تاثیر اسید استیل‌سالیسیلیک بر تفرق کروماتین اسپرم، تستوسترون و LH در موش بالغ

فرزانه محمودی(MSc)[1]- *دکتر فهیمه محمد قاسمی(PhD)[2]- فریده حسینی(MSc)[2]- دکتر زهرا عطرکار روشن(PhD)[3]

*نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

پست الکترونیک: parsahistolab@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله:۹۳/۰۷/۰۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۲۱

چکیده

مقدمه: استیل سالسیلیک اسید (ASA) داروی غیراستروئیدی ضدالتهابی است که باعث اختلال تولید مثل در مردان و حیوانات نر می‌شود.

هدف: ارزیابی تاثیر استیل‌سالیسیلیک‌اسید بر تفرق کروماتین اسپرم، تستوسترون و LH در موش بالغ

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۴۹ سر موش‌نر بالغ به‌طور مساوی به ۷ گروه تقسیم شدند. گروه ۱ (کنترل) هیچ داروئی دریافت نمی‌کرد. گروه ۲(شم) حلال دریافت میکرد. گروه‌های ۳،۴،۵،۶و۷ به ترتیب روزانه دوزهای ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱و ۵ میلی‌گرمASA دریافت می‌کردند. به همه حیوانات ۱۴ روز به‌صورت خوراکی دارو تجویز شد. در روز ۱۵ اپی‌دیدیم برداشته شد و ارزیابی به روش رادیو ایمونو اسی (RIA)، برای اندازه‌گیری سطوح سرمی تستوسترون، LH و تست SCD برای فراگمانتاسیون DNA اسپرم انجام شد. داده‌ها به روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه، توکی یا ضریب همبستگی آنالیز شد. P< ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد.

نتایج: میزان LH سرم در هیچ یک از گروه‌ها تغییر نکرد هر چند که در گروه‌های ۶،۵و۷ میزان تستوسترون به‌صورت معنی‌دار کاهش داشت(P< ۰/۰۵). ASA در گروه‌های ۶،۵و۷ هالو اسپرم‌های بزرگ را کاهش داد. فراگمانتاسیون DNA به‌صورت معنی‌دار تنها در گروه ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم افزایش یافت. رابطه آماری بین سطوحLH و نتایج تستSCD بدست نیامد. بین اسپرم‌های فراگمانته و تستوسترون رابطه منفی وجود داشت (r=-۰/۳۴۷و P<۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: ASA تأثیر سوء بر DNA اسپرم داشت بویژه در گروه آخر در دوزهای بالاتر ASA رابطه معنی‌دار بین تستوسترون و فراگمانتاسیون DNA اسپرم بوجود آمد که این اثر ممکن است ناشی از تغییر تستوسترون باشد.

کلید واژه‌ها: استیل سالیسیلیک اسید/ دی ای ان فراگمانتاسیون/ کروماتین/ هورمون‌های جنسی

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیست و چهارم شماره ۹۳، صفحات: ۸-۱

مقدمه

نازائی یکی از بزرگ‌ترین دشواری‌ها در جوامع گوناکون است. نازائی ناشی از عامل مردانه، خود عامل ۲۰ درصد نازائی‌هاست و کم و بیش در نیمی از زوج‌های نازا، عامل مردانه دیده می‌شود. جالب آن است که ۱۵ درصد بیماران با عامل نازائی مردانه، اسپرموگرام طبیعی در متغیرهای اسپرم دارند مانند تعداد اسپرم، حجم منی، مورفولوژی، حرکت و PH منی(۱).

امروزه از روش‌های کمک باروری در درمان ناباروری استفاده می‌شود. بدیهی است که میزان موفقیت این روش‌ها وابسته به سلامت و بلوغ گامت‌های زوج‌هاست. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که انتخاب اسپرم با متغیرهای معمولی: تعداد، مورفولوژی و تحرک نمی‌تواند گویای سلامت DNA اسپرم باشد(۲). همچنین، مطالعات کمک باروری IVF (In vitro fertilization) و تزریق اسپرم به داخل سیتوپلاسم اووسیت تخمک ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) نشان داده‌است که در صورت آسیب DNA اسپرم باروری صورت می‌گیرد ولی لانه‌گزینی درست رخ نمی‌دهد. افزون‌بر آن نشان داده شده چنان که اسپرم با میزان آسیب بالای DNA وارد تخمک شود ممکن است سیستم ترمیم‌کننده تخمک آنقدر توانائی نداشت باشد که این آسیب‌ها را ترمیم کند و در نتیجه به‌رغم لقاح موفق، سلول‌ها توان تشکیل جنین پس از گام ٤ تا ٨ سلولی را ندارند که همزمان با پویا شدن ژنوم است (۳).

هر چند که ژنوم آسیب‌دیده پدری در طی تکامل و رشد جنین می‌تواند متحمل تغییر پردازشی شود ولی در صورت آسیب زیاد در ژنوم پدر، احتمال آسیب‌های جنینی وجود دارد و

۱. مرکز تحقیقات دانشجوئی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۲. گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۳. گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

حتی در مواردی می‌تواند با آسیب پس از تولد در جنین همراه باشد. هر چند که در این مورد در مطالعات کمک باروری ISCI اطلاعات ناسازگار وجود دارد(۲).

