جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

آسیب‌های اکسیداتیو DNA در اسپرم مردان نابارور

نصرت‌الله ضرغامی(Ph.D)[۱]، محمد رهبانی نوبر(Ph.D.)[۲]، جعفر نوروززاده(Ph.D.)[۳]، یعقوب دلدار(M.S.)[۴]، محمد نوری (Ph.D.)[۱]، معرفت غفاری (Ph.D.-M.D.)[۱و۵].

۱-استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز، تبریز، ایران.

۲- استاد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز، تبریز، ایران.

۳-دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی ارومیه، ارومیه، ایران.

۴-کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، بخش IVF بیمارستان کوثر، دانشکده پزشکی، ارومیه، ایران.

۵-استادیار، گروه غدد تولیدمثل و جنین‌شناسی، پژوهشکده ابن‌سینا، تهران، ایران.

چکیده

آسیب‌های DNA ناشی از اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد اکسیژن، مهمترین فاکتور دخیل در انواع بیماری‌ها از جمله ناباروری مردان می‌باشد. هدف از این مطالعه مقایسه میزان آسیب اکسیداتیو DNA اسپرم بین مردان نابارور (بر اساس معیارهای سازمانی بهداشت جهانی) و بارور بود. از ۲۵ مرد نابارور و ۲۳ مرد بارور مراجعه‌کننده به مرکز درمان ناباروری تبریز نمونه منی بعد از ۷-۳ روز امتناع از نزدیکی تهیه گردید. بعد از آنالیز منی، سلول‌های اسپرم بوسیله سانتریفوژ گرادیان پرکول از مایع منی جدا و تا زمان آنالیز در درجه حرارت ۲۰° C- نگهداری شد. DNA اسپرم استخراج و میزان غلظت و خلوص آن با استفاده از اسپکتوفتومتر UV تعیین گردید. آنالیز ۸-هیدروکسی گوانین (8-OHG) توسط GC/MS (کروماتوگرافی گازی- اسپکتروسکوپی جرمی) به عنوان شاخص آسیب اکسیداتیو DNA نشان داد که فراوانی آن در DNA افراد نابارور نسبت به افراد بارور حدود ۱۰۰ مرتبه بیشتر می‌باشد. همچنین ارتباط معنی‌داری بین پارامترهای منی (مورفولوژی، تحرک و تعداد اسپرم) و آسیب اکسیداتیو DNA وجود داشت. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بالابودن میزان آسیب‌های اکسیداتیو DNA اسپرم ممکن است یکی از علل ناباروری مردان باشد.

گل واژگان: آسیب اکسیداتیو DNA، رادیکال‌های آزاد، آنتی‌اکسیدان‌ها، ناباروری و ۸-هیدروکسی گوانین.

آدرس مکاتبه: **دکتر نصرت الله ضرغامی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز، تبریز، ایران.**

پست الکترونیک:**nzarghami@hotmail.com**

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

حدود ۱۵-۱۰٪ از زوج‌ها با مشکل ناباروری مواجه هستند(۱). پژوهش انجام‌شده بر روی مردان نابارور، کاهش در تعداد، قدرت تحرک و مورفولوژی طبیعی اسپرم[1] را نشان می‌دهد که ممکن است اکسیداسیون DNA اسپرم این افراد توسط رادیکال‌های آزاد در ایجاد ناباروری نقش داشته باشد(۲).

امروزه ثابت گردیده که رادیکال‌های آزاد در ایجاد بیماری‌هایی نظیر سرطان، لوپوس[2]، پارکینسون، آلزایمر، بیماری‌های قلبی-عروقی، نقائص جنینی و مادرزادی و سقط جنین نقش دارند. رادیکال آزاد به اتم یا مولکولی اطلاق می‌گردد که به دلیل داشتن اربیتال نیمه پر با سایر اتم‌ها یا مولکول‌های آزاد یا غیرآزاد در بیومولکول‌های حیاتی بدن از جمله لیپیدها، پروتئین‌ها، قندها و DNA واکنش می‌دهد و آنها را اکسید می‌نماید(۳).

مطالعات Ollero و همکاران نشان داده است که آسیب ایجادشده بوسیله رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS)[3] در اسپرم انسان یکی از علل اصلی ناباروری مردان است و نتیجه گرفتند که تولید ROS بوسیله اسپرم‌های معیوب با میزان و کیفیت تحرک اسپرم‌ها ارتباط عکس دارد و بین تغییرات ایجاد شده در پارامترهای باروری مردان نابارور و سطح بالای ROS ارتباط معنی‌داری مشاهده گردید. بعلاوه بین کاهش ظرفیت تام آنتی‌اکسیدان (TAC) پلاسمای سمینال با کاهش کیفیت اسپرم نیز ارتباط نزدیکی وجود داشت. به علت تولید بیش از حد ROS آسیب ایجاد شده در غشای اسپرم منجر به کاهش تحرک اسپرم، غیرفعال‌شدن آنزیم‌های گلیکولیتیک و آسیب غشای آکرزومی، اکسیدشدن DNA و در نهایت باعث ناتوانی اسپرم در باروری تخمک و ایجاد یک حاملگی مؤثر می‌شود(٤).

