Original Article

Comparison of the Effect of Alpha Lipoic Acid (ALA) and Beta-Defensin 1 Protein on Human Sperm Motility and Viability in Different Times of Incubation

Reyhaneh Khayamabed[1], *Marziyeh Tavalaee*[*1], *Mohammad Hossein Nasr Esfahani*[1,2]

[1]*Department of Reproductive Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran.*

[2]*Isfahan Fertility & Infertility Center, Isfahan, Iran.*

[*]***Corresponding Author:***
Marziyeh Tavalaee;
Department of Reproductive Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran.

Email:
tavalaee.m@royaninstitute.org

Received: 10 Nov, 2018
Accepted: 16 Feb, 2019

Abstract

Background and Objectives: Antioxidant alpha lipoic acid and β-defensin 1 protein may have a positive effect on the quality of sperm parameters. In this study, the effect of sperm incubation with alpha lipoic acid antioxidant and β-defensin 1 protein were assessed on sperm motility and viability at different times.

Methods: In this experimental study, routine semen analysis was carried out on 59 infertile men according to the World Health Organization criteria (2010). Semen samples were processed by density gradient centrifugation. Then, samples were divided into three groups: control, processed semen sample treated with alpha-lipoic acid, and processed semen sample treated with beta-defensin 1. Then, all portions were evaluated for sperm motility and viability. The results were analyzed using one-way ANOVA.

Results: The mean percentage of motility in alpha-lipoic acid and β-defensin 1 groups after 1 and 2 hours, showed a statistically significant increase ($p=0.05$), while at the 3rd hour, only alpha-lipoic acid group had a significant increase in sperm motility. The mean percentage of sperm viability in alpha-lipoic acid and β-defensin 1 groups showed a significant increase compared to the control group after 1, 2, and 3 hours ($p\leq0.05$).

Conclusion: Although both alpha-lipoic acid and beta-defensin protein are effective for maintenance of sperm motility and viability after separation of time, it is recommended to use alpha-lipoic acid in sperm processing medium to maintain sperm motility and viability.

Keywords: Thioctic acid; Beta-defensin; Sperm motility.

DOI: 10.29252/qums.13.3.1

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره سیزدهم، شماره سوم، خرداد ۹۸
صفحه ۱ الی ۹

مقاله پژوهشی
(Original Article)

مقایسه اثر آنتی‌اکسیدانت آلفالیپوئیک اسید و پروتئین بتا دفنسین - ۱ بر تحرک و حیات اسپرم در زمان‌های مختلف انکوباسیون

ریحانه خیام عابد[۱]، مرضیه تولائی[۱*]، محمدحسین نصر اصفهانی[۱،۲]

[۱]گروه زیست‌فناوری تولیدمثل، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌فناوری جهاد دانشگاهی، اصفهان، ایران.

[۲]مرکز باروری و ناباروری، اصفهان، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
مرضیه تولائی؛ گروه زیست‌فناوری تولیدمثل، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌فناوری جهاد دانشگاهی، اصفهان، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
tavalaee.m@royaninstitute.org

تاریخ دریافت: ۹۷/۸/۱۹
تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: آنتی‌اکسیدانت آلفالیپوئیک اسید و پروتئین بتا دفنسین - ۱ ممکن است بر کیفیت پارامترهای اسپرم تأثیر مثبتی داشته باشد. در این مطالعه تأثیر انکوباسیون اسپرم با آنتی‌اکسیدانت آلفالیپوئیک اسید و پروتئین بتا دفنسین - ۱ بر تحرک و حیات اسپرم در زمان‌های مختلف بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه مداخله‌ای، آنالیز روتین مایع منی طبق معیار سازمان بهداشت جهانی (سال ۲۰۱۰) بر روی ۵۹ مرد نابارور انجام شد. نمونه‌های مایع منی توسط روش سانتریفوژ گرادیان غلظت شست‌وشو داده شدند. سپس نمونه‌ها به سه گروه شامل: کنترل، اسپرم‌های انکوبه‌شده با آلفالیپوئیک اسید و اسپرم‌های انکوبه‌شده با بتا دفنسین -۱ تقسیم شدند. سپس بر روی هریک از گروه‌های مذکور، ارزیابی تحرک و حیات انجام گرفت. داده‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه آنالیز شدند.

یافته‌ها: میانگین درصد تحرک اسپرم‌ها در گروه‌های آلفالیپوئیک اسید و بتا دفنسین -۱ نسبت به گروه کنترل پس از گذشت ۱ و ۲ ساعت، از لحاظ آماری افزایش معنی‌داری یافت ($p\leq ۰/۰۵$)؛ درحالی‌که در ساعت ۳ تنها گروه آلفالیپوئیک اسید در میانگین درصد تحرک، افزایش معنی‌داری نشان داد. میانگین درصد حیات اسپرم‌ها در گروه آلفالیپوئیک اسید و بتا دفنسین -۱ نسبت به گروه کنترل پس از گذشت ۱، ۲ و ۳ ساعت، از لحاظ آماری افزایش معنی‌داری یافت ($p\leq ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: اگرچه هر دو آنتی‌اکسیدانت آلفالیپوئیک اسید و پروتئین بتا دفنسین -۱ جهت حفظ تحرک و حیات اسپرم پس از گذشت زمان مؤثرند، ولی پیشنهاد می‌گردد جهت حفظ حیات و تحرک اسپرم، از آلفالیپوئیک اسید در محیط شست‌وشوی اسپرم استفاده شود.

