Archive of SID

Original Article

Effect of N-acetylcysteine on Human Sperm Parameters and DNA Damage in Frozen-thawed Sperm Samples of Asthenozoospermic Men

Rahil Jannatifar[1], Hamid Piroozmanesh[2*], Zeinab Jannatifar[3]

[1] PhD, Department of Reproductive Biology, the Academic Center for Education, Culture and Research, Qom branch, Iran.

[2] MSc, Department of Reproductive Biology, the Academic Center for Education, Culture and Research, Qom branch, Iran.

[3] Student Research Committee, School of Dentistry, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

Corresponding Author:
Hamid Piroozmanesh;
Department of Reproductive Biology, the Academic Center for Education, Culture and Research, Qom branch, Iran.

Email:
hp457@yahoo.com

Received: 29 Nov, 2020
Accepted: 06 Apr, 2021

Abstract

Background and Objectives: The semen cryopreservation is not only required for improving the success chance of assisted reproductive technologies fertility but also is performed for men undergoing chemotherapy, radiotherapy, and surgery, and facing ejaculation problems. This study aimed to investigate the effects of N-acetyl-cysteine on human sperm parameters and DNA damage in frozen-thawed sperm samples of patients with asthenozoospermia.

Methods: In this study, 20 patients with asthenozoospermia referring to Jihad University Infertility Treatment Center, Qom, Iran, were evaluated in three groups, namely control, freezing, and freezing + N-acetyl-cysteine (1mg/ml). Sperm parameters, viability, and DNA damage were respectively assessed using the World Health Organization guideline (2010), eosin-nigrosin staining, and sperm chromatin dispersion kit, respectively in all three groups. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Tukey post hoc test. The significance level was considered at the p-value of < 0.05.

Results: The freezing process resulted in a decrease in sperm motility parameters, and the addition of the antioxidant N-acetyl-cysteine improved sperm motility, morphology, and sperm viability. The addition of N-acetyl-cysteine could reduce DNA damage ($P<0.05$).

Conclusion: Our results showed that N-acetyl-cysteine could reduce the disruptive effects of the freezing-thawing process.

Keywords: DNA damage; N-acetyl-cysteine; Sperm.

DOI: 10.29252/qums.14.12.32

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره چهاردهم، شماره دوازدهم، اسفند ۹۹
صفحه ۳۲ الی ۴۰

Archive of SID

مقاله پژوهشی
(Original Article)

بررسی اثر ان-استیل سیستئین بر پارامترهای اسپرم و میزان آسیب DNA در نمونه‌های اسپرم منجمد-ذوب شده افراد آستنوزواسپرمی

راحیل جنتی‌فر[۱]، حمید پیروزمنش[۲*]، زینب جنتی‌فر[۳]

[۱] دکترای تخصصی، بخش تحقیقات، گروه پژوهشی بیولوژی تولید مثل، مرکز جهاد دانشگاهی، قم، ایران.

[۲] کارشناسی ارشد، بخش تحقیقات، گروه پژوهشی بیولوژی تولید مثل، مرکز جهاد دانشگاهی، قم، ایران.

[۳] کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
حمید پیروزمنش؛ بخش تحقیقات، گروه پژوهشی بیولوژی تولید مثل، مرکز جهاد دانشگاهی، قم، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
hp457@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: امروزه انجماد مایع منی انسان نه‌تنها برای افزایش موفقیت روش‌های کمک باروری مورد نیاز می‌باشد؛ بلکه بانک اسپرم برای مردان در معرض شیمی‌درمانی، رادیوتراپی، جراحی و نقایص انزالی به طور معمول انجام می‌شود. در این راستا، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ان-استیل سیستئین بر کیفیت پارامترهای اسپرم انسان و میزان آسیب DNA (Deoxyribonucleic acid) در نمونه‌های اسپرم منجمد-ذوب شده افراد آستنوزواسپرمی صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه ۲۰ فرد آستنوزواسپرمی مراجعه‌کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم در سه گروه (کنترل)، انجماد، انجماد + ان-استیل سیستئین (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مورد ارزیابی قرار گرفتند. پارامترهای اسپرمی، قابلیت حیات و شکست DNA به ترتیب با استفاده از دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت (WHO: World Health Organization) در سال ۲۰۱۰، رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین و استفاده از کیت SCD (Sperm Chromatin dispersion) در هر سه گروه ارزیابی شدند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون‌های ONE Way ANOVA و تعقیبی توکی صورت گرفت. تفاوت میانگین‌ها در سطح ($P<۰/۰۵$) معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: فرایند انجماد، کاهش پارامترهای حرکتی را به دنبال داشت و افزودن آنتی‌اکسیدان ان-استیل سیستئین باعث بهبود میزان تحرک، مورفولوژی و قابلیت حیات اسپرم‌ها شد. افزودن ان-استیل سیستئین به محیط فریز اسپرم می‌تواند موجب کاهش میزان آسیب DNA گردد ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که ان-استیل سیستئین می‌تواند اثرات مخرب ناشی از فرایند انجماد-ذوب را کاهش دهد.

