مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۹۳/هفته دوم شهریور ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۴/۱۶

بهینه نمودن رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج جهت ارزیابی تأثیر حفاظتی زعفران و ویتامین E بر ساختار DNA هسته‌ی اسپرم رت

دکتر شهناز رضوی[۱]، سید احمد واعظ[۲]، دکتر محمد مردانی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در دهه‌های اخیر، ارتباط بین غلظت ROS (Reactive oxygen species) و کیفیت مایع Semen مورد توجه قرار گرفته و تأثیر آن بر ناباروری در مطالعات متعددی بررسی شده است. زعفران نه تنها به عنوان یک افزودنی غذایی، بلکه به طور سنتی به عنوان یک گیاه دارویی که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است، همواره مورد توجه بوده است. ویتامین E نیز آنتی‌اکسیدان بسیار قوی است و قادر است سلول و اجزای آن را در مقابل هجوم آنتی‌اکسیدان‌ها محافظت نماید. هدف از این مطالعه، بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی زعفران و ویتامین E در حفاظت از دناتوراسیون ساختار کروماتین اسپرم در مواجهه با اسید بود.

روش‌ها: تعداد ۳۰ رت نر بالغ ویستار به صورت اتفاقی و مساوی به سه گروه شاهد (۰/۵ cc/day آب مقطر روزانه)، زعفران (۱۰۰ mg/kg/day) و ویتامین E (۱۰۰ mg/kg/day) تقسیم شدند. پس از ۶۰ روز دوره‌ی تیمار، اپیدیدیم جدا شد و از اسپرم‌های ناحیه‌ی دم آن، جهت بررسی مقاومت ساختار DNA در مقابل اسید درجنت با استفاده از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج (OA یا Acridine orange) استفاده شد.

یافته‌ها: زعفران و ویتامین E باعث کاهش حساسیت DNA به آسیب توسط اسید درجنت می‌شوند ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: احتمال می‌رود زعفران و ویتامین E به دلیل پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بالای خود، قادر باشند ساختار کروماتین را از اثرات تخریبی اسید درجنت محافظت نمایند.

واژگان کلیدی: آنتی‌اکسیدان، زعفران، ویتامین E، آسیب DNA

ارجاع: رضوی شهناز، واعظ سید احمد، مردانی محمد. **بهینه نمودن رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج جهت ارزیابی تأثیر حفاظتی زعفران و ویتامین E بر ساختار DNA هسته‌ی اسپرم رت.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۳): ۱۰۷۲-۱۰۶۱

مقدمه

یکی از عوامل مهمی که در سال‌های اخیر به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است و می‌تواند باروری را متأثر کند، استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) است. استرس اکسیداتیو اختلالی است که با تولید بیش از حد مولکول‌های فعال ROS (Reactive oxygen species) و نارسایی سیستم آنتی‌اکسیدانی همراه است (۱).

۱- استاد، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر شهناز رضوی
Email: razavi@med.mui.ac.ir

در سطح فیزیولوژیک، وجود ROS برای اسپرم و عملکردهای طبیعی آن مثل واکنش آکروزومی و ظرفیت پذیری لازم است. همچنین ROS برای فرایندهای تولید مثل مانند تعامل بین اسپرم و اووسیت، لانه‌گزینی و تکامل اولیه‌ی جنین حیاتی است (۲).

مشخص شده است که تولید بیش از حد ROS باعث قطعه قطعه شدن DNA می‌شود. این تخریب، از طریق تغییر در بازهای آلی، شکستن پیوندهای عرضی بین دو رشته‌ی DNA و یا شکستگی در یک رشته‌ی DNA، حذف و یا آرایش مجدد کروموزومی رخ می‌دهد که می‌تواند به شکست لقاح منجر شود (۳).

ایجاد تراکم در کروماتین اسپرم یکی از استراتژی‌های اصلی حفظ کروماتین در برابر اثرات مخرب استرس اکسیداتیو است. در طول فاز اسپرمیوژنز، هیستون‌ها ابتدا توسط پروتئین‌های انتقالی و سپس توسط پروتامین‌ها (پروتئین‌های به شدت بازی و غنی از سیستئین/ آرژنین) جایگزین می‌شوند، در نتیجه کروماتین اسپرم به شدت فشرده می‌شود (۴).

حفظ تمامیت کروماتین، یک عامل اساسی و مهم در افزایش میزان باروری، کیفیت جنین و پیشبرد حاملگی است (۵). از جمله آزمایش‌هایی که جهت بررسی وضعیت ساختار کروماتین استفاده می‌شوند، کروموما‌یسین A_3، آکریدین اورنج، آنیلین بلو و تولوئیدین بلو را می‌توان نام برد که آزمایش‌های کارآمدی هستند (۷-۶).

همچنین از رنگ آکریدین اورنج (AO یا Acridine orange) جهت نشان دادن حساسیت DNA هسته‌ی اسپرم به دنیچره شدن توسط اسید استفاده می‌شود. در این روش، حساسیت DNA به صورت تغییر رنگ از سبز در DNA سالم به نارنجی و قرمز در DNA آسیب دیده متغیر است. مونومرهای AO بر روی DNA دو رشته‌ای می‌نشینند. در حالی که تجمع AO روی DNA تک رشته‌ای قرار می‌گیرد (۹-۸).

استراتژی دیگر اسپرم در برابر هجوم رادیکال‌های آزاد، وجود سیستم آنتی‌اکسیدانی است (۱۰). ویتامین E (α-tocopherol) یک آنتی‌اکسیدان مهم و ضروری برای نگهداری روند اسپرماتوژنز پستانداران است. ویتامین E یک آنتی‌اکسیدان قوی است که بر روی غشای سلولی حضور دارد و با شکستن زنجیره‌ی اکسیداتیو نقش مهمی در حفاظت از سلول بازی می‌کند (۱۱).

