

## بررسی تأثیر درمان‌های آنتی‌اکسیداتیو بر روی DNA فراگمانتاسیون اسپرم و نتایج بارداری در IUI

سونیا صادقپور<sup>۱\*</sup>، عالیه قاسم‌زاده<sup>۲</sup>، محمد نوری<sup>۳</sup>، شهلا دانایی<sup>۴</sup>، حجت قاسم نژادبرنجی<sup>۵</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۳/۰۷/۰۷ تاریخ پذیرش ۱۳۹۳/۰۹/۲۵

## چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** حدود نیمی از علل ناباروری مربوط به مردان هست. یکی از علل مهم ناباروری در مردان وجود رادیکال‌های آزاد در مایع سمینال هست که باعث اکسیداسیون DNA اسپرم و DNA فراگمانتاسیون اسپرم شده و در نهایت موجب کاهش قدرت حرکتی و باروری اسپرم می‌شود. بین آسیب DNA اسپرم و تشکیل جنین، بلاستوسیت، رشد جنین و بارداری ارتباط معکوس و معنی‌داری وجود دارد. تحقیقات نشان داده‌اند که مواد آنتی‌اکسیدان می‌توانند با خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد در مایع سمینال از آسیب جلوگیری کنند. این مطالعه اثر Vit E, Vit C, Zn و امگا ۳ (w3) را بر میزان فراگمانتاسیون DNA اسپرم و پیامد حاملگی در زوج‌های کاندید IUI بررسی می‌کند.

**مواد و روش کار:** در یک مطالعه کارآزمایی بالینی شاهد دار تصادفی شده، تعداد ۱۵۰ زوج نازای ۲۵-۴۰ ساله کاندید IUI مراجعه‌کننده به بیمارستان الزهرای تبریز را که واجد معیارهای ورود به مطالعه بودند در ۵ گروه ۳۰ تایی مورد بررسی قرار دادیم. گروه شاهد، گروه دریافت‌کننده Zn، گروه دریافت‌کننده امگا ۳، گروه Vit C و گروه E Vit. نمونه‌گیری به صورت غیراحتمالی ساده صورت پذیرفت. تمامی گروه‌ها به مدت ۲ ماه تحت درمان قرار گرفتند و بعد از درمان میزان اندکس فراگمانتاسیون (DFI) DNA و نتایج حاملگی بعد از IUI مورد مقایسه قرار گرفت.

**یافته‌ها:** میزان فراگمانتاسیون (DFI) DNA در گروه شاهد در نمونه‌گیری اول  $34/7 \pm 3/66$  درصد و در نمونه‌گیری دوم  $5/4 \pm 3/3$  بود، در دریافت‌کننده‌های Zn قبل از درمان  $2/14 \pm 33/60$  بوده که پس از درمان به  $2/9 \pm 21$  کاهش یافت، در دریافت‌کننده‌های ویتامین C قبل از درمان  $5/36 \pm 38$  بوده که پس از درمان به  $5/4 \pm 26/9$  کاهش یافت، در دریافت‌کننده‌های امگا ۳ قبل از درمان  $37/2 \pm 4/72$  بود که پس از درمان به  $5/3 \pm 22/6$  کاهش یافت و در دریافت‌کننده‌های ویتامین E قبل از درمان  $37/1 \pm 3/54$  بود که این میزان بعد از درمان به  $3/09 \pm 21$  کاهش یافت. این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار بود. ( $P < 0/001$ )؛ اما میزان حاملگی در بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت.

**بحث و نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و پاسخ به درمان بهتر در گروه‌های دریافت‌کننده آنتی‌اکسیدان نسبت به گروه شاهد می‌توان بیان کرد که درمان با آنتی‌اکسیدان‌ها باعث کاهش میزان فراگمانتاسیون DNA اسپرم شده و تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های دریافت‌کننده درمان و شاهد مشاهده گردید و در بین گروه‌ها گروه دریافت‌کننده ویتامین E بیشترین کاهش در DFI را نشان می‌دهد. در بررسی ما، نتایج حاصل از IUI در گروه‌های دریافت‌کننده آنتی‌اکسیدان و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

**کلمات کلیدی:** درمان‌های آنتی‌اکسیداتیو، فراگمانتاسیون DNA اسپرم، تلقیح داخل رحمی (IUI)، DFI

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره دوازدهم، ص ۱۰۵۹-۱۰۵۰، اسفند ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: مرکز تحقیقات سلامت زنان و باروری دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تلفن: ۰۴۱ ۳۵۵۴۱۲۲۱

Email: h\_ghasem\_nejad@yahoo.com

## مقدمه

بدون استفاده از روش‌های پیشگیری از بارداری اطلاق می‌شود. طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت شکست در بارداری، بیش از ۸۰ میلیون فرد را در دنیا درگیر کرده است (۱).

ناباروری یک اختلال شایع است که به عدم رخداد بارداری پس از یک سال در یک زوج، باوجود انجام مقاربت صحیح و

<sup>۱</sup> رزیدنت بیماری‌های زنان و زایمان، مرکز تحقیقات سلامت زنان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز (نویسنده مسئول)

<sup>۲</sup> دانشیار بیماری‌های زنان و زایمان، مرکز تحقیقات سلامت زنان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

<sup>۳</sup> استاد بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

<sup>۴</sup> فلوشیپ نازایی، مرکز تحقیقات سلامت زنان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

<sup>۵</sup> رزیدنت بیولوژی تولید مثل دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی

دارند و بسته به غلظت و ماهیت آن‌ها نقش‌های فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی مهمی را در فرآیندهای زیستی بازی می‌کنند (۴). در شرایط فیزیولوژیکی، تولید مقادیر اندک ROS طی متابولیسم هوازی، برای ظرفیت‌پذیری<sup>۵</sup>، واکنش آکروزومی، لقاح اسپرم با تخمک و همچنین برای بقا اسپرم ضروری است (۴)؛ اما تولید کنترل نشده ROS توسط اسپرم‌های نابالغ و لوکوسیت‌ها در مایع سمینال منجر به اختلال در اسپرم‌های طبیعی می‌گردد (۴). استرس اکسیداتیو به طور کلی برای بیان شرایطی به کار می‌رود که میزان اکسیدان‌ها بالا باشد و یا میزان آنتی‌اکسیدانها در سلول کم باشد. اسپرماتوزوآ به دلیل داشتن مقادیر بالای اسیدهای چرب غیراشباع دارای چند پیوند دوگانه<sup>۶</sup> در غشای پلاسمایی و میزان فوق العاده ناچیز آنتی‌اکسیدان‌های سیتوپلاسمی نسبت به آسیب اکسیداتیو بسیار حساس است. استرس اکسیداتیو سبب افزایش شکستگی در رشته‌های DNA (fragmentation) می‌شود. شواهد محکمی وجود دارد که قطعه قطعه شدن DNA که به طور شایع در اسپرماتوزوآی افراد نابارور مشاهده می‌شود به خاطر غلظت بالای ROS ایجاد می‌شود (۲). لقاح بوسیله اسپرم حاوی DNA شکسته شده، ممکن است منجر به کاهش قدرت باروری اسپرم، عدم موفقیت سیکل‌های لقاح خارج رحمی، کاهش کیفیت جنین‌های حاصل، کاهش رشد جنین و افزایش سقط جنین در مراحل اولیه بارداری شود (۵). آلودگی‌های محیطی و شغلی، عفونت‌های دستگاه ادراری - تناسلی، افزایش سن، رژیم غذایی نامناسب، استفاده از برخی داروها و مصرف سیگار و الکل و... به‌عنوان عوامل مؤثر در کاهش یکپارچگی DNA اسپرم می‌باشد (۶). کاهش یکپارچگی DNA همچنین سبب کاهش میزان موفقیت در انجام تکنولوژی لقاح مصنوعی شامل IUI، IVF، ICSI می‌شود.

مایع منی طبیعی حاوی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی نظیر سوپر اکسید دسموتاز و کاتالاز و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی نظیر آسکوربات،  $\alpha$ -توکوفرول و پیرووات است که نقش حفاظت از اسپرماتوزوآ در برابر استرس اکسیداتیو را بر عهده دارند (۷). در شرایط طبیعی، ROS تولید شده در مایع منی، به طور پیوسته توسط آنتی‌اکسیدان‌های مایع منی غیرفعال می‌شود، بنابراین یکی از دلایل ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو در مایع منی ناشی از عدم تعادل بین تولید ROS و غیرفعال شدن آن توسط آنتی‌اکسیدان‌ها است (۷). به طور تقریبی ۱۰ درصد از اسپرماتوزوای مردان بارور و ۲۵-۲۰ درصد از اسپرماتوزوای مردان نابارور دارای سطوحی از فراگماتاسیون DNA است (۸). پارامترهای اسپرمی با

به گزارش سازمان بهداشت جهانی در ایران یک‌چهارم زوجها ناباروری اولیه را در طول زندگی مشترکشان تجربه می‌کنند که از میانگین جهانی بالاتر است (۱) طی ۵۰ سال گذشته دانشمندان دریافتند که تمام یا بخشی از ۴۰ تا ۵۰ درصد ناباروری‌ها، به عوامل مردانه مربوط می‌شود. هرچند بیش از یک قرن است که آنالیز مایع منی<sup>۱</sup> به‌عنوان آزمایشی روتین و ساده جهت ارزیابی توانایی باروری مردان به کار رفته است با این‌وجود در بسیاری از موارد پارامترهای تعداد، قدرت تحرک و مورفولوژی اسپرم نمی‌توانند به‌عنوان فاکتورهای پیش‌بینی‌کننده توانایی باروری مردان محسوب گردند بنابراین طی مطالعات متعدد، به‌کارگیری آزمایش‌های عملکردی اسپرم<sup>۲</sup> پیشنهاد شده است. آزمون‌های متعددی بر مبنای عملکرد فیزیولوژی و مولکولی اسپرم در روند لقاح معرفی شده‌اند، از جمله توانایی اتصال اسپرم به لایه شفاف اطراف تخمک در اولین مرحله لقاح، قدرت نفوذ شیمیایی اسپرم و به عبارتی توانایی انجام واکنش آکروزومی<sup>۳</sup> ارزیابی وضعیت DNA و کروماتین اسپرم را می‌توان نام برد (۲). کیفیت کروماتین اسپرم، عامل مهمی در حفظ پتانسیل و قابلیت باروری در مردان می‌باشد DNA اسپرم، نیمی از ماده ژنتیکی جنین حاصل از لقاح را تشکیل می‌دهد، بنابراین نیمی از درصد موفقیت باروری، منوط به انتقال بدون نقص DNA اسپرم در طول مسیر حرکت آن از بیضه تا لوله‌های فالوپ در خانم‌ها و محل انجام لقاح تخمک و تشکیل زیگوت می‌باشد (۲). تراکم کروماتین، باعث تسهیل در انتقال اسپرم و محافظت ژنوم در برابر عوامل مخرب می‌شود. فشرده بودن DNA و حضور آنتی‌اکسیدان‌ها در مایع منی، DNA اسپرم را از آسیب اکسیداتیو محافظت می‌نماید. روش‌های متعددی برای ارزیابی سلامت و آسیب‌های احتمالی کروماتین اسپرم وجود دارد که برخی به بررسی شکست DNA و برخی دیگر به بررسی تراکم و بلوغ اسپرم می‌پردازند. ساختار کروماتین اسپرم به‌عنوان یکی از شاخص‌های مهم کیفیت مایع سمینال در پیش‌گویی قدرت باروری مردان، شناخته شده است. به‌طوری‌که ارزیابی این شاخص می‌تواند به‌عنوان آزمایشی تکمیلی در کنار آزمون‌های معمول مایع سمینال، بسیار ارزشمند باشد (۳).