1-Oligoasthenteratozspermic
2-Lupus
3-Reactive Oxygen Species

Hendin و همکاران نشان دادند افزایش سطح ROS و کاهش سطح تام آنتی‌اکسیدان در ایجاد ناباروری در افراد مبتلا به واریکوسل دخالت دارد. این افزایش مرتبط با اختلال در عملکرد اسپرم و ناباروری می‌باشد که معمولا در این بیماران دیده می‌شود(٥).

مطالعات Aitken و همکاران نشان داد که افزایش تولید ROS و محصولات آن بوسیله سلول‌های زاینده مردان ارتباط نزدیکی با پاتوژنز دستگاه تناسلی مردان (سرطان بیضه و کاهش کیفیت اسپرم) دارد. وقتی میزان تولید ROS پایین باشد این رادیکال‌ها نقش مهمی در عملکرد اسپرم (شامل متراکم‌کردن DNA و تقویت ظرفیت‌پذیری[4]) انجام می‌دهند ولی وقتی با مقدار زیاد تولید شوند باعث قطعه قطعه‌شدن DNA و افزایش تومور بدخیم بیضه[5] می‌شوند(٦).

Ollero و همکاران نشان دادند که آسیب ایجاد شده در فسفولیپیدها و DNA اسپرم انسان در اثر ROS در پاتوژنز باروری مردان نقش بسزایی دارد. آسیب DNA و تولید ROS بیشترین مقدار را در اسپرم‌های نابالغ با باقیمانده سیتوپلاسمی و سر غیرطبیعی و کمترین مقدار را در اسپرم‌های کاملاً بالغ نشان می‌دهد. این گروه تفاوت معنی‌داری در تولید ROS، محتوای لیپیدی غشاء و ساختمان کروماتین در اسپرم‌های انزال‌شده انسان مشاهده کردند و نیز تغییرات عمده‌ای در حین فرآیند بالغ شدن اسپرم در این پارامترها مشاهده نمودند(۷).

در ساختمان مولکول DNA سلول‌های بدن از جمله اسپرم، رادیکال‌های آزاد می‌توانند موجب اکسیداسیون بازهای پورین و پیریمیدین، ایجاد شکستگی در یک یا دو رشته، ایجاد جایگاه‌های بدون باز[6]، تشکیل پل‌های عرضی بین DNA و پروتئین و تغییر در قند دزاکسی

4-Capacition
5-Seminoma
6-Abasic Sites

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

ریبوز شوند. رادیکال‌های آزاد قادر هستند که بیوملکول‌های حیاتی از جمله DNA را مورد حمله اکسیداتیو قرار داده و تغییراتی در ساختمان DNA ایجاد نمایند، که این تغییرات در DNA اسپرم می‌تواند موجب ناباروری شود(۸).

معمول‌ترین باز آلی DNA که توسط رادیکال‌های آزاد مورد حمله اکسیداتیو قرار می‌گیرد، باز گوانین (G) می‌باشد که تبدیل به ۸-هیدروکسی گوانین (8-OHG)[1] می‌شود(٤). با توجه به نقش مهم رادیکال‌های آزاد در ایجاد آسیب و اختلال در عملکرد اسپرم و ایجاد ناباروری مردان، با توجه به نقش مهم رادیکال‌های آزاد در ایجاد آسیب و اختلال در عملکرد اسپرم و ایجاد ناباروری مردان اندازه‌گیری 8-OHG به عنوان شاخص میزان آسیب اکسیداتیو DNA در مردان بارور و نابارور (بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی) به عنوان هدف این مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد و وسایل مورد نیاز:

محلول پرکول (Pharmacia Co. Sewden)، Ham's F10 (Seromed Co. Germany) و لوله فالکون ۱۵*ml* و کیت استخراج DNA (Boehringe-Manheim Co. Germany) و Regenerated cellulose tubular membrane (Cellusep T1) با یک nominal relative molecular mass cutoff 3500 (RMMCO) (Gibco Co. USA) و استونیتریل و بیس تری فلوراستامید (Pierce Co. USA) و استانداردهای داخلی ٦-آزاتیمین و ۲ و ٦-دی‌آمینوپورین و استانداردهای کالیبراسیون ٥-کلرواوراسیل، ٥-هیدروکسی متیل هیدانتوئین، ٥-هیدروکسی هیدانتوئین، ٥-فورمیل اوراسیل، ٥-هیدروکسی‌اوراسیل، ٥-هیدروکسی متیل‌اوراسیل، ٥-هیدروکسی‌سیتوزین، هیپوگزانتین، گزانتین، تیمین گلیکول، فپی‌آدنین، ۲-هیدروکسی‌آدنین، فپی‌گوانین (Sigma Co. USA) و۸-هیدروکسی گوانین و اتانتیول (Aldrick Co. USA) تهیه گردیدند.

