دراسة مقارنة لفعالية انزيم الكرياتين كاينيز في السائل المنوي للانسان وعلاقته بالخصوبة

انعام احمد حمزة

قسم علوم الحياة / كلية العلوم

جامعة الموصل

الاستلام **القبول**

2012 / 02 / 07 **2012 / 06 / 06**

Abstract

New approaches need to be pursued towards the assessment of sperm quality using biochemical markers and develop this markers to assess sperm function. The current study included analyzed 52 samples of human's seminal fluid wich classified into three classes: fertile normospermea (control), infertile oligospermea and azospermea. The percentage of dead sperms were obtaind by using eosin die in addition to the use of trypan blue to show the intact acrosome. The results of the study showed that the concentration of sperm in human's seminal fluid samples was ($63x10^6$/ml).The results showed ahigher level of creatine kinase CK activity in human seminal plasma in an infertile oligospermic (113.3±17U/L) and azospermic cases (97.1±11U/L) in comparison to the control normospermic case (48.5±9U/L).

الملخص

تتجه الرؤية الحديثة نحو تقييم نوعية السائل المنوي باستخدام مؤشرات كيموحيوية وتطوير هذه المؤشرات لغرض تقييم وظيفة النطف. تضمنت الدراسة الحالية تحليل 52 عينة من السائل المنوي للانسان و صنفت هذه الى ثلاثة اصناف هي: طبيعية النطف المخصبة، قليلة النطف و عديمة النطف غير المخصبة. تم الكشف عن النسبة المئوية للنطف الميتة باستخدام صبغة الأيوسين فضلا عن صبغة التريبان الزرقاء لبيان سلامة الاكروسوم. بينت الدراسة ان تركيز عينات النطف للسائل المنوي للانسان ($63x10^6$نطفة/مل). اظهرت النتائج وجود مستوى

عالي لفعالية انزيم الكرياتين كاينيز في السائل المنوي للانسان في الحالات قليلة النطف (113.3±17 U/L) وعديمة النطف (97.1 ±11 U/L) غير المخصبين مقارنة بمجموعة السيطرة طبيعية النطف (48.5 ± 9 U/L).

المقدمة

تعرف عدم الخصوبةinfertility primary بانها عدم القدرة على الانجاب بعد زواج مستقر لمدة عام، وتشكل حوالي 15% من الازواج ونصف هذه النسبة تعود الى عدم خصوبة الرجال ولا يوجد سبب واضح لحوالي 15 % من هذه الحالات (1).

اتجهت الدراسات في السنوات الماضية حول القاء الضوء على تقييم الخصوبة عن طريق قياس بعض المؤشرات الكيموحيوية لمواصفات السائل المنوي مما يساعد في تشخيص ضعف وظائف النطف، ومن هذه المؤشرات هي الانزيمات ومنها انزيم الكاينيز CK.كما يحوي البلازما المنوي على خليط من البروتينات وكلايكوبروتين وببتيدات وكلايكوببتيدات وبروستوكلاندين تفرز عن طريق اعضاء خاصة في القناة التناسلية الذكرية (2).

ان انزيم الكرياتين كاينيز (Ec2.7.3.2). انزيم يحفز الفسفرة العكسية للADP الى ATP او تحويل الكرياتين الى كرياتين فوسفيت وهذا التحويل يجهز طاقة انية تتطلبها الخلية، ويعد هذا الانزيم المفتاح الرئيسي لنقل وبناء الطاقة(3) يتواجد هذا الانزيم في مصل الدم وارتفاع قيمته تشير الى عدة حالات مرضية منها اصابات القلب و اورام الرئة المختلفة التي يصاحبها ارتفاع المتناظر الانزيمي لانزيم الكرياتين كاينيز CK_BB واورام البروستات و الخصى و الرحم وهذا قد يشير الى ان انزيم الـ CK في المصل يعد مؤشرا للاورام السرطانية، يتواجد انزيم الكرياتين كاينيز في السايتوبلازم وكذلك في المايتوكوندريا في الانسجة التي تتطلب استهلاك طاقة عالية (4). وقد تتواجد انواع المتناظرات الانزيمية لهذا الانزيم في السايتوبلازم داخل الخلية او تكون مرتبطة باللييفات العضلية (5).