کلیدواژه‌ها: تایوستیک اسید؛ بتا دفنسین؛ تحرک اسپرم.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Khayamabed R, Tavalaee M, Nasr Esfahani MH. Comparison of the effect of Alpha Lipoic Acid (ALA) and Beta-defensin 1 protein on human sperm motility and viability in different times of incubation. Qom Univ Med Sci J 2019;13(3):1-9. [Full Text in Persian]

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مقدمه

اولین قدم جهت تشخیص و درمان ناباروری، بررسی پارامترهای اسپرم (تعداد، تحرک و شکل اسپرم) می‌باشد. افراد نابارور با کاهش کیفیت پارامترهای اسپرم مواجه‌اند (۱،۲)؛ لذا احتمال کاهش باروری در این افراد بیشتر گزارش شده و جهت درمان آن‌ها نیز تکنیک‌های کمک باروری؛ ازجمله تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) و یا لقاح آزمایشگاهی (IVF) پیشنهاد می‌شود. در حین انجام این تکنیک‌ها، کیفیت پارامترهای اسپرم در طی آماده‌سازی اسپرم باید حفظ گردد (۳) تا اسپرم‌های عملکردی از اسپرم‌های غیرطبیعی که قادر به باروری تخمک نیستند، جدا شوند. دو روش معمول آماده‌سازی اسپرم که بیشتر در مراکز درمانی ناباروری استفاده می‌شود، DGC و Swim-up نام دارد. عمل سانتریفوژ در حین آماده‌سازی اسپرم، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را تولید می‌کند (۴،۵). یکی از ترکیبات بسیار مهم پلاسما، آنتی‌اکسیدانت‌ها هستند که با حذف پلاسما در حین شست‌وشو، از اسپرم حذف می‌شوند. از دیگر ترکیبات مهم پلاسما نیز می‌توان به پپتیدهای ضدمیکروبی اشاره کرد که در طی فرآیند بلوغ اسپرم نقش حفاظتی و عملکردی دارند.

تحت شرایط فیزیولوژیکی، اسپرماتوزوآ، مقدار کمی ROS تولید می‌کند که برای ظرفیت‌یابی و واکنش آکروزومی موردنیاز است. تولید بیش‌ازحد ROS در مایع منی به‌وسیله لکوسیت‌ها، همچنین اسپرم‌های غیرطبیعی می‌تواند یک علت ناباروری باشد (۶). هنگامی‌که ROSها و گونه‌های فعال نیتروژن (RNS) به مقدار زیاد تولید شوند، باعث تخریب بیولوژیکی شده که استرس اکسیداتیو و استرس نیتروزاتیو نامیده می‌شود (۷)، و با تأثیر بر روی ساختار غشا منجر به از دست رفتن قابلیت نفوذپذیری انتخابی غشای اسپرم و درنهایت، مرگ سلولی می‌گردد (۸). تخریب اکسیداتیو غشای پلاسمایی و میتوکندری اسپرم منجر به قطعه‌قطعه شدن DNA، کاهش عملکرد و تحرک اسپرم شده که درنهایت، به ناباروری ختم می‌شود (۹).

برای به حداقل رساندن فعالیت رادیکال‌های آزاد، استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد (۱۰). اخیراً آنتی‌اکسیدانتی به‌نام آلفالیپوئیک اسید شناخته‌شده که یک مولکول آمفی‌پاتیک است و در غشای سلولی و سیتوزول وجود دارد. آلفالیپوئیک اسید ازجمله آنتی‌اکسیدانت‌های کارا در محیط هیدروفیلیک و لیپوفیلیک می‌باشد و عملکردهایی به شرح زیر دارد:

۱- پاک کردن ROSهایی مثل رادیکال هیدروکسیل، اکسیژن منفرد وRNSهایی مانند پراکسی نیترات و نیتریک اکساید (۱۲)؛ ۲- احیای آنتی‌اکسیدانت‌های بیرونی و درونی مانند ویتامین E، ویتامین C، کاتالاز و گلوتاتیون ردوکتاز (۱۱)؛

۳- بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانت‌های سوپراکساید دسموتاز، گلوتامات اگزالواستات ترانس‌آمیناز، کاتالاز و لاکتات دهیدروژناز (۱۲)؛ ۴- ایجاد یک سپر قوی در غشای سلولی اسپرم در برابر حمله رادیکال‌های آزاد (۱۱).