کلیدواژه‌ها: اسپرم؛ ان-استیل سیستئین؛ آسیب DNA.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Jannatifar R, Piroozmanesh H, Jannatifar Z. Effect of N-acetylcysteine on Human Sperm Parameters and DNA Damage in Frozen-thawed Sperm Samples of Asthenozoospermic Men. Qom Univ Med Sci J 2021;14(12):32-40. [Full Text in Persian]

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

مقدمه

یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد موجودات زنده، توانایی تولید مثل می‌باشد؛ از این رو، باروری و داشتن فرزند در جامعه بشری از اهمیت به‌سزایی برخوردار است (۱). ناباروری یک مشکل بالینی جدی در زمینه تولید مثل می‌باشد که شیوع بالای این بیماری، اهمیت آن را دوچندان نموده و استرس زیادی را بر زوج‌های نابارور وارد می‌کند و بدین‌ترتیب سلامت روانی زوجین را تهدید می‌نماید (۲). نقص عملکرد اسپرم به عنوان یکی از بزرگ‌ترین عوامل دخیل در ناباروری مردان مطرح می‌باشد (۳). اختلال در تحرک اسپرم یکی از شاخص‌های عمده در ناباروری مردان است؛ به طوری که ناباروری ناشی از بی‌تحرکی یا کیفیت ضعیف تحرک اسپرم، مشکل اصلی بیماران مراجعه‌کننده به مراکز درمان ناباروری می‌باشد (۴). حدود ۶۰ سال است که انجماد به عنوان یک روش نگهدارنده اسپرم برای مدت طولانی مطرح می‌باشد. با وجود تاریخچه طولانی انجماد اسپرم، میزان بقای اسپرم همچنان محدود بوده و نمی‌تواند انتظارات ایده‌آل را برآورده نماید؛ زیرا فرایند انجماد با ایجاد آسیب‌های شیمیایی و فیزیکی مانند تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS: Reactive Oxygen Species) در اسپرم موجب آسیب به غشای سلول، اختلال در تحرک اسپرم، ایجاد ناهنجاری‌های ریختی، آسیب به آکروزوم، قطعه قطعه شدن DNA و در نتیجه کاهش عملکرد اسپرم می‌شود (۵،۶). معمولاً در روش انجماد برای حفظ حیات و تحرک اسپرم و کاهش آسیب‌های وارد شده، از محیط‌های انجماد اسپرم استفاده می‌شود (۷). اخیراً محققان برای بهبود پارامترهای اسپرمی پس از انجماد و ذوب، افزودن برخی از آنتی‌اکسیدان‌ها به محیط انجماد اسپرم را در دستور کار خود قرار داده‌اند (۸). با توجه به اینکه انتخاب یک اسپرم مناسب پس از فرایند ذوب جهت استفاده در ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) (یکی از تکنیک‌های لقاح مصنوعی) می‌تواند با درصد حاملگی بالاتر و رشد جنینی بیشتر همراه باشد، دستیابی به اسپرمی با حفظ کیفیت بالا پس از فرآیند ذوب بسیار حائز اهمیت است (۹). سیستئین اسید آمینه‌ای با وزن مولکولی پایین حاوی تیول می‌باشد که پیش‌ساز گلوتاتیون داخل سلولی است (۱۰). سیستئین به راحتی از غشای سلول وارد شده و باعث افزایش بیوسنتز گلوتاتیون داخل سلولی- هم در برون‌تنی و هم درون‌تنی- و نیز محافظت لیپیدها و پروتئین‌های غشایی به علت خواص خنثی‌کنندگی غیر مستقیم رادیکال‌های آزاد می‌شود (۱۱). مطالعات نشان می‌دهند که سنتز گلوتاتیون در شرایط برون‌تنی ممکن است به علت کمبود سیستئین در محیط کشت دچار نقص شود که این امر ناشی از ناپایداری بالای گلوتاتیون و اکسیده شدن خود به خودی آن به سیستئین می‌باشد (۱۲). سیستئین اثر محافظتی در برابر یکپارچگی عملکرد آکروزوم و میتوکندری در برابر انجماد داشته و فعالیت حرکتی اسپرم پس از خروج از انجماد را بهبود می‌بخشد (۱۳). اثبات شده است که تیول‌هایی از قبیل گلوتاتیون و سیستئین، مانع از دست رفتن فعالیت حرکتی اسپرم در مایع منی گاو پس از ذوب شده و باعث بهبود قابلیت حیات، حفظ ساختار کروماتین و یکپارچگی غشای اسپرم گاو طی ذخیره مایع منی می‌شود (۱۴). با توجه به مطالب بیان شده، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر آنتی‌اکسیدان ان-استیل سیستئین بر محیط استاندارد فریز اسپرم با ارزیابی پارامترهای اسپرمی، قابلیت حیات و میزان شکست DNA اسپرم در بیماران آستنوزواسپرمی انجام شد.

