

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 لقاح آزمایشگاهی

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

- ۱- کارشناس ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 ۲- استادیار، 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: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، 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 به‌عنوان یک عامل اکسیداتیو روی ناباروری مردان تأثیر دارد. در این پژوهش آثار افزایش سن بر پارامترهای اسپرم، آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب و گونه‌های آزاد اکسیژن داخل اسپرمی و میزان به‌وجود آمدن بلاستوسیت‌ها متعاقب لقاح آزمایشگاهی در موش نر مسن در مقایسه با موش جوان ارزیابی شد. **مواد و روش‌ها:** ۵ سر موش نر مسن ۱۰-۱۲ ماهه و ۵ موش نر بالغ جوان ۲-۳ ماهه نژاد NMRI انتخاب شدند. در این مطالعه پارامترهای اسپرم، میزان گونه‌های اکسیژن آزاد، آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب و میزان لقاح آزمایشگاهی در دو گروه ارزیابی شد. نتایج به‌وسیله آزمون‌های تی مستقل و مجذور کای بررسی شد. بین میانگین غلظت آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب و میانگین بازتابش فلورسنت گونه‌های آزاد اکسیژن نیز آزمون همبستگی انجام شد. **نتایج:** کاهش معنی‌داری ($P \leq 0.05$) در تعداد، حرکت پیشرونده و شکل طبیعی اسپرم در گروه مسن نسبت به گروه جوان مشاهده شد. بین دو گروه تفاوت معنی‌داری در میزان درصد لقاح آزمایشگاهی و تشکیل بلاستوسیت، سطح گونه‌های آزاد اکسیژن و آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب موجود در اسپرم مشاهده نشد. بین میانگین غلظت آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب و میانگین بازتابش فلورسنت گونه‌های آزاد اکسیژن در هر دو گروه مسن و جوان رابطه معنی‌دار ($P \leq 0.01$)، معکوس و خطی بود. **نتیجه‌گیری:** پیری سبب کاهش معنی‌دار در تعداد، تحرک پیشرونده و درصد زنده‌مانی اسپرم 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 لقاح آزمایشگاهی و بلاستوسیت‌های حاصل از تکوین این جنین‌ها مؤثر باشد.

کلیدواژگان: اسپرم، افزایش سن، لقاح آزمایشگاهی، گونه‌های آزاد اکسیژن، آنتی‌اکسیدان

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

مقدمه

گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (Reactive Oxidative) گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS) در متابولیسم هوازی در بدن تشکیل می‌شود [۱]. حضور ROS در سلولی نظیر اسپرم به دلیل فعالیت بالا علاوه بر داشتن آثار

آنتی‌اکسیدانی نظیر سوپر اکسید دیسموتاز و گلووتاتیون ردوکتاز در سیستم عصبی مرکزی تأثیرگذار است [۹]. به این ترتیب در این مطالعه سعی بر آن شده است که تأثیر عامل استرس‌زای سن بر پارامترهای اسپرمی، لقاح آزمایشگاهی، میزان ROS و آنتی‌اکسیدان‌های داخل سلولی در اسپرم موش مسن و موش جوان بررسی شود. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند در صورت اثر بخش بودن عصاره به‌عنوان راهکاری در درمان افراد نابارور به‌کار گرفته شود.

مواد و روش‌ها

گروه‌بندی حیوانات

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

نحوه آماده‌سازی اسپرم

به‌منظور جداسازی اسپرم، ابتدا موش‌ها با روش جا به‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند. سپس هر اپیدیدیم به‌صورت جداگانه در قطرات محیط کشت HTF بدون HEPES (شرکت ژن و سلول ایده آل، ایران) حاوی BSA (Bio ID، فرانسه) به میزان ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر قرار گرفت. اپیدیدیم‌ها توسط یک سوزن ظریف قطعه قطعه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط انکوباتور ۶/۲ درصد CO₂، ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۹۵ درصد رطوبت نگهداری شد تا اسپرم‌ها از لوله