پپتیدهای ضدمیکروبی (AMP)، مولکول‌های زیستی فعالی هستند که توسط ارگانیسم‌های زیادی تولید شده و به‌عنوان اجزای ضروری پاسخ ایمنی ذاتی آن‌ها محسوب می‌شوند. نقش اولیه این پپتیدها، دفاع میزبانی است که بر میکروارگانیسم‌های پاتوژن مهاجم، اثر سایتوتوکسیک می‌گذارد (۱۳). یکی از این پپتیدها، دفنسین (Defensin) نام دارد که از طریق ایجاد سوراخ درون غشای سلول هدف خود، باعث مرگ آن می‌شود. دفنسین‌ها (Defensin) به دو گروه α-defensins و β-defensins دسته‌بندی می‌شوند (۱۴).

دفنسین β (DEFB1 که HBD-1 هم نام دارد)، اولین عضو شناخته‌شده خانواده بتا دفنسین‌ها است (۱۵). این دفنسین دارای فعالیت ضدمیکروبی در برابر ویروس، باکتری و قارچ می‌باشد (۱۶). DEFB1 نه‌تنها در سلول‌های اپی‌تلیالی مسیر تناسلی مرد بیان می‌شود؛ بلکه در پلاسمای مایع منی و اسپرم نیز وجود دارد (۱۷) که نشان می‌دهد DEFB1 ترشح‌شده از سلول‌های اپی‌تلیال مسیر تناسلی مرد، می‌تواند به اسپرم متصل شود (۱۸). بتا دفنسین‌ها بر روی سطح اسپرم دارای یک نقش مهاری از ظرفیت‌یابی و واکنش آکروزومی زودرس هستند؛ بنابراین در صورت عدم وجود آن‌ها در اسپرم ممکن است این دو فرآیند به‌صورت زودهنگام رخ دهد که خود می‌تواند یک علت عدم موفقیت در لقاح و باروری محسوب گردد (۱۹). مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر آنتی‌اکسیدانت آلفالیپوئیک اسید و پروتئین بتا دفنسین بر روی تحرک و حیات اسپرم پس از انکوباسیون در زمان‌های مختلف صورت گرفت.

International License Creative Commons Attribution License 4.0

روش بررسی

این مطالعه مداخله‌ای بر روی ۵۹ فرد نابارور مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان انجام شد. قبل از ورود بیمار به طرح و استفاده از اضافه نمونه مایع منی افراد، مراحل طرح کاملاً به اطلاع بیمار رسانده شد و از آن‌ها فرم رضایت‌نامه کتبی اخذ گردید. مایع منی پس از ۳ الی ۴ روز پرهیز از نزدیکی توسط زوجین، جمع‌آوری شد و نمونه در ظرف پلاستیکی استریل (عاری از اثرات سمّی بر روی اسپرم کنترل‌شده) ریخته شد، سپس برای مایع شدن به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و مطابق استاندارد سازمان بهداشت جهانی (۱)، پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و شکل) به‌وسیله میکروسکوپ نوری آنالیز شدند.

غلظت اسپرم به‌وسیله لام شمارشگر اسپرم و تحرک اسپرم به کمک نرم‌افزار تجزیه‌وتحلیل مایع اسپرم

CASA, Video Test, ltd: version Sperm 2.1# 1990–2004,) Russia) بررسی شد. قسمت باقیمانده نمونه مایع منی جهت ارزیابی تأثیر آلفالیپوئیک اسید و بتا دفنسین پس از گذشت زمان ۱، ۲ و ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بر حرکت و زنده‌ماندن اسپرم درپی روش جداسازی اسپرم‌های طبیعی براساس سانتریفوژ گرادیان چگالی (DGC)، مورد استفاده قرار گرفت.

آماده‌سازی اسپرم براساس گرادیان چگالی طبق روش خیرالهی - کوهستانی و همکاران (۲۰) انجام شد. به‌طور خلاصه، دو شیب غلظت گرادیانت ۹۰ و ۴۵٪ از

SpermGrad™ (Vitrolife, Gothenburg, Sweden) تهیه شد، سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از غلظت ۹۰٪ و ۱/۵ میلی‌لیتر از غلظت ۴۵٪ به‌ترتیب در پایین و بالای یک لوله قرار گرفتند. ۱/۵ میلی‌لیتر نمونه منی شسته‌شده در بالای لایه گرادیان ۴۵٪ قرار داده شد و لوله به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰rpm (۳۰۰g) سانتریفوژ شد. پس از اتمام سانتریفوژ، محلول رویی حاوی پلاسمای منی با پیپت پاستور آسپیره‌شده به‌آرامی دور ریخته شد و به اسپرم‌های ته‌نشین‌شده محیط VitaSperm (Inoclon, Tehran, Iran) با ۱۰٪ آلبومین اضافه گردید.

