

# بررسی تأثیر داروی کتوتی芬 به عنوان بلاک کننده ماست سل بر روی پارامترهای کروماتین هسته اسپرم در مردان نابارور با علت ناشناخته

سارا سلیمانی اصل (B.Sc)<sup>۱</sup>، همایون عباسی (Ph.D)<sup>۲</sup>، محمدحسین نصر اصفهانی (Ph.D)<sup>۳</sup>، شهناز رضوی (Ph.D)<sup>۴</sup>.

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی اصفهان، اصفهان، ایران.
- ۲- استادیار، گروه اورولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی اصفهان، اصفهان، ایران.
- ۳- استادیار، گروه جنین‌شناسی، پژوهشکده رویان، جهاد دانشگاهی واحد دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی ایران، تهران، ایران.
- ۴- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی اصفهان، اصفهان، ایران.

## چکیده

مقدمه: ماست سل‌ها در التهاب و افزایش حساسیت و فیبروز نقش مهمی را ایفا می‌نمایند. این سلولها به طور طبیعی در اکثر بافت‌های محیطی از جمله بیضه وجود دارند. ولی مطالعات نشان داده است که تعداد آنها در بیضه مردان نابارور به طور چشمگیری افزایش می‌یابد و احتمالاً موجب ایجاد فیبروز در اطراف لوله‌های سمتینیفرس گشته و منجر به اختلالات اسپرماتوژن می‌شود. به نظر می‌رسد درمان با ماست سل بلاکرها مانع از رهائی مواد وازوакتیو و در نتیجه کاهش التهاب و فیبروز در این بافت گشته که در نهایت منجر به بهبود اسپرماتوژن می‌گردد. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر داروی کتوتی芬 بر روی پارامترهای اسپرمی و کروماتین هسته اسپرم در بیماران نابارور می‌باشد.

مواد و روشها: این مطالعه به صورت آینده‌نگر بر روی ۱۰ بیمار غیر اولیگوسپرم و ۱۴ بیمار میانگین اسپرم با ناباروری و ناباروری اصفهان، بدون علت زنانه و با میزان طبیعی هورمون LH و تستوسترون، تحت درمان با داروی کتوتی芬 (با دوز ۱mg دو بار در روز به مدت ۳ ماه) انجام گرفت. پارامترهای اسپرمی و کروماتین هسته اسپرم (رنگ‌آمیزی CMA3 و آیلین‌بلو) قبل از درمان، ۴۵ و ۹۰ روز پس از درمان بررسی شد و نتایج قبل و بعد از درمان با استفاده از نرم افزار SPSS به روش Paired samples t-student test مقایسه گردید.

نتایج: در گروه اولیگوسپرم ۴۵ روز پس از درمان از بین تمام پارامترها فقط حجم سیمن افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P=0.005$ ). اما ۹۰ روز بعد از درمان میانگین حجم سیمن، تعداد کل اسپرم، درصد اسپرم با مورفوولوژی طبیعی، اسپرم با مورفوولوژی سر طبیعی و اسپرم با هیستون طبیعی افزایش معنی‌داری داشت ( $P=0.05$ ). همچنین درصد تحرك اسپرم به طور معنی‌داری نسبت به قبل از درمان کاهش نشان داد ( $P=0.025$ ). در این گروه ۲ مورد حاملگی گزارش شد ( $P=0.20$ ). در بیماران غیر اولیگوسپرم نابارور میانگین تعداد اسپرم ۴۵ روز بعد از درمان نسبت به قبل از درمان کاهش معنی‌داری داشت ( $P=0.02$ ) و لی پس از ۳ ماه درمان افزایش غیر معنی‌داری نشان داد که نزدیک به میزان قبل از درمان بود ( $P>0.05$ ). همچنین ۹۰ روز پس از درمان درصد اسپرم با مورفوولوژی طبیعی، اسپرم با مورفوولوژی سر طبیعی و اسپرم با هیستون طبیعی به طور معنی‌داری افزایش یافته بود و درصد اسپرم با نقص پروتامین کاهش معنی‌داری داشت ( $P<0.05$ ). در این گروه ۲ مورد حاملگی گزارش شد ( $P=0.05$ ). ضمناً اختلاف معنی‌داری در میزان هورمون‌های تستوسترون، LH و FSH در هر دو گروه قبل و بعد از درمان مشاهده نشد ( $P>0.05$ ).

نتیجه گیری: با توجه به بهبود اسپرم و کروماتین هسته اسپرم در بیماران تحت مطالعه به نظر می‌رسد که داروی کتوتی芬 به عنوان ماست سل بلاکر در درمان ناباروری با علت ناشناخته می‌تواند مؤثر باشد. در ضمن از آنجایی که درصد موفقیت باروری در روش‌های نوین درمان ناباروری وابسته به کیفیت اسپرم می‌باشد؛ لذا پیشنهاد می‌شود که در بیماران فوق الذکر قبل از درمان جهت بهبود کیفیت اسپرم از این دارو استفاده گردد.

گل واژگان: ماست سل، کتوتی芬، کروماتین اسپرم، پارامترهای اسپرمی، اولیگوسپرمی، و ناباروری.

آدرس مکاتبه: دکتر محمدحسین نصر اصفهانی، گروه جنین‌شناسی، پژوهشکده رویان، پلاک ۳۶، کوچه سیمین، تقاطع آصف، خیابان زعفرانیه، صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۴۶۴، تهران، ایران.

پست الکترونیک: info@royaninstitute.org

## مقدمه

در نظر گرفته می‌شود شامل آنتی بیوتیک‌ها، کورتیکوستروئیدها، کالیکرین و ماست سل بلاکرها است (۱۰). نظریه درمان اختلالات باروری مردان با ماست سل بلاکرها بر پایه مشاهده افزایش تعداد ماست سل‌ها در بیضه این افراد می‌باشد (۲).

