Archive of SID

تأثیر غلظتهای مختلف از اسکوربات بر پارامترهای اسپرمی در گاو

مهران عربی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

چکیده

متابولیتهای اکسیژن،ROS، بعنوان اصلی ترین عامل ایجاد عقیمی در اسپرمها مورد توجه قرار گرفته است. در پژوهش حاضر، اثرات غلظتهای متفاوت از اسکوربات یا ویتامین C (۲۰۰۰ –۳۰۰ میکرومولار)، بر ساختار غشاء،واکنش آکروزومی، و درصد سلولهای اسپرم زنده گاو هولشتاین در محیطهای حاوی یونهای آهن دو ظرفیتی، بعنوان محرک پراکسیداسیون چربیها (LPO) بررسی گردید. LPO بعنوان یکی از نتایج هجوم ROS به غشاهای زیستی مطرح بوده که ضمن آسیب رسانی به استحکام غشاء، موجب غیر فعال شدن بسیاری از آنزیمهای غشایی مؤثر در تحرک و فعالیت اسپرمها نیز می شود. نتایج این پژوهش نشان داد، اسکوربات در غلظتهای کمتر از ۱۰۰۰ میکرومولار سبب محافظت ازسلولها در مقابل آسیبهای ناشی از رادیکالهای آزاد محیط می شود که نتیجه آن بهبود وضعیت استحکامی غشاء، افزایش واکنشهای آکروزومی، و نیز بالا رفتن درصد اسپرمهای زنده در محیط است. همچنین اضافه سازی این محدوده غلظت اسکوربات باعث کاهش معنی دار میزان MDA (بعنوان یکی از محصولات نهایی روند LPO) محیط می گردد. از سوی دیگر، اسکوربات در محدوده غلظتی ۱۰۰۰ میکرومولار و بیشتر از آن نه تنها نقش حفاظتی و آنتی اکسیدانی نداشته بلکه ضمن ایجاد کمپلکس بایونهای آهن، بعنوان یک پرواکسیدان عمل نموده وموجب بروز آسیبهای فراوان در ساختار غشاء (با افزایش میزان MDA محیط)، و کاهش درصد واکنشهای اکروزومی و اسپرمهای زنده می شود. بطورکلی چون اسکوربات درغلظتهای مختلف اثرات متفاوتی دارد محققین با عنایت به این رویکرد منفی اسکوربات، می بایست در زمینه هایی نظیر لقاح آزمایشگاهی، کشت سلولی و نگهداری و ذخیره سازی سلولهای جنسی، بطور جدی این مسئله را مد نظر قرار داده تا اثرات مخرب آنرا در سیستمهای زیستی به حداقل رسانند.

واژه های کلیدی: اسپرم گاو، اسکوربات، پراکسیداسیون، واکنش آکروزومی،آزمایش ثوزین.

مقدمه

متابولیتهای اکسیژن مولکولی(Reactive Oxygen Species, ROS) نظیر رادیکال هیدروکسیل($OH^{\cdot}$)و آنیون سوپراکسید($O_2^{-\cdot}$) قادرند با تأثیر منفی بر اعمال و ساختار سلولها، بقاء موجودات زنده را در معرض خطر قراردهند و بعنوان یکی از عوامل اصلی بروز ناباروری (عقیمی) در مردان شناخته شوند (۱، ۲٤). ROS، از یک طرف جهت انجام برخی روندهای طبیعی نظیر واکنش اکروزومی اسپرمها ضروری بوده و از طرفی دیگر با افزایش غلظت آن در محیط، موسوم به استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) ، موجب مهار قدرت تحرک و نیز تغییر در شکل ظاهری این سلولها می شود. بدین ترتیب درصدهای متفاوتی از ناباروری را ایجاد می نماید. یکی از تظاهرات مهم استرس اکسیداتیو در سلولها، پراکسیداسیون چربی غشایی(Lipid peroxidation, LPO) می باشد. LPO یک پدیده پیچیده فیزیولوژیکی بوده و در تمامی سلولهای غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع، رخ می دهد و شامل مجموعه ای از واکنشها مانند تخریب و تشکیل مجدد پیوندهای دوگانه در ساختار آنها می باشد. روند LPO موجب تخریب ساختار غشاء، کاهش قدرت تحرک، مهار فعالیتهای آنزیمی،وایجاد شکستگیهای متعدد در DNA سلولهای اسپرم شده، که حاصل آنان ناباروری می باشد (۱، ۳، ٦، ٥، ٤، ۲٤) .

