Archive of SID

فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۹، جلد ۱۳، شماره۲، بهار ۹۹، صفحه۲۷ تا ۳۸
Qiaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

ارزیابی پارامترهای اسپرمی و سطح استرس اکسیداتیو در مردان نابارور آستنوتراتوزو اسپرمی تحت درمان با ان- استیل سیستئین

راحیل جنتی فر[۱]، کاظم پریور[۲]، محمد حسین نصر اصفهانی[۳]، نسیم حیاتی رودباری[۲]
۱- گروه پژوهشی بیولوژیتولید مل، واحد تحقیقات جهاد دانشگاهی، قم. ایران.
۲-دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی، تهران، ایران.kazem_parivar@yahoo.com
۳- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری تولید مثل، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش:۹۹/۱/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: مردان نابارور دارای سطوح بالاتری از گونه های فعال اکسیژن (ROS) نسبت به مردان بارور هستند. سطح بالای ROS در اسپرم می تواند باعث اختلال در عملکرد اسپرم، آسیب DNA اسپرم و کاهش توان تولید مثلی در مردان شود. در این مطالعه اثر ان- استیل سیستئین(NAC) برمیزان کیفیت اسپرم، سلامت کروماتین، سطح استرس اکسیداتیو(ROS) و هم‌چنین ارتباط بین پارامترهای اسپرم در افراد آستنوتراتوزو اسپرمی بررسی شده است.

روش کار: این مطالعه در مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم، انجام شد. بیماران، شامل ۵۰ مرد نابارور مبتلا به آستنوتراتوزوسپرمی بودند که به مدت ۳ ماه به صورت خوراکی(۶۰۰ میلی گرم در روز) ان - استیل سیستئین دریافت کردند. پس از درمان پارامترهای اسپرم براساس سازمان بهداشت جهانی ۲۰۱۰، سلامت کروماتین به روش TUNL و کرومایسین A3 و میزان استرس اکسیداتیو با رنگ آمیزی H2DCFDA در اسپرم با وضعیت پیش درمان مقایسه شدند.

یافته‌ها: بعد از درمان با ان- استیل سیستئین، پارامتر های اسپرمی یافت($P<0/05$). میزان قطعه قطعه شدن DNA و کمبود پروتامین در مقایسه با قبل از درمان، کاهش داشته است($P<0/05$). سطح استرس اکسیداتیو به طور معنا داری نسبت به قبل از درمان کاهش یافت. ارتباط معنی داری بین سطح ROS، تحرک و مورفولوژی غیر طبیعی در اسپرم ها مشاهده شد($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: تجویز ان - استیل سیستئین می تواند پارامترهای اسپرم و وضعیت اکسید کننده / آنتی اکسیدانی را در مردان نابارور بهبود بخشد.

واژه‌های کلیدی: ناباروری، ان- استیل سیستئین ، استرس اکسیداتیو ،آستنو تراتوزو اسپرمی.

مقدمه

ناباروری به عنوان عدم توانایی بچه دار شدن پس از ۱ سال مقاربت بدون جلوگیری توسط زوجین در سن تولیدمثلی می باشد. براساس گزارشات سازمان بهداشت جهانی (WHO) ٪۱۵ زوج ها درگیر مشکل ناباروری بوده که در این میان نسبت کل ناباروری با علت مردانه (Male factor) حدود ۴۶٪ می باشد(۲۳). یکی از مهم‌ترین دلایل ناباروری مردان اثرات منفی ناشی از استرس اکسیداتیو می‌باشد. اسپرم بسیار مستعد ابتلاء به استرس اکسیداتیو است زیرا غشاء سلولی آن غنی از اسید های چرب غیر اشباع بوده و در نتیجه بیشتر در معرض آسیب های القاء شده توسط اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی قرار می گیرد(۲۲). علاوه بر این اسپرم بالغ به دلیل از دست دادن بخش زیادی از سیتوپلاسم خود طی فرآیند اسپرماتوژنز، فاقد آنزیم های سیتوپلاسمیک و مکانیسم های دفاعی آنتی اکسیدانی می باشد(۲۳). عامل اصلی ایجاد استرس اکسیداتیو تولید بیش از حد گونه های واکنشی اکسیژن

