

بررسی اثرات اسکوربات بر پارامترهای اسپرم انسان

مهران عربی Ph.D. ✨

دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

✨ آدرس مکاتبه: شهرکرد، صندوق پستی: ۱۱۵، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

پست الکترونیک: mehranarabi@hotmail.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۴/۳/۱، پذیرش مقاله: ۸۴/۹/۱۲

*** هدف:** بررسی اثر غلظت های متفاوت از اسکوربات (ویتامین C) بر ساختار غشاء، درصد سلول های فعال، و واکنش اکروزامی اسپرم های انسان در محیط های حاوی یون های فروس (Fe^{2+})، به عنوان محرک پراکسیداسیون چربی های غشاء (Lipid Peroxidation: LPO)

*** مواد و روش ها:** تعداد ۱۲ نمونه اسپرمی از افراد سالم ساکن در شهرستان شهرکرد، به صورت داوطلبانه، اخذ و جمع آوری گردید. نمونه های مذکور پس از شستشو با محلول رینگرتایرود دو بار مورد عمل سانتریفوژ (۵۰۰ Xg، هر بار به مدت ۱۰ دقیقه) قرار گرفته تا پلاسمای منی از سلول های اسپرم به طور کامل جدا گردد. رسوب های اسپرمی حاصله (حل شده در حداقل رینگرت) در مراحل بعدی پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور بررسی میزان پراکسیداسیون چربی های غشا (LPO) میزان مالون دی آلدیید (Malondialdehyde: MDA) تولید شده در محیط با روش اسپکتروفتومتری مورد سنجش قرار گرفت. آزمایش رنگ آمیزی با اتوزین نیز با هدف تعیین درصد تعداد سلول های اسپرم زنده و غیرزنده در طی سه ساعت انکوباسیون، مورد استفاده قرار گرفت. به منظور بررسی چگونگی عملکرد سلول های اسپرم در واکنش اکروزامی بر اساس آزمایش هضم ژلاتین عمل شد و بدین منظور اسپرم های تیمار شده با آهن و یا اسکوربات به لام های ژلاتین دار اضافه شده و در آخر به کمک کوماسی بلو رنگ آمیزی گردیدند. تعداد سلول های اسپرم واجد هاله (محل هضم ژلاتین در نتیجه واکنش اکروزامی در اطراف سر اسپرم ها) و نیز سلول های بدون هاله شمارش و ثبت گردیدند. در این پژوهش روش آماری t-test مورد استفاده قرار گرفت.

*** یافته ها:** نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد یون های آهن موجب افزایش میزان رادیکال های آزاد در محیط حاوی اسپرم ها شد. اسکوربات در غلظت های کمتر از ۱۰۰۰ میکرومولار موجب کاهش روند LPO (کاهش معنی داری در میزان MDA)، افزایش واکنش های اکروزامی (افزایش هاله ها)، و نیز بالا رفتن درصد اسپرم های فعال در محیط گردید. از سوی دیگر، اسکوربات در محدوده غلظتی ۱۰۰۰ میکرومولار و بیشتر از آن پس از ایجاد کمپلکس با یون های آهن، به عنوان یک پرواکسیدان عمل نموده و موجب بروز آسیب های شدید در ساختار غشای اسپرم ها (افزایش میزان MDA)، کاهش در میزان درصد واکنش های اکروزامی، و نیز کاهش تعداد اسپرم های فعال گردید.

*** نتیجه گیری:** در مجموع، اسکوربات در غلظت های مختلف اثرات متفاوتی داشته و محققین با عنایت به این رویکرد منفی از اسکوربات، می بایست آن را در زمینه هایی نظیر لقاح آزمایشگاهی، کشت سلولی و نگهداری و ذخیره سازی سلول های جنسی، به طور جدی مورد نظر قرار داده تا اثرات مخرب آن را در سیستم های زیستی به حداقل رسانند.

کلیدواژگان: اسپرم انسان، اسکوربات، پراکسیداسیون چربی ها، واکنش اکروزامی

فصلنامه پزشکی باخته، سال هفتم، شماره ۳، پاییز ۸۴، صفحات ۱۶۴-۱۷۱

مقدمه

در شکل ظاهری این سلول ها شده و بدین ترتیب درصدهایی از ناباروری را ایجاد می کنند. یکی از تظاهرات مهم استرس اکسیداتیو در سلول ها، پراکسیداسیون چربی های غشای (LPO) است. LPO پدیده ای فیزیولوژیکی بوده و در تمامی سلول هایی که غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع اند، رخ داده و بنیان آن بر مجموعه ای از واکنش ها که شامل تخریب و تشکیل مجدد پیوندهای دوگانه در ساختار این اسیدها است، بنا نهاده شده است. روند LPO موجب تغییر ساختار غشا، کاهش تحرک، مهار آنزیم ها و ایجاد آسیب در DNA سلول های اسپرم شده، که نتیجه آنان القای ناباروری است (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶). در هر دو شرایط *In vivo* و *In vitro*، جهت معکوس سازی اثرات

تجمع عوامل محیطی سمی در بدن جانوران به عنوان یکی از مهم ترین علل بروز ناباروری در نظر گرفته می شود. متابولیت های اکسیژن (Reactive Oxygen Species: ROS) نظیر رادیکال هیدروکسیل (OH) و آنیون سوپراکسید (O_2^-) قادرند تا عملکرد و ساختار سلول ها را تغییر داده و بقای موجودات زنده را در معرض خطر قرار دهند. لذا این مواد به عنوان عوامل اصلی در بروز ناباروری در مردان معرفی شده اند (۱، ۲). ROS از یک سو جهت انجام برخی روندهای طبیعی نظیر واکنش اکروزامی اسپرم ها ضروری بوده و از سوی دیگر در غلظت های فزاینده که موسوم به استرس اکسیداتیو (Oxidative Stress) است، موجب مهار قدرت تحرک و نیز تغییر

