Archive of SID

مقاله اصیل

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

مهسا عسکری‌جهرمی[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 ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح
Email: z_mazaheri@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۱/۱۰/۱۸ پذیرش مقاله: ۹۲/۰۲/۰۳

چکیده

هدف: آنتی اکسیدان‌ها از عناصر ضروری، برای حرکت اسپرم است. عصاره گیاه کالیگونوم دارای آنتی اکسیدان‌های مهمی چون کاتچین و کرستین 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 و۵۰ میلی‌گرم 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 میلی‌گرم 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 میلی‌گرم در کیلوگرم نسبت به سایر گروه به صورت معنی‌دار بهبود پیدا کرد ($P\leq ۰/۰۵$). 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 میلی‌گرم در کیلوگرم نسبت به سایر گروه‌ها بود ($P\leq ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: دوز ۳۰ میلی‌گرم 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: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲، صفحات: ۴۱-۵۴

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

رادیکال‌های آزاد (مثل: هیدروکسیل، سوپراکسید، نیتریک اسید و لیپید پروکسیل) اتم یا مولکول‌هایی است که به خاطر داشتن الکترون آزاد دائماً در بدن موجودات زنده در گردش بوده و به دلیل قابلیت واکنش‌پذیری بالای خود، آسیب‌هایی را به ماکرومولکول‌های بدن وارد می‌کند [۱].

رادیکال‌های 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 رادیکال‌های آزاد آسیب پذیراست [۲، ۳]. در مطالعه وایسیگر (Weisiger) و همکارانش آسیب اکسیداتیو DNA در اسپرم افراد بارور و نابارور مقایسه شد. این مطالعه نشان داد که آسیب اکسیداتیو مردان نابارور ۱۰۰ برابر بیشتر از مردان بارور است [٤]. در حالت عادی بین تولید رادیکال‌های آزاد در بدن و اجزای سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی تعادل برقرار است. اما مواجهه با عواملی چون داروها و سموم و آلاینده‌های محیطی سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در بدن و عدم تعادل بین تولید رادیکال‌ها و اجزای سیستم دفاع آنتی اکسیدانی شده است و حالتی به نام استرس اکسیداتیو به وجود می‌آید که منجر به آسیب بافتی می‌شود [۵]. استرس اکسیداتیو منجر به پروکسیداسیون لیپیدی (Lipid Peroxidation) در غشای اسپرم می‌شود. واکنش بعدی آن کاهش حرکت اسپرم و کاهش کیفیت سلولی است که منجر به کاهش اسپرم‌های بادوام می‌شود [٦].

تحقیقات نشان می‌دهد افزایش ناباروری در مردان ارتباط نزدیکی با کاهش مصرف مواد آنتی اکسیدانی در آن‌ها دارد و مصرف این مواد به درمان ناباروری در مردان کمک می‌کند [۷]. بنابراین مصرف مواد حاوی آنتی اکسیدان 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 اکسیداتیو از سیستم‌های دفاع آنتی اکسیدانی خود استفاده می‌کند. سیستم‌های دفاع آنتی اکسیدانی به دو گروه آنزیمی و غیر آنزیمی تقسیم می‌شود. این سیستم با جلوگیری از تشکیل رادیکال آزاد، ترمیم صدمات ناشی از فعالیت رادیکال‌ها، افزایش دفاع مولکول‌های صدمه دیده و به حداقل رسانیدن جهش سلولی با آسیب‌های رادیکال‌های آزاد مقابله می‌کند [٤].

