

## بررسی اثرات ضایعه نخاعی مزمن بر وضعیت کروماتین و DNA اسپرم‌های اپیدیدیمی رت

علیرضا طالبی (Ph.D.)<sup>۱،۲</sup>، احمد حسینی (Ph.D.)<sup>۳</sup>، محمدعلی خلیلی (Ph.D.)<sup>۴</sup>، یوسف صادقی (Ph.D.)<sup>۵</sup>، محمدحسین نصرآصفهانی (Ph.D.)<sup>۶</sup>

- ۱- استادیار، مرکز تحقیقاتی - درمانی ناباروری شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
- ۲- استادیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
- ۳- استاد، مرکز تحقیقات سلولی - مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران.
- ۴- دانشیار، مرکز درمان ناباروری اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی اصفهان، اصفهان، ایران.
- ۵- استاد، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران.
- ۶- دانشیار، پژوهشکده علوم سلولی جهاددانشگاهی (رویان)، تهران، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** کاهش باروری یکی از مشکلات اساسی بیماران ضایعه نخاعی (SCI) می‌باشد. عدم انزال مناسب و کاهش کیفیت اسپرم همانند کم شدن قابلیت حیات، کاهش میزان تحرک و افزایش درصد اسپرم‌های با مورفولوژی ناهنجار به عنوان دلایل اصلی ناباروری در افراد مبتلا به SCI عنوان می‌شوند. از آنجائیکه به دنبال ضایعه نخاعی، عصبدهی اتونوم اپیدیدیم نیز مختل می‌گردد، اسپرمها به مدت طولانی در این ارگان باقی‌مانده و تحت تأثیر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) قرار می‌گیرند. از طرفی به دلیل تغییر عملکرد طبیعی اپیدیدیم، میزان تحرک و فرآیند بلوغ هسته اسپرمها نیز دچار تغییر احتمالی خواهند شد. با توجه به اهمیت تراکم کروماتین اسپرم در پتانسیل باروری، مطالعه‌ای با هدف بررسی اثرات ضایعه نخاعی مزمن بر کیفیت کروماتین و DNA اسپرم‌های اپیدیدیمی در مدل حیوانی رت انجام شد.

**روش بررسی:** تعداد ۴۵ رت نر بالغ از نژاد Wistar انتخاب و به سه گروه SCI، شم و کنترل تقسیم شدند. گروه SCI به دنبال انجام لامینکتومی در سطح T<sub>10</sub>، توسط وزنه‌ای فلزی با وزن ۱۵g که از ارتفاع ۱۰cm رها گردید، دچار ضایعه نخاعی شدند. در گروه شم تنها عمل لامینکتومی صورت پذیرفت و در گروه کنترل هیچ عملی انجام نگردید. پس از هشت هفته اسپرم‌های اپیدیدیم هر سه گروه جهت بررسی پارامترهای مورفولوژی، تحرک و ارزیابی کیفیت کروماتین توسط تست‌های آنیلین بلو، کرومومایسین A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>)، SDS و آکریدین اورانژ (AO) مورد آزمایش قرار گرفتند. داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS و براساس آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یکطرفه، کروسکال والیس و من‌ویتنی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.  $p < 0/05$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

**نتایج:** در بررسی نمونه‌ها پارامترهای مورفولوژی و تحرک در گروه SCI نسبت به دو گروه دیگر تفاوت معنی‌داری نشان داد. تست‌های ارزیابی کروماتین شامل تست‌های آنیلین بلو و CMA<sub>3</sub> تفاوت معنی‌داری را در بین سه گروه نشان نداد؛ در حالیکه تست‌های SDS و AO تفاوت معنی‌داری در بین گروه SCI و دو گروه دیگر مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** فرآیند تراکم کروماتین اسپرم در دو فاز بیضه‌ای و اپیدیدیمی صورت می‌پذیرد. به دنبال ضایعه نخاعی، فاز بیضه‌ای که جابجایی هیستون توسط پروتامین می‌باشد متأثر نمی‌شود، در حالیکه فاز اپیدیدیمی که مربوط به تشکیل باندهای دی‌سولفیدی در بین و داخل مولکول‌های پروتامین می‌باشد، توسط SCI متأثر می‌گردد. به طور کلی می‌توان گفت که علاوه بر کاهش پارامترهای اسپرم، ایجاد اختلال در فرآیند بلوغ هسته و بروز ناهنجاری‌هایی در ساختار DNA اسپرم، می‌تواند به عنوان یکی از دلایل اصلی کاهش پتانسیل باروری در وضعیت SCI در نظر گرفته شود. لذا براساس نتایج این مطالعه می‌توان ضمن بررسی اسپرم افراد SCI در صورت افزایش میزان ناهنجاری‌های کروماتینی با انجام تدابیر درمانی خاص، از میزان این آسیبها کاست و در زمان انجام روش‌های ART با انجام تست‌های تشخیصی پیش آگهی میزان موفقیت روش‌های درمانی را به دست آورد.

**کلید واژگان:** ضایعه نخاعی مزمن، کروماتین، DNA، اسپرم، اپیدیدیم، رت.

**مسئول مکاتبه:** دکتر علیرضا طالبی، مرکز تحقیقاتی - درمانی ناباروری شهید صدوقی یزد، صفائیه، یزد، ایران.

**پست الکترونیک:** ali1345talebi@yahoo.com

## زمینه و هدف

ناباروری یکی از مشکلات اساسی مردانی است که دچار ضایعه نخاعی (SCI) می‌گردند. عدم انزال مناسب و کاهش کیفیت مایع منی به عنوان دلایل اصلی ناباروری در این بیماران می‌باشد (۱). مطالعات انسانی و حیوانی متعددی صورت پذیرفته که همگی نشان‌دهنده کاهش کیفیت اسپرم در افراد مبتلا به SCI می‌باشند (۴-۱). کم شدن قابلیت حیات، کاهش میزان تحرک، ضعف در نفوذ به موکوس سرویکس و افزایش درصد اسپرم با ناهنجاری‌های مورفولوژیکی از موارد قابل ذکر در نمونه‌های اسپرم مردان SCI می‌باشد (۵، ۳، ۲). تغییرات کیفی و کمی اسپرم در وضعیت SCI، در ارتباط مستقیم با اختلال اسپرماتوژنز می‌باشد (۸-۶). اولین بار در سال ۱۹۵۰، Bors متوجه تغییراتی در ساختار بافت‌شناسی بیضه بیماران ضایعه نخاعی شد. در این افراد کاهش تولید سلول‌های جنسی و اختلال فرایند انزال دیده شد. وی علت این اختلالات را به هم خوردن تعادل هورمونی در محور هیپوتالاموس، هیپوفیز، بیضه بیان کرد (۹).

