

Original article

## Evaluation of Spermatogenesis, Sperm Function, and Enzymes Involved in the Trans-Sulfuration Pathway under the Influence of L-Cysteine, Taurine, and Vitamin B6 in Varicocele-Induced Rats

Azam Shiasi<sup>1,2</sup>, Ramesh Monajemi\*<sup>1</sup>, Marzieh Tavalae\*<sup>2</sup>,  
Mohammad Hossein Nasr Esfahani<sup>2</sup>

1. Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

2. Department of Animal Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran.

\* **Corresponding authors.** Tel: +983195015682, Fax: +983195015687

E-mail: [m.tavalae@royan-rc.ac.ir](mailto:m.tavalae@royan-rc.ac.ir), [r\\_monajemi@yahoo.com](mailto:r_monajemi@yahoo.com)

### Article info

#### Article history:

Received: Dec 2, 2024

Accepted: Feb 1, 2025

#### Keywords:

Varicocele  
Sperm Parameters, One-Carbon Cycle  
Trans-Sulfuration Pathway  
Cystathionine Beta-Synthase  
Cystathionine Gamma-Lyase

### ABSTRACT

**Background:** Varicocele is one of the common causes of male infertility, associated with increased oxidative stress and damage to sperm DNA. This study aims to investigate the effects of L-cysteine, taurine, and vitamin B6 (LTB) on spermatogenesis, sperm function, and enzymes involved in the trans-sulfuration pathway in the testes of varicocele-induced rats.

**Methods:** Male Wistar rats (180–220 g) were randomly divided into five experimental groups: the control group (no intervention), the sham group (simple laparotomy), the varicocele group (V), the LTB-treated control group, and the LTB-treated varicocele group. Evaluations included sperm parameter assessments, testicular histology analysis, measurement of testosterone levels, vitamin B6 levels, various amino acids, and the expression of enzymes in the trans-sulfuration pathway at the protein level using the Western blot method.

**Results:** The study revealed a significant reduction in sperm quality parameters and sperm function ( $p < 0.05$ ) in the varicocele group compared to the control and sham groups. Additionally, enzymes involved in the trans-sulfuration pathway were reduced in the varicocele group compared to the sham group, although the difference was not statistically significant. Plasma B6 levels in the varicocele group showed a significant decrease compared to the control group ( $p < 0.05$ ). Supplementation with LTB improved the negative effects of varicocele on spermatogenesis and sperm function.

**Conclusion:** Antioxidants may play a role in improving varicocele. Using amino acids and vitamins involved in the one-carbon cycle and the trans-sulfuration pathway can enhance the testicular antioxidant system and counteract the negative effects of varicocele. These findings highlight the need for further studies and the potential for higher doses or longer durations of antioxidant supplementation to achieve better therapeutic effects.

How to cite this article: Shiasi A, Monajemi R, Tavalae M, Nasr Esfahani M.H. Evaluation of Spermatogenesis, Sperm Function, and Enzymes Involved in the Trans-Sulfuration Pathway under the Influence of L-Cysteine, Taurine, and Vitamin B6 in Varicocele-Induced Rats. J Ardabil Univ Med Sci. 2024;24(3):308-332.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

## Extended Abstract

**Background:** Varicocele is one of the most common causes of male infertility, leading to decreased sperm quality and production. The condition is characterized by increased dilatation in the testicular veins, which causes temperature and biochemical changes, resulting in elevated oxidative stress and DNA damage to sperm. Oxidative stress occurs when there is an imbalance between reactive oxygen species (ROS) and the body's natural antioxidant defenses, causing cellular damage to sperm membranes, proteins, lipids, and DNA. This oxidative damage reduces sperm motility, concentration, and morphology, and increases DNA fragmentation. The use of antioxidants such as L-cysteine, taurine, and vitamin B6 has been suggested as a potential therapeutic strategy due to their ability to neutralize oxidative stress and improve sperm quality by enhancing enzymes involved in production of antioxidant pathways, including enzymes like cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS), and cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE), as well as heme oxygenase-1 (HO-1) which is an inducible enzyme that breaks down heme, producing biliverdin, ferrous iron, and carbon monoxide. It plays a crucial role as an antioxidant, reducing oxidative stress in cells, and has anti-inflammatory effects. These antioxidants can maintain a balance in the oxidative environment, preventing further damage to sperm cells, and potentially improving male fertility outcomes. The aim of this study is to evaluate the effects of antioxidant supplementation LTB (vitamin B6, taurine, and L-cysteine) on sperm quality and testicular function in a rat model of varicocele, focusing on sperm parameters, and sperm functional tests.

**Methods:** This experimental study was conducted on 50 male Wistar rats (8 weeks old, weighing 180-200 grams). The rats were housed under standard laboratory conditions and provided with food and tap water ad libitum. The animals were randomly divided into five groups: control (C), sham (SH), varicocele (V), control with LTB (C+LTB),

and varicocele with LTB (V+LTB). The groups were administered a daily oral dose of a combination of vitamin B6 (7 mg/kg), taurine (100 mg/kg), and L-cysteine (100 mg/kg) for two months. After the two-month treatment period, sperm parameters including count, motility, and morphology were evaluated. DNA damage was assessed using acridine orange (AO), aniline blue (AB), and chromatin A3 (CMA3) staining. Lipid peroxidation was measured using BODIPY C11, a fluorescent dye. Histological analysis of testicular tissue was performed using hematoxylin and eosin (H&E) staining. Western blot analysis was used to assess the protein levels of CBS, CSE, and HO-1. Data were analyzed using SPSS software, and statistical significance was determined using Shapiro-Wilk, ANOVA, and Kruskal-Wallis tests ( $p < 0.05$ ).

**Results:** The study showed no significant difference in body weight between the different groups. However, the left testicle and left epididymal weights were significantly lower in the varicocele group compared to the control group ( $p < 0.05$ ). The varicocele group treated with LTB exhibited significant improvements in sperm concentration, motility, and morphology when compared to the untreated varicocele group ( $p < 0.05$ ). The Percentage of sperm abnormal morphology was significantly higher in the varicocele group compared to the control group. Functional analysis revealed increased residual histone levels, protamine deficiency, DNA damage, and lipid peroxidation in the varicocele group compared to the control group. Antioxidant treatment with LTB significantly improved these parameters ( $p < 0.05$ ). Additionally, serum metabolite analysis showed reduced testosterone and vitamin B6 in the varicocele group, while LTB treatment resulted in significant increases in the both parameters ( $p < 0.05$ ). Analysis of protein expression for CBS, CSE, and HO-1 did not show significant differences between the groups.

**Discussion:** The results of this study indicate that varicocele significantly affects sperm quality, as evidenced by reduced sperm

concentration, motility, and morphology, along with increased residual histones, DNA damage, lipid peroxidation, and protamine deficiency in sperm. These findings are consistent with previous studies, which have identified oxidative stress as a major factor in sperm damage and infertility associated with varicocele. The mechanism behind these effects involves increased ROS, which destabilizes sperm membranes, impairs mitochondrial function, and causes DNA fragmentation. This oxidative stress is further exacerbated by lipid peroxidation, which compromises the integrity of sperm membranes and disrupts cellular processes essential for sperm function. The treatment with antioxidants, including vitamin B6, taurine, and L-cysteine, improved sperm quality by neutralizing ROS and reducing lipid peroxidation, as well as enhancing sperm motility and morphology. These results align with prior studies that have demonstrated the potential of antioxidants in mitigating oxidative stress and improving male fertility in varicocele conditions. Despite the significant improvements in sperm parameters, the supplementation did not result in substantial improvements in histone excess, DNA damage, or the Johnson score, suggesting that while antioxidants like LTB are effective in mitigating some forms

of oxidative damage, they may not fully reverse all the biochemical alterations caused by varicocele. Moreover, LTB supplementation did not significantly affect homocysteine, glutamate, serine, or the expression of CBS, CSE, and HO-1 proteins, indicating that LTB may improve sperm quality via mechanisms independent of the trans-sulfuration pathway. This suggests that antioxidant supplementation could potentially offer a therapeutic strategy for reducing oxidative stress in varicocele, but the full spectrum of metabolic changes associated with the condition may require more targeted interventions.

**Conclusion:** This study assessed the effects of varicocele and antioxidant treatment on sperm quality. Results indicated that varicocele without antioxidant therapy led to decreased sperm concentration, motility, and morphology, along with increased DNA damage. Antioxidant supplementation with vitamin B6, taurine, and L-cysteine significantly improved sperm parameters and oxidative stress but did not restore key proteins involved in oxidative stress pathways. This may be due to the small sample size in Western blot testing, highlighting the need for further research with a larger cohort.

## ارزیابی اسپرما توژنز، عملکرد اسپرم و آنزیم‌های دخیل در مسیر ترانس سولفوراسیون تحت تأثیر ال-سیستئین، تائورین و ویتامین B6 در موش‌های صحرایی تحت القاء واریکوسل

اعظم شیاسی<sup>۱،۲</sup>، رامش منجمی<sup>۱\*</sup>، مرضیه تولائی<sup>۲\*</sup>، محمدحسین نصر اصفهانی<sup>۲</sup>

۱. گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

۲. پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران

\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۳۱۹۵۰۱۵۶۸۲. فاکس: ۰۳۱۹۵۰۱۵۶۸۷

پست الکترونیک: [r\\_monajemi@yahoo.com](mailto:r_monajemi@yahoo.com)، [m.tavalaee@royan-rc.ac.ir](mailto:m.tavalaee@royan-rc.ac.ir)

### چکیده

**زمینه و هدف:** واریکوسل یکی از علل شایع ناباروری مردانه است که با افزایش استرس اکسیداتیو و آسیب به DNA اسپرم مرتبط است. هدف این مطالعه بررسی تأثیر ترکیبات ال-سیستئین، تائورین و ویتامین B6 (LTB) بر اسپرما توژنز، عملکرد اسپرم و آنزیم‌های دخیل در مسیر ترانس سولفوراسیون در بیضه موش‌های صحرایی واریکوسلی است.

**روش کار:** موش‌های صحرایی نر سویه ویستار (۲۲۰-۱۸۰ گرم) به صورت تصادفی در پنج گروه آزمایشی قرار گرفتند: گروه کنترل (بدون مداخله)، گروه شم (عمل لاپاراتومی ساده)، گروه واریکوسل (V)، گروه کنترل تیمار شده با LTB (ال-سیستئین، تائورین و ویتامین B6) و گروه واریکوسل تیمار شده با LTB. ارزیابی‌ها شامل بررسی پارامترهای اسپرمی، مطالعه هیستولوژی بیضه، اندازه‌گیری سطح تستوسترون، ویتامین B6، اسیدهای آمینه مختلف، و آنزیم‌های مسیر ترانس سولفوراسیون در سطح پروتئین با استفاده از روش وسترن بلات بود.

**یافته‌ها:** نتایج این مطالعه کاهش معنی دار در کیفیت پارامترهای اسپرمی و عملکرد اسپرم ( $p < 0.05$ ) در گروه واریکوسل نسبت به کنترل و شم نشان داد. علاوه بر این آنزیم‌های دخیل در مسیر ترانس سولفوراسیون در گروه واریکوسل نسبت به گروه شم کاهش نشان داد اما معنادار نبود. سطح B6 پلاسما در گروه واریکوسل نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد ( $p < 0.05$ ). استفاده از مکمل LTB توانست اثرات منفی القاء واریکوسل بر اسپرما توژنز و عملکرد اسپرم را بهبود بخشد.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که القای واریکوسل منجر به کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی، عملکرد اسپرم و سطح ویتامین B6 در پلاسما می‌شود. هرچند کاهش آنزیم‌های مسیر ترانس سولفوراسیون معنادار نبود، اما نشان‌دهنده تأثیر واریکوسل بر این مسیر متابولیکی است. تجویز مکمل LTB (ال-سیستئین، تائورین و ویتامین B6) توانست اثرات منفی واریکوسل بر اسپرما توژنز و عملکرد اسپرم را تا حد زیادی بهبود بخشد، که نشان‌دهنده نقش بالقوه این ترکیبات در کاهش آسیب‌های ناشی از واریکوسل و بهبود باروری مردان است.

**واژه‌های کلیدی:** واریکوسل، پارامترهای اسپرم، چرخه یک کربنی، مسیر ترانس سولفوراسیون، سیستاتینونین بتا-سنتاز، سیستاتینونین گاما-لیاز

دریافت: ۱۴۰۳/۹/۱۲ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۳

## مقدمه

واریکوسل یکی از شایع‌ترین علل ناباروری مردان است که به‌طور مستقیم با مشکلاتی در فرآیند اسپرماتوژنز و کیفیت اسپرم مرتبط است. این اختلال در وریدهای بیضه‌ای باعث ایجاد افزایش فشار در سیستم وریدی بیضه‌ها می‌شود که می‌تواند به جریان خون در بیضه‌ها آسیب زده و موجب تغییرات دمایی و بیوشیمیایی در آن‌ها گردد [۱]. در نتیجه، واریکوسل به‌عنوان یک عامل استرس‌زا برای سلول‌های تولیدکننده اسپرم شناخته می‌شود و می‌تواند منجر به کاهش تولید اسپرم، آسیب به DNA اسپرم، کاهش تحرک اسپرم‌ها و در نهایت ناباروری گردد [۲]. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که استرس اکسیداتیو یکی از مکانیسم‌های اصلی آسیب‌های سلولی ناشی از واریکوسل است. استرس اکسیداتیو با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن<sup>۱</sup> و کاهش فعالیت سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی، اثرات منفی بر بیضه‌ها و فرآیند تولید اسپرم دارد [۳]. در این راستا، آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان ترکیباتی که می‌توانند به کاهش استرس اکسیداتیو کمک کنند، توجه ویژه‌ای به خود جلب کرده‌اند [۴]. ال-سیستئین، تائورین و ویتامین B6 از جمله ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند که در سال‌های اخیر در مطالعات مختلف مورد توجه قرار گرفته‌اند. این ترکیبات نه‌تنها به‌طور مستقیم استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهند، بلکه از طریق تأثیر بر روی آنزیم‌های مختلف نیز می‌توانند به بهبود عملکرد بیضه‌ها و فرآیند اسپرماتوژنز کمک کنند [۵-۸].