www.SID.ir

Archive of SID

(Reactive Oxigen Species) یا ROS می باشد که به عنوان عامل مخرب و آسیب رسان به سلول ها و بافت ها شناخته شده است(۱). استرس اکسیداتیو زمانی رخ می – دهد تولید ROS بیش از مکانیسم های دفاعی آنتی اکسیدانی طبیعی بدن باشد و باعث صدمه به بیومولکول‌ها مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA می‌شود. شواهد نشان می‌دهند که در حال حاضر آسیب اسپرم به واسطه ROS یک آسیب شناسی مشترک معنی دار در ۳۰–۸۰ درصد از موارد است(۲). اتیولوژی آسیب DNA اسپرم چند عاملی است: ممکن است به دلیل عوامل داخلی(به عنوان مثال کمبود پروتامین، سطوح گونه های فعال اکسیژن اضافی و آپوپتوزیس)، و یا عوامل خارجی شامل داروها، شیمی درمانی، سیگار کشیدن، التهاب دستگاه تناسلی، افزایش دمای بیضه(مثلاً حمام گرم، سونا و مشاغل جوشکاری، نانوایی، رژیم غذایی بد، استفاده از الکل، چاقی، رانندگی طولانی مدت و واریکوسل) باشد(۱۲). افراد نابارور دارای آستنوتراتواسپرمی(کاهش تحرک و مورفولوژی اسپرم) تحت درمان به روش IVF یا ICSI به علت آسیب شدید اسپرم، جنین‌های حاصله از کیفیت مناسبی برخودار نبوده و در صورت انتقال این جنین‌ها میزان حاملگی در آنان نسبت به افراد با آسیب کمتر اسپرم، کاهش می‌یابد و این خانواده‌ها به علت هزینه‌های درمانی سنگین، با مشکلات روحی – روانی زیادی دست به گریبان هستند(۱۲). بنابر این، بررسی آسیب‌های DNA اسپرم مخصوصاً در مردان نابارور می‌تواند به استراتژی های درمانی جدید کمک نماید و میزان موفقیت روش های کمک باروری (ART) را افزایش دهد (۲۱) .استراتژی درمانی با استفاده از آنتی اکسیدان ها به دو روش انجام میگیرد۱) خوراکی (Oral) برای مدت چند ماه قبل از شروع سیکل ART. ۲) In Vitro که به صورت مکمل در داخل محیط کشت در طی پروتکل ART. این دو روش استفاده از آنتی اکسیدان ها به ترتیب باعث به حداقل رساندن منابع درونی (Endogenous) و بیرونی (Exogenous) تولید کننده ROS می شوند. بنابر این آنتی اکسیدان ها در ART نقش مهم و کلیدی بازی می کنند به طوری که در مردان نابارور تحت درمان با روش های IVF یا ICSI ، سطوح بالای ROS سمینال با مورفولوژی اسپرم، میزان زنده مانی اسپرم و درصد لقاح رابطه منفی نشان داد در حالی که سطوح آنتی اکسیدان سمینال همبستگی مثبتی با میزان لقاح داشت(۳). ان- استیل سیستئین(NAC) از مشتقات پایدار اسید امینه سیستئین است که گروه تیول این ماده اثر آنتی اکسیدانی داشته و قادر به خنثی سازی رادیکال های آزاد است (۱۰). محققان بر این باورند که عمل آنتی اکسیدانی ان – استیل سیستئین از توانایی آن در تحریک سنتز GSH منشا می گیرد و سطح GSH درون سلولی را حفظ می‌کند و سبب پالایش ROS می شود. ان – استیل سیستئین به سرعت د- استیله شده و به سیستئین تغییر می کند. بنابراین، ممکن است با فراهم کردن سوبسترای سنتز GSH سطح GSH را افزایش دهد(۱۳، ۱۰). در واقع به عنوان یک عامل مهم در حفاظت از ساختمان بیولوژیکی سلول ها در برابر رادیکال های آزاد محسوب می گردد(۴). مطالعه محققی به نام Halil Ciftci و همکارانش در سال(۲۰۰۹) بر روی ان – استیل سیستئین به عنوان یک آنتی اکسیدان بر بیماران اولیگوزو اسپرمی نشان داد که سه ماه پس از مصرف ۶۰۰ mg/kg/day از این دارو به طور روزانه باعث افزایش تحرک و هم‌چنین کاهش وزیسکوزیته در این بیماران گردید. در ادامه تحقیق مشخص گردید که میزان ROS در سطح سرمی کاهش یافت(۷). بنابراین هدف از این مطالعه بررسی میزان کیفیت اسپرم(پارامترهای اساسی اسپرم)، سلامت کروماتین، سطح استرس اکسیداتیو و هم- چنین ارتباط درصد ROS با پارامترهای اسپرمی می باشد که در مردان نابارور آستنوتراتوزومی پس از درمان با NAC مورد بررسی قرار می گیرد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش ها

نوع مطالعه حاضر، کاربردی است. پس از تأئید طرح در کمیته اخلاقی، رضایتنامه آگاهانه اخذ و اطلاعات بیماران(نام، نام خانوادگی، سن، مدت زمان ازدواج و غیره) به صورت محرمانه نگهداری شد. این مطالعه به روش مورد شاهدی است که با نمونه گیری تصادفی از بین ۵۰ بیمار مرد نابارور(آستنوتراتوزواسپرمی) در محدوده سنی ۲۰-۴۰ سال که توسط پزشک متخصص اورولوژیست تایید شده و برای درمان به مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم مراجعه کردند، انتخاب شدند. مردانی که دارای واریکوسل، سابقه جراحی واریکوسل، بیماری سیستمیک و یا در حال مصرف دارو برای بیماری سیستمیک، سابقه شیمی درمانی یا پرتو درمانی، مشکلات آناتومیکی در اندام تناسلی از جمله آتروفی بیضه، تعداد کم اسپرم(الیگو) یا آزوسپرمی، درمان با آنتی آندروژن یا آندروژن یا تستوسترون، درمان با مهار کننده های آروماتاز یا آنتی استروژن، درمان با داروهای ضد افسردگی باشند، از مطالعه حذف شدند. افراد مورد مطالعه ان- استیل سیستئین را با تجویز پزشک روزانه سه قرص(NAC) به صورت ۲۰۰ میلی گرم روزانه، به مدت سه ماه مصرف کردند گروه کنترل همین بیماران قبل از مصرف دارو می باشند. نمونه مایع منی این افراد قبل و بعد از مصرف داروی NAC در فاصله ۳-۴ پس از مقاربت جنسی جمع آوری شد. هر نمونه پس از ارسال به آزمایشگاه، مدت ۲۰ دقیقه برای مایع شدگی در دمای اتاق (Liquefaction) قرار گرفت. سپس آنالیز مایع منی بر اساس استانداردها و معیارهای سازمان بهداشت جهانی (۸)، به صورت دستی مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان آسیب DNA از طریق روش TUNEL، بررسی میزان پروتامین از طریق رنگ آمیزی CAM3 و سطح استرس اکسیداتیو به روش رنگ آمیزی H2DCFD انجام گرفت.

این پژوهش در مرکز کارآزمایی بالینی با کد IRCT20170830035998N4 ثبت شده است .

ارزیابی پارامترهای اسپرمی

جهت بررسی پارمترهای اسپرمی(غلظت، تحرک و مورفولوژی) با استفاده از میکروسکوپ نوری و بر اساس سازمان استاندارد جهانی(۲۰۱۰) صورت گرفت. شمارش اسپرم ها از بر حسب میلیون بر لیتر توسط لام نئوبار انجام شد. بررسی میزان تحرک اسپرم ها بر اساس (WHO2010) اندازه گیری شد. درصد تحرک کل اسپرمی باید کمتراز ۴۰٪ و حرکت پیشرونده (a+b) کمتر از ۳۲٪ باشد .برای بررسی مورفولوژی نرمال اسپرم ها از روش رنگ آمیزی پاپانیکولا استفاده شد(۸). در رنگ آمیزی پاپانیکولا، سر به رنگ آبی و قطعه میانی به رنگ قرمز یا صورتی در می آید. جهت بررسی مورفولوژی اسپرم، ابتدا از هر نمونه گسترش تهیه شد سپس به صورت یک جا رنگ آمیزی پاپانیکولا انجام شد. برای هر نمونه یک لام فیکس شده از اسپرم تهیه گردیده و پس از رنگ آمیزی ۲۰۰ اسپرم توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰X بررسی شد.

