

تغییرات فراساختار اسپرم‌های اپیدیدیمی در رت‌های مصرف کننده الکل

علیرضا طالبی. Ph.D.*، ابوالقاسم عباسی سرچشمه. M.Sc.**، مریم دهقان. M.Sc.**، مریم نیری. B.Sc.**،
احمد حسینی. Ph.D.***

* گروه بیولوژی و علوم تشریحی و مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ایران

** گروه بیولوژی و علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ایران

*** گروه میکروبی شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ایران

**** گروه علوم تشریحی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: دی ماه ۸۹ تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۸۹

چکیده

هدف: ارزیابی فراساختار اسپرم‌های اپیدیدیمی رت بدنبال مصرف مزمن الکل

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۶ سر رت ویستار با سن ۱۰ هفته به دو گروه تقسیم شدند. گروه کنترل شامل ۸ رت بود که دسترسی به آب و غذا

داشتند. گروه تجربی نیز شامل ۸ رت بود که به جای آب آشامیدنی، الکل ۵ درصد را به صورت روزانه ۵۰ سانتی‌متر مکعب و به مدت ۳۰

روز مصرف نمودند. بعد از این مدت نمونه اسپرم‌های اپیدیدیمی هر دو گروه برای بررسی میکروسکوپ الکترونی استخراج شدند.

یافته‌ها: در گروه کنترل ناهنجاری‌های فراساختاری خاصی مشاهده نشد. در گروه تجربی (گروه مصرف کننده الکل) در اغلب اسپرم‌ها

طیف وسیعی از ناهنجاری‌های فراساختاری مانند تراکم غیرطبیعی کروماتین، نواحی متورم، پارگی و تخریب غشای سیتوپلاسمی،

وجود تعداد زیادی قطرات سیتوپلاسمی، تورم و ایجاد واکوتل در میتوکندری، فقدان میکروتوبول‌های آکسونومی، دژنراسانس کامل

آکسونم، حذف یک یا بیشتر الیاف متراکم خارجی و از بین رفتن کامل غشای دم اسپرم مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: اسپرم‌های اپیدیدیمی رت‌های تحت تیمار الکل انواع ناهنجاری‌های فراساختاری را در سر، قطعه میانی و قطعه اصلی دم نشان

دادند. این ناهنجاری‌ها می‌تواند به‌عنوان یکی از دلایل مهم کاهش باروری یا ایجاد ناباروری در مصرف کنندگان الکل محسوب شود.

کلیدواژه‌ها: اسپرماتوزوآ، فراساختار، ناهنجاری، مصرف الکل

مقدمه

متعددی از جمله اختلالات هورمونی، اختلالات کروموزومی،

ناهنجاری‌های ساختاری بیضه و اختلال در روند اسپرماتوزنز،

سموم، داروها، تشعشعات، بیماری‌های کلیوی و خونی، التهاب

بیضه، ضربه و چرخش بیضه، واریکوسل، انسداد مادرزادی یا

اکتسابی مسیر انتقال اسپرم و در نهایت اختلال عملکرد اسپرم

در بروز ناباروری مردان قابل ذکر است [۳-۵].

ناباروری به عدم توانایی بچه‌دار شدن بعد از حداقل یک

سال ازدواج بدون استفاده از وسایل پیشگیری اطلاق می‌شود

که در حدود ۱۲-۸ درصد از زوج‌ها را درگیر می‌سازد [۱].

در ۵۰ درصد موارد، جنس مذکر به‌نحوی در این ناباروری

دخیل بوده که در ۴۰ درصد موارد قابل تشخیص بوده و در ۶۰

درصد موارد از نظر اتیولوژی قابل تشخیص نیست [۲]. علل

✉ آدرس مکاتبه: یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، گروه علوم تشریحی و

مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری

Email: prof_talebi@ssu.ac.ir

مطالعات مذکور می‌توان گفت که تأثیر مصرف الکل بر خصوصیات اسپرم هنوز مورد بحث بوده و توافق قطعی صورت نپذیرفته است.

تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که شکستگی DNA در اسپرماتوزوای انسان فاکتور بسیار مهمی در ناباروری بوده و آپوپتوز و گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Spcies) یا ROS سبب تخریب DNA اسپرم در طول مهاجرت این سلول از لوله منی‌ساز به اپیدیدیم می‌شود [۲۲-۱۹]. همچنین ارزیابی ساختمان کروماتین اسپرم نشان می‌دهد که آلودگی هوا، دود و سمیت محیط سبب شکستگی DNA اسپرم و سبب ایجاد ناباروری در مردان می‌شوند [۲۳].

در مطالعه‌ای ضمن بررسی فراساختار اسپرم مردان نابارور، مشاهده شد که در گروهی از مردان، اسپرم فاقد نقص در ساختار آکسونوم بوده و در گروهی دیگر، اسپرم‌ها دارای نقص آکسونومال بودند [۲۴]. در مطالعه دیگر فراساختار اسپرم و پارامترهای آن در افراد معتاد بررسی شد. در این افراد درجاتی از تغییرات فراساختاری در سر و دم اسپرم مشاهده شد (۲۵). در بررسی زاوس (Zavos) و همکاران نیز نشان داده شد که سیگار سبب ناهنجاری‌های فراساختاری در دم اسپرم می‌شود [۲۶]. طی بررسی‌های انجام شده، مطالعه‌ای مبنی بر تأثیر الکل آشامیدنی بر فراساختار اسپرم مشاهده نشد. اما بررسی اثر الکل روی پروستات نشان داده است که سلول‌های اپی‌تلیال این عضو تحلیل رفته و تغییرات فراساختاری در آن‌ها ایجاد می‌شود [۲۷]. بسیاری از گزارش‌ها تغییرات فراساختاری سلول‌های اپی‌تلیال کیسه منی به‌دنبال مصرف الکل را نیز گزارش نموده‌اند [۲۸].