روش بررسی

در پژوهش حاضر ۲۰ مرد مبتلا به آستنوزواسپرمی که به منظور درمان ناباروری به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم مراجعه کرده بودند، پس از اعلام رضایت برای شرکت در مطالعه انتخاب شدند. نمونه اضافی مایع منی این بیماران پس از انجام اسپرموگرام مطابق با استانداردهای سازمان جهانی بهداشت (۲۰۱۰) و تأیید توسط پزشک متخصص ارولوژیست، جمع‌آوری گردید. نمونه به دست آمده از هریک از بیماران به سه گروه به شرح زیر تقسیم شد: گروه اول: گروه کنترل؛ گروه دوم: گروه انجماد؛ گروه سوم: گروه انجماد + ان-استیل سیستئین (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. پس از اخذ شرح حال بیماران و ۴-۳ روز پرهیز از مقاربت، یک ظرف استریل و درجه‌بندی شده جهت گرفتن نمونه به بیمار داده شد. آنالیز پارامترهای اسپرم هر فرد آستنوزواسپرمی مطابق با استانداردهای سازمان جهانی بهداشت (۲۰۱۰) قبل و بعد از فرایند انجماد-ذوب انجام شد.

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

شایان ذکر است که این مطالعه در کمیته اخلاق بررسی گشته و طی نامه شماره IR.QOM.REC.1398.006 مورد تصویب کمیته قرار گرفته است.

ارزیابی پارامترهای اسپرمی

بررسی پارمترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی) با استفاده از میکروسکوپ نوری و طبق دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت (۲۰۱۰) صورت گرفت. شمارش اسپرم‌ها بر حسب میلیون بر لیتر توسط لام نئوبار انجام شد. بررسی میزان تحرک اسپرم‌ها براساس دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت (۲۰۱۰) اندازه‌گیری گردید. در گروه بیماران آستنوزواسپرمی، درصد تحرک کل اسپرم کمتر از ۴۰ درصد بود (۱۵). برای بررسی مورفولوژی طبیعی اسپرم‌ها از روش رنگ‌آمیزی پاپانیکولا استفاده شد (۱۶). در رنگ‌آمیزی پاپانیکولا، سر به رنگ آبی و قطعه میانی به رنگ قرمز یا صورتی درمی‌آید. به منظور بررسی مورفولوژی اسپرم، ابتدا از هر نمونه گسترش تهیه شد. سپس رنگ‌آمیزی پاپانیکولا صورت گرفت. برای هر نمونه، یک لام فیکس شده از اسپرم تهیه شد. پس از رنگ‌آمیزی، ۲۰۰ اسپرم توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی (×۱۰۰۰) بررسی گردید.

ارزیابی قابلیت حیات (Viability)

برای تعیین قابلیت حیات اسپرم، براساس دستورالعمل WHO از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد (۱۷). نسبت یک حجم از سوسپانسیون اسپرم و دو حجم از ائوزین در میکروتیوب مخلوط گردید و پس از گذشت ۳۰ ثانیه، حجم مساوی از محلول نیگروزین به آن اضافه شد و گسترش نازکی از نمونه روی لام ایجاد گردید. پس از خشک شدن گسترش، با استفاده از میکروسکوپ معمولی با بزرگنمایی (×۱۰۰۰)، ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و اسپرم‌ها در گروه‌های مختلف بررسی شدند و به صورت درصد اسپرم‌های زنده گزارش گردیدند.

