



Comparison of the Effect of Alpha Lipoic Acid (ALA) and Beta-Defensin 1 Protein on Human Sperm Motility and Viability in Different Times of Incubation

Reyhaneh Khayamabed¹ , Marziyeh Tavalae^{*1} , Mohammad Hossein Nasr Esfahani^{1,2} 

¹Department of Reproductive Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran.

²Isfahan Fertility & Infertility Center, Isfahan, Iran.

*Corresponding Author:
Marziyeh Tavalae;
Department of Reproductive Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran.

Email:
tavalae.m@royaninstitute.org

Received: 10 Nov, 2018
Accepted: 16 Feb, 2019

Abstract

Background and Objectives: Antioxidant alpha lipoic acid and β -defensin 1 protein may have a positive effect on the quality of sperm parameters. In this study, the effect of sperm incubation with alpha lipoic acid antioxidant and β -defensin 1 protein were assessed on sperm motility and viability at different times.

Methods: In this experimental study, routine semen analysis was carried out on 59 infertile men according to the World Health Organization criteria (2010). Semen samples were processed by density gradient centrifugation. Then, samples were divided into three groups: control, processed semen sample treated with alpha-lipoic acid, and processed semen sample treated with beta-defensin 1. Then, all portions were evaluated for sperm motility and viability. The results were analyzed using one-way ANOVA.

Results: The mean percentage of motility in alpha-lipoic acid and β -defensin 1 groups after 1 and 2 hours, showed a statistically significant increase ($p=0.05$), while at the 3rd hour, only alpha-lipoic acid group had a significant increase in sperm motility. The mean percentage of sperm viability in alpha-lipoic acid and β -defensin 1 groups showed a significant increase compared to the control group after 1, 2, and 3 hours ($p\leq 0.05$).

Conclusion: Although both alpha-lipoic acid and beta-defensin protein are effective for maintenance of sperm motility and viability after separation of time, it is recommended to use alpha-lipoic acid in sperm processing medium to maintain sperm motility and viability.

Keywords: Thiocctic acid; Beta-defensin; Sperm motility.

DOI: 10.29252/qums.13.3.1

مقایسه اثر آنتی اکسیدانت آلفالیپوئیک اسید و پروتئین بتا دفنسنین - ۱ بر تحرک و حیات اسپرم در زمان‌های مختلف انکوباسیون

ریحانه خیام عابد^۱، مرضیه تولائی^{۱*}، محمدحسین نصر اصفهانی^{۱،۲}

چکیده

زمینه و هدف: آنتی اکسیدانت آلفالیپوئیک اسید و پروتئین بتا دفنسنین - ۱ ممکن است بر کیفیت پارامترهای اسپرم تأثیر مثبتی داشته باشد. در این مطالعه تأثیر انکوباسیون اسپرم با آنتی اکسیدانت آلفالیپوئیک اسید و پروتئین بتا دفنسنین - ۱ بر تحرک و حیات اسپرم در زمان‌های مختلف بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه مداخله‌ای، آنالیز روتین مایع منی طبق معیار سازمان بهداشت جهانی (سال ۲۰۱۰) بر روی ۵۹ مرد نابارور انجام شد. نمونه‌های مایع منی توسط روش سانتریفوژ گرادیان غلظت شست‌وشو داده شدند. سپس نمونه‌ها به سه گروه شامل: کنترل، اسپرم‌های انکوبه‌شده با آلفالیپوئیک اسید و اسپرم‌های انکوبه‌شده با بتا دفنسنین - ۱ تقسیم شدند. سپس بر روی هریک از گروه‌های مذکور، ارزیابی تحرک و حیات انجام گرفت. داده‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه آنالیز شدند.

یافته‌ها: میانگین درصد تحرک اسپرم‌ها در گروه‌های آلفالیپوئیک اسید و بتا دفنسنین - ۱ نسبت به گروه کنترل پس از گذشت ۱ و ۲ ساعت، از لحاظ آماری افزایش معنی‌داری یافت ($p \leq 0/05$)؛ درحالی‌که در ساعت ۳ تنها گروه آلفالیپوئیک اسید در میانگین درصد تحرک، افزایش معنی‌داری نشان داد. میانگین درصد حیات اسپرم‌ها در گروه آلفالیپوئیک اسید و بتا دفنسنین - ۱ نسبت به گروه کنترل پس از گذشت ۱، ۲ و ۳ ساعت، از لحاظ آماری افزایش معنی‌داری یافت ($p \leq 0/05$).

نتیجه‌گیری: اگرچه هر دو آنتی اکسیدانت آلفالیپوئیک اسید و پروتئین بتا دفنسنین - ۱ جهت حفظ تحرک و حیات اسپرم پس از گذشت زمان مؤثرند، ولی پیشنهاد می‌گردد جهت حفظ حیات و تحرک اسپرم، از آلفالیپوئیک اسید در محیط شست‌وشوی اسپرم استفاده شود.

