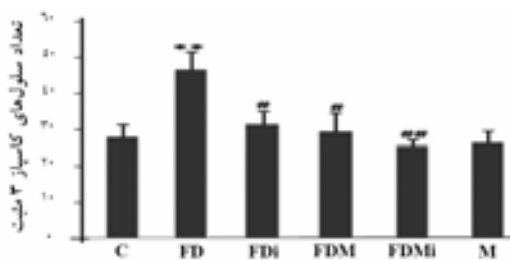


شکل ۲ برش عرضی از بیضه؛ رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی (کاسپاز ۳)، ضخامت ۵ میکرومتر، بزرگنمایی $\times 400$: C: گروه کنترل، FD: گروه دارای محرومیت غذایی، FDi: گروه دارای محرومیت غذایی و با شرایط جداسازی، FDM: گروه دارای محرومیت غذایی و با تزریق ملاتونین، FDMi: گروه دارای محرومیت غذایی و با تزریق ملاتونین و با شرایط جداسازی، M: گروه دارای تزریق ملاتونین؛ پیکانها افزایش شدید تعداد سلول های واکنش دهنده با کاسپاز ۳ را در گروه آزمایشی دارای محرومیت FD (و دارای مواجهه: احساس ناپرابری و بی عدالتی اجتماعی) نشان می دهد. تجویز ماده آنتی اکسیدان ملاتونین افزایش سلول های کاسپاز ۳ مثبت را در گروه محرومیت غذایی FD تا حد زیادی ترمیم نموده است.



شکل ۳ برش عرضی از بیضه؛ رنگ آمیزی تانل، ضخامت ۵ میکرومتر، بزرگنمایی ۴۰۰×: C: گروه کنترل، FD: گروه دارای محرومیت غذایی، FDI: گروه دارای محرومیت غذایی و با شرایط جداسازی، FDM: گروه دارای محرومیت غذایی و با تزریق مالتونین، FDMI: گروه دارای محرومیت غذایی و با تزریق مالتونین و با شرایط جداسازی، M: گروه دارای تزریق مالتونین. پیکانها افزایش شدید تعداد سلولهای تانل مثبت را در گروه آزمایشی دارای محرومیت غذایی (گروه FD) (و دارای مواجهه: احساس نابرابری و بی عدالتی اجتماعی) نشان می دهد. تجویز مالتونین (گروه FDM) افزایش سلولهای تانل مثبت دچار مرگ سلولی را در گروه محرومیت غذایی FD ترمیم نموده است.

عملکرد کاسپاز ۳ در گروه FDMI ($P < 0/01$) به خوبی نمایان است که به معنی تأثیر بیشتر استرس محرومیت در زمان مواجهه و بر خورد با سایر حیوانات است.



شکل ۴ تعداد سلولهای زاینده واکنش دهنده با کاسپاز ۳ در واحد سطح از برش عرضی بیضه؛ مقادیر برحسب میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است. معنی داری بین گروه کنترل با سایر گروه‌ها برای حداقل ۱۲۰ میدان مشاهده از ۶ رت در هر گروه با * و تفاوت بین گروه محرومیت با گروه‌های دارای تیمار با ## مشخص شده است.

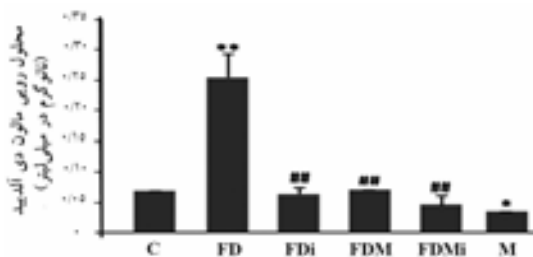
##: مرز معنی داری در حد $P < 0/01$ در مقایسه با گروه کنترل است.
 #: مرز معنی داری در حد $P < 0/05$ در مقایسه با گروه محرومیت همراه با احساس نابرابری (گروه FD)
 ###: مرز معنی داری در حد $P < 0/01$ در مقایسه با گروه محرومیت همراه با احساس نابرابری (گروه FD)
 C: گروه کنترل، FD: گروه دارای محرومیت غذایی همراه با مشاهده غذا خوردن دیگران و احساس نابرابری، FDI: گروه دارای محرومیت غذایی و با شرایط جداسازی (بدون احساس نابرابری)، FDM: گروه دارای محرومیت غذایی و احساس نابرابری و با تزریق مالتونین، FDMI: گروه دارای محرومیت غذایی و با شرایط جداسازی (بدون احساس نابرابری) با تزریق مالتونین، M: گروه دارای تزریق مالتونین (شاهد مثبت)

