

Combined Effect of Biolux-H and Zinc Supplementation on Spermatogenesis and the Expression of DAZL and AR Genes in Rat Testicular Tissue

Kiandokht Kohestanian¹, Jina Khayatzadeh^{1*}, Mohhamad Mahdi Forghanifard², Alireza Ghoreifi³, Saeedeh Zafar Balanezhad¹

1. Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

2. Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

3. Institute of Urology, Norris Comprehensive Cancer Center, University of Southern California, Los Angeles, CA, USA.

Received: December 06, 2020; Accepted: April 17, 2022

Abstract

Background and Aim: Fertility in men includes the ability to produce a sufficient number of normal sperm. Several factors affect the spermatogenesis-quality of sperm parameters. These factors include the use of certain chemical drugs, such as zinc and bioluxax-H (a combination of losartan + hydrochlorothiazide), common drugs used to treat hypertension. The present study was carried out to investigate the effect of these drugs on spermatogenesis and the expression of Dogen on its effect in rat testis.

Methods: In the present experimental study, 32 Wistar rats were randomly divided into four groups (n= 8): Group I (control) received distilled water, Group II (Lnh) was treated with Lnh (losartan and hydrochlorothiazide) (20/5 mg/kg BW/day, Group III (Zn) was treated with the Zn (Zinc gluconate, 30mg/kg BW/day, and Group IV (LnhZn) was treated with Lnh and Zn at the same doses. Treatment was continued in all groups for 60 days. After the treatment, testicular tissue, sperm parameters, and AR and Dazl genes expression in the rats were investigated.

Results: In Lnh group, a significant decrease in spermatid cell count (34.1 ± 1.8) was observed as compared to the controls. In Zn group, all factors were similar to those in the control group and spermatocyte count (75.11 ± 1.3) and Sertoli cells (14.62 ± 3.4) increased in these groups compared to those of the controls; however, this increase was observed only in the number of spermatocytes ($p < 0.05$). Also, the LnhZn group had similar results in all factors compared to the control group. Moreover, the expression of AR (0.0048 ± 0.001) and DAZL (0.008 ± 0.006) genes in the Lnh region was significantly reduced compared to that in the control group (1 ± 0.04) ($p = 0.05$). AR gene showed increased expression in Zn (1.247 ± 0.073) and LnhZn (1.354 ± 0.224) groups compared to the controls. In addition, DAZL gene in Zn experimental groups (1.68 ± 0.4) and LnhZn (1.58 ± 0.54) showed a significant increase ($p < 0.05$).

Conclusion: The use of zinc supplementation improved the side effects of Bioluxax-H on sperm quality.

Keywords: Losartan-hydrochlorothiazide; Zinc; Spermatogenesis

Please cite this article as: Kohestanian K, Khayatzadeh J, Forghanifard MM, Ghoreifi A, Zafar Balanezhad S. Combined Effect of Biolux-H and Zinc Supplementation on Spermatogenesis and the Expression of DAZL and AR Genes in Rat Testicular Tissue. Pejouhesh dar Pezeshki. 2022;46(3):73-83.

*Corresponding Author: Jina Khayatzadeh; Email: J.khayatzadeh@mshdiau.ac.ir



اثر توأم داروی بایولوزاکس- اچ و مکمل زینک بر روند اسپرماتوژنر و میزان بیان ژن‌های

در بافت بیضه موش صحرایی و DAZL

کیاندخت کوهستانیان^۱، جینا خیاطزاده^{۱*}، محمد مهدی فرقانی فرد^۲، علیرضا غریفی^۳، سعیده ظفر بالانژاد^۱

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.

۳- موسسه اورولوژی، مرکز جامع سلطان نوریس، دانشگاه کالیفرنیای جنوبی، لس آنجلس، کالیفرنیا، ایالات متحده آمریکا.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۱۶

خلاصه

سابقه و هدف: باروری در مردان شامل توانایی تولید اسپرم نرمال به تعداد کافی است، عوامل متعددی در روند اسپرماتوژنر و کیفیت پارامترهای اسپرم تاثیرگذار است. از این عوامل می‌توان به مصرف بعضی داروهای شیمیایی از جمله زینک و بایولوزاکس- اچ (ترکیب لوزارتان + هیدروکلروتیازید) از داروهای رایج در درمان فشار خون اشاره کرد. پژوهش حاضر به بررسی اثر این داروها بر اسپرماتوژنر و بیان دوزن مؤثر بر آن در بیضه رت پرداخته است.

روش کار: در این مطالعه تجربی ۳۲ سر موش نژاد ویستار ۱۰-۱۲ هفت‌های تهیه و به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شد (n=۸). گروه شاهد دریافت آب مقطرا، گروه تیمار بایولوزاکس- اچ (Lnh) با ترکیب (۵۰/۲۵) گرم/اکیلوگرم وزن بدن از هیدروکلروتیازید و لوزارتان، و گروه تیمار روی (Zn) با (۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و گروه (LnhZn) (۲۰ میلی‌گرم بایولوزاکس- اچ + روی) به صورت توأم و به روش (مری- معده ای) و به مدت ۶۰ روز، ادامه یافت. پس از اتمام دوره، بافت بیضه، پارامترهای اسپرمی و میزان بیان ژن‌های AR و DAZL در تمامی گروه‌ها بررسی شد. تحلیل واریانس یک طرفه آنوا و آزمون‌های توکی انجام شد.

