

## بررسی اثر کلسترول، ترکیبات محتوی آهن و ویتامین E، بر فراگمتاسیون DNA و کمبود پروتئین اسپرم در خرگوش

ناظم قاسمی<sup>۱</sup>، دکتر غلامرضا دشتی<sup>۲</sup>، فاطمه آموزگار<sup>۳</sup>، سید احمد واعظ<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** نقش ویتامین E به عنوان یکی از آنتی اکسیدانها و اثر ترکیبات محتوی آهن بر روی DNA به خوبی شناخته شده نیست. از این رو، مطالعه‌ای حاضر جهت تعیین نقش ویتامین E و آهن، به عنوان دو عامل مؤثر به صورت جداگانه و ترکیبی بر فراگمتاسیون DNA و کمبود پروتئین اسپرم در خرگوش انجام گرفت.

**روش‌ها:** تعداد ۴۲ عدد خرگوش نر بالغ به صورت تصادفی به هفت گروه ۶ تایی تقسیم شدند و به مدت ۶ هفته تحت رژیم غذایی مخصوص قرار گرفتند. برای گروه شاهد از غذای معمولی، گروه دوم از غذای معمولی حاوی ویتامین E (۵۰ mg/kg)، گروه سوم از غذای معمولی حاوی آهن (۵۰ mg/kg)، گروه چهارم از غذای معمولی حاوی آهن (۵۰ mg/kg) و ویتامین E (۵۰ mg/kg)، گروه پنجم از غذای حاوی ۱ درصد کلسترول، گروه ششم از غذای حاوی ۱ درصد کلسترول و ویتامین E (۵۰ mg/kg) و گروه هفتم از غذای حاوی ۱ درصد کلسترول و آهن (۵۰ mg/kg) استفاده شد. پس از طی شدن زمان لازم، خرگوش‌ها بی‌هوش و قربانی شدند و مجاری ایدیدیم و دفران آنها تشریح شد و اسپرم‌های این مجاری به کمک محلول Hams f10 خارج گردید. میزان آسیب DNA اسپرم توسط رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و کمبود پروتئین اسپرم با رنگ‌آمیزی CMA3 (Chromomycin A3) مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** مصرف همزمان غذاهای محتوی کلسترول و آهن، آسیب معنی‌داری را در DNA اسپرم ایجاد نمود. به علاوه، مصرف ویتامین E به عنوان یک عامل آنتی اکسیدان، اثر قابل توجهی در کاهش این آسیب دارد. بررسی وضعیت کروماتین اسپرم نشان داد که مصرف ترکیبات محتوی آهن و کلسترول به تنهایی و یا به شکل همزمان، باعث افزایش قابل توجهی در میانگین درصد کمبود پروتئین اسپرم می‌شود. استفاده از ویتامین E، میانگین درصد کمبود پروتئین اسپرم را به صورت متفاوت در گروه‌ها تغییر داد.

**نتیجه‌گیری:** مصرف ویتامین E به عنوان نوعی آنتی اکسیدان، آسیب DNA اسپرم ناشی از مصرف غذاهای پر کلسترول و آهن را کاهش می‌دهد.

**واژگان کلیدی:** کلسترول، آهن، ویتامین E، فراگمتاسیون DNA، کمبود پروتئین اسپرم

**ارجاع:** قاسمی ناظم، دشتی غلامرضا، آموزگار فاطمه، واعظ سید احمد. بررسی اثر کلسترول، ترکیبات محتوی آهن و ویتامین E، بر فراگمتاسیون DNA و کمبود پروتئین اسپرم در خرگوش. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۵۹): ۱۷۷۸-۱۷۶۹

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- کارشناس آزمایشگاه، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: dashti@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر غلامرضا دشتی

### مقدمه

اسپرماتوزن فرایندی سازمان یافته از تمایز و بلوغ سلول‌های زایا در بیضه است. در طول اسپرمیوزن، هسته‌ی اسپرماتید با جایگزین شدن هیستون‌های هسته‌ای توسط پروتئین‌های انتقالی و سپس پروتامین‌ها، تغییر شکل می‌یابد و متراکم می‌شود (۱). پل‌های دی‌سولفیدی بین ملکولی و درون ملکولی بین پروتامین‌های غنی از سیستئین، مسؤول تراکم و ثبات هسته‌ی اسپرم می‌باشند (۲). تراکم هسته برای حفاظت ژنوم اسپرم از استرس‌های خارجی، نظیر استرس‌های اکسیداتیو لازم به نظر می‌رسد (۳).

