مقاله پژوهشی

تاثیر ایبوپروفن بر پارامترهای اسپرمی، استرس اکسیداتیو و هیستولوژی بیضه موش

صفورا شفیق جزی[۱،۲]، نیلوفر صادقی[۱]، دینا ظهرابی[۲]، مرضیه تولائی[۱*]، محمد حسین نصر اصفهانی[۱]

۱- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه زیست‌فناوری تولیدمثل، اصفهان، ایران

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، موسسه آموزش عالی نور دانش میمه، اصفهان، ایران

*مسئول مکاتبات: Tavalaee.m@royaninstitute.org

DOI: 10.22034/ascij.2022.1940492.1306

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۰

چکیده

اخیرا استفاده از داروهایی که به دلایلی غیر از ناباروری مردان تجویز می‌شود ممکن است تأثیر بالایی بر پتانسیل باروری داشته باشد. ایبوپروفن، به عنوان یکی از داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی، احتمالاً می‌تواند تأثیر منفی بر روند اسپرماتوژنز داشته باشد که می‌تواند وابسته به دوز باشد. این عارضه جانبی احتمالاً از طریق استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود. بنابراین، در این مطالعه، ما اثر دوزهای مختلف ایبوپروفن بر اسپرماتوژنز، پارامترهای اسپرم و استرس اکسیداتیو را ارزیابی کردیم. در این مطالعه، ۱۵ موش نر NMRI، روزانه با دوزهای مختلف ایبوپروفن (۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) به مدت یک ماه گاواژ شدند. موش‌ها روزانه گاواژ شده و پس از ۳۵ روز آسان کشی شدند. سپس پارامترهای مورفومتریک بیضه، غلظت، تحرک و استرس اکسیداتیو اسپرم ارزیابی شد. در نهایت داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون ANOVA تحلیل گردید. دوزهای مختلف ایبوپروفن در مقایسه با گروه کنترل بر امتیاز جانسون و غلظت اسپرم تأثیری نداشت. اما تحرک اسپرم تنها در دوز ۱۰۰ میلی-گرم/کیلوگرم به طور ناچیزی کاهش یافت. بعلاوه سطح استرس اکسیداتیو در تمام دوزهای ایبوپروفن در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت و این افزایش تنها در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم معنادار بود (p =۰ /۰۳). بر اساس نتایج این مطالعه، تجویز مداوم ایبوپروفن به مدت یک ماه هیچ تأثیر قابل توجهی بر اسپرماتوژنز و پارامترهای اسپرم ندارد، اما به طور قابل توجهی تولید ROS را افزایش می‌دهد که تأثیر آن بر یکپارچگی کروماتین اسپرم، برای مدت طولانی نگران‌کننده است، که در آینده نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

کلمات کلیدی: ایبوپروفن، پارامترهای اسپرم، استرس اکسیداتیو

مقدمه

به شرایطی که زوجین به مدت یک سال به صورت محافظت نشده رابطه جنسی داشته باشند ولی باردار نشوند، "ناباروری" گفته می‌شود (۲۹). ناباروری، در ۱۰ تا ۱۵ درصد زوجین مشاهده می‌شود که نیمی از علل آن مربوط به فاکتورهای مردانه می‌باشد (۱). اسپرماتوژنز، یک فرآیند پیچیده می‌باشد که منجر به تولید گامت‌های نر بالغ در لوله‌های منی‌ساز می‌شود. بنابراین، هرگونه نقص در این فرایند ممکن است بر

تمایز و بلوغ اسپرم تأثیرگذار باشد (۱۷). اختلالات فرآیند اسپرماتوژنز ممکن است توسط عوامل درونی یا بیرونی ایجاد گردد. برای عوامل درونی می‌توان به فعل و انفعالات هورمونی و ناهنجاری‌های آناتومیک، و برای عوامل بیرونی موثر بر اسپرماتوژنز می‌توان به شیوه زندگی، تغذیه و مصرف برخی از داروها اشاره نمود (۱٤). در نهایت، پیامد عوامل درونی و بیرونی ممکن است منجر به افزایش سطح استرس اکسیداتیو، کاهش کیفیت اسپرم و آسیب DNA اسپرم شود (۲۳).

داروهای غیر استروئیدی ضد التهابی (NSAID) یکی از رایج‌ترین گروه‌های دارویی مسکن هستند که اثرات ضد درد و ضد تب دارند، و در دوزهای بالا دارای اثرات ضد التهابی می‌باشند (۲۸). آن‌ها تقریباً ۵ تا ۱۰ درصد کل داروهای تجویز شده در هر سال را به خود اختصاص می‌دهند.

این داروها آنزیم‌های سیکلواکسیژناز (COX) (سیکلواکسیژناز ۱ و سیکلواکسیژناز ۲) را مهار می‌کنند که این آنزیم‌ها تعیین کننده‌ی میزان پروستاگلاندین‌ها و سنتز پروستانوئیدهای دیگر مثل ترومبوکسان‌ها می‌باشند. سیکلواکسیژناز ۲ نقش بیشتری را در التهاب و درد ناشی از مداخله پروستاگلاندین ایفا می‌کند، درحالی که سیکلواکسیژناز ۱ نقش مهمی را در حفاظت از مخاط معده و هموستاز پلاکت ایفا می‌کند (۷).

