

فعالیت آنتی اکسیدان های تام و غلظت مالون دی آلدئید در مایع سمینال مردان واریکوسل

اباصلت حسین زاده کلاگر^{۱*}، علی بیدمشکی پور^۲، مریم قلی نژاد چاری^۱

(۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه و گروه نانو و بیوتکنولوژی، دانشگاه مازندران

(۲) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی کرمانشاه

تاریخ دریافت: ۸۷/۵/۵

تاریخ پذیرش: ۸۸/۳/۴

چکیده

مقدمه: واریکوسل شایع ترین علت ناباروری در مردان با شیوع تقریبی ۱۹ تا ۴۰ درصد می باشد که با مکانیسم های متعددی منجر به کاهش تولید و توانایی بارورسازی اسپرم ها می گردد. در این تحقیق، سطح آنتی اکسیدان های تام (TAC/total antioxidants capacity) و غلظت مالون دی آلدئید (MDA/malondialdehyde) در مایع سمینال به عنوان یکی از مکانیسم های احتمالی اثر واریکوسل بر روی کیفیت پارامتر های اسپرم و ناباروری در مردان بررسی شد.

مواد و روش ها: در پژوهش حاضر که یک مطالعه مورد-شاهدی است، نمونه های سمن شامل ۱۵ مرد بارور نرمواسپرمیک و ۱۴ مرد واریکوسل نابارور از مراکز IVF شهرستان بابل، فراهم شدند و بر اساس استانداردهای WHO مورد آنالیز قرار گرفتند. سطح آنتی اکسیدان های تام (TAC) و غلظت مالون دی آلدئید (MDA)، در نمونه ها به ترتیب با روش های FRAP و TBA اندازه گیری شدند.

یافته های پژوهش: بر اساس نتایج ما میانگین سطح TAC در مایع سمینال مردان واریکوسل (۳۷۰/۵۶ ± ۱۰۹۲/۴۳) به طور معنی داری کمتر از مردان بارور (۷۶۴/۷۸ ± ۲۳۳۵/۴۴) بود (p < ۰/۰۰۱). به علاوه سطح MDA در مایع سمینال مردان واریکوسل (۰/۲۷ ± ۰/۹۲) در مقایسه با مردان بارور (۰/۲۲ ± ۰/۵۷) به طور معنی داری بیشتر (p = ۰/۰۰۱) بود.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج فوق، به نظر می رسد که کاهش سطح آنتی اکسیدان ها و در پی آن افزایش سطح پراکسیداتیوی می تواند به عنوان یکی از اثرات منفی عارضه واریکوسل بر روی کیفیت و عملکرد اسپرم باشد که این نتایج نیازمند تحقیقات بیشتری است.

واژه های کلیدی: واریکوسل، ناباروری مردان، مالون دی آلدئید، فعالیت آنتی اکسیدان تام

*نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه و گروه نانو و بیو تکنولوژی، دانشگاه مازندران

مقدمه

واریکوسل توده های متشکل از وریدهای متسع و پیچ در پیچ (pampiniform) در بالا و اطراف بیضه است، (۱-۴). این اختلال آناتومیک یکی از شایع ترین علل ناباروری در مردان می باشد، (۵). که تقریباً در ۱۵ تا ۲۰ درصد جمعیت کل مردان، به ویژه جوانان، (۱). و ۱۹ تا ۴۱ درصد مردان نابارور دیده شده است، (۳۶، ۷). اگر چه پیشگویی اثر واریکوسل بر روی توانایی بارورسازی مردان تا حدودی مشکل می باشد، تحقیقات اخیر نشان داده است که احتمالاً واریکوسل با مکانیسم های متعددی بر کاهش کیفیت اسپرم اثر می گذارد که در نهایت فرآیند اسپرماتوزن دچار اختلال می گردد، (۷). یکی از این مکانیسم های پیشنهادی، افزایش سطح متابولیت های واکنش پذیر اکسیژن (oxygen species/ROS reactive) و در نتیجه افزایش سطح اکسیداتیوی (oxidative stress) است که توجه زیادی را به خود جلب نمود، (۸). ROS ها به خانواده رادیکال های آزاد تعلق دارند که به خاطر داشتن حداقل یک الکترون جفت نشده در ساختار خود، بسیار واکنش پذیر بوده به طوری که قادرند با انواع ماکرومولکول های زیستی واکنش داده و نهایتاً منجر به اکسیداسیون آن ها گردند، (۹). متداول ترین متابولیت های واکنش پذیر اکسیژن که اثر شدیدی بر بیولوژی تولید مثل می گذارند شامل آنیون سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال هیپوکلرید ($HOCl$) و رادیکال بسیار واکنش پذیر هیدروکسیل ($OH^\bullet$) می باشند، (۹، ۱۰). تولید کنترل شده و متعادل ROS توسط اسپرماتوزوآ و دیگر سلول ها برای متابولیسم هوازی ضروری است به طوری که آن ها در غلظت های پایین نقش های فیزیولوژیکی زیادی برای سلول ها دارند و به عنوان واسطه گرهای (mediator) مهمی در مکانیسم های پیام رسانی داخل سلولی عمل می کنند. اما تولید بیش از حد ROS اثرات زیان باری بر عملکرد سلول دارد، (۱۰، ۴، ۱۱). تحقیقات بسیاری نشان دادند که ROS احتمالاً با پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع دارای چند پیوند دوگانه (poly unsaturated fatty acid) در ناحیه سر