در همین راستا Schill و همکاران در سال ۱۹۸۶ اثر مثبت کتوتیفن از دسته داروئی ماست سل بلاکرها را برروی پارامترهای اسپرمی در مردان اولیگوسپرم بعد از ۳ ماه درمان گزارش کردند (۱۱). همچنین استفاده از داروی ترانیلیست<sup>۱</sup> از دسته داروئی فوق به مدت ۳ ماه منجر به ظهور اسپرم در انزال مردان آزوسپرمی گردید (۱۲)؛ اما استفاده از داروی فگروفنادین<sup>۲</sup> به عنوان ماست سل بلاکر تاثیری بر روی پارامترهای اسپرمی نداشت (۱۳).

در مطالعه حاضر تاثیر داروی کتوتیفن بر روی پارامترهای اسپرمی، کروماتین هسته اسپرم و همچنین سطح سرمی هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون ۴۵ و ۹۰ روز پس از درمان در مردان نابارور با علت ناشناخته بررسی شده است. لازم به ذکر است که این دارو مدت‌هاست که جهت درمان ناباروری توسط پزشکان تجویز می‌شود و هدف از این مطالعه فقط بررسی تاثیر آن می‌باشد.

## مواد و روشها

این مطالعه به صورت آینده‌نگر بر روی ۶۵ مرد نابارور با علت ناشناخته، با میانگین سنی  $5/962 \pm 31$  سال که میانگین طول مدت ناباروری آنها  $4/073 \pm 4/5$  سال بود و در بین مراجعه کنندگان به مرکز باروری و ناباروری اصفهان انجام شد. این افراد ابتدا توسط اورولوژیست از نظر بیماری‌های اوروژنیتال مثل هیدروسل، کریپتوکیدیسم، واریکوسل، ارکیت و.... بررسی شدند و در صورت نداشتن مشکل جراحی،

عوامل متعددی در بروز ناباروری مؤثر می‌باشند که به طور کلی به دو دسته علل مردانه و زنانه تقسیم می‌شوند. ۳۰٪ این عوامل مربوط به علل مردانه است که اکثراً منجر به اختلال در روند اسپرماتوژنی گردند (۱). فاکتورهای متعددی در ایجاد ناباروری مردان دخیل هستند که یکی از آنها افزایش تعداد ماست سل‌ها در بیضه مردان نابارور و ایجاد فیبروز در اطراف لوله‌های سینیفروس می‌باشد (۲،۳). ماست سل‌ها از سلول‌های بافت همبند هستند که با تولید و ترشح واسطه‌های شیمیائی در ایجاد التهاب مزمن، فیبروز و افزایش حساسیت نقش دارند (۴،۵).

مطالعاتی که روی بافت بیضه انجام شده است نشانگر حضور ماست سل‌ها در بافت همبند این عضو می‌باشد (۳) که براساس محل قرارگیری آنها دارای دو زیر گروه ماست سل‌های بینابینی و پری توبولار می‌باشند. در مقایسه با ماست سل بینابینی، ماست سل پری توبولار به لوله‌های سینیفروس نزدیکتر بوده و تعداد آنها کمتر از ماست سل‌های بینابینی می‌باشد (۶،۷). در بیضه مردان نابارور افزایش قابل ملاحظه‌ای در تعداد هر دو نوع ماست سل دیده می‌شود (۲،۸) اما نسبت افزایش ماست سل‌های پری توبولار بیشتر از ماست سل‌های بینابینی می‌باشد (۶،۷). این افزایش منجر به کموتاکسی فیبروبلاستها و القاء سنتز کلژن و در نهایت فیبروز پری توبولار می‌گردد (۳،۹). این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که افزایش تعداد ماست سل‌ها در بافت بیضه در پاتوفیزیولوژی ناباروری ناشناخته مردان نقش دارد و احتمالاً استفاده از ماست سل بلاکرها از جمله کتوتیفن که با بلوكه کردن گیرنده H<sub>1</sub> در سطح ماست سل‌ها مانع از رهائی هیستامین و مواد وازاکتیو دیگر از این سلولها می‌گردد، می‌تواند در درمان ناباروری ناشناخته مردان موثر باشد. درمان‌های داروئی که براساس اختلالات پایه برای مردان نابارور

1- Tranilast  
2- Fexofenadine

دست آمد (لازم به ذکر است که در کل مطالعه تمام پارامترها از جمله تحرک توسط یک فرد با مهارت لازم بررسی گردید).

ب- ارزیابی مورفولوژی اسپرم: مایع سیمن دو بار با محلول PBS به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰ سانتریفوژ شد و سپس اسمری تهیه و با روش پاپانیکولا رنگ آمیزی گردید(۱۵). مورفولوژی اسپرم طبق معیار Strict Criteria Kruger ارزیابی گردید و به طور خلاصه براساس این معیار اسپرمی طبیعی در نظر گرفته شد که دارای سر بیضی با محیط صاف، طول  $5\text{--}6 \mu\text{m}$ ، قطر  $2/5\text{--}3/5 \mu\text{m}$ ، میزان آکروزوم  $30\text{--}70\%$  اندازه سر اسپرم و قادر آنومالی در ناحیه گردن و دم باشد(۱۶).

ارزیابی کمبود پروتامین اسپرم (رنگ آمیزی  $\text{CMA}_3$ )<sup>۷</sup>: مایع منی شیستشو داده شده، در محلول کاربونی (متانول، اسیداستیک گلاسیال به نسبت ۳:۱) در دمای  $4^\circ\text{C}$  به مدت ۵ دقیقه ثابت شد. پس از تهیه اسمری از نمونه های ثبت شده، رنگ آمیزی  $\text{CMA}_3$  با  $100 \mu\text{l}$  محلول  $\text{CMA}_3$  با غلظت  $mg/ml$   $0/25$  در بافر مکالوین  $7\text{H}_2\text{O}+\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $22/9ml + 0/1M$  ( $7\text{ ml}$  اسیدسیتریک  $0/0/1M$ ) با  $pH=7.0$  و  $MgCl_2 10\text{ mM}$  با مولاریت  $2M$  و  $pH=7.0$  که حاوی است (به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت و سپس با بافر گلیسرول (حجم مساوی از بافر مکالوین با گلیسیرین) مونت گردید. با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنت (Nikon, Japan) توسط عدسی شیئی  $100\times$  در همان روز  $200$  اسپرم شمارش شد. درصد اسپرم های با رنگ زرد درخشنان  $\text{CMA}_3$  مثبت (اسپرم دارای کمبود پروتامین) و اسپرم های با رنگ زرد تیره  $\text{CMA}_3$  منفی (اسپرم طبیعی) محاسبه گردید(۱۷).