همان‌طور که عنوان شد، نتایج مطالعات متعددی، تأثیر الکل بر کیفیت اسپرم را نشان داده‌اند ولی در اغلب آن‌ها اختلاف نظر مشاهده می‌شود. در مطالعه قبلی محققان حاضر مشخص شد که مصرف الکل ۵ درصد سبب کاهش تحرک اسپرم‌های اپیدیدیمی در رت شده و همچنین پروسه تراکم

مصرف اتانول بیشترین گستردگی را در جوامع بشری داشته و سوء مصرف آن به عنوان یک مسئله جدی مورد بحث می‌باشد. این ماده با تأثیر بر سلول‌های لایدیگ که ترشح‌کننده هورمون تستوسترون هستند، سطح هورمون تستوسترون در خون را کاهش داده و سبب عملکرد سیستم تناسلی و کاهش صفات ثانویه جنسی در مرد می‌شود [۶]. با توجه به بررسی‌های انجام شده مصرف الکل علاوه بر ایجاد ناهنجاری‌های قلبی-عروقی و بیماری‌های استخوان و نقص عملکرد ایمنی، باعث بروز نقایصی در دستگاه تناسلی دو جنس مرد و زن نیز می‌شود [۷]. مشخص شده است که سوء مصرف الکل و کوکاین بر نوروترانسمیترها و هورمون‌های مؤثر در عملکرد سیستم تناسلی اثر گذاشته [۸] و همچنین سبب کاهش میل جنسی، ناتوانی جنسی، انزال زودرس، کاهش حجم بیضه، ژینکوماستی و کاهش میل جنسی می‌شود [۹]. به نظر می‌رسد که الکل بر گنادها اثر سمی داشته و سبب مهار محور هورمونی گناد-هیپوفیز-هیپوتالاموسی شده و از این طریق باروری را کاهش می‌دهد [۱۰-۱۲]. مصرف الکل توسط مرد یا زن در طول باروری آزمایشگاهی (Invitro Fertilization) سبب سقط جنین شده و تولد نوزاد زنده را به خطر می‌اندازد [۱۳]. در مطالعه بانیستر (Bannister) و همکاران هیپوگنادیسم به‌دنبال مصرف الکل در مردان نشان داده شد [۱۴]. در مطالعاتی اثر الکل و سیگار را بر فاکتورهای باروری بررسی شده است. در این بررسی‌ها مشخص شد که آزواسپرمی از تغییرات آشکار مایع منی بوده که می‌تواند سبب ناباروری شود. مصرف بیش از اندازه الکل ممکن است در آینده سبب کاهش درصد اسپرم با شکل طبیعی شده و اسپرم‌های غیرطبیعی را به‌ویژه با ناهنجاری‌های سر افزایش دهد. مطالعات مذکور نشان دادند که سیگار حرکت اسپرم و کیفیت مایع منی را تحت تأثیر قرار داده و کاهش کیفیت در مایع منی با افزایش مقدار مصرف الکل و سیگار مرتبط است [۱۷-۱۵]. از طرف دیگر؛ مطالعات الکل و اسپرم نشان می‌دهد که مصرف الکل به‌میزان متوسط به دلیل اثر آنتی‌اکسیدانی بر پارامترهای مایع منی اثر محافظتی می‌گذارد [۱۸]. با توجه به

مدت ۲ ساعت قرار داده شد. سپس شستشوی سریع با بافر فسفات ۰/۱ مولار ۳ مرتبه انجام شد. در مرحله آب‌گیری برای خارج نمودن آب بافت، نمونه‌ها از غلظت‌های رو به افزایش استن عبور داده شد و مدت توقف در هر استن به میزان ۳۰ دقیقه محاسبه شد. در مرحله آغشتگی با رزین نمونه‌های آبگیری شده به تدریج و در سه مرحله توسط مونومرهای پلاستیکی مایع جایگزین شد. در مرحله بعد قالب‌گیری نمونه‌ها انجام شد به طوری که در هر قالب یک نمونه قرار داده و رزین در قالب‌ها ریخته شد. سپس برای پلیمریزاسیون رزین و تهیه بلوک، قالب‌ها در آون ۶۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از پلیمریزاسیون، بلوک‌های تهیه شده از قالب خارج و با استفاده از تیغ در زیر استریومیکروسکوپ اصلاح شد؛ بدین ترتیب که رزین‌های اضافه اطراف نمونه به تدریج برداشته شد تا اینکه بافت داخل رزین به صورت یک ذوزنقه کوچک درآید. در مرحله برش‌گیری توسط اولترامیکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۵۰ نانومتر تهیه شد (به رنگ نقره‌ای) و روی گریدهای ۲۰۰ مش منتقل شد. سپس برای رنگ‌آمیزی گریدها از سیترات سرب و اورانیل استات استفاده شد و پس از رنگ‌آمیزی مقاطع روی گریدها و خشک شدن آن‌ها، نمونه‌ها برای مشاهده و بررسی با میکروسکوپ الکترونی انتقالی منتقل شدند. نمونه‌ها با بزرگنمایی‌های متفاوت بررسی و از مناطق مختلف مقاطع عکسبرداری شد.

یافته‌ها

مشاهدات میکروسکوپ الکترونی در دو گروه کنترل و تجربی به شرح زیر انجام پذیرفت:

گروه کنترل: اسپرم‌های مربوط به نمونه‌های گروه کنترل، در بررسی با میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) ویژگی‌های یک اسپرم طبیعی را از نظر فراساختار سر، قطعه میانی و دم نشان دادند.

سر آن‌ها به فرم کشیده و داسی شکل به همراه غشای

کروماتین اسپرم نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد [۲۹]. با توجه به اهمیت فراوان فراساختار و سلامت هسته و دیگر اجزای اسپرم در پتانسیل باروری، انجام تحقیقی در این زمینه ضرورتی انکارناپذیر است. هدف اصلی مطالعه حاضر ارزیابی فراساختار اسپرم‌های اپیدیمی رت‌هایی است که به صورت مزمن الکل خوراکی را مصرف نموده‌اند.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۶ سر رت نر بالغ (نژاد ویستار، سن ۸ هفته و میانگین وزنی ۳۰۰ گرم) به دو گروه کنترل و تجربی تقسیم شدند؛ گروه کنترل که به تعداد ۸ رت بود و به مدت ۶۰ روز به آن‌ها آب داده شد، گروه تجربی به تعداد ۸ رت که به آن‌ها به مدت ۶۰ روز (بیشتر از یک دوره اسپرماتوزنز) الکل (اتانول) ۵ درصد به جای آب داده شد و هر ۲۴ ساعت الکل آن‌ها تعویض شد [۳۰].

حیوانات به مدت حداقل دو هفته قبل از شروع آزمایش در شرایط نوری و حرارتی کنترل شده نگهداری شدند [۳۱].

پس از ۶۰ روز برای نمونه‌برداری، طی عمل بیهوشی توسط کتامین و زایلازین، از ناحیه دم اپیدیدیم، قطعه‌ای به ابعاد ۲×۲ میلی‌متر که محتوی تعداد بسیار زیادی اسپرم بود جدا نموده و در محیط کشت T6 قرار داده شد [۳۲].

نمونه‌های بافتی قبل از تثبیت توسط بافر PBS شستشو شد.