شد. نمونه‌ها پس از گذشت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، از حالت لخته‌ای خارج و آبکی شدند. تمامی این نمونه‌ها از آن جایی که از نظر تعداد، قدرت تحرک، مورفولوژی و سایر مشخصه‌های یک نمونه سالم و کامل منطبق بر معیارهای سازمان بهداشت جهانی بودند، انتخاب شدند. نمونه‌های مذکور پس از شستشو با محلول رینگرتایرود (Tyrode's Ringer) (شامل: ۰/۸ گرم NaCl، ۰/۰۲ گرم KCl، ۰/۰۲ گرم CaCl₂، ۰/۱ گرم NaHCO₃، ۰/۰۰۵ گرم NaH₂PO₄، ۰/۰۱ گرم MgCl₂، ۰/۱ گرم Hepse و ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده) دو بار مورد عمل سانتیفریژ (۱۰۰×g، ۵۰۰، هر بار به مدت ۱۰ دقیقه) قرار گرفته تا پلاسما منی از سلول‌های اسپرم به طور کامل جدا گردد.

رسوب‌های اسپرمی حاصله (حل شده در حداقل رینگرت) در مراحل بعدی پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند. مواد شیمیایی مورد استفاده به واسطه شرکت‌های ایرانی از کارخانه Merck آلمان خریداری شدند.

گروه‌های شاهد و تیمار

در پژوهش حاضر و در هر آزمایش از آن، سه گروه حاوی سلول‌های اسپرم مورد استفاده قرار گرفتند: الف) گروه شاهد: حاوی اسپرم‌های تیمار شده با آهن (بدون اسکوربات) در شروع (زمان صفر) از دوره سه ساعته انکوباسیون، ب) گروه تیمار اول: واجد اسپرم و آهن (بدون اسکوربات) در زمان‌های مختلف از دوره سه ساعته انکوباسیون (بررسی تاثیر آهن، ج) گروه تیمار دوم: واجد اسپرم، آهن و اسکوربات (جهت بررسی میزان اثر آنتی‌اکسیدانی اسکوربات در غلظت‌های مختلف). در این آزمایش‌ها مقدار اسکوربات، آهن و نمونه‌های اسپرم مورد استفاده هر یک به میزان ۰/۱ میلی لیتر بود که در یک مخلوط واکنش به میزان ۱ میلی لیتر افزوده شدند. انکوباسیون در تحت دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد.

سنجش پراکسیداسیون چربی‌های غشا (LPO)

اندازه‌گیری میزان LPO بر اساس روش اوکواوا و همکاران (۱۱) انجام گرفت. در این روش که زمان انکوباسیون نمونه‌ها در آن سه ساعت بود، در نهایت میزان تولید اجسام واکنش‌دهنده با اسید تیوباریتیوریک (Thiobarbituric Acid Reactive Substances: TBARS) از جمله مالون دی آلدیید (MDA) که در حدود ۵۰ درصد از مقدار TBARS را به خود اختصاص می‌دهد، در محیط حاوی نمونه اسپرمی ثبت شد. غلظت کمپلکس MDA+TBA، در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل نمونه اسپرمی، سولفات دودسیل سدیم، اسید استیک خالص، محلول ۱/۲ درصد TBA، با یا بدون یون‌های فلزی و اسکوربات بود. پس از حرارت دادن مخلوط واکنش، به آن ۳ میلی لیتر از مخلوط ان-بوتانول+پیریدین افزوده شد. در انتها، پس از سانتیفریژ کردن، میزان جذب نوری مخلوط واکنش با

سوء پراکسیداسیون سلولی مواد آنتی‌اکسیدان (Antioxidants) مورد استفاده قرار می‌گیرند. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که با جمع‌آوری ROS از محیط، موجب خنثی‌سازی و حذف آنان از درون و برون سلول‌ها می‌شوند. سلول‌های اسپرم در طی اسپرماتوژنز، حجم زیادی از سیتوپلاسم خود را به همراه آنتی‌اکسیدان‌های موجود در آن از دست داده، و بدین ترتیب در مقابل روند پراکسیداسیون سلولی حساس می‌شوند (۲). در مقابل به علت غوطه‌وری اسپرم‌ها در پلاسما مایع اسپرمی (Seminal Plasma) که محتوی آنتی‌اکسیدان‌های فراوانی نظیر: اسکوربات (Ascorbate) (ویتامین C)، تورین، گروه‌های تیولی، گلوکاتینون و کاتالاز، به خوبی در مقابل روند استرس اکسیداتیو محافظت می‌گردند. امروزه استراتژی کاربرد آنتی‌اکسیدان‌ها در راستای معکوس‌سازی و رفع صدمات وارده به سلول‌ها مدنظر محققان قرار گرفته است. وجود یک آنتی‌اکسیدان موثر و قوی در محیط و در زمانی که سلول‌های اسپرم محروم از محیط حامی خود یعنی پلاسما مایع اسپرمی‌اند، بسیار کارساز بوده و منجر به بقای آنان خواهد شد. در این راستا این مطلب نیز مشخص گردیده که در پلاسما مایع اسپرمی مردان نابارور مقادیر کمتری از آنتی‌اکسیدان‌ها در مقایسه با مردان بارور وجود دارد (۱، ۷).