آنتی اکسیدانها ترکیباتی هستند که با جمع آوری ROS از محیط، موجب خنثی سازی و حذف آنان از درون و برون سلولها می شوند. سلولهای اسپرم در طی اسپرماتوژنز، حجم زیادی از سیتوپلاسم و آنتی اکسیدانهای خود را از دست می دهند، و بدین ترتیب

www.SID.ir

Archive of SID

در مقابل روند پراکسیداسیون سلولی حساس می گردند(۲٤). اما بعلت غوطه ور بودن اسپرمها در پلاسمای مایع اسپرمی (منی)(Seminal plasma) حاوی آنتی اکسیدانهای فراوان نظیر: اسکوربات (ویتامین C)، تورین، گروههای سولفیدریل، گلوتاتیون، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز، بخوبی در مقابل روند استرس اکسیداتیو محافظت می شوند. امروزه استراتژی کاربرد آنتی اکسیدانها در راستای کاهش اثر اکسیدان و رفع صدمات وارده به سلول، مد نظر محققان قرار گرفته است. وجود یک آنتی اکسیدان مؤثر و قوی در محیط و در زمانی که سلولهای اسپرم محروم از محیط حامی خود یعنی پلاسمای مایع اسپرمی هستند، بسیار کارساز بوده و منجر به بقاء آنان خواهد شد. از طرفی مشخص شده است که، درپلاسمای مایع اسپرمی مردان نابارور یا عقیم درمقایسه با مردان بارور یا طبیعی مقادیرکمتری از آنتی اکسیدانها وجود دارد(۱، ۲۵).

اسکوربات بعنوان اولین خط دفاعی آنتی اکسیدانی در خون و پلاسمای مایع اسپرمی مطرح بوده، و موجب مهار روند اکسیداسیون لیپوپروتئینها می شود. درحدود ٦۵ درصد از توان آنتی اکسیدانی پلاسمای مایع اسپرمی افراد بارور مربوط به این ویتامین می باشد (۱۲). زیرا غلظت آن در پلاسمای مایع اسپرمی حدود ۱۰ برابر پلاسمای خون است (۳٦٤ µM در مقابل ٤۰ µM) (۱۷). در سال ۱۹۷۷ مشخص شد که حضور ROS در پلاسمای مایع اسپرمی موجب کاهش معنی دار غلظت اسکوربات می گردد(۲۰).

هدف از انجام این پژوهش مطالعه اثر غلظتهای متفاوت اسکوربات درمحیطهای حاوی سلولهای اسپرم گاو تیمار شده با عامل القاء (پرومونر)LPO، (محلول ۰/۲ میلی مولار سولفات آهن یا $FeSO_4$) می باشد که نتایج آن با سنجش میزان LPO جهت بررسی ساختار غشاء اسپرم، هضم ژلاتین جهت تعیین درصد سلولهای اسپرم واجد واکنش آکروزومی، و رنگ آمیزی با ائوزین جهت بررسی تعداد اسپرمهای زنده و فعال در بررسی ناباروری اسپرم مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روشها

آماده سازی محلولها و نمونه های اسپرمی: پژوهش حاضر بصورت *In vitro* بر روی سلولهای اسپرم گاو نژاد هولشتاین (Holstein) انجام شد. نه نمونه اسپرمی (مایع منی خالص بدون ترکیبات نگهدارنده) از مرکز اصلاح نژاد دام و تلقیح مصنوعی سازمان جهاد کشاورزی، روستای کبوترآباد، شهرستان زیار، از توابع اصفهان تهیه و خریداری گردید. نمونه های مذکور به سرعت و در یک فلاسک حاوی یخ ، به محل آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری در دانشگاه شهرکرد منتقل شد و پس از شستشو با محلول رینگرتایرود(شامل: ۰/۸ گرم NaCl، ۰/۰۲ گرم KCl، ۰/۰۲ گرم $CaCl_2$، ۰/۱ گرم $NaHCO_3$، ۰/۰۰۵ گرم NaH_2PO_4، ۰/۰۱ گرم $MgCl_2$ ،۰/۱ گرم گلوکز، ۰/۵ گرم Hepes ، و ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر) دو بار سانتریفوژ (۵۰۰ xg، هر بار بمدت ۱۰ دقیقه) شد تا پلاسمای منی از سلولهای اسپرم بطور کامل جدا گردد. رسوب اسپرمی در مقدار کمی محلول رینگر حل شد و در مراحل بعدی پژوهش مورد استفاده قرارگرفت.

اندازه گیری میزان LPO : بر اساس روش Ohkawa وهمکارانش (۲۳) انجام گرفت. در این روش پس از انکوباسیون نمونه ها بمدت ۹۰ دقیقه در نهایت میزان تولید اسید تیوباربیتیوریک (Thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) با اجسام واکنش دهنده از جمله مالون دی آلدیید (Malondialdehyde, MDA) که در حدود ۵۰ درصد از مقدار TBARS را شامل می شود، در محیط حاوی نمونه اسپرمی و در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه گیری شد. مخلوط واکنش شامل نمونه اسپرمی، سولفات دودسیل

www.SID.ir

Archive of SID

سدیم،اسیداستیک خالص،محلول ۱/۲ درصد TBA، با یا بدون یونهای فلزی و اسکوربات می باشد. پس از حرارت دادن این مخلوط، ۳ میلی لیتر از محلول ان-بوتانول+ پیریدین به آن افزوده و نهایتاً، پس از سانتریفوژ، میزان جذب نوری محلول فوقانی با اسپکتروفوتومتر مورد سنجش قرار گرفت.