آسیب DNA در اسپرماتوزوآی بالغ می‌تواند ناشی از آسیب در بسته‌بندی کروماتین اسپرم باشد که خود ناشی از عواملی چون: آپوپتوز ناکامل اسپرماتوزوآ پیش از انزال و افزایش ROS و اختلال در آزادسازی اسپرم باشد که خود باعث آزادسازی اسپرم نابالغ می‌شود. همچنین، مواردی چون: داروها، مواد شیمیائی، سیگار، عوامل هورمونی، واریکوسل و افزایش حرارت نیز می‌تواند باعث اختلال در DNA اسپرم و فراگمانتاسیون در آن شود(۱و۲).

ASA، داروی ضدالتهاب غیراستروئیدی(NSAID)، بیش از صد سال است که از آن به‌عنوان داروی مسکن و ضدتب استفاده می‌شود و به‌طور گسترده نیز در درمان دردهای خفیف بویژه در نواحی اسکلتی، التهاب، بیماری‌های روماتوئید، استئوآرتریت، لوپوس اریتماتوز، کنترل آسیب‌های بافت نرم و التهاب تاندون و بورسا کاربرد دارد(٤). چندین اثر این دارو، از جمله مهار تکثیر سلول‌های ماهیچه صاف، تکثیر/ رگ‌زایی اندوتلیال و بیان سیتوکین‌های پیش التهابی شرح داده شده‌اند (٥و٦). ASA به صورت پروفیلاکسی در بدخیمی‌های دستگاه گوارش بویژه کولورکتال، پروستات (٤و٧) و همچنین از زمان کشف آن با ویژگی ضدتجمع پلاکت و مهار سیکلواکسیژناز به صورت اولیه و ثانویه در پیشگیری از وقایع قلبی- عروقی در سطوح وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد(۲،٤و۷).

ASA و سایر داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی بازدارنده قوی سیکلواکسیژناز هستند. مهار این آنزیم مانع بیوسنتز پروستاگلاندین(PG) می‌شود (۱و۸). پروستاگلاندین در بلوغ جنسی، بروز رفتارهای مردانه، فعالیت استروئیدوژنز سلول‌های لیدیگ، تولید تستوسترون و در نهایت تولید مثل مردان نقش تنظیم‌کننده دارد (۹و۱۰). مجاری تناسلی مردانه مانند سلول‌های پوششی اپیدیدیم، دفران و کیسه منی مقادیر زیادی آنزیم کاتالیزکننده PG دارند(۷،۹و۱۱). گزارش شد که این آنزیم در سلول‌های لیدیگ و سلول‌های زایای بیضه موش و انسان بیان می‌شود(٤). PG می‌تواند بر تحرک اسپرم (۱۱و۱۲)، آزادسازی آن به داخل مجرای لوله اسپرم ساز، تحریک انقباض مجرای اسپرم‌ساز از راه تاثیر بر سلول‌های میوئید اطراف لوله(۱۳)، ظرفیت‌گیری و واکنش آکروزومی موثر باشد(۱۱).

تولید استروئیدها در سلول‌های لیدیگ با مقدار LH تنظیم می‌شود(۱٤و۱٥) و گزارش شده که ASA می‌تواند گیرنده‌های LH بر روی این سلول‌ها را بلوک کند(۱٦) و از این طریق سبب مهار کارکرد سلول‌های لیدیگ شود که نقش اساسی در تولید تستوسترون دارند. تستوسترون هورمون مهمی در فرآیند اسپرماتوژنز است(۱۷). در مطالعه‌ای بر گوسفندان، مصرف همزمان ASA و متی مازول (ضدالتهاب غیراستروئیدی) سبب کاهش چشمگیر غلظت اسپرم و میزان حرکت آنها شد. این عوارض می‌تواند ناشی از مهار تولید تستوسترون از سلول‌های لیدیگ مربوط به مهار هورمون LH بدلیل مصرف ASA و متی مازول باشد(۱۸). افزون بر آن در رت‌ها نیز مصرف ASA به مدت ۳۰ روز سبب کاهش حرکت اسپرم می‌شود(۱۹). این آثار سبب کاهش میزان باروری خواهد شد. از سوی دیگر در مطالعه‌ای دیگر مصرف ASA ٥۰mg/kg به مدت ۲ هفته در رت بالغ با افزایش میزان LH و FSH همراه بود(۲۰). مصرف ASA با دوز بیش از ۸۰ mg/kg/day در انسان با ایجاد عوارض ناشی از سمیت دارویی همراه است(۷)، تجویز ASA ۱٥۰mg/kg در گوسفندان به‌مدت ٤ روز منجر به کاهش تعداد اسپرم و حجم مایع منی می‌شود(۲۱) و دوز ۸۰۰ µg/day در موش به‌مدت ۷ روز سبب ویرانی آثار مربوط به متابولیسم بیضه، دم اپی‌دیدیم، سمینال وزیکول و وازودفران می‌شود و آثار آنتاگونیستی آندروژن و ضدآنابولیکی را در موش بوجود می‌آورد(۲۲و۲۳).