اسکوربات به عنوان اولین خط دفاعی آنتی‌اکسیدانی در خون و پلاسما مایع اسپرمی مطرح بوده و موجب مهار روند اکسیداسیون لیسوپروتئین‌ها می‌شود. این ویتامین در حدود ۶۵ درصد از توان آنتی‌اکسیدانی پلاسما مایع اسپرمی را در افراد بارور به خود اختصاص می‌دهد (۸). این اهمیت از آن جا ناشی می‌شود که غلظت اسکوربات در پلاسما مایع اسپرمی در حدود ۱۰ برابر آن چیزی است که در پلاسما مایع اسپرمی وجود دارد (۳۶۴ میکرومولار در مقابل ۴۰ میکرومولار) (۹). در سال ۱۹۷۷ مشخص گردید که حضور ROS در پلاسما مایع اسپرمی موجب کاهش معنی‌داری در غلظت اسکوربات آن می‌شود (۱۰).

با توجه به موارد بالا، هدف از طراحی و اجرای پژوهش حاضر آن بوده که اثرات حضور غلظت‌های متفاوت از اسکوربات (۳۰۰ تا ۲۰۰۰ میکرومولار) را در محیط‌های حاوی سلول‌های اسپرم انسان تیمار شده با محرک (پروموتور) LPO محلول ۰/۲ میلی مولار سولفات آهن (FeSO₄) مورد ارزیابی قرار داده و در این راستا آزمایش‌های سنجش میزان LPO جهت بررسی ساختار غشای اسپرم‌ها، آزمایش هضم ژلاتین جهت تعیین درصد سلول‌های اسپرم واجد واکنش اکروزومی، و آزمایش رنگ‌آمیزی با اتوزین جهت بررسی تعداد اسپرم‌های فعال در شرایط مختلف، مورد استفاده قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های مایع اسپرمی (منی) و مواد شیمیایی

۱۲ نمونه اسپرمی از افراد سالم (در محدوده سنی ۲۳ تا ۲۵ سال) ساکن در شهرستان شهرکرد، به صورت داوطلبانه، اخذ و جمع‌آوری

گردیدند. داده‌های حاصل از این پژوهش به صورت سه تکرار مستقل سه‌تایی هستند. داده‌های حاصله به صورت میانگین + انحراف معیار آورده شده‌اند.

یافته‌ها

در آزمایش سنجش میزان LPO (جدول ۱) مشخص گردید که اضافه‌سازی یون‌های آهن (پروموتور LPO) به نمونه‌های اسپرم انسان منجر به افزایش معنی‌داری (وابسته به زمان) در گسترش روند LPO (افزایش در تولید MDA) گردید. میزان MDA موجود در گروه شاهد (در زمان صفر از انکوباسیون) در حد $29 \pm 0/6$ بود که در انتهای سه ساعت زمان انکوباسیون و پس از اضافه‌سازی آهن به حد $64 \pm 0/8$ ($120/69$ درصد، $P < 0/001$) رسید. اضافه‌سازی غلظت‌های 300 و 500 میکرومولار از اسکوربات به محیط فوق موجب کاهش معنی‌داری در میزان MDA تولید شده گردید، به طوری که این میزان کاهش در غلظت 500 میکرومولار از اسکوربات و در سه ساعت پس از شروع انکوباسیون در حد $18/75$ درصد ($P < 0/001$) بود. جالب توجه آن که، اضافه‌سازی غلظت‌های بالاتر از اسکوربات (2000 – 1000 میکرومولار) به محیط واکنش، نه تنها موجب مهار پراکسیداسیون نگردید بلکه موجب افزایش فزاینده‌ای در غلظت MDA شد. این میزان افزایش در غلظت 2000 میکرومولار (در انتهای دوره انکوباسیون) در حد $68 \pm 0/7$ نسبت به شاهد ($29 \pm 0/6$) ($134/48$ درصد، $P < 0/001$) بود (جدول ۱).

در پژوهش حاضر، داده‌های به دست آمده در مورد درصد اسپرم‌های زنده و فعال انسان (جدول ۲) نشان داد که در طی انکوباسیون با یون‌های آهن، به میزان زیادی از تعداد اسپرم‌های فعال محیط کاسته شد. در انتهای دوره سه ساعته انکوباسیون، تعداد اسپرم‌های فعال محیط از $78 \pm 0/8$ درصد در گروه شاهد به $45 \pm 0/7$ درصد در گروه تیمار اول (واجد اسپرم و آهن) ($P < 0/001$) رسید. در این قسمت نیز در حضور غلظت‌های کم از اسکوربات (300 و 500 میکرومولار)، درصد اسپرم‌های فعال در محیط افزایش یافت. این میزان افزایش در پس از اضافه‌سازی غلظت 500 میکرومولار اسکوربات و در انتهای سومین ساعت از دوره انکوباسیون از حد $45 \pm 0/7$ درصد در گروه تیمار اول به $60 \pm 0/57$ درصد در گروه تیمار دوم (حاوی اسپرم، آهن و اسکوربات) ($P < 0/001$) رسید. در غلظت 1000 میکرومولار و بالاتر از اسکوربات، درصد اسپرم‌های زنده محیط به شدت کاهش یافت به طوری که در غلظت 2000 میکرومولار اسکوربات و در پایان آخرین ساعت از انکوباسیون، این میزان کاهش در مقایسه با گروه شاهد به حد $42 \pm 0/8$ درصد ($P < 0/001$) رسید (جدول ۲). در جدول ۳، نتایج مربوط به آزمایش واکنش اکروزومی یا هضم ژلاتین آورده شده است. بر اساس این داده‌ها، در گروه شاهد میزان واکنش‌های اکروزومی اسپرم‌های انسان در حد $68 \pm 0/5$ درصد بود. افزودن یون‌های آهن به نمونه‌های اسپرمی، موجب کاهش معنی‌داری در تعداد اسپرم‌های واجد واکنش اکروزومی (درصد هاله‌ها در انتهای زمان انکوباسیون) از $68 \pm 0/5$ درصد (شاهد) به $41 \pm 0/65$ درصد ($P < 0/001$) شد.

