

ارزیابی توان زیستی و آپوپتوزیس در اسپرم‌های انسان تیمار شده با سدیم آرسنیت

حمید رضا مومنی Ph.D.^{۱*}، ملک سلیمانی مهرنجانی Ph.D.^۱، محمد حسین آبنوسی Ph.D.^۱، عباس بختیاری M.Sc.^۲،
نجمه اسکندری M.Sc.^۱، محمد رفیعی Ph.D.^۲

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کد پستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

۳- دانشگاه علوم پزشکی اراک، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، اراک، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: h-momeni@araku.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱/۲۰

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش ارزیابی توان زیستی و همچنین خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی آپوپتوزیس در اسپرم‌های انسان تیمار شده با سدیم آرسنیت بود.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های اسپرم انسان با غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۲۰ و ۱۰۰ میکرومولار سدیم آرسنیت برای زمان‌های ۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه تیمار شدند. ارزیابی توان زیستی اسپرم توسط سنجش MTT و تمامیت DNA توسط رنگ آمیزی آکریدین اورنژ صورت گرفت. تغییرات مورفولوژیکی آپوپتوزیس در هسته اسپرم با رنگ آمیزی هوخست و دیف کوئیک و جنبه بیوشیمیایی آپوپتوزیس از طریق روش تانل مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و اندازه‌گیری تکراری انجام شد.

نتایج: سنجش MTT اثر متقابل معنی‌داری بین غلظت سدیم آرسنیت و زمان بر کاهش درصد توان زیستی اسپرم را نشان داد. علاوه بر آن، پس از گذشت ۱۸۰ دقیقه توان زیستی اسپرم‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. با این وجود این آلاینده تاثیری بر تمامیت DNA و همچنین جنبه‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی آپوپتوزیس در هسته اسپرم نداشت.

نتیجه‌گیری: سدیم آرسنیت موجب کاهش معنی‌دار توان زیستی اسپرم انسان می‌شود و این اثر احتمالاً از طریق آسیب به هسته و DNA اسپرم صورت نمی‌گیرد.

واژگان کلیدی: اسپرم انسان، آپوپتوزیس، تمامیت DNA، سدیم آرسنیت، توان زیستی

مقدمه

ناباروری در مردان یکی از مشکلات عمده این جنس محسوب می‌شود که آن‌ها را از نظر پزشکی و روانی مورد تاثیر قرار می‌دهد. صرف نظر از موارد معمول برای ناباروری مردان از جمله trauma, cryptorchidism, varicocele، عفونت‌ها و تومور، در سال‌های اخیر توجه اثرات زیان آور آلاینده‌های زیست محیطی بر روی سیستم تناسلی انسان که می‌تواند باروری مردان را به مخاطره بیاندازد عطف شده است.

آرسنیک به عنوان یک شبه فلز سمی محسوب می‌شود که به‌طور طبیعی در پوسته زمین یافت می‌شود و می‌تواند منابع آب آشامیدنی را از طریق شستشو، فرسایش و استخراج معدن آلوده نماید (۱). علاوه بر این آرسنیک در ساخت علف‌کش‌ها، حشره کش‌ها، مواد کشنده جوندگان، مواد نگهدارنده مواد غذایی (۲) و حتی داروها (۳ و ۴) کاربرد دارد. بنابراین آرسنیک به‌عنوان یک آلاینده زیست محیطی جدی مطرح است که قادر است از طرق مختلف از جمله پوست، سیستم تنفس و گوارش جذب و سلامتی انسان و حیوانات را تهدید نماید. مسمومیت ناشی از آرسنیک به‌طور مزمن می‌تواند باعث ایجاد سرطان (۵)، بیماری‌های پوستی (۶) و عروقی (۷) گردد. مطالعات همچنین نشان دهنده آثار مخرب آرسنیک بر روی سیستم تولید مثل جانور نر می‌باشد که منجر به ناباروری آن‌ها می‌گردد (۸، ۹ و ۱۰). مسمومیت آرسنیک در حیوانات آزمایشگاهی موجب ناتوانی در عمل کرد سلول‌های لایدیگ شده و بدین ترتیب اثرات منفی را بر روی اسپرماتوژنز اعمال می‌نماید (۱۱، ۱۲ و ۱۳). علاوه بر این گزارش‌هایی مبنی بر اثرات آرسنیک در کاهش وزن بیضه و اندام‌های جنسی مرتبط در رت (۱۲)، کاهش تعداد اسپرم رت بالغ (۱۰)، کاهش توان زیستی و قابلیت تحرک اسپرم رت بالغ (۱۴)، کاهش مورفولوژی طبیعی اسپرم موش (۹)، کاهش در فعالیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتی بیضه (۱۵) و تغییر در سطوح گونادوتروپین‌ها و تستوسترون (۱۰ و ۱۶) وجود دارد. گزارش‌های محدودی که در خصوص اثر آرسنیک بر روی اسپرم‌های انسان در دسترس می‌باشد نیز حاکی از کاهش تعداد و حرکت اسپرم (۱۷، ۱۸ و ۱۹) در افراد در معرض این آلاینده می‌باشد. در بیشتر مواردی که آرسنیک اثرات مخرب خود را بر روی سیستم تناسلی اعمال نموده است، القا استرس اکسیداتیو به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های دخیل در این امر مطرح می‌باشد (۱۵ و ۲۰).

با وجود مطالعات انجام شده در خصوص اثرات سمی آرسنیک بر روی سیستم تناسلی جانوران و انسان، با این حال بر اساس دانش ما تا کنون گزارشی که با در معرض‌گذاری اسپرم‌های انسان با این آلاینده در شرایط *in vitro* به بررسی فاکتورهای مربوط به کیفیت اسپرم به‌خصوص قابلیت حیات آن پرداخته شده باشد وجود ندارد. لذا این پژوهش با هدف ارزیابی توان زیستی اسپرم‌های انسان تیمار شده با سدیم آرسنیت در شرایط *in vitro* انجام شد. علاوه بر آن سعی شد تا به‌منظور مشخص شدن نقطه اثر سدیم آرسنیت در اسپرم، جنبه‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی آپوپتوزیس هسته اسپرم مورد توجه و بررسی قرار گیرد.