آزمون تفرق کروماتین اسپرم(SCD)، جستار تعدادی از مطالعاتی است که بر بیماران انسانی و جانوران اهلی انجام شده‌است و در حال حاضر به‌عنوان عامل مرتبط با باروری در جنس مرد پذیرفته شده‌است. این آزمون به عنوان یکی از روش‌های ارزیابی میزان کیفیت اسپرم استفاده می‌شود و گزارش شد که ۱۰-۲۰٪ اسپرماتوزوآی انزالی، DNA متلاشی شده دارند (۳-۱).

در مورد اثر ASA تاکنون گزارشی از ارتباط بین مصرف

ASA و آزمایش تفرق کروماتین اسپرم ارائه نشده‌است. بنابراین، در این مطالعه بر آن شدیم تا با آزمون SCD اثر این دارو را بر DNA هسته اسپرم موش بالغ ارزیابی کنیم. همچنین، ارزیابی ارتباط بین هورمون‌های جنسی تستوسترون و LH با تست تفرق کروماتین اسپرم از دیگر هدف‌های ما در این پژوهش بوده‌است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از ٤٩ عدد موش نر نژاد balb-c بالغ (سن ٨ الی ١٠هفته) به وزن ٣٠ تا ٤٠ گرم استفاده شد. موش‌ها از موسسه پاستور کرج تهیه شده‌بودند. حیوانات در ١٢ ساعت روشنایی و ١٢ساعت تاریکی قرار داده شده و دمای اتاق نگهداری ٢٣ ±٢ ^{o}c و درصد رطوبت اتاق ٧٠-٦٠٪ بود. حیوانات در تمامی گروه‌ها دسترسی کامل به غذا وآب آشامیدنی داشتند. ملاحظه اخلاقی براساس دستورکار کار با حیوانات مندرج در معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گیلان صورت گرفت.

حیوانات به‌صورت تصادفی به ٧ گروه ٧ تائی تقسیم شدند. با توجه به این‌که ASA در بیماران قلبی- عروقی به مقدار ٧٠-١٥٠mg/day به‌طور روتین تجویز می‌شود، با در نظر گرفتن دوز متوسط ١٠٠mg/day در فردی با وزن متوسط ٧٠kg و معادل‌سازی آن در موشی با وزن متوسط ٣٠g، میزان دوز مصرفی روزانه ٠/٥ mg در روز تخمین زده شد و بدنبال آن ٢ دوز بالاتر و پایین‌تر این مقدار نیز ارزیابی می‌شد. گروه‌ها به شرح زیر تقسیم‌بندی شدند.

١- گروه کنترل: بدون مصرف دارو. همراه با دسترسی آزادانه به آب و غذا

٢- گروه شم: با دریافت حلال ASA (DMSO 1%) به مدت دو هفته از طریق گاواژ

گروه‌های ٣ تا ٧ به ترتیب مصرف روزانه دوزهای ٠/٠٥، ٠/١، ٠/٥، ١ و ٥ میلی‌گرم ASA به مدت دو هفته به صورت گاواژ قرار گرفتند. استیل‌سالیسیلیک و DMSO از کمپانی (سیگما- آمریکا) خریداری شدند. میزان محلول تجویز شده در همه حیوانات یکسان و ٠/٢٥ میلی‌لیتر بود. پس از گذشت ١٤ روز از شروع آزمایش، حیوانات با استفاده از کتامین و زایلازین بیهوش شده، بدنبال آن حیوان تشریح شده و از دم اپی‌دیدیم برای تست SCD و ارزیابی فراگمانتاسیون DNA اسپرم یا به عبارتی ارزیابی کیفیت کروماتین اسپرم نمونه‌برداری استفاده می‌شد. برای ارزیابی هورمون‌های جنسی تستوسترون و لوتئینیزه کننده (LH) از ورید اجوف تحتانی ١میلی‌لیتر نمونه خون تهیه می‌شد.

مطالعه فراگمانتاسیون DNA اسپرم: برای ارزیابی فراگمانتاسیون DNA اسپرم و کیفیت کروماتین از روش آزمون تفرق DNA اسپرم یا SCD استفاده شد. در تهیه نمونه اسپرم از اسپرم‌های بخش دم اپیدیدیم استفاده شد. ابتدا دم اپی‌دیدیم به‌داخل دیش محتوی محلول هامز ١٠ انتقال و به مدت ٤٥ دقیقه در انکوباتور دمای ٣٧ درجه نگهداری می‌شد. برای خروج بیشتر اسپرم‌ها، پیش از قرار دادن دیش داخل انکوباتور، اپیدیدیم با یک تیغ بیستوری به بخش‌های کوچک‌تری بریده می‌شد. پس از گذشت زمان نامبرده یک میلی‌لیتر از محلول به داخل لوله‌های سانتریفوژ انتقال داده‌می‌شد. سپس، به مدت ١٠ دقیقه و با دور٣٠٠٠rpm سانتریفوژ انجام می‌شد. پس از آن محلول روئی دور ریخته شده و از محلول زیرین برای آزمایش استفاده می‌شد.