یافته‌ها: در گروه Lnh کاهش معنادار در تعداد سلول‌های اسپرماتید (۱/۰ ± ۰/۱) در مقایسه با کنترل مشاهده شد. در گروه Zn، همه عوامل مشابه گروه کنترل بودند و تعداد اسپرماتوژنری (۱/۱ ± ۰/۱) و سلول‌های سرتولی (۱/۴ ± ۰/۶) در این گروه‌هادر مقایسه با کنترل افزایش یافت اما این افزایش تنها در تعداد اسپرماتوژنری به صورت معنادار مشاهده شد. (p<0/۰۵) گروه LnhZn نتایج مشابهی را در تمام عوامل در مقایسه با گروه کنترل داشت، همچنین AR بیان ژن‌های AR (۰/۰۰۱ ± ۰/۰۰۰۱)، DAZL (۰/۰۰۰۶ ± ۰/۰۰۰۸) در گروه Lnh نسبت به کنترل (۰/۰۰۴ ± ۰/۰۰۴۸) در گروه Zn (۰/۰۷۳ ± ۰/۰۷۴) و LnhZn (۰/۰۴۷ ± ۰/۰۳۵۴) در مقایسه با کنترل افزایش بیان را نشان داد و ژن DAZL نیز در گروه‌های تجربی با مقدار (۰/۴ ± ۰/۶۸) و گروه LnhZn (۰/۰۵۴) افزایش را به صورت معنادار نشان داد (p<0/۰۵).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد استفاده از مکمل روی سبب بهبود عوارض ناشی از مصرف بایولوزاکس- اچ بر کیفیت اسپرم شد.

وازگان کلیدی: لوزارتان- هیدروکلروتیازید؛ زینک؛ اسپرماتوژنر

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Koohestanian K, Khayatzadeh J, Forghanifard MM, Ghoreifi A, Zafar Balanezhad S. Combined Effect of Biolux-H and Zinc Supplementation on Spermatogenesis and the Expression of DAZL and AR Genes in Rat Testicular Tissue. Pejouhesh dar Pezeshki. 2022;46(3):73-83.

*نویسنده مسئول مکاتبات: جینا خیاطزاده؛ آدرس پست الکترونیکی: J.khayatzadeh@mshdiau.ac.ir

مقدمه

گرفته شد تا بهتر بتوان میزان تاثیر آن را بررسی کرد (۳، ۴، ۵). امروزه مطالعات بسیاری در زمینه ارتباط بین هایپرتانسیون و فعالیت جنسی سالم در مردان انجام شده و در ارتباط با تاثیر داروهای کاهش دهنده فشارخون بر فعالیت و کیفیت باروری مردان یافته‌های ضد و نقیضی منتشر شده است (۶).

مطالعات اخیر در این زمینه نشان داد که پارامترهای عملکردی تولید مثلی و اختلالات اسپرما توژنز در افراد با بیماری‌های مزممی از جمله فشارخون بالا در اثر استفاده از داروهای تاثیرگذار بر روی محور هیپوتalamوسی- هیپوفیزی- گنادی (HPG) و آنژیوتانسین || که از جمله داروهای دسته (ACE) و (ARB) هستند، دیده شده است. این نتایج همچنین نشان می‌دهد که || Ang از طریق گیرنده‌های خود رفتار غدد درون ریز را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد. آنژیوتانسین || یک پپتید است و نقش مهمی در تنظیم فشار خون بالا و همچنین عملکرد تولید مثلی دارد. از این رو تحقیق در زمینه گروههای دارویی (ARB) از جمله لوزارتان و مشتقان آن برای مثال با بایولوزاکس- اچ (ترکیب لوزارتان و هیدروکلروتیازید) و سایر بلوك کننده‌های گیرنده || Ang به عنوان داروهای خط اول برای درمان فشارخون بالا و تاثیرات آن بر اسپرما توژنز، در جهان امروز با توجه به روند افزایشی سن مردان برای فرزندآوری بهتر است قبل از اقدام به باروری در گروه مصرف کننده این داروها مورد بررسی‌های بیشتر قرار گیرد (۷، ۸).

لوزارتان یک مهارکننده گیرنده آنژیوتانسین (ARB) است. مهار آنژیوتانسین || سبب اثرات مختلف از جمله اتساع عروق، کاهش واژوپرسین و کاهش تولید در ترشح آلدوسترون می‌شود که نتیجه آن کاهش فشار خون است ، ترکیب لوزارتان با هیدروکلروتیازید (ادرار آور) سبب کاهش سریع تر میزان فشار خون از طریق افزایش ادرار در افراد هایپرتانسیون خواهد شد (۹).

در حال حاضر مکانیسم‌های مختلف ژنتیکی و اپی ژنتیک و اهمیت آنها در کنترل بیان ژن‌ها به خصوص در زمان تغییر

سازمان جهانی بهداشت (WHO)، ناباروری را به عنوان یک مشکل پزشکی جهانی معرفی کرده است. بروز ناباروری می‌تواند اولیه و یا ثانویه باشد. حدود ۳۰-۴۰ درصد از موارد ناباروری مربوط به فاکتورهای اختصاصی مردانه، ۴۰-۵۰ درصد مربوط به فاکتورهای اختصاصی زنانه و ۱۰-۳۰ درصد از موارد باقی‌مانده مربوط به فاکتورهای اختصاصی هر دو جنس و یا با علت نامشخص است، ناباروری مردان یک سندرم چند فاکتوری است که در بیش از نیمی از موارد، علت آن نامشخص است. عوامل ژنتیکی ممکن است در جمعیت بزرگی از زوج‌های نابارور دخیل باشد (۱). بیضه به عنوان یک غده با دو کارکرد در نظر گرفته می‌شود: اول ترشحات اندکرین و آگزوکرین توسط سلول‌های سوماتیک آن است که منجر به تشکیل اجزای مایع منی و تستوسترون می‌شود. کارکرد دوم شامل بلوغ سلول‌های جنسی و تولید اسپرم است که به عنوان اسپرما توژنز نامیده می‌شود. این عملکرد نیازمند ارتباط صحیح سلول‌های ژرمینال با سلول‌های سوماتیک هم است. به نظر می‌رسد اختلال در میزان بیان و موتاسیون هریک از ژن‌های مؤثر در اسپرما توژنز یا اسپرمیوزن، بتواند سبب ناباروری مردان شود (۲). یکی از عوامل موثر در نقص عملکرد سیستم اسپرما توژنز، افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species) ROS است. به نظر می‌رسد احتلال در پژوهش‌های فراوانی نشان دادند که ROS احتمالاً با اکسیداسیون پروتئین‌ها و DNA اسپرم و به دنبال آن تغییر مورفولوژی اسپرم و به طور کلی کاهش کیفیت و عملکرد اسپرم نقش اساسی دارد. از آنجا که افزایش ROS در اختلالات اسپرم مشاهده شده است، مصرف خوراکی آنتی‌اکسیدان‌ها به طور بالقوه می‌تواند یکی از راه‌های مقابله با این آسیب‌ها باشد و طبق نتایج پژوهش‌های بسیار دیده شده که روی در کنار سایر آنتی‌اکسیدان‌ها و ویتامین‌های موثر در روند اسپرم‌زایی توانسته نقش بسیار مؤثری در بهبود پارامترهای اسپرم بداشته باشد. با توجه به نتایج پژوهش‌ها در زمینه اثر روند اسپرم‌زایی در زمان تغییر این پژوهش روی در دو گروه توأم با دارو و به تنها‌یابی در نظر