اندازه گیری پروتئین نمونه های اسپرمی: مقدار پروتئین نمونه ها بعنوان یکی از پارامترهای لازم جهت محاسبه میزان فعالیت ویژه MDA می باشد که با اندازه گیری جذب نوری نمونه ها با استفاده از سولفات دودسیل سدیم در طول موج ۷۵۰ نانومتر بوسیله اسپکتروفتومتر انجام و مقدار پروتئین نمونه ها محاسبه شد (۱۹) .

آزمایش ائوزین: بمنظور تعیین درصد تعداد سلولهای اسپرم زنده و غیر زنده طی ۹۰ دقیقه انکوباسیون، از روش رنگ آمیزی با ائوزین استفاده گردید. تعداد ٤۰۰ عدد اسپرم توسط میکروسکوپ نوری معمولی بر روی هر لام شمارش گردید. اسپرمهای زنده فاقد خاصیت رنگ پذیری بوده و در مقابل اسپرمهای غیر زنده (بدون تحرک) به رنگ قرمز تا صورتی مشاهده شدند (۹).

بررسی واکنش آکروزومی: تعیین درصد واکنشهای آکروزومی با استفاده از روش آزمایش هضم ژلاتین انجام شد (۱۵). در این روش لامها بمدت دوساعت با الکل شستشو و در یخچال نگهداری شد. سپس یک لایه نازک (۱۰۰ میکرولیتر) از محلول ژلاتین ۲/۵ درصد بر روی آنان گسترش داده شد. در مرحله بعد با قرار دادن لامها بمدت سه دقیقه در محلول ۰/۰۵ درصد گلوتارآلدئید، تثبیت گردیدند. جهت حذف مازاد گلوتارآلدئید لامها با آب مقطر شسته شده و بمدت ۱۲ ساعت در یخچال نگهداری و سپس ۵۰ میکرولیتر از نمونه های اسپرمی (تیمار شده با آهن و اسکوربات به صورت مجزا و یا با هم،و نیز گروه شاهد یا بدون تیمار بصورت مجزا) به سطح آنان اضافه گردید. لامها بمدت ۲٤ ساعت در درون یک اتاقک مرطوب با دمای ۳۹ درجه سانتی گراد نگهداری شد. بعد از این مدت ،لامها بارنگ کوماسی آبی رنگ آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری معمولی (بزرگنمایی ٤۰۰) مورد بررسی قرار گرفت. سلولهای اسپرم واجد هاله (محل هضم ژلاتین که در اطراف سر اسپرمها در نتیجه واکنش آکروزومی پدید می آید) و نیز سلولهای بدون هاله شمارش و ثبت گردید. در صورتیکه بیش از ۵۰ درصد سلولها واجد هاله باشند، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که عملکرد سلولهای آن نمونه در جهت انجام واکنش آکرزومی طبیعی بوده است.

روش آماری و مواد شیمیایی: در هر آزمایش، میانگین گروه های تیمار شده با گروه شاهد به کمک روش Student's t-test و توسط نرم افزارSPSS (Version 11.0) مقایسه گردید. داده ها حاصل سه تکرار مستقل سه تایی هستند که بصورت میانگین ± انحراف معیار مشخص شده اند.

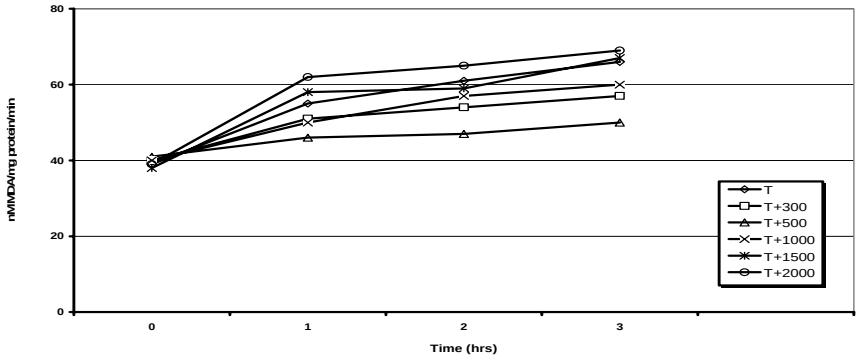
نتایج

نتایج حاصل از سنجش میزانLPO ، نشان می دهد که اضافه نمودن پروموترLPO به نمونه های اسپرم گاو منجر به افزایش معنی دار در گسترش LPO یا تولید MDA می گردد (شکل ۱). این میزان افزایش وابسته به زمان بوده و سیر صعودی بخود می گیرد بطوریکه پس از سه ساعت انکوباسیون (در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد) این افزایش بمیزان ٦۹/۲۳ درصد ($p<۰/۰۰۱$) نسبت به مقدار MDA گروه شاهد منفی(بدون آهن و اسکوربات، در زمان صفر از انکوباسیون) بود. اضافه کردن غلظتهای۳۰۰ و۵۰۰ میکرومولار اسکوربات به محیط فوق موجب کاهش معنی داری در میزان MDA تولید شده گردید، بطوریکه میزان کاهش در غلظت ۵۰۰ میکرومولار اسکوربات سه ساعت پس از شروع