Brindley در سال ۱۹۸۲ نشان داد که تغییر در فعالیت بیضه بدنبال SCI می‌تواند در اثر اختلال در تنظیم درجه حرارت بیضه به دنبال قطع عصبدهی آن باشد. افزایش درجه حرارت بیضه می‌تواند سبب بروز اختلالاتی در اسپرماتوژنز گردد (۱۰). در مطالعه دیگری که در سال ۱۹۹۴ توسط Linsenmeyer صورت پذیرفت، به دنبال ایجاد ضایعه نخاعی در سطح T<sub>9</sub> در رت، ناهنجاری‌های متعددی همانند اسپرماتوژنز ناقص، تحلیل اپیتلیوم ژرمینال، تأخیر در تخلیه اسپرم و تغییرات دژنراتیو در اسپرماتید مشاهده شد (۲). Huang نیز در سال ۱۹۹۵ پس از ایجاد ضایعه نخاعی در رت و اندازه‌گیری تغییرات هورمون‌های هیپوتالاموس، هیپوفیز و بیضه، مکانیزم اصلی اختلالات اسپرماتوژنز

و کاهش کیفیت اسپرم در وضعیت SCI حاد را تغییرات موقت در هورمون‌های مذکور بیان نمود (۶). وی در مطالعه دیگری که در سال ۱۹۹۸ انجام داد، قطع عصبدهی را مکانیزم اصلی اختلالات اسپرماتوژنز در وضعیت SCI مزمن عنوان نمود (۸). به طور کلی با توجه به شواهد موجود، علی‌رغم اتیولوژی ایجاد اختلال در عملکرد بیضه، بروز ناهنجاری‌های متعدد در اسپرماتوژنز را می‌توان به عنوان نتیجه مهم ضایعه نخاعی بیان کرد. یکی از مراحل اساسی فرآیند تولید سلول‌های جنسی نر، ایجاد تراکم کروماتین در طی تمایز اسپرماتید به اسپرم و سپس در طی عبور اپیدیدیمی اسپرم می‌باشد. مطالعات ارتباط مستقیمی بین تراکم مطلوب کروماتین و سلامت ساختار DNA و میزان باروری اسپرم نشان داده‌اند (۱۲، ۱۱). در بیضه پستانداران طی فاز اسپرمیوژنز، هیستون‌های متصل به DNA توسط پروتئین‌های بازی به نام پروتامین جایگزین گردیده و این امر سبب ایجاد تراکم کروماتین و توقف فعالیت نسخه‌برداری می‌شود. در فاز اپیدیدیمی ضمن عبور اسپرمها، گروه‌های تیول (-SH) پروتامینها اکسید می‌شود و در بین و داخل این مولکولها، باندهای دی‌سولفیدی فراوانی تشکیل می‌گردد. وجود این پل‌های دی‌سولفیدی جهت ایجاد تراکم نهایی و پایداری فیزیکی و شیمیایی کروماتین ضروری است. (۱۴، ۱۳). در مطالعه‌ای که بر روی روند ایجاد تراکم کروماتین اسپرم در رت صورت گرفت، مشخص شد که کروماتین اسپرم‌های موجود در سر اپیدیدیم دارای ۸۴٪ تیول آزاد و کروماتین اسپرم‌های موجود در ناحیه دم این ارگان دارای ۱۴٪ تیول آزاد می‌باشند. وجود این تفاوت بیانگر ایجاد باندهای دی‌سولفیدی به میزان ۱/۵ میلیارد به ازاء هر اسپرم، ضمن عبور از اپیدیدیم می‌باشد (۱۵). به دنبال ایجاد تراکم مطلوب کروماتین، DNA دو رشته‌ای اسپرم توسط نوکلئوپروتئینها احاطه می‌شود و از عوامل

## روش بررسی

حیوانات: تعداد ۴۵ رت نر بالغ از نژاد wistar با وزن ۳۰۰-۳۵۰g را به سه گروه SCI، شم<sup>۵</sup> و کنترل تقسیم و به مدت حداقل چهار هفته قبل از شروع آزمایش در شرایط نوری و حرارتی کنترل شده نگهداری شدند.

الف) گروه SCI: تعداد ۱۵ رت توسط تزریق داخل عضلانی کتامین<sup>۶</sup> (۸۰ mg/kg) و زایلازین<sup>۷</sup> (۱۰ mg/kg) بیهوش شدند (۲۰)، پس از مشخص شدن سطحی مهره T<sub>10</sub> توسط لمس، پوست حیوان تراشیده و تحت شرایط استریل با ایجاد برش و برداشتن لایه‌های عضلانی و استخوان مهره سینه‌ای مذکور، عمل لامینکتومی در زیر استریو میکروسکوپ (Zeiss, Germany) انجام گردید. سپس مهره‌های T<sub>9</sub> و T<sub>11</sub> توسط فورسپس مناسب ثابت شده و طناب نخاعی به همراه پوشش سخت شامه<sup>۸</sup> جهت ایجاد ضایعه نخاعی ضربه‌ای مشخص گردید. وزنه فلزی ۱۵g به شکل میله و با سطح مقطع ۲mm از ارتفاع ۱۰cm رها گردید، که پس از برخورد به نخاع و ایجاد SCI بلافاصله از محل برداشته شد. بروز ضایعه نخاعی با مشاهده خونریزی و کبودی توسط میکروسکوپ استریو مورد تأیید قرار گرفت. در مرحله بعد به دنبال شستشوی محل توسط سرم فیزیولوژی، لایه‌های عضلانی و پوست توسط نخ بخیه دوخته شدند. مراقبت‌های پس از عمل شامل ضد عفونی نمودن محل زخم توسط محلول بتادین و آب اکسیژنه ۲٪، تزریق زیر جلدی ۱ml سرم فیزیولوژی و تزریق داخل عضلانی ۳۳/۳ mg/kg آنتی‌بیوتیک سفازولین و قراردادن حیوان بر روی تشک الکتریکی صورت پذیرفت. (۷، ۲۱) بدنبال ایجاد SCI، از روز دوم به مدت حداقل ۲ هفته، روزانه دو مرتبه تخلیه ادرار توسط ماساژ و کمپرس مثانه انجام گردید. در طی هفته اول

مخربی همچون اسیده‌ها، حرارت، پروتئازها، DNase، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)<sup>۱</sup> و پاک‌کننده‌ها در امان می‌ماند (۱۵). بنابراین هرگونه اختلال در فرآیند ایجاد تراکم<sup>۲</sup> کروماتین اسپرم، می‌تواند سبب ایجاد ضایعه در DNA گردد و پتانسیل باروری اسپرم را متأثر می‌سازد. مطالعات، نشان دهنده افزایش درصد اسپرم‌هایی با کروماتین غیر طبیعی (۱۲) و DNA ناهنجار (۱۱، ۱۶) در افراد نابارور نسبت به افراد بارور می‌باشد. Evenson در سال ۱۹۸۰ بیان کرد که هرگاه در بیش از ۲۰٪ اسپرمها، ناهنجاری‌های DNA همانند شکست و یا دناتوره شدن<sup>۳</sup> وجود داشته باشد، نمونه مذکور نابارور محسوب می‌شود (۱۷). علی‌رغم اهمیت فراوان فرآیند متراکم شدن کروماتین و تمامیت ساختار DNA<sup>۴</sup> اسپرم در باروری، این موضوع در بیماران SCI کمتر مورد توجه قرار گرفته است. درحالیکه با در نظر گرفتن بیولوژی SCI، دلایل زیادی مبنی بر ایجاد ضایعات کروماتین در اسپرم این افراد وجود دارد. قطع عصب‌دهی و افزایش درجه حرارت بیضه، اختلال فونکسیون اپیدیدیمی و سیستم انتقالی اسپرم، افزایش میزان ROS از جمله عواملی هستند که می‌توانند بر فرآیند بلوغ هسته اسپرم در وضعیت SCI تأثیرگذار باشند (۱۸، ۱۹، ۱۰-۷).

بنابراین با توجه به کاهش باروری در مردان ضایعه نخاعی و تغییر احتمالی کیفیت کروماتین و DNA اسپرم در این افراد به عنوان یکی از دلایل کاهش، مطالعه‌ای با هدف بررسی تأثیر ضایعه نخاعی بر دو فاز بیضه‌ای و اپیدیدیمی ایجاد تراکم کروماتین اسپرم بدنبال یک دوره اسپرماتوژنز در مدل حیوانی رت در مرکز تحقیقاتی-درمانی ناباروری شهید صدوقی یزد و گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی صورت پذیرفت.

5- Sham  
6- Ketamine  
7- Zylazine  
8- Dura

1- Reactive Oxygen Species  
2- Condensation  
3- Denaturation  
4- DNA integrity

غیرمتحرک تقسیم شدند و بر این اساس صد اسپرم مورد شمارش قرار گرفتند (۲۲).

