Archive of SID

مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دوره ۶۷ ،شماره ۱۲، اسفند ۱۳۸۸، ۸۴۲-۸۳۵

فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های تام و سطح ویتامین C مایع سمینال در مردان آستنواسپرمی: مطالعه مورد- شاهدی

علی بیدمشکی‌پور[۱]
اباصلت حسین‌زاده کلاگر[۲و۳*]
مریم قلی‌نژاد چاری[۱و۲]
پوریا بی‌پروا[۴]

۱- گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه رازی، کرمانشاه
۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه
۳- گروه نانو و بیوتکنولوژی
۴- گروه شیمی، دانشکده شیمی

دانشگاه مازندران، بابلسر

*نویسنده مسئول، بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم‌پایه، گروه زیست‌شناسی، کد پستی ۱۴۶۷- ۴۷۴۱۶
تلفن: ۵۳۴۲۴۵۲-۰۱۱۲
email: acolagar@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۰۹/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۰۹/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: اختلال در عملکرد اسپرم امروزه به عنوان یکی از مهم‌ترین دلایل ناباروری در مردان شناخته شد. پلاسمای سمینال دارای یک منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی مختلف از قبیل ویتامین C است که از اسپرماتوزوآ در مقابل استرس اکسیداتیو به عنوان یکی از دلایل ناباروری که باعث نقص عملکرد و کاهش کیفیت اسپرم می‌شود، محافظت می‌کنند. هدف این مطالعه بررسی اثر غلظت آنتی‌اکسیدان‌های تام و ویتامین C پلاسمای سمینال بر تحرک اسپرم می‌باشد. ***روش بررسی:*** در این تحقیق که یک مطالعه مورد- شاهدی است، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های تام و سطح ویتامین C پلاسمای سمینال در ۶۴ نمونه سمن شامل ۳۲ مرد سالم به عنوان گروه کنترل و ۳۲ بیمار آستنواسپرمی به عنوان گروه موردی، به ترتیب با روش‌های FRAP و RP-HPLC اندازه‌گیری شدند. پارامترهای اسپرمی مطابق با دستورالعمل WHO آنالیز شدند. ***یافته‌ها:*** نتایج ما نشان داد میانگین سطح آنتی‌اکسیدان‌های تام در پلاسمای سمینال مردان آستنواسپرمی به طور معنی‌داری کمتر از مردان بارور می‌باشد (p=۰/۰۰۲). به‌علاوه، بین تحرک پایین اسپرم و کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌های تام ارتباط مثبتی مشاهده شد. از طرفی، سطح ویتامین C پلاسمای سمینال در مردان آستنواسپرمی از لحاظ آماری پایین‌تر از مردان کنترل بود (p=۰/۰۱). ***نتیجه‌گیری:*** بنابراین، با توجه به این نتایج پیشنهاد می‌شود آستنواسپرمی می‌تواند با نقص یا کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها مرتبط باشد.

کلمات کلیدی: آستنواسپرمی، آنتی‌اکسیدان، ویتامین C.

مقدمه

نقص عملکرد اسپرم (Defective sperm function) به‌عنوان یکی از بزرگترین عوامل دخیل در ناباروری مردان مطرح است.[۱و۲] اختلال در تحرک اسپرم یکی از شاخص‌های عمده در ناباروری مردان است به طوری که ناباروری ناشی از بی‌تحرکی یا کیفیت ضعیف تحرک اسپرم مشکل اصلی بیماران مراجعه‌کننده به مراکز درمانی است.[۱و۳] عوامل متعددی می‌تواند بر قدرت تحرک اسپرم اثر بگذارد که در بسیاری از موارد هنوز به خوبی شناخته نشده‌اند. یکی از فاکتورهای مهم در نقص عملکرد و کاهش تحرک اسپرم که امروزه توجه محققین زیادی را به خود جلب کرده است، وضعیتی به نام استرس اکسیداتیو است. این شرایط ناگوار در اثر افزایش متابولیت‌های واکنش‌پذیر اکسیژن Reactive Oxygen Species (ROS) ایجاد می‌شود.[۴-۶] این اکسیدان‌ها به خانواده رادیکال‌های آزاد تعلق دارند و بسته به غلظت و ماهیت آن‌ها نقش‌های فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی مهمی را در فرآیندهای زیستی بازی می‌کنند.[۵و۷] در شرایط فیزیولوژیکی، تولید مقادیر اندک ROS طی متابولیسم هوازی، برای ظرفیت‌پذیری (Capacitation)، واکنش آکروزومی، لقاح اسپرم با تخمک و همچنین برای بقا اسپرم ضروری است.[۵و۷و۸] اما تولید کنترل‌نشده ROS توسط اسپرم‌های نابالغ[۹] و لوکوسیت‌ها[۱۰] در مایع سمینال منجر به اختلال در اسپرم‌های طبیعی می‌گردد. اسپرماتوزوآ به دلیل داشتن مقادیر بالای اسیدهای چرب غیراشباع دارای چند پیوند دوگانه (Polyunsaturated fatty acids) در غشای پلاسمایی و میزان فوق‌العاده ناچیز آنتی‌اکسیدان‌های سیتوپلاسمی نسبت به آسیب اکسیداتیو بسیار حساس است.[۱۲و۱۱] شایع‌ترین متابولیت‌های واکنش‌پذیر اکسیژن که اثر شدیدی بر بیولوژی تولید مثل می‌گذارند شامل آنیون سوپراکسید (O_2^-)، پر اکسید هیدروژن (H_2O_2)،

