مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ۳۸۱/هفته‌ی اول تیر ماه ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۳۰

بررسی اثرات دزهای بالای عصاره‌ی هیدروالکلی سیاه‌دانه بر روی حرکت و آپوپتوز اسپرم در مردان نورموزواسپرم

ناهید صادق‌نژاد[۱]، غلامرضا دشتی[۲]، بهزاد ذوالفقاری[۳]، شکوفه بقازاده[۴]، فرهاد گلشن ایرانپور[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: مطالعات گذشته، حاکی از آن هستند که دزهای بالای تیموکینون، قادر به متوقف نمودن حرکت اسپرم‌ها در محیط کشت است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر عصاره‌ی سیاه‌دانه و تیموکینون بر روی حرکت و آپوپتوز اسپرم در مردان نورموزواسپرم بود.

روش‌ها: برای هر کدام از غلظت‌های سیاه‌دانه (۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ۱۰ نمونه‌ی شسته شده‌ی مایع منی مورد استفاده قرار گرفت. دو حجم ۰/۵ میلی‌لیتری از هر نمونه با یا بدون دز مورد نظر به عنوان نمونه‌ی مورد و شاهد انکوبه شدند. حرکت کلی اسپرم‌ها، بعد از یک ساعت تعیین گردید. به علاوه، آپوپتوز اسپرم‌ها به دنبال دریافت دز ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با روش رنگ‌آمیزی Annexin-Propidium iodide و به دنبال آن بررسی با روش فلوسایتومتری انجام پذیرفت.

یافته‌ها: هر دو دز عصاره‌ی سیاه‌دانه، به طور قابل توجهی سبب کاهش درصد کل حرکت، درصد اسپرم‌ها با حرکت پیش‌رونده‌ی سریع و کند و حرکت غیر پیش‌رونده می‌گردند. بعد از استفاده از عصاره‌ی سیاه‌دانه، درصد اسپرم‌های زنده، آپوپتوتیک و نکروتیک تغییر قابل ملاحظه‌ای نشان ندادند.

نتیجه‌گیری: دزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی سیاه‌دانه، به طور قابل ملاحظه‌ای درصد اسپرم‌های متحرک را در محیط کشت کاهش می‌دهند. به همین ترتیب، عصاره‌ی سیاه‌دانه با دز ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، درصد اسپرم‌های زنده را در محیط کشت تغییر نمی‌دهد.

واژگان کلیدی: آپوپتوز، سیاه‌دانه، حرکت اسپرم

ارجاع: صادق‌نژاد ناهید، دشتی غلامرضا، ذوالفقاری بهزاد، بقازاده شکوفه، گلشن ایرانپور فرهاد. **بررسی اثرات دزهای بالای عصاره‌ی هیدروالکلی سیاه‌دانه بر روی حرکت و آپوپتوز اسپرم در مردان نورموزواسپرم.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۸۱): ۴۷۷-۴۷۰

مقدمه

در جوامع پیشرفته، ناباروری به علل مردانه، زنانه یا هر دو، به عنوان یکی از مشکلات عدیده مطرح می‌شوند. از طرفی، مسأله‌ی کنترل جمعیت نیز در رأس امور بسیاری از کشورها می‌باشد و برای جلوگیری از حاملگی ناخواسته، تحقیقات وسیعی در ارتباط با مواد جلوگیری کننده از باروری مردان در حال انجام است (۲-۱). یافتن مواد جلوگیری کننده از باروری مردان، چالش جدی در پزشکی باروری است. موادی که امروزه در کلینیک در حال استفاده هستند، مانند Nonoxynol9 (N9) مواد اسپرموسایدی (Spermocide) هستند که به طور غیر اختصاصی با تخریب آکروزوم اسپرم و از هم پاشیدن غشای سلولی و آزاد شدن محتویات آکروزومی، باعث سکون آن می‌گردند (۳).

تحقیقات نشان داده است که این مواد، به دلیل سمی بودن برای اپی‌تلیوم واژن، به مجرای تحتانی ژنیتال زنانه آسیب می‌زنند (۴). ارزیابی حرکت اسپرمف یکی از موارد مهم در آنالیز اولیه‌ی خصوصیات و پارامترهای باروری مردان محسوب می‌شود (۵). شروع و تداوم حرکت اسپرم، وابسته به فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون پروتئین‌های تاژک اسپرم است (۶).

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشیار، گروه فارموکوگنوزی، دانشکده‌ی داروسازی وعلوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- آزمایشگاه آندرولوژی، بیمارستان شهید بهشتی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۵- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: فرهاد گلشن ایرانپور
Email: fgholshaniranpour@yahoo.com

سیاه‌دانه، با نام علمی .Nigalla sativa L گیاهی علفی، یک ساله و دو لپه‌ای متعلق به زیر رده‌ی جدا گلبرگان و تیره‌ی آلاله (Ranunculaceae) است. این گیاه، در نواحی اروپای جنوبی، آفریقای شمالی و آسیا (هند و ایران) می‌روید (۷). بیشتر فعالیت‌های سیاه‌دانه، مربوط به تیموکینون Thymoquinone (TQ)، که یکی از مهم‌ترین ترکیبات آن است، می‌باشد (۸).