اسپکتروفتومتر سنجیده شد. واحد اندازه‌گیری میزان تغییر LPO در محیط $nM MDA/mg \text{ protein}/min$ در نظر گرفته شد.

سنجش میزان پروتئین نمونه‌های مایع اسپرمی

مقدار پروتئین نمونه‌های اسپرمی به عنوان یکی از پارامترهای لازم جهت محاسبه میزان فعالیت ویژه MDA بوده که در این روش مقدار جذب نوری با استفاده از سولفات دودسیل سدیم در طول موج 750 نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر تعیین و مقدار پروتئین نمونه‌های اسپرمی استفاده شده، محاسبه گردید (۱۲).

سنجش درصد اسپرم‌های زنده (آزمایش انوزین)

به منظور تعیین درصد تعداد سلول‌های اسپرم زنده و غیرزنده در طی سه ساعت انکوباسیون در گروه‌های شاهد و تیمار، از روش رنگ‌آمیزی با انوزین استفاده گردید. در این روش بر روی هر لام تعداد 400 عدد سلول اسپرم به کمک میکروسکوپ نوری معمولی شمارش گردیدند و اسپرم‌های غیر زنده با رنگ قرمز تا صورتی و اسپرم‌های زنده و فعال بدون خاصیت رنگ‌پذیری، مشخص شدند (۱۳).

سنجش واکنش اکروزومی

جهت بررسی قدرت سلول‌های اسپرم در ارایه واکنش اکروزومی از آزمایش هضم ژلاتین استفاده شد (۱۴). در این روش لام‌ها پس از شستشو با الکل به مدت دو ساعت در یخچال نگهداری شده و سپس یک لایه نازک (100 میکرولیتر) از محلول ژلاتین $2/5$ درصد بر روی آنان گسترش داده شد. در مرحله بعد لام‌ها به مدت 5 دقیقه در محلول $0/05$ درصد از گلوکار آلدئید تثبیت گردیدند. در مرحله بعد، جهت حذف مازاد گلوکار آلدئید لام‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند و سپس به میزان 50 میکرولیتر از نمونه‌های اسپرمی (تیمار شده با آهن و یا آهن همراه با اسکوربات با طی دوره سه ساعته انکوباسیون) به سطح لام‌های ژلاتین‌دار اضافه شدند. در انتهای این بخش، لام‌ها برای مدت 24 ساعت در درون یک اتاقک مرطوب با دمای 39 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از انقضای این مدت، لام‌ها با رنگ کوماسی آبی رنگ‌آمیزی شده و به کمک میکروسکوپ نوری معمولی (با بزرگنمایی 400) مورد بررسی قرار گرفتند.

تعداد سلول‌های اسپرم واجد هاله (Halo) (محل هضم ژلاتین در نتیجه واکنش اکروزومی در اطراف سر اسپرم‌ها) و نیز سلول‌های بدون هاله شمارش و ثبت گردیدند. در انتها پس از تهیه عکس از لام‌های انتخاب شده در صورتی که بیش از 50 درصد سلول‌ها واجد هاله باشند، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که عملکرد سلول‌های آن نمونه در انجام واکنش اکروزومی طبیعی بوده است.

روش آماری

در هر آزمایش میانگین‌های گروه‌های تیمار با گروه شاهد به کمک روش t-test و توسط نرم افزار (SPSS ۱۱) مقایسه

جدول ۱: میزان MDA تولید شده (گسترش پراکسیداسیون چربی های غشا) در نمونه های اسپرم انسان تیمار شده با یون های آهن و در غلظت های متفاوت از اسکوربات در طی سه ساعت انکوباسیون

غلظت اسکوربات (میکرومولار)				
nM MDA/mg protein/min				
زمان انکوباسیون (ساعت)				
۰	۱	۲	۳	
۲۹±۰/۶	۴۱±۰/۸	۵۲±۱	۶۴±۰/۸	۰
۳۰±۱/۸	** ۳۵±۲	** ۴۷±۰/۸	*** ۵۴±۱	۳۰۰
۳۰±۲	*** ۳۳±۰/۵	*** ۴۱±۲	*** ۵۲±۰/۷	۵۰۰
۲۸±۱	۳۹±۱/۱	* ۴۹±۱/۳	** ۵۷±۲	۱۰۰۰
۲۹±۰/۹	* ۴۵±۱/۵	* ۵۷±۲	۶۵±۱	۱۵۰۰
۳۰±۱/۲	c ۵۳±۰/۶ ***	c ۶۰±۱ ***	c ۶۸±۰/۷ **	۲۰۰۰

مقادیر p مقایسه شده با گروه شاهد (بدون اسکوربات، در زمان صفر انکوباسیون): $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$
 مقادیر p مقایسه شده با گروه تیمار اول مربوطه (بدون اسکوربات، دارای آهن) در همان زمان از دوره انکوباسیون: $P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$
 هر داده نشانگر Mean±SD مربوط به سه مشاهده مستقل (هر یک با سه مرتبه تکرار) است.