ارزیابی آسیب DNA

ارزیابی فراگمانتاسیون DNA به روش SCD انجام شد (۱۸). در این روش مقدار ۳۰ میکرولیتر (تقریباً بین ۱۵ تا ۲۰ میلیون) از نمونه اسپرمی شستشو داده شد و با ۷۰ میکرولیتر از آگاروز با درجه ذوب پایین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مخلوط گردید. سپس نمونه مخلوط شده روی لامی که از قبل با آگاروز ۰/۶۵ درصد پوشیده شده بود، قرار گرفت و با گذاشتن یک لامل روی آن، به مدت ۴ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس با دقت لامل از سطح لام جدا گردید و هر لام به مدت ۷ دقیقه به صورت افقی در محلول اسید کلریدریک ۰/۰۸ نرمال در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق در محلول‌های تجزیه‌کننده قرار داده شد. در ادامه، شستشو صورت گرفت و هرکدام به مدت ۲ دقیقه به ترتیب در الکل ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد آبگیری شد و پس از خشک شدن، با محلول رنگ دیفکوئیک رنگ‌آمیزی گشته و توسط میکروسکوپ نوری بررسی گردید. با استفاده از این روش می‌توان میزان فراگمانتاسیون DNA را با توجه به وجود هاله اطراف هسته و اندازه آن بررسی نمود. در اسپرم‌های با فراگمانتاسیون DNA، هسته اسپرم با هاله کوچک و بدون هاله و در اسپرم‌های بدون فراگمانتاسیون DNA، هسته اسپرم با هاله بزرگ و هاله متوسط تعیین می‌شود. در این مطالعه به منظور بررسی فراگمانتاسیون DNA، ۲۰۰ سلول شمارش گردید.

آنالیز آماری

داده‌های حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS 21 و آزمون‌های ONE Way ANOVA و تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل گردیدند. تفاوت میانگین‌ها در سطح ($P<۰/۰۵$) معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ارزیابی پارامترهای اسپرمی

در میانگین تعداد اسپرم در بین سه گروه تفاوت معناداری مشاهده نشد ($P<۰/۰۵$) (جدول ۱). میانگین درصد تحرک کل اسپرم در گروه انجماد نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری را نشان داد ($P<۰/۰۰۱$). در گروه انجماد + ان-استیل سیستئین، میانگین

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین تعداد، تحرک، مورفولوژی و حیات اسپرم در گروه‌های مختلف بیماران آستنوزواسپرمی پس از انجماد و درمان با ان-استیل سیستئین (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

گروه‌ها	مورفولوژی نرمال (درصد)	تحرک پیشرونده (درصد)	تحرک کل (درصد)	تعداد (10^6)	حیات (درصد)
کنترل	۹۷/۵۱±۲/۱۱[a]	۱۵/۵۰±۳/۵۹[a]	۴۲/۲۵±۵/۴۹[a]	۶۹/۱۲±۹/۳۱[a]	۷۲/۷۸±۸/۳۱[a]
انجماد	۹۱/۰۳±۲/۹۱[b]	۷/۲۵±۲/۲۲[b]	۲۴/۰۰±۴/۱۰[b]	۶۶/۲۵±۶/۳۴[a]	۵۲/۲۱±۵/۲۱[b]
انجماد + ان-استیل سیستئین	۹۵/۱۴±۲/۷۳[c]	۱۱/۷۵±۲/۳۵[c]	۳۰/۲۵±۴/۱۲[c]	۶۶/۱۵±۷/۳۵[a]	۶۵/۸۹±۶/۳۱[c]

مقادیر به صورت Mean±SD ارائه شده‌اند. میانگین‌ها با کد حروف مختلف در یک ستون دارای تفاوت معنادار می‌باشند (P<۰/۰۵).

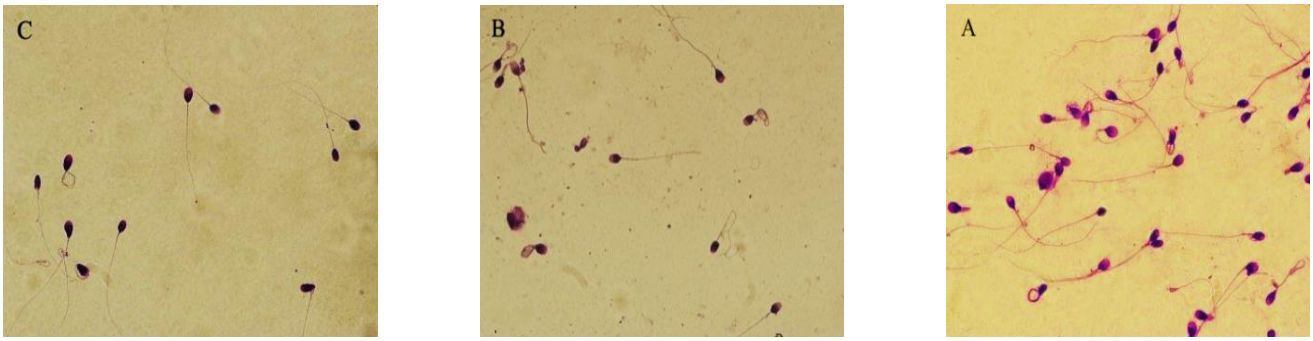
درصد تحرک کل اسپرم افزایش معناداری نسبت به گروه انجماد داشت (P<۰/۰۰۱)؛ اما در گروه انجماد + ان-استیل سیستئین، افزایش معناداری در میانگین درصد تحرک کل اسپرم نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد (جدول ۱) (P<۰/۰۵). در این مطالعه میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیشرونده در گروه انجماد نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری یافت (P<۰/۰۰۱). در گروه انجماد + ان-استیل سیستئین نیز تحرک پیشرونده، افزایش معناداری را نسبت به گروه انجماد نشان داد (P<۰/۰۰۱). شایان ذکر است که در گروه انجماد + ان-استیل سیستئین، افزایش معناداری در میزان میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیشرونده نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد (جدول ۱) (P<۰/۰۵). از سوی دیگر در گروه انجماد، کاهش معناداری در میانگین درصد اسپرم‌ها با مورفولوژی نرمال نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید (P<۰/۰۰۱). همچنین مورفولوژی نرمال اسپرم در گروه انجماد + ان-استیل سیستئین، افزایش معناداری را نسبت به گروه انجماد نشان داد (P<۰/۰۰۱). میزان مورفولوژی نرمال در گروه انجماد + ان-استیل سیستئین، خود را به گروه کنترل نزدیک کرد؛ اما این افزایش نسبت به گروه کنترل معنادار نبود (P<۰/۰۵) (جدول ۱) (شکل ۱).

