فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال شانزدهم، شماره ۴، پاییز ۱۴۰۳ ص. ۴۳-۳۷

مقاله پژوهشی

بررسی تغییرات سطح اسفنگوزین و سرامیدها در نمونه‌های الیگوزواسپرمی از مردان نابارور

آتنا اکبری، فاطمه قاسمیان*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

* (نویسنده مسئول مکاتبات): Ghasemian@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۳

چکیده

مقدمه: الیگوزواسپرمی یکی از دلایل ناباروری در مردان است که براساس معیارهای سازمان جهانی بهداشت، با تعداد کم اسپرم در مقایسه با حالت نرموزواسپرمی همراه است. از طرفی اسفنگولیپیدها تنظیم کننده‌های مهم بسیاری از فرایندهای سلولی مانند تمایز و آپوپتوز سلول هستند. از مهمترین متابولیت‌های اسفنگولیپیدی می‌توان به سرامیدها و اسفنگوزین اشاره کرد که از بین رفتن حالت پایدار در میزان سرامید می‌تواند منجر به آپوپتوز شود. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات انواع مختلف سرامید و اسفنگوزین در نمونه‌های الیگوزواسپرمی از مردان نابارور است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه نمونه سیمن از زوج‌های مراجعه‌کننده به مرکز درمان ناباروری الزهرا، رشت جمع‌آوری شدند (n=۱۰). نمونه‌ها براساس پارامترهای سازمان جهانی بهداشت آنالیز شدند و گروه‌های الیگوزواسپرمی (اسپرم کمتر از ۱۵ میلیون در هر میلی لیتر سیمن) و نرموزواسپرمی وارد مطالعه شدند. مقدار انواع سرامیدها (Cer14, Cer16, Cer18 و Cer 20) و اسفنگوزین با استفاده از روش کروماتگرافی مایع با کارایی بالا اندازه گیری شد.

نتایج: یافته‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در مقدار اسفنگوزین در گروه الیگوزواسپرمی در مقایسه با نرموزواسپرمی وجود دارد ($p<۰/۰۵$). همچنین مقدار انواع سرامیدها در گروه الیگوزواسپرمی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش داشت ($p<۰/۰۰۰۱$).

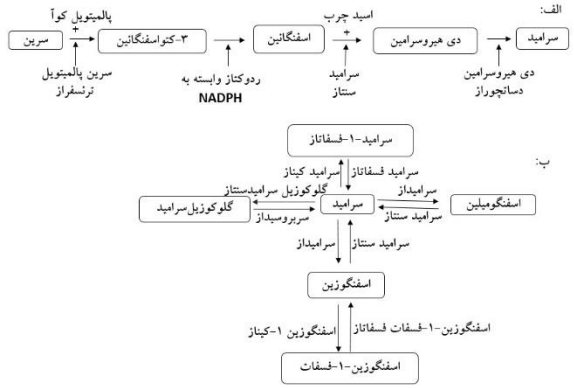
بحث و نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج نشان می‌دهد که متابولیت‌های اسفنگولیپیدی نقش بسیار مهمی در کمیت اسپرماتوژنز ایفا می‌کند و تغییرات در آن می‌تواند منجر به کاهش باروری در مردان شود. از این متابولیت‌ها می‌تواند معیار خوبی برای ارزیابی‌های باروری و همچنین اهداف دارویی قرار گیرند.

کلیدواژه‌ها: اسپرم، ناباروری مردان، سرامید، اسفنگوزین.

مقدمه

ناباروری یک مشکل تولیدمثلی رایج است و ناباروری مردانه حدود نیمی از دلایل آن را تشکیل می‌دهد [۱]. جمعیت معنی داری از موارد ناباروری مردانه با کیفیت غیرطبیعی سیمن همراه هستند که می‌توان به آستنوزواسپرمی، تراتوزواسپرمی، الیگوزواسپرمی و آزواسپرمی اشاره کرد [۱]. با این وجود الیگوزواسپرمی با تعداد کم اسپرم همراه است که منجر به ناباروری مردانه می‌شود. براساس معیارهای سازمان جهانی بهداشت (World Health Organization: WHO) نمونه‌های الیگوزواسپرمی دارای اسپرم هایی با مورفولوژی طبیعی (بیشتر از ۴ درصد) و تحرک طبیعی (بیشتر از ۳۹ درصد) هستند، اما تعداد اسپرم‌ها کمتر از ۱۵ میلیون در هر میلی لیتر منی است و به عنوان الیگوزواسپرمی شناخته می‌شوند [۲].