کلیدواژه‌ها: تایوستیک اسید؛ بتا دفنسنین؛ تحرک اسپرم.

^۱گروه زیست‌فناوری تولیدمثل، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌فناوری جهاد دانشگاهی، اصفهان، ایران.

^۲مرکز باروری و ناباروری، اصفهان، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات:

مرضیه تولائی؛ گروه زیست‌فناوری تولیدمثل، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌فناوری جهاد دانشگاهی، اصفهان، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
tavalaee.m@royaninstitute.org

تاریخ دریافت: ۹۷/۸/۱۹

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۲۷

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Khayamabed R, Tavalae M, Nasr Esfahani MH. Comparison of the effect of Alpha Lipoic Acid (ALA) and Beta-defensin 1 protein on human sperm motility and viability in different times of incubation. Qom Univ Med Sci J 2019;13(3):1-9. [Full Text in Persian]

دارد. آلفالیپوئیک اسید از جمله آنتی‌اکسیدانت‌های کارا در محیط هیدروفیلیک و لیپوفیلیک می‌باشد و عملکردهایی به شرح زیر دارد:

۱- پاک کردن ROSهایی مثل رادیکال هیدروکسیل، اکسیژن منفرد و RNSهایی مانند پراکسی نترات و نیتریک اکساید (۱۲)؛
۲- احیای آنتی‌اکسیدانت‌های بیرونی و درونی مانند ویتامین E، ویتامین C، کاتالاز و گلوکاتایون ردوکتاز (۱۱)؛

۳- بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانت‌های سوپراکساید دسموتاز، گلوکاتامات اگرالواستات ترانس‌آمیناز، کاتالاز و لاکتات دهیدروژناز (۱۲)؛ ۴- ایجاد یک سپر قوی در غشای سلولی اسپرم در برابر حمله رادیکال‌های آزاد (۱۱).

پپتیدهای ضد میکروبی (AMP)، مولکول‌های زیستی فعالی هستند که توسط ارگانسیم‌های زیادی تولید شده و به‌عنوان اجزای ضروری پاسخ ایمنی ذاتی آن‌ها محسوب می‌شوند. نقش اولیه این پپتیدها، دفاع میزبانی است که بر میکروارگانسیم‌های پاتوژن مهاجم، اثر سایتوتوکسیک می‌گذارد (۱۳). یکی از این پپتیدها، دفنسن (Defensin) نام دارد که از طریق ایجاد سوراخ درون غشای سلول هدف خود، باعث مرگ آن می‌شود. دفنسن‌ها (Defensin) به دو گروه α -defensins و β -defensins دسته‌بندی می‌شوند (۱۴).

دفنسن β (DEFB1) که HBD-1 هم نام دارد، اولین عضو شناخته‌شده خانواده بتا دفنسن‌ها است (۱۵). این دفنسن دارای فعالیت ضد میکروبی در برابر ویروس، باکتری و قارچ می‌باشد (۱۶). DEFB1 نه تنها در سلول‌های اپی‌تلیالی مسیر تناسلی مرد بیان می‌شود؛ بلکه در پلاسمای مایع منی و اسپرم نیز وجود دارد (۱۷) که نشان می‌دهد DEFB1 ترشح‌شده از سلول‌های اپی‌تلیالی مسیر تناسلی مرد، می‌تواند به اسپرم متصل شود (۱۸). بتا دفنسن‌ها بر روی سطح اسپرم دارای یک نقش مهمی از ظرفیت‌یابی و واکنش آکروزومی زودرس هستند؛ بنابراین در صورت عدم وجود آن‌ها در اسپرم ممکن است این دو فرآیند به‌صورت زود هنگام رخ دهد که خود می‌تواند یک علت عدم موفقیت در لقاح و باروری محسوب گردد (۱۹). مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر آنتی‌اکسیدانت آلفالیپوئیک اسید و پروتئین بتا دفنسن بر روی تحرک و حیات اسپرم پس از انکوباسیون در زمان‌های مختلف صورت گرفت.

