

The Effects of Calligonum Extract on Sperm Parameters and the Rate of Apoptosis in Aged Male Mice Testis issue

Mahsa Asgari Jahromi¹, Mansoureh Movahedin², Masoud Amanloo³, Seyed Javad Mowla⁴, Zohreh Mazaheri^{5*}, Hossein Batouli⁶

1- M.Sc., Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Associated Professor, Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacology, Tehran University, Tehran, Iran

4- Associated Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

5- Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

6- Associated Professor, Isfahan Agricultural and Natural Source Research Center, Isfahan, Iran

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

Received: 08/Jan/2013, Accepted: 23/Apr/2013

Abstract

Objective: Antioxidants are essential for sperm motility. Calligonum extract possesses the important antioxidants catechin and quercetin. This study investigates the effects of calligonum extract on sperm parameters and the rate of apoptosis in testes of aging male mice.

Methods: We initially performed a dose response test with using three doses of calligonum (10 mg/kg, 30 mg/kg and 50 mg/kg). A total of 25 aging male mice (11-13 months) were divided into the following groups of five mice each: control, sham and three experimental groups. The experimental groups received IP injections of calligonum extract (10 mg/kg, 30 mg/kg, 50 mg/kg) weekly for up to five weeks. The sham group received IP injections of DMSO. At the end of the injection period, mice were sacrificed and sperm parameters analyzed. To determine apoptosis in testes, we performed TUNEL staining.

Results: Our results showed that after calligonum treatment, there were improved sperm parameters in the 30 mg/kg-treated group compared to the other groups ($P \leq 0.05$).

Conclusion: Calligonum extract (30 mg/kg) can improve sperm parameters and decrease apoptosis in the testes of aging male mice. This herbal extract can be employed as an antioxidant component for clinical usage.

Keywords: Spermatozoa, Calligonum extract, Sperm parameters

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 1, Spring 2013, Pages: 41-54

بررسی تأثیر عصاره گیاه کالیگونوم بر پارامترهای اسپرم و میزان مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در بافت بیضه موش مسن

مهسا عسکری جهرمی^۱، منصوره موحدین^۲، مسعود امانلو^۳، سیدجواد مولی^۴، زهره مظاهری^{۵*}، حسین بتولی^۶

- ۱- کارشناس ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- استاد، گروه داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
- ۴- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۵- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۶- دانشیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان، اصفهان، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران تهران، کدپستی ۱۴۱۷۱۳۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح
Email: z_mazaheri@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۲/۰۲/۰۳

دریافت مقاله: ۹۱/۱۰/۱۸

چکیده

هدف: آنتی اکسیدان‌ها از عناصر ضروری، برای حرکت اسپرم است. عصاره گیاه کالیگونوم دارای آنتی اکسیدان‌های مهمی چون کاتچین و کرسستین است. هدف این مطالعه بررسی آثار عصاره گیاه کالیگونوم بر پارامترهای اسپرم و میزان مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در بافت بیضه موش مسن است.

مواد و روش‌ها: عصاره گیاه کالیگونوم در سه دوز ۱۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم به موش‌های نر NMRI ۱۱-۱۳ ماهه تزریق شد. در این مطالعه ۲۵ سر موش به پنج گروه شامل کنترل، شم و سه گروه آزمون تقسیم شدند. گروه‌های آزمون دوز ۱۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم از عصاره گیاه را به مدت ۵ هفته و به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه شم نیز حلال دی متیل سولفوکسید را به شکل داخل صفاقی دریافت کرد. یک هفته پس از اتمام تزریقات و پس از جداسازی اپیدیدیم، پارامترهای اسپرم در گروه‌ها بررسی شد. در هر موش یکی از بیضه‌ها برای انجام پاساژ بافتی و رنگ‌آمیزی تانل در تثبیت کننده بوئن قرار داده شد.

نتایج: پارامترهای اسپرم شامل تحرک، میزان بقا و ریخت‌شناسی طبیعی اسپرم در گروه تیمار شده با دوز ۳۰ میلی گرم در کیلوگرم نسبت به سایر گروه به صورت معنی‌دار بهبود پیدا کرد ($P \leq 0/05$). همچنین رنگ‌آمیزی تانل و شمارش تعداد سلول‌های دچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در بافت بیضه هریک از گروه‌های مورد مطالعه، نشان دهنده کاهش معنی‌دار این پارامتر در گروه تیمار شده با دوز ۳۰ میلی گرم در کیلوگرم نسبت به سایر گروه‌ها بود ($P \leq 0/05$).
نتیجه‌گیری: دوز ۳۰ میلی گرم در کیلوگرم از عصاره گیاه کالیگونوم منجر به بهبود کیفیت اسپرم و کاهش میزان مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌های بافت بیضه می‌شود.

کلیدواژگان: سلول اسپرم، عصاره گیاه کالیگونوم، پارامترهای اسپرم

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲، صفحات: ۴۱-۵۴

رادیكال‌های آزاد (مثل: هیدروكسيل، سوپرااكسيد، نيتريك اسيد و ليپيد پروكسيل) اتم يا مولكول‌هایی است كه به خاطر داشتن الكترون آزاد دائماً در بدن موجودات زنده در گردش بوده و به دليل قابليت واكنش‌پذيري بالاي خود، آسیب‌هایی را به ماکرومولكول‌های بدن وارد می‌کند [۱].

رادیكال‌های آزاد می‌تواند تا حدود زیادی بر اسپرم تأثیر بگذارد. باروری اسپرم به پارامترهای مختلفی چون تعداد، تحرک و ریخت‌شناسی (Morphology) اسپرم بستگی دارد و بنا بر مطالعات صورت گرفته این پارامترها تا حد زیادی نسبت به رادیكال‌های آزاد آسیب‌پذیر است [۲، ۳]. در مطالعه وایسیگر (Weisiger) و همکارانش آسیب اكسیداتیو DNA در اسپرم افراد بارور و نابارور مقایسه شد. این مطالعه نشان داد كه آسیب اكسیداتیو مردان نابارور ۱۰۰ برابر بیشتر از مردان بارور است [۴]. در حالت عادی بین تولید رادیكال‌های آزاد در بدن و اجزای سیستم دفاع آنتی‌اكسیدانی تعادل برقرار است. اما مواجهه با عواملی چون داروها و سموم و آلاینده‌های محیطی سبب افزایش تولید رادیكال‌های آزاد در بدن و عدم تعادل بین تولید رادیكال‌ها و اجزای سیستم دفاع آنتی اكسیدانی شده است و حالتی به نام استرس اكسیداتیو به وجود می‌آید كه منجر به آسیب بافتی می‌شود [۵]. استرس اكسیداتیو منجر به پروكسیداسیون لیپیدی (Lipid Peroxidation) در غشای اسپرم می‌شود. واكنش بعدی آن کاهش حرکت اسپرم و کاهش کیفیت سلولی است كه منجر به کاهش اسپرم‌های بادوام می‌شود [۶].