جدول ۲: میزان درصد سلول های زنده و فعال در نمونه های اسپرم انسان تیمار شده با یون های آهن و در غلظت های متفاوت از اسکوربات در طی سه ساعت انکوباسیون

غلظت اسکوربات (میکرومولار)				
درصد سلول های زنده				
زمان انکوباسیون (ساعت)				
۰	۱	۲	۳	
۷۸±۰/۸	c ۶۷±۱	c ۵۷±۱/۷	c ۴۵±۰/۷	۰
۷۷±۱/۶	** ۷۴±۱/۵	** ۶۳±۱	*** ۵۵±۱	۳۰۰
۷۸±۱/۵	** ۷۶±۱	*** ۷۱±۰/۵	*** ۶۰±۰/۵۷	۵۰۰
۷۶±۰/۹	۶۵±۲	* ۶۱±۱/۴	*** ۵۴±۱/۳	۱۰۰۰
۷۷±۱	** ۶۱±۱/۴	۵۸±۱/۱	* ۴۸±۱/۶	۱۵۰۰
۸۰±۲	c ۵۹±۲ **	c ۵۴±۲ *	c ۴۲±۰/۸ *	۲۰۰۰

مقادیر p مقایسه شده با گروه شاهد (بدون اسکوربات، در زمان صفر انکوباسیون): $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$
 مقادیر p مقایسه شده با گروه تیمار اول مربوطه (بدون اسکوربات، دارای آهن) در همان زمان از دوره انکوباسیون: $P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$
 هر داده نشانگر Mean±SD مربوط به سه مشاهده مستقل (هر یک با سه مرتبه تکرار) است.

جدول ۳: میزان درصد تشکیل هاله ها (واکنش های اکروزومی) در نمونه های اسپرم انسان تیمار شده با یون های آهن و در غلظت های متفاوت از اسکوربات در طی سه ساعت انکوباسیون

غلظت اسکوربات (میکرومولار)				
درصد تشکیل هاله (واکنش اکروزومی)				
زمان انکوباسیون (ساعت)				
۰	۱	۲	۳	
۶۸±۰/۵	b ۶۲±۰/۷	c ۵۴±۰/۶	c ۴۱±۰/۶۵	۰
۶۷±۰/۷	۶۳±۱	* ۵۷±۱	* ۴۴±۲	۳۰۰
۶۷±۲	** ۶۶±۰/۷	** ۵۹±۲	** ۴۶±۰/۶	۵۰۰
۷۰±۰/۹	۶۰±۱	۵۲±۱/۸	۴۲±۱	۱۰۰۰
۶۷±۱	۶۰±۱/۲	** ۴۹±۱	* ۳۸±۰/۶	۱۵۰۰
۶۹±۱/۲	c ۵۷±۱ **	c ۴۸±۱/۴ **	c ۳۵±۰/۸ **	۲۰۰۰

مقادیر p مقایسه شده با گروه شاهد (بدون اسکوربات، در زمان صفر انکوباسیون): $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$
 مقادیر p مقایسه شده با گروه تیمار اول مربوطه (بدون اسکوربات، دارای آهن) در همان زمان از دوره انکوباسیون: $P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$
 هر داده نشانگر Mean±SD مربوط به سه مشاهده مستقل (هر یک با سه مرتبه تکرار) است.

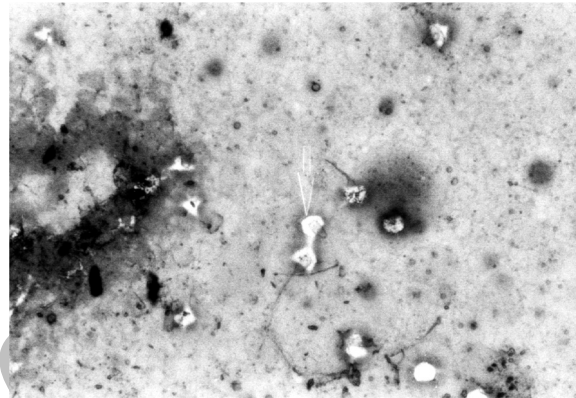
از ۳۰۰ تا ۲۰۰۰ میکرومولار مورد استفاده قرار گرفت. هدف اصلی از این طرح ارزیابی اثرات آنتی اکسیدانی اسکوربات بر برخی از خصوصیات عملکردی سلول‌های اسپرم انسان در طی روند پراکسیداسیون القا شده توسط سولفات آهن (پروموتور LPO) بود. بر اساس داده‌های حاصل از آزمایش‌های ما و همان گونه که انتظار می‌رفت (در گروه شاهد مثبت)، اضافه‌سازی یون‌های آهن، به صورت وابسته به زمان موجب افزایش معنی‌داری در میزان تولید MDA در محیط گردید. در این قسمت، اسکوربات در غلظت ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار موجب مهار گسترش روند پراکسیداسیون چربی‌های غشا اسپرم‌های انسان گردید. این یافته هم سو با نتایج حاصل از مجموعه تحقیقاتی است که در طی آنان مشخص شد که اضافه‌سازی روزانه اسکوربات به رژیم غذایی حیوانات، موجب بهبود کیفیت مایع اسپرمی، افزایش قدرت باروری، و افت شدید در میزان تولید رادیکال‌های آزاد در دستگاه تولید مثلی بدن آنان خواهد شد (۸، ۱۸، ۱۹). هم‌چنین، نتایج آزمایش ما در هم سویی با تحقیقی بوده که به روش *In vitro* در سال ۱۹۹۸ به انجام رسید و در آن مشخص گردید که اسکوربات تنها در غلظت‌های بین ۵۰ تا ۸۰۰ میکرومولار واجد خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و موجب مهار روند LPO در نمونه‌های اسپرم انسان می‌گردد (۱۵). در واقع کارایی اسکوربات در بهبود باروری، ناشی از نقش آن در جمع‌آوری و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد به ویژه رادیکال‌های پروکسیل از محیط زیست اسپرم‌ها و در نتیجه پایان دهی روند پراکسیداسیون سلولی است (۸، ۹، ۱۸، ۲۰). به هر حال بر اساس نتایج پژوهش حاضر، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و حفاظتی اسکوربات در مقابله با پراکسیداسیون سلولی تنها محدود به غلظت ۵۰۰ میکرومولار و غلظت‌های کمتر از آن بوده و حداکثر خاصیت آنتی‌اکسیدانی این ویتامین نیز مربوط به غلظت ۵۰۰ میکرومولار آن است.

