Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2017; 20(123): 62-72

Effect of Incubation Time and Vitamin E Supplementation on Sperm Motility, Viability and DNA Fragmentation in Asthenoteratozoospermic Samples

Ali Asghar Ghafarizadeh[1], Gholamhassan Vaezi[2*], Seyed Mohammad Ali Shariatzadeh[3], Ali Akbar Malekirad[4]

1. PhD Student of Physiology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
2. Professor, PhD of Physiology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Professor, PhD of Tissue and Embryology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Arak University, Arak, Iran.
4. Associate Professor, PhD of Physiology, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

Received: 8 Jul 2017, Accepted: 2 Aug 2017

Abstract

Background: In Asthenoteratozoospermic men, low motility, defected DNA and highly oxidative stress in sperm cause poor assisted reproductive techniques (ART) outcomes. The aim of this study was to determine the effect of Vitamin E (Vit E), as a potent antioxidant, on sperm motility, viability and DNA integrity at different times of in vitro incubation (after 2, 4 and 6-h) to improve asthenoteratozoospermic semen samples for ART.

Materials and Methods: Asthenoteratozoospermic semen samples of 50 volunteers were collected and examined. Each sample was divided into two groups of control and vitamin E (2mM) and kept in the 37 °C and 6 % CO2 for 2, 4 and 6 hours. After this incubation, sperm motility, viability and sperm DNA fragmentation (SCD) were evaluated in each group. Data were analyzed using repeated measurement of ANOVA and T-test. The means were considered significantly different at $p<0.05$.

Results:Significant decrease in total and progressive motility and viability as well as significant increase in sperm DNA damage (after 6h of incubation) were found in control group vs. the control group before incubation ($p<0.05$). The sperm motility and viability was significantly higher in vitamin E group compared to untreated control group ($p<0.05$). Our results also showed that DNA fragmentation significantly was lower after 6h of vitamin E treatment ($p<0.05$).

Conclusion: In vitro supplementation of vitamin E in asthenoteratozoospermia semen samples may protect spermatozoa from maltreatment effect of ROS during sperm sampling via keeping enzymatic and antioxidant process in optimum condition.

Keywords: Asthenoteratozoospermia, DNA Fragmentation, Oxidative stress, Spermatozoa, Vitamin E.

*Corresponding Author:
Address: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran.
Email: gh.vaezi@yahoo.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۲۰، شماره ۶ (شماره پیاپی ۱۲۳)، شهریور ۱۳۹۶، ۷۲-۶۲

بررسی اثر مدت زمان انکوباسیون و تیمار ویتامین E بر تحرک ، حیات و فراگمنتاسیون DNA اسپرم نمونه های آستنوتراتوزواسپرمی

علی اصغر غفاری زاده[۱]، غلامحسن واعظی[۲*]، سید محمد علی شریعت زاده[۳]، علی اکبر ملکی راد[۴]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.
۲. استاد، دکتری تخصصی فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳. استاد، دکتری تخصصی بافت و جنینی شناسی،گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران.
۴. دانشیار، دکتری تخصصی فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۱۷، تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: تحرک پایین، آسیب DNA و استرس اکسیداتیو بالا در اسپرم مردان آستنوتراتوزواسپرمی موجب بازده ضعیف درمان‌های کمک باروری (ART) در این بیماران می‌گردد. هدف از این مطالعه، تعیین اثر ویتامین E به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی بر تحرک، حیات و آسیب DNA اسپرم در زمان‌های مختلف انکوباسیون (پس از ۲، ۴ و ۶ ساعت) به منظور بهبود خصوصیات اسپرم افراد آستنوتراتوزواسپرمی جهت ART بود.

مواد و روش‌ها: نمونه منی ۵۰ بیمار آستنوتراتوزواسپرمی جمع‌آوری و سپس ارزیابی شد. هر نمونه به دو گروه کنترل و تیمار ویتامین E (۲ میکرومول) تقسیم‌بندی و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO2 با غلظت ۶ درصد به مدت ۲، ۴ و ۶ ساعت نگهداری شد. پس از انکوباسیون، پارامترهای تحرک، حیات و فراگمنتاسیون DNA اسپرم در هر گروه ارزیابی گردید. داده‌ها از طریق روش آماری اندازه‌گیری تکراری (ANOVA) و آزمون تی تست تحلیل و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: کاهش معنی‌داری در میزان قابلیت تحرک و حیات اسپرم و نیز افزایش معنی‌داری در میزان آسیب DNA اسپرم (پس از ۶ ساعت انکوباسیون) در گروه کنترل نسبت به پیش از انکوباسیون مشاهده شد($p<۰/۰۵$). میزان تحرک و حیات در گروه ویتامین E در مقایسه با گروه کنترل غیر تیماری به طور معنی‌داری افزایش داشت ($p<۰/۰۵$). آسیب DNA اسپرم نیز پس از ۶ ساعت تیمار با ویتامین کاهش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) رانشان داد.

نتیجه‌گیری: تیمار *in vitro* نمونه‌های منی بیماران آستنوتراتوزواسپرمی با ویتامین E موجب حفاظت اسپرماتوزوآ در برابر اثرات مخرب ROS از طریق حفظ شرایط آنتی اکسیدانی می‌گردد.

واژگان کلیدی: اسپرم، آستنوتراتوزواسپرمی، استرس اکسیداتیو، فراگمنتاسیونDNA ، ویتامین E.

