

Effects of Mouse Paternal Age on Sperm Parameters, Reactive Oxygen Species Levels, Intraspermic Antioxidants and In Vitro Fertilization Results

Saeedeh Nouri¹, Mansoreh Movahedin^{2*}, Zohreh Mazaheri³

- 1- M.Sc., Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: movahed.m@modares.ac.ir

Received: 05/Apr/2014, Accepted: 14/Jul/2014

Abstract

Objective: Oxidative stress as a consequence of aging can induce infertility in males. In this study, we have investigated the effects of aging on sperm parameters, intra-spermatic water soluble antioxidants, reactive oxygen species (ROS), and in vitro blastocyst formation.

Methods: We chose 5 older NMRI male mice (10-12 months) and 5 younger NMRI male mice (2-3 months). Sperm parameters, ROS, soluble antioxidants level and in vitro fertilization rate were assessed in both groups. The results were analyzed by the independent sample and chi square tests. A correlation test was performed between ROS generation and soluble antioxidant levels.

Results: Our data showed a significant decrease ($P \leq 0.05$) between sperm count, progressive motility and normal morphology. There was no significant difference in fertilization, blastocyst formation rates, ROS and water soluble antioxidant levels between the two groups. We observed a significant difference ($P \leq 0.01$), linear and inverted relation between both groups in terms of ROS and water soluble antioxidant levels.

Conclusion: Aging causes a significant decrease in sperm count, progressive motility and normal morphology. The relationship between intra-spermatic oxidant and anti-oxidants is significant, linear and inverted in both young and aging mice. Thus, high levels of water soluble antioxidants are followed by decreased ROS levels. This study has shown that age of the male mouse did not affect the rates of in vitro fertilization and blastocyst formation.

Keywords: Sperm, Aging, ROS, IVF, Antioxidant

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 17, No 3, Autumn 2014, Pages: 93-103

آثار سن موش والد بر خصوصیات اسپرمی، میزان گونه‌های فعال اکسیداتیو، آنتیاکسیدان‌های داخل اسپرمی و نتایج حاصل از لقادار آزمایشگاهی

سعیده نوری^۱، منصوره موحدین^{۲*}، زهره مظاہری^۳

۱- کارشناس ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریحی

Email: movahed.m@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۳/۰۴/۲۳

دریافت مقاله: ۹۳/۰۱/۱۶

چکیده

هدف: افزایش سن به عنوان یک عامل اکسیداتیو روی ناباروری مردان تأثیر دارد. در این پژوهش آثار افزایش سن بر پارامترهای اسperm، آنتیاکسیدان‌های محلول در آب و گونه‌های آزاد اکسیژن داخل اسpermی و میزان به وجود آمدن بلاستوسیست‌ها متعاقب لقادار آزمایشگاهی در موش نر مسن در مقایسه با موش جوان ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: ۵ سر موش نر مسن ۱۲-۱۰ ماهه و ۵ موش نر بالغ جوان ۳-۲ ماهه نژاد NMRI انتخاب شدند. در این مطالعه پارامترهای اسperm، میزان گونه‌های اکسیژن آزاد، آنتیاکسیدان‌های محلول در آب و میزان لقادار آزمایشگاهی در دو گروه ارزیابی شد. نتایج به وسیله آزمون‌های تی مستقل و مجذور کای بررسی شد. بین میانگین غلاظت آنتیاکسیدان‌های محلول در آب و میانگین بازتابش فلورسنت گونه‌های آزاد اکسیژن نیز آزمون همبستگی انجام شد.

نتایج: کاهش معنی داری ($P \leq 0.05$) در تعداد، حرکت پیشرونده و شکل طبیعی اسperm در گروه مسن نسبت به گروه جوان مشاهده شد. بین دو گروه تفاوت معنی داری در میزان درصد لقادار آزمایشگاهی و تشکیل بلاستوسیست، سطح گونه‌های آزاد اکسیژن و آنتیاکسیدان‌های محلول در آب موجود در اسperm مشاهده نشد. بین میانگین غلاظت آنتیاکسیدان‌های محلول در آب و میانگین بازتابش فلورسنت گونه‌های آزاد اکسیژن در هر دو گروه مسن و جوان رابطه معنی دار ($P \leq 0.01$)، معکوس و خطی بود.

نتیجه‌گیری: پیری سبب کاهش معنی دار در تعداد، تحرک پیشرونده و درصد زنده‌مانی اسperm می‌شود. در موش مسن و جوان، افزایش سطح آنتیاکسیدان‌های محلول در آب با کاهش سطح اکسیدان‌ها همراه است. به علاوه، سن موش نر نمی‌تواند بر میزان درصد لقادار آزمایشگاهی و بلاستوسیست‌های حاصل از تکوین این جنین‌ها مؤثر باشد.

کلیدواژگان: اسperm، افزایش سن، لقادار آزمایشگاهی، گونه‌های آزاد اکسیژن، آنتیاکسیدان

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳، صفحات: ۹۳-۱۰۳.