این روند حفاظتی در غلظت‌های بیشتر از ۵۰۰ میکرومولار از اسکوربات معکوس شده و در راستای گسترش هر چه بیشتر پراکسیداسیون در نواحی مختلف از سلول به ویژه غشاهای سلولی عمل می‌نماید. این عملکرد منفی اسکوربات مربوط به تغییر در ماهیت آن از آنتی‌اکسیدان به پرواکسیدان (Pro-Oxidant) بوده که در غلظت‌های زیاد و در همراهی و ایجاد کمپلکس با یون‌های فلزی نظیر آهن، پدیدار می‌گردد (۲، ۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷).

علاوه بر این و بر اساس دیگر یافته‌ها، مشخص شده که اسکوربات به عنوان یک عامل احیا کننده موجب رهاسازی یون‌های فلزی نظیر آهن و مس از ساختار بیوشیمیایی غشا سلول‌ها شده و بدین ترتیب با واردسازی یون‌های آهن در مجموعه واکنش‌های موسوم به فنتون (Fenton reaction) که در طی آن آب اکسیژنه محیط به رادیکال بسیار فعال هیدروکسیل تبدیل می‌گردد، موجبات گسترش بیش از پیش LPO را فراهم خواهد نمود (۲۲).

بنابراین، علی‌رغم آن که آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی نظیر اسکوربات به عنوان دومین خط دفاعی پس از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی

در این قسمت نیز الگوی عمل اسکوربات مشابه با دو آزمایش قبل بود بدین صورت که اسکوربات در غلظت‌های تا حد ۵۰۰ میکرومولار افزایش دهنده تعداد هاله‌ها، و در غلظت‌های از ۱۰۰۰ میکرومولار به بالا، کاهش دهنده تعداد هاله‌ها (مهار کننده واکنش اکروزومی) بود. کاربرد غلظت ۲۰۰۰ میکرومولار اسکوربات موجب کاهش معنی‌داری در درصد هاله‌ها از $68 \pm 5/5$ درصد (شاهد) به $35 \pm 0/8$ درصد ($P < 0/001$) شد (جدول ۳). در تکمیل این قسمت شکل ۱ نشان دهنده واکنش‌های اکروزومی در اسلاید ژلاتین دار گروه شاهد است.



شکل ۱: واکنش‌های اکروزومی در اسلاید ژلاتین دار گروه شاهد. علامت فلش مشخص کننده منطقه هاله (ژلاتین هضم شده) در اطراف سر یک سلول اسپرم است.

بحث

از جمله مباحث روز در علم فیزیولوژی تولید مثل جانوران، تاثیر عوامل محیطی بر میزان باروری است. تجمع عوامل محیطی سمی در بدن جانوران یکی از مهم‌ترین علل عقیمی محسوب می‌شود. در بدن جانوران رادیکال‌های آزاد اکسیژن در بروز حالات پاتولوژیک به طور اعم و در ایجاد عقیمی به طور اخص، دخالت مستقیم دارند. اختلالات عملکردی زیادی در سلول‌های اسپرم به دنبال تاثیر ROS و LPO پدیدار می‌گردد، که از میان می‌توان به کاهش در قدرت تحرک، اختلالات اکروزومی و اختلالات جدی در غشای سلول‌های اسپرم که موجب تضعیف اتصال اسپرم به سطح تخمک می‌شوند، اشاره نمود (۱، ۲، ۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷).

سلول‌های اسپرم در طی روند اسپرماتوزیس حجم عمده‌ای از سیتوپلاسم خود را از دست داده و بنابراین در مقایسه با سلول‌های سوماتیکی با کمبود آنتی‌اکسیدان‌ها روبرو گشته و چنانچه پلاسمای مایع اسپرمی یا محیط زیست و شنای اسپرم‌ها که حاوی انواع زیادی از آنتی‌اکسیدان‌ها است، از آنان جدا گردد شرایط بسیار خطرناک و نامطلوبی را برای این سلول‌ها فراهم خواهد آورد که اولین پیامد آن هجوم ROS موجود در محیط خواهد بود (۲، ۱۷).

