

## ارتباط ایزوفرم اندوتلیالی آنزیم سنتز کننده نیتریک اکساید با آزواسپرمی

خدیجه فوقی<sup>۱\*</sup>، فاطمه کیانی<sup>۲</sup>، معرفت غفاری نوین<sup>۳</sup>، زهرا صابر راد<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> عضو هیأت علمی دانشگاهی علوم پزشکی خراسان شمالی، دانشکده پزشکی، دپارتمان علوم تشریحی، بجنورد، ایران  
<sup>۲</sup> کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران  
<sup>۳</sup> عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دپارتمان علوم تشریح و بیولوژی تولید مثل، مرکز تحقیقات بهداشت باروری و ناباروری بیمارستان طالقانی، تهران، ایران  
<sup>۴</sup> دانشجوی کارشناسی مامائی، دانشکده پرستاری و مامائی خراسان شمالی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران  
<sup>\*</sup> نویسنده مسئول: بجنورد، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، دانشکده پزشکی، دپارتمان پاتوبیولوژی علوم تشریحی  
 پست الکترونیک: Alashtlake@gmail.com

## چکیده

**زمینه و هدف:** هدف از مطالعه حاضر مکان یابی ایزوفرم اندوتلیالی آنزیم سنتزکننده نیتریک اکساید در مردان مبتلا به اختلال آزواسپرمی و مقایسه با گروه کنترل می باشد.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه موردی تعداد ۲۷ نفر که ۱۰ نفر از افراد آزواسپرمی انسدادی و ۱۰ نفر با اختلال آزواسپرمی غیر انسدادی و ۷ نفر به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. ضمن کسب رضایت نامه کتبی از بیماران به طریق بیوپسی بیضه از سه گروه مورد مطالعه نمونه برداری به عمل آمد. نمونه ها مورد بررسی های هیستوپاتولوژی و ایمونوهیستوشیمی آنزیم eNOS قرار گرفتند.

**یافته ها:** یافته های پاتولوژی در بیماران آزواسپرمی غیرانسدادی طیف وسیعی از نماهای پاتولوژیک را به خود اختصاص داد. نمای هیستوپاتولوژی گروه آزواسپرمی انسدادی نرمال بود eNOS در سلول های مختلف بافت بیضه از قبیل سلول های لایدیگ - سلول های سرتولی - سلول های میوفیبروبلاست و سیتوپلاسم اسپرماتید های نابالغ، در هر سه گروه آزمایشی بیان شده است.

**نتیجه گیری:** بیان بیش از حد آنزیم eNOS اختلالات آزواسپرمیک بافت بیضه سلول های زایای غیر نرمال نشان دهنده ارتباط این آنزیم با ناباروری های توام با نقص اسپرماتوژنیک می باشد.

**واژه های کلیدی:** آزواسپرمی، ایمونوهیستوشیمی، eNOS، بیوپسی بیضه، اسپرماتوژنیز، آپوپتوز

وصول: ۹۳/۷/۲۲

اصلاح: ۹۳/۹/۲۴

پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۱

## مقدمه

ناباروری یکی از معضلات جدی در جوامع در حال توسعه و توسعه یافته امروزی می باشد به نحوی که سلامت روانی و روحی خانواده را به شدت تحت تأثیر قرار می دهد [۱،۲]. به علل گوناگونی در دنیای امروز تعداد زوجین نابارور رو به فزونی است [۳،۴،۶]. دلایلی از قبیل عوامل اجتماعی مانند بالا رفتن سن ازدواج در زوجین، عوامل محیطی مانند آلودگی هوا، گرم شدگی کل جهان (global warming) و برخی عوامل ناشناخته سبب بروز این اختلال می گردد. طبق آمار جهانی حدود ۱۰ الی ۱۵٪ زوجین دارای مشکلات ناباروری می باشند [۳]. ناباروری به علت مردانه حدود نیمی از علل ناباروری را به خود اختصاص داده است [۵]. یکی از علت های ناباروری مردانه آزواسپرمی است [۷]. آزواسپرمی به عدم وجود اسپرم در مایع سمینال سانترفیوژ شده اطلاق می گردد که به دو گروه انسدادی و غیرانسدادی تقسیم می شود [۵،۷]. عوامل مختلفی در بروز این اختلال نقش دارند. در این میان مولکول به ظاهر کوچک نیتریک اکساید اخیراً مورد توجه خاص محققین حیطه ناباروری قرار گرفته است که می تواند به عنوان یکی از علل ناشناخته بروز آزواسپرمی در مردان در سطح مولکولی باشد. اسیدامینه L-arginine به واسطه یکسری کوفاکتورها و آنزیم سنتزکننده نیتریک اکساید<sup>۱</sup> به L-citrulline و نیتریک اکساید تبدیل می گردد [۶]. تا به حال سه ایزوفرم NOS به نام های نوروئی nNOS- اندوتلیالی eNOS و القائی iNOS شناسایی و تخلیص شده است [۵،۶].

