Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:30 IRDT on Saturday May 12th 2018



مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، اسفند ۱۳۹٦، دوره ۷۵، شماره ۱۲، صفحه‌های ۸٦۰ تا ۸٦۸

# متابولومیکس، چشم‌اندازی برای مردان نابارور: *مقاله مروری*

نیلوفر آقارضایی[۱و۲]، رضوان مرزبانی[۳]
حسن رضادوست[۳]، سعیده زمانی کوخالو[۱]، بابک ارجمند[٤و٥]
کامبیز گیلانی[۱و٥*]

*۱- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران.*
*۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.*
*۳- گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.*
*٤- مرکز تحقیقات سلول درمانی و پزشکی بازساختی، پژوهشگاه غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.*
*٥- مرکز تحقیقات متابولومیک و ژنومیک، پژوهشگاه غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.*

*نویسنده مسئول: تهران، خیابان اوین، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن‌سینا.
تلفن: ۰۲۱- ۲۲٤۳۲۰۲۰
E-mail: k.gilany@ari.ir

## چکیده

دریافت: ۱۳۹٦/۰٤/۱۱ ویرایش: ۱۳۹٦/۰٤/۱۸ پذیرش: ۱۳۹٦/۱۱/۱۵ آنلاین: ۱۳۹٦/۱۱/۲۵

ناباروری حدود ۲۰٪ از زوج‌های جهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. عوامل موثر بر باروری در مردان و زنان به‌طور مساوی توزیع شده است. با وجود تحقیقات گسترده در ناباروری مردان اتیولوژی بسیاری از مردان نابارور ناشناخته است. در Nature سال ۲۰۱۰ از پژوهشگران برجسته و سیاست‌گذاران خواسته شد سند چشم اندازی برای سال ۲۰۲۰ ارایه دهند، که در نهایت متابولومیکس به عنوان فنآوری پیشرو در Omics توسط این افراد معرفی شد. در حدود ۲۰ سال پیش واژه‌ی متابولومیکس تعریف شد، درحالی‌که کاربرد بالینی متابولومیکس به بیش از ۱۰۰۰ سال پیش برمی‌گردد، زمانی که پزشک و فیلسوف بزرگ ایرانی، ابن‌سینا، تغییرات ادرار فرد در هنگام بیماری را مشاهده می‌کرد. امروزه این تغییرات بو یا رنگ در نتیجه تنظیم نبودن متابولیت‌ها شناخته می‌شود که نشان‌دهنده‌ی بیماری‌های متابولیک است. روش متابولومیکس تجزیه و تحلیل‌های الگویی واحد است که توسط مسیرهای بیوشیمیایی خاصی که در پس تولید مواد بیولوژیکی مانند اسپرماتوزوآ یا پلاسمای مایع منی است، دنبال می‌شود. جهت تشخیص مردان نابارور در آنالیز مایع منی پارامترهای متداولی از جمله: تحرک، مورفولوژی، غلظت و تعداد اسپرم مورد بررسی قرار می‌گیرد. پلاسمای منی انسان منبع بیولوژیک ارزشمندی است که متاسفانه در تشخیص مردان نابارور مورد استفاده قرار نمی‌گیرد. بر اساس داده‌های موجود، هیچ پارامتری برای تجزیه و تحلیل پلاسمای مایع منی وجود ندارد. بنابراین شناسایی یک پارامتر جدید جهت تشخیص مردان نابارور امری ضروری است. پیشنهاد ما بر اساس پژوهش‌های پیشین خود، استفاده از پلاسمای مایع منی جهت تشخیص مردان نابارور است. تنها تعداد محدودی از مطالعات با استفاده از روش‌های متابولومیکس به مطالعه در زمینه ناباروری مردان پرداخته‌اند.

***کلمات کلیدی:*** نشانگر زیستی، ناباروری مردان، متابولومیکس، پلاسمای مایع منی.

حدود ۱۵٪ از زوج‌ها، مشکل ناباروری دارند که در حدود ۵۰٪ از موارد، عامل مردانه دخیل می‌باشد.[۳-۱] باوجود پیشرفت در درمان ناباروری، پرسش‌های بسیاری به‌ویژه در رابطه با ناباروری مردان بدون پاسخ مانده است. به نظر می‌رسد، ناباروری مردان نوعی اختلال پیچیده است که می‌تواند بر اساس پروتئوم، متابولوم و ژنوم تشریح گردد. ناباروری مردان با منشاء ناشناخته به‌عنوان ناباروری ناشناخته یا آیدیوپاتیک (Idiopathic) طبقه‌بندی می‌شود. استفاده از فنآوری‌های جدید در زمینه‌های ژنومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس نویدی برای تشخیص و درمان ناباروری با علل مردانه می‌باشد. در این بین، امروزه تحقیقات متابولومیکس با چشم‌اندازی برای طبقه‌بندی نشانگرهای زیستی اختصاصی در جهت شناسایی هرچه بهتر ناباروری مردان ایجاد شده است (شکل ۱).[٤و٥]

شکل ۱ سیستم مرکزی زیستی شامل الف، اصل بنیادی زیست‌شناسی مولکولی (ژنتیک مولکولی) را نشان می‌دهد که در آن