ارزیابی وجود هیستون اضافی در هسته اسپرم (رنگ آمیزی آنیلین بلو): از مایع سیمن شیستشو داده شده اسمری تهیه و با استفاده از محلول گلوتار آلدئید

طبیعی بودن سطح سرمی هورمون های LH و FSH و تستوسترون خون و همچنین عدم وجود فاکتور ناباروری زنانه در همسرانشان طبق نظر پژوهش مربوطه کاندید مصرف داروی کتوتیفن (Novartis, Switzerland) شدند. این دارو با دوز  $1\text{ mg}$  دو بار در روز به مدت ۲ ماه به این افراد تجویز شد و نمونه سیمن قبل از درمان،  $45$  و  $90$  روز بعد از درمان جمع آوری شد. همچنین آزمایش خون بعد از ۳ ماه درمان جهت بررسی هورمون های مذکور انجام گرفت.

مراحل آماده سازی اسپرم: نمونه های سیمن بعد از ۴-۳ روز خودداری از مقاربت توسط بیماران جمع آوری گردید و بخشی از آن جهت آنالیز روتین سیمن و باقیمانده برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم و کروماتین هسته اسپرم استفاده شد.

#### آنالیز مایع منی:

الف- بررسی تعداد و تحرک اسپرم و حجم مایع منی: برای بررسی تعداد و تحرک اسپرم و حجم مایع منی از استانداردهای WHO<sup>۱</sup> استفاده گردید. طبق این استانداردها حجم طبیعی مایع منی  $2ml$  یا بیشتر در هر انزال، تعداد طبیعی اسپرم  $20$  میلیون یا بیشتر در هر میلی لیتر مایع منی یا  $40$  میلیون در هر انزال و درصد طبیعی تحرک  $50\%$  یا بیشتر می باشد(۱۴). جهت تعیین حجم سیمن از پیپت پاستور متصل به سرنگ استفاده شد. برای محاسبه تعداد اسپرم  $\text{ml}$  مایع منی بر روی  $16$  لام نئوبار گذاشته و توسط عدسی شیئی  $40\times$  در  $40\times$  خانه تعداد اسپرم ها شمارش شد و بدین ترتیب تعداد اسپرم در هر سانتی متر مکعب به دست آمد. همچنین جهت به دست آوردن میزان تحرک اسپرم یک قطره مایع منی بر روی لام گذاشته و با عدسی شیئی  $40\times$  و با استفاده از شمارشگر تعداد  $100$  اسپرم در چند فیلد بررسی و درصد اسپرم های متحرک و غیر متحرک به

تقسیم شدند و میانگین پارامترهای سیمن شامل حجم سیمن، تعداد اسپرم، تعداد کل اسپرم، درصد تحرك اسپرم، درصد اسپرم با سر طبیعی، درصد اسپرم با مورفولوژی طبیعی، درصد اسپرم با کمبود پروتامین(CMA<sub>3</sub> مثبت) و درصد اسپرم با هیستون طبیعی (آنیلینبلو منفی) در هر دو گروه در روزهای ۴۵ و ۹۰ پس از درمان نسبت به قبل از درمان مقایسه گردید.

نتایج جدول شماره ۱ نشان می‌دهد که در گروه اولیگواسپرم میانگین حجم سیمن در ۴۵ روز پس از درمان افزایش معنی‌داری نسبت به قبل از درمان داشت ( $P=0.006$ )؛ اما مصرف این دارو تاثیر معنی‌داری بر روی پارامترهای تعداد اسپرم، تعداد کل اسپرم، درصد تحرك و مورفولوژی طبیعی اسپرم و همچنین کیفیت کروماتین هسته اسپرم در روز ۴۵ درمان نداشت. مصرف داروی کتوتیفن در گروه اولیگواسپرم بعد از ۹۰ روز درمان تاثیر معنی‌داری بر روی تعداد اسپرم نداشت؛ اما منجر به افزایش معنی‌دار حجم مایع منی ( $P=0.005$ ) و تعداد کل اسپرم گردید ( $P=0.048$ ). همچنین در درصد تحرك اسپرم در گروه اخیر در ۹۰ روز بعد از درمان کاهش معنی‌داری مشاهده شد ( $P=0.025$ ).

در مورد مورفولوژی اسپرم مصرف این دارو باعث افزایش معنی‌دار درصد اسپرم با مورفولوژی طبیعی ( $P=0.002$ ) و اسپرم با سرطبیعی ( $P=0.001$ ) پس از ۹۰ روز درمان نسبت به قبل از درمان گردید. با توجه به نتایج جدول شماره ۱ مصرف داروی کتوتیفن باعث افزایش معنی‌دار درصد اسپرم با میزان هیستون طبیعی گردید ( $P=0.032$ )؛ اما تاثیری بر روی کمبود پروتامین نداشت.