ارزیابی آسیب DNA با روش TUNEL

میزان آسیب DNA با استفاده ازروش TUNEL (Apoptosis Detection SystemFluorescein, Promega, Mannheim, Germany) بررسی گردید. ابتدا مایع منی دوبار با بافر فسفات سالین =PBS Phosphate Buffer Saline شستشو داده شده و پس از تهیه اسمیر بر روی لام و فیکس با پارافرمالدهید ۴% ، در معرض هوا خشک می شود. کیتTUNEL شرکت پرومگا(آلمان)خریداری شد و طبق دستور العمل آن، اسلایدها رنگ آمیزی شدند .در این روش، رنگ فلئورسنت توسط آنزیمrTdT به انتهای قطعات شکسته DNA اتصال می یابد وDNA ، fluorescein-12-dUTP نشان دار می کند. رنگ سبز فلوئورسنت مشاهده شده در ناحیه خلفی سر اسپرم نشانگر اسپرم ها با آسیب DNA

www.SID.ir

Archive of SID

رنگ قرمز نشانگر اسپرم ها با DNA سالم هستند. در هر نمونه در حدود ۵۰۰ اسپرم با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنت (BX51, Olympus, Japan) با بزرگنمایی ۱۰۰ بررسی گردید.

ارزیابی کمبود پروتامین :رنگ آمیزی کرومایسین A3

کرومایسین A3 به عنوان یک فلوروکروم در سایتو ژنتیک استفاده می شود. از آن جایی که این ماده به طور خاص به نواحی غنی از گوانین – سیتوزین اتصال یافته و با جایگاه های مشابه پروتامین در DNA رقابت می کند، بنابراین شدت رنگ CAM3 بیانگر کمبود پروتامین در اسپرم می باشد. این تکنیک مشخص کننده نقص در بسته بندی کروماتین، بلوغ هسته و متراکم شدن هسته است. در این روش شستشوی مایع منی با PBS توسط سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه انجام می شود سپس،۵۰ میکرولیتراز اسپرم های را با ۵۰ میکرولیتر محلول فیکساتیو کارنوی(متانول + اسید استیک) در حرارت ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه فیکس و سپس ۳۰-۲۰ میکرولیتر ازاسپرم های فیکس شده روی لام قرار داده اسمیر تهیه می گردد. لام در دمای اتاق خشک شده.۱۰۰-۷۰ میکرولیتر محلول کرومایسین A3 روی لام در محیط تاریک به مدت ۲۰ دقیقه قرار می گیرد. آنالیز میکروسکوپی لام ها با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنت Olympus (BX51,Tokyo,Japan) و با استفاده از فیلترهای ۲۰±۵۲۰ نانومتر و ارزیابی ۵۰۰ اسپرم در هر لام و بررسی کمبود پرو تامین در هر بار در نمونه ها انجام گرفت. در ضمن بررسی هر فیلد نباید بیش از ۴۰ ثانیه طول بکشد. درصد اسپرم های با رنگ زرد درخشان به عنوان $CMA3^+$ محاسبه شد(اسپرم های $CMA3^+$ اسپرم هایی است که کمبود پروتامین دارند).

ارزیابی سطح استرس اکسیداتیو (ROS)

در این مطالعه ارزیابی اسپرم های ROS مثبت با استفاده از رنگ H2DCFDA (2', 7'- DA: DCFH) dichlorodihydrofluoresceindiacetat(شرکت Sigma Co, USA) و آنالیز با دستگاه فلوسایتومتری انجام شد. این نشانگر، حساسیت بالایی نسبت به H2O2 دارد. همان طور که قبلاً در مطالعه کیانی و همکاران(۱۴) توضیح داده شده است رنگ به طور فعال به سلول وارد شده و با عمل استراز سلولی، گروه های دی استات از هم شکافته شده و ترکیب غیر فلوئورسنت DCFH تشکیل می شود. در حضور پراکسید هیدروژن رنگ DCF به DCFH اکسید می شود و رنگ فلوئورسنت سبز از خود ساطع می کند. این ترکیب قادر به خروج از سلول نیست و با دستگاه فلوسایتومتری قابل ارزیابی است.

تحلیل آماری

داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ۲۱ آنالیز شدند. در این آنالیز از آزمون آماری paired sample Test و محاسبه ضریب همبستگی پیرسون استفاده شده و P-value< ۰/۰۵ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

ابتدا خصوصیات بالینی بیماران مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت که در جدول ۱ نشان داده شده است. در تجزیه و تحلیل داده ها، هیچ تفاوت معنی داری از نظر شاخص توده بدنی(BMI) در گروه درمانی با NAC در مقایسه با قبل از مصرف دارو وجود نداشت(P > ۰/۰۵) .

جدول۱-مقایسه میانگین شاخص توده بدنی قبل و بعد ازدرمان با NAC در فاصله سنی مردان نابارور آستنو تراتوزو اسپرمی(بین ۴۰-۲۵ سال)

فاکتور اندازه گیری شده	تعداد	قبل از درمان NAC	بعد از درمان NAC	P-value
شاخص توده بدنی	۵۰	۲۹/۱±۱۹/۶۶	۲۹/۱۳± ۱/۶۳	P>۰/۰۵

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه پارامترهای اسپرمی قبل و بعد از درمان با NAC

حجم نمونه مایع منی قبل از درمان با NAC، ۰/۸۸ ± ۳/۵۸ بود که بعد از درمان به۱/۳۲± ۴/۰۲ افزایش یافت(P<۰/۰۵). میانگین غلظت اسپرم قبل از درمان ۵/۸۰±۴۶/۵۲ و بعد از درمان ۶/۵۱±۵۴/۰۶ گزارش شد(P<۰/۰۵). میزان تحرک کل اسپرم ها و تحرک پیشرونده اسپرمی بعد از درمان نسبت به قبل افزایش معنی داری را نشان می دهد(P<۰/۰۵ . درصد ناهنجاری های مورفولوژی اسپرم که در شکل(۴-۱) نشان داده شده است قبل از درمان با NAC، ۱/۶۶ ±۹۸/۱۲ بود که به ۱/۱۶± ۹۴/۲ کاهش یافت که از لحاظ آماری معنی دار است(P<۰/۰۵).

