ارتباط بین سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدانی تام و مالون دی آلدهید با کیفیت پارامترهای اسپرمی و میزان سلامت کروماتین در افراد نابارور آستنو تراتوزو اسپرمی

راحیل جنتی فر[۱]، زهرا ابراهیمی[۲]، حمید پیروزمنش[۳]، سیده سعیده صحرائی[۴]

چکیده

اختلال عملکرد اسپرم، حاصل از گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) یکی از علل اصلی ناباروری در مردان است که به پراکسیداسیون لیپیدی و تشکیل محصولات پراکسیداسیون پایدار مانند مالون دی آلدئید (MDA) در مایع سمینال منجر می‌شود. هدف از این مطالعه تعیین سطح دو علامت بیوشیمیایی استرس اکسیداتیو، ظرفیت آنتی اکسیدانی تام و مالون دی آلدئیداست.همچنین ارتباط آن‌ها با پارامترهای اسپرمی و سلامت کروماتین در افراد نابارور آستنوتراتوزواسپرمی از دیگر اهداف تحقیق است.

در این پژوهش که مطالعه موردی ـ شاهدی است، نمونه در دو گروه مردان بارور، ۵۰ نفر و نابارور آستنو تراتوزواسپرمی، ۵۰ نفر در مرکز درمان ناباروری قم جمع‌آوری و پارامترهای اسپرمی، بررسی میزان آسیب DNA و کمبود پروتامین و سطح TAC, MDA اندازه‌گیری شد. نتایج این تحقیق، درصد پارامترهای اسپرمی در افراد نابارور نسبت به افراد بارور را کم‌تر نشان می‌دهد. (P<۰/۰۵). همچنین میزان آسیب DNA و کمبود پروتامین بین دو گروه تفاوت معناداری را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵) . سطح TAC در افراد نابارور از افراد بارور کم‌تر بود و میزان MDA بالعکس به طور چشمگیری سطح بالاتری را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵). همچنین بین TAC و MDA با پارامترهای اسپرمی و آسیب DNA ارتباط معناداری وجود دارد.

۱. دانشجو دکتری تکوین، مدیر گروه پژوهشی بیولوژی تولیدمثل واحد تحقیقات جهاد دانشگاهی قم.

آدرس: قم، شهرک بنیاد، میدان ایثار، خیابان شبنم، مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری جهاد دانشگاهی .

E-mail: Rahiljanati۲۰۱٦@gmail.com

۲. متخصص زنان و زایمان و هیئت علمی مرکزفوق تخصصی درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم .

۳. کارشناس ارشد بخش آندرولوژی مرکزفوق تخصصی درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم.

٤.کارشناس ارشد گروه پژوهشی بیولوژی تولید مثل واحد تحقیقات جهاد دانشگاهی قم.

نتایج نشان می‌دهد که به دنبال کاهش سطح TAC و افزایش MDA ، کیفیت اسپرم کاهش و میزان آسیب DNA افزایش می‌یابد. بنابراین، ارزیابی وضعیت اکسیداتیو می‌تواند به عنوان ابزاری مفید برای تشخیص و درمان ناباروری مردان، به ویژه در ناباروری ایدیوپاتیک باشد.

واژه‌گان کلیدی: آسیبDNA ، آنتی اکسیدانی تام، مالون دی آلدهید، ناباروری ،آستنوتراتوز و اسپرمی.