با توجه به مرگ سلولی بافت بیضه به عنوان یک بافت خود تجدید شونده (Renewal)، مرگ سلولی برنامه ریزی شده در گروه‌های آزمایش، نسبت به گروه کنترل بررسی و مقایسه شد. در بخش اول آنتی کاسپاز ۳ در سطح سیتوپلاسم سلولهای بافت گروه دارای محرومیت (مقایسه گروه FD با گروه کنترل؛ $P < 0/01$ و نیز شکل ۴) و در بخش دوم روش تانل در سطح هسته این سلولها (مقایسه گروه FD با گروه کنترل؛ $P < 0/001$ و نیز شکل ۵) روند مرگ سلولی برنامه ریزی شده را نشان داد. هر دو روش بر مرگ سلولی در اثر استرس محرومیت همراه با نابرابری اجتماعی دلالت داشت.

بر اساس نتایج در گروه‌های تیمار شده با مالتونین روند بهبود بخشی مشاهده شد (مقایسه گروه FD با گروه FDMI؛ $P < 0/05$ برای هر دو روش کاسپاز ۳ و تانل و نیز شکل‌های ۴ و ۵). اعمال محرومیت غذایی در شرایط جدا شدگی (شرایطی که اثر مواجهه و در نتیجه احساس نابرابری در دریافت غذا وجود نداشت) در بررسی کاسپاز ۳ مشابه مالتونین اثر بهبود بخشی مشاهده شد ($P < 0/05$). همراهی این دو عامل (جداسازی و مالتونین) موجب القای اثر تجمعی شد؛ بدین ترتیب که در زمان همراهی هر دو عامل تیماری مالتونین و جداسازی از سایر حیوانات مرگ سلولی برنامه ریزی شده به طرز معنی داری باز هم کاهش نشان داد که این اثر با کاهش

تأثیر محرومیت غذایی بر مرگ سلولی

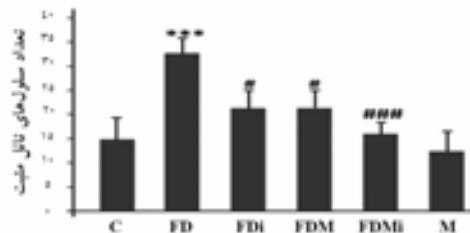
متابولیسم اسیدهای چرب غیر اشباع، جهت اندازه‌گیری مقادیر پراکسیداسیون لیپیدی (به عنوان یک نشانگر استرس اکسیداتیو) اندازه‌گیری گردید. در این آزمون افزایش شدید MDA به عنوان شاخص افزایش استرس اکسیداتیو در گروه دارای محرومیت همراه با نابرابری در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید ($P < 0.01$). چنین اثری در گروهی که همان میزان محرومیت غذایی را در محیط جدا شده داشتند دیده نشد بلکه جداسازی و ملاتونین به طور جداگانه موجب کاهش معنی‌دار در سطح مالون دی آلدیید بافتی نسبت به گروه FD شده‌اند (مقایسه گروه‌های FDi و FDM با گروه FD؛ $P < 0.01$ ؛ شکل ۶).



شکل ۶ مقدار ترکیب مالون دی آلدیید در هر میلی‌لیتر محلول رویی (Supernatant) عصاره بافتی برحسب نانوگرم؛ مقادیر برحسب میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است. گروه محروم از غذا که در معرض احساس نابرابری قرار داشته است (گروه FD)، به وضوح مقدار مالون دی آلدیید بیشتری در بافت بیضه نشان داده است. تجویز ماده آنتی‌اکسیدان ملاتونین (گروه FDM) این افزایش را تا سطح کنترل تعدیل کرده است. تجویز ملاتونین به تنهایی [گروه شاهد مثبت (M)] نیز مقدار مالون دی آلدیید را از سطح کنترل کمتر کرده است؛ بنابراین اثر آنتی‌اکسیدانی معنی‌داری داشته است. معنی‌داری بین گروه کنترل با سایر گروه‌ها برای ۶ رت در هر گروه با * و تفاوت بین گروه محرومیت با گروه‌های دارای تیمار با # مشخص شده است.