مقایسه سلامت DNA قبل و بعد از درمان با NAC

نمودار ۱ نشان دهنده درصد آسیب DNA به روش TUNEL است که بعد از مصرف داروی آنتی اکسیدان NAC به طور معنی داری کاهش یافته است (۱۴/۳۴±۱۵/۱ vs. ۲/۴۷ ۳۴/۱۹±)(P<۰/۰۵). در روش TUNELکه با میکروسکوپ فلوئورسنت میزان DNA Fragmentation اندازه گیری شده است درصد اسپرم-هایی که بالاتر از ۱۵ ٪ DFI را نشان داده اند غیر طبیعی می باشند. در این تکنیک اسپرم های با حضور آسیب DNA توسط ماده فلوئورسنت به رنگ سبز قابل مشاهده است(شکل۱).

مقایسه کمبود پروتامین قبل و بعد از درمان با NAC

محتوای کمبود پروتامین طبیعی در گروه درمانی قبل از مصرف دارو ۱/۰۹ ± ۴۷/۳۳ بوده و بعد از مصرف دارو ۱/۲۸± ۴۲/۷۷ می باشد که اختلاف میانگین مشاهده شده معنی دار است(P<۰/۰۵). کرومایسین A3 (CMA3) به عنوان یک فلوروکروم در سایتو ژنتیک استفاده می شود. از آن جایی که این ماده به طور خاص به نواحی غنی از گوانین – سیتوزین اتصال یافته و با جایگاه های مشابه پروتامین در DNA رقابت می کند، بنابراین شدت رنگ CAM3 بیانگر کمبود پروتامین در اسپرم می باشد. این تکنیک مشخص کننده نقص در بسته بندی کروماتین، بلوغ هسته و متراکم شدن هسته است. درصد اسپرم های با رنگ زرد درخشان به عنوان+CMA3 محاسبه شد. اسپرم-های+ CMA3 اسپرم هایی است که کمبود پروتامین دارند.

مقایسه سطح ROS قبل و بعد از درمان با NAC

کاهش معنی داری در میزان و سطح استرس اکسیداتیو(ROS) در اسپرم افراد نابارور آستنوتراتوزو اسپرمی بعد از مصرف داروی NAC مشاهده شد. سطح استرس اکسیداتیو با استفاده از رنگ آمیزی DCFH-DA و تکنیک فلوسایتومتری اندازه گیری شد که نشان داده شده است که سطح ROS از(۲/۸۹±۳۴/۵۵) به(۳/۶۸±۲۶/۲۲) کاهش یافت(P<۰/۰۵)(نمودار۳).

مقایسه ارتباط میزان سطح استرس اکسیداتیو و پارامترهای اسپرمی

آزمون همبستگی پیرسون مشخص کرد که بین میزان سطح ROS و میزان تحرک و مورفولوژی اسپرم ها ارتباط معناداری می تواند وجود داشته باشد. نتایج حاصل از همبستگی در جدول۳ آمده است. این آزمون نشان می‌دهد که بین میزان سطح ROS و درصد تحرک اسپرم رابطه معکوس معنادار وجود دارد، هم چنین بین میزان سطح ROS و درصد مورفولوژی غیرنرمال اسپرم همبستگی مستقیم معنادار وجود دارد.

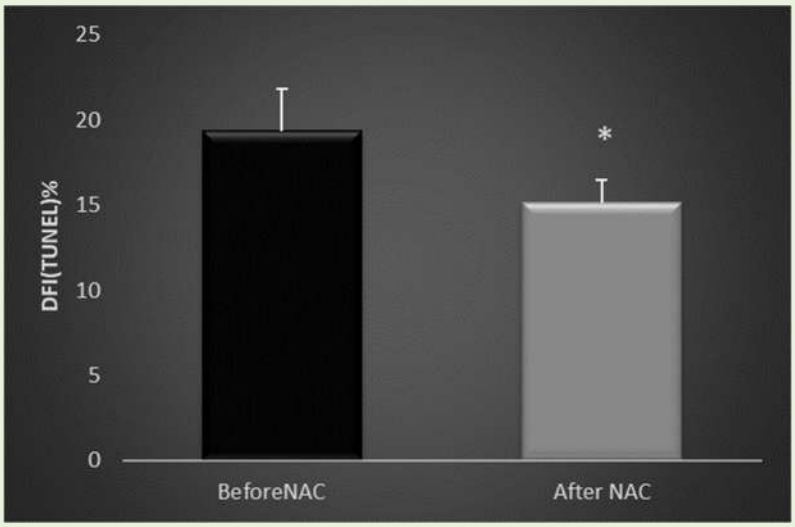
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲-مقایسه پارامترهای اسپرمی قبل و بعد از درمان با NAC

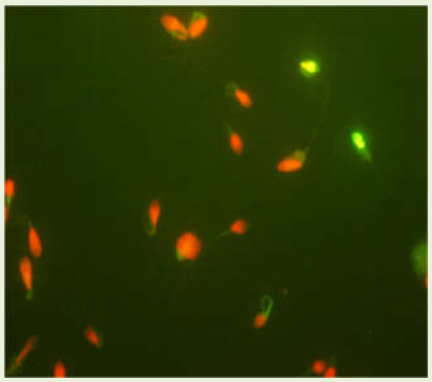
فاکتور اندازه گیری شده	قبل از درمان NAC	بعد از درمان NAC	P-value
حجم(ml)	۳/۵۸ ± ۰/۸۸	۴/۰۲ ۱±/۳۲	P<۰/۰۵
غلظت اسپرمی($10^6\times$)	۴۶/۵±۵۲/۸۰	۵۴/۶±۰۶/۵۱	P<۰/۰۵
تحرک کل اسپرمی(%)	۳۶/۵±۴۲/۲۰	۴۵۸/۱۸±۵/۹۱	P<۰/۰۵
تحرک پیشرونده اسپرمی(a+b)(%)	۲۰/۱±۶۰/۸۱	۲۴/۱±۵۴/۶۳	P<۰/۰۵
مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم(%)	±۱۲/۹۸ ۱/۶۶	۹۴/۲ ۱±/۱۶	P<۰/۰۵

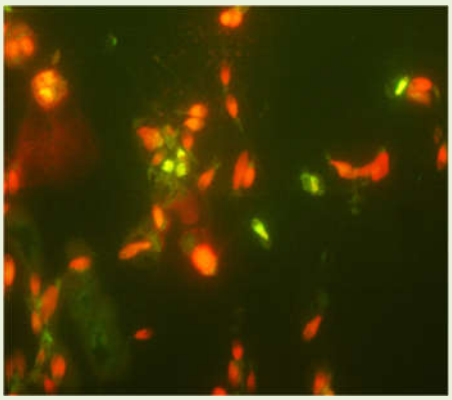
تفاوت معنی داری بین قبل و بعد از درمان NAC در پارامترهای اسپرمی مشاهده شد که از لحاظ آماری معنی داراست (P<۰/۰۵).



