بررسی اثرات اسکوربات بر پارامترهای اسپرم انسان

مهران عربی .Ph.D☆♦
☆ دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

♦ آدرس مکاتبه: شهرکرد، صندوق‌پستی: ۱۱۵، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی
پست الکترونیک: Email: 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 اکروزومی اسپرم های انسان در محیط های حاوی یون های فروس (Fe^{2+})، به عنوان محرک پراکسیداسیون چربی های غشاء (Lipid Peroxidation: LPO)

* **مواد و روش‌ها:** تعداد ۱۲ نمونه اسپرمی از افراد سالم ساکن در شهرستان شهرکرد، به صورت داوطلبانه، اخذ و جمع‌آوری گردید. نمونه‌های 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 سلول‌های اسپرم به طور کامل جدا گردد. رسوب‌های اسپرمی حاصله (حل شده درحداقل رینگر) درمراحل بعدی پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور بررسی میزان پراکسیداسیون چربی‌های غشا (LPO) میزان مالون دی آلدیید (Malondialdehyde: MDA) تولید شده در محیط با روش اسپکتروفوتومتری مورد سنجش قرار گرفت. آزمایش رنگ‌آمیزی با ائوزین نیز با هدف تعیین درصد تعداد سلول‌های اسپرم زنده و غیرزنده در طی سه ساعت انکوباسیون، مورد استفاده قرار گرفت. به منظور بررسی چگونگی عملکرد سلول‌های اسپرم در واکنش آکروزومی بر اساس آزمایش هضم ژلاتین عمل شد و بدین منظور اسپرم‌های تیمار شده با آهن و یا اسکوربات به لام‌های ژلاتین‌دار اضافه شده و در آخر به کمک کوماسی‌بلو رنگ‌آمیزی گردیدند. تعداد سلول‌های اسپرم واجد هاله (محل هضم ژلاتین در نتیجه واکنش اکروزومی در اطراف سر اسپرم‌ها) و نیز سلول‌های بدون هاله شمارش و ثبت گردیدند. در این پژوهش روش آماری t-test مورد استفاده قرار گرفت.

* **یافته‌ها:** نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد یون‌های آهن موجب افزایش میزان رادیکال‌های آزاد در محیط حاوی اسپرم‌ها شد. اسکوربات در غلظت‌های کمتر از ۱۰۰۰ میکرومولار موجب کاهش روند LPO (کاهش معنی‌داری در میزان MDA)، افزایش واکنش‌های اکروزومی (افزایش هاله‌ها)، و نیز بالا رفتن درصد اسپرم‌های فعال در محیط گردید. از سوی دیگر، اسکوربات در محدوده غلظتی ۱۰۰۰ میکرومولار و بیشتر ازآن پس از ایجاد کمپلکس با یون‌های آهن، به عنوان یک پرواکسیدان عمل نموده و موجب بروز آسیب‌های شدید در ساختار غشای اسپرم ها (افزایش میزان MDA)، کاهش در میزان درصد واکنش‌های اکروزومی، و نیز کاهش تعداد اسپرم‌های فعال گردید.

* **نتیجه گیری:** در مجموع، اسکوربات در غلظت‌های مختلف اثرات متفاوتی داشته و محققین با عنایت به این رویکرد منفی از اسکوربات، می‌بایست آن را در زمینه‌هایی نظیر لقاح آزمایشگاهی، کشت سلولی و نگهداری و ذخیره‌سازی سلول‌های جنسی، به طور جدی مورد نظر قرار داده تا اثرات مخرب آن را در سیستم‌های زیستی به حداقل رسانند.

کلیدواژگان: اسپرم انسان، اسکوربات، پراکسیداسیون چربی‌ها، واکنش اکروزومی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هفتم، شماره۳، پاییز ۸۴، صفحات ۱۷۱-۱۶۴

مقدمه

تجمع عوامل محیطی سمی در بدن جانوران به عنوان یکی از مهم‌ترین علل بروز ناباروری در نظر گرفته می‌شود. متابولیت‌های اکسیژن (Reactive Oxygen Species: ROS) نظیر رادیکال هیدروکسیل (OH.) و آنیون سوپراکسید (O_2^-.) قادرند تا عملکرد و ساختار سلول‌ها 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 اکروزومی اسپرم‌ها ضروری بوده و از سوی دیگر در غلظت‌های فزاینده که موسوم به استرس اکسیداتیو (Oxidative Stress) است، موجب مهار قدرت تحرک و نیز تغییر در شکل ظاهری این سلول‌ها شده و بدین ترتیب درصدهایی از ناباروری را ایجاد می کنند. یکی از تظاهرات مهم استرس اکسیداتیو در سلول‌ها، پراکسیداسیون چربی‌های غشای (LPO) است.LPO پدیده‌ای فیزیولوژیکی بوده و در تمامی سلول‌هایی که غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع‌اند، رخ داده و بنیان آن بر مجموعه‌ای از واکنش‌ها 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 آنزیم‌ها و ایجاد آسیب در DNA سلول‌های اسپرم شده، که نتیجه آنان القای ناباروری است (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶).

