

Original Article

Effect of N-acetylcysteine on Human Sperm Parameters and DNA Damage in Frozen-thawed Sperm Samples of Asthenozoospermic Men

Rahil Jannatifar¹ , Hamid Piroozmanesh^{2*} , Zeinab Jannatifar³ 

¹ PhD, Department of Reproductive Biology, the Academic Center for Education, Culture and Research, Qom branch, Iran.

² MSc, Department of Reproductive Biology, the Academic Center for Education, Culture and Research, Qom branch, Iran.

³ Student Research Committee, School of Dentistry, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

***Corresponding Author:**
Hamid Piroozmanesh;
Department of Reproductive Biology, the Academic Center for Education, Culture and Research, Qom branch, Iran.

Email:
hp457@yahoo.com

Received: 29 Nov, 2020
Accepted: 06 Apr, 2021

Abstract

Background and Objectives: The semen cryopreservation is not only required for improving the success chance of assisted reproductive technologies fertility but also is performed for men undergoing chemotherapy, radiotherapy, and surgery, and facing ejaculation problems. This study aimed to investigate the effects of N-acetylcysteine on human sperm parameters and DNA damage in frozen-thawed sperm samples of patients with asthenozoospermia.

Methods: In this study, 20 patients with asthenozoospermia referring to Jihad University Infertility Treatment Center, Qom, Iran, were evaluated in three groups, namely control, freezing, and freezing + N-acetyl-cysteine (1mg/ml). Sperm parameters, viability, and DNA damage were respectively assessed using the World Health Organization guideline (2010), eosin-nigrosin staining, and sperm chromatin dispersion kit, respectively in all three groups. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Tukey post hoc test. The significance level was considered at the p-value of < 0.05.

Results: The freezing process resulted in a decrease in sperm motility parameters, and the addition of the antioxidant N-acetyl-cysteine improved sperm motility, morphology, and sperm viability. The addition of N-acetyl-cysteine could reduce DNA damage ($P < 0.05$).

Conclusion: Our results showed that N-acetyl-cysteine could reduce the disruptive effects of the freezing-thawing process.

Keywords: DNA damage; N-acetyl-cysteine; Sperm.

DOI: 10.29252/qums.14.12.32

بررسی اثر ان-استیل سیستئین بر پارامترهای اسپرم و میزان آسیب DNA در نمونه‌های اسپرم منجمد-ذوب شده افراد آستنوزواسپرمی

راحیل جنتی فر^۱ ID، حمید پیروزمینش^۲ ID*، زینب جنتی فر^۳ ID

چکیده

زمینه و هدف: امروزه انجماد مایع منی انسان نه تنها برای افزایش موفقیت روش‌های کمک باروری مورد نیاز می‌باشد؛ بلکه بانک اسپرم برای مردان در معرض شیمی درمانی، رادیوتراپی، جراحی و نقایص انزالی به طور معمول انجام می‌شود. در این راستا، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ان-استیل سیستئین بر کیفیت پارامترهای اسپرم انسان و میزان آسیب DNA (Deoxyribonucleic acid) در نمونه‌های اسپرم منجمد-ذوب شده افراد آستنوزواسپرمی صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه ۲۰ فرد آستنوزواسپرمی مراجعه‌کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم در سه گروه (کنترل)، انجماد، انجماد + ان-استیل سیستئین (۱ میلی گرم بر میلی لیتر) مورد ارزیابی قرار گرفتند. پارامترهای اسپرمی، قابلیت حیات و شکست DNA به ترتیب با استفاده از دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت (WHO: World Health Organization) سال ۲۰۱۰، رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین و استفاده از کیت SCD (Sperm Chromatin Dispersion) در هر سه گروه ارزیابی شدند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون‌های ONE Way ANOVA و تعقیبی توکی صورت گرفت. تفاوت میانگین‌ها در سطح ($P < 0.05$) معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: فرایند انجماد، کاهش پارامترهای حرکتی را به دنبال داشت و افزودن آنتی اکسیدان ان-استیل سیستئین باعث بهبود میزان تحرک، مورفولوژی و قابلیت حیات اسپرم‌ها شد. افزودن ان-استیل سیستئین به محیط فریز اسپرم می‌تواند موجب کاهش میزان آسیب DNA گردد ($P < 0.05$).
نتیجه گیری: نتایج نشان دادند که ان-استیل سیستئین می‌تواند اثرات مخرب ناشی از فرایند انجماد-ذوب را کاهش دهد.

کلیدواژه‌ها: اسپرم؛ ان-استیل سیستئین؛ آسیب DNA.

^۱ دکترای تخصصی، بخش تحقیقات، گروه پژوهشی بیولوژی تولید مثل، مرکز جهاد دانشگاهی، قم، ایران.