اولین قدم جهت تشخیص و درمان ناباروری، بررسی پارامترهای اسپرم (تعداد، تحرک و شکل اسپرم) می‌باشد. افراد نابارور با کاهش کیفیت پارامترهای اسپرم مواجه‌اند (۱،۲)؛ لذا احتمال کاهش باروری در این افراد بیشتر گزارش شده و جهت درمان آن‌ها نیز تکنیک‌های کمک باروری؛ از جمله تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) و یا لقاح آزمایشگاهی (IVF) پیشنهاد می‌شود. در حین انجام این تکنیک‌ها، کیفیت پارامترهای اسپرم در طی آماده‌سازی اسپرم باید حفظ گردد (۳) تا اسپرم‌های عملکردی از اسپرم‌های غیرطبیعی که قادر به باروری تخمک نیستند، جدا شوند. دوروش معمول آماده‌سازی اسپرم که بیشتر در مراکز درمانی ناباروری استفاده می‌شود، DGC و Swim-up نام دارد. عمل سانتیفریوژ در حین آماده‌سازی اسپرم، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را تولید می‌کند (۴،۵). یکی از ترکیبات بسیار مهم پلاسمای آنتی‌اکسیدانت‌ها هستند که با حذف پلاسمای در حین شست‌وشو، از اسپرم حذف می‌شوند. از دیگر ترکیبات مهم پلاسمای نیز می‌توان به پپتیدهای ضد میکروبی اشاره کرد که در طی فرآیند بلوغ اسپرم نقش حفاظتی و عملکردی دارند.

تحت شرایط فیزیولوژیکی، اسپرماتوزوآ، مقدار کمی ROS تولید می‌کند که برای ظرفیت‌یابی و واکنش آکروزومی مورد نیاز است. تولید بیش از حد ROS در مایع منی به‌وسیله لکوسیت‌ها، همچنین اسپرم‌های غیرطبیعی می‌تواند یک علت ناباروری باشد (۶). هنگامی که ROSها و گونه‌های فعال نیتروژن (RNS) به مقدار زیاد تولید شوند، باعث تخریب بیولوژیکی شده که استرس اکسیداتیو و استرس نیتروژاتیو نامیده می‌شود (۷)، و با تأثیر بر روی ساختار غشا منجر به از دست رفتن قابلیت نفوذپذیری انتخابی غشای اسپرم و در نهایت، مرگ سلولی می‌گردد (۸). تخریب اکسیداتیو غشای پلاسمایی و میتوکندری اسپرم منجر به قطعه‌قطعه شدن DNA، کاهش عملکرد و تحرک اسپرم شده که در نهایت، به ناباروری ختم می‌شود (۹).

برای به حداقل رساندن فعالیت رادیکال‌های آزاد، استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد (۱۰). اخیراً آنتی‌اکسیدانتی به‌نام آلفالیپوئیک اسید شناخته‌شده که یک مولکول آمفی‌پاتیک است و در غشای سلولی و سیتوزول وجود

اسپرم‌های جداشده با استفاده از روش DGC به سه بخش تقسیم شدند:

الف) نمونه تیمار شده با غلظت ۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از بتا دفسنین - ۱ (Abcam, Cambridge, MA) (۱۸)؛

ب) نمونه تیمار شده با غلظت ۰/۰۲ میلی‌مولار از آلفالیپوئیک اسید (SIGMA-ALDRICH, Darmstadt, Germany) (۲۱)؛

ج) نمونه کنترل که به آن فقط محیط VitaSperm به علاوه ۱۰٪ آلبومین اضافه شد.

سپس پس از گذشت ۱، ۲ و ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، بر روی هر کدام از گروه‌ها به‌طور جداگانه، تحرک و حیات اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت.

در ادامه، رنگ‌آمیزی ائوزین - نیگروزین با توجه به استانداردهای WHO انجام شد. ائوزین ۱٪

(Merck KGaA, Darmstadt, Germany) و نیگروزین ۱۰٪

(Merck KGaA, Darmstadt, Germany) در آب مقطر تهیه و

نسبت حجمی ۱:۲ از اسپرم با ائوزین ۱٪ مخلوط شد. پس از ۳۰

ثانیه، حجم مشابهی از نکروزین به این مخلوط اضافه گردید،

سپس اسپرم‌های نازک تهیه و با استفاده از میکروسکوپ نوری

۲۰۰ در بزرگنمایی X ۱۰۰۰، اسپرم‌ها مشاهده شدند. در زیر

میکروسکوپ اسپرم‌های زنده بدون رنگ و اسپرم‌های غیرزنده با

رنگ قرمز قابل‌رؤیت بودند که نتایج به‌صورت درصد حیات

اسپرم گزارش گردید.

در آنالیز آماری جهت بررسی پارامترهای اسپرمی، از روش آنالیز

توصیفی استفاده شد. اطلاعات به‌دست‌آمده از این مطالعه برای

مقایسه اثر آنتی‌اکسیدانت آلفالیپوئیک اسید و پروتئین بتا دفسنین

بین گروه‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ با روش

واریانس یک‌طرفه تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، کمتر از ۰/۰۵

در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، ۵۹ فرد مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری

اصفهان با پارامترهای اسپرمی مطابق جدول زیر بررسی شدند.

ارزیابی پارامترهای اسپرمی در جدول آمده است.