عمده‌ترین اسفنگولیپیدهای سلول‌های یوکاریوت، اسفنگوگلیکولیپیدها و اسفنگوفسفولیپید اسفنگومیلین هستند که نقش تاثیرگذاری در ساختمان و عملکرد غشای سلول دارند. به دلیل این که متابولیت‌هایشان مانند سرامیدها، بازهای اسفنگوبید و بازهای اسفنگوبید فسفریله شده به‌عنوان مهمترین پیام‌رسان‌های سیگنالینگ سلولی هستند، اینها به یکی از جذاب‌ترین موضوعات در چند دهه گذشته تبدیل شده‌اند [۳]. سرامیدها (Ceramide: Cer) یا N-آسیل اسفنگوزین، ساختار پایه ای و اساسی اسفنگولیپیدها هستند. در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است که سرامیدها در فرایندهایی مانند تمایز سلولی، استرس، سرکوب رشد، پیری و آپوپتوز درگیر هستند [۴]. اسفنگومیلین و سرامیدها عملکردهای بسیار متفاوتی را در جایگاه‌های مشخصی از سلول دارند، چونکه تغییرات در نسبت مولی شان منجر به تغییرات در خصوصیات فیزیکی غشا می‌شود و بنابراین منجر به تشکیل میکرودومین هایی می‌شود که وزیکوله شدن غشا، چسبندگی غشا، عبور و مرور وزیکول‌های و سایر جنبه‌های دینامیکی غشا را کنترل می‌کند [۴]. بنابراین اسفنگومیلین و سرامید لیپیدهایی با چندین عملکرد هستند، به طوریکه سرامید عمدتا در این عملکردها درگیر هستند که ممکن است به صورت ازنو (de novo) یا به وسیله اسفنگومیلینازهای خاصی سنتز شوند. مسیر متابولیک اسفنگولیپید سیستم پیچیده ای است که برای بقای سلول و پاسخ به سیگنال‌های استرس ضروری است [۵]. اسفنگولیپیدها از اسفنگوبید تشکیل می‌شوند و این لیپیدها و مشتقات آن عملکردهای متفاوتی در سلول دارند [۶]. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌کنید اسفنگوزین متابولیتی است که میتواند به سرامید یا اسفنگوزین ۱-فسفات تبدیل شود. چنانچه تعادل در میزان تولید این دو متابولیت به هم ریزد به ترتیب منجر به شروع فرایندهای آپوپتوز یا رشد سلول خواهند شد [۳]. از طرف دیگر، بیوسنتز ازنو اسفنگولیپیدهای طبیعی، همانند کاتابولیسم، چندین متابولیت تولید می‌کنند که مهمترین آنها سرامید است [۱]. بنابراین سطوح حالت پایدار سرامید در سلول‌ها ممکن است به وسیله مجموعه ای از آنزیم‌ها تولید شود که این آنزیم‌ها در جایگاه‌های مختلفی سنتز و پردازش می‌شوند.



شکل ۱. بخشی از مسیر متابولیسم اسفنگولیپیدها. سرامید میتواند سرنوشت متفاوتی داشته باشد. برهم خوردن تعادل در تولید و مصرف سرامید، منجر به شروع آپوپتوز می‌شود.

در بیضه پستانداران بالغ بارور، سلول‌های گرد اسپرماتوگونی در داخل لوله‌های منی‌ساز وجود دارد. این‌ها سلول‌های زایای اسپرماتوگونی هستند که در نهایت اسپرم‌های بالغ هاپلوبید را به وجود می‌آورند که تحت حمایت متابولیکی و ساختاری سلول‌های سرتولی هستند. در جریان اسپرماتوژنز نرمال، تعدادی از سلول‌های زایای در حال بلوغ دچار آپوپتوز می‌شوند [۴] و الیگوزواسپرمی را به وجود می‌آورد. Tilly و Kolesnick پیشنهاد کردند که سرامیدهای مشتق شده از اسفنگومیلین و اسفنگومیلین ۱- فسفات می‌توانند اثرات بالقوه‌ای بر فیزیولوژی گناد از طریق میانجی‌گری آپوپتوز و کنترلش در شرایط طبیعی و پاتولوژی داشته باشند، که با بررسی و اندازه‌گیری این متابولیت‌ها

در برش‌های لوله‌های منی‌ساز انسان نیز تایید شده است [۷]. تعادل بین تحریک و توقف رشد سلول در بیضه بالغ، یک تعادل ظریف بین بیوسنتز، بازسازی، کاتابولیسم و بازیافت لیپیدها (مانند اسفنگولیپیدها) را درگیر می‌کند. با این اوصاف هنوز نوع و میزان سرامید و اسفنگوزین در نمونه‌های سیمن افراد نابارور با جزئیات مشخص نشده است.