نمودار ۱- بررسی میزان آسیب DNA به روش TUNEL قبل و بعد از درمان با NAC .

میزان DNA Fragmentation بعد از مصرف داروی NAC به طور معنی داری کاهش یافته است(p<۰/۰۵).



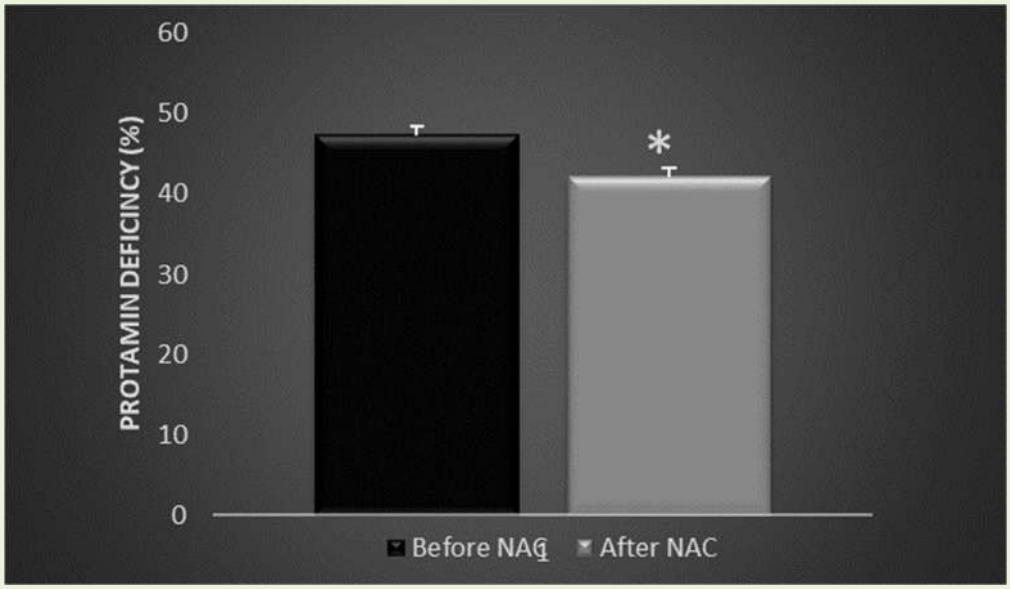


A **B**

شکل۱- بررسی میزان شکست DNA در اسپرم با انجام روشTUNEL . در شکل A میزان شکست DNA قبل از درمان با NAC را نشان می دهد و در شکل B میزان شکست DNA بعد از درمان با NAC است(رنگ سبز فلوئورسنت نشان دهنده اسپرم هایی با آسیب DNA می باشد).

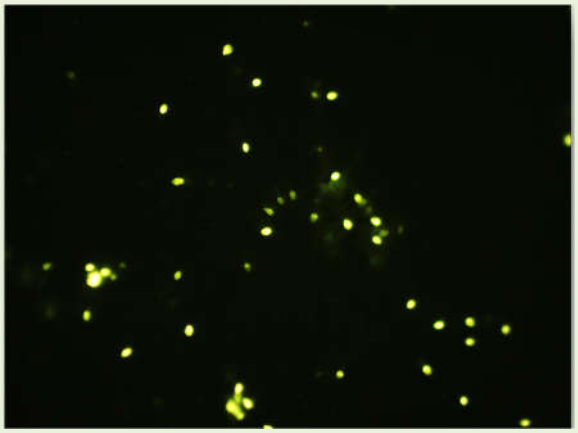
www.SID.ir

Archive of SID

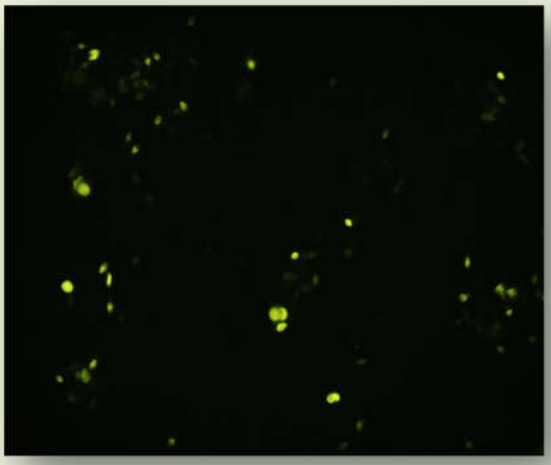


نمودار۲- بررسی میزان کمبود پروتامین قبل و بعد از مصرف NAC. .

این نمودار نشان می دهد که بعد از درمان با NAC میزان کمبود پروتامین کاهش یافته است (P<۰/۰۵).