در هر دو شرایط In vitro و In vivo، جهت معکوس‌سازی اثرات

سوء پراکسیداسیون سلولی مواد آنتی اکسیدان (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 پلاسمای مایع اسپرمی (Seminal Plasma) که محتوی آنتی‌اکسیدان‌های فراوانی نظیر: اسکوربات (Ascorbate) (ویتامین C)، تورین، گروه‌های تیولی، گلوتاتیون 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 آنتی اکسیدان موثر و قوی 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 آنتی اکسیدان موثر و قوی در محیط و در زمانی که سلول‌های اسپرم محروم از محیط حامی خود یعنی پلاسمای مایع اسپرمی‌اند، بسیار کارساز بوده و منجر به بقای آنان خواهد شد. در این راستا این مطلب نیز مشخص گردیده که در پلاسمای 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 پلاسمای مایع اسپرمی مطرح بوده و موجب مهار روند اکسیداسیون لیپوپروتیین‌ها می‌شود.این ویتامین درحدود ۶۵ درصد از توان آنتی‌اکسیدانی پلاسمای مایع اسپرمی را در افراد بارور به خود اختصاص می‌دهد (۸). این اهمیت از آن جا ناشی می‌شود که غلظت اسکوربات در پلاسمای مایع اسپرمی در حدود ۱۰ برابر آن چیزی است که در پلاسمای خون وجود دارد (۳۶۴ میکرومولار در مقابل ۴۰ میکرومولار) (۹). در سال ۱۹۷۷ مشخص گردید که حضور ROS در پلاسمای 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 حضورغلظت‌های متفاوت از اسکوربات (۳۰۰ تا ۲۰۰۰ میکرومولار) را در محیط‌های حاوی سلول‌های اسپرم انسان تیمارشده با محرک (پروموتر) LPO محلول ۰/۲ میلی‌مولار سولفات آهن ($FeSO_4$) 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 ائوزین جهت بررسی تعداد اسپرم‌های فعال در شرایط مختلف، مورد استفاده قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه های 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 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: ۰/۸گرم NaCl، ۰/۰۲ گرم KCl، ۰/۰۲گرم $CaCl_2$، ۰/۱ گرم $NaHCO_3$، ۰/۰۰۵ گرم NaH_2PO_4، ۰/۰۱ گرم $MgCl_2$، ۰/۱ گرم گلوکز، ۰/۵ گرم Hepse و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده) دو بار مورد عمل سانتریفوژ (xg ۵۰۰، هر بار به مدت ۱۰ دقیقه) قرار گرفته تا پلاسمای منی از سلول‌های اسپرم به طور کامل جدا گردد.

رسوب‌های اسپرمی حاصله (حل شده در حداقل رینگر) در مراحل بعدی پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند. مواد شیمیایی مورد استفاده به واسطه شرکت‌های ایرانی از کارخانهٔ 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 اسپرم‌ها ی 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 میلی‌لیتر بود که در یک مخلوط واکنش به میزان ۱ میلی‌لیتر افزوده شدند. انکوباسیون در تحت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

سنجش پراکسیداسیون چربی‌های غشا (LPO)

اندازه‌گیری میزان LPO بر اساس روش اوکاوا و همکاران (۱۱) انجام گرفت. در این روش که زمان انکوباسیون نمونه‌ها در آن سه ساعت بود، در نهایت میزان تولید اجسام واکنش دهنده با اسید تیوباربی تیوریک (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 میلی‌لیتر از مخلوط ان- بوتانول+پیریدین افزوده شد. در انتها، پس از سانتریفوژ کردن، میزان جذب نوری مخلوط واکنش با

اسپکتروفوتومتر سنجیده شد. واحد اندازه گیری میزان تغییر LPO در محیط nM MDA/mg protein/min در نظر گرفته شد.

سنجش میزان پروتئین نمونه های مایع اسپرمی

مقدار پروتیین 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 ۷۵۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر تعیین و مقدار پروتیین نمونه‌های اسپرمی استفاده شده، محاسبه گردید (۱۲).