ایزوپروپانل, اتانل, بافر Tris-EDTA(pH=8) اسیدفرمیک، اسپکتروفتومتر UV, سانتریفوژ با دور ٥٠٠*RPM*، اولتراسانتریفوژ, میکروسانتریفوژ, دستگاه GC/MS با مشخصات:

Hewlett-Packard5971A mass detector selective و Hewlett-Packard5890 II gas chromatograph ستون GC/MS سیلیکای کوت‌شده با فنیل متیل سیلوکسان ٥٪ (۱۲*m**۰/۲*mm i.d.*) و فاز متحرک گاز هلیوم با شدت جریان برابر با ۰/۹۳*ml min* مورد استفاده قرار گرفت.

روش کار: نمونه‌های مورد پژوهش ۲۳ نفر از مردان با اسپرموگرام طبیعی و ۲۵ نفر از مردان با اسپرموگرام غیر طبیعی بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی بودند که به مرکز ناباروری دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز مراجعه کرده بودند. ابتدا نمونه منی[2] بعد از ۷-۳ روز پرهیز تماس جنسی از افراد مورد نظر تهیه و پس از انجام اسپرموگرام و تعیین مورفولوژی، تحرک و تعداد اسپرم در یک لوله تمیز و استریل در دمای C ۲۰°- تا زمان انجام سایر آزمایشات نگهداری شد. در زمان مورد نظر، تمامی نمونه‌های اسپرم مربوط به گروه کنترل و تست از حالت انجماد خارج و طی چندین مرحله شستشوی گرادیانی با استفاده از پرکول و محیط Ham's F_{10}، سلول‌های اسپرم از پلاسمای سمینال جدا گردیدند.

استخراج DNA: بر روی رسوب سلول‌های اسپرم موجود در لوله آزمایش حدود ۱۰-٦ *ml* بافر لیزکننده سلولی و سپس بعد از ۱۰ دقیقه ٦-٤*µl* پروتئیناز K اضافه گردید. به مدت ۲ تا ۳ ثانیه نمونه‌ها مخلوط شد و لوله‌ها به مدت دو ساعت در دمای C ٦٥° در بن‌ماری

1-8-Hydroxyguanine
2-Semen

جدول۱- مقایسه میانگین میزان فاکتورهای باروری اسپرم در دو گروه مردان بارور و نابارور بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی

فاکتور / گروه	کنترل N=۲۳	تست N=۲۵	P.value
	Mean±SD	Mean±SD	
تعداد (میلیون/میلی‌لیتر)	۹۶/۰۸±۲۶/۸۱	۱۲/۷۵±٤/٦٥	P<۰/۰۰۱
تحرک اسپرم (درصد)	٥۹/۷۸±٦/۳۰	۳٥/۱٦±۱۰/۲٤	P<۰/۰۰۱
مورفولوژی (درصد)	٤٤/٦۹±۱٤/۱۱	۰/٤٤±٦/۱۳	P<۰/۰۰۱

قرار گرفت. نمونه‌ها از بن‌ماری خارج و در دمای پایین‌تر ۲۰۰-۳۰۰ μl RNase اضافه گردید. بعد از همزدن، لوله‌ها مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷° C قرار گرفت. مقدار ۲/٥-۳/٥ ml محلول رسوب دهنده پروتئین به لوله اضافه شد و لوله‌ها به مدت ٥ دقیقه در ظرف محتوی یخ قرار گرفت و سپس با دور ۲٦۹۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ گردید. به محلول روئی ٦-۷ml ایزوپروپانول اضافه و بعد از آن در دور ۱۳۷۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. روی رسوب DNA ۱۰ml اتانول ۷۰٪ اضافه و با دور ۱۳۷۰g به مدت ٥ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از حذف محلول روئی، رسوب ته لوله در شرایط خلا خشک گردید. DNA حاصل در بافر TE با pH=8 حل شد و توسط اسپکتروفتومتر UV در طول موج ۲٦۰-۲۸۰nm بررسی گردید. غلظت، خلوص و آلودگی نمونه‌های DNA جداسازی شده، مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله بعد نمونه‌های DNA توسط Cellusep T_1 دیالیز و خالص گردیدند. سپس در مرحله بعد جهت هیدرولیز اسیدی بر روی نمونه‌های DNA اسیدفورمیک سرد ٦۰٪ و استانداردهای داخلی افزوده شد.