و قطعه میانی اسپرم و به موجب آن تغییر مورفولوژی اسپرم، کاهش تحرک اسپرم و عدم ادغام موفقیت آمیز اووسیت - اسپرماتوزوآ در نقص عملکرد اسپرم نقش اساسی داشته باشد، (۱۲، ۱۳). شدت آسیب پراکسیداتیو را می توان با تخمین محصولات آلدهیدی پایدار انتهایی پراکسیداسیون لیپید (lipid peroxidative) از قبیل مالون دی آلدئید سنجید، (۱۰). این آلدئیدها می توانند از طریق واکنش پذیری با گروه تیول در پروتئین ها به طور کوالانسی به آن ها متصل گردند و عملکرد پروتئین را تغییر دهند. آن ها همچنین می توانند از طریق رادیکال های آلوکسیل و پراکسیل باعث اکسیداسیون بازهای DNA (به ویژه گروه های آمینوگوانوزین) و اضافه شدن حلقه ها گردند که مجموعه این عوامل، سلول اسپرم را جهت بارورسازی تخمک ناتوان می سازد (۱۲، ۱۴). در مقابل اثرات پاتولوژیک رادیکال های آزاد، اسپرماتوزوآ و پلاسما سمینال دارای مجموعه ای از آنتی اکسیدان های آنزیمی و غیر آنزیمی با وزن مولکولی پایین، تحت عنوان کلی ظرفیت آنتی اکسیدان های تام (TAC) می باشند. این آنتی اکسیدان ها به عنوان جمع کننده های رادیکال های آزاد جهت حفاظت اسپرماتوزوآ در برابر ROS عمل می کنند و از آنجایی که حجم عمده ای از آنتی اکسیدان های سیتوپلاسمی اسپرم طی اسپرماتوزن تخلیه می شود، نسبت به اثرات پاتولوژیک رادیکالهای آزاد فوق العاده حساس می باشند. لذا آنتی اکسیدان های مایع سمینال، جبرانی برای از دست رفتن این آنزیم های سیتوپلاسمی اند، (۹، ۱۵). بنابراین هر عاملی که سبب کاهش سطح آنتی اکسیدان های پلاسما سمینال گردد، منجر به اختلال در تعادل آنتی اکسیدان ها و رادیکال های آزاد شده و بر روی عملکرد اسپرم اثر مخرب اعمال می کند. با این وجود تحت شرایط پاتولوژیکی، تولید بالای ROS ظرفیت آنتی اکسیدان ها را پایمال می کند و باعث افزایش استرس اکسیداتیو می شود، (۱۴، ۱۳). محققان پیشنهاد دادند واریکوسل احتمالاً با سطح بالای ROS در اسپرم و کاهش ظرفیت آنتی اکسیدان های تام پلاسما سمینال در ارتباط است، (۲، ۸). اما اینکه چه

