مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)
جلد ۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳، ۲۸۷-۲۸۱

تاثیر داروی پنتوکسی فیلین بر قابلیت تحرک، قابلیت حیات و شکستگیDNA اسپرم انسان در محیط آزمایشگاه

سعید قاسمی اسماعیل آباد .M.Sc[۱]، محمد علی خلیلی .Ph.D[۱*]، علی نبی Ph.D. Candidate [۱]،
ایمان حلوایی Ph.D. Candidate [۱]،پرویز اشتری.Ph.D[۲]، سهیلا پور معصومی Ph.D. Candidate [۱]

۱- مرکز تحقیقاتی درمانی و ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
۲- گروه پژوهشی رادیو ایزوتوپ، پژوهشکده کاربرد پرتوها، پژوهشگاه علوم وفنون هسته‌ای، کرج، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: khalili59@hotmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۷/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۲۶

چکیده

هدف: پنتوکسی‌فیلین یک داروی مشتق از گزانتین و گشاد کننده عروق است، که سبب افزایش تحرک اسپرم انسانی در محیط *In vitro* می‌شود. از این دارو برای درمان ناباروری مردانی که مشکل کاهش تحرک اسپرم (آستنواسپرمی) دارند استفاده می‌گردد. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر داروی پنتوکسی فیلین بر پارامتر ها و ساختار DNA اسپرم انسانی با مشکل آستنواسپرمی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۳۸ مرد نابارور با مشکل آستنواسپرمی وارد مطالعه گردیدند. هر نمونه انزالی به‌طور تصادفی به دو گروه تجربی و کنترل تقسیم شد. نمونه‌های تجربی، تحت تاثیر داروی پنتوکسی‌فیلین با غلظت ۳/۶ میلی مول بر لیتر قرار گرفتند. سپس نمونه کنترل و تجربی در شرایط یکسان و به‌مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها از نظر پارامترهای اسپرمی (تعداد، تحرک، مورفولوژی، قابلیت حیات) و ساختار DNA اسپرمی با تست Sperm Chromatin Dispersion (SCD) مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفتند .

نتایج: پنتوکسی‌فیلین سبب افزایش تحرک اسپرمی ۸۵/۷۶±۵/۹۶ درصد در مقایسه با نمونه‌ی کنترل ۷۹/۴۴±۹/۳۷ درصد (P<۰/۰۱) شد. میانگین میزان زنده بودن اسپرم‌ها در نمونه‌ی کنترل ۸۷/۷±۸/۳ درصد بود، در حالی‌که در نمونه‌های تجربی به ۸۳/۵±۹ درصد (P<۰/۰۱) کاهش یافته بود. همچنین این دارو سبب افزایش میانگین قطعه قطعه شدن DNA اسپرم ۲۳/۳۶±۱۰/۲۵ درصد نسبت به نمونه‌های کنترل ۱۸/۵±۸/۷۴ درصد (P<۰/۰ ۰۰۱) شده بود.

نتیجه‌گیری: داروی پنتوکسی‌فیلین در عین حال که تحرک اسپرم را بهبود می‌بخشد ولی باعث کاهش حیات اسپرم‌ها و نیز باعث افزایش قطعه قطعه شدن DNA اسپرم‌ها می‌شود. بنابراین استفاده از این دارو در درمان ناباروری مردان نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

واژگان کلیدی: پنتوکسی‌فیلین، اسپرم انسان، قابلیت حیات، قابلیت تحرک، قطعه قطعه شدن DNA

مقدمه

به‌طور کلی سه عامل عمده در ناباروری مردان مطرح می‌باشد: کاهش تعداد اسپرم، کاهش قدرت تحرک و مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم‌ها. انتخاب اسپرم‌های طبیعی و بالغ در میزان موفقیت تکنیک‌های کمک باروری (Assistant Reproductive Technique) ضروری است (۱-۳). بدیهی است که هر چه کیفیت حرکتی اسپرم‌ها بهبود یابد، نتیجه موفقیت یک سیکل درمانی افزایش خواهد یافت (۴ و ۵). یکی از مشکلات اساسی در بارورشدن تخمک، عدم تحرک و یا تحرک پیشرونده ضعیف اسپرم می‌باشد (۵). Palermo و همکاران (۶) گزارش نمودند که هیچ‌یک از پارامترهای اسپرمی تعداد، تحرک و مرفولوژی به‌تنهایی به‌عنوان عامل مخدوش کننده محسوب نمی‌شوند، بلکه هر سه فاکتور فوق با هم در نتایج باروری دخیل هستند.