A



B

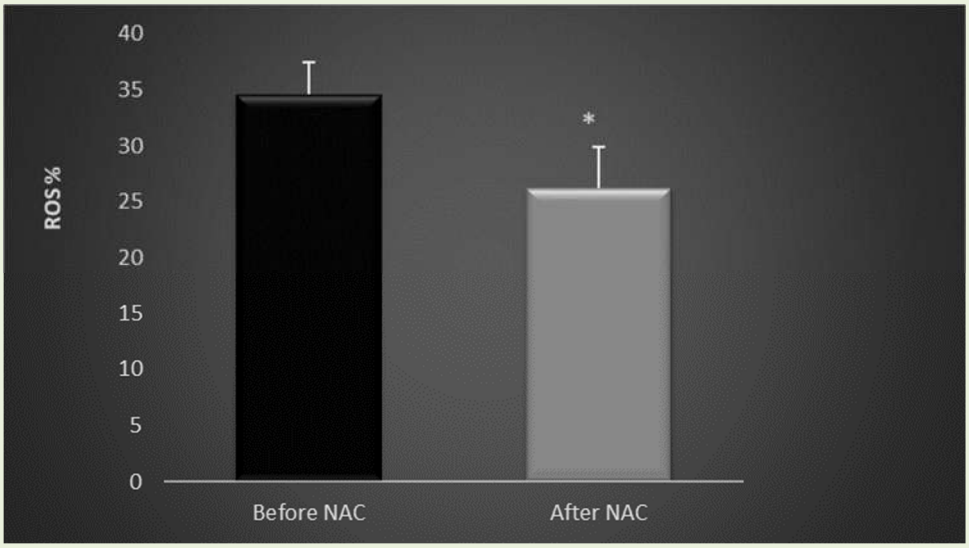
شکل۲-بررسی کمبود پروتامین با رنگ آمیزی کرومایسین A 3: اسپرم ها با رنگ زرد فلوئورسنت درخشان در ناحیه خلفی سر مثبت CMA3+نشانگر اسپرم ها با کمبود پروتامین است .سر منفی نشانگر اسپرم ها با -CMA3 رنگ زرد کمرنگ پروتامین طبیعی هستند .در شکل A میزان کمبود پروتامین قبل از درمان با NAC را نشان می دهد و در شکل B میزان کمبود پروتامین بعد از درمان با NAC است.

مقایسه ارتباط میزان سطح استرس اکسیداتیو و پارامترهای اسپرمی

آزمون همبستگی پیرسون مشخص کرد که بین میزان سطح ROS و میزان تحرک و مورفولوژی اسپرم ها ارتباط معناداری می تواند وجود داشته باشد. نتایج حاصل از همبستگی در جدول۳ آمده است. این آزمون نشان می‌دهد که بین میزان سطح ROS و درصد تحرک اسپرم رابطه معکوس معنادار وجود دارد ،هم‌چنین بین میزان سطح ROS و درصد مورفولوژی غیرنرمال اسپرم همبستگی مستقیم معنادار وجود دارد.

www.SID.ir

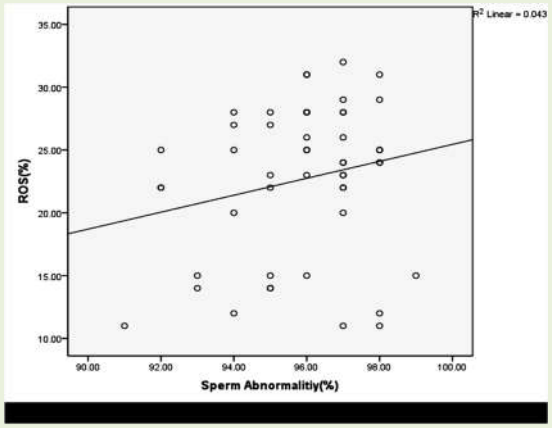
Archive of SID



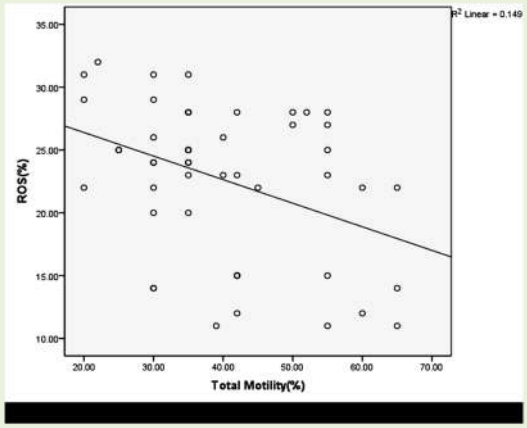
نمودار۳- مقایسه سطح ROS در اسپرم قبل و بعد از درمان با NAC، مقایسه میزان ROS نشان می دهد که بعد از درمان با NAC کاهش معنی داری مشاهده می شود(P<۰/۰۵).

جدول۳- ارتباط معنی دار بین سطح ROS و میزان تحرک و اسپرم های غیر طبیعی

پارامترها		ROS	
		R	p
تحرک اسپرم(٪)	قبل	-۰,۳۱۹	۰,۰۲
	بعد	- .۰,۳۸۶	۰,۰۰۲
مورفولوژی غیرنرمال اسپرم(٪)	قبل	۰,۳۰۱	۰,۰۳
	بعد	۰,۳۲۳	۰,۰۱



A



B

شکل۳-A ارتباط معنی دار مستقیمی بین سطح ROS و مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم وجود دارد B.: ارتباط معنی دار معکوسی بین سطح ROS و تحرک اسپرم وجود دارد