در دستگاه فیزیولوژی مردانه، نیتریک اکساید حاصل از آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز نقش های فیزیولوژیکی مختلفی از قبیل عملکرد نعوظی، ترشح آندروژن، حرکت اسپرم، بلوغ اسپرم، کیفیت اسپرم، ظرفیت یابی اسپرم، اتصال تخمک به اسپرم را ایفا می کند [۵-۷]. مکان یابی این مولکول با استفاده از روش های ایمونهیستوشیمیایی، ایمونو بلات، PCR، در بافت بیضه، اپی دیدیم، پروستات و سمینال وزیکول نقش این مولکول را در برقراری تعادل عروقی و در اسپرماتوژنیزس و بلوغ اسپرم پیشنهاد می

کند [۸،۹]. به علاوه این مولکول به ظاهر ساده در فرایندهایی از قبیل بلوغ اسپرم - تکامل سلول های زایا [۱۰] اتصالات بین سلول های سرتولی وزایا در مکان سد خونی - بیضوی [۱۱] انقباض همودینامیک و همچنین آپوپتوز سلول های زایا می تواند نقش مهمی را ایفا کند. به علاوه به دلیل توزیع گسترده نیتریک اکساید در بافت بیضه نرمال و انبرمال می توان به این نتیجه رسید که مقادیر فیزیولوژیک این مولکول به عنوان یکی از فاکتورهای مهم در باروری محسوب می گردد. میزان بیان ایزوفرم اندوتلیالی آنزیم سنتزکننده نیتریک اکساید تحت شرایط نرمال و پاتولوژیک تفاوت دارد و بیان بیش از اندازه این ایزوفرم از جمله علت های احتمالی بروز آزواسپرمی است که می تواند به دلایل مختلفی از قبیل اختلال در عملکردهای مختلف بافت بیضه - اختلال در روند مرگ برنامه ریزی شده سلول های زایا و نهایتاً اختلال در روند اسپرماتوژنیزس باشد. مرور منابع در دسترس نشان داده است که علی رغم بررسی بیان ایزوفرم اندوتلیالی در بافت های مختلف سیستم تولیدمثلی مردانه از جمله پروستات و وازدفران - کیسه های سمینال - اپی دیدیم [۱۱،۱۲] و در بافت بیضه مدل های حیوانی [۱۳] تاکنون تحقیقات بر روی مدل های انسانی بافت بیضه و در مردان با مشکل آزواسپرمی انسدادی و غیرانسدادی و مقایسه آن با گروه کنترل به روش های نیمه کمی از قبیل ایمونوهیستوشیمی صورت پذیرفته است. بر این اساس بر آن شدیم در ادامه تحقیقات قبلی به بررسی بیان نیمه کمی و نقش احتمالی آنزیم eNOS در بیماران مبتلا به اختلالات آزواسپرمیک بپردازیم.