يتألف انزيم الكرياتين كاينيز من وحدتين وكل وحدة ذات وزن جزيئي 40 KDa، وهناك ثلاثة انواع من المتناظرات الانزيمية لهذا الانزيم في خلايا نطف الانسان وهي CK_BB (النوع الدماغي) وهذا مصدره من البروستات والحويصلات المنوية، والنوع الثاني هو CK_MM (النوع العضلي) وكذلك النوع CK_MB ولهذا الانزيم شكل اخر بوزن جزيئي 64 KDa يتواجد في المايتوكوندريا (6). وكما في العضلات فان النطف تحتاج الى طاقة لحركتها وتعتمد بذلك على ATPكمصدر مباشر للطاقة لذا فان انزيم CK يعمل كنظام مولد للطاقة داخل خلايا النطف وهذه الطاقة ضرورية لحركة ونشاط النطف (7) و اظهر انزيم الكرياتين كاينيز في البلازما المنوي فعالية اكبر مما هو عليه في مصل الدم (8). وتشير الدراسة (9) ان وظيفة

وعمل النطف متعلق بمستوى فعالية هذا الانزيم، وان الانزيم ليس هو المسؤول المباشر عن فقدان وظيفة النطف ولكن يعمل كمؤشر كيموحيوي للتمايز الطبيعي للنطف. كما وجد ان هناك علاقة طردية بين محتوى نطف الانسان من انزيم الكرياتين كاينيز وبيروكسدة الدهن (6).

وقد وجد ان هناك تباين في فعالية الانزيم في العينات المختلفة للسائل المنوي للانسان كما تم اثبات ان فعالية الانزيم ونسبة CK_B/CK_M في النطف تعد مؤشرا كيموحيويا لنضج خلايا النطف ومؤشرا جيدا للخصوبة. كما وجد (10) ان هناك علاقة بين الفعالية العالية لانزيم الكرياتين كاينيز والزيادة في الاشكال غير الطبيعية للنطف ككبر حجم الراس وشكله الغير طبيعي وكذلك قصر الذيل للنطف.

الهدف من الدراسة:

* نظرا لوجود حاجة الى مؤشرات كيموحيوية لتقييم مواصفات السائل المنوي وعدم كفاية الفحوصات التقليدية المعتادة لتحليل السائل المنوي ولأهمية انزيم CK وتأثيره على نضج خلايا النطف فمن المفيد قياس فعاليه انزيم الكرياتين كاينيز في السائل المنوي وعده مؤشرا كيموحيويا للخصوبة لدى الرجال السليمين والمصابين بضعف الخصوبة.
* التعرف على مواصفات السائل المنوي للإنسان.

المواد وطرائق العمل

تحضير العينات:

عينات السائل المنوي للإنسان: تم جمع العينات الخاصة بالسائل المنوي للإنسان من بعض المختبرات الاهلية للمراجعين الذين تراوحت اعمارهم ما بين 20_45 وضعت العينات في حاويات معقمة ونظيفة وتم تحليل العينات بعد تميعها حسب مواصفات الصحة العالمية WHO.

صنفت العينات الى ثلاثة مجاميع استنادا الى اعداد النطف: طبيعية النطف (اكثر من 30 مليون/مل)، قليلة النطف (اقل من 30 مليون/مل) وعديمة النطف.

تحليل السائل المنوي:

تم تسجيل الفحوصات العيانية مثل الحجم، اللون، المظهر والدالة الحامضية. وتم قياس الفحوصات المجهرية ومنها:

اعداد النطف: تم حساب اعداد النطف باستخدام شريحة Haemocytometer

النسبة المئوية للنطف المتحركة والنطف الطبيعية: تم حسابها بوضع قطرات من محلول سترات الصوديوم تركيزه 2.9% مع وضع غطاء الشريحة،وتم العد لما لايقل عن 100 نطفة باستخدام العدسة ذات التكبير العالي.