www.SID.ir

Archive of SID

بحث ونتیجه گیری

امروزه رادیکال های آزاد اکسیژنی(ROS) و مباحث مرتبط با آن، جایگاه ویژه ای را در تحقیقات و درمان بسیاری از بیماری ها پیدا کرده اند، به گونه ای که در خصوص اثرات این مولکول های بیوشیمیایی و چگونگی عملکرد آن ها بر سلول های بدن، تحقیقات گسترده ای در انجام است. طی سال های اخیر در زمینه باروری اثرات مثبت و منفی رادیکال های آزاد اکسیژنی مورد توجه متخصصان این حوزه قرار گرفته و نتایج به دست آمده بیانگر نقش کلیدی این مولکول های فعال در فرایند تولید مثل و باروری است(۱۱). بسیاری از محققان بر این باورند که استفاده از آنتی اکسیدان درمانی می تواند بر روند درمانی زوج های نابارور تاثیرات مطلوبی بر جای می-گذارد. در بررسی های مختلف آنتی اکسیدان های مختلف با غلظت های گوناگون و به صورت ترکیبی با سایر آنتی اکسیدان ها یا ترکیبات غذایی استفاده شده و عوامل مرتبط با ناباروری و میزان تاثیر و بازدهی آنتی اکسیدان روی آنها ارزیابی شده است(۱۴) . ان – استیل سیستئین (NAC)، آنتی اکسیدان دارای تیول است که از میزان تنش اکسایشی می کاهد. NAC نسبت به گلوتاتیون و سیستئین برتری زیستی دارد بنابراین می توان بیان کرد که ان – استیل سیستئین نوعی آنتی اکسیدان قوی برای پاکسازی کردن رادیکال های آزاد می باشد(۱۰، ۸). در مطالعه حاضر پارامترهای اسپرمی افراد آستنوتراتوزو اسپرمی که به مدت سه ماه تحت درمان با داروی NAC قرار گرفته بودند نسبت به قبل از مصرف این دارو مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که پارامترهای اساسی اسپرمی نسبت به قبل از مصرف دارو بهبود معنی داری داشته است(جدول ۱). نتایج نشان داد میزان تحرک کلی، حرکت پیشرونده اسپرم(a+b) و مورفولوژی نرمال به میزان معنی داری افزایش یافته است(جدول ۱). مطابق با نتایج فوق، صفری نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که مصرف این دارو می تواند پارامترهای اساسی اسپرمی از جمله غلظت، تحرک و مورفولوژی نرمال را بهبود ببخشد(۲۰). هم چنین در تحقیق انجام شده توسط Ciftici در سال ۲۰۰۹ نشان داد که غلظت اسپرم ها در افراد نابارور بعد از سه ماه مصرف داروی NAC به طور معنی داری افزایش یافته است(۷). هم چنین تاثیر NAC بر روی غلظت اسپرم ها در مردان نابارور بعد از عمل واریکوسل نیز به اثبات رسیده است(۵). در مطالعه حاضر میزان آسیب DNA(DNA fragmentation) در روش TUNEL نشان داد که بعد از مصرف داروی NACبه مدت سه ماه به طور معنی داری کاهش یافته است(نمودار۱و شکل ۱). درمطالعه ای که Lopes و همکارانش در سال(۱۹۹۸) بر روی اثربخشی ان - استیل سیستئین بر روی پارامترهای اسپرم انجام دادند، نشان دادند میزان آسیب به DNA در شرایط آزمایشگاهی(in vitro) به میزان قابل توجهی کاهش یافت که این امر را مرتبط با کاهش در گونه های فعال اکسیژن (NOS) دانستند (۱۵). از جمله روش های متعدد برای ارزیابی کروماتین اسپرم استفاده از رنگ های فلوئورسنت می باشد . رنگ فلوئورسنت کرومومایسین A3 در شیار کوچک DNA به توالی های GC متصل می-شود. بیانچی و همکارانش در سال ۱۹۹۳ این رنگ آمیزی را به عنوان روش مفید جهت تشخیص کمبود پروتامین و وجود بریدگی در DNA معرفی کردند(۶). کمبود پروتامین بر ناهنجاری های فراساختاری کروماتین تاثیر گذار است(۱۹). قابل توجه است که درصد اسپرم های CMA3 مثبت در بیماران نابارور افزایش نشان می دهد. به علاوه بین رنگ آمیزی CMA3 اسپرم و نتایج باروری نیز مشخص شده است. کمبود پروتامین یکی از دلایل اساسی عدم موفقیت در باروری به هنگام استفاده از تکنیک های کمک باروری از جمله ICSI است(۱۹). در این مطالعه

www.SID.ir

Archive of SID

همان طور که در نمودار(۲)و شکل (۲) ملاحظه می شود، محتوای غیرطبیعی پروتامین DNA سه ماه پس از مصرف داروی NAC نسبت به قبل از مصرف دارو کاهش معنی داری وجود دارد و درصد بهبودی حاصل شده (improvement) در محتوای طبیعی پروتامین DNA به خوبی بعد از درمان مشاهده می شود. در مطالعه حاضر، ارتباط معنی داری بین کمبود پروتامین و میزان فراگمنتاسیون DNA در فراد نابارور آستنو تراتوزو اسپرمی مشاهده شد. در تایید این پژوهش در مطالعه ای که نصر و همکارانش در افراد مبتلا به واریکوسل انجام دادند ، نشان دادند که در افراد مبتلا به واریکوسل بعد از عمل واریکوسلکتومی مصرف NAC باعث شد که اسپرم های دارای کمبود پروتامین به طور قابل توجهی بهبود یابند (۱۶). این بدان معنا است، یکی از عواملی که در پتانسیل باروری بیماران تاثیر دارد در سطح هسته سلول اسپرماتید می باشد و بهبودی محتوای طبیعی پروتامین پس از استفاده از آنتی اکسیدان ها می تواند باعث کاهش آسیب یا شکستگی DNA شود(۱۷).در مطالعه ای که Oeda و همکارانش در سال(۱۹۹۷) انجام دادند، نشان دادند که تیمار با ان – استیل سیستئین در شرایط آزمایشگاهی (in vitro)باعث افزایش پارامترهای اسپرمی از جمله افزایش میزان حرکت اسپرم ها و هم چنین افزایش واکنش آکروزمی در اسپرم ها گردید و پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون با ان- استیل سیستئین سطح ROS ها به طور معنی داری کاهش یافت. این مطالعه امیدهای را برای بهبود پارامترهای اسپرمی درشرایط آزمایشگاهی برای بیماران آستنوتراتوزواسپرمی فراهم می آورد(۱۸). نتایج مطالعه ما در رابطه با سطح ROS قبل و بعد از درمان با NAC نشان داد که سطح ROS بعد از درمان به طور قابل توجهی کاهش یافت. هم چنین ارتباط معنی داری بین سطح ROS و پارامترهای اسپرمی(تحرک و موفولوژی غیر نرمال اسپرم ها وجود داشت که نشانگر تاثیر میزان استرس اکسیداتیو بر عملکرد اساسی اسپرم ها و در نتیجه میزان باروری خواهد داشت. با توجه به خاصیت آنتی اکسیدانی NAC از جمله : ۱)پاکسازی رادیکال های هیدروکسیل ۲) افزایش تولید گلوتاتیون ۳) کاهش باندهای دی سولفید و در نتیجه کاهش وزیسکوزیته مایع منی و موکوس که برای باروری اهمیت دارد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که NAC می تواند بر روی پارامترهای اسپرمی، سلامت کروماتین DNA و کاهش میزان استرس اکسیداتیو تاثیر مثبت داشته باشد و پتانسیل باروری را در افراد نابارور آستنوتراتوزواسپرمی بهبود ببخشد. با این حال، مطالعات بیشتری برای مکانیسم های تنظیمی بیان ژن و ارتباط با پارامترهای اسپرمی نیاز است، که با شناسایی این مکانیسم ها ممکن است بتواند منجر به پیشرفت اهداف درمانی جدید در بیماران آستنوتراتوزو اسپرمی شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از پرسنل سخت کوش مرکز فوق تخصصی مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1.Agarwal, A., Said, TM. (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Human reproduction update, 9(4); 331-45.

