

Effect of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) oral supplementation on changes of semen parameters, oxidative stress, inflammatory biomarkers and reproductive hormones in infertile men

Mahdiani E., MSc¹, Khadem Haghighian H., PhD², Javadi M., PhD³, Karami A.A., MD⁴, Kavianpour M., PhD Student⁵

1. MSc, Department of Nutrition, School of Health, Qazvin University of Medical Science, Qazvin, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Nutrition, School of Health, Qazvin University of Medical Science, Qazvin, Iran (Corresponding Author), Tel: +98-914-8375283, khademnut@yahoo.com

3. Associate Professor, Department of Nutrition, School of Health, Qazvin University of Medical Science, Qazvin, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Urology, Velayat Hospital, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

5. PhD student, Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

ABSTRACT

Background and Aim: Reduction in sperm motility is one of the main causes of male infertility. The aim of this study was to investigate the effect of Carob supplementation on sperm parameters, inflammatory factors, oxidative stress indices and sex hormones in the men with idiopathic infertility.

Materials and Methods: This study was a randomized double-blind controlled clinical trial which included 60 men with asthenospermia. The patients were assigned to intervention and placebo groups (n =30). The intervention group received 1500 mg Carob / day (three 500 mg capsules), and the placebo group received three placebo capsules / day for 12 weeks. The parameters of sperm, total antioxidant capacity, malondialdehyde concentration, inflammatory markers and plasma sex hormones were measured at the beginning and at the end of the study. Statistical analysis was performed by SPSS software and independent sample t-test was used to compare the mean values of changes between the two groups. P-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results: Differences in the changes in number, concentration and the percentage of motile sperms, total antioxidant capacity, concentration of MDA and plasma inflammatory markers were significant after the intervention ($p < 0.05$). Changes in sex hormones were not significant in the two groups ($P > 0.05$).

Conclusion: Increased concentration and motility of the sperm and decreased oxidative stress and inflammatory factors were observed in the intervention group. Use of plants with antioxidant capacity can be one of the ways to cope with oxidative damage to sperm in this group of infertile men.

Keywords: Carob, Asthenozoospermia, Oxidative stress, Inflammatory markers.

Received: Jan 20, 2018 **Accepted:** May 22, 2018

اثرات مکمل خوراکی خرنوب بر تغییرات فراسنج های اسپرم، شاخص استرس اکسیداتیو، فاکتورهای التهابی و هورمونهای جنسی در مردان نابارور

الهام مهدیانی^۱، حسین خادم حقیقیان^۲، مریم جوادی^۳، علی اکبر کرمی^۴، ماریا کاویانپور^۵

۱. کارشناسی ارشد، گروه علوم تغذیه، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

۲. استادیار، گروه علوم تغذیه، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران، تلفن ثابت: Email: khademnut@yahoo.com

۳. دانشیار، گروه علوم تغذیه، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

۴. استادیار، گروه جراحی، بیمارستان ولایت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

۵. دانشجوی دکتر، گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده فن آوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: کاهش تحرک اسپرم از عوامل اصلی ناباروری مردان می باشد. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر مکمل یاری دانه خرنوب بر تغییرات فراسنج های اسپرم، فاکتورهای التهابی، شاخصهای استرس اکسیداتیو و هورمونهای جنسی در مردان نابارور ایدیوپاتیک انجام گرفت.

روش بررسی: این مطالعه یک کارآزمایی بالینی تصادفی دو سوکور بود که ۶۰ مرد مبتلا به استنوسپرمی به یکی از دو گروه مداخله یا گروه دارونما (۳۰ نفر) تقسیم شدند. گروه مداخله به مدت ۱۲ هفته روزانه ۵۰۰ میلی گرم پودر خرنوب (سه کپسول ۵۰۰ میلی گرم) و گروه دارونما روزانه سه کپسول دارونما مصرف کردند. فراسنج های اسپرم، ظرفیت آنتی اکسیدانی تام، غلظت مالون دی آلدئید، فاکتورهای التهابی و هورمون های جنسی پلازما در ابتدای و انتهای مطالعه تعیین شد. تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار SPSS انجام و آزمون Independent sample t test جهت مقایسه میانگین تغییرات بین دو گروه استفاده گردید. در این پژوهش مقدار P-value کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها: پس از انجام مداخله، تغییرات تعداد، غلظت و درصد کل اسپرم های متحرک، ظرفیت آنتی اکسیدانی تام و غلظت مالون دی آلدئید و فاکتورهای التهابی پلازما در گروه مداخله معنی دار بود ($P < 0/05$). تغییرات هورمونهای جنسی در دو گروه معنی دار نبود ($P > 0/05$).

نتیجه گیری: افزایش غلظت و تحرک اسپرم و کاهش استرس اکسیداتیو و عوامل التهابی در گروه دریافت کننده خرنوب مشاهده گردید. دریافت گیاهان با ظرفیت آنتی اکسیدانی می تواند یکی از راه های مقابله با آسیب های اکسیداتیو اسپرم در این گروه از مردان نابارور باشد.