با توجه به بررسی‌های انجام شده، تاکنون مطالعه‌ای در زمینه تغییرات متابولیت‌های اسفنگولیپیدی در نمونه‌های سیمن از مردان نابارور انجام نشده است. از طرف دیگر، با توجه به اینکه ارتباط محکمی بین سرامید و فرایند آپوپتوز وجود دارد، این پس زمینه از فرایند آپوپتوز منجر به ایجاد یک هدف جهت بررسی تجربی در این مطالعه شد. به طوریکه هدف از این مطالعه اندازه گیری میزان انواع سرامیدها (C14, C16, C18, C20) و اسفنگوزین در نمونه‌های سیمن الیگوزواسپرمی و مقایسه آن با افراد نرموزواسپرمی است.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه

نمونه سیمن از زوج‌های مراجعه‌کننده به مرکز درمان ناباروری (IVF) جمع آوری شدند (n=۱۰). این افراد از میان زوج‌هایی که به مرکز درمان ناباروری بیمارستان الزهرا (گیلان، رشت) در طی سال‌های ۱۴۰۲ تا ۱۴۰۳ جهت درمان ناباروری مراجعه کرده بودند و تحت درمان کمک باروری قرار گرفتند، انتخاب شدند و رضایت کامل از این زوج‌ها بدست آمد. لازم به ذکر است که این مطالعه فقط بر زوج‌های نابارور با ناباروری فاکتور مردانه الیگوروزاسپرمی صورت گرفت و برخی از نمونه‌ها به دلیل مصرف داروهای هورمونی توسط مردان و یا وجود بیماری دیابت و/یا بیماری‌های تیروئیدی در مردان و سایر فاکتورهای ناباروری مردانه از مطالعه خارج شدند. میانگین سن مردان ۵± ۳۰/۸ سال است و هیچگونه تفاوت آماری در سن و ایندکس جرم بدن (Body Mass Index: BMI) این افراد وجود ندارد.

نمونه سیمن به روش انزال در یک ظرف استریل جمع‌آوری و در اختیار آزمایشگاه قرار گرفت (در همان روز برداشت تخمک). نمونه‌ها برای مدت ۶۰-۱۵ دقیقه بعد از انزال در دمای اتاق به حالت مایع و روان درآمدند و پارامترهای سیمن مطابق با معیارهای سازمان جهانی بهداشت (WHO, 2010) ارزیابی شدند. این معیارها عبارتند از ارزیابی حجم سیمن، pH، ویسکوزیته، غلظت اسپرم، تعداد کل اسپرم، مورفولوژی اسپرم، تحرک و وجود عفونت. بنابراین براساس ارزیابی‌ها، نمونه‌های سیمن به گروه‌های مختلف نرموزواسپرمی (غلظت اسپرم بالاتر از ۱۵ میلیون در هر میلی لیتر سیمن، مورفولوژی طبیعی بالاتر از ۴ درصد و تحرک بالاتر از ۳۲ درصد) و الیگوزواسپرمی (غلظت اسپرم کمتر از ۱۵ میلیون در هر میلی لیتر سیمن) تقسیم شدند [۲].

استخراج و آنالیز اسفنگوزین با استفاده از HPLC

لیپیدها با ۲ میلی‌لیتر کلروفرم/متانول (۱:۱، v/v) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق استخراج شدند و سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰g سانتریفیوژ شدند. ۱ میلی‌لیتر کلروفرم و ۰/۷۵ میلی‌لیتر از 0.73% NaCl به آن اضافه شد تا جداسازی فاز انجام شود و لایه پایینی کلروفرم جدا شد. فاز بالایی یک بار با ۱ میلی‌لیتر کلروفرم شسته شد و لایه‌های کلروفرم ترکیب شده به طور کامل تا حالت رسوب خشک تبخیر شدند. برای حل کردن مجدد، از ۰/۵ میلی‌لیتر NaOH ۰/۱ مولار آماده شده در متانول استفاده شد. لیپیدها برای ۳۰ دقیقه با افزودن ۲۵ میکرولیتر معرف o-فتالدهید (OPA) [۵ میلی‌گرم OPA، ۰/۱ میلی‌لیتر اتانول، ۵ میکرولیتر ۲- مرکاپتواتانول، و ۱۰ میلی‌لیتر اسید بوریک ۳% (وزنی/حجمی) با pH تنظیم شده به ۹] مشتق‌سازی شدند.