روش کار

در این مطالعه تجربی ۳۲ سرموش صحرایی نر بالغ با نزد ویستار (۴ گروه ۸ تایی موش برای تکرار در آزمایش و کاهش درصد خطای) با وزن تقریبی ۳۰۰ ± ۲۵۰ انتخاب شد. تمامی حیوانات در شرایط نوری استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند و به آب و غذا به مقدار کافی دسترسی داشتند. حیوانات به صورت تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی (جهت تکرار) در قالب گروه کنترل و تجربی مطابق پژوهش‌های مشابه در این زمینه تقسیم شدند(۲۵، ۳۲)، معیارهای خروج از مطالعه شامل: اندازه غیر طبیعی بیضه‌ها، سن و وزن بود و برای ورود به پژوهش سالم و نرمال بودن فیزیولوژی موش‌ها در نظر گرفته شد. در گروه کنترل موش‌ها هیچ دارویی دریافت نکردند و تنها به مدت ۶۰ روز با آب مقطر گاواز شدند اما گروه‌های تجربی شامل ۳ گروه تجربی ۱ (تیمار شده با ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روى)، گروه تجربی ۲ (تیمار شده با ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از داروی بایولوزاکس- آج) و گروه تجربی ۳ (تیمار شده با ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بایولوزاکس- آج + ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روى به صورت تؤام) تمام تیمارها به صورت گاواز و یک مرتبه در روز به مدت ۶۰ روز تکرار شد.

با گذشت مدت زمان تیمار، تمام گروه‌ها توسط کتابیین بیهودش شده و سپس کشته و کالبد شکافی شدند. بیضه چپ آنها از بدن جدا شد و وزن بیضه با ترازوی دیجیتال (Sartorius، آلمان) اندازه‌گیری شد، در تمام مدت تمام اصول اخلاقی کار با حیوانات رعایت شد و کد اخلاق برای انجام این پژوهش دریافت شد (IAU.MSHD.REC.1398.199). در انتهای لشه موش‌ها در کیسه درسته و فاقد نشت قرار گرفت و روی کیسه تاریخ انجام یوتانزی و نام فرد مسئول نوشته شد. بر روی لشه عنوان سمی و خطرناک ذکر شد. انتقال لاشه‌ها و معدوم کردن آنها طبق مقررات ارائه شده در منابع علمی معتبر و به روز انجام شد. مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت تازه بیضه برداشته شد و سپس استخراج RNA استفاده از کیت شرکت دنایزیست آسیا طبق پروتکل این شرکت

شرایط سلول همچون مراحل تشکیل سلول‌های زایا، تشکیل تخم، تکوین جنین و تمایز بیش از پیش شناخته شده است. شناخت بیشتر ارتباط موجود بین این مکانیسم‌ها و نقش آنها در بروز تغییرات ساختاری و عملکردی در سطح ژنوم می‌تواند اطلاعات قابل توجهی در خصوص الگوی مولکولی در روند اسپرماتوژن در اختیار ما قرار دهد (۱۰).

ژن DAZL از مجموعه ژن‌هایی است که به طور اختصاصی در سلول‌های جنسی بیضه مردان بالغ رونویسی و بیان می‌شود و نهایتاً محصول آن یک پروتئین متصل شونده به RNA است. ژن‌های DAZL چون در تمام مراحل تکامل مربوط به سلول‌های جنسی بیان می‌شوند، بنابراین نقش بسیار مهمی در فرایند اسپرماتوژن ایفا می‌کنند.

تغییرات در ژن AR (رسپتور آندروژن)، به دو دلیل مورد توجه است؛ اول اینکه ژن AR بر روی کروموزوم X قرار دارد، بنابراین به صورت همی زیگوت توسط مردان حمل شده و از زنان ناقل سالم به ارث می‌رسد. دلیل دوم اینکه آندروژن‌ها اثر مستقیمی بر روند رشد و نمو اسپرم دارند. تا کنون تعدادی موتاسیون در ژن AR مرتبط با ناباروری مردان کشف شده است. (۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴).

با توجه به چند عاملی بودن ناباروری مردان و نقش موثر عوامل ژنتیکی و محیطی مختلف در ایجاد آن لازم است در مطالعات مربوط به این بیماری سایر ژن‌ها و تاثیر متقابل آنها بر یکدیگر نیز بررسی شود.

تمایز نهایی اسپرماتیدها و جدا شدن آنها از ابی‌تلیوم لوله‌های اسپرم ساز، وابسته به گیرنده آندروژن است. در ضمن پیشرفت اسپرماتیدهای کروی به مرحله طویل شدن، به کاهش عملکرد AR سلول‌های سرتولی حساس است (۱۲). از این رو در این پژوهش به اثر لوزارتان هیدروکلروتیازید و روی بر میزان بیان ژن‌های DAZL و AR در بافت بیضه موش صحرایی پرداختیم.