www.SID.ir

Archive of SID

رادیکال‌های پراکسیل (-ROO) و رادیکال بسیار واکنش‌پذیر هیدروکسیل (-OH) می‌باشند.[۳و۴] تمام ترکیبات سلولی از جمله پروتیین‌ها، قندها، لیپیدها، اسیدنوکلئیک در معرض حملات ROS قرار دارند، در نتیجه ROS می‌تواند اثرات پاتوفیزیولوژیکی شدیدی بر اسپرم به‌جا گذارد.[۱۳] در مقابل این آسیب‌های اکسیداتیوی، پلاسمای سمینال دارای یک منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی از قبیل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز/ ردوکتاز و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی از قبیل ویتامین E، ویتامین C (اسید آسکوربیک)، پیروات، گلوتاتیون، کارنیتین، توکوفرول، تورین، هیپوتورین و غیره تحت عنوان کلی ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌های تام (Total Antioxidant Capacity (TAC می‌باشد که هر یک با مکانیسم‌های خاصی نقش اساسی در حفظ اسپرماتوزوآ در برابر حملات ROS و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد دارند.[۱۲-۱۵] به‌طور کلی، مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان‌ها شامل سه سطح حفاظتی: پیشگیری (Prevention)، جلوگیری (Interception) و ترمیم (Repair) می‌باشد.[۱۶] وجود غلظت بالای ROS در سمن به عدم تعادل بین تولید و تجزیه ROS و کاهش سیستم آنتی‌اکسیدان‌ها اشاره می‌کند که این امر می‌تواند منجر به نقص عملکرد اسپرم و در نهایت مرگ سلولی گردد.[۱۳و۱۷] آنتی‌اکسیدان‌های موجود در سمن را می‌توان به دو دسته کلی، آنتی‌اکسیدان‌های جمع‌کننده (Scavenger) و پیشگیری کننده (Preventative) تقسیم کرد. آنتی‌اکسیدان‌های پیشگیری‌کننده، مانند Metal chelator ها و پروتیین‌های متصل شونده به فلزات انتقالی اکسیدکننده از قبیل لاکتوفرین،[۱۶] از تشکیل ROS جدید جلوگیری می‌کنند و آنتی‌اکسیدان‌های جمع‌کننده از قبیل ویتامین C و E،[۱۸] بتاکاروتن و دیگر مکمل‌های رژیم غذایی، گلوتاتیون و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی،[۱۹] ROS های تولید شده از اکسید سلولی را از بین می‌برند.[۲۰] در واقع جلوگیری از ساخت ROS، اولین خط دفاعی آنتی‌اکسیدان‌ها بر علیه آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشد.[۱۵] رادیکال‌های آزاد، تمایل به واکنش‌های زنجیری دارند یعنی با داشتن یک تک الکترون می‌توانند با ترکیب دیگری واکنش داده و رادیکال آزاد جدیدی را ایجاد کنند (اصطلاحاً: Radical begets radical).[۱۲] بر این اساس برخی از آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های شکست زنجیره (Chain breaking) شناخته شدند.[۱۲و۲۱] یکی از آنتی‌اکسیدان‌های مهم پلاسمای سمینال که حدود ۶۵٪ از کل آنتی‌اکسیدان‌های شکست زنجیره را تشکیل می‌دهد اسید آسکوربیک (ویتامین C) می‌باشد.[۱۵و۱۹] غلظت بالای اسید آسکوربیک در پلاسمای سمینال احتمالا به نقش آن در حفظ اسپرماتوزوآ از حملات ROS و جلوگیری از آسیب اکسیداتیو DNA اشاره می‌کند.[۲۲] اسید آسکوربیک قادر است به طور کاتالیتیکی انتقال فعال یون‌های فلزی اکسیدکننده و رادیکال‌های آزاد را کاهش دهد به این ترتیب که در ابتدا اسید آسکوربیک خود اکسید می‌گردد و رادیکال‌های آزاد آسکوربات (Ascorbate Free Radical (AFR را تشکیل می‌دهد.[۲۳] بر خلاف دیگر رادیکال‌های آزاد، AFR نسبتاً غیرفعال است به‌طوری که می‌تواند طی واکنش‌های نامتجانس مجددا به اسید آسکوربیک و دهیدروآسکوربیک اسید (Dehydroascorbate; DHAA) تبدیل گردد و نتیجتاً از گسترش واکنش‌های شکست زنجیره‌ای جلوگیری می‌کند.[۲۴] این یافته‌ها اهمیت آنتی‌اکسیدان‌ها را در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و باوری نشان می‌دهند. مطالعات قبلی ما ارتباط نزدیکی را بین سطح TAC و کیفیت پارامترهای اسپرم در میان مردان بارور و نابارور نشان داد.[۲۵] در این مطالعه به منظور بررسی اثر TAC و ویتامین C بر تحرک اسپرم، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های تام و غلظت ویتامین C پلاسمای سمینال در بین دو گروه از مردان سالم (نرمواسپرمیک) و مردان نابارور آستنواسپرمی مورد مقایسه قرار گرفت.

روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع مورد- شاهدی شامل ۳۲ مرد آستنواسپرمی به عنوان گروه مورد و ۳۲ مرد سالم به عنوان گروه کنترل بود. حدود ۶۴ نمونه سمن (Semen) در طول تقریبا یک سال بین دی ماه ۸۶ تا بهمن ۸۷ از مرکز ناباروری حضرت فاطمه‌الزهرا (س) شهرستان بابل (IVF) جمع‌آوری گردید. مراجعه‌کنندگان متعلق به استان مازندران و استان‌های هم جوار آن بودند. نمونه‌ها بعد از دو تا سه روز دوری از آمیزش در ظروف پلاستیکی استریل دهان گشاد جمع‌آوری شدند. بعد از اینکوبه شدن مایع منی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت حدود ۱۰۰ میکرولیتر از آن جهت آنالیز پارامترهای اسپرم شامل: حجم (۲≤ میلی‌لیتر)، غلظت (۲۰٪≤)، تعداد (۴۰٪≤)، تحرک (۵۰٪≤) بر اساس استانداردهای سازمان جهانی بهداشت مورد استفاده قرار گرفت.[۲۶] مورفولوژی اسپرم (۴٪≤) نیز بر اساس قانون کروگر محاسبه شد[۲۷] (جدول ۱). حدود ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه انزال

www.SID.ir

Archive of SID

بلافاصله برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های تام و سطح اسید آسکوربیک (ویتامین C) مورد استفاده قرار گرفت. ۲- اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های تام مایع سمینال به روش FRAP: فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های تام مایع سمینال به روش Ferric Reducing of Antioxidants Power (FRAP) که اولین بار توسط Benzie در سال ۱۹۹۶ ابداع گردید، با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد.[۲۸] برای این منظور بعد از مایع‌شدن سمن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نمونه‌ها بلافاصله در ۱۴۰۰۰g به مدت هفت دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. سپس محلول رویی از رسوب جدا ۱۰ بار با آب مقطر رقیق گردید و سریعاً جهت اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان‌ها به‌کار رفت. برای اندازه‌گیری TAC، محلول استاندارد سولفات آهن (با غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار) و محلول کار FRAP [شامل: 300 mM Sodium acetate buffer pH 3.6، 10mM TPTZ (2,4,6-tri -pyridyl-s-triazine) و Ferric chloride 20mM به ترتیب با نسبت ۱۰: ۱: ۱] لازم است. محلول FRAP باید برای هر آزمایش تازه تهیه گردد. تمام مواد از شرکت سیگما (Sigma) خریداری شدند. این متد توانایی آنتی‌اکسیدان‌های مایع سمینال را در کاهش یون فریک (Fe3+) به یون فرو (Fe2+) نشان می‌دهد. بعد از آماده‌سازی محلول‌ها، داخل هر لوله آزمایش حدود ۱/۵ میلی‌لیتر محلول FRAP اضافه شد و به مدت پنج دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم انکوبه شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از نمونه سمن رقیق شده، ۵۰ میکرولیتر از محلول استاندارد با غلظت‌های مشخص و ۵۰ میکرولیتر از آب مقطر به هر یک از لوله‌های آزمایش مربوطه اضافه گردید و مجدداً در حمام آب گرم به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شدند و بعد از خارج نمودن لوله‌ها از حمام آب گرم، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (U-1600, Raleigh, China) خوانده شد و بر اساس میکرومولار بر لیتر بیان گردید (جدول ۱). ۳- اندازه‌گیری ویتامین C مایع سمینال با تکنیک HPLC: برای اندازه‌گیری غلظت ویتامین C با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ۲۴، نمونه‌های سمن به مدت چهار دقیقه در ۴۰۰۰g سانتریفوژ شدند. محلول رویی مایع سمینال ۱۰ بار با متانول سرد خالص ۱۰۰٪ (۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به همراه ۹۰۰ میکرولیتر از متانول) رقیق شدند و مخلوط حاصل به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس گردید و مجددا به مدت چهار دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شدند. سپس محلول رویی از رسوب جدا و در دمای ۲۰- تا زمان آنالیز نگه‌داری شدند. در این روش سیستم HPLC شامل پمپ (Model ۱۵۲۵ pump)، انژکتور (Rheodyne sample loop ۷۷۲۵i injector equipped with a ۲۰µL)، ستون C18 (۱۵۰×۴/۶mm, ۵µM particle size) و دتکتور (۲۴۸۷ UV model) بود. فاز متحرک با مخلوطی از استیک اسید و متانل به ترتیب نسبت‌های ۲/۵، ۸۰٪ در آب دیونیزه شده تهیه گردید. محلول‌ها پس از عبور از یک فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر، گاززدایی شدند و سپس به عنوان فاز متحرک در سیستم HPLC مورد استفاده قرار گرفتند. سرعت جریان در حدود ۱ml/min و طول موج به کار رفته ۲۵۴nm بود. قبل از اندازه‌گیری ویتامین C در نمونه‌های مجهول، نمودار کالیبراسیون با غلظت مشخص از آسکوربیک اسید باید رسم گردد. برای این منظور، محلول‌های استوک (۵mg/lit) از اسید آسکوربیک (Merck, Darmstadt, FRG) و متانول تهیه گردید. سپس برای آماده‌سازی محلول کار، محلول‌های استوک با متانول بیشتر رقیق شدند و به این ترتیب، نمودار کالیبراسیون با غلظت‌های ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۰۵، ۰/۰۰۰۴ و ۰/۰۰۰۳ مول بر لیتر آسکوربیک اسید رسم گردید. باید توجه شود فیلتر کردن تمام معرف‌ها و محلول‌های استاندارد قبل از استفاده در HPLC ضروری است (جدول ۱). کلیه آزمون‌های آماری با برنامه independent t-test و نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۶ انجام شد. میانگین سطح TAC، ویتامین C و پارامترهای اسپرمی به صورت mean±S.D با سطوح اطمینان CI٪۹۵ بیان شد و در تمام موارد $p<۰/۰۵$ از لحاظ آماری معنی‌دار بود.