بازهای اسفینگوئیدی و لیزوگلیکوسفینگولیپیدها را با استفاده از سیستم HPLC جدا کردیم. فاز متحرک متانول/آب به نسبت ۸۸:۱۲ (vol/vol) بود. ما ترکیبات لیزو مشتق‌شده با OPA را با دتکتور فلورسانس در طول موج تحریک ۳۴۰ نانومتر و طول موج نشر ۴۳۵ نانومتر کمی‌سازی کردیم. شناسایی پیک بر اساس مقایسه زمان‌های بازداری انجام شد [۸ و ۹] و مقدار اسفنگوزین اندازه گیری شد.

استخراج و آنالیز سرامید با استفاده از HPLC

نمونه‌ها دو بار با بافر فسفات سالین (PBS) سرد شستشو داده شدند. نمونه‌ها فریز و ذوب شدند و سپس رسوب حاصل در آب

مقطر به وسیله سونیکاسیون همگن شدند. نمونه‌ها در ۸۰۰g سانتریفیوژ شدند. لیپیدها با استفاده از روش تقسیم بندی Folch با مخلوطی از کلروفرم- متانول (۲:۱، v/v) استخراج شدند. سپس در ۱۵۰۰g سانتریفیوژ شده و در نهایت با کلروفرم-متانول - آب (۴۷:۴۸:۴۷۳:۴۸:۳، v/v/v) شستشو داده شدند. فاز آلی تحت یک جریان ملایم نیتروژن خشک تبخیر شدند. نمونه‌ها مجددا با ۲۰۰ میلی لیتر از ترکیب اتانول-فرمیک اسید (۹۹/۸ : ۰/۲) ورتکس شدند تا کاملا حل شود.

کروماتوگراف مایع با کارایی بالا high-performance liquid chromatograph: (HPLC) یک دستگاه Unicam-crysta، سری ۲۰۰ است که مجهز به یک پمپ باینری، یک دگازور خلا، یک محفظه ستونی با دماکنترل و یک اتوسمپلر است. جداسازی‌های HPLC در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد بر روی ستون Nucleosil AB انجام شد. فاز متحرک یک مخلوط گرادیان بود که به صورت زیر تشکیل شده بود: A) آب - استونیتریل - ۲- پروپانول (v/v/v، ۱:۱:۸) و B) استونیتریل- ۲- پروپانول (v/v، ۱:۹). مراحل برنامه گرادیان به شرح زیر بودند: صفر دقیقه ۳۵:۶۵(A-B) ، ۲ دقیقه ۳۵:۶۵(A-B) ، ۷ دقیقه ۱۰:۹۰(A-B) ، ۱۳ دقیقه ۱۰:۹۰(A-B) ، ۱۵ دقیقه ۰:۱۰۰ (A-B)، ۱۶ دقیقه ۳۵:۶۵(A-B) ، ۱۸ دقیقه ۳۵:۶۵ (A-B) . فاز متحرک قبل از استفاده به مدت ۱۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک دگاز شد. نرخ جریان ۰/۴۵۰ میلی‌لیتر در دقیقه بود. حجم نمونه تزریقی ۶ میکرولیتر بود. محلول‌های استاندارد با حل کردن سرامید در مخلوطی از اتانول-اسید فرمیک (V/V، ۹۹/۸ : ۰/۲) تهیه شدند [۱۰] و مقدار انواع سرامیدهای C14, C16, C18 و C20 اندازه گیری شد.