سنجش درصد اسپرم های زنده (آزمایش ائوزین)

به منظور تعیین درصد تعداد سلول‌های اسپرم زنده و غیرزنده در طی سه ساعت انکوباسیون در گروه‌های شاهد و تیمار، از روش رنگ‌آمیزی با ائوزین استفاده گردید. در این روش بر روی هر لام تعداد ۴۰۰ 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 رنگ پذیری، مشخص شدند (۱۳).

سنجش واکنش اکروزومی

جهت بررسی قدرت سلول‌های اسپرم در ارایه واکنش آکروزومی 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 (۱۰۰ میکرولیتر) از محلول ژلاتین ۲/۵درصد بر روی آنان گسترش داده شد. در مرحله بعد لام‌ها به مدت ۵ دقیقه در محلول ۰/۰۵ درصد از گلوتار آلدیید تثبیت گردیدند. در مرحله بعد، جهت حذف مازاد گلوتارآلدیید لام‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند و سپس به میزان ۵۰ میکرولیتر از نمونه های 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 ۲۴ساعت در درون یک اتاقک مرطوب با دمای ۳۹ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از انقضای این مدت، لام‌ها با رنگ کوماسی آبی رنگ‌آمیزی شده و به کمک میکروسکوپ نوری معمولی (با بزرگنمایی ۴۰۰) 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 ۵۰درصد سلول‌ها واجد هاله باشند، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که عملکرد سلول‌های آن نمونه در انجام واکنش اکرزومی 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 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 (پروموتر 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 ۰/۶±۲۹ بود که در انتهای سه ساعت زمان انکوباسیون و پس از اضافه‌سازی آهن به حد ۰/۸±۶۴ (۱۲۰/۶۹درصد، P<۰/۰۰۱) رسید. اضافه‌سازی غلظت‌های ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار از اسکوربات به محیط فوق موجب کاهش معنی‌داری در میزان MDA تولید شده گردید، به طوری که این میزان کاهش در غلظت ۵۰۰ میکرومولار از اسکوربات و در سه ساعت پس از شروع انکوباسیون درحد ۱۸/۷۵درصد (P<۰/۰۰۱) بود. جالب توجه آن که، اضافه‌سازی غلظت‌های بالاتر از اسکوربات (۲۰۰۰-۱۰۰۰ میکرومولار) به محیط واکنش، نه تنها موجب مهار پراکسیداسیون نگردید بلکه موجب افزایش فزاینده‌ای در غلظت MDA شد. این میزان افزایش در غلظت ۲۰۰۰ میکرومولار (در انتهای دوره انکوباسیون) درحد ۰/۷±۶۸ نسبت به شاهد (۰/۶±۲۹) (۱۳۴/۴۸درصد، P<۰/۰۰۱) 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 ۰/۸±۷۸ درصد در گروه شاهد به ۰/۷±۴۵ درصد در گروه تیمار اول (واجد اسپرم وآهن) (P<۰/۰۰۱) رسید. در این قسمت نیز در حضور غلظت‌های کم از اسکوربات (۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار)، درصد اسپرم‌های فعال در محیط افزایش یافت. این میزان افزایش در پس از اضافه‌سازی غلظت ۵۰۰ میکرومولار اسکوربات و در انتهای سومین ساعت از دوره انکوباسیون از حد ۰/۷±۴۵ درصد درگروه تیمار اول به ۰/۵۷±۶۰ درصد در گروه تیمار دوم (حاوی اسپرم، آهن و اسکوربات) (P<۰/۰۱) رسید. در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار و بالاتر از اسکوربات، درصد اسپرم‌های زنده محیط به شدت کاهش یافت به طوری که در غلظت ۲۰۰۰ میکرومولار اسکوربات و در پایان آخرین ساعت از انکوباسیون، این میزان کاهش در مقایسه با گروه شاهد به حد ۰/۸±۴۲ درصد (P<۰/۰۰۱) 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 اسپرم های انسان در حد ۰/۵±۶۸ درصد بود. افزودن یون‌های آهن به نمونه‌های اسپرمی، موجب کاهش معنی‌داری در تعداد اسپرم های واجد واکنش اکروزومی (درصد هاله ها در انتهای زمان انکوباسیون) از ۰/۵±۶۸ درصد (شاهد) به ۰/۶۵±۴۱ درصد (P<۰/۰۰۱) شد.