کلید واژه ها: خرنوب، آستنوسپرمی، استرس اکسیداتیو، فاکتورهای التهابی

وصول مقاله: ۱۳۹۶/۱۰/۳۰ اصلاحیه نهایی: ۹۷/۱/۶ پذیرش: ۹۷/۳/۱

مقدمه

تولید مثل، که از اولویت‌های اصلی سازمان بهداشت جهانی است، اساس بقای انسان است. عوامل زیادی وجود دارند که می‌توانند پتانسیل تولید مثلی را کاهش و یا کاملاً از میان ببرند و سبب ناباروری شوند. ناباروری به عدم رخداد بارداری در یک زوج، پس از یک سال نزدیکی بدون استفاده از روشهای پیشگیری از بارداری اطلاق میشود (۱). حدود ۱۵-۱۰ درصد زوجها به این مشکلات مبتلا هستند که در ۴۰ درصد موارد، ناباروری مردان، علت اصلی و در ۲۰ درصد موارد هر دو عامل زنانه و مردانه مطرح است (۲). حدود یک چهارم زوجهای ایرانی، ناباروری اولیه را در طول زندگی مشترکشان تجربه می‌کنند (۳). یکی از دلایل ناباروری در مردان آستروزواسپرمی با منشا نامشخص است. این وضعیت با کاهش حرکت اسپرم یا نبود حرکت اسپرم در مایع منی مشخص میشود (۴).

در سالهای اخیر تولید بیش از حد گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن^۱ (ROS) به وسیله لوکوسیت‌ها و نیز اسپرم‌های غیرطبیعی در مایع منی و به دنبال آن ایجاد استرس اکسیداتیو یکی از دلایل ناباروری در مردان مطرح گردیده است (۵). رادیکال‌های آزاد از مسیرهای مختلف متابولیکی در هر سلول هوازی ساخته می‌شوند اما منشا اصلی آنها در مایع سمینال مردان سلول‌های سفید و اسپرم‌های غیرطبیعی و نابالغ می‌باشند (۶). از آنجایی که آنتی‌اکسیدان‌ها نقش محوری در دفاع سلولها علیه رادیکالهای آزاد دارند، بنابراین احتمال می‌رود که کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های سیستم فیزیولوژیکی بدن با کاهش کیفیت سلولهای اسپرم مرتبط باشد (۷). یافته‌های متعددی نشان می‌دهد که گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند پارامترهای متعدد اسپرم از جمله مرفولوژی و حرکت اسپرم‌ها را به شدت تحت تاثیر قرار دهند (۸ و ۹).

امروزه با توجه به اثرات جانبی داروهای شیمیایی، مطالعه بر روی گیاهان با هدف رسیدن به ساختارهای جدید در اولویت قرار گرفته است. یکی از گیاهانی که حاوی آنتی‌اکسیدان می‌باشد، دانه خرنوب (*Ceratonia siliqua* L.) است (۱۰).

خرنوب دارای سطوح بالایی از کربوهیدرات (۷۵/۹۲٪)، پروتئین (۶/۳۴٪) و سطح پایینی از چربی (۱/۹۹٪) و شامل ۷/۳۰٪ فیبر خام می‌باشد. همچنین منبع غنی از آهن، کلسیم، سدیم، پتاسیم، فسفر و گوگرد و نیز ویتامینهای E، D، C، نیاسین، اسید فولیک و پیریدوکسین است. پودر خرنوب شامل ۱۱ ترکیب فنولی است، که پیروکالول، کاتکول و اسید کلروژنیک را به مقدر زیاد و مقادیر کمی از سایر ترکیبات فنولی مثل کومارین، سینامیک، فرولیک و اسید گالیک را دارد. همچنین دارای ۱۷ اسیدهای چرب می‌باشد، عمدتاً از چهار اسیدچرب شامل: اولئیک، لینولئیک، پالمیتیک و اسید استئاریک است (۱۱).

در مطالعه مختاری و همکاران در سال ۲۰۱۲، اثرات احتمالی دانه خرنوب بر سطوح LH^۲، FSH^۳، تستوسترون و هورمون دی‌هیدروتستوسترون، بافت بیضه و همچنین بهبود باروری در موشهای صحرایی نر بررسی گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف عصاره دانه خرنوب باعث افزایش قابل توجهی در غلظت تستوسترون و هورمون دی‌هیدروتستوسترون شده و سطح LH در گروه‌های تجربی کاهش یافته و غلظت FSH تغییرات قابل توجهی نشان نداد (۱۲). با توجه به عدم مطالعه انسانی در این زمینه، هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیر مکمل دانه خرنوب بر تغییرات فراسنج‌های اسپرم، فاکتورهای التهابی، شاخصهای استرس اکسیداتیو و میزان هورمونهای جنسی در مردان نابارور ایدیوپاتیک بود.

^۲ - Luteinizing hormone^۳ - Follicle-stimulating hormone^۱ - Reactive Oxygen Species