مراحل آماده‌سازی نمونه میکروسکوپ

الکترونی انتقالی (TEM)

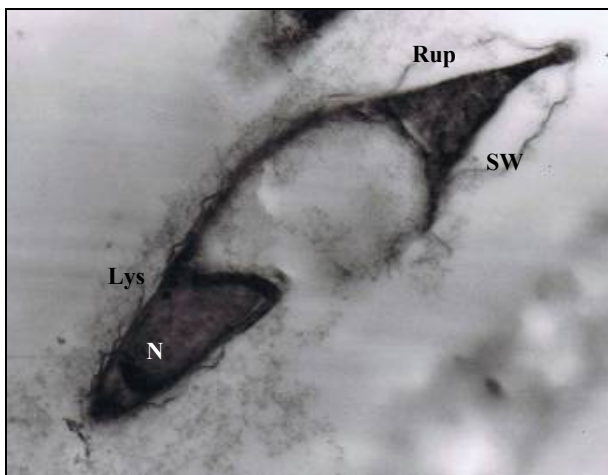
نمونه‌ها برای انجام ثبوت اولیه، به مدت حداقل ۲ ساعت در محلول گلو تارآلدید ۲/۵ درصد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در مرحله شستشو برای خارج نمودن محلول گلو تارآلدید از بافت، نمونه‌ها توسط بافر فسفات ۰/۱ مولار به مدت نیم‌ساعت شستشو داده شد. به منظور ثبوت ثانویه، نمونه‌ها در محلول تتراکسیداسمیوم ۱ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار به

قطعه اصلی دم با مجموعه میکروتوبول‌های آکسونومی در مرکز، فیبرهای متراکم خارجی در ۹ دسته و همچنین غلاف فیبری (Fibrous Sheath) به صورت کاملاً یکدست و متراکم (electron dense) در زیر غشای سیتوپلاسمی طبیعی قابل مشاهده بودند. در قطعه انتهایی (end piece) دم میکروتوبول‌های آکسونومی مشاهده شد که توسط غشای سیتوپلاسمی احاطه شده بودند.

گروه تجربی (مصرف الکل): در اسپرم‌های نمونه‌های این گروه، انواع ناهنجاری‌ها از فرم خفیف تا بسیار شدید در نواحی مختلف اسپرم و در نهایت مرگ سلولی مشاهده شد که به شرح زیر اشاره می‌شود:

الف) ناهنجاری‌های سر

در کروماتین هسته اسپرم‌های گروه تجربی، ناهنجاری‌های متعددی مشاهده شد. کاهش تراکم کروماتین به صورت کاهش دانسیته الکترونی در هسته، وجود واکوئل در اندازه‌های کوچک و بزرگ، تغییر کروماتین یکدست و متراکم به صورت گرانول‌های ریز از موارد قابل ذکر است (شکل ۳).



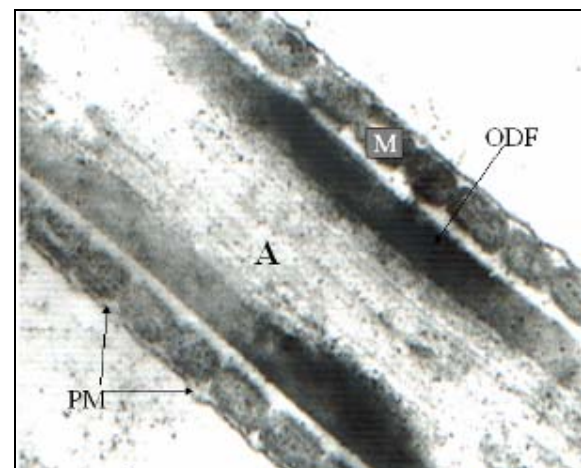
شکل ۳. مقطع ساژیتال سر اسپرم گروه تجربی: در این تصویر پارگی (Rup) و تخریب (Lys) گسترده در غشا دیده شده و قسمتی از سر نیز فاقد غشا است. ناحیه (Sw) نواحی متورم در اطراف سر را نشان می‌دهد. هسته N تراکم خود را از دست داده و به فرم گرانولار مشاهده می‌شود (بزرگنمایی: $\times 30000$).

سیتوپلاسمی سالم و آکروزوم طبیعی، هسته‌ای با کروماتین یکدست و کاملاً متراکم (electron dense) به همراه غشای هسته‌ای سالم تشخیص داده شدند (شکل ۱).



شکل ۱. سر اسپرم پلیدیمی در گروه کنترل: در این تصویر غشای سیتوپلاسمی اطراف سر به فرم متراکم و پیوسته، آکروزوم در ناحیه قدامی با غشای سالم (A) کروماتین کاملاً متراکم و یکدست (N) قابل تشخیص است (بزرگنمایی: $\times 30000$).

در قطعه میانی اسپرم‌ها میتوکندری‌ها به فرم ماریپیج و بطور یکنواخت و بدون فاصله (gap) در زیر غشای سیتوپلاسمی طبیعی قابل مشاهده بودند. در مرکز قطعه میانی مجموعه آکسونومی با طرح (۲+۹) و الیاف متراکم خارجی (Outer dense fibers) به صورت طبیعی و در ۹ دسته مشاهده شدند (شکل ۲).



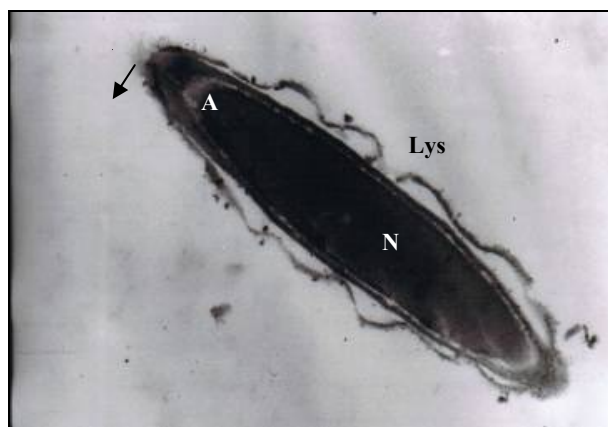
شکل ۲. برش طولی قطعه میانی اسپرم در گروه کنترل: در این تصویر غشای سیتوپلاسمی به صورت طبیعی و یکدست (PM)، میتوکندری‌ها (M) به صورت ماریپیج و بدون فاصله در زیر غشای سیتوپلاسمی، مجموعه میکروتوبول‌های آکسونومی (A) و الیاف متراکم خارجی (ODF) قابل مشاهده است (بزرگنمایی: $\times 25000$).

