DOI: 10.22092/VJ.2018.116711.1408
شماره ۱۱۹ تابستان ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی تاثیرات کوتاه و بلند مدت آندوتوکسمی القا شده با لیپوپلی ساکارید بر شاخص‌های اسپرمی موش‌های سوری

• امیر سعید صمیمی (نویسنده مسئول)
استادیار گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
• جلیل آبشناس
دانشیارگروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
• همایون بابایی
استاد گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
• علی زحمتکش
دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
• اویس جعفری
دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۲۶-۰۹-۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۱۳-۱۲-۱۳۹۶

Email: samimi@uk.ac.ir

چکیده

لیپوپلی‌ساکارید ساختار مهمی از دیواره خارجی باکتری‌های گرم منفی است. هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی اثرات کوتاه و بلند مدت آندوتوکسمی القا شده با لیپوپلی‌ساکارید باکتری اشریشیا کولی O55:B5 بر شاخص‌های اسپرمی موش‌های سوری است. از ۳۰ سر موش آزمایشگاهی نر بالغ نژاد سوری NMRI به‌ظاهر سالم، با وزن متوسط ۳۱-۲۷ گرم و سن حدود دو ماه استفاده شد. موش‌های سوری به‌طور تصادفی به دو گروه (در هر گروه ۱۵ سر) شاهد و بیمار تقسیم شدند. در آغاز مطالعه، به گروه شاهد ۰/۱ میلی‌لیتر سالین نرمال استریل و به گروه بیمار، ۰/۱ میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید با دوز ۶۷۵۰ میکروگرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. سه بار نمونه‌گیری به فاصله زمانی ۳، ۳۰ و ۶۰ روز پس از القای آندوتوکسمی صورت گرفت و در هر نمونه‌گیری، سلول‌های اسپرم اپیدیدمی پنج سر موش از هر دو گروه مورد ارزیابی قرار گرفتند. در گروه بیمار، ۳ و ۳۰ روز پس از القای آندوتوکسمی، کاهش معنی‌داری در تمامی شاخص‌های اسپرمی نسبت به گروه شاهد مشاهده شد که کمترین میزان این شاخص‌ها در روز ۳ پس از شروع مطالعه بود ($p < ۰/۰۰۱$). شصت روز پس از القای آندوتوکسمی همچنان شاخص‌های حرکت کلی و حرکت پیشرونده رو به جلو اسپرم‌ها اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد داشتند، به‌نحوی که در گروه بیمار، این دو شاخص همچنان به حالت طبیعی بازنگشته بودند. شرایط آندوتوکسیک، باعث ایجاد اختلال در سلول‌های اسپرم و روند اسپرم‌سازی، به‌خصوص در زمان پس از آن و حتی تا دو ماه یا تقریبا دو دوره اسپرماتوژنز پس از آن می‌شود.

کلمات کلیدی: آندوتوکسمی، اشریشیا کولی O55:B5، شاخص‌های اسپرمی، موش سوری

Veterinary Researches & Biological Products No 119 pp: 171-177

Evaluation of short and long-term effects of LPS-induced endotoxemia on mice sperm indices

By: Samimi, A.S., (Corresponding Author) Assistant Professor of Clinical Sciences Department, School of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Abshenas, J., Associated Professor of Clinical Sciences Department, School of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Babaei, H., Professor of Clinical Sciences Department, School of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Zahmatkesh, A., Graduat Student of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. and Jafari, O., Graduat Student of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Email: samimi@uk.ac.ir

Received: 2017-12-17 **Accepted: 2018-03-04**

Lipopolysaccharide (LPS) is part of the outer cell wall structure of gram-negative bacteria. The aim of this study was to investigate the short and long-term effects of LPS-induced endotoxemia from *Escherichia coli* O_{55}:B_5 on mice sperm indices. Thirty apparently healthy and sexually mature male NMRI mice aged 2 months and weighing averagely 27-31 gr were used in this study. Mices divided in to two groups of 15 mices; the control group and experimental group were received 0.1 steril normal sailin and 6750 µg kg-1 BW LPS by IP injection, respectively. Epididimal sperm sample were obtained from both testes of five cases in each group at 3, 30 and 60 day after induced endotoxemia. In experiment group, all sperm indices at 3rd and 30th day were significantly decreased in comparsion with the control group and the maximum reduction was seen after three day from induced endotoxemia ($P < 0.001$). Also, 60 day from endotoxemia, there were significantly differences between two groups of study in motility and progressive motility sperm indices and these indices were not return to the normal values. Endtoxemia condition has making destructive effects on sperm and spermatogenesis in short and long-term even during two months or about two times more than spermatogenesis duration.