#### ارزیابی کیفیت کروماتین / DNA اسپرم:

**الف) رنگ آمیزی آنیلین بلو (AB):** پروتئین هیستون دارای تعداد زیادی اسید آمینه‌های لیزین می‌باشد که با رنگ‌های اسیدی همانند AB واکنش می‌دهد و آبی رنگ می‌شود. بنابراین اسپرم‌هایی که پس از ایجاد تراکم در کروماتین خود دارای هیستون اضافی باشند با این رنگ آمیزی مشخص می‌شوند (۲۳، ۲۴). برای انجام این تست پس از تهیه اسمیر از هر نمونه حیوانی و خشک شدن در هوا، توسط فیکساتیو گلو تار آلدئید ۳٪ در بافر فسفات ( $NaH_2PO_4$  ۱۴ ml) با غلظت  $0.2M$  + ۳۶ ml  $Na_2HPO_4$  دارای غلظت  $0.2M$ ،  $pH=7.2$  به مدت ۳۰ دقیقه عمل ثابت شدن صورت پذیرفت. در مرحله بعد نمونه‌ها توسط محلول ۵٪ آنیلین بلو در اسید استیک ۴٪ ( $pH=3/5$ ) به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شدند. پس از شستشو با آب مقطر و مونته کردن توسط چسب انتالن، لامها را با میکروسکوپ نوری و عدسی  $\times 100$  مورد بررسی قرار داده و با شمارش صد اسپرم، تعداد اسپرم‌های بی رنگ (بالغ) و آبی رنگ (نابالغ) در هر نمونه تعیین گردیدند (۲۵).

**ب) رنگ آمیزی کرومومایسین  $A_3$  ( $CMA_3$ ):** رنگ فلورسنت  $CMA_3$  با مولکول پروتئین جهت اتصال به شیار کوچک DNA رقابت می‌نماید و به طور غیرمستقیم میزان کمبود پروتئین را در ساختار کروماتین نشان می‌دهد. اسپرم‌هایی با نقصان پروتئین توسط  $CMA_3$  رنگ می‌گیرند و ضمن بررسی با میکروسکوپ فلورسنت به رنگ زرد درخشان دیده می‌شوند. این اسپرمها در واقع اسپرم‌هایی با کروماتین نابالغ محسوب می‌گردند (۲۶، ۲۵).

برای رنگ آمیزی کرومومایسین، پس از تهیه اسمیر از هر نمونه حیوانی و خشک نمودن در هوا، لامها توسط

نیز استریل نمودن محل زخم و تزریق آنتی بیوتیک ادامه داشت. حیوانات گروه SCI به مدت ۵۶ روز (بیش از یک دوره اسپرماتوژنز در رت) به صورت انفرادی در قفس تمیز مورد مراقبت‌های ویژه قرار گرفتند.

**ب) گروه شش:** تعداد ۱۵ رت، تنها مورد عمل جراحی لامینکتومی قرار گرفتند و مراقبت‌های ویژه پس از عمل بجز تخلیه مثانه، در این گروه نیز صورت گرفت. این حیوانات به مدت ۵۶ روز به صورت انفرادی در قفس‌های تمیز نگهداری شدند.

**ج) گروه کنترل:** تعداد ۱۵ رت بدون انجام هیچ عمل جراحی و یا تزریق، به مدت ۵۶ روز به صورت انفرادی در قفس نگهداری شدند.

**نمونه گیری:** پس از هشت هفته، به دنبال بیهوش نمودن حیوانات توسط زایلازین و کتامین در هر سه گروه، ناحیه اپیدیدیم طی عمل جراحی جدا شده و در محیط کشت  $T_6$  قرار گرفتند.

با فشردن و تکان دادن آرام بافت اپیدیدیم، اسپرمها به صورت swim-out وارد محیط کشت شدند (۱۹). ظروف دهان گشاد محتوی سوسپانسیون اسپرم به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور  $37^\circ C$  با فشار ۵٪  $CO_2$  قرار داده شدند.

**آنالیز اسپرم:** جهت بررسی مورفولوژی اسپرم، با قراردادن یک قطره از نمونه‌های هر سه گروه در گوشه لام، اسمیر تهیه گردید. پس از خشک شدن در هوا، توسط متانول ثابت<sup>۱</sup> و با روش گیمسا، رنگ آمیزی شدند. در نهایت تعداد ۱۰۰ اسپرم طبیعی و غیر طبیعی مورد شمارش قرار گرفتند.

جهت بررسی تحرک اسپرمها، مقدار  $10 \mu l$  از هر نمونه توسط سمپلر<sup>۲</sup> برداشته و در محفظه Mackler chamber تخلیه شد. در بررسی میکروسکوپی نمونه‌ها با بزرگنمایی  $\times 20$  برابر طبق دستورالعمل WHO، اسپرمها به سه گروه تحرک پیشرونده، تحرک درجا و

3- Aniline blue

4- Chromomycine  $A_3$

1- Fixed

2- Sampler

می‌توان طیفی از رنگها شامل آبی روشن، بنفش و ارغوانی، به دست آورد (۲۴،۲۸). استفاده از TB به همراه رتبه‌بندی اندازه سر اسپرم به مراتب دقیق‌تر از اندازه‌گیری سر اسپرم به تنهایی می‌باشد (حداقل در مورد رت).

برای انجام تست SDS، مقدار  $100 \mu\text{l}$  از نمونه هر حیوان برداشته شد و به  $400 \mu\text{l}$  SDS ۱٪ در بافر بورات  $0.05 M$  ( $0.1 \text{ml NaOH } 1M + 0.2 \text{ml } 4\%$  ترابورات سدیم  $0.2 M + 0.4 \text{ml}$  آب مقطر،  $\text{pH}=9$ ) اضافه گردید. پس از انکوبه شدن نمونه‌ها در دمای  $37^\circ C$  به مدت ۱۲۰ دقیقه با اضافه کردن حجم مساوی گلو تار آلدئید ۲/۵٪ در بافر بورات  $0.05 M$ ، از ادامه واکنش ممانعت به عمل آمد (۲۵).

در مرحله بعد اسمیرهای حاصله از سوسپانسیون فوق در هوا خشک شد و توسط مخلوط مساوی اتانول-استن در  $4^\circ C$  به مدت ۳۰ دقیقه ثابت شدند. هیدرولیز اسیدی نمونه‌ها توسط اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال، به مدت ۵ دقیقه در  $4^\circ C$  انجام شد و سپس سه بار و هر بار به مدت ۲ دقیقه توسط آب مقطر شستشو گردید. رنگ‌آمیزی توسط محلول ۵٪ تولوئیدین بلو (Merck, Germany) در بافر ۵۰٪ مک‌الوین به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (۲۴،۲۸).

جهت ارزیابی نمونه‌های فوق با میکروسکوپ نوری، میزان ۱٪ اسپرمها در هر لام شمارش شد و اسپرمها براساس اندازه و رنگ سر رتبه بندی شدند. اسپرم با کروماتین طبیعی (آبی روشن) و بدون تورم در سر تحت عنوان  $S_0$ ، اسپرم با کروماتین نسبتاً ناهنجار (آبی تیره) و سری نسبتاً متورم تحت عنوان  $S_1$ ، اسپرم با کروماتین ناهنجار (بنفش) و سری متورم تحت عنوان  $S_2$  و بالاخره اسپرم با کروماتین بسیار ناهنجار (ارغوانی) و سری بسیار متورم تحت عنوان  $S_3$  در نظر گرفته شد.