افزایش در میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن بر روی غشاء سلول، DNA و میتوکندری‌ها مؤثر است و به نظر می‌رسد این تأثیر به‌عنوان واسطه‌ای باشد تا آبشار آپوپتوزی را از تنظیم خارج کند این شرایط ناگوار در اثر افزایش متابولیت‌های واکنش‌پذیر اکسیژن<sup>۴</sup> ایجاد می‌شود. این اکسیدان‌ها به خانواده رادیکال‌های آزاد تعلق

<sup>1</sup> Semen Analysis

<sup>2</sup> Sperm Function Tests

<sup>3</sup> Acrosome reaction

<sup>4</sup> (ROS) Reactive Oxygen Species

<sup>5</sup> Capacitation

<sup>6</sup> Polyunsaturated fatty acids

جنسی می‌باشد، روی عنصری حیاتی برای تولید مثل محسوب می‌شود. روی قادر است رادیکال‌های آزاد القا شده با عوامل مختلف از جمله اشعه‌های یونیزان را پاک سازی نموده و به‌عنوان آنتی‌اکسیدانی با توان حفاظتی بالا شناخته شود (۱۵).

یکی از آنتی‌اکسیدان‌های مهم پلاسما سمینال که حدود ۶۵ درصد از کل آنتی‌اکسیدان‌های شکست زنجیره را تشکیل می‌دهد اسید آسکوربیک (ویتامین C) می‌باشد (۱۶). غلظت بالای اسید آسکوربیک در پلاسما احتمالاً به نقش آن در حفظ اسپرماتوزوآ از حملات ROS و جلوگیری از آسیب اکسیداتیو DNA اشاره می‌کند (۱۶). اسید آسکوربیک قادر است به طور کاتالیتیکی انتقال فعال یون‌های فلزی اکسیدکننده و رادیکال‌های آزاد را کاهش دهد.

ویتامین E یک آنتی‌اکسیدان قوی است که نقش حمایتی آن در کیفیت و کمیت اسپرم، لقاح و باروری در انسان‌ها گزارش شده است این ویتامین به مقدار زیاد در سلول‌های سرتولی، اسپرماتوسیت و به مقدار کمتر در اسپرماتیدهای گرد وجود دارد (۱۷). ویتامین E از آسیب اسیدهای چرب غیراشباع بافت‌ها در برابر رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون ممانعت کرده و باعث پایداری غشاء سلول‌ها می‌شود. ویتامین E پراکسیداسیون چربی‌ها را در میتوکندری و میکروزوم بیضه مهار کرده اثرات مخرب استرس اکسیداتیو ناشی از عوامل استرس‌زا را کاهش می‌دهد (۱۷).

در نهایت یکی از علل مهم ناباروری در مردان وجود رادیکال‌های آزاد در مایع سمینال می‌باشد که باعث اکسیداسیون DNA اسپرم و تغییر بازهای آلی در ساختمان DNA و ایجاد فراگمانتاسیون می‌گردد و در نهایت موجب تخریب اسپرم یا کاهش قدرت حرکتی و باروری اسپرم می‌شود. لذا در این مطالعه ما بر آن شدیم تا تأثیر ویتامین‌های E, C, و مکمل Zn و W3 را بر روی میزان فراگمانتاسیون DNA اسپرم و نیز نتایج بارداری آن در زوجین کاندیدای (intra uterine insemination) IUI مراجعه کننده به بخش نازایی بیمارستان الزهرا قبل و بعد از دو ماه درمان مردان مبتلا به فراگمانتاسیون DNA اسپرم را مورد ارزیابی قرار دهیم.

### مواد و روش کار

در یک مطالعه کارآزمایی بالینی تصادفی شاهددار که در بخش نازایی بیمارستان الزهرا تبریز از اول آبان ماه سال ۱۳۹۱ هجری شمسی لغایت بهمن ماه سال ۱۳۹۲ انجام شد تعداد ۱۵۰ زوج نازای در محدوده سنی بین ۲۵-۴۰ ساله کاندید IUI را در پنج گروه ۳۰ تایی به صورت ذیل وارد مطالعه کردیم.

فراگمانتاسیون DNA ارتباط معنی داری دارد به طوری که با افزایش میزان فراگمانتاسیون DNA، درصد اسپرم‌های دارای تحرک و مورفولوژی طبیعی کاهش می‌یابد (۸) این مطلب موید این نکته است که عوامل مؤثر در فراگمانتاسیون DNA (تغییر در فرآیند بلوغ، آپوپتوز و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن) می‌توانند بر ساختار و عملکرد اسپرم تأثیر گذارند. همچنین ضایعات موجود در اسپرم ممکن است در بروز سقط‌های مکرر در همسران این مردان دخیل باشد (۸). بین آسیب DNA اسپرم و تشکیل جنین، بلاستوسیت، رشد جنین و بارداری ارتباط معکوس و معنی داری وجود دارد (۹). دلایل ایجاد آسیب در DNA اسپرم مانند ناباروری در مردان پیچیده و وابسته به فاکتورهایی از جمله عوامل درون بیضه ای یا خارج از بیضه ای است (۱۰).

آنتی‌اکسیدان‌ها نقش گسترده ای در آندروولوژی بازی می‌کنند. جلوگیری از ساخت ROS اولین خط دفاعی آنتی‌اکسیدان‌ها بر علیه آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشد (۱۱) این ترکیبات باعث محافظت اسپرماتوزوآ در برابر ROS تولید شده توسط اسپرماتوزوای غیرطبیعی، خنثی کردن ROS تولید شده توسط لکوسیت‌ها، ممانعت از قطعه قطعه شدن DNA، بهبود کیفیت مایع منی در افراد سیگاری، کاهش آسیب سرما به اسپرماتوزوآ، ممانعت از بلوغ اسپرم نابالغ و افزایش حرکت اسپرماتوزوآ می‌شوند (۱۲). آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که واکنش زنجیره‌های اکسیداتیو را می‌شکنند و بدین وسیله استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهند.