با توجه به نتایج جدول شماره ۲ در بیماران غیراولیگواسپرم نابارور میانگین تعداد اسپرم در ۴۵ روز پس از درمان نسبت به قبل از درمان کاهش

۰/۳٪ در بافر فسفات ( $NaH_2PO_4 ۱۴ml$  با مولاریته  $۰/۲M$ ) حاوی  $Na_2HPO_4 ۳۶ml$  دارای مولاریته  $۰/۲M$  و  $pH=۷/۲$  (pH) نمونه ثابت شد. سپس با قراردادن لامها در محلول رنگ آنیلینبلو در  $۱۰۰ml$  اسید استیک ۴٪ رنگ‌آمیزی به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. سپس با شستشو در آب جاری، آب‌گیری در الکل‌های صعودی و شفاف کردن در گزیل با چسب انتلان مونت شد و پس از ۲۴ ساعت با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) با عدسی شیئی  $۱۰0\times$  در هر لام ۲۰۰ عدد اسپرم بررسی شد و درصد اسپرم رنگ نگرفته امتیاز<sup>۱</sup> صفر و رنگ گرفته (بخشی رنگ گرفته امتیاز ۱ و یا تماماً رنگ گرفته امتیاز ۲) محاسبه گردید (۱۸). لازم به ذکر است که تمام مواد مصرفی در این مطالعه از شرکت Merck آلمان تهیه شد به جزء CMA<sub>3</sub> که تولید شرکت سیگما آمریکا بود.

نتایج به دست آمده با آزمون آماری Paired Samples t-test و با استفاده از نرم افزار SPSS-10 تحلیل و بررسی شدند.

## نتایج

از ۶۵ نفر افرادی که مورد مطالعه قرار گرفتند ۱۴ نفر از آنها به دلایل مختلفی از ادامه درمان منصرف شدند و از ۲۴ نفر باقیمانده همسران ۴ نفر، یک مورد قبل از ۴۵ روز درمان (گروه اولیگواسپرم) و ۳ مورد قبل از ۹۰ روز درمان (یک مورد گروه اولیگواسپرم و دو مورد دیگر از گروه غیر اولیگواسپرم) حامله شدند و بنابراین درمان را ۹۰ روز ادامه ندادند و فقط ۲۰ مورد دارو را به مدت ۳ ماه مصرف کردند. بیماران به دو گروه اولیگواسپرم با تعداد اسپرم کمتر از  $۲۰\times ۱۰^7$  میلیلیتر مایع سیمن و یا کمتر از ۴ میلیون در هر انزال به تعداد ۱۰ مورد و ۱۴ مورد بیمار غیراولیگواسپرمی با تعداد اسپرم بیشتر از این حد

جدول ۱- میانگین پارامترهای مایع سیمن و بلوغ هسته اسپرم قبل از درمان، ۴۵ و ۹۰ روز پس از درمان در مردان نابارور اولیگوسپرم مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان سال ۱۳۸۲

P-Value قبل و ۹۰ روز پس از درمان	P-Value قبل و ۴۵ روز پس از درمان	M±SD روز ۹۰ درمان	M±SD روز ۴۵ درمان	M±SD قبل از درمان	زمان پارامترهای اسپرم
۰/۱۰۵	۰/۲۲۳	۶/۷۵±۸/۲	۴/۴۶±۴/۸	۳/۳۰±۲/۷	تعداد اسپرم (million/ml)
۰/۰۴۸	۰/۶۸۲	۲۰/۶۲±۱۸/۶	۷/۲۹±۷/۷	۷/۸۰±۶/۷	تعداد کل اسپرم (million/ejaculate)
۰/۰۰۵	۰/۰۰۶	۴/۰۰±۱/۰	۱/۸۰±۰/۷	۲/۸۰±۱/۱	حجم مایع منی (ml)
۰/۰۲۵	۰/۲۹۷	۴۵/۰۰±۶/۵	۴۲/۰±۱۹/۰	۵۱/۰۰±۹/۶	تحرک اسپرم (%)
۰/۰۰۲	۰/۲۲۱	۱۱/۵۰±۱۰/۹	۷/۰۰±۷/۵	۵/۰۰±۳/۷	اسپرم با مورفولوژی طبیعی (%)
۰/۰۰۱	۰/۰۵۹	۱۸/۵۰±۱۲/۲	۱۰/۲۰±۹/۵	۷/۰۰±۵/۸	اسپرم با مورفولوژی سر طبیعی (%)
۰/۰۸۵	۰/۱۹۱	۲۳/۷۵±۶/۷	۲۷/۶۰±۸/۰	۲۵/۶۰±۴/۵	اسپرم با کمبود پروتامین (%)
۰/۰۳۳	۰/۱۹۳	۶۶/۵۰±۶/۶	۶۴/۰±۱۵/۴	۶۰/۵۰±۱۶/۰	اسپرم با هیستون نرمال (%)

## بحث

امروزه روش‌های درمانی مختلفی جهت درمان ناباروری با علل مردانه وجود دارد که از جمله این درمانها روش‌های ART<sup>۱</sup> مثل IVF<sup>۲</sup> و ICSI<sup>۳</sup> می‌باشد. اگرچه موفقیت این روشها در هر سیکل محدود می‌باشد لیکن با روش‌هایی مانند ICSI زوج‌های نابارور زیادی حتی در مواردی که اسپرمی در مایع منی وجود ندارد حاملگی داشته‌اند ولی این روشها هزینه زیادی دارند و جزء روش‌های تهاجمی محسوب می‌شوند. با توجه به محدودیت موفقیت و هزینه بالا در موارد عدم موفقیت سیکل‌های درمانی، بیماران مأیوس شده و از ادامه درمان منصرف می‌شوند؛ بنابراین تا حد ممکن روش‌های درمانی ارزانتر و غیرتهاجمی‌تر معقول به نظر می‌رسد. درمان داروئی ناباروری مردان جزء روش‌های درمانی غیرتهاجمی محسوب می‌شود که از جمله این داروها ماست سل بلکرها می‌باشد<sup>(۱۹)</sup>.

معنی‌داری داشت ( $P=0/۳۰$ )؛ اما در این مدت از درمان در بقیه پارامترهای مورد بررسی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین با توجه به نتایج جدول شماره ۲ اختلاف معنی‌داری در میانگین تعداد اسپرم، حجم مایع منی، تعداد کل اسپرم و درصد تحرک اسپرم ۹۰ روز پس از مصرف داروی کتوتیفن نسبت به قبل از درمان مشاهده نگردید. اما در ۹۰ روز پس از درمان افزایش معنی‌داری در درصد اسپرم با مورفولوژی طبیعی (%)، درصد اسپرم با سر طبیعی (%) و درصد اسپرم با هیستون طبیعی (%) نسبت به قبل از درمان مشاهده گردید و همچنین درصد اسپرم با کمبود پروتامین در ۹۰ روز پس از درمان در مقایسه با قبل از درمان به طور معنی‌داری کاهش یافت ( $P=0/۰۰۱$ ) (جدول شماره ۲).