مقدمه

متabolیسم هوایی در بدن تشکیل می‌شود [۱]. حضور ROS در سلولی نظری اسperm به دلیل فعالیت بالا علاوه بر داشتن آثار

گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (Reactive Oxidative Species: ROS) طی فرآیندهای فیزیولوژی طبیعی نظری

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳

نقش سن بر باروری موش نر مسن

آنٹی اکسیدانی نظریه سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز در سیستم عصبی مرکزی تأثیرگذار است [۹]. به این ترتیب در این مطالعه سعی بر آن شده است که تأثیر عامل استرس زای سن بر پارامترهای اسپرمی، لقادح آزمایشگاهی، میزان ROS و آنتی اکسیدان های داخل سلولی در اسپرم موش مسن و موش جوان بررسی شود. نتایج حاصل از این مطالعه می تواند در صورت اثر بخش بودن عصاره به عنوان راهکاری در درمان افراد نابارور به کار گرفته شود.

مواد و روش ها

گروه بندی حیوانات

در این مطالعه از تعداد ۵ سر موش نر مسن ۱۲-۱۰ ماهه و تعداد ۵ سر موش نر بالغ ۳-۲ ماهه نژاد NMRI برای استخراج اسپرم و از تعداد ۲۰ سر موش ماده بالغ نژاد NMRI ۸-۶ هفته برای استخراج تخمک به منظور انجام لقادح آزمایشگاهی (IVF) استفاده شد. تمامی این حیوانات در حیوان خانه دانشگاه تربیت مدرس در شرایط آب و هوایی مناسب، دمای ۲۵ درجه، ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و در قفسه های جداگانه نگهداری شدند. روش کار با حیوانات مطابق با قوانین بین المللی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت.

نحوه آماده سازی اسپرم

به منظور جداسازی اسپرم، ابتدا موش ها با روش جا به جایی مهره های گردنی کشته شدند. سپس هر اپیدیدیم به صورت جداگانه در قطرات محیط کشت HTF بدون HEPES (شرکت ژن و سلول ایده آل، ایران) حاوی BSA (ID Bio) (فرانسه) به میزان ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر قرار گرفت. اپیدیدیم ها توسط یک سوزن ظریف قطعه قطعه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط انکوباتور ۶/۲ درصد CO_2 ، ۳۷ درجه سانتی گراد، ۹۵ درصد رطوبت نگهداری شد تا اسپرم ها از لوله

مبتنی نظریه تأثیر در فرآیند ظرفیت پذیری، بیش فعالی، تحرک، واکنش آکروزومی، حفظ قدرت باروری [۲]، می تواند منجر به اختلالاتی نظریه کاهش بقای اسپرم، آسیب به ساختار و تمامیت هسته اسپرم نیز شود. این آثار منفی در نهایت با کاهش تحرک اسپرم ها بر میزان لقادح تخمک- اسپرم اثرگذار است [۳]. حساسیت اسپرم به استرس اکسیداتیو به دلیل مقادیر زیادی از Polyunsaturated Fatty Acids: PUFA (در غذا این سلول است [۴]. به این ترتیب، هنگامی که آبشار لبید پراکسیداسیون Lipid Peroxidation: (LPO) در اسپرم راه می افتند، تقریباً ۶۰ درصد اسیدهای چرب از غشا حذف می شود. LPO بر ساختار و عملکردهای غشا مانند سیالیت، شبی یونی، هدایت گیرندها، فرآیندهای انتقالی و آنزیم های غشا اثر می گذارد که در نهایت منجر به کاهش تحرک اسپرم می شود [۵]. از سوی دیگر؛ افزایش میزان تولید ROS در نتیجه استرس اکسیداتیو می تواند منجر به کاهش تحرک و ایجاد ناهنجاری های ریخت شناختی همچون دم پیچ خورده، آسیب به آکروزوم، قطعه قطعه شدن DNA و کاهش عملکرد اسپرم و در نتیجه سبب کاهش ظرفیت باروری اسپرم شود [۶]. از آنجایی که در سیستم تناسلی مردان به طور طبیعی بین ROS تولید شده و فعالیت آنتی اکسیدان ها تعادل برقرار است، تولید ROS در مایع منی با مکانیسم های دفاعی آنتی اکسیدانی اسپرم و پلاسمای مایع منی مواجه و در نهایت حذف می شود. با این حال، این امکان وجود دارد که این مکانیسم دفاعی در هم بشکند و میزان استرس اکسیداتیو افزایش یابد [۵]. دفاع آنتی اکسیدانی پلاسمای مایع منی قادر است کمبود آنزیم های سیتوپلاسمی اسپرم که طی بلوغ آن حذف می شود را جبران کند و اسپرم را در برابر تولیدات اکسیداتیو این سلول طی فعالیت آن، محافظت نماید [۴]. ارتباط بین استرس اکسیداتیو با فرآیند پیری [۷] و تأثیر آن بر تغییرات تحریکی در بافت پیشه به همراه کاهش در کیفیت اسپرم قبلاً در موش مطالعه شده است [۸]. همچنین مشاهده شده که سن خوکچه های هندی بر میزان آنزیم های

تعداد ۱۰۰ اسپرم مطالعه و درصد اسپرم‌های زنده محاسبه شد.