پنتوکسی‌فیلین یک داروی شناخته شده در مراکز ناباروری می‌باشد که هنوز عمل‌کرد دقیق آن بر روی اسپرم و لقاح تخمک جای بحث و تحقیق دارد (۷-۱۱). این دارو در محیط *In vitro* و در کمترین زمان می‌تواند سبب افزایش کیفیت و طول مدت تحرک اسپرم گردد (۸، ۹ و ۱۱). تاریخچه استفاده این دارو به سال ۱۹۷۲ بر می‌گردد که در بیماری‌های عروقی نظیر تصلب شرائین جهت بهبود جریان خون شریانی استفاده می‌شده است (۱۲). بنابراین این دارو در هر دو گروه آستنواسپرمی (کاهش تحرک پیشرونده اسپرم) و نورموزواسپرمی (اسپرم‌هایی که از نظر تعداد، تحرک و مورفولوژی نرمال باشد) مورد استفاده فراوان دارد (۷-۱۱). بسیاری از مردان مراجعه کننده به مراکز ناباروری دچار مشکل استنوسپرمی بوده و یکی از راه‌های بهبودی حرکت اسپرم آن‌ها در محیط آزمایشگاه اضافه نمودن پنتوکسی‌فیلین به نمونه اسپرم آنها می‌باشد. در بررسی‌های صورت گرفته استفاده از داروی پنتوکسی‌فیلین سبب بهبود وضعیت فیزیولوژیک اسپرم و متعاقب آن افزایش میزان موفقیت در درمان‌های لقاح آزمایشگاهی (In vitro fertilization, IVF) و کمک باروری شده است (۷، ۱۰ و ۱۳). همچنین در تشخیص و تفکیک اسپرم‌های زنده از مرده نیز موفق بوده و می‌تواند به‌عنوان یک تست موثر در تعیین وضعیت حیاتی اسپرم به‌کار گرفته شود (۱۴). به‌علاوه، تحقیقات متعدد در زمینه‌ی آسیب DNA بیانگر این است که بین آسیب DNA اسپرم وتشکیل جنین و بلاستوسیت، رشد جنین و باروری ارتباط معکوس و قابل ملاحظه‌ای وجود دارد (۱۵-۱۷).

ارزیابی آسیب DNA در اسپرم با سلول‌های سوماتیک کمی متفاوت است زیرا DNA در سر اسپرم بسیار فشرده‌تر از سایر سلول‌هاست. نقص در ساختار کروماتین اسپرم معمولا با محتوای غیر طبیعی پروتئین‌های هسته‌ای و یا شکست‌های رشته‌ای DNA همراه است؛ که این محتوای غیر طبیعی پروتئین‌های هسته‌ای با استفاده از تکنیک (Sperm Chromatin Dispersion) ارزیابی می‌گردد (۱۸-۲۱). با عنایت به موارد فوق، این مطالعه با هدف بررسی تاثیر پنتوکسی‌فیلین بر پارامترهای اسپرمی مردان دچار آستنواسپرمی و همچنین اثرات آن بر میزان تراکم کروماتین و ساختار DNA انجام گرفت.

مواد و رو ش‌ها

دراین مطالعه‌ی تجربی از نمونه‌ی مایع منی ۳۸ مرد با مشکل تحرک پایین اسپرم (آستنواسپرمی) که به مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباوری یزد مراجعه کردند استفاده شد. این مطالعه دارای تاییدیه کمیته اخلاق مرکز ناباروری یزد به شماره۲۲۱ می‌باشد و در این مطالعه سن و مدت ناباروری مردان در نظر گرفته نشد. از کلیه بیماران نیز رضایت نامه کتبی برای انجام این مطالعه بر روی نمونه‌های آن‌ها گرفته شد.

بررسی پارامترهای اسپرمی: نمونه‌های منی افراد پس از۲ تا ۷ روز خودداری از مقاربت، در ظروف استریل با دهانه گشاد جمع‌آوری گردیدند. نمونه‌ها پس از بررسی اولیه، به‌روش Direct Swim up شستشو داده شدند. در این روش محیط کشت را داخل لوله فالکن ریخته و سپس نمونه سیمن را به آن اضافه کرده به‌طوری‌که نمونه سیمن در پایین محیط قرار گیرد. سپس لوله فالکن را به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور قرار داده و بعد از ۴۵ دقیقه مایع رویی رو به لوله فالکن دیگر منتقل کرده، محیط کشت به آن اضافه و به مدت ۷ دقیقه در ۱۹۰۰دور بر دقیقه سانتریفیوژ و مقدار ۱۰ میکرولیتر از رسوب تهیه شده به دو بخش مساوی تقسیم شد. یک بخش به‌عنوان گروه تجربی، تحت تاثیر پنتوکسی‌فیلین (SIGMA chemical com,st Louis, USA) با غلظت استاندارد ۳/۶ میلی‌مول بر لیتر که حلال محیط Ham's F10 بود قرار گرفت و بخش دیگر به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد که فقط توسط حلال تیمار شد. هر دو گروه برای مدت ۴۵ دقیقه درشرایط یکسان در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. پس از شستشو و حذف پنتوکسی‌فیلین از نمونه‌های گروه تجربی با محیط Ham's