این مطالعه مداخله‌ای بر روی ۵۹ فرد نابارور مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان انجام شد. قبل از ورود بیمار به طرح و استفاده از اضافه نمونه مایع منی افراد، مراحل طرح کاملاً به اطلاع بیمار رسانده شد و از آن‌ها فرم رضایت‌نامه کتبی اخذ گردید. مایع منی پس از ۳ الی ۴ روز پرهیز از نزدیکی توسط زوجین، جمع‌آوری شد و نمونه در ظرف پلاستیکی استریل (عاری از اثرات سمی بر روی اسپرم کنترل‌شده) ریخته شد، سپس برای مایع شدن به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و مطابق استاندارد سازمان بهداشت جهانی (۱)، پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و شکل) به‌وسیله میکروسکوپ نوری آنالیز شدند.

غلظت اسپرم به‌وسیله لام شمارشگر اسپرم و تحرک اسپرم به کمک نرم‌افزار تجزیه و تحلیل مایع اسپرم

(CASA, Video Test, Ltd: version Sperm 2.1# 1990-2004,)

(Russia) بررسی شد. قسمت باقیمانده نمونه مایع منی جهت

ارزیابی تأثیر آلفالیپوئیک اسید و بتا دفسنین پس از گذشت زمان

۱، ۲ و ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بر حرکت و

زنده ماندن اسپرم در پی روش جداسازی اسپرم‌های طبیعی براساس

سانتریفوژ گرادیان چگالی (DGC)، مورد استفاده قرار گرفت.

آماده‌سازی اسپرم براساس گرادیان چگالی طبق روش

خیرالهی - کوهستانی و همکاران (۲۰) انجام شد. به‌طور خلاصه،

دو شیب غلظت گرادیان ۹۰ و ۴۵٪ از

SpermGrad™ (Vitrolife, Gothenburg, Sweden) تهیه شد،

سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از غلظت ۹۰٪ و ۱/۵ میلی‌لیتر از غلظت ۴۵٪

به‌ترتیب در پایین و بالای یک لوله قرار گرفتند. ۱/۵ میلی‌لیتر

نمونه منی شسته‌شده در بالای لایه گرادیان ۴۵٪ قرار داده شد و

لوله به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰rpm (۳۰۰g) سانتریفوژ شد.

پس از اتمام سانتریفوژ، محلول رویی حاوی پلاسمای منی با پیپت

پاستور آسپیره‌شده به آرامی دور ریخته شد و به اسپرم‌های

ته‌نشین شده محیط VitaSperm (Inoclon, Tehran, Iran) با ۱۰٪

آلبومین اضافه گردید.

جدول: میانگین پارامترهای اسپرمی در نمونه مایع منی

پارامترها	حداقل	حداکثر	میانگین \pm خطای معیار
غلظت اسپرم (میلیون بر میلی لیتر)	۱۵	۱۲۰	۶۵/۱۳ \pm ۳/۰۵
حجم نمونه (میلی لیتر)	۱/۲	۸	۳/۶ \pm ۰/۲
درصد تحرک اسپرم	۲۰	۷۰	۵۷/۳۹ \pm ۱/۱۴
درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم	۹۴	۹۸	۹۷/۰۸ \pm ۰/۸۱

میانگین درصد تحرک اسپرم پس از گذشت یک ساعت در گروه کنترل $61/1 \pm 1/64$ ، گروه آلفالیپوئیک اسید $79/03 \pm 1/57$ و گروه بتا دفنسنین - ۱، $79/4 \pm 2/55$ به دست آمد. به علاوه، پس از گذشت ۲ ساعت تحرک اسپرم در گروه کنترل و آلفالیپوئیک اسید و بتادفنسنین - ۱ به ترتیب $51/43 \pm 2/45$ ، $66/5 \pm 1/24$ و $66/02 \pm 3/52$ و پس از گذشت سه ساعت به ترتیب $44/95 \pm 1/73$ ، $58/39 \pm 1/59$ ، $45/42 \pm 5/93$ بود.

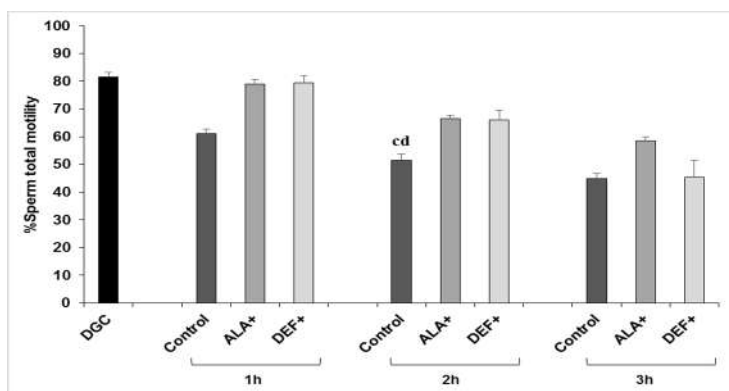
میانگین درصد تحرک پیش‌رونده اسپرم پس از گذشت یک ساعت در گروه کنترل $49/27 \pm 4/5$ ، گروه آلفالیپوئیک اسید $62/02 \pm 3/63$ و گروه بتا دفنسنین - ۱، $63/57 \pm 2/85$ به دست آمد. همچنین پس از گذشت ۲ ساعت، درصد تحرک پیش‌رونده اسپرم در گروه کنترل و آلفالیپوئیک اسید و بتادفنسنین - ۱ به ترتیب $41/02 \pm 3/7$ ، $49/16 \pm 3/63$ و $52/32 \pm 3/69$ و پس از گذشت سه ساعت به ترتیب $37/52 \pm 1/85$ ، $45/94 \pm 2/95$ و $34/56 \pm 5/4$ بود.