النسبة المئوية للنطف الميتة: تم حسابها باستخدام العدسة الزيتية وذلك بوضع قطرة من مزيج من صبغتي النيكروسين 5% التي اضيف لها 1.76من صبغة الايوسين على شريحة زجاجية تحوي على قطرة من عينة السائل المنوي لعمل مسحة، اذ تتلون النطف الميتة باللون الاحمر بسبب اختراق الصبغة للغشاء البلازمي لها بينما تبدو النطف الحية بيضاء اللون.

بيان سلامة الاكروسوم: استخدمت صبغة التريبان الزرقاء وضعت قطرة من صبغة التريبان على شريحة تحوي قطرة من السائل المنوي المخفف لعمل مسحة، بعد جفافها بالهواء تم تثبيت الشريحة بمحلول مثبت وغسلت بالماء المقطر ثم صبغت الشريحة بصبغة كمزا 7.5% لمدة 3.5ساعة بدرجة 37 درجة مئوية وغسلت بالماء المقطر ووضع غطاء الشريحة بعد ان جفت. فحصت المسحات باستخدام العدسة الزيتية لبيان الخلايا الحية والاكروسوم السليم.(11)

عزل البلازما المنوي:

بعد تحليل عينات السائل المنوي وتخفيفها تم عزل البلاما المنوي (الراشح) عن خلايا النطف (الراسب) باستخدام جهاز الطرد المركزي وبسرعة 4000 دورة/دقيقة ولمدة 20 دقيقة.

قياس فعالية انزيم الكرياتين كاينيز:

تم قياس فعالية انزيم الكرياتين كاينيز باستخدام العدة الجاهزة من شركةlinear (12).

مبدا العمل: يعتمد مبدا العمل على الزيادة في الامتصاصية عند الطول الموجي 340nm نتيجة لتكون NADPH بفعل انزيم الكرياتين كاينيز وحسب المعادلات التالية:

Creatin phpsphate +ATP ----------CK (AMP,NAC)----------> creatine +ATP

ATP + Glucose -------HK----------> ADP +G6P

G6P + $NADP^+$ +H2O -----G6P-DH----------->Glucose-6p +NADPH $+H^+$

المحاليل المستعملة:

R1: المحلول المنظم كلوكوز/ NAC

R2:المادة الاساس /المرافق الانزيمي

طريقة العمل: بعد تحضير محلول العمل وذلك بمزج 4 مل من R1 + 1مل من R2 وهذا المحلول يكون ثابت لمدة شهر بعيدا عن الضوء. تم اخذ 1 مل من محلول العمل بدرجة 37

درجة مئوية وأضيف إليه 20 مايكروليتر من العينة،مزجت جيدا وتركت لمدة ثلاث دقائق ثم قرأت الامتصاصية قراءة اولية تحت الطول الموجي 340nm وأعيدت القراءة بعد 1،2،3 دقيقه تم حساب معدل التغير في الامتصاصية/دقيقه.