F10، پارامترهای اسپرمی و میزان قطعه قطعه شدن DNA اسپرم با استفاده از تست SCD بررسی گردید.

برای شمارش و بررسی حرکت اسپرم‌ها از لام Mackler chamber طبق دستورالعمل WHO انجام گرفت (۲۲). همچنین برای بررسی قابلیت حیات از رنگ آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد، به این ترتیب ۱۰ میکرولیتر نمونه را با ۱۰میکرولیتر رنگ ائوزین- نیگروزین مخلوط نموده و پس از گذشت ۳۰ ثانیه، ۱۰ میکرولیتر ازمخلوط را برداشته و بر روی لام قرار داده و از آن گسترش تهیه کرده و در هوای محیط قرار داده تا خشک گردد. سپس تعداد یکصد اسپرم از هر نمونه توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ×۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم‌هایی که به‌رنگ صورتی یا قرمز در آمده بودند مرده و آن‌هایی‌که فاقد رنگ بودند زنده محسوب شدند (۲۳).

تست SCD (Sperm Chromatin Dispersion): جهت انجام تست SCD ۳۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم آماده شده با ۷۰ میکرولیتر از آگارز با نقطه ذوب پایین ۱ درصد مخلوط شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از این مخلوط بر روی لامی که از قبل با آگارز معمولی ۶۵ درصد پوشیده شده بود قرار گرفت. پس از گذشت ۴ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، هر لام به صورت افقی در محلول اسید کلریدریک ۰/۸ نرمال به مدت۱۷ دقیقه در دمای اتاق و در محیط تاریک و سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در محلول تجزیه کننده شماره یک در دمای اتاق قرارداده شد. سپس لام‌ها به‌مدت ۱۵دقیقه در محلول تجزیه کننده دو و در دمای اتاق قرار گرفتند. آنگاه لام‌ها در محلول شماره سه (اسیدبوریک ۰/۹ مولار، تریس ۰/۹ مولار و ۰/۲EDTA مولار) در دمای اتاق به مدت ۱۲ دقیقه قرار داده شدند. لام‌ها جهت آب‌گیری، در سری الکل‌های صعودی ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد هر کدام به‌مدت ۲ دقیقه قرار گرفتند. در نهایت، لام‌ها در دمای اتاق خشک شدند. مخلوط رنگ رایت با محلول PBS را به نسبت ۱:۱ بر روی لام اضافه کرده و پس از گذشت زمان ۱۰ دقیقه در آب شستشو داده شد. برای آنالیز میزان قطعه قطعه شدن DNA اسپرمی، لام‌ها با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ×۱۰۰ و تعداد یکصد اسپرم از هر نمونه بررسی شدند. در سلول‌هایی دارای DNA قطعه قطعه شده سر اسپرم بدون هاله و یا هاله کوچک، و سایر سلول‌های با هاله‌ی متوسط و بزرگ، سالم و بدون قطعه قطعه شدن DNA در نظر گرفته شدند (۲۳).

آنالیز آماری: برای انجام تست آماری از نرم افزار SPSS19 استفاده شد. اطلاعات بر اساس میانگین ± انحراف معیار گزارش شد. پارامترهای اسپرم قبل و بعد از مواجهه با پنتوکسی فیلین توسط آزمون paired T-test و Wilcoxon signed rank برای بررسی اطلاعات پارامتری و ناپارامتری استفاده شد، P< ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

تاثیر داروی پنتوکسی فیلین بر میزان تحرک و قابلیت حیات اسپرم

میانگین ± انحراف معیار تحرک اسپرم در نمونه‌های کنترل ۹/۳۷ ±۷۹/۴۴ درصد بود که بعد از قرارگرفتن نمونه‌ها در معرض دارو به ۵/۹۶ ± ۸۵/۷۶٪ (P< ۰/۰۱) افزایش یافت. میانگین ± انحراف معیار قابلیت حیات اسپرم در نمونه‌های کنترل ۸/۳± ۸۷/۷ درصد برآورد گردید که بعد از قرارگرفتن در معرض دارو به ۹ ±۸۳/۵ درصد (P<۰/۰۱) کاهش معنی‌دار پیدا کرد (جدول ۱)