یافته‌ها

در نمونه‌های مورد مطالعه تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین سن مردان نابارور آستنواسپرمی و مردان بارور (رنج سنی ۳۵-۲۴ سال) وجود نداشت. نتایج حاصل از آنالیز پارامترهای اسپرمی در (جدول ۱) نشان داده شده است. اگر چه پارامترهای مربوط به آنالیز اسپرموگرام (حجم، غلظت، تعداد) در گروه بیماران همانند گروه کنترل مطابق با استانداردهای WHO بود اما اختلاف بین آنها از لحاظ آماری معنی‌دار بود. از طرفی درصد اسپرم‌های متحرک و درصد اسپرم‌های دارای مورفولوژی طبیعی در مردان نابارور آستنواسپرمی در مقایسه با مردان نرمواسپرمی پایین‌تر بود ($p<۰/۰۰۱$). نتیجه حاصل از آزمایش FRAP

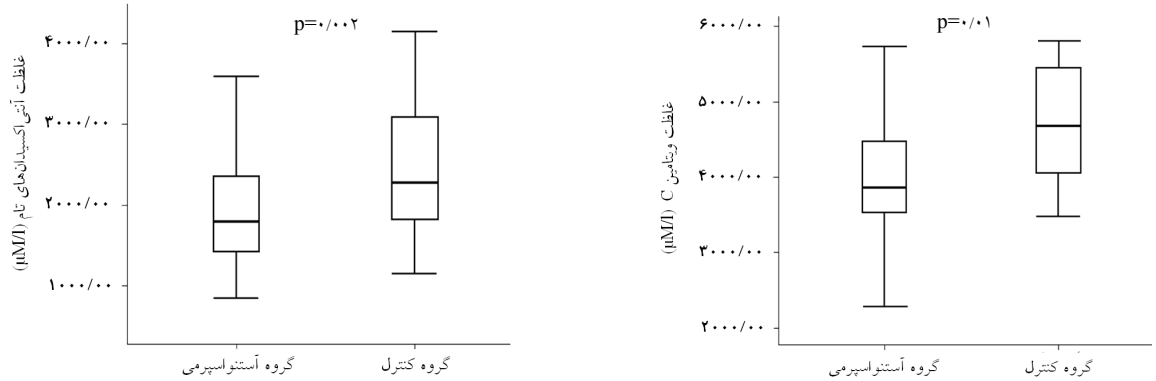
www.SID.ir

Archive of SID

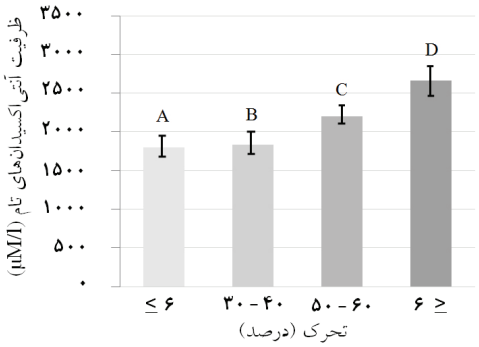
جدول- ۱: آنالیز پارامترهای اسپرم و غلظت TAC و ویتامین C در بیماران آستنواسپرمی و مردان سالم

پارامترهای اسپرم	مردان بارور (۳۲= تعداد نمونه)	مردان آستنواسپرمی (۳۲= تعداد نمونه)	p*
حجم سمن (میلی‌لیتر)	۳/۸۸±۰/۹۳	۳/۰۸±۱/۰۶	۰/۰۰۲
غلظت اسپرم ($\times 10^6$/ml)	۸۵/۷۸±۱۵/۸۲	۳۲/۸۱±۲۱/۵۵	<۰/۰۰۱
تعداد کل اسپرم ($\times 10^6$)	۳۳۳/۰۶±۱۰۵/۷۶	۹۵/۱۶±۵۶/۱۷	<۰/۰۰۱
درصد اسپرم‌های متحرک	۶۵/۳۱±۹/۰۶	۲۳/۹۱±۱۴/۳۵	<۰/۰۰۱
درصد مورفولوژی طبیعی اسپرم	۱۵/۳۱±۴/۳۱	۵/۲۲±۲/۶	<۰/۰۰۱
غلظت آنتی‌اکسیدان‌های تام (میکرومول بر لیتر)	۲۴۲۳/۷۱±۷۵۵/۰۸	۱۸۶۴/۸۶±۶۴۴/۰۱	۰/۰۰۲
غلظت ویتامین C (میکرومول بر لیتر)	۴۷۰/۸۰±۸۰/۳۴	۳۹۵/۱۵±۹۴/۵۰	۰/۰۱

*میانگین سطح TAC، ویتامین C و پارامترهای اسپرمی با آزمون آماری independent t-test به صورت Mean±SD بیان شد و مقادیر p<۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار است.



نمودار- ۱: مقایسه ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌های تام Total Antioxidant Capacity (TAC) و اسید آسکوربیک (Vit-C) در دو گروه از مردان نرمواسپرمی (n=۳۲) و آستنو- اسپرمی (n=۳۲).