اسپرم‌های جداشده با استفاده از روش DGC به سه بخش تقسیم شدند:

الف) نمونه تیمارشده با غلظت ۵۰۰ نانوگرم برمیلی‌لیتر از بتا دفنسین - ۱ (Abcam, Cambridge, MA) (۱۸)؛

ب) نمونه تیمارشده با غلظت ۰/۰۲ میلی‌مولار از آلفالیپوئیک اسید (SIGMA-ALDRICH, Darmstadt, Germany) (۲۱)؛

ج) نمونه کنترل که به آن فقط محیط VitaSperm به‌علاوه ۱۰٪ آلبومین اضافه شد.

سپس پس از گذشت ۱، ۲ و ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، بر روی هرکدام از گروه‌ها به‌طور جداگانه، تحرک و حیات اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت.

در ادامه، رنگ‌آمیزی ائوزین - نیگروزین با توجه به استانداردهای WHO انجام شد. ائوزین ۱٪

(Merck KGaA, Darmstadt, Germany) و نیگروزین ۱۰٪ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) در آب مقطر تهیه و نسبت حجمی ۲:۱ از اسپرم با ائوزین ۱٪ مخلوط شد. پس از ۳۰ ثانیه، حجم مشابهی از نکروزین به این مخلوط اضافه گردید، سپس اسمیرهای نازک تهیه و با استفاده از میکروسکوپ نوری ۲۰۰ در بزرگنمایی X ۱۰۰۰، اسپرم‌ها مشاهده شدند. در زیر میکروسکوپ اسپرم‌های زنده بدون رنگ و اسپرم‌های غیرزنده با رنگ قرمز قابل‌رؤیت بودند که نتایج به‌صورت درصد حیات اسپرم گزارش گردید.

در آنالیز آماری جهت بررسی پارامترهای اسپرمی، از روش آنالیز توصیفی استفاده شد. اطلاعات به‌دست‌آمده از این مطالعه برای مقایسه اثر آنتی‌اکسیدانت آلفالیپوئیک اسید و پروتئین بتا دفنسین بین گروه‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ با روش واریانس یک‌طرفه تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، ۵۹ فرد مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان با پارامترهای اسپرمی مطابق جدول زیر بررسی شدند.

ارزیابی پارامترهای اسپرمی در جدول آمده است.

International License Creative Commons Attribution License 4.0

جدول: میانگین پارامترهای اسپرمی در نمونه مایع منی

پارامترها	حداقل	حداکثر	میانگین± خطای معیار
غلظت اسپرم (میلیون برمیلی‌لیتر)	۱۵	۱۲۰	۶۵/۱۳±۳/۰۵
حجم نمونه (میلی‌لیتر)	۱/۲	۸	۳/۶±۰/۲
درصد تحرک اسپرم	۲۰	۷۰	۵۷/۳۹±۱/۱۴
درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم	۹۴	۹۸	۹۷/۰۸±۰/۸۱

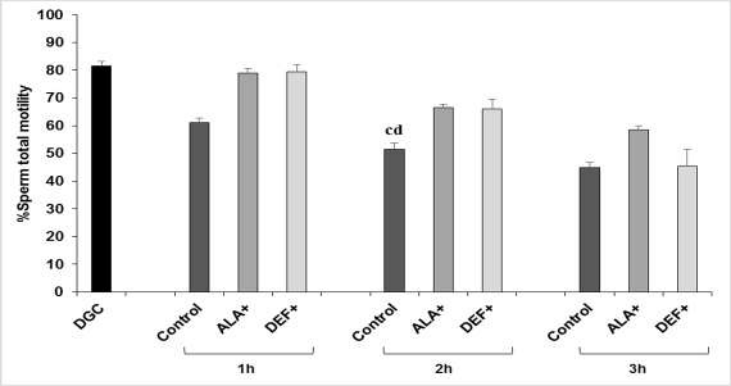
میانگین درصد تحرک اسپرم پس از گذشت یک‌ساعت در گروه کنترل ۶۱/۱±۱/۶۴، گروه آلفالیپوئیک اسید ۷۹/۰۳±۱/۵۷ و گروه بتا دفنسین- ۱، ۷۹/۴±۲/۵۵ به دست آمد. به‌علاوه، پس از گذشت ۲ ساعت تحرک اسپرم در گروه کنترل و آلفالیپوئیک اسید و بتادفنسین – ۱ به ترتیب ۵۱/۴۳±۲/۴۵، ۶۶/۵±۱/۲۴ و ۶۶/۰۲±۳/۵۲ و پس از گذشت سه ساعت به ترتیب ۴۴/۹۵±۱/۷۳، ۵۸/۳۹±۱/۵۹ و ۴۵/۴۲±۵/۹۳ بود.