تحقیقات نشان می‌دهد افزایش ناباروری در مردان ارتباط نزدیکی با کاهش مصرف مواد آنتی اكسیدانی در آنها دارد و مصرف این مواد به درمان ناباروری در مردان كمك می‌کند [۷]. بنابراین مصرف مواد حاوی آنتی اكسیدان نظیر ویتامین C، ویتامین E، ویتامین A، سولفات روی و سلنیوم در بالا بردن قدرت باروری مردان برای تولید مثل تأثیر بسیار زیادی دارد [۸]. بدن در مقابل استرس اكسیداتیو از سیستم‌های دفاع آنتی

تأثیر عصاره كالیگونوم بر پارامترهای اسپرم

اكسیدانی خود استفاده می‌کند. سیستم‌های دفاع آنتی اكسیدانی به دو گروه آنزیمی و غیر آنزیمی تقسیم می‌شود. این سیستم با جلوگیری از تشکیل رادیكال آزاد، ترمیم صدمات ناشی از فعالیت رادیكال‌ها، افزایش دفاع مولكول‌های صدمه دیده و به حداقل رسانیدن جهش سلولی با آسیب‌های رادیكال‌های آزاد مقابله می‌کند [۹].

از جمله سیستم دفاع آنتی اكسیدانی آنزیمی می‌توان به آنزیم‌هایی چون سوپر اكسید دیسموتاز (Superoxide Dismutase)، گلوتاتیون پروكسیداز (Glutathione Peroxidase) و کاتالاز (Catalase) اشاره کرد و از جمله سیستم‌های دفاع آنتی اكسیدانی غیر آنزیمی می‌توان به ویتامین E، کاروتنوئیدها، اسید آسکوربیک و غیره اشاره کرد [۷]. در بررسی‌های صورت گرفته تعداد اندکی از آنزیم‌های آنتی اكسیدانی مؤثر بر ROS (Reactive Oxygen Species) و دیگر رادیكال‌های آزاد در اسپرم شناخته شده‌است [۷]. تعداد زیادی آنتی اكسیدان‌های پاک‌کننده رادیكال‌های آزاد در بدن وجود دارد كه بخشی از آنها از منابع غذایی مثلاً میوه‌ها و سبزی‌ها و نوشیدنی‌هایی نظیر چای مشتق می‌شود. از جمله مهم‌ترین آنتی اكسیدان‌هایی كه در چای وجود دارند عبارتست از: ویتامین C، بتاکاروتن (Beta Carotene)، تانن‌ها (Tannin)، اپی‌گالوکاتچین (Epigallocatechin) و اپی‌گالوکاتچین گالات (Epigallocatechin Gallate). مطالعات قبلی نشان داده‌است كه یک‌سری از این مواد با خاصیت آنتی اكسیدانی در بعضی از گیاهان دارویی یافت می‌شود [۹-۱۱].

گیاه اسكنبیل (كالیگونوم: Calligonum) درختچه‌ای سازگار با شرایط بیابان و با دامنه انتشار بسیار گسترده است به طوری كه در اغلب شن‌زارهای مرکزی ایران رشد می‌کند. اسكنبیل متعلق به خانواده علف هفت بند (Polygonaceae) دارای تنه‌ای منشعب، یا غیر منشعب، سفید رنگ، ساقه ایستا و افراشته است كه برگ‌هایش اغلب حالت آوین به خود می‌گیرند. این گیاه دارای آنتی اكسیدان‌های مهمی از جمله كاتچین (Catechin)، اپی‌گالوکاتچین گالات و كرسین (Croctin) است. با توجه به مطالعات انجام شده و تلاش برای جایگزینی

آنتی اکسیدان‌های مصنوعی با آنتی اکسیدان‌های طبیعی و تأکید طب سنتی بر استفاده از گیاهان برای درمان ناتوانی‌های جنسی، در پژوهش حاضر اثر عصاره گیاه کالیگونوم بر بهبود کیفیت پارامترهای اسپرم و میزان قطعه قطعه شدن DNA بررسی شد.

مواد و روش‌ها

گروه‌بندی حیوانات

در این مطالعه ۱۵ سر موش سوری نر نژاد NMRI، ۱۱-۱۳ ماهه، در سه گروه قرار گرفتند و عصاره گیاه کالیگونوم با دوزهای ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم، ۳۰ میلی گرم در کیلوگرم و ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم به شکل داخل صفاقی به آن‌ها تزریق شد. علاوه بر این ۵ سر موش در گروه کنترل و ۵ سر موش در گروه شم در نظر گرفته شدند. موش‌ها در حیوانخانه دانشگاه تربیت مدرس در شرایط ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی و روشنایی و با شرایط مناسب آب و غذایی طبق قوانین کار با حیوانات آزمایشگاهی نگهداری شدند.

آماده‌سازی عصاره گیاه کالیگونوم

در این تحقیق از عصاره اتانولی گیاه کالیگونوم به منظور تأثیر بر پارامترهای اسپرمی استفاده شد. طبق آزمایش‌ها و تحقیقات انجام گرفته [۱۲] دی متیل سولفوکسید (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) به عنوان حلال مناسب این عصاره انتخاب شد.

ارزیابی تأثیرات عصاره گیاه کالیگونوم بر

پارامترهای اسپرم

برای بررسی پارامترهای اسپرم، در هنگام نمونه‌گیری دم اپیدیدیم (Epididym) جدا شد و در یک میلی‌لیتر محلول PBS (Phosphate Buffered Saline) قرار گرفت. سپس اپیدیدیم توسط یک قیچی استریل قطعه قطعه شده و به مدت

۲۰-۳۰ دقیقه برای ظرفیت‌پذیری اسپرم‌ها و خروج آن‌ها از داخل قطعات خرد شده، در انکوباتور قرار گرفت. پس از خارج کردن نمونه‌ها از انکوباتور، تجزیه و تحلیل اسپرم طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (WHO) انجام شد و در تمام گروه‌ها داده‌ها اندازه‌گیری و ثبت شد.

اسپرم‌ها به کمک لام هموسیتمومتر نئوبار (Hemocytometer Neubauer) شمارش شدند و برای تعیین میزان تحرک اسپرم، ابتدا درصد اسپرم‌های متحرک در ۵ میدان دید مشخص شد و سپس میانگین آن به عنوان درصد اسپرم متحرک ثبت شد.