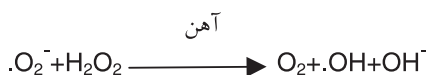
در پژوهش حاضر، اسکوربات به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مهم و بسیار فعال در پلاسمای مایع اسپرمی، در یک محدوده غلظتی خاص

مشاهده گردید. در این ارتباط استراتژی کاربرد موادی آنتی اکسیدان در جهت بهبود هر چه بیشتر وضعیت استحکام غشاء اسپرم ها به عنوان یک امر ضروری، مورد نظر پژوهش گران این حوزه قرار گرفته است (۲۸).

اسکوربات با توان آنتی اکسیدانی خود (در غلظت ۵۰۰ میکرومولار و کم تر از آن) موجب خنثی سازی اثرات سوء آهن بر رویدادهای سلولی شروع کننده واکنش اکروزومی شده اما در غلظت های بالاتر این روند معکوس شده و بر شمار اسپرم های فاسد واکنش اکروزومی بر روی لام های ژلاتین دار افزوده گردید.

از جمله نقایص القاء شده توسط اثر LPO در اسپرم ها اختلالات گسترده در غشاء سلولی آنان بوده که موجب تضعیف اتصال این سلول ها به سطح تخمک می شوند (۲، ۴، ۱۴، ۲۵). از طرف دیگر، آب اکسیژنه (H₂O₂) به عنوان سوسترای اصلی در واکنش هابر-ویس مطرح بوده و در حضور یون های آهن به رادیکال های هیدروکسیل مبدل می شود.

این رادیکال های فعال به نوبه خود موجب القاء و گسترش LPO در غشاهای زیستی خواهند شد و یکی از نتایج آن ایجاد اختلال در غشاء های اکروزومی و سپس مهار واکنش اکروزومی خواهد بود:



نقل و انتقالات یونی نقش مهمی در شروع واکنش اکروزومی اسپرم ها ایفاء می کنند (۳۰). در این راستا نیز مشخص شده که القاء روند LPO موجب مهار تبادلات یونی لازم جهت فعالیت های اسپرم می شود (۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۱).

نتیجه گیری

در مجموع، اسکوربات در غلظت های مختلف اثرات متفاوتی داشته و محققین با عنایت به این رویکرد منفی اسکوربات، می بایست آن را در زمینه هایی نظیر لقاح آزمایشگاهی، کشت سلولی و نگهداری و ذخیره سازی سلول های جنسی، به طور جدی مورد نظر قرار داده تا اثرات مخرب آن را در سیستم های زیستی به حداقل رسانند.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از مساعدت جناب آقای دکتر بهزاد شارق رییس محترم دانشکده علوم جهت فراهم آوری تسهیلات آزمایشگاهی، سرکار خانم دکتر نها افتخاری جهت آنالیزهای آماری، و جناب آقای سید رسول صیدایی کارشناس آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری گروه زیست شناسی، دانشگاه شهرکرد، تشکر و قدردانی می گردد.

نظیر کاتالاز، در مهار روند پراکسیداسیون عمل می نمایند، اما کاربرد آنان به مثابه یک تیغ دو لبه بوده که در یک محدوده بسیار ظریف از تغییرات غلظتی ضمن تغییر ماهیت، به عوامل خطرآفرین برای سلول ها مبدل خواهند شد.

در همین راستا و در پژوهشی جدید نشان داده شد که به دنبال اضافه سازی یون های آهن به محیط حاوی اسپرم های گاو، کاهش معنی داری در تعداد سلول های اسپرم های متورم شده پدیدار گردید که این به منزله بروز اشکالات جدی در ساختار غشا این سلول ها است. در این پژوهش نشان داده شد که افزودن اسکوربات در محدوده ۷۰۰ میکرومولار و کمتر از آن موجب بهبود وضعیت استحکام غشاء اسپرم ها (افزایش در تعداد اسپرم های متورم شده) گردید (۲۳).

لاگارس و همکاران نشان دادند که یک همبستگی قوی و مثبت بین نتایج آزمایش تورم اسپرمی و رنگ آمیزی با اتوزین جهت تعیین تعداد سلول های زنده و فعال، وجود دارد (۲۴). روند LPO با افزایش دهی پیوندهای دوگانه در غشاء، موجب آسیب رسانی به آن شده و بدین ترتیب ضمن برهم ریختن ساختار غشاء، موجب غیر فعال شدن سلول ها می گردد (۲، ۲۵، ۲۶). رادیکال های آزاد به ویژه انواع ROS موجب مهار آنزیم های درون سلولی نیز گردیده و بدین ترتیب اسپرم ها از منابع آنزیمی دخیل در تامین ATP مورد نیاز جهت تحرک و فعالیت محروم می گردند (۲، ۲۷). در پژوهش حاضر، پروموتور LPO موجب کاهش شدیدی در درصد اسپرم های فعال انسان گردید.

با توجه به موارد بالا، کاهش در تعداد اسپرم های زنده را می توان به مجموعه اثرات سو ROS و LPO بر ساختار غشاء و عملکرد آن نسبت داد. اسکوربات با توان آنتی اکسیدانی خود (در غلظت ۵۰۰ میکرومولار و کمتر از آن) موجب خنثی سازی این اثرات سو گردید اما در غلظت های بالاتر (با بروز خاصیت پرواکسیدانی اسکوربات) این روند معکوس شده و بر میزان اسپرم های غیرفعال محیط افزوده گردید. گزارشی دیگر عنوان می دارد که اسکوربات (غلظت های ۴۰۰-۱۰۰۰ میکرومولار) در نمونه های اسپرم انسان تیمار شده با آهن، موجب افت شدیدی در قدرت تحرک اسپرم های محیط می شود (۱۵).