طبق جدول شماره‌های ۳ و ۴ میانگین هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون خون قبل و بعد از درمان در هر دو گروه اولیگوسپرم و غیراولیگوسپرم نابارور در طیف طبیعی بود و تفاوت معنی‌داری نسبت به هم نداشت.

1- Assisted Reproductive Technology

2- In Vitro Fertilization

3- Intra Cytoplasmic Sperm Injection

جدول ۲- میانگین پارامترهای مایع سیمن و بلوغ هسته اسپرم قبل از درمان، ۴۵ و ۹۰ روز پس از درمان در مردان نابارور غیر اولیگواسپرم مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان سال ۱۳۸۲

P-Value قبل و ۹۰ روز پس از درمان	P-Value قبل و ۴۵ روز پس از درمان	روز ۹۰ درمان $M \pm SD$	روز ۴۵ درمان $M \pm SD$	قبل از درمان $M \pm SD$	زمان پارامترها
۰/۹۰۰	۰/۰۳۰	۵۲/۱۵±۱۴/۸	۴۲/۰۷±۱۷/۸	۵۳/۹±۲۲/۱	تعداد اسپرم ( <i>million/ml</i> )
۰/۲۸۸	۰/۰۷۰	۱۶۰/۷±۸۱/۶	۱۳۶/۳±۵۶/۲	۱۹۱/۳±۱۱۵/۲	تعداد کل اسپرم ( <i>million/ejaculate</i> )
۰/۱۹۳	۰/۷۰۰	۳/۰۷±۱/۱	۳/۳۵±۱/۲	۳/۵۳±۱/۶	حجم مایع منی ( <i>ml</i> )
۰/۸۸۰	۰/۶۲۴	۴۵/۳۸±۱۹/۱	۴۴/۸۵±۲۲/۵	۴۷/۵۰±۱۲/۸	تحرک اسپرم (%)
۰/۰۰۰	۰/۱۰۵	۴۱/۲۴±۱۲/۴	۱۶/۸۶±۱۱/۵	۱۴/۶۵±۸/۳	اسپرم با مورفولوژی طبیعی (%)
۰/۰۰۱	۰/۴۰۵	۴۶/۹۳±۱۲/۲	۳۲/۴۳±۱۱/۵	۲۰/۶۵±۱۱/۵	اسپرم با مورفولوژی سر طبیعی (%)
۰/۰۰۱	۰/۶۳۵	۱۵/۳۸±۶/۰	۲۳/۰۷±۹/۸	۲۱/۷۱±۷/۶	اسپرم با کمبود پروتامین (%)
۰/۰۰۱	۰/۹۳۷	۸۵/۵۲±۵/۴	۸۰/۲۱±۸/۲	۸۰/۳۵±۴/۶	اسپرم با هیستون نرمال (%)

ولی تاثیری در میزان حاملگی نداشت(۱۱). در سال Matsuki ۲۰۰۰ و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی ۱۵ فرد اولیگواسپرم با علت ناشناخته داشتند تجویز ترانیلیست (اباستین)<sup>۱</sup> به عنوان ماست سل بلاکر به مدت ۳ ماه منجر به افزایش تعداد اسپرم در ۵۷٪ بیماران شد. همچنین ۳ مورد حاملگی (۱۴٪) گزارش گردید اما میزان تحرک و مورفولوژی طبیعی اسپرم تغییری نکرد(۲۳). اهمیت کلینیکی ترانیلیست از دسته داروئی ماست سل بلاکرها در مردان نابارور گزارش شده است. تجویز این دارو به مدت ۳ ماه در ۱۷ بیمار منجر به افزایش معنی دار تعداد اسپرم شد و در ۳ مورد حاملگی گزارش گردید. اما تحرک اسپرم و مورفولوژی طبیعی آن تغییری نکرد و همچنین تاثیری بر سطح سرمی هورمون‌های LH و FSH و تستوسترون نداشت(۲۴). در مطالعه بالینی دیگر که توسط Hibi و همکاران انجام شد مصرف داروی ترانیلیست به مدت ۳ ماه منجر به افزایش معنی دار تعداد اسپرم و تعداد کل اسپرم گردید و ۲۸٪ حاملگی گزارش شد(۱۹). همچنین تجویز داروی

تحقیقات نشان می‌دهد که ماست سل‌ها به طور طبیعی در بافت‌های بیضه و اپیدیدیم وجود دارند و در التهاب و اختلالات فیبروتیک نقش دارند(۲۰). برای اولین بار Maseki افزایش تعداد ماست سل‌ها در بافت بیضه مردان نابارور را گزارش کرد(۲). مطالعات بعدی نشان دادند افزایش تعداد این سلولها با اختلالات اسپرماتوژنن همراه است که به دلیل افزایش ترشح رادیکال‌های آزاد از گرانولهای سیتوپلاسمی ماست سل‌ها پس از تحریکات آرژیک و ایمونولوژیک منجر به فیبروز می‌گردد(۷، ۲۰، ۲۱).

Meinke و همکاران پیشنهاد کردند که تریپتاز مترشحه از ماست سل‌ها باعث کموتاکسی فیبروبلاستها، القاء سنتز کلژن و در نهایت فیبروز دیواره پری توبولار در بیضه افراد نابارور می‌شود(۲۲). این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که استفاده از ماست سل بلاکرها ممکن است در درمان مردان نابارور با علت ناشناخته مؤثر باشد. در همین راستا Schill و همکاران گزارش گردند که در مردان اولیگواسپرم ایدیوپاتیک مصرف کتوتیفن به مدت ۳ ماه منجر به بهبود نسبی در تعداد و تحرک اسپرم شد.