برای شناسایی اسپرم‌های زنده از رنگ‌آمیزی فوق حیاتی استفاده شد. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم با ۱۰ میکرولیتر از رنگ ائوزین نکروزین (Eosin Nigrosin) مخلوط شد و سپس یک قطره ۱۰ لاندایی از مایع مذکور روی لام قرار گرفت و پس از ده دقیقه اسپرم‌ها به کمک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $\times 400$ مطالعه شدند. در این نوع رنگ‌آمیزی سر اسپرم‌های مرده به دلیل نقص در غشای خود ائوزین را جذب کرده و به رنگ قرمز دیده می‌شود. در حالی که اسپرم‌های زنده بی‌رنگ بوده و رنگ ائوزین را به خود جذب نمی‌کنند. برای اندازه‌گیری درصد اسپرم‌های زنده، در ۵ میدان دید تعداد اسپرم‌های زنده و مرده مطالعه و درصد اسپرم‌های زنده محاسبه شد.

در این مطالعه برای بررسی شکل اسپرم، اسپرم‌ها با رنگ دیفکوییک (Diff-Quik) رنگ‌آمیزی شدند. اسپرم‌های طبیعی در ناحیه سر گردن و دم هیچ مشکلی ندارند. درحالی که اسپرم غیر طبیعی با دم پیچ خورده سر ماکروسفال (Macrocephal)، میکروسفال (Microcephal)، اسپرم دو سر یا اسپرم بدون سر مشخص می‌شود. برای تعیین میزان اسپرم‌های طبیعی از نظر شکل، ۵ میدان دید میکروسکوپی در نظر گرفته شد و اسپرم‌های طبیعی و غیر طبیعی شمارش شدند و سپس درصد اسپرم‌های طبیعی از نظر ریخت‌شناسی محاسبه شد. نحوه رنگ‌آمیزی اسپرم در این مطالعه مطابق روش زیر بود:

فلورسنت مشاهده شد. برای شمارش سلول‌های مرده ۵ مقطع مجرای اسپرم‌ساز در هر گروه مورد مطالعه قرار گرفت. سلول‌های اسپرماتوگونی (Spermatogonia Cells) در بخش پایه مجاری اسپرم‌ساز شمارش شدند و سطوح یکسانی در گروه‌ها معادل ۱ میلی‌متر مربع در هر گروه برای شمارش سلول‌های دچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده بررسی شد. در این پروتکل برای رنگ‌آمیزی نمونه‌های کنترل مثبت از هر دو محلول TUNEL-Enzyme solution و TUNEL-Lable solution به نسبت ۱ به ۹ استفاده شد. در حالی که برای نمونه‌های کنترل منفی تنها از TUNEL-Lable solution استفاده شد. برای نمونه کنترل مثبت از بافت تیموس استفاده شد. به علت ازدیاد سلول‌های دچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در این بافت، نقطه‌های روشن زیادی در این بافت مشاهده می‌شود که نمایانگر سلول‌های دچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده نشان‌دار شده طی رنگ‌آمیزی تانل است (شکل ۱).

تجزیه و تحلیل اطلاعات

ارزیابی آماری داده‌ها با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس (Analysis of Variance: ANOVA) و آزمون تکمیلی Tukey Post Hock انجام شد. در انجام آزمون‌های آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. کلیه اطلاعات ارائه شده برحسب میانگین $\pm$ انحراف استاندارد (Mean $\pm$ SEM) است. میزان $P \leq 0/05$ معنی‌دار محسوب شد.

نتایج

نتایج ارزیابی تأثیرات عصاره گیاه کالیگونوم بر

پارامترهای اسپرم

نتایج حاصل از بررسی بافت بیضه تفاوت قابل ملاحظه‌ای را از نظر واکوئل‌های موجود در بافت بین گروه‌های تیمار شده و کنترل مسن نشان نداد (شکل ۲).

رنگ‌آمیزی Diff-Quick برای بررسی ریخت‌شناسی

اسپرم

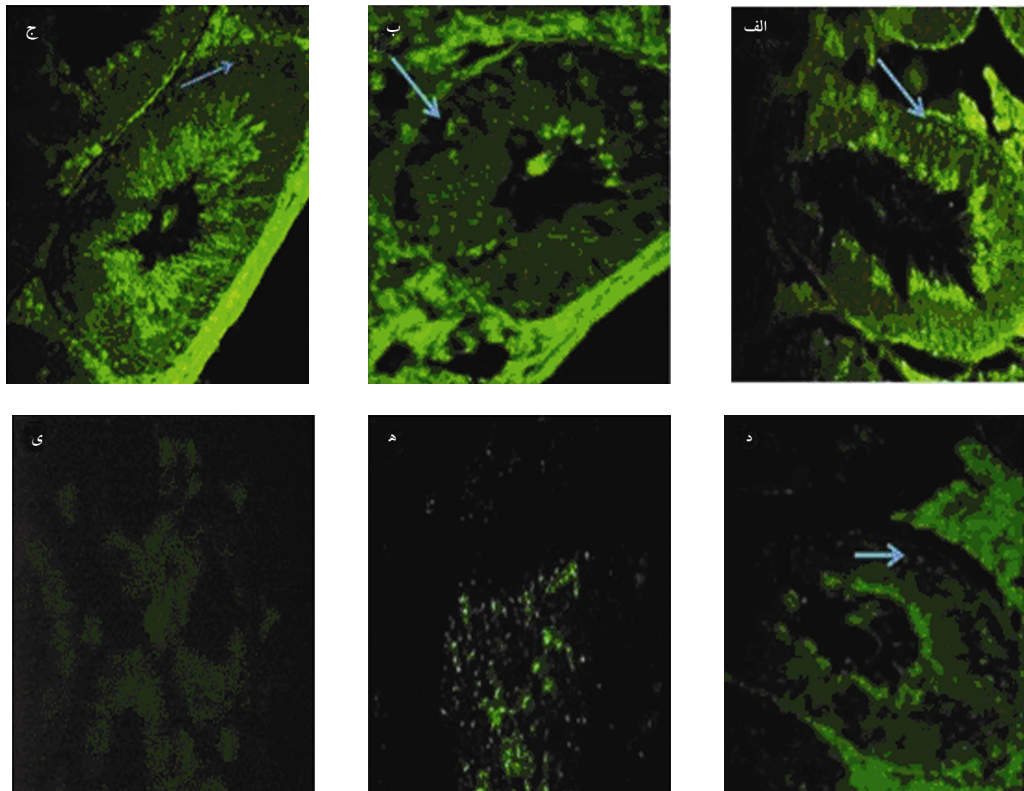
مراحل انجام رنگ‌آمیزی دیف‌کوئیک شامل تهیه اسپرم از نمونه، خشک کردن در انکوباتور ۸۷ درجه سانتی‌گراد، تثبیت نمودن در الکل اتانول ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰-۳۵ ثانیه، رنگ‌آمیزی با محلول آماده Diff-Quick به مدت ۳۵-۴۰ ثانیه و در نهایت شستشو در آب بود. اسپرم‌هایی با هسته پررنگ، سر داسی شکل و دم صاف به عنوان اسپرم طبیعی تلقی شدند.