(د) رنگ آمیزی آکریدین اورانژ (AO): این رنگ فلورسنت

فیکساتیو کارنوی<sup>۱</sup> (متانول-اسید استیک گلاسیال به نسبت ۳:۱) به مدت ۱۰ دقیقه در یخچال ثابت و سپس توسط  $100 \mu\text{l}$  محلول  $\text{CMA}_3$  به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. در مرحله بعد پس از شستشو توسط بافر مک‌الوین<sup>۲</sup> (سیترات فسفات) و مونته کردن با چسب انتالن لامها با میکروسکوپ فلورسنت (Zeiss, Germany) Axiplane و فیلتر مناسب (460-470nm) بررسی شدند. با شمارش یک صد اسپرم، تعداد اسپرم‌های زرد فلورسنت درخشان ( $\text{CMA}_3^+$ ) و اسپرم‌های فاقد درخشندگی ( $\text{CMA}_3^-$ ) در هر نمونه مشخص گردید (۲۵،۲۶).

(ج) تست بررسی پایداری کروماتین توسط (SDS)<sup>۳</sup> و رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو<sup>۴</sup> (TB): جهت ایجاد پایداری در کروماتین به هنگام عبور اسپرم از اپیدیدیم باندهای دی‌سولفیدی (S-S) در بین و داخل مولکول‌های پروتامین تشکیل می‌شود. پاک‌کننده SDS پس از تخریب غشاء هسته اسپرم، می‌تواند باندهای دی‌سولفیدی را احیاء نماید و سبب تشکیل گروه‌های آزاد تیول در کروماتین گردد. هرچه پایداری کروماتین کمتر باشد، تعداد بیشتری از باندهای دی‌سولفیدی توسط SDS شکسته می‌شود و سر اسپرم تورم بیشتری پیدا می‌کند؛ به همین دلیل به کارگیری SDS را "تست خروج از تراکم" نیز می‌نامند. بسته به میزان خروج از تراکم کروماتین می‌توان اسپرمها را رتبه بندی نمود (۲۵،۲۷،۲۸).

تولوئیدین بلو رنگ‌های متاکروماتیک است که پس از احیاء باندهای دی‌سولفیدی در کروماتین توسط SDS و در دسترس قرار گرفتن DNA، به گروه فسفات آن متصل می‌گردد. بدیهی است که هرچه میزان تراکم کروماتین کمتر باشد، رنگ‌پذیری DNA توسط TB افزایش می‌یابد. در نهایت ضمن بکارگیری رنگ مذکور

- 1- Carnoy
- 2- Mcelvian
- 3- Sodium dodecyl sulfate
- 4- Tolouidine Blue

جداول و شاخصهای آماری به صورت  $M \pm SD$  و برای تحلیل از آزمونهای آماری آنالیز واریانس یکطرفه و در صورت نیاز آزمون تعقیبی LSD و آزمونهای غیرپارامتری من ویتنی و کروسکال والیس استفاده شده است. سطح معنی داری  $\alpha = 0/05$  در نظر گرفته شد و از نرم افزار آماری SPSS ویرایش ۱۱ استفاده گردید.

### نتایج

در این آزمایش تعداد ۵ رت مردند. از این تعداد سه رت در طی عمل جراحی و ایجاد ضایعه نخاعی و دو رت دیگر در اثر پارگی مثانه در ضمن تخلیه ادرار از بین رفتند.

**الف) پارامترهای اسپرم:** با توجه به جدول شماره ۱، میانگین درصد اسپرمهای با تحرک پیشرونده (سریع و آهسته) و مجموع تمامی درجات حرکتی<sup>۱</sup> در گروه SCI نسبت به دو گروه شم و کنترل کاهش معنی داری داشت. در حالیکه این تفاوت در مورد تحرک درجا در بین سه گروه معنی دار نبود. در مقایسه دو به دو گروهها، تحرک پیشرونده و مجموع تمامی درجات حرکتی در بین دو گروه شم و کنترل، بدون تفاوت ولی در بین دو گروه SCI و شم دارای تفاوت معنی داری بودند. در بررسی پارامتر مورفولوژی (جدول شماره ۱) میانگین درصد اسپرمهایی با مورفولوژی غیرطبیعی در گروه SCI افزایش معنی داری را نسبت به گروههای شم

جهت تمایز DNA دو رشته‌ای سالم از DNA تک رشته‌ای دناتوره شده به کار می‌رود. AO با DNA سالم زیر میکروسکوپ فلورسنت سبز رنگ و با DNA تک رشته‌ای قرمز رنگ می‌شود. پس از تهیه اسمیرو خشک نمودن در هوا فیکساسیون اسمیرها توسط محلول کارنوی (متانول-اسیداستیک به نسبت ۱:۳) به مدت حداقل ۲ ساعت (ترجیحاً Overnight) انجام گرفت و سپس رنگ AO تازه با غلظت  $0/19 mg$  در بافر سیترات فسفات به مدت ۱۰ دقیقه بر روی لام ریخته شد. پس از شستشوی لامها توسط آب جاری و قرار دادن لامل روی آنها، توسط میکروسکوپ فلورسنت با فیلتر  $460 nm$  بررسی شد (۲۴، ۲۵).

**بررسی آماری:** پس از جمع‌آوری داده‌ها، آنها را کدگذاری نموده و اطلاعات به کامپیوتر وارد گردید. با استفاده از آزمونهای آماری آنالیز واریانس ANOVA برای مقایسه سه گروه و تست LSD برای مقایسه دوه دو گروهها تجزیه و تحلیل آماری با  $P < 0/05$  صورت پذیرفت.

در مورد تست CMA3 به دلیل عدم توزیع طبیعی داده‌ها از آزمونهای غیر پارامتری Kruskal-wallis برای مقایسه سه گروه و Mann-Whitney برای مقایسه دوه دو گروهها استفاده گردید. تمام داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار می‌باشند. در گزارش داده‌ها از

جدول ۱- بررسی پارامترهای اسپرم در سه گروه کنترل، شم، ضایعه نخاعی در بررسی تأثیر ضایعه نخاعی مزمن بر

### وضعیت کروماتین و DNA اسپرمهای اپیدیدیمی رت

p-value	قطع نخاعی M±SD	شم M±SD	کنترل M±SD	گروهها
				متغیرها
<0/05	4/61±0/2/72	16/25±0/34	16/75±4/95	تحرک پیشرونده سریع (%)
<0/05	24/44±12/75	34/32±8/22	37/08±6/30	تحرک پیشرونده کند (%)
>0/05	22/72±9/04	22/82±9/95	17/08±8/07	تحرک درجا (%)
<0/05	51/77±8/85	73/44±7/02	70/91±5/72	تحرک توتال (%)
<0/05	36/88±10/16	16/00±8/40	11/40±4/40	درصد مورفولوژی غیر طبیعی

$\alpha = 0/05$

جدول ۲- ارزیابی کیفیت کروماتین در سه گروه کنترل، شم، ضایعه نخاعی در بررسی تأثیر ضایعه نخاعی مزمن بر وضعیت کروماتین و DNA اسپرم‌های اپیدیدیمی رت

P-value	قطع نخاعی M±SD	شم M±SD	کنترل M±SD	گروهها
				متغیرها
>۰/۰۵	۱/۴۰±۱/۵۰	۱/۰۰±۱/۴۱	۰/۹۰±۱/۵۹	CMA <sub>3</sub> <sup>+</sup> درصد اسپرم‌های
<۰/۰۵	۷۲/۰۶±۲۲/۷۵	۲۶/۴۱±۹/۸۰	۲۷/۱۶±۸/۵۱	Total score
<۰/۰۵	۱۸/۵۰±۱۳/۴۸	۶/۱۰±۲/۸۴	۱۳/۶۰±۸/۷۵	AO <sup>+</sup> درصد اسپرم‌های
>۰/۰۵	۱±۱/۱	۱±۱/۰۵	۰/۹±۱/۲	درصد اسپرم‌های AB <sup>+</sup>

$\alpha = 0/05$

و گروه‌های کنترل و شم تفاوت معنی‌داری داشت. همچنین صرف میانگین مجموع اسپرم‌هایی با تورم سر ( $S_1+S_2+S_3$ ) در گروه SCI نسبت به دو گروه افزایش معنی‌داری را نشان داد (شکل شماره ۳).