نمودار- ۲: مقایسه سطح TAC با میزان تحرک اسپرم در چهار گروه از مردان، در هر گروه (n=۱۶). (A-B, p=۰/۷۹۴)، (A-C, p=۰/۰۶۸)، (A-D, p=۰/۰۰۱)، (B-C, p=۰/۱۵۴)، (B-D, p=۰/۰۰۴) و (C-D, p=۰/۰۷۵). p<۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار است.

نشان داد، غلظت آنتی‌اکسیدان‌های تام (TAC) مایع سمینال در مردان آستنواسپرمی کمتر از مردان سالم (p=۰/۰۰۲) می‌باشد (نمودار ۱).

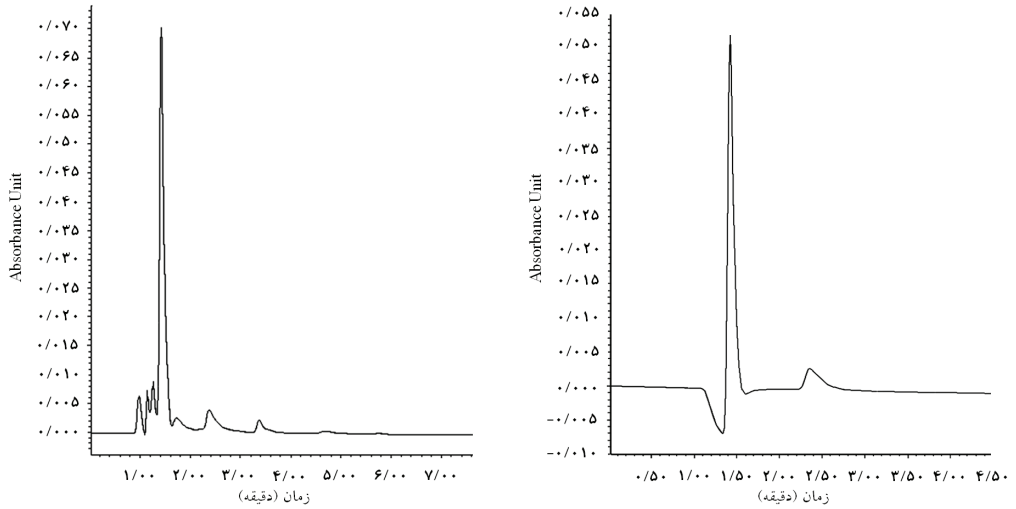
تحقیق ما نشان می‌دهد بین کاهش سطح TAC و تحرک پایین اسپرم یک ارتباط مثبت وجود دارد. این تفاوت در (نمودار ۲) بهتر قابل مشاهده است. سطح ویتامین C نیز اختلاف معنی‌داری (p=۰/۰۱) را در بین دو گروه مورد مطالعه نشان داد (نمودار ۲ و ۳). به احتمال زیاد یکی از دلایل کیفیت پایین پارامترهای اسپرمی از جمله تحرک اسپرم در مردان آستنواسپرمی کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌های پلاسمای سمینال از جمله ویتامین C باشد که این اثر منجر به افزایش اثرات پاتولوژیکی رادیکال‌های آزاد پلاسمای سمینال می‌گردد.

بحث

در این تحقیق غلظت آنتی‌اکسیدان‌های تام (TAC) در دو گروه از مردان بارور نرمواسپرمی و نابارور آستنواسپرمی مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج این مطالعه میانگین سطح TAC پلاسمای

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار- ۳: کروماتوگرام به دست آمده از غلظت اسید آسکوربیک استاندارد ۰/۰۰۱ مولار (سمت راست) و نمونه مایع سمینال یک مرد بارور (سمت چپ): در این نمودار زمان لازم (دقیقه) برای ظهور پیک بعد از تزریق نمونه تا رسیدن به دتکتور و Absorbance Unit (AU) در طول موج ۲۵۴ نانومتر است.