ابتدا ٣٠ میکرولیتر نمونه اسپرم با ٧٠ میکرولیتر آگارز با درجه ذوب پائین در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد مخلوط می‌شد. سپس، نمونه مخلوط شده بر روی لامی که از پیش با آگاروز ٦٥درصد پوشیده شده، قرارمی‌گرفت و با گذاشتن یک لامل روی آن به مدت ٤ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد درون یخچال گذاشته می‌شد. سپس، با ریزبینی لامل از سطح اسلاید جدا شده و هرلام به مدت ٧ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی و داخل اسید کلریدریک ٠/٠٨ درصد قرار داده می‌شد. پس از این مرحله اسلاید برای ٢٥ دقیقه در دمای اتاق در ظرفی حاوی محلول لیزکننده (pH:٧/٥) با محتوی: (تریزاسیدی ٠/٤ مولار، دومرکاپتواتانول ٠/٨ مولار، اس دی اس(SDS)١ درصد، اتیلن دی امید ترا استیک اسید (EDTA) ٥٠ میلی مولار، کلرید سدیم ٢ مولار) قرار می‌گرفت و پس از ٢ بار شست و شو در آب معمولی یا آب مقطر به ترتیب در اتانول ٧٠، ٩٠ و ١٠٠٪ (هر کدام به‌مدت ٢ دقیقه) آبگیری شده و در هوای آزاد خشک می‌شد. نمونه‌ها به روش PBS-Wright به

نسبت ۱:۱ به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی می‌شد. سپس، لام‌ها با میکروسکوپ نوری بررسی و در هر نمونه ۲۰۰ سلول ارزیابی و میزان شکست یا فراگمانتاسیون DNA هسته اسپرم بر اساس اندازه هالو ارزیابی می‌شد. هر چه سلول سالم‌تر هالوی بزرگ‌تر دارد. به این صورت سلول‌ها به سه نوع: هالوی بزرگ، هالوی کوچک و بدون هالو یا شکسته شده(فراگمانته) تقسیم می‌شدند. در هر حیوان ۲۰۰ سلول مطالعه می‌شد. ایندکس فراگمانتاسیون از رابطه تعداد سلول فراگمانته بر تعداد کل سلول‌های سالم و فراگمانته محاسبه و جواب کلی در عدد ۱۰۰ ضرب و به‌صورت درصد بیان می‌شد.

ارزیابی هورمون‌های جنسی: پس از جمع‌آوری نمونه‌خون، به مدت نیم ساعت نمونه‌ها در دمای اتاق نگهداری شده و سپس اقدام به سانتریفوژ در rpm ۳۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه شد. به‌دنبال جدا شدن سرم از سلول‌های خونی، نمونه سرم در ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری و برای ارزیابی هورمون‌های جنسی (LH و تستوسترون) از کیت رادیوایمونومتری (Serotec) استفاده شد.

آنالیز آماری: همه داده‌های کمی ابتدا به روش ناپارامتری کولموگراف- اسمیرنوف برای نرمال بودن داده‌ها ارزیابی می‌شد. پس از آن، از روش آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. در صورت معنی‌داری یا $p<۰/۰۵$، داده‌ها به روش توکی ارزیابی و بدین ترتیب معنی‌داری بین گروه‌ها نیز مشخص شد. برای ارزیابی رابطه بین هورمون‌های جنسی و آزمون تراکم کروماتین اسپرم از آزمون ضریب همبستگی استفاده شد. در $p<۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی می‌شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از برنامه spss۱۷ استفاده شد.

نتایج

درصد هالوی بزرگ و کوچک در گروه کنترل به ترتیب ۵/۱۱±۳۹/۷۱ و ۸/۶۲±۴۶/۰۰ و اندکس فراگمانتاسیون (بدون هالو) در گروه کنترل۶/۴۷±۱۴/۲۸ بود. در گروه‌های شم ۰/۰۵، ۰/۱ میلی‌گرم درصد هالوی بزرگ در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌دار نشان نداد و این در حالی بود که درصد هالوی بزرگ در گروه‌های ۰/۵، و ۱ و ۵ میلی‌گرم در مقایسه با کنترل به‌صورت معنی‌دار کاهش داشت ($p<۰/۰۵$). همچنین، در گروه‌های۰/۰۵، ۰/۱و ۰/۵میلی‌گرم، درصد هالوی کوچک در مقایسه با کنترل تفاوت معنی‌دار نشان نداد در حالی که درصد سلول‌های با هالوی کوچک در دو گروه آخر یعنی گروه‌های ۱و ۵ میلی‌گرم در مقایسه با کنترل افزایش معنی‌دار نشان داد($p<۰/۰۵$). اندکس فراگمانتاسیون تنها در گروه ۵میلی‌گرم در مقایسه با کنترل افزایش معنی‌دار داشت۶/۴۷±۱۴/۲۸ در برابر ۷/۰۹±۲۴/۰۰ و در سایر گروه‌ها در مقایسه با کنترل تفاوت معنی‌دار نشان نداد(جدول ۱).