امروزه محققین بر این باورند که غنی کردن محیط اطراف اسپرم با آنتی‌اکسیدان‌ها، احتمالاً منجر به حفاظت اسپرماتوزوآ بر علیه آسیب‌های القاء شده با استرس اکسیداتیو می‌گردد (۱۳) در تحقیقات گسترده نقش چهارآنتی‌اکسیدان در باروری مردان اثبات شده است که عبارتند از: اسیدهای چرب امگا ۳، روی (Zn)، ویتامین C، ویتامین E. به طور کلی اسیدهای چرب امگا ۳ در باروری مردان، بیان ژن دخیل در اسپرماتوزن، مورفولوژی، تعداد و حرکت اسپرم و همچنین متابولیسم استرول در بیضه‌ها نقش مهمی دارند. ترکیب اسیدهای چرب موجود در اسپرماتوزوآ یکی از عوامل مهم و مؤثر بر باروری به شمار می‌رود (۱۴). غلظت اسیدهای چرب امگا ۳ موجود در اسپرماتوزوآ در مردان نابارور کمتر از سایر مردان است. روی (Zn) به‌عنوان عامل کمکی<sup>۷</sup> بیش از ۳۰۰ متالوآنزیم شرکت کننده در متابولیسم پروتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، رونویسی DNA و سنتز پروتئین عمل می‌کند به دلیل این که رونویسی DNA بخش مهمی از تکوین سلول‌های

<sup>7</sup> Cofactor

DNA فراگمانتاسیون اسپرم نیز در دو مرحله قبل از شروع درمان و بعد از اتمام آن انجام شد. نمونه‌های با SDF کمتر از ۱۵ درصد نمونه با میزان شکست خیلی پایین ارزیابی شده و رتبه خوب به آن تعلق گرفت. نمونه‌های با SDF بین ۳۰-۱۵ درصد نمونه با میزان شکست پایین ارزیابی شده و رتبه متوسط به آن تعلق گرفت و نمونه‌های با SDF بالاتر از ۳۰ درصد نمونه با میزان شکست بالا ارزیابی شده رتبه غیر طبیعی به آن تعلق گرفت (۵۱).

روش انجام IUI: برای افزایش موفقیت قبل از انجام IUI کلومیفن سیترات و HMG برای تحریک تخمک گذاری تجویز گردید. کلیه زنان در روز سوم سیکل بعد از انجام سونوگرافی واژینال قرص کلومیفن ۱۰۰ میلی‌گرم از روز سوم قاعدگی به مدت ۵ روز مصرف کرده و آمپول HMG ۷۵ واحد عضلانی در روزهای ۶ و ۷ تزریق کرده و بیماران مجدداً در روزهای ۱۱ یا ۱۲ سیکل با سونوگرافی واژینال پیگیری شده و زمانیکه حداقل یک فولیکول ۱۸ میلی‌متری در تخمدان رویت می‌شد آمپول HCG ۵۰۰۰ واحد به صورت عضلانی تزریق شده و ۳۶ ساعت بعد ۰.۵ سی سی از اسپرم شسته شده را پس از آماده سازی همسر و قرار دادن در وضعیت لیتوتومی توسط کاتتراز سرویکس وارد کرده و به آرامی در رحم تزریق می‌کردیم (IUI انجام می‌شد). برای حمایت فاز لوتئال ۵۰ میلی‌گرم آمپول پروژسترون روزانه تا دو هفته عضلانی تجویز شد. در روزهای ۱۰ و ۱۳ پس از تلقیح دو بار برای اثبات حاملگی HCG  $\beta$  اندازه‌گیری شده که در صورت مثبت بودن حاملگی بیوشیمیایی اثبات گردیده و در صورتیکه دو هفته بعد از تأخیر قاعدگی ساک حاملگی توسط سونوگرافی رویت شود حاملگی کلینیکال اثبات می‌شد (۳۹).

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ استفاده گردید. متغیرهای کمی به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار و داده‌های کیفی به صورت تعداد و درصد گزارش شدند. جهت مقایسه میانگین متغیرهای کمی در ۵ گروه از آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه (OneWay ANOVA) استفاده شد و در صورت معنی‌دار بودن این آزمون، برای مقایسه دو به دو گروه‌ها از آزمون تعقیبی Tukey HSD استفاده شد. برای مقایسه میانگین قبل و بعد DFI هر یک از گروه‌ها بطور جداگانه از آزمونتی زوجی paired samples t-test استفاده شد. حد معنی‌داری آماری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

در این مطالعه غیر از اصول کلی تجویز داروها، منع اخلاقی خاصی وجود نداشته و کلیه مراحل درمان براساس رفرانس‌های موجود بودند و داروهای تجویزی ویتامین بوده و عارضه جانبی خاصی نداشتند ولی با این حال جهت انجام مطالعه از هریک از بیماران، رضایت نامه آگاهانه کتبی اخذ شد.

(۱) گروه شاهد

(۲) گروهی که ویتامین C (به میزان ۱۰۰۰ میلی‌گرم در روز) دریافت کردند.

(۳) گروهی که ویتامین E (به میزان ۴۰۰ میلی‌گرم در روز) دریافت کردند.

(۴) گروهی که W3 (به میزان ۱۰۰۰ میلی‌گرم در روز) دریافت کردند.

(۵) گروهی که Zn (به میزان ۳۰ میلی‌گرم در روز) دریافت کردند.

مردان زوجین تمامی گروه‌ها به غیر از گروه شاهد مدت ۲ ماه تحت درمان بودند قبل از درمان و در انتهای آن فراگمانتاسیون DNA اسپرم همه گروه‌ها اندازه‌گیری شد هر پنج گروه در پروسه IUI قرار گرفته و نتایج باروری ثبت گردید. در انتهای مطالعه میزان تأثیر آنتی‌اکسیدانها بر روی فراگمانتاسیون DNA اسپرم و میزان باروری بین گروه‌ها مقایسه گردید.