^۲ کارشناسی ارشد، بخش تحقیقات، گروه پژوهشی بیولوژی تولید مثل، مرکز جهاد دانشگاهی، قم، ایران.

^۳ کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات:

حمید پیروزمینش؛ بخش تحقیقات، گروه پژوهشی بیولوژی تولید مثل، مرکز جهاد دانشگاهی، قم، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:

hp457@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۱۷

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Jannatifar R, Piroozmanesh H, Jannatifar Z. Effect of N-acetylcysteine on Human Sperm Parameters and DNA Damage in Frozen-thawed Sperm Samples of Asthenozoospermic Men. Qom Univ Med Sci J 2021;14(12):32-40. [Full Text in Persian]

مقدمه

یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد موجودات زنده، توانایی تولید مثل می‌باشد؛ از این رو، باروری و داشتن فرزند در جامعه بشری از اهمیت به‌سزایی برخوردار است (۱). ناباروری یک مشکل بالینی جدی در زمینه تولید مثل می‌باشد که شیوع بالای این بیماری، اهمیت آن را دوچندان نموده و استرس زیادی را بر زوج‌های نابارور وارد می‌کند و بدین ترتیب سلامت روانی زوجین را تهدید می‌نماید (۲). نقص عملکرد اسپرم به عنوان یکی از بزرگ‌ترین عوامل دخیل در ناباروری مردان مطرح می‌باشد (۳). اختلال در تحرک اسپرم یکی از شاخص‌های عمده در ناباروری مردان است؛ به طوری که ناباروری ناشی از بی‌حرکی یا کیفیت ضعیف تحرک اسپرم، مشکل اصلی بیماران مراجعه‌کننده به مراکز درمان ناباروری می‌باشد (۴). حدود ۶۰ سال است که انجماد به عنوان یک روش نگهدارنده اسپرم برای مدت طولانی مطرح می‌باشد. با وجود تاریخچه طولانی انجماد اسپرم، میزان بقای اسپرم همچنان محدود بوده و نمی‌تواند انتظارات ایده‌آل را برآورده نماید؛ زیرا فرایند انجماد با ایجاد آسیب‌های شیمیایی و فیزیکی مانند تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS: Reactive Oxygen Species) در اسپرم موجب آسیب به غشای سلول، اختلال در تحرک اسپرم، ایجاد ناهنجاری‌های ریختی، آسیب به آکروزوم، قطعه قطعه شدن DNA و در نتیجه کاهش عملکرد اسپرم می‌شود (۵،۶). معمولاً در روش انجماد برای حفظ حیات و تحرک اسپرم و کاهش آسیب‌های وارد شده، از محیط‌های انجماد اسپرم استفاده می‌شود (۷). اخیراً محققان برای بهبود پارامترهای اسپرمی پس از انجماد و ذوب، افزودن برخی از آنتی‌اکسیدان‌ها به محیط انجماد اسپرم را در دستور کار خود قرار داده‌اند (۸). با توجه به اینکه انتخاب یک اسپرم مناسب پس از فرایند ذوب جهت استفاده در ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) (یکی از تکنیک‌های لقاح مصنوعی) می‌تواند با درصد حاملگی بالاتر و رشد جنینی بیشتر همراه باشد، دستیابی به اسپرمی با حفظ کیفیت بالا پس از فرآیند ذوب بسیار حائز اهمیت است (۹). سیستین اسید آمینه‌ای با وزن مولکولی پایین حاوی تیول می‌باشد که پیش‌ساز گلوپتاتینون داخل سلولی است (۱۰). سیستین به راحتی از غشای سلول وارد شده و باعث افزایش بیوسنتز گلوپتاتینون داخل سلولی - هم در

برون‌تنی و هم درون‌تنی - و نیز محافظت لیپیدها و پروتئین‌های غشایی به علت خواص خنثی‌کنندگی غیر مستقیم رادیکال‌های آزاد می‌شود (۱۱). مطالعات نشان می‌دهند که سنتز گلوپتاتینون در شرایط برون‌تنی ممکن است به علت کمبود سیستین در محیط کشت دچار نقص شود که این امر ناشی از ناپایداری بالای گلوپتاتینون و اکسیده شدن خود به خودی آن به سیستین می‌باشد (۱۲). سیستین اثر محافظتی در برابر یکپارچگی عملکرد آکروزوم و میتوکندری در برابر انجماد داشته و فعالیت حرکتی اسپرم پس از خروج از انجماد را بهبود می‌بخشد (۱۳). اثبات شده است که تیول‌هایی از قبیل گلوپتاتینون و سیستین، مانع از دست رفتن فعالیت حرکتی اسپرم در مایع منی گاو پس از ذوب شده و باعث بهبود قابلیت حیات، حفظ ساختار کروماتین و یکپارچگی غشای اسپرم گاو طی ذخیره مایع منی می‌شود (۱۴). با توجه به مطالب بیان شده، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر آنتی‌اکسیدان ان-استیل سیستین بر محیط استاندارد فریز اسپرم با ارزیابی پارامترهای اسپرمی، قابلیت حیات و میزان شکست DNA اسپرم در بیماران آستنوزواسپرمی انجام شد.