به ترتیب $50/6 \pm 3/35$ ، $66/54 \pm 2/84$ و $68/62 \pm 3/17$ و پس از گذشت سه ساعت میانگین درصد تحرک اسپرم‌های تیمار شده با آلفالیپوئیک اسید و بتا دفنسنین - ۱ در ساعات ۱ و ۲ نسبت به گروه کنترل به نسبت مشابه افزایش یافت که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($p=0/05$)، اما در ساعت ۳ فقط اسپرم‌های تیمار شده با آلفالیپوئیک اسید، افزایش معنی‌داری در درصد تحرک خود داشتند. همچنین با مقایسه میانگین درصد تحرک پیش‌رونده، در اسپرم‌های تیمار شده مشخص گردید درصد تحرک پیش‌رونده برای نمونه تیمار شده با آلفالیپوئیک اسید در هر سه ساعت، افزایش معنی‌داری داشته است، اما برای نمونه تیمار شده با بتا دفنسنین - ۱ در ساعات ۱ و ۲، افزایش بیشتری در میانگین درصد تحرک پیش‌رونده نسبت به نمونه تیمار شده با آلفالیپوئیک اسید مشاهده گردید، ولی در ساعت ۳، تغییری در درصد تحرک پیش‌رونده دیده نشد.

میانگین درصد حیات اسپرم پس از گذشت یک ساعت در گروه کنترل $67/64 \pm 2/95$ ، گروه آلفالیپوئیک اسید $79/31 \pm 2/14$ و گروه بتا دفنسنین - ۱، $74/44 \pm 2/04$ به دست آمد. همچنین پس از گذشت ۲ ساعت، درصد حیات اسپرم در گروه کنترل، آلفالیپوئیک اسید و بتادفنسنین ۱ به ترتیب $56/98 \pm 3/42$ ، $56/98 \pm 3/42$ و $56/98 \pm 3/42$ بود.

نمودار شماره ۳ میانگین درصد حیات اسپرم‌های تیمار شده را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. طبق نمودار، در هر سه ساعت میانگین درصد حیات اسپرم‌های تیمار شده هم با آلفالیپوئیک اسید و هم با بتا دفنسنین - ۱ افزایش معنی‌داری داشت و در نمونه تیمار شده با آلفالیپوئیک اسید افزایش بیشتری مشاهده گردید.

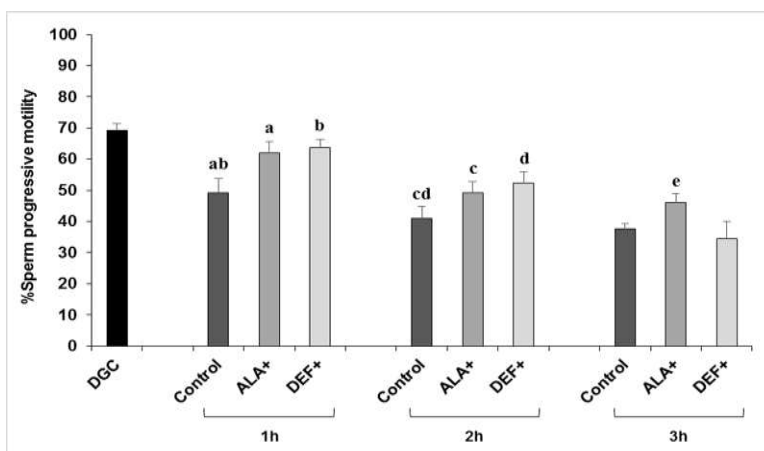
میانگین درصد حیات اسپرم در سه گروه کنترل، تیمار شده با آلفالیپوئیک اسید و تیمار شده با بتا دفنسنین - ۱، ۲ و ۳ ساعت. حروف مشترک، نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح آماری است:



نمودار شماره ۱: مقایسه میانگین درصد تحرک اسپرم در سه گروه کنترل، تیمار شده با آلفالیپوئیک اسید و تیمار شده با بتا دفنسنین - ۱، ۲ و ۳ ساعت.