چند دم و قرار گرفتن آن‌ها در یک غشای مشترک (اشکال ۱۰ و ۱۱) و وجود قطرات سیتوپلاسمی (Residual Cytoplasm) متصل به قطعه میانی دم (اشکال ۹ و ۸) از موارد قابل ذکر بودند.



شکل ۵. مقطع عرضی از قطعات میانی و اصلی دم اسپرم‌های گروه تجربی: در این تصویر وجود واکوئول در میتوکندری (V) در قطعه میانی، به هم خوردگی نظم اجزای داخلی در قطعه اصلی دم (D) از موارد قابل مشاهده است (بزرگنمایی: $\times 12000$).

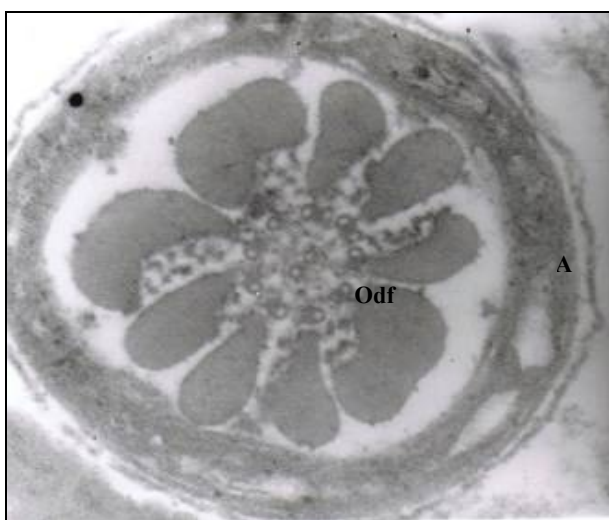
غشای سیتوپلاسمی سر به میزان کمی از محل طبیعی خود جدا شده و به صورت نواحی با تورم خفیف در موارد بسیاری قابل مشاهده بود. پارگی غشا، وجود گسستگی و ایجاد فاصله در نواحی مختلف غشای سر قابل ذکر بودند (اشکال ۳، ۴). تخریب غشای سلولی با از بین رفتن تراکم الکترونی در این ساختار به صورت پراکنده مشاهده شد (اشکال ۳ و ۴).



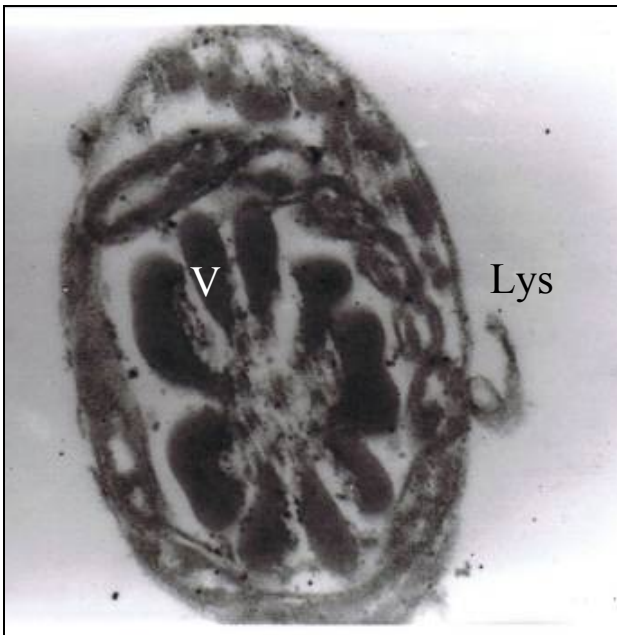
شکل ۴. مقطع طولی سر اسپرم گروه تجربی: غشای سیتوپلاسمی سر اسپرم‌ها در چند ناحیه جدا گشته و غشا در حال تخریب (Lys) است. در ناحیه قدام سر غشای خارجی آکروزوم (A) در حال تخریب است. هسته (N) با تراکم طبیعی مشاهده می‌شود (بزرگنمایی: $\times 30000$).

ب) ناهنجاری‌های قطعه میانی

اسپرم‌های گروه تجربی در ساختار میکروتوبولی، الیاف متراکم خارجی، میتوکندری‌ها و غشای سیتوپلاسمی ناهنجاری‌هایی را نشان دادند. اسپرم‌هایی که طرح آکسونمی (۲+۹) آن‌ها تغییر یافته بود، به تعداد زیادی در مقاطع قابل تشخیص بودند. علاوه بر این اسپرم‌هایی که تقریباً نیمی از مجموعه آکسونم و الیاف متراکم خارجی خود را از دست داده بودند نیز مشاهده شد (شکل ۴). ایجاد فاصله در بین میتوکندری‌ها، میتوکندری‌های متورم و واکوئوله (اشکال ۵، ۹ و ۱۰)، تخریب کریستال‌ها، از بین رفتن و افزایش حجم میتوکندری‌ها از ناهنجاری‌های دیده شده در اسپرم‌های گروه تجربی بود (اشکال ۶ و ۹). در قطعه میانی، ناهنجاری‌های همانند تخریب غشای سیتوپلاسمی به صورت نقطه‌ای یا وسیع، اتصال



شکل ۶. مقطع عرضی قطعه میانی دم اسپرم در گروه تجربی: در این تصویر الیاف متراکم خارجی (odf) و مجموعه آکسونمی (A) طبیعی بوده ولی میتوکندری‌ها واکوئوله (V) بوده و کریستال‌های آن‌ها دچار بی‌نظمی شده است (بزرگنمایی: $\times 50000$).



شکل ۱۰. مقطع عرضی قطعه میانی دم اسپرم در گروه تجربی: غشای سیتوپلاسمی در ناحیه گسترده‌ای دچار تخریب (Lys) شده و از بین رفته است. بعضی از میتوکندری‌ها افزایش حجم (V) را نشان می‌دهند. الیاف متراکم خارجی و آکسونم به فرم طبیعی است (بزرگنمایی: $\times 50000$).

ج) ناهنجاری‌های قطعه اصلی دم

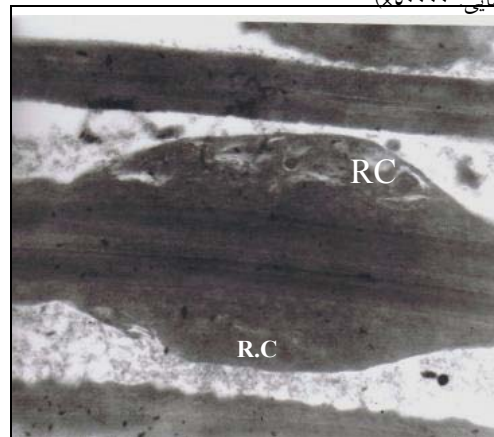
در قطعه اصلی دم از بین رفتن دو یا چند میکروتوبول آکسونمی، از بین رفتن الیاف متراکم خارجی، وجود واکوئول‌های بزرگ، جدایی و تورم غشای سیتوپلاسمی و تخریب غشا از ناهنجاری‌های مهم بودند (اشکال ۱۱ و ۱۲).