مشتق‌سازی[1]: بعد از هیدرولیز نمونه‌های DNA، طی عمل مشتق‌سازی، بازها و نوکلئوزیدهای قطبی و استانداردهای داخلی به مواد فرار تبدیل می‌شوند. این مشتقات در مقابل حرارت مقاوم هستند و این خاصیت باعث می‌شود طی آنالیز با GC/MS طیف جرمی بدهند. روش مشتق‌سازی بوسیله حرارت دادن در دمای ۹۰-۱٤۰ درجه سانتیگراد انجام می‌گیرد که نتیجه آن واکنش تری متیل سیلیلاسیون[2] می‌باشد. برای جلوگیری از اکسیداسیون بیش از حد DNA خصوصاً 8-OHG مقدار ٥ میکرولیتر آنتی اکسیدان ویژه بنام اتانتیول[3] به نسبت ۱ به ۳ با استونیتریل مخلوط و به نمونه‌های DNA و استانداردهای کالیبراسیون افزوده می‌شود. برای اینکه عمل مشتق‌سازی ۸-هیدروکسی گوانین بهتر انجام شود از تری فلورواستیک اسید (TFA) نیز استفاده گردید. پس از مرحله مشتق‌سازی ترکیبات ٦-آزاتیمین و ۲ و ٦-دی‌آمینوپورین به عنوان استاندارد داخلی به نمونه‌های DNA کنترل و بیمار افزوده گردید، بطوریکه هر دو ترکیب فوق در مدت هیدرولیز و مشتق‌سازی پایدار هستند.

1-Derivatization
2-Trimethylsilylation
3-Ethanethiol

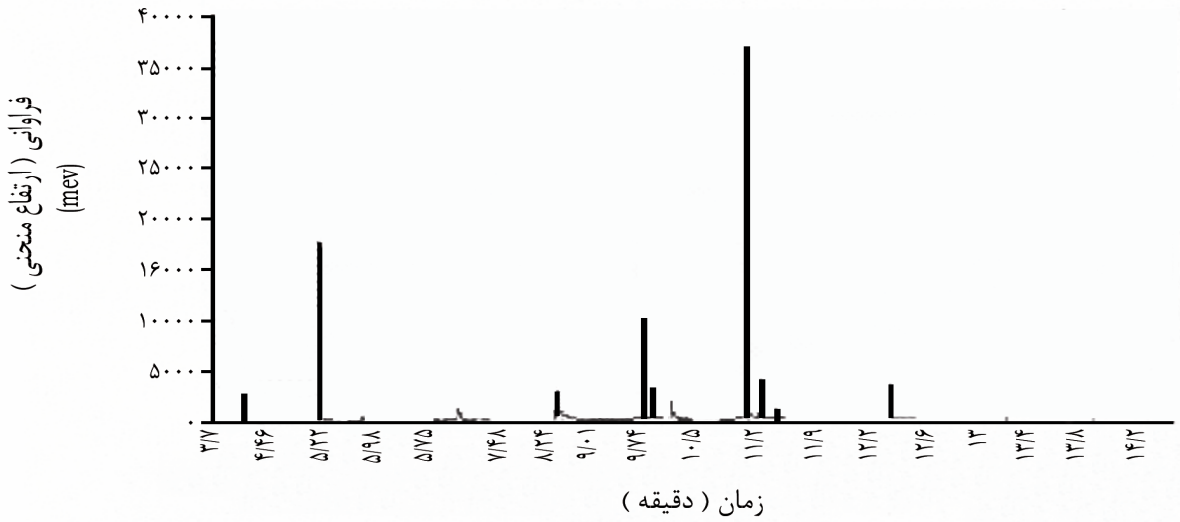
جدول۲- انواع استانداردهای مورد استفاده و زمان بازیافت هر یک در آنالیز DNA اسپرم مردان بارور و نابارور به روشGC/MS

ردیف	استاندارد کالیبراسیون	زمان بازیافت (دقیقه)
۱	۵-کلرو اوراسیل	٤/١٨
۲	۵-هیدروکسی متیل هیدانتوئین	٤/٦٨
۳	۵-هیدروکسی هیدانتوئین	٥
٤	۵-فرمیل اوراسیل	٥/٦٧
٥	۵-هیدروکسی اوراسیل	٦/٠٣
٦	۵-هیدروکسی متیل اوراسیل	٧/١٣
٧	۵-هیدروکسی سیتوزین	٧/٣١
٨	تیمین گلیکول (ایزومر سیس)	٨/١٠
٩	تیمین گلیکول (ایزومر ترانس)	٨/٤٠
١٠	هیپوگزانتین	٨/٧
١١	فاپی (FAPy) آدنین	٩/٢٧
١٢	۸-هیدروکسی آدنین	٩/٩٨
١٣	۲-هیدروکسی آدنین	١٠/١٠
١٤	گزانتین	١٠/٢٦
١٥	فاپی (FAPy) گوانین	١٠/٩٠
١٦	۸-هیدروکسی گوانین	١١/٤٧
١٧	آزاتیمین (استاندارد داخلی)	٤/٢٨
١٨	دی آمینو پورین (استاندارد داخلی)	١١/٤٧