میانگین درصد تحرک پیش‌رونده اسپرم پس از گذشت یک‌ساعت در گروه کنترل ۴۹/۲۷±۴/۵، گروه آلفالیپوئیک اسید ۶۲/۰۲±۳/۶۳ و گروه بتا دفنسین – ۱، ۶۳/۵۷±۲/۸۵ به دست آمد. همچنین پس از گذشت ۲ ساعت، درصد تحرک پیش‌رونده اسپرم در گروه کنترل و آلفالیپوئیک اسید و بتادفنسین – ۱ به‌ترتیب ۴۱/۰۲±۳/۷، ۴۹/۱۶±۳/۶۳ و ۵۲/۳۲±۳/۶۹ و پس از گذشت سه ساعت به ترتیب ۳۷/۵۲±۱/۸۵، ۴۵/۹۴±۲/۹۵ و ۳۴/۵۶±۵/۴ بود.

میانگین درصد حیات اسپرم پس از گذشت یک‌ساعت در گروه کنترل ۶۷/۶۴±۲/۹۵، گروه آلفالیپوئیک اسید ۷۹/۳۱±۲/۱۴ و گروه بتا دفنسین – ۱، ۷۴/۴۴±۲/۰۴ به دست آمد. همچنین پس از گذشت ۲ ساعت، درصد حیات اسپرم در گروه کنترل، آلفالیپوئیک اسید و بتادفنسین ۱ به ترتیب ۵۶/۹۸±۳/۴۲، ۷۱/۹۲±۲/۳۱ و ۶۸/۶۲±۳/۱۷ و پس از گذشت سه ساعت به‌ترتیب ۵۰/۶±۳/۳۵، ۶۶/۵۴±۲/۸۴ و ۶۴/۳±۱/۸ بود.

میانگین درصد تحرک اسپرم‌های تیمارشده با آلفالیپوئیک اسید و بتا دفنسین – ۱ در ساعات ۱ و ۲ نسبت به گروه کنترل به نسبت مشابه افزایش یافت که این اختلاف ازنظر آماری معنی‌دار بود (p=۰/۰۵)، اما در ساعت ۳ فقط اسپرم‌های تیمارشده با آلفالیپوئیک اسید، افزایش معنی‌داری در درصد تحرک خود داشتند. همچنین با مقایسه میانگین درصد تحرک پیش‌رونده، در اسپرم‌های تیمارشده مشخص گردید درصد تحرک پیش‌رونده برای نمونه تیمارشده با آلفالیپوئیک اسید در هر سه ساعت، افزایش معنی‌داری داشته است، اما برای نمونه تیمارشده با بتا دفنسین – ۱ در ساعات ۱ و ۲، افزایش بیشتری در میانگین درصد تحرک پیش‌رونده نسبت به نمونه تیمارشده با آلفالیپوئیک اسید مشاهده گردید، ولی در ساعت ۳، تغییری در درصد تحرک پیش‌رونده دیده نشد.

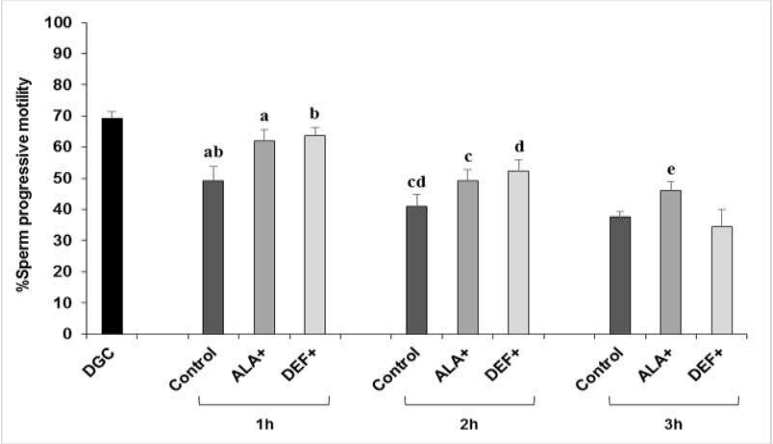
نمودار شماره ۳ میانگین درصد حیات اسپرم‌های تیمارشده را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. طبق نمودار، در هر سه ساعت میانگین درصد حیات اسپرم‌های تیمارشده هم با آلفالیپوئیک اسید و هم با بتا دفنسین – ۱ افزایش معنی‌داری داشت و در نمونه تیمارشده با آلفالیپوئیک اسید افزایش بیشتری مشاهده گردید.