ارزیابی قابلیت حیات اسپرم (Viability)

میانگین درصد اسپرم‌های زنده (قابلیت حیات) در گروه انجماد نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری یافت (P<۰/۰۰۱). از سوی دیگر، قابلیت حیات اسپرم در گروه انجماد + ان-استیل سیستئین، افزایش معناداری را نسبت به گروه انجماد نشان داد (P<۰/۰۰۱) (شکل ۲، C-B). در گروه انجماد + ان-استیل سیستئین نیز میانگین درصد اسپرم‌های زنده، کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل یافت (جدول ۱) (P<۰/۰۰۱). در شکل ۲، A-B-C قابلیت حیات اسپرم در گروه‌های مختلف نشان داده شده است.

ارزیابی آسیب DNA

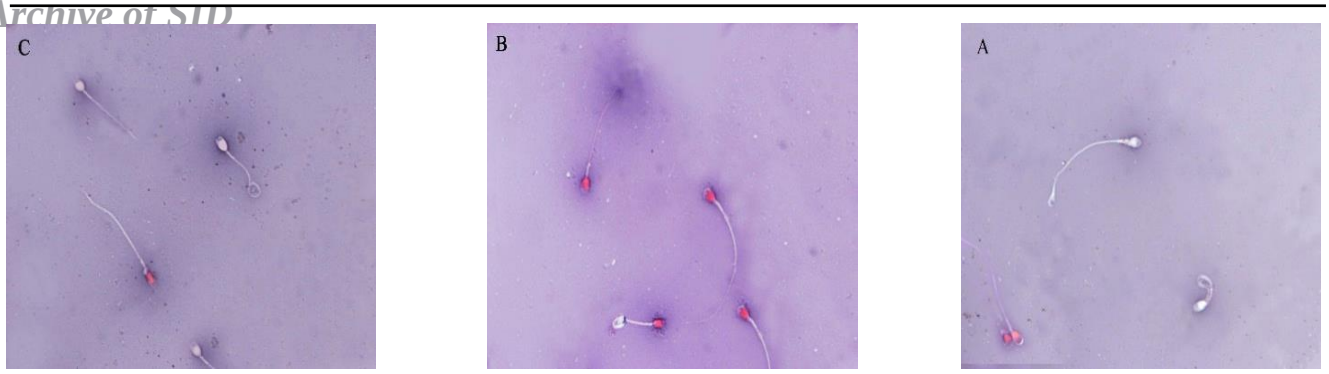
در گروه انجمادی، افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل در میانگین درصد آسیب DNA مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). میانگین درصد آسیب DNA در گروه انجماد + ان-استیل سیستئین، کاهش معناداری را نسبت به گروه انجماد نشان داد (P<۰/۰۰۱). همچنین در گروه انجماد + ان-استیل سیستئین، افزایش معناداری در میانگین درصد آسیب DNA نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید (P<۰/۰۰۱) (جدول ۲).