*جدول ۱: میانگین±انحراف معیار تحرک و قابلیت حیات اسپرم انسان در گروه کنترل و تیمار با داروی پنتوکسی فیلین با غلظت ۳/۶ میلی مول بر لیتر. *میزان تحرک اسپرم در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری افزایش پیدا کرده است .#میزان قابلیت حیات اسپرم در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری افزایش پیدا کرده است.*

پارامتر اسپرمی	گروه: تیمار شده به وسیله PTX	گروه: کنترل	P- value
قابلیت تحرک	۸۵/۷۶± ۵/۹۶*	۷۹/۴۴ ±۹/۳۷	P<۰/۰۱
قابلیت حیات	۸۳/۵±۹#	۸۷/۷ ±۸/۳	P<۰/۰۱

تاثیر داروی پنتوکسی‌فیلین بر ساختار DNA اسپرم

میانگین± انحراف معیار میزان قطعه قطعه شدن DNA اسپرم در نمونه‌های کنترل ۸/۷۴ ± ۱۸/۵ بود و تیمار با داروی پنتوکسی‌فیلین سبب افزایش این میزان به ۱۰/۲۵ ± ۲۳/۳۶ گردید. این میزان افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۰۱) (جدول ۲)

جدول ۲: میانگین±انحراف معیار شکستگی DNA اسپرم انسان در گروه کنترل و گروه تیمار با داروی پنتوکسی فیلین با غلظت ۳/۶ میلی مول بر لیتر. توسط تست SCD (Sperm Chromatin Dispersion). ★DNA Fragmentation Index، # میزان قطعه قطعه شدن DNA در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری افزایش پیدا کرده است.

متغیر	گروه: تیمار شده به وسیله PTX	گروه: کنترل	P value
★DFI	۲۳/۳۶ ± ۱۰/۲۵#	۱۸/۵ ±۸/۷۴	p<۰/۰۰۰۱

بحث

داروی پنتوکسی‌فیلین یک داروی همولوژیک بوده و ویسکوزیته خون را تحت تاثیر قرار می‌دهد. این دارو به‌عنوان مهار کننده آنزیم فسفودی استراز عمل کرده که خود باعث افزایش سطح AMP داخل سلولی می‌شود .این افزایش متعاقبا باعث ازدیاد گلیکولیز سلولی و تولید انرژی ATP خواهد شد. بنابراین، سبب افزایش سطح تولید منبع انرژی ATP و افزایش تحرک اسپرم نیز می‌گردد (۷-۱۱). درسال ۱۹۸۷ مطالعه‌ای در خصوص میزان ATP و ارتباط آن باتحرک اسپرم انسانی توسط Megory انجام گرفت. او و همکارانش تحرک پیش رونده را وابسته به سطح ATP دانستند (۲۴). همچنین، پنتوکسی‌فیلین، ظرفیت اسپرم را در واکنش آکروزومی و پاسخ به کلسیم و مایع فولیکولار انسان را افزایش می‌دهد (۷، ۹-۱۱ و ۲۵). اثر پنتوکسی‌فیلین در سیکل‌های درمانی IVF و بیمارانی که عامل مرد در ناباروری موثر است روشن نیست (۷، ۹ و ۱۱). در مطالعه‌ای که Tourney و همکارانش داشتند نشان دادند که استفاده از پنتوکسی‌فیلین در بیمارانی که قبلا در IVF شکست خورده‌اند اثری بر روی بهبود نتایج IVF و تقسیمات جنین ندارد (۲۶). از آنجاکه تعیین سالم وزنده بودن اسپرم یک شرط اولیه در تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم است و اسپرم استخراج شده از ناحیه‌ی بیضه معمولا فاقد تحرک است. پنتوکسی‌فیلین می‌تواند میزان حیاتی اسپرم را نیز تعیین نماید (۱۴). به‌هر حال هنوز عمل‌کرد دقیق پنتوکسی‌فیلین بر روی اسپرم و لقاح تخمک و همچنین جنین چند سلولی جای تحقیق دارد.