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

گیاه اسکنبیل (کالیگونوم: Calligonum) درختچه‌ای سازگار با شرایط بیابان و با دامنه انتشار بسیار گسترده است به طوری که در اغلب شن‌زارهای مرکزی ایران رشد می‌کند. اسکنبیل متعلق به خانواده علف هفت بند (Polygonaceae) دارای تنه‌ای منشعب، یا غیر منشعب، سفید رنگ، ساقه ایستا و افراشته است که برگ‌هایش اغلب حالت آویز به خود می‌گیرند. این گیاه دارای آنتی اکسیدان‌های مهمی از جمله کاتچین (Catechin)، اپی‌گالاکتوکاتچین گالات و کرستین (Crocetin) است. با توجه به مطالعات انجام شده و تلاش برای جایگزینی

www.SID.ir

Archive of SID

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 میلی‌گرم در کیلوگرم، ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم و ۵۰ میلی‌گرم 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 عصارهٔ 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 هموسیتومتر 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 نمونهٔ اسپرم با ۱۰ میکرولیتر از رنگ ائوزین نگروزین (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 ۴۰۰× 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:

www.SID.ir

Archive of SID

رنگ‌آمیزی Diff-Quick برای بررسی ریخت‌شناسی اسپرم

مراحل انجام رنگ‌آمیزی دیفکوییک 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 آندونوکلئاز 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 گزیلول 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 فلورسنت مشاهده شد. برای شمارش سلول‌های مرده ۵ مقطع مجرای اسپرم‌ساز در هر گروه مورد مطالعه قرار گرفت. سلول‌های اسپرماتوگونیا (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 شدهٔ 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 ارایه شده برحسب میانگین ± انحراف استاندارد (Mean ± SEM) است. میزان $P\leq ۰/۰۵$ معنی‌دار محسوب شد.