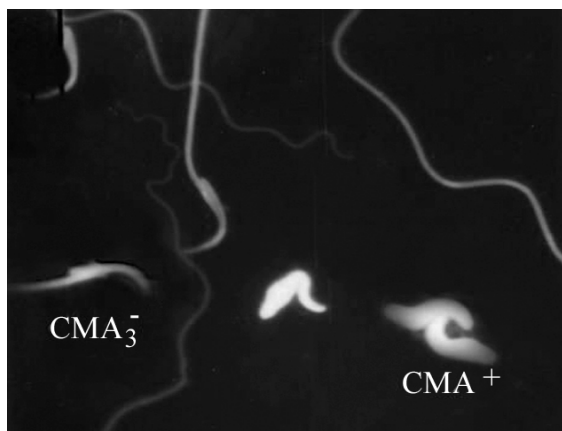
در مقایسه دو به دو گروهها، پارامترهای Total score و مجموع اسپرم‌هایی با تورم سر، در بین گروه‌های شم و کنترل بدون تفاوت بود؛ در حالیکه این دو پارامتر در بین گروه SCI و گروه شم تفاوت معنی‌داری را نشان داد.

در مورد تست AO، با توجه به جدول شماره ۲، تفاوت معنی‌داری در بین گروه SCI و گروه‌های شم و کنترل مشاهده گردید (شکل شماره ۴). به عبارتی در گروه ضایعه نخاعی، میانگین اسپرم‌هایی با DNA غیرطبیعی افزایش معنی‌داری را نسبت به دو گروه دیگر نشان داد. در مقایسه دو به دو گروهها، تفاوت معنی‌داری در بین

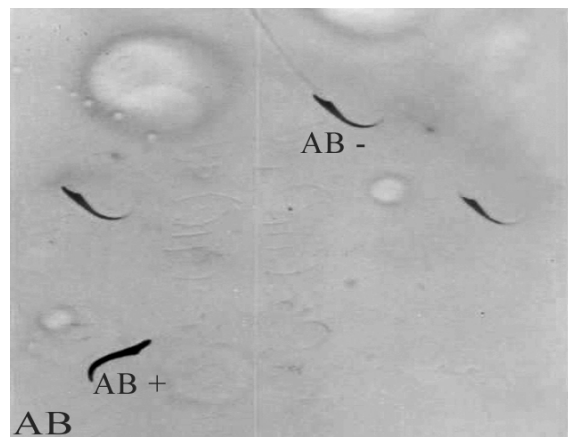
و کنترل نشان داد. مقایسه دو به دو گروهها نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در بین گروه‌های کنترل و شم و تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌های شم و SCI بود. (در بررسی پارامترهای اسپرم  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد).

ب) ارزیابی کیفیت کروماتین / DNA اسپرم: با توجه به جدول شماره ۲ تست‌های AB و CMA<sub>3</sub> (شکل شماره ۱ و ۲) تفاوت معنی‌داری در بین سه گروه نشان نداد. در مقایسه دو به دو گروهها نیز تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌های شم و کنترل و همچنین در بین گروه‌های شم و SCI مشاهده شد. در تست SDS و رنگ‌آمیزی TB، ابتدا برای هر نمونه میزان Total score طبق رابطه زیر محاسبه گردید.

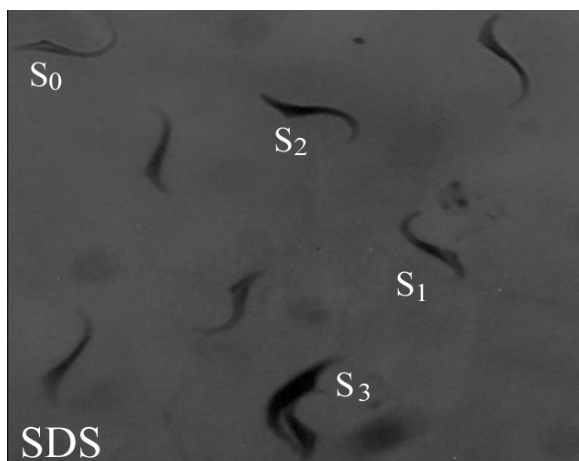
$$\text{Total score} = (S_0 \times 0) + (S_1 \times 1) + (S_2 \times 2) + (S_3 \times 3)$$
 مطابق جدول دو، اسکور توتال در بین گروه SCI



شکل ۲- تست CMA3 اسپرم‌های طبیعی با سر سبز رنگ CMA<sup>-</sup> و اسپرم‌های با نقصان پروتامین به رنگ زرد درخشان CMA<sup>+</sup>، بزرگنمایی  $\times 100$



شکل ۱- تست AB، اسپرم‌های بالغ با سر آبی روشن AB<sup>-</sup> و اسپرم‌های نابالغ با سر بنفش AB<sup>+</sup>، بزرگنمایی  $\times 100$

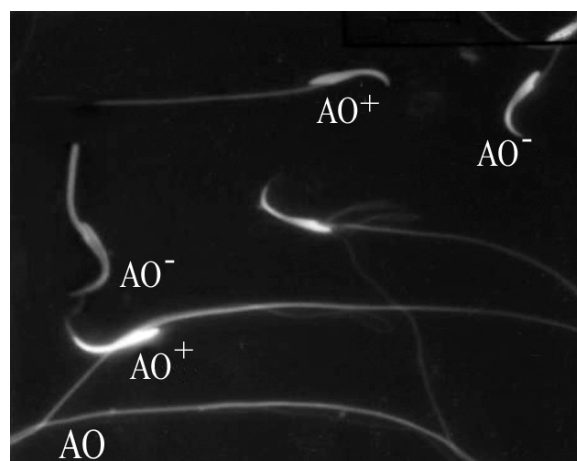


شکل ۴- تست SDS+TB اسپرم‌های با سر نرمال (S0)، با مقدار کمی تورم در سر (S1)، با مقدار متوسط تورم در سر (S2) و با سر بسیار متورم (S3)، بزرگنمایی  $\times 100$ .

اپیدیدیم، مشاهده نمود که سرعت حرکت این اسپرم‌ها در محیط کشت به طور معنی‌داری کاهش یافته است (۲۹).

گروه تحقیقاتی Linsenmeyer نیز در سال ۱۹۹۹ با ایجاد ضایعه نخاعی در سطح T<sub>9</sub> رت، نشان دادند که زمان عبور اسپرم از سر به دم اپیدیدیم به طور معنی‌داری در گروه تجربی نسبت به گروه شم افزایش می‌یابد. آنها تأخیر در انتقال اسپرم را یکی از دلایل اصلی کاهش کیفیت سیمین، خصوصاً کاهش تحرک اسپرم در وضعیت SCI بیان داشتند (۳۰). در مطالعه دیگری که توسط Hung در سال ۲۰۰۳ بر روی رت‌های SCI صورت گرفت، میزان تحرک اسپرم‌های اپیدیدیمی متناسب با شدت ضایعه دچار کاهش شده بود (۴). مطالعات گسترده‌ای که بر روی کیفیت سیمین مردان ضایعه نخاعی صورت گرفته است، همگی در تأیید نتایج حاصل از این تحقیق، نشان دهنده کاهش تعداد اسپرم، کاهش تحرک و افزایش تعداد اسپرم با مورفولوژی ناهنجار می‌باشند (۱-۳).