Key words: Endotoxemia, *Escherichia coli* O_{55}:B_5, Sperm indices, Mice

مقدمه

لیپوپلی‌ساکارید ساختار مهمی از دیواره خارجی باکتری‌های گرم منفی است (۷). ورود لیپوپلی‌ساکاریدها به سیستم گردش خون را آندوتوکسمی می‌نامند، که یکی از عواقب آن شوک و نهایتا مرگ است (۵، ۱۸ و ۲۱). آندوتوکسمی از مهمترین علل مرگ و میر دام‌ها و به‌ویژه نوزادان در خلال ۲۴ ساعت اول پس از تولد است (۷). ناکارآمدی مغز استخوان در تولید گلبول‌های سفید خون، نقایص مادرزادی در کارآیی سیستم ایمنی، سرکوب سیستم ایمنی، مانند استفاده از داروهای کورتیکواستروئیدی و یا عدم دریافت آغوز کافی در ۲۴ ساعت آغازین پس از تولد، از جمله عوامل تضعیف کننده‌های سیستم ایمنی و بروز آندوتوکسمی است (۷). آندوتوکسین‌ها باعث بروز توکسمی و تب بالا شده که بدلیل آزادسازی واسطه‌های دفاعی بدن میزبان است و سرعت رهاسازی این واسطه‌ها و بروز علائم به سرعت و پخش عامل بیماری‌زا در بدن وابسته است. تظاهر بالینی آندوتوکسمی، حاصل تأثیر آن‌ها بر مونوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها است که در واقع، این سلول‌ها آغازگر سیستم پاسخ التهابی بدن محسوب می‌شوند. یکی از واسطه‌های التهابی که مسؤل بروز علائم به‌شمار می‌رود، فاکتور نکروزدهنده توموری آلفا (TNF-α) است که شدت بروز علائم با غلظت پلاسمایی این ترکیب نسبت مستقیم دارد (۱۷ و ۲۲). در خلال بیماری، آسیب به دیواره عروق نیز وارد شده و زمینه بروز خون‌ریزی را فراهم می‌سازد (۷). انعقاد درون عروقی منتشره یکی از اختلالات معمول در حالات شدید آندوتوکسمی است که غالبا به مرگ بیمار منتهی می‌شود (۱۴). این حالت به دلیل گردش موادی نظیر دیواره سلولی باکتری‌ها، کمپلکس‌های آنتی‌ژن ـ آنتی‌بادی و آندوتوکسین‌ها در خون بوده که آسیب لایه درونی دیواره عروق را باعث می‌شوند (۱۶). از پیامدهای این اختلال، چسبندگی پلاکت‌ها به هم و تشکیل ترومبوزهای پلاکتی درون عروق است. در ادامه این روند و با مصرف واسطه‌های انعقادی، حالت افزایش ظرفیت انعقادپذیری (Hypercoagulable state) به کاهش قابلیت انعقادپذیری خون (Hypocoagulation) تغییر می‌یابد و همراهی توأمان این وضعیت با فعال شدن سیستم فیبرینولیز می‌تواند علتی مهم در استعداد حیوان به

خونریزی (Hemorrhagic diathesis) باشد (۸ و ۱۴). درصورتی که بیمار پس از ابتلا به آندوتوکسمی از بین نرود، عوامل بیماری‌زا در بسیاری از ارگان‌های بدن از جمله در مفاصل، دریچه‌های قلب، مننژ، بیضه‌ها و چشم جایگزین شده و ضایعات بافتی شدیدی را ایجاد می‌کنند (۱۲).

بافت پوششی لوله‌های منی‌ساز از دو نوع سلول شامل سلول‌های سرتولی و سلول‌های زاینده یا سلول های جنسی در حال تقسیم تشکیل شده است. سلول‌های زاینده ضمن تقسیمات ممتد و تغییر شکل از کناره‌ی لوله به طرف بخش میانی منتقل می‌شوند. این مجموعه از تقسیمات را اسپرم‌زایی یا اسپرماتوژنز می‌نامند (۲). اسپرماتیدها طی مراحل و تغییراتی اسپرماتوزوئیدها را ایجاد می‌کنند. این تبدیل اسپرماتید را اسپرمیوژنز می‌گویند. تغییرات مذکور شامل متراکم شدن کروماتین هسته، ساخته شدن دم اسپرم، و تشکیل کلاهک است. کلیه این تقسیمات در موش سوری یعنی زمان تقریبی برای تبدیل اسپرماتوگونیوم به اسپرماتوزوئید، ۳۰ روز است (۵).