ارتباطی بین واریکوسل و ناباروری وجود دارد به روشنی مشخص نشده است. در مطالعه Hendin و همکاران، سطح ROS و ظرفیت آنتی اکسیدان ها در مردان نابارور دارای واریکوسل اختلاف معنی داری را در مقایسه با مردان بارور واریکوسلی نشان داد. با این وجود، آن ها اختلاف معنی داری را بین مردان دارای واریکوسل جزئی و مردان نابارور واریکوسلی نیافتند، (۱۶). مطالعه Smith و همکاران اختلاف معنی داری را بین سطح ROS در اسپرماتوزوای مردان واریکوسل با پارامترهای اسپرمی نرمال و غیر نرمال مطابق با قانون WHO، نشان داد، (۱۷). با توجه به نتایج ضد و نقیض در مورد ارتباط استرس اکسیداتیو با واریکوسل و ناباروری، در این تحقیق دو بیومارکر مهم در بررسی وضعیت اکسیداتیوی بین دو گروه از مردان نابارور واریکوسلی و مردان سالم بارور مورد مطالعه قرار گرفت. از آنجا که یکی از اثرات بیماری واریکوسل آسیب، فرآیند اسپرماتوزن و طی آن تولید اسپرم های غیرطبیعی می باشد، انتظار می رود که افزایش تعداد اسپرم های غیرطبیعی در سمن مردان واریکوسل با افزایش سطح رادیکال های آزاد سبب تشدید اثرات اکسیداتیوی گردد. به همین منظور در تحقیق کنونی سطح TAC و MDA به عنوان یک ابزار کلینیکی مناسب برای تخمین پراکسیداسیون لیپید غشای اسپرم، جهت تعیین شدت اکسیداتیوی مایع سمینال مردان واریکوسل مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها: مطالعه حاضر از نوع مورد-شاهدی با روش نمونه گیری تصادفی، شامل ۲۹ نمونه سمن (semen) از مردان بارور نرمواسپرمیک ($n=15$) به عنوان گروه شاهد و مردان واریکوسل ($n=14$) به عنوان گروه مورد در مراکز IVF شهرستان بابل می باشد. مراجعه کنندگان متعلق به استان مازندران و استان های هم جوار آن بودند. نمونه ها بعد از ۲ تا ۳ روز دوری از آمیزش در همان مراکز IVF در ظرف های پلاستیکی استریل جمع آوری شدند.

مطالعه پارامترهای اسپرم: نمونه های سمن تهیه شده، حدود نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه اینکوبه شدند تا از فرم توده ای به فرم مایع روان تبدیل گردند. حدود

۱۰۰ میکرولیتر از نمونه مایع روان برای بررسی پارامترهای اسپرمی (نظیر غلظت سمن، حرکت، تعداد و مورفولوژی اسپرم) بر اساس استانداردهای سازمان بهداشت جهانی (WHO, 1998) برداشته شد، (۱۸). و آنالیز اسپرموگرام با روش های معمول میکروسکوپی انجام شد، (جدول ۱). بقیه نمونه های انزالی سریعاً جهت اندازه گیری TAC و MDA در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد فریز شدند.

اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدان های تام مایع سمینال به روش FRAP: فعالیت آنتی اکسیدان های تام مایع سمینال با اندکی تغییر به روش FRAP (ferric reducing of antioxidants power) اولین بار توسط Benzie در سال ۱۹۹۶ ابداع گردید، اندازه گیری شد، (۱۹). برای این منظور ابتدا نمونه های سمن در ۱۰۰۰۰ g به مدت ۷ دقیقه سانتیفریوژ شدند. محلول رویی از رسوب جدا شد و ۵ بار با آب مقطر رقیق گردید، سپس سریعاً جهت اندازه گیری آنتی اکسیدان ها به کار رفت. برای اندازه گیری TAC، محلول استاندارد سولفات آهن (با غلظت های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار) و محلول FRAP [شامل: 30 mM Sodium acetate buffer pH 3.6، 10 mM TPTZ (2,4,6-tri-pyridyl-s-، 20 mM Ferric chloride و triazine) به ترتیب با نسبت ۱، ۱ و ۱] استفاده شد. بعد از آماده سازی محلول ها، داخل هر لوله آزمایش ۱/۵ میلی لیتر محلول FRAP اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه در حمام آب گرم انکوبه شدند. سپس حدود ۵۰ میکرولیتر از نمونه های رقیق شده سمن، ۵۰ میکرولیتر آب مقطر (به عنوان کنترل) و ۵۰ میکرولیتر از محلول های استاندارد با رقت های تهیه شده، به هر لوله آزمایش مربوطه اضافه گردید و مجدداً در حمام آب گرم به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه حرارت داده شدند و بعد از خارج نمودن لوله ها از حمام آب گرم، جذب نمونه ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه گیری گردید. غلظت نمونه ها به کمک برنامه Excel بر اساس نمودار استاندارد، محاسبه شد.