مقدمه

امروزه رادیکال‌های آزاد اکسیژنی(ROS) در بسیاری از بیماری‌ها به عنوان عامل مخرب و آسیب رسان به سلول‌ها و بافت‌ها شناخته شده است.مطالعات بسیاری نشان می‌دهند که ROS ، با بیماری‌هایی مثل سرطان، بیماری‌های قلبی ـ عروقی، نفروپاتی دیابتی و حتی با فرآیندهایی نظیر پیری و ناباروری ارتباط دارد (۱و۲). مقادیر کم و کنترل‌شده ROS در فرآیندهای فیزیولوژیک سلول به عنوان پیک ثانویه شرکت دارد و در واقع مقادیر فیزیولوژیک آن، برای فعالیت‌های طبیعی سلول لازم و ضروری است (۳ ROS) و در اسپرم نیز نقش‌های فیزیولوژیک مختلفی را ایفا می‌کند. مقدار طبیعی و نرمال ROS در شرایط فیزیولوژیک برای فعالیت سلولی، از جمله ظرفیت‌پذیری، واکنش اکروزمی و لقاح ضروری به نظر می‌رسد؛ اما آثار پاتولوژیک ناشی از تولید بیش از حد آن در اسپرم و مایع سیمن کاهش تحرک، تعداد و مورفولوژی نرمال اسپرم‌ها و در نهایت آسیب DNAی اسپرم یا قطعه قطعه شدن DNA را موجب خواهد شد که دلیل القای ناباروری در بخش مهمی از مردان نابارور است (۴). اسپرماتوزوآ به دلیل حضور آنزیم NADPH اکسیداز و مقدار زیادی اسید چرب غیراشباع در غشای پلاسمایی و نیز به علت از دست دادن مقدار زیادی سیتوپلاسم به صورت قطرات سیتوپلاسمی در طول فرایند تکامل (که باعث کاهش مقدار آنتی اکسیدان‌های داخل سلولی می‌شود)؛ نسبت به شرایط استرس اکسیداتیو آسیب‌پذیر است (۵). در واقع افزایش پراکسیداسیون لیپیدی غشا و افزایش میزان مالون دی آلدهید کاهش تحرک اسپرم را در پی خواهد داشت (۶). آسیب DNAی ناشی از آثار مخرب رادیکال‌های آزاد اکسیژن، می‌تواند مهم‌ترین فاکتور دخیل در ناباروری مردان باشد (۷). اسپرم‌های نابالغ که دارای باقی‌مانده سیتوپلاسمی و سر غیرطبیعی هستند، نسبت به اسپرم‌های بالغ داری آسیبDNAی بیش‌تری هستند؛ به همین دلیل در نمونه‌های تراتو اسپرمی مشاهده شده است که آسیب DNAی ناشی از افزایش میزان ROS تولید شده از نمونه‌های طبیعی بیش‌تر است و می‌تواند علت ناباروری در افراد تراتوزواسپرمی باشد (۸). با توجه به این شواهد، محققان دریافتند یکی از دلایل اصلی ناباروری در افراد، تولید بیش از حد ROS و یا کاهش توانایی آنتی اکسیدانی در مایع منی است که شرایط استرس اکسیداتیو و در نهایت کاهش تحرک، افزایش مرگ و میر و آسیب DNA در اسپرماتوزوآ را موجب می‌شود (۹). سیستم‌های آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی، برای غلبه بر استرس اکسیداتیو و برقراری هموستازی سلولی وجود دارد. مولکول‌های آنتی اکسیدانی در برابر سمی‌بودن خود به خودی اکسیژن، پراکسیداسیون غشا و آثار مخرب آن از اسپرم محافظت می‌کنند (۱۰, ۱۱). مطالعات نشان می‌دهند که اسپرماتوزوا توسط آنتی اکسیدان‌های مختلف و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان موجود در مایع منی و یا خود اسپرماتوزوا، در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت می‌شوند. آنتی اکسیدان‌ها در آندرولوژی دارای نقش گسترده‌ای هستند. این ترکیبات موارد ذیل را باعث می‌شوند:

محافظت اسپرماتوزوا در برابر ROS تولید شده توسط اسپرماتوزوای غیرطبیعی، خنثی‌کردن ROS تولید شده توسط لکوسیت‌ها، ممانعت از قطعه قطعه‌شدن DNA، بهبود کیفیت مایع منی در افراد نابارور، کاهش آسیب سرما به اسپرماتوزوا، ممانعت از بلوغ اسپرم نابالغ و افزایش حرکت اسپرماتوزوا. آنتی اکسیدان‌ها موادی هستند که واکنش زنجیره‌ای اکسیداتیو را می‌شکنند و بدین وسیله استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهند (۱۲). مجموعه‌ای از آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی با وزن مولکولی پایین، تحت عنوان کلی «ظرفیت آنتی اکسیدانی تام» (TAC) هستند. این آنتی اکسیدان‌ها به عنوان جمع‌کننده‌های رادیکال‌های آزاد به عنوان محافظ در برابر ROS عمل می‌کنند و از آن‌جا که اسپرماتوزوآ حجم عمده‌ای از آنزیم‌های آنتی اکسیدانی خود را طی اسپرماتوژنز از دست می‌دهند، نسبت به آثار پاتولوژیک رادیکال‌های آزاد فوق‌العاده حساس هستند. لذا هر عاملی که باعث کاهش TAC شود، اسپرم را در برابر شرایط استرس اکسیداتیو آسیب‌پذیر خواهد کرد (۱۳, ۱۴). بنابراین، با توجه نقش مهم رادیکال‌های آزاد در ایجاد آسیب و اختلال در عملکرد اسپرم و ایجاد ناباروری مردان، به تأثیر مهم مالون‌دی‌آلدهید (MDA) و ظرفیت اکسیدانی تام (TAC) در محافظت از عملکرد اسپرم و سلامت کروماتین در افراد نابارور به بررسی رابطه بین سطح مالون‌دی‌آلدهید و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام در سیمن افراد نابارور آستنو-تراتوزواسپرمی و میزان آسیب DNA خواهیم پرداخت.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه حاضر، کاربردی است.پس از تأیید طرح در کمیته اخلاق جهاد دانشگاهی مشهد (با شناسه IR.ACECR.JDM.REC.۱۳۹۷/۰۰۵) نمونه‌های سیمن در قالب دو گروه، مردان بارور ۵۰ نفر (به عنوان گروه کنترل) و ۵۰ نفر افراد نابارور آستنوتراتو زواسپرمی، (به عنوان گروه آزمایشی)، در محدوده سنی ۲۰ ـ ۴۰ جمع‌آوری گردید. از افراد شرکت کننده در طرح، به دلیل استفاده از نمونه مایع منی آن‌ها، به صورت محرمانه رضایتنامه آگاهانه اخذ و اطلاعات ایشان نام، نام خانوادگی، سن، مدت زمان ازدواج دریافت شد. نمونه سیمن افراد، بعد از همسان سازی شرایط سنی در فاصله ۳-۵ روز پس از مقاربت جنسی جمع آوری شد. هر نمونه پس از ارسال به آزمایشگاه، مدت ۲۰ دقیقه برای مایع (Liquefaction) شدن در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت.سپس مایع منی بر اساس استانداردها و معیارهای سازمان بهداشت جهانی (۱۵)؛ به صورت دستی مورد ارزیابی قرار گرفت. بعد از آنالیز مایع منی، برای جداشدن پلاسمای منی از اسپرم‌ها نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور، سانتریفوژ گردید. مایع رویی حاوی پلاسما به میکروتیوپ‌های ۱/۵ منتقل و تا زمان اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