در مطالعه حاضر، داروی پنتوکسی فیلین به میزان ۳/۶ میلی‌مول و به‌مدت ۴۵ دقیقه در نمونه‌های آستنواسپرمی استفاده شد. در مطالعات مشابه که توسط Kaskar و همکاران در سال ۱۹۹۴ انجام شده بود محققین بر این عقیده بودند که مقدار استاندارد داروی پنتوکسی فیلین جهت افزایش تحرک اسپرم بدون ایجاد اثر سوء ناشی از سمیت آن ۳/۶ میلی‌مول می‌باشد و باید بعد از زمان تقریبی یک ساعت با شستشوی مجدد از محیط نمونه خارج نمود (۲۷). نتایج بررسی حاضر نشان دهنده تاثیر مثبت پنتوکسی‌فیلین بر تحرک اسپرم افراد آستنواسپرم بود. هرچند تماس با دارو بر حیات اسپرم اثر منفی داشت و میزان زنده بودن اسپرم‌ها را کاهش داد. این نتایج با نتایج Yovich و همکاران (۷) همخوانی دارد. این محققین ابراز داشتند که پنتوکسی فیلین درافزایش تحرک اسپرمی در نمونه‌های آستنواسپرمی و همچنین الیگواسپرمی بسیار موفق می‌باشد گرچه نقشی را در افزایش تعداد اسپرم متحرک ایفا نخواهد کرد. در مطالعات گذشته خلیلی و همکاران (۱۴، ۲۸ و ۲۹) نشان دادند که افزودن پنتوکسی‌فیلین به نمونه‌ی اسپرم منجر به افزایش تحرک اسپرم‌ها می شود. در مطالعات خلیلی و همکاران تاثیر داروی پنتوکسی‌فیلین روی تحرک و مورفولوژی اسپرم‌های به‌دست آمده از چهار طریق متداول انزال، ناحیه‌ی اپی‌دیدیم، ناحیه‌ی بیضه و بالاخره انزال- انجماد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که پنتوکسی‌فیلین در افزایش حرکت اسپرم در هر چهار گروه مورد بررسی موثر بوده است. گرچه روی دو نمونه انزالی و انجماد موثرتر واقع شده بود (۲۸). علاوه بر این،

پنتوکسی‌فیلین اثر سو روی مورفولوژی اسپرم ایجاد ننموده بود (۲۹). نتایج ما در این مطالعه با نتایج تحقیق مذکور مشابهت داشت.