2.Agarwal, A., Saleh, RA., Bedaiwy, MA. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertility and sterility, 79(4); 829-43.

3.Agarwal, A., Sekhon, LH. (2010). The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. Human Fertility, 13(4); 217-25.

4.Aruoma, OI., Halliwell, B., Hoey, BM., Butler, J. (1989). The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. Free Radical Biology and Medicine, 6(6); 593-7.

www.SID.ir

Archive of SID

5.Barekat, F., Tavalaee, M., Deemeh, MR., Bahreinian, M., Azadi, L., Abbasi, H. (2016). A preliminary study: N-acetyl-L-cysteine improves semen quality following varicocelectomy. International Journal of Fertility & Sterility, 10(1); 120.

6.Bizzaro, D., Manicardi, GC., Bianchi, P., Bianchi, U., Mariethoz, E., Sakkas, D. (1998). In-situ competition between protamine and fluorochromes for sperm DNA. Molecular human reproduction. 1998;4(2):127-32.

7.Ciftci, H., Verit, A., Savas, M., Yeni, E., Erel, O. (2009). Effects of N-acetylcysteine on semen parameters and oxidative/antioxidant status. Urology, 74(1); 73-6.

8.Cooper, TG., Noonan, E., Von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H., Behre, HM. (2010). World health organization reference values for human semen characteristics. Human reproduction update, 16(3); 231-45.

9.De Vries, N., De Flora, S. (1993). N-acetyl-l-cysteine. Journal of Cellular Biochemistry, 53(S17F); 270-7.

10. Dodd, S., Dean, O., Copolov, DL., Malhi, GS., Berk, M. (2008). N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. Expert Opinion on Biological Therapy, 8(12); 1955-62**.**

11. Gharagozloo, P., Aitken, RJ. (2011). The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. Human Reproduction, 26(7); 1628-40.

12. Halliwell, B., Gutteridge, JM. (2014). Free radicals in biology and medicine: Oxford University Press, USA.

13. Kelly, GS. (1998). Clinical applications of N-acetylcysteine. Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic, 3(2); 114-27.

14. Lanzafame, FM., La Vignera, S., Vicari, E., Calogero, AE. (2009). Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. Reproductive Biomedicine Online, 19(5); 638-59.

15. Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J-G., Casper, RF. (1998). Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. Human Reproduction (Oxford, England), 13(4); 896-900.

16. Nasr-Esfahani, MH., Abasi, H., Razavi, S., Ashrafi, S., Tavalaee, M. (2009). Varicocelectomy: semen parameters and protamine deficiency. International journal of andrology, 32(2); 115-22.

17. Ni, K., Steger, K., Yang, H., Wang, H., Hu, K., Chen, B. (2015). 295 Sperm protamine mRNA ratio and DNA fragmentation index represent reliable clinical biomarkers for men with varicocele after microsurgical varicocele ligation. European Urology Supplements, 14(2); e295.

18. Oeda, T., Henkel, R., Ohmori, H., Schill, WB. (1997). Scavenging effect of N-acetyl-L-cysteine against reactive oxygen species in human semen: a possible therapeutic modality for male factor infertility? Andrologia, 29(3); 125-31.

19. Razavi, S., Nasr-Esfahani, MH., Mardani, M., Mafi, A., Moghdam, A. (2003). Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. Andrologia, 35(4); 238-43.

20. Safarinejad, MR., Safarinejad, S. (2009). Efficacy of selenium and/or N-acetyl-cysteine for improving semen parameters in infertile men: a double-blind, placebo controlled, randomized study. The Journal of Urology, 181(2); 741-51.

21. Showell, MG., Mackenzie-Proctor, R., Brown, J., Yazdani, A., Stankiewicz, MT., Hart, RJ. (2014). Antioxidants for male subfertility. Cochrane Database of Systematic Reviews, 12; 56-60**.**

22. Tremellen, K. (2008). Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. Human reproduction update,14(3);243-58.

23. Tvrdá, E., Kňažická, Z., Bárdos, L., Massányi, P., Lukáč, N. (2011). Impact of oxidative stress on male fertility—a review. Acta Veterinaria Hungarica, 59(4); 465-84.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of Sperm Quality and Oxidative Stress Level in Asthenoteratozoospermia Men by N-Acetylcysteine Treatment

R. Jannatifar[1], **K. Parivar[1]**, **M. H. Nasr-Esfahani[2]**, N. Hayati Roodbari[1]

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. **kazem_parivar@yahoo.com**

2. Department of Reproductive Biotechnology,Reproductive Biomedicine Research Center, ACECR, Royan Institute forBiotechnology, Isfahan, Iran**sahar_hamedi@yahoo.com**

Received:2020.2.10 **Accepted: 2020.4.3**

Abstract

Inroduction & Objective: Infertile men have higher levels of semen reactive oxygen species (ROS) than fertile men. High levels of semen ROS can cause sperm dysfunction, sperm DNA damage and reduced male reproductive potential. This study investigated the effects of supplementation with N-acetyl-cysteine (NAC) on sperm parameters; chromatin integrity and level of stress oxidative (ROS) in infertile men.

Material and Methods: The study was carried out in the unit of ACECR Infertility Research Center, Qom, Iran. The patients consisted of 50 infertile men with asthenoteratozoospermia who received NAC (600 mg/d) orally for 3 months, after which they were compared with pre-treatment status. Sperm parameters according WHO (World Health Organization) guidelines, protamine deficiency (chromomycin A3 staining), sperm DNA damage (TUNEL assay), percentage and intensity of ROS (DCFH-DA staining) were assessed in infertile men.

Results: After NAC treatment, patients' sperm parameters improved (P<0.05). DNA fragmentation and protamine deficiency showed significant decreases compared to pre-treatment levels (P<0.05). Hormonal profile improvement was associated with lowered FSH and LH levels and increased amount of testosterone (P<0.05). Stress oxidative level (ROS) significantly decreased (P<0.05). The correlation between Stress oxidative and sperm parameters was found (P<0.05).

Conclusion: NAC oral supplementation may improve sperm parameters and oxidative/antioxidant status in infertile males.

.

Keywords: Infertility, N-Acetyl-Cysteine, Oxidative Stress, Asthenoteratozoospermia.

www.SID.ir