کینون‌ها موادی هستند که نسبت به مواد معمول و شناخته شده، سمیت کمتری دارند و علاوه بر سکون اسپرم‌ها، در وضعیت حیات آن‌ها تغییر چندانی به وجود نمی‌آورند و به نظر می رسد دارای مکانیسم انتخابی با عمل بر روی تاژک اسپرم می‌باشند (۳). مطالعاتی نیز در مورد تأثیر سیاه‌دانه و تیموکینون بر اسپرم‌ها در محیط کشت انجام گرفته است. مطالعه‌ی Alhimaidi در زمینه‌ی لقاح آزمایشگاهی (IVF یا In vitro fertilisation) نشان داد که استفاده از تیموکینون در موش‌های سوری باعث توقف اسپرم، کاهش میزان لقاح و رشد جنینی در محیط کشت می‌گردد (۹). بر خلاف نتایج مطالعات Alhimaidi (۹)، Kamarzaman و همکاران نشان دادند که لقاح آزمایشگاهی اسپرم‌ها و اووسیت‌های موش‌هایی که تحت تأثیر تزریق داخل صفاقی سیکلوفسفامید قرار گرفته‌اند، در صورت حضور تیموکینون در محیط کشت، افزایش میزان باروری و کاهش بلاستومرهای ناقص و جنین‌های متلاشی شده مشاهده می‌گردد (۱۰).

در مطالعات پیشین نیز مشخص گردیده است که تیموکینون در دزهای پایین، سبب افزایش حرکت اسپرم‌های انسان (۱۱) و در دزهای بالاتر از ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، سبب توقف اسپرم‌ها در محیط کشت می‌شود.

با توجه به نتایج به دست آمده در مورد تیموکینون، که دزهای بالای آن می‌تواند سبب توقف اسپرم‌ها در محیط کشت شود و در عین حال حتی در دزهای خیلی بالا، افزایش خیلی زیاد اسپرم‌های مرده مشاهده نمی‌گردد، هدف از انجام این مطالعه، روشن نمودن توانایی یا عدم توانایی متوقف نمودن اسپرم‌ها در محیط کشت توسط عصاره‌ی سیاه‌دانه بود. بدیهی است که ممکن است ترکیبات دیگر موجود در عصاره، بر اثرات تیموکینون نقش تقویتی یا تضعیفی داشته باشند. علاوه بر آن، عصاره‌ی سیاه‌دانه بسیار ارزان‌تر از تیموکینون خالص است.

روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر در مرکز تحقیقات باروری ناباروری بیمارستان شهید بهشتی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد.

تهیه‌ی عصاره‌ی سیاه‌دانه

دانه‌ی گیاه سیاه‌دانه، از مراکز معتبر در اصفهان تهیه و به تأیید متخصصین گروه فارموکوگنوزی دانشکده‌ی داروسازی اصفهان رسید. پس از پودر شدن دانه‌ها (۷۰۰ گرم)، عصاره‌گیری به کمک روش پرکولاسیون با الکل ۷۵ درصد انجام شد. عصاره با روش پرکولاسیون با نسبت ۷۰:۳۰ از $EthOH/H_2O$ به دست آمد. بعد از فیلتراسیون، عصاره‌ی هیدروالکلی با کمک دستگاه روتاری و فریزدرایر خشک شد و به مقدار ۳۰ گرم رسید.

طرز تهیه‌ی محلول سیاه‌دانه

برای به دست آوردن دزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۰/۰۵ و ۰/۱۰ گرم از عصاره‌ی هیدروالکلی سیاه‌دانه در ۱ سی‌سی آب مقطر حل شد و میزان ۵۰ میکرولیتر از این دو محلول، به ترتیب به نمونه‌های مورد مربوط به دزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید.

تهیه و بررسی نمونه‌ی مایع منی

۲۰ مرد مراجعه کننده به مرکز تحقیقات ناباروری که حدود ۷-۳ روز مقاربت نداشتند و در بررسی اولیه‌ی پارامترهای اسپرمی بر اساس معیارهای سازمان جهانی بهداشت نورموزواسپرم بودند (۱۲)، در این مطالعه قرار گرفتند. جهت هر کدام از دزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم از سیاه‌دانه، ۱۰ نمونه اسپرم در نظر گرفته شد. هر نمونه‌ی مایع منی در ظرف استریل دهانه گشاد (SUPA-Iran) جمع‌آوری و به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه جهت مایع شدن در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. در این مطالعه، حرکت اسپرم‌ها تحت دو دز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ی سیاه‌دانه مورد بررسی قرار گرفت که هر یک از این دزها بر روی ۱۰ نمونه‌ی مایع منی آزمایش شدند. روش کار، بدین ترتیب بود که پس از شستشوی نمونه‌ی مایع منی در محیط کشت Ham's F10 (F-10 Nutrient Medium) همراه با آلبومین، دو حجم ۰/۵ میلی‌لیتری از نمونه در لوله‌ی آزمایش جداگانه به عنوان نمونه‌های شاهد و مورد در نظر گرفته شدند. سپس یک حجم مساوی (۵۰ میکرولیتر) از آب مقطر در نمونه‌های شاهد و محلول سیاه‌دانه در غلظت‌های متفاوت نمونه‌های مورد اضافه شد. تمامی نمونه‌ها به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. درصد اسپرم‌های متحرک با میکروسکوپ نوری مجهز به سیستم Computer assisted sperm analysis (CASA) (Casa VT-sperm test 2.3 model, Company of Video Test-Finland) اندازه‌گیری شد. مطالعات اخیر، نشان داده‌اند که استفاده از سیستم آنالیز اسپرم CASA برای بررسی پارامتر حرکتی اسپرم، دقت و تکرار پذیری آزمایش‌های انجام شده را بیشتر می‌کند و اطلاعات مناسب‌تری نسبت به روش‌های دستی در اختیار قرار می‌دهد (۱۳). جهت ارزیابی میزان آپوپتوز، نمونه‌های مربوط به دز ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تحت بررسی فلوسایتومتری نیز قرار گرفتند.