عوامل مختلفی می‌توانند باعث تخریب و اختلال در عملکرد بافت بیضه شوند (۱). از جمله این عوامل می‌توان به آندوتوکسین‌ها اشاره کرد. به طور کلی اندوتوکسین به صورت مستقیم در چند زمینه کاهش عملکرد تولیدمثلی جنس نر مؤثر است: ۱- تاثیر روی خود بیضه، ۲- تاثیر روی تعداد و ساختار و حرکت اسپرم‌های رها شده از بیضه به مایع منی، ۳- توانایی بارورسازی اسپرم‌ها، ۴- حرکت کلی اسپرم‌ها، ۵- تکامل جنین‌هایی که در شرایط لقاح طبیعی و یا در شرایط آزمایشگاهی ایجاد شده‌اند. عفونت‌های حاد یا مزمن دستگاه ادراری-تناسلی از مهمترین علل ناباروری در دام‌های نر می‌باشند (۱۵، ۱۸ و ۲۱). ممکن است که عفونت‌های حاد بتوانند بر روند تولید هورمون‌های استروئیدی در بافت بیضه موثر باشند (۱۷) و بدین ترتیب موجب اختلال در اسپرم‌زایی در بافت بیضه شوند یا موجب آزاد شدن اکسیژن فعال شده Reactive Oxygen Species (ROS) شده و از این طریق بر ساختار و عملکرد بافت بیضه تاثیر بگذارند (۶ و ۲۲). بروز شرایط التهابی در انسان و دام‌ها می‌تواند منجر به عوارض شدید در ارگان‌های مختلف بدن بشود (۷، ۱۷ و ۲۳). به‌خصوص در جنس نر این احتمال می‌رود که بروز شرایط آندوتوکسمی می‌تواند منجر به عوارض تولید مثلی و عقیمی شود (۴، ۶ و ۲۲). اهمیت تاثیر آندوتوکسین‌ها بر دستگاه تولید مثلی جنس نر در انسان (۲۰، ۲۲ و ۲۳)، خرگوش (۵)، قوچ (۲۱) و خوک (۱۳ و ۱۸) مورد تاکید قرار گرفته است. کاجیهارا و همکاران (۲۰۰۶) و جعفری و همکاران (۲۰۱۸) اثرات معنی‌دار القای آندوتوکسمی را بر مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوز) سلول‌های زاینده بافت بیضه، نقص در فعالیت اسپرماتوژنز و اختلال در استروئیدوژنز در موش‌ها را گزارش کردند (۱۱ و ۱۲). برکیا و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ از اثرات طولانی و کوتاه مدت آندوتوکسمی را در کیفیت اسپرم خرگوش مورد بررسی قرار داده‌اند (۵). بر اساس بررسی منابع انجام شده توسط نویسندگان، گزارشی مبنی بر اثرات مزمن (طولانی مدت) آندوتوکسمی بر روی کیفیت اسپرم در موش سوری منتشر نشده است. با توجه به اطلاعات محدودی که در مورد اثرات لیپوپلی‌ساکارید بر شاخص‌های اسپرمی موش‌ها وجود دارد، لذا هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی اثرات کوتاه و بلند مدت آندوتوکسمی القا شده با لیپوپلی‌ساکارید باکتری اشرشیاکولی $B_5:O_{55}$ بر شاخص‌های اسپرمی موش‌های سوری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۳۰ سر موش آزمایشگاهی نر بالغ، نژاد NMRI به‌ظاهر سالم با وزن متوسط ۳۱-۲۷ گرم و سن حدود ۱/۵ تا ۲ ماه خریداری شد. در مرحله اول حیوانات جهت تطابق با شرایط محیط به مدت دو هفته در محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی تحت مراقبت قرار گرفتند. در طول مطالعه در شرایط استاندارد و با استفاده از پلت‌های تجاری مخصوص (ساخت شرکت جوانه خراسان، مشهد، ایران) تغذیه شده و بصورت آزادانه به غذا و آب آشامیدنی دسترسی داشتند. شرایط نور (۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی) و دمای (۲۲ درجه سانتی‌گراد) کنترل شده درنظر گرفته شد. موش‌های سوری به‌طور تصادفی به دو گروه (در هر گروه ۱۵ سر) شاهد و بیمار تقسیم شدند. در آغاز مطالعه، به گروه شاهد ۰/۱ میلی‌لیتر سالین نرمال استریل و به گروه بیمار، ۰/۱ میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید (*Escherichia coli* $O_{55}:B_5$ lipopolysaccharide, Sigma-Aldrich, product No L2880) با دوز ۶۷۵۰ میکروگرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن (۱۱) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. در مطالعه جعفری و همکاران (۲۰۱۸) مشخص شد که تنها در دوز ۶۷۵۰ میکروگرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن، موش‌ها در شرایط آندوتوکسمی توانستند زنده بمانند و در تمامی دوزهای بالاتر از این مقدار، موش‌ها تلف می‌شدند (۱۱).

به‌منظور ارزیابی اثرات آندوتوکسین بر روی شاخص‌های اسپرمی، در زمان‌های ۳، ۳۰ و ۶۰ روز پس از شروع مطالعه، هر بار تعداد پنج سر موش به صورت تصادفی از هر گروه انتخاب، بی‌هوش (با دوز بالا و کشنده کتامین و زیلازین)، و بر اساس اصول اخلاقی کشته شدند. ابتدا ناحیه اسکروتوم باز، سپس بیضه (هر دو طرف) و اپیدیدیم آن‌ها خارج و جدا شدند. برای خروج و رهاسازی اسپرم‌ها، دم اپیدیدیم با استفاده از یک قیچی تیز در اندازه‌های کاملا یکسان و توسط یک فرد متخصص تکه تکه شده (۵) و هر یک به‌طور جداگانه‌ای درون لوله‌های فالکن حاوی یک میلی‌لیتر فسفات بافر سالین (pH =۷,۴ and ۲۹۵ = mOsm) ریخته شده، سپس درون آنکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد دی‌اکسیدکربن برای مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند تا اسپرم‌ها از داخل لومن اپیدیدیم به داخل محیط لوله فالکن انتقال پیدا کنند. به صورت کلی در روش ذکر شده، تمامی سلول‌های اسپرم، فارغ از زنده یا مرده بودن، سالم یا ناسالم بودن و متحرک یا غیر متحرک بودن از داخل لومن اپیدیدیم به داخل محیط لوله فالکن رها می‌شوند (از این به بعد، این سوسپانسیون به‌عنوان ظرف کار (یا همان Stock) در نظر گرفته شد). تعداد، حرکت کلی، حرکت پیشرونده رو به جلو و ثبات غشای پلاسمایی اسپرم‌های رها شده از لومن اپیدیدیم به محیط فالکن مورد ارزیابی قرار گرفت. تمامی مراحل آزمایشگاهی توسط یک فرد متخصص و در شرایط کاملا یکسان انجام شد. لازم به ذکر است، از آنجا که طول دوره‌ی اسپرماتوژنز در موش۳۰ روز است، در مطالعه‌ی حاضر بیشترین مدت مطالعه ۶۰ روز انتخاب شد. به عبارتی تا دو برابر بیشتر از طول دوره‌ی اسپرماتوژنز نیز ارزیابی ادامه یافت.