همچنین استانداردهای کالیبراسیون۵-کلرواوراسیل، ۵-هیدروکسی متیل هیدانتوئین،۵-هیدروکسی هیدانتوئین،۵-فورمیل اوراسیل، ۵-هیدروکسی‌اوراسیل، ۵-هیدروکسی متیل‌اوراسیل، ۵-هیدروکسی‌سیتوزین، هیپوگزانتین، گزانتین، تیمین گلیکول، فپی‌آدنین، ۲-هیدروکسی‌آدنین، فپی‌گوانین ($1nM$-۰/۲ از هر کدام) به ترکیبات فرار تبدیل و مورد آنالیز طیف جرمی قرار گرفتند. در مرحله آخر ترکیبات گازی تشکیل شده از نمونه‌ها را برای اندازه‌گیری میزان8-OHG به دستگاه GC/MS تزریق گردید. دستگاه طیف جرمی و فراوانی8-OHG بعنوان شاخصی از آسیب رادیکال‌های آزاد بر روی DNA اسپرم در گروه افراد نابارور و بارور و DNA بافت تیموس گوساله که به طور مصنوعی در معرض اکسیداسیون قرار گرفته بود بعنوان گروه کنترل ثانویه ارائه نمود.

نتایج

نمونه‌های ارزیابی در این پژوهش ٤٨ نفر بودند که بر اساس پارامترهای اسپرموگرام و با توجه به معیارهای سازمان بهداشت جهانی به دو گروه تقسیم شدند. بدین شرح که نمونه‌های با تعداد اسپرم بیش از ۲۰ میلیون



نمودار ۱ - آنالیز GC/MS روی DNA اکسیدشده تیموس گوساله به عنوان گروه کنترل

در هر میلی‌لیتر و تحرک اسپرم مساوی یا بیش از ۵۰٪ و مورفولوژی طبیعی بیشتر از ۳۰٪ در گروه کنترل (C) و افراد دارای پارامترهای اسپرموگرام کمتر از مقادیر فوق در گروه تست قرار گرفتند:

بر این اساس از ٤٨ نمونه مورد پژوهش ۲۳ نفر در گروه کنترل با میانگین سنی ۲۹/٤±٥/۹ و ۲۵ نفر در گروه تست با میانگین و انحراف معیار سنی ۲۸/٦±۳/٤ قرار گرفتند. در جدول۱ میانگین میزان پارامترهای اسپرم که فاکتورهای باروری نیز نامیده می‌شوند در دو گروه کنترل و تست مقایسه شده‌اند. همانطور که از جدول و بویژه ستون Pvalue مشخص است میانگین میزان فاکتورهای باروری ارزیابی شده در این پژوهش با P<۰/۰۰۱ در دو گروه اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند، که البته با توجه به این که اساس تقسیم‌بندی افراد به دو گروه نیز همین فاکتورها بوده است، این مورد بدیهی و قابل پیش‌بینی می‌باشد.

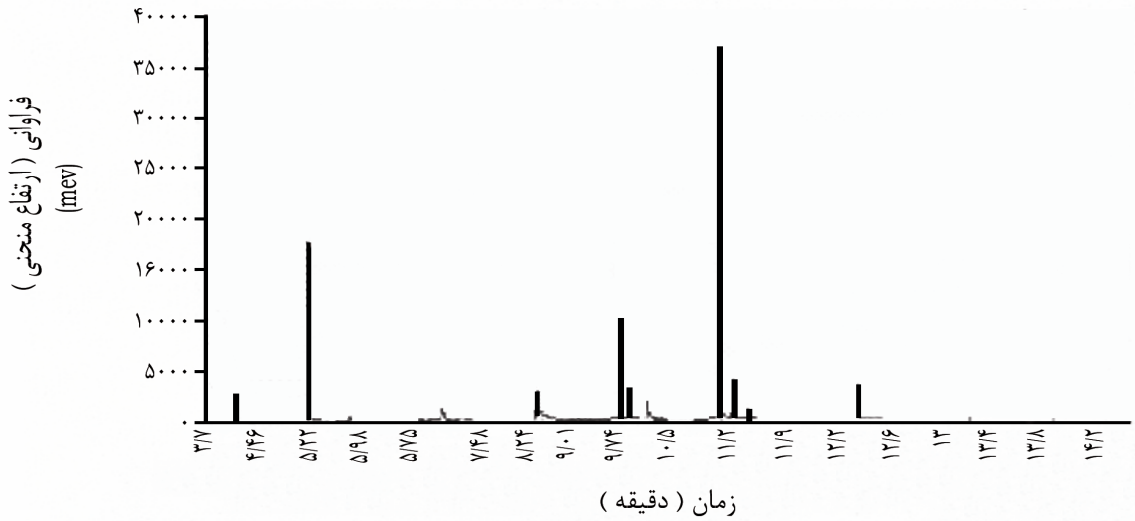
زمان بازیافت(RT)[1] هر یک از این بازهای آلی در جدول شماره ۲ آورده شده است. با توجه به این جدول، زمان بازیافت 8-OHG برابر ۱۱/٤٥ دقیقه می‌باشد.