جدول ۱: میزان MDA تولید شده (گسترش پراکسیداسیون چربی های غشا) در نمونه‌های اسپرم انسان تیمار شده با یون‌های آهن و در غلظت‌های متفاوت از اسکوربا ت در طی سه ساعت انکوباسیون

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

مقادیر p مقایسه شده با گروه شاهد (بدون اسکوربات، در زمان صفر انکوباسیون): $P<0.01$ c، $P<0.001$ b

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 اسکوربا ت در طی سه ساعت انکوباسیون

غلظت اسکوربات (میکرومولار)	درصد سلول‌های زنده زمان انکوباسیون (ساعت)			
	۰	۱	۲	۳
۰	۷۸±۰/۸	c ۶۷±۱	c۵۷±۱/۷	c ۴۵±۰/۷
۳۰۰	۷۷±۱/۶	** ۷۴±۱/۵	**۶۳±۱	*** ۵۵±۱
۵۰۰	۷۸±۱/۵	** ۷۶±۱	*** ۷۱±۰/۵	***۶۰±۰/۵۷
۱۰۰۰	۷۶±۰/۹	۶۵±۲	* ۶۱±۱/۴	***۵۴±۱/۳
۱۵۰۰	۷۷±۱	** ۶۱±۱/۴	۵۸±۱/۱	*۴۸±۱/۶
۲۰۰۰	۸۰±۲	c ۵۹±۲ **	c ۵۴±۲*	c ۴۲±۰/۸ *

مقادیر p مقایسه شده با گروه شاهد (بدون اسکوربات، در زمان صفر انکوباسیون): $P<0.01$ c، $P<0.001$ b

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 اسکوربا ت در طی سه ساعت انکوباسیون

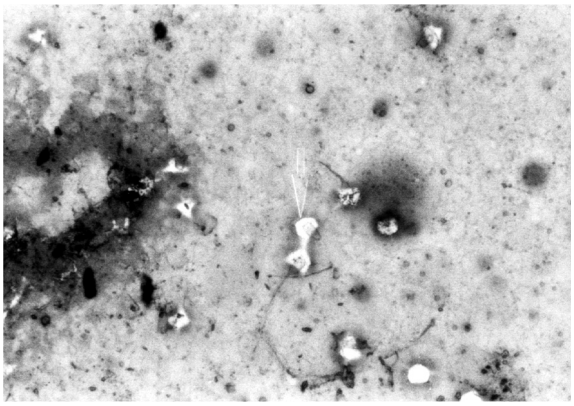
غلظت اسکوربات (میکرومولار)	درصد تشکیل هاله (واکنش اکروزومی) زمان انکوباسیون (ساعت)			
	۰	۱	۲	۳
۰	۶۸±۰/۵	b ۶۲±۰/۷	c ۵۴±۰/۶	c۴۱±۰/۶۵
۳۰۰	۶۷±۰/۷	۶۳±۱	*۵۷±۱	* ۴۴±۲
۵۰۰	۶۷±۲	** ۶۶±۰/۷	**۵۹±۲	** ۴۶±۰/۶
۱۰۰۰	۷۰±۰/۹	۶۰±۱	۵۲±۱/۸	۴۲±۱
۱۵۰۰	۶۷±۱	۶۰±۱/۲	** ۴۹±۱	* ۳۸±۰/۶
۲۰۰۰	۶۹±۱/۲	c۵۷±۱**	c۴۸±۱/۴ **	c ۳۵±۰/۸**

مقادیر p مقایسه شده با گروه شاهد (بدون اسکوربات، در زمان صفر انکوباسیون): $P<0.01$ c، $P<0.001$ b

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.

در این قسمت نیز الگوی عمل اسکوربات مشابه با دو آزمایش قبل بود بدین صورت که اسکوربات در غلظت های تا حد ۵۰۰ میکرومولار افزایش دهنده تعداد هاله ها، و در غلظت های از ۱۰۰۰ میکرومولار به بالا، کاهنده تعداد هاله‌ها (مهار کننده واکنش اکروزومی) بود. کاربرد غلظت ۲۰۰۰ میکرومولار اسکوربات موجب کاهش معنی داری در درصد هاله ها از ۵/ ± ۶۸ درصد (شاهد) به ۰/۸±۳۵ درصد (P<۰/۰۰۱) شد (جدول ۳). در تکمیل این قسمت شکل ۱ نشان دهندهٔ واکنش های 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 مهم ترین علل عقیمی محسوب می شود. در بدن جانوران رادیکال های آزاد اکسیژن در بروز حالات پاتولوژیک به طور اعم و در ایجاد عقیمی به طور اخص، دخالت مستقیم دارند. اختلالات عملکردی زیادی در سلول های اسپرم به دنبال تاثیرROS وLPO پدیدار می گردد، که از میان می‌توان به کاهش درقدرت 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 اسپرماتوژنز 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 آنتی اکسیدان مهم و بسیار فعال در پلاسمای مایع اسپرمی، در یک محدوده غلظتی خاص 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 (پروموتر 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 اضافه سازی 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 می گردد (۱۵).