برای ارزیابی درصد حرکت کلی و حرکت پیشرونده رو به جلوی

اسپرم‌ها، یک قطره از نمونه فوق (سوسپانسیون حاوی دم اپیدیدیم و فسفات بافر سالین کاملا یکنواخت شده) برداشته و بر روی یک اسلاید میکروسکپ از پیش گرم شده در آنکوباتور (با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد در جهت جلوگیری از شوک حرارتی به اسپرم‌ها) قرار داده شد. سپس یک عدد لامل (از پیش گرم شده) با ابعاد ۲۲ در ۲۲ میلی‌متر بر روی اسلاید قرار داده شده و با استفاده از میکروسکوپ اینورت (Olympus co, Japan ,CKX۳۱) با بزرگنمایی ۴۰۰ مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت. تعداد اسپرم‌های دارای حرکت کلی و حرکت پیشرونده رو به جلو، به‌صورت درصد (٪) ثبت گردید (۱۷).

برای شمارش تعداد کل اسپرم‌ها، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون دم اپیدیدم و فسفات بافر سالین به لوله‌های اپندورف انتقال داده شده و سپس با ۹۹۰ میکرولیتر فسفات بافر سالین رقیق شد (حجم ساخته شده معادل ۱۰۰۰ میکرولیتر مساوی با یک میلی‌لیتر شد و همچنین ضریب رقت در این مرحله 10^{2} در نظر گرفته شد). بعد از مخلوط شدن کامل این سوسپانسیون، 10^{-4} میکرولیتر از سوسپانسیون فوق (به‌دلیل فضای مشخص و محدود شده) در سطح نئوبار ریخته شد (به همین جهت ضریب رقت در این مرحله نیز 10^{4} در نظر گرفته شد) و تعداد سلول‌های اسپرم با استفاده از خانه‌های لام نئوبار در زیر میکروسکپ نوری معمول شمارش شد (شکل ۱). تعداد خانه‌های بررسی شده، ۵ خانه لحاظ شد که از سلول‌های اسپرم شمارش شده در این ۵ خانه، میانگین گرفته شد (شکل۱). با توجه به اینکه تعداد کل خانه‌های موجود در قسمت مرکز لام نئوبار ۲۵ عدد بود، میانگین بدست آمده از ۵ خانه، در عدد ۲۵ ضرب شد. نهایتا اسپرم‌های شمارش شده در عدد 10^{6} ضرب شده (در مجموع ضرایب رقت) و در واحد میلی‌لیتر (به‌دلیل مجموع حجم ساخته شده در شروع روند رقیق‌سازی) بیان گردید (۲۲ و ۲۳).

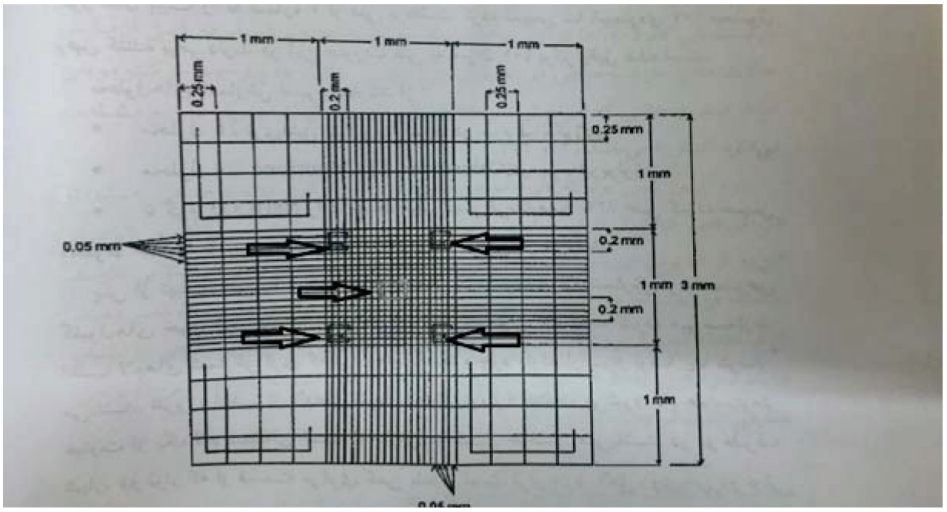
برای ارزیابی ثبات غشای پلاسمایی اسپرم‌ها از آزمایش HOS-WT (Hypoosmotic swelling-water test) استفاده گردید (۱۳ و ۱۹). برای انجام این آزمایش، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی اسپرم (شامل دم اپیدیدیم و فسفات بافر سالین) در ۴/. میلی‌لیتر آب دو بار تقطیرشده (در جهت تامین محیطی با اسمولاریته پایین)، ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه در آنکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس، یک قطره از نمونه فوق (اسپرم رقیق شده) بر روی یک صفحه اسلاید میکروسکپ گذاشته شده و بر روی آن لامل قرار داده شد و تغییرات ناحیه دم ۲۰۰ سلول اسپرم زیر میکروسکوپ فاز-کنتراست با بزرگنمایی ۴۰۰ بررسی شد. سلول‌های اسپرم سالم (بدون تغییرات تورمی و ساختاری در ناحیه دم)، شمارش شده و در واحد درصد (٪) ارائه گردید (۱۰ و ۱۶). لازم به ذکر است که تمامی مراحل آزمایشگاهی بالا توسط یک فرد متخصص انجام شد.