مواد و روشها

تهیه و آماده‌سازی نمونه: نمونه‌های اسپرم از آزمایشگاه سینا اراک و از افرادی که برای آزمایش معمول اسپرموگرام مراجعه نموده بودند تهیه و با رعایت دمای مناسب به آزمایشگاه منتقل گردید. با توجه به توصیه‌های قبلی، نمونه‌ها معمولاً بین سه تا هفت روز پس از انزال قبلی جمع‌آوری شده بودند. نمونه‌گیری طبق توصیه سازمان بهداشت جهانی در ظروف مخصوص و دهانه گشاد و غیرسمی انجام گرفت. ابتدا پارامترهای اسپرمی شامل شمارش و قابلیت تحرک بر روی نمونه‌ها انجام شد تا اطلاعات اولیه‌ای در مورد کیفیت اسپرم کسب گردد. به منظور شستشوی اسپرم، نمونه‌ها به نسبت ۱ به ۴ با محیط کشت mM HEPES ۲۵ + Ham's F10 (۲۱) مخلوط و سپس با دور ۲۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. عمل شستشو با رسوب اسپرم دوبار دیگر به‌روش بالا تکرار گردید و سرانجام با اضافه نمودن محیط کشت فوق‌الذکر به رسوب نهایی، سوسپانسیونی از اسپرم به‌دست آمد.

شمارش و قابلیت تحرک اسپرم: شمارش اسپرم بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (WHO) (۲۲) انجام گرفت. به این منظور سوسپانسیون اسپرم به نسبت ۹:۱ با فیکساتور فرمالین ۲ درصد رقیق شد. شمارش اسپرم با استفاده از هموسیستمتر نئوبار انجام و تعداد اسپرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید. بررسی قابلیت تحرک اسپرم بر اساس دستورالعمل WHO (۲۲) انجام شد. بدین ترتیب که ابتدا ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم درون Makler chamber که از پیش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم شده بود منتقل و حرکات اسپرم

قرائت گردید. با استفاده از میانگین جذب نوری هشتم نمونه اسپرم منحنی استاندارد رسم شد و معادله رگرسیون حاصل از آن به دست آمد.

از اسپرم‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت، تعداد 3×10^6 اسپرم انتخاب و سنجش MTT بر روی آن‌ها انجام شد. سپس با استفاده از معادله رگرسیون به دست آمده از منحنی استاندارد درصد قابلیت حیات هر نمونه تیمار محاسبه گردید.

بررسی تمامیت DNA اسپرم - رنگ آمیزی آکریدین اورنژ:

جهت بررسی تمامیت DNA از لحاظ تمایز DNA دو رشته‌ای سالم از DNA تک رشته‌ای دناتوره شده از رنگ آمیزی آکریدین اورنژ استفاده شد (۲۴). بدین ترتیب که از نمونه‌های اسپرم لحظه زمانی صفر، کنترل مثبت و اسپرم‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت ($20, 0/1$ و 100 میکرومولار به مدت 180 دقیقه) گسترش تهیه ($n=6$) و در درجه حرارت اتاق خشک شد. سپس گسترش‌ها در محلول متانول-اسید استیک گلاسیال (به نسبت 3 به 1) به مدت 14 ساعت در درجه حرارت 4 درجه سانتی‌گراد تثبیت و سپس با محلول آکریدین اورنژ ($0/19$) درصد در بافر سیترات فسفات، ($pH=2/5$) به مدت 10 دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. لام‌ها به مدت 5 دقیقه با آب مقطر شستشو و سپس در دمای آزمایشگاه خشک شدند. سپس لام‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس (Olympus, Japan) توسط فیلتر مناسب با بزرگنمایی $1000 \times$ مورد بررسی قرار گرفتند. اسپرم‌ها با توجه به میزان رنگ پذیری در دو گروه شامل اسپرم‌های با سر سبز (بیانگر DNA دو رشته‌ای سالم) و اسپرم‌های با سر زرد یا قرمز (بیانگر DNA تک رشته‌ای دناتوره شده) مورد بررسی قرار گرفتند. در هر لام 100 اسپرم شمارش شد تا درصد اسپرم‌های دو رشته‌ای و تک رشته‌ای تعیین گردد.

جهت کنترل روش مذکور، از نمونه‌های کنترل مثبت استفاده شد. بدین منظور DNA نمونه‌های اسپرم با استفاده از دستگاه ترموسایکلر در دمای 96 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه دناتوره شدند. از این نمونه‌ها گسترش تهیه و به روش اشاره شده در فوق رنگ آمیزی گردید.

بررسی آپتوزیس در هسته اسپرم: به منظور بررسی تغییرات مورفولوژیکی آپتوزیس در هسته اسپرم، از رنگ فلورسنت هوخست ۳۳۳۴۲ (Hoechst)، سیگما، آمریکا) استفاده شد (۲۵). بدین ترتیب از نمونه‌های اسپرم لحظه زمانی صفر و

زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. تعداد 200 اسپرم برای هر نمونه بررسی و درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیشرونده، حرکت درجا و بدون حرکت محاسبه گردید.