بررسی پارامترهای اسپرمی

جهت بررسی پارمترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی) با استفاده از میکروسکوپ نوری و بر اساس سازمان استاندارد جهانی (WHO۲۰۱۰) بررسی و اسپرم‌ها بر حسب میلیون بر لیتر توسط لام نئوبار شماره شد. میزان تحرک اسپرم‌ها بر اساس WHO به دو گروه حرکت پیشرونده، شامل (a+b) و حرکت غیر پیشرونده اندازه‌گیری شد. درصد تحرک کل اسپرمی باید از ٤٠% و حرکت پیشرونده باید از ۳۲% بالاتر باشد. برای بررسی مورفولوژی نرمال اسپرم‌ها از روش رنگ‌آمیزی پاپا نیکولا استفاده شد. در این روش رنگ‌آمیزی، اسپرم نرمال با محتوای سر بیضی شکل و اکروزوم، ٤٠% تا ۷۰% در ناحیه سر تعریف می‌شود. باید دقت کرد که ناحیه گردن و دم اسپرم نیز حالت طبیعی داشته باشد (۱۵).

بررسی میزان پراکندگی کروماتین اسپرم (SCD)

یکی از روش‌های بررسی قطعه قطعه شدن DNAی اسپرم با این روش است که باید بر روی نمونه تازه صورت گیرد. ابتدا آگارز استاندارد با غلظت ۰/٦٥درصد آماده می‌شود؛ یک لام لیبل دار به آگارز ذوب شده داخل و سپس خارج می‌شود تا یک لایه آگارز روی لام قرار گیرد و در ادامه در دمای محیط گذاشته می‌شود تا آگارز روی لام ببندد. با سمپلر ۷۰ میکرو لیتر آگارز با نقطه ذوب پایین درون یک میکروتیوپ ریخته می‌شود و سپس ۳۰ میکرو لیتر نمونه داخل میکروتیوپ ریخته می‌شود و در ادامه سپس آگارز با نقطه ذوب پایین با نمونه مخلوط شده؛ ۵۰ میکرولیتر از این مخلوط روی لام کوت شده با آگارز معمولی گذاشته و بعد برروی آن یک لام بزرگ (۲٤×٥۰mm) قرار داده و به مدت ٤ دقیقه در یخچال نگه داری می‌شود. سپس لام درون محلول HCl ۰/۰۸ نرمال، به مدت ۱۷ دقیقه در تاریکی قرار داده می‌شود. لام به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده می‌شود و سپس به منظور آبگیری آهسته از نمونه‌ها، لام‌ها در سری‌های الکل ۷۰%، ۹۰% و۱۰۰%، هر کدام به مدت ۲ دقیقه قرار داده می‌شود. سپس لام‌ها در دمای اتاق گذاشته می‌شوند تا خشک شوند. داخل یک لوله، رنگ رایت با محلولPBS به نسبت یک به یک مخلوط و سپس این مخلوط با سمپلر بر روی تمام لام ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه زمان داده می‌شود. پس از شست‌وشو با آب، لام برای آنالیز از نظر قطعه قطعه شدن DNA آماده شده است. لام آماده شده با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰X بررسی و تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش می‌شود و میزا ن سلول‌هایی که دچار قطعه قطعه شدن DNA شدند به صورت درصد بیان می‌شود.

بررسی کمبود پروتامین

میزان کمبود پروتامین اسپرم، با استفاده از رنگ کرومایسین A۳ مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور خلاصه، ابتدا مایع منی دوبار با محلول PBS شست‌وشو داده شد و سپس با فیکساتیو کارنوی(متانول و اسید استیک گلاسیال) به نسبت۳:۱ به مدت ۵ دقیقه در ٤ درجه سانتی گراد فیکس گردید. پس از تهیه اسمیر و خشک شدن در معرض هوا، هر اسلاید توسط ۱۰۰ میکرولیتر محلول کرومایسین A (CAM۳,Sigma) ۲۵/. میلی‌گرم در میلی‌لیتر بافر مک الوین(McIlvain Buffer) حاوی ۱۰ میلی مولار کلرید منیزیم، به مدت ۲۰دقیقه رنگ‌آمیزی شد. در ادمه لام‌ها در محلول بافر PBS دوبار شست‌وشو و توسط میکروسکوپ فلئورسنت با بزرگنمایی۱۰۰ بررسی شد. رنگ درخشان در ناحیه خلفی سر اسپرم نشانهٔ وجود اسپرم‌ها با کمبود پروتامین (CMA۳ مثبت) و رنگ زرد کمرنگ (CMA۳ منفی) گویای وجود پروتامین طبیعی در اسپرم است. در هر نمونه در حدود ۲۰۰ اسپرم شمارش گردید.