روش‌های آماری

با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ (SPSS for Windows, SPSS Inc., Chicago, Illinois)، برای مقایسه داده‌ها بین گروه‌ها و زمان‌های مختلف مورد مطالعه از روش آماری One Way ANOVA و تست تعقیبی توکی استفاده شد. سطح معنی‌داری آزمون نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

شاخص‌های اسپرمی مورد ارزیابی در جدول ۱ نشان داده شده است. گروه بیمار، ۳ روز پس از القای آندوتوکسمی کاهش معنی‌داری نسبت



شکل ۱- موقعیت خانه‌های (۵ خانه که با پیکان سیاهرنگ مشخص شده است) بررسی شده برای شمارش تعداد سلول‌های اسپرم در لام نئوبار (هماسیتومتر) و نحوه محاسبه حجم و فضای موجود در سطح آن که معادل 10^{-4} میلی‌لیتر در نظر گرفته می‌شود.

به گروه شاهد در بررسی شاخص تعداد کلی اسپرم‌ها نشان داد. در این شاخص، همچنان در روز ۳۰، تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه بیمار با گروه شاهد وجود داشت، اما در روز ۶۰، اختلاف آماری معناداری بین دو گروه مطالعه دیده نشد (که نشان می‌دهد تعداد کلی اسپرم‌ها در گروه بیمار طبیعی شده است). بین گروه شاهد و بیمار در زمان‌های ۳، ۳۰ و۶۰ روز پس از القای آندوتوکسمی، در شاخص حرکت کلی اسپرم‌ها اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت که کمترین میزان این شاخص در روز ۳ گروه بیمار دیده شد. در زمان ۳ ،۳۰ و۶۰ روز پس از شروع آزمایش بین گروه شاهد با گروه بیمار اختلاف آماری معنی‌دار در شاخص حرکت پیشرونده رو به جلوی اسپرم‌ها وجود داشت. در شاخص ثبات غشای پلاسمایی، بعد از ۳ و ۳۰ روز از آغاز مطالعه بین گروه شاهد با گروه بیمار اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت. اما در زمان ۶۰ روز پس از شروع آزمایش، بین گروه شاهد و بیمار از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشت.

در زمان‌های مختلف مطالعه، تغییرات آماری معنی‌داری در هیچ‌یک از شاخص‌های اسپرمی مورد ارزیابی در گروه شاهد دیده نشد. در گروه بیمار، تمامی شاخص‌های اسپرمی مورد ارزیابی به‌جز شاخص تعداد کلی اسپرم‌ها، در زمان‌های ۳، ۳۰ و ۶۰ روز پس از شروع آزمایش، روند افزایشی معنی‌داری داشت و در مورد شاخص تعداد کل اسپرم‌ها، تنها در روز ۶۰ افزایش معنی‌داری نسبت به زمان‌های ۳ و ۳۰ روز نشان داد (با سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵). اما بین روزهای ۳ و ۳۰ اختلاف معنی‌داری دیده نشد (جدول ۱).

بحث

مطالعات محدودی در رابطه با اثرات کوتاه مدت لیپویلی‌ساکاریدها بر روی بافت بیضه و اسپرم در موش ها وجود دارد (۱۱ و ۱۲). مطالعه حاضر به بررسی تاثیرات کوتاه و بلند مدت آندوتوکسمی القا شده با لیپوپلی‌ساکارید باکتری اشرشیاکولی B۵:O۵۵ بر شاخص های اسپرمی موش‌های سوری می‌پردازد. با وجود اندک بودن مطالعات انجام گرفته در این زمینه، بیان شده است که لیپوپلی‌ساکاریدها می‌توانند با عوارض مستقیم و غیر مستقیم خود باعث اختلال در فعالیت و عملکرد اندام‌ها و بافت‌های تولید مثلی جنس نر بشوند (۹ و ۱۵).