استفاده از گیاهان دارویی به طور روز افزونی در حال افزایش است. یکی از گیاهان دارویی که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است و در ایران تولید می‌شود، زعفران است که به دلیل رنگ، طعم و بوی خاص، از آن به عنوان یک افزودنی غذایی استفاده می‌گردد. زعفران (Crocus sativus L.) کلاله‌ی خشک شده‌ی گل زعفران است که متعلق به خانواده‌ی Iridaceae و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است (۱۲).

مطالعات قبلی طیف گسترده‌ای از اثرات دارویی زعفران و مواد مؤثر آن را نشان داده‌اند. برخی از اثرات درمانی زعفران و اجزای موجود در آن که مرتبط با این تحقیق است، عبارت از خواص آنتی‌اکسیدانی و از بین برنده‌ی رادیکال‌های آزاد، محرک قوای جنسی، اثر حفاظت ژنتیکی، ضد موتاسیون (۱۳)، بهبود مورفولوژی و تحرک اسپرم (۱۴) هستند.

در این مطالعه با القای آسیب DNA اسپرم توسط اسید دترجنت، میزان کارایی زعفران و ویتامین E به

عنوان آنتی‌اکسیدان‌های فعال در مقابله با این آسیب بررسی می‌شود. ارزیابی آسیب DNA با استفاده از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج صورت می‌گیرد.

روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

در این آزمایش ۳۰ رت نر بالغ ویستار، با سن ۱۲ هفته و وزن ۲۰۰–۱۸۰ g از مؤسسه‌ی انستیتو پاستور تهران خریداری شد. قبل از شروع مطالعه، به مدت ۱۰ روز حیوانات در شرایط مشابه دوره‌ی مطالعه نگهداری شدند.

رت‌ها به طور اتفاقی به سه گروه ۱۰ تایی تقسیم گردیدند. گروه اول روزانه ۱۰۰ mg/kg زعفران، گروه دوم روزانه ۱۰۰ mg/kg ویتامین E و گروه سوم (شاهد) روزانه ۰/۵ cc آب مقطر از طریق گاواژ به مدت ۶۰ روز دریافت کردند.

رت‌ها در شرایط استاندارد در قفس‌های مخصوص به ابعاد $20 \times 30 \times 40\ cm^3$ (هر ۵ رت در یک قفس)، در دمای ۲ ± ۲۱ °C و تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در شبانه‌روز همراه با دسترسی آزاد به آب و غذای مخصوص جوندگان قرار گرفتند. پس از اتمام دوره‌ی درمان، رت‌ها ابتدا با کلروفرم بیهوش و سپس با روش قطع نخاع قربانی شدند.

آماده‌سازی زعفران و ویتامین E

زعفران مصرفی در این مطالعه از قائن خراسان تهیه گردید. ۱۰۰۰ mg کلاله‌ی خشک زعفران ابتدا آسیاب گردید و سپس به مدت حداقل ۲ ساعت با ۲۰ ml آب مقطر گرم مخلوط شد. محلول به دست آمده در دمای ۴ °C نگهداری شد و روزانه از آن برای درمان گروه زعفران استفاده گردید. ویتامین E (با نام (±)– α-Tocopherol analytical standard) از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد.

تهیه‌ی اسپرم از اپیدیدیم

پس از قطع نخاع و قربانی کردن رت‌ها، به طور اپیدیدیم چپ خارج شد. انتهای دیستال دم اپیدیدیم جدا شد و در پتری دیش حاوی ۲ ml نرمال سالین ۳۷ °C قرار داده شد. برای خروج راحت‌تر اسپرم‌ها چندین برش در اپیدیدیم زده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور (۳۷ °C) قرار گرفت تا اسپرم‌ها از قطعات بافتی خارج شوند و سوسپانسیونی از اسپرم ایجاد شود. از این سوسپانسیون، جهت رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج (AO) و بررسی پارامترهای اسپرم استفاده شد.

بررسی پارامترهای اسپرم

با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ فاز کنتراست، تعداد، تحرک و مورفولوژی اسپرم‌ها بررسی شد.

تعداد اسپرم: سوسپانسیون اسپرم به نسبت ۱:۲۰ با نرمال سالین رقیق گردید. از سوسپانسیون حاضر مقدار ۱۰ µl بر روی لام نئوبار قرار گرفت و لامل روی آن گذاشته شد. به استثنای مربع وسط (مخصوص شمارش اریتروسیت یا Central erythrocyte counting area)، شمارش اسپرم در ۸ مربع بزرگ دیگر لام نئوبار انجام شد. عدد حاصل در ۱۰۴ × ۵ ضرب شد تا تعداد کل اسپرم به صورت تقریبی به دست آید (۱۵).

تحرک اسپرم: جهت بررسی تحرک اسپرم رت، یک قطره از سوسپانسیون اسپرم روی لام نئوبار گرم قرار گرفت و لاملی روی آن گذاشته شد. حداقل ۱۰ میدان میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ فاز

کنتراست و بزرگ‌نمایی ۲۰۰ × شمارش شد و درصد اسپرم‌های متحرک و غیر متحرک محاسبه گردید (۱۶).

مورفولوژی اسپرم: بررسی با میکروسکوپ فاز کنتراست نمایی مناسب از نقص‌های مورفولوژیک اسپرم را فراهم می‌آورد (۱۷). تعداد حداقل ۲۰۰ اسپرم برای هر رت با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ × و لام نئوبار شمارش گردید. داده‌ها به صورت درصد اسپرم‌های طبیعی و غیر طبیعی با زیر گروه‌های ناهنجاری سر، ناهنجاری گردن و ناهنجاری دم نشان داده شد (۱۸).