روش بررسی

در پژوهش حاضر ۲۰ مرد مبتلا به آستنوزواسپرمی که به منظور درمان ناباروری به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم مراجعه کرده بودند، پس از اعلام رضایت برای شرکت در مطالعه انتخاب شدند. نمونه اضافی مایع منی این بیماران پس از انجام اسپرموگرام مطابق با استانداردهای سازمان جهانی بهداشت (۲۰۱۰) و تأیید توسط پزشک متخصص ارولوژیست، جمع‌آوری گردید. نمونه به دست آمده از هریک از بیماران به سه گروه به شرح زیر تقسیم شد: گروه اول: گروه کنترل؛ گروه دوم: گروه انجماد؛ گروه سوم: گروه انجماد + ان-استیل سیستین (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. پس از اخذ شرح حال بیماران و ۳-۴ روز پرهیز از مقاربت، یک ظرف استریل و درجه‌بندی شده جهت گرفتن نمونه به بیمار داده شد. آنالیز پارامترهای اسپرم هر فرد آستنوزواسپرمی مطابق با استانداردهای سازمان جهانی بهداشت (۲۰۱۰) قبل و بعد از فرایند انجماد-ذوب انجام شد.

شایان ذکر است که این مطالعه در کمیته اخلاق بررسی گشته و طی نامه شماره IR.QOM.REC.1398.006 مورد تصویب کمیته قرار گرفته است.

ارزیابی پارامترهای اسپرمی

بررسی پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی) با استفاده از میکروسکوپ نوری و طبق دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت (۲۰۱۰) صورت گرفت. شمارش اسپرم‌ها بر حسب میلیون بر لیتر توسط لام نوبار انجام شد. بررسی میزان تحرک اسپرم‌ها براساس دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت (۲۰۱۰) اندازه‌گیری گردید. در گروه بیماران آستنوزواسپرمی، درصد تحرک کل اسپرم کمتر از ۴۰ درصد بود (۱۵). برای بررسی مورفولوژی طبیعی اسپرم‌ها از روش رنگ‌آمیزی پاپانیکولا استفاده شد (۱۶). در رنگ‌آمیزی پاپانیکولا، سر به رنگ آبی و قطعه میانی به رنگ قرمز یا صورتی درمی‌آید. به منظور بررسی مورفولوژی اسپرم، ابتدا از هر نمونه گسترش تهیه شد. سپس رنگ‌آمیزی پاپانیکولا صورت گرفت. برای هر نمونه، یک لام فیکس شده از اسپرم تهیه شد. پس از رنگ‌آمیزی، ۲۰۰ اسپرم توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی (۱۰۰×) بررسی گردید.

ارزیابی قابلیت حیات (Viability)

برای تعیین قابلیت حیات اسپرم، براساس دستورالعمل WHO از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد (۱۷). نسبت یک حجم از سوسپانسیون اسپرم و دو حجم از ائوزین در میکروتیوب مخلوط گردید و پس از گذشت ۳۰ ثانیه، حجم مساوی از محلول نیگروزین به آن اضافه شد و گسترش نازکی از نمونه روی لام ایجاد گردید. پس از خشک شدن گسترش، با استفاده از میکروسکوپ معمولی با بزرگنمایی (۱۰۰×)، ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و اسپرم‌ها در گروه‌های مختلف بررسی شدند و به صورت درصد اسپرم‌های زنده گزارش گردیدند.

ارزیابی آسیب DNA

ارزیابی فراگماتاسیون DNA به روش SCD انجام شد (۱۸).