ارزیابی تأثیر عصاره گیاه کالیگونوم بر میزان

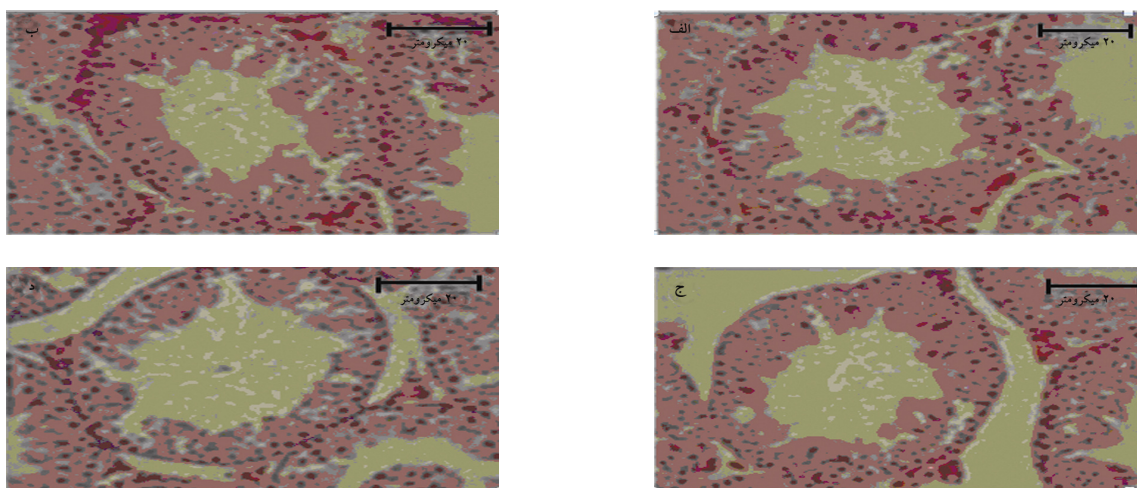
مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده اسپرم

در این مطالعه برای اندازه‌گیری تعداد اسپرم‌های دچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) در مجاری اسپرم‌ساز، از رنگ‌آمیزی تانل (TUNEL) استفاده شد. قطعه قطعه شدن DNA، فرآیند غیر قابل برگشتی است که حتی قبل از این که تغییراتی در نفوذپذیری غشاء روی دهد، صورت می‌گیرد. آنزیم آندونوکلاز هسته‌ای به طور انتخابی DNA را در بین واحدهای نوکلئوزومی می‌شکند. این جایگاه شکست از طریق آنزیم موجود در رنگ‌آمیزی تانل نشان‌دار می‌شود و مورد بررسی قرار می‌گیرد. در این تحقیق رنگ‌آمیزی بافت بیضه به کمک روش Roche انجام شد.

در این روش پس از پارافین‌زدایی، نمونه‌های بافت بیضه به مدت ۱۰ دقیقه در گزیرلول قرار گرفتند. سپس لام‌ها به ترتیب در الکل‌های ۹۰، ۸۰ و ۷۰ آب‌دهی شد. پس از آن، لام‌ها با استفاده از محلول PBS شسته و سپس در پروتئیناز k به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در ادامه لام‌های بافتی مورد نظر به مدت ۱۰ دقیقه با محلول نفوذ پذیرکننده انکوبه و سپس مجدداً با PBS شستشو داده شد. در مرحله بعد، محلول رنگ تانل به میزان ۵۰ میکرولیتر روی هر نمونه بافتی ریخته شد و مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و پس از شستشوی نهایی با میکروسکوپ



شکل ۱ مقاطع بافت بیضه در دوزهای مختلف پس از ۵ هفته از تزریق عصاره گیاه کالیگونوم در موش مسن؛ (الف) دوز ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم، (ب) دوز ۳۰ میلی گرم در کیلوگرم، (ج) دوز ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم، (د) کنترل مسن، (ه) کنترل مثبت (بافت تیموس)، (ی) کنترل منفی. فلش آبی رنگ نمایانگر سلول‌های اسپرماتوگونیای دچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است (رنگ آمیزی تانل).



شکل ۲ مقاطع بافت بیضه در دوزهای مختلف پس از ۵ هفته از تزریق عصاره گیاه کالیگونوم در موش مسن؛ (الف) دوز ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم، (ب) دوز ۳۰ میلی گرم در کیلوگرم، (ج) دوز ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم، (د) گروه کنترل (رنگ آمیزی: هماتوکسیلین و اتوزین، بزرگنمایی: $\times 400$)

تأثیر عصاره کالیگونوم بر پارامترهای اسپرم

در میان همه گروه‌های مورد مطالعه کمترین میزان تحرک اسپرم در دوز ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مشاهده شد در حالی که بالاترین میزان تحرک در دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بود (جدول ۱). بنابراین به نظر می‌رسد که دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بهترین تأثیر را بر پارامتر تحرک اسپرم در بین سایر دوزهای مورد مطالعه داشته است.

در دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره کالیگونوم بیشترین میزان بقای اسپرم مشاهده شد که به صورت معنی‌داری ($P \leq 0/05$) بیشتر از گروه کنترل بود. تجویز دوزهای ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم منجر به کاهش میزان بقای اسپرم شد ولی با میزان بقا در گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت؛ اما میزان بقا در این گروه‌ها با گروه تیمار شده با دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم معنی‌دار بود ($P \leq 0/05$).

با توجه به جدول ۱، میانگین تعداد اسپرم بر حسب میلیون در گروه کنترل مسن $0/29 \pm 4/11$ بوده است. در حالی که پس از تجویز دوزهای مختلف از عصاره گیاه کالیگونوم تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. پس به نظر می‌رسد که استفاده از دوزهای مختلف این گیاه روی تعداد اسپرم‌ها تأثیر چندانی نداشته است؛ هرچند که استفاده از دوز ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم منجر به کاهش تعداد اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل شد، اما این کاهش معنی‌دار نبود. طبق جدول ۱ درصد ریخت‌شناسی طبیعی اسپرم در تمامی گروه‌های آزمایش نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت ($P \leq 0/05$). افزایش تعداد اسپرم‌های دارای شکل طبیعی در گروه تیمار شده با دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نسبت به گروه کنترل در مقایسه با سایر دوزها بیشتر بود.