استرس اکسیداتیو به حالتی اطلاق می‌شود که در آن تولید گونه‌های فعال اکسیژن از میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن فراتر می‌رود و موجب آسیب به ساختارهای سلولی مختلف می‌شود. در مردانی که به واریکوسل مبتلا هستند، افزایش تولید

استرس اکسیداتیو یکی از علل اصلی آسیب به بیضه‌ها و اسپرم‌ها به‌شمار می‌رود [۳]. گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند به غشاهای سلولی، پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA آسیب رسانده و منجر به تغییرات ساختاری و عملکردی در سلول‌های اسپرم‌ساز شوند. از جمله اثرات منفی استرس اکسیداتیو بر اسپرم‌ها می‌توان به کاهش تحرک، افزایش درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و آسیب به DNA اسپرم اشاره کرد که به‌طور مستقیم بر باروری تأثیر می‌گذارند. این آسیب‌های اکسیداتیو همچنین می‌تواند باعث کاهش عملکرد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بیضه‌ها شود [۹]. در این میان، آنزیم‌هایی نظیر سیستاتیونین  $\beta$  سنتاز<sup>۲</sup> (CBS)، سیستاتیونین  $\gamma$  لیاز<sup>۳</sup> (CSE) و هم اکسیژناز-۱ (HO-1)<sup>۴</sup> نقش مهمی در سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن دارند. این آنزیم‌ها در فرآیندهای تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نظیر گلوتاتیون و سایر ترکیبات محافظتی دخالت دارند [۱۰، ۱۱]. در نتیجه، یکی از راه‌های کاهش آسیب‌های واریکوسل، تحریک فعالیت این آنزیم‌ها و بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی است [۱۲]. آنزیم‌های سیستاتیونین  $\beta$  سنتاز و سیستاتیونین  $\gamma$  لیاز در مسیر متابولیسم سیستئین و تولید گلوتاتیون نقش مهمی ایفا می‌کنند.

این آنزیم‌ها به‌طور مستقیم در کاهش استرس اکسیداتیو و حفظ تعادل آنتی‌اکسیدانی در بدن دخالت دارند. سیستاتیونین  $\beta$  سنتاز مسئول تبدیل سیستاتیونین به سیستئین است که یکی از پیش‌سازهای اصلی گلوتاتیون محسوب می‌شود. از سوی دیگر، سیستاتیونین  $\gamma$  لیاز نقش مهمی در تبدیل سیستاتیونین به سیستئین ایفا می‌کند [۱۳]. گلوتاتیون به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان کلیدی، نقش محافظتی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو دارد و میزان آن در سلول‌های بیضه‌ای می‌تواند بر کیفیت اسپرم و فرآیند

<sup>2</sup> Cystathionine  $\beta$ -Synthase

<sup>3</sup> Cystathionine  $\gamma$ -Lyase

<sup>4</sup> Heme Oxygenase 1

<sup>1</sup> Reactive Oxygen Species

و گلوپتایون<sup>۳</sup> (GSH) ضروری می‌باشد، دخیل هستند [۱۶-۱۸].

یکی از متابولیت‌های هم‌اکسیژناز (منو کسید کربن) می‌تواند با اثر بر یکی از محصولات میانی مسیر ترانس سولفوراسیون به نام سیستاتینین، منجر به مهار موقت تولید H<sub>2</sub>S از طریق CSE و منحصر شدن موقتی تولید آن از دو طریق دیگر شامل CBS و ۳- MST شود و بدین ترتیب با کاهش موقتی میزان تولید H<sub>2</sub>S نقش مهمی در کنترل تولید رقابتی H<sub>2</sub>S بازی می‌کند [۱۶-۱۸]. طبق مطالعات، هموسیستئین در شرایط استرس اکسیداتیو مخصوصاً بیماری‌های قلبی عروقی بطور چشمگیری افزایش می‌یابد [۱۹] بعلاوه، مسیر هموسیستئین نیز نقش مهمی در باروری و موفقیت بارداری ایفا می‌کند [۱۹] شواهد در مورد نقش مهم مسیر هموسیستئین در باروری در حال افزایش است [۲۰-۲۲] و مشخص شده است که چندین واسطه از مسیر هموسیستئین مستقیماً در سنتز پروتئین‌ها، سنتز و ترمیم DNA و تعادل استرس اکسیداتیو که واسطه‌های مهمی در گامتورنز می‌باشند، دخیل هستند. بنابراین پیشنهاد شده است که احتمالاً اختلال در این مسیر که به هیپرهموسیستئینی منتهی می‌شود، برای تولید مثل مضر باشد [۲۱،۲۳]. نتایج برخی از مطالعات نیز حاکی از کاهش بیان آنزیم‌های مسیر ترانس سولفوراسیون CBS و CSE افزایش سطح هموسیستئین در افراد مبتلا به واریکوسل می‌باشد [۲۴]. مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۲ بر روی پارامترهای اسپرم در مردان نابارور مبتلا به بیماری واریکوسل و مردان بارور نشان دادند که حرکت اسپرم در گروه‌های نابارور مبتلا به واریکوسل به‌طور قابل توجهی کمتر بود و بیان ژن‌های CBS و CSE نیز در این گروه‌ها کاهش یافت. همچنین، ارتباط مثبتی میان بیان این ژن‌ها و کیفیت اسپرم مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که

اسپرمتورنز تأثیر گذار باشد [۱۴]. تحقیقات نشان داده‌اند که کاهش فعالیت این آنزیم‌ها در شرایطی مانند واریکوسل می‌تواند منجر به کاهش سطح گلوپتایون و در نهایت آسیب به اسپرم‌ها شود [۱۴]. یکی از نشانه‌های دال بر افزایش سطح استرس اکسیداتیو، افزایش سطح هموسیستئین خون می‌باشد که از محصولات چرخه ۱- کربن بوده و در شرایط طبیعی از طریق مسیر متابولیکی ترانس سولفوراسیون، به سیستئین تبدیل می‌شود.

تحقیقات نشان می‌دهد که ویتامین B6، همراه با سایر ویتامین‌های B مانند فولات و ویتامین B12، در تنظیم متابولیسم تک کربنی که برای عملکردهای سلولی مانند سنتز نوکلئوتید و تعادل ردوکس ضروری است، نقش دارد [۱۵]. کمبود این ویتامین‌ها می‌تواند منجر به افزایش سطح هموسیستئین شود که با پاتولوژی برخی بیماری‌ها، از جمله بیماری‌های قلبی عروقی و ناباروری بالقوه مرتبط است [۱۱،۱۲]. در زمینه واریکوسل، خواص آنتی‌اکسیدانی ویتامین B6 ممکن است به کاهش استرس اکسیداتیو کمک کند، بنابراین عملکرد بیضه و کیفیت اسپرم را می‌تواند بهبود بخشد [۱۵،۱۱]. ویتامین B6 به‌طور غیرمستقیم از طریق فعال‌سازی CBS و CSE در تنظیم سطح هموسیستئین و تولید ترکیباتی که در تنظیم استرس اکسیداتیو، التهاب و سیگنال‌دهی سلولی نقش دارند، مشارکت می‌کند. بنابراین، کمبود ویتامین B6 می‌تواند اثرات منفی بر این مسیر و سلامت کلی بدن داشته باشد. این دو آنزیم به همراه آنزیم ۳- مرکاپتوپیروات سولفو ترانسفراز<sup>۱</sup> (MST-۳) در تولید متابولیت‌های سولفیدی شامل مولکول هیدروژن سولفید<sup>۲</sup> (H<sub>2</sub>S) که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است و سیستئین که برای سنتز آنتی‌اکسیدانت‌های تائورین

<sup>1</sup> 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase

<sup>2</sup> Hydrogen Sulfide

<sup>3</sup> Glutathione

کاهش فعالیت آنزیم‌های CBS و CSE و در نتیجه کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی، به‌ویژه آزادسازی  $H_2S$ ، می‌تواند نقش مهمی در ناباروری مردان ایفا کند و نیازمند تحقیقات بیشتری برای بررسی دقیق‌تر است [۲۵].

همچنین در مطالعه اخیر این گروه نشان داده شد که کاهش بیان پروتئین‌های آنتی‌اکسیدانی CBS، CSE و HO-1 همراه با آسیب به ساختار بیضه‌ها و اسپرم‌سازی است. همچنین، کاهش شدید ویتامین B6 در گردش خون گروه واریکوسل شناسایی شد که احتمالاً ناشی از التهاب در بیضه‌ها بود. این نتایج نشان می‌دهد که کمبود ویتامین B6 می‌تواند نقش کلیدی در ایجاد آسیب‌های واریکوسل داشته باشد [۲۶].

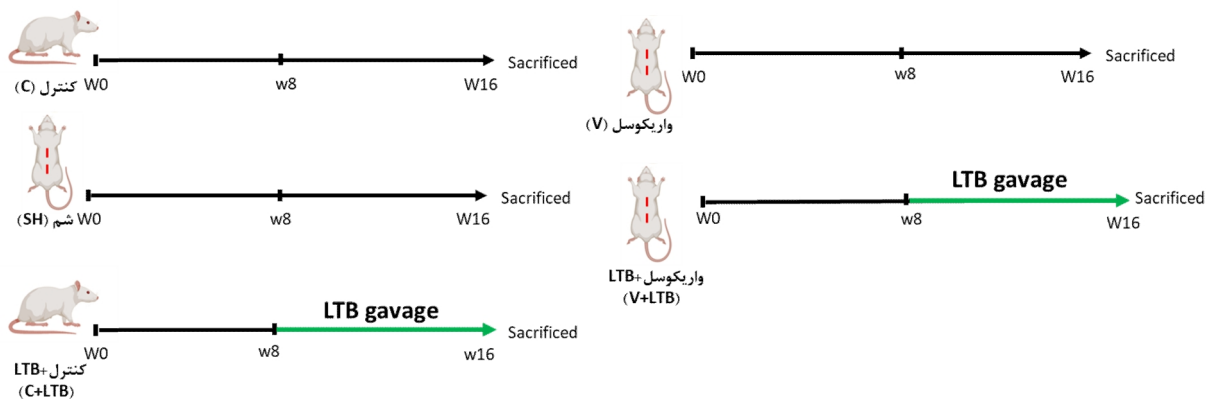
واریکوسل از طریق ایجاد استرس‌اکسیداتیو و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند CBS و CSE، بر کیفیت اسپرم و فرآیند اسپرماتوژنز تأثیر منفی می‌گذارد. با توجه به اینکه مطالعات اخیر کاهش بیان این آنزیم‌ها و کمبود ویتامین B6 را در مردان مبتلا به واریکوسل گزارش کرده‌اند، بررسی تأثیر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند ال-سیستئین، تائورین و ویتامین B6 بر این مسیر متابولیکی می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در زمینه بهبود ناباروری مردان ارائه دهد. این مطالعه با هدف بررسی مسیر ترانس‌سولفوراسیون و بهبود پارامترهای اسپرمی در مدل حیوانی واریکوسل انجام شد تا امکان به‌کارگیری این راهکار درمانی در آینده ارزیابی گردد.

### روش کار

این مطالعه به صورت مطالعه مداخله‌ای می‌باشد. این مطالعه بر روی ۵۰ حیوان آزمایشگاهی موش صحرایی نر ۸ هفته، نژاد Wistar در محدوده وزن (۲۲۰g) -

۱۸۰) انجام گردید. این مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق موسسه رویان (IR.ACECR.ROYAN.REC.1400.144) قرار گرفت. تمام روش‌ها و پروتکل‌ها مطابق با دستورالعمل‌ها و مقررات ARRIVE انجام شد [۲۷]. حیوانات مورد استفاده در این مطالعه از موسسه بیوتکنولوژی رویان در اصفهان، ایران تهیه شد.

حیوانات در مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی پژوهشگاه رویان اصفهان تحت شرایط استاندارد در قفس‌های مخصوص، ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت نور و دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. قبل از شروع آزمایش موش‌ها به مدت ۱۴ روز در مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی در کنار هم به صورت گروه‌بندی‌شده قرار داده شدند تا با شرایط محیط سازش پیدا کرده و استرس‌های محیطی بر نتیجه آزمایش‌ها هیچ‌گونه تأثیری نداشته باشد. این حیوانات توسط پلیت تغذیه شده و جهت آبدهی از شیر آب شهری استفاده می‌شد. در این مطالعه موش صحرایی به صورت تصادفی به پنج گروه، گروه کنترل (C) (بدون مداخله)، گروه شم (SH) (عمل لاپاراتومی ساده)، گروه واریکوسل (V)، گروه کنترل تیمار شده با LTB (ال-سیستئین، تائورین و ویتامین B6) (C+LTB) و گروه واریکوسل تیمار شده با LTB (V+LTB) تقسیم‌بندی شدند (شکل ۱) و پس از گذشت ۲ ماه از القاء واریکوسل، ویتامین B6 و داروهای تائورین و ال-سیستئین به مدت ۲ ماه (به صورت گاواژ) مصرف کردند. در این مطالعه هفته‌ای یکبار میزان وزن موش صحرایی و میزان خوراک مصرفی از طریق ترازو و میزان آب مصرفی از طریق لوله استوانه مدرج ارزیابی شد.