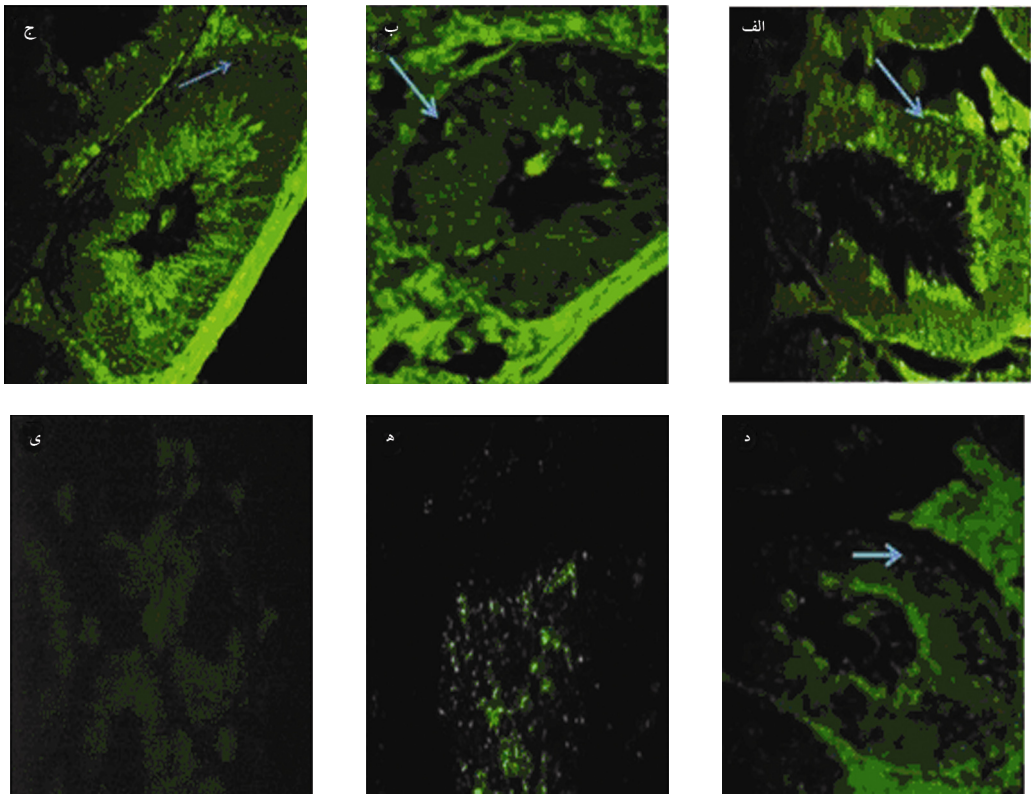
نتایج

نتایج ارزیابی تأثیرات عصاره گیاه کالیگونوم بر پارامترهای اسپرم

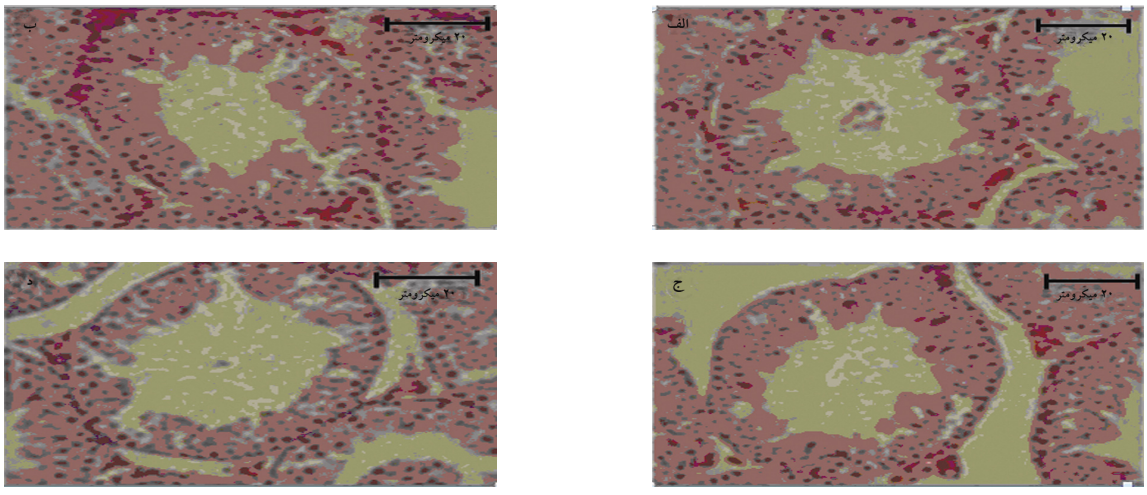
نتایج حاصل از بررسی بافت بیضه تفاوت قابل ملاحظه‌ای را از نظر واکوئل‌های موجود در بافت بین گروه‌های تیمار شده و کنترل مسن نشان نداد (شکل ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ مقاطع بافت بیضه در دوزهای مختلف پس از ۵ هفته از تزریق عصاره گیاه کالیگونوم در موش مسن؛ (الف) دوز ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، (ب) دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، (ج) دوز ۵۰ میلی‌گرم 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 (رنگ‌آمیزی تانل).



شکل ۲ مقاطع بافت بیضه در دوزهای مختلف پس از ۵ هفته از تزریق عصاره گیاه کالیگونوم در موش مسن؛ (الف) دوز ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، (ب) دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، (ج) دوز ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، (د) گروه کنترل (رنگ‌آمیزی: هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی: ۴۰۰×)

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به جدول ۱، میانگین تعداد اسپرم بر حسب میلیون در گروه کنترل مسن ۰/۲۹ ± ٤/۱۱ بوده است. در حالی که پس از تجویز دوزهای مختلف از عصارهٔ 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≤۰/۰۵). 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.

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 عصارهٔ کالیگونوم بیشترین میزان بقای اسپرم مشاهده شد که به صورت معنی‌داری (P≤۰/۰۵) 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≤۰/۰۵).