بررسی شکل اسپرم

در این مطالعه برای بررسی شکل اسپرم، اسپرم‌ها با رنگ آمیزی شدن. سپس اسپرم‌های با اشکال غیر طبیعی سر، اشکال غیر طبیعی گردن، اشکال غیر طبیعی دم ارزیابی شدند. برای تعیین میزان اسپرم‌های طبیعی تعداد ۱۰۰ اسپرم شمارش شدند.

بررسی های بافت شناسی نمونه پافت بیضه

پس از برداشتن ناحیه دم اپیدیدیم، بافت بیضه از بدن حیوان جداسازی و به مدت ۴۸ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. سپس توسط الكل های سریالی آب گیری، با زایلول شفافسازی و در نهایت قالب گیری شد. بعد از تهیه برش های ۵ میکرومتری با هماتوکسیلین و اوزین رنگ آمیزی و زیر میکروسکوب نوری بررسی شد.

لِقَاحُ آزمَائِشَگاهِي (IVF)

آماده‌سازی موشک‌های ماده

به منظور تحریک تخمک گذاری، میزان ۱۰ واحد بین المللی Intervet) (PMSG، بلژیک) و ۴۸ ساعت بعد ۱۰ واحد بین المللی HCG (Pregnyl، ایران) به روش داخل صفاقی به موش های ماده تزریق شد. پس از گذشتן ۱۸-۲۰ ساعت از تزریق HCG، به منظور گفتن تخمک MII از ناحیه آمپول لوله رحمی، موش ها به روش جا به جایی مهره های گردنی کشته شدند و ناحیه لوله رحمی (Oviduct) موش ها برداشته شد و در داخل قطرات کشت ۱۰۰ میکرولیتری که در زیر روغن قرار داشت، گذاشته شد. قطرات کشت حاوی HTF BSA (شرکت ژن و سلول ایدهآل، ایران) + HEPES محتوی (۵ میلی گرم در میلی لیتر بود. با پاره کردن ناحیه آمپولا، به میزان ۵ میلی گرم در میلی لیتر بود. با پاره کردن ناحیه آمپولا، تخمک های MII خارج شدند. تخمک ها در قطره دیگری شیستشو داده شدند و به قطرات کشت مخصوص IVF که

خارج شوند [۱۰]. از یکی از اپیدیدیم‌ها برای بررسی پارامترهای اسپرمی، ارزیابی میزان ROS، اندازه گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل و از دیگری به منظور بررسی لفاح آزمایشگاهی استفاده شد. به منظور انجام IVF، اسپرم‌های فعال و سالم که با روش Swim up در کناره‌های قطره جمع شده بودند، از کناره قطره جمع آوری و سپس به قطرات حاوی تخمک‌های MII آماده شده برای IVF اضافه شدند.

بررسی پارامترهای اسپرم

بررسی تعداد اسپرم

به منظور شمارش اسپرم، چند مرتبه قطره حاوی اسپرم پیپتاز شد تا پراکنده گی یکنواختی ایجاد شود. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی اسپرم با ۹۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شد تا به این ترتیب اسپرم ها بی حرکت شوند. تعداد اسپرم ها در میزان ۱۰ میکرولیتر از این مخلوط با استفاده از لام هموسیتومر نوبار (Hemocytometer Neubauer) و با بزرگنمایی ۴۰۰ در زیر میکروسکوپ شمارش شد.

بررسی تحرک اسپریم

برای تعیین درصد تحرک اسپرم، تعداد ۱۰۰ اسپرم شمارش و نوع تحرک هر کدام ثبت شد. در این مطالعه تحرک اسپرم به صورت حرکت پیشرونده سریع، حرکت پیشرونده آهسته، حرکت غیر پیشرونده و غیر متحرک بررسی شد.

بررسی قدرت زنده‌مانی اسپرم

۱۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم با ۱۰ میکرولیتر از رنگ تریپان بلو مخلوط شد و پس یک قطره ۱۰ میکرولیتری از مخلوط مذکور روی لام قرار گرفت و پس از ۳۰ ثانیه اسپرمها با بزرگنمایی $\times 400$ مطالعه شد. سر اسپرم‌هایی که نقص در غشای خود داشتند، تریپان بلو را جذب کرد و به رنگ آبی دیده شد؛ در حالی که اسپرم‌های زنده بی‌رنگ بود و رنگ را به خود جذب نکرد. برای اندازه‌گیری درصد اسیم‌های زنده،

نقش سن بر باروری موش نر مسن

سپس به مدت ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. بعد از سپری شدن مدت انکوباسیون در تاریکی، ۹۰۰ میکرولیتر PBS به آن اضافه شد و با ۲۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد، سوب رویی آنها تخلیه و برای بررسی با دستگاه فلوسیتومتری (BD Biosciences, آمریکا) آماده شد.