مثبتی نظیر تأثیر در فرآیند ظرفیت‌پذیری، بیش‌فعالی، تحرک، واکنش آکروزومی، حفظ قدرت باروری [۲]، می‌تواند منجر به اختلالاتی نظیر کاهش بقای اسپرم، آسیب به ساختار و تمامیت هسته اسپرم نیز شود. این آثار منفی در نهایت با کاهش تحرک اسپرم‌ها بر میزان لقاح تخمک- اسپرم اثرگذار است [۳]. حساسیت اسپرم به استرس اکسیداتیو به دلیل مقادیر زیادی از انواع اسیدهای چرب غیر اشباع (Polyunsaturated Fatty Acids: PUFA) در غشا این سلول است [۴]. به این ترتیب، هنگامی که آبشار لیپید پراکسیداسیون (Lipid Peroxidation: LPO) در اسپرم راه می‌افتد، تقریباً ۶۰ درصد اسیدهای چرب از غشا حذف می‌شود. LPO بر ساختار و عملکردهای غشا مانند سیالیت، شیب یونی، هدایت گیرنده‌ها، فرآیندهای انتقالی و آنزیم‌های غشا اثر می‌گذارد که در نهایت منجر به کاهش تحرک اسپرم می‌شود [۵]. از سوی دیگر؛ افزایش میزان تولید ROS در نتیجه استرس اکسیداتیو می‌تواند منجر به کاهش تحرک و ایجاد ناهنجاری‌های ریخت‌شناختی 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 به‌طور طبیعی بین ROS تولید شده و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها تعادل برقرار است، تولید ROS در مایع منی با مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی اسپرم و پلاسمای مایع منی مواجهه و در نهایت حذف می‌شود. با این حال، این امکان وجود دارد که این مکانیسم دفاعی در هم بشکند و میزان استرس اکسیداتیو افزایش یابد [۵]. دفاع آنتی‌اکسیدانی پلاسمای مایع منی قادر است کمبود آنزیم‌های سیتوپلاسمی اسپرم که طی بلوغ آن حذف می‌شود را جبران کند و اسپرم را در برابر تولیدات اکسیداتیو این سلول طی فعالیت آن، محافظت نماید [۴]. ارتباط بین استرس اکسیداتیو با فرایند پیری [۷] و تأثیر آن بر تغییرات تخریبی در بافت بیضه به همراه کاهش در کیفیت اسپرم قبلاً در موش مطالعه شده است [۸]. همچنین مشاهده شده که سن خوکچه‌های هندی بر میزان آنزیم‌های

تعداد ۱۰۰ اسپرم مطالعه و درصد اسپرم‌های زنده محاسبه شد.

بررسی شکل اسپرم

در این مطالعه برای بررسی شکل اسپرم، اسپرم‌ها با رنگ (Avicenna Research institute-Iran) Quick Diff، رنگ‌آمیزی شدند. 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.

بررسی‌های بافت‌شناسی نمونه بافت 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 الکل‌های سریالی آب‌گیری، با زایلول شفاف‌سازی و در نهایت قالب‌گیری شد. بعد از تهیه برش‌های ۵ میکرومتری با همتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی و زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد.

لقاح آزمایشگاهی (IVF)

آماده‌سازی موش‌های ماده

به منظور تحریک تخمک‌گذاری، میزان ۱۰ واحد بین‌المللی PMSG (Intervet، بلژیک) و ۴۸ ساعت بعد ۱۰ واحد بین‌المللی HCG (Pregnyl، ایران) به روش داخل صفاقی به موش‌های ماده تزریق شد. پس از گذشتن ۲۰-۱۸ ساعت از تزریق HCG، به منظور گرفتن تخمک MII از ناحیه آمپول لوله رحمی، موش‌ها به روش جا به‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند و ناحیه لوله رحمی (Oviduct) موش‌ها برداشته شد و در داخل قطرات کشت ۱۰۰ میکرولیتری که در زیر روغن قرار داشت، گذاشته شد. قطرات کشت حاوی HTF محتوی HEPES (شرکت ژن و سلول ایده‌آل، ایران) + BSA به میزان ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. با پاره کردن ناحیه آمپولا، تخمک‌های MII خارج شدند. تخمک‌ها در قطره دیگری شستشو داده شدند و به قطرات کشت مخصوص IVF که

خارج شوند [۱۰]. از یکی از اپیدیدیم‌ها برای بررسی پارامترهای اسپرمی، ارزیابی میزان ROS، اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل و از دیگری به منظور بررسی لقاح آزمایشگاهی (IVF) استفاده شد. به منظور انجام IVF، اسپرم‌های فعال و سالم که با روش Swim up در کناره‌های قطره جمع شده بودند، از کنار قطره جمع‌آوری 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 پیتاژ شد تا پراکندگی یکنواختی ایجاد شود. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی اسپرم با ۹۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شد تا به این ترتیب اسپرم‌ها بی‌حرکت شوند. تعداد اسپرم‌ها در میزان ۱۰ میکرولیتر از این مخلوط با استفاده از لام هموسیئومتر نئوبار (Hemocytometer Neubauer) و با بزرگنمایی $\times 400$ در زیر میکروسکوپ شمارش شد.

بررسی تحرک اسپرم

برای تعیین درصد تحرک اسپرم، تعداد ۱۰۰ اسپرم شمارش و نوع تحرک هرکدام 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 سپس 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 اسپرم‌های زنده،

نقش سن بر باروری موش نر مسن

سپس به مدت ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد، سوپ 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 (Fluorescence Recovery After Photobleaching) که در سال ۱۹۹۶ توسط Strain و Benzie معرفی شد، یک روش بسیار حساس، تکرارپذیر و دقیق است [۱۱].