روش بررسی

این تحقیق به صورت کارآزمایی بالینی تصادفی، دوسوکور، کنترل با دارونما طراحی شده بود که بر روی مردان نابارور با علت ناشناخته انجام گردید. مردان آستنواسپرمی که برای درمان ناباروری به کلینیک فوق تخصصی بیمارستان ولایت شهر قزوین در سال ۱۳۹۵ مراجعه کننده به عنوان جامعه پژوهشی در نظر گرفته شد. تمایل به همکاری، گذشتن حداقل یک سال از زمان تصمیم برای فرزنددار شدن و عدم استفاده از وسایل پیشگیری کننده از بارداری، مردان ۲۰-۴۵ ساله و ابتلا به آستنواسپرمی با منشأ نامشخص (ایدیوپاتیک) بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی (۱۳)، معیارهای ورود به مطالعه بودند. مردان نابارور با علت مشخص (مثل اختلالات هورمونی)، نابارور بودن زوجه، در صورت مصرف مواد مخدر و الکل، داشتن بیماری زمینه ای مثل دیابت، بیماری کلیوی (کراتینین بیش از دو برابر)، بیماری کبدی مزمن و مصرف مکمل های آنتی اکسیدانی در سه ماه گذشته وارد مطالعه نشدند. دو نمونه منی به فاصله یک ماه از مردان مراجعه کننده برای درمان ناباروری، گرفته شد. نمونه ها در حالت اجتناب سه روزه از آمیزش جنسی جمع آوری شد. برای تبدیل نمونه ها از شکل توده ای به حالت روان، سی دقیقه تا ۶۰ دقیقه اینکوبه صورت گرفت. برای ارزیابی پارامترهای اسپرم بر اساس استانداردهای سازمان بهداشت جهانی (۱۳)، ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه مایع روان بررسی شد (۱۴). از آنالیز کامپیوتری مایع منی برای ارزیابی میزان تحرک اسپرم استفاده شد. همچنین آزمایش های میکروسکوپی جهت ارزیابی و تعیین فراسنج هایی چون غلظت اسپرم در هر میلی لیتر مایع منی، زنده بودن و بررسی مورفولوژی اسپرم ها انجام گردید. در صورتی که افراد دارای معیارهای ورود به مطالعه بودند، اهداف و روش انجام پژوهش برای آنها توضیح داده شد و سپس از کلیه افراد داوطلب برای انجام پژوهش، رضایت نامه کتبی گرفته شد. فرم جمع آوری اطلاعات در مورد ویژگی های عمومی بیماران تکمیل گردید. اندازه گیری وزن و نمایه توده بدنی

برای بیماران انجام گرفت. همچنین در ابتدای مطالعه، ۱۰ سی سی خون به منظور اندازه گیری ظرفیت تام آنتی اکسیدانی، مالون دی آلدئید (^۱MDA)، پروتئین واکنش گر C (^۲CRP)، فاکتور نکروز کننده تومور (^۳TNFα) و هورمونهای جنسی از بیماران گرفته شد.

خرنوب تهیه شده پس از تایید توسط کارشناس گیاه پزشکی دانشگاه تبریز، در دانشکده داروسازی تبریز، به حالت پودر درآمده و داخل کپسول ریخته شد. کدگذاری بسته های حاوی کپسول ها، توسط فردی غیر از پژوهشگران به صورت الف و ب انجام گرفت و افراد داوطلب به صورت تصادفی در گروه مداخله و دارونما قرار گرفتند. بیماران به این صورت که به تعداد افراد شرکت کننده کارت هایی با برچسب الف و ب (به صورت مخلوط) وجود داشت، با بیرون آوردن کارت ها بیماران به دو گروه خرنوب و دارونما تقسیم شدند. در این مطالعه پژوهشگر و بیمار نسبت به گروه های مطالعه کور بودند.

گروه مداخله، روزانه ۱/۵ گرم پودر دانه خرنوب (به صورت سه کپسول ۵۰۰ میلی گرمی) و گروه دارونما کپسول پلاسبو که از لحاظ ظاهری، مشابه کپسول خرنوب بوده و حاوی لاکتوز بود، دریافت کردند. طول مدت این مطالعه ۱۲ هفته بود. انتخاب دوز تجویزی در مطالعه حاضر نیز بر اساس مطالعه پایلوتی بود که توسط محققان طرح صورت گرفته بود. این مطالعه پایلوت بر روی ده مرد نابارور آیدیوپاتیک به صورت بررسی مکمل یاری خرنوب بر روی فراسنج های اسپرم انجام شده بود. در انتهای مطالعه مجدداً وزن بیماران اندازه گیری و نمایه توده بدنی آن ها محاسبه شد و همچنین از بیماران نمونه ی منی و سرم، گرفته شد. این پژوهش، در مرکز ثبت کارآزمایی های بالینی ایران با شماره IRCT2016072519669N2 ثبت شد.