ارزیابی سطح MAD و TAC

ظرفیت TAC با استفاده از کیت‌های موجود در بازار (Wurttemberg Germany،Zell Bio GmbH) اندازه گیری شد. دامنه تشخیص، توسط - ELIZA میلی متر (۱۲۵-۲۰۰۰ میلی‌مول‌برلیتر) بود. سطح MAD توسط (Abnova CAT.N.KA۳۷۳٦, ELIZA Kit، Abnova Corporation، Taiwan) مورد سنجش قرار گرفت. دامنه ارزیابی سطح MDA (۰/۵ -۱۰ میلی مول بر لیتر) بود. طوج موج ٥۳٤ برای خوانش سطح MDA استفاده شد.

آنالیز آماری

داده‌ها با برنامه Independent t- test و نرم افزار SPSS تحلیل آماری شد. میانگین سطح MDA و TAC در هر دو گروه مطالعه به صورت Mean ± SD بیان و سطح معنادار از نظر آماری P<۰/۰۵ تعریف گردید.

یافته‌ها

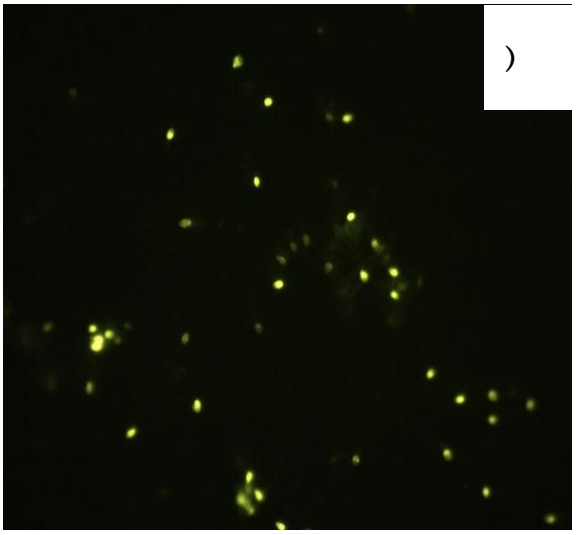
بررسی پارامترهای اسپرم

نتیجهٔ این پژوهش نشان می‌دهد که کیفیت پارامترهای اسپرم در افراد نابارور آستنو تراتوزو اسپرمی نسبت به افراد بارور پایین است (جدول ۱). در واقع تعداد اسپرم‌ها، میزان تحرّک و همچنین مورفولوژی اسپرم‌ها در افراد نابارور نسبت به افراد بارور، تفاوت معناداری نشان می‌دهد (P<۰/۰۵).

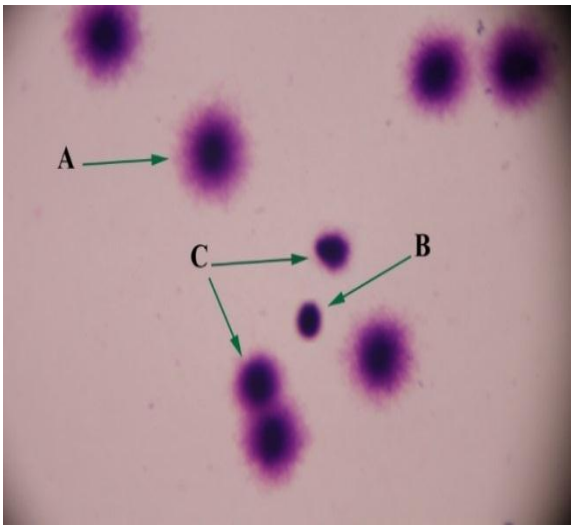
بررسی میزان پراکندگی کروماتین اسپرم

بررسی مقایسه میزان DNA fragmentation در افراد بارور و نابارور آستنوتراتو اسپرمی نشـان می‌دهـد کـه میـزان آسیب DNA در افراد نابارور نسبت به از افراد بارور به طور معناداری بیش‌تر می‌باشد (جدول ۱)، (شکل۱ الف).

بررسی میزان کمبود پروتامین که با روش رنگ آمیزی کرومایسین A۳ انجام گرفت نشان می‌دهد که تفـاوت در میزان پروتامین در افراد بارور و نابارور معنادار است و میزان CMA۳+ که نشان دهنده کمبـود پروتـامین اسـت در افراد نابارور از افراد بارور بیش‌تر می‌باشد (جدول۱)، (شکل۱ ب).



)



شکل ۱: الف) تست SCD برای بررسی میزان قطعه قطعه شدن DNAی اسپرم می‌باشد: A: اسپرم داری هالۀ بزرگ در اطراف سر خود می‌باشد؛ یعنی DNAی اسپرم سالم است؛ B: اسپرمی که هاله ندارد، بدین معنا که DNAی آن قطعه قطعه شده است؛ C: اسپرم دارای هاله متوسط داری قطعه قطعه شدن DNA می‌باشد. هرچه هالۀ ایجاد شده در اطراف سر اسپرم بزرگ‌تر باشد، DNA سالم‌تر است.

ب) تست کرومایسین۳A: این تست برای بررسی میزام کمبود پروتامین در اسپرم است. اسپرم‌ها با رنگ زرد فلئورسنت درخشان در ناحیه خلفی سر مثبت CMA۳+، گویای اسپرم‌ها با کمبود پروتامین است سر منفی حاکی از اسپرم‌ها با CMA۳- رنگ زرد کمرنگ پروتامین طبیعی است.