سمینال در مردان آستنواسپرمی به‌طور چشمگیری پایین‌تر از مردان سالم (p=۰/۰۰۲) بود. علاوه بر این به منظور بررسی اثر TAC بر کیفیت تحرک اسپرم، نمونه‌ها بر اساس درصد تحرک به چهار گروه تقسیم شدند (نمودار ۲). نتایج نشان داد ارتباط نزدیکی بین غلظت TAC و میزان تحرک اسپرم وجود دارد که مطابق با نتایج دیگر محققین بود.[۲۹و۳۰] در مطالعه Koca سطح TAC مایع سمینال در مردان نابارور آستنواسپرمی به طور معنی‌داری پایین‌تر از مردان بارور بود. آنها همچنین همبستگی مثبتی را بین TAC و تحرک اسپرم مشاهده کردند.[۳۰] در مطالعه خسروبیگی ارتباط TAC با درصد حرکت پیشرونده اسپرم (Progressively motile sperm%) بررسی شد. آنها همچنین سطح TAC را در بین دو گروه از مردان آستنواسپرمی و نرمواسپرمی با روش کالریمتریک اندازه‌گیری کردند. نتایج آنها همبستگی مثبتی را بین TAC و تحرک اسپرم نشان داد، از طرفی سطح TAC در گروه آستنواسپرمی از لحاظ آماری پایین‌تر از مردان نرمواسپرمی بود.[۳۱] در مقابل، Siciliano هیچ اختلاف معنی‌داری بین غلظت TAC مایع سمینال در میان بیماران آستنواسپرمی و نمونه‌های کنترل نیافتند.[۳۲] مطالعات بسیاری نشان دادند آنتی‌اکسیدان‌هایی از قبیل ویتامین C، ویتامین E، N-استیل سیستئین، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، آنزیم کاتالاز، آلبومین، تورین، هیپوتورین از کاهش تحرک اسپرم جلوگیری می‌کنند و کوآنزیم Q-10 منجر به افزایش تحرک اسپرم می‌شود.[۳۳] با توجه به اینکه اسید آسکوربیک یکی از فراوان‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های بدن می‌باشد، پلاسمای سمینال به کاهش سطح ویتامین C در بدن بسیار حساس است.[۳۴] یک روش دقیق، برای سنجش ویتامین C تکنیک HPLC می‌باشد.[۲۴] روش‌های HPLC متعددی برای تعیین کمیت و کیفیت ویتامین C در پلاسمای سمینال و سرم مثل [Ion exchange and ion pair reversed phase HPLC] که بیشتر اوقات با EleCtrochemical Detection (ECD) به‌کار می‌رود.[۳۵و۳۶] در تحقیق حاضر، غلظت ویتامین C پلاسمای سمینال با یک تکنیک ساده HPLC (RP-HPLC method coupled with UV detection) اندازه‌گیری شد. در مطالعه قبلی یافته‌های ما اختلاف معنی‌داری را بین سطح پایین ویتامین C در مردان نابارور سیگاری و غیرسیگاری در مقایسه با مردان بارور نشان داد[۳۷] که مطابق با نتایج دیگر محققین بود.[۳۸-۴۰] در این مطالعه به منظور بررسی دقیق‌تر اثر اسیدآسکوربیک با تحرک اسپرم، غلظت آن در پلاسمای سمینال دو گروه از مردان سالم بارور و مردان آستنواسپرمی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج ما سطح اسید آسکوربیک در بیماران آستنواسپرمی به‌طور قابل ملاحظه‌ای پایین‌تر از مردان سالم بود (p=۰/۰۱). این اختلاف نشان می‌دهد که سطح پایین ویتامین C احتمالا می‌تواند یکی از دلایل ناشناخته ناباروری در مردان آستنواسپرمی باشد. با توجه به اینکه سیتوپلاسم اسپرماتوزوآ دارای