* **نویسنده مسئول:** ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
Email: gh.vaezi@yahoo.com

مقدمه

ناباروری از مشکلات اساسی جوامع امروزی است که زوج های درگیر را هم از نظر پزشکی و هم از نظر روانی تحت شعاع قرار می دهد. براساس آمارهای جهانی حدود ۱۰-۱۵ درصد زوج ها نابارورند. براساس همین مطالعات، سهم مردان در ناباروری ۲۵-۴۰ درصد است (۱). آستنوتراتوزواسپرمی یکی از دلایل ناباروری و یا کاهش باروری در مردان است. از مشخصه اسپرم این افراد تحرک کمتر از ۴۰ درصد و ناهنجاری مورفولوژی بیش از ۹۶ درصد می باشد. در واقع اسپرم این افراد نسبت به اسپرم افراد بارور مقادیر بالایی رادیکال های آزاد اکسیژن(ROS)تولید می کند (۲،۳). علاوه بر این، مطالعات نشان داده که میزان مالوندی آلدئید(MDA) منی افراد آستنوتراتوزواسپرمی نسبت به میزان آن در افراد نرمال دارای افزایش معنی دار و میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی (TAC)دارای کاهش معنی داری است (۴). تحقیقات حاکی از آن است که رادیکال‌های آزاد، عامل عمده اختلال در عملکرد اسپرم است و استرس اکسیداتیو و لیپید پراکسیداسیون غشای پلاسمایی اسپرم ایجاد شده توسط آن می تواند موجب القاء تغییرات مخرب در اجزای سلولی شود و به عملکرد های اسپرمی وابسته به غشای پلاسمایی و نیز عملکردهای وابسته به تمامیت DNA آسیب برساند (۳). علاوه بر این که نمونه منی افراد آستنوتراتوزواسپرمی خود دارای آسیب اسپرمی و لیپیدپراکسیداسیون بالا می باشد، آماده سازی و نگهداری اسپرم این افراد نیز در محیط آزمایشگاه برای انجام تکنیک کمک باروری (ART)، ممکن است چندین ساعت به طول بینجامدو طی این مرحله به دلیل ایجاد عدم تعادل در ظرفیت آنتی اکسیدانی و افزایش در تولید ROS، اسپرم ها آسیب دیده و عملکرد آن کاهش می یابد (۵،۶). بنابراین برای جلوگیری از این آسیب، اضافه نمودن فاکتورهای آنتی اکسیدانی به محیط اسپرمی ممکن است موثر واقع شود و میزان موفقیت ART را افزایش دهد (۷). ویتامین E از جمله آنتی اکسیدان‌هایی است که به طور طبیعی در مایع منی وجود دارد این آنتی اکسیدان فعالیت رادیکال های آزاد را خنثی و از تولید لیپیدپراکسیدها که سوخت واکنش زنجیره پراکسیداتیو هستند جلوگیری می کند و در نتیجه اسپرم را از آسیب‌های ROS حفاظت می‌کند (۸،۹). در زمینه اثر ویتامین E بر حفاظت انجمادی اسپرم در مدل های حیوانی و اسپرم انسانی مطالعاتی انجام گرفته است که بیانگر اثر وابسته به دوز ویتامین E در بهبود تحرک و حیات اسپرم از طریق مهار لیپید پراکسیداسیون غشای پلاسمایی اسپرم می باشد (۱۰،۱۱). تجویز خوراکی ویتامین E در ترکیب با دیگر آنتی اکسیدان ها نیز توانسته است میزان آسیب DNA را در بیماران نابارور کاهش و باعث افزایش تحرک و بهبود مورفولوژی اسپرم افراد آستنوتراتوزواسپرمی شود(۱۳،۱۲). با توجه به استرس اکسیداتیو بالای موجود در مایع منی بیماران استنوتراتوزواسپرمی و همچنین استرس اکسیداتیو ایجاد شده در مراحل آماده سازی و نگهداری اسپرم این افراد در محیط آزمایشگاه و با توجه به نقش آنتی اکسیدانی ویتامین E در بهبود خصوصیات اسپرم، هدف از این مطالعه تعیین اثر ویتامین E در زمان های انکوباسیون مختلف بر روی قابلیت تحرک، حیات و تمامیت DNA اسپرم مردان نابارور آستنوتراتوزواسپرمی بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، از مایع منی۵۰ مرد نابارور آستنوتراتوزواسپرمی (۲۵ تا ۴۰ سال) مراجعه کننده به مرکزفوق تخصصی درمان ناباروری جهاد دانشگاهی استان مرکزی (امید رویان) که بیش از یک سال از اقدامشان برای بارداری بدون پیش گیری گذشته استفاده شد. نمونه ها با فاصله زمانی ۳ روز پس از آخرین انزال یا نزدیکی با روشMasturbation در ظروف مخصوص و دهان گشاد و غیرتوکسیک جمع آوری شد (۲). این مطالعه با رعایت اصول اخلاقی و با مجوز کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی

اراک به شماره IRANKMU.REC.1394.37 صورت گرفت.