اندازه گیری غلظت مالون دی آلدئید با روش TBA: غلظت MDA با استفاده از متد تیوباربیتوریک

یافته های پژوهش

نتیجه حاصل از آنالیز کیفیت پارامترهای اسپرمی در بین مردان بارور و واریکوسل در جدول ۱ نشان داده شده است. هیچ تفاوت معنی داری بین سن و حجم سمن بین دو گروه مشاهده نشد (به ترتیب، با $p=0/123$ و $p=0/357$) و غلظت اسپرم در مردان بارور به طور معنی داری ($p<0/001$) بیشتر از مردان واریکوسل بود. درصد اسپرم های متحرک و درصد اسپرم هایی با مورفولوژی طبیعی نیز در مردان بارور به طور معنی داری (به ترتیب با $p<0/001$ و $p<0/05$) بیشتر از مردان واریکوسل بود. (جدول ۱)

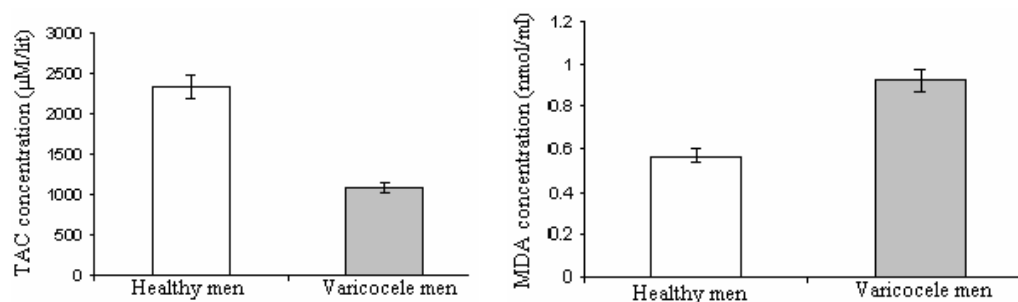
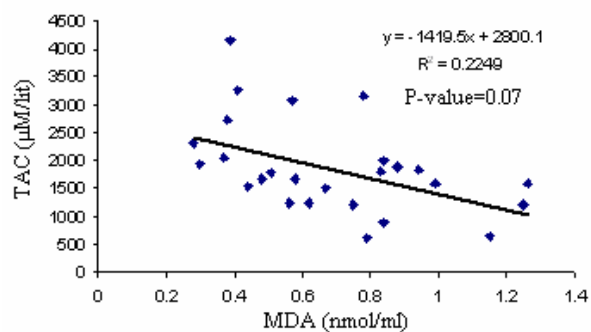
مقایسه سطح TAC و MDA در مایع سمینال مردان بارور نرمواسپرمیک و واریکوسل در جدول ۱ نشان داده شده است. نتیجه حاصل از تحقیق ما نشان داد که سطح TAC در مایع سمینال مردان بارور سالم به طور معنی داری بیشتر از مردان واریکوسلی است ($p<0/001$)، از طرفی غلظت MDA در مایع سمینال مردان واریکوسل به طور چشمگیری ($p<0/001$) بیشتر از مردان بارور بود، (نمودار ۱). از طرفی سطح TAC پلاسما سمینال دارای همبستگی معکوسی با غلظت MDA بود اما این همبستگی از نظر آماری معنی دار نبود ($p=0/07$) $r=-0/47$ ؛ (نمودار ۲).

اسید شرح داده شده توسط رائو و همکاران اندازه گیری گردید، (۲۰). بر اساس این روش ابتدا نمونه های سمن در g ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی (پلاسما سمینال) به همراه ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر در لوله آزمایشگاه ریخته شد و به هر لوله ۵۰۰ میکرولیتر معرف TBA ($0/67$ گرم 2-thiobarbituric acid در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و سپس به ترتیب ۰/۵ گرم NaOH و ۱۰۰ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال به آرامی بدان افزوده شد) اضافه گردید و سر لوله ها توسط ورقه های آلومینیومی کاملاً پوشانده شدند و به مدت یک ساعت در حمام آب جوش قرار گرفتند و پس از خنک شدن در دمای اتاق، لوله ها مجدداً در g ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. در نهایت جذب محلول رویی در طول موج ۵۳۴ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (UV1600) خوانده شد. غلظت MDA با استفاده از ضریب خاموشی $1.0 \times 10^5 \times 0/56$ (بر اساس قانون بیرلامبرت: $A=\epsilon dc$) محاسبه و به صورت nmol/ml گزارش گردید.