www.SID.ir

Archive of SID

انکوباسیون درحد ۲٤/۲۵ درصد ($p<۰/۰۱$) بود. جالب توجه آنکه، اضافه کردن غلظتهای بیشتر اسکوربات (۲۰۰۰-۱۰۰۰ میکرومولار) به محیط واکنش، نه تنها موجب کاهش روند پراکسیداسیون نگردید بلکه موجب افزایش فزاینده ای در غلظت MDA شد، بطوریکه این افزایش (نسبت به شاهد مربوطه) در غلظت ۲۰۰۰ میکرومولار به ۷٦/۹۳ درصد ($p<۰/۰۰۱$) رسید (شکل ۱).



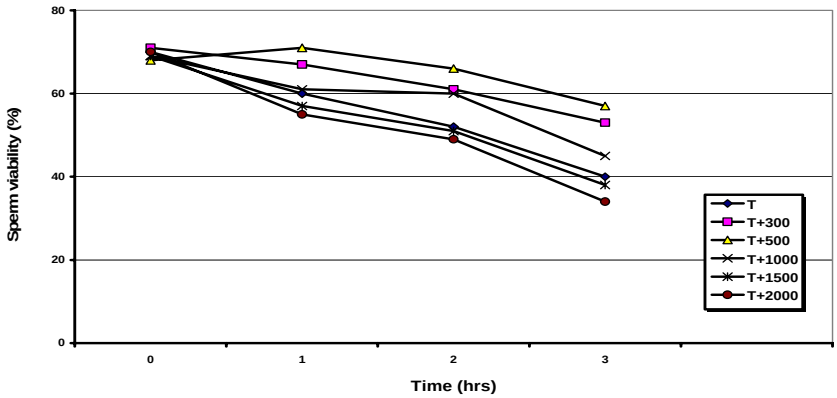
شکل ۱) میزان MDA تولید شده در نمونه های اسپرم گاو واجد یونهای آهن وغلظتهای متفاوت از اسکوربات در فواصل زمانی مختلف.
T : رینگر تایرود (شاهد) مقدار غلظت اسکوربات بر حسب میکرومولار است.

درصد اسپرمهای زنده و فعال گاو طی دوره سه ساعته انکوباسیون با یونهای آهن (پروموترLPO)، بشدت کاهش یافت بطوریکه پس از دوره انکوباسیون، تعداد اسپرمهای زنده محیط به ٤۲/۸٦ درصد در مقایسه با شاهد منفی رسید (شکل۲). درحضور غلظتهای کم اسکوربات (۳۰۰ و۵۰۰ میکرومولار)، درصد اسپرمهای زنده درمقایسه با گروه شاهد مربوطه (در هر زمان از انکوباسیون) افزایش یافت. این میزان افزایش درغلظت ۵۰۰ میکرومولار اسکوربات و در سومین ساعت از انکوباسیون بمیزان ۳۲/۵۱ درصد ($p<۰/۰۱$) بود. درغلظت ۱۰۰۰ میکرومولار و بالاتر اسکوربات، درصد اسپرمهای زنده محیط بشدت کاهش یافت. در بالاترین غلظت اسکوربات و در آخرین ساعت از انکوباسیون، این میزان کاهش در گروههای تیمار یافته نسبت به گروه شاهد منفی به ۵۱/٤۳ درصد ($p<۰/۰۰۱$) رسید(شکل ۲).

