لکوسیتواسپرمی و اثرات آن بر پارامترهای اسپرم در مردان مراجعه‌کننده برای درمان ناباروری

حسن حسنی‌بافرانی (Ph.D.)[1]، محمداسماعیل شهاب‌الدین (M.Sc.)[2]

۱- گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی کاشان، کاشان، ایران

۲- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی کاشان، کاشان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: لکوسیت‌های پراکسیداز مثبت، منبع اصلی تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) در مایع سمینال می‌باشند. استرس اکسیداتیو در نتیجه افزایش ROS از دو منبع لکوسیت‌های مایع سمینال و اسپرمهای معیوب، تولید می‌شود که منجر به پراکسیداسیون لیپیدها، اختلال در تحرک و کاهش توانایی باروری اسپرم می‌شود. هدف از این مطالعه، مقایسه پارامترهای اسپرم (تعداد، تحرک و مورفولوژی اسپرم) در مردان نابارور مبتلا به لکوسیتواسپرمی و بدون لکوسیتواسپرمی و اندازه‌گیری میزان ملان دی‌آلدئید (MDA) و قدرت تام آنتی اکسیدانی ایجاد شده در مایع سمینال می‌باشد.

روش بررسی: تعداد ۱۱۰ مرد مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری کاشان، طی سال‌های ۸۷-۱۳۸٦ بر اساس نتایج آنالیز مایع سمینال در گروه‌های لکوسیتواسپرمی و بدون لکوسیتواسپرمی تقسیم شدند. ٤٥ مرد با پارامترهای نرمال (براساس معیارهای WHO) به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. پس از ارزیابی اسپرم، مایع سمینال برای اندازه‌گیری MDA و TAC در دمای $-80^{\circ}C$ ذخیره شد. میزان ملان دی‌آلدئید و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدان در مایع سمینال، به روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. با استفاده از آزمون‌های کروسکال والیس، χ^2 و فیشر نتایج دو گروه مقایسه شد. $p<0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج: براساس نتایج اسپرموگرام ۳۰ نفر در گروه لکوسیتواسپرمی و ۳۵ نفر علیرغم وجود لکوسیت در مایع سمینال (کمتر از $0/25\times10^6$ در میلی‌لیتر)، در گروه غیر لکوسیتواسپرمی قرار گرفتند. تحرک اسپرم (a+b) در گروه لکوسیتواسپرمی در مقایسه با گروه غیرلکوسیتواسپرمی و گروه افراد سالم، اختلاف معنی‌داری را نشان داد (به ترتیب $p<0/05$ و $p<0/001$). میزان MDA در گروه لکوسیتواسپرمی ($178\pm18/48\mu mol/L$) به مقدار زیادی بیشتر از گروه غیر لکوسیتواسپرمی ($2/7\pm1/73\mu mol/L$) و افراد سالم ($0/4\pm0/14\mu mol/L$) بود (به ترتیب $p<0/001$ و $p<0/0001$). همچنین میزان TAC در گروه لکوسیتواسپرمی ($\mu mol/L$ ٦٣٦±٧٥/٥٨) در مقایسه با گروه غیر لکوسیتواسپرمی ($\mu mol/L$ ٩٨٦±١٠٥/٥٦) و کنترل ($\mu mol/L$ ٩٨٩±٩٥/٩٥) به طور معنی‌داری ($p<0/0001$) پایین‌تر بود.

نتیجه‌گیری: وجود مقادیر بالای لکوسیت منجر به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) در مایع سمینال می شود. رادیکال‌های آزاد و محصولات پایدار ناشی از آن (MDA)، باعث کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (TAC) مایع سمینال می‌گردد. کاهش TAC و افزایش میزان MDA، باعث اختلال در عملکرد اسپرم به ویژه تحرک آن می‌گردد. با توجه به تأثیر مستقیم پارامترهای اسپرم بر قدرت باروری اسپرم و لقاح، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً لکوسیتواسپرمی منجر به اختلال در قدرت باروری مردان می‌گردد.

کلید واژگان: اسپرموگرام، استرس اکسیداتیو، پارامترهای اسپرم، گونه‌های فعال اکسیژن، لکوسیتواسپرمی، ناباروری مردان.