معیارهای ورود به مطالعه:

- آزمایشات هورمونی طبیعی زن
- زنان نازای کاندید روش IUI
- سن زوجین بیشتر از ۲۵ سال و کمتر از ۴۰ سال
- شاخص توده بدنی بیشتر از  $19 \text{ kg/m}^2$  و کمتر از  $30 \text{ kg/m}^2$
- حداقل یک لوله باز در هیستروسالپینگوگرافی
- عدم وجود سرویسیت یا ضایعه سرویکس در معاینه
- SDF (فراگمانتاسیون DNA اسپرم) در مرد
- عدم اعتیاد به مواد مخدر و سیگار
- عدم وجود واریکوسل

معیارهای خروج:

- آزمایشات هورمونی غیر طبیعی
- گالاکتوره
- هیستروسالپینگوگرافی غیرطبیعی و چسبندگی در لوله‌ها
- سابقه جراحی پرتونئال در زن
- الیگو اسپرمی یا استنواسپرمی شدید مرد که کاندید IVF باشد.

قبل از ورود بیماران به مطالعه با تک تک آن‌ها مصاحبه گردید تا رضایت آن‌ها جهت ورود به این مطالعه جلب شود. همه بیماران پذیرش شده بیش از یکسال سابقه نازایی داشته و از آن‌ها دو بار اسپرموگرام انجام شده بود. بررسی‌های هورمونی، فیزیکی و سنی در همه آن‌ها صورت گرفته و تاریخچه درمانی بیماران ثبت گردید. نمونه‌گیری به شکل غیراحتمالی ساده انجام شد. ارزیابی

است ( $P < 0.001$ ). متوسط درصد تغییرات DFI در این گروه  $39/11 \pm 37/1$  اندازه‌گیری شد.

میزان DFI در گروه دریافت‌کننده مکمل امگا ۳ قبل از درمان  $37/2 \pm 4/72$  بود. این میزان پس از درمان به  $22/6 \pm 3/5$  کاهش یافت. تفاوت قبل و بعد از درمان از نظر آماری معنی‌دار بوده است ( $P < 0.001$ ). متوسط درصد تغییرات DFI در این گروه  $5/61 \pm 39/22$  درصد گزارش شد.

میزان DFI در گروه دریافت‌کننده ویتامین C قبل از درمان  $38 \pm 5/36$  بود. این میزان پس از درمان به  $26/9 \pm 5/4$  کاهش یافت. تفاوت قبل و بعد از درمان از نظر آماری معنی‌دار بوده است ( $P < 0.001$ ). متوسط درصد تغییرات DFI در این گروه  $29/49 \pm 8/89$  درصد گزارش شد.

مقایسه تغییرات بین DFI در پنج گروه مورد بررسی نشان می‌دهد که تجویز ویتامین E توانسته به طور قابل توجهی در کاهش فراگماتاسیون مؤثر باشد ( $P < 0.001$ ).

آزمون توکی برای مقایسه دو بدو گروهها از نظر دو متغیر انجام شد که در همه گروهها معنی‌دار بود. بجز دو گروه دریافت‌کننده روی و امگا ۳ ( $p = 0.912$ ) و گروه دریافت‌کننده ویتامین C و روی ( $P = 0.021$ ).

میزان حاملگی در گروه شاهد ۴ نفر (۱۳.۳ درصد) و در گروه دریافت‌کننده ویتامین E، ۶ نفر (۲۰ درصد) و در گروه دریافت‌کننده Zn، ۴ نفر (۱۳.۳ درصد) و در گروه دریافت‌کننده امگا ۳، ۵ نفر (۱۶.۶ درصد) و در گروه دریافت‌کننده ویتامین C، ۵ نفر (۱۶.۶ درصد) بود که تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه‌های فوق وجود نداشت.

## یافته‌ها

میانگین سنی مردان شرکت کننده در مطالعه  $33/7 \pm 4/7$  و میانگین سنی زنان  $30/3 \pm 3/8$  سال بود که در محدود سنی ۲۵ تا ۴۰ سال قرار داشتند؛ و میانگین شاخص توده بدنی (BMI) زنان در این مطالعه  $24/8 \pm 3/7$  می‌باشد. میانگین مدت ناباروری بیماران  $3/3 \pm 2/6$  سال بود. ناباروری افراد مورد مطالعه ۵۶ درصد (۸۴ مورد) به صورت اولیه و ۴۴ درصد (۶۶ مورد) به صورت ثانویه می‌باشد.

ضخامت آندومتر در روز تزریق HCG در ۲۶ نفر کمتر از ۸ میلی‌متر (۱۷.۳ درصد) و ۱۲۴ نفر بالای ۸ میلی‌متر (۸۲.۶ درصد) اندازه‌گیری شد.

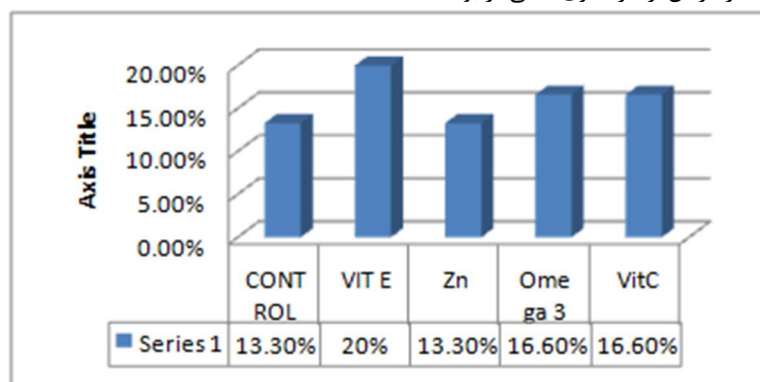
تعداد فولیکول در روز IUI در ۷۲ نفر (۴۸ درصد) ۳ یا بیشتر و در ۷۸ نفر (۵۲ درصد) کمتر از ۳ بود.