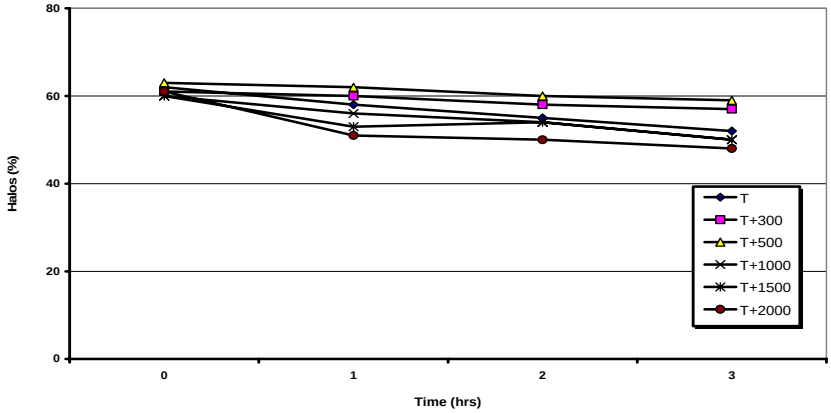
آزمایش واکنش آکروزومی یا هضم ژلاتین نشان داد که در گروه شاهد منفی میزان واکنشهای آکروزومی اسپرمهای گاو ٦۲ درصد است (شکل ۳). افزودن یونهای آهن به نمونه های اسپرم گاو، موجب کاهش معنی داری (۱٦/۱٤درصد ، $p<۰/۰۵$ ، نسبت به شاهد منفی) تعداد اسپرمهای واجد واکنش آکروزومی (درصد هاله ها) در انتهای زمان انکوباسیون گردید. در این بخش نیز الگوی عمل اسکوربات مشابه با دو آزمایش قبل بود بدین معنا که اسکوربات در غلظتهای تا ۵۰۰ میکرومولار موجب افزایش تعداد هاله ها، و در غلظتهای بالاتر از ۱۰۰۰ میکرومولار نقش پرواکسیدانی داشته و کاهش دهنده تعداد هاله ها (مهار کننده واکنش آکروزومی) است. استفاده از غلظت ۲۰۰۰ میکرومولار اسکوربات موجب کاهش درصد هاله ها تا میزان ۲۳درصد در مقایسه با شاهد منفی پس از انکوباسیون گردید.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲) درصد سلولهای زنده و فعال گاو در محیط واجد یونهای آهن وغلظتهای متفاوت از اسکوربات در فواصل زمانی مختلف.
T : رینگر تایرود (شاهد) غلظت اسکوربات بر حسب میکرومولار است.



شکل ۳) درصد سلولهای اسپرم گاو با واکنش اکروزومی (تولید هاله) در محیط واجد یونهای آهن وغلظتهای متفاوت از اسکوربات در فواصل زمانی مختلف. T :رینگر تایرود (شاهد) غلظت اسکوربات بر حسب میکرومولار است.

بحث و نتیجه گیری

از جمله مباحث روز در علم فیزیولوژی تولید مثل جانوران، تأثیر عوامل محیطی بر میزان باروری می باشد. تجمع عوامل محیطی سمی در بدن جانوران یکی از مهمترین علل عقیمی محسوب می شود. در بدن جانوران رادیکالهای آزاد اکسیژن در بروز حالات پاتولوژیک بطور اعم و در ایجاد عقیمی بطور اخص، دخالت مستقیم دارند. اختلالات عملکردی زیادی در سلولهای اسپرم بدنبال تأثیر ROS وLPO پدیدار می گردد، که می توان به کاهش قدرت تحرک، اختلالات آکروزومی، و اختلالات جدی در غشاء سلول اسپرم با خاصیت تضعیف کنندگی اتصال اسپرم به سطح تخمک اشاره نمود (۱، ۲، ۳، ۱۳،۱۵، ٤٦، ۲٦).

سلولهای اسپرم در طی روند اسپرماتوژنز حجم عمده ای از سیتوپلاسم خود را از دست داده، بنابراین در مقایسه با سلولهای سوماتیکی با کمبود آنتی اکسیدانها روبرو می شود. با جداشدن پلاسمای مایع اسپرمی یا محیط زیست و شنای اسپرمها که حاوی انواع زیادی از آنتی اکسیدانهاست، شرایط بسیار خطرناک و نامطلوبی برای این سلولها فراهم خواهد شد که اولین پیامد آن هجوم ROS موجود در محیط خواهد بود (۲، ۲٤).

در پژوهش حاضر، اسکوربات بعنوان یک آنتی اکسیدان مهم و بسیار فعال در پلاسمای مایع اسپرمی، در محدوده غلظتی خاص از۳۰۰ تا ۲۰۰۰ میکرومولار مورد استفاده قرار گرفت. هدف اصلی ازاین طرح ارزیابی اثرات آنتی

www.SID.ir

Archive of SID

اکسیدانی اسکوربات بر برخی از خصوصیات عملکردی سلولهای اسپرم گاو در طی روند پراکسیداسیون القاء شده توسط سولفات آهن (پروموترLPO) بود. بر اساس داده های حاصل از آزمایشهای انجام شده و همانگونه که انتظار می رفت (در گروه کنترول مثبت)، افزودن یونهای آهن، بصورت وابسته به زمان موجب افزایش معنی دار میزان تولید MDA محیط گردید. اسکوربات در غلظت۵۰۰ میکرومولار و کمتر از آن باعث مهارگسترش پراکسیداسیون چربیهای غشایی اسپرمهای گاو شد. این یافته هم سو با نتایج حاصل از مجموعه تحقیقاتی است که در طی آنان مشخص گردید که افزودن 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 (۷، ۱۲، ۲۸). همچنین، نتایج آزمایش این تحقیق در هم سویی با تحقیقی است که به روش *In vitro* ، در سال ۱۹۹۸ به انجام رسید و در آن مشخص گردید که اسکوربات تنها در غلظتهای بین ۵۰ تا۸۰۰ میکرومولار واجد خاصیت آنتی اکسیدانی بوده و موجب مهار روند LPO در نمونه های اسپرم انسان می گردد (۱۳).