بررسی ساختار کروماتین اسپرم

رنگ‌آمیزی AO بدون انکوباسیون محلول اسید درجنت: برای رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج پس از تهیه‌ی اسمیر با غلظت مناسب از سوسپانسیون اسپرم، ابتدا اسمیرها در فیکساتیو کارنوی (حداقل ۲ ساعت) فیکس شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با رنگ آکریدین اورنج ۰/۱۹ mg/ml تازه تهیه شده در بافر سیترات فسفات (pH ۲/۵، ۰/۳ M NaH_2PO_4 + ۵ ml ۰/۱ M Citric acid ۸۰ ml) انکوبه گردید. تمام اسمیرها در یک روز و توسط میکروسکوپ فاز کنتراست با فیلتر ۴۶۰ nm بررسی شدند. میزان نوردهی حداکثر به ۴۰ ثانیه برای بررسی هر فیلد محدود بود. رنگ سبز، مربوط به اسپرم‌های با DNA طبیعی و رنگ نارنجی تا قرمز، مربوط به DNA دنیچره بود. در مجموع، تعداد ۲۰۰ اسپرم برای هر نمونه بررسی گردید (۸).

رنگ‌آمیزی AO همراه با انکوباسیون محلول اسید درجنت: در این روش پس از فیکس کردن و قبل از رنگ‌آمیزی با آکریدین اورنج (AO)، اسمیرها ابتدا به مدت ۱ دقیقه با محلول اسید درجنت (pH۱/۲، ۱۰۰ Triton-X ۰/۱ درصد، ۰/۱۵ M NaCl، ۰/۰۸ N HCl) انکوبه شدند. پس از آن رنگ‌آمیزی با AO انجام شد.

آنالیز آماری

در این بررسی از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۷/۰ (version 17, SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده شد. تمام داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون One-way ANOVA (One-way analysis of variance) و به دنبال آن با آزمون Tukey مقایسه شدند. $P < ۰/۰۵۰$ بیانگر معنی‌داری داده‌ها بود.

یافته‌ها

پارامترهای اسپرمی

تعداد اسپرم: شمارش تعداد اسپرم رت‌های تیمار شده با زعفران و ویتامین E (گروه‌های مورد) در مقایسه با گروه شاهد، افزایش معنی‌داری نشان نداد (جدول ۱).

تحرک اسپرم: میانگین درصد اسپرم‌های متحرک در گروه ویتامین E و زعفران در مقایسه با گروه شاهد، افزایش معنی‌داری داشت ($P \leq ۰/۰۰۱$). همچنین افزایش میانگین درصد اسپرم‌های متحرک در گروه زعفران در مقایسه با گروه ویتامین E نیز معنی‌دار بود ($P = ۰/۰۰۷$) (جدول ۱).

مورفولوژی اسپرم: میانگین درصد کل ناهنجاری‌های اسپرم در گروه‌های زعفران و ویتامین E در مقایسه با گروه شاهد، کاهش معنی‌داری داشت ($P \leq ۰/۰۰۱$). بررسی زیر گروه ناهنجاری‌های مورفولوژیک اسپرم نیز کاهش معنی‌دار را نشان داد. بدین صورت که مقدار P در زیر گروه سر و گردن اسپرم در گروه‌های مورد در مقایسه با گروه شاهد $P \leq ۰/۰۰۱$ و در زیر گروه ناهنجاری دم، در

گروه‌های زعفران و ویتامین E در مقایسه با گروه شاهد، به ترتیب برابر با P = ۰/۰۰۴ و P = ۰/۰۰۱ بود (جدول ۱).

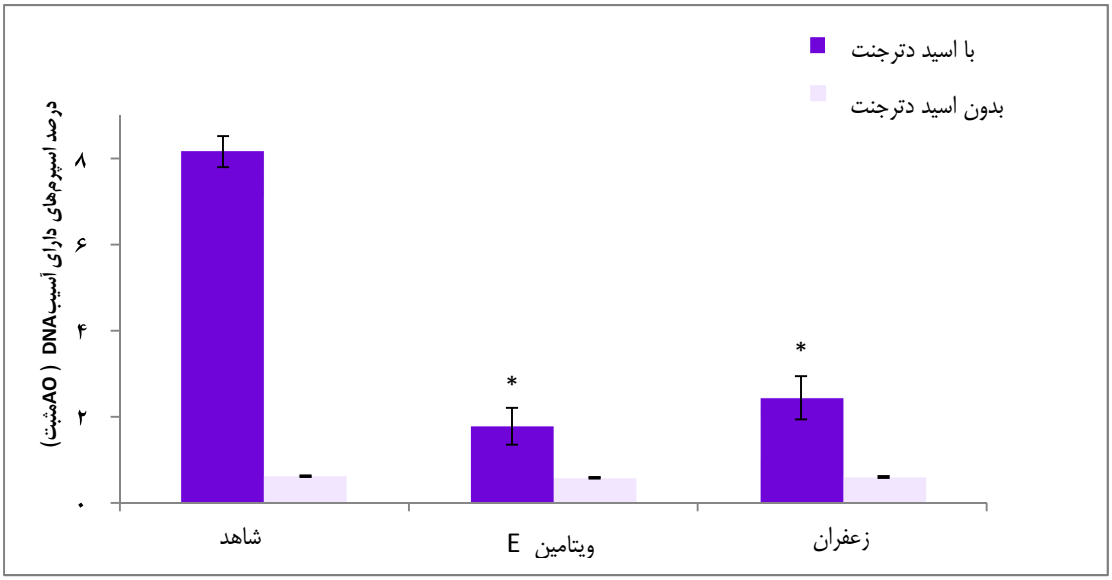
رنگ‌آمیزی AO بدون انکوباسیون با اسید دترجنت: میانگین درصد اسپرم‌های دارای آسیب DNA (AO مثبت) در گروه‌های شاهد، ویتامین E و زعفران به ترتیب ۰/۱۷ ± ۱/۰۰، ۰/۱۲ ± ۰/۷۱ و ۰/۱۶ ± ۰/۹۴ به دست آمد. هیچ اختلاف معنی‌داری در میانگین اسپرم‌های دارای آسیب DNA (AO مثبت) بین گروه شاهد و گروه‌های مورد مشاهده نگردید (شکل ۱).