## جدول ۳- مقایسه هورمون‌های جنسی خون قبل و بعد از درمان در مردان نابارور اولیگواسپرم

با علت ناشناخته مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان سال ۱۳۸۲

P-Value	بعد از درمان M±SD	قبل از درمان M±SD	زمان هورمون
۰/۱۷۳	۷/۳±۳/۶	۶/۸±۳/۸	(IU/ml) FSH
۰/۸۳	۱۱/۴±۷/۸	۱۱/۷±۸/۴	(IU/ml) LH
۰/۲۰	۶/۸±۴/۵	۵/۸±۴/۵	تستوسترون (IU/ml)

اسپرم در بیماران اولیگواسپرم ۴۵ و ۹۰ روز پس از درمان در مقایسه با قبل از درمان تفاوت معنی‌داری نداشت؛ اما حجم سیمین ۴۵ و ۹۰ روز پس از درمان نسبت به قبل از درمان افزایش معنی‌داری پیدا کرد؛ که منجر به افزایش معنی‌دار تعداد کل اسپرم در ۹۰ روز پس از درمان شده است ( $P=0/048$ ). اگرچه اسپرمها و ترشحات لوله‌های سمینیفروس حجم اندکی از مایع منی را تشکیل می‌دهند و احتمالاً افزایش حجم مایع منی می‌تواند به علت کاهش التهاب و تغییرات فیبروتیک و در نتیجه افزایش ترشحات غدد ضمائم جنسی باشد. اگرچه میانگین تعداد اسپرم بر خلاف مطالعات قبلی تفاوتی نسبت به قبل از درمان نداشته است (۱۱،۱۹-۲۴) اما تعداد کل اسپرم بعد از مصرف داروی کتوتیفن افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد که با نتایج مطالعات Hibi و Schill همخوانی دارد (۱۱،۱۹). همچنین میانگین درصد حرک اسپرم به طور معنی‌داری پس از ۹۰ روز نسبت به قبل از درمان در بیماران اولیگواسپرم کاهش یافته است. این یافته برخلاف مطالعات قبلی

ترانیلست منجر به ظهر اسپرم در مایع منی مردان آزواسپرم پس از یکسال درمان گردید (۱۲).

Akiyama و همکاران که تاثیر داروی ترانیلست را در مردان نابارور با علت ناشناخته بررسی می‌کردند نشان دادند که واسطه‌های شیمیائی به ویژه ۶-Keto-PGF1-alpha و هیستامین در پلاسمای سمینال بیماران تحت درمان با ترانیلست کاهش می‌یابد و فرض کردند که این دارو از طریق مهار رهائی واسطه‌های شیمیائی ماست‌سل‌های بیضه عمل می‌کنند. این واسطه‌ها به عنوان مواد وازواکتیو عمل نموده و باعث القاء التهاب می‌شوند (۲۵). فیبروز به دنبال بهبود التهاب دیده می‌شود که احتمالاً باعث اختلال یا تغییر در سد خونی- بیضه‌ای گردیده و ممکن است برای سلول‌های ژرمینال مضر بوده و منجر به کاهش تعداد اسپرم گردد (۱۹). از طرف دیگر استفاده از داروی Fexofenadine تاثیری بر روی پارامترهای اسپرمی نداشت (۱۲). نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که میانگین تعداد

## جدول ۴- مقایسه هورمون‌های جنسی خون قبل و بعد از درمان در مردان نابارور غیر اولیگواسپرم

با علت ناشناخته مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان سال ۱۳۸۲

P-Value	بعد از درمان M±SD	قبل از درمان M±SD	زمان هورمون
۰/۲۵۷	۵/۸±۲/۲	۴/۸±۱/۷	(IU/ml) FSH
۰/۸۱۳	۲/۶±۳/۲	۴/۸±۲/۹	(IU/ml) LH
۰/۱۰۸	۱۰/۵±۱۰/۷	۲/۴±۱/۲	تستوسترون (IU/ml)

است که شاید به دلیل تحلیل بافت فیبروز در اثر مصرف داروی کتوتیفن و افزایش کارآیی سلولهای سرتولی برای تولید اسپرم با کیفیت بهتر باشد که این موضوع فرضیه است و نیاز به بررسی دارد.

همچنین در مطالعه حاضر مصرف داروی کتوتیفن در گروه غیراولیگواسپرم بر خلاف گروه اولیگواسپرم تاثیری بر روی تعداد کل اسپرم نداشت که احتمالاً به این دلیل می‌باشد که در گروه غیراولیگواسپرم  $5 \pm 3/7$  در بیماران بیشتر از نظر مورفولوژی ( $14/6 \pm 8/3$ ) و هسته اسپرم دچار مشکل بودند و در این گروه بیشترین تاثیر دارو در مرحله اسپرمیوژن بوده است.

در مطالعه حاضر مورفولوژی طبیعی سراسپرم در هر دو گروه اولیگواسپرم و غیراولیگواسپرم ۹۰ روز پس از درمان بهبود یافت و این بهبود برخلاف یافته‌های مطالعات قبلی می‌باشد که احتمالاً به دلیل استفاده از روش‌های مختلف در بررسی مورفولوژی است. در مطالعات قبلی از استانداردهای WHO جهت بررسی مورفولوژی اسپرم استفاده شده است ولی در مطالعه حاضر مورفولوژی اسپرم طبق معیار Strict Criteria بررسی شده است که روش دقیق‌تر و مطمئن‌تری است (۱۶).

در بین پارامترهای اسپرمی مورفولوژی اسپرم مهمترین عامل مؤثر در لقاح می‌باشد (۲۸) و تحقیقات نشان می‌دهد که درصد لقاح، کیفیت جنین و شانس باروری ارتباط معنی‌داری با کیفیت سراسپرم تزریق شده در اووسیت دارد (۲۹).