الحسابات: فعالية انزيم الكرياتين كاينيز = U/L التغير في الامتصاصية / دقيقة 8095x

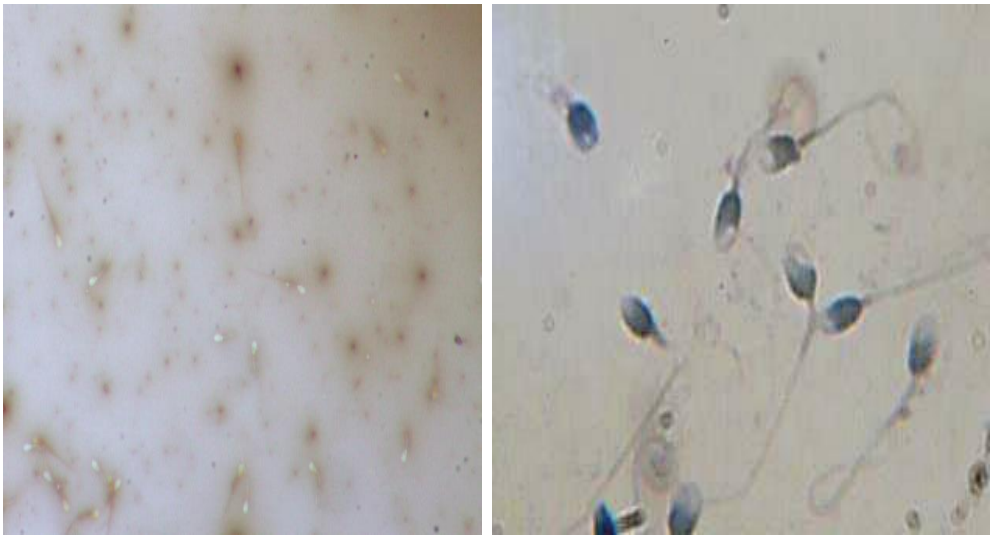
النتائج والمناقشة

جدول (1): مواصفات السائل المنوي في الإنسان (المعدل ± الانحراف المعياري)

الحالات	العدد	اعداد النطف/مل	% للنطف المتحركة	% للنطف طبيعية الشكل	حجم السائل المنوي (مل)
طبيعية النطف المخصبة	25	10^6 x 8 ± 63	11± 60	7 ± 67	0.5± 3.5
قليلة النطف غير المخصبة	17	10^6 x 7± 23	7± 45	5 ± 58	0.8± 2.5
عديمة النطف	10	_	_	_	0.8± 2.2

أظهرت النتائج ان النسبة المئوية للنطف الميتة الخاصة بالسائل المنوي للرجال المخصبة كانت (17 %) والنسبة المئوية للنطف ذات الاكروسوم السليم كانت (77%) باستخدام صبغة التريبان الزرقاء. شكل رقم1 (1 و 2).

(2) (1)



شكل رقم (1): 1. يوضح سلامة اكروسوم النطف باستخدام صبغة التريبان الزرقاء بقوة تكبير (5760x):
2. يوضح النطف الحية والميتة باستخدام صبغة الايوسين والنكروسين بقوة تكبير (2304x) لنطف الانسان.

أظهرت نتائج الدراسة ان فعالية انزيم الكرياتين كاينيز في البلازما المنوي للرجال المخصبين (السيطرة control) كانت (U/L 48.5) مع وجود تباين في فعالية انزيم الكرياتين كاينيز في الحالات قيد الدراسة الخاصة بالسائل المنوي للإنسان (جدول رقم 2) اذ كانت فعالية الانزيم في البلازما المنوي للانسان في حالة قليلة اعداد النطف غير المخصبين (U/L113.3) اعلى مقارنة بحالة طبيعية النطف المخصبين (U/L 48.5) والنسبة المئوية للزيادة في الفعالية هي (133). وكانت فعالية الانزيم في حالة عديمة النطف هي (U/L 97.1) والنسبة المئوية للزيادة في الفعالية هي (100) مقارنة بمجموعة السيطرة.

جدول (2): فعالية انزيم الكرياتين كاينيز في الحالات قيد الدراسة

الحالات	فعالية الانزيم	النسبة المئوية للفعالية	النسبة المئوية للتغيير في الفعالية
طبيعية النطف	9 ± 48.5	100	-----
قليلة النطف	17 ± 113.3	233	+ 133
عديمة النطف	11 ± 97.1	200	+ 100