در این روش عوامل آنتی‌اکسیدانی محلول در آب موجود در نمونه مورد مطالعه موجب احیا کمپلکس فریک تری پیریدیل تریازین (TpTz-Fe^{3+}) به فرم فرو (TpTz-Fe^{2+}) می‌شود که در محیط اسیدی آبی رنگ است و حداکثر جذب نوری آن در طول موج ۵۹۳ نانومتر است. سرعت واکنش با قدرت احیا کنندگی نمونه رابطه خطی دارد. در این روش Fe^{3+} به صورت مازاد استفاده می‌شود؛ عامل محدود کننده سرعت، قدرت احیا کنندگی نمونه است

محلول‌های استاندارد یون آهن Fe^{2+} با استفاده از محلول ذخیره آهن ۱۰۰۰ میکرومولار تهیه شد (جدول ۱).

جدول ۱ نحوه تهیه محلول‌های استاندارد یون آهن

محلول شاهد ۱	محلول شاهد ۲	محلول شاهد ۳	محلول شاهد ۴	محلول شاهد ۵
۰	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
۱۰۰	۸۷۵	۷۵۰	۵۰۰	۰
۰	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰

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

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

انجام روش IVF

به‌منظور 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) + BSA 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 (2,7 dichlorofluorescein diacetate) (Sigma، آلمان) که یک روش عمومی برای اندازه‌گیری ROS در انواع مختلفی از سلول‌ها است و با روش فلوسیتومتری بررسی شد.

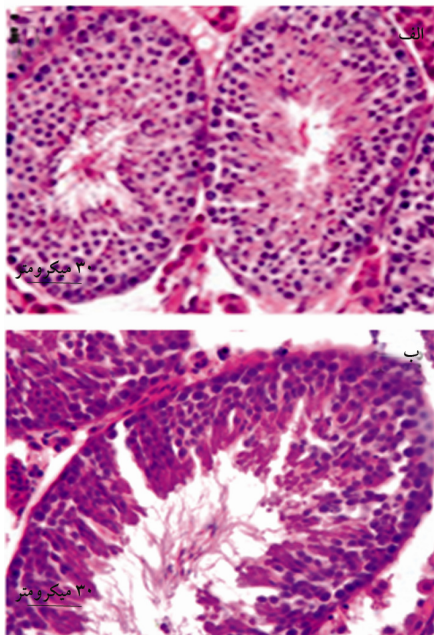
به این ترتیب که اسپرم‌ها با ۲۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و سوپ رویی که حاوی محیط کشت بود دور ریخته شد. این مرحله با PBS (Phosphate Buffered Saline) تکرار شد. در تاریکی به ازای هر یک میلیون اسپرم، ۱۰ میکرولیتر از DCF-DA ۲۰ میکرومولار به سلول‌ها اضافه شد و به آرامی پیتاژ شد؛

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 به‌طور طبیعی حفظ شده بود. در قاعده لوله‌های منی‌ساز، سلول‌های اسپرماتوگونی به همراه سلول‌های سرتولی مشاهده شد. به علاوه؛ دم اسپرم‌ها در داخل لوله‌های منی‌ساز به‌طور کامل مشهود بود. در فضای بینابینی لوله‌ها نیز ماتریکس سلولی به همراه سلول‌های لایذیک به‌صورت 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 زا یا شکاف‌های مشهودی قابل مشاهده بود. به علاوه؛ قطر داخلی لوله‌ها به نسبت گروه جوان به‌طور 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 به‌صورت 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 شیریه 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. به مدت 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 به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند، از سوپ رویی آن که حاوی شیریه سلول‌ها بود برای انجام ۳ تکرار این آزمون استفاده شد.

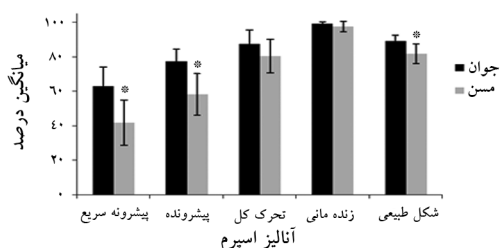
روش‌های آماری

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 لقاح 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 به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) بیان شد. بین میانگین غلظت آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب و میانگین بازتابش فلورسنت 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 $5/73 \pm 81/75$ بود، در حالی که در گروه جوان $3/31 \pm 89$ 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، زنده مانی 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

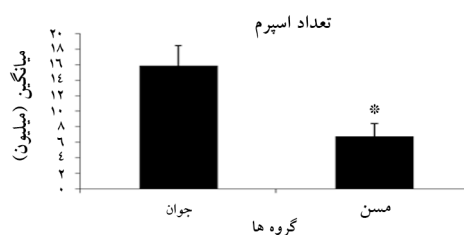
نتایج حاصل از مطالعه در مورد درصد لقاح آزمایشگاهی نشان داد که میزان لقاح آزمایشگاهی در گروه مسن $67/30$ درصد و در گروه جوان $60/97$ درصد بود. این نتایج تفاوت معنی داری را از نظر آماری نشان نداد. در مورد درصد بلاستوسیست نیز در گروه مسن 20 درصد و در گروه جوان 26 درصد مشاهده شد که این نتایج نیز با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشتند (جدول ۲).