تیمار نمونه‌ها با سدیم آرسنیت: نمونه‌های اسپرم با کیفیت بالا از لحاظ تعداد و قابلیت تحرک پس از شستشو و شمارش در لوله‌های اپندورف جداگانه (20 میلیون اسپرم در میلی‌لیتر) تفکیک شدند. سپس به لوله‌ها سدیم آرسنیت (مرک، آلمان) اضافه شد به طوری که غلظت‌های $20, 0/1$ و 100 میکرومولار حاصل گردد. لوله‌های مربوط به هر غلظت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد برای زمان‌های $60, 0$ ، 120 و 180 دقیقه نگه‌داری شدند ($n=6$ برای هر غلظت و زمان). سپس این نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری پارامترهای اسپرمی به شرح زیر مورد استفاده قرار گرفتند.

ارزیابی توان زیستی اسپرم به کمک سنجش MTT: اصول

سنجش MTT، $3-(4,5\text{-dimethylthiazol-2-yl})-2,5\text{-diphenyl tetrazolium bromide}$ بر اساس روش موسمن (۲۳) صورت گرفت. جهت این سنجش، ابتدا منحنی استاندارد MTT جهت مشخص شدن ارتباط بین میزان احیا MTT و قابلیت حیات اسپرم انسان رسم گردید. بدین منظور از هشت نمونه اسپرم متفاوت با کیفیت بالا از لحاظ تعداد و قابلیت تحرک استفاده شد. پس از انجام مراحل شستشو، سوسپانسیون اسپرم به دو بخش مجزا تقسیم گردید. یکی از بخش‌ها در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد و اسپرم‌های بخش دیگر به وسیله سه دوره‌ی متناوب انجاماد در نیتروژن مایع و ذوب در 37 درجه سانتی‌گراد کشته شدند. سپس از اسپرم‌های دو بخش به نسبت $10:0$ ، $8:2$ ، $4:4$ ، $6:4$ ، $8:2$ و $10:0$ (به ترتیب مرده و زنده) در لوله‌های اپندورف طوری مخلوط شدند که در هر لوله تعداد 3×10^6 اسپرم وجود داشته باشد. سپس به هر لوله 10 میکرولیتر محلول غلیظ MTT (سیگما، آمریکا، 5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر 25 mM + Ham's F10-HEPES) اضافه شد و به مدت 1 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. لوله‌ها سپس با دور 10000 rpm به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ و رسوب در 200 میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide) حل شد. محلول مجدداً با دور 4000 rpm به مدت 4 دقیقه سانتریفیوژ و محلول بنفش رویی در پلیت 96 خانه وارد و جذب نوری محلول بنفش رنگ با استفاده از دستگاه Elisa reader (SCO diagnostic, Germany) با طول موج 505 نانومتر

مدت ۱۸۰ دقیقه) گسترش تهیه (n=۶) و در درجه حرارت اتاق خشک شد. سپس گسترش‌ها توسط کیت تانل (Chemicon, USA) و بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده رنگ‌آمیزی و سپس توسط میکروسکوپ معمولی بررسی و با بزرگنمایی $100\times$ عکس تهیه گردید.

جهت کنترل روش ذکر شده، از نمونه‌های کنترل مثبت استفاده شد. بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپرم سانتریفیوژ و رسوب به مدت ۲ دقیقه با محلولی شامل سیترات سدیم ۰/۱ درصد و تریتون X-۱۰۰ ۰/۱ درصد در آب مقطر سوسپانسیون شد. محلول با DNase (سیگما، آمریکا) با غلظت ۱۰۰۰u به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مجاور شد. سپس گسترش اسپرمی تهیه شد و پس از خشک شدن در هوای اتاق توسط کیت TUNEL رنگ آمیزی و عکس تهیه شد.

آنالیز آماری: داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS از طریق آنالیز واریانس یک طرفه و اندازه‌گیری تکراری (repeated measure) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. جهت مقایسه میانگین‌ها از تست توکی استفاده شد. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

توان زیستی اسپرم انسان تیمار شده با سدیم آرسنیت

با استفاده از سنجش MTT، نتایج حاصل از آنالیز واریانس اندازه‌گیری تکراری نشان داد که اثر متقابل معنی‌داری ($P < 0.01$) بین غلظت سدیم آرسنیت و زمان بر کاهش درصد توان زیستی اسپرم وجود دارد (جدول ۱).

تیمار شده با سدیم آرسنیت (۰/۱، ۲۰ و ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه) گسترش تهیه شد (n=۶). گسترش‌ها در محیط آزمایشگاه خشک و توسط هوخست (۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت ۳۰ ثانیه) رنگ آمیزی شدند. لام‌ها توسط PBS شستشو شده (۳ بار و هر بار ۵ دقیقه) و سپس توسط میکروسکوپ فلورسنس توسط فیلتر مناسب مورد بررسی قرار گرفتند و از آن‌ها عکس تهیه شد.

جهت بررسی کمی تغییرات هسته اسپرم‌های تیمار شده، از رنگ‌آمیزی دیف کوئیک (Diff-Quick) استفاده شد. بدین ترتیب که از اسپرم‌های لحظه زمانی صفر و اسپرم‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت (۰/۱، ۲۰ و ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه) گسترش تهیه (n=۶) و در درجه حرارت اتاق خشک شد. گسترش‌ها به مدت ۲۵ ثانیه با متانول خالص تثبیت و سپس با دو محلول دیف کوئیک (هر کدام به مدت ۲۵ ثانیه) رنگ آمیزی شدند. سپس نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری ارزیابی و از آن‌ها عکس تهیه شد. در این رنگ آمیزی آکروزوم اسپرم به رنگ صورتی و هسته اسپرم به رنگ بنفش دیده می‌شود. با استفاده از عکس‌های گرفته شده، قطر کوچک هسته اسپرم‌ها در گروه‌های ذکر شده توسط نرم افزار موتیک در ۱۰۰ اسپرم اندازه‌گیری شد.