شکل شماره ۱: بررسی مورفولوژی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی پاپانیکولا در گروه‌های مختلف (بزرگنمایی Ob×1000): A: گروه کنترل؛ B: گروه انجماد؛ C: گروه انجماد + آنتی‌اکسیدان

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID



شکل شماره ۲: سنجش قابلیت حیات اسپرم انسان با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین در گروه‌های مختلف (بزرگنمایی ۱۰۰۰×Ob): A: گروه کنترل؛ B: گروه انجماد؛ C: گروه انجماد + آنتی‌اکسیدان (اسپرم با سر سفید= زنده و اسپرم با سر قرمز یا صورتی= مرده)

جدول شماره ۲: مقایسه میانگین درصد آسیب DNA اسپرم در گروه‌های مختلف بیماران آستنوزواسپرمی پس از انجماد و درمان با ان-استیل سیستئین (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

گروه‌ها	آسیب DNA
کنترل	۱۹/۶±۴/۵[a]
انجمادی	۳۹/۶±۵/۱[b]
انجماد + ان-استیل سیستئین	۲۵/۴±۴/۸[c]

مقادیر به صورت Mean±SD ارائه شده‌اند. میانگین‌ها با کد حروف مختلف در یک ستون دارای تفاوت معنادار می‌باشند (P<۰/۰۵).

بحث

تلاش برای قابلیت باروری اسپرم از حدود یک قرن پیش آغاز شده و همچنان ادامه دارد. یافته‌های مطالعه حاضر نشان دادند که در فرایند انجماد-ذوب، بروز استرس اکسیداتیو که ناشی از بر هم خوردن تعادل بین رادیکال‌های آزاد اکسیژن و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مایع منی می‌باشد، ممکن است منجر به کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی مردان شود (۵،۱۹). استرس اکسیداتیو شامل: غلبه رادیکال‌های آزاد تولید شده نظیر رادیکال‌های هیدروکسیل، آنیون‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی در سلول‌ها می‌باشد (۲۰). در مطالعه حاضر گروه انجماد کاهش معناداری را در میزان تحرک و تحرک پیشرونده نسبت به گروه کنترل نشان داد؛ در صورتی که گروه درمان با ان-استیل سیستئین، بهبود قابل توجهی در میزان تحرک نسبت به گروه انجماد داشت. Michael در سال ۲۰۱۰ گزارش نمود که ان-استیل سیستئین اثر مثبتی بر تحرک اسپرم دارد (۲۱). این یافته‌ها با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارند. در مطالعه‌ای که Oeda و همکاران در سال ۱۹۹۷ انجام دادند، بیان نمودند که تیمار با ان-استیل سیستئین در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) باعث افزایش پارامترهای اسپرمی از جمله افزایش میزان حرکت اسپرم‌ها و همچنین افزایش واکنش آکروزمی در اسپرم‌ها گردیده و پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون با ان-استیل سیستئین، سطح ROS به طور معناداری کاهش یافته است (۲۲). در پژوهش دیگری اثر ال-سیستئین بر اسپرم اسب در شرایط انجماد بررسی گشت و گزارش گردید که این اسید آمینه باعث بهبود پارامترهای کیفی اسب در طول ذخیره‌سازی در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت شد؛ به گونه‌ای که غلظت ۲۰۰ مول بر لیتر آن سبب بهبود تحرک پیشرونده، حیات و یکپارچگی آکروزوم اسپرم گردید (۱۳). از سوی دیگر، بررسی اثر آنتی‌اکسیدان‌های ویتامین E و سیستئین بر پارامترهای اسپرم بیانگر بهبود تحرک اسپرم و سلامت غشای پلاسمایی پس از انجماد می‌باشد (۲۳). در مطالعه حاضر نتایج حاصل از ارزیابی مورفولوژی اسپرم‌های تیمار شده با ان-استیل سیستئین پس از فرایند انجماد-ذوب نشان دادند که در گروه انجماد، کاهش معنا داری در میانگین درصد اسپرم‌ها با مورفولوژی نرمال نسبت به گروه کنترل رخ داده است. مورفولوژی نرمال اسپرم در گروه انجماد + ان-استیل سیستئین، افزایش معناداری را نسبت به گروه انجماد نشان داد. در طول روند انجماد-ذوب، آسیب به غشای سلول باعث نقص و تغییرات مورفولوژیکی و آسیب‌های ساختاری و عملکردی به اسپرم شده و در نتیجه موجب کاهش توان باروری اسپرم می‌شود. در مورد تأثیر ان-استیل سیستئین بر مورفولوژی نرمال اسپرم‌ها، مطالعات In vivo وجود دارد که در جدیدترین آن‌ها نشان داده شده است که این آنتی‌اکسیدان می‌تواند باعث