اندازه‌گیری قابلیت حیات اسپرم نیز مهم است، زیرا باعث جداسازی نمونه‌های اسپرمی مرده از نمونه‌های اسپرم زنده ولی بدون تحرک می‌شود. طبق اطلاعات موجود، قابلیت حیاتی اسپرم با میزان باروری ارتباط دارد (۳۰ و ۳۱). قابلیت حیاتی اسپرم توسط ساختمان غشا اسپرم و عمل‌کرد آن تعیین می‌شود. بنابراین کل ساختمان غشایی به‌وسیله آزمایش قابلیت حیات اسپرم ارزیابی می‌شود (۳۲-۳۴). در مطالعات قبلی نشان داده شده که استفاده از پنتوکسی فیلین در دو گروه افراد با پارامترهای اسپرم طبیعی و افراد نابارور منجر به آسیب به تمامیت غشای سلول اسپرم نمی‌شود. Burger و همکاران (۳۵) از پنتوکسی فیلین با غلظت ۳ میلی‌مول استفاده کرده و تمامیت غشای سلول اسپرم را با استفاده از آزمون Hypo-osmotic swelling تحت بررسی انجام دادند. آن‌ها دریافتند که قابلیت حیات بین دو گروه دارو و کنترل تفاوت معنی‌داری ندارد. اگرچه در این مطالعه در گروه دارو قابلیت حیات کاهش یافته بود درحالی‌که غلظت داروی استفاده شده و روش بررسی قابلیت حیات نیز در ۲ مطالعه متفاوت بود به اضافه اینکه روش آماده‌سازی اسپرم نیز در مطالعه ما Direct swim up و در مطالعه Burger و همکاران روش شیب غلظت (Density gradient centrifugation) بود. یکی دیگر از نتایج به‌دست آمده در مطالعه ما، تاثیر سو داروی پنتوکسی‌فیلین بر DNA اسپرم انسانی بود. نتایج نشان داد که تماس با دارو سبب قطعه قطعه شدن DNA می‌گردد. شواهد و مدارک کلینیکی نشان می‌دهند که آسیب‌های DNA اسپرم و قطعه قطعه شدن آن می‌تواند برروی پارامترهای اسپرم و همچنین میزان لقاح و حاملگی تاثیر منفی داشته باشد (۱۵، ۱۶، ۳۶ و ۳۷). DNA اسپرم به گونه‌ای سازمان‌دهی شده است که کروماتین هسته به حالت متراکم وپایدار نگه داشته می‌شود (۱۸-۲۰). این سازمان‌دهی DNA نه تنها اجازه می‌دهد که اطلاعات ژنتیکی به‌صورت متراکم به زیگوت منتقل می‌شود؛ بلکه از طرف دیگر تضمین می‌کند که DNA از لحاظ فیزیکی وشیمیایی به گونه‌ای انتقال یابد که جنین بتواند به‌راحتی به اطلاعات DNA دسترسی داشته باشد (۱۹). اسپرم‌های بارور دارای DNA پایدار هستند که قادر است در زمان مناسب طی فرآیند لقاح از حالت متراکم خارج شده و DNA بدون نقصی را به جنین انتقال دهد (۱۸-۲۰). نقص در ساختار کروماتین اسپرم معمولا با محتوای غیرطبیعی پروتئین‌های هسته‌ای و یا شکست رشته‌ی DNA همراه است. این محتوای غیر طبیعی پروتئین‌های هسته‌ای با استفاده از تکنیک‌های متفاوتی مانند SCD ارزیابی می‌گردد (۲۳، ۳۸). قطعه قطعه شدن DNAعلامت بیولوژیک خاص آپوپتوزیس می‌باشد، یک اتفاق تغییر ناپذیر که هنگام مرگ سلولی، قبل از تغییرات غشایی رخ می‌دهد. قطعه قطعه شدن DNA با واسطه فعالیت اندونوکلئازهای درون سلولی وابسته به کلسیم و منیزیم اتفاق می‌افتد. این آنزیم‌ها، DNA را در مناطقی که بین نوکلئوزوم‌ها قرار گرفته است می‌شکافند و قطعات یکسان DNA ایجاد می‌کنند. استفاده از تست SCD در ارزیابی قطعه قطعه شدن DNAهسته ها بسیار موثر می‌باشد (۳۸). از طرف دیگر، تجربیات به‌دست آمده از روش‌های کمک باروری نشان می‌دهد که چنانچه اسپرم با میزان بالایی از آسیب DNA در روند IVF و ICSI(Intracytoplasmic sperm injection) وارد تخمک شود، سیستم ترمیمی تخمک ممکن است توانایی ترمیم این آسیب‌ها را نداشته و در بسیاری از موارد با وجود موفقیت در لقاح سلول‌های جنسی، توانایی تشکیل جنین یا ادامه تکامل تا مرحله بعد از ۴ تا ۸ سلولی که مصادف با فعال شدن ژنوم است وجود نخواهد داشت (۱۵-۱۷, ۳۶). با توجه به مکانیسم متراکم شدن بیشتر DNA در اسپرم نسبت به سلول های سوماتیک، با استفاده از آزمون می‌توان درجات متفاوتی از قطعه قطعه شدن DNA را با استفاده از بافر لیز کننده - که منجر به شکسته شده باندهای دی سولفید و خارج شدن پروتئین‌ها می شود، ارزیابی کرد. در این‌حالت لوپ‌های DNA خارج شده و هاله‌ای اطراف ساختار مرکزی هسته تشکیل می‌شود. پس از تیمار با اسید، اسپرمی که داریDNA قطعه قطعه شده است، پراکندگی لوپ‌های DNA بدام افتاده و بیانگر محدود شدن هاله‌ها یا عدم وجود آن‌هاست (۲۳, ۳۸). که متفاوت از اسپرم‌هایی است که فاقد قطعه قطعه شدن DNA است. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه مشابهی در این زمینه انجام نشده است و این مطالعه یکی از اولین مطالعاتی است که تاثیر پنتوکسی فیلین را روی DNA اسپرم نشان می‌دهد، مطالعات بیشتری روی این دارو و تاثیر آن روی محتوای ژنتیکی سلول اسپرم پیشنهاد می‌شود تا مکانیسم مولکولی آسیب احتمالی که پنتوکسی فیلین در این زمینه ایجاد می‌کند را مشخص نماید.

نتیجه گیری

پنتوکسی‌فیلین، با غلظت ۳/۶ میکرومول بعد از گذشت زمان ۴۵ دقیقه می‌تواند تاثیر سو بر DNA اسپرم بگذارد. همچنین پنتوکسی‌فیلین باعث کاهش قدرت حیات اسپرم می‌شود. لذا، پیشنهاد می‌شود در زمان استفاده از این دارو در کلینیک احتیاط بیشتری لحاظ گردد. بنابراین استفاده از این دارو به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

تشکر و قدردانی

از مدیریت پژوهشکده علوم تولید مثل یزد به خاطر حمایتشان و راهنمایی‌های سرکار خانم ساره عاشورزاده و اعظم آقارحیمی و حبیبه قیصری در انجام این پژوهش تشکر و قدرانی می‌شود.

منابع

1. Brugh VM, Lipshultz LI. Male factor infertility: evaluation and management. Med Clin North Am. 2004; 88(2): 367-85.

2. Brugh VM, Matschke HM, Lipshultz LI. Male factor infertility. Endocrinol Metab Clin North Am. 2003; 32(3): 689.

3. Hirsh A. Male subfertility. BMJ. 2003; 327(7416): 669-72.

4. Kaneko S, Oshio S, Kobanawa K, Kobayashi T, et al. Purification of human sperm by a discontinuous Percoll density gradient with an innercolumn. Biol Reprod. 1986; 35(4): 1059-63.

5. Tournaye H. Male factor infertility and ART. Asian J Androl. 2012; 14(1): 103-8.

6. Palermo G, Joris H, Derde MP, Camus M, et al. Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 1993; 59(4): 826-35.

7. Yovich JM, Edirisinghe WR, Cummins JM, Yovich JL. Influence of pentoxifylline in severe male factor infertility. Fertil Steril. 1990; 53(4): 715-22.

8. Rizk B, Fountain S, Avery S, Palmer C, et al. Successful use of pentoxifylline in male-factor infertility and previous failure of in vitro fertilization: a prospective randomized study. J Assist Reprod Genet. 1995; 12(10): 710-4.

9. Fountain S, Rizk B, Avery S, Palmer C, et al. An evaluation of the effect of pentoxifylline on sperm function and treatment outcome of male-factor infertility: a preliminary study. J Assist Reprod Genet. 1995; 12(10): 704-9.

10. Faka B, Api M, Ficicioglu C, Gurbuz A, et al. Pentoxifylline in male-factor infertility: its therapeutic efficacy after oral administration. Acta Eur Fertil. 1994; 25(6):351-3.

11. Tournaye H, Van Steirteghem AC, Devroey P. Pentoxifylline in idiopathic male-factor infertility: a review of its therapeutic efficacy after oral administration. Hum Reprod. 1994; 9(6): 996-1000.

12. Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. Drugs. 1987; 34(1): 50-97.

13. Terriou P, Hans E, Giorgetti C, Spach JL, et al. Pentoxifylline initiates motility in spontaneously immotile epididymal and testicular spermatozoa and allows normal fertilization, pregnancy, and birth after intracytoplasmic sperm injection. J Assist Reprod Genet. 2000; 17(4): 194-9.

14. Khalili MA, Mir-Rokni F, Kalantar SM. Application of vitality tests on asthenozoospermic samples from infertile men. Iran Biomed. 1999; 3: 77-81.

15. Sharbatoghli M, Valojerdi MR, Amanlou M, Khosravi F, et al. Relationship of sperm DNA fragmentation, apoptosis and dysfunction of mitochondrial membrane potential with semen parameters and ART outcome after intracytoplasmic sperm injection. Arch Gynecol Obstet. 2012; 286(5): 1315-22.

16. Guerin P, Matillon C, Bleau G, Levy R, et al. Impact of sperm DNA fragmentation on ART outcome. Gynecol Obstet Fertil. La fragmentation de l'ADN du spermatozoide: impact en Assistance medicale a la procreation. 2005; 33(9): 665-8.

17. Boyer P, Boyer-Gervoise M. Are IVF results predictable through the analysis of sperm DNA fragmentation?. Gynecol Obstet Fertil. L'analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique permet-elle de predire le resultat de la FIV ? L'estude de la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoides n'a pas d'interet. 2003; 31(12): 1060-3.

18. Schlicker M, Schnulle V, Schneppel L, Vorob'ev VI, et al. Disturbances of nuclear condensation in human spermatozoa: search for mutations in the genes for protamine 1, protamine 2 and transition protein 1. Hum Reprod. 1994; 9(12): 2313-7.

19. Roque A, Ponte I, Suau P. Secondary structure of protamine in sperm nuclei: an infrared spectroscopy study. BMC Struct Biol. 2011; 11:14.

20. Chapman JC, Michael SD. Proposed mechanism for sperm chromatin condensation/decondensation in the male rat. Reprod Biol Endocrinol. 2003; 1:20.

21. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Gil-Salom M, et al. Sperm DNA fragmentation levels in testicular sperm samples from azoospermic males as assessed by the sperm chromatin dispersion (SCD) test. Fertil Steril. 2009; 92(5): 1638-45.

22. W.H.O. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5 eds: Cambridge University Press; 2010.

23. Nabi A, Khalili M, Halvaei I, Roodbari F. Prolonged incubation of processed human spermatozoa will increase DNA fragmentation . Andrologia. 2014; 46(4); 374–379

24. Megory E, Shoham Z, Madgar I, Lunenfeld B, et al. ATP content in human semen and sperm quality. Arch Androl. 1987; 19(3): 243-7.

25. DasGupta S, O'Toole C, Mills CL, Fraser LR. Effect of pentoxifylline and progesterone on human sperm capacitation and acrosomal exocytosis. Hum Reprod. 1994; 9(11): 2103-9.

26. Tournaye H, Van der Linden M, Van den Abbeel E, Devroey P, et al. The effect of pentoxifylline on mouse in-vitro fertilization and early embryonic development. Hum Reprod. 1994; 9(10): 1903-8.

27. Kaskar K, Franken DR, van der Horst G, Kruger TF. The effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics and zona pellucida binding potential of teratozoospermic men. Hum Reprod. 1994; 9(3): 477-81.

28. Khalili M, Vahidi S, Fallah-Zadeh H. The effect of pentoxifylline on motility of spermatozoa from asthenozoospermic samples: fresh ejaculates, cryopreserved ejaculates, epididymal, and testicular. MIDDLE EAST FERTILITY SOCIETY JOURNAL. 2001; 6: 144-51.

29. Khalili MA, Vahidi S. The effect of pentoxifytline on motility and morphology of spermatozoa from epididymal and testicular samples of infertile men. J Reprod Infertil. 2000; 1(3): 64.

30. Jarow JP. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. J Urol. 2002; 168(5): 2309.

31. Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. Nature 413 (6856): 603-9.

32. Huszar G, Willetts M, Corrales M. Hyaluronic acid (Sperm Select) improves retention of sperm motility and velocity in normospermic and oligospermic specimens. Fertil Steril. 1990; 54(6): 1127-34.

33. Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, et al. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. J Androl. 2000; 21(6): 895-90.

34. Vetter CM, Miller JE, Crawford LM, Armstrong MJ, et al. Comparison of motility and membrane integrity to assess rat sperm viability. Reprod Toxicol. 1998; 12(2): 105-14.

35. Burger M, Sikka SC, Bivalacqua TJ, Lamb DJ, et al. The effect of sildenafil on human sperm motion and function from normal and infertile men. Int J Impot Res. 2000; 12(4): 229–34.

36. Esbert M, Pacheco A, Vidal F, Florensa M, et al. Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. Reprod Biomed Online. 2011; 23(6): 704-10.

37. Evenson DP, Wixon R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. Theriogenology. 2006; 65(5): 979-9.

38. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, et al. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. Journal of Andrology. 2003; 24(1): 59-66.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Autumn 2014; 5(3): 281-287

Original Article

The Effect of pentoxifylline on human sperm parameters and DNA integrity– An in-vitro study

Ghasemi Esmail-Abad S, M.Sc.[1], Khalili MA, Ph.D.[1*], Nabi A, Ph.D. Candidate[1], Halvaei I, Ph.D. Candidate [1], Ashtari P, Ph.D.[2], Pourmasumi S, Ph.D. Candidate[1]

1. Research and Clinical Center for Infertility, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
2. Agricultural, Medical and Industrial Research School, Karaj, Iran

* Email corresponding author: khalili59@hotmail.com

Received: 21 Oct. 2013 Accepted: 15 Apr. 2014

Abstract

Aim: Pentoxifylline (PTX) is a methylxanthine derivative medicine used to improve motility of human spermatozoa in-vitro. It is commonly used in treatment of male-factor infertility, including asthenozoospermia. This study aimed to evaluate the effect of PTX on human sperm parameters and DNA integrity from asthenozoospermic problem.

Material and methods: A total of 38 infertile men with asthenozoospermia were allocated in this experimental study. Specimens were randomly divided into experimental group treated with 3.6 mM PTX, and control group. All samples were incubated at 37˚ C for 45 min. Semen parameters and sperm DNA fragmentation were measured using sperm chromatin dispersion (SCD) test.

Results: PTX improved sperm motility, significantly, compared to the control (85.76±5.96 Vs 79.44±9.37, respectively, P<.01). There was also a significant decrease in sperm viability in the PTX-treated group in comparison to controls (87.7±8.3 Vs 83.5±9, respectively, P<.01). In addition, sperm DNA fragmentation was higher in PTX-treated group compared to control (23.36±10.25 and 18.5±8.74, respectively, P<.0001).

Conclusion: PTX might have some negative impact(s) on sperm DNA quality, although it has improved the sperm motility. Further studies are needed to elucidate the safety of PTX treatments in ART clinics.

Keywords: Pentoxifylline, Human Sperm, Motility, Viability, DNA Fragmentation