بررسی میزان فراگماتاسیون DNA اسپرم:

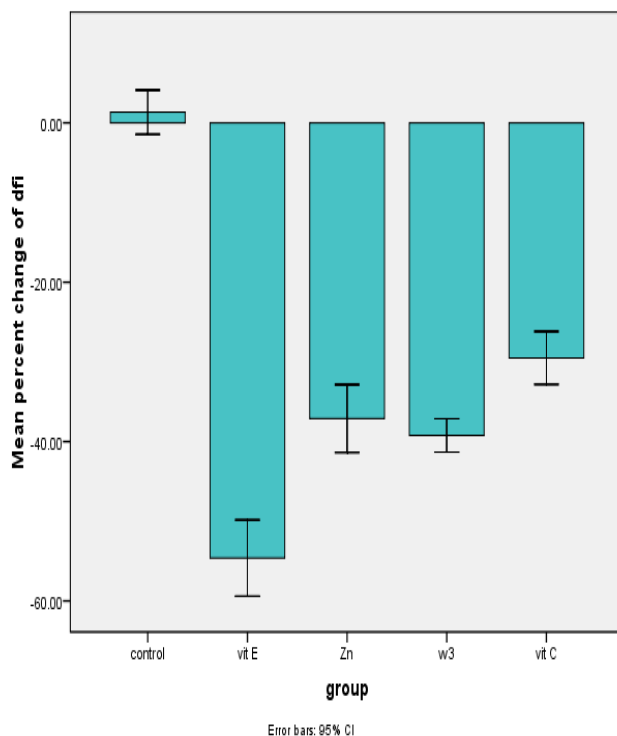
میزان DFI در گروه شاهد در نوبت اول  $34/7 \pm 3/66$  و در نوبت دوم  $35/3 \pm 5/4$  شد تفاوت در دو نوبت نمونه‌گیری از نظر آماری معنی‌دار نبوده است ( $P = 0.213$ ). متوسط درصد تغییرات DFI در گروه شاهد  $1/33 \pm 7/41$  درصد گزارش شد.

میزان DFI در گروه دریافت‌کننده ویتامین E قبل از درمان  $37/1 \pm 3/54$  بود و این میزان پس از درمان به  $21 \pm 3/09$  کاهش یافت. تفاوت قبل و بعد از درمان از نظر آماری معنی‌دار بوده است ( $P < 0.001$ ). متوسط درصد تغییرات DFI در این گروه  $54/6 \pm 12/8$  درصد گزارش شد.

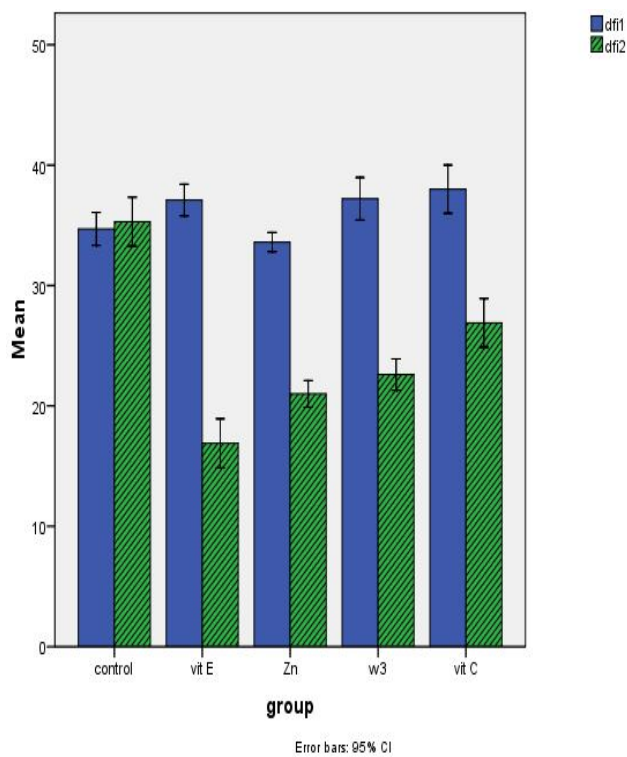
میزان DFI در گروه دریافت‌کننده مکمل روی (Zn) قبل از درمان  $33/6 \pm 2/14$  بود. این میزان پس از درمان به  $21 \pm 2/9$  کاهش یافت. تفاوت قبل و بعد از درمان از نظر آماری معنی‌دار بوده



نمودار (۱): مقایسه میزان حاملگی در گروه‌های مختلف



نمودار (۲): مقایسه میانگین درصد تغییرات DFI در گروه‌های مختلف



نمودار (۳): مقایسه میانگین DFI قبل و بعد از مداخله در گروه‌های مختلف

**جدول (۱): مقایسه میانگین DFI قبل و بعد از مداخله در گروه‌های مختلف به صورت جداگانه**

Paired Samples Statistics					
	group	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
control	Pair 1	dfi1 34.70	30	3.669	.670
		dfi2 35.30	30	5.440	.993
vit E	Pair 1	dfi1 37.10	30	3.537	.646
		dfi2 16.90	30	5.467	.998
Zn	Pair 1	dfi1 33.60	30	2.143	.391
		dfi2 21.00	30	2.983	.545
w3	Pair 1	dfi1 37.20	30	4.723	.862
		dfi2 22.60	30	3.500	.639
vit C	Pair 1	dfi1 38.00	30	5.363	.979
		dfi2 26.90	30	5.410	.988