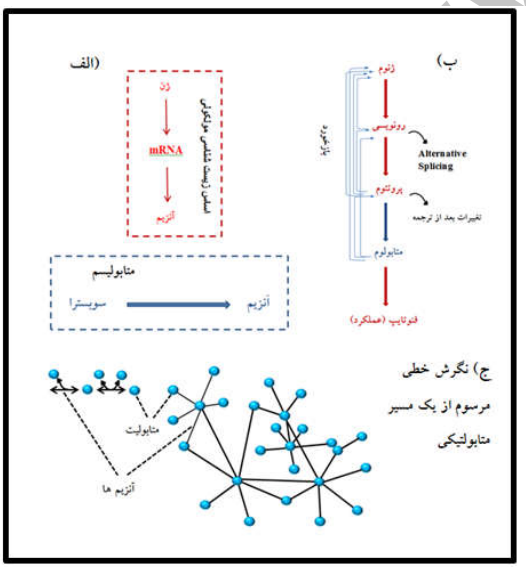
www.SID.ir

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:30 IRDT on Saturday May 12th 2018

جریان اطلاعات از ژن به سمت رونوشت پروتیین است، همچنین جایی در متابولیسم که آنزیم عمل می‌کند را نشان داده است، ب، طرح شماتیک و کلی سازمان یافته اومیک که جریان اطلاعات از ژن به رونوشت، پروتئوم، متابولوم و عملکرد یا فنوتیپ را نشان می‌دهد و ج، نمایش خطی متداول مسیر متابولیک و دیدگاه پذیرفته شده از ارتباطات متابولیتی را نشان می‌دهد. دایره‌های آبی رنگ متابولیت‌ها هستند، درحالی‌که اتصالات نشان‌دهنده‌ی فعالیت آنزیمی می‌باشد.[۵]

ترکیبات در بدن موجود زنده به متابولیت‌های اولیه و ثانویه تقسیم می‌شوند. به‌طور کلی متابولیت‌های اولیه بین تمام ارگانیسم‌های زنده توزیع شده‌اند و با فرآیندهای ضروری زندگی مرتبط هستند، که شامل ترکیباتی مانند قندها، اسیدهای آمینه و اسیدهای آلی می‌باشند. این ترکیبات توسط فرآیندهای متابولیکی اولیه از قبیل گلیکولیز، تنفس و فتوسنتز تولید می‌شوند. افزون‌براین، منابع انرژی مانند پروتیین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و یا پلی ساکاریدها متعلق به متابولیسم اولیه هستند، اگرچه این ترکیبات در جزییات ساختاری از موجودی به موجود دیگر تفاوت‌هایی دارند. در مقابل، متابولیت‌های ثانویه دارای توزیع محدودتری می‌باشند و اغلب به‌عنوان ویژگی خاصی از موجودات و گونه‌ها محسوب می‌شوند. به‌طور کلی می‌توان گفت، متابولیت‌های اولیه در فرآیندهای متابولیکی تغذیه‌ای و ضروری در داخل هر سلول شرکت می‌کنند. در مقابل، به‌نظر نمی‌رسد متابولیت‌های ثانویه به‌طور مستقیم در رشد و گسترش نقش داشته باشند و بیشتر برای ارگانیسمی که آن‌ها را تولید می‌کند به جهت تاثیر در تعاملات اکولوژیکی بین موجودات و محیط مرتبط با آن‌ها مهم هستند.[۶و۷] نشانگر زیستی (Biomarker) یک متابولیت یا دسته‌ای از متابولیت‌های یک فرآیند، رویداد یا شرایط زیستی است که بتواند به سادگی و به‌طور کاملا مجزا محاسبه، ارزیابی و مورد مطالعه قرار گیرد. یک نشانگر زیستی مناسب باید در مراحل اولیه یک رویداد زیستی و به راحتی قابل دسترس باشد.[۱] در تشخیص و ارزیابی نشانگرهای زیستی در ارتباط با مشکل ناباروری مردانه، چندین روش مبتنی بر آنالیز شیمیایی و بیوشیمیایی ایجاد شده است. این روش‌ها به صورت مقایسه‌های کمی و کیفی بین نشانگرهای زیستی در شرایط سلامتی و ناباروری مردان است.[۸]

دانش متابولومیکس، شامل بررسی تمام یا بخشی از متابولیت‌های سلول‌ها، بافت‌ها و یا مایعات بیولوژیک در واحد زمان است که در آغاز به‌عنوان روشی برای ژنومیکس کاربردی مطرح شده بود.[۹و۱۰] اما امروزه تاثیر خود را فراتر از آن برده است و این کاربردی و عملی شدن، برای ارزیابی تغییرات در سطوح متابولیتی تبدیل به یک باور قوی شده است.[۱۰و۱۱] متابولیت‌ها خروجی‌های فرآیندهای تنظیم سلولی هستند و اهداف آن‌ها می‌تواند به‌عنوان آخرین پاسخ تنظیمات بیولوژیکی به تغییرات اکولوژیکی در نظر گرفته شود، مجموعه‌ای از متابولیت‌هایی که به‌وسیله سیستم بیولوژیکی ایجاد می‌شوند "متابولوم" نامیده می‌شوند.[۱۲-۱۴] به‌علت اثر تنظیمی متابولیت‌ها به عنوان بخشی از مسیرهای بیوشیمیایی، به خصوص با توجه به کاربرد آن‌ها به‌عنوان مارکرهای تشخیصی برای بیماری‌های مختلف، ارزیابی سطوح متابولیتی امری بسیار ضروری است.[۱۵] طی دهه‌ی گذشته، اصطلاحات مختلفی در ارتباط با کمیت و کیفیت متابولیت بیان شده است، از جمله نقشه‌برداری متابولوم (Metabolome mapping)، انگشت‌نگاری متابولیک (Metabolic fingerprinting)، ردیابی متابولیک (Metabolic footprinting) و تجزیه و تحلیل هدفمند متابولیک (Metabolic target analysis) که در جدول ۱ به‌صورت مختصر توضیح داده شده‌اند.[۱۶]