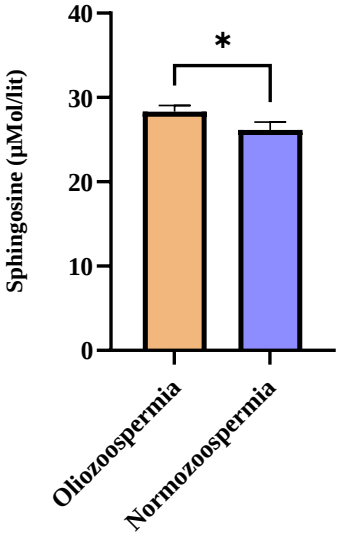
آنالیز آماری

جهت انجام آنالیزهای آماری از نرم افزار Graphpad prism 9 و برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت مقادیر از تست t-student استفاده شد. داده‌های همه‌ی گروه‌ها در سطح اطمینان ۹۵% (P<۰/۰۵) برای تعیین اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

میزان اسفنگوزین در نمونه‌های الیگوزواسپرمی

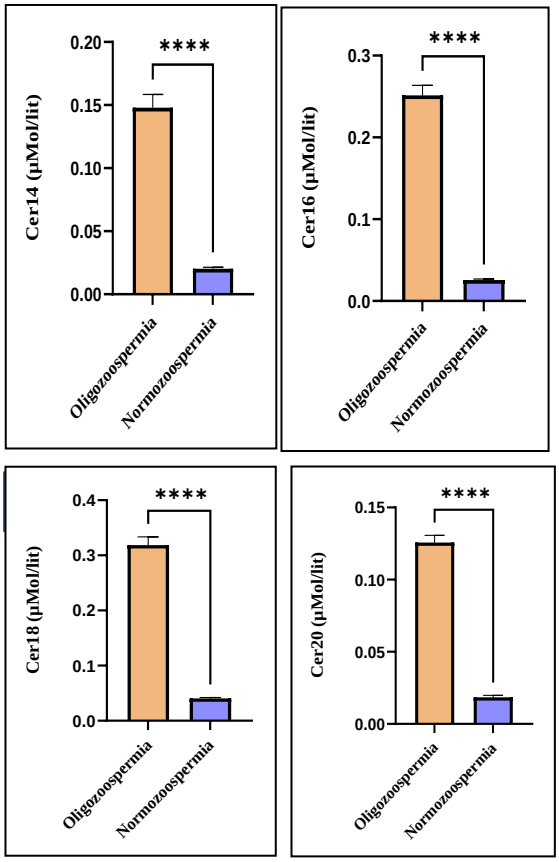
همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، میزان اسفنگوزین در نمونه‌های الیگوزواسپرمی و نرموزواسپرمی (گروه کنترل) به ترتیب ۲۶/۱۴ و ۲۸/۳ میکرومول/ لیتر است. آنالیز آماری اختلاف معنی داری را بین دو گروه نشان می‌دهد (P=/۰۳۷۱).



شکل ۲. میزان اسفنگوزین در نمونه‌های الیگوزواسپرمی و نرموزواسپرمی. نتایج تفاوت معنی داری را در میزان اسفنگوزین بین دو گروه نشان می‌دهد.
*P <۰/۰۵

میزان سرامیدها در نمونه‌های الیگوزواسپرمی

نتایج نشان می‌دهد (شکل ۳)، میزان Cer14 در گروه الیگوزواسپرمی در مقایسه با گروه کنترل (نرموزواسپرمی) افزایش معنی‌داری دارد (به ترتیب µMol/lit ۰/۱۴ و ۰/۰۲; P<۰/۰۰۰۱) (شکل ۳a). مقدار Cer16 نیز در گروه الیگوزواسپرمی در مقایسه با گروه نرموزواسپرمی تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد (به ترتیب µMol/lit ۰/۲۵ و ۰/۰۲، P<۰/۰۰۰۱) (شکل ۳b). ادامه آنالیز آماری، افزایش معنی داری را در مقدار Cer18 در گروه الیگوزواسپرمی (µMol/lit ۰/۳۱) در مقایسه با نرموزواسپرمی (µMol/lit ۰/۰۴) نشان می‌دهد (P<۰/۰۰۰۱) (شکل ۳c). اندازه‌گیری مقدار Cer20 در نمونه‌های الیگوزواسپرمی (µMol/lit ۰/۱۲) هم تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل (µMol/lit ۰/۰۱) نشان داد (P<۰/۰۰۰۱) (شکل ۳d).