اثر فارماکودینامیکی این داروها عمدتا با مهار سیکلواکسیژناز ۲ انجام می‌شود در حالی که عوارض جانبی عمدتا به دلیل مهار سیکلواکسیژناز ۱ می‌باشد (۲۸).

ایبوپروفن متعلق به گروه NSAID می‌باشد و معمولا برای درد، تب و التهاب استفاده می‌شود. در بیشتر موارد، ایبوپروفن در بیماری‌ها و اختلالات دردناک متداول مانند آرتریت روماتوئید (روماتیسم مفصلی)، دندان درد، دوره قاعدگی و میگرن استفاده می‌شود. ایبوپروفن را می‌توان به صورت خوراکی یا وریدی مصرف نمود. هنگامی که به صورت خوراکی مصرف می‌شود، معمولا عملکرد آن در کمتر از یک ساعت شروع می‌شود. تا کنون مطالعات متعددی انجام گردیده که اثر ایبوپروفن را در دوزهای مختلف بر توانایی تولیدمثل انسان و یا گونه‌های مختلف حیوانات، در هر دو جنس نر و ماده بررسی نموده است. به عنوان مثال گروهی از محققان اثر ایبوپروفن را بر بافت بیضه انسان بررسی کردند و دریافتند که این دارو باعث تغییراتی در ترشح هورمون‌های بیضه می‌گردد (۱۳).

همچنین محققان نشان دادند قرار گرفتن رحم در معرض دوزهای درمانی ایبوپروفن منجر به کاهش کیفیت برخی از پارامترهای اسپرمی در زاده های نر نسل اول و دوم می‌گردد (۲۲).

مطالعات متعدد، اثرات متفاوتی از ایبوپروفن بر پارامترهای مختلف اسپرم مانند حرکت، حیات، تعداد و سلامت DNA را بیان نموده‌اند (۱۰،۲۰).

به طور کلی به نظر می‌رسد زمانی که ایبوپروفن، در دوزهای بالا استفاده می‌شود، کیفیت مایع منی را تغییر دهد. این اثر ایبوپروفن در کیفیت منی ممکن است از طریق مکانیسم‌هایی همچون کاهش سنتز تستوسترون و پروستاگلاندین، کلاته شدن یون روی (Zn) و مهار سنتز نیتریک اکسید باشد (۳).

با توجه به مطالب گفته شده و اینکه بیشتر داروهای ضد التهابی و مسکن به صورت وابسته به دوز باعث فعال شدن مسیر استرس اکسیداتیو می‌شوند، لذا به دلیل استفاده‌ی این داروها برای درمان برخی بیماری‌ها، بررسی تاثیر این دارو بر پارامترهای اسپرمی ضروری به نظر می‌رسد.

لذا در این مطالعه برای اولین بار غلظت‌های مختلف ایبوپروفن (۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بر

هیستولوژی بیضه، پارامترهای اسپرمی و سطح استرس اکسیداتیو مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی (نوع تحقیق بنیادی می‌باشد)، تعداد ۱۵ سر موش نر نژاد NMRI با سن ٦ هفته و میانگین وزن ۳۰ گرم از پژوهشکده زیست فناوری پژوهشگاه رویان خریداری شدند و بر اساس اصول اخلاقی نگهداری حیوانات آزمایشگاهی و دسترسی آزادانه به آب و غذا و شرایط یکسان (۱۲:۱۲ تاریکی و روشنایی، رطوبت ۵۰ درصد، دما ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند (لازم به ذکر است که این طرح در کمیته اخلاق پژوهشکده رویان با کد IR.ACECR.ROYAN.REC.1399.021 مورد تایید قرار گرفته است). پس از گذشت یک هفته آشنایی موش‌ها با محیط، موش‌ها به طور تصادفی به پنج گروه سه تایی شامل گروه کنترل (این گروه با ترکیب آب و DMSO (Merck، آلمان) که حلال ایبوپروفن می باشد، گاواژ شدند (دوز DMSO مصرفی، ۵ میلی لیتر بر کیلوگرم بود (۸) و گروه‌های مصرف کننده ایبوپروفن (هدیه از شرکت دارویی CellOxess) با دوز mg/kg ۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ تقسیم شدند (۲۱). گاواژ به صورت روزانه انجام گردید (گروه کنترل گاواژ شده با آب و DMSO نشان دهنده عدم تاثیر استرس گاواژ بر پارامترهای اسپرمی است) و پس از گذشت ۳۵ روز که معادل یک دوره اسپرماتوژنز در موش است (۱۸)، موش‌ها را وزن کشی کرده و در نهایت آسان کشی شدند (گاواژ دارو، از زمان شروع بلوغ موش‌ها یعنی هنگامی که هفت هفته‌ای بودند آغاز گردید). پس از آسان کشی نمودن موش‌ها، بیضه چپ و اپی‌دیدیم جمع آوری گردید. پس از جداسازی بیضه از اپی‌دیدیم، برای ارزیابی مورفومتریک بیضه و اپی‌دیدیم، با استفاده از کولیس، طول، عرض، ضخامت و سپس وزن بیضه و همچنین طول اپی‌دیدیم اندازه‌گیری و داده‌ها ثبت گردید. جهت ارزیابی‌های بافت شناسی، نمونه‌ی بافت بیضه‌ی سمت چپ موش‌ها را در محلول فرمالین ۱۰ درصد (Merck، آلمان) (۲ میلی لیتر فرمالدئید در ۱۸ میلی لیتر آب مقطر حل گردید) قرار داده و فیکس شدند، سپس از آن‌ها مقاطع بافتی تهیه شد و رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین انجام گردید. این رنگ آمیزی امکان مشاهده‌ی کلی نحوه توزیع و چینش سلول ها و بررسی ساختار بافتی کلی نمونه را فراهم می کند(۲٦). در نهایت ارزیابی لام‌های رنگ آمیزی شده با استفاده از امتیاز جانسون و میکروسکوپ نوری صورت گرفت (امتیازدهی به روش جانسون روشی برای ارزیابی و تجزیه و تحلیل بافت شناسی بیضه در مقیاس ۱ تا ۱۰ می‌باشد، که نمره بالاتر نشان دهنده وضعیت بهتر اسپرماتوژنز و نمره پایین‌تر نشان دهنده اختلال شدیدتر عملکرد اسپرماتوژنز است (۲۵). جهت دستیابی به اسپرم، ناحیه‌ی انتهایی اپی‌دیدیم که محل اصلی تجمع اسپرم‌های بالغ است، را قطعه قطعه نموده و به یک پتری‌دیش حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت شستشو اسپرم (وایتا–اسپرم، ایناکلون–ایران) و سرم آلبومین ۱۰درصد (Sigma، آمریکا) منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده می‌شود. پس از ۳۰ دقیقه، اسپرم‌های استخراجی از قطعات اپی‌دیدیم جمع‌آوری و به یک لوله‌ی سانتریفوژ منتقل گردید. سپس بررسی تعداد، تحرک و استرس اکسیداتیو اسپرم انجام شد.