آماده‌سازی اسپرم

نمونه های منی برای مایع شدن، به مدت ۳۰ دقیقه درانکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد و آنالیز مایع منی طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی انجام گرفت (۲). سپس اسپرم‌ها در دو مرحله شستشو داده شد. نمونه های اسپرم در دور ۲۵۰۰(RPM) به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و پلاسما از پلت اسپرمی جدا گردید. سپس پلاسما در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد تا زمان آنجام آنالیزهای مربوطه نگهداری شد. میزان پراکسیداسیون لیپیدی نمونه‌های پلاسمای اسپرم در گروه های مختلف به روش اسپکتوفتومتری تیوباربیتوریک اسید (TBA) طبق متد Buege and Aust اندازه گیری گردید (۱۴).ظرفیت آنتیاکسیدانی کل (TAC) مایع منی نیز به روش Antioxidants Power Ferric Reducing of(FRAP) و طبق متد Benzie، اندازه‌گیری شد (۱۵). پس از شستشو پلت اسپرمی با محیط کشت Ham's F10(GIBCO, Paisley, UK) حاوی ۱۰ درصد آلبومین سرم انسانی (Octapharma, Lachen, Awitzerland) مخلوط شد و شمارش اسپرم بر اساس دستور العمل سازمان بهداشت جهانی(WHO) انجام شد. نمونه های اسپرم در لوله های اپندورف جداگانه تفکیک شد (یک میلی لیتر دارای ۲×۱۰۶ اسپرم) و به هر یک از لوله ها غلظت‌های صفر (گروه کنترل شامل محیط Hams F10 حاوی ۱۰ درصد آلبومین) و ۲ میلی مولار ویتامین E(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (به عنوان دوز اپتیمم برای اسپرماتوزوآ)، اضافه شد. انتخاب دوز طبق مطالعات پیشین پیرامون اثر حفاظتی این آنتی اکسیدان ها بر پارامترهای اسپرم در محیط in vitro صورت گرفت (۱۶،۱۷). سپس نمونه‌های اسپرم در زمان های مختلف (۰، ۲ ، ۴ و ۶ ساعت) انکوبه شدندو جهت اندازه گیری پارامترهای اسپرمی مورد استفاده قرار گرفتند.

ارزیابی حیات اسپرم

به منظور بررسی حیات اسپرم از روش رنگ آمیزی ائوزین – نگروزین استفاده شد (۲). برای انجام این روش محلول یک درصد ائوزین و محلول ۱۰ درصد نگروزین در آب مقطر تهیه گردید. سپس محلول ائوزین (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) را به نسبت دو به یک به مخلوط اسپرم اضافه کرده و پس از ۳۰ ثانیه محلول نگروزین (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) به اندازه مخلوط فوق اضافه شد. از مخلوط حاصل گسترش تهیه و پس از خشک شدن لام، با بزرگنمایی۱۰۰ X زیر میکروسکوپ نوری (مدل Nikon Eclipse E200) حیات سلول های اسپرم بررسی گردید. سر اسپرم های زنده در این رنگ آمیزی به رنگ سفید و اسپرم های مرده به رنگ قرمز مشاهده می شوند که این رنگ قرمز درون سیتوپلاسم به علت عبور ائوزین از غشای اسپرم مرده است. در این آزمون درصد اسپرم های زنده گزارش شد(۲).

ارزیابی تحرک اسپرم

برای سنجش حرکت اسپرم ابتدا ۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون محیط کشت و اسپرم روی لام منتقل و حرکات اسپرم زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰X مورد بررسی قرار گرفت. حداقل ۵ میدان دید میکروسکوپ برای تعیین قابلیت تحرک ۲۰۰ اسپرم برای هر نمونه بررسی و درصد اسپرم های دارای حرکت پیشرونده، حرکت درجا و بدون حرکت محاسبه گردید (۲).

ارزیابی فراگمنتاسیون DNA اسپرم

آسیب DNA در اسپرم را می توان به طور مستقیم (شکست و اکسیداسیون) و یا به طور غیر مستقیم (تراکم کروماتین) مورد ارزیابی قرار داد. تست SCD (sperm chromatin dispersion test) ، شکست DNA را اندازه گیری می‌کند. برای انجام این تست، ۷۰ میکرولیتر از نمونه اسپرمی با غلظت۵-۱۰میلیون در هر میلی‌لیتر نمونه های کنترل و تیمار شده با ویتامین E در زمان های مختلف با

آگاروز یک درصد (با درجه ذوب پایین) در دمای۳۷درجه سانتیگراد مخلوط و بر روی لامی که از قبل با آگاروز ۰/۶۵ درصد پوشیده بود گذاشته شد و باگذاشتن یک لامل بر روی آن، به مدت۴ دقیقه در دمای۴ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس با جدا کردن لامل ها، هر لام به صورت افقی در محلول اسیدکلریدریک ۰/۰۸ نرمال به مدت۷ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرارداده شد و سپس به مدت ۲۵ دقیقه در محلول لیز کننده قرار گرفت. در ادامه لام‌ها به‌مدت ۵ دقیقه با آب مقطر شستشو و به‌ترتیب در الکل۹۰، ۷۰و۱۰۰درصد،۲دقیقه دهیدراته شد. بعد از خشک شدن لام ها، با محلول رنگ Wrightو PBS به‌نسبت۱ : ۱ رنگ آمیزی و بعد از۱۰دقیقه با آب معمولی شستشو و توسط میکروسکوپ نوری بررسی گردید . درصد اسپرمهای با آسیب DNA (هسته اسپرم با هاله کوچک، بدون هاله و سلول اسپرم degrade شده) و بدون آسیب DNA (هسته اسپرم با هاله بزرگ و هاله متوسط) ارزیابی شد که در مجموع نتایج به‌صورت اندیکس فراگمنتاسیون(DFI) گزارش گردید (۱۸).

نحلیل آماری

داده های حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ (IBM Statistics 22) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. به منظور بررسی اثر متقابل گروه ها در زمان های متفاوت برروی پارامترهای مختلف اسپرم از آنالیز واریانس اندازه گیری تکراری استفاده شد. هم چنین برای مقایسه پارامترهای مختلف بین گروه ویتامین E و کنترل از آزمون t-test مستقل استفاده گردید. در نهایت مقادیر بصورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد و تفاوت میانگین ها در سطح $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

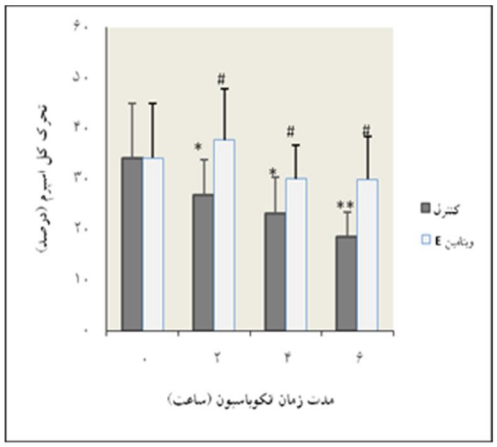
خصوصیات مایع منی افراد آستنوتراتوزواسپرمی