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل (آزمون (FRAP

هم‌اکنون روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌شود. روش (FRAP) Recovery After Photobleaching (Benzie and Strain, 1996) معرفی شده، یک روش بسیار حساس، تکرارپذیر و دقیق است [۱۱]. در این روش عوامل آنتی‌اکسیدانی محلول در آب موجود در نمونه مورد مطالعه موج احیا کمپلکس فریک تری (TpTz-Fe³⁺) به فرم فرو (Fe³⁺-Tz-Pt) تغییر می‌شود که در محیط اسیدی آبی رنگ است و حداقل جذب نوری آن در طول موج ۵۹۳ نانومتر است. سرعت واکنش با قدرت احیا کنندگی نمونه رابطه خطی دارد. در این روش به صورت مازاد استفاده می‌شود؛ عامل محدود کننده سرعت، قدرت احیا کنندگی نمونه است. محلول‌های استاندارد یون آهن²⁺ با استفاده از محلول ذخیره آهن³⁺ (جدول ۱) تهیه شد.

حاوی HTF بدون BSA + HEPES به میزان ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود، انتقال یافتند.

انجام روش IVF

به منظور انجام IVF، حجمی از اسپرم که حاوی ۱۵۰۰۰۰ اسپرم بود به قطرات ۵۰ میکرولیتر مربوط به IVF که تخمک‌های MII در آن قرار داده شده بودند، اضافه شد. پس از گذشت ۶ ساعت IVF خاتمه یافته محسوب شد. سپس سلول‌های تخم به قطرات کشت جنین که حاوی محیط کشت global (Life Global, آمریکا) به میزان ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود، منتقل شدند. به مدت ۵ روز کشت داده شدند و تکوین جنین‌ها گزارش شد.

ارزیابی میزان ROS در سلول اسپرم

میزان ROS در سلول اسپرم با استفاده از DCF-DA (Sigma) (dichlorofluorescin diacetate) روش عمومی برای اندازه‌گیری ROS در انواع مختلفی از سلول‌ها است و با روش فلوسیتومتری بررسی شد. به این ترتیب که اسپرم‌ها با ۲۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سوب رویی که حاوی محیط کشت بود دور ریخته شد. این مرحله با (PBS) Phosphate Buffered Saline) تکرار شد. در تاریکی DCF-DA به ازای هر یک میلیون اسپرم، ۱۰ میکرولیتر از ۲۰ میکرومولار به سلول‌ها اضافه شد و به آرامی پیپتاژ شد؛

جدول ۱ نحوه تهیه محلول‌های استاندارد یون آهن

محلول شاهد ۵	محلول شاهد ۴	محلول شاهد ۳	محلول شاهد ۲	محلول شاهد ۱	محلول شاهد ۰	محلول ذخیره آهن (میکرومول)
۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۰		آب مقطر
.	۵۰۰	۷۵۰	۸۷۵	۱۰۰		
۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۰		غلظت یون آهن (میکرومول)

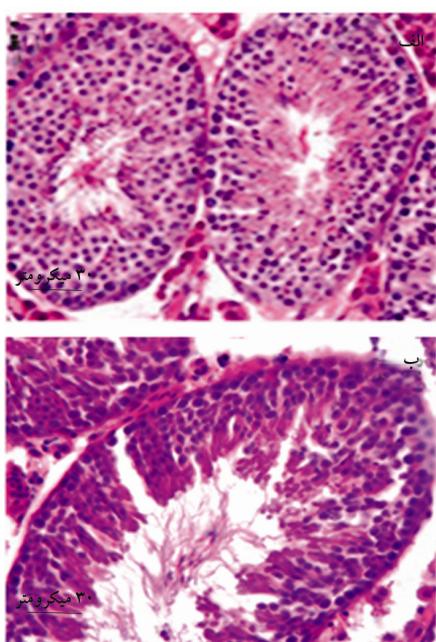
استاندارد به آن اضافه و کاملاً ورتكس شد. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، جذب نور کلیه

برای رسم نمودار استاندارد ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول کار FRAP در یک لوله آزمایش ریخته شد و ۵۰ میکرولیتر از نمونه

نتایج

بررسی با میکروسکوپ نوری

در مشاهدات میکروسکوپ نوری، بیضه موش‌های گروه جوان ظاهری طبیعی داشت؛ به طوری که تمامیت بافت و ساختار و قطر لوله‌ها به طور طبیعی حفظ شده بود. در قاعده لوله‌های منی‌ساز، سلول‌های اسپرماتوگونی به همراه سلول‌های سرتولی مشاهده شد. به علاوه؛ دم اسپرم‌ها در داخل لوله‌های منی‌ساز به طور کامل مشهود بود. در فضای بینابینی لوله‌ها نیز ماتریکس سلولی به همراه سلول‌های لایدیک به صورت طبیعی مشاهده شد (شکل ۱ الف)؛ در حالی که در گروه مسن بافت پوششی لوله‌های منی‌ساز شکاف‌دار بود. تمامیت بافت حفظ شده بود ولی بین رده‌های مختلف سلول‌های زایا شکاف‌های مشهودی قابل مشاهده بود. به علاوه؛ قطر داخلی لوله‌ها به نسبت گروه جوان به طور واضحی بزرگ‌تر بود که نشان دهنده کاهش ضخامت بافت پوششی در گروه مسن نسبت به گروه جوان بود. تعداد اسپرم‌های موجود در داخل لوله‌های منی‌ساز نیز به صورت واضحی نسبت به گروه جوان کاهش نشان می‌داد (شکل ۱ ب).