بررسی غلظت و تحرک اسپرم: برای ارزیابی تحرک اسپرم ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌ی شست و شو داده نشده‌ی اسپرم‌ها را روی لامی که از قبل به دمای ۳۷ درجه رسیده است، قرار داده و یک لامل با زاویه‌ی ٤٥ درجه روی آن قرار گرفت. سپس با میکروسکوپ

نوری، تعداد ۲۰۰ اسپرم را در چندین میدان دید شمارش، و اسپرم‌ها در سه وضعیت متحرک، غیر متحرک و بی‌حرکت مورد بررسی قرار گرفت و نتایج بصورت درصد تحرک اسپرم گزارش شد.

جهت شمارش تعداد اسپرم‌ها از لام شمارشگر اسپرم (sperm meter, Sperm Processor, India) استفاده گردید. در ابتدا ۵ میکرولیتر از نمونه درون محفظه‌ی داخلی لام قرار داده شد و سرپوش شیشه‌ای روی آن قرار گرفت. سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری، تمامی اسپرم‌های موجود در خانه‌های ۱۰ ستون لام، شمارش گردید و عدد حاصل ابتدا تقسیم بر ۱۰ و سپس در یک میلیون ضرب و گزارش شد(۱۹).

بررسی لیپید پراکسیداسیون اسپرم: پراکسیداسیون لیپید یک حمله‌ی اکسایشی از جانب ROS می‌باشد که طی آن با دریافت الکترون از لیپیدهای غشایی منجر به تبدیل آن‌ها به رادیکال آزاد لیپیدی می‌شوند. این واکنش با تکرار زنجیروار خود در غشای اسپرم، باعث آسیب غشای سلولی اسپرم می‌گردد. میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشای اسپرم را می‌توان با استفاده از رنگ Bodipy 581/591-C11 ارزیابی نمود. Bodipy، یک رنگ فلورسانس می‌باشد که در حلال-های آلی به شدت انحلال می‌یابد. اساس کار این تست بر حساسیت این پروب به اکسیداسیونی استوار است که توسط رادیکال های آزاد تشکیل شده از لیپید پراکسیدازها تولید گشته است. این پروب در میان غشاهای بیولوژیکی جای می‌گیرد، به گونه‌ای که قابل ردیابی می‌باشد و در هنگام حمله‌ی رادیکال‌های آزاد با تغییر پرتودهی از اشعه قرمز به اشعه سبز توسط دستگاه فلوسایتومتری قابل ردیابی می‌باشد. برای این تست، ابتدا دو لوله‌ی سانتریفوژ یکی به عنوان لوله کنترل و دیگری به عنوان لوله تست آماده شد. سپس ۲ میلیون اسپرم از محیط اسپرم رقیق شده به هر یک از دو لوله‌ی تست و کنترل اضافه گردید. پس از به حجم رساندن لوله‌ی کنترل به ۵۰۰ میکرولیتر با اضافه کردن PBS، ۵ میکرولیتر از رنگ BODIPY با غلظت نهایی ۵ میلی‌مولار فقط به لوله‌ی سانتریفوژ تست در محیط تاریک اضافه نمودیم. بعد از به حجم رساندن لوله‌ی تست به ۵۰۰ میکرولیتر با اضافه کردن PBS، لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور تاریک با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده می‌شود. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور g ۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید و پس از رقیق شدن با PBS (شستشوی اسپرم ها با افزودن PBS به نمونه و سانتریفیوژ با دور g ۳۰۰۰ در دو نوبت) درصد لیپید پراکسیداسیون توسط دستگاه فلوسایتومتری (BD FACs calibur) مورد بررسی قرار گرفت (۲).