داده های توصیفی حاضر در جدول ۱ نشان دهنده خصوصیات مایع منی ۵۰ نفر از افراد آستنوتراتوزواسپرمی پیش از انکوبه کردن اسپرم با محیط های تیماری می‌باشد. در این جدول خصوصیاتی چون حجم مایع سمن، تحرک، تعداد، حیات و مورفولوژی طبیعی اسپرم، میزان MDA و FRAP مایع منی و میزان آسیب DNA اسپرم این بیماران نشان داده شده است.

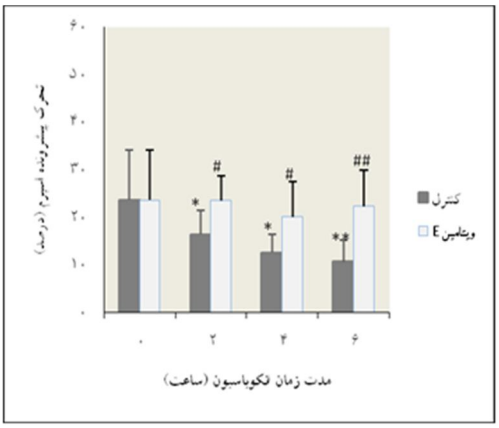
جدول ۱. اطلاعات توصیفی مربوط به پارامترهای مایع منی بیماران آستنوتراتوزواسپرمی پیش از تیمار با آنتی اکسیدان‌ها.

پارامترها(n=50)		میانگین±SD
حجم (ml)		۳/۳۵±۱/۷۸
PH		۷/۹۱±۰/۲۸
تعداد اسپرم ($\times 10^6$/ml)		۷۴/۴±۲۶/۶
تحرک کل (٪)		۳۴/۲±۱۰/۷
تحرک پیشرونده اسپرم (٪)		۳۴/۲±۱۰/۵۷
حیات اسپرم (٪)		۵۷/۶±۱۸/۵
مورفولوژی طبیعی اسپرم (٪)		۱/۶±۰/۷
MDA پلاسمای سمینال (seminal plasma)	(nmol/ml	۱/۹۳±۰/۵
ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام (seminal plasma)	(µmol/l	۱۳۳۹/۲±۱۵۰/۳
فراگمنتاسیون DNA اسپرم (٪)		۲۲/۵۳±۶/۷۴

مقایسه درصد تحرک اسپرم در گروه کنترل در زمان‌های مختلف انکوباسیون، بیان گر کاهش معنی‌دار تحرک کل و تحرک پیش‌رونده نسبت به تحرک پیش از انکوباسیون بود. به طوریکه در نمونه‌های اسپرم تیمار نشده، میزان تحرک کل و پیش‌رونده اسپرم پس از ۲ و ۴ ساعت به میزان ($p<۰/۰۵$) و پس از ۶ ساعت به میزان ($p<۰/۰۱$) به طور معنی داری کاهش یافته بود. همان طور که در نمودار ۱ مشاهده می شود، در نمونه های تیمار شده با ویتامین E (۲ میلی مولار)، افزایش معنی داری ($p<۰/۰۵$) در درصد تحرک کل اسپرم نسبت به گروه کنترل غیر تیماری مشاهده گردید. این افزایش درمیزان تحرک اسپرم در زمان ۶ ساعت به طور قابل ملاحظه ای نسبت به سایر زمان های انکوباسیون بیشتر بود. نتایج نمودار ۲ نشان دهنده افزایش معنی دار تحرک پیش‌رونده اسپرم پس از ۲، ۴ و ۶ ساعت انکوباسیون نمونه ها با ویتامین E($p<۰/۰۱$) می باشد.



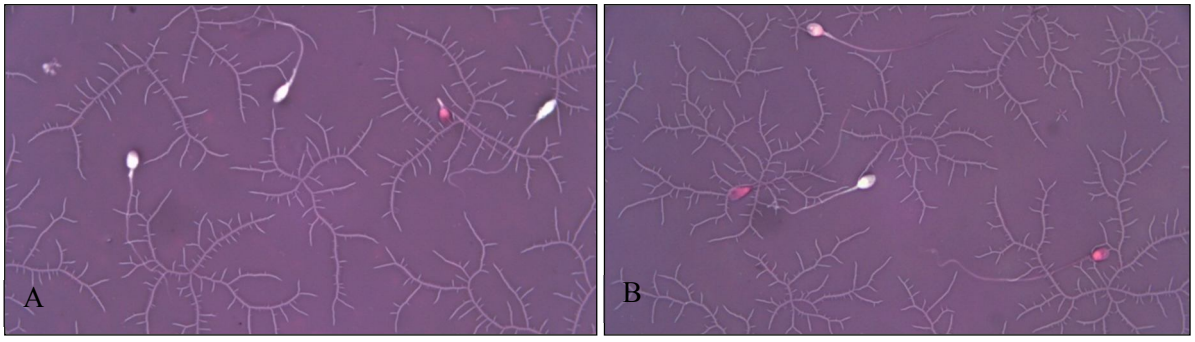
نمودار ۱. درصد تحرک کل اسپرم در گروه‌های ویتامین E و کنترل در زمان های ۰، ۲، ٤ و ٦ ساعت پس از انکوباسیون. مقادیر بصورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. p<0.001 ** ,p<0.05* مقایسه آماری با گروه کنترل پیش از انکوباسیون. p<0.05# مقایسه آماری با گروه کنترل