روش اندازه‌گیری درصد اسپرم‌های متحرک در نمونه‌ها

جهت اندازه‌گیری درصد اسپرم‌های متحرک، از تمامی نمونه‌های

شاهد و مورد در دزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی سیاه‌دانه پس از انکوبه کردن، لام مرطوب تهیه شد و سپس لام‌ها با میکروسکوپ نوری مجهز به سیستم CASA و عدسی ۴۰ آنالیز شد و به ترتیب درصد کل اسپرم‌های متحرک پیش‌رونده‌ی سریع، پیش‌رونده‌ی کند، متحرک در جا و غیر متحرک تعیین و محاسبه گردید.

روش اندازه‌گیری میزان آپوپتوز اسپرم‌ها

فلوسایتومتری با دستگاه Becton Dikinson FACSCalibur (Biosciences,USA) و با استفاده از نرم‌افزار Cell quest نسخه‌ی ۲۰۰۸ انجام شد. با اندازه‌گیری چند پارامتری با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر با دو لیزر ۵۳۰ و ۶۴۰ نانومتر آپوپتوز ایجاد شده با تابش اندازه‌گیری شد. پراکندگی نور در جلو (FSC یا Forward scatter) و جنب (SSC یا Side scatter) و همین‌طور فلورسانس AnnexinV و Propidium iodide (PI) بر اسپرم‌ها اندازه‌گیری شد. سپس، نمودار فراوانی اسپرم‌ها با فلورسنت PI بر حسب AnnexinV در دو پلات FL1-FL2 برای شناسایی و درصد اسپرم‌های آپوپتوتیک و نکروتیک رسم شد. برای بررسی وضعیت آپوپتوز، از روش رنگ‌آمیزی AnnexinV به همراه تکنیک فلوسیتومتری استفاده شد. رنگ‌آمیزی AnnexinV برای تفکیک آپوپتوز اولیه (Early apoptosis) به کار می‌رود. طی آپوپتوز، فسفوتیدیل سرین از لایه‌ی داخلی غشای فسفولیپیدی به لایه‌ی خارجی آن منتقل می‌شود و AnnexinV به آن متصل می‌گردد. استفاده‌ی هم‌زمان رنگ AnnexinV با رنگ PI، موجب تفکیک سلول‌ها در مرحله‌ی Late apoptosis و نکروز نیز می‌شود (۱۴). کیت Annexin-PI از شرکت eBioscience,USA خریداری شد.

روش کار، بدین ترتیب بود که حجمی حاوی یک میلیون اسپرم از نمونه‌ی مورد نظر جهت بررسی به روش فلوسایتومتری جدا و با دور g ۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، مایع رویی جدا گردید و پلت باقی مانده در بافر فسفات معلق و بار دیگر سانتریفیوژ تکرار شد. به دنبال آن، بار دیگر مایع رویی جدا شد و به ترتیب ۲ میکرولیتر Annexin، ۱۰۰ میکرولیتر بافر و ۲ میکرولیتر PI اضافه گردید و به مدت ۱۵–۱۰ دقیقه در دمای ۲۵–۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در تاریکی انکوبه شد. سپس، محصول کار به لوله‌ی فلوسایتومتری منتقل شد تا توسط دستگاه خوانده شود.

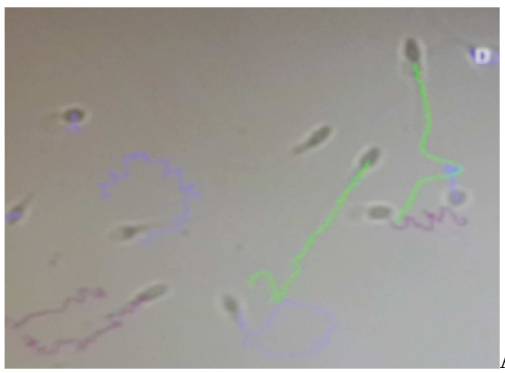
نتایج به دست آمده از هر گروه طبقه‌بندی شد و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت آنالیز داده‌ها از آزمون Paired t استفاده گردید.