میزان توانایی سلول های اسپرم در اجرای واکنش اکروزومی (بخشی از مرحله ظرفیت پذیری اسپرم ها بوده که در طی آن آنزیم های هیدرولیتیکی اسپرم آزاد شده و در دست یابی اسپرم به تخمک نقش مهمی را ایفاء می نماید) به عنوان عامل تعیین کننده ای در باروری مطرح بوده و تضمین کننده فرایند لقاح کامل و مناسب است. استحکام طبیعی غشا نه تنها برای متابولیسم طبیعی اسپرم، بلکه جهت اتصال موفق آن به تخمک و واکنش اکروزومی طبیعی اسپرم نیز، لازم و ضروری است.

در پژوهش حاضر، کاهش زیادی در درصد اسپرم های با واکنش اکروزومی (هضم لایه نازک ژلاتین) در گروه های تیمار شده با آهن



References

۱. عربی مهران، راویندرآنانند. تاثیر نیکوتین بر اسپرم افراد نورمواسپریمیک: تعدیل توسط آنتی اکسیدان ها. فصل نامه باروری و ناباروری، سال سوم، شماره یازدهم، تابستان ۱۳۸۱: صفحات ۲۲-۱۱
2. Sharma RK, Agarwal A: Role of reactive oxygen species in male infertility. *J Urol* 1996; 48: 835-850
3. Aitken RJ: Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1999; 59: 1037-1046
4. Arabi M, Sanyal SN, Kanwar U, Anand RJK: The Effect of antioxidants on nicotine and caffeine induced changes in human sperm -An in vitro Study. In: *Male fertility and lipid metabolism*, (eds.: De Vriese, S.R., and Christophe, A.B.), 2003; 16: 250-267, 2003
5. Arabi M: Nicotinic infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Andrologia* 2004; 36: 305-310
6. Arabi M: Analysis of impact of metal ion contamination on Carp (*Cyprinus carpio* L.) *Biol Trace Elem Res* 2004; 100(3): 229-246
7. Sikka SC: Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci* 1996; 1: 78-86
8. Donnelly ET, Neil M, Lewis EM: Antioxidant supplementation in vitro does improve human sperm motility. *Fertil Steril* 1999; 72(3): 484-495
9. Jacob RA, Pianalto FS, Agee RE: Cellular ascorbate depletion in healthy men. *J Nutr* 1992; 122: 1111-1118
10. Lewis SEM, Sterling ES, Young, IS, Thompson W: Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1997; 67(1): 42-147
11. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for Lipid Peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358
12. Lees M, Paxman J: Modification of Lowry procedure for the analysis of proteolipid protein. *Anal Biochem* 1972; 47: 184-192
13. Blom E: A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertil Steril* 1950; 1: 176-177
14. Fiscor G, Ginsberg LC, Oldford GM, Snoke RE, Becker RW: Gelatin-substrate film technique for detection of acrosin in single mammalian sperm. *Fertil Steril* 1983; 30: 543-552
15. Verma A, Kanwar KC: Human sperm motility and lipid peroxidation in different ascorbic acid concentrations: an in vitro analysis. *Andrologia* 1998; 23: 325-329
16. Engel S, Schreiner T, Petzoldt R: Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. *Andrologia* 1999; 31: 17-22
17. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA: Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003; 79: 829-843
18. Yousef MI, Abdallah GA, Kamel KI: Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Anim Reprod Sci* 2003; 76(1-2): 99-111
19. Audet I, Laforest JP, Martineau GP, Matte JJ: Effect of vitamin supplements on some aspects of performance, vitamin status, and semen quality in boars. *J Anim Sci* 2004; 82(2): 626-633
20. Dawson EB, Harris WA, Teter MC, Powell LC: Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertil Steril* 1992; 58: 1034-1039
21. Sadrzadeh SM, Anderson DK, Panter SS, Hallway PE, Eaton JW: Hemoglobin potentiates central nervous system damage. *J Clin Invest* 1987; 79(2): 662-664
22. Gutteridge JMC: Antioxidants, nutritional supplements and life-threatening diseases. *Br J Biomed Sci* 1994; 51: 288-295
23. Arabi M: Membrane integrity and motility of bull spermatozoa in presence of different concentrations of vitamin C. *J Sci* 2005; (Teacher training university) (submitted)
24. Lagares MA, Petzoldt H, Sieme H, Klug E: Assessing equine sperm-membrane integrity. *Andrologia* 1999; 32: 163-167
25. Rao B, Soufir JC, Martin M, David G: Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Res* 1989; 24: 127-134
26. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy, MA: Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003; 79: 829-843
27. De Lamirande E, Gagnon C: Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl* 1992; 13: 379-386

28. Yanagimachi R: Mammalian fertilization. In: The physiology of reproduction (eds.: Knobil, E. and Neil, J.D.), Vol. 2, 2nd edition, Raven Press, New York, 189-318, 1998
29. Aitken RJ: Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biol Reprod 1999; 59: 1037-1046
30. Ernster L: Lipid peroxidation in biological membranes: mechanisms and implications. In: Active oxygen, lipid peroxides and antioxidants, CRC Press, Boca Raton, 1-38, 1993
31. Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MC: The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. J Androl 2000; 21: 895-902



Archive of SID