شاخص‌های اسپرمی مورد ارزیابی در جدول ۱ نشان داده شده است. در بررسی تمام شاخص‌های اسپرمی، ۳ و ۳۰ روز پس از القای آندوتوکسمی در گروه بیمار کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داد. کمترین میزان این شاخص‌ها در زمان ۳ روز پس از شروع مطالعه دیده شدکه نشان از اثر مستقیم و سریع لیپوپلی‌ساکارید بر روی رده-های پایینی سلول‌های اسپرم دارد که با سایر پژوهش‌ها در انسان (۳، ۱۵ و ۲۳)، خرگوش (۵)، موش (۳) و خوک (۱۸) همخوانی دارد. لیپوپلی ساکاریدها از طریق ایجاد کمپلکس با مولکول‌های چربی متصل‌شونده به پروتئین (Lipid Binding Protein (LBP)) به گیرنده‌های Toll-like درسطح سلول‌های موثر در سیستم ایمنی بدن متصل شده (۹) و منجر به ترشح و آزادسازی مولکول‌ها و عوامل موثر در شروع روند التهابی شامل انواع سیتوکین‌ها، اینترلوکین‌ها، فاکتور نکروزکننده آلفا، از سلول‌های دستگاه ایمنی بدن (از جمله ماکروفاژها، مونوسیت‌ها، لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و .....) می‌شود (۵ و ۲۳). با آغاز فرایند التهاب عمومی بدن، سندرم پاسخ التهابی سیستمیک (Systemic Inflammatory Response Syndrome) در مدت زمان کوتاه بروز کرده و روند آبشاری متعاقب آن شروع شده که در مرحله اول پس از آسیب به دیواره لایه

جدول ۱- شاخص‌های مورد ارزیابی (میانگین ± انحراف از معیار) در زمان‌ها و گروه‌های مختلف مورد مطالعه.

شاخص‌های اسپرمی مورد ارزیابی	گروه‌ها	زمان پس از شروع مطالعه (روز)		
		۳	۳۰	۶۰
تعداد کل (× ۱۰۶ در میلی لیتر)	شاهد	۷۵/۷۰±۱۲/۲۹	۷۶/۳۰±۱۲/۱۰	۷۶/۳۰±۱۱/۴۹
	بیمار	۵۱/۶۰±۱۲/۳۵*a	a۵۶/۴۰±۱۱/۶۷*	۷۵±۸/b۲۷
حرکت کلی (درصد)	شاهد	۸۶±۵/۱۶	۸۵±۴/۲۱	۸۶±۴/۵۹
	بیمار	۲۵/۳۰±۱۲/۸۴*a	۶۱/۸۰±۳/۱۱*b	۷۳/۱۰±۴/۳۸*c
حرکت پیشرونده رو¬ به جلو (درصد)	شاهد	۶۶±۵/۱۶	۶۶±۴/۸۷	۶۵/۷۰±۴/۲۴
	بیمار	۱۰±۸/۱۶*a	۴۱/۳۰±۳/۲۳*b	۵۲/۶۰±۴/۳۲*c
آزمایش ثبات غشای پلاسمایی (درصد)	شاهد	۴۴/۸۰±۱۱/۰۴	۵۱/۶۰±۴/۸۸	۵۱/۶۰±۴/۸۸
	بیمار	۲۶/۱۰±۲/۵۱*a	۴۲/۷۰±۵/۴۳*b	۵۰/۸۰±۹/۴۳*c

علائم متفاوت (a, b, c) در هر ردیف بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) در هر شاخص طی زمان‌های مختلف می‌باشد.

علامت (*)در ستون مربوط به هر شاخص بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) میان گروه شاهد و بیمار در همان شاخص می‌باشد.

اندوتلیال عروقی، افزایش نفوذپذیری و مسیر انعقاد داخل عروقی (Disseminate Intravascular Coagulation (DIC)) (به دلیل تاثیر اندوتوکسین‌ها بر روی فاکتورهای انعقادی) شکل گرفته (۸ و ۱۴) و در مرحله دوم ترومبوز عروقی (به‌دلیل شکل‌گیری کمپلکس‌های آنتی‌ژن-آنتی‌بادی و چسبندگی پلاکت‌ها) ایجاد شده که به‌دنبال آن کاهش خونرسانی به بافت‌های مختلف (Tissue hypoperfusion) از جمله بافت بیضه رخ می‌دهد. با کاهش خون‌رسانی به بافت بیضه، فعالیت تامین انرژی در میتوکندری‌ها (۱۵) واقع در قسمت گردن اسپرم‌ها مختل شده که منجر به اختلال در عملکرد آن و نقص در روند اسپرم‌سازی می‌شود (۸ و ۱۴). از سویی دیگر تشکیل کمپلکس لیپوپلی‌ساکارید، چربی متصل شونده به پروتئین و گیرنده‌های Toll-like به صورت مستقیم با اثر بر روی روند اسپرماتوژنز منجر به کاهش حرکت اسپرم‌ها و مرگ برنامه‌ریزی شده اسپرم‌ها و سلول‌های زاینده آن‌ها می‌شود (۹ و ۱۲).