## روش کار

جامعه مورد مطالعه: در این مطالعه موردی - شاهدی به مطالعه ۲۷ نفر از مردانی که هر کدام از آنها به دلایلی به مراکز تشخیصی و درمانی ناباروری مراجعه نمودند پرداختیم. بیماران در سه گروه کنترل به تعداد ۷ نفر گروه آزواسپرمی انسدادی به تعداد ۱۰ نفر و گروه آزواسپرمی غیر انسدادی به تعداد ۱۰ نفر تقسیم شدند. پس از کسب مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

انکوباتور تیمار گردید. سپس شستشو انجام شده و بعد از آن آنتی بادی ثانویه ضدخرگوشی بیوتینه (Goat anti rabbit/bitinated) با رقت ۱:۲۰۰ به مدت ۱ ساعت در انکوباتور تیمار گردید. پس از شستشو آنتی بادی ثالثیه (Straptividin /HRP) با رقت ۱:۲۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه تیمار می شود. سپس از ماده رنگی دی-آمینو بنزیدین استفاده شد. در نمونه کنترل منفی جهت تأیید کار به جای آنتی بادی اولیه شستشو با PBS انجام شد. قابل توجه این که برای کنترل مثبت خارجی از که نمونه های جفت انسانی از مادرانی زایمان Full-term داشتند استفاده شد.

روش آماری: بررسی آماری نتایج حاصل از ایمونوهیستوشیمی دو گروه با استفاده از آزمون غیرپارامتری Kruscal wallis ارزیابی شده است. مقایسه رنگ پذیری ایمونوهیستوشیمی سلول های مختلف از آزمون Willcoxon استفاده شده است. در بررسی هیستوپاتولوژی بیماران آزواسپرمی غیرانسدادی نتایج آماری به صورت توصیفی و درصد ارائه شده است.

### یافته ها

الف) یافته های هیستوپاتولوژی: افراد دو گروه آزواسپرمی انسدادی و غیرانسدادی تحت مطالعه هیستوپاتولوژی با استفاده رنگ آمیزی H & E قرار گرفتند. مردان با عارضه آزواسپرمی انسدادی از لحاظ هیستوپاتولوژیک نمای اسپرمانوتوزیس نرمال داشتند. تنها یک مورد از افراد با مشکل آزواسپرمی انسدادی درجاتی از مناطق فیبروتیک به صورت لوکال و در بقیه مناطق نمای اسپرمانوتوزیس نرمال داشتند. بیماران آزواسپرمی غیرانسدادی همگی دارای تظاهرات پاتولوژیک گسترده که بر اساس رده بندی Johns score چندین حالت پاتولوژیک دیده شد (جدول ۱).

ب) یافته های ایمونوهیستوشیمی: نمونه های جفت انسانی که به عنوان کنترل مثبت خارجی در نظر گرفته شده اند در سلول های سین سیشوتروفوبلاست و اندوتلیال رنگ پذیری ایمونوهیستوشیمی داشتند. در سه گروه مورد مطالعه (آزواسپرمی انسدادی-آزواسپرمی غیر انسدادی-کنترل) انواعی از سلول موجود در توبول سمینی فرا عم از لایدیگ، سرتولی، سیتوپلاسم اسپرما تیدهای نابالغ و سلول

و رضایت نامه کتبی با استفاده از بیوپسی بیضه<sup>۱</sup> که جهت درمان و یا تشخیص به مراکز نازایی برای انجام تکنیک های کمک باروری برای دسترسی به اسپرم مراجعه کرده بودند نمونه برداری صورت گرفت. نمونه ها تحت مطالعات نیمه کمی ایمونوهیستوشیمی و هیستوپاتولوژی قرار گرفت.

هیستوپاتولوژی نمونه های بافتی: نمونه ها بلافاصله پس از عمل بیوپسی بیضه به روش TESE درون محلول محیط کشت Hams f10 و سپس در محلول فیکساتیو بوئین و بعد از آن در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شدند. پس از آن بافت ها تحت آماده سازی - قالب گیری- برش دادن- تهیه نمونه لام از بافت و نهایتاً رنگ آمیزی شده و زیر میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند.