آنالیز آماری: کلیه آزمون های آماری با برنامه independent t-test و نرم افزار SPSS 16 انجام شد. میانگین سطح MDA و TAC در دو گروه مورد مطالعه به صورت $\text{mean} \pm \text{S.D}$ با سطوح اطمینان (CI) ۹۵ درصد بیان شد و در تمام موارد $p<0/05$ از لحاظ آماری معنی دار بود. بررسی همبستگی بین سطح TAC و MDA با استفاده از آنالیز Spearman correlation انجام شد.

جدول ۱. مقایسه کیفیت پارامترهای اسپرمی بین مردان بارور و واریکوسل

p- value	مردان واریکوسل	مردان سالم	پارامترهای اسپرم
	۱۴	۱۵	تعداد نمونه
۰/۱۲۳	۲۸/۹۲ ± ۴/۳۴	۳۱/۶ ± ۴/۶۷	سن افراد (سال)
۰/۳۵۷	۳/۷۳ ± ۱/۸۳	۴/۲۶ ± ۱/۱۶	حجم سمن (میلی لیتر)
<۰/۰۰۱	۵۰/۱۴ ± ۲۴/۸۵	۹۱/۳۳ ± ۱۱/۲۵	غلظت اسپرم (۱ × ۱۰ ^۶ /ml)
<۰/۰۰۱	۱۸۷/۰۲ ± ۴۵/۴۷	۳۸۹/۰۶ ± ۱۳۰/۵۱	تعداد کل اسپرم (×۱۰ ^۶)
<۰/۰۵	۴۷/۱۴ ± ۱۷/۶۱	۶۱/۳۳ ± ۸/۷۵	درصد اسپرم های متحرک
<۰/۰۰۱	۴/۴۲ ± ۳/۲	۱۵/۶ ± ۴/۴۲	درصد مورفولوژی طبیعی اسپرم (بر اساس قانون کروگر)
<۰/۰۰۱	۱۰۸۱/۳۵ ± ۳۵۳/۷	۲۳۳/۴۹ ± ۷۶۴/۷۸	غلظت TAC (میکرومول بر لیتر)
<۰/۰۱	۰/۹۲ ± ۰/۲۷	۰/۵۷ ± ۰/۲۲	غلظت MDA (نانومول بر میلی لیتر)

نمودار ۱. مقایسه سطح MDA (چپ) و TAC (راست) بین مردان سالم نرمواسپرمیک و واریکوسل (به ترتیب $p < ۰/۰۰۱$ و $p < ۰/۰۱$).نمودار ۲. ارتباط بین سطح TAC و MDA: همبستگی در $p = ۰/۰۱$ معنی دار است.

بحث و نتیجه گیری

علی رغم مطالعات فراوان در زمینه نقش واریکوسل و ناباروری مردان، اثرات منفی آن بر ناباروری تاکنون به روشنی مشخص نشده و مکانیسم دقیق اثر آن بر عملکرد اسپرم همچنان بحث برانگیز و نگران کننده است. مطالعات بسیاری نشان داد که افزایش سطح اکسیداتیوی مایع سمینال از طریق مکانیسم های مختلف از جمله پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم، آسیب در متابولیسم اسپرم و توانایی بارورسازی آن، سهم عمده ای در نقص عملکرد اسپرم دارد (۲۱). لذا آنتی اکسیدان های پلاسما سمینال به عنوان مهمترین سد دفاعی اسپرم ها محسوب می شوند که با به دام انداختن رادیکال های آزاد، از اثرات پاتولوژیکی و آسیب های بعدی اسپرم جلوگیری می کنند (۲۳-۲۲). تاکنون محققان بسیاری پیشنهاد دادند استرس اکسیداتیو می تواند نقش مهمی را در نقص عملکرد اسپرم در میان بیمارانی که از واریکوسل رنج می برند بازی کند (۲، ۱۶، ۲۴-۲۸).