بررسی سطح MAD و TAC

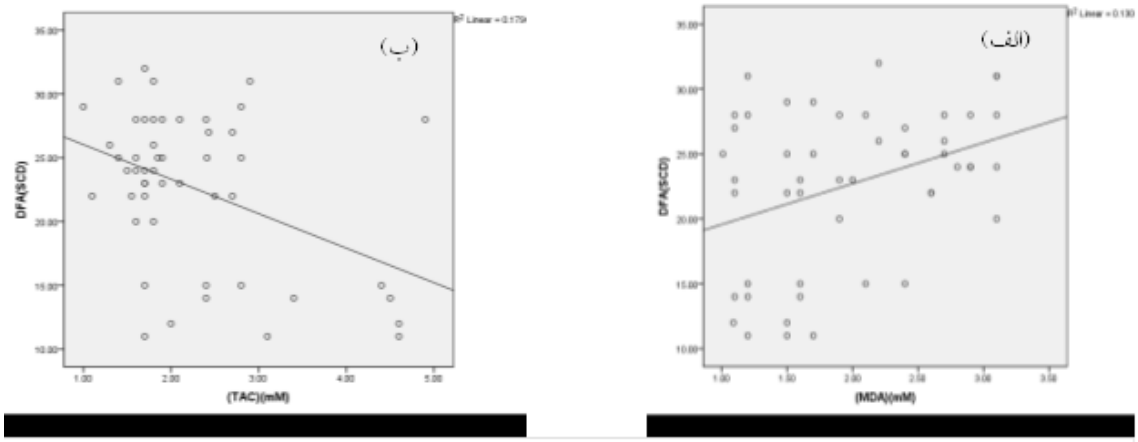
مقایسه سطح TAC در مایع سمینال افراد بارور و نابارور آستنو تراتوزو اسپرمی، تفـاوت قابـل ملاحظـه‌ای را نشـان می‌دهد. همان طور که در نمودار ۱مشاهده می‌شود، سطح TAC در افراد بارور از افراد نابارور بسیار بیش‌تـر اسـت

(P<۰/۰۵). نمودار۲ نشان می‌دهد که غلظت MDA در افراد بارور نسبت به افراد نابارور بسیار کم‌تر است و دارای تفاوت معنا داری است (P<۰/۰۵).

داده‌های این تحقیق نشان می‌دهد سطح TACی پلاسمای سمینال با میزان آسیب DNA دارای همبستگی معکوسی می‌باشد که از لحاظ آماری معنادار است (r=-.٤٢٣**,p<۰/۰۰۲). از طرفی میزان MDAی پلاسمای سمینال با میزان DNA fragmentation همبستگی یا ارتباط مستقیم دارد که از لحاظ آماری معنادار می‌باشد (r=.۳۶۰*,p<۰,۰۱) (نمودار ۳ الف و ب). در جدول۲ ارتباط بین TACوMDA با تحرک اسپرم و مورفولوژی اسپرم در افراد نابارور نشان داده شده است که معنادار است.

بحث

در جدول ۱ نتایج ارزیابی پارامترهای اسپرمی در افراد نابارور و مقایسه آن‌ها با پارامترهای اسپرمی افراد بارور نشان داده شده است. بر اساس جدول مذکور، بین میانگین پارامترهای اسپرمی بین افراد بارور و نابارور آستنو تراتوزو اسپرمی تفاوت معناداری وجود دارد. مطالعات مختلف نشان می‌دهند که هرچه کیفیت پارامترهای اسپرم پایین‌تر باشد، سلامت DNA هم با مشکلات بیش‌تری مواجه است. فاکتورهای مختلفی موجب آسیب DNA می‌گردند که از جمله آن‌ها می‌توان به استرس گرمایی، عدم جایگزینی پروتامین به جای هیستون، استرس اکسیداتیو و آپوپتوزیس اشاره کرد (۱۶).



نمودار ۳ الف: ارتباط و همبستگی بین میزان MDA و DNA fragmentation ب: ارتباط و همبستگی بین میزان TAC و DNA fragmentation

در مورد استرس گرمایی، "صالح" و همکاران (۱۷) با استفاده از روش SCSA، آسیب DNA را بررسی و گزارش کردند که افراد نابارور داری واریکوسل، دارای تعداد زیادی اسپرم با آسیب DNA هستند. همچنین بر اساس مطالعه‌ای، اکسیداسیون اسپرم توسط رادیکال‌های آزاد موجب قطعه قطعه‌شدن DNA گردیده و در ایجاد