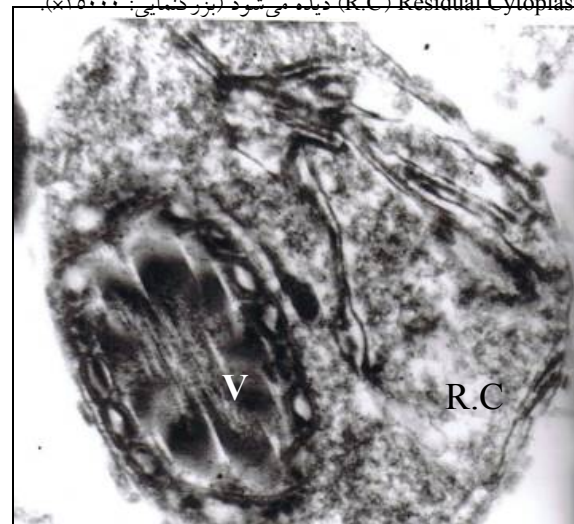
شکل ۱۱. مقطع عرضی قطعه اصلی دم اسپرم در گروه تجربی: در این مقطع وجود واکوئول بزرگ (V) در دم باعث تغییر ساختار الیاف متراکم خارجی شده است (بزرگنمایی: $\times 50000$).



شکل ۷. مقطع عرضی دو دم اسپرم در گروه تجربی: به هم ریختگی عناصر دم و اتصال آن‌ها و قرار گرفتن در یک غشای مشترک قابل مشاهده است (بزرگنمایی: $\times 50000$).



شکل ۸. برش طولی قطعه میانی دم اسپرم در گروه تجربی: در برش طولی مقدار زیادی سیتوپلاسم متصل به دم تحت عنوان قطرات سیتوپلاسمی Residual Cytoplasm (R.C) دیده می‌شود (بزرگنمایی: $\times 25000$).

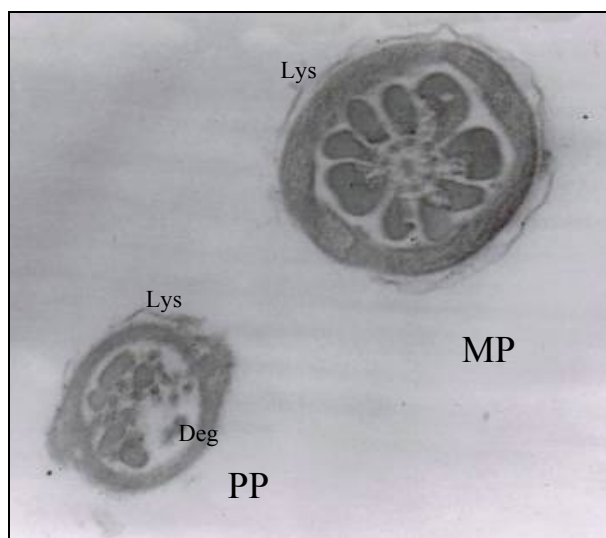


شکل ۹. برش عرضی قطعه میانی دم اسپرم در گروه تجربی: مقدار زیادی سیتوپلاسم متصل به دم تحت عنوان قطرات سیتوپلاسمی (R.C)، میتوکندری‌ها متورم و واکوئله (V) دیده می‌شود (بزرگنمایی: $\times 30000$).

نشان دهنده اختلالات احتمالی در اسپرم انسان بوده و در موارد بالینی مد نظر قرار گیرند. بنابراین شناسایی اثر مواد مخرب محیطی نظیر الکل بر کیفیت هسته اسپرم می‌تواند به‌عنوان یک مطالعه پایه برای مطالعات بالینی روی افراد نابارور که گرفتار مصرف الکل هستند در نظر گرفته شود.

محققانی به نام مانش (Maneesh) و همکاران در سال ۲۰۰۶ بیان کردند که مصرف الکل سبب کاهش در تحرک و غلظت اسپرم می‌شود [۳۴]. مطالعات حیوانی و انسانی نیز نشان دهنده تأثیر سوء الکل بر ریخت‌شناسی اسپرم است [۳۵ و ۳۶]. الکل به‌واسطه رادیکال‌های آزاد اکسیژن و تشدید آپوپتوز موجب آسیب به بافت بیضه می‌شود. به‌علاوه میزان فراگمتاسیون DNA بیضه‌ای در رت‌هایی که رژیم الکلی داشته‌اند بیشتر از موش‌هایی بوده که رژیم غذایی معمولی داشتند. اتانول تعداد آپوپتوزیس اسپرماتوگونیا و همچنین اسپرماتوسیت‌ها را افزایش می‌دهد. تزریق مستقیم الکل به‌داخل بیضه، میزان قطعه قطعه شدن DNA بیضه را افزایش می‌دهد که موجب ازدیاد آپوپتوزیس می‌شود. به‌هرحال سطوح لیگاند Fas در بیضه‌های رت‌هایی که مصرف مزمن الکل داشتند، زیاد می‌شود. در محیط آزمایشگاه، کشت سلول‌های سرتولی با الکل تولید لیگاند fas را افزایش می‌دهد. به‌علاوه سطح mRNA ژن P53 بیضه رت‌هایی که مصرف مزمن الکل داشتند، افزایش می‌یابد. همه این مشاهدات احتمالاً بیانگر افزایش آپوپتوزیس سلول‌های زیای بیضه‌ای است [۳۷].