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

گروه	تعداد اسپرم برحسب میلیون (x ×۱۰^٦) ± انحراف معیار	درصد تحرک ± انحراف معیار	درصد زنده ماندن ± انحراف معیار	درصد ریخت‌شناسی طبیعی ± انحراف معیار
کنترل مسن	٤/۱۱ ± ۰/۲۹	٦۰/۷۰ ± ۲/۱٦	▲ ۵۸/٦۸ ± ۱/٤٤	۵٦/۸۱ ± ۳/۱۱
شم	٤/۳ ± ۰/۳۰	۵۸/۷ ± ۳/۲	▲ ۵۸/٦۳ ± ۲/۹٤	۵۸/٦۳ ± ۲/۹٤
دوز ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم	۳/۹۲ ± ۰/۹٤	▪▲#* ۵۵/۳۰ ± ۱/۵۱	▲ ۵۲/۵٤ ± ۲/٤٤	* ٦۵/۳٦ ± ۱/۵٦
دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم	▪● ٤/۵ ± ۰/۲۵	▪●#* ٦۹/۷۸ ± ۰/۹٦	٦۹/٤٦ ± ۱/۵٤	* ٦۸/۳٤ ± ۱/۵٦
دوز ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم	۳/۹ ± ۰/۲۱	#* ٦۵/۹٤ ± ۰/۹۵	▲ ۵٦/۷۲ ± ۱/۰٤	* ٦٤/۳۰ ± ۱/۵۸

*: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل مسن در همان ستون (P≤۰/۰۵)

#: تفاوت معنی‌دار با گروه شم در همان ستون (P≤۰/۰۵)

●: تفاوت معنی‌دار با دوز ۱۰ در همان ستون (P≤۰/۰۵)

▲: تفاوت معنی‌دار با دوز ۳۰ در همان ستون (P≤۰/۰۵)

■: تفاوت معنی‌دار با دوز ۵۰ در همان ستون (P≤۰/۰۵)

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SEM) ارایه 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≤۰/۰۵). بیشترین میزان سلول‌های دچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در دوز ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مشاهده شد اما در مقایسه با گروه کنترل مسن معنی‌دار

www.SID.ir

Archive of SID

نبود (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 اسپرماتوگونیا دچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در هر مجرای اسپرم‌ساز در یک میلی‌متر مربع از هر لوله ± انحراف معیار
دوز ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم	۲۳ ± ۰/۶۳
دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم	۱۴/۲ ± ۲ *#
دوز ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم	۲۰ ± ۰/۶۴ *
کنترل مسن	۲۵ ± ۲/۵

*: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل مسن ($P \leq ۰/۰۵$).
#: تفاوت معنی‌دار با سایر دوزهای مورد مطالعه ($P \leq ۰/۰۵$).
نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SEM) ارایه شده است.

بحث

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 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 مولکول ها 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 گلوتاتیون پروکسیداز در اسپرم به اثبات رسیده است. علاوه بر آن؛ مولکول‌های غیر آنزیمی آنتی

www.SID.ir

Archive of SID

اکسیدان شامل ویتامین C و E، پیروات گلوتاتیون، کارنیتین (Carnitine)، N- استیل، L- سیستئین، 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 آلدهید (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 [٤]. مطالعات نشان داده‌اند که فلاونویید (Flavonoids) و کاتچین از طریق واکنش با آنزیم گلوتاتیون پروکسیداز عملکرد آنتی اکسیدانی خود را انجام می‌دهد [١٣].

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. گلوتاتیون پروکسیداز نقش مهمی را در روند بلوغ اسپرم از زمان تولید تا زمان ظرفیت‌پذیری بازی می‌کند [١٤].

هال (Hall) و همکاران نشان دادند که عدم وجود گلوتاتیون پروکسیداز ممکن است منجر به کاهش ظرفیت و توان باروری شود [١٥]. مطالعات دیگری نیز نشان داد که مهار فعالیت گلوتاتیون پروکسیداز منجر به تولید پراکسید در غشاء و کروماتین شده در نتیجه شکاف در DNA اسپرم ایجاد می‌شود [١٦]. بعضی از مطالعات افزایش میزان گلوتاتیون پروکسیداز را در نتیجه استفاده از آنتی اکسیدان‌های کاتچین و فلاونویید نشان دادند که نتیجه نهایی این فرایند افزایش میزان اسپرم‌های متحرک است [١٣].