در بخش دوم این مطالعه ضمن آزمایشات ارزیابی کیفیت کروماتین هسته اسپرم، تفاوت معنی‌داری در دو تست AB و CMA<sub>3</sub> بین گروه SCI و دو گروه دیگر



شکل ۵- تست AO اسپرم‌های با رنگ سبز AO- و اسپرم‌های با رنگ زرد و نارنجی AO+، بزرگنمایی  $\times 100$ .

گروه‌های کنترل و شم مشاهده نشد. در حالیکه بین گروه‌های SCI و شم، این تفاوت معنی‌دار بود (در تمام قسمت‌های بررسی کروماتین اسپرم  $P < 0.05$ ) در نظر گرفته شد).

## بحث

از آنجائیکه بیماران ضایعه نخاعی از نظر عوامل ایجاد کننده، شدت ضایعه و مدت زمان بیماری در وضعیت مشابهی نمی‌باشند و با توجه به شباهت زیاد فرآیند اسپرماتوژنز و بلوغ اسپرم در انسان و رت، جهت انجام بررسی کنترل شده، در مطالعه حاضر از مدل حیوانی رت استفاده گردید. در بخش نتایج، اسپرم حیوانات SCI پارامترهای مورفولوژی و تحرک متفاوتی را نسبت به گروه‌های شم و کنترل نشان دادند. به عبارتی میزان تحرک پیشرونده، کل اسپرم‌های متحرک و درصد اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی به طور معنی‌داری در گروه SCI نسبت به دو گروه دیگر کاهش پیدا کرده بود. این یافته توسط دیگر محققان نیز در مطالعات انسانی و حیوانی به دست آمده است (۱،۲،۴،۹،۱۰).

Billups در سال ۱۹۹۰ با انجام عمل جراحی سمپاتکتومی در رت و بررسی اسپرم‌های ناحیه دم



مشاهده نگردید. از آنجائیکه تست AB نشان دهنده وجود هیستون اضافی و تست  $CMA_3$  نشان دهنده وجود نقصان پروتئین طی جایگزینی هیستون- پروتئین در فاز بیضه‌ای ایجاد تراکم کروماتین اسپرم می‌باشند، می‌توان اظهار نمود که این مرحله از اسپرماتوژنز توسط ضایعه نخاعی تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد. Hou در سال ۱۹۹۵ با بررسی سیمن بیماران SCI و رنگ‌آمیزی اسپرم آنها توسط Acidic Aniline Blue بیان کرد که ضایعه نخاعی تأثیری بر فاز اسپرمیوژنز فرآیند ایجاد تراکم کروماتین ندارد (۳۱).

$CMA_3$  یک تست بسیار اختصاصی و حساس جهت نشان دادن تراکم کروماتین طی اسپرمیوژنز می‌باشد. در یک مطالعه حیوانی، که بلوغ هسته و میزان پروتئین شدن کروماتین اسپرم موش توسط  $CMA_3$  مورد بررسی قرار گرفته بود. در وضعیت طبیعی اسپرم‌های موش ضمن گذرانیدن فرآیند بلوغ هسته در بیضه، بتدریج پروتئینه شده و از تعداد اسپرم‌های  $CMA_3^+$  بتدریج کاسته شد. این میزان در اسپرم‌های اپیدیدیمی حدود صفر درصد گزارش گردیده است (۳۲).

در مطالعه حاضر نیز وضعیتی مشابه با بررسی فوق دیده شد. به عبارتی می‌توان اظهار کرد که فرآیند پروتئینه شدن کروماتین اسپرم در رت توسط ضایعه نخاعی متأثر نشده و روند طبیعی خود را سپری نموده است.

در تست SDS و رنگ‌آمیزی TB، تفاوت معنی‌داری بین گروه SCI و دو گروه شم و کنترل مشاهده گردید. این بدان معناست که در گروه ضایعه نخاعی درصد اسپرم‌های با تورم سر و رنگ متاکروماتیک افزایش یافته است. هنگام استفاده از محلول یک درصد SDS، باندهای دی‌سولفیدی بیشتری در اسپرم‌های با کروماتین ناپایدار شکسته شده و این امر باعث می‌گردد که مولکول DNA پوشش نوکلئوپروتئینی خود را

از دست داده و گروه‌های فسفات بیشتری در دسترس رنگ TB قرار بگیرند.

بدیهی است که هرچه میزان پایداری کروماتین کمتر باشد، میزان تورم هسته و رنگ‌پذیری DNA افزایش خواهد یافت (۲۸ و ۲۴). از آنجائیکه تشکیل باندهای دی‌سولفیدی و ایجاد پایداری در کروماتین اسپرم طی فاز اپیدیدیمی ایجاد تراکم کروماتین صورت می‌پذیرد، می‌توان اظهار نمود که ضایعه نخاعی بر این مرحله تأثیر نامطلوب گذاشته و سبب افزایش درصد اسپرم‌هایی با کروماتین ناپایدار می‌گردد.

با توجه به نتایج مطالعه فعلی ضمن بکارگیری تست AO در گروه SCI میانگین اسپرم‌هایی با DNA غیرطبیعی و دناتوره، افزایش معنی‌داری را نسبت به به گروه‌های دیگر نشان داد.

بطور کلی میزان پایداری کروماتین و ساختار DNA اسپرم در وضعیت ضایعه نخاعی کمتر مورد توجه قرار گرفته است و اطلاعات موجود ناقص و گاه در تناقض می‌باشند. Engh در سال ۱۹۹۲ ضمن بررسی سیمن مردان SCI توسط تکنیک فلوسایتومتری<sup>۱</sup> با مشاهده افزایش تعداد اسپرم‌هایی با شکست DNA بیان کرد که در این بیماران ناهنجاری‌هایی در فرآیند تراکم کروماتین و ساختار DNA اسپرم بوجود می‌آید (۳۳). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نیز مؤید نتایج Engh می‌باشند.

Kempinas در سال ۱۹۹۸ ضمن انجام سمپاتکتومی در رت و بررسی اسپرم‌های اپیدیدیمی حیوان با روش فلوسایتومتری و رنگ‌آمیزی AO، بیان داشت که هیچ شواهدی مبنی بر ایجاد ضایعه در DNA اسپرم بدنبال قطع عصبدهی اتونوم بیضه وجود ندارد (۱۹). حال آنکه Hirsch در سال ۱۹۹۹ با ایجاد ضایعه نخاعی در سطح  $T_{10}$  رت و بررسی کوتاه مدت و دراز مدت اسپرم‌های اپیدیدیمی حیوان، با روشی مشابه با مطالعه

1- Flow cytometry

Kempinas, تفاوت معنی‌داری را در ساختار DNA اسپرم، بین گروه SCI و گروه ششم مشاهده نمود (۷). دلیل احتمالی تفاوت در نتایج حاصل از مطالعات فوق می‌تواند مربوط به تفاوت در روش قطع عصب‌دهی و در نتیجه وسعت منطقه متأثره باشد. بطوریکه Kempinas با برداشتن گانگلیون مزانتریک تحتانی عمل سمپاتکتومی را انجام داد؛ حال آنکه Hirsch با انجام ضایعه نخاعی توسط وزنه وضعیت اختلال در عصب‌دهی را بوجود آورده است. روشی که در مطالعه حاضر بکار گرفته شد، همانند روش Hirsch بود و نتایج حاصل نیز در هر دو مطابقت نشان می‌دهند.

در طی عبور اسپرم از اپیدیدیم ضمن ایجاد باندهای دی‌سولفیدی، میزان رنگ‌پذیری DNA کاهش می‌یابد، فاکتورهایی که سبب اکسیداسیون ناقص گروه‌های تیول و بروز ناپایداری در کروماتین اسپرم می‌شوند، قادرند در افزایش حساسیت DNA نسبت به عوامل دنا‌توره‌کننده (همانند اسید، حرارت) شرکت داشته باشند. به عبارتی کاهش پایداری کروماتین سبب افزایش ضایعات DNA اسپرم می‌گردد؛ چرا که با کاهش پایداری کروماتین و در دسترس قرار گرفتن DNA، میزان حساسیت این مولکول به اسید یا حرارت افزایش یافته و توسط رنگ AO قرمز می‌شود (۳۶-۳۴). در مطالعه فعلی نیز ضمن به کارگیری تست‌های SDS و AO تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌ها SCI و گروه‌های دیگر مشاهده شد.

