مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
تابستان ۱۳۹۲؛۵(۲):۴۱۱-۴۱۸

Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
Summer2013;5(2): 411-418

مقاله پژوهشی

مکان یابی ایزوفرم اندوتلیالی آنزیم سنتزکننده نیتریک اکساید (eNOS) در بافت بیضه مردان مبتلا به آزواسپرمی انسدادی

*معرفت غفاری نوین[۱]، فرهنگ عابد[۲]، فاطمه کیانی[۳]، خدیجه فوقی[۴]**

[۱]عضو هیات علمی مرکز تحقیقات بهداشت باروری و ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ، تهران، ایران
[۲]مرکز ناباروری صبوحی، بیمارستان مهدیه تهران. مرکز تحقیقات بهداشت باروری و ناباروی، تهران، ایران
[۳]کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۴]عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، دانشکده پزشکی، دپارتمان علوم تشریحی، تهران، ایران
نویسنده مسئول: عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، دانشکده پزشکی، دپارتمان علوم تشریحی
پست الکترونیک: alashtlake@gmail.com

وصول: ۹۲/۲/۲ اصلاح: ۹۲/۴/۱۹ پذیرش: ۹۲/۶/۱۶

چکیده

زمینه وهدف: *یکی از علت های ناباروری با علل مردانه آزواسپرمی انسدادی می باشد که این اختلال جزء اختلالات پس بیضوی (post testicular) می باشد. طبق مطالعات مشابهی که قبلا صورت پذیرفت بیماران آزواسپرمی مقادیر متفاوتی از بیان آنزیم eNOS را از خود نشان می دهند. به همین دلیل بر آن شدیم که به بررسی بیان آنزیم eNOS در بیماران آزواسپرمی انسدادی بپردازیم.*

مواد و روش کار: *در این مطالعه موردی –شاهدی تعداد ۱۰ نفر درگروه آزواسپرمی انسدادی و ۷ نفر در گروه کنترل (از مردان بارور) که جهت درمان و یا تشخیص ناباروری به مراکز نازایی مراجعه نمودند وارد مطالعه شدند. ضمن کسب رضایت نامه کتبی از هر دوگروه تحت عمل بیوپسی بیضه قرارگرفتند. سپس نمونه ها به روش ایمونوهیستوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته ها: *آنزیم eNOS در سلول های لایدیگ و سلول های سرتولی در ه ردو گروه بیان شدند ولی در سلول های زایای نرمال دیده نشد. تنها تفاوت بارز بیان آنزیم eNOS در سلول های سرتولی بوده است که این بیان در گروه انسدادی بیشتر از کنترل بوده است. این نتایج ازلحاظ آماری معنی داربوده است (P<۰/۰۰۱)*

نتیجه گیری: *سلول های سرتولی و ارتباط متقابل این سلول ها با سلول های زایای توبول سمی نیفر احتمالا نقش بالقوه مهمی را در کیفیت اسپرم و نهایتا وقوع یک باروری موفق برعهده دارد.*

واژه های کلیدی: آزواسپرمی انسدادی، نیتریک اکساید، eNOS، ایمونوهیستوشیمی

مقدمه

طبق آمار جهانی حدود ۱۰ الی ۱۵ ٪ زوجین دارای مشکلات ناباروری می باشند [۱]. ناباروری به علت مردانه حدود نیمی از علل ناباروری را به خود اختصاص داده است [۱،۲]. یکی از علت های ناباروری مردانه آزواسپرمی است [۲]. آزواسپرمی به وضعیتی درمردان اطلاق می گردد که در مایع سمینال سانترفیوژشده هیچ اسپرمی یافت نشود [۳] آزواسپرمی به دو گروه کلی انسدادی وغیرانسدادی تقسیم می شود [۴]. در آزواسپرمی انسدادی در طول مسیر حرکت اسپرم از بیضه تا انزال انسداد به صورت فیزیکی وجوددارد ولی اسپرماتوژنزیس طبیعی است در حالیکه در آزواسپرمی غیرانسدادی بیمار با کاهش یا فقدان اسپرماتوژنزیس در بیضه مواجه شده ونقص شدید بیضوی وجوددارد. آزواسپرمی انسدادی می تواند در اثر بیماری زایی اپی دیدیمی، وازال و یا مجارای انزالی ایجاد گردد. یکی از شایع ترین علل انسداد وازال وازکتومی است. از دیگر علل شایع در بروز آزواسپرمی انسدادی می توان به عفونت های سیستم ادراری- تناسلی، جراحت های

اسکروتال واینگوئینال در طی جراحی و عوامل ژنتیکی و یا واریکوسل اشاره نمود [۵]. اخیرا دانشمندان نقش نیتریک اکساید را نیز به عنوان عامل احتمالی دخیل در آزواسپرمی انسدادی دانسته اند [۶] این مولکول از تبدیل اسیدامینه L-arginine به واسطه یکسری کوفاکتورها و آنزیم سنتزکننده نیتریک اکساید [1] به L-citruline و نیتریک اکساید تبدیل می گردد [۷]. تا به حال سه ایزوفرم NOS به نام های نورونی- اندوتلیالی و القائی شناسایی و تخلیص شده است [۷]. در میان ایزوفرم های NOSایزوفرم اندوتلیالی آنزیم سنتزکننده نیتریک اکساید وابسته به کلسیم داخل سلولی است [۸،۹] مطالعات اخیر پیشنهاد می کند که نیتریک اکساید در دستگاه فیزیولوژی مردانه نقش های فیزیولوژیکی مختلفی از قبیل عملکرد نعوظی، ترشح آندروژن، حرکت اسپرم، بلوغ اسپرم، کیفیت اسپرم، ظرفیت یابی اسپرم، اتصال تخمک به اسپرم را ایفا می کند [۱۰]. مکان یابی این مولکول در بافت بیضه ، اپی دیدیم، پروستات وسمینال وزیکول نقش این مولکول را در برقراری تعادل عروقی و در اسپرماتوژنزیس و بلوغ اسپرم پیشنهاد می کند [۱۰-۸] سیستم های تولیدمثلی با استفاده ازروش های ایمونوهیستوشیمی آنزیم eNOS مطالعات اخیر پیشنهاد می کند بیان این آنزیم نقش مهم بالقوه ای را در بافت های اپی دیدیم، پروستات، کیسه های سمینال، و همچنین بافت بیضه موش و انسان ایفا می کند [۱۱]. در بافت بیضه آنزیم eNOS در سلول های مختلف بافت بیضه نرمال انسان ازقبیل سلول های اندوتلیال بافت بیضه، در سلول لایدیگ، در سلول های سرتولی، میوفیبروبلاست های اطراف توبول سمی نیفرمکان یابی شده است [۷،۱۰]. در صورتی که بیان این آنزیم در سلول های مختلف بافت بیضه مردان مبتلا به آزواسپرمی انسدادی بررسی نشده است. لذا در این مطالعه به منظوربررسی بررسی بیان و نقش انزیم eNOS در بیماران آزواسپرمی انسدادی به بررسی مکان یابی آنزیم eNOSدر بافت بیضه افراد گروه کنترل وبیماران با اختلال آزواسپرمی انسدادی قرارگرفتند.

رو ش کار

در این مطالعه موردی –شاهدی تعداد ۱۰ نفر از مردان مبتلا به آزواسپرمی انسدادی و ۷ نفر از مردان با بافت بیضه طبیعی مورد بررسی ایمونوهیستوشیمی قرار گرفتند. از این دو گروه پس از کسب مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و رضایت نامه کتبی از بیماران مبتلا نمونه برداری به روش بیوپسی بیضه [2] صورت پذیرفت. قابل ذکر می باشد که عمل بیوپسی بیضه در حین درمان و یا تشخیص برای انجام تکنیک های کمک باروری برای دسترسی به اسپرم انجام شده و خطری را متوجه بیمار ننمود.

ایمونوهیستوشیمی بافت ها:

روش به کار گرفته در این مطالعه بر اساس مطالعات قبلی انجام پذیرفت [۹]. پس از بیوپسی بافت بیضه و تشخیص نوع انسدادی آزواسپرمی (وجود اسپرم در نمونه بیوپسی شده و عدم وجود اسپرم در نمونه مایع سمینال بافت بیضه در محلول فیکساتیو بوئین و پس از ۴ ساعت در محلول فیکساتیو فرمالین ۱۰٪ برای بررسی ایمونوهیستوشیمی قرارداده شد.

مراحل انجام ایمونوهیستوشیمی:

۱.برش های ۵ میکرونی از بلوک های پارافینی بافت ها و قرار دادن بر روی لام های پوشش دار شده با Poly- L-Lysin.

2.پارافین زدایی.

۳.خنثی سازی پراکسیدازهای درون زاد [3] با استفاده از پراکسیدهیدروژن ۳ درصد و متانول (Merck Germany) به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی.

۳.بلوکه کردن آنتی بادی ها ی غیر اختصاصی با استفاده از سرم بزی[4] (DAKO Denmark).

۴. بلوکه کردن بیوتین های درون زاد [5] (Merck Germany) نیز با استفاده از محلول بلوک کننده بیوتین به مدت ۱۵ دقیقه.

۵.تیمار نمونه ها اطراف لام ها با استفاده ازآنتی بادی اولیه پلی کلونال خرگوشی ضد انسانی آنزیم eNOS (Rabbit

1 -Nitric oxide synthase (NOS)

2 -Testicular Biopsy
3 -Endogenous peroxidase
4- Goat serum
5 -Endogenous Biotin

Ab cam cat num≠ ab5589 anti human eNOS (USA) بارقت ۱:۵۰به مدت ۱ساعت در انکوباتور.

۶. شستشو

۷.تیمار با آنتی بادی ثانویه ضدخرگوشی بیوتینه (Goat anti rabbit/bitinated) (Ab cam cat num≠ab 6721USA) بارقت ۱:۲۰۰ به مدت ۱ ساعت در انکوباتور.

۸.شستشو

۹.تیمار باآنتی بادی ثالثیه (Straptividin /HRP(sigma (cat num ≠s 2341با رقت ۱:۲۰۰۰به مدت ۳۰ دقیقه

۱۰.مواجهه با ماده رنگی دی –آمینو بنزیدین (DAB)(DAKO Denmark)[1].

۱۱.نمونه کنترل منفی جهت تأئید کار به جای آنتی بادی اولیه با PBS شستشو گردید.

۱۲. نمونه کنترل مثبت خارجی از نمونه های جفت انسانی مادرانی که زایمان Full –term داشتند استفاده گردید.

در پایان نمونه ها ی مورد مطالعه که دارای کد های مخفی بودند توسط سه محقق مورد بررسی قرار گرفته و براساس شدت رنگ پذیری شدید (+++)، متوسط (++)، خفیف (+) و بدون واکنش (۰) نمره گذاری گردید [۹-۱۲].

روش آماری:

بررسی آماری نتایج حاصل از ایمونوهیستوشیمی دوگروه با استفاده از آزمون غیرپارامتری Kruscal wallis تجزیه تحلیل گردید.

یافته ها

سلول های لایدیگ ، سرتولی اسپرماتیدهای نابالغ که به نظر سلول های در حال آپوپتوزیس می باشند رنگ پذیری eNOS نشان دادند (تصاویر ۲ و ۱). در هر دو گروه سلول های زایای نرمال در اکثر توبول ها میانگین شدت رنگ پذیری صفر بود اما در برخی موارد توبول ها رنگ پذیری ضعیفی داشتند. سلول های لایدیگ در گروه آزواسپرمی انسدادی و گروه کنترل رنگ پذیری یکسانی داشته است (جدول۱) تنها تفاوت قابل ملاحظه رنگ پذیری سلول های سرتولی بوده که در گروه آ زواسپرمی انسدادی شدت رنگ پذیری بیشتری را نسبت به گروه کنترل داشته است (جدول ۲). سلول های زایای با هسته پیکنوتیک وهتروکرماتین که بیشتر به سلول های زایای در حال آپوپتوز شبیه است در گروه انسدادی و کنترل رنگ پذیری یکسانی داشته اند (تصویر ۲). علاوه بر سلول های در نظر گرفته شده فوق دیگر سلول ها مانند اندوتلیوم عروق خونی بیضوی و سلول های شبه عضلانی میوئید نیز درجاتی از رنگ پذیری eNOS رانشان داد (تصویر ۱ و ۲).

جدول۱

گروه /سلول	سلول لایدیگ	سلول سرتولی
گروه کنترل	++	+
گروه آزواسپرمی انسدادی	++	++

رنگ پذیری ایمونوهیستوشیمی آنزیمeNOS در نمونه های حاصل از بیوپسی بیضه درسلول های دو گروه انسدادی و کنترل: (۰: عدم رنگ پذیری +: رنگ پذیری ضعیف ++: رنگ پذیری با شدت متوسط +++: رنگ پذیری شدید). بیان eNos در سلول های سرتولی گروه آزو اسپرمی انسدادی اختلاف معنی داری با گروه کنترل نشان داد (P<۰/۰۰۱)

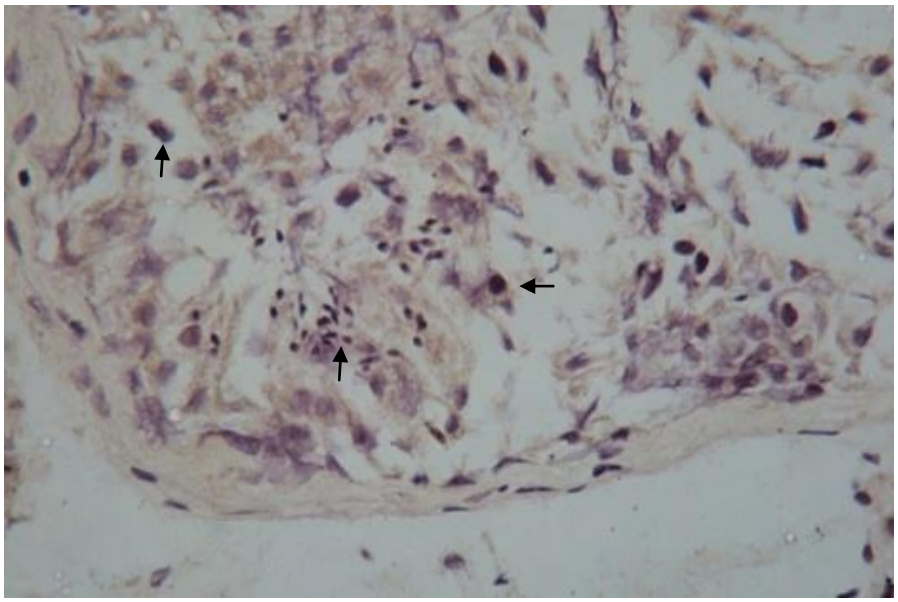
1 -3,3́ daiamno benzidine

جدول۲

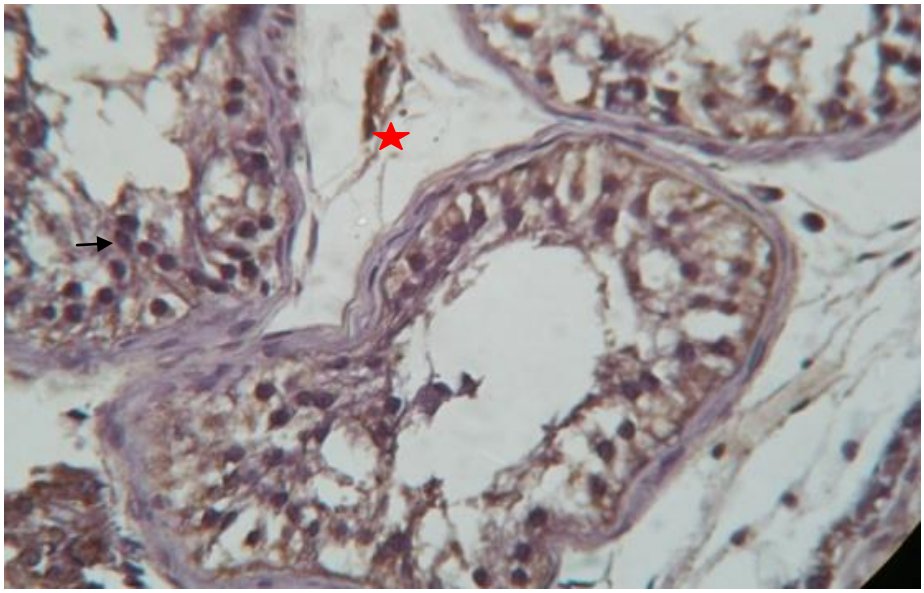
گروه/سلول	سیتوپلاسم اسپرماتیدنابالغ	سلول زایای طبیعی	سلول های زایای با هسته پیکنوتیک (ابنرمال)
گروه کنترل	+	۰	+
گروه آزواسپرمی انسدادی	+	۰	+

رنگ پذیری ایمونوهیستوشیمی آنزیم eNOS در نمونه های حاصل از بیوپسی بیضه درسلول های جنسی دوگروه انسدادی وکنترل :

(۰: عدم رنگ پذیری +: رنگ پذیری ضعیف ++: رنگ پذیری با شدت متوسط +++: رنگ پذیری شدید). اختلاف معنی داری در بیان eNOS نشان ندادند ($p>۰/۰۵$)



تصویر۱: رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی eNOS در گروه آزو اسپرمی. سلول های سرتولی (پیکان)، لیدیک (پیکان سفید، بالا وچپ) و رده اسپرماتوزوئید (نوک پیکان). بزرگنمایی40X



تصویر۲: رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیeNOS در گروه کنترل. سلول های سرتولی (پیکان)، دیواره عروق خونی(*) بزرگنمایی۴۰x

بحث

در مطالعه حاضر درمقایسه بیان آنزیم eNOS در افراد آزواسپرمی انسدادی و گروه کنترل با تغییرات زیادی مواجه نشده و به جز در سلول های سرتولی که افزایش بیان در گروه انسدادی وجود داشت در دیگر سلول ها این بیان نیمه کمی تقریبا مشابه بود. این در حالی است که در مطالعه ای که قبلا برروی بیماران آزواسپرمی غیرانسدادی انجام داده ایم این تغییرات بیان در کل سلول های بافت بیضه اعم از سلول های جنسی و غیرجنسی متفاوت بوده است [۱۵]. علت این امر احتمالا به این دلیل است که در افراد آزواسپرمی غیر انسدادی به دلیل نماهای مختلف هیستوپاتولوژی از توبول فیبروز تا هایپواسپرماتوژنزیس که نمایانگر نقص در فرایناسپرماتوژنزیس هستند میزان بیان پروتئین eNOS نسبت به گروه آزواسپرمی انسدادی که اسپرماتوزنزیس نرمال دارند در مقایسه با گروه کنترل تغییرات بیشتری داشته است. کیفیت بد اسپرم ها در بیماران آزواسپرمی انسدادی و موفقیت کم حاملگی پس از انسداد از طریق وازکتومی مشهود می باشد، به همین خاطر فاکتورهائی از قبیل اختلالات اپی دیدیمی، آنتی بادی های ضد اسپرم [1] و عوامل افزاینده این آنتی بادی ها مانند نیتریک اکساید می توانند در بروز اختلال آزواسپرمی انسدادی نقش مهم بالقوه ای را ایفا کنند [۱۱،۱۲] از طرفی افزایش میزان آنتی بادی های ضداسپرم در این بیماران همراه با افزایش در سطوح نیتریک اکساید می توان به این نتیجه رسید که در افراد با اختلال آزواسپرمی انسدادی این مولکول با افزایش تولید آنتی بادی ضداسپرم سبب اختلال در روند تولیدمثلی می گردند [۱۶]

پروتئین eNOS به وسیله روش های رنگ آمیزی های ایمونولوژیکی نشان داده شده است و دیده شده است که در سلول های زایای در حال تخریب در بیضه های رت های نرمال و کریپتورکیدیسم بیان این پروتئین صورت می پذیرد [۱۵، ۱۰] . بنابر این نیتریک اکساید ممکن است در

1 -Anti sperm Antibody

کنترل عملکرد بافت بیضه چه در شرایط نرمال و چه در شرایط پاتولوژیک نقش داشته باشد گزارشات زیادی توجه به درهم کنش بین سلول های سرتولی وزایا دارند [۱۶،۱۸،۲۱]. به همین طریق در همکنش [۱] بین سلول های زایا و سلول های سرتولی ممکن است بیان eNOS را نیز متأثر سازد. بنابراین می توانیم این طور استنباط کنیم، هنگامی که در توبول های سمی نیفر شاهد انواع سلول های زایا هستیم، شاهد بیان بیشتر آنزیم eNOS می باشیم. منطقی است در مواردی که بیماران از لحاظ هیستولوژی نرمال هستند مثل بیماران آزواسپرمی انسدادی و افراد گروه کنترل نسبت به حالت هیستوپاتولوژی در بیماران آزواسپرمی غیر انسدادی که نماهایی از کاهش سلول های زایا در توبول ها را دارند ، بیان سلول های سرتولی به همان اندازه بیشتر می شود [۱۶]. البته عملکرد نیتریک اکساید در سلول های سرتولی هنوز مشخص نشده است [۱۰]. اما با توجه به فرضیات و مطالب فوق نقش و عملکرد احتمالی آن می تواند تنظیم تکامل سلول های زایا باشد. اخیرا پیشنهادشده است که وجود eNOS درسلول های سرتولی با در همکنش بین سلول های زایا [۲۳] و آنزیم گاما گلوتامیل ترانس پپتیداز [۱۸] ارتباط دارد. این آنزیم انتقال اسیدهای آمینه را در غشاء پلاسمائی فعال کرده و سطح گلوتاتیون را تنظیم می کند [۲۴]. از طرفی NOS یک تنظیم کننده حیاتی و مهم در نفوذپذیری اپی تلیوم های متعدد [۲۳] بنابراین به احتمال قوی در اپی تلیوم توبول سمی نیفر نیز هم می تواند به عنوان یک تنظیم کننده ایفای نقش کند. همراه بودن ایزوفرم اندوتلیالی آنزیم سنتز کننده نیتریک اکساید با پروتئین هائی از قبیل اکلودین، اکتین، آلفا توبولین [۱] می تواند مؤید این مطلب باشد که درکنترل اتصالات محکم در بافت بیضه مؤثر است [۲۳]. مطالعات نشان داده که بیان eNOS در سلول های زایای در حال تخریب و آپوپتوتیک همراه بوده است اما بیان iNOS همراه با بقای سلول های زایای اپی تلیوم توبول های سمی نیفروس همراه می باشد [۲۴]

نیتریک اکساید حاصل از کاتالیز آنزیم اندوتلیالی نیتریک اکساید در سطوح پاتولوژیک بالاتر از(10^{-4}) مولار تخریب سلول های زایای اپی تلیوم توبول های سمی نیفر را از طریق آپوپتوز القا می کند. همواره آپوپتوزیس برای از بین بردن و حذف اسپرم های ناسالم نقش ایفا میکند و افزایش بیان آنزیم eNOS می تواند سبب تخریب غشائ میتوکندری در اسپرم و نهایتا آزاد سازی سیتوکروم C و به راه افتادن آبشار Caspase برای تحریک بیشتر فرایند آپوپتوزیس می باشد[۲۵،۲۶].

در این مطالعه بیان آنزیم eNOS در دو گروه مورد آزمایش شدت رنگ پذیری سلول های سوماتیک (لایدیگ وسرتولی) و جنسی (سلول زایای نرمال وابنرمال و اسپرماتید نابالغ) موردارزیابی قرارگرفت. تمامی سلول ها با درجاتی شدت رنگ پذیری ضعیف تا شدت بالا داشتند به جز سلول های زایای نرمال که تقریبا فاقدرنگ پذیری ایمونوهیستوشیمی بوده است. یافته های حاصل ازبررسی ایمونوهیستوشیمی نمونه های مورد مطالعه بانتایج حاصل از یافته های زینی [۲] و همکارانش [۹] در سال ۱۹۹۶که ایمونوهیستوشیمی eNOS را بر روی بافت بیضه واپی دیدیم و وازدفران در افراد سالم ا نجام دادند مطابقت دارد. این مقاله شاید تنها مقاله نزدیک با موضوع مورد مطالعه ما باشد. بااین وجود یکی از نقایص اصلی مطالعات زینی و همکارانش در این بررسی این بوده است که نمونه های کنترل آن ها افرادی بودند که درجاتی از نقائص اسپرماتوژنزیس راداشته و همچنین افرادی که هیپر تروفی خوش خیم پروستات [۳] داشتند وارد مطالعه شدند و به عبارتی در گروه کنترل افراد بافت بیضه سالم به معنای واقعی نمونه بافتی سالم نداشتند. در حالیکه در مطالعه حاضر افراد گروه کنترل شامل افرادی بودند که دارای اسپرماتوژنزیس کاملا نرمال وبافت بیضه سالم بوده و برای تشخیص ناباروی و یا دلایل دیگر (به عنوان مثال داشتن استرس در دادن نمونه) طبق صلاحدید پزشک اورولوژیست تحت عمل بیوپسی بیضه قرار گرفتند.

نتیجه گیری

هرچند که نیتریک اکساید آزاد شده از انواع مختلف آنزیم های سنتز کننده نیتریک اکساید [۴] در اپی تلیوم سمی

1 -interaction

2 -Zini
3 -Benign Prostate Hypertrophy(BPH)
4 -Nitric oxide synthase

نیفر وجوددارد اما به احتمال قوی این آنزیم eNOS است که تنظیم کننده اصلی فرایند اسپرماتوژنزیس می باشند. این فرضیه می تواند راه کارهای بالینی را در جهت استراتژی های درمانی برای جلوگیری از اختلالات آزواسپرمیایی وابسته به نیتریک اکساید داشته باشد.

تشکر و قدردانی

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

References

1. Irvine DS,Epidemilogy and etiology of male infertility, Human reprod,1998;1333-44 Review
2. Stanwell-Smith RE,Hendry WF,The prognosis of male subinfertility ,Br J Urol, 1984;56(4):422-428
3. Cesare Battaglia "et al", Interatesticular Doppler flow , seminal plasma nitrites/nitrates and nonobstructive sperm extraction from patients with obstructive and nonobstructive azospsermia, Fertility and Sterility 2001; 75 1088- 1093
4. Nistal M, Riestra ML,Paniagua R.Testicular biopsy in patients with azoospermia.Am J Surg Pathol 1999; 23 (12) : 1586-54
5. Ezeh UI,Moore HD, Cooke ID,Correlation of sperm extraction with morphological ,biophysical and endocrine profiles in men with azoospermia due to primary gonadal failure,Human Reprod 1998; 13(11) : 3066-74
6. Koji Shiraishi , Katu ssuke,Nitric oxide produced in the testis is involved in dilation of inernal spermatic veun that compromises spermatogenesis in infertile men with varicocele ,Bju.international 2006; (1086-1090)
7. Sejal B Doshi, Karishma Khullar, Rakesh K Sharma and Ashok Agarwal, Role of reactive nitrogen species in male infertility,reproductive biology and endocrinology 2012;10:109
8. M.Fujisawa A,K. Yamanaka, H, Tanaka,H. Okada, S. Arakawa and S.Kamidono, Expression of endothelial nitric oxide synthase in sertoli cells of men withinfertility of various causes ,BJU, 2001;.87 (85-8)
9. Zini A, O' Bryan MK, Magid MS, Shegel PN,Immuonohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis , Epididymis and vasdeferanes suggest a possible role for nitric oxide in spermatogenesis ,sperm maturation and programmed cell death,Biol Reprod 1996;55:935-41
10. Burnett AL,Richer DD, Chamness SL ,"et al", Localization of nitric oxide synthase in the reproductive of the male rat,Biol Reprod 1995 ; 52 :1-7
11. Moncada S, Palmwer RM,Higgs EA, Nitric oxide : Physiology , pathophysiology and pharmacology,Pharmacol Rev 1991; 43: 109-42
12. Scmmith HHW,Walter U,NO at work ,cell 1994; 78: 919-25
13. Le Magueresse B ,Jegou B.Possible nvolvement of germ cell in the regulation of estradiol -17β and ABP secretion by immature rat sertoli cells (in vitro studies),Biochem Biophys Res Commun 1986; 14 : 861-9
14. Nikki p,y.lee , c.yan cheng, Mitric oxide/nitric oxide systhase, spermatogenesis and Tight junction Dynamics, Biology of reproduction2003;pp(267-276)
15. Shaul ,DW,North ,A.J.,Wu,L.C.,Wells ,L.B,Brannon ,T.S., Lau,K.s ., Michel .T.,Endothelial nitric oxide synthase is expreesed in cultured human bronchiolar epithelium ,.J.clin.Invest 1994;vol 94 pp(2231-2236)
16. Middendorf R,Muller D, Wiches S,Holstein AF,Davidoff MS,Evidence for production and functional acticvity of nitric oxide in seminal tubules and blood vessels of human testis ,.J.clin Androl 1997;vol 82. Pp(4154-4161)
17. Del Punta K,Charreau EH,Pignataro OP,Nitric oxide inhibits Leydig cell Steroiogenesis,Endocrinology1996; vol 137 PP(5337-5343)
18. Tomomoto Ishikawa ,Yutaka Kondo,Kasumasa Goda and Msato Fujisawa ,Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in transgenic mice Accelerates Testicular Germ cell Apoptosis Induced by Exprimental Cryptorchidism,Journal of Andrology, 2005;vol26 pp(281-288)

19. Kang You Min , Zhang Jian , LIJIAN , Duan Xiang –Lin ,Expression of eNOS in rat tetes from infancy to maturity ,current zoology ;200349(3) 3339-45
20. Foghi,k,Ghaffarinovin,M,Madjd Jabbari ,Z,Najafi,T, HEIDARI, M., ROSTAMPOUR YASOORI, A.. Immuno-histochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in testicular cells of men with non-obstructive azoospermi, Iranian Journal of Reproductive Medicine, 2011; Vol 9, Num 4
21. Liao DL, Yu, LQ, Xin H;Exploration on the relationship between AbAs and NO level of infertile patients and on investigative Chinese and western medicine treatment; 2004, vol 24, NO4306-308
22. M. Murad Başar, Üçler Kisa, Devrim Tuğlu, Erdal Yilmaz, Halil Başar, Osman Çağlayan, and Ertan Batislam, Testicular Nitric Oxide and Thiobarbituric Acid Reactive Substances Levels in Obstructive Azoospermia: A Possible Role in Pathophysiology of Infertility,Mediators of inflammation 2006;page 1-5
23. Sejal B Doshi, Karishma Khullar, Rakesh K Sharma and Ashok Agarwal, Role of reactive nitrogen species in male infertility,reproductive biology and endocrinology 2012;10:109
24. Lee NP, Cheng CY: Nitric oxide/nitric oxide synthase, spermatogenesis, and tight junction dynamics, Biol Reprod 2004, 70:267–276
25. Makker K, Agarwal A, Sharma R: Oxidative stress & male infertility, Indian J Med Res 2009, 129:357–367
26. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS: Peroxynitrite: a cloaked oxidant from superoxide and nitric oxide, Chem Res Toxicol 1992, 5:834–842.

Original Article

Immuno-histochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in testicular cells of men with obstructive azoospermia

Marefat ghaffari novin[1], Farhang Abed[2],Fatemeh Kiani[3],Khadijeh Foghi[4]*

[1]faculty member of Infertility and Reproductive Health Research Center(IRHRC). Shahid Beheshti Univeristy of Medical Sciences.Tehran.Iran
[2]Sabohi infertility center, Mahdieh hospital. Infertility and Reproductive Health Research Center(IRHRC).Tehran.Iran
[3]Msc , Shahid Beheshti Univeristy of Medical Sciences,Tehran,Iran
[4]faculty member of north Khorasan University of Medical Sciences. Medicine school,Anatomical sciences Department, Tehran,Iran

***Corresponding Author**: North Khorasan University of Medical Sciences, Medicine school, ,Tehran,Iran
Email:alashtlake@gmail.com

Abstract

Background & Objectives*: Obstructive azoospermy is one of the cause of infertility in men which is classified as post testicular disorders. According to previous studies patients with azoospermia show deferent levels of eNOS enzyme.The aim of this study was to assess the eNOS enzyme expression in patients with azoospermia.*

Method and Materials*: In this case control study 10 patients with azoospermia and 7 healthy men referred to infertility center for treatment or diagnosis were studied. After filling consents the testicular biopsies were obtained and fixed*

Results: *Leydig and sertoli cells expressed eNOS ,but germinal normal cells did not expressed eNOS enzyme . Interestingly eNOS enzyme expression in case group showed significant level of difference in comparison with those of control(P<0.001).*

Conclusion*: according to the results of this study sertoli cells and their intractions with germinal cells of seminiferous tubule may play an important role in sperm quality and a successful fertilization.*

Keywords*: Immunohistochemestry, eNOS, Obstructive azoospermy ,Nitric oxide*

Submitted:2013 Apr 22
Revised:2013 July 10
Accepted:2013 Sep 7