مسئول مکاتبه: دکتر حسن حسنی‌بافرانی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی کاشان، کاشان، ایران

پست الکترونیک: hhassani@kaums.ac.ir

دریافت: ۸۷/۹/۱۷ **پذیرش:** ۸۷/۱۰/۲۳

Downloaded from http://www.jri.ir

زمینه و هدف

نیمی از موارد ناباروری، به علت ناهنجارهای مربوط به مایع سمینال[1] است (۱). ناباروری مردان ناشی از علل متعددی از جمله اختلالات هورمونی، اختلالات کروموزومی، ناهنجاری‌های ساختاری بیضه و اختلال در روند اسپرماتوژنز، سموم، داروها، تشعشعات رادیواکتیو، بیماری‌های کلیوی، کبدی یا خونی، اورکیت، ترومای بیضه، تورشن بیضه، عدم نزول بیضه، واریکوسل، بیماری‌های انسدادی مادرزادی یا اکتسابی مسیر انتقال اسپرم و در نهایت اختلال عملکرد اسپرم می‌باشد و در بعضی موارد نیز علت خاصی برای ناباروری مرد یافت نمی‌شود (۲).

یکی از مکانیسم‌های دخیل در ناباروری مردان، اختلال عملکرد اسپرم به علت واکنش‌های التهابی می‌باشد. این واکنشها ناشی از علل عفونی و غیرعفونی می‌باشد و ویژگی آنها وجود تعداد زیاد لکوسیت در مایع سمینال است؛ این وضعیت لکوسیتواسپرمی[2] نامیده می‌شود. با وجود شیوع بالای لکوسیتواسپرمی در مردان نابارور (۲۰-۱۰٪)، هنوز نقش آن در پاتوژنز ناباروری نامشخص است (۳).

براساس تعریف WHO، لکوسیتواسپرمی به وجود لکوسیت‌های پراکسیداز مثبت بیش از ۱×۱۰^{۶} در هر میلی‌لیتر از مایع سمینال گفته می‌شود (٤). برخی از مطالعات، لکوسیتواسپرمی را وجود $۰/۵\times۱۰^{۶}$ یا $۰/۲۵\times۱۰^{۶}$ لکوسیت در هر میلی‌لیتر مطرح کرده‌اند (٥،٦). ٦۰-٥۰٪ لکوسیت‌های پراکسیداز مثبت را لکوسیت‌های پلی‌مورفونوکلئار[3] (۷) و ۳۰-۲۰٪ بقیه را ماکروفاژها به خود اختصاص می‌دهند (۸).

لکوسیت‌های پراکسیداز مثبت، منبع عمده تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)[4] در مایع سمینال می‌باشند (۹،۱۰). علاوه بر لکوسیت‌های مایع سمینال، اسپرم‌های معیوب بویژه اسپرم‌های حاوی بقایای سیتوپلاسمی نیز می‌توانند به عنوان تولید کننده ROS عمل نمایند (۱۱).

سلول‌های ژرمینال در مردان، در همه مراحل تکاملی خود پتانسیل ایجاد ROS را دارند (۱۲). عده‌ای از محققان، با توجه به نقش لکوسیتها در فاگوسیتوز اسپرم‌های غیر طبیعی، اثر لکوسیتواسپرمی را بر پارامترهای اسپرم (تعداد، تحرک و مورفولوژی)، مثبت می‌دانند؛ این اثر مثبت در برخی مطالعات نیز مشاهده شده است (۱۳،۱٤). گروهی دیگر در مطالعات خود، تأثیر منفی لکوسیتواسپرمی را بر پارامترهای اسپرم نشان داده‌اند. در برخی از مطالعات نیز ارتباطی میان لکوسیتواسپرمی و پارامترهای اسپرم مشاهده نشده است (۱٥،۱٦).

در مطالعه Gomez و همکاران، ارتباط منفی بین میزان ROS تولیدی توسط اسپرم و کیفیت اسپرم در مایع سمینال نشان داده شده است (۱۷). Huszar و همکاران، بیان کردند که کیفیت ضعیف اسپرم و افزایش ROS ایجاد شده، با وجود بقایای سیتوپلاسم در اسپرم مرتبط است. این محققین بیان کردند که وقتی اسپرماتوژنز دچار آسیب شود، در مکانیسم حذف سیتوپلاسم نیز اختلال بروز می‌کند، در نتیجه اسپرم که از اپی‌تلیوم ژرمینال آزاد می‌شود، مقداری از سیتوپلاسم اضافی را نیز با خود دارد. آنها خاطر نشان نمودند که ارتباط معنی‌داری بین وجود سیتوپلاسم اضافی با میزان فعالیت آنزیم کراتین فسفوکیناز وجود دارد (۱۸). Aitken بیان نموده اسپرم‌هایی که سیتوپلاسم اضافی دارند، ممکن است توسط آنزیم گلوکز-٦-فسفات دهیدروژناز، ROS بیشتری تولید نمایند (۱۹). همچنین اسپرم‌های نابالغ در پاسخ به اثر تحریکی استرهای فوربول[5] مانند فوربول ۱۲-