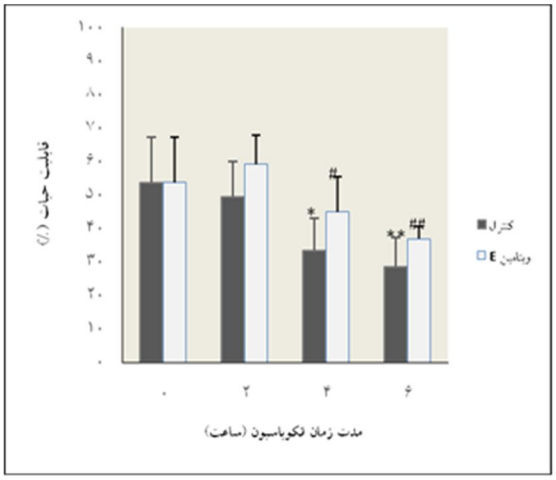
نمودار ۲. درصد تحرک پیش‌رونده اسپرم در گروه‌های ویتامین E و کنترل در زمان های ۰، ۲، ٤ و ٦ ساعت پس از انکوباسیون. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. *p<0.01 و p<0.001 تفاوت معنی‌دار گروه کنترل در مقایسه با پیش ازانکوباسیون.#p<0.01## ,p<0.03مقایسه آماری با گروه کنترل.**

قابلیت حیات اسپرم

به منظور بررسی قابلیت حیات یا زنده مانی اسپرم از روش های رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین (E&N) استفاده شد (تصویر ۱). نتایج آنالیزها نشان داد که میانگین قابلیت حیات اسپرم در گروه کنترل در زمان های ۴ (p<۰/۰۱) و ۶ ساعت (p<۰/۰۰۱) بعد از انکوباسیون اسپرم دارای کاهش معنی داری می باشد. اما پس از گذشت ۲ ساعت از انکوباسیون نمونه ها میزان زنده مانی و سلامت غشاء اسپرم‌ها در گروه کنترل کاهش معنی داری نشان نداد(نمودار۳). علاوه بر این، نمودار ۳ میانگین درصد قابلیت حیات مربوط به نمونه‌های اسپرم را در گروه های ویتامین E و نیز گروه کنترل غیر تیماری نشان می دهداین نتایج نشان داد که قابلیت حیات اسپرم در گروه ویتامین E نسبت به گروه کنترل پس از انکوباسیون در زمان های ۲ ، ۴ و ۶ ساعت دارای افزایش معنی دار می باشد (p<۰/۰۳).



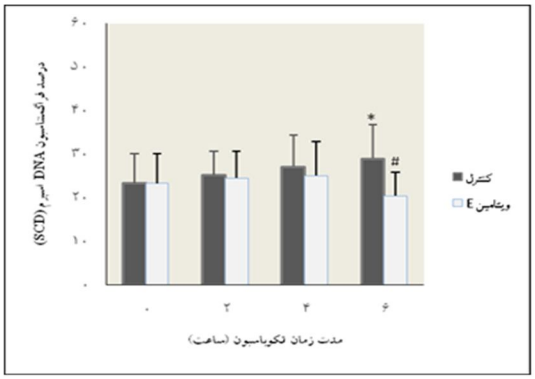
تصویر۱. قابلیت حیات اسپرم‌ها را توسط رنگ‌آمیزی ائوزین-نکروزین در گروه کنترل (A) و ویتامین E (B) نشان می دهد. اسپرم‌های زنده سفید رنگ و اسپرم های مرده به رنگ قرمز مشاهده می‌شوند (بزرگ‌نمایی ۱۰۰×).



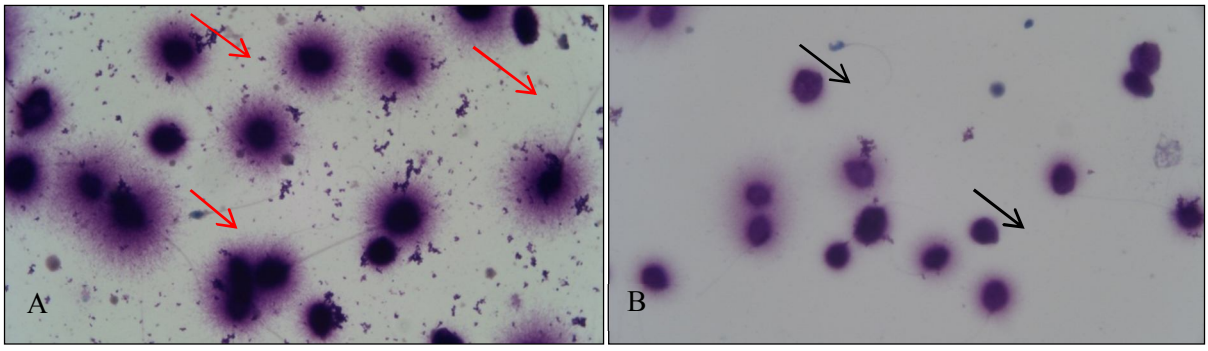
نمودار ۳. درصد قابلیت حیات با استفاده از رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین در گروه‌های ویتامین E و کنترل در زمان های صفر، ۲، ٤ و ٦ ساعت پس از انکوباسیون. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است.*p<0.01 و **p<0.001 تفاوت معنی‌دار گروه کنترل در مقایسه با پیش از انکوباسیون.#p<0.01 ,##P<0.03 مقایسه آماری با گروه کنترل.