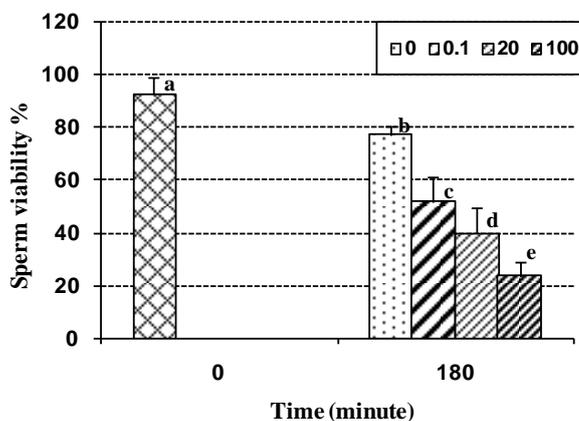
به منظور بررسی تغییرات بیوشیمیایی آپوپتوزیس در هسته اسپرم (شکستگی DNA)، تکنیک تانل (TUNEL TdT-mediated dUTP nick end-labeling) استفاده شد. این روش با نشاندار نمودن انتهای آزاد قطعات شکسته شده DNA دو رشته‌ای قادر است با شناسایی سطوح بالایی از شکست DNA، آپوپتوزیس را در مراحل اولیه تشخیص دهد (۲۶). بدین منظور از نمونه‌های اسپرم لحظه زمانی صفر، کنترل مثبت و اسپرم‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت (۰/۱، ۲۰ و ۱۰۰ میکرومولار به

جدول ۱: اثر متقابل بین غلظت سدیم آرسنیت و زمان بر کاهش معنی‌دار درصد توان زیستی اسپرم انسان. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است. آنالیز واریانس اندازه‌گیری تکراری، n=۶

Sodium arsenite (μM)	Time (minute)				P-value
	0	60	120	180	
0	92.5 \pm 5.6	86.5 \pm 8.4	81.7 \pm 7.9	77.1 \pm 3.3	P<0.01
0.1	92.5 \pm 5.6	75.5 \pm 13.7	66.9 \pm 16.4	51.9 \pm 9.2	
20	92.5 \pm 5.6	57.6 \pm 8.9	48.8 \pm 10.2	39.7 \pm 12.8	
100	92.5 \pm 5.6	47.9 \pm 9.4	38.2 \pm 9.1	23.5 \pm 5.4	
P-value		P<0.01			

زمانی ۱۸۰ دقیقه کاهش یافته است (شکل ۱). این شکل همچنین نشان می‌دهد که انکوباسیون اسپرم‌ها پس از ۱۸۰ دقیقه (غلظت صفر) موجب کاهش معنی‌دار ($P < 0.001$) توان زیستی آن‌ها نسبت به لحظه زمانی صفر شده است.

سنجش MTT همچنین نشان داد که پس از گذشت ۱۸۰ دقیقه توان زیستی اسپرم‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف سدیم آرسنیت (۰/۱، ۲۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به صورت وابسته به غلظت به طور معنی‌داری ($P < 0.001$) نسبت به گروه غلظت صفر، لحظه

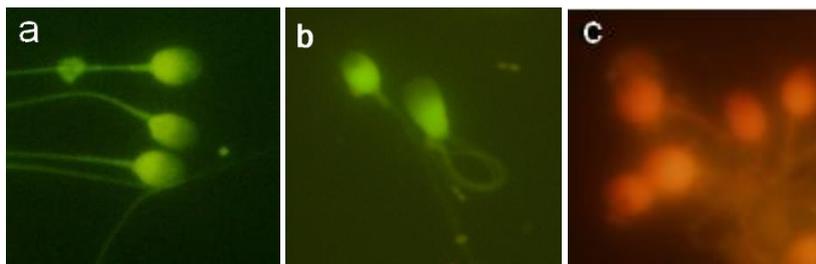


شکل ۱: تاثیر سدیم آرسنیت بر توان زیستی اسپرم انسان سنجش شده با روش MTT. تیمار اسپرم‌ها پس از ۱۸۰ دقیقه با غلظت‌های مختلف سدیم آرسنیت (۰/۱، ۲۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به صورت وابسته به غلظت موجب کاهش معنی‌دار توان زیستی اسپرم‌ها نسبت به گروه غلظت صفر، لحظه زمانی ۱۸۰ دقیقه شده است. حروف غیر مشابه بیانگر معنی‌دار بودن میانگین‌ها می‌باشد. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است. آنالیز واریانس یک طرفه، تست توکی، $n=6$

تمامیت DNA اسپرم‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت

و ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه نشان داد که تیمار اسپرم‌ها با سدیم آرسنیت در مقایسه با گروه لحظه زمانی صفر، تاثیر قابل توجهی روی دنا توره شدن ساختمان دو رشته‌ای DNA اسپرم نداشت (شکل ۲).

نتایج بررسی تمامیت DNA (دو رشته‌ای سالم در مقابل تک رشته‌ای دنا توره) در اسپرم‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت با غلظت‌های ۰/۱ و ۲۰ میکرومولار (داده‌ها نشان داده نشده است)



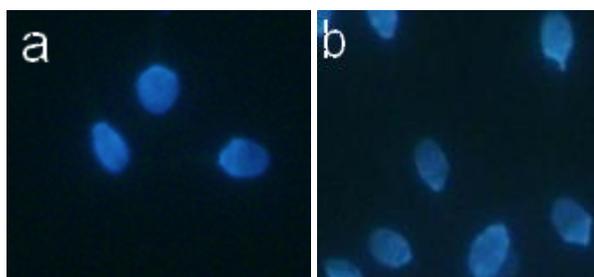
شکل ۲: بررسی تمامیت DNA دو رشته‌ای در مقابل تک رشته‌ای در نمونه‌های اسپرم انسان: (a) اسپرم‌های لحظه زمانی صفر: اسپرم با DNA دو رشته‌ای سالم (سبز رنگ)، (b) اسپرم‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت (۱۰۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه) در مقایسه با اسپرم‌های لحظه زمانی صفر تاثیر قابل توجهی بر تمامیت DNA/اسپرم نداشت. (c) کنترل مثبت: اسپرم انسان با DNA تک رشته‌ای (به مواد و روش‌ها مراجعه شود) (قرمز رنگ). رنگ آمیزی آکریدین اورنژ، بزرگمایی $\times 1000$.