De Vos و همکاران مشاهده کردند که میزان باروری در ICSI در مواردی که جهت تزریق از اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی استفاده می‌شود کمتر از مواردی است که اسپرم دارای مورفولوژی طبیعی باشد. همچنین درصد حاملگی و لانه گزینی بعد از انتقال جنین‌های حاصل از اسپرم غیرطبیعی، به طور

می‌باشد که هیچگونه تفاوتی را در درصد تحرک اسپرم قبل و بعد از درمان گزارش نکرده‌اند.

Cincik و همکاران نشان دادند که تحرک اسپرم در بیمارانی که افزایش تعداد ماست سل در بافت بیضه دارند کاهش می‌یابد و گزارش کردند که درمان با ماست سل بلاکرها احتمالاً منجر به افزایش تحرک اسپرم می‌شود (۲۱). این نتیجه با نتایج به دست آمده در این مطالعه و مطالعات قبلی همخوانی ندارد. البته لازم به ذکر است که Yamamoto و Schill افزایش در میانگین تحرک اسپرم در بیماران اولیگواسپرم را گزارش کردند که با نتایج این مطالعه همخوانی ندارد (۱۱، ۲۶). البته با توجه به این که از بین پارامترهای اسپرمی مورفولوژی اسپرم مهمترین پارامتر در شانس باروری حتی در روش‌های ART است به نظر می‌رسد که کاهش اندک در درصد تحرک اسپرم تاثیر چندانی در روند باروری نداشته باشد (۲۸).

در بیماران غیراولیگواسپرم افزایش معنی‌داری در تعداد اسپرم قبل و بعد از درمان مشاهده نمی‌شود. در حقیقت، در این گروه ابتدا کاهش معنی‌دار در تعداد اسپرم در ۴۵ روز پس از درمان و سپس افزایش در تعداد اسپرم در ۹۰ روز پس از درمان ایجاد شده است که البته این افزایش معنی‌دار نبوده و نزدیک به میانگین قبل از درمان است.

Sakkas و همکاران روی افراد نابارور نشان می‌دهد که در این افراد نسبت اسپرم‌های آپوپتیک بیشتر از افراد بارور است. همچنین این محققین بیان کردند که روند طبیعی تولید اسپرم وابسته به ظرفیت سلولهای سرتولی می‌باشد و در بیماران نابارور در طی فرآیندی به نام Abortive apoptosis اسپرم‌های آپوپتیک از بین نرفته و در مایع منی ظاهر می‌شوند (۲۷). در بیمارانی که ابتدا کاهش اسپرم و سپس افزایش آن مشاهده می‌شود احتمالاً تأثیر فرایند Abortive apoptosis بر روی اسپرم‌ها کاهش یافته

شد(۳۱). همچنین Bartoov و همکاران نشان دادند که بین طبیعی بودن هسته اسپرم نسبت به مورفولوژی کل اسپرم با میزان لقاح ارتباط قویتری وجود دارد(۳۲). بنابراین استفاده از روش‌های درمانی که باعث بهبود کیفیت کروماتین هسته اسپرم و همچنین مورفولوژی اسپرم می‌شود در افزایش شانس موفقیت IVF و ICSI مؤثر می‌باشد.

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، درمان با کتوتیفن منجر به بهبود کیفیت اسپرم می‌شود و احتمالاً شانس موفقیت روش‌های ART را بالا می‌برد. همچنین اگرچه استفاده از داروی کتوتیفن در شروع درمان اثرات منفی بر روی پارامترهای اسپرمی دارد اما به تدریج باعث بهتر شدن کیفیت اسپرم می‌شود؛ بنابراین مصرف طولانی مدت این دارو احتمالاً می‌تواند در بهبود پارامترهای اسپرمی و افزایش شانس باروری مؤثر باشد.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری متخصصین و پرسنل محترم مرکز باروری و ناباروری اصفهان، همکاران گروه علوم تشريح دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و همکاری مسئولین پژوهشکده رویان که زمینه اجرای این تحقیق را فراهم آوردند تقدیر و تشکر می‌نماییم. کلیه هزینه‌های مصرفی و غیرمصرفی این تحقیق از بودجه پژوهشکده رویان تأمین شده است.

چشمگیری کاهش می‌یابد و تزریق اسپرم غیرطبیعی منجر به تولید جنین با پتانسیل لانه گزینی کمتر می‌شود(۳۰).

در مطالعه حاضر نیز در ۴ موردی که باروری گزارش شده است بعد از مصرف دارو، در مورفولوژی اسپرم بهبود ایجاد شد و درصد حاملگی نیز نزدیک به درصد گزارش شده توسط مطالعات قبلی می‌باشد. احتمال می‌رود که داروی کتوتیفن با برداشتن بافت فیبروز توبولار و افزایش خونرسانی به اپیتلیوم ژرمینال و در نهایت بهبود مورفولوژی اسپرم منجر به ایجاد حاملگی در این زوجین شده باشد.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مصرف داروی کتوتیفن بعد از ۳ ماه علاوه بر بهبود مورفولوژی اسپرم منجر به بهبود بلوغ هسته اسپرم در هر دو گروه می‌گردد. بدین ترتیب داروی کتوتیفن بر روند اسپرمیوژن تأثیر مثبتی داشته و اسپرمهای با کیفیت بهتری تولید می‌شوند؛ البته مصرف این دارو برخلاف گروه اولیگواسپرم منجر به کاهش معنی دار درصد اسپرم با کمبود پروتامین در گروه غیراولیگواسپرم گردید که احتمالاً در گروه غیراولیگواسپرم ناباروری بیشتر به دلیل نقص در کیفیت کروماتین اسپرم بوده و تاثیر این دارو در این گروه بر روی فرآیند اسپرمیوژنیمی باشد. در مطالعه‌ای که توسط Nasr و همکاران انجام یافته رابطه معنی داری بین کمبود پروتامین و میزان لقاح پیدا

## References

- 1-Jaffe S.B., Jewelewicz R. The basic infertility investigation. Fertil Steril.1991;56(4):599-613.
- 2- Maseki Y., Miyake K., Mitsuya H., Kitamura H., Yamada K. Mastocytosis occurring in the testes from patients with idiopathic male infertility. Fertil Steril.1981;36(6):814-7.
- 3- Meineke V., Frungieri M.B., Jessberger B., Vogt H., Mayerhofer A. Human testicular mast

- cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men. Fertil Steril.2000;74(2):239-44.
- 4- Metcalfe D.D., Baram D., Mekori Y.A. Mast cells. Physiol Rev.1997;77(4):1033-79.
- 5- Cairns J.A., Walls A.F. Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts.J Clin Invest.1997;99(6):1313-21.