*: مرز معنی‌داری در حد $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل است.
 **: مرز معنی‌داری در حد $P < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل است.
 ###: مرز معنی‌داری در حد $P < 0.001$ در مقایسه با گروه محرومیت همراه با احساس نابرابری (گروه FD) است.

C: گروه کنترل، FD: گروه دارای محرومیت غذایی همراه با مشاهده غذا خوردن دیگران و احساس نابرابری، FDi: گروه دارای محرومیت غذایی و با شرایط جداسازی (بدون احساس نابرابری)، FDM: گروه دارای محرومیت غذایی و احساس نابرابری و با تزریق ملاتونین، FDMi: گروه دارای محرومیت غذایی و با شرایط جداسازی (بدون احساس نابرابری) با تزریق ملاتونین، M: گروه دارای تزریق ملاتونین (شاهد مثبت)



شکل ۵ تعداد سلول‌های زاینده با هسته تانل مثبت در واحد سطح از برش عرضی بیضه؛ مقادیر برحسب میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است. معنی‌داری بین گروه کنترل با سایر گروه‌ها برای حداقل ۱۲۰ میدان مشاهده از ۶ رت در هر گروه با * و تفاوت بین گروه محرومیت با گروه‌های دارای تیمار با # مشخص شده است.

***: مرز معنی‌داری در حد $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل است.
 #: مرز معنی‌داری در حد $P < 0.05$ در مقایسه با گروه محرومیت همراه با احساس نابرابری (گروه FD)
 ###: مرز معنی‌داری در حد $P < 0.001$ در مقایسه با گروه محرومیت همراه با احساس نابرابری (گروه FD)

C: گروه کنترل، FD: گروه دارای محرومیت غذایی همراه با مشاهده غذا خوردن دیگران و احساس نابرابری که افزایش مشخصی نسبت به گروه کنترل در تعداد سلول‌های تانل مثبت دچار مرگ سلولی نشان داده‌اند، FDi: گروه دارای محرومیت غذایی و با شرایط جداسازی (بدون احساس نابرابری) که کاهش معنی‌داری در سلول‌های تانل مثبت نسبت به گروه دارای احساس نابرابری نشان دادند، FDM: گروه دارای محرومیت غذایی و احساس نابرابری و با تزریق ملاتونین که تعداد سلول‌های تانل مثبت تقریباً برابر با گروه دارای محرومیت غذایی و با شرایط جداسازی (بدون احساس نابرابری) بود. FDMi: گروه دارای محرومیت غذایی و با شرایط جداسازی (بدون احساس نابرابری) و با تزریق ملاتونین که نسبت به دو گروه FDM و FDi اثر تجمعی نشان داده و کاهش شدیدی در تعداد سلول‌های تانل مثبت نشان داد و M: گروه دارای تزریق ملاتونین (شاهد مثبت)

در بررسی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده با روش تانل نیز اثر مرگ سلولی استرس نابرابری واضح‌تر و اثر افزایشی در همراهی دو عامل تیماری (جداسازی و ملاتونین) در گروه FDMi بهتر دیده شد (مقایسه گروه‌های FDMi با FD؛ $P < 0.001$).

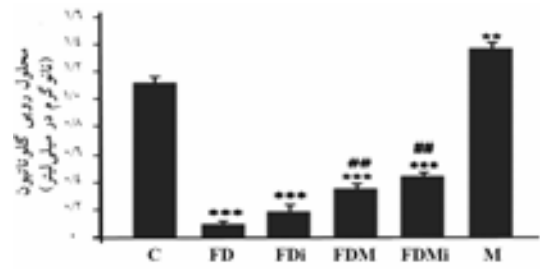
در تمامی گروه‌ها بین گروه کنترل و گروه ششم (دارای تزریق سالین) هیچ تفاوتی مشاهده نشد و نتایج گروه ششم از مجموعه نتایج گروه‌ها حذف شد.