**شکل ۱: سیستم مرکزی زیستی شامل الف، اصل بنیادی زیست‌شناسی مولکولی (ژنتیک مولکولی)**



www.SID.ir

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:30 IRDT on Saturday May 12th 2018

تنوع ساختاری بسیار وسیع متابولیت‌های موجود در متابولوم انسانی نشان می‌دهد که تجزیه و تحلیل تنها با تکیه بر یک تکنیک دستگاهی کاری بسیار مشکل است، این مطلب حضور و مقایسه انواع تکنولوژی‌ها را موجه می‌کند. تکنیک‌های مورد استفاده در پژوهش‌های متابولومیک به‌طور کلی به دو گروه روش‌های طیف سنجی نوری و طیف‌سنجی غیرنوری طبقه‌بندی می‌شوند. تفاوت‌های ذاتی در مکانیسم‌های مورد استفاده در هر کدام از این تکنیک‌ها آن‌ها را دارای مزایا و معایبی ذاتی برای اهداف کمی و کیفی سازی تبدیل می‌کنند. جدول ۲ خلاصه‌ای از مکانیسم و توانایی این تکنیک‌ها در مطالعات متابولومیکس ارایه می‌دهد.

شاید در مواجهه با تکنیک‌های متنوع در دنیای شیمی آنالیز، سوال بزرگ در رابطه با انتخاب نوع تکنیک در رابطه با متابولومیکس مطرح شود. به‌نظر می‌رسد عواملی مانند هدف کار، نوع متابولیت‌های هدف (مطالعه‌ی متابولومیکس می‌تواند به صورت هدفمند (Targeted metabolomics) و یا غیرهدفمند (Untargeted metabolomics) تعریف شود)، دقت و درستی و سرعت مورد نیاز برای مطالعه در انتخاب الگوی کار بسیار اثربخش باشند. به‌عنوان مثال این‌که در یک مطالعه متابولومیکس بهتر است از Mass spectrometry (MS) یا Nuclear magnetic resonance (NMR) استفاده شود، بسیار به هدف آنالیز و ماتریکس همراه نمونه بستگی دارد. سیستم‌های اسپکترومتری جرمی از مزیت حساسیت بسیار بالا بهره می‌برند گرچه مراحل آماده‌سازی ممکن است در اندازه‌گیری، خطا به‌وجود آورد. حال آن‌که در تکنیک NMR قدرت انتخاب کمتر است، محدودیتی برای نوع ساختارهای شیمیایی وجود ندارد ولی حد تشخیص پایین است و جداسازی اولیه که از یک سیستم کروماتوگرافی به‌وجود آمده است، وجود ندارد. به عبارت دیگر در سیستم‌های Liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) پتانسیل بالقوه برای شناسایی ترکیبات بسیار بیشتر است. اساس تفسیر داده‌ها در هر دو روش به‌طور کامل متفاوت است و نیاز به آموزش بسیار بالایی دارد.[۱۷-۱۹]

استرس اکسیداتیو، در نتیجه عدم تعادل بین گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species, ROS) و آنتی‌اکسیدان‌ها در مایع منی می‌تواند منجر به تخریب اسپرماتوزوآها شود که موجب ناباروری مردان می‌گردد. نخستین مطالعه متابولومیکس در رابطه با ناباروری مردان بر روی استرس اکسیداتیو انجام شده است. استرس اکسیداتیو موجب اختلالات اسپرماتوژنیک می‌شود که به دلیل افزایش سطح گونه‌های اکسیژن فعال در پلاسمای مایع منی (Seminal plasma) همراه با اختلال در سیستم حفاظتی آنتی‌اکسیدانی می‌باشد.[۸و۲۰] عدم تعادل استرس اکسیداتیو در پلاسمای مایع منی مردان نابارور آیدیوپاتیک به کمک تکنیک طیف سنجی رامان به اثبات رسیده است.[۲۱]

افزون‌براین در مطالعه‌ی دیگری در این راستا، نشان داده شد که عدم تعادل اکسیداتیو در گروه Testicular sperm extraction (TESE) منفی نسبت به TESE مثبت بسیار بیشتر است.[۲۲] افزون‌براین، Kandar و همکاران به ارزیابی رتینول و آلفا توکوفرول در پلاسمای مایع منی به جهت تعیین تغییر استرس اکسیداتیو در افراد سیگاری و افراد غیرسیگاری پرداختند. با این حال، آن‌ها قادر به نشان دادن تغییرات قابل توجه این متابولیت‌ها در پلاسمای مایع منی نشدند.[۲۳] De Iuliis و همکاران تولید خودبه‌خود سوپراکسید در اسپرماتوزوا را نشان دادند که دارای ارتباط منفی با تحرک اسپرم است.[۲۴] گزارش شده است که مردان آستنوزواسپرمیک تغییر قابل توجهی را در سطح متابولوم در مقایسه با مردان بارور نشان می‌دهند که این بر اساس مطالعات انگشت‌نگاری متابولومیکس در پلاسمای مایع منی بیماران مبتلا به آستنوزواسپرمیک صورت گرفته است. افزون‌براین، در مطالعه‌ای عدم تعادل ROS در پلاسمای مایع منی افراد آستنوزواسپرمیک در مقایسه با مردان بارور مشاهده گردید.[۲۵]