در این روش مقدار ۳۰ میکرولیتر (تقریباً بین ۱۵ تا ۲۰ میلیون) از نمونه اسپرمی شستشو داده شد و با ۷۰ میکرولیتر از آگاروز با درجه ذوب پایین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مخلوط گردید. سپس نمونه مخلوط شده روی لامی که از قبل با آگاروز ۰/۶۵ درصد پوشیده شده بود، قرار گرفت و با گذاشتن یک لامل روی آن، به مدت ۴ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس با دقت لامل از سطح لام جدا گردید و هر لام به مدت ۷ دقیقه به صورت افقی در محلول اسید کلریدریک ۰/۰۸ نرمال در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق در محلول‌های تجزیه‌کننده قرار داده شد. در ادامه، شستشو صورت گرفت و هر کدام به مدت ۲ دقیقه به ترتیب در الکل ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد آبگیری شد و پس از خشک شدن، با محلول رنگ دیفکوئیک رنگ‌آمیزی گشته و توسط میکروسکوپ نوری بررسی گردید. با استفاده از این روش می‌توان میزان فراگماتاسیون DNA را با توجه به وجود هاله اطراف هسته و اندازه آن بررسی نمود. در اسپرم‌های با فراگماتاسیون DNA، هسته اسپرم با هاله کوچک و بدون هاله و در اسپرم‌های بدون فراگماتاسیون DNA، هسته اسپرم با هاله بزرگ و هاله متوسط تعیین می‌شود. در این مطالعه به منظور بررسی فراگماتاسیون DNA، ۲۰۰ سلول شمارش گردید.

آنالیز آماری

داده‌های حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS 21 و آزمون‌های ONE Way ANOVA و تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل گردیدند. تفاوت میانگین‌ها در سطح ($P < 0.05$) معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ارزیابی پارامترهای اسپرمی

در میانگین تعداد اسپرم در بین سه گروه تفاوت معناداری مشاهده نشد ($P < 0.05$) (جدول ۱). میانگین درصد تحرک کل اسپرم در گروه انجماد نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری را نشان داد ($P < 0.001$). در گروه انجماد + ان-استیل سیستین، میانگین

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین تعداد، تحرک، مورفولوژی و حیات اسپرم در گروه‌های مختلف بیماران آستروزواسپرمی پس از انجماد و درمان با ان-استیل سیستین (۱ میلی گرم بر میلی لیتر)

گروه‌ها	مورفولوژی نرمال (درصد)	تحرک پیشرونده (درصد)	تحرک کل (درصد)	تعداد (۱۰ ^۶)	حیات (درصد)
کنترل	۹۷/۵۱±۲/۱۱ ^a	۱۵/۵۰±۳/۵۹ ^a	۴۲/۲۵±۵/۴۹ ^a	۶۹/۱۲±۹/۳۱ ^a	۷۲/۷۸±۸/۳۱ ^a
انجماد	۹۱/۰۳±۲/۹۱ ^b	۷/۲۵±۲/۲۲ ^b	۲۴/۰۰±۴/۱۰ ^b	۶۶/۲۵±۶/۳۴ ^a	۵۲/۲۱±۵/۲۱ ^b
انجماد + ان-استیل سیستین	۹۵/۱۴±۲/۷۳ ^c	۱۱/۷۵±۲/۳۵ ^c	۳۰/۲۵±۴/۱۲ ^c	۶۶/۱۵±۷/۳۵ ^a	۶۵/۸۹±۶/۳۱ ^c

مقادیر به صورت Mean±SD ارائه شده‌اند. میانگین‌ها با کد حروف مختلف در یک ستون دارای تفاوت معنادار می‌باشند (P<۰/۰۵).

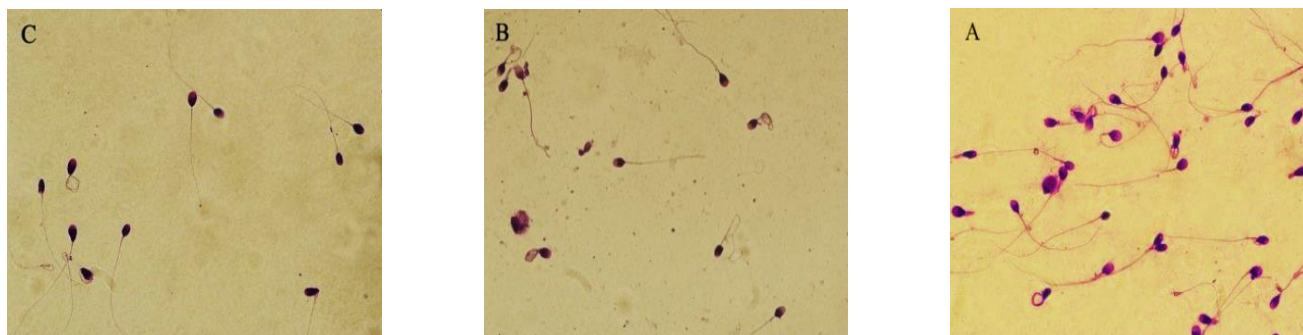
ارزیابی قابلیت حیات اسپرم (Viability)

میانگین درصد اسپرم‌های زنده (قابلیت حیات) در گروه انجماد نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری یافت (P<۰/۰۰۱). از سوی دیگر، قابلیت حیات اسپرم در گروه انجماد + ان-استیل سیستین، افزایش معناداری را نسبت به گروه انجماد نشان داد (P<۰/۰۰۱) (شکل ۲، C-B). در گروه انجماد + ان-استیل سیستین نیز میانگین درصد اسپرم‌های زنده، کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل یافت (جدول ۱) (P<۰/۰۰۱). در شکل ۲، A-B-C قابلیت حیات اسپرم در گروه‌های مختلف نشان داده شده است.