التهاب‌های حاد یا مزمن دستگاه ادراری تناسلی از مهمترین علل ناباروری در دام‌های نر می‌باشند (۱۵ و ۱۸). ممکن است که التهاب‌های حاد بتوانند بر روند تولید هورمون‌های استروئیدی در بافت بیضه موثر باشند (۱۷) و بدین ترتیب موجب اختلال در اسپرم‌زایی در بافت بیضه نیز بشوند. یکی دیگر از عوامل آسیب رساننده سلول‌های اسپرم، رادیکال‌های آزاد (Free Radicals) شامل اکسیژن فعال‌شده (Reactive Oxygen Species (ROS)) و نیتروژن‌های فعال‌شده (Reactive Nitrogen Species) است (۶). لیپوپلی‌ساکاریدها باعث آزاد شدن اکسیژن‌های فعال شده می‌شوند که با اتصال به ساختار فسفولیپیدی غشای سلول‌ها، ناپایداری و ازهم گسستگی دیواره آن‌ها را به‌دنبال دارد (۲۲) و می‌توانند از این طریق نیز بر ساختار و عملکرد بافت بیضه تاثیر بگذارند (۶ و ۲۲). این اکسیژن‌های فعال شده از سویی منجر به آسیب به قسمت‌های مختلف دیواره سلول‌های اسپرم، سلول‌های زاینده آن‌ها و به‌دنبال آن اختلال در عملکرد آن‌ها شده و از سویی دیگر می‌تواند باعث آسیب به سلول‌های اندوتلیال عروقی بشود که در ادامه کاهش خونرسانی به بافت بیضه را درپی داشته باشد (۶). یافته‌های پژوهش حاضر نیز نشان می‌دهد که در ۳۰ روز پس از القای آندوتوکسمی، فعالیت و ساختار سلول‌های اسپرم همچنان به حالت طبیعی بازنگشته که یا نشان از تاثیر مستقیم لیپوپلی‌ساکارید بر رده پایینی اسپرم‌ها دارد و یا حاکی از آسیب به سلول‌های زاینده اسپرم‌ها در روز ۳ پس از شروع آزمایش است.

در زمان ۶۰ روز، در شاخص‌های حرکت کلی و حرکت پیشرونده رو به جلوی اسپرم‌ها اختلاف آماری معناداری بین دو گروه مطالعه دیده شد به‌نحوی که در گروه بیمار این دو شاخص مورد بررسی همچنان به حالت طبیعی بازنگشته بودند (جدول ۱). لیپوپلی ساکاریدها از دو قسمت زنجیره پلی‌ساکاریدی و لیپید A تشکیل شده است که قسمت لیپیدی، نقش سمی آن‌را بر عهده دارد. با توجه به ساختار لیپوپلی‌ساکاریدها و شکسته شدن و دفع تدریجی آن‌ها، غلظت سرمی آن‌ها به مرور کاهش یافته و به‌دنبال آن تاثیرات آن نیز کم‌تر می‌شود (۲۴). در قسمت بررسی مطالعه تاثیرات طولانی مدت پژوهش حاضر، نیمی از شاخص‌های اسپرمی در روز ۶۰ به حالت طبیعی بازنگشته که یا نشان از اثر غلظت پایین لیپوپلی‌ساکاریدها بخصوص بر روی قسمت دمی رده پایینی سلول‌های اسپرمی در روز ۶۰ بوده (چراکه حرکت اسپرم‌ها وابسته به حرکت‌های موجی تازک در قسمت دم است) و یا ناشی از اثر غلظت متوسط لیپوپلی ساکاریدها در روز ۳۰ بر روی سلول‌های زاینده اسپرم‌ها می‌باشد. برکیا و همکاران در سال ۲۰۱۰ از اثرات طولانی مدت و کوتاه مدت آندوتوکسمی بر کیفیت اسپرم خرگوش صحبت به‌میان آورده‌اند (۵). براساس بررسی منابع انجام شده توسط نویسندگان، گزارشی مبنی بر اثرات مزمن (طولانی مدت) آندوتوکسمی بر روی کیفیت اسپرم در موش سوری منتشر نشده است. لذا هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی اثرات طولانی مدت آندوتوکسمی القایی بواسطه لیپوپلی ساکارید باکتری اشرشیاکولی بر کیفیت اسپرم اپیدیدیمی است. در گروه بیمار، تمامی شاخص‌های اسپرمی مورد ارزیابی به‌جز شاخص تعداد کلی اسپرم‌ها، در زمان‌های ۳، ۳۰ و ۶۰ روز پس از شروع آزمایش، روند افزایشی معنی‌داری داشت و در مورد شاخص تعداد کل اسپرم‌ها، در زمان ۶۰ افزایش معنی‌داری نسبت به زمان های ۳ و ۳۰ روز نشان داد (با سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵). از مهمترین علل این مسئله می‌توان به کاهش تدریجی غلظت اندوتوکسین در خون اشاره داشت (۲۴).

نتیجه‌گیری کلی

اگرچه هنوز هم مکانیسم دقیق اثر لیپوپلی‌ساکاریدها بر شاخص‌های کیفی و کمی اسپرم‌ها مشخص نیست، ولی این نکته را نمی‌توان نادیده گرفت که بروز شرایط اندوتوکسیک، باعث ایجاد عوارضی در اسپرم و مکانیسم‌های اسپرم‌سازی، به‌خصوص در زمان پس از بروز آندوتوکسمی و حتی تا دو ماه یا تقریبا دو دوره اسپرماتوژنز پس از آن می‌شود. نتایج کلی حاصل از این تحقیق در مورد اثرات آندوتوکسمی با تک دوز بیان شده، می‌تواند بر پارامترهای کیفی و کمی اسپرم از قبیل تعداد، ثبات غشایی پلاسمایی، حرکت کلی و پیشرونده اسپرم‌ها تاثیرهای مضر داشته باشد. به‌نظر می‌رسد نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه برای مشخص شدن مکانیسم دقیق اثر اندوتوکسین‌ها است.