**بحث و نتیجه‌گیری**

۲۰-۱۵ درصد از زوجین علی‌رغم تلاش برای بچه دار شدن به‌عنوان زوج نابارور شناخته می‌شوند که علل نیمی از موارد ناباروری به علت فاکتور مردانه می‌باشد. بخش عمده ناباروری مردان با پارامترهای مختل اسپرم همراه می‌باشد. لذا این افراد کاندید استفاده از روش‌های کمک باروری بوده و ممکن است به کرات این درمان‌ها را تجربه کرده باشند. یکی از عوامل بسیار مهم در موفقیت لقاح گامت‌ها، سلامت DNA و کروماتین اسپرم است. مطالعات مختلف نشان می‌دهند که هرچه کیفیت پارامترهای اصلی اسپرم پایین‌تر باشد سلامت DNA اسپرم هم با مشکلات بیشتری مواجه است. لذا قبل از انتخاب روش درمانی مناسب برای این زوجین ارزیابی میزان شکست DNA اسپرم (SDF) توصیه می‌شود. در بسیاری از این موارد در صورت مشخص شدن وجود آسیب در DNA اسپرم با انجام مداخلات درمانی مناسب امکان بهبود کیفیت اسپرم فراهم می‌باشد. اطمینان از سلامت DNA اسپرم یکی از موارد مهم در فرآیند باروری تخمک و تداوم تکامل جنین و موفقیت روش‌های کمک باروری است. ارزیابی سلامت DNA اسپرم در مردانی با سن بالا، زوجین مبتلا به سقط مکرر جنین، مردان مبتلا به واریکوسل یا مردانی که در تماس با مواد سمی و آلودگی‌های محیطی و یا مبتلا به سرطان پیش از شروع شیمی درمانی هستند، توصیه می‌شود. لذا در تحقیق حاضر ما به امتحان این فرضیه پرداختیم که آیا استفاده از ویتامین C, E و مکمل روی (Zn) و امگا ۳ به‌عنوان درمان‌های آنتی‌اکسیداتیو قادر به کاهش DFI اسپرم می‌باشد؟

نتایج به دست آمده از مطالعه ما با نتایج مطالعات قبلی در این زمینه قابل مقایسه می‌باشد. دریک مطالعه که در سال ۲۰۰۶ Song و همکاران روی تأثیر ویتامین C بر روی میزان سلامت DNA اسپرم بررسی کردند، نشان دادند که با کاهش اسید آسکوربیک مایع منی میزان صدمه به DNA در اسپرم‌ها افزایش و درصد تحرک آن‌ها کاهش می‌یابد. در مطالعه ما نیز پاسخ به درمان در گروه دریافت‌کننده ویتامین C اختلاف معنی‌داری را با گروه کنترل نشان داد لذا ویتامین C قادر به کاهش DFI خواهد بود (۱۸).

در مطالعه Hammadeh و همکاران در سال ۲۰۰۱ نقش آنتی‌اکسیدانی Zn را به اثبات رساندند و همچنین نقش روی را با القای سیگنال‌های پاسخ به استرس در مقابله با استرس اکسیداتیو و تولید اسپرم، افزایش قابلیت زیستی آن و ممانعت از تخریب اسپرماتوزئید به اثبات رسیده است. در بررسی‌های ما نیز روی (Zn) قادر به کاهش DFI به طور معنی‌داری بود که با مطالعه فوق همخوانی داشت (۱۹).

در مطالعه Greco و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داده شد که آنتی‌اکسیدان‌ها قطعه قطعه شدن DNA اسپرم را در اثر استرس اکسیداتیو را کاهش داده و استفاده روزانه از مکمل ویتامین E به مدت ۲ ماه باعث کاهش تعداد اسپرماتوزوای دچار آسیب در DNA می‌شود در مطالعه ما نیز ویتامین E بیشترین میزان کاهش DFI را در بین گروه‌ها نشان داد (۶).

در مطالعه Safarinejad و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داده شد که غلظت اسیدهای چرب امگا ۳ موجود در اسپرماتوزوا در

کاهش مربوط به گروه دریافت‌کننده روی بود که البته اختلاف معنی‌داری را با گروه دریافت‌کننده امگا ۳ نشان نداد. در بررسی ما، نتایج حاصل از IUI در گروه‌های دریافت‌کننده آنتی‌اکسیدان و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری با هم نداشته است اما با توجه به اینکه میزان فراگمانتاسیون اسپرم بهبود یافته است شاید استرس‌های مختلف روحی و روانی بر باروری افراد تاثیر گذاشته باشد و یا شاید نداشتن اختلاف به دلیل کمتر بودن حجم نمونه‌های ما در هر گروه بوده باشد و یا نیاز به تکرار دفعات سیکل IUI باشد. همچنین تغییر شیوه زندگی و آلاینده‌های صنعتی که در اطراف ما وجود دارد می‌تواند باعث کاهش قدرت باروری افراد شود و لذا اصلاح شیوه زندگی نیز برای جلوگیری از مواجهه با استرس‌های اکسیداتیو توصیه می‌شود. در نهایت پیشنهاد می‌شود برای بررسی تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها بر نتایج حاملگی بررسی در حجم نمونه بالاتری انجام گیرد و همچنین استفاده توأم چندآنتی‌اکسیدان با هم شاید پیامد حاملگی را بهبود بخشد.

## References:

1. Rowe PJ. WHO manual for the standardized investigation, diagnosis, and management of the infertile male. Cambridge: Cambridge University Press; 2000.
2. Sakkas D, Tomlinson M. Assessment of sperm competence. *Semin Reprod Med* 2000; 18: 133-9.
3. Oehninger S. Strategies for the infertile man. *Semin Reprod Med* 2001; 19: 231-7.
4. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res* 2009; 129(4):357-67.
5. Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod* 1998; 13(4):998-1002.
6. Greco E, Iacobelli M, Rienzi L. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* 26, 2005, 349-53.
7. Goyanes VJ, Ron-Corzo A, Costas E, Maneiro E. Morphometric categorization of the human oocyte and early conceptus. *Hum Reprod* 1990; 5(5):613-8.

مردان نابارور کمتر از سایر مردان است و به این نتیجه رسیدند که ROS احتمالاً با پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع PUFA (Poly Unsaturated Fatty Acid) در ناحیه‌ی سروقطعه میانی اسپرم، اکسیداسیون پروتئین و DNA اسپرم و به موجب آن تغییر مورفولوژی اسپرم، کاهش تحرک اسپرم و عدم ادغام موفقیت آمیز اووسیت-اسپرماتوزوآ در نقص عملکرد اسپرم، نقش اساسی دارد (۲۰). در بررسی ما نیز امگا ۳ به طور معنی‌داری باعث کاهش DFI در مقایسه با گروه کنترل شد.