1- Semen
2- Leukocytospermia
3- Polymorphonuclear
4- Reactive Oxygen Species
5- Phorbol esters

Downloaded from http://www.jri.ir

میریستات ۱۳- استات (PMA)[1]، میزان زیادی ROS ایجاد می‌کنند (۱۷،۲۰،۲۱).

اسپرم نسبت به ROS حساس است؛ چرا که غشای پلاسمایی آن حاوی مقدار زیادی اسیدهای چرب غیراشباع است (۲۲) و با توجه به عدم وجود سیتوپلاسم در آن، فاقد آنزیم‌های محافظتی است یا آنزیم‌های محافظتی آن خیلی کم است (۲۳)؛ همچنین آنزیم‌های آنتی اکسیدانی داخل سلولی قادر به محافظت از غشای پلاسمایی اسپرم در نواحی آکروزوم و دم اسپرم نیست (۲٤).

تولید ROS توسط دو منبع لکوسیتها، اسپرم یا هر دو، در مایع سمینال، استرس اکسیداتیو ایجاد می‌گردد که به پراکسیداسیون لیپید، اختلال در تحرک اسپرم و کاهش توانایی باروری آن منجر می‌شود (۲۵)؛ بنابراین تعیین منشاء تولید ROS اضافی در مایع سمینال انسان اهمیت فوق‌العاده‌ای دارد.

اگرچه مطالعات زیادی در ارتباط با لکوسیتواسپرمی انجام شده است، ولی اندازه‌گیری میزان ملان دی‌آلدئید (MDA)[2] و همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (TAC)[3] مایع سمینال در مردان نابارور بدون لکوسیتواسپرمی، در مطالعات محدودی بررسی شده است. هدف از این مطالعه، اندازه‌گیری میزان ملان دی‌آلدئید و همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مایع سمینال در مردان نابارور مبتلا به لکوسیتواسپرمی یا بدون لکوسیتواسپرمی، و ارتباط آن با پارامترهای اسپرم (تعداد، تحرک و مورفولوژی اسپرم) می‌باشد.

روش بررسی

نمونه مایع سمینال از تعداد ۱۱۰ نفر از مردان مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری کاشان طی سال‌های ۱۳۸٦ تا ۱۳۸۷ دریافت شد. آنالیز استاندارد مایع سمینال در آزمایشگاه آندرولوژی مرکز ناباروری، براساس معیارهای WHO انجام شد.

بر اساس نتایج آنالیز مایع سمینال، نمونه‌های مایع سمینال به گروه‌های لکوسیتواسپرمی (تعداد لکوسیت پراکسیداز مثبت بیشتر از $0/25\times10^6/ml$) و بدون لکوسیتواسپرمی (لکوسیت پراکسیداز مثبت با تعداد کمتر از $0/25\times10^6/ml$) تقسیم شدند.

گروهی از مردان که به علت ناباروری همسرشان به مرکز درمان ناباروری مراجعه نموده بودند و پارامترهای مایع سمینال آنها طبق معیارهای WHO نرمال بود، به عنوان گروه کنترل (تعداد ٤٥ نفر) انتخاب شدند.

آزمایش کشت ادرار و مایع سمینال افراد شرکت کننده در مطالعه، برای تشخیص وجود اشریشیا کلی[4]، استرپتوکوک[5] و اوروپلاسما اورالیتیکوم[6] انجام شد. تعداد کلونی‌های تشکیل شده بیشتر یا مساوی ۱۰۰۰/ml، به عنوان کشت باکتریایی مثبت در نظر گرفته شد.