شکل ۱. شکل شماتیک طرح مطالعه

آزاد شد. سپس یک سوزن بخیه blunt به قطر ۰/۸۵ میلی‌متر در کنار ورید کلیوی قرار داده شد و با نخ بخیه غیرجذب سیلک ۰-۴، در نزدیکی محل انشعاب ورید اجوف تحتانی و قبل از ورود ورید اسپرمتیک، گره زده شد. پس از اطمینان از کاهش قطر ورید کلیوی (تا حدود ۵۰٪) و جلوگیری از آسیب احتمالی، سوزن بخیه blunt از داخل لیگاتور خارج گردید. این اقدام موجب کاهش قطر خارجی ورید و در عین حال بازگشت جریان خون در ورید شد. در پایان، احشا به داخل محوطه شکمی بازگردانده شد و پس از افزودن آنتی‌بیوتیک، محل برش در دو لایه عضله و پوست با استفاده از بخیه بسته شد [۳۰]. این انسداد باعث افزایش فشار وریدی و در نهایت منجر به ایجاد واریکوسل شد.

#### آماده سازی ال-سیستئین، تائورین و ویتامین B6

ویتامین B6، ال-سیستئین و تائورین از شرکت رها دارو استان اصفهان خریداری شد. پس از القاء واریکوسل به صورت همزمان گروه های کنترل با LTB و واریکوسل با LTB به صورت روزانه (یک بار در روز) گاوژ دریافت کردند. دوز ویتامین B6 ۷ mg/kg [۳۱]، دوز داروی تائورین ۱۰۰ mg/kg [۳۲]، دوز داروی ال-سیستئین ۱۰۰ mg/kg [۳۳] استفاده شد. تیمار با مکمل LTB به مدت ۶۵ روز، که معادل دوره کامل اسپرمتوزنز در موش صحرائی است، انجام گرفت.

در این مطالعه موش صحرائی نر نژاد ویستار با سن ۶-۸ هفته با وزن (۱۸۰-۲۲۰ گرم) به صورت تصادفی در گروه های ۱- کنترل (C) (N=10)، ۲- شم (SH) (N=10)، ۳- کنترل تیمار شده با LTB (ال-سیستئین، تائورین و ویتامین B6) (C+LTB) (N=10)، ۴- گروه واریکوسل (V) (N=10) و ۵- گروه واریکوسل تیمار شده با LTB (V+LTB) (N=10) تقسیم بندی شدند. در گروه های تحت درمان با LTB دوماه بعد از القاء واریکوسل تحت تیمار با LTB به مدت دوماه قرار گرفتند. LTB به صورت دهانی از طریق روش گاوژ یکبار در روز به مدت دوماه مصرف شد. LTB: ویتامین B6 و تائورین و ال-سیستئین

#### نحوه القاء واریکوسل

ایجاد واریکوسل تجربی مطابق با روش شرح داده شده توسط Turner انجام گرفت [۲۸]. پروتکل بیهوشی مطابق دستورالعمل کمیته اخلاق برای حیوانات انجام شد [۲۹]. در این روش، از تزریق داخل صفاقی ۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم کتامین (۱۰ درصد) و ۲ میلی گرم بر کیلوگرم زایلازین (۲ درصد) برای موش های صحرائی با وزن ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم استفاده شد [۲۹]. پس از بیهوشی، حیوانات در وضعیت سوپاین قرار گرفته و یک برش عمودی به طول ۳ تا ۴ سانتی متر، در فاصله یک بند انگشت از زیر جناق سینه ایجاد شد. پس از مشاهده ورید کلیوی چپ و محل ورود ورید اسپرمتیک، به آرامی اطراف ورید کلیوی



**نمونه‌گیری**

در پایان مطالعه، تمامی موش‌های صحرایی وزن‌کشی شدند. بیهوشی با تزریق داخل صفاقی کتامین ( $100 \text{ mg/kg}$ )، زایلازین ( $10 \text{ mg/kg}$ ) و آسپرومازین ( $3 \text{ mg/kg}$ ) انجام شد و پس از اطمینان از بیهوشی کامل با تست فشار پا، خون‌گیری از قلب با سرنگ از بطن راست قلب انجام و خون در لوله‌های EDTA و هپارین جمع‌آوری شد. نمونه‌های خون برای ارزیابی تستوسترون، ویتامین B6، هموسیستئین، متیونین، گلوتامات، گلوتامین، سرین و تیروزین به آزمایشگاه نوبل استان اصفهان ارسال شدند. در گروه واریکوسل تنها، مشاهده اتساع در وریدهای اسپرماتیک سمت چپ و تجمع خون در آن‌ها به عنوان نشانه موفقیت القای واریکوسل در نظر گرفته شد. پس از آسان‌کشی، بیضه چپ و راست و اپیدیدیم چپ و راست با رعایت اصول بهداشتی خارج شدند. سپس پارامترهای مورفومتریک در همه گروه‌ها مانند طول، ضخامت، وزن بیضه چپ و طول اپیدیدیم با استفاده از کولیس خط‌کش دار اندازه‌گیری شد. پس از آن، بافت بیضه چپ به دو بخش تقسیم شد؛ یک بخش در ویال حاوی نیتروژن مایع برای تخلیص پروتئین در فریزر  $-80^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد ذخیره شد و بخش دیگر در فرمالین  $10\%$  برای ارزیابی‌های بافت‌شناسی نگهداری گردید. در نهایت، شکم موش بخیه شده و اجساد در پلاستیک‌های زرد رنگ در چاله آهک دفن شدند.

ناحیه دم اپیدیدیم چپ برای تحلیل اسپرمی جدا شده و به آزمایشگاه منتقل گردید. بخش دم اپیدیدیم در یک پتری دیش حاوی  $5$  میلی‌لیتر محیط شستشوی اسپرم VitaSperm و سرم آلبومین قرار داده شد. برای استخراج اسپرم، دم اپیدیدیم به قطعات کوچک تقسیم شد و به مدت  $30$  دقیقه همراه با محیط کشت در انکوباتور با دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از انکوباسیون، قطعات بافتی از محیط کشت جدا شدند و دیش حاوی اسپرم استخراج‌شده برای بررسی تحرک اسپرم و سایر پارامترها به مدت

$30$  دقیقه در انکوباتور نگهداری شدند. نمونه‌های اسپرمی برای ارزیابی پارامترها و تست‌های عملکردی استفاده شدند.

**ارزیابی حجم بیضه**

در این روش، ابتدا بیضه از بافت‌های اطراف خود جدا شد. سپس در یک لوله مدرج به میزان  $2$  میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک ریخته شد، در مرحله بعد بیضه در این محلول غوطه‌ور شد، تفاوتی که در حجم محلول قبل و بعد از غوطه‌ور شدن بیضه مشاهده شد به عنوان حجم بافت بیضه در نظر گرفته شد.

**ارزیابی پارامترهای اسپرمی**

الف) ارزیابی تعداد اسپرم

برای بررسی غلظت اسپرم، ابتدا نمونه‌های اسپرم استخراج‌شده از اپیدیدیم در محیط مناسب استخراج VitaSperm رقیق شدند. سپس، یک میکرولیتر از نمونه به لام مکرر منتقل شد. این لام دارای شبکه‌بندی استاندارد است و نمونه تحت میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ( $\times 40$ ) مشاهده گردید. در این مرحله، شمارش اسپرم‌های موجود در مربع‌های مشخص انجام شد. با استفاده از تعداد شمارش‌شده و حجم مشخص نمونه، تعداد اسپرم‌ها محاسبه و به صورت غلظت اسپرم در میلیون بر میلی‌لیتر بیان شد [۳۴].

**ب) تحرک اسپرم**

اسپرم‌های استحصال‌شده از اپیدیدیم توسط پیپت کردن به خوبی همگن شدند و  $10$  میکرولیتر (یک قطره) بر روی یک لام قرار داده و روی آن یک لامل گذاشته به طوری که لایه نازک از مایع در زیر لامل به‌طور یکنواخت پخش گردد، سپس توسط میکروسکوپ نوری (با بزرگنمایی  $\times 40$ ) تحرک پیش‌رونده، درجا و اسپرم بی‌تحرک مورد بررسی قرار گرفتند.  $200$  عدد اسپرم از میدان‌های میکروسکوپی به شکل تصادفی ارزیابی شدند و سپس میانگین آن‌ها بر اساس درصد تحرک و عدم تحرک ثبت می‌شد [۳۵].

**ج) ریخت شناسی اسپرم**

برای بررسی مورفولوژی اسپرم و تشخیص اسپرم‌های طبیعی از غیرطبیعی، از روش رنگ آمیزی آئوزین-نیگروزین استفاده شد. در هر لام، تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش و از نظر مورفولوژی، شامل شکل سر، گردن، قطعه میانی و دم، بررسی شدند. درصد اسپرم‌های دارای ناهنجاری‌های مورفولوژیکی محاسبه و نتایج به صورت درصد گزارش گردید [۳۵،۳۶].

**ارزیابی کیفیت کروماتین اسپرم****الف) میزان آسیب رشته DNA**

برای ارزیابی هرگونه شکستگی در دو رشته DNA اسپرم حیوانات، رنگ آمیزی آکریدین اورنج (AO)<sup>۱</sup> در نظر گرفته شد. در این روش، گسترش نازکی از سوسپانسیون اسپرم موش که در مقابل هوا خشک شد، تهیه گردید. به طور خلاصه، گسترش‌ها در فیکساتیو کارنوی (متانول- اسیداستیک به نسبت ۳ به ۱) به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس به وسیله محلول رنگ AO (۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) به مدت ۸ دقیقه رنگ آمیزی شدند. لام‌های رنگ گرفته با آب جاری شستشو داده شدند و سپس در برابر هوا خشک گردیدند. سپس در همان روز اسپرم‌ها در گروه‌های مختلف با استفاده از میکروسکوپ فلورسینس (Olympus BX51, Japan) با بزرگنمایی ۱۰۰ بررسی شدند. اسپرم‌ها با توجه به میزان رنگ پذیری، در دو گروه شامل: اسپرم‌های سبز رنگ یا طبیعی (AO منفی) و اسپرم‌های قرمز رنگ (AO مثبت) با DNA دناتور، قرار گرفتند [۳۷]. در پایان، درصد اسپرم‌های سبز و قرمز محاسبه شد.

**ب) میزان تراکم کروماتین اسپرم**

برای ارزیابی میزان تراکم کروماتین اسپرم از رنگ آمیزی آنیلین بلو (AB)<sup>۲</sup> استفاده شد. اساس ارزیابی بر این نکته استوار است که طی اسپرمتوژنز

پروتامین به جای هیستون در کروماتین هسته قرار می‌گیرد که این جایگزینی در تراکم و پایداری اسپرم بسیار با اهمیت است. در این روش، گسترش‌های تهیه شده، به مدت ۲ ساعت در محلول گلوکارآلدئید ۳ درصد در دمای اتاق ثابت شدند. سپس، لام‌ها با محلول رنگ AB ۵ درصد در اسیداستیک ۴ درصد (اسیدیته ۳/۵) به مدت یک ساعت و ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند. پس از شستشو با آب، لام‌ها در مجاورت هوا خشک شدند. لام‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus CX31, Japan) و بزرگنمایی ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند. اسپرم‌ها بر اساس میزان رنگ پذیری در دو گروه شامل: اسپرم‌های نابالغ با هیستون زیاد به رنگ آبی تیره (AB مثبت) و اسپرم‌های بالغ به رنگ آبی روشن (AB منفی) قرار گرفتند، سپس درصد اسپرم‌های نابالغ محاسبه شد [۳۸].

**ج) میزان کمبود پروتامین اسپرم با رنگ آمیزی****کروماتین A3 (CMA3)**

کروماتین A3 به عنوان یک فلوروکروم استفاده می‌شود و به صورت برگشت پذیر به شیار کوچک DNA متصل و با جایگاه‌های مشابه پروتامین در DNA رقابت می‌کند، بنابراین شدت رنگ CMA3، بیانگر کمبود پروتامین در اسپرم می‌باشد. این تکنیک مشخص کننده نقص در بسته بندی کروماتین، بلوغ هسته و متراکم شدن هسته است. در این روش گسترش‌های تهیه شده، فیکساتیو کارنوی (متانول- اسیداستیک به نسبت ۳ به ۱) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط رنگ CMA3 و بافر مک الوین (۵۰ میکرولیتر رنگ CMA3 به ۴۵۰ میکرولیتر بافر مک الوین) به مدت ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه بر روی لام قرار داده شد (در محیط مرطوب انجام گردید). پس از شستشو با آب، لام‌ها در مجاورت هوا خشک شدند. لام‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus CX31, Japan) و بزرگنمایی ۱۰۰

<sup>1</sup> Acridine Orange<sup>2</sup> Aniline Blue

منی‌ساز از هر نمونه بررسی و به هر لوله نمره‌ای بین ۱ تا ۱۰ اختصاص داده شد. امتیاز بندی به صورت زیر می‌باشد: نمره ۱: عدم حضور هر گونه سلول داخل لوله‌ها. نمره ۲: فقدان سلول‌های زایا، تنها حضور سلول‌های سرتولی. نمره ۳: وجود تنها سلول‌های اسپرماتوگونی. نمره ۴: تعداد زیاد سلول‌های اسپرماتوگونی، کمتر از ۵ سلول اسپرماتوسیت، بدون حضور اسپرماتید و اسپرماتوزوآ. نمره ۵: تعداد زیاد سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت، بدون حضور اسپرماتید و اسپرماتوزوآ. نمره ۶: تعداد زیاد سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت، حضور ۵ تا ۲۰ سلول اسپرماتید، بدون اسپرماتوزوآ. نمره ۷: تعداد زیاد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید، بدون اسپرماتوزوآ. نمره ۸: حضور ۵ تا ۱۰ اسپرماتوزوآ. نمره ۹: اسپرماتوزوآهای زیاد، اپیتلیوم زایای نامرتب با سلول‌های زایای پراکنده و فاصله‌دار، گسیختگی لوله‌های لومن. نمره ۱۰: اسپرماتوزنز کامل، تعداد فراوان اسپرماتوزوآ، اپیتلیوم زایای کاملاً منظم، قطر طبیعی لومن لوله‌ها [۴۱].