در این مطالعه فعالیت آنتی اکسیدان های تام و همچنین سطح مالون دی آلدئید به عنوان یک نشانگر مناسب جهت تخمین شدت اکسیداتیو در مایع سمینال مردان بارور سالم و بیماران واریکوسل اندازه گیری گردید (جدول ۱). بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق میانگین سطح پلاسما سمینال آنتی اکسیدان های تام در مردان سالم تا حدود قابل ملاحظه ای بیشتر از مردان واریکوسل بود ($p < 0.001$). از طرفی اندازه گیری سطح MDA حاکی از آن بود که شدت اکسیداسیون در مردان واریکوسل به طور معنی داری بیشتر از مردان بارور است ($p < 0.01$). نتایج ما همچنین یک رابطه معکوس را بین ظرفیت آنتی اکسیدان های تام و شدت اکسیداسیون لیپید نشان داد (نمودار ۲). مطالعات دیگری نیز ثابت کردند که بیماران واریکوسل به طور معنی داری غلظت مالون دی آلدئید بیشتری را نسبت به مردان نابارور بدون واریکوسل دارند (۲۹-۳۰). در یک تحقیق سطح بالای ROS و کاهش ظرفیت آنتی اکسیدان ها در ۲۱ بیمار نابارور دارای واریکوسل در مقایسه با ۱۷ بیمار بارور به عنوان کنترل مشاهده شد، با این وجود یک گروه ۱۵ نفره

دارای واریکوسل جزئی، سطح یکسانی از ROS را نسبت به مردان نابارور واریکوسلی داشتند و مقدار آنتی اکسیدان تام در مقایسه با افراد بارور بدون واریکوسل به طور معنی داری پایین تر بود (۱۶). همچنین Smith و همکاران با مقایسه ۵۵ بیمار دارای واریکوسل که به دو گروه نرمال و غیر نرمال مطابق با قانون WHO دسته بندی شده بودند و ۲۵ مرد نرمواسپرمیک ثابت کردند که اسپرماتوزوای بیماران دارای واریکوسل به طور معنی داری میزان ROS بالاتری را حتی در گروه بیماران دارای پارامترهای استاندارد دارند (۱۷). که قابل مقایسه با نتایج تحقیقات قبلی بود (۲۴، ۳۱). این که چه مکانیسم یا مکانیسم هایی در ارتباط با واریکوسل و ناباروری وجود دارد همچنان به صورت معمایی باقی مانده است. مطالعات متعددی رابطه معنی داری بین واریکوسل و کیفیت پایین پارامترهای اسپرم نشان دادند. محققین بسیاری بهبود تمام پارامترهای اسپرمی را بعد از جراحی واریکوسل مشاهده کردند (۳۲-۳۴). در کنار این تحقیقات، مطالعات دیگری نیز وجود دارند که هیچ ارتباط معنی داری را بین پارامترهای اسپرمی و بیماری واریکوسل نیافتند (۳۵). نتایج تحقیقات صالح و همکاران به یک کاهش معنی دار در غلظت و شکل نرمال اسپرم بین مردان نابارور دارای واریکوسل در مقایسه با مردان بارور و نابارور اشاره می کند. مطالعات آن ها همچنین نشان داد درصد تحرکت اسپرم در بیماران واریکوسلی به طور معنی داری پایین تر از مردان بارور است (۳۱). بر اساس آنالیز پارامترهای اسپرمی حاصل از نتایج ما درصد اسپرم های متحرک در مردان واریکوسل به طور چشمگیری کمتر از مردان بارور بود ($p < 0.05$). همچنین غلظت اسپرم و درصد اسپرم هایی با مورفولوژی طبیعی در مردان واریکوسل به طور معنی داری کمتر از مردان بارور بود ($p < 0.001$). (جدول ۱). مقایسه نتایج این تحقیق با نتایج دیگر تحقیقات نشان می دهد که واریکوسل می تواند به نحوی با کاهش کیفیت اسپرم در ارتباط باشد. به علاوه، شاید یکی از فاکتور های موثر در عارضه واریکوسل و کیفیت پایین پارامترهای اسپرمی پراکسیداسیون لیپیدی غشای اسپرم یا تولید محصولات آلدئیدی سیتوتوکسیک

گردید، برای دستیابی به نتایج دقیق تر روش هایی نظیر HPLC توصیه می شود. از دیگر محدودیت های مطالعه ما تعداد کم نمونه های واریکوسل بود به طوری که بررسی پارامتر های مختلف استرس اکسیداتیو در چهار گروه از بیماران واریکوسل بارور- نابارور و مردان بارور- نابارور بدون عارضه واریکوسل پیشنهاد می گردد. به طور خلاصه، طبق تحقیقات صورت گرفته و تحقیق حاضر، این احتمال وجود دارد که یکی از مکانیسم های احتمالی اثر واریکوسل بر روی عملکرد اسپرم، از طریق کاهش سطح آنتی اکسیدان های مایع سمینال و افزایش محصولات آلدئیدی پایدار پراکسیداسیون لیپید از قبیل مالون دی آلدئید واسطه گردد که این نتایج نیازمند تحقیقات بیشتر و گسترده تر است.