آنالیز آماری: برای بررسی و تحلیل داده‌های خام حاصل از این مطالعه از نرم‌افزار IBM SPSS Statistics نسخه ۲۳ استفاده گردید. نرمال بودن داده-ها با روش Kolmogorov-Smirnov بررسی گردید و سپس از روش آماری تحلیل واریانس یک طرفه (One-Way Anova) و آزمون Tukey استفاده شد. نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد بوده و $P \leq ۰/۰۵$ به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد. برای رسم نمودار نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

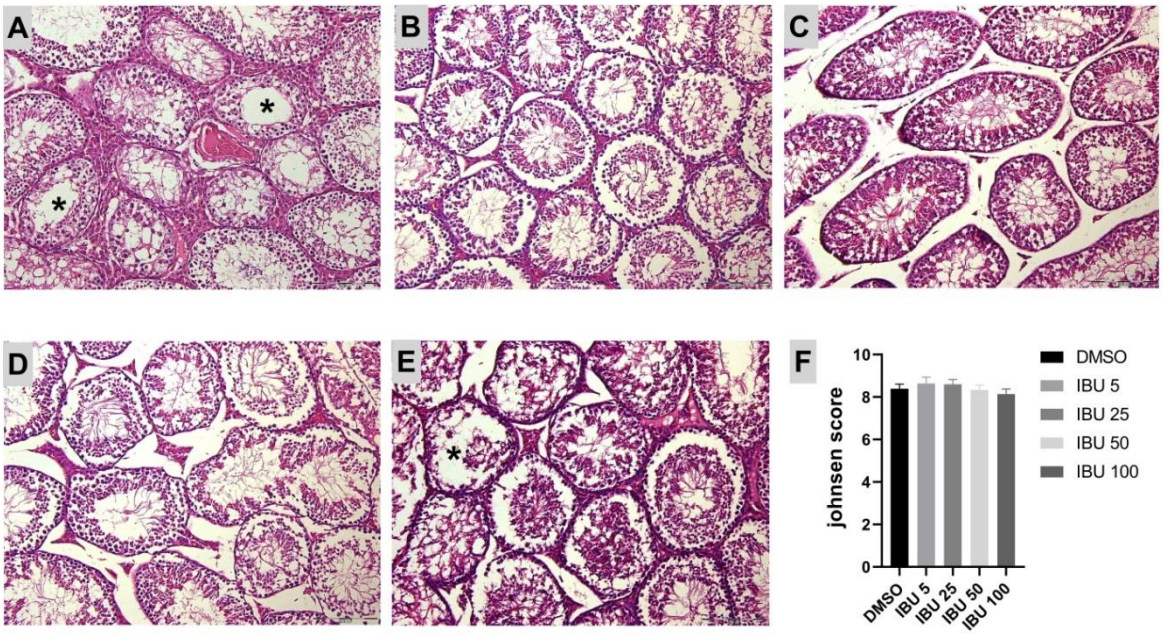
آنالیز مقایسه‌ای وزن موش، پارامترهای مورفومتریک بیضه و اپی‌دیدیم در بین گروه‌ها (جدول ۱) بیانگر آن بود که غلظت‌های متفاوت ایبوپروفن (۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) تاثیر معنی‌داری در وزن موش، طول اپیدیدیم، طول بیضه، و وزن بیضه نداشته است ($p > ۰/۰۵$). با بررسی مقطع بافت بیضه با استفاده از امتیاز جانسون (شکل۱)، نتایج نشانگر آن است که در تمام دوزهای ایبوپروفن استفاده شده (۵،

، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)، امتیاز جانسون تغییر معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل (DMSO) نداشته است. لذا ایبوپروفن نتوانسته تاثیر منفی بر روند سلول‌های زایا در طی فرایند اسپرماتوژنز در بیضه داشته باشد (p >۰/۰۵). شکل۲ نتایج آنالیز مقایسه‌ای دوزهای متفاوت ایبوپروفن را بر روند غلظت و تحرک اسپرم نشان می‌دهد. همانگونه که در شکل مشخص است غلظت اسپرم در دوزهای متفاوت ایبوپروفن نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نداشته است (p >۰/۰۵). در حالی که ما شاهد تاثیر منفی (غیرمعنادار) ایبوپروفن بر حرکت اسپرم در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل بودیم ولی سایر دوزهای ایبوپروفن به طور معناداری تحت تاثیر مصرف این دارو قرار نگرفته است (p >۰/۰۵).