شکل ۳. میزان انواع مختلف سرامید در نمونه‌های الیگوزواسپرمی و نرموزواسپرمی. نتایج تفاوت معنی‌داری را در مقادیر Cer14، Cer16، Cer18 و Cer20 در گروه الیگوزواسپرمی در مقایسه با نرموزواسپرمی نشان می‌دهد. $P<0/0001$ ****.

بحث

نتایج حاضر نشان می‌دهد که اسفنگوزین و سرامید نقش بسیار مهمی بر کمیت اسپرماتوژنز دارند. به طوریکه تغییرات این اسفنگولیپیدها نسبت به حالت طبیعی، منجر به کاهش تعداد اسپرم و الیگوزواسپرمی در مردان می‌شود و پتانسیل باروری را کاهش می‌دهد. از این میان تغییرات سرامیدها در میان نمونه‌های الیگوزواسپرمی بسیار زیاد نشان دادند.

مطالعات نشان داده است که در بافت‌های غیرعصبی، افزایش سرامید ۱۶ به دلیل آپوپتوز خواهد بود. اگرچه سرامید میتواند از اسفنگومیلین‌ها و به وسیله اسفنگومیلینازها ایجاد شود، اما سرامید میتوکندریایی با آپوپتوز همراه است و سرامید تولید شده در سایر قسمت‌های سلول بر این مکانیسم مرگ تاثیری ندارد [۱۱]. در مطالعه‌ای دیگری نشان داده شده است که میتوکندری‌ها از لوله‌های منی ساز موش صحرایی بالغ دارای سرامید و اسفنگومیلین است و اینها در مکانیسم‌های آپوپتوز درگیر نیستند [۱۲].

در حال حاضر بسیار سخت است که نتیجه‌گیری قطعی در ارتباط با نقش بیولوژیکی سرامیدهای ساده مانند سرامیدهای ۱۶ یا ۱۸ یا ۲۴ در موقعیت‌های فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی در بدن گرفته شود. با توجه به پیچیدگی‌های متابولیک، بیولوژی سلول و مسیرهای سیگنالینگ عمل کننده در سطوح مختلف‌شان در سلول، ارزیابی‌ها همچنان ادامه دارد. مقدار کلی سرامید در بیضه بیان کننده تعادل بین فرایندهای تولید و حذف سرامید است و منجر به ایجاد یک حالت پایدار از آنها در بیضه بالغ می‌شود. به نظر می‌رسد که هدف مهم این گونه‌های اسفنگولیپیدی ایجاد شده در بیضه‌ها این است که به تدریج و در نهایت به اجزای این گامت‌ها تبدیل شوند.

اسفنگولیپیدها به طور گسترده در غشای سلول بیان می‌شود و در تمایز، رشد و سیگنالینگ غشایی درگیر هستند. برای مثال گلیکواسفنگولیپیدهای GM1 در اسپرم‌ها و گلیکواسفنگولیپیدهای GM3 در سلول‌های سرتولی لوله‌های منی ساز وجود دارند. در مراحل اولیه اسپرم‌زایی، سرامید و اسفنگومیلین در مرحله اسپرماتوسیت ظاهر می‌شود و ترکیبات عمده ای از سر اسپرم پستانداران را تشکیل می‌دهد [۳]. تغییرات اسفنگولیپیدی در جریان اسپرم‌زایی نقش مهمی را در باروری مردان ایفا می‌کند. تحقیقات نشان داده است که اسفنگولیپیدها در تنظیم فرایندهای مختلف سلولی مانند تمایز، آپوپتوز و گامتوژنز درگیر هستند. بخصوص ساختارهای تخصصی شده اسفنگولیپیدها برای ثبات اتصالات بین سلولی در اسپرماتیدها و در نتیجه باروری مردان ضروری است. با این وجود، اسفنگولیپیدهایی مانند سرامید القا کننده آپوپتوز هستند و اسفنگوزین ۱-فسفات به عنوان فاکتور بقا عمل می‌کنند و برای محافظت سلول‌های زایا از مرگ سلولی القا شده با استرس‌های خارج سلولی ضروری هستند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که درگیری پیچیده‌ای از اسفنگولیپیدها در حفظ عملکردهای بیضه‌ای، گامتوژنز و حفاظت در مقابل آپوپتوز در جریان اسپرم‌زایی وجود دارد و بر اهمیت‌شان در سلامت باروری مردان تاکید می‌کند [۳].