- 6- Jezek D., Banek L., Hittmair A., Pezerovic-Panjan R., Goluza T., Schulze W. Mast cells in testicular biopsies of infertile men with 'mixed atrophy' of seminiferous tubules. *Andrologia*.1999;31(4):203-10.
- 7- Nagai T., Takaba H., Miyake K., Hirabayashi Y., Yamada K. Testicular mast cell heterogeneity in idiopathic male infertility. *Fertil Steril*.1992;57(6):1331-6.
- 8-Apa D.D., Cayan S., Polat A., Akbay E. Mast cells and fibrosis on testicular biopsies in male infertility. *Arch Androl*.2002;48(5):337-44.
- 9- Ruoss S.J., Hartmann T., Caughey G.H. Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. *J Clin Invest*.1991;88(2):493-9.
- 10- Haidl G., Schill W.B. Guidelines for drug treatment of male infertility. *Drugs*.1991;41(1):60-8.
- 11- Schill W.B., Schneider J., Ring J. The use of ketotifen, a mast cell blocker, for treatment of oligoasthenozoospermia.*Andrologia*.1986;18:570-3.
- 12-Yamamoto M., Hibi H., Miyake K. Appearance of spermatozoon after administration of mast cell blocker to a patient with azoospermia. *Hinyokika Kiyo*.1994;40(6):541-3.
- 13- Cayan S., Apa D.D., Akbay E. Effect of fexofenadin, a mast cell blocker, in infertile men with significantly increased testicular mast cells. *Asia J Androl*.2002;4:291-294.
- 14- World health organization(WHO). Laboratory manual for the examination of human sperm and sperm- cervical mucus interaction. 3<sup>th</sup> Edition New York, Cambridge university press. Cambridge.1992.pp:1-15.
- 15- Comhaire F., Vermeulen L. Human semen analysis. *Hum Reprod*.1995;1(4):343-362.
- 16-Kruger T.F., Acosta A.A., Simmons K.F., Swanson R.J., Matta J.F., Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in invitro fertilization. *Fertil Steril*.1988;49:112-117.
- 17- Nasr-Esfahani M.H., Razavi S., Mardani M. Relation between different human sperm nuclear maturity tests and In Vitro Fertilization. *J Assist Reprod Genet*.2001;18(4):219-25.
- 18-Hammadeh M.E., Stieber M., Haidl G., Schmidt W. Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. *Andrologia*. 1998;30(1):29-35.
- 19- Young L.C. The mast cell: origin, morphology and function. *Exp Toxicol Pathol*. 1997;49:409-424.
- 20-Cincik M., Sezen S.C.The mast cells in semen: their effects on sperm motility. *Arch Androl*. 2003;49(4):307-11.
- 21- Hashimoto J., Nagai T., Takaba H., Yamamoto M., Miyake K. Increased mast cells in the limiting membrane of seminiferous tubules in testes of patients with idiopathic infertility. *Urol Int*.1988;43(3):129-32.
- 22- Matsuki S., Sasagawa I., Suzuki Y., Yazawa H., Tateno T., Hashimoto T., Nakada T., Saito H., Hiroi M. The use of ebastine, a mast cell blocker, for treatment of oligozoospermia. *Arch Androl*. 2000;44(2):129-32.
- 23- Hibi H., Kato K., Mitsui K., Taki T., Yamada Y., Honda N., Fukatsu H., Yamamoto M. The treatment with tranilast, a mast cell blocker, for idiopathic oligozoospermia. *Arch Androl*.2001; 47(2):107-11.
- 24- Hibi H., Kato K., Mitsui K., Taki T., Yamada Y., Honda N., Fukatsu H., Yamamoto M. Treatment of oligoasthenozoospermia with tranilast, a mast cell blocker, after long-term administration. *Arch Androl*.2002;48(6):451-9.
- 25-Akiyama H., Oeda T., Ichikawa T., Ozawa H., Nagai A., Ohmori H. Clinical evalution of Tranilast on idiopathic male infertility. *Jpn Fertil Steril*. 1996;41:54-58.
- 26-Yamamoto M., Hibi H., Miyake K. New treatment of idiopathic severe oligozoospermia with mast cell blocker: results of a single-blind study. *Fertil Steril*.1995;64(6):1221-3.
- 27-Sakkas D., Mariethoz E., St John J.C. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res*.1999;251(2):350-5.
- 28- Rogers B.J., Bentwood B.J., Van Campen H., Helmbrecht G., Soderdahl D., Hale R.W. Sperm morphology assessment as an indicator of human fertilizing capacity. *J Androl*.1983;4(2):119-25.
- 29- Lundin K., Soderlund B., Hamberger L. The relationship between sperm morphology and rates of fertilization, pregnancy and spontaneous abortion in an in-vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod*.1997; 12(12):2676-81.
- 30- De Vos A., Van De Velde H., Joris H., Verheyen G., Devroey P., Van Steirteghem A. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*.2003; 79(1):42-8.
- 31-Nasr-Esfahani M.H., Razavi S., Mardani M.,

Tofigh Hesabi S. Efficiency of sil-select and percoll to recover spermatozoa with normal chromatin and morphology and the effect these parameters on fertilization, embryo quality and cleavage score. MEFS J.2003;8(1):36-42.

32- Bartoov B., Berkovitz A., Eltes F., Kogosowski A., Menezo Y., Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. J Androl.2002;23(1):1-8.