بررسی میزان فراگمنتاسیونDNA اسپرم با استفاده از آزمون SCD

مقایسه میانگین شکست DNA اسپرم با استفاده از تست SCD بیانگر افزایش معنی دار میزان فراگمنتاسیون DNA پس از ۶ ساعت در گروه کنترل نسبت به پیش از انکوباسیون بود($p<0.01$) (نمودار ۴). در نمونه‌های اسپرم تیمار شده با ویتامین Eکاهش معنی داری ($p<۰/۰۱$) در میزان فراگمنتاسیون DNA پس از ۶ ساعت انکوباسیون، از طریق اندازه‌گیری اسپرم‌های دارای هاله طبیعی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (نمودار ۴)(تصویر ۲).



نمودار ٤. بررسی میزان آسیب DNA اسپرم با استفاده از تست SCD در گروه‌های ویتامین E و کنترل در زمان های ۰، ۲، ٤ و ٦ ساعت پس از انکوباسیون. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است*p<0.01 تفاوت معنی‌دار گروه کنترل در مقایسه با پیش از انکوباسیون.#p<0.02 مقایسه آماری با گروه کنترل.



تصویر۲. میزان آسیب DNA اسپرم را توسط تکنیک SCD و رنگ آمیزی رایت در گروه کنترل (A) و ویتامین E (B) نشان می دهد. اسپرم‌های دارای آسیب DNA (هسته اسپرم با هاله کوچک، بدون هاله و سلول اسپرم degrade شده) با فلش قرمز و اسپرم‌های بدون آسیب DNA (هسته اسپرم با هاله بزرگ و هاله متوسط) با فلش مشکی مشخص شده‌اند (بزرگ‌نمایی ۱۰۰×).

بحث

چنان که نتایج تحقیق حاضر نشان داد، میزان تحرک کل و پیش‌رونده اسپرم پس از زمان‌های مختلف انکوباسیون در گروه کنترل نسبت به پیش از انکوباسیون دارای کاهش معنی داری بود، اما میزان حیات اسپرم پس از گذشت ۲ ساعت از انکوباسیون کاهش معنی داری با لحظه صفر نداشت و تنها پس از ۴ و ۶ ساعت انکوباسیون دارای کاهش معنی داری بود. در مطالعه دیگری نیز کاهش تدریجی در تحرک و حیات اسپرم همراه با افزایش پیوسته در سطح MDA طی ۰/۵ تا ۶ ساعت پس از انکوباسیون اسپرم مشاهده گردید که تغییر در این پارامترها به استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط اسپرماتوزوآ طی نگهداری و انکوباسیون آن در آزمایشگاه، نسبت داده شد. چرا که به دلیل محتوای پایین آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در اسپرم انسان توانایی مقابله کامل با استرس اکسیداتیو وجود ندارد، در نتیجه رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده توسط اسپرماتوزوآ و لوکوسیت ها می تواند باعث افت سطح ATP داخل سلولی و در نهایت تحرک اسپرم شود و هم چنین با ایجاد لیپید پراکسیداسیون در غشاء پلاسمایی اسپرم که غنی از اسید چرب غیر اشباع است، می تواند باعث افزایش نفوذ پذیری غشاء ، غیر فعالسازی آنزیم ها و تولید محصولات اسپرم کش شود (۱۶). مطالعات کوباياشی وهمکاران در سال ۲۰۰۱ نیز نشان داد که یک کاهش پیوسته در تعداد سلولهای اسپرم زنده و فعال در ارتباط با افزایش مقدار ROS وجود دارد (۱۹). نتایج ارزیابی تست SCDنشان داد که میزان آسیب DNA اسپرم بعد از ۶ ساعت انکوباسیون درگروه کنترل غیرتیماری نسبت به پیش از انکوباسیون دارای افزایش معنی داری است. در یک مطالعه ای که توسط فرناندز و همکاران با استفاده از روش SCD به منظور ارزیابی میزان آسیب DNAاسپرم اسب نر انجام شده نشان دادند که بیشترین میزان آسیب که به DNA اسپرم وارد شده مربوط به زمان های بیش از ۶ ساعت انکوباسیون اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد می باشد(۲۰). یکی از علل آسیب DNA اسپرم ممکن است ناشی از استرس اکسیداتیو باشد. ترکیبات ROS می توانند از میتوکندری و ناحیه میانی اسپرم آزاد شده و به ساختار کروماتینی در سر اسپرم دسترسی پیدا کنند. رادیکال های آزاد اکسیژنی مانند هیدروژن پراکسید به لحاظ توانایی نفوذپذیری از خلال غشا احاطه کننده هسته، قابلیت تحت تاثیر قرار دادن هسته اسپرم و آسیب رساندن به آن را دارند (۲۱). طی لیپیدپراکسیداسیون مولکول های لیپیدی شکسته شده و محصولات حاوی کربونیل پایدار فراوانی مانند مالون دی آلدئید (MDA) و ۴-هیدروکسی-۲- آلکنال از اسیدهای چرب امگا-۶ همانند DHA بوجود می آیند. MDA جهش زا و ۴-هیدروکسی -۲- آلکنال توکسی ژنیک است. و تولید این محصولات، علاوه بر سمیت سلولی، خطرات دیگری را مانند شکست DNA اسپرم به همراه دارند. بنابراین، لیپیدپراکسیداسیون نه تنها به طور مستقیم سبب آسیب دیدن غشا و عملکرد آن می شود، بلکه به طور غیر مستقیم روی DNA و سلامت آن نیز تاثیر می گذارد (۲۲).علاوه بر این حجم کوچک مولکول های اکسیدان آنها را قادر می سازد تا به مناطقی از کروماتین نفوذ کنند که نوکلئازهایی چون DNase I به دلیل حجم زیادش قابلیت دسترسی به آن را ندارند. این دلایل به خوبی این مطلب را توجیه می کند که به چه دلیل بیشترین آسیب به DNA از طریق تنش اکسایشی حاصل می شود (۲۳). برای غلبه بر عدم تعادل بین سطوح ROS و استرس اکسیداتیو، محققان تلاش نمودند که با افزودن ترکیبات آنتی اکسیدانی در شرایط آزمایشگاهی به محیط آماده سازی اسپرم بهبودی را در نتایج روش های کمک باروری (ART) ایجاد نمایند(۲۴،۷)، چرا که استفاده از اسپرم آسیب دیده در ART ممکن است منجر به کاهش معنی دار در میزان موفقیت در لقاح و آبستنی گردد(۷). نتایج حاصله از این پژوهش نشان می دهد که تحرک کل، تحرک پیشرونده و حیات در گروه تیمار شده با ویتاین E به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش و از طرفی درصد اسپرم های با DNA آسیب دیده کاهش می یابد. تاکنون مطالعه ای