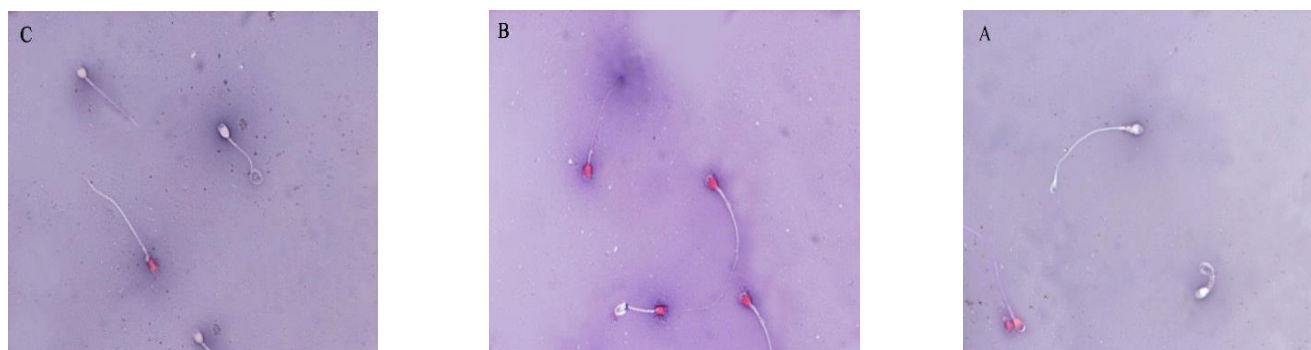
ارزیابی آسیب DNA

در گروه انجمادی، افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل در میانگین درصد آسیب DNA مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). میانگین درصد آسیب DNA در گروه انجماد + ان-استیل سیستین، کاهش معناداری را نسبت به گروه انجماد نشان داد (P<۰/۰۰۱). همچنین در گروه انجماد + ان-استیل سیستین، افزایش معناداری در میانگین درصد آسیب DNA نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید (P<۰/۰۰۱) (جدول ۲).

درصد تحرک کل اسپرم افزایش معناداری نسبت به گروه انجماد داشت (P<۰/۰۰۱)؛ اما در گروه انجماد + ان-استیل سیستین، افزایش معناداری در میانگین درصد تحرک کل اسپرم نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد (جدول ۱) (P<۰/۰۵). در این مطالعه میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیشرونده در گروه انجماد نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری یافت (P<۰/۰۰۱). در گروه انجماد + ان-استیل سیستین نیز تحرک پیشرونده، افزایش معناداری را نسبت به گروه انجماد نشان داد (P<۰/۰۰۱). شایان ذکر است که در گروه انجماد + ان-استیل سیستین، افزایش معناداری در میزان میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیشرونده نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد (جدول ۱) (P<۰/۰۵). از سوی دیگر در گروه انجماد، کاهش معناداری در میانگین درصد اسپرم‌ها با مورفولوژی نرمال نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید (P<۰/۰۰۱). همچنین مورفولوژی نرمال اسپرم در گروه انجماد + ان-استیل سیستین، افزایش معناداری را نسبت به گروه انجماد نشان داد (P<۰/۰۰۱). میزان مورفولوژی نرمال در گروه انجماد + ان-استیل سیستین، خود را به گروه کنترل نزدیک کرد؛ اما این افزایش نسبت به گروه کنترل معنادار نبود (P<۰/۰۵) (جدول ۱) (شکل ۱).



شکل شماره ۱: بررسی مورفولوژی اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی پاپانیکولا در گروه‌های مختلف (بزرگنمایی ۱۰۰۰×): A: گروه کنترل؛ B: گروه انجماد؛ C: گروه انجماد + آنتی اکسیدان



شکل شماره ۲: سنجش قابلیت حیات اسپرم انسان با استفاده از رنگ آمیزی انوزین-نیگروزین در گروه‌های مختلف (بزرگنمایی $100\times$): A: گروه کنترل؛ B: گروه انجماد؛ C: گروه انجماد + آنتی اکسیدان (اسپرم با سر سفید= زنده و اسپرم با سر قرمز یا صورتی= مرده)

جدول شماره ۲: مقایسه میانگین درصد آسیب DNA اسپرم در گروه‌های مختلف بیماران آستروزواسرمی پس از انجماد و درمان با ان-استیل سیستین (۱ میلی گرم بر میلی لیتر)

گروه‌ها	آسیب DNA
کنترل	$19/6 \pm 4/5^a$
انجمادی	$39/6 \pm 5/1^b$
انجماد + ان-استیل سیستین	$25/4 \pm 4/8^c$

مقادیر به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ارائه شده‌اند. میانگین‌ها با کد حروف مختلف در یک ستون دارای تفاوت معنادار می‌باشند ($P < 0/05$).

بحث

تلاش برای قابلیت باروری اسپرم از حدود یک قرن پیش آغاز شده و همچنان ادامه دارد. یافته‌های مطالعه حاضر نشان دادند که در فرایند انجماد-ذوب، بروز استرس اکسیداتیو که ناشی از برهم خوردن تعادل بین رادیکال‌های آزاد اکسیژن و ظرفیت آنتی اکسیدانی مایع منی می‌باشد، ممکن است منجر به کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی مردان شود (۵، ۱۹). استرس اکسیداتیو شامل: غلبه رادیکال‌های آزاد تولید شده نظیر رادیکال‌های هیدروکسیل، آنیون‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن بر سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی در سلول‌ها می‌باشد (۲۰). در مطالعه حاضر گروه انجماد کاهش معناداری را در میزان تحرک تحرک پیشرونده نسبت به گروه کنترل نشان داد؛ در صورتی که گروه درمان با ان-استیل سیستین، بهبود قابل توجهی در میزان تحرک نسبت به گروه انجماد داشت. Michael در سال ۲۰۱۰ گزارش نمود که ان-استیل سیستین اثر مثبتی بر تحرک اسپرم دارد (۲۱). این یافته‌ها با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارند. در مطالعه‌ای که Oeda و همکاران در سال ۱۹۹۷ انجام دادند، بیان

نمودند که تیمار با ان-استیل سیستین در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) باعث افزایش پارامترهای اسپرمی از جمله افزایش میزان حرکت اسپرم‌ها و همچنین افزایش واکنش آکروزمی در اسپرم‌ها گردیده و پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون با ان-استیل سیستین، سطح ROS به طور معناداری کاهش یافته است (۲۲). در پژوهش دیگری اثر ال-سیستین بر اسپرم اسب در شرایط انجماد بررسی گشت و گزارش گردید که این اسید آمینه باعث بهبود پارامترهای کیفی اسب در طول ذخیره‌سازی در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت شد؛ به گونه‌ای که غلظت ۲۰۰ مول بر لیتر آن سبب بهبود تحرک پیشرونده، حیات و یکپارچگی آکروزوم اسپرم گردید (۱۳). از سوی دیگر، بررسی اثر آنتی اکسیدان‌های ویتامین E و سیستین بر پارامترهای اسپرم بیانگر بهبود تحرک اسپرم و سلامت غشای پلاسمایی پس از انجماد می‌باشد (۲۳). در مطالعه حاضر نتایج حاصل از ارزیابی مورفولوژی اسپرم‌های تیمار شده با ان-استیل سیستین پس از فرایند انجماد-ذوب نشان دادند که در گروه انجماد، کاهش معناداری در میانگین درصد اسپرم‌ها با مورفولوژی نرمال نسبت به گروه کنترل رخ داده است. مورفولوژی نرمال اسپرم در گروه انجماد + ان-استیل سیستین، افزایش معناداری را نسبت به گروه انجماد نشان داد. در طول روند انجماد-ذوب، آسیب به غشای سلول باعث نقص و تغییرات مورفولوژیکی و آسیب‌های ساختاری و عملکردی به اسپرم شده و در نتیجه موجب کاهش توان باروری اسپرم می‌شود. در مورد تأثیر ان-استیل سیستین بر مورفولوژی نرمال اسپرم‌ها، مطالعات In vivo وجود دارد که در جدیدترین آن‌ها نشان داده شده است که این آنتی اکسیدان می‌تواند باعث

گزارش گردید که میزان آسیب به ROS در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) به میزان قابل توجهی کاهش یافته است که این امر را با کاهش در گونه‌های فعال اکسیژن (NOS) مرتبط دانستند (۲۸)؛ بنابراین تصور می‌شود که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند ان-استیل سیستین بتواند باعث کاهش عوامل استرس‌زا مانند ROS و در نهایت کاهش آسیب DNA شود.

نتیجه‌گیری

نتیجه حاصل از این مطالعه بیانگر آن بودند که ان-استیل سیستین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان بسیار قوی، دفاع مؤثری علیه رادیکال‌های آزاد داشته و سبب افزایش درصد تحرک کل، تحرک پیشرونده اسپرم، مورفولوژی نرمال، حیات سلول و کاهش فراگمانتاسیون DNA پس از فرایند انجماد-ذوب در افراد آستنوزواسپرمی می‌شود؛ بدین صورت که بر اسپرم انسان در برابر آسیب ناشی از واکنش پراکسیداسیون لیپیدی غشا که در محیط‌های انجمادی اسپرم به وقوع می‌پیوندد، اثر حفاظتی دارد؛ بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که اضافه نمودن این آنتی‌اکسیدان موجب بهبود عملکرد اسپرم می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کارکنان سخت‌کوش مرکز فوق تخصصی مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم که پژوهشگران را در انجام این مطالعه یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

بهبود مورفولوژی اسپرم‌ها در بیماران آستنوزواسپرمی شود (۲۴، ۲۵). جدا شدن سلول‌های زنده از مرده امر بسیار مهمی است که همواره مورد توجه محققان می‌باشد. به دلیل استرس‌های ناشی از ذوب و انجماد، همواره نگره داشتن تعداد سلول‌های زنده پس از این پدیده از نظر کلینیکی بسیار مهم می‌باشد؛ از این رو مطالعات متعددی با استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در مورد میزان زنده‌مانی اسپرم پس از انجماد و ذوب انجام شده‌اند و همواره محققان به دنبال پیدا کردن راهی برای افزایش کیفیت اسپرم هستند (۲۳). در این مطالعه میانگین درصد قابلیت حیات اسپرم در گروه انجماد نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری یافت. از سوی دیگر، قابلیت حیات اسپرم در گروه انجماد + ان-استیل سیستین، افزایش معناداری را نسبت به گروه انجماد نشان داد. در تأیید یافته‌های پژوهش حاضر، اسدپور و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که ان-استیل سیستین می‌تواند در موش‌هایی که با استات سرب آلوده شده بودند، باعث افزایش معنادار تحرک و قدرت زنده ماندن اسپرم شود (۲۶). در مطالعه خلیلی و همکاران (۲۰۱۰) اثر غلظت‌های مختلف اسیدهای آمینه سیستین بر اسپرم قوچ مغانی در شرایط انجماد بررسی شد و مشاهده گردید که این اسید آمینه سبب بهبود قابل توجه حرکت پیشرونده اسپرم، حیات و یکپارچگی غشای آکروزوم اسپرم شده است (۲۷). در پژوهش مذکور، میانگین درصد آسیب DNA در گروه انجماد + ان-استیل سیستین، کاهش معناداری نسبت به گروه انجماد داشت. در این راستا، در مطالعه‌ای که Lopes و همکاران در سال ۱۹۹۸ پیرامون اثربخشی ان-استیل سیستین بر پارامترهای اسپرم انجام دادند،

References:

1. Decherney AH. Principles & practice of assisted reproductive technology (3 Vols). London: JP Medical Ltd; 2013. [Link](#)
2. Esteves SC, Roque M, Bedoschi GM, Conforti A, Humaidan P, Alviggi C. Defining low prognosis patients undergoing assisted reproductive technology: POSEIDON criteria-the why. Front Endocrinol (Lausanne) 2018;9:461. DOI: [10.3389/fendo.2018.00461](https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00461)
3. Direkvand Moghaddam A, Delpisheh A, Sayehmiri K. An investigation of the worldwide prevalence of infertility as a systematic review. Qom Univ Med Sci J 2016;10(1):76-87. [Link](#)
4. Ricci E, Viganò P, Cipriani S, Somigliana E, Chiaffarino F, Bulfoni A, et al. Coffee and caffeine intake and male infertility: a systematic review. Nutr J 2017;16(1):37. DOI: [10.1186/s12937-017-0257-2](https://doi.org/10.1186/s12937-017-0257-2)

5. Mocé E, Fajardo AJ, Graham JK. Human sperm cryopreservation. EMJ 2016;1(1):86-91. [Link](#)
6. Zandiyeh S, Shahverdi A, Ebrahimi B, Sabbaghian M. A novel approach for human sperm cryopreservation with AFPIII. Reprod Biol 2020;20(2):169-74. [DOI: 10.1016/j.repbio.2020.03.006](#)
7. Isachenko E, Isachenko V, Weiss JM, Kreienberg R, Katkov II, Schulz M, et al. Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. Reproduction 2008;136(2):167-73. [DOI: 10.1530/REP-07-0463](#)
8. Amidi F, Pazhohan A, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M, Nekoonam S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. Cell Tissue Bank 2016;17(4):745-56. [DOI: 10.1007/s10561-016-9566-5](#)
9. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. Adv Urol 2012;2012:854837. [DOI: 10.1155/2012/854837](#)
10. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. Cell Mol Life Sci 2003;60(1):6-20. [DOI: 10.1007/s000180300001](#)
11. Minarini A, Ferrari S, Galletti M, Giambalvo N, Perrone D, Rioli G, et al. N-acetylcysteine in the treatment of psychiatric disorders: current status and future prospects. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2017;13(3):279-92. [DOI: 10.1080/17425255.2017.1251580](#)
12. Zhitkovich A. N-acetylcysteine: antioxidant, aldehyde scavenger, and more. Chem Res Toxicol 2019;32(7):1318-9. [DOI: 10.1021/acs.chemrestox.9b00152](#)
13. Sariözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutaş PA, Bilgen A. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. Cryobiology 2009;58(2):134-8. [DOI: 10.1016/j.cryobiol.2008.11.006](#)
14. Ansari MS, Rakha BA, Malik MF, Andrabi SM, Ullah N, Iqbal R, et al. Effect of cysteine addition to the freezing extender on the progressive motility, viability, plasma membrane and DNA integrity of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. J Appl Anim Res 2016;44(1):36-41. [DOI: 10.1080/09712119.2014.987292](#)
15. World Health Organization. World health statistics 2010. Geneva: World Health Organization; 2010. [Link](#)
16. Brito LF, Greene LM, Kelleman A, Knobbe M, Turner R. Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. Theriogenology 2011;76(4):745-50. [DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.04.007](#)
17. 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. [DOI: 10.1023/a:1020310503143](#)
18. Singh A, Agarwal A. The role of sperm chromatin integrity and DNA damage on male infertility. Open Reprod Sci J 2011;3(1):65-71. [DOI: 10.2174/1874255601103010065](#)
19. Dariush G, Gholamhossein R, Rouhollah F, Mahmood GS, Abdolhossein S, Mohsen S, et al. The application of ultrasonic vibration in human sperm cryopreservation as a novel method for the modification of physicochemical characteristics of freezing media. Sci Rep 2019;9(1):10066. [DOI: 10.1038/s41598-019-46424-0](#)
20. Torki-Boldaji B, Azadi L, Tavalae M, Nasr-Esfahani MH. Human sperm cryopreservation update in treatment of infertility: a review study. J Cell Tissue 2017;8(4):332-53. [Link](#)
21. Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN, et al. Effect of N-acetyl-L-cysteine supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. Reprod Domest Anim 2010;45(2):201-7. [DOI: 10.1111/j.1439-0531.2008.01202.x](#)
22. Oeda T, Henkel R, Ohmori H, Schill WB. Scavenging effect of N-acetyl-L-cysteine against reactive oxygen species in human semen: a possible therapeutic modality for male factor infertility? Andrologia 1997;29(3):125-31. [DOI: 10.1111/j.1439-0272.1997.tb00305.x](#)
23. Majzoub A, Agarwal A. Antioxidants in sperm cryopreservation. Male infertility. Cham: Springer; 2020. P. 671-8. [DOI: 10.1007/978-3-030-32300-4_54](#)

24. Jannatifar R, Parivar K, Roodbari NH, Nasr-Esfahani MH. Effects of N-acetyl-cysteine supplementation on sperm quality, chromatin integrity and level of oxidative stress in infertile men. *Reprod Biol Endocrinol* 2019;17(1):24. [DOI: 10.1186/s12958-019-0468-9](https://doi.org/10.1186/s12958-019-0468-9)
25. Jannatifar R, Parivar K, Hayati Roodbari N, Nasr-Esfahani MH. The effect of N-acetyl-cysteine on NRF2 antioxidant gene expression in asthenoteratozoospermia men: a clinical trial study. *Int J Fertil Steril* 2020;14(3):171-5. [DOI: 10.22074/ijfs.2020.44411](https://doi.org/10.22074/ijfs.2020.44411)
26. Asadpour R, Azari M, Hejazi M, Tayefi H, Zaboli N. Protective effects of garlic aqueous extract (*Allium sativum*), vitamin E, and N-acetylcysteine on reproductive quality of male rats exposed to lead. *Vet Res Forum* 2013;4(4):251-7. [Link](#)
27. Khalili B, Jafaroghli M, Farshad A, Paresh-Khiavi M. The effects of different concentrations of glycine and cysteine on the freezability of Moghani ram spermatozoa. *Asian Austral J Anim Sci* 2010;23(3):318-25. [DOI: 10.5713/ajas.2010.90387](https://doi.org/10.5713/ajas.2010.90387)
28. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998;13(4):896-900. [DOI: 10.1093/humrep/13.4.896](https://doi.org/10.1093/humrep/13.4.896)