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

بهبود مورفولوژی اسپرم‌ها در بیماران آستنو تراتوزواسپرمی شود (۲۴،۲۵). جدا شدن سلول‌های زنده از مرده امر بسیار مهمی است که همواره مورد توجه محققان می‌باشد. به دلیل استرس‌های ناشی از ذوب و انجماد، همواره نگه داشتن تعداد سلول‌های زنده پس از این پدیده از نظر کلینیکی بسیار مهم می‌باشد؛ از این رو مطالعات متعددی با استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در مورد میزان زنده‌مانی اسپرم پس از انجماد و ذوب انجام شده‌اند و همواره محققان به دنبال پیدا کردن راهی برای افزایش کیفیت اسپرم هستند (۲۳). در این مطالعه میانگین درصد قابلیت حیات اسپرم در گروه انجماد نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری یافت. از سوی دیگر، قابلیت حیات اسپرم در گروه انجماد + ان-استیل سیستئین، افزایش معناداری را نسبت به گروه انجماد نشان داد. در تأیید یافته‌های پژوهش حاضر، اسدپور و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که ان-استیل سیستئین می‌تواند در موش‌هایی که با استات سرب آلوده شده بودند، باعث افزایش معنادار تحرک و قدرت زنده ماندن اسپرم شود (۲۶). در مطالعه خلیلی و همکاران (۲۰۱۰) اثر غلظت‌های مختلف اسیدهای آمینه سیستئین بر اسپرم قوچ مغانی در شرایط انجماد بررسی شد و مشاهده گردید که این اسید آمینه سبب بهبود قابل توجه حرکت پیشرونده اسپرم، حیات و یکپارچگی غشای آکروزوم اسپرم شده است (۲۷). در پژوهش مذکور، میانگین درصد آسیب DNA در گروه انجماد + ان-استیل سیستئین، کاهش معناداری نسبت به گروه انجماد داشت. در این راستا، در مطالعه‌ای که Lopes و همکاران در سال ۱۹۹۸ پیرامون اثربخشی ان-استیل سیستئین بر پارامترهای اسپرم انجام دادند، گزارش گردید که میزان آسیب به ROS در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) به میزان قابل توجهی کاهش یافته است که این امر را با کاهش در گونه‌های فعال اکسیژن (NOS) مرتبط دانستند (۲۸)؛ بنابراین تصور می‌شود که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند ان-استیل سیستئین بتواند باعث کاهش عوامل استرس‌زا مانند ROS و در نهایت کاهش آسیب DNA شود.

نتیجه‌گیری

نتیجه حاصل از این مطالعه بیانگر آن بودند که ان-استیل سیستئین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان بسیار قوی، دفاع مؤثری علیه رادیکال‌های آزاد داشته و سبب افزایش درصد تحرک کل، تحرک پیشرونده اسپرم، مورفولوژی نرمال، حیات سلول و کاهش فراگمانتاسیون DNA پس از فرایند انجماد-ذوب در افراد آستنوزواسپرمی می‌شود؛ بدین‌صورت که بر اسپرم انسان در برابر آسیب ناشی از واکنش پراکسیداسیون لیپیدی غشا که در محیط‌های انجمادی اسپرم به وقوع می‌پیوندد، اثر حفاظتی دارد؛ بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که اضافه نمودن این آنتی‌اکسیدان موجب بهبود عملکرد اسپرم می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کارکنان سخت‌کوش مرکز فوق تخصصی مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم که پژوهشگران را در انجام این مطالعه یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

1. Decherney AH. Principles & practice of assisted reproductive technology (3 Vols). London: JP Medical Ltd; 2013. Link
2. Esteves SC, Roque M, Bedoschi GM, Conforti A, Humaidan P, Alviggi C. Defining low prognosis patients undergoing assisted reproductive technology: POSEIDON criteria-the why. Front Endocrinol (Lausanne) 2018;9:461. DOI: 10.3389/fendo.2018.00461
3. Direkvand Moghaddam A, Delpisheh A, Sayehmiri K. An investigation of the worldwide prevalence of infertility as a systematic review. Qom Univ Med Sci J 2016;10(1):76-87. Link
4. Ricci E, Viganò P, Cipriani S, Somigliana E, Chiaffarino F, Bulfoni A, et al. Coffee and caffeine intake and male infertility: a systematic review. Nutr J 2017;16(1):37. DOI: 10.1186/s12937-017-0257-2

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

5. Mocé E, Fajardo AJ, Graham JK. Human sperm cryopreservation. EMJ 2016;1(1):86-91. Link

6. Zandiyeh S, Shahverdi A, Ebrahimi B, Sabbaghian M. A novel approach for human sperm cryopreservation with AFPIII. Reprod Biol 2020;20(2):169-74. DOI: 10.1016/j.repbio.2020.03.006

7. Isachenko E, Isachenko V, Weiss JM, Kreienberg R, Katkov II, Schulz M, et al. Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. Reproduction 2008;136(2):167-73. DOI: 10.1530/REP-07-0463