نمودارهای ۱و۲ و ۳ طیف جرمی 8-OHG را در گروه کنترل, تست و استاندارد DNA تیموس (کنترل شاهد) نشان می‌دهد. با مقایسه نمودار۱و۲ کاملاً مشخص است که پیک مربوط به 8-OHG در گروه تست بسیار بیشتر از گروه کنترل می‌باشد. سطح زیر منحنی مربوط به 8-OHG در گروه تست در حدود ۲۰۰۰۰ و در مورد گروه کنترل در حدود ۲۰۰ می‌باشد و یعنی می‌توان گفت که میزان اکسیداسیون DNA در گروه افراد نابارور ۱۰۰ مرتبه بیشتر از گروه افراد بارور می‌باشد. با توجه به این که میزان پارامترهای اسپرم (مورفولوژی، تحرک و تعداد اسپرم) گروه تست پایین‌تر از گروه کنترل است لذا می‌توان نتیجه گرفت که اکسیداسیون DNA رابطه معکوسی با میزان پارامترهای معرف قدرت باروری اسپرم دارد.

بحث

اگرچه آسیب‌های حاصل از DNA روی رادیکال‌های ROS بعنوان عامل سببی بسیاری از روندهای پاتولوژیک در انسان پیشنهاد گردیده است ولی

1-Retention Time

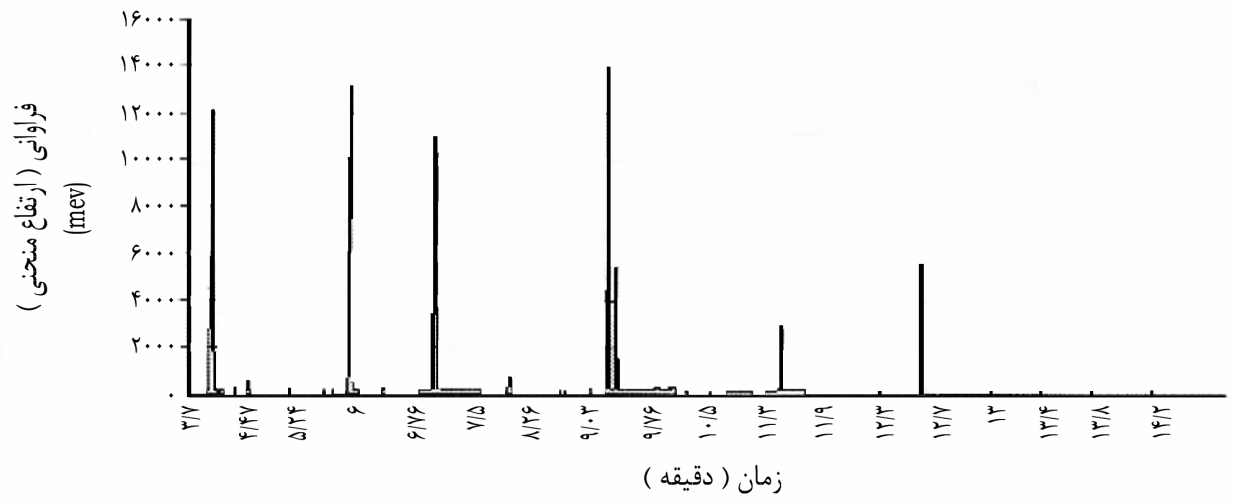


نمودار ۱ - آنالیز GC/MS روی DNA اکسیدشده تیموس گوساله به عنوان گروه کنترل

آسیب اکسیداتیو DNA اسپرم افراد نابارور کمتر مورد توجه محققین بوده است. بنابراین، مطالعات اخیر نشان داده است که تعدادی از بازهای پورین اکسیده شده بوسیله روش‌های حساس قابل شناسائی می‌باشند و ردیابی ۸-هیدروکسی گوانین بعنوان یکی از ۲۰ نوع تولیدات حاصل از آسیب‌های اکسیداتیو DNA می‌باشد که بدنبال هیدرولیز آنزیمی DNA و جداسازی به روش‌های کروماتوگرافی نظیر HPLC بطور موفقیت‌آمیزی جهت شناسائی و تعیین میزان آسیب‌های DNA در بافت‌های مختلف انسانی و خون و ادرار مورد استفاده قرار گرفته است. بطوریکه اخیراً این روش‌ها برای ارزیابی افراد در معرض خطر اکسیداتیو مرتبط با روش زندگی، زمینه ژنتیک، بیماریهای تحلیل برنده و سموم محیطی مورد استفاده قرار می‌گیرد(۹).