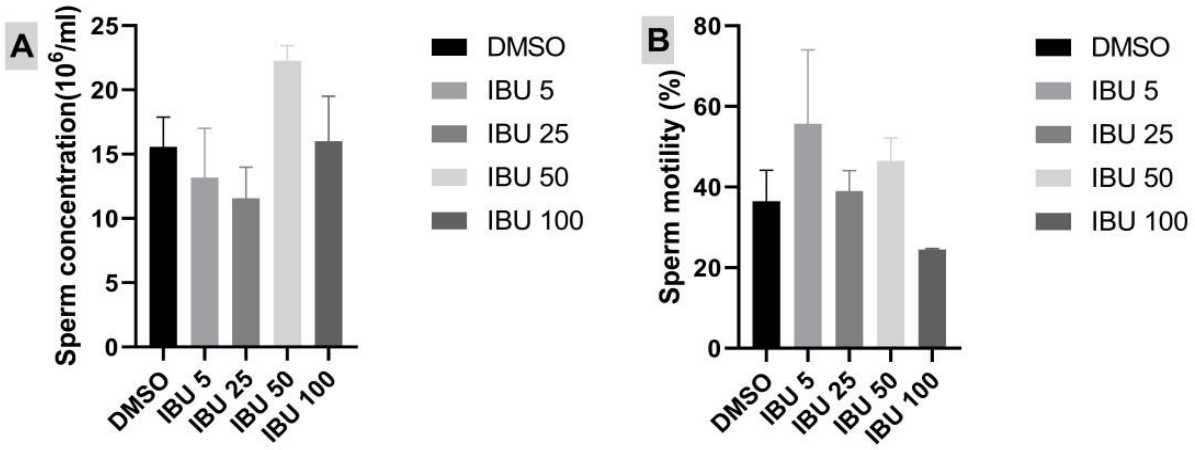
شکل ۳ نتایج آنالیز مقایسه‌ای دوزهای متفاوت ایبوپروفن را بر روند استرس اکسیداتیو (لیپید-پراکسیداسیون) اسپرم نشان می‌دهد. میانگین لیپید-پراکسیداسیون اسپرم در دوزهای ۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ایبوپروفن نسبت به گروه کنترل افزایش را داشته ولی این افزایش فقط در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ایبوپروفن معنی دار بوده است (p = ۰/۰۳).

جدول ۱. مقایسه وزن بدن، وزن بیضه، طول بیضه و طول اپیدیدیم بین گروه ها (میانگین ± خطای استاندارد)

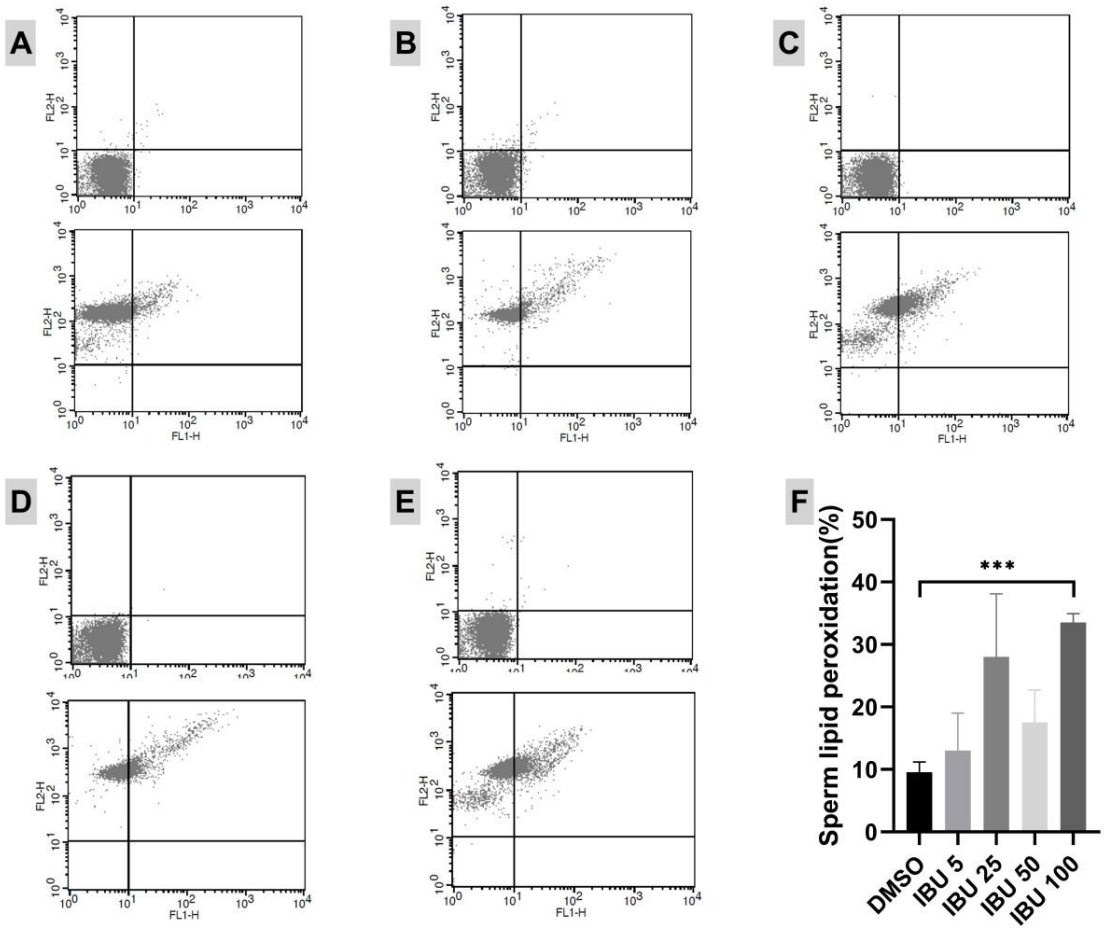
پارامترها	گروه DMSO	ایبوپروفن ۵ (میلی‌گرم/کیلوگرم)	ایبوپروفن ۲۵ (میلی‌گرم/کیلوگرم)	ایبوپروفن ۵۰ (میلی‌گرم/کیلوگرم)	ایبوپروفن ۱۰۰ (میلی‌گرم/کیلوگرم)
وزن نهایی بدن (گرم)	۳۹/۰٦±۱/۱۸	۳٦/٤۳±۰/۳۸	۳۲/۰۳±٤/۱٤	۳۸/٦۸ ±۱/٦۷	۳۸/۲۰±۱/۵۷
وزن بیضه (گرم)	۰/۰۹±۰/۰۱	۰/۰۹±۰/۰۰	۰/۰۹±۰/۰۰	۰/۱۳±۰/۰۱	۰/۰۹±۰/۰۰
طول بیضه (سانتی‌متر)	۰/۸۵±۰/۰۷	۰/۹۰±۰/۱۵	۰/۸۳±۰/۰۳	۰/۹۵±۰/۱۱	۰/۷٦±۰/۰۳
طول اپیدیدیم (سانتی‌متر)	۱/۸۳±۰/۱۱	۱/۹۳±۰/۲۰	۱/۸٦±۰/۱٤	۱/۹۵±۰/۰۵	۲/۰۳±۰/۰۳