#### ارزیابی هورمون، اسیدآمین و ویتامین B6

در این مطالعه، سطح سرمی متیونین، هوموسیستئین و تائورین با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) طبق پروتکل تولیدکننده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج به صورت میکرومول در لیتر ( $\mu\text{mol/L}$ ) گزارش شد. همچنین، غلظت سرمی ویتامین B6 با استفاده از کیت‌های ELISA (شرکت روش، سوئیس) و با استفاده از آنالایزرهای Elecsys 2010 و Cobas e411 اندازه‌گیری شد. روش کار طبق دستورالعمل‌های تولیدکننده انجام شد و نتایج به صورت نانومول در لیتر (nmol/L) گزارش گردید.

#### ارزیابی میزان پروتئین از طریق وسترن بلات

در آزمایش وسترن بلات، ابتدا پروتئین‌ها از بافت یا سلول‌ها با استفاده از Lysis Buffer استخراج و غلظت آن‌ها به روش برادفورد تعیین شد. سپس پروتئین‌ها توسط الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید-

مورد بررسی قرار گرفتند. اسپرم‌ها بر اساس میزان رنگ پذیری در دو گروه شامل: اسپرم‌های کمبود پروتامین به رنگ زرد درخشان (CMA3 مثبت) و اسپرم‌های بالغ به رنگ کم رنگ (CMA3 منفی) قرار گرفتند، سپس درصد اسپرم‌های نابالغ محاسبه شدند [۳۹].

#### د) ارزیابی سطح پراکسیداسیون لیپیدها

پراکسیداسیون لیپیدی به‌عنوان یک عامل مهم آسیب‌رسان به غشای اسپرم محسوب می‌شود که منجر به کاهش چشمگیر باروری می‌شود. در این روش از رنگ فلورسنت لیپوفیلیک C11 BODIPY (581/591) به‌عنوان پروب استفاده می‌گردد. تا به حال این پروب به‌عنوان شاخص بسیار حساس برای اکسیداسیون اسیدهای چرب مورد استفاده قرار گرفته است. در هر نمونه تقریباً ۱۰۰۰ سلول مورد بررسی قرار گرفت. فلورسانس ساطع شده از رنگ BODIPY-C11 در باند FL3 با باند نوری ۶۲۰ نانومتر، در باند FL2 با باند نوری ۵۳۰ نانومتر شناسایی شد. اسپرم‌ها با توجه به میزان آسیب لیپیدی و رنگ‌پذیری در دو گروه بررسی شد؛ این دو گروه شامل موارد زیر بود: اسپرم‌هایی که دچار لیپیدپراکسیداسیون شده بودند تولید فلورسانس سبزرنگ و اسپرم‌های طبیعی فلورسانس به رنگ قرمز تولید کردند. سپس نتایج به صورت درصد لیپید پراکسیداسیون گزارش گردید [۴۰].

#### بررسی‌های بافتی (رنگ آمیزی H & E)

برای ارزیابی امتیازدهی جانسون، ابتدا نمونه‌های بافتی از بیضه‌های سمت چپ تهیه و در محلول فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. سپس با استفاده از مراحل پاساژ بافتی و قالب‌گیری، مقاطع بافتی به ضخامت ۵ میکرومتر آماده شدند. در این مطالعه، از هر گروه به‌طور تصادفی ۳ نمونه بافت انتخاب شد و برای هر نمونه ۶ مقطع بافتی روی لام قرار داده شد که با استفاده از رنگ‌های هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) رنگ آمیزی انجام شد. بدین منظور، حداقل ۵۰ لوله

گرفته شد و برای رسم نمودار از Graph Pad Prism9 استفاده گردید.

### یافته‌ها

#### ارزیابی‌های وزن موش صحرایی و ریخت سنجی بیضه و اپیدیدیم (طول، عرض، ضخامت، وزن)

میانگین وزن موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف در جدول ۱ آمده است. در این مطالعه، میانگین وزن بدن بین گروه‌ها تفاوت آماری معناداری نداشت. میانگین وزن بیضه چپ در گروه واریکوسل به‌طور معناداری، کمتر از گروه کنترل بود ( $p=0/02$ ). علاوه بر این، میانگین وزن بیضه چپ در گروه واریکوسل تیمار شده با LTB نسبت به گروه‌های کنترل، شم و گروه کنترل تیمار شده با LTB به‌طور معناداری کمتر بود (به ترتیب  $p<0/001$ ،  $p=0/016$ ،  $p=0/02$ ). در مقابل، میانگین وزن بیضه راست بین گروه‌ها تفاوت آماری معناداری مشاهده نشد. همچنین، میانگین وزن اپیدیدیم سمت چپ در گروه واریکوسل تیمار شده با LTB نسبت به گروه‌های شم، کنترل و کنترل تیمار شده با LTB به‌طور معناداری کمتر بود ( $p<0/05$ ).

میانگین حجم بیضه راست در گروه واریکوسل نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت. علاوه بر این، میانگین حجم بیضه سمت راست در گروه شم نسبت به گروه کنترل و کنترل تیمار شده با LTB افزایش معناداری را نشان داد ( $p<0/05$ ). همچنین، میانگین حجم بیضه سمت چپ در گروه واریکوسل تیمار شده با LTB نسبت به گروه‌های کنترل، شم و کنترل تیمار شده با LTB کاهش یافت ( $p<0/05$ ) (جدول ۱).

سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) براساس وزن مولکولی جداسازی و به غشای PVDF انتقال داده شدند. پس از بلوکه‌سازی غشا با شیر خشک ۱۰٪، غشا با آنتی‌بادی‌های اولیه (sc-47778)  $\beta$ -actin، CBS (sc-133208) و HO-1 (ab13243) به مدت یک شب انکوبه شد. سپس آنتی‌بادی‌های ثانویه m-mouse anti-IgG $\kappa$  BP-HRP (sc-516102) و rabbit IgG-HRP (sc-2357) به کار رفتند. در پایان، پروتئین‌ها با روش لومینسانس شیمیایی (ECL) شناسایی و داده‌ها با نرم‌افزار IMAGE J تحلیل شدند [۴۲].

#### آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS-25 (USA, IL, SPSS, Inc., Chicago) تجزیه و تحلیل شد. داده‌هایی که نرمال نبودند از طریق روش‌های ترنسفورم نرمال گردید. اکثر پارامترها با توجه به آزمون شاپیرو-ویلک نرمال بودند و از طریق روش آزمون توکی برای متغیرهایی با یک فرض ثابت از همگنی واریانس‌ها استفاده شد. در همین حال، آزمون سی‌دانت<sup>۱</sup> برای متغیرهایی که فرض همگنی واریانس‌ها ثابت نشده بود، ارزیابی گردید. داده‌هایی که توزیع نرمال نداشته‌اند با استفاده از آزمون آنووا یک طرفه، کروسکال-والیس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. توصیف داده‌ها در بخش آماری توصیفی از شاخص‌های میانگین و انحراف معیار<sup>۲</sup> استفاده شد. همچنین  $p<0/05$  برای سطح معناداری در نظر

<sup>1</sup> C Dunnett

<sup>2</sup> Standard Deviation

جدول ۱. مقایسه وزن بدن، اپیدیدیم و بیضه و حجم بیضه بین گروه‌های مطالعه

| پارامتر                          | شم (Sh)                   | کنترل (C)                 | واریکوسل (V)              | کنترل با تیمار LTB (C+LTB) | واریکوسل با تیمار LTB (V+LTB) |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| وزن نهایی موش صحرایی (گرم)       | ۳۷۳/۲۶ ± ۲۶/۰۸            | ۳۹۵/۱۸ ± ۲۴/۷۷            | ۳۸۲/۰ ± ۳۵/۹۴             | ۳۷۲/۳۳ ± ۲۵/۹۳             | ۳۷۱/۷۰ ± ۲۱/۶۸                |
| وزن بیضه چپ (گرم)                | ۱/۴۱ ± ۰/۲۸ <sup>bc</sup> | ۱/۵۴ ± ۰/۱۴ <sup>bc</sup> | ۱/۴۶ ± ۰/۱۴ <sup>ac</sup> | ۱/۴۳ ± ۰/۲۱ <sup>bc</sup>  | ۱/۱۳ ± ۰/۳۱ <sup>a</sup>      |
| وزن بیضه راست (گرم)              | ۱/۳۸ ± ۰/۲۴               | ۱/۴۶ ± ۰/۱۴               | ۱/۳۵ ± ۰/۱۴               | ۱/۴۲ ± ۰/۱۵                | ۱/۳۳ ± ۰/۲                    |
| وزن اپیدیدیم راست (گرم)          | ۰/۷۵ ± ۰/۲۲               | ۰/۷۰ ± ۰/۰۶               | ۰/۶۰ ± ۰/۱۲               | ۰/۶۸ ± ۰/۰۵                | ۰/۶۶ ± ۰/۰۴                   |
| وزن اپیدیدیم چپ (گرم)            | ۰/۷۷ ± ۰/۲۳ <sup>ac</sup> | ۰/۷۱ ± ۰/۰۶ <sup>b</sup>  | ۰/۶۵ ± ۰/۱۴ <sup>a</sup>  | ۰/۶۷ ± ۰/۱ <sup>ab</sup>   | ۰/۵۹ ± ۰/۰۶ <sup>abc</sup>    |
| حجم بیضه راست (cm <sup>3</sup> ) | ۱/۶۰ ± ۰/۱۸ <sup>a</sup>  | ۱/۵ ± ۰/۲۰ <sup>b</sup>   | ۱/۰۷ ± ۰/۰۴ <sup>a</sup>  | ۱/۴۷ ± ۰/۳۳ <sup>b</sup>   | ۱/۳۲ ± ۰/۳۵ <sup>ab</sup>     |
| حجم بیضه چپ (cm <sup>3</sup> )   | ۱/۵۹ ± ۰/۲۳ <sup>b</sup>  | ۱/۵۴ ± ۰/۱۲ <sup>b</sup>  | ۱/۱۵ ± ۰/۰۴ <sup>ab</sup> | ۱/۴۸ ± ۰/۳۶ <sup>b</sup>   | ۱/۳۵ ± ۰/۱۶ <sup>a</sup>      |

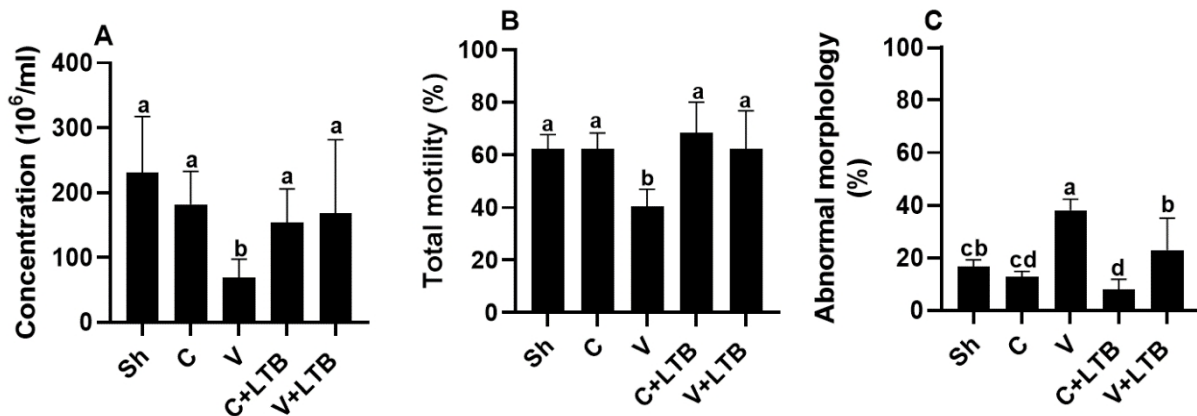
در ستون‌ها حروف غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف معنادار می‌باشد و حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنادار است.

گروه کنترل (C) (بدون مداخله)، گروه شم (SH) (عمل لاپاراتومی ساده)، گروه واریکوسل (V)، گروه کنترل تیمار شده با LTB (C+LTB) و گروه واریکوسل تیمار شده با LTB (V+LTB)، LTB (آل-سیستین، تائورین و ویتامین B6)

### مقایسه پارامترهای اسپرم در بین گروه‌های مطالعه

میانگین غلظت و حرکت کل اسپرم در گروه واریکوسل به طور معناداری در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم کاهش یافت ( $p < 0.001$ ). میانگین غلظت، تحرک اسپرم در گروه واریکوسل تیمار شده با LTB نسبت به گروه واریکوسل افزایش معناداری دیده شد ( $p < 0.05$ ). علاوه بر این، میانگین درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم در گروه واریکوسل نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی کاهش معناداری مشاهده شد.

( $p < 0.05$ ) (نمودار ۱، A, B). میانگین درصد اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی در گروه واریکوسل به صورت معنادار نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری را نشان داد ( $p < 0.05$ ). علاوه بر این درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم در گروه کنترل تیمار شده با LTB نسبت به گروه کنترل و شم کاهش یافت اما این اختلاف از لحاظ آماری معنادار نبود (نمودار ۱، C).



نمودار ۱. مقایسه پارامترهای اسپرم

(A) نمودار میانگین غلظت اسپرم، (B) میانگین درصد حرکت اسپرم، (C) میانگین درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم در بین گروه‌های آزمایشی مطالعه را نشان می‌دهد. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد (SD) بیان گردید.

در ستون‌ها حروف غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف معنادار می‌باشد و حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنادار است.