Fraga و همکاران (۱۹۹۱) نقش کاهش ویتامین C رژیم غذایی را روی آسیب اکسیداتیو DNA اسپرم با استفاده از اندازه گیری ۸-هیدروکسی، ۲-داکسی گوانوزین مورد ارزیابی قرار دادند(۱۰) و همچنین در سال ۱۹۹۷ Kodam و همکاران با اندازه‌گیری آسیب‌های اکسیداتیو در اسپرم مردان نابارور دریافتند که میزان شاخص اکسیداتیو DNA deoxyguanosin برابر با ۱/۲±۰/۱ با محدوده ۳/۱-۰/۲ بود که با گزارشات قبلی تقریبا همخوانی داشت. همچنین میزان ۸-هیدروکسی، ۲-داکسی گوانوزین در سایر سلول‌ها یا بافت‌ها با روش HPLC توسط Kodam و همکاران اندازه‌گیری گردید و میزان آسیب اکسیداتیو DNA در گلبول‌های سفید خون از ۰/۶-۰/۳ در بافت ریه ۰/۷-۰/۵ و در مخاط کولون ۰/۵-۰/۳ در هر 10^{5} داکسی گوانوزین در مقایسه با این سلول‌ها و سایر بافت‌های بدن، آسیب اکسیداتیو DNA اسپرم انسان بسیار شدیدتر بود. بطوریکه میزان متوسط سطح ۸-هیدروکسی، ۲-داکسی گوانوزین در اسپرم مردان نابارور نسبت به گروه کنترل بالاتر بود(۲).

در این مطالعه برای اولین بار با بکارگیری روش GC/MS جهت اندازه‌گیری 8-OHG در DNA اسپرم



نمودار ۳ - آنالیز GC/MS روی DNA حاصل از مردان دارای پارامترهای طبیعی‌مایع منی(Semen)
(براساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی) به عنوان گروه کنترل

مردان نابارور و مقایسه آن با افراد بارور مشخص شد که میزان 8-OHG در گروه افراد نابارور حدود ۱۰۰ مرتبه بیشتر از گروه افراد بارور می‌باشد. که این یافته‌های ما با نتایج سایر محققین مطابقت داشته است. Kodama و همکاران در پژوهشی که بوسیله HPLC-EC به انجام رساندند به نتایجی در خصوص نقش اکسیداسیون DNA اسپرم در باروری مردان دست یافتند. پژوهش آنان نشان داد که ارتباطی بین میزان8-OHG و غلظت اسپرم یا تعداد اسپرم در واحد حجم مایع سمینال وجود دارد (P<۰/۰۱، r= -۰/۴۹)(۲). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که یک رابطه منفی بین میزان سطح 8-OHG با غلظت اسپرم وجود دارد. بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که آسیب اکسیداتیو شدید DNA اسپرم با شرایط الیگوآزواسپرمی همراه می‌باشد. که یکی از راههای بیان ارتباط این است که اسپرم بیماران با آسیب اکسیداتیو شدید DNA، دژنره شده و در طول روند اسپرماتوژنز و بلوغ اسپرم در اپی‌دیدیم توسط سلول‌های پوششی جذب می‌شوند که منجر به کاهش تعداد اسپرم در این بیماران می‌گردد.

در سال ۱۹۹۹، Shen و همکاران در ارزیابی آسیب‌های اکسیداتیو DNA در اسپرم انسان و ارتباط آن با ناباروری مردان، با اندازه گیری سطح 8-OHdG بوسیله HPLC-EC در نمونه‌های اسپرم انسانی ۶۰ بیمار نابارور و ٥٤ فرد کنترل، دریافتند که میزان سطح 8-OHdG در اسپرم DNA بیماران نابارور بطور قابل ملاحظه‌ای بالاتر از افراد سالم می‌باشد.

همچنین در بررسی ارتباط بین میزان سطح 8-OHdG و پارامترهای معمول مایع سمینال مشخص گردید که یک رابطه مثبت معنی‌داری بین 8-OHdG و نقص سر اسپرم وجود دارد (P<۰/۰۰۱، r=۰/۳۸) در صورتیکه یک رابطه منفی معنی‌داری برای 8-OHdG با غلظت اسپرم (P<۰/۰۰۱، r=-۰/٤۲) تعداد کل اسپرم(P<۰/۰۰۱، r=-۰/٤۲) حرکت اسپرم(P<۰/۰۰۱، r=-۰/۲٤) و مرفولوژی طبیعی اسپرم (P<۰/۰۰۱، r=-۰/۳۹) مشاهده گردید و نتایج حاصله نشان داد که آسیب اکسیداتیو به DNA اسپرم ممکن است در اتیولوژی ناباروری مرد مهم باشد و اندازه گیری 8-OHdG ممکن است دارای ارزش تشخیصی در ارزیابی عملکرد اسپرم و ناباروری مردان باشد(۱۱).

در سال ۲۰۰۰، Shen و همکارش شناسایی آسیب اکسیداتیو DNA در اسپرم انسان و ارتباط آنرا با عملکرد اسپرم و ناباروری مردان مورد مطالعه قرار داده‌اند. به نظر آنها اندازه‌گیری 8-OHdG می‌تواند به عنوان یک بیومارکر اختصاصی و کمی آسیب‌های اکسیداتیو ایجاد شده بوسیله عوامل ROS در DNA اسپرم انسان باشد. ارتباط نزدیک سطح 8-OHdG با باروری مردان، عملکردهای اسپرم و پارامترهای معمول ارزیابی اسپرم نشانگر ارزش تشخیصی بالای این روش در کاربردهای کلینیکی است(۱۲).