بررسی سطح مالون دی آلدیید و گلوکاتونین

مالون دی آلدیید

این ترکیب به عنوان یک متابولیت فعال حاصل از

همراهی دو عامل جداسازی و ملاتونین تغییر اضافی ایجاد نکرده است و دارای اثر تجمعی نیز نبوده است. ملاتونین به تنهایی نیز در مقایسه با گروه کنترل اثر آنتی‌اکسیداتیو داشته و موجب کاهش سطح طبیعی مالون دی‌آلدیید بافتی شده است (مقایسه گروه کنترل با ملاتونین $P < 0/05$; شکل ۶).



شکل ۷ مقدار ترکیب گلوکاتاتیون در هر میلی‌لیتر محلول رویی عصاره بافتی بر حسب میکروگرم؛ مقادیر برحسب میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است. گروه محروم از غذا که در معرض احساس نابرابری قرار داشته است (گروه FD)، به وضوح مقدار گلوکاتاتیون کمتری در بافت بیضه نشان داده است. تجویز ماده آنتی‌اکسیدان ملاتونین (گروه FDM) این کاهش را تا حدود زیادی تعدیل کرده است. تجویز ملاتونین به تنهایی [گروه شاهد مثبت (M)] نیز مقدار گلوکاتاتیون را از سطح کنترل بیشتر کرده است و بنابراین اثر آنتی‌اکسیدانی معنی‌دار داشته است. مقادیر برحسب میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است. معنی‌داری بین گروه کنترل با سایر گروه‌ها برای ۶ رت در هر گروه با * و تفاوت بین گروه محرومیت با گروه‌های دارای تیمار با # مشخص شده است.

*** ##: مرز معنی‌داری در حد $P < 0/01$ در مقایسه با گروه محرومیت همراه با احساس نابرابری (گروه FD)
 ***: مرز معنی‌داری در حد $P < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل (C)
 C: گروه کنترل، FD: گروه دارای محرومیت غذایی همراه با مشاهده غذا خوردن دیگران و احساس نابرابری، FDi: گروه دارای محرومیت غذایی و با شرایط جداسازی (بدون احساس نابرابری)، FDM: گروه دارای محرومیت غذایی و احساس نابرابری و با تزریق ملاتونین، FDMi: گروه دارای محرومیت غذایی و با شرایط جداسازی (بدون احساس نابرابری) با تزریق ملاتونین، M: گروه دارای تزریق ملاتونین (شاهد مثبت)

گلوکاتاتیون

گلوکاتاتیون به عنوان قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان درون سلولی در این مطالعه ارزیابی شد. نتایج در این آزمون نشان دهنده اثر بسیار کاهنده محرومیت غذایی همراه با نابرابری بر سطح آنزیم گلوکاتاتیون بافتی است ($P < 0/001$). در این آزمون اعمال

محرومیت غذایی در شرایط جدا شدگی حیوانات بر تغییر مقادیر بافتی گلوکاتاتیون تأثیر محسوسی نسبت به گروه محرومیت همراه با احساس نابرابری نداشته است (شکل ۷). ملاتونین موجب افزایش معنی‌دار در سطح گلوکاتاتیون بافتی در گروه دارای محرومیت شده است (مقایسه گروه‌های FDM با FD؛ $P < 0/01$) به علاوه ملاتونین توانسته سطح طبیعی گلوکاتاتیون بافتی را نیز در مقایسه با گروه کنترل افزایش دهد ($P < 0/01$) (شکل ۷).

بحث

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اگر محرومیت غذایی با احساس نابرابری همراه باشد، غلایمی از استرس اکسیداتیو را ایجاد می‌کند که با تجویز ماده آنتی‌اکسیدان ملاتونین بسیاری از آثار این استرس اکسیداتیو ترمیم می‌شود. بر این اساس ملاتونین بر سلامت باروری در رت‌های نری که دارای مواجهه با نابرابری باشند، مؤثر است.