در واقع کارایی اسکوربات در بهبود باروری، ناشی از نقش آن در جمع آوری و خنثی سازی رادیکالهای آزاد بویژه رادیکالهای پروکسیل از محیط زیست اسپرمها و در نتیجه پایان دادن به روند پراکسیداسیون سلولی است (۲۸،۱۷،۱۲،۱۰). بهر حال بر اساس نتایج پژوهش حاضر، خاصیت آنتی اکسیدانی و حفاظتی اسکوربات درمقابله با پراکسیداسیون سلولی تنها محدود به غلظت ۵۰۰ میکرومولار و غلظتهای کمتر از آن بوده و حداکثر خاصیت آنتی اکسیدانی این ویتامین نیز مربوط به غلظت ۵۰۰ میکرومولار آن است. در غلظتهای بالاتر از اسکوربات این روند حفاظتی معکوس شده و در راستای گسترش هر چه بیشتر پراکسیداسیون در نواحی مختلف ازسلول بویژه غشاء های سلولی و اندامکی عمل می نماید. این عملکرد منفی اسکوربات مربوط به تغییر در ماهیت آن از آنتی اکسیدان به پرواکسیدان بوده که درغلظتهای زیاد و ایجاد کمپلکس با یونهای فلزی نظیر آهن، پدیدار می گردد (۱۲، ۲٤، ۲۳، ۲٦).

علاوه بر این و بر اساس دیگر یافته ها، مشخص شده است که اسکوربات بعنوان یک عامل احیاء کننده موجب رها شدن یونهای فلزی نظیر آهن و مس از ساختار بیوشیمیایی غشاء سلولها شده و بدین ترتیب با وارد نمودن یونهای آهن در مجموعه واکنشهای موسوم به فنتون (Fenton reaction) تبدیل کننده آب اکسیژنه محیط به رادیکال بسیار فعال هیدروکسیل، موجبات گسترش بیش از پیش LPO را فراهم خواهد نمود (۱٦). بنابراین، علیرغم آنکه آنتی اکسیدانهای غیر آنزیمی نظیر اسکوربات بعنوان دومین خط دفاعی پس از آنتی اکسیدانهای آنزیمی نظیر کاتالاز، در مهار روند پراکسیداسیون عمل می نمایند، اما کاربرد آنان به مثابه تیغی دو لبه است که در محدوده بسیار ظریفی از تغییرات غلظتی ضمن تغییر ماهیت، بعوامل خطر آفرین برای سلولها مبدل خواهند شد.

Lagares و همکارانش نشان دادند که یک همبستگی قوی و مثبت بین نتایج آزمایش تورم اسپرم و رنگ آمیزی با ائوزین جهت تعیین تعداد سلولهای زنده و فعال، وجود دارد(۱۸). روند LPO با افزایش پیوند های دوگانه در غشاء، موجب آسیب رسانی به آن می شود و بدین ترتیب ضمن بهم ریختن ساختار غشاء، موجب غیر فعال شدن سلولها می گردد(۲، ۲۲، ۲٤).

رادیکالهای آزاد بویژه انواع ROS موجب مهار آنزیمهای درون سلولی نیز می شود و بدین ترتیب اسپرمها از منابع آنزیمی دخیل در تأمین ATP مورد نیاز جهت تحرک و فعالیت محروم می گردند (۱۱، ۲٤). در پژوهش حاضر، پروموترLPO موجب افت شدیدی در

www.SID.ir

Archive of SID

درصد اسپرمهای زنده و فعال گاو می شود. با توجه به موارد بالا، کاهش در تعداد اسپرمهای زنده را می توان به مجموعه اثرات سوء ROS وLPO بر ساختار غشاء و عملکرد آن نسبت داد. اسکوربات با توان آنتی اکسیدانی خود (در غلظت ۵۰۰ میکرومولار و کمتر از آن) موجب خنثی شدن این اثرات سوء می گردد اما در غلظتهای بالاتر (با بروز خاصیت پرواکسیدانی) این روند معکوس شده و بر میزان اسپرمهای غیرفعال محیط می افزاید. در گزارش دیگر آمده است که اسکوربات (غلظتهای ٤۰۰۰-۱۰۰۰ میکرومولار) در نمونه های اسپرم انسان تیمار شده با آهن، موجب افت شدید قدرت تحرک اسپرمها می شود (۲٦).