روش‌های متعددی جهت بررسی وضعیت کروماتین اسپرم وجود دارد، برای مثال رنگ‌آمیزی آنیلین بلو وجود هیستون‌های اضافی (۴) و رنگ‌آمیزی کرومومایسین A، کمبود پروتامین را نشان می‌دهند (۵). در رنگ‌آمیزی کرومومایسین A<sup>۳</sup>، مکان‌هایی که دارای کمبود پروتامین می‌باشند، توسط CMA<sup>۳</sup> (Chromomycin A<sup>۳</sup>) جایگزین می‌شوند و کمبود پروتامین به صورت کلی و به طور غیر مستقیم ارزیابی می‌گردد (۶).

اختلال در فرایند اسپرماتوزن، می‌تواند منجر به ساخت اسپرمی شود که سطح بالایی از نقایص DNA را دارد. صدمه به DNA، دارای اتیولوژی چند عاملی است. یکی از این علل، کمبود میزان پروتامین می‌باشد. کمبود میزان پروتامین، از علل آسیب رسان به DNA می‌باشد. در مطالعه‌ای ثابت شده است که میزان پروتامین در اسپرم افراد نابارور، کاهش می‌یابد و این کمبود پروتامین، منجر به عدم تراکم صحیح هسته‌ی اسپرم می‌گردد (۵-۶).

یکی دیگر از عوامل ایجاد کننده‌ی آسیب DNA

اسپرم، قرار گرفتن هسته‌ی اسپرم در معرض شوک‌های اکسیداتیو می‌باشد. وجود رادیکال‌های آزاد با منشأ داخلی تولید شده توسط خود اسپرم و منشأ خارجی (هنگام عبور اسپرم از لوله اپیدیدیم)، می‌تواند به DNA اسپرم آسیب برساند. متابولیت‌های اکسیداتیو در اسپرم فعالیت ویژه‌ای دارند. اما با این وجود، هیچ مکانیسم ترمیمی DNA در کروماتین متراکم اسپرم وجود ندارد (۷)؛ به همین دلیل، بازهای DNA اسپرم و پیوندهای فسفو دی استری ساختار آن، به صدمات پراکسیداتیو حساس هستند؛ به طوری که سطح بالای ROS (Reactive oxygen species) منجر به تخریب بازها، پیوستگی عرضی پروتئین‌ها و تجزیه شدن DNA می‌شود (۸-۹).

مکانیسم‌های متفاوتی برای مهار استرس اکسیداتیو و کاهش صدمات ناشی از ROS وجود دارد که یکی از آنها سیستم آنتی‌اکسیدانت است (۱۰). وجود آنتی‌اکسیدان‌ها یک وضعیت ثابت از سطح ROS را در سمینال پلازما ایجاد می‌کند. آنها به عنوان یک پاک‌سازی کننده‌ی رادیکال آزاد، اسپرم را در برابر ROS حفاظت می‌کنند. آنتی‌اکسیدانت‌ها شامل دو گروه آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشند. از انواع غیر آنزیمی، می‌توان به ویتامین‌های A، C، E، پیروات، گلوتاتیون، تائورین، هیپوتائورین، کوآنزیم Q اشاره کرد (۱۱).

ویتامین‌های E و C جزء انواع آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی هستند که بسته به دوز مشخصی، اثرات حفاظتی خود را نشان می‌دهند (۱۲). مصرف ویتامین‌های C و E به ترتیب منجر به کاهش غلظت مارکرها‌ی پراکسیداسیون لیپید و تجزیه شدن DNA می‌شود (۱۳-۱۴).

نشان داده است که کیفیت اسپرم‌ها به دنبال افزایش وزن بدن کاهش قابل توجهی پیدا می‌کند. در این طرح، اثر ویتامین E را که روی آنتی اکسیدان بودن آن اختلاف نظر است و نیز آهن که مقدار بالای آن به عنوان آتروژن اثبات شده و در جوامع فقیر کمبود آن شایع است، به عنوان دو عامل مؤثر به صورت جداگانه و ترکیبی، بر DNA فراگمتاسیون و کمبود پروتئین اسپرم، با انجام روش‌های آکریدین اورنج و CMA<sup>۳</sup> در اسپرم خرگوش‌های نری که با رژیم غذایی پر کلسترول و نیز آهن و ویتامین E تغذیه شدند، مورد بررسی قرار گرفت.