فعال در لوله‌های سمینیفروس در مراحل مختلف همراه با اسپرم های بالغ یا در حال بلوغ مشاهده شد. در داخل لوله‌ها رده‌های مختلف سلول‌های اسپرماتوژنیک در مراحل مختلف تقسیم به همراه سلول‌های سرتولی دیده شدند. همچنین در بافت بینالبینی تجمعاتی از سلول‌های لیدیگ به همراه عروق و سایر سلول‌های همبندی مشهود بود. تعداد سلول‌های اسپرماتوگونیا در گروه Lnh با مقادیر میانگین و انحراف معیار (20 ± 20 mg/kg) با غلظت Zn ۳۰ mg/kg از LnhZn (LnhZn) با 20 ± 20 mg/kg نسبت به همراه Zn به عنوان 20 ± 20 mg/kg از Lnh با مقادیر میانگین و انحراف معیار (20 ± 20 mg/kg) افزایش معنادار نشان داد. به گروه کنترل (20 ± 20 mg/kg) در گروه تجربی با تیمار 20 ± 20 mg/kg نسبت به گروه کنترل (20 ± 20 mg/kg) در گروه تجربی با تیمار 20 ± 20 mg/kg نسبت به گروه کنترل (20 ± 20 mg/kg) تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک افزایش معنادار نشان داد ($p \leq 0.05$).

در مورد سلول‌های اسپرماتید شاهد کاهش معنادار تنها در گروه Lnh (10 ± 10 mg/kg) نسبت به گروه کنترل (10 ± 10 mg/kg) بودیم.

(p) اما در سایر گروه‌ها این تفاوت معنادار نبود. ($p > 0.05$) سلول‌های لیدیگ در گروه‌های تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل تغییری نداشتند ضمن اینکه هیچ‌گونه تفاوت معناداری در تعداد سلول‌های سرتولی هم نسبت به گروه کنترل دیده نشد. (p > 0.05) مطابق با (جدول ۱) میزان دقیق عدد p ذکر شد)

انجام شد. پس از انجام بررسی‌های کمی و کیفی RNA، cDNA استفاده شد. برای ساخت cDNA از کیت فرمنتاز استفاده شد و تمامی مراحل مطابق پروتکل این کیت انجام شد. از PCR time Real DAZL و AR به عنوان زن‌های هدف استفاده و بتا اکتین به عنوان زن ساختمانی برای کنترل داخلی استفاده شد. بیان نسبی زن‌ها سنجش شد. در بیضه چپ پس از تهیه مقاطع بافتی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائزین شاخص دهایی از جمله تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، سرتولی، لیدیگ، اسپرماتید و اسپرماتوژنیت با میکروسکوپ نوری (Zise Germany) تعیین شد. سپس این یافته‌ها برای هر تکرار و هر تیمار به نرم افزار Shapiro SPSS و برایش ۱۶ منتقل شد، آزمون شاپیرو ویلک (- Wilk) به دلیل حجم نمونه کم) برای مشخص شدن نرمال بودن توزیع متغیرها، به منظور تعیین وجود اختلاف معنادار بین گروه‌های شم و تجربی با گروه کنترل و با همدیگر از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد.

میانگین و انحراف معیار به صورت $\bar{x} \pm SD$ بیان شد. $p < 0.05$ مرز استنتاج آماری برای بررسی اختلاف معناداری میانگین بین گروه‌های تجربی و کنترل بود. برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار GraphPad prism 8.0 استفاده شد.

یافته‌ها

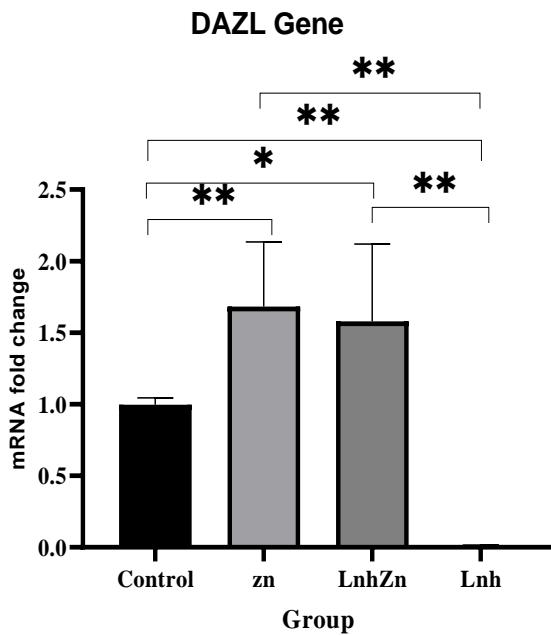
در بررسی‌های هیستولوژیک بافت بیضه گروه کنترل اسپرماتوژن

جدول ۱- مقایسه میزان تعداد سلول‌های ژرمینال، سرتولی و لیدیگ در گروه‌های تحت درمان با گروه کنترل

Parameters	Control	Lnh	Zn	LnhZn	P-value
Spermatocyte Cells	70.20 ± 4.01^a	73.63 ± 0.8^b	75.11 ± 1.3^b	72.39 ± 2.2^{ab}	0.003
Leydig Cells	19.45 ± 1.7^{ab}	21.97 ± 2.4^{ab}	21.4 ± 1.5^{ab}	18.79 ± 1.9^a	0.007
Sertoli Cells	12.87 ± 2.5^a	11 ± 4.03^a	14.62 ± 3.4^a	10.87 ± 2.6^a	0.087
Spermatid Cells	50.71 ± 4.1^a	34.1 ± 1.8^b	50.75 ± 2.5^a	53.12 ± 3.9^a	0.001
Spematozoa Cells	65.30 ± 5.7^a	49.11 ± 5.4^b	62.72 ± 2.5^a	74.81 ± 2.5^c	0.001

آزمون همگنی واریانس بین گروه‌ها برقرار است و به این منظور در تحلیل واریانس ANOVA از آزمون F و برای مقایسات جفتی Tukey استفاده شد.