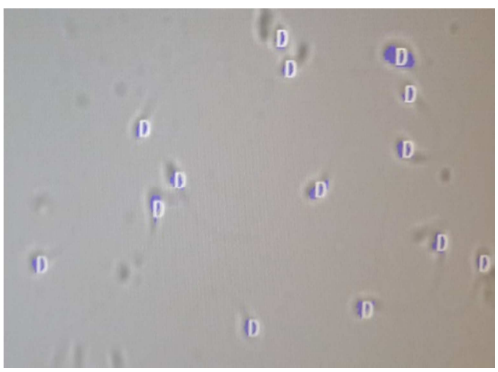
در تحلیل نتایج فلوسایتومتری و نمودارهای رسم شده، به شرح زیر تفکیک و در دو گروه شاهد و مورد تحت بررسی آماری قرار گرفتند. در پلات FL1-FL2 در کوادران (مربع‌های) رسم شده، سلول‌های زنده در قسمت LL (Lower left) که Annexin منفی و PI منفی بود؛ سلول‌هایی که در مراحل ابتدایی آپوپتوز (Early apoptosis) بودند، در قسمت LR (Lower right) که Annexin مثبت و PI منفی بود؛ سلول‌های مرده به دلایل غیر آپوپتوتیک (نکروز) در قسمت UL (Upper left) که Annexin منفی و PI مثبت بود و در نهایت، سلول‌های مراحل انتهایی آپوپتوز در قسمت UR (Upper right) با Annexin مثبت و PI مثبت قرار گرفتند.

یافته‌ها

نتایج مربوط به حرکت اسپرم‌ها

افزودن هر دو دز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ی سیاه‌دانه به نمونه‌های مورد در مقایسه با گروه شاهد باعث کاهش معنی‌داری در درصد کل حرکت اسپرم‌ها، درصد اسپرم‌هایی با حرکت پیش‌رونده‌ی سریع و کند و درصد اسپرم‌هایی با حرکت در جا گردید (شکل ۱، جدول ۱).


A)


B)

شکل ۱. گروه شاهد (A) و مورد (B) (تحت دز ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به ترتیب از بالا به پایین درصد اسپرم‌های متحرک در درجات متفاوت (سبز: پیش‌رونده‌ی سریع، بنفش: پیش‌رونده‌ی کند، آبی: درجا، D: بی‌حرکت)

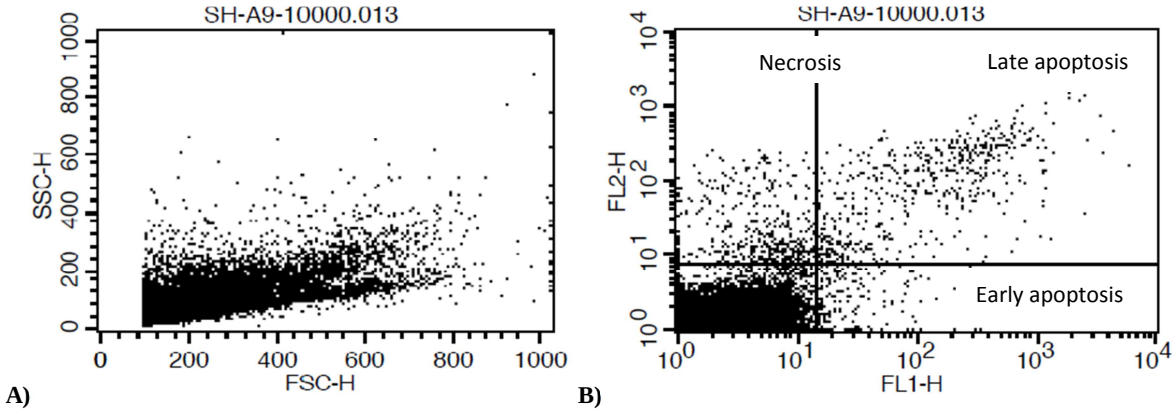
جدول ۱. میانگین حرکت و انواع آن در دو گروه شاهد و مورد در دو دز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

دز (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	متغیر	مورد	شاهد	مقدار P
		میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	
۵	درصد اسپرم‌های متحرک	۱۹/۰۰ ± ۵/۷۸	۶۰/۸۰ ±۱۴/۵۳	< ۰/۰۰۱
	درصد اسپرم‌های غیر متحرک	۸۱/۰۰ ± ۵/۷۸	۳۹/۲۰ ± ۱۴/۵۳	< ۰/۰۰۱
	درصد اسپرم‌های پیش‌رونده‌ی سریع	۲/۰۰ ± ۱/۲۲	۱۲/۴۰ ± ۶/۲۰	< ۰/۰۰۱
	درصد اسپرم‌های پیش‌رونده‌ی کند	۸/۴۰ ± ۵ /۳۱	۳۰/۲۰ ± ۳/۴۲	< ۰/۰۰۱
	درصد اسپرم‌های درجا	۸/۶۰ ± ۲/۷۰	۱۸/۲۰ ± ۶/۰۵	۰/۰۱۲
۱۰	درصد اسپرم‌های متحرک	۱۲/۳۶ ± ۱۰/۲۰	۵۶/۲۷ ± ۱۷/۱۰	< ۰/۰۰۱
	درصد اسپرم‌های غیر متحرک	۸۷/۶۳ ± ۱۰/۲۰	۴۳/۶۳ ±۱۷/۱۰	< ۰/۰۰۱
	درصد اسپرم‌های پیش‌رونده‌ی سریع	۰/۶۳ ± ۱/۲۸	۱۲/۷۲ ±۶/۰۵	< ۰/۰۰۱
	درصد اسپرم‌های پیش‌رونده‌ی کند	۵/۵۴ ± ۷/۱۱	۲۷/۰۰ ± ۶/۵۶	< ۰/۰۰۱
	درصد اسپرم‌های درجا	۶/۱۸ ± ۵/۷۰	۱۷/۰۹ ± ۷/۳۱	< ۰/۰۰۱