نمودار شماره ۱: مقایسه میانگین درصد تحرک اسپرم در سه گروه کنترل، تیمارشده با آلفالیپوئیک اسید و تیمارشده با بتا دفنسین – ۱ پس از گذشت ۱، ۲ و ۳ ساعت. حروف مشترک، نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح آماری است:

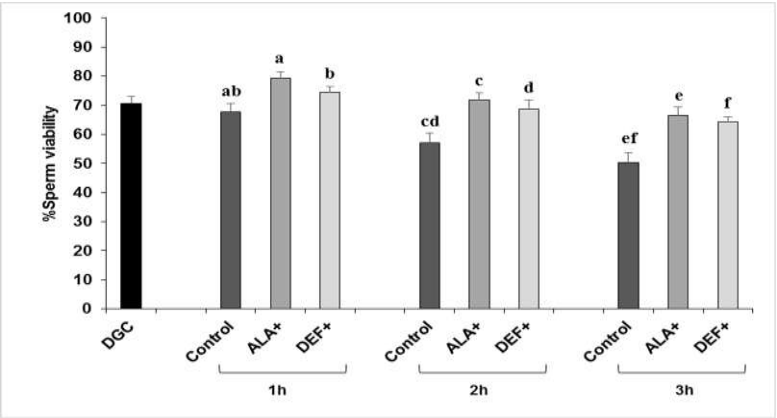
a) بین گروه کنترل و +ALA پس از یک ساعت (p=۰/۰۰۰)؛ b) بین گروه کنترل و +DEF پس از یک‌ساعت (p=۰/۰۰۰)؛ c) بین گروه کنترل و +ALA پس از ۲ ساعت (p=۰/۰۰۰)؛ d بین گروه کنترل و +DEF پس از ۲ ساعت (p= ۰/۰۰۰)؛ e: بین گروه کنترل و +ALA پس از سه ساعت (p=۰/۰۰۰).

International License Creative Commons Attribution License 4.0



نمودار شماره ۲: مقایسه میانگین درصد تحرک پیش‌رونده اسپرم در سه گروه کنترل، تیمارشده با آلفالیپوئیک اسید و تیمارشده با بتا دفنسین - ۱ پس از گذشت ۱، ۲ و ۳ ساعت. حروف مشترک، نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح آماری است:

a) بین گروه کنترل و +ALA پس از یک‌ساعت (p=۰/۰۰۲)؛ b: بین گروه کنترل و +DEF پس از یک‌ساعت (p=۰/۰۰۱)؛ c) بین گروه کنترل و +ALA پس از ۲ ساعت (p= ۰/۰۴۱)؛ d بین گروه کنترل و +DEF پس از ۲ ساعت (p= ۰/۰۴۹)؛ e: بین گروه کنترل و +ALA پس از سه ساعت (p= ۰/۰۳۸).



نمودار شماره ۳: مقایسه میانگین درصد حیات اسپرم در سه گروه کنترل، تیمارشده با آلفالیپوئیک اسید و تیمارشده با بتا دفنسین - ۱ پس از گذشت ۱، ۲ و ۳ ساعت. حروف مشترک، نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح آماری است:

a) بین گروه کنترل و +ALA پس از یک‌ساعت (p=۰/۰۱)؛ b: بین گروه کنترل و +DEF پس از یک‌ساعت (p=۰/۰۱۲)؛ c: بین گروه کنترل و +ALA پس از ۲ ساعت (p=۰/۰۰۱)؛ d بین گروه کنترل و +DEF پس از ۲ ساعت (p=۰/۰۱۳)؛ e) بین گروه کنترل و +ALA پس از سه ساعت (p= ۰/۰۰۱)؛ f) بین گروه کنترل و +DEF پس از سه ساعت (p= ۰/۰۰۲).

بحث

در حال حاضر تعداد زیادی از زوج‌ها با مشکل ناباروری مواجه‌اند. این زوج‌ها می‌توانند با مراجعه به مراکز درمان ناباروری، جهت درمان از تکنیک‌های کمک باروری استفاده کنند. قبل از استفاده از این تکنیک‌ها باید نمونه مایع منی جهت جداشدن اسپرم‌های طبیعی از غیرطبیعی به‌وسیله روش‌های جداسازی اسپرم آماده شود. در طی این آماده‌سازی، به دلیل استرس‌های فیزیکی ازجمله فشار دور سانتریفوژ، محیط‌های کشت و غیره، کاهش قابل‌توجهی در درصد تحرک، حیات و افزایش آسیب‌های غشایی و ساختار کروماتین اسپرم دیده می‌شود. تحقیقات نشان داده‌اند روند شست‌وشوی اسپرم به‌علت حذف پلاسمای مایع منی باعث کاهش ظرفیت دفاعی آنتی‌اکسیدانت و ایجاد استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش سطح ROS می‌گردد (۵)، که این افزایش سبب پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم و آسیب DNA اسپرم می‌شود (۲۱) که درنهایت، می‌تواند منجر به کاهش پتانسیل باروری گردد. آلفالیپوئیک اسید یک آنتی‌اکسیدانت قوی محلول در آب و چربی بوده که با پاک‌سازی ROS اضافی، از تخریب ساختمانی غشای سلول جلوگیری کرده و موجب کاهش میزان پراکسیدها می‌شود (۷،۲۱).