ایمونوهیستوشیمی بافت ها: پس از بیوپسی بافت بیضه و تشخیص نوع انسدادی و غیر انسدادی آزواسپرمی (وجود اسپرم در نمونه بیوپسی شده و عدم وجود اسپرم در نمونه مایع سمینال در بیماران نابارور آزواسپرمی انسدادی و عدم وجود اسپرم در نمونه بیوپسی شده و وجود اسپرم در نمونه مایع سمینال در بیماران نابارور آزواسپرمی غیر انسدادی) بافت بیضه در محلول فیکساتیو بوئین جهت بررسی های هیستوپاتولوژی و پس از ۴ ساعت در محلول فیکساتیو فرمالین ۱۰٪ برای بررسی ایمونوهیستوشیمی قرارداده شد. از بافت ها بلوک های پارافینی گرفته شد. برای انجام ایمونوهیستوشیمی برش های ۵ میکرونی از بافت ها به عمل آمده و بر روی لام هایی که با چسب Poly-L-Lysin پوشانده شده است قرار داده شد. لام ها ابتدا پارافین زدایی شده سپس پراکسیدازهای درون زاد<sup>۲</sup> با استفاده از پراکسید هیدروژن ۳٪، درصد و متانول به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی بلوکه شدند. اتصالات غیراختصاصی آنتی بادی ها با استفاده از سرم بزی مسدود شدند. سپس بیوتین های درون زاد نیز با استفاده از محلول بلوک کننده بیوتین به مدت ۱۵ دقیقه متوقف شدند. اطراف لام ها با استفاده از قلم داکو محدود شده (آنتی بادی اولیه پلی کلونال خرگوشی ضد انسانی آنزیم Rabbit eNOS anti human eNOS با رقت ۱:۵۰ به مدت ۱ ساعت در

### 2-Endogenous peroxidase

جدول ۱: یافته های پاتولوژی بیوپسی بیض مردان مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی مراجعه کننده به مراکز درمان ناباروری:

درصد	تعداد بیماران	تشخیص هیستوپاتولوژی
۲/۲۷٪	۶	هایپواسپرماتوژنزیس (Hypospermatogenesis)
۷/۲۲٪	۵	توقف ناکامل بلوغ اسپرم (Incomplete maturation arrest)
۱/۱۸٪	۴	سندرم سلول سرتولی تنها (Sertoli cell only syndrome (SCOS)
۶/۱۳٪	۳	توبول فیبروتیک (Tubulofibrotic)
۹/۰۹٪	۲	توقف کامل بلوغ اسپرم (Complete maturation arrest)
۹/۰۹٪	۲	نمای مخلوط (Mixed pattern)

جدول ۲: رنگ پذیری ایمونوهیستوشیمی آنزیم eNOS در نمونه های حاصل از بیوپسی بیضه در سلول های جنسی سه گروه (انسدادی - غیرانسدادی و کنترل):

(۰: عدم رنگ پذیری +: رنگ پذیری ضعیف ++: رنگ پذیری با شدت متوسط +++: رنگ پذیری شدید)

گروه/سلول	لایدیگ	سرتولی	لامینا پروپریا	میوفیبروبلاست ها
کنترل	++	+	+++	++
آزواسپرمی انسدادی	++	++	+	+
آزواسپرمی غیرانسدادی	+	+	+	+

جدول ۳: مکان یابی سلول های زایا در نمونه های بیوپسی شده در بافت بیضه انسانی آنزیم eNOS با استفاده از روش IHC.

(۰: عدم رنگ پذیری +: رنگ پذیری ضعیف ++: رنگ پذیری با شدت متوسط +++: رنگ پذیری شدید)

گروه/سلول	اسپرماتیدهای نابالغ	سلول زایای اینرمال با هسته پیکنوتیک	سلول زایای نرمال
کنترل	+	+	۰
آزواسپرمی انسدادی	+	+	۰
آزواسپرمی غیرانسدادی	++	++	۰

این بیماران به دلیل طیف گسترده هیستوپاتولوژی از توبول فیروز تا هایپواسپرماتوزنزیس (طبقه بندی پاتولوژیک بافت بیضه Johnsén score) که نمایانگر نقص در فرایند اسپرماتوزنزیس هستند میزان بیان پروتئین eNOS نسبت به گروه آزواسپرمی انسدادی که اسپرماتوزنزیس نرمال دارند در مقایسه با گروه کنترل تغییرات بیشتری داشته است.