از بین عواملی که سبب کاهش کیفیت اسپرم در وضعیت SCI می‌شوند، دو عامل افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن ROS و قطع عصب‌دهی می‌توانند در بروز اختلالات کروماتینی اسپرم بیشترین سهم را داشته باشند. نقش کیفیت پایین<sup>۱</sup> پلاسمای سیمن مردان ضایعه نخاعی در کاهش کیفیت اسپرم به اثبات رسیده است (۷، ۱۸، ۱۰، ۲۹، ۳۷-۳۹).

مطالعه نشان می‌دهد که میزان ROS سیمن بیماران SCI نه تنها از افراد بارور بلکه از افراد نابارور با دلایل غیر از ضایعه نخاعی نیز بیشتر می‌باشد (۱۸). ROS توسط اسپرمها (خصوصاً اسپرم‌های غیرطبیعی) و گلبول‌های سفید به داخل مایع سیمن ترشح می‌شود. از آنجائیکه ضایعه نخاعی سبب ایجاد لکوسایتوسپرمی (۴۰) و تتراتوسپرمی (۴۱) می‌شود، کاهش کیفیت اسپرم وابسته به ROS در بیماران SCI و حیواناتی که به صورت تجربی دچار ضایعات نخاعی شده‌اند، دور از انتظار نمی‌باشد. گونه‌های فعال اکسیژن با کاهش ATP داخلی سلول، تأثیر بر غشاء سیتوپلاسمی و ساختار DNA اسپرم می‌توانند سبب کاهش تحرک، کاهش قابلیت حیات، افزایش ناهنجاری‌های مورفولوژیکی و بروز ضایعات در کروماتین و DNA اسپرم گردند (۴۱، ۴۰). در مطالعه حاضر نیز اگرچه میزان ROS اندازه‌گیری نشده است؛ ولی با توجه به نتایج دیگر محققان، کاهش کیفیت اسپرم و ایجاد اختلال در تراکم کروماتین و ساختار DNA اسپرم رت‌های SCI را می‌توان به افزایش ROS نسبت داد. از طرف دیگر مطالعات نشان دهنده وجود ارتباط مستقیم بین اختلال در ساختار کروماتین و کاهش کیفیت اسپرم می‌باشند (۱۶، ۱۷، ۴۲). بنابراین می‌توان اظهار نمود که بدنال ضایعه نخاعی، گونه‌های فعال اکسیژن، اولاً سبب ایجاد اختلال در ماده ژنتیکی اسپرم گردیده و ثانیاً بر مورفولوژی و تحرک اسپرم نیز تأثیر نامطلوب خود را بجای می‌گذارند. علاوه بر این کاهش کیفیت اسپرم نیز می‌تواند نتیجه اختلالات کروماتینی محسوب گردد.

قطع عصب‌دهی بیضه به بدنال ضایعه نخاعی می‌تواند بر فرآیند اسپرماتوژنز تأثیر نامطلوب گذاشته و علاوه بر کاهش کیفیت اسپرم، می‌تواند سبب بروز ضایعاتی در ساختار DNA آن شود (۷، ۳۰). از طرفی به بدنال قطع عصب‌دهی بیضه، درجه حرارت این ارگان بالا رفته و این امر می‌تواند علاوه بر ایجاد اختلال

1- Poor semen quality

در اسپرماتوژنز سبب تغییر در ساختار طبیعی کروماتین گردد و حساسیت DNA را نسبت به عوامل دنا توره کننده افزایش دهد (۳۴، ۱۰). در مطالعه حاضر نیز دنبال ایجاد ضایعه نخاعی درصد اسپرم های دارای DNA ناهنجار، افزایش معنی داری را نسبت به گروه های دیگر نشان داد.

اپیدیدیم مجرای است که اسپرم نابالغ ضمن عبور، فرآیند بلوغ را کامل نموده و در نهایت به اسپرمی متحرک و بالغ می گردد. مطالعه Golan و همکاران نشان می دهد که واکنش های پیچیده ای بین اسپرم های عبوری از یک طرف و مایع اپیدیدیمی، ریز محیطها، ایلیومی اپیدیدیم و بافت بینابینی آن از طرف دیگر جهت انجام فعالیت های طبیعی این عضو صورت می پذیرد (۳۶).

اپیدیدیم، خصوصاً ناحیه دم<sup>۱</sup> آن، اعصاب کلی نرژیک، آدرنژیک و غیر آدرنژیک - غیرکولینرژیک فراوانی را از عقده ها و شبکه های عصبی متعدد دریافت می کند (۴۳). بنابراین این سؤال مطرح است که آیا در ضمن ضایعه نخاعی و قطع عصب دهی اتونوم اپیدیدیم، فرآیند بلوغ اسپرم متأثر می شود؟ بررسی های انجام شده در حیوان آزمایشگاهی رت نشان می دهد که ضمن قطع عصب دهی اپیدیدیم توسط عوامل شیمیایی و یا عمل جراحی، فونکسیون طبیعی این عضو دچار اختلال می گردد (۱۹). تشکیل باندهای دی سولفیدی جهت پایداری کروماتین و ایجاد تحرک در اسپرم دو وظیفه اصلی اپیدیدیم محسوب می شوند. بنابراین وجود باندهای (S-S) به اندازه کافی و مشاهده وضع طبیعی تحرک اسپرمها می توانند نشان دهنده فعالیت طبیعی این عضو باشند. در صورت اختلال در عصب دهی اپیدیدیم در وضعیت SCI و مختل شدن عملکرد طبیعی آن، فاز دوم تراکم کروماتین و میزان تحرک اسپرمها دچار

اختلال گشته و این امر می تواند بر پتانسیل باروری اسپرم تأثیر نامطلوب بگذارد. در مطالعه حاضر نیز هر دو مارکر تراکم کروماتین هسته و میزان تحرک اسپرم توسط ضایعه نخاعی متأثر شده اند. لازم به ذکر است که به دلیل اعتبار تست SCSA در رت و همچنین پایداری بیشتر کروماتین اسپرم رت نسبت به انسان (۴۴) می توان اظهار نمود که اولاً مدل حیوانی رت جهت ارزیابی کروماتین اسپرم دنبال ضایعه نخاعی مدل مناسبی است و ثانیاً در صورت مشاهده تغییرات معنی دار، می توان به طور قطع این موضوع را به نمونه های انسانی تعمیم داد.

### نتیجه گیری

نتیجه کلی حاصل از مطالعه حاضر این است که ضایعه نخاعی مزمن سبب کاهش کیفیت پارامترهای اسپرم کاهش میزان تراکم کروماتین و افزایش میزان اسپرم های با DNA غیرطبیعی می گردد. در بیان علل این وضعیت می توان به قطع عصب دهی اتونوم، تاخیر در انتقال اپیدیدمی اسپرم و همچنین تأثیر نامطلوب عوامل اکسید کننده اشاره نمود. در نهایت پیشنهاد می گردد که در برنامه های کمکی تولید مثل بیماران ضایعه نخاعی تست های بررسی کروماتین اسپرم به عنوان تست های پیشگویی کننده میزان ناباروری بکار گرفته شوند.

### تشکر و قدردانی

با تشکر از ریاست محترم مرکز تحقیقاتی - درمانی ناباروری شهید صدوقی یزد، جناب آقای دکتر افلاطونیان و با تشکر از جناب آقای مهرداد سلیمانی کارشناس محترم آزمایشگاه جنین شناسی که ما را در به ثمر رسانیدن این طرح صمیمانه یاری نمودند.