وقوع آپوتوزیس در اسپرم‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت

است) و ۱۰۰ میکرومولار در زمان ۱۸۰ دقیقه، در مقایسه با اسپرم‌های لحظه زمانی صفر نشانه‌های مورفولوژیکی آپوتوزیس را نشان نداد (شکل ۳). علاوه بر آن، نتایج حاصل از رنگ آمیزی دیف کوئیک نشان داد که قطر هسته اسپرم‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت (۰/۱، ۲۰ و ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۳ ساعت)

بررسی مورفولوژیکی هسته اسپرم‌های انسان که با هوخست ۳۳۳۴۲ رنگ آمیزی شده بودند، در گروه تیمار شده با سدیم آرسنیت با غلظت ۰/۱ و ۲۰ میکرومولار (داده‌ها نشان داده نشده

تغییر معنی‌داری در مقایسه با اسپرم‌های، لحظه زمانی صفر نداشت (جدول ۲).



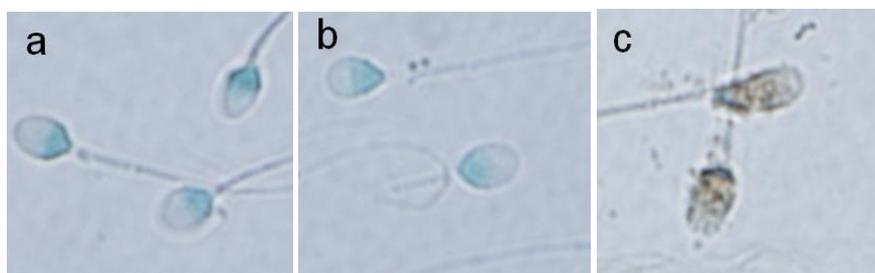
شکل ۳: بررسی مورفولوژیکی آپوتوزیس در هسته اسپرم‌های انسان. (a) اسپرم‌های لحظه زمانی صفر: (b) اسپرم‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت (۱۰۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه) در مقایسه با اسپرم‌های لحظه زمانی صفر تاثیر قابل توجهی بر مورفولوژی هسته اسپرم را نشان نداد. رنگ آمیزی هوخست ۳۳۳۴۲، بزرگنمایی $\times 1000$.

جدول ۲: میانگین قطر هسته اسپرم انسان در گروه‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت با غلظت ۰/۱، ۰/۲ و ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه در مقایسه با اسپرم‌های لحظه زمانی صفر تفاوت معنی‌داری نداشت. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار است. آنالیز واریانس یک طرفه، $n=6$

Sodium arsenite (μM)	Diameter of sperm nucleus (μm)	
	Time (minute)	
	0	180
0	3.37 ± 0.24	3.37 ± 0.24
0.1	3.37 ± 0.24	3.41 ± 0.19
20	3.37 ± 0.24	3.33 ± 0.21
100	3.37 ± 0.24	3.39 ± 0.24

اسپرم‌های لحظه زمانی صفر، تاثیر قابل ملاحظه‌ای روی شکسته شدن DNA اسپرم نداشت و اسپرم‌های گروه تیمار همچون اسپرم‌های لحظه زمانی صفر به صورت تانل منفی ظاهر شدند (شکل ۴).

به منظور بررسی جنبه بیوشیمیایی آپوتوزیس (شکسته شدن DNA) در اسپرم‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت روش تانل انجام شد. نتایج نشان داد که تیمار اسپرم‌های انسان با غلظت‌های ۰/۱ و ۲۰ میکرومولار (داده‌ها نشان داده نشده است) و ۱۰۰ میکرومولار سدیم آرسنیت برای ۱۸۰ دقیقه در مقایسه با



شکل ۴: بررسی جنبه بیوشیمیایی آپوتوزیس (شکسته شدن DNA) در اسپرم‌های انسان با استفاده از روش تانل: (a) اسپرم‌های لحظه زمانی صفر: اسپرم‌های با DNA سالم (تانل منفی). (b) اسپرم‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت (۱۰۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه) به صورت تانل منفی ظاهر شدند. (c) کنترل مثبت: اسپرم‌های آپوتوتیک با DNA شکسته شده (به مواد و روش‌ها مراجعه شود) که به صورت تانل مثبت ظاهر شدند. بزرگنمایی $\times 1000$.

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در معرض گذاری اسپرم انسان با سدیم آرسنیت طی سه ساعت توان زیستی اسپرم‌ها را کاهش می‌دهد و این کاهش احتمالا ناشی از تغییر در هسته و DNA اسپرم نیست.