International License Creative Commons Attribution License 4.0

به‌علاوه در روند شست‌وشوی اسپرم، پروتئین‌های موجود در پلاسما نیز از اسپرم‌ها جدا می‌شوند. یکی از این پروتئین‌ها، بتا دفنسین - ۱ نامیده می‌شود که یک پروتئین ترشحی است و در طی فرآیند بلوغ اسپرم، دفاع میزبانی و تنظیم عملکرد اسپرم نقش مهمی دارد. همچنین این پروتئین قادر است میزان Ca^{2+} درون‌سلولی را افزایش دهد؛ به همین جهت باعث افزایش تحرک اسپرم می‌شود (۱۸).

تابه‌حال اثر آلفالیپوئیک اسید بر روی حیات و تحرک اسپرم انسانی بررسی نشده است، اما Ibrahim و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند انکوباسیون اسپرم بز با غلظت ۰/۰۲ میلی‌مولار از آلفالیپوئیک اسید قادر است تحرک و حیات اسپرم را حفظ کند (۲۱). از طرفی، Diao و همکاران بیان کردند انکوباسیون اسپرم انسان با غلظت ۵۰۰ نانوگرم برمیلی‌لیتر از بتا دفنسین - ۱ نیز می‌تواند تحرک و حیات اسپرم را حفظ کند (۱۸). ازآنجایی‌که تاکنون در مطالعه‌ای به بررسی و مقایسه دقیق اثر دو ماده آلفالیپوئیک اسید، بتا دفنسین - ۱ بر تحرک و حیات اسپرم در زمان‌های مختلف انکوباسیون پرداخته نشده بود؛ لذا در این مطالعه سعی گردید تأثیر اسپرم‌های انکوبه‌شده با این دو ماده از لحاظ تحرک و حیات بررسی شود.

نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان داد درصد تحرک اسپرم‌های انکوبه‌شده با آلفالیپوئیک اسید و بتا دفنسین - ۱ نسبت به گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد، همچنین درصد حیات اسپرم‌های انکوبه‌شده با این دو ماده نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری نشان داد. این یافته‌ها با مطالعات Ibrahim و همکاران در گونه اسپرم بز (۲۱) و Diao و همکاران همخوانی داشت (۱۸). در توجیه این نتایج می‌توان گفت پلاسمای منی شامل ترکیباتی است که در حفظ تحرک و حیات اسپرم نقش دارند و پس از حذف پلاسما در آزمایشگاه، با شبیه‌سازی کردن محیط شست‌وشوی اسپرم و مایع منی می‌توان تا حدودی از اثرات مخرب سانتریفوژ کاست.

در مطالعه حاضر، نتایج به‌دست‌آمده از نمودار شماره ۱ نشان داد میزان افزایش تحرک اسپرم‌های انکوبه‌شده با آلفالیپوئیک اسید و بتا دفنسین - ۱ پس از گذشت ۱ و ۲ ساعت به نسبت مشابه است، اما پس از گذشت سه ساعت تنها اسپرم‌های انکوبه‌شده با آلفالیپوئیک اسید، افزایش معنی‌داری در تحرک نشان دادند. همچنین طبق نمودار شماره ۳، در ارزیابی حیات اسپرم‌ها پس از گذشت ۱، ۲ و سه ساعت در گروه انکوبه‌شده با آلفالیپوئیک اسید و گروه انکوبه‌شده با بتا دفنسین - ۱ مشاهده گردید گروه انکوبه‌شده با آلفالیپوئیک اسید نسبت به گروه انکوبه‌شده با بتا دفنسین - ۱ افزایش بیشتری داشته است.

این نتایج، بیانگر نقش دفاعی و حفاظتی آلفالیپوئیک اسید و بتا دفنسین از اسپرم در برابر عوامل برون‌زاد و درون‌زاد است؛ به‌نحوی‌که آن‌ها توانسته‌اند از پیشروی زنجیره تولید و افزایش ROS در درون سلول جلوگیری و با جارو کردن رادیکال‌های آزاد، غشای اسپرم را در برابر خطرات احتمالی آسیب محافظت کنند. اگرچه در این مطالعه سطح ROS و آسیب DNA بررسی نشد، ولی مطالعات پیشین نشان داده‌اند ارتباط مثبت معنی‌داری بین سلامت DNA اسپرم، درصد تحرک و حیات اسپرم وجود دارد (۲۲). بنابراین اگر اسپرمی دچار آسیب DNA شده باشد به‌احتمال زیاد به سمت فرآیند مرگ سلولی یا آپوپتوز گرایش پیدا می‌کند و توانایی حفظ حیات و تحرک تا سه ساعت پس از انکوباسیون در شرایط آزمایشگاهی را نخواهد داشت؛ لذا به‌نظر می‌رسد افزودن برخی از آنتی‌اکسیدانت‌های کارا و پروتئین‌های دفاعی می‌توانند به بهبود کسب موفقیت نتایج تکنیک‌های کمک باروری جهت افراد نابارور کمک کنند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد می‌توان از آنتی‌اکسیدانت آلفالیپوئیک اسید به‌دلیل ویژگی منحصربه‌فرد حلال‌بودن در آب و چربی، همچنین از پروتئین بتا دفنسین به‌علت نقش دفاعی و محافظتی در برابر اثرات میکروارگانیسم‌های داخل مایع منی و استرس‌های اکسیداتیو، جهت حفظ درصد تحرک و حیات اسپرم در محیط‌های شست‌وشوی اسپرم استفاده کرد. برتری چشمگیری در استفاده از این دو ترکیب در نتایج وجود ندارد، ولی ازلحاظ مقرون‌به‌صرفه بودن و دسترسی آسان، استفاده از آلفالیپوئیک اسید پیشنهاد می‌گردد.