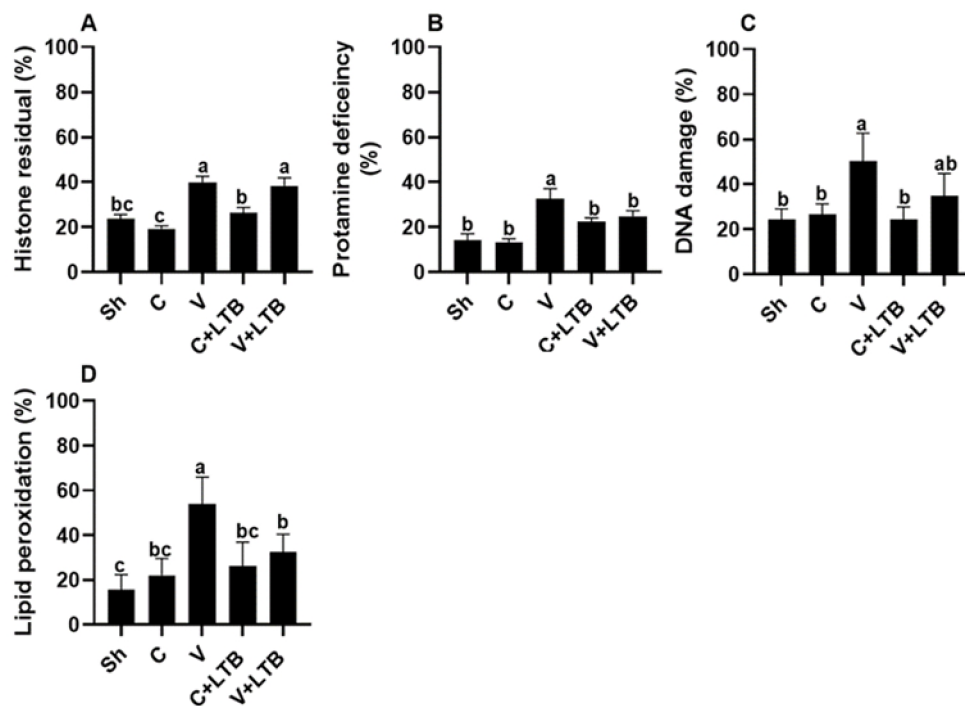
گروه کنترل (C) (بدون مداخله)، گروه شم (SH) (عمل لاپاراتومی ساده)، گروه واریکوسل (V)، گروه کنترل تیمار شده با LTB (C+LTB) و گروه واریکوسل تیمار شده با LTB (V+LTB)، LTB (آل-سیستین، تائورین و ویتامین B6)

**مقایسه سنجش تست‌های عملکردی اسپرم در بین گروه‌های مطالعه**

نسبت به گروه واریکوسل کاهش و بهبود مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). اما میانگین درصد هیستون‌های اضافی، آسیب DNA در گروه واریکوسل تیمار شده با LTB نسبت به گروه واریکوسل اختلاف معناداری مشاهده نشد (نمودار ۲، A-E). همچنین میانگین درصد هیستون اضافی در گروه کنترل تیمار شده با LTB در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۲، A) (شکل ۲، B).

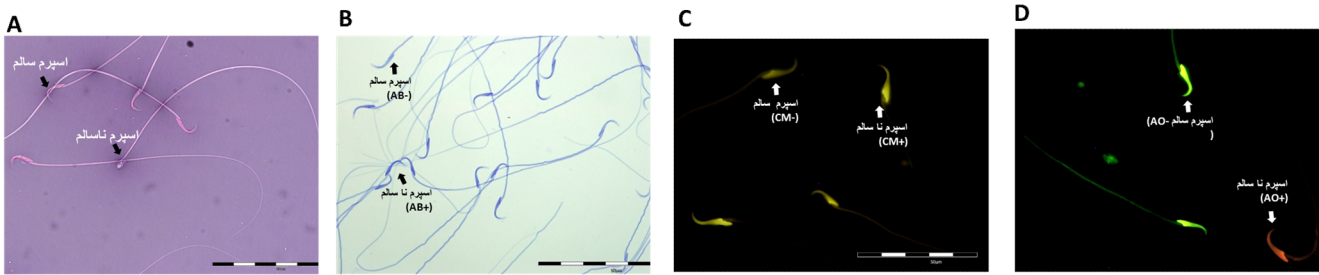
ارزیابی میانگین درصد هیستون‌های اضافی، کمبود پروتامین، آسیب DNA و لیپیدپراکسیداسیون اسپرم در گروه واریکوسل نسبت به گروه‌های کنترل و شم افزایش معناداری مشاهده شد ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۲، A) (شکل ۲، A-D).

علاوه بر این، میانگین درصد کمبود پروتامین و لیپید پراکسیداسیون در واریکوسل تیمار شده با LTB



**نمودار ۲. مقایسه تست‌های عملکردی اسپرم**

(A) میانگین درصد هیستون‌های اضافی، (B) میانگین درصد کمبود پروتامین، (C) میانگین درصد آسیب DNA اسپرم و (D) میانگین درصد پراکسیداسیون لیپید را در بین گروه‌های آزمایشی مطالعه را نشان می‌دهد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد (SD) بیان گردید. در ستون‌ها حروف غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف معنادار می‌باشد و حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنادار است. گروه کنترل (C) (بدون مداخله)، گروه شم (SH) (عمل لاپاراتومی ساده)، گروه واریکوسل (V)، گروه کنترل تیمار شده با LTB (C+LTB) و گروه واریکوسل تیمار شده با LTB (V+LTB)، LTB (آل-سیستئین، تائورین و ویتامین B6)



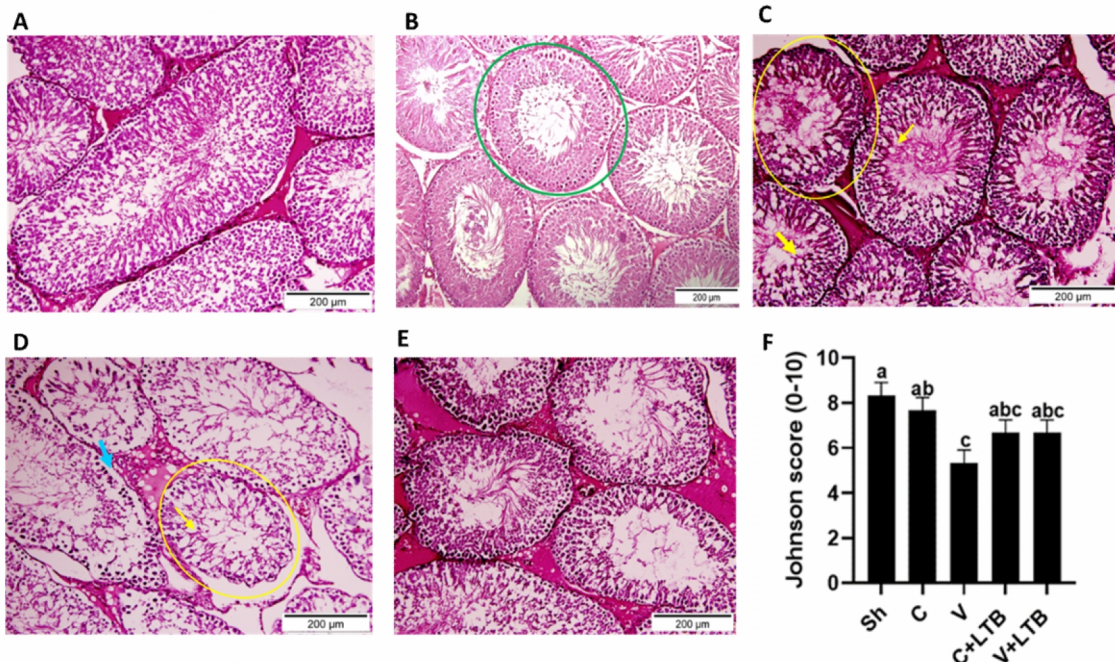
شکل ۲. ارزیابی ریخت‌شناسی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های مختلف

(A) شکل نشان‌دهنده ارزیابی ریخت‌شناسی اسپرم از طریق رنگ‌آمیزی اتوزین و تکروزین می‌باشد (اسپرم سالم دارای سر، تنه و دم سالم و اسپرم ناسالم ممکن است حاوی سر، تنه و یا دم ناسالم می‌باشد). (B) رنگ‌آمیزی آنیلین بلو (AB+) نشان‌دهنده وجود هیستون اضافی در کروماتین، AB- نشان‌دهنده وجود بلوغ طبیعی تراکم کروماتین اسپرم). (C) رنگ‌آمیزی کروماتین A3 (CMA3+) نشان‌دهنده وجود بسته بندی غیر طبیعی کروماتین و پروتامیناسیون ناکافی، CMA3- نشان‌دهنده وجود بسته‌بندی نرمال کروماتین) و (D) رنگ‌آمیزی آکریدیل اورانژ (AO+) نشان‌دهنده وجود DNA ناسالم و AO- نشان‌دهنده وجود DNA ناسالم است).

### بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی

بررسی میکروسکوپی مقاطع بافت بیضه نشان داد که در گروه‌های کنترل و شم، تمامی رده‌های سلولی مرتبط با اسپرماتوژنز، شامل اسپرماتوگونو، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتوسیت ثانویه، اسپرماتید گرد و سلول‌های سرتولی، به‌وضوح قابل مشاهده بودند (شکل ۳، A و B). در مقابل، در گروه واریکوسل، ادم در فضای بینابینی بافت، تخریب سلول‌های زایا و کاهش برخی از پارامترهای اسپرماتوژنز متناظر شد (شکل ۳، D). اما در گروه واریکوسل تیمار شده با LTB نسبت به گروه واریکوسل کاهش ادم در فضای بینابینی و بهبود رده‌های سلولی اسپرماتوژنز و سلول‌های لیدیک مشاهده شد (شکل ۳، E). اما در

گروه کنترل تیمار شده با LTB افزایش ادم و تغییر در لوله‌های منی‌ساز نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (شکل ۳، C). همچنین ارزیابی نمره جانسون در گروه واریکوسل نسبت به گروه‌های کنترل و شم کاهش معناداری را نشان داد ( $p < 0.05$ ). علاوه بر این میانگین نمره جانسون در گروه کنترل تیمار شده با LTB نسبت به گروه کنترل و شم کاهش مشاهده شد اما این اختلاف از لحاظ آماری معنادار نبود. همچنین میانگین درصد نمره جانسون در گروه واریکوسل تیمار شده با LTB در مقایسه با گروه واریکوسل افزایش یافت اما این اختلاف از لحاظ آمادری معنادار نبود (شکل ۳، نمودار F)



شکل ۳. تصاویر هیستولوژی مقطع بافت بیضه با استفاده از رنگ آمیزی H&E را نشان می‌دهد.

(A) بافت بیضه شم (در این تصویر چروکیدگی و واکوئل مشاهده نشد). (B) بافت بیضه کنترل (دایره سبز نشان دهنده لوله‌های منی ساز سالم و حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید، اسپرماتوزوآ و همچنین شامل مرحله اسپرماتوزنز کامل می‌باشد). (C) کنترل تیمار شده با LTB (دایره زرد نشان‌دهنده چروکیدگی لوله‌های منی ساز ناشی از پدیده ادم را نشان می‌دهد، همچنین پیکان زرد نشان‌دهنده واکوئل در بافت بیضه می‌باشد). (D) واریکوسل (دایره زرد نشان‌دهنده چروکیدگی لوله‌های منی ساز ناشی از پدیده ادم را نشان می‌دهد، همچنین پیکان زرد نشان‌دهنده واکوئل در بافت بیضه می‌باشد. پیکان آبی نشان‌دهنده جدا شدن سلول‌های اسپرماتوگونی از سطح غشاء پایه لوله‌های منی ساز می‌باشد). (E) واریکوسل تیمار شده با LTB (در این تصویر چروکیدگی و واکوئل مشاهده نشد) (F) نمودار نمره جانسون (۱-۱۰) را نشان می‌دهد. در ستون‌ها حروف غیرمشتک نشان‌دهنده اختلاف معنادار در سطح آماری می‌باشد و حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنادار است.