ناباروری نقش داشته باشد (۱۸). در ساختمان مولکول DNAی سلول‌های بدن، از جمله اسپرم، رادیکال‌های آزاد می‌توانند اکسیداسیون بازهای پورین و پیریمدین ایجاد شکستگی در یک یا دو رشته، جایگاه‌های بدون باز، تشکیل پل‌های عرضی بین DNA و پروتئین و تغییر در قند دزاکسی ریبوز را ایجاد کنند. همچنین این رادیکال‌ها قادر هستند در ساختمان DNA تغییراتی را موجب شوند و ناباروری ایجاد کند (۱۹). در مقالات متعددی گزارش شده است، طی اسپرمیوژنز کروماتین اسپرم تحت بازسازی گسترده قرار می‌گیرد؛ به طوری که هیستون‌های کروماتین با پروتامین جایگزین و کروماتین متراکم می‌گردد. عدم تراکم کروماتین می‌تواند به قطعه قطعه شدنDNA اسپرم منجر گردد (۲۰) . مطالعات مختلف نشان می‌دهند که در مردان نابارور نسبت هیستون / پروتامین نسبت به افراد بارور بیش‌تر است. وجود نقص در نسبت هسیتون/ پروتامین باعث نقص در تراکم کروماتین اسپرم می‌شود که همین امر مستعد شدن DNAی اسپرم را در مقابل شرایط استرس اکسیداتیو به دنبال دارد (۲۱ و ۲۲).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که میزان آسیب DNA و درصد کمبود پروتامین در افراد نابارور آستنوتراتوزواسپرمی از افراد بارور به طور معناداری بیش‌تر است. اسپرم‌های دارای آسیب کروماتین، دارای پیامدهای ناخوشایندی بر روی نتایج کلینیکی و باروری هستند؛ به طوری که اخیراً در یک متاآنالیز مشخص شده است بین افزایش آسیب DNAی اسپرم و کاهش میزان تولد زنده نوزادان پس از استفاده از تکنیک‌های کمک باروری ارتباط معناداری وجود دارد؛ بدین معنا که افزایش میزان آسیب DNA در اسپرم، احتمالاً با افزایش در آسیب سقط جنین و کاهش نوزادان سالم همراه است (۲۳). در این مطالعه، میزان TAC و همچنین سطح MDA، به عنوان علامت به منظور تخمین شدت اکسیداتیو در مایه سمینال مردان بارور سالم و بیماران آستنوتراتوزو اسپرمی اندازه گیری شد. بر اساس نتایج این تحقیق، میانگین سطح پلاسمای TAC در مردان سالم تا حدود قابل ملاحظه‌ای از مردان نابارور بیش‌تر است ($P<۰/۰۵$). از طرفی، اندازه‌گیری سطح MDA، حاکی از آن است که شدت اکسیداسیون در مردان آستنو تراتوزواسپرمی به طور معناداری از مردان بارور بیش‌تر است ($P<۰/۰۵$) که این یافته‌ها با مطالعه Fraczek و همکاران مشابه است و نشان می‌دهد که میزان سطح MDA پلاسمای سمینال در حالت پاتولوژیک، از جمله آستنو زواسپرمی از حالت نرمواسپرمی بالاتر است (۲۴). همچنین Koca و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که سطح TAC در مایع سمینال افراد نابارور آستنوزو اسپرمی نسبت به مردان بارور به طور معناداری پایین‌تر است و نیز بین TAC و میزان تحرک اسپرم همبستگی مثبتی گزارش کردند (۲۵). داده‌های این مطالعه نیز این تحقیق را تأیید می‌کند؛ به طوری که میزان TAC در افراد نابارور آستنو تراتوزو اسپرمی نسبت به افراد بارور، به طور چشمگیری پایین‌تر بود.

مطالعات نشان می‌دهند که محصولات آلدهیدی، از جمله MDA می‌تواند از طریق واکنش‌پذیری با گروه تیول در پروتئین‌ها به طور کوالانسی به آن‌ها متصل گردند و عملکرد پروتئین را تغییر دهند. آن‌ها همچنین می‌توانند از طریق رادیکال‌های الکوسیل و پراکسیل اکسیداسیون بازهای DNA و آسیب به DNA اسپرم را موجب شوند (۲۶ و ۲۷). در این مطالعه بین سطح MDA در مایع سمینال و میزان آسیب DNA ارتباط مثبتی ملاحظه می‌شود که گویای شدت اکسیداتیو و آسیب پذیری DNA در مردان نابارور است (۲۸). همچنین نتیجه این تحقیق، بین TACو MAD، با پارامترهای اسپرم (تحرک، مورفولوژی) و نیز میزان آسیب DNAی اسپرم ارتباط خاصی را نشان می‌دهد. در واقع می‌توان نتیجه گرفت که کاهش سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، DNAی اسپرم را آسیب‌پذیر می‌کند و از آن‌جا که حجم عمده‌ای از آنتی اکسیدان‌های سیتوپلاسمی اسپرم، طی اسپرماتوژنز تخلیه می‌شود، نسبت به آثار پاتولوژیک رادیکال‌های آزاد فوق العاده حساس هستند (۱۳). مطالعات Orello و همکارانش نشان می‌دهد که بین کاهش ظرفیت تام آنتی اکسیدان پلاسمای سمینال TAC، با کاهش کیفیت اسپرم ارتباط نزدیکی وجود دارد (۲۹). به علت تولید بیش از حد ROS ، آسیب ایجاد شده در غشای اسپرم به کاهش تحرک اسپرم، غیرفعال شدن آنزیم‌های گلیکولیتیک و آسیب غشای آکرزومی، اکسیدشدن DNA و در نهایت به ناتوانی اسپرم در باروری تخمک و ایجاد بارداری موفق منجر می‌شود (۳۰).

به طور خلاصه، طی تحقیقات صورت گرفته و تحقیق حاضر، این احتمال وجود دارد که در مردان نابارور، آستنو تراتوزو اسپرمی، کاهش میزان سطح ظرفیت تام آنتی اکسیدان مایع سمینال (TAC) و افزایش محصولات آلدئیدی پایدار پراکسیداسیون لیپیدی، از قبیل مالون دی آلدئید (MDA) و نیز کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی را به دنبال دارد. همچنین میزان آسیب‌پذیری DNA افزایش می‌یابد. این نتایج، استفاده از آنتی اکسیدان‌ها را برای بهبود پارامترهای اسپرم در مردان نابارور پیشنهاد می‌دهد.