آنالیز مایع سمینال: نمونه مایع سمینال به روش خودارضایی[7] پس از ۳ تا ۵ روز پرهیز جنسی تهیه گردید. پس از مایع شدن[8] مایع سمینال، آنالیز پارامترهای اسپرم (حجم، تعداد، تحرک و مورفولوژی اسپرم) براساس استانداردهای WHO اندازه‌گیری شد. حجم مایع سمینال با پی‌پت مدرج مشخص شد. با استفاده از لام نئوبار (Conception Technologies, san Diego, CA) تعداد اسپرم به ازای واحد حجم تعیین گردید. لام اسمیر مایع سمینال با استفاده از روش پاپانیکولا[9] رنگ‌آمیزی شد و طبق معیارهای WHO، مورفولوژی اسپرم ارزیابی شد. معیار نرمال برای

1- Phorbol 12-myristate 13-acetate
2- Malonyldialdehyde
3- Total Antioxidant Capacity
4- Escherichia coli
5- Streptococcus
6- Ureaplasma urealyticum
7- Masturbation
8- Liquefaction
9- Papanicola

Downloaded from http://www.jri.ir

پارامترهای اسپرم، عبارت از تعداد اسپرم $۲۰\times۱۰^{۶}/ml$≤، تحرک ۵۰٪≤ و مورفولوژی نرمال ۳۰٪≤ (۲۶) بود.

تست پراکسیداز: میزان لکوسیت مایع سمینال با رنگ‌آمیزی پراکسیداز بررسی شد (۲۷). حجم $۲۰\mu l$ مایع سمینال به ویال ۲ میلی‌لیتری (Corning Costar Crop., UK) منتقل شد و سپس $۲۰\mu l$ بافر فسفات (PBS; pH= ۷/۰) و $۴۰\mu l$ محلول بنزیدین به آن اضافه شد. پس از مخلوط کردن محلول فوق ۵ دقیقه در درجه حرارت آزمایشگاه قرار داده شد. لکوسیت‌های پراکسیداز مثبت به رنگ قهوه‌ای، با لام نئوبار و میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۲۰× شمارش شدند. به طور میانگین ۵ تا ۱۰ میدان میکروسکوپی شمارش شد. نتایج حاصل از شمارش، پس از محاسبه میزان رقت مایع سمینال طبق معیار WHO مشخص شد. اگر تعداد لکوسیت پراکسیداز مثبت بیشتر از $۰/۲۵\times۱۰/^{۶}ml$ بود، در گروه لکوسیتواسپرمی قرار می‌گرفت (۲۸). منظور از لکوسیتها در این مطالعه تمام لکوسیت‌های پلی‌مورفونوکلئار و ماکروفاژها می‌باشد.

اندازه‌گیری MDA: میزان ملان دی‌آلدئید طبق پروتکل Rao و همکاران (۲۹) اندازه‌گیری شد. در این روش میزان ملان دی‌آلدئید توسط روش تیوباربیتوریک اسید (TBA)[1] مورد بررسی قرار گرفت. در این روش $۱۰۰\mu l$ از مایع سمینال به $۹۰۰\mu l$ آب مقطر اضافه شد. سپس $۰/۵ml$ از معرف TBA (Sigma alderich corp; USA) به نمونه رقیق شده اضافه شده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای $۱۰۰\ ^{\circ}C$ قرار داده شد. برای تهیه معرف TBA؛ در $۱۰۰ml$ آب مقطر محتوی ۰/۵ گرم NaOH، $۰/۶۷g$ از۲- تیوباربیتوریک اسید و $۱۰۰ml$ اسید استیک گلایسیال اضافه شد. پس از سرد شدن نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و در $۴۰۰۰g$ سانتریفیوژ شد. در نهایت مایع رویی جدا گردید و میزان جذب نوری آن با دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج $۵۳۴nm$ اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت میکرومول در هر لیتر مایع سمینال بیان شده است.

اندازه‌گیری قدرت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC): آزمایش FRAP[2] با استفاده از متد Benzie و Strain قدرت آنتی‌اکسیدانی مایع سمینال (TAC)، اندازه‌گیری و نتایج به صورت میکرومول یون فریک در هر لیتر مایع سمینال بیان شد (۳۰). آزمایش FRAP یک روش ساده برای اندازه‌گیری توانایی احیاکنندگی یون فریک است و اخیراً به‌عنوان یک روش جدید در ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی معرفی شده است. معرف FRAP حاوی $۲/۵ml$ از یک محلول $۱۰mM$ تری پیریدیل تریازین (TPTZ) (Sigma alderich corp; USA) در $۴۰mM$ اسید کلریدریک (Merck, Germany) به اضافه $۲/۵ml$ از بافر استات $۰/۳M$ با pH=۳/۶ می‌باشد. برای این آزمایش $۵۰\mu l$ از مایع سمینال به معرف FRAP اضافه شده و پس از تشکیل کمپلکس رنگی، مقادیر با استفاده از مقایسه تغییرات جذب نوری در $۵۹۳nm$ بین نمونه تحت آزمایش و استاندارد حاوی FeSO4 در مقادیر مشخص بدست می‌آمد.