8. Amidi F, Pazhohan A, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M, Nekoonam S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. Cell Tissue Bank 2016;17(4):745-56. DOI: 10.1007/s10561-016-9566-5

9. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. Adv Urol 2012;2012:854837. DOI: 10.1155/2012/854837

10. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. Cell Mol Life Sci 2003;60(1):6-20. DOI: 10.1007/s000180300001

11. Minarini A, Ferrari S, Galletti M, Giambalvo N, Perrone D, Rioli G, et al. N-acetylcysteine in the treatment of psychiatric disorders: current status and future prospects. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2017;13(3):279-92. DOI: 10.1080/17425255.2017.1251580

12. Zhitkovich A. N-acetylcysteine: antioxidant, aldehyde scavenger, and more. Chem Res Toxicol 2019;32(7):1318-9. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.9b00152

13. Sariözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutaş PA, Bilgen A. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. Cryobiology 2009;58(2):134-8. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2008.11.006

14. Ansari MS, Rakha BA, Malik MF, Andrabi SM, Ullah N, Iqbal R, et al. Effect of cysteine addition to the freezing extender on the progressive motility, viability, plasma membrane and DNA integrity of Nili-Ravi buffalo (Bubalus bubalis) bull spermatozoa. J Appl Anim Res 2016;44(1):36-41. DOI: 10.1080/09712119.2014.987292

15. World Health Organization. World health statistics 2010. Geneva: World Health Organization; 2010. Link

16. Brito LF, Greene LM, Kelleman A, Knobbe M, Turner R. Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. Theriogenology 2011;76(4):745-50. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.04.007

17. Nasr-Esfahani MH, Aboutorabi R, Esfandiari E, Mardani M. Sperm MTT viability assay: a new method for evaluation of human sperm viability. J Assist Reprod Genet 2002;19(10):477-82. DOI: 10.1023/a:1020310503143

18. Singh A, Agarwal A. The role of sperm chromatin integrity and DNA damage on male infertility. Open Reprod Sci J 2011;3(1):65-71. DOI: 10.2174/1874255601103010065

19. Dariush G, Gholamhossein R, Rouhollah F, Mahmood GS, Abdolhossein S, Mohsen S, et al. The application of ultrasonic vibration in human sperm cryopreservation as a novel method for the modification of physicochemical characteristics of freezing media. Sci Rep 2019;9(1):10066. DOI: 10.1038/s41598-019-46424-0

20. Torki-Boldaji B, Azadi L, Tavalaee M, Nasr-Esfahani MH. Human sperm cryopreservation update in treatment of infertility: a review study. J Cell Tissue 2017;8(4):332-53. Link

21. Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN, et al. Effect of N-acetyl-L-cysteine supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. Reprod Domest Anim 2010;45(2):201-7. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2008.01202.x

22. Oeda T, Henkel R, Ohmori H, Schill WB. Scavenging effect of N-acetyl-L-cysteine against reactive oxygen species in human semen: a possible therapeutic modality for male factor infertility? Andrologia 1997;29(3):125-31. DOI: 10.1111/j.1439-0272.1997.tb00305.x

23. Majzoub A, Agarwal A. Antioxidants in sperm cryopreservation. Male infertility. Cham: Springer; 2020. P. 671-8. DOI: 10.1007/978-3-030-32300-4_54

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

24. Jannatifar R, Parivar K, Roodbari NH, Nasr-Esfahani MH. Effects of N-acetyl-cysteine supplementation on sperm quality, chromatin integrity and level of oxidative stress in infertile men. Reprod Biol Endocrinol 2019;17(1):24. DOI: 10.1186/s12958-019-0468-9

25. Jannatifar R, Parivar K, Hayati Roodbari N, Nasr-Esfahani MH. The effect of N-acetyl-cysteine on NRF2 antioxidant gene expression in asthenoteratozoospermia men: a clinical trial study. Int J Fertil Steril 2020;14(3):171-5. DOI: 10.22074/ijfs.2020.44411

26. Asadpour R, Azari M, Hejazi M, Tayefi H, Zaboli N. Protective effects of garlic aquous extract (Allium sativum), vitamin E, and N-acetylcysteine on reproductive quality of male rats exposed to lead. Vet Res Forum 2013;4(4):251-7. Link

27. Khalili B, Jafaroghli M, Farshad A, Paresh-Khiavi M. The effects of different concentrations of glycine and cysteine on the freezability of Moghani ram spermatozoa. Asian Austral J Anim Sci 2010;23(3):318-25. DOI: 10.5713/ajas.2010.90387

28. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. Hum Reprod 1998;13(4):896-900. DOI: 10.1093/humrep/13.4.896

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0