References

.۱ Cui X. Reactive oxygen species: the achilles' heel of cancer cells? : Mary Ann Liebert, Inc. ۱٤۰ Huguenot Street, ۳rd Floor New Rochelle, NY ۱۰۸۰۱ USA; ۲۰۱۲.

.۲ Yang H, Jin X, Lam CWK, Yan S-K. Oxidative stress and diabetes mellitus. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. ۲۰۱۱;٤۹(۱۱):۱۷۷۳-۸۲.

.۳ Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. Nutrition reviews. ۲۰۱۲;۷۰(٥):۲٥۷-٦٥.

.٤ Aitken RJ. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage .Molecular reproduction and development. ۲۰۱۷;۸٤(۱۰):۱۰۳۹-٥۲.

.٥ Aitken RJ, Gibb Z, Baker MA, Drevet J, Gharagozloo P. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. Reproduction, Fertility and Development. ۲۰۱٦;۲۸(۲):۱-۱۰.

.٦ dos Santos Hamilton TR, de Castro LS, Delgado JC, de Assis PM, Siqueira AFP, Mendes CM, et al. Induced lipid peroxidation in ram sperm: semen profile, DNA fragmentation and antioxidant status. Reproduction. ۲۰۱٦:REP-۱٥-۰٤۰۳.

.۷ Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. BJU international. ۲۰۰٥;۹٥(٤):٥۰۳-۷.

.۸ Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Thomas Jr AJ, Sikka SC. Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced

by β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. Fertility and sterility. ۲۰۰۵;۸۳(۱):۹۵-۱۰۳.

.۹ Tvrdá E, Kňažická Z, Bárdos L, Massányi P, Lukáč N. Impact of oxidative stress on male fertility—a review. Acta Veterinaria Hungarica. ۲۰۱۱;۵۹(٤):٤٦٥-٨٤.

.۱۰ Agarwal A, Sekhon LH .The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. Human Fertility. ۲۰۱۰;۱۳(٤):۲۱۷-۲٥.

.۱۱ Gallardo JM. Evaluation of antioxidant system in normal semen. Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion. ۲۰۰۷;٥۹(۱):٤۲-۷.

.۱۲ Bansal AK, Bilaspuri G. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Veterinary Medicine International. ۲۰۱۱;۲۰۱۱.

.۱۳ Smith R, Vantman D, Ponce J, Escobar J, Lissi E. Andrology: Total antioxidant capacity of human seminal plasma. Human reproduction. ۱۹۹٦;۱۱(۸):۱٦٥٥-٦۰.

.۱٤ Maneesh M, Jayalekshmi H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. Indian Journal of Clinical Biochemistry. ۲۰۰٦;۲۱(۲):۸۰-۹.

.۱٥ Cooper TG ,Noonan E, Von Eckardstein S, Auger J, Baker H, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Human reproduction update. ۲۰۱۰;۱٦(۳):۲۳۱-٤٥.

.۱٦ Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A ,et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. Fertility and Sterility. ۲۰۰۳;۷۹:۱٥۹۷-٦۰٥.

.۱۷ Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas Jr AJ. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. Fertility and sterility. ۲۰۰۳;۸۰(٦):۱٤۳۱-٦.

.۱۸ Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. Fertility and sterility. ۱۹۹۷;٦۸(۳):٥۱۹-۲٤.

.۱۹ Rehman A, Jenner A, Halliwell B. [۳٦] Gas chromatography-mass spectrometry analysis of DNA: Optimization of protocols for isolation and analysis of DNA from human blood. Methods in enzymology. ۳۱۹: Elsevier; ۲۰۰۰. p. ٤۰۱-۱۷.

.۲۰ Tavalaee M, Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR. Etiology and evaluation of sperm chromatin anomalies. Int J Fertil Steril. ۲۰۰۸;۲(۱.(

.۲۱ Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M. Andrology: Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. Journal of assisted reproduction and genetics. ۲۰۰۱;۱۸(٤):۲۲۱-۷.

.۲۲ Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction. Current Opinion in Urology. ۲۰۰٦;۱٦۳٤,-٤۲۸:(٦)

.۲۳ Osman A, Alsomait H, Seshadri S, El-Toukhy T, Khalaf Y. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. Reproductive biomedicine online. ۲۰۱٥;۳۰(۲):۱۲۰-۷.

.۲٤ Fraczek M, Szkutnik D, Sanocka D, Kurpisz M. Peroxidation components of sperm lipid membranes in male infertility. Ginekologia polska. ۲۰۰۱;۷۲(۲):۷۳-۹.

.۲۵ Koca Y, Özdal Ö, Celik M, Ünal S, Balaban N. Antioxidant activity of seminal plasma in fertile and infertile men .Archives of andrology. ۲۰۰۳;٤۹(٥):۳٥٥-۹.

.۲٦ John Aitken R, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. Biology of reproduction. ۱۹۸۹;٤۱(۱):۱۸۳-۹۷.

.۲۷ Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. Journal of Biological Chemistry. ۲۰۰۳;۲۷۸(۳۳):۳۱٤۲٦-۳۳.

.۲۸ Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. ۲۰۰٥.

.۲۹ Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, et al. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. Human reproduction. ۲۰۰۱;۱٦(۹):۱۹۱۲-۲۱.