مطالعات نشان داده است که سطح سیترات، لاکتات و گلیسریل فسفوریل کولین پلاسمای مایع منی در مردان مبتلا به آزواسپرمی در مقایسه با افراد سالم گروه شاهد تغییر یافته است که نشان دهنده‌ی تداخل احتمالی ROS با ناباروری است.[۲۶] در پژوهشی که به‌تازگی انجام گرفته است، ۳۶ متابولیت متمایز در آزوسپرمی غیرانسدادی (Non-obstructive azoospermia, NOA) شناسایی گردید. این متابولیت‌ها می‌توانند به‌عنوان نشاگرهای زیستی متمایز برای تشخیص گروه‌های متفاوت NOA مورد استفاده قرار گیرند که بسیار دارای اهمیت است، چرا که NOA حدود ۱۰٪-۶ از موارد ناباروری مردان را شامل می‌شود.[۲۰و۲۷] واریکوسل با برخی از شرایط اسپرماتوژنز در ارتباط است که از پارامترهای مایع منی نرمال تا اسپرماتوزواهای الیگوآستنوتراتوزواسپرمیا (Oligoasthenoteratozoospermia, OAT)



www.SID.ir

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:30 IRDT on Saturday May 12th 2018

**جدول ۱: تعاریف مرتبط با متابولومیکس[۱۶]**

| واژه | تعریف |
|---|---|
| **متابولوم Metabolome** | مجموعه‌ای کامل از تمام متابولیت‌های پیدا شده در نمونه‌های بیولوژیکی (اغلب با وزن مولکولی کم)، که محصولات نهایی بیان ژن هستند. |
| **نقشه‌برداری متابولوم Metabolome mapping** | شناسایی کامل و جامع تمام متابولیت‌های یک محیط بیولوژیک هدف |
| **متابولومیکس Metabolomics** | شناساسی همراه با تعیین مقدار تمام متابولیت‌ها در محیط بیولوژیک هدف |
| **پروفایل متابولیک Metabolic profiling** | شناسایی و تعیین مقدار تعدادی منتخب از متابولیت‌های از پیش تعریف شده، که کمابیش مربوط به یک مسیر بیولوژیک خاص می‌شوند |
| **انگشت‌نگاری متابولیک/ متابولومیکس Metabolic/Metabolomics fingerprinting** | تجزیه و تحلیل کلی، سریع و معمولا بدون شناسایی بر اساس پروفایل کلی نمونه از نمونه‌های خام و یا عصاره‌های نمونه به منظور طبقه‌بندی و یا غربالگری نمونه‌ها |
| **ردیابی متابولیک/اگزومتابولومیکس Metabolic footprinting/Exometabolomics** | تجزیه و تحلیل محتوای متابولوم خارج سلولی یک موجود زنده، متشکل از متابولیت‌های ترشح شده از سلول که هنوز توسط محیط اطراف سلولی مصرف و تجزیه نشده‌اند. به‌عنوان مثال در سیستم‌های میکروبی، شامل محیط اطراف ارگانیسم یعنی محیط کشت است. |
| **تجزیه و تحلیل هدفمند متابولومیک /متابولیت Target analysis metabolic/Metabolit** | تجزیه و تحلیل کیفی و کمی گروهی از متابولیت‌های مرتبط با واکنش‌های متابولیک مشخص. برای نمونه پروفایل آمینواسیدها یا اسیدهای چرب |
| **تعیین پروفایل متابولیک غیر هدفمند Profiling untargeted metabolic** | تعیین پروفایل متابولیک غیرهدفمند معمولا به‌عنوان مقایسه تجزیه و تحلیل‌های بین گروه کنترل و گروه تحت درمان می‌باشد. این تنها به گروهی از متابولیت‌ها ختم نمی‌شود و شامل گروه بزرگی از متابولیت‌ها است و می‌تواند به شناسایی متابولیت‌های جدید منجر شود. |
| **متابونومیکس Metabonomics** | اندازه‌گیری کمی پاسخ متابولیکی واسته به چندین متغیر مستقل در یک سیستم زنده، به محرک‌های پاتوفیزیولوژیک و یا تغییرات ژنتیکی |

یا آزواسپرمی را شامل می‌شود. این می‌تواند به‌عنوان یک نتیجه طبیعی کلیدی در مردان نابارور در نظر گرفته شود. ارتباط نزدیکی بین استرس اکسیداتیو با اختلال عملکردی اسپرم‌ها وجود دارد. همچنین استرس اکسیداتیو موجب از بین رفتن یکپارچگی ژنوم اسپرم از طریق افزایش تعداد شکست‌ها در DNA تک رشته‌ای و دو رشته‌ای می‌شود.[۲۸-۳۱] توضیح دیگری که می‌توان ارایه نمود در رابطه با اختلالات غلظت متابولیت‌هاست که توسط پروفایل متابولومیکس مایع منی در شرایط وابسته به واریکوسل نشان داده شده است.[۳۲]

مدت زیادی است که پلاسمای مایع منی به‌عنوان یک منبع کلیدی جهت بررسی ناباروری مردان مورد استفاده قرار می‌گیرد. یکی از نخستین مطالعاتی که از پلاسمای مایع منی برای شناسایی نشانگر زیستی استفاده شد توسط Hamamah و همکاران با استفاده از فناوری NMR انجام گرفت.[۲۶] آن‌ها در مطالعه‌ی خود به تجزیه و تحلیل چهار گروه پرداختند: افرادی که دارای اختلالات اسپرماتوژنیک هستند، افرادی که دارای انسداد آزواسپرمیک (وازکتومی) هستند، افراد مبتلا به OAT شدید و افراد نورموزواسپرمیک نرمال (گروه شاهد). آن‌ها دریافتند که سطح گلیسریل فسفوریل کولین، سیترات و لاکتات در مردان آزواسپرمیک نسبت به گروه شاهد کمتر است. افزون‌براین نسبت سیترات به لاکتات و نسبت Glycerophospholipids (GPC) به لاکتات تفاوت چشمگیری با گروه شاهد و نقص اسپرماتوژنیک یا گروه‌های انسدادی آزواسپرمی دارند.[۲۶] درحالی‌که با استفاده از یک روش ساده‌تر یعنی Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) نشان داده شد که تغییرات چشمگیری در سطح متابولوم بین مردان آزواسپرم غیرانسدادی و نورموزواسپرمیک وجود دارد.[۳۳]



www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:30 IRDT on Saturday May 12th 2018