براساس مطالعات انسانی و حیوانی کم غذایی و عدم ثبات در شرایط اجتماعی، بر سلامت فردی و اجتماعی اثر مخرب دارد [۱، ۲]. براساس مطالعات آثار فقر و نابرابری غذایی بر سلامت افراد به صورت استرس مزمن و مرتبط با آثار بافتی، فعالیت‌های بدن را در اندام‌های مختلف تحت تأثیر قرار می‌دهد [۱]

محرومیت از غذا عوامل استرس اکسیداتیو مثل لیپید پراکسیدازها و پراکسید هیدروژن در بافت مغز را افزایش داده و عوامل آنتی‌اکسیدان بافتی نظیر گلوکاتاتیون و SOD و ویتامین E را کاهش می‌دهد [۳۰]. مطالعات نشان داده اثر محرومیت غذایی بر میزان لیپوفوشین (Lipofuscin) مغز افزایش یافته است [۱]

در سایر مطالعات گرسنگی و محرومیت غذایی را نوعی استرس اکسیداتیو معرفی کرده‌اند که موجب افزایش نشانگر زیستی مالون دی‌آلدیید و SOD و کاتالاز شده و نیز موجب تغییر در مقادیر گلوکاتاتیون بافتی می‌شود که همسو با نتایج این مطالعه در افزایش مالون دی‌آلدیید و کاهش گلوکاتاتیون موجود در بافت بیضه دارای محرومیت می‌باشد [۳۱-۳۳]

تأثیر محرومیت غذایی بر مرگ سلولی

جداسازی توانسته موجب کاهش سطح مالون دی آلدیید و افزایش سطح گلوکاتایون، شود. از طرفی در ساختار بیضه حیوانات دارای محرومیت و با شرایط جدا شدگی نسبت به گروه دارای محرومیت ولی دارای مواجهه، مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده کمتری نیز مشاهده شده است که شاید بتوان این اثر را نیز به فقدان اثر استرس اکسیداتیو محرومیت غذایی در شرایط جداسازی نسبت داد. این نتایج پیشنهاد می‌کند، احتمالاً درک و آگاهی و احساس محرومیت استرس اکسیداتیو بارزی محسوب می‌شود و طبیعتاً منجر به ایجاد عوارضی نظیر تغییر در سطوح اکسیدان‌های بافتی یا مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده می‌شود. ملاتونین در مطالعه حاضر به عنوان ترکیبی آنتی‌اکسیدان مورد مصرف آگروژن قرار گرفته است. نتایج نشان دهنده این است که ملاتونین بر بسیاری از آثار کاهنده بی‌عدالتی غذایی بر سلول‌های زاینده در بیضه، اثر بهبود دهنده داشته و به این ترتیب احتمالاً بر سلامت باروری در رت‌های نر نیز مؤثر است.

این مطالعه نشان داد که محرومیت غذایی به تنهایی منجر به تغییر عوامل بیوشیمیایی در استرس اکسیداتیو و نیز ایجاد مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده بافتی نمی‌شود، ولی آثار محرومیت هنگامی که در محیط با احساس نابرابری و بی‌عدالتی غذایی اعمال شود به صورت بارزی مشاهده می‌شود. این اثر با تزریق ماده آنتی‌اکسیدان ملاتونین از بین رفته است. ملاتونین در گروه محرومیت غذایی همراه با مشاهده، میزان آپوپتوز را به حد گروه‌های طبیعی کاهش داده، مالون دی آلدیید را به حد طبیعی رسانده و گلوکاتایون را نیز افزایش داده ولی به حد طبیعی رسانده است. ملاتونین به این ترتیب احتمالاً بر سلامت باروری در رت‌های نری که با شرایط نابرابری و بی‌عدالتی اجتماعی مواجه شدند مؤثر است. همچنین نتایج این مطالعه بر اکسیداتیو بودن محرومیت همراه با احساس نابرابری تأکید دارد.

با توجه به مؤثر بودن ملاتونین در برخورد با نابرابری اجتماعی در رت، در صورت تکرار نتایج در آزمایش‌های مشابه و ارایه مسیرهای دقیق مولکولی آن، آزمایش‌هایی برای یافتن دوز مؤثر ملاتونین بر بدن انسان و استفاده در محیط‌های مبتلا

در این مطالعه نیز افزایش مالون دی آلدیید و کاهش گلوکاتایون موجود در بافت بیضه دارای محرومیت غذایی مشاهده گردیده است. این تغییرات نشان دهنده تغییر ثبات در ترکیبات درون سلولی به نفع افزایش عوامل استرس اکسیداتیو بوده و نشان دهنده کاهش توان سلول‌های در معرض کم غذایی همراه با نابرابری در سرکوب عوامل این استرس می‌باشد.