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	$50 (60/97)$	$13 (26)$
پیر	۵۲	$35 (67/30)$	$7 (20)$

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.

زنده مانی 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 $9/75 \pm 80/33$ و در گروه جوان $7/92 \pm 87/40$ بود که اختلاف معنی داری را نشان نداد. میزان حرکت پیشرونده در گروه مسن $12/02 \pm 58/17$ و در گروه کنترل جوان $7/19 \pm 77/2$ دیده شد که با یکدیگر اختلاف معنی داری ($P=0/013$) را

بررسی میزان ROS و میزان آنتی‌اکسیدان‌های

درون سلولی در دو گروه مورد مطالعه

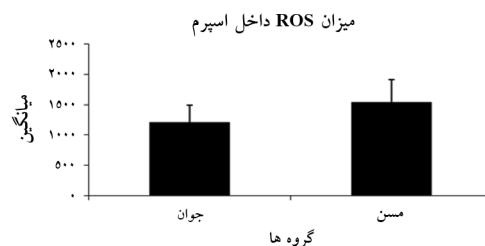
میزان غلظت آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب در گروه مسن $179/48 \pm 403/88$ میکرومول و در گروه جوان $70/87 \pm 623/88$ میکرومول مشاهده شد. این دو غلظت به‌دست آمده نیز که با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۴).



شکل ۴ بررسی غلظت آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب داخل سلول اسپرم در موش مسن و جوان: اعداد به‌صورت 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 $378/27 \pm 1536/87$ و در گروه جوان $288/42 \pm 1206/35$ مشاهده شد. این اختلاف نیز از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۵).

بین میانگین غلظت آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب و 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 به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) بیان شده است.

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 به‌عنوان 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 به‌نظر 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 پراکسیداسیون لیپید در محیط افزایش می‌یابد، قدرت تحرک اسپرم‌ها به‌طور 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 به‌خصوص 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]. به‌طور کلی افزایش میزان ROS در مایع منی موجب پراکسیداسیون لیپید، آسیب به غشا و در

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 بدشکلی‌های اسپرم می‌شود [۲۲]. این آثار منفی ایجاد شده بر پارامترهای اسپرمی به صورت مستقیم بر میزان لقاح و قابلیت بارورسازی اسپرم تأثیرگذار است، با این وجود در تحقیق حاضر درصد لقاح آزمایشگاهی و درصد بلاستوسیت 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 آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب و میانگین بازتابش فلورسنت 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 آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب بررسی شد و سایر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیم لحاظ نشده بود. در این صورت این احتمال وجود دارد که محتوای سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان که در این تحقیق اندازه‌گیری نشده‌است در دو گروه متفاوت باشد و تعادل مناسب بین میزان ROS تولید شده و محتوای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دلیل بر تمامی آثار مشاهده شده در این مطالعه باشد. به این ترتیب لازم است مطالعه بیشتری روی کلیه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی درون اسپرم انجام گیرد. تفاوت مشاهده شده احتمالی در اندازه‌گیری سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در

نتیجه کاهش حرکت اسپرم، غیر فعال 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 آنتی‌اکسیدان‌ها (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 بی‌اثر 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 نظیر 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 آنتی‌اکسیدان‌های 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، به طوری که این میزان تولید شده با مقداری که میتوکندری‌های اسپرم تولید می‌کنند تقریباً برابری 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 فرایند اسپرمیوزن 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 مؤثرتر روش‌های درمانی در موارد ناباروری به دلیل افزایش ROS می‌تواند مؤثر واقع شود.

مطابق با نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، پیری سبب کاهش معنی‌دار در تعداد، تحرک پیشرونده و شکل طبیعی اسپرم می‌شود. رابطه بین اکسیدان و آنتی‌اکسیدان‌های موجود در اسپرم‌های موش مسن و جوان، رابطه خطی معکوس معنی‌داری 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 نمی‌تواند بر میزان لقاح 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 oligoastheno-teratospermic men. *Iran Red Crescent Med J* 2013; 15(9): 780-5.
- [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, 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.
- [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.