جدول ۱. تاثیر دوزهای مختلف استیل‌سالیسیلیک اسید بر تست تفرق کروماتین اسپرم موش بالغ

گروه‌ها	هالوی بزرگ	هالوی کوچک	بدون هالو (فراگمانته)
گروه ۱	۳۹/۷۱±۵/۱۱	۴۶/۰۰±۸/۶۲	۱۴/۲۸±۶/۴۷
گروه ۲	۳۸/۳۸±۵/۵۵	۴۵/۷۸±۵/۱۲	۱۵/۷۱±۵/۸۱
گروه ۳	۳۸/۸۵±۵/۵۵	۴۲/۰۷±۲/۴۳	۱۹/۰۷±۵/۶۰
گروه۴	۳۶/۰۰±۵/۱۸	۴۶/۵۰±۷/۴۸	۱۷/۵۰±۴/۱۳
گروه ۵	۲۷/۲۹±۴/۲۳*	۵۲/۷۱±۳/۳۴*	۲۰/۰۰±۳/۵۲
گروه ۶	۲۲/۶۴±۸/۴۹*	۵۷/۲۸±۴/۱۳*	۲۲/۲۱±۴/۸۱
گروه ۷	۱۴/۲۱±۴/۶۸*	۶۱/۷۸±۶/۶۱*	۲۴/۰۰±۷/۰۹*

کلیه داده‌ها بصورت میانگین± انحراف معیار بیان شده‌اند. * مقادیر معنی‌دار در مقایسه با کنترل را نمایش می‌دهد ($p<۰/۰۵$). گروه ۱: کنترل، گروه ۲: شم و گروه‌های ۳ الی ۷ به ترتیب تحت مصرف روزانه دوزهای۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۵ میلی‌گرم ASA به مدت دو هفته قرار گرفته‌اند.

نتایج ارزیابی هورمون‌های جنسی نشان داد که میزان سرمی LH در هیچ یک از گروه‌ها با تفاوت معنی‌دار نداشت(جدول ۲). این در حالی بود که میزان سرمی تستوسترون در گروه‌های۰/۵،۱ و ۵ در مقایسه با کنترل به‌صورت معنی‌دار کاهش داشتند ($p<۰/۰۵$). در گروه‌های شم،۰/۵۰و۰/۱ میلی‌گرم تفاوت معنی‌داری در مقایسه با کنترل در میزان

سرمی تستوسترون دیده نشد(جدول ۲).

جدول ۲. تاثیر دوزهای مختلف استیل سالیسیلیک اسید بر سطح سرمی هورمون‌های جنسی موش بالغ

گروه‌ها	تستوسترون (ng/ml)	LH (Iu/L)
گروه ۱	۳/۱۳±۰/۶۸	۰/۲۸±۰/۱۴
گروه ۲	۳/۹۰±۱/۰۴	۰/۲۵±۰/۰۶
گروه ۳	۲/۷۱±۰/۸۳	۰/۳۴±۰/۱۴
گروه۴	۲/۵۰±۰/۸۷	۰/۳۷±۰/۳۲
گروه ۵	۱/۶۱±۰/۶۷*	۰/۲۹±۰/۱۳
گروه ۶	۱/۳۹±۰/۶۴*	۰/۱۷±۰/۰۹
گروه ۷	۱/۱۶±۰/۵۴*	۰/۳۳±۰/۱۸

کلیه داده‌ها بصورت میانگین± انحراف معیار بیان شده‌اند. *مقادیر معنی‌دار در مقایسه با کنترل را نمایش می‌دهد (p<۰/۰۵). گروه ۱: کنترل، گروه۲: شم و گروه‌های ۳ الی ۷ به ترتیب تحت مصرف روزانه دوزهای۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۵ میلی‌گرم ASA به مدت دو هفته قرار گرفته‌اند.

همچنین، چکیده ارتباط بین درجه‌های گوناگون SCD و هورمون‌های جنسی تستوسترون و LH در جدول ۳ آورده شده‌است. برپایه نتایج ارتباط معنی‌داری بین LH و درجه گوناگون SCD دیده نمی‌شود. این در حالی است که بین تستوسترون و درجات مختلف SCD ارتباط وجود دارد به شیوه‌ای که با کاهش تستوسترون تعداد سلول‌های با هاله بزرگ کاهش یافته بودند به عبارت دیگر همبستگی از نوع مثبت P<۰/۰۵ و ضریب هبستگی ۰/٦۱۸ بود. هرچند که ارتباط بین تستوسترون و اسپرم‌های با هالوی کوچک یا فراگمانته از نوع منفی بود یعنی با کاهش تستوسترون، میزان هالو نیز به‌صورت معنی‌دار کاهش می‌یافت (جدول ۳).