میزان توانایی سلولهای اسپرم در انجام واکنش اکروزومی (بخشی از مرحله ظرفیت پذیری اسپرمها بوده که در طی آن آنزیمهای هیدرولیتیکی اسپرم آزاد می شود و در رسیدن اسپرم به تخمک نقش مهمی را ایفاء می نماید) بعنوان عاملی تعیین کننده ای در باروری مطرح بوده و تضمین کننده فرایند لقاح کامل و مناسب است. استحکام طبیعی غشاء نه تنها برای متابولیسم طبیعی اسپرم، بلکه جهت اتصال موفق آن به تخمک و واکنش اکروزومی طبیعی اسپرم نیز، لازم و ضروری است. در این مطالعه، درصد اسپرمهای با واکنش اکروزومی (هضم لایه نازک ژلاتین) در گروههای تیمار شده با آهن بمقدار زیاد کاهش یافت بنابراین استراتژی کاربرد مواد آنتی اکسیدان در جهت بهبود هر چه بیشتر وضعیت استحکام غشاء اسپرمها بعنوان یک امر ضروری، مورد نظر پژوهشگران این حوزه قرار گرفته است (۲۷). اسکوربات با توان آنتی اکسیدانی خود (در غلظت ۵۰۰ میکرومولار و کمتر از آن) موجب خنثی شدن اثرات سوء آهن بر رویدادهای سلولی شروع کننده واکنش آکروزومی می شود اما در غلظتهای بالاتر این روند معکوس شده و شمار اسپرمهای فاقد واکنش آکروزومی روی لامهای ژلاتین دار افزایش می یابد.

از جمله نقایص حاصل از القاء شدن LPO در اسپرمها ایجاد اختلالات گسترده در غشاء سلولی آنان بوده که موجب تضعیف اتصال این سلولها به سطح تخمک می شود(۳، ۱۵، ۲٤). از طرف دیگر، آب اکسیژنه (H_2O_2) بعنوان سوبسترای اصلی در واکنش هابر- ویس مطرح بوده و در حضور یونهای آهن به رادیکالهای هیدروکسیل مبدل می شود.این رادیکالهای فعال به نوبه خود موجب القاء و گسترشLPO در غشاهای زیستی خواهد شد و یکی از نتایج آن ایجاد اختلال در غشاهای آکروزومی و سپس مهار واکنش آکروزومی خواهد بود:

Haber-Weiss equation: $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{یون فلز}} {}^{\cdot}O_2 + {}^{\cdot}OH + OH^-$

نقل وانتقالات یونی نقش مهمی در شروع واکنش آکروزومی اسپرمها ایفاء می کند (۸). در این راستا نیز مشخص شده است که القاء روند LPO موجب مهار تبادلات یونی لازم جهت فعالیتهای اسپرم می شود (۸، ۱٤، ۲۷). در مجموع، اسکوربات در غلظتهای مختلف اثرات متفاوتی داشته و محققین با عنایت به این رویکرد منفی اسکوربات، می بایست آنرا در زمینه هایی نظیر لقاح آزمایشگاهی، کشت سلولی و نگهداری و ذخیره سازی سلولهای جنسی، بطور جدی مد نظر قرار دهد تا اثرات مخرب آنرا در سیستمهای زیستی به حداقل رساند.

تقدیر و تشکر: باسپاس از زحمات سرکار خانم دکتر نهال افتخاری در آنالیزهای آماری و جناب آقای رسول صیدایی در انجام کارهای آزمایشگاهی.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱- عربی م.،و راویندر آ.(۱۳۸۱). تأثیر نیکوتین بر اسپرم افراد نورمواسپرمیک: تعدیل توسط آنتی اکسیدانها، فصلنامه باروری و ناباروری،سال سوم،شماره یازدهم،تابستان: ص۲۲-۱۱.

2-Agarwal, A., Saleh, R.A. and Bedaiwy, M.A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil. Steril.: 79: 829-843.

3-Aitken, R.J. (1999), Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biol. Repord.: 59: 1037-1046.

4-Arabi, M. (2004). Analysis of impact of metal ion contamination on Carp (*Cyprinus carpio* L.). Biol. Trace Elem. Res.: 100(3): 229-246.

5-Arabi, M. (2004). Nicotinic infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. Andrologia: 36: 305-310.

6-Arabi, M., Sanyal, S.N., Kanwar, U. and Anand, R.J.K. (2003). 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.), Chapter 16, AOCS Press, USA, pp. 250-267.

7-Audet, I., Laforest, J.P., Martineau, G.P. and Matte, J.J. (2004). Effect of vitamin supplements on some aspects of performance, vitamin status, and semen quality in boars. J. Anim. Sci. 82(2): 626-633.

8-Baumber, J., Ball, B.A., Gravance, C.G., Medina, V. and Davies-Morel, M.C. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. J. Androl.: 21: 895-902.