ناشی از آن از جمله مالون دی آلدئید باشد. در تحقیق کنونی فعالیت آنتی اکسیدان های تام مایع سمینال به روش FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) اندازه گیری شد. روش FRAP توانایی آنتی اکسیدان های مایع سمینال در احیاء یون فریک به یون فرو است، (۱۹). اما این روش تنها برای اندازه گیری آنتی اکسیدان هایی با وزن مولکولی پایین مناسب است و برای اندازه گیری آنتی اکسیدان های آنزیمی و پروتئین های متصل به آنزیم چندان مناسب نیست. روش Enhanced chemiluminescence و کالریمتریک روش های دقیق تر و با ارزش تری برای اندازه گیری آنتی اکسیدان های تام می باشد، (۳۶). با توجه به اینکه در مطالعه حاضر میزان MDA پلاسمای سمینال با روش اسپکتروفتومتری بررسی

References

- 1-Enciso M, Muriel L, Fernandez JL, Goyanes V, Segrelles E, Marcos M et al. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the Sperm Chromatin Dispersion Test. J. Androl 2006; 27: 106-11.
- 2-Chen SS, Chang LS, Chen HW, Wei YH. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and male infertility in Taiwanese patients with varicocele. Hum. Reprod 2002; 17: 718-25.
- 3-Nagler HM, Luntz RK, Martinis FG. Varicocele In: infertility in the male. Lipshultz LI and Howards SS, St. Louis (editors): Mosby Year Book; 1997.p.336-59.
- 4-Rajeev K, Rupin S. Varicocele and male infertility: Current status. J Obstet Gynecol India 2005; 55: 505-16.
- 5-Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Varicocele and male infertility: Part II. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. Hum. Reprod 2001; 17: 473-81.
- 6-Greenberg SH. Varicocele and male infertility. Fertile Steril 1977; 28: 699-706.
- 7-Marmar JL. The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. Hum. Reprod 2001; 7:461-72.
- 8-Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. Int, J Androl 1993; 16: 183-8.
- 9-Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. Experimental Biology 2005;43: 963-74.
- 10-Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. Urology 1996; 48: 835-50.
- 11-Schlesinger MH, Wilets IF, Naglar HM. Treatment outcome after varicocelectomy; a critical analysis. Urol Clin North AM 1994; 21: 517-29.
- 12-Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S, Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. Biol. Reprod 1989; 40: 183- 97.
- 13-Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. The Walpole Lecture J. Reprod. Fertil 1987; 83: 459-69.
- 14-Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ. Malondialdehyde, a product of lipid