جدول ۱ بررسی تأثیر دوزهای مختلف عصاره گیاه کالیگونوم بر پارامترهای اسپرم موش مسن

گروه	تعداد اسپرم بر حسب میلیون ($\bar{x} \pm 10^6$)	درصد تحرک $\pm$ انحراف معیار	درصد زنده ماندن $\pm$ انحراف معیار	درصد ریخت‌شناسی طبیعی $\pm$ انحراف معیار
کنترل مسن	$4/11 \pm 0/29$	$60/70 \pm 2/16$	$58/68 \pm 1/44$ ▲	$56/81 \pm 3/11$
شم	$4/3 \pm 0/30$	$58/7 \pm 3/2$	$58/63 \pm 2/94$ ▲	$58/63 \pm 2/94$
دوز ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم	$3/92 \pm 0/94$	$55/30 \pm 1/51$ ▲#	$52/54 \pm 2/44$ ▲	$65/36 \pm 1/56$ *
دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم	$4/5 \pm 0/25$ **	$69/78 \pm 0/96$ ▲#	$69/46 \pm 1/54$	$68/34 \pm 1/56$ *
دوز ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم	$3/9 \pm 0/21$	$65/94 \pm 0/95$ ▲#	$56/72 \pm 1/04$ ▲	$64/30 \pm 1/58$ *

*: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل مسن در همان ستون ($P \leq 0/05$)

تفاوت معنی‌دار با گروه شم در همان ستون ($P \leq 0/05$)

● تفاوت معنی‌دار با دوز ۱۰ در همان ستون ($P \leq 0/05$)

▲ تفاوت معنی‌دار با دوز ۳۰ در همان ستون ($P \leq 0/05$)

■ تفاوت معنی‌دار با دوز ۵۰ در همان ستون ($P \leq 0/05$)

نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SEM) ارائه شده است.

نتایج ارزیابی تأثیر عصاره گیاه کالیگونوم بر

میزان قطعه قطعه شدن DNA اسپرم

میانگین تعداد سلول‌های دچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده نشان داد که کمترین میزان مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در گروه تیمار شده با دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره گیاه

کالیگونوم وجود دارد و کاهش میزان مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در این گروه (۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) نسبت به گروه کنترل مسن و سایر گروه‌ها (دوز ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) معنی‌دار بود ($P \leq 0/05$). بیشترین میزان سلول‌های دچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در دوز ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مشاهده شد اما در مقایسه با گروه کنترل مسن معنی‌دار

نمود (جدول ۲). پس می‌توان گفت که دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نسبت به سایر دوزهای مورد مطالعه تأثیر بیشتری بر کاهش روند مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌های اسپرماتوگونیای بافت بیضه دارد. در مجموع نتایج نشان داد که دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم دوز مناسب و تأثیرگذار بر برخی از پارامترهای اسپرم موش مسن است.

جدول ۲. بررسی تأثیر دوزهای مختلف عصاره گیاه کالیگونوم بر میزان مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در مجاری اسپرم‌ساز

گروه‌های مورد مطالعه	میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونیای چهار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در هر مجرای اسپرم‌ساز در یک میلی‌متر مربع از هر لوله $\pm$ انحراف معیار
دوز ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم	23 ± 0.63
دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم	$14.2 \pm 2^{**}$
دوز ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم	$20 \pm 0.64^{*}$
کنترل مسن	25 ± 2.5

*: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل مسن ($P \leq 0.05$).

تفاوت معنی‌دار با سایر دوزهای مورد مطالعه ($P \leq 0.05$).

نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SEM) ارائه شده است.

بحث

کیلوگرم، دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم و دوز ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بود که پس از تجزیه و تحلیل پارامترهای اسپرم، دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به عنوان دوز بهینه شناخته شد. مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر نقش گیاهان دارای خاصیت آنتی اکسیدانی را در بهبود کیفیت پارامترهای اسپرم مشخص ساخته است [۹-۱۱]، هرچند که در رابطه با آثار گیاه کالیگونوم گزارشی مشاهده نشد. به طور کلی افزایش میزان ROS در مایع منی موجب پروکسیداسیون لیپید، آسیب غشایی و در نتیجه کاهش حرکت اسپرم، غیر فعال‌سازی آنزیم‌های گلیکولیز، آسیب به غشای آکروزوم (Acrosomal Membrane) و اکسیداسیون DNA می‌شود. به همین دلیل اسپرم قادر به بارور کردن تخمک نبوده و ناباروری رخ می‌دهد. مولکول‌هایی به نام آنتی اکسیدان (آنزیمی و غیر آنزیمی) برای حفظ هموستاز اکسیداتیو (Oxidative Homeostasis) و مقابله با استرس اکسیداتیو وجود دارد. این مولکول‌ها یا مانع تولید ROS می‌شود یا آن‌ها را خنثی می‌کند یا اعمال آن‌ها را بی اثر می‌سازد [۱]. وجود آنزیم‌های آنتی اکسیدانی چون سوپر اکسید دیسموتاز کاتالاز و گلوکاتایون پروکسیداز در اسپرم به اثبات رسیده است. علاوه بر آن؛ مولکول‌های غیر آنزیمی آنتی

باروری اسپرم به پارامترهای مختلفی چون تعداد، تحرک و ریخت‌شناسی آن بستگی دارد و بنا بر مطالعات صورت گرفته پارامترهای مذکور تا حد قابل توجهی نسبت به رادیکال‌های آزاد آسیب‌پذیرند [۷]. بنابراین با توجه به برخی ناباروری‌های موجود به دلیل بالا بودن سن در برخی زوجین، به نظر می‌رسد که استفاده از یک آنتی اکسیدان با منشأ گیاهی که بتواند بدون ایجاد آثار جانبی، تأثیرات تقویت کننده‌ای داشته باشد ضروری است. امروزه مشخص شده است که بسیاری از گیاهان دارای خواص آنتی اکسیدانی هستند. از جمله این گیاهان، گیاهی از راسته علف هفت‌بند به نام کالیگونوم است. این گیاه در تحقیق حاضر به عنوان یک عامل آنتی اکسیدانی در راستای بهبود عامل استرس‌زای سن استفاده شد و نتایج حاصل نشان داد که کالیگونوم منجر به کاهش آثار نامطلوب استرس ناشی از افزایش سن بر پارامترهای اسپرمی می‌شود.