عامل مهمی که می‌تواند تخریب هسته اسپرم را سبب شود افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) و کمبود آنتی‌اکسیدان‌ها است [۳۸]. گونه‌های فعال اکسیژن توسط اسپرم‌ها (به‌ویژه انواع غیرطبیعی) و گلبول‌های سفید به داخل مایع سمن ترشح می‌شود. کاهش کیفیت اسپرم وابسته به ROS در مردان مصرف‌کننده الکل و حیواناتی که به‌صورت تجربی مصرف‌کننده الکل شده‌اند، دور از انتظار نیست. گونه‌های



شکل ۱۲. مقطع عرضی قطعه اصلی (PP) و میانی (MP) دم اسپرم در گروه تجربی: در قطعه میانی دم، غشای سیتوپلاسمی به طور گسترده دچار تخریب (Lys) شده است. در قسمت پایین تصویر، مقطع عرضی قطعه اصلی دم با غشای سیتوپلاسمی تخریب شده به همراه دژنراسانس (Deg) قابل تشخیص است (بزرگنمایی: ×۳۰۰۰۰).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف مزمن الکل سبب بروز ناهنجاری‌های فراساختاری همچون اختلال در تراکم کروماتین هسته، پارگی و تخریب غشای سیتوپلاسمی، وجود سیتوپلاسم اضافی، ایجاد تورم در میتوکندری و تخریب کریستاهای این اندامک، دژنره شدن قطعه میانی دم، دژنره شدن آکسونم، حذف الیاف متراکم خارجی و دژنره شدن قطعه اصلی دم می‌شود. با توجه به بررسی منابع اطلاعات موجود، مطالعات اندکی در زمینه آثار مصرف مزمن الکل بر اسپرم‌های اپیدیمی صورت گرفته و در واقع مطالعه حاضر در نوع خود منحصر به فرد است.

متأسفانه در جامعه امروزی، مصرف الکل به‌خصوص توسط مردان جوان رو به افزایش است. الکل علاوه بر تأثیر بر سیستم‌های مختلف بدن، می‌تواند بر دستگاه تولید مثل مذکر و از جمله اسپرم تأثیرگذار باشد [۳۳]. مطالعات ریخت‌شناسی و فراساختاری اسپرم مدل‌های حیوانی می‌تواند

شکل هسته، گسیختگی کریستاهای میتوکندری، اتساع شدید سیستم‌های شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار و وجود مواد سیتوپلاسمی مانند تجمع اجسام متراکم مشاهده شد [۴۰-۴۲].

که نتایج مطالعه حاضر با این یافته‌ها مطابقت دارد. از موارد مهم ناهنجاری‌های وابسته به مصرف الکل در مطالعه حاضر، اختلال در ساختار طبیعی دم اسپرم بود. این اختلالات در ساختار آکسونم و در میتوکندری اغلب اسپرم‌های گروه تجربی مشاهده شد. سمزوک (Semczuk) و همکاران در تحقیقی مشابه تحقیق حاضر، تأثیر مصرف الکل را بر فراساختار اسپرم ارزیابی کردند و تغییراتی مانند ناهنجاری در هسته و سر اسپرم، ناهنجاری کلاهک آکروزومی، بی‌نظمی فیبریل‌های مجموعه آکسونمی، فقدان موضعی میتوکندری، میتوکندری غیرطبیعی و اسپرم‌های دوسر مشاهده شد [۴۳-۴۵].

در بررسی کورتاد (Courtade) و همکاران بر فراساختار اسپرم مردان نابارور نشان داده شد که گروهی از این بیماران فاقد نقص در ساختار آکسونم بوده، گروهی دچار نقص آکسونمی در قطعه میانی یا قطعه اصلی دم اسپرم بودند و گروهی نیز دچار نقص آکسونمی در هر دو قطعه میانی و اصلی دم اسپرم بوده و همچنین ناهنجاری‌هایی مانند نقص در غشای میتوکندری و نقص در کلاهک آکروزومی سر اسپرم مشاهده شد [۲۴].

در مطالعه دیگری اثر الکل بر فراساختار سلول‌های اپی‌تلیال کیسه منی بررسی شد. نتایج نشان داده است که تغییرات سلولی به‌صورت وجود قطرات چربی به اندازه‌های مختلف، تراکم کروماتین محیطی در هسته، بزرگی بیش از حد میتوکندری و اتساع شدید سیستم‌های شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار است [۲۷]. الگوتامی (El-Gothamy) و همکاران نقایص فراساختار اسپرم در افراد معتاد به حشیش، تریاک و هروئین را بررسی کردند [۴۶]. در این مطالعه نمونه سیمن مورد آزمایش قرار گرفته و علایمی چون الیگواسپرمی و نکرواسپرمی مشاهده شد. همچنین تغییرات شدیدی در سر

فعال اکسیژن با کاهش ATP داخل سلولی، تأثیر بر غشای سیتوپلاسمی و همچنین ساختار کروماتین و DNA اسپرم، می‌تواند سبب کاهش تحرک، کاهش قابلیت حیات، افزایش ناهنجاری‌های ظاهری و بروز ضایعات در کروماتین و DNA اسپرم شود [۳۸]. در مطالعه حاضر اگرچه میزان ROS و ناهنجاری‌های کروماتین اسپرم در نمونه‌های مورد آزمایش اندازه‌گیری نشده است ولی با توجه به نتایج دیگر مطالعات همانند مطالعه طالبی (Talebi) و همکاران در سال ۲۰۱۱ [۲۹] و همچنین شواهدی حاکی از تأثیرات مخرب ROS بر اسپرم همانند ایجاد اختلال در تراکم کروماتین و افزایش ناهنجاری‌های DNA اسپرم، می‌توان کاهش دانسیته هسته اسپرم و همچنین تخریب غشای اسپرم را به افزایش ROS در حیوانات مصرف کننده الکل نسبت داد.

ناهنجاری‌های فراساختاری موجود در اسپرم‌هایی که دچار آپوپتوز شده‌اند، توسط گراندینی (Grandini) و همکاران [۳۹] به تفصیل بررسی شده‌اند. ایشان علایمی همچون وجود واکوئل در هسته، ایجاد تراکم کروماتین در حاشیه هسته و عدم تراکم آن در مرکز، خالی بودن یا تحلیل رفتن آکروزوم، وجود واکوئل‌های اتوفازیک، تولید غشای اضافی هسته در ناحیه پشت آکروزوم و بالاخره مشاهده اجسام آپوپتوتیک محتوی واکوئل‌های شفاف و اجزای سیتوپلاسمی، کروماتین و آکسونم را دلیل بر بروز آپوپتوز معرفی می‌نماید. از آنجایی که نتایج میکروسکوپ الکترونی مطالعه حاضر نیز اغلب شواهد فوق را نشان دادند، می‌توان گفت که اسپرم‌های گروه تجربی نیز در حد نسبتاً بالایی دچار آپوپتوز شده‌اند. مشاهده اجسام واکوئل مانند تحت عنوان اجسام آپوپتوتیک در برخی از اسپرم‌های گروه با مصرف الکل می‌تواند تأیید کننده نتیجه فوق باشد.

در مطالعه دیگری اثر الکل بر فراساختار سلول‌های اپی‌تلیال پروستات بررسی شد. در این سلول‌ها، کاهش حجم و تغییرات فراساختاری همانند وجود قطرات چربی، تغییر

سیگاری مطالعه شد و تغییر در تعداد و ترتیب قرار گرفتن میکروتوبول‌های آکسونمی در این افراد از مهمترین یافته‌ها بود [۲۸]. در این مطالعات تغییرات فراساختاری ایجاد شده شباهت زیادی به مشاهدات تحقیق حاضر دارد.