گیاناتاسیو (Giannattasio) و همکاران نیز ثابت کردند که فعالیت این آنزیم در افراد بارور ده برابر افراد نابارور است [١٦]. آلکان (Alkan) و همکاران نیز نشان دادند که فعالیت این آنزیم آنتی اکسیدانی (گلوتاتیون پروکسیداز) در افراد نابارور کمتر از افراد بارور است [١٤]. داندکار (Dandekar) و همکاران ثابت کردند که فعالیت گلوتاتیون پروکسیداز ارتباط مثبتی با نمونه‌های اولیگواستنوزوتراتوزواسپرمیک (Oligo-astheno-teratozoospermia) دارد و میزان پروکسیداسیون لیپید در این نمونه‌ها بالاست. این نتایج بیانگر آن است که فعالیت بالای آنزیم گلوتاتیون 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 [١٧].

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 [١٧-١٩]. 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 [١٨، ١٩].

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 بر هم ریختن ساختار غشاء موجب غیر فعال شدن آن می‌شود [٢٠].

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 ٣٠ میلی‌گرم در کیلوگرم نسبت به دوز ١٠ و ٥٠ میلی‌گرم 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 [٢١]. اما بر خلاف مطالعه حاضر آنتی اکسیدان‌های موجود در انار، تعداد اسپرم‌ها را در گروه

www.SID.ir

Archive of SID

آزمون بهبود بخشید. در مطالعه دیگری نیز استفاده از عصاره پیاز منجر به افزایش تعداد سلول‌های اسپرماتوسیست 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 اسپرماتوگونیا (Spermatogonia)، سلول‌های اسپرماتوسیست، اسپرماتوزویید (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 [۲٤].

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 عصارهٔ گیاهان برای ارزیابی پارامترهای اسپرمی انجام شده که پس از استفاده از عصارهٔ گیاهان دارای ترکیبات آنتی اکسیدانی بهبود پارامترهای اسپرمی و سطح کاهش یافتهٔ رادیکال‌های آزاد مشاهده شده است [۹-۱۱].

در مطالعه حاضر، نتایج بررسی تعداد اسپرم نشان دهنده کاهش تعداد اسپرم‌ها در دوز ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم 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 اسپرمیوژنز (Spermiogenesis) و در نتیجه کاهش تعداد اسپرم‌های اپیدیدیمی است [۲٦].

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 ائوزین 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 کوبایلیش (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

www.SID.ir

Archive of SID

داد کـه افـزودن آنتـی اکـسیدان اسـکوربات (Ascorbate Antioxidant) به اسپرم‌ها در غلظت‌هـای زیـاد، بـرای مهـار پروکسیداسیون لیپیدی ایجاد شده در نتیجه تیمار با جیوه منجـر به ایجاد آثار منفی و القای هرچه بیشتر پروکسیداسیون لیپیـدی می‌شود [۲۸].

مطالعـه دیگـری در سـال ۲۰۰٤ نـشان داد کـه اسـتفاده از غلظت بالای آنتی اکسیدان آلبومین آثار سوء داشته و منجـر بـه گسترش هرچه بیشتر روند پروکسیداسیون چربی خواهـد شـد [۲۷]. پروکـسیداسیون لیپیـدی بـا تـأثیر منفـی بـر سـاختار بیوشیمیایی غشای اسپرمی هماننـد ایجـاد اخـتلال در عبـور و مرور یون‌ها، نه تنها موجب غیر فعال شدن این سلول‌ها می‌شود بلکه با گذشت زمان موجبات مرگ این سلول‌ها را نیـز فـراهم می‌کند [۲۹].