**جدول ۲: تکنیک‌های تحلیلی مورد استفاده در حوزه متابولومیکس**

| | مزایا | معایب | هزینه آزمایش |
|---|---|---|---|
| NMR | این روش‌ها می‌توانند به‌طور مستقیم در نمونه استفاده شوند و ساختارهای شیمیایی کمتر تحت تاثیر ماتریکس قرار می‌گیرند، بسته به قدرت مگنت حساسیت می‌تواند بهبود یابد، آماده‌سازی نمونه پیچیده نیست و بدون نیاز به مشتق‌سازی انجام می‌پذیرد، بسیار تکرارپذیر هستند. | به‌طور کلی حساسیت این تکنیک‌ها کم است، خروجی شامل طیفی پیچیده و دشوار برای تفسیر است و نیاز به تخصص بالا دارد، تداخل پیک بالا است و به ازای هر ساختار شیمیایی چندین پیک وجود دارد، تنها در حلال‌های دوتره انجام پذیر است، در نوع خاصی از این تکنیک یعنی MRI که برای مطالعه‌ی بافت‌های زنده مورد استفاده قرار می‌گیرد (مزیت) حساسیت پایین و نیاز به حجم بالایی از نمونه است. | ارزان |
| LC/MS | بسته به نوع دستگاه دقت‌های تا چهار رقم پس از اعشار از جرم ترکیبات به‌دست می‌آیند، برای گستره وسیعی از ترکیبات شیمیایی قابل استفاده است، در تکنیک‌های Tandem mass spectrometry (MS/MS) امکان استخراج اطلاعات ساختاری از ترکیبات وجود دارد، به‌صورت کوپل با ستون‌های کروماتوگرافی و یا به‌صورت مستقیم قابل استفاده است، کمابیش نیاز به مشتق‌سازی ندارند، حساس‌ترین تکنیک متابولومیکس هستند، قابلیت اتوماسیون دارند. | گران قیمت هستند، نیاز به زمان زیاد برای بهینه‌سازی و آنالیز، جستجوی کتابخانه‌ای محدود، نیاز به تخصص بالا در تفسیر داده‌های خروجی، برخی ماتریکس‌های (مانند نمک‌ها) همراه نمونه می‌توانند باعث اختلال در یونیزاسیون و در نتیجه کاهش حساسیت شوند، امکان تشکیل حالت‌های مختلف یونی برای یک مولکول و در نتیجه دشواری تفسیر داده‌ها. | گران |
| GC/MS | بسیار مناسب برای ترکیبات فرار (و به‌ویژه غیرقطبی) و قیمت پایین به ازای هر آنالیز برای این ترکیبات، در صورت مجهز بودن به آشکارسازهای دقیق مانند Time-of-flight (TOF) mass spectrometry قابلیت استخراج داده‌هایی با دقت تا چهار رقم بعد اعشار، در صورت مجهز بودن به آشکارسازهای MS/MS قابلیت استخراج اطلاعات ساختاری برای ترکیبات ناشناخته فراهم می‌شود. حساس، مجهز به کتابخانه‌های تجاری و عمومی بزرگ، تکرارپذیری بالا، قابلیت اتوماسیون. | نیاز به زمان بالا برای بهینه‌سازی شرایط و آنالیز، نیاز به مشتق‌سازی به‌خصوص برای ترکیبات غیرفرار، نامناسب برای ترکیبات ناپایدار حرارتی و جرم مولکولی بالا، برای آنالیز ترکیبات غیر فرار باید مشتق‌سازی شوند، برخی متابولیت‌ها نمی‌توانند فرار شوند حتی با مشتق‌سازی، آماده‌سازی نمونه پیچیده و تکرارناپذیر است، انواع روش‌های تزریق وجود دارد. | گران |
| FTIR NIR Raman | این روش‌ها می‌توانند به‌طور مستقیم در نمونه استفاده شوند و ساختارهای شیمیایی کمتر تحت تاثیر ماتریکس قرار می‌گیرند، ارایه اطلاعات ساختاری محدود است اما برای شناسایی گروه‌های عاملی مفید است، می‌توان به‌طور مستقیم در نمونه استفاده شود، تجزیه و تحلیل سریع (۱۰–۶۰ ثانیه)، اثر انگشت بسیار مناسب و منحصر به فرد برای هر ترکیب برای جستجوی کتابخانه‌ای، بدون نیاز به مشتق‌سازی برای حالت‌های مختلف مایع، بخار و جامد قابل استفاده هستند. | طیف بسیار پیچیده و دشوار برای تفسیر و به عبارت دیگر تنها گروه‌های عاملی قابل شناسایی هستند، شناسایی متابولیت به صورت مجزا کمابیش غیرممکن است، نیاز به خشک کردن نمونه. | خیلی ارزان |

Nuclear magnetic resonance (NMR), Liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS), Gas chromatography mass spectrometry (GC/MS), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Near-infrared spectroscopy (NIR), Raman spectroscopy (Raman).



www.SID.ir

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:30 IRDT on Saturday May 12th 2018