در این تحقیق ۵ هفته پس از تزریق عصاره گیاه، پارامترهای اسپرم در گروه‌های تیمار شده مقایسه و بررسی شد. دوزهای مورد استفاده در این تحقیق شامل دوز ۱۰ میلی‌گرم در

تأثیر عصاره کالیگونوم بر پارامترهای اسپرم

[۱۶]. آلکان (Alkan) و همکاران نیز نشان دادند که فعالیت این آنزیم آنتی اکسیدانی (گلوکاتیون پروکسیداز) در افراد نابارور کمتر از افراد بارور است [۱۴]. داندکار (Dandekar) و همکاران ثابت کردند که فعالیت گلوکاتیون پروکسیداز ارتباط مثبتی با نمونه‌های اولیگواسستوزوتراتوزواسپرمیک (-Oligo astheno-teratozoospermia) دارد و میزان پروکسیداسیون لیپید در این نمونه‌ها بالاست. این نتایج بیانگر آن است که فعالیت بالای آنزیم گلوکاتیون پروکسیداز در نمونه‌های بیماری‌شناختی (Pathologic) ممکن است ROS را کاتالیز کرده و منجر به افزایش حرکت اسپرم شود و در قدرت باروری آن تأثیرگذار باشد [۱۷].

در گزارش‌های زیادی عنوان شده است که قدرت تحرک اسپرم‌ها در زمان افزایش رادیکال‌های آزاد و محصولات نهایی روند پروکسیداسیون چربی در محیط به طور معنی‌داری دچار افت شده و علت اصلی آن ایجاد اختلال در فرآیندهای تبادل یونی غشاء و آنزیم‌های دخیل در اجرای آن‌ها است [۱۷-۱۹]. از سوی دیگر، رادیکال‌های آزاد به ویژه انواع اکسیژن فعال موجب مهار آنزیم‌های درون سلولی شده و بدین ترتیب اسپرم‌ها از منابع آنزیمی دخیل در تأمین ATP مورد نیاز برای تحرک محروم خواهند بود [۱۸، ۱۹].

همچنین مشخص شده است که روند پروکسیداسیون لیپید با افزایش پیوندهای دوگانه در غشای سلول‌ها موجب آسیب و ناپایداری آن شده و بدین ترتیب ضمن برهم ریختن ساختار غشاء موجب غیر فعال شدن آن می‌شود [۲۰].

در تحقیق حاضر تأثیر عصاره گیاه کالیگونوم بر پارامترهای اسپرم موش مسن نشان دهنده تفاوت معنی‌دار پارامترهای تحرک، ریخت‌شناسی طبیعی اسپرم و میزان بقا در دوز ۳۰ میلی گرم در کیلوگرم نسبت به دوز ۱۰ و ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم بود.

همانند مطالعه حاضر، استفاده از آنتی اکسیدان‌های موجود در آب انار منجر به افزایش تحرک اسپرم در گروه آزمون نسبت به گروه کنترل شد [۲۱]. اما بر خلاف مطالعه حاضر آنتی اکسیدان‌های موجود در انار، تعداد اسپرم‌ها را در گروه

اکسیدان شامل ویتامین C و E، پیرووات گلوکاتیون، کارنیتین (Carnitine)، N-استیل، L-سیستین، کاروتنوئیدها، کوآنزیم Q10 و ... نیز در مایع منی وجود دارد. در اسپرم فعالیت بالای Cu/Zn سوپراکسید دیسموتاز به اثبات رسیده و مطالعات زیادی در رابطه با نقش آن به عنوان آنتی اکسیدان در زیست‌شناسی تولید مثل صورت گرفته است. این آنزیم با جلوگیری از پروکسیداسیون لیپیدی غشای اسپرم، موجب کاهش تولید مالون دی آلدئید (Malondialdehyde) و در نهایت افزایش حرکت اسپرم می‌شود. کاتالاز نیز در برابر آثار سمی ناشی از پراکسید هیدروژن از اسپرم محافظت می‌کند. کاتالاز، پراکسید هیدروژن تولید شده توسط سوپر اکسید دیسموتاز را تجزیه کرده و مانع تشکیل رادیکال‌های فوق‌العاده سمی هیدروکسیل می‌شود. بدین ترتیب قادر است از اسپرم در برابر آثار مضر ناشی از این رادیکال آزاد حفاظت نماید [۴]. مطالعات نشان داده‌اند که فلاونوئید (Flavonoids) و کاتچین از طریق واکنش با آنزیم گلوکاتیون پروکسیداز عملکرد آنتی اکسیدانی خود را انجام می‌دهد [۱۳].

این آنزیم نیز مانند سوپر اکسید دیسموتاز با ممانعت از پروکسیداسیون لیپید غشای اسپرم و در نهایت از طریق بهبود حرکت اسپرم بر عملکرد اسپرم تأثیر می‌گذارد. گلوکاتیون پروکسیداز نقش مهمی را در روند بلوغ اسپرم از زمان تولید تا زمان ظرفیت‌پذیری بازی می‌کند [۱۴].

هال (Hall) و همکاران نشان دادند که عدم وجود گلوکاتیون پروکسیداز ممکن است منجر به کاهش ظرفیت و توان باروری شود [۱۵]. مطالعات دیگری نیز نشان داد که مهار فعالیت گلوکاتیون پروکسیداز منجر به تولید پراکسید در غشاء و کروماتین شده در نتیجه شکاف در DNA اسپرم ایجاد می‌شود [۱۶]. بعضی از مطالعات افزایش میزان گلوکاتیون پروکسیداز را در نتیجه استفاده از آنتی اکسیدان‌های کاتچین و فلاونوئید نشان دادند که نتیجه نهایی این فرایند افزایش میزان اسپرم‌های متحرک است [۱۳].

گیانائاسیو (Giannattasio) و همکاران نیز ثابت کردند که فعالیت این آنزیم در افراد بارور ده برابر افراد نابارور است

آزمون بهبود بخشید. در مطالعه دیگری نیز استفاده از عصاره پیاز منجر به افزایش تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت I و II (Spermatocyte) در گروه آزمون نسبت به گروه کنترل شد [۲۲]. بررسی تأثیر عصاره گیاه شاه تره نیز افزایش معنی‌داری را در سلول‌های اسپرماتوگونی (Spermatogonia)، سلول‌های اسپرماتوسیت، اسپرماتوزوئید (Spermatozoid) و لایدیگ (Leydig Cells) نشان داد [۱۰].

همانند مطالعه حاضر که سن به عنوان یک عامل استرس‌زا مد نظر قرار گرفت، در سال ۲۰۰۸ محمدی و همکارانش نیز تأثیر آنتی اکسیدان سلنیوم بر استرس اکسیداتیو ایجاد شده در نتیجه افزایش سن را بررسی کردند و نشان دادند که پارامترهای تحرک و ریخت‌شناسی طبیعی اسپرم در گروه‌های استفاده کننده از آنتی اکسیدان افزایش می‌یابد [۲۳].