^۱ - Malondialdehyde

^۲ - C-reactive protein

^۳ - Tumor necrosis factor alpha

(Colorimetric Assay) با استفاده از کیت شرکت

یافته ها

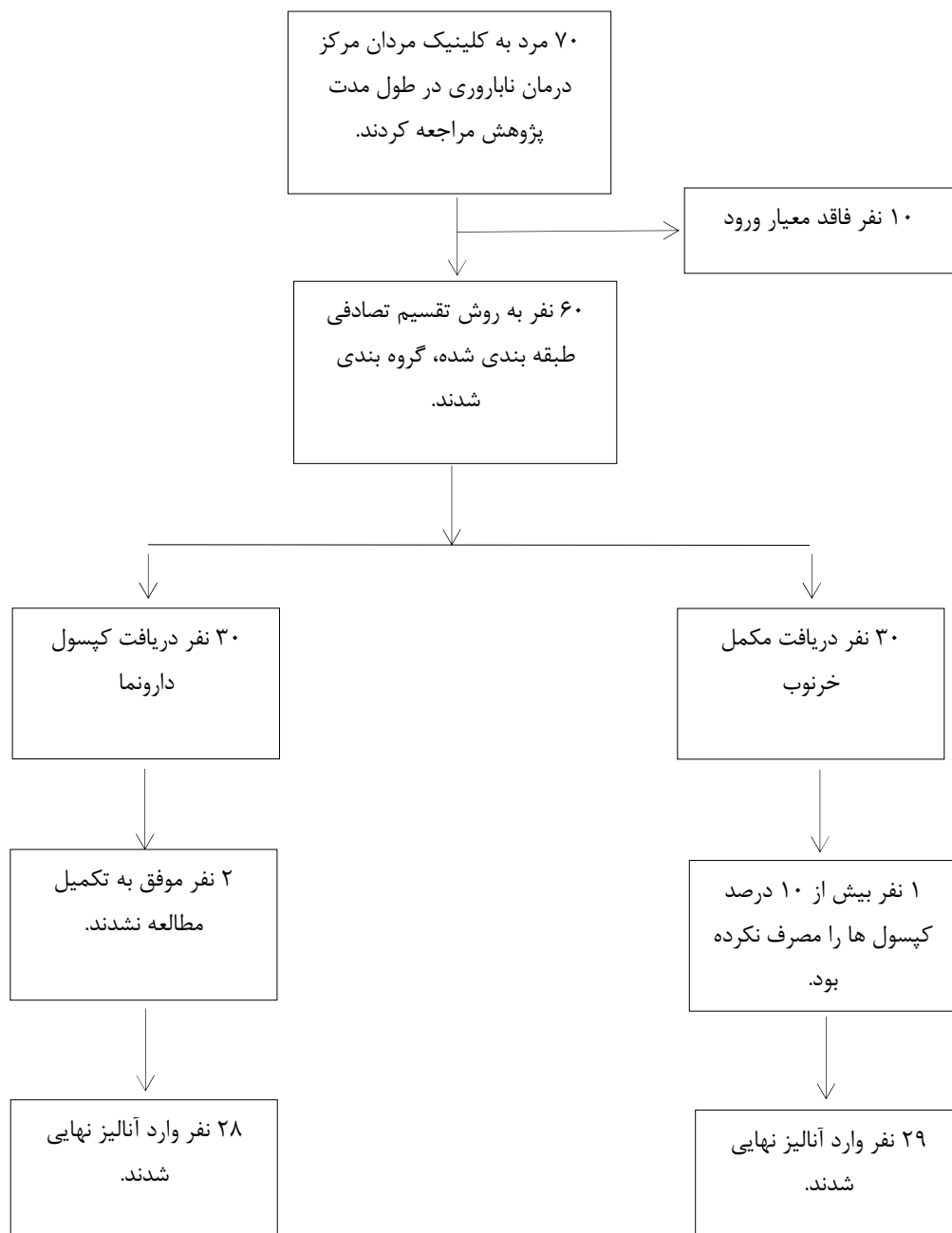
از بین ۷۰ مرد مراجعه کننده به کلینیک فوق تخصصی، در مجموع ۶۰ مرد آستنواسپریم وارد پژوهش شده و به دو گروه مکمل و دارونما ($n=30$) تقسیم شدند. از این تعداد ۵۷ نفر که شامل ۲۹ نفر در گروه مکمل و ۲۸ نفر در گروه دارونما بودند، دوره مطالعه را تکمیل کردند و ۳ نفر از مطالعه خارج شدند (شکل ۱). ویژگی های عمومی افراد شرکت کننده در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. از نظر توزیع سن، میزان تحصیلات، کشیدن سیگار و مدت زمان ابتلا به ناباروری بین گروه مداخله و گروه پلاسبو در ابتدای پژوهش تفاوت معنی داری وجود نداشت ($P>0.05$). همچنین در ابتدا و انتهای مطالعه، اختلاف آماری معنی داری در هیچ یک از خصوصیات تن سنجی بیماران، بین دو گروه مشاهده نشد. (جدول ۲) ($P>0.05$).

با توجه به نتایج مطالعه، پس از انجام مداخله، تغییرات در تعداد اسپرم ها، غلظت اسپرم ها، درصد کل اسپرم های متحرک شامل حرکت پیشروندهی اسپرم (اسپرم های متحرک درجهی $a+b$)، درصد اسپرم های متحرک با درجهی a و درصد اسپرم های متحرک با درجهی b در گروه دریافت کنندهی خرنوب در مقایسه با گروه دارونما، معنی دار بود (جدول ۳) ($P<0.05$). تغییرات در گروه دریافت کنندهی خرنوب، پس از انجام مداخله به صورت افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی تام پلاسما و کاهش در غلظت مالون دی آلدئید و فاکتورهای التهابی CRP و TNF آلفا معنی دار بود (جدول ۴) ($P<0.05$). همچنین نتایج مطالعه نشان داد که تغییرات در هورمونهای جنسی در انتهای مطالعه معنی دار نبود. (جدول ۵) ($P>0.05$).

ظرفیت تام آنتی اکسیدانی، با روش رنگ سنجی (Cayman, Catalog No: 709001) و غلظت مالون

دی آلدئید با استفاده از روش رنگ سنجی اسید تیوباربیتوریک (TBA: Thiobarbituric Acid) اندازه گیری شد. ابزار کار در این بررسی کیت ELISA تومور نکروزیس فاکتور آلفای انسانی، تولید شرکت Biosource آمریکا می باشد. در این مطالعه، به منظور اندازه گیری سطح سرمی CRP از روش ایمونوتوریدیمتریک و کیت تشخیص کمی CRP (شرکت پارس آزمون، کرج، ایران) استفاده گردید. هورمون LH و FSH به روش الیزا و با کیت-E12654r CSB ساخت شرکت CUSABIO ژاپن اندازه گیری شد. سطوح تستوسترون و پرولاکتین سرم به ترتیب با استفاده از کیت های اندازه گیری هورمون الایزا (تهیه شده از شرکت DRG Instruments GmbH آلمان با حساسیت سنجش هورمونی 0.083 (نانوگرم در میلی لیتر)) و RIA (رادیوایمونو اسی) (تهیه شده از شرکت Padyab Teb Diagnostic ایران با حساسیت سنجش هورمونی 0.09) اندازه گیری شد.