در مطالعه حاضر شدت رنگ پذیری نزدیک به صفر در سلول های زایای نرمال و مقادیر رنگ پذیری با شدت بالاتر در سلول های اسپرماتید نابالغ و سلول های زایای غیر طبیعی به ظاهر هسته پیکنوتیک دیده شد. ارتباط ملکولی بین سطوح eNOS و مکان یابی این آنزیم و تعداد اسپرم و مورفولوژی نرمال اسپرم دیده شده اند [۱۴]. بافت های بیضه با تظاهرات پاتولوژیک نورمو اسپرمیک مقادیر کمتری از بیان eNOS را سطح بافتی نشان می دهد [۱۴، ۱۶]. علاوه بر این به دلیل کیفیت بد اسپرم ها در بیماران آزواسپرمی انسدادی و موفقیت کم حاملگی پس از انسداد از طریق وازکتومی مشهود می باشد به همین خاطر فاکتورهائی از قبیل اختلالات اپی دیدیمی، آنتی بادی های ضد اسپرم<sup>۱</sup> و عوامل افزاینده این آنتی بادی ها مانند مولکول نیتریک اکساید می توانند در بروز اختلال آزواسپرمی انسدادی نقش مهم بالقوه ای را ایفا کنند [۱۷]. از طرفی افزایش میزان آنتی بادی های ضد اسپرم در این بیماران همراه با افزایش در سطوح نیتریک اکساید می توان به این نتیجه رسید که در افراد با اختلال آزواسپرمی انسدادی این مولکول با افزایش تولید آنتی بادی ضد اسپرم سبب اختلال در روند تولید مثلی می گردند [۱۴، ۱۷]. بنابر این نیتریک اکساید ممکن است در کنترل عملکرد بافت بیضه چه در شرایط نرمال و چه در شرایط پاتولوژیک نقش داشته باشد گزارشات زیادی توجه به در هم کنش بین سلول های سرتولی وزایا دارند [۱۸]. به همین طریق در هم کنش<sup>۲</sup> بین سلول های زایا و سلول های سرتولی ممکن است بیان eNOS را نیز متأثر سازد. می توان بنابراین می توان به این فرضیه برسیم که بیان eNOS در سلول های سرتولی هنگامی که در توبول ها

های زایای با هسته پیکنوتیک که به نظر سلول های در حال آپوپتوزیس بودند رنگ پذیری eNOS در آنها مشاهده گردید. شدت رنگ پذیری در سه گروه مورد مطالعه در سلول های زایای نرمال در اکثر توبول ها میانگین صفر بود. اما در برخی موارد توبول ها رنگ پذیری ضعیفی داشتند.

شدت رنگ پذیری سلول های غیر جنسی (از قبیل سلول های سرتولی، لایدیگ، لامینا پروپریا، سلول های میوفیبروبلاست) در گروه غیر انسدادی نسبت به دو گروه (کنترل و انسدادی) کاهش نشان داد. (جدول ۲)

شدت رنگ پذیری سلول های جنسی (اسپرماتید های نابالغ و اسپرماتید های با هسته به ظاهر پیکنوتیک) در گروه همراه با اختلالات شدیدتر توبول سمینیفروس یعنی آزواسپرمی غیرانسدادی نسبت به دو گروه (انسدادی و کنترل) افزایش داشت. (جدول ۳)

## بحث

عوامل گوناگونی در بروز آزواسپرمی دخالت دارند که در این میان مولکول نیتریک اکساید و ایزوفرم اندوتلیالی آنزیم سنتزکننده نیتریک اکساید اخیرا مورد توجه خاص محققین قرار گرفته است. در مطالعه پیش رو رنگ پذیری ایمونوهیستو شیمی آنزیم eNOS در افراد مبتلا به آزواسپرمی انسدادی و غیرانسدادی با گروه کنترل مورد بررسی نیمه کمی قرار گرفت. شدت رنگ پذیری کمتر سلول های غیر جنسی در مواردی که با اختلال شدید اسپرماتوزنزیس در بیماران مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی، می تواند گواهی بر عملکرد آنزیم eNOS در مقادیر فیزیولوژیک باشد. نیتریک اکساید به عنوان چاقوی دو لبه ای است که هم در مقادیر بالاتر و هم در مقادیر پائین تر فیزیولوژیک می تواند برای سلول ها مضر باشد [۱۳]. حال اینکه در گروه آزواسپرمی غیر انسدادی که نسبت به دو گروه دیگر اختلال وسیع تری را در تمامی بخش های توبول سمینی فر دارند سلول های غیر زایا با رنگ پذیری کمتری مواجه شدند. بنابراین مقادیر بیان eNOS در سلول های غیرزایا در گروه غیرانسدادی کمتر از حد نرمال مورد نیاز برای عملکرد صحیح بافت بیضه بوده است. این یافته ها با یافته های پاتولوژیک بیماران مبتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی نیز قابل توجه است. در