أظهرت النتائج ارتفاع فعالية الانزيم في الحالات قليلة وعديمة النطف غير المخصبين مقارنة بالحالة الطبيعية (control). كما اظهرت النتائج وجود تقارب بفعالية انزيم الكرياتين كاينيز في الحالات قليلة وعديمة النطف لاشتراكهما بصفة عدم الاخصاب, وهذه النتيجة جاءت مطابقة لما وجده Dandekar and Parkan (13) بوجود علاقة عكسية بين تركيز النطف وفعالية انزيم الكرياتين كاينيز مع وجود تباين في فعالية الكرياتين كاينيز في السائل المنوي للمخصبين وغير المخصبين. كما توافقت هذة النتيجة مع (14) اذ وجدوا ان فعالية انزيم الكرياتين كاينيز في السائل المنوي للانسان كانت مرتفعة في حالة قليلة النطف مقارنة بفعالية الانزيم في حالة النطف الطبيعية، واستنتجوا ان النطف في حالة طبيعية النطف تكون ناضجة من الناحية الكيموحيوية والقدرة على الاخصاب، بينما العكس قد يكون صحيح بالنسبة لحالة قليلة النطف.

ان الارتفاع في تركيز الانزيم قد يعود الى الفقدان غير الكامل للسايتوبلازم اثناء عملية توالد النطف وهذا يؤدي الى اعاقة عملية توالد النطف ونضجها وبالتالي فان النطف غير الناضجة تعاني من الفشل في الارتباط بالطبقة الشفافة Zona Pellucida المحيطة ببويضة الانثى (6) وبهذا تكون فعالية الانزيم مؤشرا لعدم نضج النطف. ان المرحلة النهائية لتمايز النطف تمر عبر تنقلات تشير الى نضج النطف من خلال فقدانها لمكونات السايتوبلازم اثناء تولد السبرماتيد الناضج من قبل خلايا سيرتولي، فالسايتوبلازم المتبقي الخاص بالنطف يتواجد

بشكل كتلة غير منتظمة في القطعة الوسطية للنطف واذا كانت هذه الكتلة تمثل اكثر من ثلث راس النطفة تسمى القطرة السايتوبلازمية cytoplasmic droplet.(14) وتشير الدراسة (15) بان هنالك بعض العوامل التي تفرز من الخلايا الطلائية المبطنة للنواة، هذه العوامل هي المسؤولة عن نضج واكمال عملية توالد النطف تكون مفقودة في حالات المرضى اللذين تظهر لديهم نسبة عالية من الانزيم والاهتمام بدراسة هذه العوامل تساعد في استكمال عملية توالد النطف واثبات القدرة على الاخصاب.

كما اشارت الدراسة المقدمة من قبل الباحثان Eliasson و Lindholmer (16) ان تركيز انزيم الكرياتين كاينيز في الجزء الاولي من القذفة المنوية الذي مصدرة البروستات اوطا بكثير من تركيزة في الجزء الاخير من القذفة الذي مصدرة الحويصلات المنوية.

ان الاختبارات الخاصة بانزيم الكرياتين كاينيز تكون اكثر خصوصية وفاعلية من بقية التقنيات المتداولة في تحليل السائل المنوي لانه يصف نوعية السائل المنوي وكذلك القدرة الاخصابية له استنادا الى الصفات الكيموحيوية للنطف. ويشير الباحث Asseo وجماعته (8) ان فعالية انزيم الكرياتين كاينيز تعود الى وجود النوع BB (CK) فقط في البلازما المنوي للانسان. وفي دراسة اخرى وجد ان المتناظر الرئيسي المتواجد في السائل المنوي هو CK-MM .(17)

يفرز انزيم الكرياتين كاينيز من الانيبيبات المنوية والنطف والبربخ والحويصلات المنوية ومن غدة البروستات بصورة رئيسية، لذا فان قياس فعالية هذا الانزيم في السائل المنوي يعد مؤشرا لوظيفة البروستات و لنوعية السائل المنوي من خلال دراسة خصوبة الرجال (18).