ارزیابی توان زیستی اسپرم یکی از روش‌هایی است که می‌تواند اطلاعاتی را در خصوص ظرفیت لقاح اسپرم ارائه دهد. این سنجش به روش‌های مختلف از جمله ائوزین-نگروزین، MTT، تریپان بلو و پروپیدیوم آیوداید قابل انجام است. روش ائوزین-نگروزین به عنوان یک روش تشخیصی کیفی جهت تفکیک اسپرم‌های زنده از مرده مورد استفاده قرار می‌گیرد (۸، ۲۷). اگرچه این روش ساده و ارزان است ولی تحت تاثیر مشاهده کننده قرار داشته و با خطا همراه می‌باشد. اخیرا سنجش MTT توسط نصر اصفهانی و همکاران (۲۱) به منظور بررسی توان زیستی اسپرم انسان مورد استفاده قرار گرفته است. با این حال این ارزیابی به صورت کیفی انجام شده که نمی‌تواند اطلاعات دقیقی را در خصوص توان زیستی اسپرم انسان ارائه نماید. در مطالعه حاضر روش کمی سنجش MTT برای اولین بار برای ارزیابی توان زیستی اسپرم انسان به کار گرفته شد. این روش کمی برای ارزیابی توان زیستی اسپرم گاو (۲۸)، اسب (۲۹)، بوفالو (۳۰) و گراز (۳۱) نیز مورد استفاده قرار گرفته است. در روش MTT فعالیت متابولیکی و ظرفیت میتوکندری‌های فعال سلول‌ها مورد سنجش قرار می‌گیرد (۳۲). برعکس سایر روش‌های بررسی توان زیستی سلولی که در آن‌جا از تریپان بلو و پروپیدیوم آیوداید استفاده می‌شود، تنها تمامیت غشای سلول‌ها سنجش می‌شود (۳۳ و ۳۴) و اطلاعاتی در خصوص میتوکندری‌ها و یا عمل متابولیکی سلول ارائه نمی‌گردد. در روش MTT که به طور گسترده جهت ارزیابی توان زیستی و تزیاید سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۳) نمک زرد تترازولیوم به وسیله دهیدرونازهای میتوکندری‌های فعال در سلول‌های زنده به بنفش فورمازان احیا می‌شود و بنابراین میزان رنگ بنفش تولید شده متناسب با تعداد سلول‌های زنده و لذا توان زیستی سلولی است (۳۵). اگر چه این روش تمامیت میتوکندریایی را مورد سنجش قرار می‌دهد، اما بایستی توجه داشت که احیای MTT می‌تواند بوسیله دهیدرونازهای متعلق به دیگر ارگانل‌های سلولی مثل لیزوزوم‌ها نیز صورت گیرد. صرف نظر از اینکه احیای MTT توسط میتوکندری‌ها و یا سایر ساختارهای دیگر سلولی صورت می‌گیرد،

سلول‌هایی که از نظر متابولیکی فعال می‌باشند این احیا را انجام می‌دهند و می‌تواند به عنوان یک روش رنگ سنجی سریع و معتبر برای سنجش توان زیستی اسپرم به کار رود.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که انکوباسیون اسپرم‌ها پس از ۱۸۰ دقیقه موجب کاهش معنی‌داری در توان زیستی اسپرم در مقایسه با اسپرم‌های لحظه زمانی صفر شد. مطالعات نشان می‌دهد که انکوباسیون اسپرم انسان در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت می‌تواند موجب کاهش شدید قابلیت تحرک آن‌ها به واسطه افزایش گونه اکسیژن واکنش پذیر (Reactive Oxygen Species, ROS) گردد (۳۶). بنابراین این احتمال وجود دارد که کاهش توان زیستی ایجاد شده در اسپرم‌ها در این پژوهش نیز ناشی از انکوباسیون اسپرم‌ها و احتمالا در اثر افزایش تولید ROS در آن‌ها بوده باشد. نتایج همچنین نشان داد که تیمار اسپرم‌ها با سدیم آرسنیت موجب کاهش وابسته به زمان و غلظت در توان زیستی اسپرم‌ها می‌شود. گزارش‌های متعددی وجود دارد که در آن‌ها اثرات مخرب آرسنیک بر روی دستگاه تناسلی را به القا استرس اکسیداتیو نسبت می‌دهند (۸، ۱۵، ۲۰ و ۳۷). بنابراین این احتمال وجود دارد که کاهش قابلیت حیات ایجاد شده در اسپرم‌ها در این پژوهش نیز ناشی از استرس اکسیداتیو حاصل از تاثیر سدیم آرسنیت بوده باشد. با این فرض، این سوال مطرح است که این آلاینده اثرات خود را مشخصا بر روی کدام بخش اسپرم اعمال نموده است. آیا سر با دارا بودن هسته و کروماتین و یا تنه با اجتماعی از میتوکندری‌ها؟

تمامیت DNA اسپرم یکی از پارامترهای مهم کیفیت اسپرم در پیش بینی ناباروری محسوب می‌شود (۳۷). گزارش‌هایی نیز وجود دارد که آسیب DNA به وسیله آرسنیک را نشان می‌دهد (۳۸). بنابراین یکی از احتمالات ممکن برای کاهش قابلیت حیات اسپرم‌های مورد تاثیر به وسیله سدیم آرسنیت می‌توانست تاثیر بر روی تمامیت هسته و DNA باشد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سدیم آرسنیت تاثیری بر روی تبدیل DNA دو رشته‌ای به تک رشته‌ای نداشت. علاوه بر آن، مشخصه‌های مورفولوژیکی (تغییرات هسته و کروماتین) و بیوشیمیایی (شکستگی DNA) آپوپتوزیس در اسپرم‌های مورد تاثیر با سدیم آرسنیت حاکی از عدم بروز نشانه‌های آپوپتوزیس در هسته و DNA این اسپرم‌ها بود. عدم تاثیر سدیم آرسنیت بر تمامیت هسته و DNA در مطالعه قبلی (۳۷) که در آن جا تیمار رت‌ها با سدیم آرسنیت (۸ میلی گرم بر کیلوگرم) به مدت ۵۶ روز انجام شده بود نیز تاییدی

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی حوزه معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اراک انجام شده است (قرارداد طرح پژوهشی به شماره ۹۰/۱۰۶۳۳ مورخ ۹۰/۱۰/۱۰) که بدین‌وسیله از مسئولین مربوطه تشکر به عمل می‌آید. نویسندگان همچنین از مسئولین محترم آزمایشگاه سینا اراک که نسبت به در اختیار گذاشتن اسپرم انسان، در این پژوهش همکاری شایسته‌ای معمول نمودند صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