براساس یافته‌های مطالعه ما می‌توان نتیجه گرفت، استفاده از درمان‌های آنتی‌اکسیداتیو می‌تواند باعث بهبود فراگمانتاسیون DNA اسپرم شود. در این مطالعه که به بررسی و مقایسه اثر ویتامین E، C، و مکمل روی (Zn) و امگا ۳ بر میزان DFI پرداخته شد، میزان پاسخ به درمان در همه گروه‌های مداخله نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بوده و گروه دریافت‌کننده ویتامین E بیشترین میزان کاهش را در DFI نشان داد و کمترین میزان

8. Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during inVtro maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 2003; 59(3-4):939-49.
9. Donnelly E.T, McClure N., Lewis S.E. The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis* 1999, 505-12.
10. Kefer J.C, Agarwal A, Sabanegh E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *Int J Urol* 2009;16: 449-57.
11. Kao SH, Chao HT, Chen HW, Hwang TI, Liao TL, Wei YH. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertil Steril* 2007;30.
12. Goto Y, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T. Oxidative stress on mouse embryo development invitro. *Free Radic Biol Med* 1992; 13(1):47-53.
13. Gharagozloo P, Aitken J, The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Human Reproduction* 2011; 26(7): 1628-40.



14. Klotz LO, Kröncke KD, Buchczyk DP, Sies H. Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J Nutrition* 2003; 133(5):1448S-51S.
15. Favier AE. The role of zinc in reproduction. *Biological trace Element Res* 1992; 32(1):363-82.
16. Kemal Duru N, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2000; 74(6):1200-7.
17. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 2007; 43(1):4-15.
18. Song GJ, Norkus EP, Lewis V. Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in fertile men. *Int J Androl* 2006; 29(6):569-75.
19. Hammadeh M.E, Zeginiadev T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W, Strehler E. Predictive value of Sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl* 2001; 46:99.
20. Safarinejad MR, Hosseini SY, Dadkhah F, Asgari MA. Relationship of omega 3 & omega 6 fatty acids with semen characteristics, and anti-oxidant status of seminal plasma: A comparison between fertile & infertile men. *Clin Nutr* 2009; 8.

## EFFECTS OF ANTIOXIDATIVE TREATMENTS ON SPERM DNA FRAGMENTATION AND PREGNANCY RESULTS IN IUI

Sonia Sadeghpour<sup>1\*</sup>, Aliye Ghasemzadeh<sup>2</sup>, Mohammad Nouri<sup>3</sup>, Shahla Danai<sup>4</sup>, Hojat Ghasemnejad Berenji<sup>5</sup>

Received: 29 Sep, 2014; Accepted: 16 Nov, 2014

### Abstract

**Background & Aims:** More than half of all infertility cases are contributed by males. One of the important causes of infertility is free radicals in seminal fluid which causes sperm DNA oxidation and alteration in organic bases in DNA structure that finally leads to sperm destruction and reduction of its movement and fertility ability. Therefore, in addition to semen analysis, sperm function tests are recommended. One of these performance tests is the evaluation of sperm double-stranded DNA. So the effect of vitamins E, C, omega-3W supplementation and zinc (Zn) as a treatment of antioxidative stress on the level of DNA fragmentation of sperm as well as the outcome of pregnancy in IUI candidates couples will be examined. The aim of this study was the evaluation of effects of antioxidative treatment on sperm DNA fragmentation and IUI pregnancy tests.

**Materials & Methods:** In a randomized clinical trial study, 150 infertile IUI candidates who met our inclusion criteria were enrolled in the study. A simple non-probability sampling was performed and 150 infertile couples (aged 25-40 years) attending were classified into five groups of 30 as follows: control group, the group receiving vitamin C, the group receiving vitamin E, the group receiving omega-3, and the group receiving zinc (Zn); all groups were treated for 2 months. Statistical analysis was performed by SPSS, and DNA fragmentation index results were compared between the groups.

**Results:** The mean DFI in group receiving Zn before and after the treatment was  $33.6 \pm 2.14$  and  $21 \pm 2.9$  respectively. The mean DFI in group receiving Vitamin C before and after the treatment was  $38 \pm 5.36$  and  $26.9 \pm 5.4$  respectively, and in the control group it was  $34.7 \pm 3.66$  in the first sampling and  $35.3 \pm 5.4$  in the second sampling. In the group receiving omega 3, it decreased from  $37.2 \pm 4.72$  before treatment to  $22.6 \pm 3.5$  after the treatment. In the group receiving vitamin E, it was  $37.1 \pm 3.54$  before the treatment that decreased to  $21 \pm 3.09$  after the treatment. The comparison of the changes in 5 groups shows that vit. E was effective in reducing the fragmentation rate significantly ( $P < 0.001$ ). The pregnancy rate was not significantly different in study groups based on the chi-square analysis.

**Conclusion:** Accordingly, this study and better response to treatment in groups receiving antioxidants comparing to the control group, we can conclude that the antioxidant therapy can decrease the sperm DNA fragmentation. The difference between the control and case groups was significant; the most considerable decrease in defragmentation was in group receiving vit. E. There were no cases of pregnancy in groups receiving the antioxidants and no cases of pregnancy were seen.

**Keywords:** Antioxidant treatments, sperm DNA fragmentation, intrauterine insemination (IUI), DFI

**Address:** Women's Reproductive Health Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran  
Tel: 041-35541221

**Email:** h\_ghasem\_nejad@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2015; 25(12): 1059 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> Resident of Obstetrics and Gynecology, Women's Reproductive Health Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (Corresponding Author)

<sup>2</sup> Associate Professor, Gynecology and Obstetrics Department, Women's Reproductive Health Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

<sup>3</sup> Professor, Biochemistry Department, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical sciences, Tabriz, Iran

<sup>4</sup> Infertility Fellowship, Women's Reproductive Health Research Center, Tabriz University of Medical sciences, Tabriz, Iran

<sup>5</sup> DVM, Resident of Reproductive Biology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran