بررسی ارتباط بین سطح مارکرهای لیپید پراکسیداسیون در پلاسمای سمینال و تحرک اسپرم

علی خسروبیگی (M.Sc.)[۱]، نصرت ا له ضرغامی (M.D., Ph.D.)[۲]، جعفر نوروززاده(Ph.D.)[۳]، معرفت غفاری (M.D., Ph.D.)[۴].

۱- دانشجوی دکترا، گروه بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز، تبریز، ایران.

۲- دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز، تبریز، ایران.

۳- دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی ارومیه، ارومیه، ایران.

٤- استادیار، گروه غدد تولید مثل و جنین شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی تولید مثل و نازایی، پژوهشکده ابن‌سینا، تهران، ایران.

چکیده

مقدمه: اختلال در تحرک اسپرم یکی از عوامل دخیل در ناباروری مردان است. تمامی فاکتورهایی که باعث آستنواسپرمی می‌شوند به طور کامل شناخته نشده‌اند. یکی از فاکتورهایی که می‌تواند باعث آستنواسپرمی گردد، استرس اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است. هدف از این مطالعه مقایسه پراکسیداسیون لیپیدی، از طریق اندازه‌گیری یک مارکر جدید (ایزوپروستان $F_{2\alpha}$) و مالون دی‌آلدئید در پلاسمای سمینال مردان نرمواسپرمیک و آستنواسپرمیک و ارتباط آن با قدرت تحرک اسپرم است.

مواد و روشها: مطالعه حاضر از نوع مورد- شاهدی، شامل ۱۵ نمونه نرمواسپرمیک به عنوان گروه شاهد و ۱۵ نمونه آستنواسپرمیک به عنوان گروه مورد بود. سطح ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ پلاسمای سمینال به روشEIA با استفاده از کیت تجاری موجود اندازه‌گیری شد. میزان مالون دی‌آلدئید با روش تیوباربیتوریک اسید (TBA) اندازه‌گیری گردید. جهت مقایسه داده‌ها، بین دو گروه از آزمون آماری Mann-Whitney مستقل استفاده شد. بررسی همبستگی بین پارامترهای کیفیت اسپرم و غلظت ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ و نیز مالون دی‌آلدئید با استفاده از آنالیز همبستگی Spearman انجام شد. کلیه آزمون‌های آماری به صورت دو دنباله‌ای با α برابر ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج: میانگین سطوح ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ دارای اختلاف معنی‌داری بین دو گروه نبود ($p>۰/۰۵$). اما متوسط سطح مالون دی‌آلدئید اختلاف معنی‌داری را بین این دو گروه نشان داد($p<۰/۰۵$). سطح ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ و مالون دی‌آلدئید هر دو دارای همبستگی معکوس معنی‌داری با قدرت تحرک اسپرم بود($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که پراکسیداسیون لیپیدی غشای اسپرم، ممکن است به عنوان یک عامل مهم در کاهش قدرت تحرک اسپرم مطرح نباشد اما برای حصول به یک نتیجه قطعی نیاز به انجام بررسی‌های بیشتر می‌باشد.

گل واژگان: پراکسیداسیون لیپیدی، قدرت تحرک اسپرم، ایزوپروستان $F_{2\alpha}$، مالون دی آلدئید، پلاسمای سمینال، آستنواسپرمی، و نرمواسپرمی.

آدرس مکاتبه: دکتر نصرت اله ضرغامی، گروه بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز، تبریز، ایران.

پست الکترونیک: nzarghami@hotmail.com

Downloaded from http://www.jri.ir

مقدمه

از هر شش زوج در سنین تولید مثل، یک زوج دارای مشکل ناباروری است(۱،۲). آسیب‌های ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)[1] به عنوان یک فاکتور مهم در ناباروری مردان مطرح است(۲،۳). کاهش تحرک اسپرم (آستنواسپرمی)[2] یکی از عوامل دخیل در ناباروری مردان است. عواملی که باعث کاهش قدرت تحرک اسپرم می‌گردند در بسیاری از موارد هنوز به طور کامل شناخته نشده‌اند. یکی از فاکتورهایی که می‌تواند باعث کاهش قدرت تحرک اسپرم گردد، استرس اکسیداتیو ناشی از ROS است (٤). استرس اکسیداتیو، ناشی از تولید بیش از حد ROS و یا نقص در مکانیسم دفاعی آنتی‌اکسیدان است. ROS نقش دوگانه‌ای را در باروری مردان دارد. از یک طرف ROS نقشی اساسی در فرآیندهایی نظیر ظرفیت‌پذیری[3]، واکنش آکروزومی و لقاح[4] ایفا می‌کند و از طرف دیگر می‌تواند باعث آسیب‌های شدید در اسپرم گردد. اسپرم‌ها به طور ویژه‌ای مستعد آسیب‌های ناشی از ROS هستند؛ زیرا از یک طرف غشای پلاسمایی آنها مملو از اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه (PUFA)[5] است و از طرف دیگر میزان سیتوپلاسم حاوی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در اسپرم فوق‌العاده ناچیز است(۷-٤). عقیده بر این است که ROS باعث القای پراکسیداسیون لیپیدی در غشاء اسپرم شده و پراکسیداسیون اسیدهای چرب ناشی از آن دارای اثرات سمی بر روی اسپرم است که منتهی به کاهش عملکرد اسپرم می‌گردد(۱۲-۸). گروهی براین عقیده‌اند که افزایش سطح ROS طی یک سری از واکنش‌ها از جمله اکسیداسیون گروه‌های سولفیدریل (-SH) منجر به کاهش فسفریلاسیون پروتئین آکسونمال[6] می‌گردد که این امر باعث کاهش تحرک اسپرم می‌شود(۷). فرضیه دیگر این است که پراکسید هیدروژن (یکی از انواع ROS) می‌تواند از غشای اسپرم عبور کرده و وارد سیتوپلاسم آن گردد. پراکسید هیدروژن در سیتوپلاسم اسپرم منجر به مهار فعالیت برخی از آنزیم‌ها از جمله گلوکز- ٦- فسفات دهیدروژناز (G6PD) می‌شود. این آنزیم ورود گلوکز به مسیر هگزوز منوفسفات (مسیر پنتوز فسفات) را کنترل می‌کند. این مسیر در شرایط عادی تولید کننده نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات احیا شده (NADPH) برای واکنش‌های احیائی در سلول است. مهار شانت هگزوز منوفسفات باعث کاهش تولید NADPH، به عنوان اکی والان احیاء کننده در سلول می‌شود. گلوتاتیون پراکسیداز یک آنزیم آنتی اکسیدان اصلی در اسپرم می‌باشد که جهت احیاء ROS از گلوتاتیون احیاء شده (G-SH) استفاده می‌کند. در نتیجه عمل آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون احیاء شده (G-SH) به فرم اکسید شده آن (G-S-S-G) تبدیل می‌گردد. سلول برای احیاء مجدد گلوتاتیون اکسید شده، به NADPH احتیاج دارد. بنابراین کاهش سطح NADPH، به علت مهار آنزیم G6PD، باعث کاهش فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز، به عنوان دفاع آنتی‌اکسیدانی، می‌شود. بنابراین میزان پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشای اسپرم افزایش می‌یابد، در نتیجه سیالیت غشاء کاهش پیدا می‌کند. نتیجه این تغییرات کاهش تحرک اسپرم خواهد بود (۱۳،۱٤).

در طی مسیر پراکسیداسیون لیپیدی چندین محصول تولید می‌شود که مهمترین آنها مالون دی‌آلدئید[7] (MDA) و ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ (با نام علمی $15\text{-}F_{2t}$-Isoprostane) است(۱۲،۱۵). بیشترین بیومارکری که در بررسی پراکسیداسیون لیپیدی در اسپرم‌ها بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد، مالون دی‌آلدئید است که از طریق

1- Reactive Oxygen Species
2- Asthenospermia
3- Capacitation
4- Fertilization
5- Polyunsaturated Fatty Acids
6-Axonemal
7- Malondialdehyde

Downloaded from http://www.jri.ir

تست تیوباربیتوریک اسید (TBA) اندازه‌گیری می‌شود (۱۶). علیرغم سادگی این تست، خطای آن زیاد است به‌طوری که تفسیر نتایج حاصل از این تست در بررسی پراکسیداسیون لیپیدی با احتیاط فراوانی صورت می‌گیرد. یک دلیل اصلی در بروز این خطاها، عدم پایداری مالون دی‌آلدئید است (۱۵). ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ یک ایزومر پروستاگلاندینها است که در شرایط in vivo از اسید آراشیدونیک، مستقل از مسیر سیکلواکسیژناز، طی حمله رادیکال‌های آزاد به غشای سلول تولید می‌شود. ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ به عنوان یک بیومارکر اختصاصی، کمی و پایدار از نظر شیمیایی برای ارزیابی استرس اکسیداتیو در شرایط in vivo مطرح می‌باشد (۱۹-۱۷).

بررسی پراکسیداسیون لیپیدی در غشای اسپرم، در اکثر مطالعات از طریق اندازه‌گیری مالون دی‌آلدئید در پلاسمای سمینال [1] و یا اسپرم انجام شده است (۲۶-۲۰، ۱۶، ۱۱، ۱۰، ۵). Suleiman و همکاران هیچ ارتباطی را بین میزان تحرک اسپرم و سطح MDA پلاسمای سمینال مشاهده نکردند(۲۴). Gomez و همکاران مشاهده کردند که غلظت MDA در اسپرم‌ها ناشی از القای پراکسیداسیون لیپیدی در حضور سولفات فرو و اسکوربات دارای همبستگی معکوسی با میزان تحرک اسپرم می‌باشد(۱۶). مطالعه Fraczek و همکاران نشان داد که میزان سطح مالون دی‌آلدئید پلاسمای سمینال در حالات پاتولوژیک از جمله آستنواسپرمی بالاتر از حالت نرمواسپرمی است(۲۵). Nakamura و همکاران مشاهده کردند که میزان MDA پلاسمای سمینال بین مردان نرمواسپرم و آستنواسپرم دارای تفاوت معنی‌داری نمی‌باشد(۲۶). مطالعه Keskes-Ammar و همکاران نشان داد که میزان MDA پلاسمای سمینال دارای همبستگی معکوسی با قدرت تحرک اسپرم است (۲۷). اما در مرور مقالات جهت مطالعه حاضر، مطالعه‌ای در رابطه با بررسی سطح ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ در پلاسمای سمینال و ارتباط آن با پارامترهای باروری اسپرم، به خصوص میزان تحرک اسپرم، انجام نشده است. بنابراین با توجه به نتایج ضد و نقیض در رابطه با مالون دی آلدئید، به خصوص در مقایسه سطح پلاسمای سمینال آن در مردان نرمواسپرم و آستنواسپرم و فقدان اطلاعات کافی در رابطه با سطوح ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ در پلاسمای سمینال، مطالعه‌ای مورد- شاهدی با روش نمونه‌گیری تصادفی طراحی گردید که اهداف آن شامل: (الف) مقایسه میزان سطوح مالون دی‌آلدئید و ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ در پلاسمای سمینال مردان نرمواسپرم و آستنواسپرم (ب) بررسی ارتباط بین میزان سطوح مالون دی‌آلدئید و ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ با قدرت تحرک اسپرم، بود.

مواد و روشها

مطالعه حاضر از نوع مورد - شاهدی، شامل ۱۵ نمونه نرمواسپرم به عنوان گروه شاهد و ۱۵ نمونه آستنواسپرم ایدیوپاتیک به عنوان گروه مورد بود. نمونه‌ها از مردان مراجعه‌کننده به بخش IVF بیمارستان الزهراء دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز در طی ماه‌های خرداد تا آبان سال ۱۳۸۲ به طور تصادفی انتخاب گردیدند. براساس داده‌های حاصل از مطالعات قبلی برای مالون دی‌آلدئید و نیز یک مطالعه پیشاهنگ[2]، با در نظر گرفتن α برابر ۰/۰۵ و β برابر ۰/۲ (توان ۸۰٪)، حداقل حجم نمونه مورد نیاز در هر گروه ۱۵ نفر محاسبه گردید. نمونه‌های مایع منی[3] به وسیله استمناء[4] بعد از ۷۲ -۴۸ ساعت پرهیز از نزدیکی از هر دو گروه به دست آمد و در ظروف پلاستیکی استریل جمع‌آوری گردید. نمونه‌های منی در طول مدت یک ساعت پس از

1- Seminal plasma

2- Pilot study
3- Semen
4- Masturbation

Downloaded from http://www.jri.ir

جمع‌آوری جهت تعیین اسپرموگرام آنالیز گردید. نمونه‌ها ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ ^oC قرار داده شد تا به طور کامل مایع شود[1]. سپس پارامترهای کیفیت اسپرم یعنی تعداد اسپرم، مورفولوژی و میزان تحرک اسپرم، با استفاده از دستگاه Sperm Quality Analyzer IIC (United Medical Systems Inc., Sunta Ana, CA, USA) طبق معیار سازمان بهداشت جهانی (WHO) تعیین گردید(۲۸). معیار WHO جهت طبیعی بودن نمونه‌ها از این قرار بود: تعداد اسپرم‌ها بیشتر یا مساوی ۲۰ میلیون در هر میلی‌لیتر مایع منی، درصد تحرک اسپرم‌ها بیشتر یا مساوی ۵۰٪ و مورفولوژی طبیعی اسپرم‌ها بیشتر یا مساوی ۳۰٪. نمونه‌های الیگواسپرم، آزواسپرم، تراتواسپرم[2] (نقص مورفولوژی) و نیز نمونه‌های لکواسپرمیک[3] (تعداد لکوسیت بالاتر از یک میلیون در هر میلی‌لیتر مایع منی) از مطالعه حذف شدند. نمونه‌های مایع منی در ۳۰۰۰*rpm* و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع رویی (پلاسمای سمینال) به دقت جدا و به تیوب‌های اپندروف منتقل و تا زمان اندازه‌گیری آنالیت‌های مورد نظر در ۸۰-^oC منجمد گردید. اندازه‌گیری سطح آزاد ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ در پلاسمای سمینال به وسیله روش EIA[4] و با استفاده از کیت تجاری موجود (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) انجام گردید. به طور خلاصه این روش براساس رقابت بین ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ آزاد موجود در نمونه و ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ (تریسر)[5] کونژوگه شده با آنزیم استیل‌کولین استراز در جهت اتصال به آنتی‌بادی اختصاصی علیه ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ است. به دلیل اینکه غلظت تریسر ثابت است و در مقابل غلظت ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ در نمونه‌ها متغیر است، مقداری از تریسر که می‌تواند به آنتی‌بادی اختصاصی متصل گردد متناسب با عکس غلظت ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ در نمونه‌ها می‌باشد. کلیه معرف‌ها با استفاده از آب کاملاً خالص[6] تهیه گردید. به همین منظور آب دیونیزه را با کربن فعال شده مخلوط و سپس با استفاده از کاغذ صافی واتمن[7] شماره ۱ صاف گردید. حجم نمونه مورد استفاده در این روش ۵۰*µl* بود. پس از انکوبه کردن پلیت[8] به مدت ۱۸ ساعت در دمای اتاق، سه بار با استفاده از بافر مربوطه شستشو شد. سپس معرف المن[9]، ۵ و' ۵- دی تیو- بیس- (۲-نیترو بنزوئیک اسید)، به همراه سوبسترای آنزیم استیل‌کولین استراز و استیل تیوکولین، به هر چاهک[10] پلیت افزوده شد. هیدرولیز استیل‌تیوکولین به وسیله آنزیم باعث تولید تیوکولین می‌گردد که با معرف المن واکنش داده و تولید ترکیب زرد رنگ ۲- تیو- ۲- نیتروبنزوئیک اسید می‌کند که دارای حداکثر جذب در ۴۰۵ *nm* است که در دستگاه ELISA reader[11] (STAT FAX 2100, USA) قرائت گردید. با رسم %B/B0 در مقابل غلظت‌های مختلف استاندارد ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ که یک منحنی نزولی بود، منحنی استاندارد رسم شد. در این منحنی B جذب مربوط به استانداردها و یا نمونه‌ها بود و B0 ماکزیمم مقداری از تریسر بود که در غیاب نمونه می‌تواند به آنتی‌بادی‌های چاهک متصل گردد. غلظت ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ در نمونه‌ها بر حسب *pg/ml* گزارش گردید. حد آشکارسازی[12] و ویژگی[13] کیت مورد استفاده به ترتیب ۵ *pg/ml* و ۱۰۰٪ بود. ضریب تغییر (CV) درون سنجش[14] کمتر از ۱۰٪ بود.

1- Liquefaction
2- Teratozoospermia
3- Leukocytospermia
4- Enzyme Immunoassay
5- Tracer
6- Ultra Pure
7- Whatman
8- Plate
9- Ellman's Reagent
10- Well
11- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
12- Detection limit
13- Specificity
14- Intra-assay coefficient of variation

Downloaded from http://www.jri.ir

غلظت مالون دی‌آلدئید پلاسمای سمینال با استفاده از روش تیوباربیتوریک اسید (TBA) و به طریق اسپکتروفوتومتری اندازه گیری شد (۲۲). تمام واکنشگرهای مورد نیاز در این روش از شرکت (Merck, Germany) تهیه گردید. ابتدا ۰/۵ *ml* از پلاسمای سمینال را به مخلوطی از ۳/۰ *ml* اسیدفسفریک ۱٪، ۱/۰ *ml* تیوباربیتوریک اسید ۰/۶٪ و ۰/۱۵ *ml* هیدروکسی‌تولوئن بوتیله شده (BHT) ۰/۲٪ در متانول ۹۵٪ افزوده و به طور شدید مخلوط شد. سپس این مخلوط به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب جوش حرارت داده شد. پس از خنک کردن به وسیله جریان آب، ۴/۰ *ml* از ۱- بوتانول به آن اضافه گردید و به طور شدید مخلوط شد. پس از سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ *rpm* به مدت ۱۰ دقیقه، فاز بوتانول را به دقت جدا کرده و جذب نوری آن در ۵۳۲ *nm* قرائت گردید. غلظت MDA با استفاده از ضریب خاموشی $1/56\times10^{5}\ mol^{-1}.l.cm^{-1}$ [1] برای کمپلکس MDA-TBA محاسبه (۲۹) و بر حسب μM گزارش گردید.

جهت آنالیز داده‌ها از آزمون آماری غیر پارامتری Mann-Whitney استفاده شد. بررسی همبستگی بین پارامترهای کیفیت اسپرم و غلظت ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ و نیز مالون دی‌آلدئید با استفاده از آنالیز همبستگی Spearman انجام شد. کلیه آزمون‌های آماری به‌صورت دو دنباله با α برابر ۰/۰۵ با سطوح اطمینان (CI) ۹۵٪ در نظر گرفته شد. سطوح مالون دی‌آلدئید و ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ و نیز پارامترهای کیفیت اسپرم به‌صورت SD ± میانگین گزارش شده است. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 10 انجام گرفت.

نتایج

ابتدا پارامترهای باروری اسپرم در دو گروه نرمواسپرم و آستنواسپرم مورد مطالعه، بررسی گردید که نتایج در جدول شمارهٔ ۱ آورده شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود تعداد اسپرم‌ها بین دو گروه دارای اختلاف معنی‌داری نبود($p>0/05$). اما میزان تحرک اسپرم، درصد اسپرم‌های دارای حرکت سریع (PMS)[2] و مورفولوژی طبیعی اسپرم‌ها بین دو گروه دارای تفاوت آماری معنی‌داری بودند($p<0/05$).

میزان مالون دی‌آلدئید و ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ پلاسمای سمینال دو گروه در جدول شمارهٔ ۲ آورده شده است. میانگین سطوح مالون دی‌آلدئید بین دو گروه تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p<0/05$)، به طوری که در مردان آستنواسپرم بالاتر از مردان نرمواسپرم بود.

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار پارامتر های کیفیت اسپرم درمردان نرمواسپرم و آستنواسپرم مراجعه کننده به بخش IVF بیمارستان الزهراء دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز سال ۱۳۸۲

گروه / پارامترهای کیفیت اسپرم	نرمواسپرم (M±SD) (n=۱۵)	آستنواسپرم (M±SD) (n=۱۵)	P-Value
تعداد *(Millions/ml)*	۹۹/۸۷± ۳۳/۲۵	۷۸/۴۷±۲۹/۱۹	>۰/۰۵
تحرک (٪)	۵۲/۰۰± ۴/۱۴	۳۴/۶۷± ۹/۵۴	<۰/۰۵
اسپرم های با حرکت سریع (٪)	۱۵/۶۷± ۵/۶۲	۴/۴۲± ۳/۶	<۰/۰۵
مورفولوژی (٪)	۴۲/۶۶±۷/۹۸	۳۳/۳۳± ۴/۸۸	<۰/۰۵

1- Extinction Coefficient

2- Progressively Motile Sperms

Downloaded from http://www.jri.ir

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار میزان سطوح مالون دی آلدئید و ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ پلاسمای سمینال درمردان نرمواسپرم و آستنواسپرم مراجعه کننده به بخش IVF بیمارستان الزهراء دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز سال ۱۳۸۲

متغیر / گروه	نرمواسپرم (M±SD) (n =۱۵)	آستنواسپرم (M±SD) (n =۱۵)	P-Value
ایزو پروستان $F_{2\alpha}$ *(pg/ml)*	۶۵/۰۰ ± ۱۲/۳۸	۵۸/۱۷ ± ۱۵/۹۷	>۰/۰۵
مالون دی آلدئید *(μM)*	۰/۷۲ ± ۰/۲۳	۰/۴۰ ± ۰/۲۲	<۰/۰۵

متوسط سطوح ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ پلاسمای سمینال نیز در مردان آستنواسپرم بالاتر از مردان نرمواسپرم بود، اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود (p> ۰/۰۵).

در مرحله بعد همبستگی بین میزان سطوح مالون دی‌آلدئید و ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ پلاسمای سمینال با میزان تحرک اسپرم و درصد اسپرم‌های دارای حرکت سریع مورد بررسی قرار گرفت. سطوح ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ پلاسمای سمینال دارای همبستگی معکوسی با میزان تحرک اسپرم بود که این همبستگی از نظر آماری نیز معنی‌دار بود (r =-۰/۴۱ ، p<۰/۰۵) (نمودار شمارهٔ ۱). این همبستگی در هر یک از گروه‌های مورد مطالعه، فقط در گروه آستنواسپرم از نظر آماری معنی‌دار بود (r = -۰/۶۰،p<۰/۰۵). میزان سطوح مالون دی‌آلدئید پلاسمای سمینال نیز همبستگی معکوس معنی‌داری را با قدرت تحرک اسپرم نشان داد (r =-۰/۵۳، p<۰/۰۵) (نمودار شمارهٔ ۲). اما این همبستگی در هیچکدام از گروهها به تفکیک معنی‌دار نبود. میزان سطوح پلاسمای سمینال مالون دی‌آلدئید با درصد اسپرم‌های دارای حرکت سریع نیز دارای همبستگی معکوس معنی‌داری بود(r= -۰/۵۸، p<۰/۰۵) (نمودارشمارهٔ ۳). اما بین میزان سطوح ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ پلاسمای سمینال و درصد اسپرم‌های دارای حرکت سریع هیچ همبستگی مشاهده نشد. همبستگی بین میزان سطوح مالون دی‌آلدئید و ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ پلاسمای سمینال با درصد اسپرم‌های دارای حرکت سریع، در هیچکدام از گروهها معنی‌دار نبود. در این مطالعه بین میزان سطوح ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ پلاسمای سمینال و درصد اسپرم‌های دارای مورفولوژی نرمال همبستگی معکوس معنی‌داری ملاحظه گردید(r=-۰/۴۲، p<۰/۰۵). اما این همبستگی به تفکیک در هیچکدام از گروهها معنی‌دار نبود. مورفولوژی طبیعی اسپرمها با میزان سطوح پلاسمای سمینال مالون دی‌آلدئید در هیچکدام از گروهها و نیز برای کل نمونه‌ها دارای همبستگی معنی‌داری نبود.

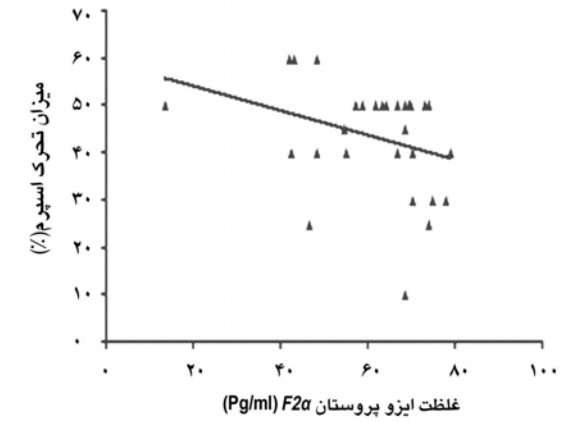
بحث

براساس نتایج این مطالعه میانگین سطح پلاسمای سمینال مالون دی‌آلدئید در مردان آستنواسپرم بالاتر از مردان نرمواسپرمیک بود، اما متوسط سطوح ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ اختلاف معنی‌داری را از نظر آماری بین این دو گروه نشان نداد. همچنین میزان سطوح مالون دی‌آلدئید و ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ پلاسمای سمینال با قدرت تحرک اسپرم دارای همبستگی معکوس معنی‌داری بودند که در مورد مالون دی‌آلدئید این همبستگی شدیدتر بود.

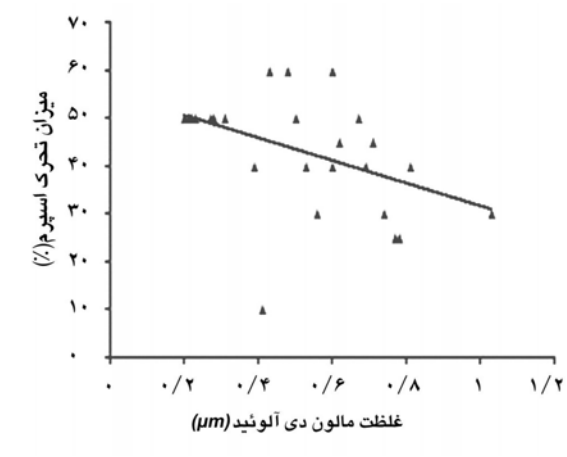
Downloaded from http://www.jri.ir

در مطالعه Gomez و همکاران ارتباط بین غلظت مالون دی‌آلدئید اسپرم با قدرت تحرک آن و نیز اسپرم‌های دارای حرکت سریع (PMS) بررسی گردید، که در هر دو مورد همبستگی معکوس معنی‌داری مشاهده شد (١٦). در مطالعه Keskes-Ammar و همکاران نیز این همبستگی با قدرت تحرک اسپرم مشاهده شد(٢٧). در مطالعه حاضر نیز بین غلظت مالون دی‌آلدئید پلاسمای سمینال و قدرت تحرک اسپرم و نیز اسپرم‌های دارای حرکت سریع (PMS) همبستگی معکوس معنی‌داری مشاهده شد. اما این یافته بر خلاف مشاهده Suleiman و همکاران بود (٢٤). مطالعه Nakamura و همکاران نشان داد که میانگین سطوح مالون دی‌آلدئید پلاسمای سمینال مردان نرمواسپرم و آستنواسپرم دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشد(٢٦). اما در مطالعه حاضر این اختلاف معنی‌دار بود که این یافته مشابه مطالعه Fraczek و همکاران است(٢٥). بررسی سطح ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ در پلاسمای سمینال در این مطالعه وجه تمایز و نقطه قوت آن با سایر مطالعاتی است که پراکسیداسیون لیپیدی را در اسپرم بررسی کرده‌اند.

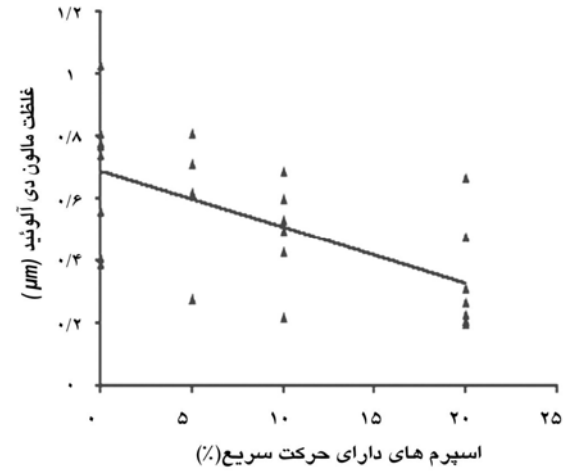
در سال‌های اخیر مطالعات گسترده‌ای بر روی ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ به عنوان یک بیومارکر جهت پراکسیداسیون لیپیدی انجام شده است. در حال حاضر اندازه‌گیری ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ به عنوان یک معیار قابل اعتماد جهت آسیب‌های اکسیداتیو در شرایط in vivo مطرح می‌باشد که این امر ناشی از چند خصوصیت و مزیت آن نسبت به سایر بیومارکرها به خصوص مالون دی‌آلدئید می‌باشد. اوّل اینکه ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ یک ترکیب پایدار است و نیز یک محصول اختصاصی پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از حمله رادیکال‌های آزاد می‌باشد. از طرف دیگر این ترکیب در مقادیر قابل اندازه‌گیری در تمام بافت‌های بیولوژیکی وجود دارد و نیز فرم آزاد آن در تمام مایعات بیولوژیکی یافت می‌گردد و سرانجام اینکه سطح ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ در



نمودار ١- همبستگی بین میزان تحرک اسپرم و غلظت ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ پلاسمای سمینال (p< ٠/٠٥ ، r= -٠/٤١)



نمودار ٢- همبستگی بین و سطوح مالون دی آلدئید پلاسمای سمینال میزان قدرت تحرک اسپرم (p< ٠/٠٥ ، r= -٠/٥٣)



نمودار ٣- همبستگی بین سطوح پلاسمای سمینال مالون دی آلدئید و درصد اسپرم های دارای حرکت سریع (p< ٠/٠٥ ، r= -٠/٥٨)

Downloaded from http://www.jri.ir

مایعات بیولوژیکی تحت تاثیر رژیم غذایی واقع نمی‌شود (۱۸). ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ در واقع ایزومری از پروستاگلاندین‌ها می‌باشد. پروستاگلاندین‌ها از اسید آراشیدونیک آزاد شده از غشای سلول، تحت اثر آنزیم فسفولیپاز A_2، طی مسیر سیکلواکسیژناز تولید می‌شوند. اما ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ از اسید آراشیدونیک استریفه شده در فسفولیپیدهای غشای سلول در طی حمله رادیکال‌های آزاد تشکیل گردیده و سپس توسط آنزیم فسفولیپاز A_2 آزاد شده و وارد مایع خارج سلولی می‌گردد(۳۰). در مطالعه حاضر اختلاف معنی‌داری در میزان سطوح ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ پلاسمای سمینال بین مردان نرمواسپرم و آستنواسپرم مشاهده نشد. سطوح ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ پلاسمای سمینال، نظیر مالون دی‌آلدئید، همبستگی معکوس معنی‌داری را با قدرت تحرک اسپرم نشان داد. اما با درصد اسپرم‌های دارای حرکت سریع (PMS) دارای همبستگی معنی‌داری نبود. سطوح ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ پلاسمای سمینال با درصد مورفولوژی طبیعی اسپرمها نیز دارای همبستگی معنی‌داری بود که این همبستگی در مورد مالون دی‌آلدئید مشاهده نشد. احتمال می‌رود که ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ بیومارکر بهتری در بررسی مورفولوژی باشد. اما به دلیل اینکه مورفولوژی تمام نمونه‌ها در محدوده طبیعی بود این نتیجه نمی‌تواند زیاد مورد تفسیر و بحث قرار گیرد. نظر به اینکه ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ یک مارکر اختصاصی جهت بررسی پراکسیداسیون لیپیدی غشاء است (۱۷،۱۹) و با توجه به این امر که در مطالعه ما تفاوت معنی‌داری در سطح آن بین دو گروه مورد مطالعه ملاحظه نشد، بنابراین احتمال می‌رود که پراکسیداسیون لیپیدی در غشای اسپرم نمی‌تواند به‌عنوان یک عامل مهم مستقیم در آستنواسپرمی مطرح شود. از طرفی مالون دی‌آلدئید فقط در غشای پلاسمایی تولید نمی‌شود، بلکه از اسیدهای چرب PUFA موجود در چربی‌های پلاسمای سمینال، در نتیجه حمله رادیکال‌های آزاد نیز می‌تواند تولید گردد(۱۲). در مطالعه حاضر میزان سطح مالون دی‌آلدئید پلاسمای سمینال در گروه آستنواسپرم به طور معنی‌داری بالاتر از گروه نرمواسپرم بود. با توجه به اینکه مالون دی‌آلدئید ترکیب‌های فوق‌العاده فعال است و می‌تواند با بیومولکول‌ها واکنش دهد(۱۲،۱۵)، بنابراین احتمال می‌رود که نقص در قدرت تحرک اسپرم‌ها در گروه آستنواسپرم به طور ثانوی و ناشی از اثر مالون دی‌آلدئید باشد و نه پراکسیداسیون لیپیدی در غشای اسپرم. با توجه به اینکه در بررسی حاضر برخلاف سایر مطالعاتی که در این زمینه انجام شده است، هر دو بیومارکر مهم در بررسی پراکسیداسیون لیپیدی مورد مطالعه قرار گرفته است، این احتمال بیشتر قوت می‌گیرد.

دقیق‌ترین روش بررسی سطح ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ در مایعات بیولوژیکی استفاده از کروماتوگرافی گازی-اسپکترومتری جرمی (GC– MS) است(۱۸). برخی از مطالعات اشاره بر این دارند که استفاده از روش EIA در مطالعه سطح ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ یک روش نیمه‌کمی است و نتایج باید با اندکی تأمل و احتیاط تفسیر گردد، هرچند که استفاده از این روش رو به فزونی است(۳۱). همچنین در بررسی غلظت مالون دی‌آلدئید، استفاده از روش‌های رفرانس نظیر HPLC توصیه می‌گردد(۱۲). با توجه به اینکه در مطالعه حاضر میزان مالون دی‌آلدئید پلاسمای سمینال از طریق روش اسپکتروفتومتری بررسی گردید، بنابراین نتایج باید با احتیاط تفسیر گردد. یکی دیگر از محدودیت‌های مطالعه ما تعداد کم نمونه مورد بررسی بود که به خصوص در رابطه با سطوح ایزوپروستان $F_{2\alpha}$ پلاسمای سمینال، مطالعات با تعداد نمونه بیشتری پیشنهاد می‌گردد.

به طور خلاصه مطالعه حاضر نشان داد که پراکسیداسیون لیپیدی غشای اسپرم، ممکن است به‌عنوان یک عامل مهم در کاهش قدرت تحرک اسپرم

Downloaded from http://www.jri.ir

مطرح نباشد اما برای حصول به یک نتیجه قطعی نیاز به بررسی‌های بیشتر است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه به عنوان طرح تحقیقاتی مصوب در مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز انجام شد و هزینه آن توسط این مرکز تامین گردید. از همکار ارجمند جناب آقای دکتر کامران صداقت بابت مشاوره در آنالیز آماری نتایج این مطالعه، کمال تشکر را داریم.

References

1- Hull M.G., Glazener C.M., Conway D.I., Foster P.A., Hinton R.A., Coulson C., Lambert P.A., Watt E.M. Population study of causes, treat-ment and outcome of infertility. Br Med J.1995;291: 1693-97.
2- Ollero M., Gil-Guzman E., Lopez M.C., Sharma R.K., Agarwal A., Larson K., Evenson D., Thomas A.J. Jr., Alvarez J.G. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implicatin in the diagnosis and treatment of male infertility. Hum Reprod.2001;16: 1912-21
3- Pasqualotto F.F., Sharma .K., Nelson D.R., Thomas A.J. Jr., Agarwal. A. Relationship between oidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. Fertil Steril.2000;73:459-64.
4- Gagnon C., de Lamirande E. Male sterility and motility disorders, 1 Edition, published by Springer-Verlag, New York.1999;pp:37-44.
5- Antoine L., Karine L., Jerome G., Anne-Marie P. Values of sperm thiobarbituric acid-reactive substance in fertile men. Clin Chim Acta. 2002; 325:113-15
6- Zorn B., Vidmar G., Meden-Vrtovec H. Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection.Int J Androl.2003;26:279-85.
7- Gil-Guzman E., Ollero M., Lopez M.C., Sharma R.K., Alvarez J.G., Thmas A.J. Jr., Agarval A. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. Hum Reprod.2001;16:1922-30.
8- Agarwal A., Saleh R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. Urol Clin North Am. 2002;29:817-27.
9- Conquer J.A., Martin J.B., Tummon I., Watson L., Tekpetey F.Fatty acid analysis of blood serum, seminal plasma, and spermatozoa of normozoospermic vs. asthenozoospermic males. Lipids.1999; 34:793-9.
10- Koksal I.T., Usta M., Orhan I., Abbasoglu S., Kadioglu A. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. Asian J Androl. 2003;5:95-9.
11- Segnini A., Camejo M.I., Proverbio F. Chlamydia trachomatis and sperm lipid peroxidation in infertile men. Asian J Androl. 2003;5:47-9.
12- Sanocka D., Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. Reprod Biol Endocrinol. 2004;2:12-19.
13- Agarwal A., Saleh R.A., Bedaiwy M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil Steril.2003;79:829-43.
14- Armstrong J.S., Bivalacqua T.J., Chamulitrat W., Sikka S., Hellstrom W.J. A comparison of the NADPH oxidase in human sperm and white blood cells. Int J Androl.2002;25:223-9.
15- Meagher E.A., FitzGerald G.A. Indices of lipid peroxidation In Vivo: strengths and limitations. Free Radic Biol Med.2000;28:1745-50.
16- Gomez E., Irvine D.S., Aitken R.J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. Int J Androl. 1998;21: 81-94.
17- Lawson J.A., Rokach J., FitzGerald G.A. Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation In Vivo. J Biol Chem. 1999; 274:24441-4.
18- Roberts L.J., Morrow J.D. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress In Vivo. Free Radic Biol Med. 2000;28:505-13.

Downloaded from http://www.jri.ir

19- Pratico D., Lawson J.A., Rokach J., Fitz Gerald G.A. The isoprostanes in biology and medicine. Trends Endocrinol Metab.2001;12: 243-7.
20- Ichikawa T., Oeda T., Ohmori H., Schill W.B. Reactive oxygen species influence the acrosome reaction but not acrosin activity in human spermatozoa. Int J Androl. 1999;22:37-42.
21- Rhemrev J.P., Vermeiden J.P., Haenen G.R., De Bruijne J.J., Rekers-Mombarg L.T., Bast A. Progressively motile human spermatozoa are well protected against in vitro lipid peroxidation Imposed by induced oxidative stress. Andrologia.2001; 33:151-8.
22- Dandekar S.P., Nadkarni G.D., Kulkarni V.S., Punekar S. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. J Postgrad Med. 2002;48:186-89.
23- Ozgocmen S., Sogut S., Fadillioglu E., Ardicoglu A., Ardicoglu O. Antioxidant status and lipid peroxidation in seminal plasma and spermatozoa of patients with ankylosing spondylitis. Rheumatology.2003;42:805-7.
24- Suleiman S.A., Ali M.E., Zaki Z.M., el-Malik E.M., Nasr M.A. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. J Androl. 1996;17:530-37.
25- Fraczek M., Szkutnik D., Sanocka D., Kurpisz M. Peroxidation components of sperm lipid membranes in male infertility. Ginekologia Polska. 2001;72:73-79.
26- Nakamura H., Kimura T., Nakajima A., Shimoya K., Takemura M., Hashimoto K., Isaka S., Azuma C., Koyama M., Murata Y. Detection of oxidative stress in seminal plasma and fractionated sperm from subfertile male patients. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2002;105:155-60.
27- Keskes-Ammar L., Feki-Chakroun N., Rebai T., Sahnoun Z., Ghozzi H., Hammami S., Zghal K., Fki H., Damak J., Bahloul A. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. Arch Androl. 2003;49:83-94.
28- World Health Organization: WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interactin. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1999.
29- Nourooz-Zadeh J., Tajaddini-Sarmadi J., Mc Carthy S., Betteridge D.J., Wolff S.P. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. Diabetes.1995;44:1054-8.
30- Roberts L.J. 2nd, Morrow J.D. Products of the isoprostane pathway: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation. Cell Mol Life Sci. 2002;59:808-20.
31- Nonaka-Sarukawa M., Yamamoto K., Aoki H., Takano H., Katsuki T., Ikeda U., Shimada K. Increased urinary 15-F2t-isoprostane concentrations in patients with non-ischaemic congestive heart failure: a marker of oxidative stress. Heart. 2003;89:871-4.

Downloaded from http://www.jri.ir