1. Ayotte JD, Montgomery DL, Flanagan SM, Robinson KW. Arsenic in groundwater in eastern New England: occurrence, controls, and human health implications. *Environ Sci Technol*. 2003; 37(10): 2075-83.
2. Akter KF, Owens G, Davey DE, Naidu R. Arsenic speciation and toxicity in biological systems. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2005; 184: 97- 149.
3. Chou WC, Dang CV. Acute promyelocytic leukemia: recent advances in therapy and molecular basis of response to arsenic therapies. *Curr Opin Hematol*. 2005; 12(1): 1-6.
4. Hu J, Fang J, Dong Y, Chen SJ, et al. Arsenic in cancer therapy. *Anticancer Drugs*. 2005; 16(2): 119-27.
5. Arsenic in drinking water. *J Environ Health*. 2001; 64(2): 36- 44.
6. Das HK, Mitra AK, Sengupta PK, Hossain A, et al. Arsenic concentrations in rice, vegetables, and fish in Bangladesh: a preliminary study. *Environ Int*. 2004; 30(3): 383-7.
7. Wang CH, Jeng JS, Yip PK, Chen CL, et al. Biological gradient between long-term arsenic exposure and carotid atherosclerosis. *Circulation*. 2002; 105(15): 1804-9.
8. Momeni HR, Oryan S, Eskandari N. Effect of vitamin E on sperm number and testis histopathology of sodium arsenite-treated rats. *Reprod Biol*. 2012; 12(2): 171-81.
9. Pant N, Murthy RC, Srivastava SP. Male reproductive toxicity of sodium arsenite in mice. *Hum Exp Toxicol*. 2004; 23(8): 399-403.
10. Jana K, Jana S, Samanta PK. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an

بر مطالعه حاضر بود. بنابراین این طور می‌توان نتیجه گرفت که کاهش قابلیت حیات اسپرم‌ها ناشی از سدیم آرسنیت احتمالا به‌علت تاثیر آن بر روی هسته و DNA اسپرم نبوده و دلیل آن نیز ممکن است به علت فشرده بودن DNA اسپرم و مقاومت آن در مقابل آسیب ناشی از این آلاینده باشد. احتمال دیگر کاهش قابلیت حیات اسپرم می‌توانست از طریق تاثیر سدیم آرسنیت بر روی میتوکندری‌های اسپرم باشد. این احتمال وجود دارد که سدیم آرسنیت با ایجاد استرس اکسیداتیو و در پی آن پراکسیداسیون لیپید منجر به تغییر در تراوی غشا (۳۹) و یا تغییر پتانسیل غشای میتوکندری‌ها (۴۰) که به نوبه خود منجر به آزاد شدن فاکتورهای آپوپتوزیک مثل سیتوکروم c و فاکتور القا کننده آپوپتوزیس (Apoptosis inducing factor) از میتوکندری‌ها می‌شود شده باشد. همچنین این آلاینده ممکن است با ایجاد اختلال در عملکرد میتوکندری‌ها موجب اختلال در فرایند فسفوریلاسیون اکسیداتیو در این اندامک شده و منجر به تخلیه ATP (۴۱) در اسپرم شود که در نهایت منجر به کاهش قابلیت حیات اسپرم شده باشد. سدیم آرسنیت همچنین قادر است با اتصال به لیگاند های حاوی سولفور باعث ایجاد اختلال و کاهش در فعالیت آنزیم‌های سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانت شود (۱۵ و ۴۲) و این امر می‌تواند در تشدید اثرات اکسیداتیو سدیم آرسنیت روی کاهش توان زیستی اسپرم عمل نموده باشد. اینکه آیا در این پژوهش سدیم آرسنیت اثرات مخرب خود را به‌طور مستقیم بر روی اسپرم یا به‌طور غیرمستقیم از طریق تضعیف سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتی اعمال نموده است مشخص نیست و نیاز به تحقیق بیشتر در این زمینه دارد. اندازه‌گیری شاخص‌های القا استرس اکسیداتیو و یا اندازه‌گیری آنزیم‌های سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتی در اسپرم می‌تواند این موضوع را روشن نماید.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از سنجش کمی MTT نشان دهنده اثرات مخرب سدیم آرسنیت در کاهش توان زیستی اسپرم انسان بود. از آنجا که این آلاینده تاثیری بر تمامیت DNA و همچنین القا آپوپتوزیس در اسپرم‌های انسان نداشته است، لذا این طور می‌توان احتمال داد که کاهش توان زیستی القا شده در اسپرم‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت (در بازه زمانی سه ساعت) از طریق آسیب به هسته و DNA نبوده است.