گروه کنترل (C) (بدون مداخله)، گروه شم (SH) (عمل لاپاراتومی ساده)، گروه واریکوسل (V)، گروه کنترل تیمار شده با LTB (C+LTB) و گروه واریکوسل تیمار شده با LTB (V+LTB)، LTB (آل-سیستئین، تائورین و ویتامین B6)

### مقایسه متابولیت‌های سرم در بین گروه‌های مطالعه

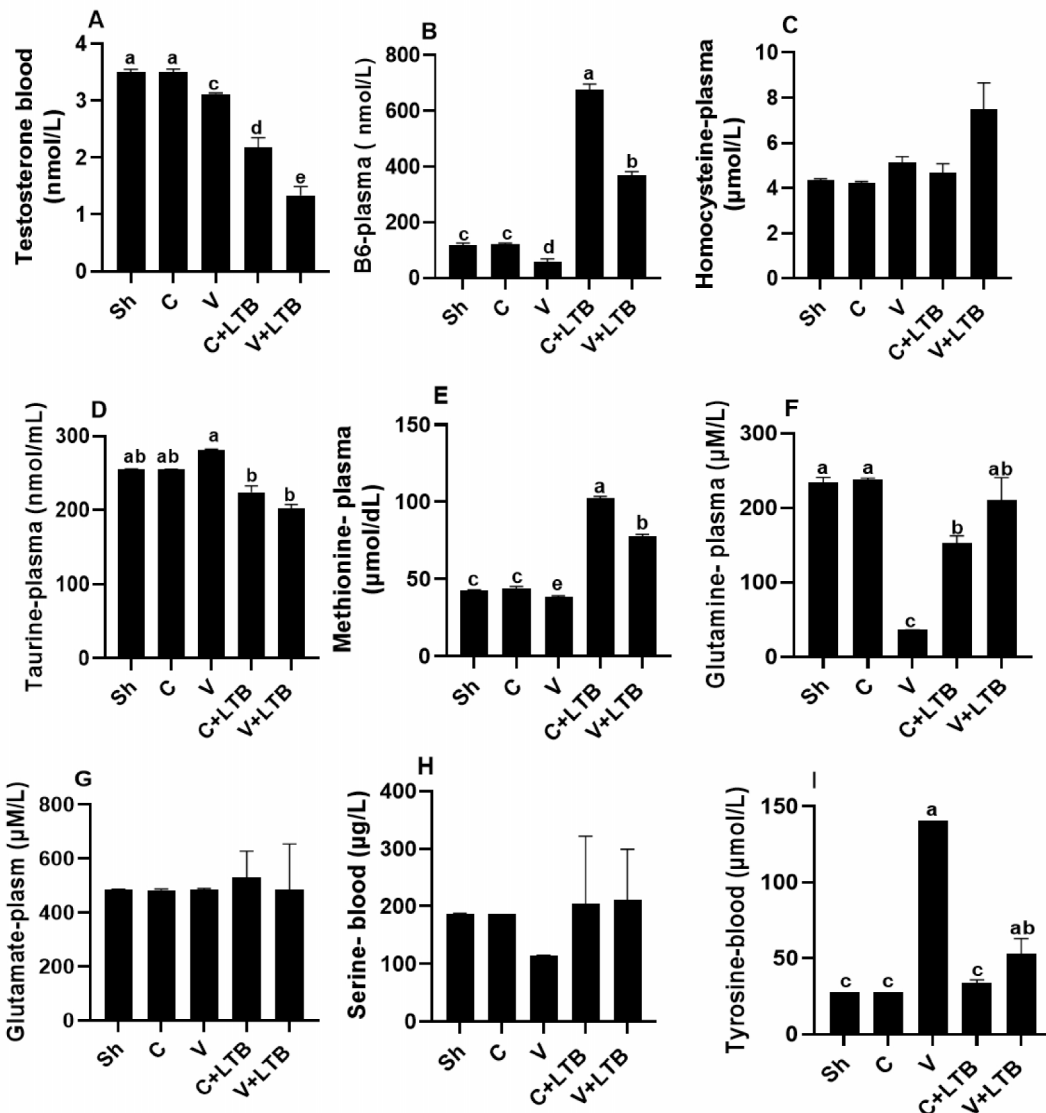
میانگین سطح تستوسترون در گروه‌های واریکوسل، واریکوسل و کنترل تیمار شده با LTB به صورت چشمگیری نسبت به گروه کنترل و شم کاهش یافت ( $p < 0.01$ ) (نمودار ۳، A). همچنین، میانگین ویتامین B6 در گروه واریکوسل به صورت معناداری در مقایسه با گروه کنترل و شم کاهش معناداری را نشان داد ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۳، B). میانگین ویتامین B6 تایروزیل در گروه‌های واریکوسل تیمار شده با LTB نسبت به گروه واریکوسل افزایش معناداری مشاهده شد ( $p < 0.01$ ) (نمودار ۳، I و B). علاوه بر این، میانگین ویتامین B6 در گروه کنترل تیمار شده با LTB نسبت به گروه‌های کنترل، شم و واریکوسل

تیمار شده با LTB به صورت چشمگیری افزایش یافت ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۳، B). همچنین، میانگین تایروزیل در گروه واریکوسل تیمار شده با LTB نسبت به گروه واریکوسل بدون LTB کاهش معناداری نشان داد ( $p < 0.05$ ). در این مطالعه میانگین میزان هموسیستئین، گلوتامات و سرین در بین گروه‌های آزمایشی اختلاف آماری معناداری مشاهده نشد (نمودار ۳، G و H). میانگین تائورین در گروه واریکوسل تیمار شده با LTB نسبت به گروه واریکوسل کاهش معناداری را نشان داد ( $p < 0.05$ ). میانگین تائورین در گروه کنترل تیمار شده با LTB در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم تفاوت آماری معناداری مشاهده نشد (نمودار ۳، D). میانگین میزان



شده با LTB نسبت به گروه کنترل و شم افزایش چشمگیری را نشان داد ( $p < 0.01$ ) (نمودار ۳، E). در گروه کنترل تیمار شده با LTB میزان گلوتامین نسبت به گروه‌های کنترل و شم کاهش معناداری مشاهده شد ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۳، F).

متیونین و گلوتامین در گروه واریکوسل نسبت به گروه‌های کنترل و شم کاهش معناداری نشان داد ( $p < 0.05$ ). همچنین میانگین متیونین و گلوتامین در گروه واریکوسل تیمار شده با LTB نسبت به گروه واریکوسل افزایش معناداری متناظر شد ( $p < 0.05$ ). علاوه بر این میانگین متیونین در گروه کنترل تیمار



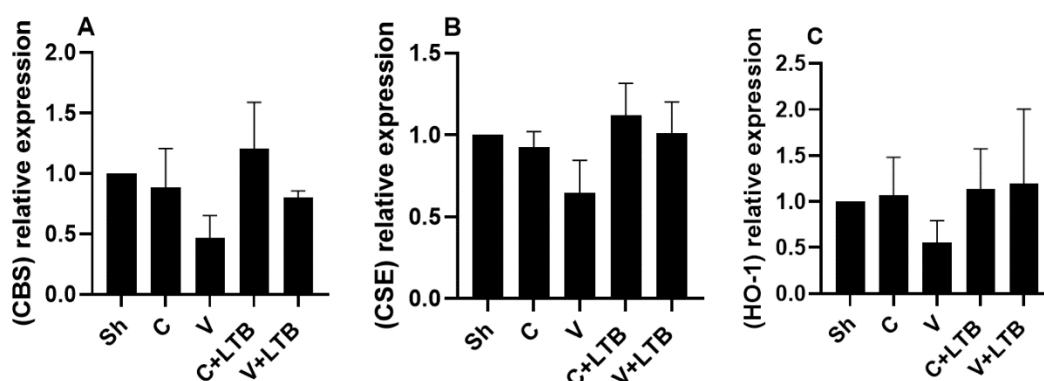
نمودار ۳. مقایسه متابولیت‌های سرم

(A) نمودار میانگین تستوسترون، (B) میانگین هموسیستین، (C) میانگین B6، (D) میانگین تائورین، (E) میانگین متیونین، (F) میانگین گلوتامین، (G) میانگین گلوتامات، (H) میانگین سرین و (I) تایروزین در بین گروه‌ها را نشان می‌دهد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد (SD) بیان گردید. در ستون‌ها حروف غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف معنادار می‌باشد و حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنادار است. گروه کنترل (C) (بدون مداخله)، گروه شم (SH) (عمل لاپاراتومی ساده)، گروه واریکوسل (V)، گروه کنترل تیمار شده با LTB (C+LTB) و گروه واریکوسل تیمار شده با LTB (V+LTB)، LTB (آل-سیستین، تائورین و ویتامین B6)

## ارزیابی میزان پروتئین آنزیم‌های CBS، CSE و HO-1 در بافت هموژن بیضه در بین گروه‌های مطالعه

هر گروه از ۳ نمونه بافت هموژن استفاده گردید و همانگونه که در نمودار ۴ مشاهده می‌شود، اختلاف معناداری در میزان پروتئین‌ها در بین گروه‌ها مشاهده نشد (نمودار ۴، A-C) (شکل ۴، A و B).

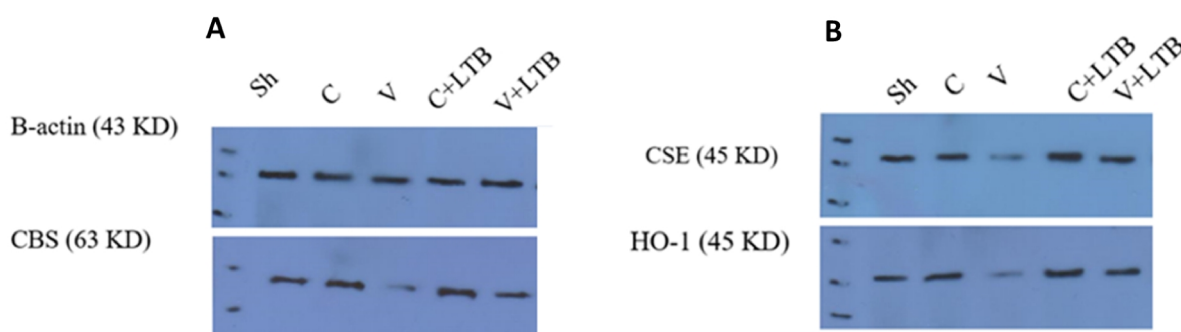
میزان پروتئین CBS، CSE و HO-1 با استفاده از روش وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. برای



نمودار ۴. ارزیابی میزان پروتئین آنزیم‌های CBS، CSE و HO-1 در بافت هموژن بیضه

(A) ارزیابی پروتئین آنزیم CBS، (B) ارزیابی پروتئین آنزیم CSE و (C) ارزیابی پروتئین آنزیم HO-1 در هموژن بافت بیضه در بین گروه‌ها را نشان می‌دهد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد (SD) بیان گردید. در ستون‌ها حروف غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف معنادار می‌باشد و حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنادار است.

گروه کنترل (C) (بدون مداخله)، گروه شم (SH) (عمل لاپاراتومی ساده)، گروه واریکوسل (V)، گروه کنترل تیمار شده با LTB (C+LTB) و گروه واریکوسل تیمار شده با LTB (V+LTB) (آل-سیستئین، تائورین و ویتامین B6)



شکل ۵. باندهای حاصل از وسترن بلات برای سنجش پروتئین‌های آنزیمی CBS، CSE، HO-1 و پروتئین بتا‌آکتین.

(A) شکل باند پروتئین بتا‌آکتین و آنزیم CBS، (B) شکل باند پروتئین آنزیم CSE و آنزیم HO-1 را نشان می‌دهد. گروه کنترل (C) (بدون مداخله)، گروه شم (SH) (عمل لاپاراتومی ساده)، گروه واریکوسل (V)، گروه کنترل تیمار شده با LTB (C+LTB) و گروه واریکوسل تیمار شده با LTB (V+LTB) (آل-سیستئین، تائورین و ویتامین B6).

بیضه‌ها می‌گردد [۴۳] این عوامل مستقیماً با کاهش باروری ارتباط دارد [۲۵، ۲۳، ۱۷]. در این مطالعه، برای بررسی مسیرهای درون‌سلولی از مدل جراحی واریکوسل در موش‌های صحرایی آزمایشگاهی استفاده شد؛ مدلی که به خوبی تأیید شده و به‌طور

## بحث

واریکوسل، صرف‌نظر از علل آناتومیکی یا عملکردی، منجر به ایجاد اختلال در تخلیه وریدی بیضه می‌شود در نتیجه سبب افزایش دما، کمبود اکسیژن و آزادسازی بیش‌ازحد گونه‌های فعال اکسیژن در

گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. هدف از این تحقیق، ارزیابی تأثیر واریکوسل بر بیان پروتئین‌های کلیدی آنزیم‌های مرتبط با سیستم آنتی‌اکسیدانی درونی و برخی نشانگرهای متابولیکی آن‌ها بود. نتایج این مطالعه نشان داد که واریکوسل باعث آسیب بافت بیضه و اختلال در فرآیند اسپرم‌زایی می‌شود. در این مطالعه مشاهده شد که غلظت، تحرک و مورفولوژی طبیعی اسپرم در گروه موش صحرایی مبتلا به واریکوسل کاهش چشمگیری را نسبت به گروه سالم (گروه شم و کنترل) نشان داد. علاوه بر این، پارامترهای عملکردی اسپرم مانند نقص در بلوغ هسته اسپرم، کمبود پروتئین لیپید پراکسیداسیون و آسیب DNA اسپرم نیز مشاهده شد. این نتایج با آسیب بافت بیضه (نمره جانسون) در گروه واریکوسل همخوانی داشت. علاوه بر این در این مطالعه، پروتئین‌های اصلی تولیدکننده آنتی‌اکسیدانی درونی، یعنی CBS و CSE ارزیابی گردید و مشاهده شد که هر دو پروتئین به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافته‌اند اما از لحاظ آماری معنادار نبود و این نتایج با مطالعه قبلی شیاسی و همکاران همخوانی ندارد [۲۶].

در مطالعه اکبری‌ان و همکاران، نشان داده شد که واریکوسل باعث کاهش قابل‌توجه بیان ژن‌های CBS و CSE می‌شود [۲۵]. این دو ژن مسئول تولید آنزیم‌هایی هستند که در تولید آنتی‌اکسیدان‌های فیزیولوژیکی مانند گلووتالون و هیدروژن سولفید نقش دارند. پیش‌بینی می‌شود که کاهش فعالیت این آنزیم‌ها منجر به کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌های فیزیولوژیکی در بیضه‌ها شود. در مدل حیوانی، کاهش سطح گلووتالون و هیدروژن سولفید به‌طور واضح مشاهده شده است و در مطالعات دیگر نیز کمبود GSH در بیماران مبتلا به واریکوسل به اثبات رسیده است. این کاهش‌ها می‌تواند به آسیب اکسیداتیو بیشتر و کاهش عملکرد اسپرم منجر شود [۴۴-۴۶] در شرایط استرس، آنزیم HO-1 فعال شده و به کاهش آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو کمک می‌کند. با

افزایش استرس اکسیداتیو در واریکوسل، انتظار می‌رفت فعالیت این آنزیم در گروه واریکوسل افزایش یابد، اما در این مطالعه، میزان HO-1 در گروه واریکوسل کاهش یافت که از نظر آماری معنادار نبود. این کاهش ممکن است ناشی از کاهش بیان ژن HMOX1 یا تجزیه پروتئین‌ها باشد. همچنین، کاهش گاز H<sub>2</sub>S فعال‌کننده غیرمستقیم HMOX1 از طریق مسیر Nrf2 یا استرس آندوپلاسمی منجر به تجمع پروتئین‌های تا نخورده شده و ممکن است در این کاهش نقش داشته باشد [۴۷، ۴۸].