نتایج فلوسایتومتری

نتایج حاصل از بررسی آپوپتوز با روش فلوسایتومتری، هیچ تفاوت معنی داری بین درصد اسپرم‌های زنده و نکروتیک و آپوپتوتیک و آپوپتوز اولیه در گروه شاهد و مورد نشان نداد (شکل ۲ و ۳، جدول ۲).

بدین ترتیب، سیاه‌دانه در دزهای بالا منجر به توقف و یا کاهش حرکت اسپرم می‌شود؛ بدون این که به طور معنی‌دار و قابل ملاحظه‌ای آپوپتوز یا نکروز را نسبت به گروه شاهد افزایش دهد.

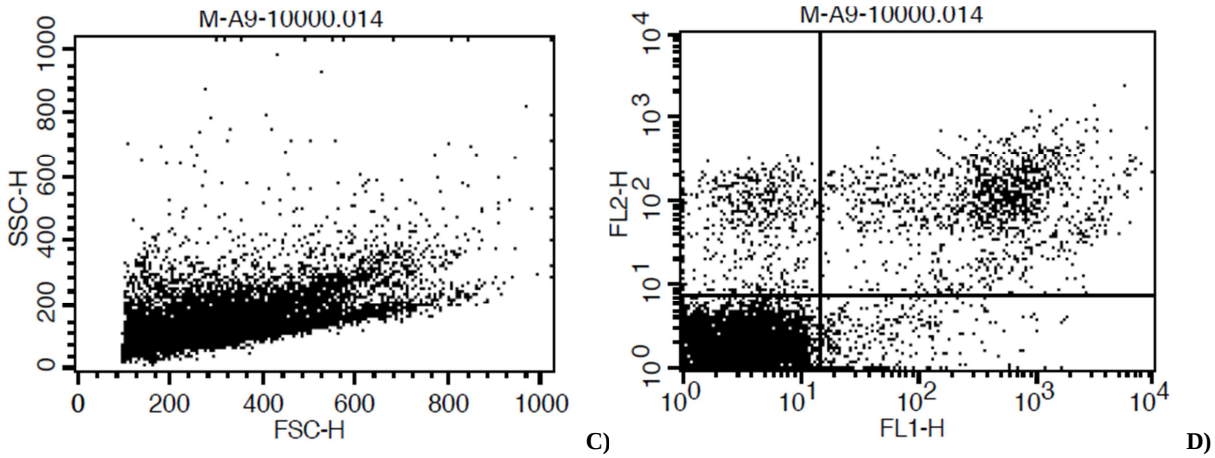


A) B)

شکل ۲. آنالیز فلوسایتومتری اسپرم‌های نمونه‌ی شاهد. به ترتیب از چپ به راست نمودار **Forward scatter** (FSC) (A) اندازه‌ی سلول بر حسب **Side scatter** (SSC) گرانولیته‌ی سلول و نمودار نقطه‌ای (B). کانال **FL1** مربوط به **Annexin** مثبت با فلورسانس سبز و کانال **FL2** مربوط به **Propidium iodide** (PI) مثبت با فلورسانس قرمز

جدول ۲. میانگین تغییرات آپوپتوتیک در دو گروه شاهد و مورد در دز ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

متغیر	مورد	شاهد	مقدار P
	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	
میزان اسپرم‌های نکروتیک Upper left	۴/۲۰ ± ۱/۹۸	۳/۴۳ ± ۲/۵۸	۰/۴۲۰
میزان اسپرم‌های آپوتوتیک Upper right	۳۵/۷۵ ± ۱۸/۷۱	۱۹/۰۰ ± ۹/۱۶	۰/۰۶۰
میزان اسپرم‌های زنده Lower left	۵۵/۰۷ ± ۱۸/۷۶	۶۵/۷۸ ± ۱۴/۱۰	۰/۱۹۰
میزان اسپرم‌ها در آپوپتوز اولیه Lower right	۴/۶۸ ± ۳/۳۶	۹/۷۰ ± ۹/۱۹	۰/۱۴۰



شکل ۳. آنالیز فلوسایتومتری اسپرم‌های نمونه‌ی مورد. به ترتیب از چپ به راست نمودار Forward scatter (FSC) (C) اندازه‌ی سلول بر حسب Side scatter (SSC) گرانولیته‌ی سلول و نمودار نقطه‌ای (D). کانال FL1 مربوط به Annexin مثبت با فلورسانس سبز و کانال FL2 مربوط به Propidium iodide (PI) مثبت با فلورسانس قرمز