- estrogenic mode of action. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006; 4: 9.
11. Sanghamitra S, Hazra J, Upadhyay SN, Singh RK, et al. Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2008; 52(1): 84-90.
 12. Ahmad I, Akthar KM, Hussain T. Arsenic induced microscopic changes in rat testis. *Professional Med J*. 2008; 15(2): 287-291.
 13. Chinoy NJ, Tewari K, Jhala DD. Fluoride and/or arsenic toxicity in mice testis with formation of giant cells and subsequent recovery by some antidotes. *Fluoride*. 2004; 37(3): 172-84.
 14. Mukherjee S, Mukhopadhyay PK. Studies on Arsenic Toxicity in Male Rat Gonads and its Protection by High Dietary Protein supplementation. *Al Ameen J Med Sci* 2009; 2(1): 73-77.
 15. Manna P, Sinha M, Sil PC. Protection of arsenic-induced testicular oxidative stress by arjunolic acid. *Redox Rep*. 2008; 13(2): 67-77.
 16. Sarkar M, Chaudhuri GR, Chattopadhyay A, Biswas NM. Effect of sodium arsenite on spermatogenesis, plasma gonadotrophins and testosterone in rats. *Asian J Androl*. 2003; 5(1): 27-31.
 17. Xu W, Bao H, Liu F, Liu L, et al. Environmental exposure to arsenic may reduce human semen quality: associations derived from a Chinese cross-sectional study. *Environ Health*. 2012; 11: 46.
 18. Li P, Zhong Y, Jiang X, Wang C, et al. Seminal plasma metals concentration with respect to semen quality. *Biol Trace Elem Res*. 2012; 148(1): 1-6.
 19. Balabanic D, Rupnik M, Klemencic AK. Negative impact of endocrine-disrupting compounds on human reproductive health. *Reprod Fertil Dev*. 2011; 23(3): 403-16.
 20. Shi H, Shi X, Liu KJ. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem*. 2004; 255(1-2): 67-78.
 21. 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.
 22. World health organization (WHO) laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 1999.
 23. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65(1-2): 55-63.
 24. Tejada AL, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, et al. Test for the Practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril*. 1984; 42: 87-91.
 25. Whiteside G, Munglani R. TUNEL, Hoechst and immunohistochemistry triple-labelling: an improved method for detection of apoptosis in tissue sections--an update. *Brain Res Brain Res Protoc*. 1998; 3(1): 52-3.
 26. Jerome KR, Vallan C, Jaggi R. The tunel assay in the diagnosis of graft-versus-host disease: caveats for interpretation. *Pathology*. 2000; 32(3): 186-90.
 27. Björndahl L, Söderlund I, Kvist U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Human Reproduction*. 2003; 18(4): 813-816.
 28. Aziz DM. Assessment of bovine sperm viability by MTT reduction assay. *Anim Reprod Sci*. 2006; 92(1-2): 1-8.
 29. Aziz DM, Ahlswede L, Enbergs H. Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability. *Theriogenology*. 2005; 64(6): 1350-6.
 30. Iqbal M, Ijaz A, Aleem M, Rehman H, et al. Assessment of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) semen by MTT reduction assay. *S. Afr. j. anim. sci*. 2009; 39(5): 294-300.
 31. Byuna JW, Choo SH, Kim HH, Kim YJ, et al. Evaluation of Boar Sperm Viability by MTT Reduction Assay in Beltsville Thawing Solution Extender. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*. 2008; 21: 494 - 498.
 32. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 1986; 89(2): 271-7.
 33. Parsley CP, Cheng KW, Song L, Hochman S. Thin slice CNS explants maintained on collagen-coated culture dishes. *J Neurosci Methods*. 1998; 80(1): 65-74.
 34. Elliott JL. Experimental models of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis*. 1999; 6(5): 310-320.
 35. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 1986; 89(2): 271-277.
 36. Calamera JC, Fernandez PJ, Buffone MG, Acosta AA, et al. Effects of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. *Andrologia*. 2001; 33(2): 79-86.

37. Momeni HR, Eskandari N. Effect of vitamin E on sperm parameters and DNA integrity in sodium arsenite-treated rats. *Iran J Reprod Med.* 2012; 10(3): 249-256.
38. Balakumar B, Ramanathan K, Kumaresan S, Suresh R. DNA damage by sodium arsenite in experimental rats: ameliorative effects of antioxidant vitamins C and E. *Ind J Sci Tech.* 2010; 3(3): 322-327.
39. Chang SI, Jin B, Youn P, Park C, et al. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007; 218(2): 196-203.
40. Miller WH Jr, Schipper HM, Lee JS, Singer J, et al. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res.* 2002; 62(14): 3893-903.
41. Allamaneni SS, Agarwal A, Nallella KP, Sharma RK, et al. Characterization of oxidative stress status by evaluation of reactive oxygen species levels in whole semen and isolated spermatozoa. *Fertil Steril.* 2005; 83(3): 800-3.
42. Das J, Ghosh J, Manna P, Sinha M, et al. Taurine protects rat testes against NaAsO₂-induced oxidative stress and apoptosis via mitochondrial dependent and independent pathways. *Toxicol Lett.* 2009; 187(3): 201-10.

Evaluation of Viability and Apoptosis in Human Sperm Treated with Sodium Arsenite

Momeni HR, Ph.D.^{1*}, Soleimani Mehranjani M, Ph.D.¹, Abnosi MH, Ph.D.¹,
Bakhtiari A, M.Sc.², Eskandari N, M.Sc.¹, Rafeie M, Ph.D.³

1. Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

2. M.Sc. in Animal physiology, Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

3. Department of Statistical Biology and Epidemiology, the University of Arak Medical Sciences, Arak, Iran

* Email corresponding author: h-momeni@araku.ac.ir

Received: 9 Apr. 2013

Accepted: 13 Aug. 2013

Abstract

Aim: The aim of this research was to evaluate viability as well as morphological and biochemical features of apoptosis in human sperm treated with sodium arsenite.

Material and methods: Human sperm samples were exposed with different concentration of sodium arsenite (0, 0.1, 20 and 100 μ M) for 0, 60, 120 and 180 minutes. Sperm viability was done using MTT assay and sperm DNA integrity was investigated by acridine orange staining. Morphological feature of apoptosis in sperm nucleus was studied using Hoechst and Diff-Quick staining, whereas biochemical feature of apoptosis was studied by TUNEL method. Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA and repeated measure.

Results: MTT assay showed a significant interaction between sodium arsenite concentration and time on the decrease sperm viability. In addition, after 180 minutes, the viability of sperm treated with sodium arsenite was significantly decreased compared to control. However, this pollutant had no effect on DNA integrity as well as morphological and biochemical features of apoptosis in the sperm nucleus.

Conclusion: Sodium arsenite caused a significant decrease in human sperm viability and this effect was not due to the damage of sperm nucleus and DNA.

Keywords: Human sperm, Apoptosis, DNA integrity, Sodium arsenite, Sperm viability