جدول ۳. ارتباط درجات تست تفرق اسپرم(SCD) با هورمون‌های جنسی در موش‌های بالغ تحت درمان با استیل سالیسیلیک

هورمون	هالوی بزرگ		هالوی کوچک		بدون هالو (فراگمنته)	
	عدد p	ضریب همبستگی	عدد p	ضریب همبستگی	عدد p	ضریب همبستگی
LH	۰/۳	۰/۱۶۱	۰/۱۷	-۰/۲۱۲۲	۰/۹۹	۰/۰۰۱
تستوسترون	۰/۰۰۱	۰/۶۱۸*	۰/۰۰۱	-۰/۵۰۸*	۰/۲۴	-۰/۳۴۷*

* اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵)

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه ما نشان داد تجویز استیل سالیسیلیک اسید در دوزهای مختلف اثر متفاوت بر فراگمانتاسیون DNA اسپرم دارد و با افزایش دوز این اثر بیشتر می‌شود. همچنین، این مطالعه نشان داد که دوزهای بالاتر استیل سالیسیلیک اسید باعث کاهش تستوسترون سرم می‌شد در حالی‌که دوزهای پائین‌تر بی‌اثرند. افزون بر این که استیل سالیسیلیک در هیچ یک از دوزها نتوانست تغییر معنی‌داری در سطح سرمی LH در مقایسه با کنترل ایجاد کند. افزون بر این هیچ ارتباطی بین LH و درجه SCD دیده نشد. در حالی‌که با کاهش تستوسترون تعداد سلول‌های با هاله بزرگ کاهش یافتند و اسپرم‌های با هالوی کوچک یا فراگمانته افزایش یافتند. در همین مورد نشان داده‌شده که استیل سالیسیلیک اسید می‌تواند گیرنده‌های LH را بلوک کرده و از این راه سبب مهار عملکرد سلول‌های لیدیگ شود که نقش اساسی در تولید تستوسترون دارند. دید الکار و همکاران در ۱۹۷۹ به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن رت، ۵ میلی‌گرم استیل سالیسیلیک اسید به مدت ۸، ۱۵، ۲۲ و ۳۰ روز را بررسی کردند. آسپرین در گروه ۸ روزه سبب افزایش تستوسترون پلاسما و کاهش LH و FSH شد اما در مدت طولانی‌تر یعنی ۱۵ روز و بیشتر نتایج برعکس بود و اسیدفسفاتاز پروستاتیک فعال در همه گروه‌ها کاهش یافته بود. کریستنسن و همکاران در ۲۰۱۲ نشان دادند که مصرف همزمان آسپرین و پاراستامول تغییر فاحشی بر مورفولوژی لوله‌های سمی نیفر، تعداد سلول‌های لیدیگ و اندازه گونادوسیت‌های آپوپتوتیک ایجاد نکرد اما منجر به کاهش کم‌وبیش اندک در میزان تولید پروستاگلاندین و بدنبال آن کاهش ۲۰-۷۵٪ در مقدار تستوسترون شد(۲٤).

آسیب DNA در اسپرماتوزوآی بالغ می‌تواند ناشی از آسیب در بسته‌بندی کروماتین اسپرم باشد که خود ناشی از عواملی چون: آپوپتوز ناقص اسپرماتوزوآ پیش از انزال و افزایش ROS و اختلال در اسپرمیوژنز می‌شود که خود باعث آزادسازی اسپرم نابالغ خواهد شد. همچنین، موارد مجیطی

چون: داروها، مواد شیمیائی، سیگار، عوامل هورمونی، واریکوسل و افزایش دما نیز می‌تواند باعث اختلال در DNA اسپرم و فرا گمانتاسیون در آن شود(۱و۲).

شاید بتوان مکانیسم احتمالی افزایش فراگمانتاسیون DNA اسپرم را در این مطالعه ناشی از کاهش تستوسترون دانست که یافته‌های مطالعه ما آن را تائید کرد. از مکانیسم‌های دیگر شاید افزایش ROS یا آپوپتوز در بافت بیضه در گروه آخر باشد که در این رابطه نشان داده شده با افزایش ROS، فراگمانتاسیون DNA اسپرم افزایش می‌یابد. به طور مشابه نشان داده شد که مصرف ASA در بافت کبد و طحال می‌تواند منجر به افزایش تولید ROS و آپوپتوز شود(۲۵). همچنین، اسپام پاتی و همکاران در سال ۲۰۱٤ در مطالعه‌ای in vitro بر سلول‌های تومورال گاسترو انتروپانکراتیک و نوروراندوکرین برونکو پولمونار نشان دادند که آسپرین ویژگی آپوپتوتیک دارد، افزون بر این که تکثیر سلولی را کاهش می‌دهد(۲٦). ما در مطالعه خود برای ارزیابی فراگمانتاسیون DNA اسپرم از روش SCD یا هالواسپرم استفاده کردیم این روش ساده و در همان‌سان اقتصادی است و پتانسیل DNA اسپرم را به تغییر ماهیت در مقابل مواد اسیدی نشان می‌دهد (۱).