- peroxidation, is mutagenic in Human cells. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc 2003; 1-41.
- 15-Elsayed NM, Bendich A. Dietary antioxidants: potential effects on oxidative products in cigarette smoke. Elsevier Science Inc 2001; 21: 551-67.
- 16-Hendin B, Kolettis P, Sharma RK, Thomas AJ, Agarwal A. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. J Urol 1999; 161: 1831-4.
- 17-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. J. Hum. Reprod 2006; 21: 986-93.
- 18-World Health Organization (WHO). Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, 4th ed. Cambridge, UK7C Ambridge University Press; 1999.p. 4-23.
- 19-Benzie IFF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. Int. J Food Sc. Nutr 1996; 47: 233-262.
- 20-Rao B, Souflir JC, Martin M, David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. Gamete Res 1989; 24: 127-34.
- 21-Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. Free. Rad. Biol. Med 1999; 26: 869-80.
- 22-Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. Hum. Reprod 1999; 14: 2801-7.
- 23-Smith R, Vantman D, Ponce J, Escobar J, Lissi E. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. Hum. Reprod 1996; 11: 1655-60.
- 24-Barbieri ER, Hidalgo ME, Venegas A, Smith R, Lissi EA. Varicocele associated decrease in antioxidant defenses. J Androl 1999; 20: 713-17.
- 25-Chen SS, Chang LS, Wei YH. Oxidative damage proteins and decrease of antioxidant capacity in patients with varicocele. Free Rad Biol Med 2001; 30: 1328 -34.
- 26-Romeo C, Ientile R, Impellizzeri P, Turiaco N, Teletta M, Antonuccio P et al. Preliminary report on nitric oxide-mediated oxidative damage in adolescent varicocele. Hum Reprod 2003; 18: 26-29.
- 27-Mehraban D, Ansari M, Keyhan H, Gilani MS, Naderi G, Esfehiani F. Comparison of nitric oxide concentration in seminal fluid between infertile patients with and without varicocele and normal fertile men. Urol 2005; 106-10.(persian)
- 28-Agarwal A. Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility. Reproductive BioMedicine Online 2006; 12: 630-3.
- 29-Mostafa T, Anis TH, EL-Nashar A, Imam H, Othman IA. Varicolectomy reduces reactive oxygen species levels and increases antioxidant activity of seminal plasma from infertile men with varicocele. Int. J Androl 2001; 24: 261-5.
- 30-Koksal IT, Tefekli A, Usta M, Erol H, Abbasoglu S, Kadioglu A. The role of reactive oxygen species in testicular dysfunction associated with varicocele. Brit. J Urol 2000; 86: 549-52.
- 31-Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ Jr. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. Fertil Steril 2003; 80: 1431-6.
- 32-Schlesinger MH, Wilets IF, Nagler HM. Treatment outcome after varicolectomy: a critical analysis. Urol Clin North Am 1994; 21: 517-29.
- 33-Kim ED, Leibman BB, Grinblat DM, Lipshultz LI. Varicocele repair improves semen parameters in azoospermic men with spermatogenic failure. J Urol 1999; 162: 737-40.
- 34-Parikh FR, Kamat SA, Kodwaney GG, Balaiah D. Computer- assisted semen analysis parameters in men with varicocele: is surgery helpful? Fertil Steril 1996; 66: 440-5.
- 35-Nieschlag E, Hertle L, Fishedick A, Abshagen K, Behre HM. Update on treatment of varicocele: counselling as effective as occlusion of the vena spermatica. Hum. Reprod 1998; 13: 2147-50.
- 36-Said TM, Kattal N, Sharma R, Sikka SC, Thomas AJ, Mascha E et al. Enhanced

Chemiluminescence assay vs colorimetric assay for measurement of the total

antioxidant capacity of human seminal plasma. J Androl 2003;24: 676-80.



Total Antioxidant Capacity and Malondialdehyde Levels in Seminal Plasma Among The Varicocele-Suffering Men

Hosseinzadeh Colagar A¹*, Bidmeshkipour A², Gholinezhad Chari M¹

(Received: 26 Jul, 2008

Accepted: 25 May, 2009)

Abstract

Introduction: Varicocele is the most common cause of male infertility with approximately 19 to 40% prevalence that leads to low sperm production and fertilization through several mechanisms. In this case-control study, seminal total antioxidant capacity (TAC) and malondialdehyde (MDA) were investigated as one of the possible mechanism(s) by which varicocele may affect the sperm parameters quality and male infertility.

Materials & Methods: Semen samples were provided from healthy (normalospermic; n=15) and varicocele-suffering (infertile; n=14) men at babol IVF centers, then analyzed according to WHO (World Health Organization/1998) standards. Seminal TAC and MDA levels in all the specimen were measured by FRAP and TBA methods, respectively.

Findings: Based on the results, mean concentration ($\pm$ S.D) of TAC in the seminal plasma of varicocele-suffering men ($1092.43 \pm 370.56 \mu\text{mol/l}$) was significantly lower ($p < 0.001$) than that of the healthy men ($2335.44 \pm 764.78 \mu\text{mol/l}$). Moreover, MDA levels in seminal plasma of varicocele-suffering cases ($0.92 \pm 0.27 \text{ nmol/ml}$) was significantly ($p = 0.001$) higher than that of the healthy ones ($0.57 \pm 0.22 \text{ nmol/ml}$).

Discussion & Conclusion: It implies that low level of seminal TAC activity and subsequently high oxidative status could be regarded as one of the negative effects of varicocele on sperm quality and the function which initiates further studies.

Key words: Varicocele, Male infertility, Malondialdehyde, Total antioxidant capacity

1. Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Nano&Biotechnology Dept, University of Mazandaran, Mazandaran, Iran

2. Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran

*(corresponding author)