سلول‌های اسپرماتوگونی که اساس اسپرماتوژنز هستند به وسیله یک ریزمحیط تخصصی به نام نیچ سلول‌های بنیادی

اسپرماتوگونی حمایت می‌شود. تکوین بعد از تولد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به وسیله تغییرات متابولیکی مشخصی تعیین می‌شود. درک فاکتورهای نیچ که این حوادث بلوغ را تنظیم میکند، برای کاربرد کلینیکی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در حفظ باروری مردانه بسیار ضروری است. بلوغ مورفولوژیکی نیچ با تجمعات قطرات لیپیدی همراه است. انالیز پروتئیومیکس نشان می‌دهد که تغییرات لیپید نیچ در این فرایند بسیار موثر است [۱۳]. متابولیت‌های اسفنگولیپیدها، بخصوص اسفنگوزین و اسفنگوزین ۱- فسفات نقش حیاتی در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از طریق میانجی‌گری فرایندهای سیگنالینگ سلولی و حفظ ویژگی‌های بنیادی سلول ایفا می‌کنند و در تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی درگیر هستند [۱۴]. همچنین سرامید یک متابولیت عمده اسفنگولیپیدی است که به عنوان پیامبر ثانویه عمل می‌کند که می‌تواند منجر به توقف چرخه سلولی و آپوپتوز شود و حفظ سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و در نتیجه فرایند اسپرم‌زایی را تحت تاثیر قرار دهد [۱۵]. بنابراین اسفنگولیپیدها ترکیبات ضروری غشاهای سلولی هستند و در عبور و مرور پروتیین‌های درون سیستم‌های درون غشایی دخالت دارند و توزیع درست پروتیین‌ها برای عملکردهای سلولی من جمله سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را برعهده دارند [۱۶]. با شناخت نقش دقیق اسفنگولیپیدها و شناخت تغییرات آنها در جریان اسپرم‌زایی می‌تواند دیدگاه جدیدی را در ناباروری مردان و روش‌های درمانی بالقوه برای سلامت باروری معرفی نماید [۳].

در مجموع، مطالعه حاضر نشان می‌دهد که یکی از اتفاقات مهم در جریان اسپرم زایی تغییرات در سرامیدها و اسفنگوزین است که به طور معنی‌داری این تغییرات در نمونه‌های الیگوزواسپرمی در مقایسه با نرموزواسپرمی مشاهده شد. با توجه به مسیر متابولیسم اسفنگولیپیدها، به نظر می‌رسد که اسفنگوزین تولید شده و افزایش در مقدار اسفنگوزین، بیشتر در جهت تولید سرامید و در نهایت تاثیر منفی بر اسپرم‌زایی پیش می‌رود و منجر به الیگوزواسپرمی می‌شود. بنابراین درگیری این متابولیت‌های اسفنگولیپیدی در فیزیولوژی تولیدمثلی مردان و نقش احتمالی در حوادث پاتولوژیکی مرتبط با باروری و لقاح اسپرم پیشنهاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مطالعه از مساعدت صمیمانه همکاران مرکز درمان ناباروری الزهرای رشت در تهیه نمونه‌های سیمن بسیار سپاسگزارند.

منابع

[1] Li X, Luo T, Li H, Yan N. Sphingomyelin Synthase 2 Participate in the Regulation of Sperm Motility and Apoptosis. Molecules. 2020; 25(18): 4231.

[2] World Health Organization (WHO), WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, sixth ed., 2021. Geneva.

[3] Wang D, Tang Y, Wang Z. Role of sphingolipid metabolites in the homeostasis of steroid hormones and the maintenance of are the major acyl groups of sphingomyelins and ceramides in the head of mammalian spermatozoa. J Biol Chem, 2007; 282(25): 18151-18161.

[4] Oresti GM, Reyes JG, Luquez JM, Osses N, Furland NE, Aveldaño MI. Differentiation-related changes in lipid classes with long-chain and very long-chain polyenoic fatty acids in rat spermatogenic cells. J Lipid Res. 2010; 51(10): 2909-2921.

[5] Molina-Mora JA, Mesen-Porras S, Quiros-Fernandez I, Kop-Montero. M, Rojas-Cespedes A, Quiros S, Siles F, Mora R. Sphingolipid pathway as a biosensor of cancer chemosensitivity: a proof of principle. Uniciencia, 2022; 36(1):1-15.