در واقع کارایی اسکوربات در بهبود باروری، ناشی از نقش آن در جمع آوری و خنثی سازی رادیکال های آزاد به ویژه رادیکال های پروکسیل از محیط زیست اسپرم ها 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 می گردد (۲، ۸، ۱۵، ۲۱).

علاوه بر این و بر اساس دیگر یافته ها، مشخص شده که اسکوربات به عنوان یک عامل احیا کننده موجب رهاسازی یون های فلزی نظیرآهن 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 می گردد، 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

نظیر کاتالاز، در مهار روند پراکسیداسیون عمل می‌نمایند، 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 سلول‌ها مبدل خواهند شد.

در همین راستا و در پژوهشی جدید نشان داده شد که به دنبال اضافه‌سازی یون‌های آهن به محیط حاوی اسپرم های گاو، کاهش معنی‌داری در تعداد سلول‌ها یا اسپرم های متورم شده پدیدار گردید که این به منزله بروز اشکالات جدی در ساختار غشا این سلول‌ها است. در این پژوهش نشان داده شد که افزودن اسکوربات در محدوده ۷۰۰ میکرومولار و کمتر از آن موجب بهبود وضعیت استحکام غشا اسپرم‌ها (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 رنگ‌آمیزی با ائوزین جهت تعیین تعداد سلول‌های زنده و فعال، وجود دارد (۲۴). روند LPO با افزایش‌دهی پیوندهای دوگانه در غشا، موجب آسیب‌رسانی به آن شده و بدین ترتیب ضمن برهم ریختن ساختار غشا، موجب غیر فعال شدن سلول‌ها می گردد (۲، ۲۵، ۲۶). رادیکال‌های آزاد به ویژه انواع ROS موجب مهار آنزیم‌های درون سلولی نیز گردیده و بدین ترتیب اسپرم‌ها از منابع آنزیمی دخیل در تامین ATP مورد نیاز جهت تحرک و فعالیت محروم می گردند (۲، ۲۷). در پژوهش حاضر، پروموتر LPO موجب کاهش شدیدی در درصد اسپرم های فعال انسان گردید.

با توجه به موارد بالا، کاهش در تعداد اسپرم‌های زنده را می‌توان به مجموعه اثرات سو ROS و LPO بر ساختار غشا و عملکرد آن نسبت داد. اسکوربات با توان آنتی‌اکسیدانی خود (در غلظت ۵۰۰ میکرومولار و کمتر از آن) موجب خنثی‌سازی این اثرات سو گردید اما در غلظت‌های بالاتر (با بروز خاصیت پرواکسیدانی اسکوربات) این روند معکوس شده و بر میزان اسپرم‌های غیرفعال محیط افزوده گردید. گزارشی دیگر عنوان می‌دارد که اسکوربات (غلظت‌های ۴۰۰۰-۱۰۰۰ میکرومولار) در نمونه‌های اسپرم انسان تیمار شده با آهن، موجب افت شدیدی در قدرت تحرک اسپرم‌های محیط می شود (۱۵).

میزان توانایی سلول‌های اسپرم در اجرای واکنش اکروزومی (بخشی از مرحله ظرفیت‌پذیری اسپرم‌ها بوده که در طی آن آنزیم‌های هیدرولیتیکی اسپرم آزاد شده و در دست‌یابی اسپرم به تخمک نقش مهمی را ایفا می‌نماید) به عنوان عامل تعیین کننده‌ای 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 مشاهده گردید. در این ارتباط استراتژی کاربرد مواد 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 اسپرم‌های فاقد واکنش اکروزومی بر روی لام های ژلاتین‌دار 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 (H_2O_2) به عنوان سوبسترای 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:

$$.O_2^- + H_2O_2 \xrightarrow{\text{آهن}} O_2 + .OH + OH^-$$

نقل و انتقالات یونی نقش مهمی در شروع واکنش اکروزومی اسپرم‌ها 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).

نتیجه‌گیری

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 شارقی 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.

Refrences

۱. عربی مهران، راویندرآناند. تاثیر نیکوتین بر اسپرم افراد نورمواسپرمیک: 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 Repord 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 potetiates 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 Repord 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