## References

- 1- Sonksen J., Sorensen F.B. Fertility in men with spinal cord or cauda Equina lesions. *Seminars in neurobiology*. 1992;12(2):106-113.
- 2- Linsenmeyer T.A., Perkasch I. Infertility in men with spinal cord injury. *Arch phys Med Rehabil*. 1991;72:747-54.
- 3- Sedor J.F., Hirsch I.H. Evaluation of sperm morphology of electroejaculates of spinal cord- injured men. *Fertil Steril*.1995;63:1125-27.
- 4- Hosea F.S. Huang. Ming- Tang Li. Spinal cord contusion impairs sperm motility in the rat without disrupting spermatogenesis. *J Androl*.2003;24(3):371-80.
- 5- Brackett N.L., Bloch W.E. Predictors of necrospemia in men with spinal cord injury. *J Urol*.1998;159(3):844-47.
- 6- Huang H.F, Linsenmeyer T.A. Acute effects of spinal cord injury on the pituitary- testicular hormone axis and sertoli cell functions. *J Andrology*.1995;16(2):148-57.
- 7- Hirsch I.H., Bin Huang. Chancellor M.B. spermatogenesis in Early and chronic phases of experimental SCI in the Rodent. *J Andrology*.1999;20(1):63-71.
- 8- Huang H.F., Linsenmeyer T.A., Anesetti R. Suppression and Recovery of spermatogenesis Following SCI in the rat. *J Andrology*.1998;19(1):72-79.
- 9- Bors E., Engle E.T. Fertility in paraplegic males; A Preliminary report of endocrine studies. *J Clin Endocrinol*. 1950;10:381-98.
- 10- Brindley G.S. Deep scrotal temperature and the effect on it of clothing and Paraplegia. *Br J Urol*.1982;54:49-55.
- 11- Sun J.G., Jurisicora A., Capser R.F. Detection of DNA fragmentation in human sperm correlation with fertilization in vitro. *Boil Reprod*.1997;56(3):602-607.
- 12- Filator M.V., Semonova E.V., Vorobeva O.A. Relationship between abnormal sperm chromatin packing and IVF results. *Mol Hum Reprod*.1999;5(9):825-30.
- 13- Francarilla S., Cordeschi G. Chromatin defects in normal and malformed human ejaculated and epididymal spermatozoa. *J Reprod Fertile*.1996;106:259-68.
- 14- Sward W.S., Coffey D.S. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod*.1991;44:569-74.
- 15- Mahi C.A., Yanagimachi R. Induction of nuclear condensation of mammalian sperm in vitro. *J Reprod Fertile*. 1975;44:293-96.
- 16- Spano M., Bonde J.P., Hyollund H.I., Kolstad H.A. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil Steril*.2000;73:43-50.
- 17- Evenson D.P., Darzynkiewicz Z., Melamed M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*.1980;210:1131-33.
- 18- Padron O.F., Brackett N.L., Sharma R.K., Lynne C.M., Thomas A.J.Jr., Agarwal A. Seminal reactive oxygen species and sperm motility and Morphology in men with spinal cord injury. *Fertil Steril*.1997;67(6):1115-20.
- 19- Kempinas W.D., Suarez J.D., Roberts N.L., Strader L.F., Ferrell J., et al. Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy. *Biol Reprod*.1998;59(4):897-904.
- 20- Dana Allen. *Handbook of veterinary Drugs*.1993 Lippincot Co.pp:530.
- 21- Rabchevsky A.G., Fugaccia I., Sullivan P.G., Blades D.A., Scheff S.W., Patrick G. Efficacy of Methylprednisolone therapy for the injured rat spinal cord. *J Neurosci Res*.2002;68(1):7-18.
- 22- World Health Organization. *Laboratory manual for the examination of human semen and semen- cervical mucus interaction*. 3<sup>rd</sup> Edition. Newyork: Cambridge university Press.1999;27.
- 23- Auger J., Mesbah M., Huber C., Dadoune J.P. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects. *Int J Andr*.1990;13(6):452-62.
- 24- Erenpreiss J., Bars J., Lipatnikova V., Erenpreisa J., Zalkalns J., et al. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *J Androl*.2001;22(1):45-53.
- 25- 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.
- 26- Esterhuizen A.D., Franken D.R., Lourens J.C., Van Zyl C., Muller II., et al. Chromatin packaging as an indicator of human sperm dysfunction. *J Assist Reprod Gente*.2000;17(9):508-14.
- 27- Said S., Funahashi H., Niwak K., DNA Stability and thiol- disulphide status of rat sperm nuclei during epididymal maturation and penetration of oocytes. *Zygote*. 1999;7(3):249-54.
- 28- Barrera C., Mazzolli A.B., Pelling C., Strockert J.C. Metachromatic staining of human sperm nuclei after reduction of disulphide bonds. *Acta Histochem*.1993;94(2):141-9.
- 29- Billups K.L., Tillman S.L., Change T.S.K. Reduction of epididymal sperm motility after ablation of the IMG in the rat. *Fertil Steril*.1990;53:1076-82.
- 30- Linsenmeyer T.A., Ottenweller J.E., Huang H.F.S.

- Epididymal sperm transport in normal and recent spinal cord injured Sprague Dawley rats. *J Spinal Cord Med.* 1999;22:102-6.
- 31- Hou J.W., Chen D., Jeyendran R.S. Sperm nuclear maturity in spinal cord-injured men. *Arch Med Rehabil.* 1995;76(5):444-5.
- 32- Sakkas D., Manicardi G., Bianchi P.G. Relationship between the presence of endogenous nick and sperm chromatin packaging in maturing and Fertilizing mouse spermatozoa. *Biol Reprod.* 1995;52(5):1149-55.
- 33- Clausen O.P., Parvis K., Stien R. Sperm quality assessed by flow cytometry and accessory sex gland function in spinal cord injured men after repeated vibration-inducedejaculation. *Paraplegia.* 1993;31(1):3-12.
- 34- Charles C., Robert M.K. Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure. *Biol Reprod.* 1999; 60: 615-20.
- 35- Sailer B.L., Sarkar L.J., Bjordahl J.A., Jost L.K., Evenson D.P. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl.* 1997; 8(3):294-301.
- 36- Golan R., Cooper T.G., Oschry Y., Oberpenning F., Schulze H., et al. Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by Flow cytometry. *Hum Reprod.* 1996;11 (7):1457-62.
- 37- Ricker D.D., Chamness S.L., Hinton B.T., Chang T.S. Changes in luminal fluid protein composition in the rat cauda epididymidis following partial sympathetic denervation. *J Androl.* 1996;17(2):117-26.
- 38- Brackett N.L., Lynne C.M., Weizman M.S., Bloch W. E. Endocrine profiles and semen quality of spinal cord injured men. *J Urol.* 1994;151(1):114-9.
- 39- Brackett N.L., Davi R.C. Seminal plasma of spinal cord injured men inhibits sperm motility of normal men. *J Urol.* 1996;155:1632-1635.
- 40- Saleh R., Agarwal A. Oxidative stress and male infertility. *J Androl.* 2002;23:737-52.
- 41- Sharma R.K., Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology.* 1996;48:835-50.
- 42- Irvine D.S., Twigg J.P., Gordon E.L., Fulton N., Milne P.A., et al. DNA integrity in human spermatozoa. *J Andrology.* 2000;21(4):33-443.
- 43- Hodson N. The nerves of the testis, epididymis, and scrotum. *The testis.* Newyork, Academic press. 1970; 47-99.
- 44- Wanichanon Ch., Roberts K.U., Chipona A.G., et al. Chromatin condensation during spermiogenesis in rats. *Science Asia.* 2001; 27:211-220.