آسیب یا شکست در DNA اسپرم به پروتامین DNA ارتباط دارد (۲۷). عامل‌های اکسیداتیو باعث افزایش هیستون‌ها شده که خود باعث آسیب DNA می‌شود(۲۵). شاید در این مطالعه مصرف ASA در دوز بالا باعث افزایش تولید ROS و در نتیجه نسبت بالاتر هیستون به پروتامین اسپرم شده باشد زیرا در همین مورد گزارش شد که در نمونه اسپرم‌هایی که درصد ناهنجاری کروموزومی بیشتر دارند، نسبت هیستون به پروتامین نیز افزایش می‌یابد(۲۷). به طور کلی آنومالی‌های فلاژل پیش‌آگهی خوبی دارد. ولی آنومالی گردن و آکروزوم اسپرم، موفقیت ICSI را کاهش می‌دهد که خود نشان‌دهنده نقش اختصاصی بخش‌های گوناگون اسپرم است (۲۷). به عبارت دیگر با افزایش فراگمانتاسیون DNA اسپرم شانس موفقیت باروری کاهش می‌یابد.

به‌طور چکیده این بررسی نشان می‌دهد که تجویز دوزهای گوناگون ASA به مدت دو هفته در موش بالغ بر LH سرم بی‌تاثیر است. در حالی‌که در دوزهای بالاتر باعث کاهش تستوسترون و افزایش فراگمانتاسیون DNA اسپرم می‌شود. به عبارت دیگر مصرف آسپرین در دوزهای پائین بر DNA اسپرم بی‌تاثیر و در دوزهای بالا موثر است و چه بسا موفقیت بارداری را یتواند کاهش دهد. ارزیابی مولکولی و ژنتیکی DNA اسپرم به دنبال تجویز استیل سالیسیلیک اسید از مواردی است که برای مطالعات آینده پیشنهاد می‌شود.

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی گیلان به شماره ثبت ۱۹٦ می‌باشد.

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

1. Schulte RT, Ohl DA, Sigman M, Smith GD. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. J Assist Reprod Genet 2010; 27(1): 3-12.
2. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. Fertil Steril 2003; 79(3): 1597-605.
3. Rahimipour M, Talebi AR, Anvari M, Sarcheshmeh AA, Omidi M. Effects of different doses of ethanol on sperm parameters, chromatin structure and apoptosis in adult mice. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2013; 170(2): 423-8.
4. Qstensen M, Khamashta M, Lokshin M, Parke A, Brucato A, Carp H, et al. Anti-inflammatory and immunosuppressive drugs and reproduction. Arthritis Res Ther 2006; 8(3): 209.
5. Khaidakov M, Szwedo J, Mitra S, Ayyadevara S, Dobretsov M, Lu J, Mehta JL. Antiangiogenic and antimitotic effects of aspirin in hypoxia -reoxygenation cardiovasc. J Cardiovasc Pharmacol 2010; 56(6): 635-641.
6. Marra DE, Simoncini T, Liao JK. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by sodium salicylate mediated by upregulation of p 21(waf1) and p27(kip1). Circulation 2000; 102(17): 2124-2130.
7. Martinez ME, Greenberg ER. More aspirin for less cancer?. J Natl Cancer Inst 2007; 99(8): 582-583.
8. Campos C, de Gregorio R, Garcia-Nieto R, Gago F, Ortiz P, Alemany S. Regulation of cyclooxygenaseactivity by metamizole. Eur J Pharmacol1999; 378 (3): 339–347.
9. Balaji T, Ramanathan M, Menon VP. Localization of cyclooxygenase-2 in mice vas deferens and its effects on fertility upon suppression using nimesulide:

a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor. Toxicology 2007; 234(1-2): 135-144.
10. Gupta C, Bentlejewski CA. Role of prostaglandins in the testosterone dependent wolffian duct differentiation of the fetal mouse. Biol Reprod 1992; 47(6): 1151-1160.
11. Kennedy JH, Korn N, Thurston RJ. Prostaglandin levels in seminal plasma and sperm extracts of the domestic turkey, and the effects of cyclooxygenase inhibitors on sperm mobility. Reprod Biol Endocrinol 2003; 1: 74.
12. Gottlieb C, Svanborg K, Eneroth P, Bygdeman M. Effect of prostaglandins on human sperm function in vitro and seminal adenosine triphosphate content. Fertil Steril 1988; 49(2): 322-327.
13. Tripiciano A, Filippini A, Ballarini F, Palombi F. Contractile response of peritubular myoid cells to prostaglandin F2alpha. Mol Cell Endocrinol 1998; 138(1-2): 143-150.
14. Conte D, Romanelli F, Fillo S, Guidetti L, Isidori A, Franceschi F, Latini M, Luigi L. Aspirin inhibitsandrogen response to chorionic gonadotropin in humans. Am J Physiol 1999; 277(6 Pt 1): 1032–1037.
15. Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. Trombo Res 2003; 110(5-6): 255-258.
16. Didolkar AK, Patel PB, Roychowdhury D. Effect of aspirin on spermatogenesis in mature and immature rats. Int J Androl 1980; 3(5): 585-598.
17. Didolkar AK, Gurjar A, Joshi UM, Sheth AR, Roychowdhury D. Effect of aspirin on blood plasma levels of testosterone, LH and FSH in maturing male rats. Int J Androl 1980; 3(3): 312-318.
18. Rodriguez LA, Cea-Soriano L, Martin-Merino E, Johansson S. Discontinuation of low dose aspirin and risk ofmyocardial infarction: case-control study in UK primary care. BMJ 2011; 343: d4094.
19. Gwayi N, Bernard RT. The effects ofmelatonin on sperm motility in vitro in wistar rats. Andrologia 2002; 34(6): 391-396.
20. Asok Kumar R, Chinoy NJ. Effects of acetysalicylic acid on reproductive organs of adolescent male rats. Endocrinol Exp 1988; 22(3): 187–195.
21. Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. Biomed Pharmacother 2006; 60(3): 97-108.
22. Fujinoki M. Melatonin-enhanced peractivation of hamster sperm. Reproduction 2008; 136(5): 533-541.
23. Mehta JL, Mohandas B. Aspirin resistance: fact or fiction? A point of view. World J Cardiol 2010; 2(9): 280-288.
24. Kristensen DM, Lesne L, Le Fol V, Desdoits-Lethimonier C, Dejucq-Rainsford N, Leffers H, Jegou B. Paracetamol(acetamonophen), aspirin (acetylsalicylic acid) and indomethacin are anti-androgenic in the rat testis. Int J Andrology 2012; 35(3): 377-384.
25. Bhattacharyya S, Ghosh S, Sil PC. Amelioration of aspirin induced oxidative impairment and apoptotic cell death by a novel antioxidant protein molecule isolated from the herb Phyllanthus niruri. PLoS One 2014; 19; 9(2): e89026
26. Spampatti M, Vlotides G, Spöttl G, Maurer J, Göke B, Auernhammer CJ. Aspirin inhibits cell viability and mTOR downstream signaling in gastroenteropancreatic and bronchopulmonary neuroendocrine tumor cells. World J Gastroenterol 2014: 7; 20(29): 10038-49.
27.Akbari H, Saleh M, Heidari M, Ghaffari Novin M, Azargashb E. Evaluation of sperm parameters and chromatin abnormalities in male infertility using CASA and chromatin dispersion test. Pejouhesh 2013: 36;(4):176-183.

Effect of Acetylsalicylic Acid on Sperm Chromatin Dispersion Test, Testosterone and LH in Adult Mouse

Mahmudi F (MSc)[1]- *Mohammadghasemi F (PhD)[2]- Hosseini F (MSc) [2]- Atrkar Roshan Z (PhD)[3]

*Corresponding Address: Cellular & Molecular Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

Email: parsahistolab@gmail.com

Received: 29 Sep/2014 Accepted : 14 Jan/2015

Abstract

Introduction: Acetylsalicylic acid (ASA) is a non-steroidal anti inflammatory drug, causing reproductive failure in human males or animals.

Objective: To evaluate the effect of acetylsalicylic acid on sperm chromatin dispersion test, testosterone and LH in adult mouse

Materials and Methods: In this experimental study, 49 adult male mice were equally divided into seven groups. Group 1 (control) received no drug. Group 2 (sham) received vehicle. Groups 3,4,5,6 and 7 received 0.05, 0.1, 0.5, 1 and 5 mg ASA, on daily basis, respectively. All animals were treated orally for 14 days. On day 15, epididymis was removed and evaluations were made by radioimmunoassay (RIA) and SCD test for the study of serum testosterone or LH level and sperm DNA fragmentation, respectively. Data were analyzed using statistical tests of ANOVA, Tuckey or correlation test. Level of significance was set at $p<0.05$.

Results: Serum LH levels were not changed in all groups; however; in groups 5,6 testosterone levels were significantly reduced ($p<0.05$). ASA in groups 5,6 and 7 reduced large halosperms. DNA fragmentation was significantly increased just in 5mg/kg group. There was no statistical correlation between LH levels and SCD test findings. A negative correlation was found between small hallo fragmented sperms and testosterone ($p<0.02$ $r= -0.347$).

Conclusion: The results showed that ASA has deleterious effects on sperm DNA, especially in dose of 5mg/kg. There is a significant correlation between testosterone and sperm DNA fragmentation in higher doses of ASA. These effects may be due to testosterone hormone alterations.

Conflict of interest: non declared

Key words: Acetylsalicylic acid/ Chromatin /DNA Fragmentation/ Sex Hormones

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 94, Pages: 1-8

Please cite this article as: Mahmudi F, Mohammadghasemi F, Hosseini F, Atrkar Roshan Z. Effect of Acetylsalicylic Acid on Sperm Chromatin Dispersion Test, Testosterone and LH in Adult Mouse. J of Guilan University of Med Sci 2015; 24(94):1-8. [Text in Persian]

1. Student Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
2. Department of Anatomy, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, Rasht, Iran
3. Department of Social Medicine, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, Rasht, Iran

^