در سال ۱۹۹۹، Zenzes و همکاران گزارش نمودند که مصرف سیگار آسیب اکسیداتیو DNA را افزایش می‌دهد. دود سیگار حاوی مواد موتاژن، کارسینوژن و مواد تولیدکننده رادیکال‌های آزاد می‌باشد. استعمال دخانیات موتاسیون در DNA اسپرم را افزایش می‌دهد و ذخایر آنتی‌اکسیدانی پلاسما، پلاسمای سمینال بافت‌ها را تخلیه می‌کند. میزان 8-OHG در DNA اسپرم در بین افراد سیگاری ۵۰٪ بیشتر از افراد غیرسیگاری می‌باشد. غلظت آلفا توکوفرول و اسکوربات در پلاسمای سمینال افراد سیگاری کمتر از افراد غیرسیگاری است(۱۳). لذا در مطالعه حاضر نیر افراد نابارور غیر سیگاری جهت بررسی آسیب اکسیداتیو DNA انتخاب گردیدند. بدیهی است که در آینده‌ای بسیار نزدیک فاکتور اکسیداسیون DNA اسپرم در سنجش باروری مردان در آزمایشگاه نیز مد نظر قرار خواهد گرفت و لذا جزئیات بیشتری در این خصوص و نیز در رابطه با نقش رادیکال‌های آزاد در امر باروری در کنار سایر عوامل مؤثر، روشن خواهد شد.

در حالت طبیعی در بدن توازنی بین سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و ترمیم DNA با اکسیداسیون DNA وجود دارد و همیشه سطح پایینی از DNA اکسید و سریعاً توسط مکانیسم‌های دفاعی ترمیم می‌گردد. حدود نیمی از علل ناباروری مربوط به مردان می‌باشد. یکی از علل مهم ناباروری در مردان وجود رادیکال‌های آزاد در مایع سمینال می‌باشد که باعث اکسیداسیون DNA اسپرم و تغییر بازهای آلی در ساختمان DNA می‌گردد و در نهایت موجب تخریب اسپرم یا کاهش قدرت حرکتی و باروری می‌شود. در پژوهش حاضر نیز ارتباط ناباروری مردان و میزان 8-OHG در DNA اسپرم افراد نابارور به روش GC/MS تجربه شد. در خاتمه باید گفت که بررسی ارتباط اکسیداسیون DNA اسپرم با فاکتورهای باروری اسپرم و لذا باروری مردان در ابتدای مسیر خود است و ناشناخته‌های زیادی در این زمینه وجود دارد که امیدواریم تحقیقات و پژوهش‌های آینده پرده از بسیاری از مجهولات بردارد و همواره ره بر رهروان روشن‌تر و هموارتر گردد.

تشکر و قدردانی

از همکاری آقای دکتر فیروز و خانم‌ها دکتر فرزدی و دکتر قاسم‌زاده و پروفسور Barry Halliwell به علت همکاری و راهنمائی در اجرای این مطالعه صمیمانه تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

References

1-Mosher, W.D and W.F. Pratt; "Fecundity and Infertility in the United Stated: Incidence and Trends", Fertil Steril. 1991; 56:192.
2-Kodama H., Yamaguchi R., Fukuda J., et al. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. Fertil Steril. 1997; 68(3): 519- 24.
3-Halliwell B., Guttering J.M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J. 1984; 219: 1- 14.

4-Quzman E.G, Ollero M, Lopez M.C. Differential production of reactive oxygen species by subset of human spermatozoa at different stages of maturation. Hum Reprod 2001, 16(8): 1922- 30.
5-Hendin EN, Kolettis PN, Sharma PK. Varicocele is associated with elevated spermatozoa active oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. J Urol 1999, 161(6): 1831-4.
6-Aitken RJ. The amorosol lecture. The spermatozoon: a cell in crisis? J Reprod Fertil 1999, 115(1): 1-7.
7-Ollero M, Enrique G, Lopez M.C. Characterization of subset of human spermatozoa at different stage of maturation: implication treatment of male infertility. In the diagnosis and treatment of male infertility. Hum Reprod. 2001, 16(9): 1912- 21.
8-Rehman A., Jenner A., Halliwell B: Gas chromatography-mass spectrometry analysis of DNA: optimization of protocols for isolation and analysis of DNA from human blood. Methods in Enzymol. 2000; 319: 401- 17.
9-Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames B. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy,2-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 87: 4533- 7.
10-Fraga CG, Motchnik PA, Shigm. Enaga MK, Helbrock JH, Jacob RA, Ames B. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88: 11003- 6.
11-Shen HM, Chia SE, Ong CN. Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. J Androl. 1999; 20(6): 718- 23.
12-Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. Free Radic Biol Med. 2000; 28(4): 529- 36.
13-Zenzes T.M., Bielecki R., reed E. Detection of benzopyrene diolepoxide DNA adducts in sperm of men exposed to cigarette smoke. Fertil Steril. 1999; 72(2): 330- 9.