شکل ۱ برش بافت‌شناسی از بافت بیضه موش جوان (الف) و موش مسن (ب)

نمونه‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد. تمامی این مراحل برای نمونه مجهول نیز تکرار شد. جذب نور کلیه نمونه‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر در مقابل محلول‌های شاهد (محلول شاهد ۱، صفر استاندارد است) خوانده شد. میزان غلظت آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب در نمونه‌های مجهول براساس نمودار استاندارد محاسبه شد.

برای به‌دست آوردن شیره سلولی به‌منظور دسترسی به آنتی‌اکسیدان‌های داخل سلولی، ۲۰۰ میکرولیتر Triton X-100 ۰/۵ درصد روی اسپرم‌ها ریخته شد و با پیپتاژ خوب مخلوط شد. به‌مدت ۳۰ دقیقه روی یخ توسط شیکر (Shaker) تکان داده شد؛ سپس با استفاده از دستگاه سونیکیت (با فرکانس ۵۰ هرتز، دامنه ۸۰ نیم سیکل در ثانیه) اسپرم‌ها شکسته شدند و با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند، از سوب رویی آن که حاوی شیره سلول‌ها بود برای انجام ۳ تکرار این آزمون استفاده شد.

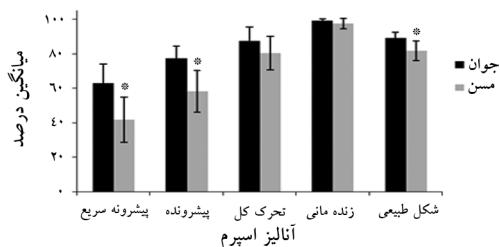
روش‌های آماری

نتایج حاصل از این مطالعه توسط نرم افزار کامپیوتری SPSS نسخه ۲۱ (SPSS, Inc, 2012 USA) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. بررسی نتایج حاصل از مطالعه پارامترهای اسپرمی از نظر تعداد، تحرک، زنده‌مانی و شکل اسپرم‌ها به همراه نتایج بررسی میزان ROS و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از آزمون آماری تی مستقل (Independent Samples Test) بررسی شد. میزان لقادمی آزمایشگاهی و تشکیل بلاستوسیست توسط آزمون مجذور کای (Chi-Square) ارزیابی شد. در آزمون‌های فوق، سطح معنی‌داری $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) بیان شد. بین میانگین غلظت آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب و میانگین بازتابش فلورستن ROS آزمون همبستگی انجام شد، سطح معنی‌داری $P \leq 0.01$ در نظر گرفته شد.

نقش سن بر باروری موش نر مسن

نشان دادند. حرکت سریع در گروه مسن $12/98 \pm 41/80$ و در گروه جوان $10/84 \pm 63$ مشاهده شد که در این مورد نیز اختلاف معنی داری ($P=0.023$) را نشان داد (شکل ۳).

شکل طبیعی اسپرم بر حسب میانگین درصد در گروه مسن $89 \pm 5/73$ بود، در حالی که در گروه جوان $81/75 \pm 3/31$ مشاهده شد. نتایج در این بخش تفاوت معنی داری ($P=0.048$) را بین دو گروه نشان داد (شکل ۳).



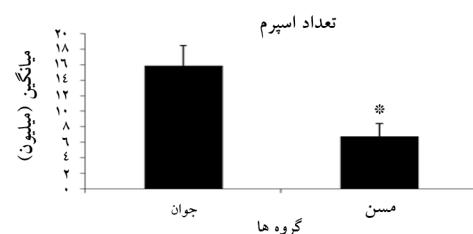
شکل ۳ بررسی پارامتر تحرک، زنده‌مانی و شکل طبیعی اسپرم در موش مسن و جوان؛ اعداد به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) بیان شده است. *: اختلاف معنی دار با گروه جوان ($P \leq 0.05$).

بررسی نتایج لقاح آزمایشگاهی در دو گروه مورد مطالعه

نتایج حاصل از مطالعه در مورد درصد لقاح آزمایشگاهی نشان داد که میزان لقاح آزمایشگاهی در گروه مسن $77/30 \pm 60/97$ درصد و در گروه جوان $60/97$ درصد بود. این نتایج تفاوت معنی داری را از نظر آماری نشان نداد. در مورد درصد بلاستوسیست نیز در گروه مسن $20/26$ درصد و در گروه جوان $17/26$ درصد مشاهده شد که این نتایج نیز با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشتند (جدول ۲).

بررسی نتایج پارامترهای اسپرمی در دو گروه مورد مطالعه

در نتایج به دست آمده میانگین تعداد اسپرم‌ها بر حسب میلیون در گروه مسن $1/64 \pm 6/8$ بود. این در حالی است که در گروه جوان $2/57 \pm 15/90$ شمارش شد که با یکدیگر اختلاف معنی داری ($P=0.001$) را نشان دادند (شکل ۲).



شکل ۲ بررسی پارامتر تعداد اسپرم در موش مسن و جوان؛ اعداد به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) بیان شده است. *: اختلاف معنی دار با گروه جوان ($P \leq 0.05$).