رنگ‌آمیزی AO همراه با انکوباسیون با اسید دترجنت: میانگین درصد اسپرم‌های AO^+ در گروه شاهد ۱/۶۴ ± ۲۶/۹۸ بود که به ترتیب در گروه‌های ویتامین E و زعفران به ۰/۸۵ ± ۵/۸۲ و ۱/۱۳ ± ۶/۹۳ کاهش معنی‌دار داشت (P ≤ ۰/۰۰۱) (شکل ۱).

جدول ۱. میانگین درصد پارامترهای اسپرمی در گروه‌های مختلف

پارامترها	گروه‌ها		
	شاهد	ویتامین E	زعفران
تعداد اسپرم ($\times 10^6$)	۸۸/۷۳ ± ۱۰/۶۶	۱۱۲/۶۵ ± ۱۵/۲۸	۱۲/۴۰±۹۷/۴۰
تحرک اسپرم (درصد)	۵/۹۰ ± ۰/۶۱	۱۲/۵۱ ± ۱/۲۷**	۱۷/۹۵ ± ۱/۴۳**،*a
ناهنجاری‌های سر (درصد)	۱۲/۲۷ ± ۰/۵۹	۵/۲۸ ± ۰/۸۱**	۶/۱۶ ± ۰/۶۰**
ناهنجاری‌های گردن (درصد)	۲۵/۲۱ ± ۱/۷۹	۱۱/۱۳ ± ۱/۰۲**	۱۱/۶۳ ± ۰/۸۲**
ناهنجاری‌های دم (درصد)	۱/۷۸ ± ۰/۰۹	۰/۹۵ ± ۰/۱۱**	۱/۰۳ ± ۰/۲۱*
کل ناهنجاری (درصد)	۳۹/۲۸ ± ۱/۴۵	۱۷/۳۸ ± ۱/۵۰**	۱۹/۹۶ ± ۱/۳۳**

* P < ۰/۰۱۰ و ** P ≤ ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه شاهد، a: در مقایسه به گروه ویتامین E



شکل ۱. رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج با و بدون انکوبه کردن با اسید دترجنت در گروه‌های مورد و شاهد

P ≤ ۰/۰۰۱ *

بحث

با وجود این که آنالیز پارامترهای سمن (semen) یک ابزار تشخیصی ارزشمند برای ارزیابی وضعیت باروری مردان است. پیش‌بینی باروری بالقوه تنها بر اساس آن چندان قابل اعتماد نیست. پارامترهای متداول مورد استفاده برای ارزیابی سمن دارای کاربرد محدودی هستند (۱۹). هر سلول اسپرم شامل بخش‌های ساختاری مختلفی است که دارای عملکردهای متفاوتی هستند و برای لقاح موفق، همه‌ی آن‌ها باید عملکرد صحیح داشته باشند (۲۰). بنابراین بررسی اسپرم از نظر پارامترهای مرسوم همراه با ارزیابی ساختارهای مهمی چون غشای پلاسمایی و کروماتین، کمک شایانی در تشخیص ناباروری با علل مردانه می‌کند.

عواملی که موجب کاهش کیفیت سمن می‌شوند، می‌توانند به مرگ جنین ختم شوند. ROS یکی از مواردی است که کیفیت سمن را تحت تأثیر قرار می‌دهد و در مواردی که بیش از حد طبیعی تولید شود، می‌تواند به اسپرم آسیب وارد کند. اسپرم آسیب دیده، می‌تواند با تخمک لقاح انجام دهد؛ اما تکامل رویان حاصل به میزان آسیب DNA بسیار وابسته است (۲۱). تولید تعداد کمتر اسپرم و تغییر در مورفولوژی آن می‌تواند در فردی که در معرض موتاژن‌ها قرار دارد، ایجاد شود (۲۲). ناهنجاری‌هایی مانند بسته‌بندی ضعیف کروماتین و آسیب DNA، با کیفیت پایین سمن همراه هستند (۲۳).

Bochenek و همکاران نشان دادند که وجود کروماتین غیر طبیعی در تعداد زیادی از اسپرم‌های گاو، موجب کاهش باروری می‌شود (۲۴). همچنین نشان داده شده است که بخشی از اسپرم‌های متحرک در افراد نابارور، دارای فراگمانتاسیون DNA هستند (۲۵). آسیب کروماتین اسپرم را می‌توان به وسیله‌ی آکریدین اورنج تشخیص داد؛ چرا که DNA دارای شکستگی، به شرایط اسیدی pH = ۱/۲ حساس است (۲۶).

عدم رنگ‌پذیری نمونه‌ها در شرایط متداول رنگ‌آمیزی AO، می‌تواند به علت اختلاف ساختار غشای سلولی نمونه‌های رت با انسان باشد. از این رو، هنگام استفاده از محلول اسید دترجنت که حاوی Triton-X ۱۰۰ می‌باشد، این شرایط غشا را نسبت به رنگ نفوذ پذیرتر می‌کند و رنگ AO به کروماتین دسترسی خواهد داشت و با قرارگیری به صورت مجتمع بر روی شکستگی‌های DNA، آسیب را بیشتر نمایان می‌سازد.