9-Blom, E. (1950). A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. Fertil. Steril.: 1: 176-177.

10-Dawson, E.B., Harris, W.A., Teter, M.C. and Powell, L.C. (1992). Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. Fertil. Steril.: 58: 1034-1039.

11-De Lamirande, E. and Gagnon, C. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. J. Androl.: 13: 379-386.

12-Donnelly, E.T., Neil, M. and Lewis, E.M. (1999). Antioxidant supplementation in vitro does improve human sperm motility. Fertil. Steril.: 72(3) 4: 84-495.

13-Engel, S., Schreiner, T. and Petzoldt, R. (1999). Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. Andrologia: 31: 17-22.

14-Ernster, L. (1993). Lipid peroxidation in biological membranes: mechanisms and implications. In: Active oxygen, lipid peroxides and antioxidants, CRC Press, Boca Raton, pp. 1-38.

15-Fiscor, G., Ginsberg, L.C., Oldford, G.M., Snoke R.E. and Becker R.W. (1983). Gelatin-substrate film technique for detection of acrosin in single mammalian sperm. Fertil. Steril.: 30: 543-552.

16-Gutteridge, J.M.C. (1994). Antioxidants, nutritional supplements and life– threatening diseases. Br. J. Biomed. Sci.: 51: 288-295.

17-Jacob, R.A., Pianalto, F.S. and Agee, R.E. (1992). Cellular ascorbate depletion in healthy men. J. Nutr.: 122: 1111-1118.

18-Lagares, M.A., Petzoldt, H., Sieme, H., and Klug, E. (1999). Assessing equine sperm-membrane integrity. Andrologia: 32: 163-167.

19-Lees, M., and Paxman, J. (1972). Modification of Lowry procedure for the analysis of proteolipid protein. Anal. Biochem.: 47: 184-192.

20-Lewis, S.E.M., Sterling, E.S., Young, I.S. and Thompson, W. (1997). Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. Fertil. Steril. 67(1): 42-147.

21-Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. (1979). Assay for Lipid Peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem.: 95: 351-358.

22-Rao, B., Soufir, J.C., Martin, M. and David, G. (1989). Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece

www.SID.ir

Archive of SID

abnormalities and motility. Gamete Res.: 24: 127-134.

23-Sadrzadeh, S.M., Anderson D.K., Panter S.S., Hallway P.E. and Eaton J.W. (1987). Hemoglobin potetiates central nervous system damage. J. Clin. Invest.: 79(2): 662-664.

24-Sharma, R.K. and Agarwal, A. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. J. Urol.: 48: 835-850.

25-Sikka S.C. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Front. Biosci.: 1: 78-86.

26-Verma, A. and Kanwar, K.C. (1998). Human sperm motility and lipid peroxidation in different ascorbic acid concentrations: an in vitro analysis. Andrologia: 23: 325-329.

27-Yanagimachi, R. (1998). Mammalian fertilization. In: The physiology of reproduction (eds.: Knobil, E. and Neil, J.D.), Vol. 2, 2nd edition, Raven Press, New York, pp.189-318.

28-Yousef, M.I., Abdallah, G.A. and Kamel, K.I. (2003). Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. Anim. Reprod. Sci.: 76 (1-2): 99-111.

www.SID.ir

Archive of SID

The Concentration Effect of Ascorbate on Sperm Parameters in Bull

M. Arabi

Department of Biology, Shahrekord University, POB 115, Shahrekord, Iran.

Abstract

Oxygen metabolites as reactive oxygen species (ROS) are considered as major factors in male infertility. In the present investigation, we aimed to study the effect of different concentrations of ascorbate/vitamin C (300-2000 micromolar), on membrane integrity, acrosome reaction, and viability of bull (Holstein) spermatozoa in presence of iron (ferrous) ions as lipid peroxidation (LPO) promoter. LPO is one of the manifestations of ROS attack in biological membranes. LPO impinges on membrane integrity, triggers inactivation of membrane bound enzymes which involve in sperm motility. Ascorbate in concentrations below 1000 micromolar protects spermatozoa from free radical damages as evidenced from improvement in their membrane integrity (data of LPO test), elevated acrosome reactions, and increased viability. Concomitantly, there is also witnessed depletion of malondialdehyde (MDA)(an end product of LPO) generation following ascorbate supplementation. Ascorbate at 1000 micromolar concentration and above, however, is not protective, as evidenced by abrupt fall in sperm membrane integrity and rate of acrosome reactions and lowered % live sperm cells. Collectively, ascorbate acts as a double-edged sward in different concentrations and researchers must keep in mind this negative side of ascorbate application in their research fields like in vitro fertilization, cell culture, and preservation of gametes to minimize its deleterious impacts on biological systems.

Keywords: Bull sperm, Ascorbate, Peroxidation, Acrosome reaction, Eosin test.

www.SID.ir