افزون‌براین، در جدیدترین مطالعه‌ای که بر روی آزواسپرمی غیرانسدادی انجام گردید، موفق به شناسایی ۳۶ نشانگر زیستی از پلاسمای مایع منی این بیماران با استفاده از تکنیک تعیین پروفایل متابولیک غیرهدفمند گردیدند.[۳۴] همچنین، یکپارچگی اطلاعات پروتئومیکس و متابولومیکس نمایانگر مسیر Polyol است که مسیری کلیدی برای جستجوی نشانگر زیستی TESE منفی است.[۳۵] افزون‌براین ما با انگشت‌نگاری متابولیک پلاسمای مایع منی از بیماران مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی با نتیجه‌ی TESE مثبت در مقایسه با TESE منفی، نشان داده شد که تکنیک انگشت‌نگاری متابولیک پتانسیل بسیار خوبی برای پیشرفت به‌عنوان یک ابزار تشخیصی دارد.[۲۲] در مطالعه‌ای دیگر، لیپیدهای پلاسمای مایع منی به‌عنوان یک منبع جهت بررسی ناباروری مردان در بیماران مبتلا به آسیب طناب نخاعی مورد استفاده قرار گرفت.[۳۶] آن‌ها نشان دادند که لیپیدها به‌طور عمده به گلیسرولیپیدها، گلیسروفسفولیپیدها، فئول لیپیدها، آسیل‌های چرب و دسته‌جات پلی‌کتیدها تعلق دارند. آن‌ها مولکول‌های ذکر شده را با مسیرهای متعدد متابولیکی مانند بیوسنتز GTP, CTP و UTP در ارتباط دانستند که نشان دهنده‌ی آن است که مسیرهای پیام‌رسان ممکن است در بیماران مبتلا به آسیب طناب نخاعی تغییر کنند. Jayaraman و همکاران با استفاده از طیف سنجی NMR به آنالیز پلاسمای مایع منی بیماران مبتلا به ناباروری با علت مردانه آیدیوپاتیک و افراد شاهد سالم با باروری ثابت شده، پرداختند.[۳۷] گروه‌های ناباروری که در این مطالعه وجود داشتند بیماران نابارور آیدیوپاتیک مبتلا به پارامترهای نورموزوسپرمیک نرمال، الیگوزوسپرمیک، آستنوزوسپرمی، آزوسپرمی و تراتوزوسپرمی بودند. نویسندگان به خوبی این موضوع را نشان دادند که تنوع در پروفایل نشانگرهای زیستی بین ناباروری آیدیوپاتیک و سایر گروه‌های ترکیبی می‌توانند ناشی از تنظیم مثبت یا منفی برخی از ترکیبات مانند آرژنین، لایزین، تیروزین، سیترات، فروکتوز و پرولین باشد. مطالعه دیگری که به تازگی منتشر شده است، از پلاسمای مایع منی از طریق روش‌های متابولومیک برای درک سندروم نقص کلیه–یانگ (Kidney-Yin deficiency syndrome, KYDS) استفاده نمود که توانست ۴۱ متابولیت مختلف را شناسایی کند.[۳۸] هفت متابولیت به پنج مسیر متابولیکی بالقوه مربوط هستند که با بیوسنتز و متابولیسم آمینواسیدهای آروماتیک، چرخه اسید تری‌کربوکسیلیک و متابولیسم اسفنگولیپیدها در ارتباط می‌باشند. آن‌ها نشان دادند که تغییر در مسیرهای متابولیکی نقش مهمی را در ایجاد ناباروری مرتبط با KYDS در مردان ایفا می‌کند. با وجود این‌که اکثر مطالعات ما در رابطه با متابولومیکس ناباروری مردان است ولی تاکنون، متاسفانه مطالعات اندکی بر روی متابولومیکس در ارتباط با ناباروری مردان انجام شده است.

در مطالعه Zhang و همکاران با استفاده از فناوری LC/MS به آنالیز متابولوم ادرار مردان الیگوزوسپرمیک پرداخته شده و تغییرات چشمگیری را در ۱۰ متابولیت مشاهده کردند. از این تعداد، در آسیل کارنیتین، اسید آسپارتیک و لوسیل پرولین کاهش و در آدنین و متیل گزانتین افزایش، مشاهده شد که ارتباط قابل توجهی با خطر ابتلا به الیگوزوسپرمیک دارد.[۳۹]

این نویسندگان از همین سیستم برای آنالیز پروفایل متابولوم ادرار مردان نابارور نرمواسپرمیک استفاده کردند تا به بررسی مکانیسم‌های احتمالی و نشانگرهای زیستی ادراری بپردازند. آن‌ها قادر به نشان دادن الگوی متابولوم ادراری شدند که می‌تواند به تفکیک افراد نابارور نرموزوسپرمیک از افراد شاهد بارور کمک کند. افزون‌براین، آن‌ها به شناسایی مجموع ۳۷ نشانگر زیستی کاربردی پرداختند که نقش‌های عملکردی مهمی را در مدیریت انرژی و سازماندهی هورمونی و آنتی‌اکسیدانی در اسپرماتوژنز ایفا می‌کند.[۴۰] این منجر به شناسایی یک الگوی نشانگر زیستی ترکیبی از لوکوترین E4، ۳-هیدروکسی پالمیتیول–کارنیتین، آسپارتات، گزانتوزین و متوکسی تریپتوفان گردید که می‌تواند جهت تشخیص به کار برده شود، این مارکرها ممکن است رویدادهای کلیدی و اصلی ناباروری نرموزوسپرمیک را برجسته و مشخص کنند.[۴۱]

متابولومیکس زمینه‌ای به‌نسبت جدید در Omics است که هنوز به خوبی توسعه نیافته است. پیشرفته‌ترین روش متابولومیکس یعنی کروماتوگرافی مایع به همراه طیف سنجی جرمی تاکنون استفاده نشده است. این روش تعداد متابولیت‌های شناسایی شده از پلاسمای مایع منی و اسپرماتوزوآ را افزایش می‌دهد. با وجود اینکه متابولومیکس به‌عنوان یک تکنولوژی عالی برای کشف نشانگرهای زیستی وجود دارد، اما متاسفانه هنوز فقدان آن در زمینه‌ی طب ناباروری احساس می‌شود. این می‌تواند به‌علت فقدان افراد آموزش دیده و متخصص در زمینه‌ی متابولومیکس باشد.