در سال ۲۰۱۰ داروی سیکلوفسفامید (Cyclophosphamide) برای القای استرس سلولی استفاده و تأثیر آنتی اکسیدان گیاه جینسینگ (Ginseng) برای غلبه بر این استرس سلولی بررسی شد. همانند مطالعه حاضر آنتی اکسیدان‌های موجود در گیاه استفاده شده توانست میزان اسپرم‌های دارای ریخت‌شناسی غیرطبیعی را کاهش دهد [۱۰]. همچنین پروکسیداسیون لیپیدی ایجاد شده در نتیجه استرس سلولی القا شده توسط کادمیوم (Cadmium)، در نتیجه استفاده از آنتی اکسیدان‌های موجود در عصاره چای سبز کاهش یافت [۲۴].

تأثیر عصاره چای سبز بر بیماری‌های القا شده توسط دوکسوروبیسین (Doxorubicin) نشان دهنده تأثیرات مثبت آنتی اکسیدان‌های موجود در این گیاه بر پارامترهای غلظت و حرکت اسپرم در گروه آزمون بود [۲۵].

تاکنون مطالعات مختلفی با استفاده از عصاره گیاهان برای ارزیابی پارامترهای اسپرمی انجام شده که پس از استفاده از عصاره گیاهان دارای ترکیبات آنتی اکسیدانی بهبود پارامترهای اسپرمی و سطح کاهش یافته رادیکال‌های آزاد مشاهده شده است [۹-۱۱].

در مطالعه حاضر، نتایج بررسی تعداد اسپرم نشان دهنده

کاهش تعداد اسپرم‌ها در دوز ۱۰ و ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم نسبت به گروه کنترل مسن بود اما این کاهش معنی‌دار نبود. با این حال مطالعات کائو (Cao) و همکاران نشان داد که با افزایش میزان استرس اکسیداتیو سطح آنتی اکسیدان‌های مهم آنزیمی و غیر آنزیمی در سلول لایدیگ کاهش می‌یابد و باعث کاهش سنتز و ترشح تستوسترون (Testosterone) می‌شود و عامل مؤثری برای اختلال در فرآیند اسپرمیوزن (Spermiogenesis) و در نتیجه کاهش تعداد اسپرم‌های اپیدیدیمی است [۲۶].

بررسی درصد ریخت‌شناسی طبیعی افزایش معنی‌داری را در هر ۳ دوز استفاده شده نسبت به گروه کنترل مسن نشان داد. مطالعه دیگری نشان داد که میان تولید ROS در اسپرم و نسبت اسپرم‌های بد شکل ارتباط معنی‌داری وجود دارد [۲۷]. داده‌های حاصل از این پژوهش نیز افزایش تعداد اسپرم‌های بدشکل و مرده را در گروه کنترل نسبت به گروه‌های آزمون تأیید می‌کند.

محققین معتقدند در شرایط افزایش میزان رادیکال‌های آزاد، ریزش سلول‌های بافت پوششی منجر به ایجاد آسیب سلول‌های سرتولی (Sertoli Cells) و متلاشی شدن پل‌های سیتوپلاسمی و در نتیجه کاهش تعداد اسپرم و افزایش بدشکلی اسپرم می‌شود [۲۷].

در تحقیق حاضر، میزان زنده ماندن اسپرم‌ها از طریق بررسی میزان نفوذپذیری غشاء به رنگ اتوزین بررسی شد و مشاهده شد که پس از مصرف آنتی اکسیدان، میزان بقای اسپرم افزایش می‌یابد. شاید علت این اتفاق کاهش ROS در محیط باشد زیرا کوبایلش (Kobaylish) و همکاران در سال ۲۰۰۱ عنوان کردند که کاهش مستمر در تعداد سلول‌های زنده و فعال در ارتباط با افزایش میزان ROS در محیط است [۲۰]. بر اساس نتایج پژوهش حاضر کاربرد غلظت معینی از عصاره گیاه کالیگونوم منجر به افزایش میزان بقای اسپرم‌ها می‌شود اما در مقابل کاربرد غلظت‌های بیشتر، تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل ایجاد نمی‌کند. مطالعه‌ای در سال ۱۹۹۸ نیز نشان

تأثیر عصاره کالیگونوم بر پارامترهای اسپرم

باشد که این اتفاق نه تنها روند مرگ سلولی را در دسته‌های سلولی تسریع می‌کند بلکه باعث کاهش مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌های سالم خارج از دسته سلولی می‌شود. این توجیه تئوریتیک مشابه یافته‌های باکر (Baker) و همکارانش است که در سال ۲۰۱۱ در مجله Nature منتشر شد. در مطالعه باکر و همکاران مشخص شد که سلول‌های پیر می‌توانند باعث پیر شدن سلول‌های مجاور شوند. شاید این موضوع در مورد سلول‌های در حال مرگ هم درست باشد؛ یعنی این سلول‌ها هم بتوانند باعث القا مرگ در سلول‌های مجاور شوند. با در نظر گرفتن قابلیت ترشح میکرووزیکول‌ها (Microvesicles) توسط سلول‌ها و از آنجایی که این وزیکول‌ها حاوی اطلاعاتی از وضعیت سلول والد هستند، بنابراین سلول‌های در حال مرگ قادرند که به کمک ترشح این میکرووزیکول‌های خارج سلولی باعث القا مرگ در سلول‌های سالم مجاور شوند. در یک دسته سلولی به خاطر تماس سلول‌های در حال مرگ با هم دیگر میزان میکرووزیکول‌هایی که به سمت سلول‌های سالم راه دارند نسبت به سطح سلول در حال مرگ کاهش می‌یابد، بنابراین میزان مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌های سالم خارج از دسته سلولی کاهش می‌یابد [۳۱].

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره گیاه کالیگونوم در مقایسه با دوز ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم تأثیرات چشمگیری بر بهبود کیفیت پارامترهای اسپرم و کاهش میزان مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌های بافت بیضه دارد. بنابراین استفاده از عصاره این گیاه، به عنوان یک آنتی اکسیدان برای استفاده بالینی در ناباروری مردان پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس صورت پذیرفته است. همچنین از همکاری آقای دکتر محمدنژاد و نیز مساعدت علمی و تکنیکی آقای پور بیرانوند سپاسگزاری می‌شود.

داد که افزودن آنتی اکسیدان اسکوربات (Ascorbate Antioxidant) به اسپرم‌ها در غلظت‌های زیاد، برای مهار پروکسیداسیون لیپیدی ایجاد شده در نتیجه تیمار با جیوه منجر به ایجاد آثار منفی و القای هرچه بیشتر پروکسیداسیون لیپیدی می‌شود [۲۸].

مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۴ نشان داد که استفاده از غلظت بالای آنتی اکسیدان آلبومین آثار سوء داشته و منجر به گسترش هرچه بیشتر روند پروکسیداسیون چربی خواهد شد [۲۷]. پروکسیداسیون لیپیدی با تأثیر منفی بر ساختار بیوشیمیایی غشای اسپرمی همانند ایجاد اختلال در عبور و مرور یون‌ها، نه تنها موجب غیر فعال شدن این سلول‌ها می‌شود بلکه با گذشت زمان موجبات مرگ این سلول‌ها را نیز فراهم می‌کند [۲۹].

بررسی میزان مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در گروه آزمون ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کاهش معنی‌داری را نسبت به دو گروه آزمون دیگر نشان داد. مطالعه‌ای نشان داد آسیب ایجاد شده در فسفولیپید و DNA اسپرم انسان در اثر ROS در ناباروری مردان نقش به‌سزایی دارد [۳۰]. رادیکال‌های آزاد می‌تواند در ساختمان مولکول‌های DNA سلول‌های بدن از جمله اسپرم موجب اکسیداسیون بازهای پورین و پریمیدین شده و در یک یا دو رشته DNA شکستگی ایجاد کند؛ سپس باعث ایجاد جایگاه‌های بدون باز و تشکیل پل‌های عرضی بین DNA و پروتئین و در نهایت تغییر در قند دزاکسی ریبوز و ایجاد ناباروری در مرد شود [۳۰]؛ بنابراین در پژوهش حاضر به دنبال استفاده از عصاره گیاه کالیگونوم میزان مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌های بافت بیضه موش‌های تیمار شده با دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نسبت به سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری نشان داد. در تحقیق حاضر مشخص شد که در دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، سلول‌های دچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده به شکل دسته سلولی (Cluster) هستند که این حالت در دوزهای دیگر مشاهده نمی‌شود. شاید علت کاهش قابل توجه مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، دسته‌ای شدن سلول‌های در حال مرگ

منابع

- [1] Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. J Androl 1987; 8(5): 338-48.
- [2] Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp Physiol 1997; 82(2): 291-5.
- [3] Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim 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.
- [4] Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. J Biol Chem 1973; 248(13): 4793-6.
- [5] Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Front Biosci 1996; 1: e78-86.
- [6] Kamkar A, JebeliJavan A, Jamshidi R. Antioxidant capacity of essential oil and extract of Iranian Mentha spicat. JVL R 2009; 1(1): 69-77. (Persian)
- [7] Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas Jr AJ, Agarwal A. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. Hum Reprod 2001; 16(9): 1922-30.
- [8] Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. Curr Opin Obstet Gynecol 2006; 18(3): 325-32.
- [9] Nikravesh MR, Jalali M, Mohammadi S. Effects of crude Onion extract on murine testis. J Reprod Infertil 2010; 10(4): 239-44. (Persian)
- [10] Naseri M, Heydari Nasrabadi M, Khodarahmi P, Ahmadi F, Mojibi P, Abotalebei H. Study of the Effect of *Fumaria parviflora* Alcoholic Extract on Spermatogenesis in Male Rats. NCMBJ. 2011; 1(2): 61-5. (Persian)
- [11] Hosseini A, Zare S, Ghaderi Pakdel F, Ahmadi A. Beneficial effects of American ginseng on epididymal sperm analyses in cyclophosphamide treated rats. J Reprod Infertil 2010; 45: 211-26. (Persian)
- [12] Zilochi M, Movahedin M, Haghiri Ebrahimabadi AR, Batooli H. The effects of Calligonum extract and Quercetin on normal semen quality after freezing and thawing. M.Sc. Thesis, Tehran: Tarbiat Modares University, 2011.
- [13] Nagata H, Takekoshi S, Takagi T, Honma T, Watanabe K. Antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase. Tokai J Exp Clin Med 1999; 24(1): 1-11.
- [14] Alkan I, Simşek F, Haklar G, Kervancioğlu E, Ozveri H, Yalçın S, Akdaş A. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. J Urol 1997; 157(1): 140-3.
- [15] Hall L, Williams K, Perry AC, Frayne J, Jury JA. The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced: implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. Biochem J

- 1998; 333 (Pt 1): 5-9.
- [16] Giannattasio A, De Rosa M, Smeraglia R, Zarrilli S, Cimmino A, Di Rosario B, Ruggiero R, Colao A, Lombardi G. Glutathione peroxidase (GPX) activity in seminal plasma of healthy and infertile males. *J Endocrinol Invest* 2002; 25(11): 983-6.
- [17] Dandekar SP, Nadkarni GD, Kulkarni VS, Puneekar S. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. *J Postgrad Med* 2002; 48(3): 186-89. (Persian)
- [18] Engel S, Schreiner T, Petzoldt R. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. *Andrologia* 1999; 31(1): 17-22.
- [19] Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003; 79(4): 829-43.
- [20] 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.
- [21] Amini Rad O, Khalili MA, Soltani Gord Faramarzi HR. Influence of pomegranate juice on sperm parameters and fertility in mice. *Hormozgan Med J* 2009; 13(3): 182-8.
- [22] Baghy Nia N, Oryan S, Fani A, Maleki Rad A. The effects of cardamom-tea watery extract on oxidative stress. *AMUJ* 2008; 11(4): 1-7. (Persian)
- [23] Mohamadi Sh, Movahedin M, Mowla SJ. Antioxidant Effects of Selenium on Sperm Parameters and Testicular Structure in Young and Aged Mice. *J Reprod Infertil* 2008; 9(3): 229-37. (Persian)
- [24] EL-Shahat AE, Gabr A, Meki AR, Mehana ES. Altered testicular morphology and oxidative stress induced by cadmium in experimental rats and protective effect of simultaneous green tea extract. *Int J Morphol* 2009; 27(3): 757-64.
- [25] Sato K, Sueoka K, Tanigaki R, Tajima H, Nakabayashi A, Yoshimura Y, Hosoi Y. Green tea extracts attenuate doxorubicin-induced spermatogenic disorders in conjunction with higher telomerase activity in mice. *J Assist Reprod* 2010; 27(8): 501-8.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] Verma A, Kanwar KC. Human sperm motility and lipid peroxidation in different ascorbic acid concentrations: an in vitro analysis. *Andrologia* 1998; 30(6): 325-9.
- [29] Arabi M, Shahgholian H. Antioxidant potential of ascorbate and albumin in mercury treated bull spermatozoa. *AJUMS* 2007; 17: 59-72. (Persian)
- [30] Rehman A, Jenner A, Halliwell B. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of DNA: optimization of protocols for isolation and analysis of DNA from human blood. *Methods Enzymol* 2000; 319: 401-17.
- [31] Baker D, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur

NK, Childs BG, Van de Sluis B, Kirkland JL, Van Deursen JM. Clearance of p16Ink4a-

positive senescent cells delays ageing-associated disorders. Nature 2011; 479: 232-6.