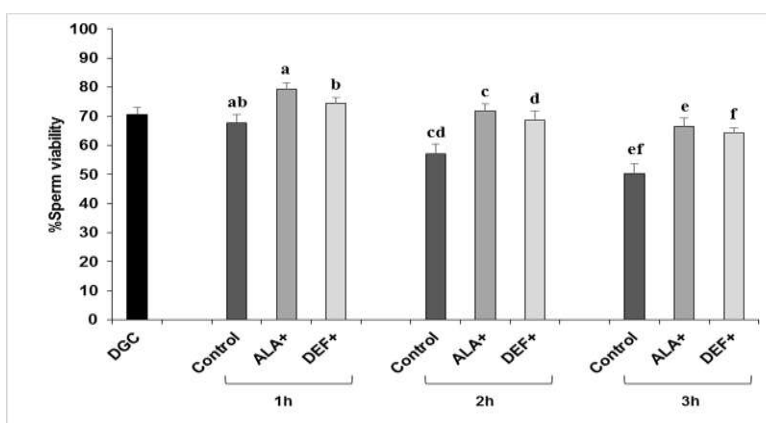
حروف مشترک، نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح آماری است:

(a) بین گروه کنترل و ALA+ پس از یک ساعت ($p=0/000$)؛ (b) بین گروه کنترل و DEF+ پس از یک ساعت ($p=0/000$)؛ (c) بین گروه کنترل و ALA+ پس از ۲ ساعت ($p=0/000$)؛ (d) بین گروه کنترل و DEF+ پس از ۲ ساعت ($p=0/000$)؛ (e) بین گروه کنترل و ALA+ پس از سه ساعت ($p=0/000$).



نمودار شماره ۲: مقایسه میانگین درصد تحرک پیش‌رونده اسپرم در سه گروه کنترل، تیمار شده با آلفالیپوئیک اسید و تیمار شده با بتا دفسین - ۱ پس از گذشت ۱، ۲ و ۳ ساعت. حروف مشترک، نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح آماری است:

(a) بین گروه کنترل و ALA+ پس از یک ساعت (p=۰/۰۰۲): b: بین گروه کنترل و DEF+ پس از یک ساعت (p=۰/۰۰۱): c: بین گروه کنترل و ALA+ پس از ۲ ساعت (p=۰/۰۴۱): d: بین گروه کنترل و DEF+ پس از ۲ ساعت (p=۰/۰۴۹): e: بین گروه کنترل و ALA+ پس از سه ساعت (p=۰/۰۳۸).



نمودار شماره ۳: مقایسه میانگین درصد حیات اسپرم در سه گروه کنترل، تیمار شده با آلفالیپوئیک اسید و تیمار شده با بتا دفسین - ۱ پس از گذشت ۱، ۲ و ۳ ساعت. حروف مشترک، نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح آماری است:

(a) بین گروه کنترل و ALA+ پس از یک ساعت (p=۰/۰۰۱): b: بین گروه کنترل و DEF+ پس از یک ساعت (p=۰/۰۱۲): c: بین گروه کنترل و ALA+ پس از ۲ ساعت (p=۰/۰۰۱): d: بین گروه کنترل و DEF+ پس از ۲ ساعت (p=۰/۰۱۳): e: بین گروه کنترل و ALA+ پس از سه ساعت (p=۰/۰۰۱): f: بین گروه کنترل و DEF+ پس از سه ساعت (p=۰/۰۰۲).

بحث

می‌شود. تحقیقات نشان داده‌اند روند شست‌وشوی اسپرم به علت حذف پلاسمای مایع منی باعث کاهش ظرفیت دفاعی آنتی‌اکسیدانت و ایجاد استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش سطح ROS می‌گردد (۵)، که این افزایش سبب پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم و آسیب DNA اسپرم می‌شود (۲۱) که در نهایت، می‌تواند منجر به کاهش پتانسیل باروری گردد. آلفالیپوئیک اسید یک آنتی‌اکسیدانت قوی محلول در آب و چربی بوده که با پاک‌سازی ROS اضافی، از تخریب ساختمانی غشای سلول جلوگیری کرده و موجب کاهش میزان پراکسیدها می‌شود (۷،۲۱).

در حال حاضر تعداد زیادی از زوجها با مشکل ناباروری مواجه‌اند. این زوجها می‌توانند با مراجعه به مراکز درمان ناباروری، جهت درمان از تکنیک‌های کمک باروری استفاده کنند. قبل از استفاده از این تکنیک‌ها باید نمونه مایع منی جهت جداسازی اسپرم‌های طبیعی از غیرطبیعی به وسیله روش‌های جداسازی اسپرم آماده شود. در طی این آماده‌سازی، به دلیل استرس‌های فیزیکی از جمله فشار دور سانتیفریژ، محیط‌های کشت و غیره، کاهش قابل توجهی در درصد تحرک، حیات و افزایش آسیب‌های غشایی و ساختار کروماتین اسپرم دیده

Archive of SID

اما پس از گذشت سه ساعت تنها اسپرم‌های انکوبه‌شده با آلفالیپوئیک اسید، افزایش معنی‌داری در تحرک نشان دادند. همچنین طبق نمودار شماره ۳، در ارزیابی حیات اسپرم‌ها پس از گذشت ۱، ۲ و سه ساعت در گروه انکوبه‌شده با آلفالیپوئیک اسید و گروه انکوبه‌شده با بتا دفسنین - ۱ مشاهده گردید گروه انکوبه‌شده با آلفالیپوئیک اسید نسبت به گروه انکوبه‌شده با بتا دفسنین - ۱ افزایش بیشتری داشته است.