در این مطالعه، کلیه داده ها به صورت میانگین ($\pm$) انحراف معیار) و فراوانی (درصد) به ترتیب برای متغیرهای کمی و کیفی نشان داده شد. در ابتدا، نرمال بودن توزیع داده ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov ارزیابی شد. جهت مقایسه میانگین تغییرات متغیرهای کمی بین دو گروه از آزمون Independent sample t test استفاده شد. در این پژوهش مقدار P-value کمتر از 0.05 از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار (SPSS: Statistical Package for the Social Sciences) نسخه ۱۶ انجام شد.



شکل ۱- فلوچارت پژوهش و نحوه تخصیص نمونه ها به گروه دریافت کننده ی خرنوب و گروه دریافت کننده ی دارونما

جدول ۱ ویژگی های عمومی مردان آستواسپریم شرکت کننده به تفکیک دو گروه دریافت کنندهی خرنوب و گروه دریافت کنندهی دارونما پیش از

مداخله			
متغیرها	خرنوب (n=29)	دارونما (n=28)	P-value
سن (سال)	31/08 ± 4/11	30 ± 3/96	*.0/497
(میانگین ± انحراف معیار)			
مدت زمان ناباروری (سال)	3/84 ± 1/02	3/71 ± 0/99	*.0/4
(میانگین ± انحراف معیار)			
میزان تحصیلات	11 (37/93)	8 (28/57)	0/731
زیر دیپلم			
[تعداد/ (درصد)]	12 (41/37)	13 (46/42)	**
دیپلم			
دانشگاه	6 (79/31)	7 (25)	
سیگار کشیدن	10 (34/48)	9 (32/14)	**0/9
بله			
[تعداد/ (درصد)]	19 (65/51)	19 (67/85)	
خیر			

*بر اساس آزمون آماری Independent samples t test

**بر اساس آزمون آماری Chi-squared test

جدول ۲ میانگین و انحراف معیار شاخص های تن سنجی در دو گروه دریافت کنندهی خرنوب و گروه دریافت کنندهی دارونما در ابتدا و انتهای

پژوهش و مقایسه بین گروه ها

متغیر	خرنوب (n=29)	دارونما (n=28)	P-value *
(میانگین ± انحراف معیار)	(میانگین ± انحراف معیار)		
ابتدای مطالعه	86/34 ± 9/34	84/86 ± 9/01	0/496
وزن (کیلو گرم)			
انتهای مطالعه	86/74 ± 10/46	85/76 ± 10/09	0/854
ابتدای مطالعه	27/47 ± 2/83	26/52 ± 2/73	0/276
نمایه توده بدنی (کیلو گرم/متر مربع)			
انتهای مطالعه	27/60 ± 3/17	26/65 ± 3/06	0/235

*بر اساس آزمون آماری Independent samples t test

جدول ۳. میانگین و انحراف معیار تغییرات فراسنج های اسپرم در ابتدا و انتهای مطالعه در دو گروه دریافت کنندهی خرنوب و گروه دریافت کنندهی دارونما

متغیر	پس از پژوهش		P-value *
	خرنوب (n=29) (میانگین $\pm$ انحراف معیار)	دارونما (n=28) (میانگین $\pm$ انحراف معیار)	
حجم انزال (mL)	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.021	0.607
تعداد کل اسپرم ($\times 10^6$)	12.51 ± 4.88	0.86 ± 0.42	<0.001
غلظت اسپرم ($\times 10^6/mL$)	3.71 ± 2.09	1.7 ± 0.23	0.01
اسپرم های متحرک با درجه a (%)	3.32 ± 2.38	0.18 ± 0.07	<0.001
اسپرم های متحرک با درجه b (%)	2.23 ± 1.35	0.24 ± 0.09	0.012
اسپرم های متحرک با درجه c (%)	1.03 ± 0.4	0.67 ± 0.14	0.214
اسپرم های متحرک با درجه d (%)	5.43 ± 1.02	0.29 ± 0.26	0.027
اسپرم های متحرک با درجه a+b+c (%)	5.55 ± 1.78	0.94 ± 0.11	0.01
اسپرم های متحرک با درجه a+b+c (%)	5.4 ± 1.02	0.73 ± 0.75	0.019
اسپرم های با مورفولوژی طبیعی (%)	0.19 ± 0.01	0.15 ± 0.05	0.11
اسپرم های زنده (%)	0.12 ± 0.02	0.69 ± 0.06	0.098

* مقایسه میانگین تغییرات فراسنج های اسپرم بین دو گروه دریافت کننده مکمل خرنوب و دارونما (آزمون آماری Independent samples t-test).