با این حال، می‌توان احتمال دیگری نیز در نظر گرفت. حضور محلول اسید دترجنت یک عامل آسیب رساننده‌ی قوی به غشا و کروماتین است. قرارگیری محلول اسیدی مجاور کروماتین باعث شکستگی‌های وسیع در DNA اسپرم می‌گردد. این آسیب در گروه شاهد بسیار شدید است و می‌توان چنین نتیجه گرفت که تغذیه‌ی رت‌ها با زعفران و ویتامین E موجب مقاوم‌تر شدن کروماتین در برابر آسیب اکسیدان‌ها می‌گردد.

اختلال در تمامیت ساختار کروماتین می‌تواند به صورت شکستگی‌های تک رشته‌ای و دو رشته‌ای مشخص گردد که باعث ایجاد قطعات دنیچره‌ی تک رشته (SSDNA یا Single strand DNA) می‌شود. این مورد باعث ایجاد رنگ قرمز در حضور آکریدین اورنج و در طول موج ۴۸۸ nm می‌شود که مشخص کننده‌ی اتصال آکریدین اورنج به SSDNA است. در حالی که وقتی آکریدین اورنج به DNA دو رشته‌ای

(DSDNA یا Double strand DNA) متصل می‌شود، رنگ سبز تولید می‌کند (۲۶).

در طول روند اسپرمیوژنز، هیستون‌ها توسط پروتامین جایگزین می‌شوند. این بازآرایی، کروماتین را در برابر عواملی مانند دترجنت‌ها، اسیدها، DNaseها و پروتئازها مقاوم می‌سازد (۲۷).

در برابر هجوم رادیکال‌های آزاد، وجود سیستم آنتی‌اکسیدانی و تراکم کروماتین اسپرم دو مکانیسم مؤثری هستند که اجزای سلولی اسپرم را محافظت می‌نمایند.

از طرف دیگر، هنگامی که ROS بیش از حد تولید شود، سیستم آنتی‌اکسیدانی قادر به مقابله با آن نیست و در نتیجه، منجر به ایجاد شرایطی به نام استرس اکسیداتیو می‌شود. تمام اجزای سلولی هدف بالقوه‌ای برای استرس اکسیداتیو محسوب می‌شوند (۲۹-۲۸، ۱). از سوی دیگر، حدود ۲۵ درصد از مردان نابارور، مبتلا به ناباروری با علت ناشناخته هستند و آنالیز مایع سمن آن‌ها دارای مقادیر غیر طبیعی ROS است (۳۰).

مشخص شده است که آسیب DNA اسپرم می‌تواند با کیفیت پایین تکامل جنین در مراحل بعدی همراه باشد (۳۱، ۸). نصر اصفهانی و همکاران نشان دادند که بین آزمایش‌های بلوغ هسته‌ی اسپرم و میزان موفقیت در لقاح آزمایشگاهی، ارتباط معنی‌داری وجود دارد و از طریق بررسی وضعیت کروماتین اسپرم، می‌توان شانس موفقیت در لقاح آزمایشگاهی را پیشگویی کرد (۸).

به علاوه، مشخص گردیده است که آسیب DNA اسپرم و کمبود پروتامین علاوه بر میزان موفقیت در لقاح به طریق ICSI (Intra-cytoplasmic sperm injection)، بر تکامل جنین نیز تأثیر دارد؛ به طوری که جنین‌هایی که از اسپرم‌های دارای آسیب DNA بالا ایجاد می‌شوند، پتانسیل کمتری جهت رسیدن به مرحله‌ی بلاستوسیست را دارند (۳۲). استرس اکسیداتیو می‌تواند با تغییر، جابه‌جایی، ایجاد سایت‌های آزاد و حذف بازها موجب آسیب DNA شود (۳). اگر آسیب جزیی باشد، اسپرم (همچنین تخمک) قادر است آن را اصلاح نماید (۲۹)؛ اما در آسیب‌های گسترده، آپوپتوز و تکه تکه شدن جنین (Embryo fragmentation) می‌تواند رخ دهد (۳۳).

آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند DNA و دیگر اجزای سلولی را محافظت نمایند و از این طریق، کیفیت مایع سمن را بهبود بخشند (۳۴). در سال‌های اخیر، توجهات به سمت استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های غذایی و گیاهان دارویی متمرکز شده است. از خصوصیات زعفران و عناصر سازنده‌ی آن، تحریک میل جنسی، بهبود عملکرد ارکشن و افزایش کیفیت مایع سمن است که در طب سنتی از آن برای درمان ناتوانی‌های جنسی استفاده می‌شده است (۳۵، ۱۴).

ویتامین E نیز به عنوان یک آنتی‌اکسیدان اندوژن و همچنین آنتی‌اکسیدان رژیم غذایی (مکمل غذایی)، با عملکرد طبیعی سیستم تولید مثل مذکر مرتبط است و همچنین اسپرم و ساختار سلولی آن را در برابر رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند (۳۶). ویتامین E یک آنتی‌اکسیدان لیپوفیلیک است که بر روی غشای سلول قرار دارد و نقش مهمی در حفاظت سلول علیه اکسیدان‌ها بر عهده دارد (۳۷).

زعفران نیز دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی است که این اثرات به دلیل وجود عناصر کاروتنوئید موجود در آن (سافرانال، کروسین، کروستین، و دی‌متیل

کروستین) است. هر یک از این عوامل، ویژگی آنتی‌اکسیدانی منحصر به فردی دارند؛ با این حال، اثر سینرژیسم آن‌ها پتانسیل آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی به زعفران می‌دهد (۳۸).

نتایج این مطالعه نشان داد که زعفران و ویتامین E می‌تواند پارامترهای اسپرمی را بهبود بخشد، ساختار کروماتین اسپرم را محافظت نماید و حساسیت DNA به دناتوراسیون پس از قرار گرفتن در معرض محلول اسید دترجنت را کاهش دهد.