بررسی میزان مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در گروه آزمون ۳۰ میلی‌گرم در کیلـوگرم کـاهش معنـی‌داری را نـسبت بـه دو گروه آزمون دیگر نشان داد. مطالعه‌ای نـشان داد آسـیب ایجـاد شـده در فـسفولیپید و DNA اسـپرم انـسان در اثـر ROS در ناباروری مردان نقش بـه‌سـزایی دارد [۳۰]. رادیکـال‌هـای آزاد می‌تواند در ساختمان مولکول‌هـای DNA سـلول‌هـای بـدن از جمله اسپرم موجب اکـسیداسیون بازهـای پـورین و پریمیـدین شده و در یک یا دو رشته DNA شکستگی ایجاد کنـد؛ سـپس باعث ایجاد جایگاه‌های بدون باز و تشکیل پل‌های عرضی بـین DNA و پروتئین و در نهایت تغییر در قنـد دزاکـسی ریبـوز و ایجاد ناباروری در مرد شود [۳۰]؛ بنابراین در پـژوهش حاضـر به دنبال استفاده از عصاره گیاه کالیگونوم میـزان مـرگ سـلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌های بافت بیضه موش‌های تیمار شده با دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نسبت به سایر گروه‌هـا کـاهش معنی‌داری نشان داد. در تحقیق حاضر مشخص شد کـه در دوز ۳۰ میلـی‌گـرم در کیلـوگرم، سـلول‌هـای دچـار مـرگ سـلولی برنامه‌ریزی شده به شکل دسته سـلولی (Cluster) هـستند کـه این حالت در دوزهای دیگر مـشاهده نمـی‌شـود. شـاید علـت کاهش قابل توجه مرگ سـلولی برنامـه‌ریـزی شـده در دوز ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، دسته‌ای شدن سلول‌هـای در حـال مـرگ باشد که این اتفاق نه تنها روند مرگ سـلولی را در دسـته‌هـای سـلولی تـسریع مـی‌کنـد بلکـه باعـث کـاهش مـرگ سـلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌هـای سـالم خـارج از دسـته سـلولی می‌شود. این توجیه تئورتیک مشابه یافته‌هـای بـاکر (Baker) و همکارانش است که در سـال ۲۰۱۱ در مجلـه Nature منتـشر شد. در مطالعه باکر و همکاران مشخص شد که سلول‌های پیـر می‌توانند باعث پیر شدن سلول‌های مجـاور شـوند. شـاید ایـن موضوع در مورد سلول‌های در حال مـرگ هـم درسـت باشـد؛ یعنی این سلول‌ها هم بتوانند باعـث القـا مـرگ در سـلول‌هـای مجاور شوند. با در نظر گرفتن قابلیت ترشح میکرووزیکـول‌هـا (Microvesicles) توسـط سـلول‌هـا و از آن‌جـایی کـه ایـن وزیکول‌ها حاوی اطلاعـاتی از وضـعیت سـلول والـد هـستند، بنابراین سلول‌های در حال مرگ قادرند که به کمک ترشح ایـن میکرووزیکول‌های خارج سلولی باعث القا مرگ در سلول‌هـای سالم مجاور شـوند. در یـک دسـته سـلولی بـه خـاطر تمـاس سلول‌های در حال مرگ با هم دیگر میزان میکرووزیکول‌هـایی که به سمت سلول‌های سالم راه دارند نسبت به سطح سلول در حـال مـرگ کـاهش مـی‌یابـد، بنـابراین میـزان مـرگ سـلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌هـای سـالم خـارج از دسـته سـلولی کاهش می‌یابد [۳۱].

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که دوز ۳۰ میلـی‌گـرم در کیلـوگرم عـصاره گیـاه کـالیگونوم در مقایـسه بـا دوز ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم و ۵۰ میلی‌گـرم در کیلـوگرم تـأثیرات چشمگیرتری بر بهبود کیفیت پارامترهای اسپرم و کاهش میـزان مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌هـای بافـت بیـضه دارد. بنابراین استفاده از عصاره این گیاه، به عنوان یک آنتی اکـسیدان برای استفاده بالینی در ناباروری مردان پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانـشگاه تربیـت مـدرس صـورت پذیرفته است. همچنین از همکاری آقـای دکتـر محمـدنژاد و نیـز مساعدت علمی و تکنیکی آقای پور بیرانوند سپاسگزاری می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

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. JVLR 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, Haghir 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, Yalçin 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

www.SID.ir

Archive of SID

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, Punekar 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 chem-iluminescence 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, Tchkonia T, LeBrasseur

www.SID.ir

Archive of SID

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.

www.SID.ir