www.SID.ir

Archive of SID

مقادیر اندکی از آنزیم‌های خنثی‌کننده ROS می‌باشد، بنابراین برای حفاظت از خود به سیستم‌های آنتی‌اکسیدان مایع سمینال روی می‌آورد.[۱۹ و ۱۵] بر اساس نتایج برخی از مطالعات در مراکز تحقیقاتی، تولید ROS توسط اسپرم‌ها به طور چشم‌گیری در تکنیک‌های فراهم‌آوری اسپرم جهت کمک به باروری (شامل پرکول گرادیان، شستشوی اسپرم، چرخه‌های مکرر سانتریفیوژ)، افزایش می‌یابد، افزایش در سطح ROS و عدم حفاظت آنتی‌اکسیدان‌ها به سبب برداشت مایع سمینال، احتمالا منجر به قرار گرفتن اسپرم‌ها در معرض آسیب‌های اکسیداتیو می‌گردد.[۳۳و۱۵] اسپرم‌های انتخاب شده برای تکنیک‌های کمکی تولید مثل (ART) و تزریق میکروسکوپی اسپرم به تخمک (Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI معمولا از یک محیطی با استرس اکسیداتیو گرفته می‌شوند، آسیب‌های پراکسیداتیو جانبی بر غشای پلاسمایی اسپرم و DNA مانع از لقاح موفقیت‌آمیز اسپرم و تخمک می‌گردد به طوری که اسپرماتوزوآهایی با DNA آسیب دیده که در روش ICSI به‌کار برده می‌شوند، می‌توانند فرآیند بارورسازی و تکامل جنین را به مخاطره بیاندازند که هنوز چگونگی آن مشخص نشده است.[۳۹و۱۵] بنابراین عوامل حفاظتی بر علیه ROS، از جمله آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند عوامل درمانی موثری برای ناباروری مردان محسوب شوند.[۴۰] به طوری که امتیازات بالقوه آنتی‌اکسیدان‌ها در کمک به تولیدمثل، توجه محققین زیادی را به خود جلب کرده است. امروزه بر این باورند که غنی‌کردن محیط اطراف اسپرم با آنتی‌اکسیدان‌ها، احتمالا منجر به حفاظت اسپرماتوزوآ بر علیه آسیب‌های القاء شده با استرس اکسیداتیو می‌گردد. بر این اساس محققین بسیاری نقش آنتی‌اکسیدان‌ها را در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) مورد بررسی قرار دادند. مطابق با مطالعه Keskes-Ammar مصرف روزانه ۲۲۵µg/day سلنیوم و ۴۰۰mg/day ویتامین E به صورت خوراکی برای سه ماه به طور معنی‌داری با کاهش سطح مالون دی‌آلدئید مایع سمینال، منجر به بهبود تحرک اسپرم می‌گردد.[۴۱] انکوبه کردن نمونه‌های سمن مردان آستنواسپرمی در شرایط آزمایشگاهی با ۵۰ میلی‌مولار از کوآنزیم Q-10 تحرک اسپرم را به طور معنی‌داری افزایش داد.[۴۲] مطالعاتی نیز نشان داد که گلوتاتیون درمانی (۶۰۰ میلی‌گرم) به صورت تزریق درون عضلانی به طور معنی‌داری تحرک اسپرم را افزایش می‌دهد.[۴۳] مطالعات کلنیکی بسیاری نیز نشان دادند مکمل کردن محیط اطراف اسپرم‌ها با ویتامین‌های C و E با کاهش ساخت ROS توسط اسپرم همراه است.[۴۰] این نتایج نشان می‌دهد احتمالا TAC عوامل درمانی موثری برای ناباروری مردان محسوب می‌شوند. با این وجود، نتایج آزمایشات کلینیکی آنتی‌اکسیدان‌ها که در درمان مردان نابارور استفاده می‌شود همچنان بحث‌برانگیز است و نیاز به بررسی‌های جامع‌تری دارد. روش‌های متعددی برای اندازه‌گیری TAC وجود دارد. در تحقیق کنونی فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های تام مایع سمینال به روش Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) اندازه‌گیری شد. اساس این روش بر مبنای توانایی آنتی‌اکسیدان‌های مایع سمینال در احیاء یون فریک به یون فرو است که نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های تام می‌باشد.[۲۸] اما این روش تنها برای اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان‌هایی با وزن مولکولی پایین مناسب است و برای اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و پروتئین‌های متصل به آنزیم چندان مناسب نیست. روش Enhanced chemiluminescence و کالریمتریک روش‌های دقیق‌تر و با ارزش‌تری برای اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان‌های تام می‌باشد.[۴۴] به‌طور خلاصه نتایج ما نشان داد که سطح پایین آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله اسید آسکوربیک در مایع سمینال بیماران آستنواسپرمی می‌تواند منجر به حساسیت بیشتر سلول‌های اسپرم نسبت به آسیب اکسیداتیوی گردد و احتمالاً یکی از اثرات پاتولوژیک آنها کیفیت پایین تحرک اسپرم می‌باشد. با توجه به مطالعه حاضر و تحقیقات پژوهشگران دیگر پیشنهاد می‌شود اندازه‌گیری دقیق سطح ROS و TAC پلاسمای سمینال (آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی) احتمالاً می‌تواند در تشخیص زیر گروه بیماران نابارور که دارای سطح بالای ROS و غلظت پایین TAC یا هر دو می‌باشند موثر باشد و از طرفی با به‌کار بردن آنتی‌اکسیدان‌های مناسب در دوز مشخص بتوان شرایط مطلوب‌تری را جهت بارورسازی اسپرم در کلینیک‌های ناباروری فراهم ساخت. بنابراین، اندازه‌گیری سطح آنتی‌اکسیدان‌ها و بررسی وضعیت اکسیداتیوی مایع سمینال در مردان نابارور از جمله بیماران آستنواسپرمی، احتمالا کمک زیادی در تشخیص، درمان و تقویت باروری مردان خواهد داشت. *سپاسگزاری:* از جناب آقای دکتر غلامعلی جورسرایی عضو مرکز باروری و ناباروری حضرت فاطمه الزهرا (س) و دیگر کارشناسان این مرکز که زحمت تهیه نمونه‌ها را تقبل نمودند و همچنین از زحمات آقای عیسی طهماسب پور مرزونی که در آنالیز طیف‌های HPLC ما را یاری نمودند صمیمانه تقدیر و تشکر می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Díez-Sánchez C, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, et al. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet* 2000;67(3):682-96.
2. Spiropoulos J, Turnbull DM, Chinnery PF. Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? *Mol Hum Reprod* 2002;8(8):719-21.
3. Moore FL, Reijo-Pera RA. Male sperm motility dictated by mother's mtDNA. *Am J Hum Genet* 2000;67(3):543-8.
4. Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJ. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J Androl* 1995;16(6):464-8.
5. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* 2004;8(6):616-27.
6. Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol* 2005;43(11):963-74.
7. Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 1997;20(2):61-9.
8. Agarwal A, Prabakaran SA, Sikka SC. Clinical Relevance of Oxidative Stress in Patients With Male FactorInfertility: Evidence-Based Analysis. *Am Urol Assoc* 2007;26:2-11.
9. Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ Jr, et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod* 2001;16(9):1922-30.
10. Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, et al. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril* 2002;78(6):1215-24.
11. Aitken J, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 1994;16(4):259-67.
12. Maneesh M, Jayalekshmi H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. *Indian J Clin Biol* 2006;21(2):80-9.
13. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility: a clinical perspective. Hum Reprod Update 2008;14(3):243-58.
14. Smith R, Vantman D, Ponce J, Escobar J, Lissi E. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Hum Reprod* 1996;11(8):1655-60.
15. Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. Urol Clin North Am 2002;29(4):817-27.
16. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993;215(2):213-9.
17. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem* 2001;8(7):851-62.
18. Sies H, Stahl W, Sundquist AR. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci* 1992;669:7-20.
19. Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci* 1996;1:e78-86.
20. Agarwal A, Prabakaran SA, Sikka SC. Clinical Relevance of Oxidative Stress in Patients With Male FactorInfertility: Evidence-Based Analysis. *Am Urol Assoc* 2007;26:2-11.
21. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993;300(2):535-43.
22. Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(24):11003-6.
23. Buettner GR, Jurkiewicz BA. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. Radiat Res 1996;145(5):532-41.
24. Patriarca M, Menditto A, Morisi G. Determination of ascorbic acid in blood or serum and in seminal plasma using a simplified sample preparation and high performance liquid chromatography coupled with UV detection. *J Liquid Chromatography* 1991;14:297-312.
25. Hosseinzadeh Colagar A, Pour Amir M, Tahmasb Pour Marzony E. Seminal plasma total antioxidants capacity of the infertile smoker and nonsmoker men. *J Shahid Chamran Uni Med Sci* 2008;19:124-31. [in Persian].
26. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination Of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4th ed. New York, NY: Cambridge University Press; 1999.
27. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986;46(6):1118-23.
28. Benzie IF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr* 1996;47(3):233-61.
29. Shi YC, Shang XJ, Wang XL, Huang YF. Correlation of total antioxidant capacity in seminal plasma with sperm motility of infertile men. Zhonghua Nan Ke Xue 2006;12(8):703-5.
30. Koca Y, Ozdal OL, Celik M, Unal S, Balaban N. Antioxidant activity of seminal plasma in fertile and infertile men. *Arch Androl* 2003;49(5):355-9.
31. Khosrowbeygi A, Zarghami N, Deldar Y. Correlation between Sperm Quality Parameters and Seminal Plasma Antioxidants Status. *Iranian J of Reprod Med* 2004;2(2):58-64.
32. Siciliano L, Tarantino P, Longobardi F, Rago V, De Stefano C, Carpino A. Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia. *J Androl* 2001;22(5):798-803.
33. 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.
34. Chinoy NJ, Mehta RR, Seethalakshmi L, Sharma JD, Chinoy MR. Effects of vitamin C deficiency on physiology of male reproductive organs of guinea pigs. *Int J Fertil* 1986;31(3):232-9.
35. Hernanz A. High-performance liquid chromatographic determination of ascorbic acid in serum using paired-ion chromatography and UV spectrophotometric detection. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988;26(7):459-61.
36. Chung WY, Chung JK, Szeto YT, Tomlinson B, Benzie IF. Plasma ascorbic acid: measurement, stability and clinical utility revisited. *Clin Biochem* 2001;34(8):623-7.
37. Colagar AH, Marzony ET. Ascorbic Acid in human seminal plasma: determination and its relationship to sperm quality. *J Clin Biochem* Nutr 2009;45(2):144-9.
38. Mostafa T, Tawadrous G, Roaia MM, Amer MK, Kader RA, Aziz A. Effect of smoking on seminal plasma ascorbic acid in infertile and fertile males. *Andrologia* 2006;38(6):221-4.
39. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13(7):1864-71.
40. Rolf C, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Hum Reprod* 1999;14(4):1028-33.
41. Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, Ghozzi H, Hammami S, et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch Androl* 2003;49(2):83-94.
42. Lewin A, Lavon H. The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. *Mol Aspects Med* 1997;18 Suppl:S213-9.
43. Lenzi A, Lombardo F, Sgrò P, Salacone P, Caponecchia L, Dondero F, et al. Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertil Steril* 2003;79(2):292-300.
44. Said TM, Kattal N, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Mascha E, et al. Enhanced chemiluminescence assay vs colorimetric assay for measurement of the total antioxidant capacity of human seminal plasma. *J Androl* 2003;24(5):676-80.