بحث

نتایج حاصل از مطالعات انجام گرفته در In vivo با تجویز خوراکی یا تزریق داخل صفاقی تیموکینون و عصاره‌ی سیاه‌دانه، حاکی از اثرات مفید آن‌ها بر بهبود کارکرد تناسلی حیوانات مورد آزمایش هستند. این نتایج، شامل افزایش وزن اندام‌های تناسلی، سرعت و تعداد اسپرم‌ها و همچنین بهبود روند اسپرماتوژنز (۱۵)، افزایش معیارهای باروری شامل افزایش وزن سمینال وزیکول، افزایش میزان تستوسترون، حرکت و تعداد اسپرم‌ها (۱۶) افزایش درصد اسپرم‌های زنده نسبت به مرده، کاهش اسپرم‌های غیر طبیعی (بهبود مورفولوژی) (۱۷)، افزایش ضخامت و قطر لوله‌های سمنی‌فروس، افزایش تعداد اسپرماتوگونی‌ها و دیگر رده‌های سلولی دخیل در اسپرماتوژنز همانند اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه، اسپرماتید، سلول‌های سرتولی و لیدیگ (۱۸) افزایش هورمون‌های جنسی Follicle-stimulating hormone (FSH) و Luteinizing hormone (LH) و تستوسترون (۱۹) می‌باشند.

نتایج تحقیق حاضر که در عمل نتایج حاصل از به کار بردن عصاره‌ی سیاه‌دانه در In vitro هستند، حاکی از آن می‌باشند که سیاه‌دانه در دزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از درصد اسپرم‌های متحرک در گروه‌های مختلف (پیش‌رونده‌ی سریع و کند، در جا) در محیط کشت می‌کاهد. علاوه بر آن، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان دهنده‌ی آن است که عصاره‌ی سیاه‌دانه متوقف نمودن حرکت اسپرم‌ها را با زنده نگه داشتن بیشتر سلول‌ها انجام می‌دهد و در واقع، می‌توان گفت که عصاره‌ی سیاه‌دانه، به جای یک Spermicide می‌تواند یک ماده‌ی Spermostatic باشد.

این در حالی است که مواد مورد استفاده در جلوگیری از باروری در مردان همانند N9، نقش یک Spermicide قوی را بازی می‌کنند و سبب ایجاد آسیب‌هایی در غشای پلاسمایی اسپرم و شکست DNA و ژنوم آن می‌شوند و بدین ترتیب، موجبات مرگ سلول اسپرم را فراهم می‌کنند (۲۰).

در ابتدا، تصور می‌شد که N9 از فعالیت ویروس Human immunodeficiency virus (HIV) جلوگیری می‌کند، اما با مطالعات بیشتر مشخص گردید که N9 نه تنها باعث محافظت در برابر بیماری جنسی واگیردار (Sexully transmitted diseases یا STD) نمی‌شود (۲۱)، بلکه با آسیب رساندن به دستگاه تناسلی زن و تحریک مخاط آن، سبب انتقال بیماری‌های جنسی واگیردار می‌گردد (۲۲). تحقیقات وسیع انجام گرفته در زمینه‌ی N9 گزارشی مبنی بر پیش‌گیری و کاهش STD ارایه نشده است (۴). نتایج مطالعه‌ی حاضر، مطابق با نتایج تحقیق Alhimaidi بر موش‌هایی است که با استفاده از تیموکینون در دز بالا (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در محیط کشت تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI یا Intra-cytoplasmic sperm injection) و IVF (لقاح آزمایشگاهی) توقف اسپرم‌ها را گزارش نموده است (۹).

همچنین، نتایج تحقیق کنونی، مطابق با مطالعات پیشین مبنی بر این بود که دزهای بالاتر از ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیموکینون، سبب توقف اسپرم‌ها در محیط کشت بدون تغییر معنی‌دار در درصد اسپرم‌های زنده می‌شود.

حرکت اسپرم، فرایند مولکولی پیچیده‌ای است که در نتیجه‌ی انتشار امواج عرضی در طول فلاژلوم صورت می‌گیرد (۲۳). در مطالعه‌ی Hughes و همکاران (۴) بیان شد که مواد کینونی با عملکرد اختصاصی بر روی فلاژلوم اسپرم، باعث توقف حرکت آن می‌شوند و این نتیجه، با فروپاشی غشای پلاسمایی و آکروزومی صورت نگرفته

و سکون اسپرم‌ها بدون آسیب به حیات آن‌ها محقق گردیده است. این مکانیسم انتخابی، با درگیر کردن و هدف قرار دادن تاژک اسپرم صورت می‌گیرد. کینون‌ها با هدف قرار دادن پروتئین‌های کلیدی در دم اسپرم، منجر به سکون آن می‌شوند. سرکوب چشمگیر حرکت اسپرم با الکیل‌دار شدن گروه تیول که توسط A-kinase anchor proteins (AKAP4) در تاژک اسپرم بیان می‌شود، محقق می‌گردد (۳). الکیل‌دار شدن AKAP4، باعث می‌شود تا تاژک به تحریکات Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) غیر حساس شود (۲۴). cAMP در فعال نمودن حرکت اسپرم و نیز حفظ و تنظیم آن نقش مهمی ایفا می‌کند (۲۵).