در زمینه اثر تیمار درون آزمایشگاهی ویتامین E بر پارامترهای اسپرم بیماران آستنوتراتوزواسپرمی صورت نگرفته است. اما مطالعات مختلفی بر روی اثر حفاظتی ویتامین E بر قابلیت حیات و تحرک اسپرم انسانی و حیوانی در شرایط in vivo و in vitro صورت گرفته است (۱۷،۲۵،۸،۱۶)که با نتایج مطالعه حاضر هم راستا می باشد. تجویز خوراکی ویتامین E (به میزان IU ۴۰۰) همراه با سلنیوم (به میزان ۲۰۰ میکروگرم) در بیماران استنوتراتوزواسپرمی به مدت ۱۰۰ روز، بهبود تحرک و مورفولوژی اسپرم این افراد را نشان داد(۲۶). علاوه بر این، در تیمار in vitro نمونه های اسپرم انسانی با دوزهای (۰/۱ تا ۲ میلی مولار) از ویتامین E، تحرک اسپرم به صورت وابسته به دوز بعد از زمان یک ساعت تیمار در دوزهای ۱ و ۲ میلی مولار افزایش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل داشت. با این حال، در دوز ۲ میلی مولار، تحرک و حیات اسپرم پس از ۶ ساعت انکوباسیون نسبت به گروه کنترل به میزان بیشترین مقدار بود. حیات اسپرم نیز بعد از دو ساعت در دوزهای یک و دو میلی مولار افزایش یافت (۱۶). تیمار نمونه های منی افراد تراتواسپرمی با آلفاتوکوفرول به میزان ۴۰ میکرومولار به مدت یک ساعت نشان دهنده افزایش تحرک و حیات اسپرم در نمونه های تیماری آلفاتوکوفرول نسبت به گروه کنترل بود (۲۵). در مطالعه نظم بجنوردی و همکاران نیز که اثر ویتامین E (با غلظت‌های ۱،۲ و ۵ میلی‌مولار) بر روی پارامترهای اسپرم افراد الیگواسپرمی و نیز افراد طبیعی پس از انجماد سریع بررسی شد. نتایج نشان داد که افزودن ویتامین E در دوز ۲ میلی مولار بر قدرت تحرک و به ویژه حرکت پیشرونده و میزان زنده‌ماندن اسپرم تاثیر معنی دار دارد (۱۱). در این مطالعه شاهد کاهش معنی‌دار میزان اسپرم‌های با DNA آسیب‌دیده در گروه ویتامین E در مقایسه با گروه کنترل بودیم. مطالعات مختلفی که بر روی تیمار خوراکی ویتامین E انجام گرفته نیز بیانگر این بود که ویتامین E اثر حفاظتی بر تمامیت DNA اسپرم انسان دارد و باعث کاهش میزان آسیب DNA می گردد (۲۹-۲۷). ویتامین E یا آلفا توکوفرول به علت حلالیت در چربی می‌تواند مانع از اثرات تخریبی ROS بر روی پارامترهای اسپرم شود (۳۰). یک مولکول توکوفرول به عنوان یک آنتی اکسیدانت زنجیره شکن، می تواند دو رادیکال پروکسیل لیپید و در نتیجه دو واکنش بالقوه زنجیره‌ای پراکسیداسیون را مهار کند(۳۱). ویتامین E باعث حفاظت غشای پلاسمایی اسپرم در برابر آسیب می شود علاوه بر این مورفولوژی و تحرک اسپرم را نیز از طریق اتصال به اندوپراکسیدها حفظ می‌کند (۳۲). ویتامین Eباافزایش سیستم آنتی اکسیدانی باعث افزایش قابلیت حیات اسپرم می‌شود (۱۶). هم چنین به واسطه جلوگیری از آسیب اکسیداتیو اندوژنوس DNA و جلوگیری از آسیب غشاء موجب محافظت اسپرماتوزوآ می‌شود و بدین وسیله کمک می کند تا اسپرم به حمله اکسیداتیو غلبه کند. ویتامین E می‌تواند از این طریق درصد تحرک و حیات اسپرم را بهبود بخشد و موجب حفظ تمامیت DNA اسپرم شود(۱۷).

نتیجه گیری

با توجه به یافته های این مطالعه به نظر می رسد که افزودن ویتامین E به میزان ۲ میلی‌مولار به محیط اسپرمی نمونه های بیماران آستنوتراتوزواسپرمی در شرایط درون آزمایشگاهی پیش از انجام تکنیک های ART می‌تواند روش موثری در بهبود تحرک، حیات و کاهش آسیب DNA این افراد باشد و بنابراین استفاده از آن بتواند به عنوان بخشی از فرآیند درمان بیماران ناباروری قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

با تشکر فراوان از مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری جهاد دانشگاهی استان مرکزی و دانشگاه اراک که امکانات و تجهیزات لازم برای انجام این تحقیق را فراهم نمودند.