در مطالعه دیگری اثر فلوروئید را بر فراساختار اسپرم خرگوش بررسی نموده و نقص در ساختار میتوکندری، فقدان غشای خارجی میتوکندری، جداشدگی آکروزوم از سطح هسته و فقدان آکسونم مشاهده شد [۴۸]. از طرفی مشخص شده است که گاسپیول سبب تغییراتی فراساختاری اسپرماتوزوآ و سلول‌های اپی‌تلیال اپی‌دیدیم و مجرای دفران مورد و تخریب میتوکندری در قطعه میانی می‌شود [۴۹] که نتایج این تحقیقات مشابه نتایج مطالعه حاضر است. در بررسی فراساختار اسپرم‌های مردانی که دارای آستنواسپرمی بودند کاهش معنی‌داری در ساختار آکسونمال در مقایسه با گروه طبیعی مشاهده شد. معتقدند که کاهش محتویات آکسونمی سبب کاهش تحرک اسپرم می‌شود [۵۰].

در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که مصرف مزمن الکل در بررسی میکروسکوپ الکترونی سبب بروز ناهنجاری‌های متعددی در فراساختار قسمت‌های مختلف اسپرم می‌شود. با توجه به اهمیت سلامت کروماتین اسپرم میتوان ناهنجاری‌های DNA اسپرم را به عنوان یکی از دلایل اصلی ناباروری مردان مصرف کننده الکل عنوان نمود. در بیان اتیلوژی این وضعیت، تأثیر نامطلوب ROS بر پارامترهای اسپرم، کیفیت کروماتین و DNA هسته، اختلال در سلامت غشاء و همچنین افزایش میزان آپوپتوز در اسپرم بدنال مصرف مزمن الکل اشاره نمود.

اسپرم به صورت تراکم گرانولار کروماتین با واکوئول‌های هسته‌ای و قطرات سیتوپلازمیک، پارگی غشای پلاسمایی و ضایعات آکروزومی در اسپرم دژنره از موارد دیگر ناهنجاری‌های فراساختاری بوده که توسط گروه تحقیقاتی مذکور مشاهده شد. همچنین در مطالعه دیگری تأثیر اتانول بر فراساختار بیضه مرد بررسی شده و ناهنجاری‌هایی مانند کاهش عملکرد ترشحی سلول‌های سرتولی، شکستگی DNA در بیضه و بروز آپوپتوز در اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت مشاهده شد [۳۷]. آن‌ها علت بروز ناهنجاری‌های فوق را تأثیر مصرف الکل بر روند اسپرمیوزن و بلوغ اپیدیمی اسپرم بیان نمودند که یافته‌های مطالعه حاضر را تأیید می‌کند. همچنین محقق بنام اید (Eid) و همکاران نشان داده‌اند که اتانول از طریق آسیب به بیضه سبب افزایش آپوپتوز در سلول‌های زایا می‌شود [۴۷]. با توجه به شواهد فوق می‌توان گفت که اسپرم‌های گروه تجربی در مطالعه حاضر دچار آپوپتوز شده‌اند.

تغییرات ایجاد شده در فراساختار اسپرم‌های گروه تجربی در مطالعه فعلی ویژه مصرف الکل نبوده و در موارد دیگری نیز مشاهده شده‌اند. مطالعه فراساختار و پارامترهای اسپرم در افراد معتاد نشان داد که پارامترهایی مانند حجم سیمن، تعداد و تحرک اسپرم در این افراد کاهش می‌یابد [۲۵]. در این مطالعه، ۶۵ درصد از اسپرم‌ها دچار ناهنجاری‌هایی در سر و دم همانند کروماتین تمایز نیافته هسته، وجود انکلوزیون‌ها یا شکل‌های متفاوت در داخل سلول، نقص کلاهک آکروزومی و وجود قطرات سیتوپلاسمی بودند. در بررسی دیگری ناهنجاری‌های دم اسپرم در افراد

References

1. Kamel RM. Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 6: 8-21.
2. Bhasin S, de Kretser DM, Baker HW. Clinical review 64: Pathophysiology and natural history of male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1525-9.
3. Zhang HJ, Jin BF. Azoospermia factor and male

- infertility. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2010; 16: 166-9.
4. **Anderson K, Nisenblat V, Norman R.** Lifestyle factors in people seeking infertility treatment - A review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2010; 50: 8-20.
 5. **Huang YF.** Varicocele and male infertility. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2010; 16: 195-200.
 6. **Emanuele MA, Emanuele NV.** Alcohol's effects on male reproduction. *Alcohol Health Res World* 1998; 22: 195-201.
 7. **Emanuele N, Emanuele MA.** The endocrine system: alcohol alters critical hormonal balance. *Alcohol Health Res World* 1997; 21: 53-64.
 8. **Cocores JA, Miller NS, Pottash AC, Gold MS.** Sexual dysfunction in abusers of cocaine and alcohol. *Am J Drug Alcohol Abuse* 1988; 14: 169-73.
 9. **Vijayasanan ME.** Alcohol and sex. *N Z Med J* 1981; 93: 18-20.
 10. **Boyden TW, Pamentor RW.** Effects of ethanol on the male hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Endocr Rev* 1983; 4: 389-95.
 11. **Saso L.** Effects of drug abuse on sexual response. *Ann Ist Super Sanita* 2002; 38: 289-96.
 12. **Klonoff-Cohen H, Lam-Kruglick P, Gonzalez C.** Effects of maternal and paternal alcohol consumption on the success rates of in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer. *Fertil Steril* 2003; 79: 330-9
 13. **Bannister P, Losowsky MS.** Ethanol and hypogonadism. *Alcohol* 1987; 22: 213-7.
 14. **Emanuele MA, Emanuele N.** Alcohol and the male reproductive system. *Alcohol Res Health* 2001; 25: 282-7.
 15. **Goverde HJ, Dekker HS, Janssen HJ, Bastiaans BA, Rolland R, Zielhuis GA.** Semen quality and frequency of smoking and alcohol consumption--an explorative study. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1995; 40: 135-8.
 16. **Guo H, Zhang HG, Xue BG, Sha YW, Liu Y, Liu RZ.** Effects of cigarette, alcohol consumption and sauna on sperm morphology. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2006; 12: 215-221
 17. **Gaur DS, Talekar MS, Pathak VP.** Alcohol intake and cigarette smoking: impact of two major lifestyle factors on male fertility. *Indian J Pathol Microbiol* 2010; 53: 35-40.
 18. **Marinelli D, Gaspari L, Pedotti P, Taioli E.** Mini-review of studies on the effect of smoking and drinking habits on semen parameters. *Int J Hyg Environ Health* 2004; 207: 185-92.
 19. **Alvarez JG.** DNA fragmentation in human spermatozoa: significance in the diagnosis and treatment of infertility. *Minerva Ginecol* 2003; 55: 233-9.
 20. **Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ.** DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000; 21: 33-44.
 21. **Mehdi M, Khantouche L, Ajina M, Saad A.** Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters. *Andrologia* 2009; 41: 383-6.
 22. **Sakkas D, Alvarez JG.** Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010; 93: 1027-36.
 23. **Evenson DP, Wixon R.** Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 207(2 Suppl): 532-7.
 24. **Courtade M, Lagorce C, Bujan L, Caratero C, Mieuisset R.** Clinical characteristics and light and transmission electron microscopic sperm defects of infertile men with persistent unexplained asthenozoospermia. *Fertil Steril* 1998; 70: 297-304.
 25. **el-Shoura SM, Abdel Aziz M, Ali ME, el-Said MM, Ali KZ, Kemeir MA, et al.** Deleterious effects of khat addiction on semen parameters and sperm ultrastructure *Hum Reprod* 1995; 10: 2295-300.
 26. **Zavos PM, Correa JR, Karagounis CS, Ahparaki A, Phoroglou C, Hicks CL, et al.** An