شکل ۱- مقایسه امتیاز جانسون (F) و رنگ آمیزی H & E بافت بیضه در گروه‌های DMSO (A)، ایبوپروفن ۵ (B)، ۲۵ (C)، ۵۰ (D) و ۱۰۰ mg/kg (E)



شکل ۲- مقایسه غلظت (A) و تحرک اسپرم (B) بین گروه DMSO و غلظت‌های مختلف ایبوپروفن



شکل ۳- نمودار فلوسایتومتری در گروه‌های DMSO (A)، ایبوپروفن ۵ (B)، ۲۵ (C)، ۵۰ (D) و ۱۰۰ mg/kg (E) و نمودار مقایسه‌ی لیپید پراکسیداسیون بین گروه‌ها (F)

بحث

نتایج این مطالعه نشان می دهد که مصرف داروی ایبوپروفن در دوزهای۵، ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ میلی-گرم/کیلوگرم تاثیر منفی بر وزن موش، وزن بیضه، طول اپیدیدیم و طول بیضه و همچنین روند اسپرماتوژنز که بر اساس امتیاز جانسون بررسی شده بود، نداشته است. در رابطه با تاثیر دوزهای مختلف ایبوپروفن (۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بر غلظت اسپرم، نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف این دارو، اثر معنی‌داری بر غلظت اسپرم نداشته است. Roodbari و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند مصرف ایبوپروفن با دوز ۳۰ و ۵۷ میلی‌گرم/کیلوگرم طی یک دوره اسپرماتوژنز، تعداد اسپرم را کاهش می‌دهد (۲۱). علت عدم معنی‌داری در مطالعه ما می‌تواند به دلیل تعداد کم موش در هر گروه، دوره گاواژ که در یک دوره اسپرماتوژنز و یا حتی دوز داروی ایبوپروفن استفاده شده باشد، بنابراین مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است که بتواند تناقض بین نتایج را کمتر کند. در رابطه با تاثیر دوزهای مختلف ایبوپروفن (۵، ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بر تحرک اسپرم، نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف این دارو اثر چشمگیری بر تحرک اسپرم نداشت و تنها در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم کاهش درصد حرکت اسپرم نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. نتایج یک مطالعه قبلی نشان داده که تحرک اسپرم پس از مصرف ایبوپروفن با دوز ۳۰ و ۵۷ میلی‌گرم/کیلوگرم طی یک دوره اسپرماتوژنز، کاهش می یابد که البته این کاهش فقط برای دوز ۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم معنی‌دار بود در صورتی که برای دوز ۵۷ میلی‌گرم/کیلوگرم معنی‌دار نبوده است(۱۵). Martini و همکاران (۲۰۰۸) نیز کاهش تحرک اسپرم را به دنبال مصرف ایبوپروفن با دوز ۰/۵۶، ۱/۱۲ و ۱/۶۸ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم نشان دادند (۱۵). از طرفی، بررسی نتایج Stutz و همکاران (۲۰۰۰) نشان داد که تزریق روزانه ایبوپروفن با دوز ۵/۶ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۳۵ و ۶۰ روز تاثیر قابل توجهی بر تحرک اسپرم نداشت (۲۴). ایبوپروفن در متابولیسم آراشیدونیک اسید از طریق مهار فعالیت سیکلواکسیژناز، باعث کاهش تولید پروستاگلاندین‌ها می‌شود و از آنجایی که پروستاگلاندین‌ها واسطه‌های التهابی می‌باشند، منجر به اثرات ضد التهابی میگردد. بر اساس مطالعات زمینه ای، به طور کلی ایبوپروفن از طریق مهار تولید سوپراکسید (۱۲)، مهار سیکلواکسیژناز (۱۶)، اثر بر میتوکندری که موجب کاهش تولید آدنوزین‌تری‌فسفات (۲۷) و افزایش گونه های فعال اکسیژن (ROS) می شود (۱۱)، ممکن است منجر به افزایش استرس اکسیداتیو گردد. لذا در این مطالعه، سطح استرس اکسیداتیو از طریق بررسی لیپید پراکسیداسیون مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان می دهد که در تمام دوزهای مختلف ایبوپروفن (۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)، افزایش لیپید پراکسیداسیون در اسپرم قابل مشاهده است ولی فقط در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نسبت به گروه کنترل معنی دار بود. این نتایج می‌تواند بیانگر آن باشد که استفاده از ایبوپروفن با غلظت‌های مختلف منجر به افزایش تولید ROS در سطح سلول اسپرم شده است ولی هنوز تاثیر پاتوژنیک را بر غلظت و تحرک نگذاشته است. این اثر وابسته به دوز بوده که در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم افزایش را نشان داده است. لذا این احتمال داده می‌شود که مدت گاواژ موش‌ها جهت مشاهده آسیب کوتاه بوده است. Islas-Flores و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند قرار گرفتن ماهی کپور در معرض ایبوپروفن منجر به افزایش لیپید پراکسیداسیون در خون و کبد می گردد (۱۱). Bonelli و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند قرار گرفتن سلول MKN-45 در معرض ایبوپروفن منجر به