[6] Rollin-Pinheiro R, Rochetti VP, Xisto MIDDS, Liporagi-Lopes LC, Bastos B, Rella A, Singh A, Rozental S, Del Poeta M, Barreto-Bergter E. Sphingolipid biosynthetic pathway is crucial for growth, biofilm formation and membrane integrity of Scedosporium boydii. Future Med Chem. 2019; 11(22): 2905-2917.

[7] Tilly JL, Kolesnick RN. Sphingolipids, apoptosis, cancer treatments and the ovary: investigating a crime against female fertility. Biochim Biophys Acta, 2002;1585:135-138

[8] Merrill AH Jr, Wang E, Mullins RE, Jamison WCL, Nimkar S, Liotta DC. Quantitation of free sphingosine in liver by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem, 1988; 171: 373–281.

[9] Groener JE, Poorthuis BJ, Kuiper S, Helmond MT, Hollak CE, Aerts JM. HPLC for simultaneous quantification of total ceramide, glucosylceramide, and ceramide trihexoside

concentrations in plasma. Clin Chem, 2007; 53(4): 742-747.
[10] Fillet M, Van Heugen JC, Servais AC, De Graeve J, Crommen J. Separation, identification and quantitation of ceramides in human cancer cells by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. J Chromatogr A, 2002; 949(1-2): 225-233.
[11] Birbes H, El Bawab S, Hannun YA, Obeid LM. Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis. FASEB J, 2001; 15(14): 2669-2679.
[12] Furland NE, Oresti GM, Antollini SS, Venturino A, Maldonado EN, Aveldaño MI. Very long-chain polyunsaturated fatty acids are the major acyl groups of sphingomyelins and ceramides in the head of mammalian spermatozoa. J Biol Chem, 2007; 282(25): 18151-18161.
[13] Voigt AL, Dardari R, Lara NLM, He T, Steele H, Dufour A, Orwig KE, Dobrinski I. Multiomics approach to profiling Sertoli cell maturation during development of the spermatogonial stem cell niche. Mol Hum Reprod, 2023; 29(3): gaad004.
[14] Salman B, Ronald H, Hill A, Liu YY. The Role of Sphingolipids in Modulating Pluripotency of Stem Cells. Springer, 2013; 167-191.
[15] Gomez-Larrauri A, Presa N, Dominguez-Herrera A, Ouro A, Trueba M, Gomez-Muñoz A. Role of bioactive sphingolipids in physiology and pathology. Essays Biochem, 2020; 64(3): 579-589.
[16] Aguilera-Romero A, Lucena R, Sabido-Bozo S, Muñiz M. Impact of sphingolipids on protein membrane trafficking. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2023; 1868(8): 159334.

Investigation of Sphingosine and Ceramide Level Changes in Oligozoospermia Samples among Infertile Men

Akbari A., Ghasemian F. *

Department of Biology, Faculty of sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

* (Corresponding author): ghasemian@guilan.ac.ir

Received: July 2024 Accepted: September 2024

Abstract

Background: Oligozoospermia is one of the causes of infertility in men, characterized by a low sperm count compared to normozoospermia according to World Health Organization criteria. Sphingolipids are crucial regulators of many cellular processes, such as cell differentiation and apoptosis. The most important sphingolipid metabolites include ceramides and sphingosine, where an imbalance in ceramide levels can lead to apoptosis. This study aims to investigate the changes in various types of ceramides and sphingosine in oligozoospermia samples from infertile men.

Materials and Methods: In this study, semen samples were collected from couples visiting the Alzahra Infertility Treatment Center in Rasht (n=10). The samples were analyzed based on World Health Organization parameters, and oligozoospermia (sperm count less than 15 million per milliliter of semen) and normozoospermia groups were included in the study. The levels of various ceramides (Cer14, Cer16, Cer18, and Cer20) and sphingosine were measured using high-performance liquid chromatography.

Results: The findings showed a significant difference in the level of sphingosine in the oligozoospermia group compared to the normozoospermia group ($p<0.05$). Additionally, the levels of various ceramides were significantly increased in the oligozoospermia group compared to the control group ($p<0.0001$).

Conclusion: Overall, the results indicate that sphingolipid metabolites play a crucial role in the quantity of spermatogenesis, and alterations in these metabolites can lead to reduced fertility in men. Therefore, these metabolites can serve as good criteria for fertility assessments and pharmaceutical targets.

Keywords: Sperm, Male infertility, Ceramide, Sphingosine, HPLC.