جدول ۴ میانگین و انحراف معیار تغییرات متغیرهای استرس اکسیداتیو و فاکتورهای التهابی پلاسما در ابتدا و انتهای مطالعه در دو گروه دریافت کنندهی

متغیر	خرنوب و گروه دریافت کنندهی دارونما پس از پژوهش		P-value *
	خرنوب (n=29) (میانگین $\pm$ انحراف معیار)	دارونما (n=28) (میانگین $\pm$ انحراف معیار)	
ظرفیت آنتی اکسیدانی تام پلاسما (mM)	0.74 ± 0.02	0.01 ± 0.001	0.001
مالون دی آلدیید پلاسما ($\mu\text{mol/L}$)	0.23 ± 0.01	0.03 ± 0.002	0.041
CRP ($\mu\text{mol/L}$)	1.67 ± 0.57	0.1 ± 0.03	0.039
TNF- α ($\mu\text{mol/L}$)	2.37 ± 0.56	0.12 ± 0.13	0.044

*: مقایسه میانگین تغییرات متغیرهای استرس اکسیداتیو و فاکتورهای التهابی پلاسما بین دو گروه دریافت کننده خرنوب و دارونما (آزمون آماری

(Independent samples t-test)

جدول ۵ میانگین و انحراف معیار تغییرات هورمونهای جنسی در ابتدا و انتهای مطالعه در دو گروه دریافت کننده ی خرنوب و گروه دریافت کننده ی دارونما

متغیر	پس از پژوهش	
	خرنوب (n=۲۹)	دارونما (n=۲۸)
	(میانگین ± انحراف معیار)	(میانگین ± انحراف معیار)
تستسترون (نانوگرم بر میلی لیتر)	۲/۰۱ ± ۰/۳۶	۰/۸ ± ۰/۰۱
FSH (نانوگرم بر میلی لیتر)	-۰/۷۵ ± ۰/۳	۰/۰۶ ± ۰/۰۲
LH (نانوگرم بر میلی لیتر)	-۰/۷ ± ۰/۱۴	-۰/۰۲ ± ۰/۰۱
پرولاکتین (نانوگرم بر میلی لیتر)	-۶/۷۳ ± ۰/۱۶	۱/۱۵ ± ۲/۲۴
P-value *		
	۰/۳۱۲	۰/۱۹۲
	۰/۱۱۳	۰/۳۱۲

*مقایسه میانگین تغییرات هورمونهای جنسی در دو گروه دریافت کننده ی خرنوب و دارونما (آزمون آماری Independent samples t-test).

بحث

طبق نتایج مطالعات انجام گرفته، در طول دهه های گذشته کیفیت اسپرم کاهش یافته است (۱۵). ریزمغذی های مختلفی در متابولیسم اسپرم نقش دارند (۱۶ و ۱۷). محتوای بالای اسیدهای چرب غیر اشباع در غشای پلاسمایی اسپرم را دلیل حساس بودن بالای اسپرم نسبت به ROS می دانند (۱۸). اسپرم ها توسط پراکسیداسیون لیپید غیر فعال می شوند که همراه با تغییر در عملکرد غشا، تغییر در متابولیسم و مورفولوژی و تحرک و باروری است. هم اسپرم و هم مایع سمینال حاوی آنتی اکسیدانهایی هستند که قادر به مقابله با اثرات مضر ROS هستند مطالعات نشان داده اند که مردان نابارور به احتمال زیاد نسبت به مردان بارور دارای ظرفیت آنتی اکسیدانی پایین هستند (۱۹).

در مطالعه ما تغییرات میانگین تعداد اسپرم ها، غلظت اسپرم ها، درصد کل اسپرم های متحرک شامل حرکت پیشرونده ی اسپرم (اسپرم های متحرک درجه ی a+b)، درصد اسپرم های متحرک با درجه ی a و درصد اسپرم های متحرک با درجه ی b در گروه دریافت کننده ی خرنوب در مقایسه با گروه دارونما، معنی دار بود، که همسو با مطالعات انجام گرفته توسط Hadwan و همکاران در سال ۲۰۱۴ (۱۹) و Elsheikh MG و همکاران در سال ۲۰۱۵ (۲۰) و

Abad C در سال ۲۰۱۳ (۲۱) بود که نشان داد آنتی

اکسیدان ها باعث بهبود کیفیت اسپرم شده بود. افزایش در قدرت تحرک اسپرم ها در نتیجه مصرف هم زمان ویتامین E و سلنیوم در مردان نابارور در مطالعه دیگری گزارش شده است (۲۲). اما در مطالعه Greco E در سال ۲۰۰۵ درمان با دو آنتی اکسیدان ویتامین C و ویتامین E تفاوت معنی داری در قبل و بعد از درمان دیده نشد، اما اطلاعات این مطالعه نشان میدهد که تجویز آنتی اکسیدان میتواند از آسیبهای وارد بر DNA اسپرم در طی مدت زمان کوتاه موثر باشد (۲۳). در مطالعه Omu A و همکاران در سال ۲۰۰۸ با تجویز هم زمان روی و ویتامین های E و C در مردان استنواسپرماتیک باعث کاهش استرس اکسیداتیو، آپوپتوز اسپرم ها و شاخص قطعه قطعه شدن DNA گردید (۲۴). در مطالعه ما در گروه دریافت کننده ی خرنوب، پس از انجام مداخله تغییرات میانگین ظرفیت آنتی اکسیدانی تام و غلظت مالون دی آلدئید پلاسما در مقایسه با گروه دارونما، معنی دار بود.