همچنین، Miki و همکاران، با ایجاد جهش در ژن AKAP4، ناباور شدن موش‌ها را به علت اسپرم‌های غیر متحرک گزارش دادند (۲۶). فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون دینئین به طور غیر هم‌زمان در طول آکسونم رخ می‌دهد و به دنبال فسفریلاسیون دینئین، Adenosine triphosphatase (ATPase) فعال می‌شود و حرکت میکروتوبولی رخ می‌دهد (۲۷). از طرفی، مسیر Cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A (cAMP/PKA) با فسفریلاسیون دینئین در آکسونم همراه است (۲۸). از آن جایی که تیموکینون نیز جزء رده‌ی کینون‌ها است، نتایج مطالعه‌ی حاضر مؤید نتایج به دست آمده توسط Hughes و همکاران (۴) می‌باشد.

Kamarzaman و همکاران، اثر افزودن تیموکینون به محیط کشت IVF را به دنبال تزریق داخل صفاقی سیکلوفسفامید به موش‌های نر و ماده بررسی و چنین نتیجه‌گیری کردند که افزودن تیموکینون به محیط کشت در دزهای ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار، باعث افزایش میزان باروری در موش‌ها می‌گردد و تعداد بلاستومرهای ناقص و جنین‌های متلاشی شده را کاهش می‌دهد. بدین ترتیب، آن‌ها تیموکینون را به عنوان آنتی‌اکسیدانی مناسب جهت حفظ جنین‌ها به حساب می‌آورند (۱۰).

به طور کلی، به نظر می‌رسد که در مجموع نتایج به دست آمده توسط فاضلیان و همکاران حاکی از اثرات متفاوت تیموکینون و سیاه‌دانه بر اسپرم‌ها در دزهای پایین و بالا است (۱۱)؛ بدین ترتیب، دزهای بالای سیاه‌دانه می‌تواند باعث کاهش سرعت و حرکت اسپرم شود و احتمال می‌رود در آینده بتوان از آن در موارد متعدد در آزمایشگاه‌های باروری و جلوگیری از باروری در مردان استفاده نمود و یا در مطالعات بعدی، در مواردی که توقف اسپرم‌ها بدون کشتن آن‌ها لازم است، استفاده نمود.

همان‌طور که اشاره شد، تحقیقاتی که امروزه در زمینه‌ی جلوگیری از باروری در مردان در حال انجام است، در پی یافتن موادی با هدف دوگانه‌ی جلوگیری از باروری و حفاظت علیه STD می‌باشند؛ بدین ترتیب، به نظر می‌رسد انجام تحقیقات بیشتر در زمینه‌ی اثرات سیاه‌دانه و تیموکینون بر روی دستگاه ژنیتال زنانه و بافت پوششی آن و همچنین نقش آن در پیش‌گیری و کاهش بیماری‌های STD ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد ناهید صادق‌نژاد به شماره‌ی ۳۹۴۰۶۲ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است. از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به دلیل حمایت مالی سپاسگزاری می‌گردد. همچنین، از جناب آقای دکتر سید جواد هاشمی‌نیا مسؤول فلوسایتومتری آزمایشگاه مرکزی که ما را در این تحقیق یاری نمودند، قدردانی می‌شود.

References

1. Kadkhodaei Elyaderani M, Saki G, Saki J. Study the effect of oxamate on rat sperm motility in vivo. Jundishapur Sci Med J 2009; 8(2): 169-76. [In Persian].
2. Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumbe J. Effect of antioxidants on preservation of motility,viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degrees C. Theriogenology 2001; 56(4): 577-89.
3. Hughes LM, Griffith R, Carey A, Butler T, Donne SW, Beagley KW, et al. The spermostatic and microbicidal actions of quinones and maleimides: toward a dual-purpose contraceptive agent. Mol Pharmacol 2009; 76(1): 113-24.
4. Hughes LM, Griffith R, Aitken RJ. The search for a topical dual action spermicide/microbicide. Curr Med Chem 2007; 14(7): 775-86.
5. Turner RM. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. Reprod Fertil Dev 2006; 18(1-2): 25-38.
6. Tash JS, Means AR. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. Biol Reprod 1983; 28(1): 75-104.
7. Niazmand S, Fereidouni E, Mahmoudabady M, Mousavi SM. Endothelium-independent vasorelaxant effects of hydroalcoholic extract from Nigella sativa seed in rat aorta: the roles of Ca2+ and K+ channels. Biomed Res Int 2014; 2014: 247054.
8. Chaieb K, Kouidhi B, Jrah H, Mahdouani K, Bakhrouf A. Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of Nigella sativa and its potency to prevent bacterial biofilm formation. BMC Complement Altern Med 2011; 11: 29.
9. Alhimaidi AB. Thymoqunone treatment of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) compared to in