Archive of SID



www.SID.ir

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:30 IRDT on Saturday May 12th 2018

## References


1. Kovac JR, Pastuszak AW, Lamb DJ. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. *Fertil Steril* 2013;99(4):998-1007.
2. Downes A, Elfick A. Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine. *Sensors (Basel, Switzerland)* 2010;10(3):1871-89.
3. Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol* 2004;22(5):245-52.
4. Villas-Bôas SG, Roessner U, Hansen M, Smedsgaard J, Nielsen J. Metabolome Analysis: An Introduction. New Jersey, NJ: John Wiley and Sons, Inc.; 2006.
5. Hollywood K, Brison DR, Goodacre R. Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics* 2006;6(17):4716-23.
6. Villas-Bôas SG, Roessner U, Hansen M, Smedsgaard J, Nielsen J. Sampling and sample preparation. Metabolome Analysis: An Introduction. New Jersey, NJ: John Wiley and Sons, Inc.; 2006. P. 39-82.
7. Villas-Bôas SG, Roessner U, Hansen M, Smedsgaard J, Nielsen J. The chemical challenge of the metabolome. Metabolome Analysis: An Introduction. New Jersey, NJ: John Wiley and Sons, Inc.; 2006. P. 15-38.
8. Deepinder F, Chowdary HT, Agarwal A. Role of metabolomic analysis of biomarkers in the management of male infertility. *Expert Rev Mol Diagn* 2007;7(4):351-8.
9. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol* 1998;16(9):373-8.
10. Shulaev V. Metabolomics technology and bioinformatics. *Brief Bioinform* 2006;7(2):128-39.
11. Viant MR, Rosenblum ES, Tieerdema RS. NMR-based metabolomics: a powerful approach for characterizing the effects of environmental stressors on organism health. *Environ Sci Technol* 2003;37(21):4982-9.
12. Denkert C, Budczies J, Kind T, Weichert W, Tablack P, Schouli J, et al. Mass spectrometry-based metabolic profiling reveals different metabolite patterns in invasive ovarian carcinomas and ovarian borderline tumors. *Cancer Res* 2006;66(22):10795-804.
13. Fiehn O. Metabolomics: the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002;48(1-2):155-71.
14. Qi Y, Song Y, Gu H, Fan G, Chai Y. Global metabolic profiling using ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 2014;1198:15-27.
15. Fernie AR, Trethewey RN, Krotzky AJ, Willmitzer L. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5(9):763-9.
16. Kell DB. Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Curr Opin Microbiol* 2004;7(3):296-307.
17. Botros L, Sakkas D, Seli E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod* 2008;14(12):679-90.
18. Lenz EM, Bright J, Knight R, Wilson ID, Major H. Cyclosporin A-induced changes in endogenous metabolites in rat urine: a metabonomic investigation using high field 1H NMR spectroscopy, HPLC-TOF/MS and chemometrics. *J Pharm Biomed Anal* 2004;35(3):599-608.
19. Williams RE, Lenz EM, Lowden JS, Rantalainen M, Wilson ID. The metabonomics of aging and development in the rat: an investigation into the effect of age on the profile of endogenous metabolites in the urine of male rats using 1H NMR and HPLC-TOF MS. *Mol Biosyst* 2005;1(2):166-75.
20. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996;48(6):835-50.
21. Jafarzadeh N, Mani-Varnosfaderani A, Minai-Tehrani A, Savadi-Shiraz E, Sadeghi MR, Gilany K. Metabolomics fingerprinting of seminal plasma from unexplained infertile men: a need for novel diagnostic biomarkers. *Mol Reprod Dev* 2015;82(3):150.
22. Gilany K, Jafarzadeh N, Mani-Varnosfaderani A, Darbandi M, Minai-Tehrani A, Amini M. Metabolic fingerprinting of seminal plasma from non-obstructive azoospermia patients: positive TESE versus negative TESE. *J Reprod Infertil* 2018;19(2). [In press]
23. Kanďár R, Drábková P, Myslíková K, Hampl R. Determination of retinol and α-tocopherol in human seminal plasma using an HPLC with UV detection. *Andrologia* 2014;46(5):472-8.
24. De Iuliis GN, Wingate JK, Koppers AJ, McLaughlin EA, Aitken RJ. Definitive evidence for the nonmitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(5):1968-75.
25. Gilany K, Moazeni-Pourasil RS, Jafarzadeh N, Savadi-Shiraz E. Metabolomics fingerprinting of the human seminal plasma of asthenozoospermic patients. *Mol Reprod Dev* 2014;81(1):84-6.
26. Hamamah S, Seguin F, Barthelemy C, Akoka S, Le Pape A, Lansac J, et al. 1H nuclear magnetic resonance studies of seminal plasma from fertile and infertile men. *J Reprod Fertil* 1993;97(1):51-5.
27. Costabile RA, Spevak M. Characterization of patients presenting with male factor infertility in an equal access, no cost medical system. *Urology* 2001;58(6):1021-4.
28. Mostafa T, Anis TH, El-Nashar A, Imam H, Othman IA. Varicocelectomy reduces reactive oxygen species levels and increases antioxidant activity of seminal plasma from infertile men with varicocele. *Int J Androl* 2001;24(5):261-5.
29. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 2002;23(6):737-52.
30. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 2003;80(3):531-5.
31. Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, et al. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 2006;21(4):986-93.
32. Mostafa T, Anis T, Imam H, El-Nashar AR, Osman IA. Seminal reactive oxygen species-antioxidant relationship in fertile males with and without varicocele. *Andrologia* 2009;41(2):125-9.
33. Gilany K, Pouracil RS, Sadeghi MR. Fourier transform infrared spectroscopy: a potential technique for noninvasive detection of spermatogenesis. *Avicenna J Med Biotechnol* 2014;6(1):47-52.
34. Gilany K, Mani-Varnosfaderani A, Minai-Tehrani A, Mirzajani F, Ghassempour A, Sadeghi MR, et al. Untargeted metabolomic profiling of