محققان درصد برآمدند که با استفاده از آنتی اکسیدانها بتوانند از کاهش تحرک، افزایش مرگ و میر و آسیب DNA توسط شرایط استرس اکسیداتیو در افراد و نابارور جلوگیری کنند. در مطالعه ای که توسط Verma و

همکاران در سال ۱۹۹۹ انجام شد اثر حفاظتی غلظتهای 1 و 2 α mmol/L-توکوفرول بر تحرک، زنده ماندن و میزان پراکسیداسیون لیپیدی در اسپرمهای طبیعی در طول زمان ۰/۵ تا ۶ ساعت بررسی شد. این مطالعه نشان داد که - α توکوفرول به صورت وابسته به دوز و زمان می تواند کاهش تحرک، کاهش بقا و افزایش مالون دی آلدید (محصول نهایی پراکسیداسیون لیپید) را در اسپرمهای طبیعی برطرف کند (۲۵).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مکمل خرنوب باعث کاهش فاکتورهای التهابی CRP و TNF آلفا بعد از دوازده هفته گردید. التهاب باعث کاهش قدرت دفاع آنتی اکسیدانی بدن میگردد (۲۶). در مطالعات مختلف گزارش شده که دریافت آنتی اکسیدان به صورت مکمل باعث کاهش فاکتورهای التهابی میگردد (۲۷-۲۹). مطالعه ای که توسط Block و همکارانش انجام شد، نشان داد که مصرف مکمل ویتامین C سبب باعث کاهش معنی دار سطح CRP می شود (۳۰). در مطالعاتی که روی موش های مبتلا به استرس اکسیداتیو القا شده صورت گرفته، تجویز آنتی اکسیدان ها مثل رزوراترول، ویتامین E، سلنیوم و بتاکاروتن باعث کاهش MDA و $TNF-\alpha$ شده اند (۳۲) و (۳۱). خرنوب به دلیل داشتن پلی فنول ها به عنوان آنتی اکسیدانهای قوی، میتواند به عنوان یک مکمل درمانی محتمل در پیشگیری و درمان التهاب مزمن باشد.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر تغییرات در هورمون تستسترون بعد از مصرف مکمل خرنوب مثبت بود ولی این تغییرات معنی دار نبود. همچن تغییر در سایر هورمونهای جنسی در این مطالعه معنی دار نبود. در تنها مطالعه ای که بر روی موشها انجام شده و به بررسی تاثیر دریافت خرنوب بر هورمونهای جنسی پرداخته اند، مصرف عصاره دانه خرنوب در موشهای نر باعث افزایش قابل توجهی در غلظت تستوسترون، هورمون دی هیدروتستوسترون و کاهش سطح LH شده است (۱۲). به نظر میرسد که افزایش سطوح

تستوسترون توسط خرنوب به علت اثر مستقیم آن بر سلولهای لایدیگ و در بیوستز تستوسترون باشد (۳۳). این اثرات احتمالاً از طریق تحریک سنتز PGE2 انجام میشوند. علاوه بر این، دانه خرنوب حاوی اسیدهای gammalinolenic و آلفا لینولنیک اسید که می تواند به dihomogamma لینولنیک اسید تبدیل و به PGE2 تبدیل گردد (۳۴) که در نهایت باعث افزایش تولید آدنوزین منوفسفات حلقوی (CAMP) و باعث تحریک تولید تستوسترون گردند (۱۲).

نتیجه گیری

افزایش غلظت و تحرک اسپرم و کاهش استرس اکسیداتیو و عوامل التهابی در گروه دریافت کننده خرنوب مشاهده گردید. دریافت گیاهان با ظرفیت آنتی اکسیدانی می تواند یکی از راه های مقابله با آسیب های اکسیداتیو اسپرم در این گروه از مردان نابارور باشد. بدیهی است که برای مشخص کردن ارتباط بالینی داده ها، مطالعات بیشتری با حجم نمونه و طول مدت زمان مکمل یاری بیشتری نیاز است. علاوه بر این، محدودیت های ناشی از کم بودن بودجه، قادر به اندازه گیری رادیکال های آزاد و آنتی اکسیدان های آندوژن شبیه گلوکاتینون و سلنیم در افراد شرکت کننده نبودیم. انجام مطالعه ای با تعداد نمونه های بیشتر و دوزهای متفاوت و تعیین اثربخشی ماکزیمم دوزها پیشنهاد میگردد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته تغذیه مربوط به خانم الهام مهدیانی می باشد که در تاریخ ۹۵/۰۴/۲۱ در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی قزوین با کد IR.QUMS.REC.1395.42 به تصویب رسید. از معاونت محترم تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی قزوین به عنوان حمایت کننده مالی تقدیر و تشکر به عمل می آید.