مطالعات زیادی اثرات آنتی‌اکسیدانی زعفران را نشان داده‌اند. از جمله حسین‌زاده و همکاران نشان دادند که کاربرد داخل صفاقی عصاره‌ی زعفران و کاروتنوئیدهای سازنده‌ی آن (سافرانال و کروسین) در رت موجب بهبود رفتارهای جنسی مثل افزایش دفعات ارکشن، افزایش دفعات مقاربت، انزال سریع‌تر و ... می‌شود (۳۵). به علاوه، مشخص شده است که استفاده از ۵۰ mg زعفران ۳ بار در هفته به مدت ۳ ماه، به طور معنی‌داری مورفولوژی طبیعی و تحرک اسپرم انسان را بهبود می‌بخشد، اما بر تعداد اسپرم بی‌تأثیر است (۱۴).

همچنین Dominguez-Rebolledo و همکاران نشان دادند که مصرف کروسین به خصوص ۱ mM تحرک را در اسپرم‌های گوزن قرمز که از انجماد خارج شده است، بهبود می‌بخشد؛ اما بر لیپید پراکسیداسیون بی‌تأثیر است (۳۹). به نظر می‌رسد این خصوصیات آنتی‌اکسیدانی زعفران است که این اثرات را ایجاد می‌کند.

در مقابل، در مطالعه‌ی دیگری نشان داده شده است که در مقایسه با گروه دارونما، در نمونه‌های الیگو آستنو تراتوزو اسپرمیای با علت ناشناخته، استفاده از زعفران (۶۰ mg/day) اثر مثبتی بر پارامترهای اسپرم (تعداد، مورفولوژی و تحرک اسپرم‌ها) ندارد. همچنین در مقایسه با گروه شاهد، زعفران بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این افراد نیز تأثیر قابل توجهی ندارد (۴۰). این اختلاف در نتایج ممکن است به دلیل استفاده از دوزهای متفاوت باشد. همچنین نوع جمعیت مورد آزمایش (در برخی موارد افراد سالم و در سایر مطالعات افراد نابارور) نیز می‌تواند عاملی در ایجاد نتایج متفاوت باشد.

در مورد ویتامین E نیز گزارش شده است که تجویز آن به میزان ۳۰۰ mg در بیماران مبتلا به آستنواسپرمی باعث افزایش قابل توجهی در تحرک اسپرم می‌شود (۳۴). در مطالعه‌ی دیگری نشان داده شده است که درمان با آنتی‌اکسیدان با دوز ۶۰۰ mg N–استیل سیستئین (NAC یا N-acetyl cysteine) همراه با ویتامین و مواد معدنی باعث افزایش قابل توجهی در تعداد اسپرم بیماران مبتلا به الیگواسپرمی می‌شود (۴۱). همچنین مصرف خوراکی ویتامین E (۴۰۰ mg) و سلنیوم (۲۲۵ mg) باعث افزایش قابل توجهی در تحرک و تعداد اسپرم مردان نابارور می‌شود (۴۲).

علاوه بر این، مؤمنی و همکاران ویتامین E را به تنهایی و همراه با p-NP (Para-nonylphenol) به عنوان اکسیدان در رت تجویز کردند. آن‌ها گزارش کردند که ویتامین E تعداد اسپرم‌های زنده را در گروه‌های ویتامین E و P-NP همراه با ویتامین E نسبت به گروه شاهد بهبود می بخشد. همچنین تعداد اسپرم و تحرک آن در گروه P-NP همراه با ویتامین E در مقایسه با گروه P-NP بهبود یافت (۴۳).

زعفران دارای اثرات حفاظت از DNA نیز هست. در مطالعه‌ای دیگر Premkumar و همکاران دوزهای متفاوت زعفران (mg/kg ۲۰، ۴۰ و ۸۰) را همراه با داروهای آنتی‌تومور در موش سوری به کار بردند و مشاهده نمودند که آسیب DNA کاهش می‌یابد (۴۴). به علاوه، حسین‌زاده و همکاران نشان دادند که استفاده از mg/kg ۴۰ و ۸۰ و یا mg/kg ۵۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ کروسین ۴۵ دقیقه قبل از استفاده از متیل متان سولفات می‌تواند موجب کاهش آسیب DNA در کبد، کلیه، ریه و طحال شود (۴۵).

ویتامین E نیز با اثر آنتی‌اکسیدان بسیار قوی خود قادر است کروماتین را در برابر استرس اکسیداتیو محافظت نماید. مطابق با نتایج مطالعه‌ی، Greco و همکاران نشان داد که استفاده از g/day ۱ در روز ویتامین‌های C و E موجب کاهش آسیب DNA می‌شود، اما هیچ اثری بر پارامترهای اسپرمی ندارد (۴۶). همچنین Tunc و همکاران گزارش کردند که استفاده از Menevit (حاوی آنتی‌اکسیدان‌های لیکوپن، ویتامین‌های C و E، روی، سلنیوم، فولات و عصاره‌ی سیر) به مدت ۳ ماه هیچ اثری بر پارامترهای اسپرمی ندارد؛ اما موجب حفاظت از کروماتین و بهبود بسته‌بندی کروماتین می‌شود (۴۷). از طرفی، Menezo و همکاران دریافتند که استفاده از ویتامین‌های C و E (۴۰۰ mg)، روی و سلنیوم باعث کاهش میزان فراگمنتاسیون DNA می‌شود و از طرفی، موجب تأثیر ناخواسته و ایجاد عدم تراکم (Decondensation) در هسته‌ی اسپرم می‌گردد که شاید به علت تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها به ویژه ویتامین C بر روی پل‌های دی‌سولفید در پروتامین است (۴۸).