- electron microscope study of the axonemal ultrastructure in human spermatozoa from male smokers and nonsmokers. *Fertil Steril* 1998; 69: 430-34.
27. **Martinez M, Milton FA, de Oliveira SA, Reis GS, Pereira S, Segatelli TM, et al.** Morphological alterations on the prostate of *Calomys callosus* submitted to chronic ethanol ingestion. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2006; 38: 117-23.
 28. **Martinez M, Mattos EC, Mello WJ, Cagnon VH, Martinez FE.** Morphology of the seminal vesicle of *Calomys callosus* submitted to experimental chronic alcoholism. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2001; 33: 453-61.
 29. **Talebi AR, Abbasi Sarcheshmeh A, Khalili MA, Tabibnejad M.** Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. *Alcohol* 2011; 45: 403-409.
 30. **Anderson RA Jr, Willis BR, Oswald C, Zaneveld LJ.** Ethanol-induced male infertility: impairment of spermatozoa. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; 225: 479-86.
 31. **Kempinas WD, Suarez JD, Roberts NL, Strader LF, Ferrell J, Goldman JM, et al.** Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy. *Biol Reprod* 1998; 59: 897-904.
 32. **Talebi AR, Khalili MA, Abbasi A, Anvari M.** Evaluation of epididymal necrospemia following experimental chronic spinal cord injury in rat. *Ir J Reprod Med* 2007; 5: 171-6.
 33. **Cicero TJ, Nock B, O'Connor L, Adams ML, Sewing BN, Meyer ER.** Acute alcohol exposure markedly influences male fertility and fetal outcome in the male rat. *Life Sci* 1994; 55: 901-10.
 34. **Maneesh M, Dutta S, Chakrabarti A, Vasudevan DM.** Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males. *Indian. J. Physiol Pharmacol* 2006; 50: 291-6.
 35. **Anderson, R. A. Jr., Willis, B. R., Oswald, C. and Zaneveld, L. J.** Ethanol-induced male infertility: impairment of spermatozoa. *J. Pharmacol Exp Ther* 1983; 225: 479-486.
 36. **Nagy F, Pendergrass PB, Bowen DC, Yeager JCA.** Comparative study of cytological and physiological parameters of semen obtained from alcoholics and non-alcoholics. *Alcohol* 1986; 21: 17-23.
 37. **Zhu Q, Meisinger J, Emanuele NV, Emanuele MA, LaPaglia N, Van Thiel DH.** Ethanol exposure enhances apoptosis within the testes. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24: 1550-6.
 38. **Pons-Rejraji H, Sion B, Saez F, Brugnion F, Janny L, Grizard G.** Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility. *Gynecol Obstet Fertil* 2009; 37: 529-35.
 39. **Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, et al.** Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 15: 830-9.
 40. **Gomez MI, de Castro CR, Fanelli SL, Quintans LN, Costantini MH, Castro JA, Castro GD.** Biochemical and ultrastructural alterations in the rat ventral prostate due to repetitive alcohol drinking. *J Appl Toxicol* 2007; 27: 391-8.
 41. **Cagnon VH, Garcia PJ, Guazzelli Filho J, Martinez FE, Mello W Jr, Martinez M.** Ultrastructural study of the lateral lobe of the prostate of Wistar rats submitted to experimental chronic alcohol ingestion. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1998; 30: 77-84.
 42. **Cagnon VH, Tomazini FM, Garcia PJ, Martinez M, Padovani CR, Martinez FE.** Structure and ultrastructure of the ventral prostate of isogenic mice (C57B1/6J) submitted to chronic alcohol ingestion. *Tissue Cell* 2001; 33: 354-60.
 43. **Semczuk M.** Further investigations on the ultrastructure of spermatozoa in chronic alcoholics.

- Z Mikrosk Anat Forsch 1978; 92: 494-508.
44. **Semczuk M.** Investigations on the ultrastructure of spermatozoa in chronic alcoholics. Z Mikrosk Anat Forsch 1976; 90: 1113-7.
45. **Semczuk M.** Experimental electron microscopy studies on rat spermatozoa in chronic alcoholic intoxication. Patol Pol 1983; 34: 87-99.
46. **El-Gothamy Z, el-Samahy M.** Ultrastructure sperm defects in addicts. Fertil Steril 1992; 57: 699-702.
47. **Eid NA, Shibata MA, Ito Y, Kusakabe K, Hammad H, Otsuki Y.** Involvement of Fas system and active caspases in apoptotic signalling in testicular germ cells of ethanol-treated rats. Int J Androl 2002; 25: 159-67.
48. **Kumar A, Susheela AK.** Ultrastructural studies of spermiogenesis in rabbit exposed to chronic fluoride toxicity. nt J Fertil Menopausal Stud 1994; 39: 164-71.
49. **Hoffer AP.** Ultrastructural studies of spermatozoa and the epithelial lining of the epididymis and vas deferens in rats treated with gossypol. Arch Androl 1982; 8: 233-46.
50. **Hancock AD, de Kretser DM.** The axonemal ultrastructure of spermatozoa from men with asthenospermia. Fertil Steril 1992; 57: 661-4.