1 -Anti sperm Antibody

2 -interaction

از نقائص اسپرمتوزنزیس را داشته و همچنین افرادی که هیپر تروفی خوش خیم پروستات<sup>۱</sup> داشتند وارد مطالعه شدند و به عبارتی در گروه کنترل افراد بافت بیضه سالم به معنای واقعی نمونه بافتی سالم نداشتند. در حالیکه در مطالعه حاضر افراد گروه کنترل شامل افرادی بودند که دارای اسپرمتوزنزیس کاملاً نرمال و بافت بیضه سالم بوده و برای تشخیص ناباروی و یا دلایل دیگر (به عنوان مثال داشتن استرس در دادن نمونه) طبق صلاحدید پزشک اورولوژیست تحت عمل بیوپسی بیضه قرار گرفتند [۲۱].

### نتیجه گیری

شباهت بیشتر هیستوپاتولوژی بافت بیضه مردان مبتلا به آزواسپرمی انسدادی به گروه نرمال نسبت به گروه غیرانسدادی و از سوی دیگر افزایش بیان ایزوفرم اندوتلیالی آنزیم سنتز کننده نیتریک اکساید در مردان مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی می تواند بیانگر این واقعیت باشد که احتمالاً آنزیم eNOS نقش محوری را در تکامل و آپوپتوز سلول های زایا در توبول سمینی فر و روند اسپرمتوزنزیس طبیعی ایفای کند. با علم به این موضوع در گام های تحقیقاتی آینده می توان با استفاده از مهارکننده های وسیع ایزوفرم اندوتلیالی آنزیم سنتزکننده نیتریک اکساید بر روی مردان آزواسپرمی خصوصاً مردان مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی که وضعیت بحرانی تری را از نظر سلامت سلول های موجود در توبول های سمی نیفر و تعداد اسپرم نرمال را دارند به تقویت هرچه بیشتر این فرضیه نوظهور و در نهایت راهکارهای بالینی جهت مرتفع ساختن این نقیصه را ارائه نمود.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از یافته های پژوهشی در مرکز تحقیقات باروری - ناباروری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می باشد.

شاهد انواع سلول های زایا هستیم بیشتر است. منطقی است در مواردی که بیماران از لحاظ هیستولوژی نرمال هستند مثل بیماران آزواسپرمی انسدادی و افراد گروه کنترل نسبت به حالت هیستوپاتولوژی در بیماران آزواسپرمی غیر انسدادی که نمایی از کاهش سلول های زایا در توبول ها را دارند بیان سلول های سرتولی به همان اندازه بیشتر می شود. البته عملکرد نیتریک اکساید در سلول های سرتولی هنوز مشخص نشده است [۲۱-۱۹] و نیازمند افزودن روش های کمی دیگری از قبیل ایمونو بلات و PCR می باشد. تعداد اندک اسپرم می تواند مربوط به در معرض قرار گرفتن طولانی مدت اپی تلیوم توبول سمینیفر با مقادیر بالای eNOS باشد که سبب تولید گونه های واکنش دهنده با اکسیژن (Reactive Oxygen Species) شده [۲۵] و از این طریق سبب آسیب به توبول سمی نیفر و آتروفی بیضه و نهایتاً کاهش تعداد کلی اسپرم و نهایتاً آزواسپرمی گردد [۲۰].

نیتریک اکساید حاصل از کاتالیز آنزیم اندوتلیالی نیتریک اکساید در سطوح پاتولوژیک بالاتر از  $10^4$  تخریب سلول های زایای اپی تلیوم توبول های سمی نیفر را از طریق آپوپتوز القا می کند [۱۷،۲۲].