به دنبال افزایش اکسیدان‌های بافتی (مالون دی آلدیید) و کاهش عوامل متعادل کننده آن (گلوکاتایون)، انتظار می‌رود پیامدهای استرس اکسیداتیو از جمله مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌های زاینده بیضه رخ دهد. نتایج مطالعه حاضر این امر را تأیید کرد.

ملاتونین مترشح از غده پینه‌آل هورمونی است که موجب چرخه شبانه روزی خواب و بیداری در بسیاری از جانوران می‌شود و با ایجاد رفتار فصلی تولید مثلی در برخی جانوران شناخته شده است [۳۳].

به علاوه ملاتونین همسو با توان آنتی‌کسیدانی خود، اثر ضد مرگ سلولی نیز از خود نشان داده است [۲۰].

در مطالعات گذشته روی استرس محرومیت غذایی مشخص شده است که یکی از عواملی که موجب بدتر شدن وضعیت جانور در برخورد با محرومیت می‌شود، احساس نابرابری و شرایط مواجهه با سایر حیوانات برخوردار و غیر محروم است. به این ترتیب در شرایط جداسازی آثار محرومیت غذایی کاهش می‌یابد [۱، ۲]. در مطالعه حاضر با توجه به تفاوت مشاهده شده بین گروه‌های دارای محرومیت و احساس نابرابری با گروه‌های دارای محرومیت جدا نگه داشته شده از سایرین، مشخص شد که محرومیت غذایی همراه با مشاهده غذا خوردن دیگران، اثر اکسیداتیو و مرگ سلولی قوی در بیضه ایجاد می‌کند که این آثار با تجویز ملاتونین از بین می‌رود. شرایط جداسازی (محرومیت بدون نابرابری) اثری مشابه ملاتونین از خود نشان می‌دهد. به این صورت که محرومیت همراه با بی‌عدالتی، موجب افزایش مقدار مالون دی آلدیید و کاهش گلوکاتایون در بافت بیضه می‌شود و شرایط

دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی صورت پذیرفته است. بدین وسیله از حمایت‌های سرکار خانم دکتر معتمدی از این مطالعه و مساعدت و همفکری‌های آقای دکتر محمدرضا بیگدلی و خانم دکتر لیلا خلیج در بررسی‌های بیوشیمیایی سپاسگزاری می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات علوم اعصاب

منابع

- [1] Moradi F, Vaez Mahdavi MR, Ahmadiani A, Rogani M, Altiraihi T, Mojarab S. Can social instability, food deprivation and food inequality accelerate neuronal aging? *BCN* 2012; 3(3): 38-48.
- [2] Aghajani M, Vaez Mahdavi MR, Khalili Najafabadi M, Ghazanfari T. The effect of social stress on chronic pain perception in female and male mice. *PLOS one* 2012; 7(10): e47218.
- [3] Mahdi Doost S, Vaez Mahdavi MR, Kabudanian Ardestani S, Sedaghat R, Jalilvand F, Aghajani M, Khalili M. The effect of stress due to food deprivation, social inequality and instability on quantitative and qualitative lipofuscin in brain. *Physiol pharmacol J* 2012; (In Press). (Persian)
- [4] Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 1998; 94(6): 557-72.
- [5] Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 250(1-2): 66-9.
- [6] Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility *Fertil Steril* 2003; 80(3): 531-5.
- [7] Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil Steril* 2000; 73(3): 459-64.
- [8] Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int* 2005; 95(4): 503-7.
- [9] Abd-Elmoaty MA, Saleh R, Sharma R, Agarwal A. Increased levels of oxidants and reduced antioxidants in semen of infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 2010; 94(4): 1531-4.
- [10] Kirby ED, Geraghty AC, Ubuka T, Bentley GE, Kaufer D. Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. *PNAS* 2009; www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0901176106
- [11] Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev* 2004; 25(5): 747-806.
- [12] Ogawa T. Spermatogonial transplantation: the principle and possible applications. *J Mol Med (Berl)* 2001; 79(7): 368-74.
- [13] Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and

- spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 1972; 52(1): 198-236.
- [14] Gong Y, Han XD. Nonylphenol-induced oxidative stress and cytotoxicity in testicular Sertoli cells. *Reprod Toxicol* 2006; 22(4): 623-30.
- [15] Eskenazi B, Kidd SA, Marks AR, Slotter E, Block G, Wyrobek AJ. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Hum Reprod* 2005; 20(4): 1006-12.
- [16] Super antioxidant is natural fertility treatment, NUTRA 2003; <http://www.nutraingredients-usa.com/Research/Super-antioxidant-is-natural-fertility-treatment>
- [17] Mendiola J, Torres-Cantero AM, Vioque J, Moreno-Grau JM, Ten J, Roca M, Moreno-Grau S, Bernabeu R. A low intake of antioxidant nutrients is associated with poor semen quality in patients attending fertility clinics. *Fertil Steril* 2010; 93(4): 1128-33.
- [18] Agarwal A, Gupta S, Sharma RS. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 28.
- [19] Taketani T, Tamura H, Taniguchi K, Maekawa R, Sugino N. Influence of oxidative stress on oocyte quality and protective role of melatonin as an antioxidant. *Biol Reprod* 2007; 77: 218.
- [20] Um HJ, Kwon TK. Protective effect of melatonin on oxaliplatin-induced apoptosis through sustained Mcl-1 expression and antioxidant action in renal carcinoma Caki cells. *J Pineal Res* 2010; 49(3): 283-90.
- [21] Leja-Szpak A, Jaworek J, Pierzchalski P, Reiter RJ. Melatonin induces pro-apoptotic signaling pathway in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1). *J Pineal Res* 2010; 49(3): 248-55.
- [22] Lee CH, Yoo KY, Choi JH, Park OK, Hwang IK, Kwon YG, Kim YM, Won MH. Melatonin's protective action against ischemic neuronal damage is associated with up-regulation of the MT2 melatonin receptor. *J Neurosci Res* 2010; 88(12): 2630-40.
- [23] Crespo I, Miguel BS, Laliena A, Alvarez M, Culebras JM, González-Gallego J, Tuñón MJ. Melatonin prevents the decreased activity of antioxidant enzymes and activates nuclear erythroid 2-related factor 2 signaling in an animal model of fulminant hepatic failure of viral origin. *J Pineal Res* 2010; 49(2): 193-200.
- [24] Casao A, Cebrián I, Asumpção ME, Pérez-Pé R, Abecia JA, Forcada F, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 8: 59.
- [25] Haque N, Asraf Hossain SK. Melatonin: It's role in seasonality and breeding in farm animals- a review. 2011; <http://www.wayambajournal.com/documents/1315923969.pdf>
- [26] Abraham P, Kolli VK, Rabi S. Melatonin attenuates methotrexate-induced oxidative stress and renal damage in rats. *Cell Biochem Funct* 2010; 28(5): 426-33.
- [27] Lee YD, Kim JY, Lee KH, Kwak YJ, Lee SK, Kim OS, Song DY, Lee JH, Baik TK, Kim BJ, Kim JY, Baik HW. Melatonin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation in sleep-deprived mice. *J Pineal Res* 2009; 46(1): 53-7.
- [28] Parlaktas BS, Ozyurt B, Ozyurt H, Tunc AT, Akbas A. Levels of oxidative stress parameters and the protective effects of melatonin in psychosis model rat testis. *Asian J Androl*

- 2008; 10(2): 259-65.
- [29] Hayter CL, Bishop GM, Robinson SR. Pharmacological but not physiological concentrations of melatonin reduce iron-induced neuronal death in rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 2004; 362(3): 182-4.
- [30] Janzadeh N, Movahedin M. The study of antioxidative effect of melatonin on cure of sensitive-motor damage in mice brain Edema model. M.Sc. Thesis, Trabiati Modares University, Tehran 2008.
- [31] Morales AE, Pérez-Jiménez A, Hidalgo MC, Abellán E, Cardenete G. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in Dentex dentex liver. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2004; 139(1-3): 153-61.
- [32] Al-Majed A. Probuocol Attenuates Oxidative Stress, Energy Starvation, and Nitric Acid Production Following Transient Forebrain Ischemia in the Rat Hippocampus. *Oxid Med Cell Longev* 2011; 2011: 471590.
- [33] Bhardwaj SK, Sharma ML, Gulati G, Chhabra A, Kaushik R, Sharma P, Kaur G. Effect of starvation and insulin-induced hypoglycemia on oxidative stress scavenger system and electron transport chain complexes from rat brain, liver, and kidney. *Mol Chem Neuropathol* 1998; 34(2-3): 157-68.