منابع

1. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. Indian J Med Res. 2009; 129(4):357-67.
2. PRESS, W. H. O. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. World Health Organization, Geneva. 2010, S. 7-113.
3. Fanaei H, Khayat S, Halvaei I, Ramezani V, Azizi Y, Kasaeian A, et al. Effects of ascorbic acid on sperm motility, viability, acrosome reaction and DNA integrity in teratozoospermic samples. Iranian journal of reproductive medicine. 2014 Feb; 12(2):103.
4. Colagar AH, Karimi F, Jorsaraei SG. Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno-and oligoasheno-teratospermic men. Iranian Red Crescent Medical Journal. 2013 Sep; 15(9):780.
5. Gibb Z, & Aitken RJ. The impact of sperm metabolism during in vitro storage: The stallion as a model. BioMed research international. 2016 ; 2016, 1-8.
6. Nabi A, Khalili MA, Halvaei I, Roodbari F. Prolonged incubation of processed human spermatozoa will increase DNA fragmentation. Andrologia. 2014 May 1;46(4):374-9.
7. Im Yun J, Gong SP, Song YH, Lee ST. Effects of combined antioxidant supplementation on human sperm motility and morphology during sperm manipulation in vitro. Fertility and sterility. 2013 Aug 31; 100(2):373-8.
8.Tabatabaei S, Batavani R, Ayen E. Effects of vitamin E addition to chicken semen on sperm quality during in vitro storage of semen. InVeterinary Research Forum 2011 June; 2(2): 103-111. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University.
9. Franco JS, Chaveiro A, Góis A, da Silva FM. Effects of α-tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. Journal of equine veterinary science. 2013 Oct 31; 33(10):787-93.
10. Breininger E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM, Beconi MT. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. Theriogenology. 2005 May 31; 63(8):2126-35.
11. NazmBojnoordi M, Movahedin M, Amanpoor S, Ghasemi Hamid Abadi H. [The effect of antioxidants on the quality of frozen-thawed sperm with the rapid freezing method]. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences, 2008; 18(63): 20-27.
12. Rengaraj D, Hong YH. Effects of dietary vitamin E on fertility functions in poultry species. International journal of molecular sciences. 2015 Apr 30; 16(5):9910-21.
13. Ahmadi S, Bashiri R, Ghadiri-Anari A, Nadjarzadeh A. Antioxidant supplements and semen parameters: An evidence based review. International Journal of Reproductive Biomedicine. 2016; 14(12):729-736.
14. Buege JA, Aust SD. [30] Microsomal lipid peroxidation. Methods in enzymology. 1978 Dec 31; 52:302-10.
15. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical biochemistry. 1996 Jul 15; 239(1):70-6.
16.Verma A, Kanwar KC. Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. Asian J Androl. 1999 Sep; 1(3):151-4.
17. Bansal AK, Bilaspuri GS. Antioxidant effect of vitamin E on motility, viability and lipid peroxidation of cattle spermatozoa under oxidative stress. Animal Science Papers and Reports, 2009; 27(1):5-14.
18. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. FertilSteril.2005 Oct 31; 84(4):833-42.
19. Kobayashi H, GIL□GUZMAN EN, Mahran AM, Sharma RK, Nelson DR, AGARWAL A. Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol□dependent chemiluminescence assay. Journal of andrology. 2001 Jul 8; 22(4):568-74.

20.Keshtgar S, Fanaei H, Bahmanpour S, Azad F, Ghannadi A, Kazeroni M. In vitro effects of α□ tocopherol on teratozoospermic semen samples. Andrologia. 2012 May 1;44(s1):721-7.
21.López-Fernández C, Crespo F, Arroyo F, Fernández JL, Arana P, Johnston SD, et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: II. The stallion. Theriogenology. 2007 Dec 31; 68(9):1240-50.
22. Aitken RJ, Baker MA. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. International Journal of Developmental Biology. 2013; 57(2-3-4): 265-272.
23. Nabil H, Moemen LA, Elela MHA. Studying the levels of malondialdehyde and antioxidant parameters in normal and abnormal human seminal plasma. Aust J Basic Appl Sci. 2008; 2(3): 773-8.
24. Aitken RJ, Bronson R, Smith TB, De Iuliis GN. The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies. MHR: Basic science of reproductive medicine. 2013 Apr 1; 19(8):475-85.
25.Banihani S, Sharma R, Bayachou M, Sabanegh E, Agarwal A. Human sperm DNA oxidation, motility and viability in the presence of l□carnitine during in vitro incubation and centrifugation. Andrologia. 2012; 44(s1):505-512.
26. Moslemi MK, Tavanbakhsh S. Selenium-vitamin E supplementation in infertile men: effects on semen parameters and pregnancy rate. Int J Gen Med. 2011; 4:99–104.
27.Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. Journal of andrology. 2005; 26(3): 349-353
28.Abad C, Amengual MJ, Gosálvez J, Coward K, Hannaoui N, Benet J, et al. Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and subpopulations of sperm with highly degraded DNA. Andrologia. 2013 Jun 1; 45(3):211-6.
29.Sadeghpour S, Ghasemzadeh A, Nouri M, Danaii S, &GhasemnejadBerenji H. [Effects of antioxidative treatments on sperm DNA fragmentation and pregnancy results in IUI]. Urmia Medical Journal. 2015 Mar 15; 25(12):1050-9
30. Khanalizadeh M, Najafian M. The Effect of Vitamin E and Selenium on Cyclophosphamide Detoxification in Hepatic Tissues of Mature Rats. Int J Adv Biol Biom Res. 2014; 2(4):1406-1413.
31. Marin-Guzman J, Mahan DC, & Pate JL. Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars. Journal of animal science. 2000; 78(6): 1537-1543.