با توجه به اینکه دوره اسپرماتوژنز در موش صحرایی حدود ۶۵ روز است، در این مطالعه پس از دو ماه از القای واریکوسل، درمان با مکمل‌های LTB به مدت دو ماه در گروه‌های واریکوسل و کنترل انجام شد. هدف از این مطالعه بررسی تأثیرات درمانی مکمل‌های تائورین، ال-سیستئین و ویتامین B6 بر پارامترهای اسپرم و عملکرد آنتی‌اکسیدانی در موش‌های صحرایی مبتلا به واریکوسل بود.

نتایج نشان داد که در گروه‌های واریکوسل، پارامترهایی همچون غلظت (تعداد) اسپرم، تحرک آن‌ها کاهش یافته و در عین حال، میزان اسپرم‌های غیرطبیعی به‌طور چشمگیری افزایش یافت. علاوه بر این، در گروه واریکوسل، پارامترهای عملکردی اسپرم شامل کمبود پروتئین، آسیب DNA و پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم نیز افزایش قابل‌توجهی نشان داد.

در گروه واریکوسل، مصرف مکمل LTB به مدت دو ماه بهبود قابل‌توجهی در تعداد و تحرک اسپرم نشان داد و همچنین میزان مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم کاهش یافت. این نتایج در مقایسه با گروه واریکوسل کاملاً مشهود بود. همچنین، میزان پراکسیداسیون لیپیدی در اسپرم گروه واریکوسل تحت درمان با LTB کاهش یافت. در نهایت، کاهش استرس اکسیداتیو باعث بهبود کلی در پارامترهای اسپرم شد.

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند ویتامین B6، تائورین، و ال-سیستئین، به‌طور جداگانه با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود منجر به کاهش استرس‌اکسیداتیو شده و در نتیجه کاهش استرس‌اکسیداتیو منجر به کاهش آسیب عملکرد اسپرم می‌شود [۲۶-۲۸].

آنتی‌اکسیدان‌ها از طریق خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن<sup>۱</sup> (RNS)، از آسیب به مولکول‌های زیستی مانند DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها جلوگیری می‌کنند [۱۲]. یکی از مسیرهای مهم در تنظیم پاسخ آنتی‌اکسیدانی، مسیر Nrf2/Keap1 است که از طریق فعال‌سازی فاکتور رونویسی Nrf2<sup>۲</sup>، ژن‌های مرتبط با آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز<sup>۳</sup> (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز<sup>۴</sup> (GPx) و کاتالاز<sup>۵</sup> (CAT) را بیان می‌کنند و سلول‌ها را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو مقاوم می‌سازد. به‌علاوه، با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی در غشای سلولی، پایداری غشاء حفظ شده و عملکرد سلول بهبود می‌یابد [۲۹،۳].

آنتی‌اکسیدان‌ها از مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده (آپوپتوز) ناشی از استرس‌اکسیداتیو نیز جلوگیری می‌کنند؛ به‌ویژه از طریق مهار آزادسازی سیتوکروم c از میتوکندری و تنظیم مسیرهای وابسته به کاسپاز، که این فرآیند برای جلوگیری از تخریب سلول‌های حیاتی ضروری است. همچنین، این ترکیبات می‌توانند مسیرهای التهابی مانند فاکتور هسته‌ای تقویت‌کننده زنجیره سبک کاپا از لنفوسیت‌های بی‌فعال شده<sup>۶</sup> (NF-κB) را مهار کرده و با کاهش سطح سایتوکاین‌های التهابی نظیر فاکتور نکروز توموری آلفا<sup>۷</sup> (TNF-α) و اینترلوکین-۶ (IL-6)، میزان التهاب و آسیب ناشی از

استرس‌اکسیداتیو را کاهش می‌دهند. از سوی دیگر، آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند تائورین، ویتامین B و ال‌سیستئین به‌طور خاص با تثبیت عملکرد میتوکندری و کاهش آسیب DNA، از توقف چرخه سلولی جلوگیری کرده و رشد سلولی را تحت شرایط استرس تسهیل می‌کنند [۳ و ۲۹]. این مکانیسم‌ها نشان می‌دهند که آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در تنظیم پاسخ سلولی به استرس‌اکسیداتیو، جلوگیری از آسیب سلولی و بهبود عملکرد اندام‌ها در شرایط بیماری‌هایی مانند واریکوسل منجر می‌شود [۲۹].

این مطالعه نشان داد که مکمل LTB توانست کمبود پروتامین را در اسپرم بهبود بخشد؛ اما تأثیری بر کاهش هیستون‌های اضافی، آسیب DNA یا نمره جانسون نداشت. برخی مطالعات پیشین نشان دادند که ترکیباتی مانند آلفالیپوئیک‌اسید و ویتامین‌های E و B می‌توانند به بهبود ساختار کروماتین و افزایش کیفیت اسپرم کمک کنند، اما با نتایج این مطالعه همخوانی نداشت [۲۳،۲۸،۳۳]. در این مطالعه، بررسی میزان پروتئین‌های CBS، CSE، و HO-1 در بافت بیضه گروه‌های مختلف نشان داد که علی‌رغم کاهش پروتئین‌ها در گروه واریکوسل، تغییرات معناداری در سطح این پروتئین‌ها مشاهده نشد. همچنین در گروه تحت درمان با LTB، اگرچه سطح پروتئین‌ها نسبت به گروه واریکوسل افزایش یافت، اما این افزایش نیز از نظر آماری معنادار نبود. این پدیده می‌تواند به دلیل محدودیت‌های روش وسترن بلات باشد که قادر به شناسایی تغییرات کوچک یا جزئی در سطح پروتئین‌ها نمی‌باشد و نیاز به تغییرات قابل توجه در میزان پروتئین برای ایجاد تغییرات آماری معنادار دارد. علاوه بر این، تنظیمات پس از ترجمه پروتئین‌ها، مانند فسفریلاسیون یا استیلایسیون، ممکن است بر عملکرد آنزیم‌ها تأثیر بگذارد بدون اینکه تغییرات معناداری در سطح پروتئین‌ها مشاهده شود. همچنین، مکانیسم‌های جبرانی در پاسخ به بیماری‌هایی مانند واریکوسل ممکن است فعالیت آنزیم‌ها را بدون

<sup>1</sup> Nitrogen Reactive Species

<sup>2</sup> Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2

<sup>3</sup> Superoxide Dismutase

<sup>4</sup> Glutathion Peroxidase A

<sup>5</sup> Catalase

<sup>6</sup> Nuclear Factor Kappa B

<sup>7</sup> Tumor Necrosis Factor Alpha

تغییرات آشکار در سطح پروتئین‌ها تنظیم کنند. در نهایت، درمان با LTB ممکن است بیشتر بر فعالیت آنزیمی پروتئین‌ها تأثیر بگذارد تا بر سطح پروتئین‌ها و همچنین مدت زمان و دوز درمان می‌تواند بر نتایج اثر گذار باشد. بنابراین، برای درک دقیق‌تر اثرات درمان‌های مختلف بر این پروتئین‌ها و فعالیت آن‌ها، نیاز به تحقیقات تکمیلی و استفاده از روش‌های دیگر نظیر اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی و بررسی تغییرات پس از ترجمه وجود دارد.

در این مطالعه، تغییرات اسید آمینه و ویتامین B6 مرتبط با فعالیت ترکیبی چرخه یک کربن و مسیر ترانس سولفوراسیون بررسی شد. هموسیستئین که به عنوان ماده اولیه برای تولید سیستئین در مسیر ترانس سولفوراسیون و متیونین در چرخه یک کربن عمل می‌کند [۴۹]، در گروه واریکوسل افزایش یافت اما از لحاظ آماری معنادار نبود. در این مطالعه، در گروه واریکوسل تحت درمان LTB سطح هموسیستئین افزایش غیر معناداری یافته است. این افزایش نشان می‌دهد که آنزیم‌های CBS و CSE که از هموسیستئین برای تولید سیستئین استفاده می‌کنند، کاهش یافته‌اند. در نتیجه، هموسیستئین در بدن انباشته شده است.

در همان زمان، متیونین در گروه واریکوسل نیز کاهش یافت، که احتمالاً به دلیل کاهش متیلاسیون هموسیستئین به متیونین، که نشان‌دهنده نقص در چرخه یک کربن است. در گروه واریکوسل تحت درمان با LTB میزان متیونین افزایش معناداری را نسبت به گروه واریکوسل نشان داد و این نتیجه ممکن است به دلیل تجمع هموسیستئین و فرآیندهای جایگزین برای تولید متیونین، در شرایط خاص مانند کمبود SAME، بدن ممکن است سطح متیونین را از منابع دیگر در بدن به‌طور موقت آزاد کند تا در فرآیندهای متابولیک ضروری، مانند تولید S-آدنوزین متیونین SAME و فعال‌سازی آنزیم‌های مهم از جمله CBS استفاده کند [۴۹،۵۰]. این امر

می‌تواند به صورت جبران‌کننده باعث افزایش سطح متیونین شود. همچنین، ویتامین B6 نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای متیلاسیون و متابولیسم متیونین ایفا می‌کند [۴۹،۵۰]. افزایش مصرف ویتامین B6 یا سایر ترکیبات مرتبط با فرآیندهای متابولیکی ممکن است به‌طور موقت باعث افزایش سطح متیونین شود، حتی اگر مسیرهای اصلی متیلاسیون هموسیستئین مختل شده باشند.

همچنین، تائورین به‌طور قابل توجهی در گروه واریکوسل افزایش اما در گروه واریکوسل تحت درمان با LTB کاهش یافت، در گروه واریکوسل، افزایش قابل توجه سطح تائورین نشان‌دهنده این است که بدن به‌طور جبرانی سعی کرده است تا از سیستئین‌های اضافی استفاده کند. این افزایش ممکن است به دلیل مسیرهای جایگزین باشد که در شرایط استرس اکسیداتیو فعال می‌شوند. یکی از این مسیرها تبدیل سیستئین به تائورین از طریق آنزیم سیستئین د اکسیژناز<sup>۱</sup> (CDO) است که در صورت اختلال در تولید گلووتاتیون و هیدروژن سولفید برای جلوگیری از تجمع سمی سیستئین‌های اضافی فعال می‌شود [۵۱].

در این مطالعه، همچنین سطح ویتامین B6 در گروه واریکوسل کاهش و در گروه واریکوسل تحت درمان LTB افزایش قابل توجهی را نشان داد. کاهش سطح ویتامین B6 در گروه واریکوسل ممکن است به دلیل افزایش استرس اکسیداتیو و اختلال در عملکرد آنزیم‌های وابسته به این ویتامین باشد. ویتامین B6 نقش حیاتی در فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند CBS و CSE دارد [۵۲]. کاهش سطح ویتامین B6 می‌تواند به نقص در این مسیرها و به دنبال آن به اختلال در تولید آنتی‌اکسیدان‌ها و افزایش آسیب اکسیداتیو منجر شود. درمان با LTB منجر به افزایش قابل توجه سطح ویتامین B6 در گروه تحت درمان شد. این افزایش ممکن است به دلیل اثرات مثبت LTB بر جذب و متابولیسم ویتامین B6 و همچنین بهبود

<sup>1</sup> Cysteine Dioxygenase

عملکرد آنزیم‌های مرتبط با این ویتامین باشد. در این مطالعه ارزیابی سطح میانگین گلوتامین در گروه واریکوسل کاهش و در گروه واریکوسل تحت درمان افزایش نشان داد. اما میزان گلوتامات در بین گروه‌های آزمایشی اختلاف معناداری مشاهده نشد. همچنین میزان سرین در گروه واریکوسل کاهش یافت اما از لحاظ آماری معنادار نبود.

در این مطالعه، ارزیابی گلوتامین نشان داد که سطح گلوتامین در گروه واریکوسل کاهش یافته، اما در گروه واریکوسل تحت درمان با LTB افزایش یافته است. این تغییرات نشان‌دهنده تأثیر مثبت درمان با LTB در بازسازی ذخایر گلوتامین و بهبود وضعیت متابولیک در شرایط واریکوسل است. همچنین، میزان گلوتامات در بین گروه‌ها اختلاف معناداری نداشت، که ممکن است نشان‌دهنده عدم تغییرات قابل توجه در سطح گلوتامات تحت شرایط درمان و غیر درمان باشد. همچنین، به نظر می‌رسد که درمان با LTB تأثیر زیادی بر سطح گلوتامات نداشته باشد. در رابطه با میزان سرین، مشاهده شد که اسید آمینه سرین در گروه واریکوسل کاهش یافت، اما از لحاظ آماری معنادار نبود. کاهش سرین می‌تواند به دلیل تغییرات متابولیک ناشی از استرس اکسیداتیو و اختلال در فرآیندهای متابولیک در واریکوسل باشد، اما چون این کاهش از نظر آماری معنادار نبوده است، شاید این تغییرات تحت تأثیر عوامل دیگری قرار گرفته باشد. علاوه بر این در گروه واریکوسل، سطح تیروزین به‌طور معناداری افزایش یافت که ممکن است ناشی از استرس اکسیداتیو و اختلالات متابولیک باشد. در گروه تحت درمان با LTB، کاهش تیروزین مشاهده شد، اما این کاهش از نظر آماری معنادار نبود، که نشان می‌دهد درمان با LTB ممکن است تأثیری بر متابولیسم تیروزین داشته باشد که نیاز به بررسی‌های بیشتر دارند. این یافته‌ها حاکی از آن است که مکمل LTB می‌تواند استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون

لیپیدی و تکه‌تکه شدن DNA اسپرم را کاهش داده و بلوغ DNA را بهبود بخشد. با این حال، در این مطالعه مکمل LTB نتوانست تأثیر مثبتی بر عملکرد اسپرم، و میزان پروتئین‌های کلیدی مسیر ترانس سولفوراسیون CBS، CSE و HO-1 گذارد.