الاستنتاجات:

- ظهور فعالية لانزيم الكرياتين كاينيز في البلازما المنوي للإنسان.
- كانت فعالية الانزيم في حالتي قليلة النطف وعديمة النطف اعلى بنسبة (100،133) على التوالي مقارنة بفعالية الانزيم في البلازما المنوي للرجال المخصبين.
- يعد انزيم الكرياتين كاينيز مؤشرا لنضج خلايا النطف وقدرتها على تلقيح البويضة.

التوصيات:

- قياس فعالية الانزيم في انواع اخرى من الحيوانات مثل الثور والأرنب.
- قياس فعالية الانزيم في مستخلص خلايا لنطف ومقارنتها بفعالية الانزيم في البلازما المنوي لمعرفة اين تكمن اعلى فعالية للانزيم.

المصادر

1) Sharlip, I.D., Jarow, j. p., Belker, A.M., LI, Lipshultz, Sigman.M, Thomas, AG, Best practice policies formale infertility. *Fertil Steril*; 77:873-882 (2002).

2) Aitken, R.G. Assessment of sperm function. *Human Repro*, 3:89-95 (1988)

3) McMurry, Catellion. Chemical reaction, energy rates and equilibrium, heat changes during chemical reactions. Fundamentals general, organic, and biological chemistry, 4th ed., chapter 7, pp164-90, Lipincott, (2003).

4) Barid, M.F., Graham, S.M., Barker, J.S. Bickerstaff, G.F, Kreatin kinase, Jornal of Nutrition and Metabolism, 13:10-5 (2012).

5) Tietz, N. W. "Text book of clinical chemistry", 3rd ed; W.B. Saunderscompany, U.S.A. Advision of Harcourt Brace and Company, Philadelphia (1999).

6) Huszar H. The role of sperm CK in the assessment of male fertility. *Reprod Med Rev*; 3:179-197 (1994).

7) Johna-lott D, Robert D, and John BH. Creatine kinase in: Clinical enzymology, clinical diagnosis, and management by laboratory methods, Vol. 1, 20th ed., pp 292-93, W.S. Saunders company, (2001).

8) Asseo, P.P., Panidis, D.K., Papadimase, J.S., Ikkos, D.G.. CK in seminal plasma of infertile men. *Int.J.Androl*; 4(4):431-9 (1981).

9) Halak, J. Sharma, R.K., Pasqualotto, F.F., Ranganathan, p. Thomas, A.J. Agarwal, A. CK as an indicator of sperm quality. *Urology*; 58(3): 446 - 51(2001).

10) Twigg, J; Fulton, N; Gomez, E.Irvine, DS.Aitken, RJ. Analysis of intracellular reactive oxygen species. *Hum.Reprod*, 13:1429-1436 (1998).

11) Kovacs, A.; Foot R.H. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbitspermatozoa.*Biotech Histochem*., 67:119-124(1992).

12) IFCC.Clin Chem. *Lab Med*.; 40, (6):635-642 (2002) Sharlip, I.D.Jarow, J.P; Belker, A.M.et, al Best policies for male infertility. *Fertile Steril*;77:873-882 (2002).

13) Dandekar, S. P. and Parkar, G.M. Correlition between CK activity, lipid peroxidation and water teast in male Infertility. *jornal of postgraduate medicine*; 45 (2):42-8(1999).

14) Rajinders S., Rakesh K. S., Ashok, A. Relationship between creatin kinase activity and semen. *Int J Fertility*, 43:192-197(1998).

15) Huzar, G; Ston, K; Dix, D; Vigue, l. putative Creatin kinase, Biol Redpro, 63, 925-932(2000).

16) Eliasson, R.; Lindholmer, C. Functions of male accessory gential organs. Chop. Men. E.S.E. Hafez, Ed., C.V. Mosby Co. St. Louis, Mo (1976).

17) Gershbein L.L. and Thielen R.D. Enzymatic and electrolyte profiles of human semen. The prostate; 12 (3): 263-69(2008).

18) Basima, SA; Tyfoor, JM; Hamid, GH. Evaluation of seminal plasma Creatine kinase and its iso-enzymes, Journal Edition, 5,1 (2012).