در بررسی سایر پارامترهای اسپرمی نتایج به دست آمده به شکل زیر مشاهده شد.

زنده‌مانی بر حسب میزان درصد در گروه مسن $2/94 \pm 97/33$ و در گروه جوان $1/22 \pm 99$ بود که با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشت (شکل ۳).

در نتایج حاصل از تحرک اسپرم، مشاهده شد که تحرک کل در گروه مسن $87/40 \pm 9/75$ و در گروه جوان $80/33 \pm 7/92$ بود که اختلاف معنی داری را نشان نداد. میزان حرکت پیشروندۀ در گروه مسن $58/17 \pm 12/02$ و در گروه کترل جوان $77/2 \pm 7/19$ دیده شد که با یکدیگر اختلاف معنی داری ($P=0.013$) را

جدول ۲ بررسی لقاح آزمایشگاهی در دو گروه مسن و جوان

گروه	تعداد تخمک متافاز ۲ (MII)	تعداد دو سلولی (درصد)	تعداد بلاستوسیست (درصد)
جوان	۸۲	(۶۰/۹۷) ۵۰	(۲۶/۱۳) ۱۳
پیر	۵۲	(۶۷/۳۰) ۳۵	(۲۰/۷) ۷

بحث

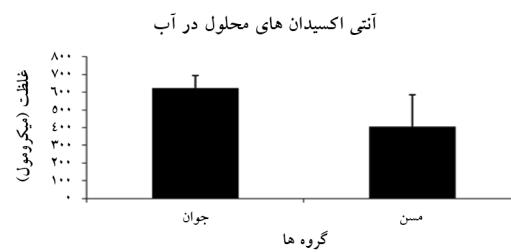
افزایش سن همواره با افزایش میزان تولید رادیکال‌های آزاد همراه بوده است و به این ترتیب می‌تواند منجر به کاهش تعداد اسپرم، اشکال طبیعی، تحرک و در نتیجه کاهش توانایی باروری اسپرم شود [۱۲]. بنابراین در این مطالعه سن به عنوان یک عامل استرس‌زا در نظر گرفته شد و بررسی تأثیرات این عامل بر پارامترهای اسپرمی مورد توجه قرار گرفت.

مطابق با مطالعه حاضر، عامل سن منجر به کاهش تعداد اسپرم شد. همانند مطالعه حاضر، مقایسه پارامترهای اسپرم بین گروه‌های مسن و جوان در مطالعه ویروبک (Wyrobek) و همکاران نیز انجام گرفت. در مطالعه این گروه از محققین نشان داده شد که پارامترهایی چون تحرک و تعداد اسپرم با افزایش سن کاهش می‌یابد [۱۳]. این در حالی است که برخی از محققین تنها کاهش تحرک اسپرم را در نتیجه افزایش سن گزارش کرده‌اند [۱۴]. بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر در گروه مسن نسبت به گروه جوان، حرکت پیشرونده سریع و حرکت پیشرونده که مجموعه حرکات سریع و آهسته بود کاهش معنی‌داری را نشان داد. در این مطالعه تحرک کل اسپرم که شامل حرکت پیشرونده سریع، پیشرونده آهسته و درجا بود، تفاوت معنی‌داری را نشان نداد؛ بنابراین به نظر می‌رسد که به دلیل تعداد زیاد حرکت درجا در گروه پیر در این پارامتر معنی‌داری از بین رفته بود.

محققین بیان کرده‌اند که وقتی رادیکال‌های آزاد و محصولات نهایی روند پرکسیداسیون لیپید در محیط افزایش می‌یابد، قدرت تحرک اسپرم‌ها به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد که علت اصلی آن اختلال در تبادلهای یونی غشا و آنزیم‌های دخیل در انجام این تبادلات یونی است. از طرف دیگر؛ رادیکال‌های آزاد به خصوص گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر باعث مهار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی درون سلولی می‌شود و اسپرم را از منابع آنزیمی دخیل در تأمین انرژی مورد نیاز برای تحرک محروم خواهد کرد [۱۵، ۱۶]. به طور کلی افزایش میزان ROS در مایع منی موجب پرکسیداسیون لیپید، آسیب به غشا و در

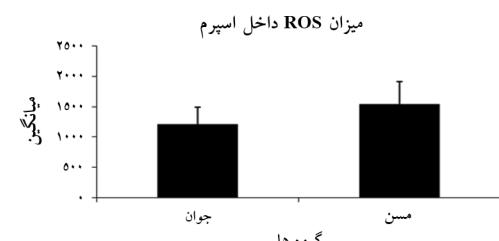
بررسی میزان ROS و میزان آنتی‌اکسیدان‌های درون سلولی در دو گروه مورد مطالعه

میزان غلظت آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب در گروه مسن $179/48 \pm 403/88$ میکرومول و در گروه جوان $623/88 \pm 70/87$ میکرومول مشاهده شد. این دو غلظت به دست آمده نیز که با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۴).



شکل ۴ بررسی غلظت آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب داخل سلول اسپرم در موش مسن و جوان: اعداد به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) بیان شده است.