Archive of SID

www.SID.ir

seminal plasma in nonobstructive azoospermia men: A noninvasive detection of spermatogenesis. *Biomed Chromatogr* 2017;31(8).
35. Gilany K. Metabolomics study of human seminal plasma of infertile male. *Metabolomics* 2017;7(2 Suppl).
36. da Silva BF, Del Giudice PT, Spaine DM, Gozzo FC, Lo Turco EG, Bertolla RP. Metabolomics of male infertility: characterization of seminal plasma lipid fingerprints in men with spinal cord injury. *Fertil Steril* 2011;96(3):S233.
37. Jayaraman V, Ghosh S, Sengupta A, Srivastava S, Sonawat HM, Narayan PK. Identification of biochemical differences between different forms of male infertility by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *J Assist Reprod Genet* 2014;31(9):1195-204.
38. Chen X, Hu C, Dai J, Chen L. Metabolomics analysis of seminal plasma in infertile males with kidney-yang deficiency: a preliminary study. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015;2015:892930.
39. Zhang J, Huang Z, Chen M, Xia Y, Martin FL, Hang W, et al. Urinary metabolome identifies signatures of oligozoospermic infertile men. *Fertil Steril* 2014;102(1):44-53.
40. Dunn WB. Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. *Phys Biol* 2008;5(1):011001.
41. Zhang J, Mu X, Xia Y, Martin FL, Hang W, Liu L, et al. Metabolomic analysis reveals a unique urinary pattern in normozoospermic infertile men. *J Proteome Res* 2014;13(6):3088-99.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:30 IRDT on Saturday May 12th 2018

Archive of SID



www.SID.ir

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 7:30 IRDT on Saturday May 12th 2018

TUMJ Tehran University Medical Journal, March 2018; Vol. 75, No. 12: 860-868 Review Article

# Metabolomics: a bird's eye view of infertile men: *review article*

Niloofar Agharezaee M.Sc.[1,2]
Rezvan Marzbani M.Sc.[3]
Hassan Rezadoost Ph.D.[3]
Saeideh Zamani Koukhaloo M.Sc.[1]
Babak Arjmand M.D., Ph.D.[4,5]
Kambiz Gilany Ph.D.[1,5*]

*1- Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran.*
*2- Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.*
*3- Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.*
*4- Cell Therapy and Regenerative Medicine Research Center, Endocrinology and Metabolism Molecular Cellular Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*
*5- Metabolomics and Genomics Research Center, Endocrinology and Metabolomis Molecular Cellular Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*

[*]Corresponding author: Avicenna Research Institute, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Evin Ave., Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 22432020
E-mail: k.gilany@ari.ir

## Abstract

Received: 02 Jul. 2017 Revised: 09 Jul. 2017 Accepted: 04 Feb. 2018 Available online: 14 Feb. 2018

Infertility influences an estimated 20% of couples worldwide. The factors that can affect the fertility potential are equally distributed between men and women. Despite extensive research in male infertility, the etiology in majority of infertile men is unknown. In 2010, there was an opinion published in Nature asking a selection of leading researchers and policy-makers about what their future focuses will be in 2020. Metabolomics was mentioned as the leading omics technology by them. The word metabolomics has been defined almost 20 years ago. However, the clinical metabolomics history goes back to more than 1,000 years ago. The great Persian physician and philosopher Avicenna observed an individual urine changes during illness. Today, the color or smell changes are known to be caused by metabolites deregulation indicating metabolic diseases. Metabolomics approach is a systematic analysis of the unique pattern followed by a specific biochemical pathway that uses a biological material, e.g. spermatozoa or human seminal plasma. For the diagnosis of infertile men, the typical parameters of semen analysis are: sperm motility, sperm morphology, concentration and count. Human seminal plasma is a valuable biological source which was not used in the diagnosis of infertile men, unfortunately. To the best of our knowledge, there is no parameter for analysis of the human seminal plasma. Thus, the need for a novel parameter to diagnose infertile men is urgently needed. We recommend the use of seminal plasma in order to diagnose infertile men according to our previous research. Only a handful studies have used metabolomics approaches in the male infertility. In this study, we summarize the current research and our contribution to the field of male infertility and metabolomics. One of our main contributions has been to use metabolic profiling of seminal plasma from non-obstructive azoospermia to find 36 potentials biomarkers for detection of spermatogenesis. A search in the PubMed using keywords "metabolomics" and "infertility" shows only 59 publications. This demonstrates how newborn the metabolomics in its application for male infertility is. In this review article we have tried to have a comprehensive and specific approach to male infertility from a metabolomics perspective and related techniques.

***Keywords:*** biomarker, male infertility, metabolomics, seminal plasma.



Archive of SID
www.SID.ir