این نتایج، بیانگر نقش دفاعی و حفاظتی آلفالیپوئیک اسید و بتا دفسنین از اسپرم در برابر عوامل برونزاد و درونزاد است؛ به نحوی که آن‌ها توانسته‌اند از پیشروی زنجیره تولید و افزایش ROS در درون سلول جلوگیری و با جارو کردن رادیکال‌های آزاد، غشای اسپرم را در برابر خطرات احتمالی آسیب محافظت کنند. اگرچه در این مطالعه سطح ROS و آسیب DNA بررسی نشد، ولی مطالعات پیشین نشان داده‌اند ارتباط مثبت معنی‌داری بین سلامت DNA اسپرم، درصد تحرک و حیات اسپرم وجود دارد (۲۲). بنابراین اگر اسپرمی دچار آسیب DNA شده باشد به احتمال زیاد به سمت فرآیند مرگ سلولی یا آپوپتوز گرایش پیدا می‌کند و توانایی حفظ حیات و تحرک تا سه ساعت پس از انکوباسیون در شرایط آزمایشگاهی را نخواهد داشت؛ لذا به نظر می‌رسد افزودن برخی از آنتی‌اکسیدانت‌های کارا و پروتئین‌های دفاعی می‌تواند به بهبود کسب موفقیت نتایج تکنیک‌های کمک باروری جهت افراد نابارور کمک کند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد می‌توان از آنتی‌اکسیدانت آلفالیپوئیک اسید به دلیل ویژگی منحصربه‌فرد حلال‌بودن در آب و چربی، همچنین از پروتئین بتا دفسنین به علت نقش دفاعی و محافظتی در برابر اثرات میکروارگانیسم‌های داخل مایع منی و استرس‌های اکسیداتیو، جهت حفظ درصد تحرک و حیات اسپرم در محیط‌های شست‌وشوی اسپرم استفاده کرد. برتری چشمگیری در استفاده از این دو ترکیب در نتایج وجود ندارد، ولی از لحاظ مقرون‌به‌صرفه بودن و دسترسی آسان، استفاده از آلفالیپوئیک اسید پیشنهاد می‌گردد.

به‌علاوه در روند شست‌وشوی اسپرم، پروتئین‌های موجود در پلاسما نیز از اسپرم‌ها جدا می‌شوند. یکی از این پروتئین‌ها، بتا دفسنین - ۱ نامیده می‌شود که یک پروتئین ترشحی است و در طی فرآیند بلوغ اسپرم، دفاع میزبانی و تنظیم عملکرد اسپرم نقش مهمی دارد. همچنین این پروتئین قادر است میزان Ca^{2+} درون سلولی را افزایش دهد؛ به همین جهت باعث افزایش تحرک اسپرم می‌شود (۱۸).

تابه‌حال اثر آلفالیپوئیک اسید بر روی حیات و تحرک اسپرم انسانی بررسی نشده است، اما Ibrahim و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند انکوباسیون اسپرم بز با غلظت ۰/۰۲ میلی‌مولار از آلفالیپوئیک اسید قادر است تحرک و حیات اسپرم را حفظ کند (۲۱). از طرفی، Diao و همکاران بیان کردند انکوباسیون اسپرم انسان با غلظت ۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از بتا دفسنین - ۱ نیز می‌تواند تحرک و حیات اسپرم را حفظ کند (۱۸). از آنجایی که تاکنون در مطالعه‌ای به بررسی و مقایسه دقیق اثر دو ماده آلفالیپوئیک اسید، بتا دفسنین - ۱ بر تحرک و حیات اسپرم در زمان‌های مختلف انکوباسیون پرداخته نشده بود؛ لذا در این مطالعه سعی گردید تأثیر اسپرم‌های انکوبه‌شده با این دو ماده از لحاظ تحرک و حیات بررسی شود.

نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان داد درصد تحرک اسپرم‌های انکوبه‌شده با آلفالیپوئیک اسید و بتا دفسنین - ۱ نسبت به گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد، همچنین درصد حیات اسپرم‌های انکوبه‌شده با این دو ماده نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری نشان داد. این یافته‌ها با مطالعات Ibrahim و همکاران در گونه اسپرم بز (۲۱) و Diao و همکاران همخوانی داشت (۱۸). در توجیه این نتایج می‌توان گفت پلاسما منی شامل ترکیباتی است که در حفظ تحرک و حیات اسپرم نقش دارند و پس از حذف پلاسما در آزمایشگاه، با شبیه‌سازی کردن محیط شست‌وشوی اسپرم و مایع منی می‌توان تا حدودی از اثرات مخرب سانتریفوژ کاست.

در مطالعه حاضر، نتایج به‌دست‌آمده از نمودار شماره ۱ نشان داد میزان افزایش تحرک اسپرم‌های انکوبه‌شده با آلفالیپوئیک اسید و بتا دفسنین - ۱ پس از گذشت ۱ و ۲ ساعت به نسبت مشابه است،

انجام شد؛ لذا از تمامی کارکنان محترم مراکز فوق کمال تشکر و قدردانی را داریم.

این طرح (با کد ۹۵۰۰۰۲۳۳) با همکاری پژوهشکده زیست‌فناوری پژوهشگاه رویان و مرکز باروری ناباروری اصفهان

References:

1. WHO, World Health Organization Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2010. Link
2. Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril* 2006;85(3):629-34. Link
3. Cissen M, Bensdorp A, Cohlen BJ, Repping S, de Bruin JP, van Wely M. Assisted reproductive technologies for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2016;26(2):CD000360. Link
4. Yoshida K, Yamasaki T, Yoshiike M, Takano S, Sato I, Iwamoto T. Quantification of seminal plasma motility inhibitor/semenogelin in human seminal plasma. *J Androl* 2003;24(6):878-84. Link
5. Chi HJ, Kim JH, Ryu CS, Lee JY, Park JS, Chung DY, et al. Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2008;23(5):1023-8. Link
6. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl* 2005;26(6):654-60. Link
7. Golbidi S, Laher I. Antioxidant therapy in human endocrine disorders. *Med Sci Monit* 2010;16(1):RA9-24. Link
8. Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* 2008;59(1):2-11. Link
9. Bahreinian M, Tavalae M, Abbasi H, Kiani-Esfahani A, Shiravi AH, Nasr-Esfahani MH. DNA hypomethylation predisposes sperm to DNA damage in individuals with varicocele. *Syst Biol Reprod Med* 2015;61(4):179-86. Link
10. Anghel A, Zamfiresco S, Dragomir C, Nadullo D. The effects of antioxidants on the cytological parameters of cryopreserved buck semen. *Rom Biotechnol Lett* 2010;15(3):26-32. Link
11. Moura FA, de Andrade KQ, dos Santos JC, Goulart MO. Lipoic Acid: its antioxidant and anti-inflammatory role and clinical applications. *Curr Top Med Chem* 2015;15(5):458-83. Link
12. Shen T, Jiang ZL, Li CJ, Hu XC, Li QW. Effect of alpha-lipoic acid on boar spermatozoa quality during freezing-thawing. *Zygote* 2016;24(2):259-65. PubMed
13. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol* 2004;75(1):39-48. Link
14. Dorin JR, Barratt CL. Importance of β -defensins in sperm function. *Mol Hum Reprod* 2014;20(9):821-6. Link
15. Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J. Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci* 2006;63(11):1294-313. Link
16. Prado-Montes de Oca E. Human beta-defensin 1: a restless warrior against allergies, infections and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42(6):800-4. Link
17. Com E, Bourgeon F, Evrard B, Ganz T, Colleu D, Jégou B, et al. Expression of antimicrobial defensins in the male reproductive tract of rats, mice, and humans. *Biol Reprod* 2003;68(1):95-104. Link

18. Diao R, Fok KL, Chen H, Yu MK, Duan Y, Chung CM, et al. Deficient human β -defensin 1 underlies male infertility associated with poor sperm motility and genital tract infection. *Sci Transl Med* 2014;6(249):249ra108. Link
19. Colledge WH. Defending sperm function. *PLoS Genet* 2013;9(10):e1003889. Link
20. Kheirollahi-Kouhestani M, Razavi S, Tavalae M, Deemeh MR, Mardani M, Moshtaghian J, et al. Selection of sperm based on combined density gradient and Zeta method may improve ICSI outcome. *Hum Reprod* 2009;24(10):2409-16. Link
21. Ibrahim SF, Osman K, Das S, Othman AM, Majid NA, Rahman MP. A study of the antioxidant effect of alpha lipoic acids on sperm quality. *Clinics (Sao Paulo)* 2008;63(4):545-50. Link
22. Ruiz-Lopez MJ, Evenson DP, Espeso G, Gomendio M, Roldan ER. High levels of DNA fragmentation in spermatozoa are associated with inbreeding and poor sperm quality in endangered ungulates. *Biol Reprod* 2010;83(3):332-8. PubMed