با وجود نتایج حاضل از پژوهش حاضر، Piomboni و همکاران گزارش کردند که استفاده از بتا گلوکان، Papaya، لاکتوفرین و ویتامین‌های C و E تأثیری بر آسیب DNA ندارد؛ هر چند درصد تحرک پیش رونده و مورفولوژی طبیعی را بهبود می‌بخشد (۴۹).

نتایج به دست آمده در این مطالعه، تأیید کننده‌ی اثر حفاظتی زعفران و ویتامین E از کروماتین در مقابل اسید دناتوراسیون است. همچنین نتایج این بررسی نشان از قدرت بالای زعفران و ویتامین E در بهبود پارامترهای اسپرمی دارد. صرف نظر از قیمت به نسبت بالای زعفران، این گیاه دارویی، بومی کشور ایران است و دارای خصوصیات درمانی بسیاری است و جا دارد با تحقیقات بیشتر اثرات مفید درمانی آن بیش از پیش نمایان گردد. با توجه به تغییر سبک زندگی، آلودگی‌های محیطی و رژیم‌های غذایی ناسالم که نتیجه‌ی آن‌ها مواجهه‌ی بیشتر با اکسیدان‌ها است، مصرف غذاها و مکمل‌های گیاهی و سالم مثل زعفران و ویتامین E می‌تواند ضامن حفظ سلامتی باشد؛ هر چند تحقیقات وسیع‌تری در این زمینه پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات سرکار خانم آموزگار مسؤول آزمایشگاه بافت‌شناسی و همچنین سرکار خانم علی اکبری مسؤول آزمایشگاه کشت سلولی که در زمینه‌ی انجام پژوهش حاضر همکاری نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Geva E, Lessing JB, Lerner-Geva L, Amit A. Free radicals, antioxidants and human spermatozoa: clinical implications. Hum Reprod 1998; 13(6): 1422-4.
2. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. Reprod Biol Endocrinol 2005; 3: 28.
3. Giudice LC. Infertility and the environment: the medical context. Semin Reprod Med 2006; 24(3): 129-33.
4. Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. Genome Biol 2007; 8(9): 227.
5. Sadeghi MR, Lakpour N, Heidari-Vala H, Hodjat M, Amirjannati N, Hossaini JH, et al. Relationship between sperm chromatin status and ICSI outcome in men with obstructive azoospermia and unexplained infertile normozoospermia. Rom J Morphol Embryol 2011; 52(2): 645-51.
6. Hanukoglu I. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. Drug Metab Rev 2006; 38(1-2): 171-96.
7. Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. J Androl 2008; 29(5): 488-98.
8. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M. Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. J Assist Reprod Genet 2001; 18(4): 219-25.
9. Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, Sato A. The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. Fertil Steril 1996; 66(4): 634-9.
10. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet 1994; 344(8924): 721-4.
11. Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Vet Med Int 2010; 2010.
12. Abdullaev, F. Biological properties and medicinal use of Saffron (Crocus sativus l.). Acta Hort (ISHS) 2007; 739: 339-45.
13. Khayatnouri M, Safavi SE, Safarmashaei S, Babazadeh D, Mikailpourardabili B. The effect of Saffron orally administration on spermatogenesis index in rat. Advances in Environmental Biology 2011; 5(7): 1514-21.
14. Heidary M, Vahhabi S, Reza NJ, Delfan B, Birjandi M, Kaviani H, et al. Effect of saffron on semen parameters of infertile men. Urol J 2008; 5(4): 255-9.
15. Vega SG, Guzman P, Garcia L, Espinosa J, Cortinas de NC. Sperm shape abnormality and urine mutagenicity in mice treated with niclosamide. Mutat Res 1988; 204(2): 269-76.
16. Linder RE, Klinefelter GR, Strader LF, Narotsky MG, Suarez JD, Roberts NL, et al. Dibromoacetic acid affects reproductive competence and sperm quality in the male rat. Fundam Appl Toxicol 1995; 28(1): 9-17.
17. Jasko DJ. Evaluation of stallion semen. Vet Clin North Am Equine Pract 1992; 8(1): 129-48.
18. Linder RE, Strader LF, Slott VL, Suarez JD. Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposures to fourteen reproductive toxicants. Reprod Toxicol 1992; 6(6): 491-505.
19. Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M, Aguero A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. Theriogenology 1999; 51(4): 721-7.
20. Amann R, Graham J. Spermatozoal function. In: McKinnon A, Voss JL, editors. Equine reproduction. Philadelphia, PA: Lea and Febiger; 1993. p. 715- 45.
21. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. J Exp Zool 1999; 284(6): 696-704.
22. Wyrobek AJ, Bruce WR. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1975; 72(11): 4425-9.
23. Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. J Androl 1995; 16(1): 80-7.
24. Bochenek M, Smorag Z, Pilch J. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. Theriogenology 2001; 56(4): 557-67.
25. Lopes S, Jurisicova A, Casper RF. Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1998; 13(3): 703-8.
26. Rybar R, Faldikova L, Faldyna M, Machatkova M, Rubes J. Bull and boar sperm DNA integrity evaluated by sperm chromatin structure assay in the Czech Republic. Veterinarni Medicina 2004; 49(1): 1-8.
27. Mahi CA, Yanagimachi R. Induction of nuclear decondensation of mammalian spermatozoa in vitro. J Reprod Fertil 1975; 44(2): 293-6.
28. Bucak MN, Sariozkan S, Tuncer PrB, Sakin F, Atessahin A, Kulaksiz R, et al. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (Capra hircus ancryrensis) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. Small