International License Creative Commons Attribution License 4.0

تشکر و قدردانی

این طرح (با کد ۹۵۰۰۰۲۳۳) با همکاری پژوهشکده زیست‌فناوری پژوهشگاه رویان و مرکز باروری ناباروری اصفهان انجام شد؛ لذا از تمامی کارکنان محترم مراکز فوق کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References:

1. WHO, World Health Organization Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2010. Link
2. Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. Fertil Steril 2006;85(3):629-34. Link
3. Cissen M, Bensdorp A, Cohlen BJ, Repping S, de Bruin JP, van Wely M. Assisted reproductive technologies for male subfertility. Cochrane Database Syst Rev 2016;26(2):CD000360. Link
4. Yoshida K, Yamasaki T, Yoshiike M, Takano S, Sato I, Iwamoto T. Quantification of seminal plasma motility inhibitor/semenogelin in human seminal plasma. J Androl 2003;24(6):878-84. Link
5. Chi HJ, Kim JH, Ryu CS, Lee JY, Park JS, Chung DY, et al. Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. Hum Reprod 2008;23(5):1023-8. Link
6. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. J Androl 2005;26(6):654-60. Link
7. Golbidi S, Laher I. Antioxidant therapy in human endocrine disorders. Med Sci Monit 2010;16(1):RA9-24. Link
8. 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. Link
9. Bahreinian M, Tavalaee M, Abbasi H, Kiani-Esfahani A, Shiravi AH, Nasr-Esfahani MH. DNA hypomethylation predisposes sperm to DNA damage in individuals with varicocele. Syst Biol Reprod Med 2015;61(4):179-86. Link
10. Anghel A, Zamfiresco S, Dragomir C, Nadullo D. The effects of antioxidants on the cytological parameters of cryopreserved buck semen. Rom Biotechnol Lett 2010;15(3):26-32. Link
11. Moura FA, de Andrade KQ, dos Santos JC, Goulart MO. Lipoic Acid: its antioxidant and anti-inflammatory role and clinical applications. Curr Top Med Chem 2015;15(5):458-83. Link
12. Shen T, Jiang ZL, Li CJ, Hu XC, Li QW. Effect of alpha-lipoic acid on boar spermatozoa quality during freezing-thawing. Zygote 2016;24(2):259-65. PubMed
13. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. J Leukoc Biol 2004;75(1):39-48. Link
14. Dorin JR, Barratt CL. Importance of β-defensins in sperm function. Mol Hum Reprod 2014;20(9):821-6. Link
15. Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J. Human beta-defensins. Cell Mol Life Sci 2006;63(11):1294-313. Link
16. Prado-Montes de Oca E. Human beta-defensin 1: a restless warrior against allergies, infections and cancer. Int J Biochem Cell Biol 2010;42(6):800-4. Link
17. Com E, Bourgeon F, Evrard B, Ganz T, Colleu D, Jégou B, et al. Expression of antimicrobial defensins in the male reproductive tract of rats, mice, and humans. Biol Reprod 2003;68(1):95-104. Link

International License Creative Commons Attribution License 4.0

18. Diao R, Fok KL, Chen H, Yu MK, Duan Y, Chung CM, et al. Deficient human β-defensin 1 underlies male infertility associated with poor sperm motility and genital tract infection. Sci Transl Med 2014;6(249):249ra108. Link

19. Colledge WH. Defending sperm function. PLoS Genet 2013;9(10):e1003889. Link

20. Kheirollahi-Kouhestani M, Razavi S, Tavalaee M, Deemeh MR, Mardani M, Moshtaghian J, et al. Selection of sperm based on combined density gradient and Zeta method may improve ICSI outcome. Hum Reprod 2009;24(10):2409-16. Link

21. Ibrahim SF, Osman K, Das S, Othman AM, Majid NA, Rahman MP. A study of the antioxidant effect of alpha lipoic acids on sperm quality. Clinics (Sao Paulo) 2008;63(4):545-50. Link

22. Ruiz-Lopez MJ, Evenson DP, Espeso G, Gomendio M, Roldan ER. High levels of DNA fragmentation in spermatozoa are associated with inbreeding and poor sperm quality in endangered ungulates. Biol Reprod 2010;83(3):332-8. PubMed

International License Creative Commons Attribution License 4.0