افزایش ROS می گردد. به دنبال مصرف همزمان آنتی اکسیدان سیستئین با ایبوپروفن این اثر خنثی گردید که نشان‌دهنده معکوس بودن این روند می‌باشد (٦). ایبوپروفن یکی از مشتقات آریل پروپیونیک اسید است. ویژگی مشترک مشتقات پروپیونیک اسید، توانایی آن‌ها در تولید ROS در حضور نور می‌باشد. ROS تولید شده توسط ایبوپروفن در حضور نور سفید باعث ایجاد شکاف در رشته DNA می‌شود. تولید ROS ناشی از ایبوپروفن هم چنین باعث دژنره شدن DNA در لنفوسیت‌ها می‌گردد (۹). از طرفی اسپرم به دلیل وجود اسیدهای چرب اشباع نشده فراوان در غشای پلاسمایی، محدود بودن سطح دفاع آنتی‌اکسیدانی و مکانیسم ترمیم و تشخیص آسیب DNA محدود، در برابر استرس اکسیداتیو آسیب‌پذیر است (٤، ٥).

نتیجه‌گیری

یافته‌های حاصل از این پژوهش حاکی از آن است که مصرف ایبوپروفن باعث القای استرس اکسیداتیو شده و منجر به افزایش ROS می‌گردد. افزایش ROS به نوبه خود سطح لیپیدپراکسیداسیون غشا را افزایش داده و از این طریق منجر به کاهش تحرک اسپرم می-گردد. با توجه به اینکه ما آسیب معنی‌داری در روند اسپرماتوژنز و پارامترهای اسپرمی مشاهده نکردیم این احتمال است که استفاده کوتاه مدت ایبوپروفن اثری مخرب بر تولید و تمایز اسپرم ندارد ولی احتمالا استفاده بلند مدت آن می‌تواند تاثیر پاتوژنیک داشته باشد که به مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است.

منابع

1. Agarwal A. 2019. Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility. *World J Mens Health*, 37(3):296-312.

2. Aitken RJ., Wingate JK., De Iuliis GN., McLaughlin EA., 2007. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 13(4): 203-211.

3. Banihani SA. 2019. Effect of Ibuprofen on semen quality. *Andrologia*, 51(4): e13228.

4. Bisht S., Dada R. 2017. Oxidative stress: Major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventive strategies. *Frontiers in Bioscience*, 9: 420-447.

5. Bisht S., Faiq M., Tolahunase M., Dada R. 2017. Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews Urology*, 14(8): 470-485.

6. Bonelli P., Tuccillo FM., Calemma R., Pezzetti F., Borrelli A., Martinelli R., De Rosa A., Esposito D., Palaia R., Castello G. 2011. Changes in the gene expression profile of gastric cancer cells in response to Ibuprofen: a gene pathway analysis. *Pharmacogenomics Journal*, 11(6): 412-428.

7. Charles NF., Estella TF., Kechia F., Bathelemy N., Bonaventure N. 2018. Overview of non-steroidal anti-inflammatory drugs (nsaids) in resource limited countries. *MOJ Toxicology*, 4(1): 5-13.

8. Gad SC., Cassidy CD., Aubert N., Spainhour B., Robbe H. 2006. Nonclinical vehicle usein studies by multipl e routes in multiple species. *International Journal of Toxicology*, 25(6): 499-521.

9. Husain MA., Sarwar T., Rehman SU., Ishqi HM., Tabish M. 2015. Ibuprofen causes photocleavage through ROS generation and intercalates with DNA: a combined biophysical and molecular docking approach. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(21): 13837-13850.

10. Ingram MJ., Zeller E., Moss GP., Hall CE. 2006. A potential antiimplantation and

Seminars in Cell & Developmental Biology, 59:10-26.

18. Oakberg E.F. 1956. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *American Journal of Anatomy*, 99(3): 507-516.

19. Razi M., Sadrkhanloo R.A., Malekinejad H., Sarafzadeh-Rezaei F. 2011. Varicocele time-dependently affects DNA integrity of sperm cells: evidence for lower in vitro fertilization rate in varicocele-positive rats. *International Journal of Fertility and Sterility*, 5(3):174.

20. Robinson N., Gustofson R.L., Larsen F.W. 2005. Regular use of Ibuprofen does not affect semen analysis parameters, need for ICSI, or ART clinical pregnancy rate. *Fertility and Sterility*, 84: S14.

21. Roodbari F., Abedi N., Talebi A.R. 2015. Early and late effects of Ibuprofen on mouse sperm parameters, chromatin condensation, and DNA integrity in mice. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 13(11):703-10.