Ruminant Research 2010; 89(1): 24-30.
29. Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. Am J Reprod Immunol 2008; 59(1): 2-11.
30. Sigman M, Jarow JP. Male infertility. In: Wein AJ, editor. Campbell-Walsh urology. 9th ed. Philadelphia, PA: Sanders Elsevier; 2007. p. 609-53.
31. Razavi SH, Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR, Shayesteh M, Tavalaee M. Evaluation of zeta and HA-binding methods for selection of spermatozoa with normal morphology, protamine content and DNA integrity. Andrologia 2010; 42(1): 13-9.
32. Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, et al. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. Reprod Biomed Online 2005; 11(2): 198-205.
33. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. Reproduction 2001; 122(4): 497-506.
34. Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Nasr MA. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. J Androl 1996; 17(5): 530-7.
35. Hosseinzadeh H, Ziaee T, Sadeghi A. The effect of saffron, Crocus sativus stigma, extract and its constituents, safranal and crocin on sexual behaviors in normal male rats. Phytomedicine 2008; 15(6-7): 491-5.
36. Uzunhisarcikli M, Kalender Y, Dirican K, Kalender S, Ogutcu A, Buyukkomurcu F. Acute, subacute and subchronic administration of methyl parathion-induced testicular damage in male rats and protective role of vitamins C and E. Pesticide Biochemistry and Physiology 2007; 87(2): 115-22.
37. Bansal A, Bilaspuri G. 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.
38. Kumar V, Bhat Z, Kumar D, Khan N, Chashoo I, Shah M. Pharmacological profile of crocus sativus-a comprehe sive review. Pharmacologyonline 2011; 3: 799-811.
39. Dominguez-Rebolledo AE, Fernandez-Santos MR, Bisbal A, Ros-Santaella JL, Ramon M, Carmona M, et al. Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. Reprod Fertil Dev 2010; 22(5): 856-70.
40. Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. A prospective double-blind randomized placebo-controlled study of the effect of saffron (Crocus sativus Linn.) on semen parameters and seminal plasma antioxidant capacity in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. Phytother Res 2011; 25(4): 508-16.
41. Paradiso GG, Gravina GL, Angelozzi G, Sacchetti A, Innominato PF, Pace G, et al. May antioxidant therapy improve sperm parameters of men with persistent oligospermia after retrograde embolization for varicocele? World J Urol 2008; 26(1): 97-102.
42. Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, Ghozzi H, Hammami S, et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. Arch Androl 2003; 49(2): 83-94.
43. Momeni HR, Soleimani Mehranjani M, Abnosi MH, Mahmoodi M. Effects of vitamin E on sperm parameters and reproductive hormones in developing rats treated with para-nonylphenol. Iran J Reprod Med 2009; 7(3): 111-6.
44. Premkumar K, Thirunavukkarasu C, Abraham SK, Santhiya ST, Ramesh A. Protective effect of saffron (Crocus sativus L.) aqueous extract against genetic damage induced by anti-tumor agents in mice. Hum Exp Toxicol 2006; 25(2): 79-84.
45. Hosseinzadeh H, Abootorabi A, Sadeghnia HR. Protective effect of Crocus sativus stigma extract and crocin (trans-crocin 4) on methyl methanesulfonate-induced DNA damage in mice organs. DNA Cell Biol 2008; 27(12): 657-64.
46. Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. J Androl 2005; 26(3): 349-53.
47. Tunc O, Thompson J, Tremellen K. Improvement in sperm DNA quality using an oral antioxidant therapy. Reprod Biomed Online 2009; 18(6): 761-8.
48. Menezo YJ, Hazout A, Panteix G, Robert F, Rollet J, Cohen-Bacrie P, et al. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. Reprod Biomed Online 2007; 14(4): 418-21.
49. Piomboni P, Gambera L, Serafini F, Campanella G, Morgante G, De Leo V. Sperm quality improvement after natural anti-oxidant treatment of asthenoteratospermic men with leukocytospermia. Asian J Androl 2008; 10(2): 201-6.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 26.04.2014
Vol. 32, No. 293, 2nd Week, September 2014
Accepted: 07.07.2014

Optimizing Acridine Orange Staining for Assessment of Protective Effects of Saffron and Vitamin E on Rat Sperm DNA Structure

Shahnaz Razavi PhD[1], Sayyed Ahmad Vaez MSc[2], Mohammad Mardani PhD[3]

Original Article

Abstract

Background: In recent decades, relation between reactive oxygen species (ROS) concentration and semen quality was noted. Traditionally, saffron has been not only considered as a food additive but also as a medicinal herb, which has good antioxidant properties. Vitamin E is considered as a endogenous and supplementary antioxidant which can protects the cell. The aim of this study was to evaluate the protection influence of saffron and vitamin E on sperm DNA against acid.

Methods: Thirty adult male Wistar rats randomly divided into 3 equal groups of saffron, vitamin E and controlwhich received saffron (100 mg/kg/day), vitamin E (100 mg/kg/day) and distilled water (0.5 cc/day), respectively. After 60 days, cauda epididymis dissected and sperm were used for analysis of sperm chromatin susceptibility to acid denaturation via acridine orange (AO) staining. Acridine orange staining was carried out with or without acid detergent incubation.

Findings: Both, saffron and vitamin E, decreased sperm DNA damage against acid ($P < 0.001$).

Conclusion: Saffron and vitamin E protect DNA against denaturation, probably because of their powerful antioxidant properties.

Keywords: Antioxidants, Saffron, Vitamin E, DNA damage

Citation: Razavi Sh, Vaez SA, Mardani M. **Optimizing Acridine Orange Staining for Assessment of Protective Effects of Saffron and Vitamin E on Rat Sperm DNA Structure.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(293): 1061-72

1- Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- PhD student, Department of Tissue Engineering, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Shahnaz Razavi PhD, Email: razavi@med.mui.ac.ir