نتایج میانگین بازتابش فلورسنت DCF که نشان دهنده میزان ROS درون سلولی بود نیز در گروه مسن $\pm 378/27$ و در گروه جوان $1206/35 \pm 288/42$ مشاهده شد. این اختلاف نیز از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۵). بین میانگین بازتابش فلورسنت ROS آزمون همبستگی انجام شد که در هر دو گروه مسن و جوان رابطه معنی‌دار، معکوس و کاملاً خطی بود ($P=0/000$).



شکل ۵ بررسی میزان ROS درون سلولی در اسپرم موش مسن و جوان: اعداد به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) بیان شده است.

نقش سن بر باروری موش نر مسن

با گروه جوان داشت. این نتیجه مطابق با نتایج به دست آمده در مطالعه عزیز (Aziz) و همکاران در سال ۲۰۰۴ بود. این گروه از محققین نشان دادند که میان تولید ROS در اسپرم و نسبت اسپرم‌های بد شکل ارتباط معنی‌داری وجود دارد. این اعتقاد وجود دارد که در شرایط افزایش میزان رادیکال‌های آزاد، ریزش سلول‌های اپیتلیالی منجر به ایجاد آسیب به سلول‌های سرتولی شده و پل‌های سیتوپلاسمی را متلاشی می‌کند. به این ترتیب این فرایند منجر به کاهش تعداد اسپرم و افزایش بدشکل‌های اسپرم می‌شود [۲۲]. این آثار منفی ایجاد شده بر پارامترهای اسپرم تأثیرگذار است، با این وجود در تحقیق بارورسازی اسپرم در حاضر درصد لقاح آزمایشگاهی و درصد بلاستوسیست در گروه‌های مسن و جوان با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشت. عدم وجود اختلاف معنی‌دار را می‌توان به دلیل استفاده از اسپرم‌های *Swim up* شده که از بهترین و سریع‌ترین اسپرم‌ها محسوب می‌شوند، مرتبط دانست. به این ترتیب شاید با انتخاب تصادفی اسپرم‌ها در قطره حاوی اسپرم، میزان اختلاف حقیقی بین دو گروه مسن و جوان مشخص شود. میزان غلظت آنتی‌اسیدان‌های محلول در آب و میانگین بازتابش فلورستن DCF که نشان دهنده میزان ROS درون سلولی است در گروه‌های مسن و جوان نیز با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشت؛ عدم اختلاف معنی‌دار می‌تواند به این دلیل باشد که در این تحقیق فقط آنتی‌اسیدان‌های محلول در آب بررسی شد و سایر آنتی‌اسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیم لحظه نشده بود. در این صورت این احتمال وجود دارد که محتوای سایر آنزیم‌های آنتی‌اسیدان که در این تحقیق اندازه‌گیری نشده است در دو گروه متفاوت باشد و تعادل مناسب بین میزان ROS تولید شده و محتوای آنزیم‌های آنتی‌اسیدانی دلیل بر تمامی آثار مشاهده شده در این مطالعه باشد. به این ترتیب لازم است مطالعه بیشتری روی کلیه آنزیم‌های آنتی‌اسیدانی درون اسپرم انجام گیرد. تفاوت مشاهده شده احتمالی در اندازه‌گیری سایر آنزیم‌های آنتی‌اسیدانی در

نتیجه کاهش حرکت اسپرم، غیرفعال کردن آنزیم‌های گلیکولیز، آسیب به آکروزوم و DNA می‌شود، در نتیجه اسپرم قادر به اتصال به تخمک نیست و ناباروری رخ می‌دهد. در این خصوص آنتی‌اسیدان‌ها (آنزیمی و غیر آنزیمی) در راستای حفظ هموستاز و مقابله با استرس اکسیداتیو عمل می‌کند. این مواد با ممانعت از تولید، خشی کردن آثار یا به اثر کردن فعالیت رادیکال‌های آزاد، نقش خود را ایفا می‌کند [۱۷]. علاوه بر تأثیر مستقیم ROS بر اسپرم، افزایش سن می‌تواند با تأثیر بر سایر سلول‌های دستگاه تولید مثلی نظری لایدیگ، نقش خود را ایفا کند. به این ترتیب برای مثال می‌توان اشاره داشت که افزایش شکل‌گیری لیپوفوشین نیز از جمله عواملی است که به دنبال افزایش سن رخ می‌دهد. تحقیقات نشان داده‌است که تراکم لیپوفوشین با افزایش سن در سلول‌های اپیدیدیم و لیدیگ افزایش می‌یابد [۱۸]. کائو (Cao) و همکاران نیز نشان دادند که با افزایش میزان استرس اکسیداتیو، سطح آنتی‌اسیدان‌های مهم آنزیمی و غیر آنزیمی در سلول لیدیگ نیز کاهش می‌یابد و باعث کاهش سنتز و ترشح تستوسترون می‌شود [۱۹]. از طرف دیگر؛ طی سنتز تستوسترون توسط سلول لیدیگ، به میزان زیادی ROS تولید می‌شود، بهطوری که این میزان تولید شده با مقداری میتوکندری‌های اسپرم تولید می‌کند تقریباً برابر می‌کند. ROS تولید شده را می‌توان مسئول پیری سلول‌های لیدیگ دانست. بنابراین مهار سنتز تستوسترون در واقع نشان دهنده پیری سلول لیدیگ است [۲۰]. تمامی عوامل تأثیرگذار بر سلول لیدیگ، می‌تواند منجر به اختلال در فرآیند اسپرمیوژن و به تبع آن کاهش در تعداد اسپرم‌های اپیدیدیمی شود.