منابع مورد استفاده

1. Alavi, S.M. and J. Cosson. 2005. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International* 29: 101-110.

2. Ali, N.A., W.D. Jülich, C. Kusnick and U. Lindequist. 2001. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology* 74: 173-179.

3. Auroux, M.R., L. Jacques, D. Mathieu and J. Auer. 1991. Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: an in□vitro study in man with *Escherichia coli. International Journal of Andrology* 14: 264-270.

4. Biswas, B. and S. Yenugu. 2014. Transcriptional regulation of the rat sperm-associated antigen 11e (Spag 11e) gene during endotoxin challenge. *Molecular Genetics and Genomics* 289: 837-845.

5. Brecchia, G., R. Cardinali, E. Mourvaki, G. Collodel, E. Moretti, A. Dal Bosco and C. Castellini. 2010. Short-and long-term effects

of lipopolysaccharide-induced inflammation on rabbit sperm quality. *Animal Reproduction Science* 118: 310-316.
6. Collodel, G., E. Moretti, G. Brecchia, L. Kuželová, J. Arruda, E. Mourvaki and C. Castellini. 2015. Cytokines release and oxidative status in semen samples from rabbits treated with bacterial lipopolysaccharide. *Theriogenology* 83: 1233-1240.
7. Constable, P.D., K.W. Hinchcliff, S.H. Done and W. Gruenberg. 2017. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. Elsevier, USA.
8. Dolente, B.A., P.A. Wilkins and R.C Boston. 2002. Clinicopathologic evidence of disseminated intravascular coagulation in horses with acute colitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 220: 1034-1038.
9. Fujita, Y., T. Mihara, T. Okazaki, M. Shitanaka, R. Kushino, C. Ikeda, H. Negishi, Z. Liu, J.S. Richards and M. Shimada. 2011. Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 on human sperm recognize bacterial endotoxins and mediate apoptosis. *Human Reproduction* 26: 2799-2806.
10. Hishinuma, M. and J. Sekine. 2003. Evaluation of membrane integrity of canine epididymal spermatozoa by short hypoosmotic swelling test with ultrapure water. *Journal of Veterinary Medical Science* 65: 817-820.
11. Jafari, O., H. Babaei, R. Kheirandish, A.S. Samimi and A. Zahmatkesh. 2018. Histomorphometrical evaluation of mice testicular tissue following short- and long-term effects of lipopolysaccharide-induced endotoxemia. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 21: 47-52.
12. Kajihara, T., R. Okagaki, and Ishihara. 2006. LPS-induced transient testicular dysfunction accompanied by apoptosis of testicular germ cells in mice. *Medical Molecular Morphology* 39: 203-208.
13. Lechniak, D., A. Kedzierski and D. Stanislawski. 2002. The use of HOS test to evaluate membrane functionality of boar sperm capacitated in vitro. *Reproduction in Domestic Animals* 37: 379-380.
14. Levi, M., E. de Jonge and T. van der Poll. 2001. Rationale for restoration of physiological anticoagulant pathways in patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation. *Critical Care Medicine* 29: S90-94.
15. Li, Z., D. Zhang, Y. He, Z. Ding, F. Mao, T. Luo and X. Zhang. 2016. Lipopolysaccharide compromises human sperm function by reducing intracellular cAMP. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 238: 105-112.
16. Neild, D.M., M.G. Chaves, M. Flores, M.H. Miragaya, E. Gonzalez and A. Agüero. 2000. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia* 32: 351-355.
17. O'bryan, M.K., S. Schlatt, D.J. Phillips, D.M. de Kretser and M.P. Hedger. 2000. Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo. *Endocrinology* 141: 238-246.
18. Okazaki, T., T. Mihara, Y. Fujita, S. Yoshida, H. Teshima and M. Shimada. 2010. Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improves the quality of boar sperm during liquid storage and cryopreservation. *Theriogenology* 74: 1691-1700.
19. Rota, A., N. Penzo, L. Vincenti and R. Mantovani. 2000. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology* 53: 1415-1420.
20. Sanocka-Maciejewska, D., M. Ciupińska and M. Kurpisz. 2005. Bacterial infection and semen quality. *Journal of Reproductive Immunology* 67: 51-56.
21. Sokkar, S.M., G. Darwiesh, A. Madbooly and O.R. Kaaden. 2003. Study of the pathological effect of Escherichia coli endotoxin in rams. *Zoonoses and Public Health* 50: 226-230.
22. Urata, K., H. Narahara, Y. Tanaka, T. Egashira, F. Takayama and I. Miyakawa. 2001. Effect of endotoxin-induced reactive oxygen species on sperm motility. *Fertility and Sterility* 76: 163-166.
23. Yu, H., J. Dong, Y. Gu, H. Liu, A. Xin, H. Shi, F. Sun, Y. Zhang, D. Lin and H. Diao. 2013. The novel human β-defensin 114 regulates lipopolysaccharide (LPS)-mediated inflammation and protects sperm from motility loss. *Journal of Biological Chemistry* 288: 12270-12282.
24. Zachary, J.F. 2017. Pathologic basis of veterinary disease. Elsevier, USA.