References

1. Barratt CL, Björndahl L, De Jonge CJ, Lamb DJ, Osorio Martini F, McLachlan R, et al. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance—challenges and future research opportunities. *Hum Reprod Update* 2017; 23: 660-80.
2. Jodar M, Soler-Ventura A, Oliva R. Semen proteomics and male infertility. *J Proteomics* 2017; 162: 125-34.
3. Vahidi S, Ardalan A, Mohammad K. Prevalence of primary infertility in the Islamic Republic of Iran in 2004-2005. *Asia Pac J Public Health* 2009; 21: 287-93.
4. Castillo J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R. Human sperm chromatin epigenetic potential: genomics, proteomics, and male infertility. *Asian J Androl* 2015; 17: 601.
5. Rowe PJ, Comhaire FH. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile male: Cambridge University Press, 2000.
6. Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am* 2002; 29: 817-27.
7. Soleimanzadeh A, Malekifard F, Kabirian A. Protective effects of hydro-alcoholic garlic extract on spermatogenic disorders in streptozotocin-induced diabetic C57BL/6 mice. *SJKU* 2017; 22: 8-17. [In Persian]
8. Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol* 2005; 43: 963.
9. O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic Biol Med* 2006; 41: 528-40.
10. Custodio L, Fernandes E, Escapa A, López-Avilés S, Fajardo A, Aligue R, et al. Antiproliferative and apoptotic activities of extracts from carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Planta Med* 2008; 74: PA48.
11. Youssef MKE, El-Manfaloty MM, Ali HM. Assessment of proximate chemical composition, nutritional status, fatty acid composition and phenolic compounds of carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Food Public Health* 2013; 3: 304-8.
12. Mokhtari M, Sharifi E, Sh A. The effects of hydro alcoholic extract of *Ceratonia siliqua* L. seeds on pituitary--testis hormones and spermatogenesis in rat. *Advances in Environmental Biology* 2012; 2012: 2778-84.
13. Garolla A, Maiorino M, Roverato A, Roveri A, Ursini F, Foresta C. Oral carnitine supplementation increases sperm motility in asthenozoospermic men with normal sperm phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase levels. *Fertil Steril* 2005; 83: 355-61.
14. Künzle R, Mueller MD, Hänggi W, Birkhäuser MH, Drescher H, Bersinger NA. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril* 2003; 79: 287-91.
15. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas Jr AJ, Agarwal A. The reactive oxygen species—total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum Reprod Update* 1999; 14: 2801-7.
16. Dattilo M, Cornet D, Amar E, Cohen M, Menezo Y. The importance of the one carbon cycle nutritional support in human male fertility: a preliminary clinical report. *Reprod Biol Endocrinol* 2014; 12: 71.
17. Haghighian HK, Haidari F, Mohammadi-asl J, Dadfar M. Randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial examining the effects of alpha-lipoic acid supplement on the spermatogram and seminal oxidative stress in infertile men. *Fertil Steril* 2015; 104: 318-24.
18. Mohammadi S, Movahedin M, Mowla SJ. The effects of Selenium on changes in sperm antioxidant capacity in old and adult rats. *SJKU* 2009; 14: 84-91. [In Persian]

19. Als Salman A, Al Mashhedy LA, Hadwan MH. Zinc supplementation attenuates lipid peroxidation and increases antiperoxidant activity in seminal plasma of Iraqi asthenospermic men. *Life Sci J* 2013; 10: 989-97.
20. El Sheikh M, Hosny M, Elshenoufy A, Elghamrawi H, Fayad A, Abdelrahman S. Combination of vitamin E and clomiphene citrate in treating patients with idiopathic oligoasthenozoospermia: A prospective, randomized trial. *Andrology* 2015; 3: 864-7.
21. Abad C, Amengual M, Gosálvez J, Coward K, Hannaoui N, Benet J, et al. Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and subpopulations of sperm with highly degraded DNA. *Andrologia* 2013; 45: 211-6.
22. Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, Ghazzi H, Hammami S, et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch Androl* 2003; 49: 83-94.
23. Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* 2005; 26: 349-53.
24. Omu A, Al-Azemi M, Kehinde E, Anim J, Oriowo M, Mathew T. Indications of the mechanisms involved in improved sperm parameters by zinc therapy. *Med Princ Pract* 2008; 17: 108-16.
25. Verma A, Kanwar K. Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. *Asian J Androl* 1999; 1: 151-4.
26. Jelic S, Padeletti M, Kawut SM, Higgins C, Canfield SM, Onat D, et al. Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Circulation* 2008; 117: 2270-8.
27. Teixeira-Lemos E, Nunes S, Teixeira F, Reis F. Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-inflammatory properties. *Cardiovasc Diabetol* 2011; 10: 1.
28. Sánchez-Moreno C, Dashe JF, Scott T, Thaler D, Folstein MF, Martin A. Decreased levels of plasma vitamin C and increased concentrations of inflammatory and oxidative stress markers after stroke. *Stroke* 2004; 35: 163-8.
29. Alizadeh F, Javadi M, Karami AA, Gholaminejad F, Kavianpour M, Haghighian HK. Curcumin nanomicelle improves semen parameters, oxidative stress, inflammatory biomarkers, and reproductive hormones in infertile men: A randomized clinical trial. *Phytother Res* 2018; 32: 514-21.
30. Block G, Jensen CD, Dalvi TB, Norkus EP, Hudes M, Crawford PB, et al. Vitamin C treatment reduces elevated C-reactive protein. *Free Radic Biol Med* 2009; 46: 70-7.
31. Shargorodsky M, Debby O, Matas Z, Zimlichman R. Effect of long-term treatment with antioxidants (vitamin C, vitamin E, coenzyme Q10 and selenium) on arterial compliance, humoral factors and inflammatory markers in patients with multiple cardiovascular risk factors. *Nutr Metab Insights* 2010; 7: 1.
32. Shishehbor MH, Brennan M-L, Aviles RJ, Fu X, Penn MS, Sprecher DL, et al. Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation* 2003; 108: 426-33.
- Makris DP, Kefalas P. Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Technol Biotechnol* 2004; 42: 105-8.
34. Mobli M, Qaraaty M, Amin G, Haririan I, Hajimahmoodi M, Rahimi R. Scientific evaluation of medicinal plants used for the treatment of abnormal uterine bleeding by Avicenna. *Arch Gynecol Obstet* 2015; 292: 21-35.