در مطالعه حاضر، مشخص شد که زنده‌مانی در گروه‌های پیر و جوان با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند، اما کوبایاشی (Kobayashi) و همکاران در سال ۲۰۰۱ عنوان کردند که کاهش در میزان زنده‌مانی سلول‌ها در ارتباط با افزایش میزان ROS در محیط به صورت طبیعی رخ می‌دهد [۲۱]. در مطالعه حاضر مشخص شد که برخلاف زنده‌مانی، شکل طبیعی اسپرم در گروه مسن کاهش معنی‌داری در مقایسه

جنین‌ها مؤثر باشد. به این ترتیب لازم است تا این عامل در محیط بدن در بین دو گروه مسن و جوان نیز با یکدیگر مقایسه و بررسی شود.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته علوم تشریحی مصوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی آن دانشگاه انجام شده است. از همکاری تکنیکی آقای پور بیرانوند سپاسگزاری می‌شود.

انتخاب مؤثرباند روش‌های درمانی در موارد ناباروری به دلیل افزایش ROS می‌تواند مؤثر واقع شود. مطابق با نتایج به دست آمده در این مطالعه، پیری سبب کاهش معنی دار در تعداد، تحرک پیشرونده و شکل طبیعی اسperm می‌شود. رابطه بین اکسیدان و آنتی‌اکسیدان‌های موجود در اسperm‌های موش مسن و جوان، رابطه خطی معکوس معنی داری بود؛ به این معنی که افزایش سطح آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب با کاهش سطح اکسیدان‌ها همراه بوده است. این مطالعه نشان داد که سن موش نر نمی‌تواند بر میزان لقادح آزمایشگاهی و درصد بلاستوسیت‌های حاصل از تکوین

منابع

- [1] Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(8): 3199-207.
- [2] Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59(1): 2-11.
- [3] Aitken RJ, Curry BJ. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14(3): 367-81.
- [4] Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am* 2002; 29(4): 817-27.
- [5] Hosseinzadeh Colagar A, Karimi F, Jorsaraei SG. Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno- and oligoasthen-
- [6] Walczak-Jedrzejowska R, Wolski JK, Slowikowska-Hilczer J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent European J Urol* 2013; 66(1): 60-7.
- [7] Jervis KM, Robaire B. The effects of long-term vitamin E treatment on gene expression and oxidative stress damage in the aging Brown Norway rat epididymis. *Biol Reprod* 2004; 71(4): 1088-95.
- [8] Centola GM, Eberly S. Seasonal variations and age-related changes in human sperm count, motility, motion parameters, morphology, and white blood cell concentration. *Fertil Steril* 1999; 72(5): 803-8.
- [9] Vohra BP, Sharma SP, Kansal VK. Age-dependent variations in mitochondrial and cytosolic antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different regions of central nervous system of guinea pigs. *Indian J Biochem Biophys* 2001; 38(5): 321-6.

- [10] Liu J, Lee GY, Lawitts JA, Toner M, Biggers JD. Preservation of mouse sperm by convective drying and storing in 3-O-methyl-D-glucose. *PLoS One* 2012; 7(1): e29924.
- [11] Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239(1): 70-6.
- [12] Serra V, von Zglinicki T, Lorenz M, Saretzki G. Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. *J Biol Chem* 2003; 278(9): 6824-30.
- [13] Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Armheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, Glaser RL, Pearson FS, Evenson D. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(25): 9601-6.
- [14] Winkle T, Rosenbusch B, Gagsteiger F, Paiss T, Zoller N. The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. *J Assist Reprod Genet* 2009; 26(1): 41-6.
- [15] Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003; 79(4): 829-43.
- [16] Engel S, Schreiner T, Petzoldt R. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. *Andrologia* 1999; 31(1): 17-22.
- [17] Sheweita SA, Tilmisany AM, Al-Sawaf H. Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Curr Drug Metab* 2005; 6(5): 495-501.
- [18] Paniagua R, Amat P, Nistal M, Martin A. Ultrastructure of Leydig cells in human ageing testes. *J Anat* 1986; 146: 173-83.
- [19] Cao L, Leers-Sucheta S, Azhar S. Aging alters the functional expression of enzymatic and non-enzymatic anti-oxidant defense systems in testicular rat Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 88(1): 61-7.
- [20] Zirkin BR, Chen H. Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. *Biol Reprod* 2000; 63(4): 977-81.
- [21] Kobayashi H, Gil-Guzman E, Mahran AM, Rakesh, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwa A. Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay. *J Androl* 2001; 22(4): 568-74.
- [22] Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil Steril* 2004; 81(2): 349-54.