در بررسی‌های ژنی نیز مطابق با نمودار (شماره ۳)، مقایسه میزان بیان ژن Dazl در بیضه موش‌های صحرایی دریافت‌کننده Zn (0.168 ± 0.04) دارای افزایش بیان نسبت به گروه کنترل و گروه LnhZn (0.158 ± 0.054) نیز افزایش بیان نسبت به گروه کنترل (0.140 ± 0.005) را نشان داد ($p=0.014$). در حالی که در گروه مصرف‌کننده Lnh (0.1008 ± 0.0006) این تفاوت به صورت کاهش معنا دار دیده شد ($p=0.00$). همچنین تفاوت بین میزان بیان ژن گروه Zn و LnhZn با گروه Lnh نیز معنادار بود ($p=0.00$) (نمودار ۳).



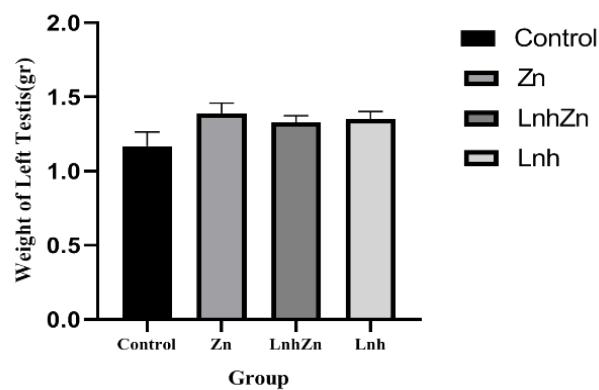
نمودار ۳- مقایسه میانگین بیان ژن Dazl در بیضه موش‌های صحرایی

میله‌های ستاره‌دار، نشانه تفاوت معنادار است ($p \leq 0.01$).

در مورد ژن AR نیز در گروه مصرف‌کننده Zn (0.073 ± 0.073) و LnhZn (0.124 ± 0.054) دارای افزایش بیان نسبت به گروه کنترل (0.04 ± 0.04) است با سطح معناداری به ترتیب 0.001 و 0.0002 ($p=0.00$) و در گروه مصرف‌کننده Lnh (0.048 ± 0.0048)، کاهش معنادار دیده شد ($p=0.00$) (نمودار ۴). همچنین تفاوت بین میزان بیان ژن گروه Zn (0.073 ± 0.073)

مقایسه میانگین وزن بیضه چپ موش‌های صحرایی براساس (نمودار ۱) گروه کنترل (0.26 ± 0.017) نسبت به گروه‌های تحت تیمار با zn (0.19 ± 0.039)، LnhZn (0.12 ± 0.033) و گروه Lnh (0.15 ± 0.035) با میزان معناداری ($p=0.03$) تفاوت معناداری را نشان نداد ($p>0.05$).

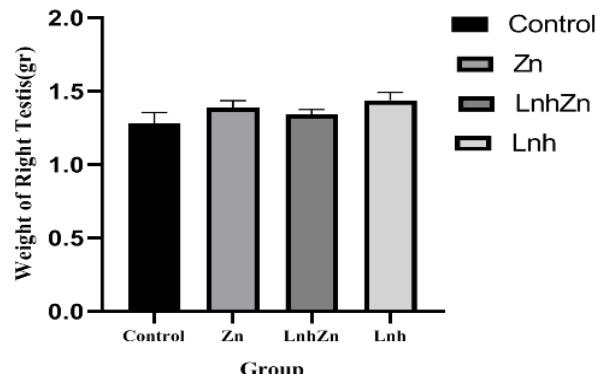
Left Testis



نمودار ۱- مقایسه میانگین وزن بیضه چپ موش‌های صحرایی(گرم) در گروه‌های مورد مطالعه ($p \leq 0.05$)

در مورد وزن بیضه راست نیز همانند بیضه چپ گروه کنترل (0.21 ± 0.028) نسبت به گروه‌های تحت تیمار با zn (0.13 ± 0.044) و گروه LnhZn (0.14 ± 0.034) و گروه Lnh (0.15 ± 0.040) با میزان معناداری ($p=0.023$) تفاوت معناداری را همانند وزن بیضه چپ نشان نداد ($p>0.05$) (نمودار ۲).

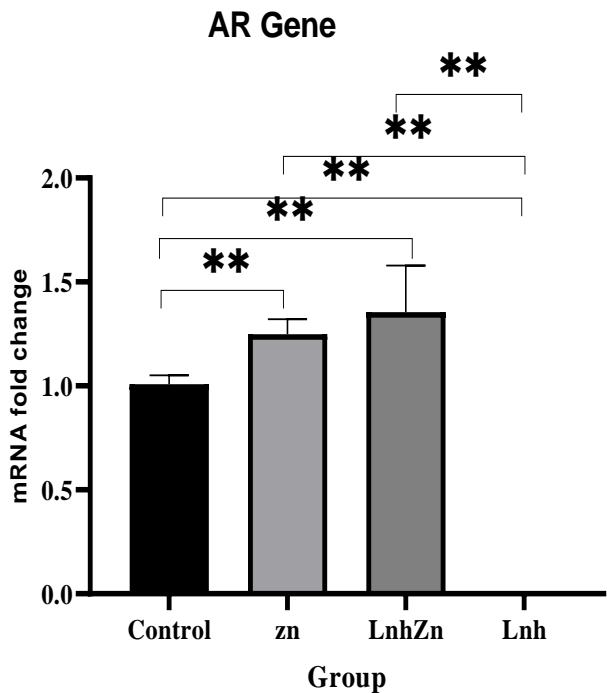
Right Testis



نمودار ۲- مقایسه میانگین وزن بیضه راست موش‌های صحرایی(گرم) در گروه‌های مورد مطالعه ($p \leq 0.05$)