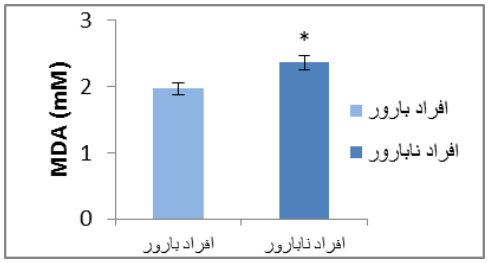
.۳۰ Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez M, Sharma R, Alvarez J, Thomas Jr A, et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. Human Reproduction. ۲۰۰۱;۱٦(۹):۱۹۲۲-۳۰.

پارامترهای اسپرم	افراد بارور	افراد نابارور	P value
تعداد اسپرم (10^6)	۹۰/۱۳±۱۱/۲۵	۵۰/۱٤± ۲٤/۸۵	P<۰/۰۵
درصد تحرک اسپرم	۵۲/..± ٤/۱٤	۳٤/ ٦۷±۹ /۵٤	P<۰/۰۵
درصد مورفولوژی غیر نرمال	۹۵/ ٦±۰/۲۲	۹۸/٦±./٤۲	P<۰/۰۵
درصد فراگمنتاسیون DNA	۱۲/ ٦٤±./۸۵	۳۱/۹۲±./۹٦	P<۰/۰۵
درصد کمبود پروتامین (CMA۳+)	٤٤/۸۷±۳/۵٦	۲۸/۰۰±۲/۰۹	P<۰/۰۵

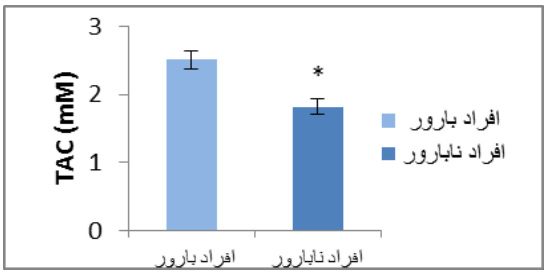
جدول۱ : مقایسه پارامترهای اسپرمی بین افراد بارور و نابارور آستنو تراتوزو اسپرمی

Correlations			
		(MDA)(mM)	(TAC)(mM)
Total Motility(%)	Pearson Correlation	-.۴۶۳**	.۵۹۸**
	Sig. (۲-tailed)	.۰۰۱	.۰۰۰
	N	۵۰	۵۰
Sperm Abnormalitiy(%)	Pearson Correlation	.۴۱۲**	-.۵۱۰**
	Sig. (۲-tailed)	.۰۰۳	.۰۰۰
	N	۵۰	۵۰

جدول۲: ارتباط بین TAC,MDAو میزان تحرک ، مورفولوژی اسپرم در افراد نابارور آستنو تراتوزو اسپرمی (P<۰/۰۵)



نمودار۲. بررسی سطح MDA در افراد بارور و نابارور آستنو تراتوزو اسپرمی (p<۰/۰۵).



نمودار۱. مقایسه سطح TAC بین افراد بارور و نابارور آستنو تراتوزو اسپرمی (p<۰/۰۵)

Correlation of Total Antioxidants Levels and with Sperm Parameters and Chromatin Malondialdehyde integrity in Asthenoteratozoospermia Men

Rahil jannatifar[۱]*, Zahra Ebrahimi[۲], Hamid piroozmanesh[۳], seyedeh Saeideh Sahraei[٤]

[۱] Department of Reproduction Biology, Academic Center for Education, Culture and Research, Qom Branch, Iran.

Abstract

Background and purpose: Sperm dysfunction caused by reactive oxygen species (ROSs) is one of the major causes of infertility in men, which leads to, lipid peroxidation (LPO) and the formation of stable peroxidation products like Malondialdehyde (MDA) in seminal plasma. MDA is effective factor in reducing fertility. The aim of this study is to determine two biochemical markers of oxidative stress; TAC and MDA, and correlation to sperm parameters and chromatin integrity at asthenoteratozoospermia men. Materials and methods: In this study, a case-control study was carried out in two groups of ۵۰ fertilized men and ۵۰ asthenoteratozoospermia men in Qom IVF center; Iran. Semen analysis was performed according to WHO (۲۰۱۰) guidelines. DNA damage, protamine deficiency and TAC, MDA levels in all patients were measured by kit methods, respectively. Results: According to our results, the percentage of sperm parameters in the infertile men were lower than the fertile men ($p < ۰,۰۵$). Also, there was a significant difference in DNA damage and protamine deficiency between the two groups ($p < ۰,۰۵$).

Lower TAC levels (۱,۸۲± ۰,۱۱ vs. ۲,۲۵ ± ۰,۱۳) and higher MDA levels (۲,۳٦ ± ۰,۰۹ vs. ۱,۹۷ ± ۰,۱۰) were observed in infertile men with asthenoteratozoospermia compared to fertile men.Conclusion: These results suggest that decreasing TAC and increasing MDA lead to low sperm parameters and high DNA integrity in sperm of asthenoteratozoospermia men. Therefore, evaluation of oxidative status and antioxidant defenses system may be as a useful tool for diagnosis and treatment of male infertility especially in idiopathic male infertility.

Keywords: DNA damage, Total antioxidant capacity, Malondialdehyde, Infertility, Asthenoteratozoospermia