### نتیجه‌گیری

این مطالعه به بررسی تأثیر واریکوسل و درمان‌های آنتی‌اکسیدان بر پارامترهای اسپرمی پرداخته است. نتایج نشان دادند که واریکوسل بدون درمان آنتی‌اکسیدانی منجر به کاهش کیفیت اسپرم و عملکرد اسپرم می‌شود. استفاده از مکمل آنتی‌اکسیدانی LTB بهبود قابل توجهی در پارامترهای اسپرمی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی ایجاد کرد، هرچند تأثیر معنی داری بر بهبود عملکرد کروماتین اسپرم و پروتئین‌های مسیر ترانس سولفوراسیون نداشت.

### محدودیت‌ها

مدت زمان درمان با مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی (LTB) در این مطالعه می‌تواند یکی از محدودیت‌های مطالعه باشد که برای مشاهده اثرات طولانی‌مدت آن‌ها بر عملکرد اسپرم و پروتئین‌های مسیرهای متابولیک کافی نبوده است. همچنین به دلیل هزینه‌های بالا روش Real Time PCR، در این مطالعه ارزیابی بیان ژن صورت نگرفت.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان از مسئولین و پرسنل پژوهش‌شکده زیست‌فناوری پژوهشگاه رویان کمال تشکر و قدردانی را دارند. این مقاله از پایان نامه دکترای تخصصی زیست‌شناسی تکوین مصوب گروه زیست‌شناسی گروه علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان استان اصفهان با همکاری پژوهش‌شکده زیست‌فناوری پژوهشگاه رویان استان اصفهان استخراج شده است.

## References

- 1- Kavoussi P, Birowo P, Saleh R, Shah R, Agarwal A. Varicocele and male infertility conundrum: making sense of a never-ending story for the busy clinician. *Arab J Urol*. 2024; 22(1):1-5.
- 2- Mauchart P, Vass RA, Nagy B, Sulyok E, Bódis J, Kovács K. Oxidative stress in assisted reproductive techniques, with a focus on an underestimated risk factor. *Curr Issues Mol Biol*. 2023; 45(2):1272-1286.
- 3- Agarwal A, Hamada A, Esteves SC. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. *Nat Rev Urol*. 2012; 9(12):678-90.
- 4- Ribas-Maynou J, Yeste M. Oxidative stress in male infertility: causes, effects in assisted reproductive techniques, and protective support of antioxidants. *Biology (Basel)*. 2020; 9(4):77.
- 5- Jannatifar R, Parivar K, Roodbari NH, Nasr-Esfahani MH. Effects of N-acetyl-cysteine supplementation on sperm quality, chromatin integrity and level of oxidative stress in infertile men. *Reprod Biol Endocrinol*. 2019; 17(1):24.
- 6- Zhou X, Liu F, Zhai S. Effect of L-carnitine and/or L-acetyl-carnitine in nutrition treatment for male infertility: a systematic review. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2007;16 Suppl 1:383-90.
- 7- Rezaee-Tazangi F, Zeidooni L, Rafiee Z, Fakhredini F, Kalantari H, Alidadi H, et al. Taurine effects on bisphenol a-induced oxidative stress in the mouse testicular mitochondria and sperm motility. *JBRA Assist Reprod*. 2020; 24(4):428-435.
- 8- Blacher J, Safar ME. Homocysteine, folic acid, B vitamins and cardiovascular risk. *J Nutr Health Aging*. 2001;5(3):196-9. PMID: 11458292.
- 9- Agarwal A, Rana M, Qiu E, AlBunni H, Bui AD, Henkel R. Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility. *Andrologia*. 2018; 50(11):e13126.
- 10- Banerjee R, Zou CG. Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-beta-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein. *Arch Biochem Biophys*. 2005; 433(1):144-56.
- 11- Miles EW, Kraus JP. Cystathionine beta-synthase: structure, function, regulation, and location of homocystinuria-causing mutations. *J Biol Chem*. 2004; 279(29):29871-4.
- 12- Pyrgidis N, Sokolakis I, Palapelas V, Tishukov M, Mykoniatis I, Symeonidis EN, et al. The effect of antioxidant supplementation on operated or non-operated varicocele-associated infertility: a systematic review and meta-analysis. *Antioxidants (Basel)*. 2021; 10(7):1067.
- 13- Kruger WD. Cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency: of mice and men. *Mol Genet Metab*. 2017; 121(3):199-205.
- 14- Lllavanera M, Mateo-Otero Y, Bonet S, Barranco I, Fernández-Fuertes B, Yeste M. The triple role of glutathione S-transferases in mammalian male fertility. *Cell Mol Life Sci*. 2020; 77(12):2331-2342.
- 15- Taş S, Sarandöl E, Dirican M. Vitamin B6 supplementation improves oxidative stress and enhances serum paraoxonase/arylesterase activities in streptozotocin-induced diabetic rats. *ScientificWorld Journal*. 2014; 2014:351598.
- 16- Singh K, Jaiswal D. One-carbon metabolism, spermatogenesis, and male infertility. *Reprod Sci*. 2013; 20(6):622-30.
- 17- Morellato AE, Umansky C, Pontel LB. The toxic side of one-carbon metabolism and epigenetics. *Redox Biol*. 2021;40:101850.
- 18- Dattilo M, Cornet D, Amar E, Cohen M, Menezo Y. The importance of the one carbon cycle nutritional support in human male fertility: a preliminary clinical report. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014 29;12:71.
- 19- Nazifi S, Razavi SM, Safi N, Rakhshandehroo E. Malignant ovine theileriosis: alterations in the levels of homocysteine, thyroid hormones and serum trace elements. *J Bacteriol Parasitol*. 2012;3(7):1-4.
- 20- Crha I, Kralikova M, Melounova J, Ventruba P, Zakova J, Beharka R, et al. Seminal plasma homocysteine, folate and cobalamin in men with obstructive and non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet*. 2010; 27(9-10):533-8.
- 21- Ebisch IM, Thomas CM, Peters WH, Braat DD, Steegers-Theunissen RP. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Hum Reprod Update*. 2007; 13(2):163-74.

- 22- Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Guéant-Rodriguez RM, Daval JL, Guéant JL. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update*. 2007; 13(3):225-38.
- 23- Barekat F, Tavalae M, Deemeh MR, Bahreinian M, Azadi L, Abbasi H, et al. A preliminary study: N-acetyl-l-cysteine improves semen quality following varicocele. *Int J Fertil Steril*. 2016; 10(1):120-6.
- 24- Zhang L, Wang Y, Li Y, Li L, Xu S, Feng X, et al. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S)-releasing compounds: therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Front Pharmacol*. 2018; 9:1066.
- 25- Akbarian F, Tavalae M, Dattilio M, Nasr-Esfahani MH. Down-regulated expression of cystathionine β-synthase and cystathionine γ-lyase in varicocele, and infertile men: a case-control study. *Cell J*. 2022; 24(4):176-181.
- 26- Shiasi A, Tavalae M, Monajemi R, M D, Nasr-Esfahani MH. Impact of varicocele on the expression of testicular enzymes involved in the transsulfuration pathway. *Int J Fertil Steril*. 2025; 19(1):80-87.
- 27- National research council (US) subcommittee on laboratory animal nutrition. Nutrient requirements of laboratory animals: Fourth revised edition. Washington (DC): national academies press (US); 1995.
- 28- Turner TT. The study of varicocele through the use of animal models. *Hum Reprod Update*. 2001; 7(1):78-84.
- 29- Molina AM, Moyano MR, Serrano-Rodriguez JM, Ayala N, Lora AJ, Serrano-Caballero JM. Analyses of anaesthesia with ketamine combined with different sedatives in rats. *Vet Med*. 2015; 60(7).
- 30- Razi M, Sadrkhanloo RA, Malekinejad H, Sarafzadeh-Rezaei F. Varicocele time-dependently affects DNA integrity of sperm cells: evidence for lower in vitro fertilization rate in varicocele-positive rats. *Int J Fertil Steril*. 2011; 5(3):174-85.
- 31- Suidasari S, Urugami S, Yanaka N, Kato N. Dietary vitamin B6 modulates the gene expression of myokines, Nrf2-related factors, myogenin and HSP60 in the skeletal muscle of rats. *Exp Ther Med*. 2017; 14(4):3239-3246.
- 32- Kalender S, Apaydin FG, Kalender Y. Testicular toxicity of orally administered bisphenol a in rats and protective role of taurine and curcumin. *Pak J Pharm Sci*. 2019; 32(3):1043-1047.
- 33- Omar HE, Abd-elghafar SK, Fiedan IO, Ahmed EA. L-cysteine ameliorated testicular toxicity induced by acrylamide in rats. *Eur J Biol Res*. 2015; 5(2):1-8.
- 34- Shi M, Sekulovski N, MacLean JA, Hayashi K. Effects of bisphenol a analogues on reproductive functions in mice. *Reprod Toxicol*. 2017; 73:280-291.
- 35- Razi M, Sadrkhanloo RA, Malekinejad H, Sarrafzadeh-Rezaei F. Testicular biohistochemical alterations following experimental varicocele in rats. *Iran J Reprod Med*. 2012; 10(3):209-18.
- 36- Razi M, Sadrkhanloo RA, Malekinejad H, Sarafzadeh-Rezaei F. Varicocele time-dependently affects DNA integrity of sperm cells: evidence for lower in vitro fertilization rate in varicocele-positive rats. *Int J Fertil Steril*. 2011 Oct;5(3):174-185.
- 37- Rezaie Agdam H, Razi M, Amniattalab A, Malekinejad H, Molavi M. Co-administration of vitamin E and testosterone attenuates the atrazine-induced toxic effects on sperm quality and testes in rats. *Cell J*. 2017; 19(2):292-305.
- 38- Taghizabet N, Mangoli E, Anbari F, Masoodi SA, Talebi AR, Mazrooei M. The effect of heracleum persicum (Golpar) oil and alcoholic extracts on sperm parameters and chromatin quality in mice. *Int J Reprod Biomed*. 2016; 14(6):365-70.
- 39- Afiyani AA, Deemeh MR, Tavalae M, Razi M, Bahadorani M, Shokrollahi B, et al. Evaluation of heat-shock protein A2 (HSPA2) in male rats before and after varicocele induction. *Mol Reprod Dev*. 2014; 81(8):766-76.
- 40- Aitken RJ, Wingate JK, De Iuliis GN, McLaughlin EA. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. *Mol Hum Reprod*. 2007; 13(4):203-11.



- 41- Dang-Cong T, Nguyen-Thanh T. Testicular Histopathology and Spermatogenesis in Mice with Scrotal Heat Stress [Internet]. *Male Reproductive Anatomy*. IntechOpen; 2022. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.99814>
- 42- Kurien BT, Scofield RH. Western blotting: an introduction. *Methods Mol Biol*. 2015; 1312:17-30.
- 43- Cho CL, Esteves SC, Agarwal A. Novel insights into the pathophysiology of varicocele and its association with reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. *Asian J Androl*. 2016; 18(2):186-93.
- 44- Shaygannia E, Nasr-Esfahani MH, Sotoodehnejadnematlahi F, Parivar K. Is ferroptosis involved in ROS-induced testicular lesions in a varicocele rat model? *Basic Clin Androl*. 2021; 31(1):10.
- 45- Shafie A, Kianian F, Ashabi G, Kadkhodae M, Ranjbaran M, Hajiaqaei M, et al. Beneficial effects of combination therapy with testosterone and hydrogen sulfide by reducing oxidative stress and apoptosis: Rat experimental varicocele model. *Int J Reprod Biomed*. 2022 ; 20(11):941-954.
- 46- Micheli L, Cerretani D, Collodel G, Menchiari A, Moltoni L, Fiaschi AI, et al. Evaluation of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in seminal plasma of men with genitourinary infections, varicocele and idiopathic infertility. *Andrology*. 2016; 4(3):456-64.
- 47- Micheli L, Cerretani D, Collodel G, Menchiari A, Moltoni L, Fiaschi AI, et al. Evaluation of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in seminal plasma of men with genitourinary infections, varicocele and idiopathic infertility. *Andrology*. 2016; 4(3):456-64.
- 48- Yang G, Zhao K, Ju Y, Mani S, Cao Q, Puukila S, et al. Hydrogen sulfide protects against cellular senescence via S-sulfhydration of Keap1 and activation of Nrf2. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 18(15):1906-19.
- 49- Kalhan SC, Marczewski SE. Methionine, homocysteine, one carbon metabolism and fetal growth. *Rev Endocr Metab Disord*. 2012; 13(2):109-19.
- 50- Johansson M, Van Guelpen B, Vollset SE, Hulthdin J, Bergh A, Key T, et al. One-carbon metabolism and prostate cancer risk: prospective investigation of seven circulating B vitamins and metabolites. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18(5):1538-43.
- 51- Singh S, Padovani D, Leslie RA, Chiku T, Banerjee R. Relative contributions of cystathionine beta-synthase and gamma-cystathionase to H<sub>2</sub>S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions. *J Biol Chem*. 2009; 284(33):22457-22466.
- 52- Yang J, Minkler P, Grove D, Wang R, Willard B, Dweik R, et al. Non-enzymatic hydrogen sulfide production from cysteine in blood is catalyzed by iron and vitamin B<sub>6</sub>. *Commun Biol*. 2019; 2:194.