www.SID.ir

Archive of SID

Tehran University Medical Journal; Vol. 67, No. 12, Mar 2010: 835-842

Seminal plasma total antioxidant capacity and vitamin- C levels in asthenozoospermia: a case- control study

Ali Bidmeshkipour Ph.D.[1]
Abaslt Hosseinzadeh Colagar Ph.D.[2,3*]
Maryam Gholinezhad Chari M.S.[1,2]
Pourya Biparva Ph.D.[4]

1- Department of Biology, Faculty of Basic Science, Razi University, Kermanshah, Iran.
2- Department of Biology, Faculty of Basic Science.
3-Nano and Biotechnology Research Group.
4- Department of Chemistry, Faculty of Chemistry

University of Mazandaran, Babolsar Iran.

*Corresponding author: Department of Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Code Post: 47416-95447, Babolsar, Iran.
Tel: +98-112-5342452
email: acolagar@yahoo.com

Received: December 02, 2009 Accepted: January 10, 2009

Abstract

***Background*:** Defective sperm function is now recognized as one of the most important causes of male infertility. Seminal plasma possesses a rich source of different enzymatic and non-enzymatic antioxidants such as vitamin C (ascorbic acid) that protect spermatozoa against oxidative stress as one of the mediators of infertility causing sperm dysfunction and low sperm quality. The aim of this study was investigation of seminal total antioxidant capacity and determination of vitamin C effects on sperm motility.

***Methods*:** We designed a case-control study with a total subject of 62 males. Sperm parameters were analyzed according to World Health Organization guidelines (WHO, 1999). Total antioxidant capacity and vitamin C level of seminal plasma were measured in the 32 normozoospermic as the control group and 32 asthenospermic men as the case group using FRAP (Ferric Reducing of Antioxidants Powers) and RP-HPLC (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography) methods, respectively.

***Results*:** Our results indicated that total antioxidant capacity levels in the seminal plasma of asthenospermic men were significantly lower than healthy men (p=0.002). In addition, we found a positive correlation between reduced total antioxidant capacity levels and low sperm motility. Vitamin C levels of seminal plasma in asthenospermic men were statistically lower than control men (p=0.01).

Conclusions: It is suggested that asthenospermia could be related to an antioxidant deficiency or it's reduction.

Keywords: Asthenozoospermia, antioxidant, vitamin C.

www.SID.ir