22. Rossitto M., Marchive C., Pruvost A., Sellem E., Ghettas A., Badiou S., Boizet-Bonhoure B. 2018. Intergenerational effects on mouse sperm quality after in utero exposure to acetaminophen and Ibuprofen. *FASEB Journal*, fj201800488RRR. https://doi.org/10.1096/ fj.201800488RRR

23. Semet M., Paci M., Saïas-Magnan J., Metzler-Guillemain C., Boissier R., Lejeune H., Perrin J. 2017. The impact of drugs on male fertility: a review. *Andrology*, 5(4): 640-663.

24. Stutz AC., Martini RD., Ruiz MG., Munoz L., 2000. Functional activity of mouse sperm was not affected by low doses of aspirin-like drugs. *Archives of Andrology*, 44(2): 117–128.

25. Tang WH., Zhou SJ., Song SD., He HY., Wu H., Zhang Z., Yang YZ., Zhang HL., Mao JM., Liu DF., Zhao LM., Lin HC., Hong K., Ma LL., Zhuang XJ., Jiang spermicidal strategy: Putative derivatives of nonoxynol- 9 and anti-inflammatory agents and their spermicidal activity. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health*, 11: 258–261.

11. Islas-Flores H., Gómez-Oliván LM., Galar-Martínez M., García-Medina S., Neri-Cruz N., Dublán-García O. 2014. Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and brain on common carp (Cyprinus carpio) using oxidative stress biomarkers. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(7): 5157-66.

12. Kantor TG., 1979. Ibuprofen. *Annals of Internal Medicine*, 91(6):877-82.

13. Kristensen DM., Desdoits-Lethimonier C., Mackey AL., Dalgaard MD., De Masi F., Munkbøl CH., Styrishave B., Antignac JP., Le Bizec B., Platel C., Hay-Schmidt A., Jensen TK., Lesné L., Mazaud-Guittot S., Kristiansen K., Brunak S., Kjaer M., Juul A., Jégou B. 2018. Ibuprofen alters human testicular physiology to produce a state of compensated hypogonadism. *Proceeding of Natural Academy of Sciences of USA*, 115(4): E715-E724.

14. Leaver RB., 2016. Male infertility: an overview of causes and treatment option s. *British Journal of Nursing*, 25(18): S35-S40.

15. Martini AC., Vincenti LM., Santillán ME., Stutz G., Kaplan R., Ruiz RD., de Cuneo MF., 2008. Chronic administration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS): effects upon mouse reproductive functions. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba*, 65(2):41-51.

16. McAnulty SR., Owens JT., McAnulty LS., Nieman DC., Morrow JD., Dumke CL., Milne GL. 2007. Ibuprofen use during extreme exercise: effects on oxidative stress and PGE2. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 39(7):1075-9.

17. Neto F.T., Bach P.V., Najari B.B., Li P.S., Goldstein M. 2016. Spermatogenesis in Humans and Its affecting factors.

H.2018.A clinical trial onthe consistency of bilateral testicular tissue histopathology and Johnsen score: single side or bilateral side biopsy? *Oncotarget*, 9(35): 23848-23859.

26. Titford M. 2005. The long history of hematoxylin. *Biotech Histochemistry*, 80(2): 73-78.

27. Varrassi G., Pergolizzi JV., Dowling P., Paladini A., 2020. Ibuprofen Safety at the Golden Anniversary: Are all NSAIDs the Same? A Narrative Review. *Advances in Therapy*, 37(1): 61-82.

28. Wongrakpanich S., Wongrakpanich A., Melhado K., Rangaswami J., 2018. A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in the Elderly. *Aging and Disease*, 9(1): 143-150.

29. World Health Organization., 2010. Examination and processing human semen. 5th ed. *Cambridge: Cambridge University Press*.

The Effect of Ibuprofen on Sperm Parameters, Oxidative Stress and Histology of Mice Testis

Safoura Shafigh Jazi[1,2], Niloofar Sadeghi[1], Dina Zohrabi[2], Marziyeh Tavalaee [*1], Mohammad Hossein Nasr-Esfahani[1]

1. Department of Animal Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Science, NourDanesh Institute of Higher Education, Isfahan, Iran

Abstract

Recently, the application of drugs administered for reasons other than male infertility may have profound effect on fertility potential. Ibuprofen, as one of the non-steroidal anti-inflammatory drugs can possibly have a negative effect on the spermatogenesis process which could be dose-dependent. This side effect is likely acquired through oxidative stress. Therefore, in this study, we assessed the effect of different doses of Ibuprofen on spermatogenesis, sperm parameters, and oxidative stress. In this study, 15 male NMRI mice were daily gavaged by different doses of Ibuprofen (0, 5, 25, 50, and 100 mg/kg) for one month. Then, morphometric parameters of testis, sperm concentration, motility and oxidative stress were assessed. Finally, the data were analyzed using SPSS software and ANOVA test. Different doses of Ibuprofen had no effect on Johnson score and sperm concentration as compared to the control group. However, sperm motility was insignificantly reduced only at a dose of 100 mg / kg. In addition, the level of oxidative stress in all doses of Ibuprofen increased compared to the control group and, this increase was only significant at the dose of 100 mg/kg (P=0.03). Based on the results of this study, continuous administration of Ibuprofen for one month has no significant effect on spermatogenesis and sperm parameters but significantly increase ROS production, the effect of which on sperm chromatin integrity, for longer period remain a concern, which needs more studies in the future.

Keywords: Ibuprofen, Sperm Parameters, Oxidative Stress.