تمامی سلول ها با درجاتی شدت رنگ پذیری ضعیف تا شدت بالا داشتند به جز سلول های زایای نرمال که تقریباً فاقد رنگ پذیری ایمونوهیستوشیمی بوده است. سلول های زایای در توبول سمی نیفر مقادیری از مولکول های کوچک نیتریک اکساید را تولید می کنند که در مقادیر بالای فیزیولوژیک با تولید پروکسی نیتریت می تواند بلافاصله با پروتئین ها- لیپید ها و DNA واکنش نشان دهد که تاثیرات مخربی بر روند طبیعی اسپرمتوزنزیس خواهد داشت [۲۳]. یافته های حاصل از بررسی ایمونوهیستوشیمی نمونه های مورد مطالعه با نتایج حاصل از یافته های Zini و همکارانش [۲۴] در سال ۱۹۹۶ که ایمونوهیستوشیمی eNOS را بر روی بافت بیضه واپی دیدیم و وازدفران در افراد سالم انجام دادند مطابقت دارد. این مقاله شاید تنها مقاله نزدیک با موضوع مورد مطالعه ما باشد [۲۱،۲۶]. با این وجود یکی از نقایص اصلی مطالعات Zini و همکارانش در این بررسی این بوده است که نمونه های کنترل آن ها افرادی بودند که درجاتی

## References

1. Akira Tsujimura, Yasushi Miyagawa, Eitetsu Koh, Mikio Namiki, and Kazuo Sengoku, Male Infertility and Its Causes in Human Toshinobu Miyamoto, (2011)
2. Sigman M, Jarow JP. Male infertility, In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED Jr, Wein AJ, eds, Campbell's Urology, Philadelphia, Pa: Saunders; 2002:1475-1531
3. S.O. Ikuerowol, M. C. Izegebu, A. S. Benebo, I. O. Fadeyibi, F.O. Testicular Biopsies of Azoospermic Men African Journal of Urology 2010; Vol. 16, No. 3
4. Moncada S, (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology, Pharm. Rew. 43(2): 109-142.
5. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, "et al", Incidence and main causes of infertility in a resident population of three French regions (1988-1989), Hum. Reprod. 1991; Jul; 6(6):811-6.
6. Thippeswamy, T., McKay, J., Quinn, J.P. and Morris, R, (2006) Nitric oxide, a biological double-faced janus- is this good or bad? Histol. Histopathol, 21(4): 445-458.
7. Eskiocak S, "et al", Effect of psychological stress on the L-arginine nitric oxide pathway and semen quality, Brazil J Med Biol Res 2006; 39: 581-588.
8. Toshinobu Miyamoto, Akira Tsujimura, Yasushi Miyagawa, Eitetsu Koh, Mikio Namiki and Kazuo Sengoku, Male Infertility and Its Causes in Human Received ; Review Article 2011;
9. Cesare Battaglia, "et al", Interstitial Doppler flow, seminal plasma nitrites/nitrates and nonobstructive sperm extraction from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia: Fertility and Sterility, 2001; 75 1088- 1093
10. Nistal M, Riestra ML, Paniagua R, Testicular biopsy in patients with azoospermia, Am J Surg Pathol 1999; 23 (12) : 1586-54
11. Ezeh UI, Moore HD, Cooke ID, Correlation of sperm extraction with morphological, biophysical and endocrine profiles in men with azoospermia due to primary gonadal failure. Human Reprod, 1998; 13(11) : 3066-74
12. Koji Shiraishi and Katu ssuke, Nitric oxide produced in the testis is involved in dilation of internal spermatic vein that compromises spermatogenesis in infertile men with varicocele, Bju. international (2006) (1086-1090)
13. M. Mc Cann, C. Mastronardi, A. Walcewska, S. Kkaranth, V. Rettori and W.H Yu, The role of nitric oxide in reproduction, (1999). vol 32 pp 1367-1379
14. M. Fujisawa A, K. Yamanaka, H. Tanaka, H. Okada, S. Arakawa and S. Kamidono, Expression of endothelial nitric oxide synthase in sertoli cells of men with infertility of various causes, BJU. (2001). 87 (85-8)
15. Sejal B Doshi, Karishma Khullar, Rakesh K Sharma and Ashok Agarwal Doshi, "et al", Role of reactive nitrogen species in male infertility. Reproductive Biology and Endocrinology 2012, 10:109
16. Rosselli, M. and Paul, J, (1998) Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathology of reproduction, Hum. Rep. Update 4913: 3-1
17. Zhang, H. and Zheny, R.L, (1996) Possible role of nitric oxide of fertile and asthenozoospermic infertile human sperm functions, Free Radic. Res. 25: 347-354.
18. Zini A, O' Bryan MK, Magid MS, Shegel PN, Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, Epididymis and vas deferens suggest a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation and programmed cell death, Biol Reprod 1996; 55:935-41
19. Burnett AL, Richer DD, Chamness SL, "et al", Localization of nitric oxide synthase in the reproductive tract of the male rat, Biol Reprod 1995 ; 52 :1-7
20. Le Magueresse B, Jegou B, Possible involvement of germ cell in the regulation of oestradiol-17 and ABP secretion by immature rat sertoli cells (in vitro studies), Biochem Biophys Res Commun 1986; 14 : 861-9
21. Foghi Kh, Ghaffari Novin M, Madjd Jabbari Z, Najafi T, Heidari M H, A Rostampour Yasoori, Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in testicular cells of men with nonobstructive azoospermia [Persian].

22. Burnett AL, Maguire MP, Chamness SL, "et al".: Characterization and localization of nitric oxide synthase in the human prostate, *Urology* 45: 435–439, 1995
23. Nikki p.y.lee and c.yan chengy, Nitric oxide/nitric oxide synthase, spermatogenesis and Tight junction Dynamics, *Biology of reproduction*(2003);pp(267-276)
24. Kang You Min , Zhang Jian , LIJIAN , Duan Xiang –Lin , Expression of eNOS in rat testes from infancy to maturity , *current zoology* (2003) 49(3) 3339-45
25. Sejal B Doshi, Karishma Khullar, Rakesh K Sharma and Ashok Agarwal\* Doshi , "et al", Role of reactive nitrogen species in male infertility *Reproductive Biology and Endocrinology* 2012, 10:109
26. Najafi T , Ghaffari Novin M, Pakravesht J , Foghi Kh, Fadayi F, Rahimi G . Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in endometrial tissue of women with unexplained infertility, *Iran J Reprod Med.* 2012 Mar; 10(2): 121–126 [Persian].



# Relationship between endothelial nitric oxide synthase and Azoospermia

Foghi KH1\*, Kiani F2, Ghaffari Novni M3, Saber Rad Z4

<sup>1</sup>faculty member of North Khorasan Medical University of Science, Department of Anatomical Sciences, Bojnurd, Iran

<sup>2</sup>Master Science of Biochemistry, Shahid Beheshti Medical University of Science, Department of Biochemistry, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Associate Professor of Shahid Beheshti Medical University of Science, Department of Reproductive, Tehran, Iran

<sup>4</sup>Midwifery Student, North Khorasan University of Medical Science, Midwifery & Nursing School, Student Research Committee NKUMS

\*Corresponding Author: North Khorasan University of Medical Science, Department of Anatomical Sciences, Bojnurd, Iran  
Email: Alashtlake@gmail.com

## Abstract

**Background & objectives:** The aim of the present study was to characterize the localization of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in "normal" human testis and in testis with azoospermia and their possible relationship with testicular tissue.

**Materials & Methods:** In this case-control study, testicular biopsies were obtained from 10 men with obstructive azoospermia (Group1= OA) and 10 men with non-obstructive azoospermia (Group2=NO) and 7 men with normospermia (Group 3=control) who were attended to infertility center for diagnosis or infertility treatment. Immunohistochemistry was used to localize of the isoform of eNOS. In addition, the histopathological evaluation was examined in these three groups.

**Results:** Histopathological examination of the testis revealed no difference between normal and obstructive groups. Different histopathological appearances were observed in non-obstructive azoospermic group. The eNOS protein was localized in the cytoplasm of sertoli and leydig cells in three groups. Except from normal germ cells, the rest of germ cells including (immature spermatids, abnormal germ cells and germ cells with pyknotic nuclei) showed positive immunostaining. The expression of eNOS in non-obstructive group was significantly higher than others ( $P = 0.001$ ). In contrast, immature spermatids and abnormal germ cells in three groups were the same.

**Conclusion:** various expression of eNOS in several types of testicular tissue suggest that elevated eNOS localization could play important role in abnormal spermatogenesis and germ cell apoptosis.

**Key words:** eNOS, non-obstructive azoospermia, immunostaining