اسپرمازوگونی، اسپرماتید و سلول‌های سرتولی تحت تاثیر تیمار با Biolozax-H به طور معنادار تغییر می‌کند. اسپرمازوژن فرایند بسیار پیچیده‌ای است که عوامل متعددی می‌تواند بر آن اثر کرده و منجر به ناباروری و یا کاهش باروری در فرد شود. فرایند اسپرمازوژن شامل مراحل متوالی از جمله: فعل‌سازی سلول‌های اپیتلیوم زایا، بلوغ اسپرم‌ها و مهاجرت آنهاست (۳۰، ۳۱، ۳۲). اگر هر یک از این مراحل تخریب شود سبب زوال باروری می‌شود. روی به عنوان عناصر معدنی مهم و یکی از آنتی‌اکسیدان‌های رایج برای عملکرد طبیعی سیستم تولید مثلی در مردان شناخته شده است که سبب تنظیم بسیاری از آنزیم‌ها و فرایندهای بیوشیمیابی و سیگنال‌های مهم سلولی می‌شود. برای مثال در بسیاری از پژوهش‌ها ثابت شد که روی به عنوان یک عامل ضروری در فعالیت پروتئین‌های ضروری در همانندسازی سلول‌های جنسی در اندام‌های تولید مثلی مردان عمل می‌کند. (۱۵، ۱۶) بر مبنای یافته‌های حاصل می‌توان Zinc را به عنوان یک مکمل دارویی کم خطر برای مردان با مشکلات باروری پیشنهاد کرد، از این رو در این پژوهش به بررسی اثر Zinc در کنار داروی Biolozax-H و نقش آن در پارامترهای اسپرمازوژن پرداخته شد و مشاهده شد که مصرف همزمان این دو می‌تواند سبب بهبود بسیاری از پارامترهای اسپرمی شود. در حال حاضر مکانیسم‌های مختلف اپی‌ژنیک و اهمیت آنها در کنترل بیان ژن‌ها به خصوص در زمان تغییر شرایط سلول، شناخت بیشتر ارتباط موجود بین این مکانیسم‌ها و نقش آنها در بروز تغییرات ساختاری و عملکردی در سطح ژنوم می‌تواند راه کارهای مفیدی برای بهبود در روند اسپرمازوژن در اختیار ما قرار دهد، آندروزن‌ها هورمون‌های استروئیدی حیاتی هستند که بر خصوصیات ثانویه جنسی و همچنین شروع و نگهداری اسپرمازوژن اثر دارند که اقدامات آنها از طریق گیرنده‌های آنдрوزن انجام می‌شود که از جمله گیرنده‌های هسته ای هستند. تحقیقات اخیر نشان داد که عملکرد صحیح AR برای ایجاد اسپرمازوژن نرمال لازم است و ناک اوت ژن AR در ظاهر خصوصیات زنانه از جمله واژن با انتهای کور و فالوس شبیه

$\pm ۰/۰۰۱$) LnhZn ($۱/۳۵۴ \pm ۰/۲۲۴$) با $۰/۰۰۱$ (Lnh) نیز معنادار بود ($p=۰/۰۰۴۸$).



نمودار ۴- مقایسه میانگین بیان ژن AR در بیضه موش‌های صحرابی میله‌های ستاره‌دار، نشانه تفاوت‌های معنادار است ($p \leq 0/01$).

بحث

در طی دهه گذشته شناخت عملکرد تولید مثل مردان و اهمیت عوامل مردانه در ناباروری پیشرفت قابل توجهی پیدا کرده است. بسیاری از مردان نابارور دچار اختلالات قابل اصلاح توسط درمان‌های دارویی هستند که در صورت تشخیص مشکل و درمان دارویی صحیح برطرف می‌شوند و به این وسیله امکان لقاح طبیعی فراهم می‌شود. طبق یافته‌های مطالعه حاضر، ترکیب (لوزارتان + هیدروکلروتیازید) و روی تاثیر مثبتی در بهبود معیارهای آنالیز اسپرم دارد و می‌تواند اثرات سوء داروی مشتق شده از لوزارتان را بر روند اسپرمازوژن کاهش دهد. در بررسی‌های مورفولوژی از بافت بیضه رت در این پژوهش مشخص شد که پارامترهایی مثل تعداد سلول‌های لایدیگ،

رفت و میوز رخ نمی دهد و در نهایت منجر به ناباروری می شود. که این یافته ها مشابه با یافته های پژوهش حاضر به تأثیر مثبت آنتی اکسیدان زینک بر روند پروسه اسپرماتوژنز در پارامترهای اسپرمی و از جمله افزایش میزان بیان زن AR در گروه زینک Lnh نسبت به کنترل و همچنین کاهش اثر سوء مصرف داروی Lnh را در هم افزایی با zn اشاره دارد.

در سال ۲۰۰۱ یک مطالعه مداخله ای توسط Mifsud و همکارانش نشان داد که پیشرفت سرطان پروستات در افرادی که داروهای مسدود کننده گیرنده آنزیوتانسین II مصرف می کنند به دلیل کاهش سطح آنتی زن های اختصاصی پروستات prpstat –specific antigen (PSA) سرم در مقایسه با گروه کنترل و گروه دارونما کمتر بوده است (۲۹). زن DAZL یک همولوگ اتوزوممال DAZ است. در نتیجه DAZL همیشه به عنوان کاندیدای مهم ناباروری مردان دیده می شود. DAZL این زن در سلول های جنسی قبل و بعد از تولد بیان می شود و نقش مهمی در کنترل سیستم میوز و حفظ تعادل سلول های جنسی دارد. نشان داده شده است که حذف این زن حتی می تواند منجر به آزادسپرمی یا الیگوسپرمی شود. بسیاری از مطالعات نشان داده اند که استفاده از آنتی اکسیدان ها مانند ویتامین E و کارنیتین می تواند بیان زن های مربوط به DAZL را تحریک کند و سبب افزایش تحرك اسپرم و کیفیت کروماتین شود (۲۵، ۲۶).

بنابراین در مطالعه حاضر، افزایش بیان این زن در گروه های تجربی Zn و گروه LnhZn را می توان به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی روی موجود در این ترکیب دانست. با توجه به نتایج و شواهد موجود و در نظر گرفتن مصرف بی عارضه قرص روی در بیماران با مشکل فشار خون و مصرف کننده داروهای بلک کننده گیرنده آنزیوتانسین II، شاید بتوان از این ترکیب دارویی برای درمان ناباروری غیر قابل توجیه و گاهی حتی بدون علت مردان یا قبل از به کار گرفتن روش های کمک باروری مثل ICSI و IUI استفاده کرد و عوارض احتمالی این گروه از داروها را به حداقل رساند.

کلیتوریس ، بیضه به صورت شکمی و اختلال شدید در سلول های زایا همراه است (۱۷، ۱۸، ۱۹).

AR جهش یافته و یا ناقص از لحاظ عملکرد با بیماری هایی نظیر سرطان پروستات، سرطان بیضه و سندروم تخمدان پلی کیستیک مرتبط است. گرچه صدها موتاسیون در زن AR و در بیماری های مختلف گزارش شده اند ، اما اطلاعات اندکی از اثر داروهای مختلف بر این زن و میزان بیان آن در مردان گزارش شده است (۲۰، ۲۱).

در سال ۲۰۰۴ Cabral و همکاران، ۱۹۲ فرد مبتلا به سرطان پروستات را از نظر جهش ناحیه پرومотор و 5UTR زن AR مورد بررسی قرار دادند (۲۱). در پژوهش دیگر Crocitto و همکاران نیز در همین زمینه در سال ۱۹۹۷ بر روی جهش های زن AR مطالعه کردند و موفق به شناسایی دو جهش نقطه ای در این زن در افراد مبتلا به سرطان پروستات شدند (۲۲).

Russell و همکاران نشان دادند که از دست دادن AR در سلول های مختلف بیضه سبب اختلال در روند اسپرماتوژنز می شود. با اختلال در عملکرد سلول های سرتولی، ایست اسپرماتوژن در مرحله دیپلوتون که مرحله اولیه اسپرماتوسیت و قبل از تقسیم میوز ۲ است (۲۳، ۲۴).

در سال ۲۰۱۳، Hazra و همکارانش نشان دادند که بیان بیش از اندازه از گیرنده های آندروژنی در سلول های سرتولی (tgSCAR) می تواند منجر به بلوغ زودرس سلول های سرتولی و در نهایت کاهش نهایی تعداد سلول های زایا خواهد شد (۲۵، ۲۶).

اخیراً در پژوهشی که توسط berg و همکارانش در سال ۲۰۱۴ انجام شد، نیافته های حاصل از آن نشان داد که یکی از عوامل انتقال روی بر روی گیرنده AR تحت عنوان Zip9 (Zip9) وجود دارد، تا امروز فقط تعداد بسیار کمی گزارش وجود دارد که به نقش Zip9 موجود در گیرنده های آندروژن در سلول های سرتولی و نقش آن در اسپرماتوژن اشاره کرده است (۲۷، ۲۸).

مطالعات نشان داده که وقتی AR به طور اختصاصی در سلول های سرتولی وجود نداشته باشد، سلول های سرتولی نابالغ باقی خواهند ماند، پروسه اسپرماتوژن بسیار کند پیش خواهد

نتیجه‌گیری و پیشنهادات

ترکیب (لوزارتان + هیدروکلروتیازید) و روی تاثیر مثبت به خصوص در میزان بیان ژن AR و همچنین تعداد سلول‌های اسپرما توگونیا نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌های تجربی دارد اما از آنجا که این تحقیق بر روی موش‌های سالم انجام شده است، لازم است مطالعاتی با گروه‌هایی که شامل موش‌ها با مشکلات مختلف باروری هستند نیز انجام گیرد، همچنین مطالعاتی در زمینه بررسی نقش (لوزارتان + هیدروکلروتیازید) بر میزان بیان ژن ها AR و DAZL بر بافت اپیدیدیم بپشه برای بررسی‌های دقیق‌تر اثر این دارو توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از دانشکده علوم دانشگاه آزاد واحد مشهد و همچنین گروه محترم زیست‌شناسی این دانشکده به دلیل حمایت در پروسه انجام این پژوهش قدردانی می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

تمام اصول اخلاقی کار با حیوانات رعایت شد و کد اخلاق برای انجام این پژوهش دریافت شد (IAU.MSHD.REC.1398.199).

تعارض منافع

نویسنده‌گان، تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

References

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, De Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Van der Poel S. The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009. Human reproduction. 2009 Nov 1;24(11):2683-7.
2. Hecht NB. The making of a spermatozoon: a molecular perspective. Developmental genetics. 1995;16(2):95-103.
3. Sinclair S. Male infertility: nutritional and environmental considerations. Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic. 2000 Feb 1;5(1):28-38.
4. Nadjarzadeh A, Sadeghi MR, Amirjannati N, Vafa MR, Motevalian SA, Gohari MR, Akhondi MA, Yavari P, Shidfar F. Coenzyme Q10 improves seminal oxidative defense but does not affect on semen parameters in idiopathic oligoasthenoteratozoospermia: a randomized double-blind, placebo controlled trial. Journal of endocrinological investigation. 2011 Sep;34(8):e224-8.
5. Lombardo F, Sansone A, Romanelli F, Paoli D, Gandini L, Lenzi A. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility: an overview. Asian Journal of andrology. 2011 Sep;13(5):690.
6. Doumas M, Douma S. The effect of antihypertensive drugs on erectile function: a proposed management algorithm. The journal of clinical hypertension. 2006 May;8(5):359-63.
7. Ueda T, Kai H, Imaizumi T. Losartan/hydrochlorothiazide combination vs. high-dose losartan in patients with morning hypertension—a prospective, randomized, open-labeled, parallel-group, multicenter trial. Hypertension Research. 2012 Jul;35(7):708-14.
8. Uchiwa H, Kai H, Iwamoto Y, Anegawa T, Kajimoto H, Fukuda K, Imaizumi T, Fukumoto Y, MAPPY Study Investigators. Losartan/hydrochlorothiazide combination is safe and effective for morning hypertension in Very-Elderly patients. Clinical and experimental hypertension. 2018 Apr 3;40(3):267-73.
9. Bolat D, Oltulu F, Uysal A, Kose T, Gunlusoy B, Yigiturk G, Turk NS, Turan T. Effects of losartan on experimental varicocele-induced testicular germ cell apoptosis. Andrologia. 2016 Sep;48(7):840-6.
10. Meistrich ML. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. Fertility and sterility. 2013 Nov 1;100(5):1180-6.
11. Hardy DO, Scher HI, Bogenreider T, Sabbatini P, Zhang ZF, Nanus DM, Catterall JF. Androgen receptor CAG repeat lengths in prostate cancer: correlation with age of onset. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1996 Dec 1;81(12):4400-5.
12. Västermark Å, Giwercman YL, Hagströmer O, De-Meyts ER, Eberhard J, Ståhl O, Cedermark GC, Rastkhani H, Daugaard G, Arver S, Giwercman A. Polymorphic variation in the androgen receptor gene: association with risk of testicular germ cell cancer and metastatic disease. European Journal of Cancer. 2011 Feb 1;47(3):413-9.
13. Lin LH, Baracat MC, Maciel GA, Soares Jr JM, Baracat EC. Androgen receptor gene polymorphism and polycystic ovary syndrome. International Journal of Gynecology & Obstetrics. 2013 Feb 1;120(2):115-8.
14. Mosaad YM, Shahin D, Elkholy AA, Mosbah A, Badawy W. CAG repeat length in androgen receptor gene and male infertility in Egyptian patients. Andrologia. 2012 Feb;44(1):26-33.
15. Zhao J D. Zinc levels seminal plasma and their correlation with male infertility. SciRep. 2016;6:22386.
16. Baltaci AK, Mogulkoc R, Ayyildiz M, Kafali E, Koyuncuoglu T. Lipid peroxidation in kidney and testis tissues in experimental hypothyroidism: the role of zinc. Bratislavské lekarske listy. 2014 Jan 1;115(8):498-501.
17. Wang RS, Yeh S, Tzeng CR, Chang C. Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. Endocrine reviews. 2009 Apr 1;30(2):119-32.
18. Ruwanpura SM, McLachlan RI, Meachem SJ. Hormonal regulation of male germ cell development. Journal of Endocrinology. 2010 May 1;205(2):117-31.
19. Verhoeven G, Willems A, Denolet E, Swinnen JV, De Gendt K. Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2010 May 27;365(1546):1537-56.
20. O'Donnell L, Nicholls PK, O'Bryan MK, McLachlan RI, Stanton PG. Spermiation: The process

- of sperm release. *Spermatogenesis* 2011; 1: 14-35; PMID: 21866274.
21. Cabral DF, Santos A, Ribeiro ML, Mesquita JC, Carvalho-Salles AB, Hackel C. Rarity of DNA sequence alterations in the promoter region of the human androgen receptor gene. *Brazilian journal of medical and biological research*. 2004;37:1789-94.
22. Crocitto LE, Henderson BE, Coetze GA. Identification of two germline point mutations in the 5' UTR of the androgen receptor gene in men with prostate cancer. *The Journal of urology*. 1997 Oct 1;158(4):1599-601.
23. Russell LD, Bartke A, Goh JC. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *American Journal of Anatomy*. 1989 Mar;184(3):179-89.
24. Dunleavy JE, O'Bryan MK, Stanton PG, O'Donnell L. The cytoskeleton in spermatogenesis. *Reproduction*. 2019 Feb 1;157(2):R53-72.
25. Salehinezhad F, Eshraghi H, Kadivar A, Shirian S, Asghari A, Aali E, Davoodian N. Amelioration effects of vitamin E, melatonin, L-carnitine, and atorvastatin, on destructive effects of busulfan in the testes of male rats: A gene expression evaluation. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*. 2019 May 6.
26. Tahmasbpour-Marzooni E. Most Common Genetic Abnormality and Molecular Mutations on Human Sperm Y Chromosome and their Effects on Male Infertility. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2014 Nov 10;16(11):51-63.
27. Berg AH, Rice CD, Rahman MS, Dong J, Thomas P. Identification and characterization of membrane androgen receptors in the ZIP9 zinc transporter subfamily: I. Discovery in female atlantic croaker and evidence ZIP9 mediates testosterone-induced apoptosis of ovarian follicle cells. *Endocrinology*. 2014 Nov 1;155(11):4237-49.
28. Buldan A, Dietze R, Shihan M, Scheiner-Bobis G. Non-classical testosterone signaling mediated through ZIP9 stimulates claudin expression and tight junction formation in Sertoli cells. *Cellular signalling*. 2016 Aug 1;28(8):1075-85.
29. Mifsud A, Sim CK, Boettger-Tong H, Moreira S, Lamb DJ, Lipshultz LI, Yong EL. Trinucleotide (CAG) repeat polymorphisms in the androgen receptor gene: molecular markers of risk for male infertility. *Fertility and sterility*. 2001 Feb 1;75(2):275-81.
30. Suárez-Quian CA, Martínez-García F, Nistal M, Regadera J. Androgen receptor distribution in adult human testis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999 Jan 1;84(1):350-8.
31. Hazra R, Corcoran L, Robson M, McTavish KJ, Upton D, Handelsman DJ, Allan CM. Temporal role of Sertoli cell androgen receptor expression in spermatogenic development. *Molecular Endocrinology*. 2013 Jan 1;27(1):12-24.
32. Sudawadee Y, Vipavadee C, Kanokporn S, Paiwan S. Effects of Boesenbergia rotunda juice on sperm qualities in male rats. *Journal of medicinal plants research*. 2011 Aug 18;5(16):3861-7.