

***Effect of administration exogenous leptin on reactive oxygen species level
in Seminal plasma male Sprague-Dawley rats***

***Abbasihormozi SH., Msc., Shahverdi A.H., Ph.D. *, Cheraghi J., Ph.D.,
Akhlaghi A.A., M.Sc., Kheime A., B.Sc***

**P.O.Box: 10395-4644, Embryology Department, Cell Sciences Research Center, Royan Institute,
ACECR, Tehran, Iran*

Received: Jan 2012

Accepted: Mar 2012

Abstract

Purpose: The Increase of oxidative stress production a causes after oxygen free radicals one of the factors involved in male infertility. In this study the role of leptin in product reactive oxygen species in seminal plasma in adult rat were evaluated

Materials and Methods: Sixty-five male rats were randomly divided into four groups. The control group receives normal saline and other animal, in experimental groups 2, 3 and 4 were given daily intraperitoneal leptin injections of 5, 10, or 30 mg/kg body weight for 7, 15 and 42 at all. Reactive Oxygen Species Levels and Expression of leptin were measured respectively with DCFH-A and immunohistochemical and sperm parameters were assessed by computer-assisted semen analysis (CASA). Two ways ANOVA with Tukey post hoc test were conducted to compare mean of groups. P-value < 0.05 was considered significant.

Result: The results show that sperm count was higher in treated groups than that of control group. These differences were significant ($p \leq 0.05$). The interaction between treatment and time showed significant effect on ROS variations. After immune staining leptin were found in the seminiferous, tubules and Leptin receptor were found in the interstitium.

Conclusion: the results of this study indicate that leptin administration by increasing levels of oxygen free radicals, may lead to increase of sperm count and the number of abnormal sperm in the experimental groups.

Key Words: Exogenous leptin, Reactive oxygen species, Sperm parameters

آثار تزریق اگزوزنوس لپتین بر تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژنی در پلاسمای مایع منی موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد اسپراگ

شیماء عباسی هرمزی ^{M.Sc.*}، عبدالحسین شاهرودی ^{Ph.D.*}، جواد چراغی ^{D.V.M.*}، علی اصغر اخلاقی ^{M.Sc.**}، ابوالفضل خیمه ^{B.Sc.***}

*گروه جنین‌شناسی مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

**گروه علوم پایه دانشکده پیراپزشکی دانشگاه ایلام، ایران

***گروه اپیدمیولوژی و سلامت باروری مرکز تحقیقات اپیدمیولوژی باروری پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

****بخش حیوانات آزمایشگاهی مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

تاریخ دریافت: دی ماه ۹۰ تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۹۰

چکیده

هدف: بررسی نقش لپتین در القا رادیکال‌های آزاد اکسیژنی در پلاسمای مایع منی موش صحرایی بالغ

مواد و روش‌ها: ۶۵ موش صحرایی نر به طور تصادفی انتخاب و به ۴ گروه تقسیم شدند. حیوانات گروه کنترل طبیعی سالین دریافت کردند و موش‌های گروه‌های دو، سه و چهار، لپتین را با سه دوز متفاوت ۵، ۱۰ و ۳۰ میکروگرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی و یک بار در روز به مدت ۷، ۱۵ و ۲۲ روز دریافت کردند. سطوح رادیکال آزاد اکسیژنی و بیان لپتین به ترتیب با روش‌های DCFH-DA و ایمونوهیستوشیمی اندازه‌گیری و پارامترهای اسپرم با نرم افزار CASA بررسی شد. آزمون ANOVA دوطرفه به همراه آزمون تعقیبی Tukey برای مقایسه میانگین بین گروه‌ها استفاده و معنی‌داری در سطح $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تعداد اسپرم در گروه‌های تیمار شده با لپتین در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت ($p \leq 0.05$). اثر متقابل تیمار و زمان در کل آزمایش روی تغییرات رادیکال آزاد مایع منی معنی‌دار بود ($p \leq 0.05$). رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی لپتین را روی لوله‌های سمینی فرسورس و رسپتور لپتین را در فضای بینابینی مشخص نمود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق لپتین با افزایش سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژنی، باعث افزایش تعداد اسپرم و افزایش اسپرم‌های غیرطبیعی در گروه‌های آزمایشی می‌شود.

کلید واژه‌ها: اگزوزنوس لپتین، رادیکال آزاد اکسیژنی، پارامترهای اسپرمی

مقدمه

لقاح وحشی رشد و تکوین طبیعی جنین بسیار ضروری است، یکی از این پروتئین‌ها مولکول لپتین و گیرنده آن است [۱-۳].

انواع مختلفی از پروتئین‌ها و mRNAها در اسپرم موجودات زنده شناسایی شده است که در فرایند متابولیسم انرژی اسپرم، فرایند

آدرس مکاتبه: تهران، اتوبان رسالت، خیابان بنی‌هاشم، میدان بنی‌هاشم، خیابان حافظ شرقی، ساختمان تحقیقات، گروه اسپرم بیولوژی. صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۴۶۴۴
Email: shahverdi@royaninstitute.org

قطعه قطعه شدن DNA اسپرم می‌شود [۱۲]. رادیکال‌های آزاد قادر است که بیومولکول‌های حیاتی از جمله DNA را مورد حمله اکسیداتیو قرار داده و تغییراتی در ساختمان DNA ایجاد نمایند، این تغییرات در DNA اسپرم می‌تواند موجب ناباروری شود [۱۳].

حال این‌که آیا لپتین تزریق شده و عمل متقابل لپتین با گیرنده‌اش در بیضه یا در اسپرماتوزو، باعث افزایش رادیکال‌های آزاد می‌شود و آیا این رادیکال‌های آزاد باعث آسیب اسپرم می‌شود یا نه در مطالعه حاضر بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از ۶۵ موش صحرایی نر بالغ از نوع آلبینو نژاد اسپراگو (Sprague-Dawley) با سن ۸-۶ هفته که از موسسه رازی ایران تهیه شده بودند استفاده شد. این موش‌ها تحت شرایط کنترل شده از نظر دما و شرایط نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. برای حذف تنش و تطبیق حیوانات با محیط جدید حیوانات یک هفته قبل از انجام آزمایش‌ها به محل نگهداری منتقل شدند. در نهایت موش‌های صحرایی مورد آزمایش به طور تصادفی در ۴ گروه (هرگروه ۱۵ سر و در هر گروه لپتین با سه دوز مشخص شده تزریق شد و گروه کنترل ۲۰ سر) به شرح ذیل تقسیم بندی شدند.

۱- گروه اول (کنترل): که ۵ موش از این گروه در روز صفر آزمایش کشته شدند و ۱۵ موش دیگر به مدت ۷، ۱۵ و ۴۲ روز به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن سالیین دریافت کردند.

۲- گروه دوم؛ لپتین به مدت ۷ روز با سه دوز متفاوت ۵، ۱۰ و ۳۰ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن تزریق شد.

۳- گروه سوم؛ لپتین به مدت ۱۵ روز با سه دوز متفاوت ۵، ۱۰ و ۳۰ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن تزریق شد.

۴- گروه چهارم؛ لپتین به مدت ۴۲ روز با سه دوز متفاوت ۵، ۱۰ و ۳۰ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن تزریق شد.

در روز نخست موش‌ها توزین شدند سپس لپتین و

لپتین از واژه یونانی لپتوس به معنی لاغر گرفته شده و نشان دهنده آثار این هورمون در کاهش وزن است، لپتین در سال ۱۹۹۴ توسط محققى به نام جفرى فریدمن (Jeffrey friedman) کشف شد [۴ و ۵]. این هورمون اغلب توسط بافت سفید چربی تولید شده و در تنظیم وزن بدن با تاثیر بر سلول‌های چربی اثر گذار است [۶ و ۷].

وظایف متعددی برای لپتین، از جمله جلوگیری از مصرف غذا، تحریک و تنظیم مصرف انرژی، تنظیم شروع بلوغ و اثر بر سیستم تولید مثل گزارش شده است. بازگشت باروری موش‌های فاقد ژن لپتین با تیمار لپتین، یکی از مصداق‌های تأثیر این هورمون بر سیستم تولید مثل است [۸].

کنترل ترشح گونادوتروپین‌ها توسط هیپوتالاموس و با میانجگری GnRH صورت می‌گیرد. در موش‌های *ob/ob* فاقد ژن لپتین این چرخه کنترلی ناقص بوده و نابارور هستند و در این موش‌ها ارگان‌های تولید مثل تحلیل رفته و با تیمار لپتین، سیستم تولید مثل به دلیل ترشح گونادوتروپین‌ها به حالت اول باز می‌گردد و با رفع نقص چرخه کنترلی، ارگان‌های تولید مثل و باروری رشد و فعالیت خود را باز می‌یابد. این تجربه، نظریه نقش مهم لپتین در تنظیم ترشح GnRH و کنترل تولید مثل را اثبات می‌نماید [۹ و ۱۰].

گزارش‌های متعددی مبنی بر افزایش درصد اسپرم‌های غیرطبیعی در حیوانات تیمار شده با لپتین ارائه شده است [۱۱]. احتمالاً تولید تعداد زیاد اسپرم‌های غیر طبیعی با ایجاد استرس اکسیداتیو و تأثیر مستقیم لپتین بر سلول‌های زایا در بیضه حاصل می‌شود. استرس اکسیداتیو یکی از علل اصلی ناباروری مردان است [۱۲]. استرس اکسیداتیو با افزایش رادیکال‌های آزاد حاصل و باعث تخریب سلول می‌شود و با اکسیژن و اکسیدان‌های مشتق شده از آن، تحریک می‌شود [۱۱]. استرس اکسیداتیو نقش مهمی در ایجاد و افزایش اسپرم‌های غیرطبیعی داشته و باعث کاهش تعداد اسپرم و تغییر شکل و

۵۰ میکرومولار از DCFH-DA (رنگ فلورسنت دی کلروفلورسین دی استات) ۵ میکرولیتر به ۱ میلی لیتر از نمونه اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور انکوبه شد، بعد از آن برای شستن نمونه‌ها، ۱۰۰۰ میکرولیتر از محیط کشت Hams آلبومین دار (۲/۵) روی نمونه‌ها ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۲۰۰۰ سانتریفوژ و برای بررسی با دستگاه فلوسایتومتری (FACS caliber, Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) آماده شد.

بررسی بافت‌شناسی بیضه‌های تیمار شده با

لپتین به روش ایمونوهیستوشیمی

موش‌های نر بالغ به مدت ۱۵ و ۴۲ روز با لپتین به صورت تزریق داخل صفاقی تیمار شدند. در انتهای دوره تزریق موش‌های تیمار شده به وسیله گاز CO₂ کشته شدند، سپس بیضه آنها برداشته شد و به منظور تثبیت کردن به مدت ۶ روز در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند، پس از فرآیند نفوذ پارافین، بلوک‌گیری با استفاده از قالب‌های فلزی انجام شد با استفاده از میکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۶ میکرون تهیه شد و سپس برای شناسایی حضور لپتین و رسپتور لپتین در سطح لوله‌های سمینی فرس رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی انجام شد. در این روش می‌توان به کمک رنگ فلورسنت به وجود آنتی ژن‌های موجود در سطح لوله‌های اسپرمی پی برد. بافت بیضه تثبیت شده در پارافین با قرار گرفتن در گزلیل و اتانول دیپارافینه شد و سپس هیدروژن پراکسید ۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه برای متوقف کردن پراکسیداز اندوژنوس به کار برده شد، نمونه‌ها در بافر بلوکه کننده سرم بزی BSA (یک درصد) به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در مرحله بعد آنتی بادی اولیه پلی کلونال (rabbit anti-leptin) و آنتی بادی ثانویه (anti-leptin receptor) به لام اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شدند، سپس لام‌ها در TBS شستشو و آنتی بادی ثانویه

محلول سالین بر اساس وزن موش‌های صحرایی به صورت داخل صفاقی تزریق شد. در پایان دوره تزریق، موش‌های صحرایی با استنشاق گاز CO₂ کشته شدند.

بررسی پارامترهای اسپرم اپیدیدیم

با قیچی استریل دم اپیدیدیم راست رت‌ها برداشته و با چند برش به آن دریک لوله آزمایش استریل حاوی ۱ میلی لیتر محیط کشت Ham's F10 محتوی ۵/۲ درصد HSA قرار داده شد، لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا اسپرم‌ها خارج و در محیط شناور شوند. آنالیز اسپرم بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی WHO (World Health Organization) انجام گرفت. برای بررسی تعداد اسپرم‌ها از لام هموسایتومتر استفاده شد و با استفاده از بزرگنمایی ۴۰× میکروسکوپ نوری شمارش شدند. شمارش برای هر نمونه دوبار انجام گرفت و میانگین آن اعلام شد. نتایج به صورت تعداد اسپرم بر حسب میلیون در یک میلی لیتر مایع منی بیان شد.

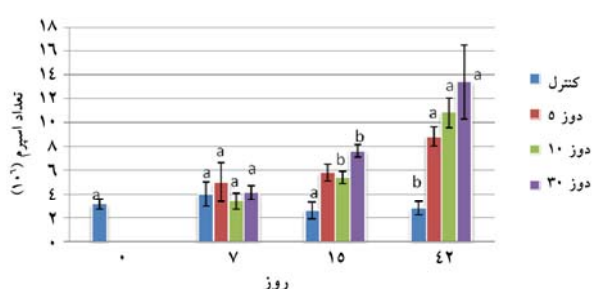
به منظور بررسی مورفولوژی اسپرم بعد از قرار دادن قطره‌ای از محیط کشت حاوی اسپرم روی لام (Leja, Nieuw-Venep, The Netherlands) با لام دیگری اسمیری از آن تهیه شد و بعد از تثبیت اسمیر اسلایدها با رنگ آمیزی اسپرم بلو رنگ شدند و زیر میکروسکوپ فاز کنتراست (NikonTM Eclipse E-200, Japan) متصل به دوربین (Basler Vision TechnologieTM A312FC at 50 fps, Ahrensburg, Germany) با بزرگنمایی ۴۰× مشاهده شدند. برای بدست آوردن پارامترهای ریخت‌شناسی، ۲۰۰ اسپرم در هر نمونه با استفاده از CASA بررسی شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها برای انجام اندازه گیری

رادیکال آزاد اکسیژنی

برای بررسی رادیکال‌های آزاد بعد از swim up، برای تهیه

گروه کنترل با گروه‌هایی که لپتین با دوز ۵، ۱۰ و ۳۰ میکروگرم دریافت کردند، اختلاف معنی‌داری به صورت افزایشی وجود دارد ($p \leq 0.05$). نتایج نمونه‌گیری در گروه چهارم (گروهی که ۴۲ روز تحت تیمار با لپتین قرار گرفتند) نشان داد که بین گروه کنترل با گروه‌هایی که لپتین با دوز ۵، ۱۰ و ۳۰ میکروگرم دریافت کردند، اختلاف معنی‌داری به صورت افزایشی وجود دارد ($p \leq 0.05$).



شکل ۱. مقایسه میزان (میانگین \pm انحراف معیار) تغییرات تعداد اسپرم در گروه شاهد و آزمایش در دوره تزریق لپتین به مدت ۴۲ روز حروف غیر مشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها است ($p \leq 0.05$).

بررسی ریخت‌شناسی اسپرم در رت‌های تیمار

شده با لپتین

بررسی‌های ریخت‌شناختی نشان داد که بین درصد اسپرم‌های اپیدیدیم با ریخت‌شناسی طبیعی گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p \leq 0.05$) (جدول ۱).

در بررسی پارامترهای ریخت‌شناختی بین گروه‌ها در گروهی که لپتین با دوز ۵ میکروگرم تزریق شد در روزهای مختلف نمونه‌گیری (۱۵، ۷ و ۴۲ روز) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p \geq 0.05$). اما در گروه‌هایی که لپتین با دوز ۱۰ و ۳۰ میکروگرم تزریق شد با گذشت زمان اختلاف معنی‌داری به صورت کاهشی مشاهده شد ($p \leq 0.05$).

(receptor rabbit for leptin and goat for leptin) به نمونه‌ها اضافه شد و انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انجام گرفت. برای رنگ‌آمیزی هسته‌ها از DAB+CHROMOGEN استفاده شد. در نهایت آنالیز برش‌ها توسط میکروسکوپ فلوروسنس انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

طرح آماری استفاده شده در این آزمایش آنالیز واریانس دو طرفه ANOVA بود و معادله پارامتری کروسکال والیس برای شناسایی گروه‌هایی که دو به دو با هم متفاوت بودند، استفاده شد. از آزمون Tukey در سطح معنی‌داری ۵ درصد استفاده و از برنامه SPSS نسخه ۱۶ برای آنالیز داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

بررسی تعداد اسپرم در رت‌های تیمار شده با

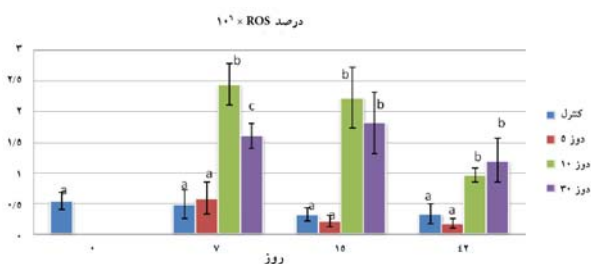
لپتین

نتایج این بررسی در شکل ۱ آمده است. روز صفر (زمان صفر) روز اول دوره آزمایش قبل از تزریق در هر گروه است. زمان اول، روز ۷، زمان دوم، روز ۱۵ و زمان سوم، روز ۴۲ دوره آزمایش است. نتایج نشان داد که در این آزمایش تزریق لپتین روی تعداد اسپرم در گروه‌های تیمار شده با لپتین در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود ($p \leq 0.05$).

شمارش تعداد اسپرم در زمان‌های مختلف نمونه‌گیری در گروه دوم (گروهی که هفت روز تحت تیمار با لپتین قرار گرفتند) نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف تزریق با گروه کنترل وجود ندارد ($p \geq 0.05$). شمارش تعداد اسپرم در زمان‌های مختلف نمونه‌گیری در گروه سوم (گروهی که ۱۵ روز تحت تیمار با لپتین قرار گرفتند) نشان داد که بین

بررسی میزان رادیکال آزاد تولید شده در پاسخ به تزریق لپتین در زمان‌های مختلف نمونه‌گیری در گروه سوم (گروهی که لپتین به مدت ۱۵ روز تزریق شد) نشان داد که درصد رادیکال‌های آزاد اکسیژنی گروه کنترل با دوزهای ۱۰، ۳۰ و همچنین دوز ۵ با دوزهای ۱۰ و ۳۰ اختلاف آماری معنی‌داری دارد ($p \leq 0.05$). در گروه چهارم (گروهی که لپتین به مدت ۴۲ روز تزریق شد) بین میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژنی تولید شده در گروه کنترل و گروهی که لپتین با دوز ۵ میکروگرم تزریق شده با گروه‌هایی که لپتین با دوز ۱۰ و ۳۰ تزریق شده اختلاف معنی‌داری به صورت افزایشی مشاهده شد ($p \leq 0.05$).

همچنین در مقایسه دوز در روزهای مختلف تزریق، درصد رادیکال‌های آزاد بین گروه‌ها در دوز ۵ بین گروه دوم (گروهی که ۷ روز تحت تیمار با لپتین قرار گرفتند) با گروه سوم و همچنین بین گروه دوم با گروه چهارم (گروهی که ۴۲ روز تحت تیمار با لپتین قرار گرفتند) اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p \leq 0.05$). در دوز ۱۰ بین گروه دوم با گروه چهارم اختلاف معنی‌داری به صورت کاهشی وجود دارد ($p \leq 0.05$). در دوز ۳۰ نیز بین گروه دوم با گروه چهارم اختلاف معنی‌داری به صورت کاهشی وجود دارد ($p \leq 0.05$) (شکل ۲).



شکل ۲. مقایسه میزان (میانگین \pm انحراف معیار) تغییرات رادیکال آزاد اکسیژنی در گروه شاهد و آزمایش در دوره تزریق لپتین به مدت ۴۲ روز حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها است ($p \leq 0.05$)

جدول ۱. میانه یافته‌های مورفولوژیک اسپرم دم اپیدیدیم در گروه‌های مورد مطالعه

روز- گروه	متغیرها	طبیعی	سر غیر طبیعی	دم غیر طبیعی
دوز ۵		۵۱/۶۶±۱/۷۱	۴۱/۱۴±۹/۱۳	۳۲/۱۶±۱/۱۹
کنترل دوز ۱۰		۹۱/۶۲±۱/۰۱	۷۵/۱۰±۶/۹۲	۲۶/۵۸±۱/۵۸
دوز ۳۰		۷۱/۵۰±۱/۲۲	۹/۰۸±۵/۸۷	۱۹/۴۱±۱/۶۰
گروه دوز ۵		۵۵/۰۰±۸/۸۸	۲۱/۷۵±۵/۹۵	۲۳/۲۵±۲۵/۰۱
۷) دوز ۱۰		۶۱/۱۲±۱/۵۴	۱۶/۲۵±۲/۲۱*	۲۲/۶۲±۲/۰۶*
روزه) دوز ۳۰		۴۷/۵۰±۲/۴۵*	۲۳/۸۷±۳/۲۵*	۲۶/۱۲±۳/۰۴*
گروه دوز ۵		۵۷/۱±۳/۸۹	۲۰/۸۷±۱/۳	۲۲/۰۰±۲/۱۵
۱۵) دوز ۱۰		۶۲/۵۰±۳/۳۵	۱۹/۸۷±۱/۳۵*	۱۷/۶۲±۱/۶۳*
روزه) دوز ۳۰		۵۰/۰۰±۷/۹*	۲۳/۸۷±۳/۷۱*	۲۷/۳۷±۲/۳۰*
گروه دوز ۵		۵۶/۰۰±۲/۵۰	۱۸/۲۵±۲/۸۴	۲۵/۷۵±۸/۷
۴۲) دوز ۱۰		۳۵/۰۰±۷/۹۰*	۲۱/۲۵±۳/۳۷*	۷۵/۴۳±۳/۷*
روزه) دوز ۳۰		۳۸/۶۲±۲/۹۶*	۲۰/۱۲±۳/۵۱*	۷/۵۰±۴/۳۳*

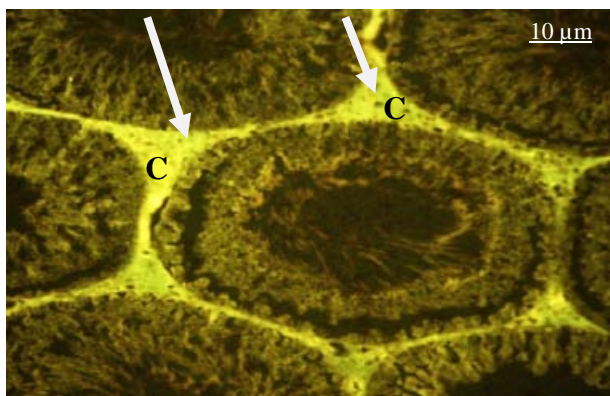
* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل در سطح معنی‌داری ($p \leq 0.05$) و در همان ردیف

بررسی سطح رادیکال آزاد اکسیژنی (ROS) در

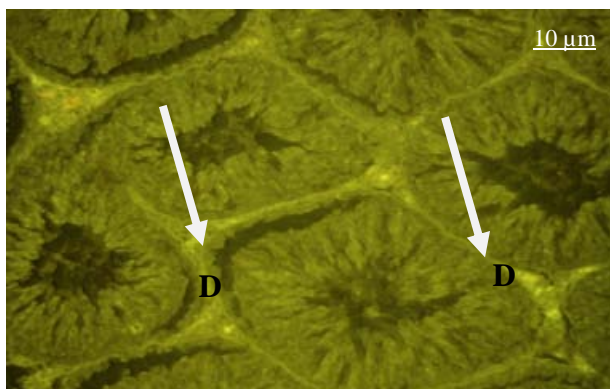
رت‌های تیمار شده با لپتین

اثر تزریق لپتین در دوره زمانی ۴۲ روزه روی ایجاد رادیکال آزاد اکسیژنی بررسی شد. روز صفر روز اول دوره آزمایش قبل از تزریق در هر گروه است. زمان اول روز ۷، زمان دوم روز ۱۵ و زمان سوم روز ۴۲ دوره آزمایش است. درصد رادیکال‌های آزاد اکسیژنی موش‌های صحرائی نر در زمان‌های مختلف نمونه‌گیری در گروه کنترل نشان می‌دهد که هیچ‌گونه اختلاف آماری معنی‌داری در میزان فاکتورهای مورد نظر وجود ندارد ($p \geq 0.05$).

درصد رادیکال‌های آزاد اکسیژنی نمونه منی موش‌های صحرائی در زمان‌های مختلف نمونه‌گیری در گروه دوم نشان داد که بین میزان کنترل و دوز ۵ با دوز ۱۰ و ۳۰ اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p \leq 0.05$). همچنین بین میزان دوز ۱۰ با دوز ۳۰ اختلاف معنی‌داری به صورت کاهشی وجود دارد ($P \leq 0.05$).



شکل ۵. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای شناسایی لپتین در سلول‌های لایدیگ رت در گروهی که لپتین با دوز ۱۰ میکروگرم به مدت ۷ روز تزریق شد. C: سلول‌های رنگ شده لپتین در فضای بینابینی، بار: ۱۰ میکرومتر



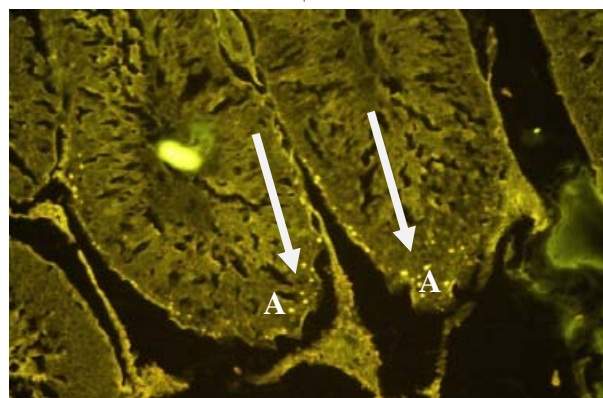
شکل ۶. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای شناسایی لپتین در سلول‌های لایدیگ رت در گروهی که لپتین با دوز ۳۰ میکروگرم به مدت ۴۲ روز تزریق شد. D: سلول‌های رنگ شده لپتین در فضای بینابینی، بار: ۱۰ میکرومتر

بحث

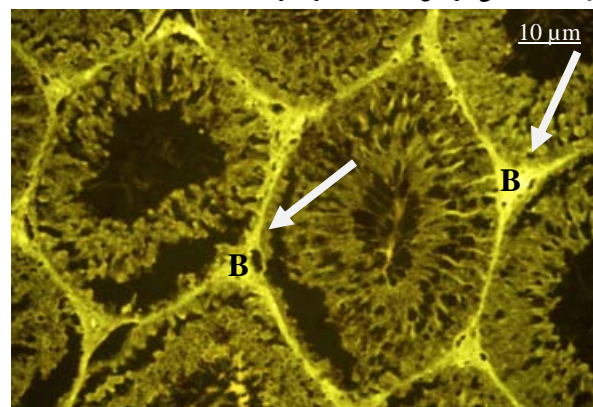
محور تحقیق حاضر بررسی آثار آگروژنوس لپتین بر تغییرات تعداد اسپرم، پارامترهای اسپرمی و سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژنی بود و بافت‌شناسی بیضه از نظر جایگاه لپتین و گیرنده‌اش در بافت بیضه مطالعه شد. بر اساس نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر تزریق لپتین باعث افزایش قابل توجه تعداد اسپرم در گروه‌های آزمایشی با دوز ۱۰ و ۳۰ میکروگرم، در مقایسه با گروه

آنالیز ایمونوهیستوشیمی

شدت رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای لپتین و گیرنده آن در گروه‌های آزمایشی و کنترل در شکل‌های ۳ تا ۶ مشاهده می‌شود. بافت بیضه موش‌های تیمار شده با لپتین، به وسیله آنتی‌بادی آنتی لپتین و آنتی رسپتور لپتین، رنگ‌آمیزی شدند. در گروه کنترل (شکل ۳) رنگ آمیزی اختصاصی لپتین (ایمونوهیستوشیمی) نشان داد که لپتین در لوله‌های سمینی فرس روی سلول‌های زایا و اغلب اسپرماتوسیت‌ها بیان می‌شود و در رنگ‌آمیزی اختصاصی گیرنده لپتین در گروه‌های آزمایشی (شکل ۵ تا ۶)، گیرنده لپتین در فضای بینابینی و اغلب در سلول‌های لایدیگ مشاهده شد و نتایج نشان داد که بیان گیرنده لپتین با غلظت اسپرم نسبت عکس دارد.



شکل ۳. رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای شناسایی لپتین در لوله‌های سمینی فرس رت در گروه کنترل. A: سلول‌های رنگ شده لپتین روی لوله‌های سمینی فرس، بار: ۱۰ میکرومتر



شکل ۴. رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای شناسایی لپتین در سلول‌های لایدیگ رت در گروهی که لپتین با دوز ۳۰ میکروگرم به مدت ۱۵ روز تزریق شد. B: سلول‌های رنگ شده لپتین در فضای بینابینی، بار: ۱۰ میکرومتر

طبیعی (دم پیچ خورده و بدون فلاپ) در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بود. این نتایج با یافته‌های هارن (Haron) و همکاران که ارتباط بین لپتین و سطوح هورمون‌های تولید مثلی و اثرشان بر پارامترهای مورفولوژیکی اسپرم را گزارش نمودند، همسو بود. در پژوهش‌های Haron نیز کیفیت اسپرم در گروهی که لپتین را با دوز ۳۰ میکروگرم گرفته بودند به طور معنی‌داری پایین‌تر از سایر گروه‌ها بود. همچنین Haron در مطالعه خود بیان کرد که میزان غلظت لپتین در سرم موش‌های گروه‌های آزمایشی با گروه کنترل تفاوت قابل ملاحظه‌ای نداشت اما سطح FSH و LH در موش‌هایی که لپتین با دوز ۱۰ و ۳۰ میکروگرم تزریق شد در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری بالاتر گزارش شده بود [۱۲] و طبق پژوهش‌های تنا-سمپر، باریو و فومبن (Barreiro، Tena-Sempere و Fombonne) که افزایش اسپرم‌های غیرطبیعی را با افزایش سطح FSH و LH در موش‌های تیمار شده با لپتین مرتبط دانسته، ممکن است یکی از دلایل نقص اسپرمی مشاهده شده در بررسی حاضر، مربوط به افزایش سطح FSH و LH در گروه‌های تیمار شده با لپتین در مقایسه با گروه کنترل باشد [۲۱-۱۹].

هانافی، پاولی و زهدی (Zohdy و Pauli، Hanafy) گزارشی نموده‌اند که بین افزایش بافت چربی در نتیجه افزایش سطح چرخش لپتین در بدن با کاهش سطح تستسترون و افزایش سطح استروژن ارتباط وجود دارد؛ در این مطالعات چاقی به‌طور قابل ملاحظه‌ای ترشح هورمون‌ها را مختل می‌کند و روی تولید مثل اثر می‌گذارد و گزارش شده که هر تغییری در افزایش سطح استروژن روی اسپرماتوژنز اثر آسیب رسان دارد [۲۴-۲۲]. افزایش اسپرم‌های غیر طبیعی در موش‌های تیمار

کنترل و گروهی که با دوز ۵ میکروگرم تحت تیمار با لپتین قرار گرفتند، شد که این نتایج با مطالعه باراش (Barash) همسو بود. در مطالعه Barash و همکاران وزن بیضه و وزیکول سمینال در موش‌های صحرایی تیمار شده با لپتین، افزایش یافت و این امر باعث افزایش ارتفاع سلول‌های اپیتلیال و افزایش تعداد اسپرم در مقایسه با گروه کنترل شد [۱۴].

ویگل، کامفیلد و چهاب (Chehab و Campfield، Weigle) در پژوهش‌های خود روی بافت‌شناسی بافت تخمدان نشان دادند که وزن تخمدان و بیضه در موش‌های تیمار شده با لپتین افزایش می‌یابد و لپتین در تخمدان باعث توسعه فولیکول‌ها و در بیضه باعث تحریک سلول‌های لوله‌های سمینی فرس می‌شود [۱۸-۱۶].

در حالی که نتایج این تحقیق نتایج برای (Bray) را تأیید نمی‌کند، Bray در مطالعات خود کاهش تعداد اسپرم در اپیدییدیم و کاهش قطر لوله‌های سمینی فر در موش‌های صحرایی چاق زوکر (Zucker) تیمار شده با لپتین را گزارش نمود ولی تعداد اسپرم‌های غیرطبیعی در نمونه‌ها افزایش یافته بود و این تفاوت نتایج ممکن است به دلیل نژاد موش‌های مورد مطالعه باشد [۱۵]. Barash نیز این تفاوت را این‌گونه تفسیر کرد که هرچند مکمل لپتین در زمان کمبود لپتین عملکرد تولید مثل را بهبود می‌بخشد ولی ممکن است میزان دوز لپتین در زمان دسترسی، اثرعکس روی تولید مثل داشته باشد [۱۴].

براساس نتایج حاصل از بررسی حاضر کیفیت اسپرم موش‌های نر مورد مطالعه با میزان دوز لپتین تزریق شده ارتباط عکس داشتند، به طوری که در موش‌های تیمار شده با دوز ۳۰ میکروگرم به مدت ۴۲ روز، اسپرم‌های غیر

کردند اسپرم‌های نابالغ با باقیمانده سیتوپلاسمی و سر غیر طبیعی بیشترین میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژنی را تولید کرده و کمترین مقدار در اسپرم‌های بالغ دیده می‌شود [۲۷]. Aitken و همکاران نیز افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژنی توسط سلول‌های زاینده مردان را با کاهش کیفیت اسپرم مرتبط دانسته و حضور میزان پایین رادیکال‌های آزاد اکسیژنی برای عملکرد طبیعی اسپرم (شامل متراکم کردن DNA و تقویت ظرفیت پذیری) را ضروری می‌دانند ولی افزایش آن را نیز تهدیدی برای قطعه قطعه شدن DNA اسپرم گزارش نمودند [۲۸].

در بررسی‌های ایمونوهیستوشیمی بافت بیضه که به منظور شناسایی جایگاه لپتین و گیرنده آن در این مطالعه انجام شد، مشخص شد در گروه کنترل، لپتین روی غشای پایه و اغلب روی اسپرماتوسیت‌ها بیان شده ولی در بافت‌های بینابینی مشاهده نشد؛ در حالی که در گروه‌های آزمایشی بیان گیرنده لپتین در فضای بینابینی بالا بود. نتایج ایمونوهیستوشیمی تأییدی بر نتایج پارامترهای مورفولوژی و رادیکال‌های آزاد در گروه‌های آزمایشی و کنترل است. در گروه سوم (گروهی که ۱۵ روز تحت تیمار با لپتین قرار گرفتند)، افزایش میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژنی و همچنین بیشترین درصد نقص اسپرمی مشاهده شد که در بررسی ایمونوهیستوشیمی نیز، بیشترین بیان گیرنده لپتین در ناحیه بینابینی مشاهده شد. این نتایج، با یافته‌های آکوئلا (Aquila) و ایشیکاوا (Ishikawa) همسو است. Aquila و Ishikawa نیز افزایش بیان mRNA گیرنده لپتین را در زمان نقص اسپرمی در موش‌های صحرایی گزارش نموده‌اند [۲۹ و ۳۰]. گلاندر (Glander) و همکاران نیز حضور لپتین را در لوله‌های سمینی فروس بیماران نابارور گزارش

شده با لپتین به دنبال افزایش سطح FSH که با استروژن به صورت سینرژیک عمل می‌کند، اتفاق می‌افتد و همین طور که Zohdy و Pauli ، Hanafy در پژوهش‌های خود به آن اشاره کردند تغییر در سطح استروژن باعث نقص اسپرمی می‌شود.

دلیل دیگر افزایش اسپرم‌های غیر طبیعی در مطالعه حاضر افزایش سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژنی بود، رادیکال‌های آزاد اکسیژنی یکی از فاکتورهای مؤثر در ناباروری مردان از طریق تولید اسپرم‌های غیر طبیعی است، در مطالعه حاضر در سه گروه تیمار شده با لپتین، افزایش درصد رادیکال‌های آزاد در روز ۱۵، یعنی در زمانی که اسپرم‌ها به بلوغ کامل نرسیده بودند، مشاهده شد؛ در حالی که از روز ۱۵ تا انتهای دوره (۴۲ روز) میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژنی در گروه‌های آزمایشی کاهش پیدا کرد که می‌توان این کاهش را با افزایش قدرت دفاعی اسپرم بالغ در مقابل رادیکال‌های آزاد اکسیژنی توجیه نمود (با توجه اینکه دوره اسپرماتوزن در رت از سلول زایا تا اسپرماتید ۵۴-۵۲ روز است اما حداکثر بلوغ در رت حدود ۱۰۰ روز به طول می‌انجامد) [۲۵]. نتایج تحقیق حاضر با مطالعات کلارک، الرو و آیتکن (Aitken و Ollero، clark) همسو بود.

clark منبع اولیه اکسیژن فعال در مایع منی را خود اسپرماتوزوا می‌داند و در نمونه‌های با رادیکال‌های آزاد اکسیژنی بالا، افزایش اسپرم‌های با مورفولوژی غیر طبیعی و کاهش ظرفیت نفوذ اسپرم به داخل اووسیت را گزارش نمود [۲۶].

Ollero و همکاران آسیب ایجاد شده به وسیله رادیکال‌های آزاد اکسیژنی در اسپرم انسان را یکی از علل اصلی ناباروری مردان گزارش نمودند، این پژوهشگران بیان

و مدیریت بهتر این کار نیازمند تحقیق و مطالعه بیشتر است.

کرده‌اند [۳۱].

Bin و همکاران نقص اسپرماتوژنز را با افزایش بیان لپتین و گیرنده آن در بیضه رت‌ها مرتبط دانسته که این نتایج با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد [۳۲].

باتوجه به نقش لپتین در افزایش تعداد اسپرم و البته تأثیری که در ایجاد اسپرم‌های غیر طبیعی از طریق افزایش سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژنی ایفا می‌کند، در برنامه‌های باروری افراد چاق نابارور، کنترل سطح چرخش این هورمون در بدن و استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها ضروری به نظر می‌رسد

تقدیر و تشکر

این پروژه با حمایت مالی پژوهشگاه رویان صورت گرفته و بدین وسیله از مدیریت و همچنین از همفکری و همیاری صمیمانه کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های اسپرم بیولوژی، فلوسایتومتری، بافت‌شناسی و بخش حیوانات آزمایشگاهی پژوهشگاه در اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. **Richer S, Whittington K, Ford, WCL.** Confirmation of NADP Oxidase Activity in Human Sperm. J Report Fertile 1998; 21: Abstract 118.
2. **Bartha T, Sayed-ahmeda A, Rudas P.** Expression of leptin and its receptor in various tissues of ruminants. Domest Anim Endocrinol 2005; 29: 193-202.
3. **Balhorn R, Brewer L, Crozett M.** DNA condensation by protamine and arginine-rich peptide : analysis of toroid stability using single DNA molecules. Mol Reprod Dev 2000; 56:230-4.
4. **Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, McCann SM.** Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:1023-8.
5. **Zhang Y, Proenca P, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman J M.** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 1994; 372, 425-32.
6. **Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic T, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D, et al.** Receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. Nature Med 1996; 2: 585-9.
7. **Buyse M, Aparicio T, Guilmeau S, Goiott H, Sobhani I, Bado A.** Paracrineactions of the stomach- derived leptin. Med Sci 2004; 183-8.
8. **Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS.** Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. J Clin Invest 1997; 99: 391-5.
9. **Baratta M.** Leptin- from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. Med Sci Monit 2002; 8: 282-92.
10. **Block SS, Butler WR, Ehrhardt RA, Bell AW, van Amburgh ME, Boisclair YR.** Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. Endocrinology 2001; 171: 339-48.
11. **Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA.** Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil Steril 2003; 79:829-43.
12. **Haron MN, D'Souza UJ, Jaafar H, Zakaria R, Singh HJ.** Exogenous leptin administration decreases sperm count and increases the fraction of abnormal sperm in adult rats. Fertil Steril. 2010; 93: 322-4.
13. **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.
14. **Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, et al.** Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 1996; 137: 3144-7.
 15. **Bray G A, York DA.** Leptin and clinical medicine: a new piece in the puzzle of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2771-6.
 16. **Weigle D, Bukowski TR, Foster DC, Holderman S, Kramer J, Lasser G, et al.** Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. *J Clin Invest* 1995; 96: 2065-70.
 17. **Campfield L, Smith F, Guisez Y, Devos R, Burn P.** Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 1995; 269: 546-9.
 18. **Chehab FF, Lim ME, Lu R.** Correction of sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 1996; 12: 318-20.
 19. **Fombonne J, Charrier C, Goddard I, Moysse E, Krantic S.** Leptin-mediated decrease of cyclin A2 and increase of cyclin D1 expression: relevance for the control of prepubertal rat Leydig cell division and differentiation. *Endocrinology* 2007; 2126-37.
 20. **Tena-Sempere M, Barreiro ML.** Leptin in male reproduction: testis paradigm. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 188: 9-13.
 21. **Tena-Sempere M, Manna PR, Zhang FP, Pinilla L, González LC, Diéguez C, et al.** Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression. *J Endocrinol* 2001; 170: 413-23.
 22. **Hanafy S, Halawa FA, Mostafa T, Mikhael NW, Khalil KT.** Serum leptin correlates in infertile oligozoospermic males. *Andrologia* 2007; 39: 177-80.
 23. **Pauli EM, Legro RS, Demers LM, Kunselman AR, Dodson WC, Lee PA.** Diminished paternity and gonadal function with increasing obesity in men. *Fertil Steril* 2008; 90: 346-51.
 24. **Zohdy W, Kamal EE, Ibrahim Y.** Androgen deficiency and abnormal penile duplex parameters in obese men with erectile dysfunction. *J Sex Med* 2007; 4: 797-808.
 25. **Karl PI, Katz R, Daum F, Fisher SE.** 6-Mercaptopurine and spermatogenesis in the young rat. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 1569-73.
 26. **Clark IA, Hunt NH, Cowden WB.** Oxygen-Derived Free Radicals in the Pathogenesis of Parasitic Disease. *Adv Parasitol* 1986; 25, 1-44.
 27. **Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, et al.** Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 2001; 16: 1912-21.
 28. **Aitken RJ, Buckingham DW, West KM.** Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa: Analysis of the Cellular Mechanisms Involved in Luminol- and Lucigenin-Dependent Chemiluminescence. *J Cell Physiol* 1992; 151: 466-77.
 29. **Ishikawa T, Fujioka H, Ishimura T, Takenaka A, Fujisawa M.** Expression of leptin and leptin receptor in the testis of fertile and infertile patients. *Andrologia* 2007; 39, 22-7.
 30. **Aquila S, Gentile M, Middea E, Catalano S, Morelli C, Pezzi V, et al.** Leptin secretion by human ejaculated spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 4753-61
 31. **Glander HJ, Lammert A, Paasch U, Glasow A,**

- Kratsch J.** Leptin exists in tubuli seminiferi and in seminal plasma. *Andrologia* 2002; 34: 227-33.
32. **Chen B, Guo JH, Lu YN, Ying XL, Hu K, Xiang ZQ, et al.** Leptin and varicocele-related spermatogenesis dysfunction: animal experiment and clinical study. *Int J Androl* 2008; 32: 532-41.