### روش‌ها

در این مطالعه از ۴۲ عدد خرگوش نر بالغ استفاده شد. ابتدا خرگوش‌ها به مدت چند روز برای تطابق با شرایط محیطی در لانه‌ی حیوانات نگهداری شدند و سپس به صورت تصادفی به هفت گروه ۶ تایی تقسیم شدند و به مدت ۶ هفته تحت رژیم غذایی مخصوص قرار گرفتند.

برای گروه شاهد از غذای معمولی، گروه دوم از غذای معمولی حاوی ویتامین E (۵۰ mg/kg)، گروه سوم از غذای معمولی حاوی آهن (۵۰ mg/kg)، گروه چهارم از غذای معمولی حاوی ویتامین E (۵۰ mg/kg) و آهن (۵۰ mg/kg)، گروه پنجم از غذای حاوی ۱ درصد کلسترول، گروه ششم از غذای حاوی ۱ درصد کلسترول و ویتامین E (۵۰ mg/kg) و گروه هفتم از غذای حاوی ۱ درصد کلسترول و آهن (۵۰ mg/kg) استفاده شد. پس از طی ۶ هفته، خرگوش‌ها با داروی کتامین با دوز ۷۵ mg/kg بی‌هوش و قربانی شدند و مجاری اپیدیدیم و دفران

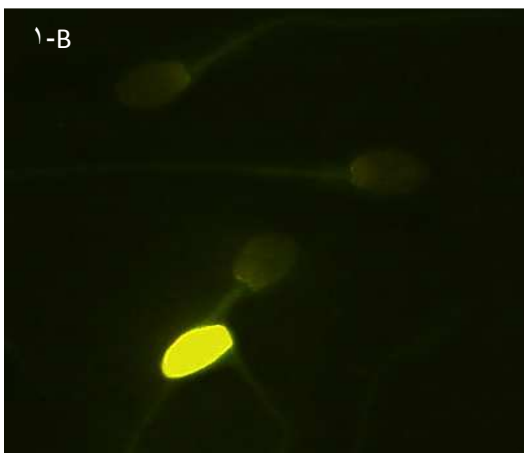
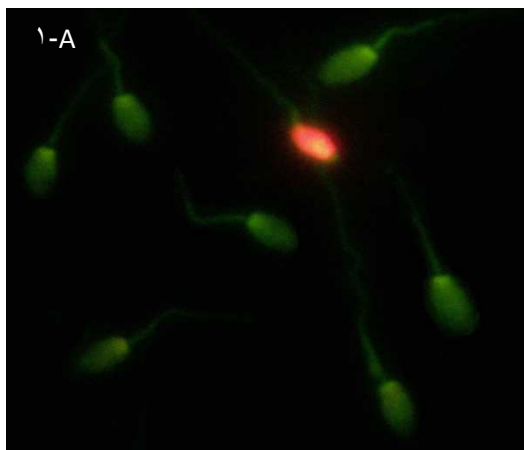
یکی از مکانیسم‌هایی که آنتی اکسیدانت‌ها علیه استرس اکسیداتیو انجام می‌دهند، مکانیسم پیشگیری است. پروتئین‌هایی که هسته‌ای از آهن و مس یا هسته‌ای با ظرفیت اتصال به این فلزات مثل آلومین، متالوتیونتین، سرلوپلاسمین، فریتین، ترانسفرین و میوگلوبین را دارند، از تولید رادیکال هیدروکسیل جلوگیری می‌کنند.

آهن از نظر فراوانی چهارمین عنصری است که در پوسته‌ی زمین وجود دارد. وجود آهن در ساختار بافت‌های پستانداران در قرن ۱۸ میلادی به اثبات رسید و از آن زمان تا کنون، مطالعات وسیعی در ارتباط با این عنصر و اهمیت آن برای انجام واکنش‌های حیاتی انجام شده است.

آهن ذخیره‌ای به صورت فریتین و هموسیدرین می‌باشد و آهن موجود در پلاسما به صورت اتصال به مولکول ترانسفرین است (۱۵). این عنصر، یکی از عوامل مهم در تولید گونه‌های مختلف اکسیژن فعال می‌باشد. رابطه‌ی بین مصرف مقادیر بالای آهن و آسیب DNA اسپرمی به صورت ضد و نقیض در بسیاری از مطالعات گزارش شده است. در مطالعه‌ای که در بر روی رت انجام شد، بین میزان آسیب DNA اسپرمی و میزان آهن مصرفی، ارتباط معنی‌داری گزارش شد (۱۸-۱۶)، اما برخلاف این مطالعه، در بررسی انجام شده بر روی بیماران تالاسمی، هیچ رابطه‌ای بین متغیرها مشاهده نشد (۱۹).

افزایش وزن بدن و سندرم‌های متابولیک، ارتباط بالقوه‌ای با مشکلات باروری دارند (۲۰-۲۲). از جمله عوامل مهم مداخله کننده در این سندرم‌ها می‌توان به افزایش میزان تری گلیسیریدها و LDL (Low-density lipoprotein) اشاره کرد. مطالعات

فلورسنت محاسبه و درصد آن‌ها مشخص شد. در این روش، هسته‌ی اسپرم‌هایی که به رنگ نارنجی تا قرمز دیده شدند، به عنوان اسپرم‌های با آسیب DNA و هسته‌ی اسپرم‌هایی که به رنگ سبز دیده شدند، به عنوان اسپرم‌های طبیعی در نظر گرفته شدند (شکل ۱-A).



شکل ۱. در رنگ‌آمیزی با آکریدین اورنج، اسپرمی که آسیب DNA دارد، به رنگ نارنجی تا قرمز (۱-A) و در رنگ‌آمیزی با CMA<sup>۳</sup>، اسپرمی که دارای کمبود پروتئین است، به رنگ زرد درخشان (۱-B) دیده می‌شود.

آن‌ها تشریح شد. سپس اسپرم این مجاری به کمک محلول Hamz f10 خارج و پس از تهیه‌ی اسمیر، رنگ‌آمیزی گردید. برای رنگ‌آمیزی CMA<sup>۳</sup> و آکریدین اورنج، از کیت‌های آماده‌ی شرکت سپاهان طب، بر اساس دستورالعمل مربوط استفاده گردید.

برای تشخیص DNA فراگمتاسیون بعد از فاصله‌ی کوتاهی از تهیه‌ی اسمیر، اسمیرهای اسپرمی پس از خشک شدن در معرض هوا، در محلول فیکساتیو کارنوی دور از نور و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت ثابت شدند. در مرحله‌ی بعد، با محلول آکریدین اورنج به مدت ۱۰-۷ دقیقه، رنگ‌آمیزی انجام گرفت. لام‌ها پس از رنگ‌آمیزی در زیر میکروسکوپ فلورسنت (با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰×) بررسی شدند. در این رنگ‌آمیزی، DNA تک رشته‌ای به رنگ قرمز و DNA طبیعی دو رشته‌ای به رنگ سبز مشاهده می‌گردد.

برای بررسی کمبود پروتئین بعد از تهیه‌ی اسمیر، محلول فیکساتیو کارنوی جهت رنگ‌آمیزی بر روی لام‌ها گذاشته شد و در هوای اتاق قرار گرفت تا خشک شود. در ادامه، هر اسلاید به مدت ۲۰ دقیقه با محلول CMA<sup>۳</sup> رنگ‌آمیزی شد و پس از شستشو، اسلایدها جهت حذف رنگ اضافی با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (با بزرگ‌نمایی ۱۰۰×) تعداد ۱۰۰ اسپرم شمارش گردید. اسپرم‌های با رنگ زرد درخشان CMA<sup>۳</sup>+ و اسپرم‌های با رنگ زرد تیره CMA<sup>۳</sup>- بودند.

### یافته‌ها

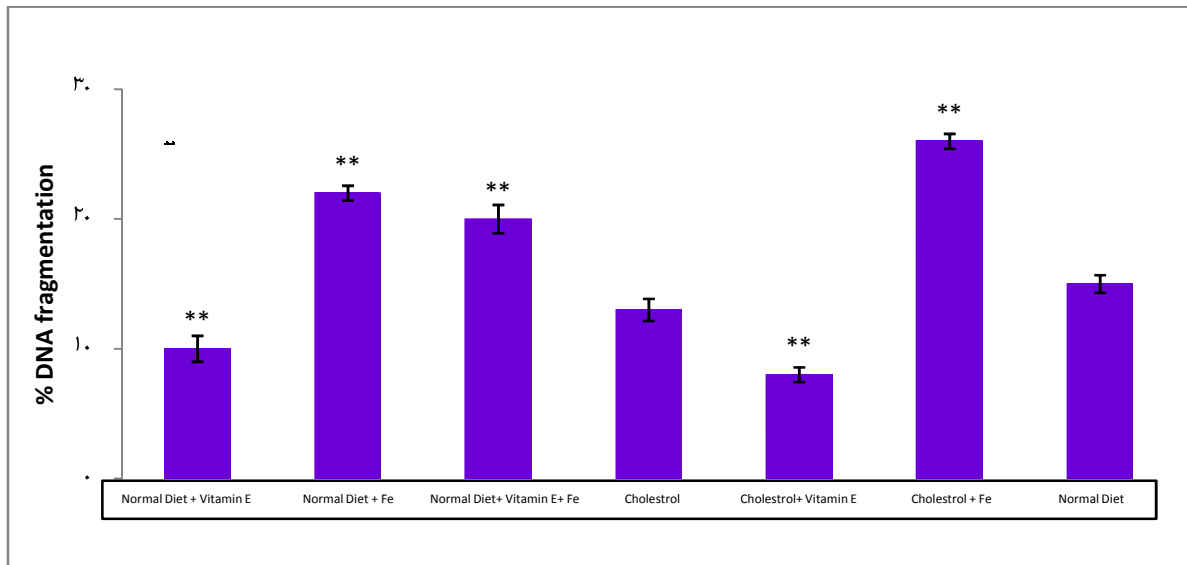
میزان آسیب DNA اسپرم در همه‌ی گروه‌ها با استفاده از روش آکریدین اورنج و با کمک میکروسکوپ

اختلاف بین میانگین درصد اسپرم‌هایی که آسیب DNA داشتند، در گروهی که برای آن‌ها از غذای محتوی آهن و یا از غذای محتوی آهن و

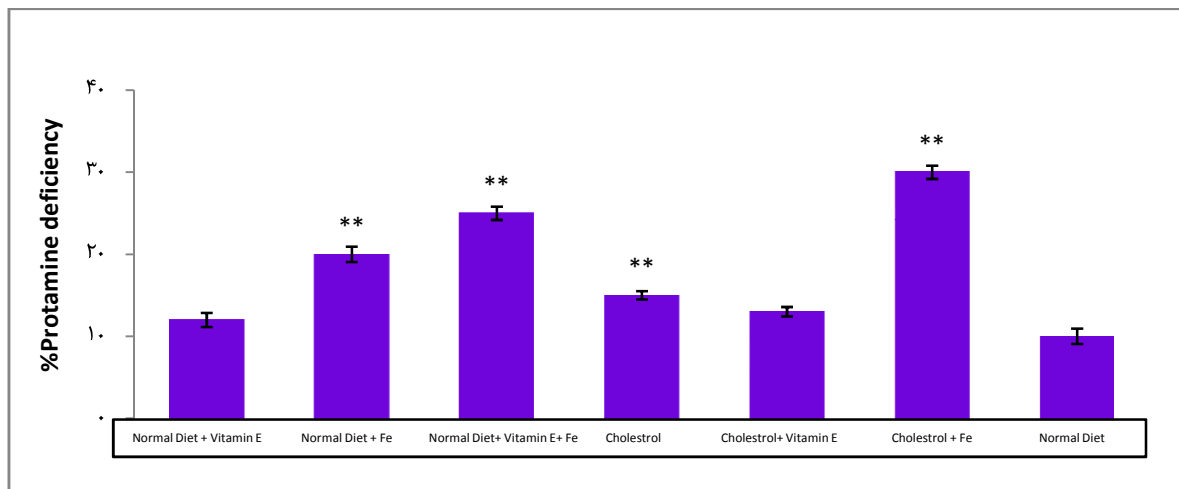
با رنگ زرد کم رنگ (CMA<sup>3-</sup>) دیده شدند (شکل B-1). بعد از شمارش ۱۰۰ اسپرم در چند فیلد، میانگین درصد کمبود پروتامین مشخص می‌شود. مقایسه‌ی میانگین درصد کمبود پروتامین در گروه‌ها نشان داد که مصرف غذای پر کلسترول و آهن، به شکل معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است. مصرف ویتامین E، در گروه‌های مختلف به شکل متفاوت باعث افزایش و یا کاهش کمبود پروتامین شده است (شکل ۳).

کلسترول بالا استفاده شده بود، به شکل معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش پیدا کرد؛ به علاوه، مصرف ویتامین E، آسیب حاصل را کاهش داد (شکل ۲).

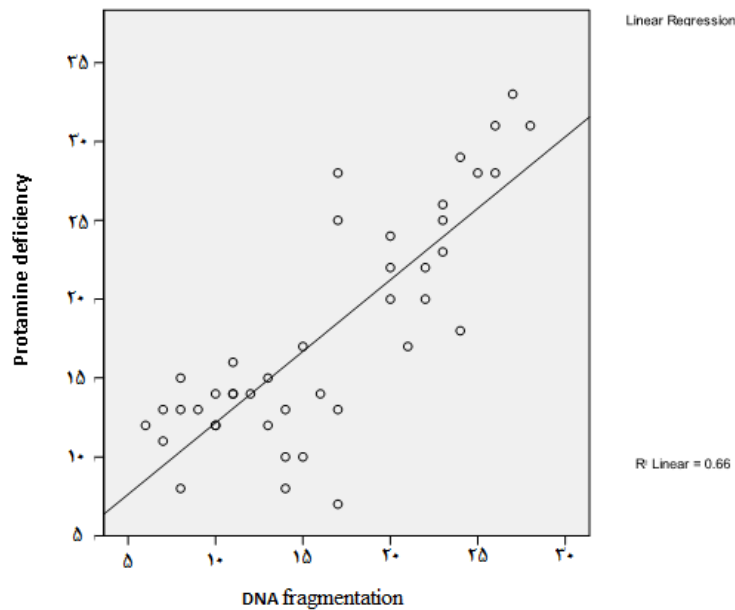
کمبود پروتامین اسپرم با استفاده از روش کرومومایسین A<sup>3</sup> و به کمک میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفت. در این روش، هسته‌ی اسپرم‌هایی که دارای کمبود پروتامین بودند، به رنگ زرد درخشان (CMA<sup>3+</sup>) و هسته‌ی اسپرم‌های طبیعی



شکل ۲. مقایسه‌ی میانگین آسیب DNA اسپرم در گروه‌های مختلف نسبت به گروه شاهد (\*\*P < ۰/۰۰۱)



شکل ۳. مقایسه‌ی میانگین کمبود پروتامین اسپرم در گروه‌های مختلف نسبت به گروه شاهد (\*\*P < ۰/۰۰۱)



شکل ۴. مقایسه‌ی میانگین آسیب DNA و کمبود پروتامین اسپرم در گروه‌های مختلف

هشت فرم مختلف وجود دارد و هر کدام، دارای فعالیت بیولوژیکی مخصوص به خود می‌باشند (۲۶). وظیفه‌ی اصلی ویتامین E به عنوان آنتی‌اکسیدان، محصور کننده‌ی رادیکال‌های آزاد در غشای پلاسمایی و لیپو پروتئین‌های پلازما است. ویتامین E با رادیکال‌های لیپید به دست آمده از پروکسید شدن اسیدهای چرب Poly unsaturated نیز واکنش می‌دهد. مصرف ویتامین E با کاهش میانگین DNA فراگمتاسیون مرتبط است؛ اما تأثیر دوزهای بالای ویتامین E در این مورد، نامشخص است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از ویتامین E به عنوان نوعی آنتی‌اکسیدان، نقش مهمی در کاهش میانگین DNA فراگمتاسیون ناشی از مصرف آهن و کلسترول دارد. به علاوه، در گروهی که ویتامین E با کلسترول به صورت همزمان مصرف شده است، کاهش میانگین درصد کمبود پروتامین دیده می‌شود؛ اما در سایر گروه‌ها ویتامین E، خود عاملی در جهت

مقایسه‌ی میانگین آسیب DNA و کمبود پروتامین نشان می‌دهد که با افزایش میانگین کمبود پروتامین، میزان آسیب DNA به صورت هم جهت افزایش می‌یابد (شکل ۴).

### بحث

تخمین زده می‌شود که در حدود نیمی از موارد ناباروری، به علت عوامل پیش گفته باشد. چندین عامل احتمالی که منجر به نقص عملکرد تولید مثلی مردانه می‌شوند، عبارت از استرس‌های اکسیداتیو، نواقص اندوکرینی و افزایش وزن بدن هستند (۲۵-۲۳). سیستم‌های آنتی‌اکسیدان، از جمله سیستم‌های مهم در مهار استرس‌های اکسیداتیو و کاهش عوارض ناشی از ROS می‌باشند (۱۰). این سیستم‌ها با تثبیت میزان ROS در مایع سمینال پلازما و پاکسازی رادیکال آزاد، اسپرم را در برابر صدمات ROS محافظت می‌کنند. ویتامین E به عنوان ویتامین محلول در چربی، به

DNA و پروتئین‌های هسته‌ای است. در فشرده شدن کروماتین اسپرم، پروتئین نقش اساسی دارد (۲۷). در طی مراحل انتهایی اسپرماتوزن در هسته‌ی اسپرم، تغییر ساختار (Remodeling) کروماتین رخ می‌دهد. این تغییر ساختار، ناشی از جابه‌جایی پروتئین‌های هیستونی با پروتئین می‌باشد. وجود پیوندهای دی‌سولفیدی درون و بین مولکولی بین ریشه‌های سیستمین پروتئین، باعث ایجاد تراکم و استحکام می‌شود. سلامت DNA به تراکم ساختار کروماتین بستگی دارد که با جایگزینی پروتئین به جای هیستون‌های هسته‌ای در طی اسپرمیوزن رخ می‌دهد. بنابراین، کمبود پروتئین می‌تواند یکی از عوامل ایجاد کننده‌ی آسیب DNA باشد.

در این مطالعه، مقایسه‌ی میانگین آسیب DNA و کمبود پروتئین نشان می‌دهد که با افزایش میانگین کمبود پروتئین، میزان آسیب DNA به صورت هم جهت افزایش می‌یابد.

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مصرف بیش از حد ترکیبات محتوی آهن و کلسترول، بر روی کیفیت اسپرم اثر می‌گذارد و می‌تواند منجر به بروز اختلالاتی در باروری شود. از این رو با توجه به موارد ذکر شده، به منظور کاهش اثرات سوء این ترکیبات، لازم است از مصرف بالای آن‌ها جلوگیری شود. همچنین مصرف ویتامین E به عنوان نوعی آنتی‌اکسیدان، به همراه این ترکیبات توصیه می‌شود. هر چند انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر در این مورد اجتناب ناپذیر است.

### تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از نتایج طرح تحقیقاتی شماره‌ی

افزایش میانگین درصد کمبود پروتئین می‌باشد. در مطالعات زیادی اثرات سوء آهن به عنوان نوعی ROS، بر روی DNA اسپرم مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج به صورت ضد و نقیض گزارش شده است. در مطالعه‌ای که بر روی اسپرم رت انجام شد ارتباط معنی‌داری بین آسیب DNA و میزان آهن مصرفی وجود داشت (۱۸-۱۶)؛ اما در مطالعه‌ای مشابه که بر روی بیماران تالاسمی انجام گرفت هیچ رابطه‌ای بین این متغیرها پیدا نشد (۱۹).

در مطالعه‌ی حاضر نیز نتایج نشان داد که مصرف ترکیبات محتوی آهن به تنهایی و یا به همراه غذاهای پر کلسترول، آسیب معنی‌داری را در DNA ایجاد می‌کند. به علاوه، میانگین درصد کمبود پروتئین اسپرم را نیز افزایش می‌دهد (۲۲-۲۰).

از جمله عوامل مهم مداخله کننده در این سندرم‌ها، می‌توان به افزایش میزان تری‌گلیسیریدها و کلسترول اشاره کرد. مطالعات نشان داده است که کیفیت اسپرم‌ها به دنبال افزایش وزن بدن، کاهش قابل توجهی پیدا می‌کند. نتایج این مطالعه نشان داد که غذای پر کلسترول به تنهایی و یا به همراه آهن، اثر قابل توجهی در افزایش میانگین درصد کمبود پروتئین دارد. همچنین در همراهی با آهن، آسیب معنی‌داری را در DNA ایجاد می‌کند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که در ایجاد آسیب‌های DNA، عوامل متعددی دخالت دارند و در مواقعی که چند تا از این عوامل همراه با هم باشند، به صورت قابل توجهی آسیب DNA افزایش پیدا می‌کند.

بر خلاف ساختار کروماتین در سلول‌های سوماتیک، کروماتین اسپرم به صورت محکم بسته‌بندی شده است که این تراکم ناشی از ارتباط بین

علوم پزشکی اصفهان و حمایت مالی این دانشگاه انجام شد.

۲۸۹۰۴۵ می باشد که با همکاری استادان محترم گروه علوم تشریح دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه

## References

- Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 1982; 93(2): 298-305.
- Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, et al. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996; 11(4): 837-43.
- Marushige Y, Marushige K. Enzymatic unpacking of bull sperm chromatin. *Biochim Biophys Acta* 1975; 403(1): 180-91.
- Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune JP. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl* 1990; 13(6): 452-62.
- Iranpour FG, Nasr-Esfahani MH, Valojerdi MR, al-Taraihi TM. Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17(1): 60-6.
- Nasr-Esfahani MH, Abasi H, Razavi S, Ashrafi S, Tavalae M. Varicocele: semen parameters and protamine deficiency. *Int J Androl* 2009; 32(2): 115-22.
- Pogany GC, Corzett M, Weston S, Balhorn R. DNA and protein content of mouse sperm. Implications regarding sperm chromatin structure. *Exp Cell Res* 1981; 136(1): 127-36.
- Kemal DN, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2000; 74(6): 1200-7.
- Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003; 9(4): 331-45.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine. 3<sup>rd</sup> ed. New York, NY: Oxford University Press; 1999. p. 617-783.
- Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am* 2002; 29(4): 817-27.
- Hull MG, North K, Taylor H, Farrow A, Ford WC. Delayed conception and active and passive smoking. The Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood Study Team. *Fertil Steril* 2000; 74(4): 725-33.
- Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Nasr MA. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl* 1996; 17(5): 530-7.
- Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, Ghozzi H, Hammami S, et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch Androl* 2003; 49(2): 83-94.
- Chaler Jea SN. Clin chemistry. New Delhi, India: Jaypee Publishers: Medical Publications; 1999.
- Aitken RJ, Buckingham DW, West KM. Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J Cell Physiol* 1992; 151(3): 466-77.
- Wellejus A, Poulsen HE, Loft S. Iron-induced oxidative DNA damage in rat sperm cells in vivo and in vitro. *Free Radic Res* 2000; 32(1): 75-83.
- Lucesoli F, Caligiuri M, Roberti MF, Perazzo JC, Fraga CG. Dose-dependent increase of oxidative damage in the testes of rats subjected to acute iron overload. *Arch Biochem Biophys* 1999; 372(1): 37-43.
- Perera D, Pizzey A, Campbell A, Katz M, Porter J, Petrou M, et al. Sperm DNA damage in potentially fertile homozygous beta-thalassaemia patients with iron overload. *Hum Reprod* 2002; 17(7): 1820-5.
- Corona G, Mannucci E, Schulman C, Petrone L, Mansani R, Cilotti A, et al. Psychobiologic correlates of the metabolic syndrome and associated sexual dysfunction. *Eur Urol* 2006; 50(3): 595-604.
- Demir T, Demir O, Kefi A, Comlekci A, Yesil S, Esen A. Prevalence of erectile dysfunction in patients with metabolic syndrome. *Int J Urol* 2006; 13(4): 385-8.
- Kasturi SS, Tannir J, Brannigan RE. The metabolic syndrome and male infertility. *J Androl* 2008; 29(3): 251-9.
- Pasquali R. Obesity, fat distribution and infertility. *Maturitas* 2006; 54(4): 363-71.
- Pasquali R, Patton L, Gambineri A. Obesity and infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2007; 14(6): 482-7.
- Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM,



- Hamilton BD, Carrell DT. Obesity and male reproductive potential. *J Androl* 2006; 27(5): 619-26.
26. Traber MG, Packer L. Vitamin E: beyond antioxidant function. *Am J Clin Nutr* 1995; 62(6 Suppl): 1501S-9S.
27. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 1991; 44(4): 569-74.

## Effect of Cholesterol, Iron and Vitamin E on Protamine Deficiency and DNA Fragmentation of Male Rabbit Sperm

Nazem Ghasemi MSc<sup>1</sup>, Gholam-Reza Dashti PhD<sup>2</sup>, Fatimah Amoozgar<sup>3</sup>, Seyed-Ahmad Vaez<sup>4</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** The role of vitamin E as an antioxidant and iron-containing compounds on DNA is not well defined. So, recent study was carried out to determine the role of vitamin E and iron, as both separate and combined effect on sperm protamine deficiency and DNA fragmentation in male rabbits.

**Methods:** This study included 42 male rabbits which were randomly divided into seven groups each containing six rabbits. They were all treated under special diets for 6 weeks. After this period the animals were anesthetized and sacrificed. The epididymis duct and vas deferens were dissected and their sperms were extracted from it by Ham's f10 solution. Sperm DNA fragmentation and protamine deficiency were evaluated by the acridine orange and chromomycin A3 staining, respectively.

**Findings:** The mean values of protamine deficiency and DNA fragmentation were significantly higher in group that concomitant use of cholesterol and iron. In addition, Vitamin E as an antioxidant agent has a significant effect in reducing these damages.

**Conclusion:** Vitamin E as an antioxidant, decrease sperm DNA damage resulting from the consumption of foods high in cholesterol and iron.

**Keywords:** Cholesterol, Iron, Vitamin E, DNA fragmentation, Protamine deficiency, Sperm

**Citation:** Ghasemi N, Dashti GhR, Amoozgar F, Vaez SA. **Effect of Cholesterol, Iron and Vitamin E on Protamine Deficiency and DNA Fragmentation of Male Rabbit Sperm.** J Isfahan Med Sch 2014; 31(259): 1769-78

1- PhD Student, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of medical sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Senior Demonstrator, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- MSc Student, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Gholam Reza Dashti PhD, Email: dashti@med.mui.ac.ir