vitro fertilization (IVF) of mice oocytes and their development in vitro. Adv Mol Med 2005; 1(3): 119-23.
10. Kamarzaman S, Abdul Wahab AY, Abdul Rahman S. Effects of thymoquinone supplementation on cyclophosphamide toxicity of mouse embryo in vitro. Glob Vet 2014; 12(1): 80-90.
11. Fazelian K, Dashti G, Golshan Iranpour F, Baghazadeh S. Effects of low doses of exogenous thymoquinone on sperm motility and viability of normozoospermic men. J Isfahan Med Sch 2014; 32(287): 776-83. [In Persian].
12. World Health Organization, Department ofReproductive Health and Research. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva, Switzerland: WHO; 2010.
13. Kime DE, Ebrahimi M, Nysten K, Roelants I, Rurangwa E, Moore HDM, et al. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals. Aquatic Toxicology 1996; 36(3): 223-37.
14. Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, Canova S, Pozzobon C, et al. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. Hum Reprod 2002; 17(10): 2665-72.
15. AL-Zuhairy RGM. The phytotherapeutic effect of traditional crude oil of Nigella sativa on male reproductive system of albino mice treated with low toxic dose of paracetamol. Med J Babylon 2012; 9(1): 229-37.
16. Bashandy AS. Effect of fixed oil of Nigella sativa on male fertility in normal and hyperlipidemic rats. Int J Pharmacol 2007; 3(1): 27-33.
17. Aboul-Ela EI. Cytogenetic studies on Nigella sativa seeds extract and thymoquinone on mouse cells infected with schistosomiasis using karyotyping. Mutat Res 2002; 516(1-2): 11-7.
18. Al-Sa'aidi JAA, Al-Khuzai ALD, Al-Zobaydi NFH. Effect of alcoholic extract of Nigella sativa on fertility in male rats. Iraqi J Vet Sci 2009; 23(Suppl 2): 123-8.
19. El Khasmi M, Issaoub Allah A, Farh M, Riad F, Safwate A, El Abbadi N, et al. Effect of Nigella sativa fixed oil on the hormonal profile of androgens and circulating in male rats. Phytotherapie 2011; 9(6): 338-42.
20. Centola GM. Dose-response effects of gramicidin-D, EDTA, and nonoxynol-9 on sperm motion parameters and acrosome status. Contraception 1998; 58(1): 35-8.
21. Malkovsky M, Newell A, Dalgleish AG. Inactivation of HIV by nonoxynol-9. Lancet 1988; 1(8586): 645.
22. Roddy RE, Cordero M, Cordero C, Fortney JA. A dosing study of nonoxynol-9 and genital irritation. Int J STD AIDS 1993; 4(3): 165-70.
23. Ford WC. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? Hum Reprod Update 2006; 12(3): 269-74.
24. Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, et al. The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. Dev Cell 2005; 9(2): 249-59.
25. Bajpai M, Doncel GF. Involvement of tyrosine kinase and cAMP-dependent kinase cross-talk in the regulation of human sperm motility. Reproduction 2003; 126(2): 183-95.
26. Miki K, Willis WD, Brown PR, Goulding EH, Fulcher KD, Eddy EM. Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility. Dev Biol 2002; 248(2): 331-42.
27. Tash JS, Means AR. Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium. Biol Reprod 1982; 26(4): 745-63.
28. Hamasaki T, Barkalow K, Richmond J, Satir P. cAMP-stimulated phosphorylation of an axonemal polypeptide that copurifies with the 22S dynein arm regulates microtubule translocation velocity and swimming speed in Paramecium. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88(18): 7918-22.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 34, No. 381, 1st Week, July 2016

Received: 16.03.2016

Accepted: 19.05.2016

Effects of High Doses of Hydroalcoholic Extract of Nigella Sativa on Sperm Motility and Apoptosis in Normozoospermic Men

Nahid Sadeghnejad[1], Gholam Reza Dashti[2], Behzad Zolfaghari[3], Shekofeh Baghazadeh[4], Farhad Golshan-Iranpour[5]

Original Article

Abstract

Background: Previous studies have revealed that high doses of Thymoquinone (TQ) is able to cease the movement of sperms in culture medium.The aim of this study was to investigate and evaluate whether Nigella sativa (NS) extract has similar effect on spermatozoa with TQ or not.

Methods: Ten washed semen samples were used for each concentration of NS (5 and 10 mg/ml). Two 0.5 ml aliquots of each sample were incubated with or without the considered dose as case and control samples. Total sperm motility was assessed after one hour. In addition, apoptosis of sperms receiving dose of 10 mg/ml were measured by Annexin-PI staining method followed by flow cytometry detection.

Findings: Both doses of NS extract substantially reduce the percentage of total motility, fast and slow progressive and non-progressive sperms. After administration of NS extract, the percentages of alive, apoptotic and necrotic sperms did not show significant change.

Conclusion: 5 and 10 mg/ml doses of NS extract considerably diminish the percentage of motile spermatozoa in culture medium. Similarly, NS extract with dose of 10 mg/ml does not change the percentage of viable spermatozoa in culture medium.

Keywords: Apoptosis, Nigella Sativa, Sperm motility

Citation: Sadeghnejad N, Dashti GR, Zolfaghari B, Baghazadeh S, Golshan-Iranpour F. **Effects of High Doses of Hydroalcoholic Extract of Nigella Sativa on Sperm Motility and Apoptosis in Normozoospermic Men.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(381): 470-7.

1- MSc Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Department of Pharmacognosy Sciences, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Andrology Laboratory, Shahid Beheshti Hospital, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Farhad Golshan-Iranpour PhD, Email: fgolshaniranpour@yahoo.com