آنالیز آماری: با استفاده از آزمون کروسکال والیس متغیرهای پیوسته بین سه گروه آنالیز شد. برای آنالیز سایر متغیرها از آزمون‌های χ^2 و فیشر استفاده گردید و ارتباط بین متغیرها با ضریب همبستگی اسپیرمن بررسی شد. محاسبات آماری با نرم‌افزار SPSS انجام شده است و $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه، ۱۱۰ زوج نابارور مراجعه کننده به مرکز ناباروری کاشان طی سال‌های ۸۷-۱۳۸۶ مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سن افراد مورد مطالعه، ۳۵

1- Thiobarbituric Acid

2- Ferric Reducing Antioxidant Power

Downloaded from http://www.jri.ir

جدول ۱- مقایسه پارامترهای مایع منی شامل تعداد لوکوسیت، میزان MDA و TAC و پارامترهای اسپرم در گروه‌های کنترل، لکوسیتواسپرمی و غیر لکوسیتواسپرمی مراجعه کننده به مرکز ناباروری کاشان، ۸۷-۱۳۸۶

متغیر	گروهها (M±SD)		
	کنترل (n=۴۵)	غیرلوکوسیتواسپرمی (n=۳۵)	لوکوسیتواسپرمی (n=۳۰)
حجم مایع منی (*ml*)	۴/۰±۱/۷	۴/۱±۱/۶	۳/۸±۱/۶
شمارش اسپرم (*x۱۰^۶/ml*)	۸۰/۵±۱۰/۴۱	۷۷/۴± ۱۱/۲	۷۶/۴±۱۱/۵
درصد زنده ماندن اسپرم (٪)	۶۷±۱۷	۷۲±۱۵	۷۳±۱۸
مورفولوژی طبیعی (٪)	۱۹±۱۳	۲۰±۱۶	۲۷±۱۶
تحرک اسپرم (a+b) (٪)	۷۴/۷۸±۱۱/۸۲	۶۸/۰۷±۱۳/۸۶[b]	۴۲±۲۱/۴۴[a]
تعداد لوکوسیت (*x۱۰^۶/ml*)	۰	۰/۲۳±۰/۱۵	۰/۷۵±۰/۱۱[c]
میزان MDA (*µmol/L*)	۰/۴±۰/۱۴[c]	۲/۷±۱/۷۳[d]	۱۷۸±۱۸/۴۸[c]
TAC (*µmol/L*)	۹۸۹±۹۵/۹۵	۹۸۶±۱۰۵/۵۶[d]	۶۳۶±۷۵/۵۸[c]

a: اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های افراد سالم با لکوسیتواسپرمی p<۰/۰۰۱، b: اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های غیر لکوسیتواسپرمی با لکوسیتواسپرمی p<۰/۰۵، c: اختلاف معنی‌دار در تعداد لوکوسیت، میزان MDA و TAC بین گروه‌های افراد سالم با لکوسیتواسپرمی p<۰/۰۰۰۱، d: اختلاف معنی‌دار در تعداد لکوسیت، میزان MDA و TAC بین گروه‌های غیرلکوسیتواسپرمی با لکوسیتواسپرمی p<۰/۰۰۰۱.

سال (از ۲۸ تا ۴۱ سال) بود. از بین ۱۱۰ مرد مراجعه‌کننده، ۳۰ نفر لکوسیتواسپرمی داشتند و تعداد ۳۵ نفر، اگر چه در مایع سمینال آنها لکوسیت وجود داشت، تعداد لکوسیت‌های آنان کمتر از $۰/۲۵\times۱۰^۶/ml$ بود.

اگر چه بین میانگین تعداد اسپرم در افراد لکوسیتواسپرمی ($۷۶/\pm۱۱۵\times۴۱۰^۶/ml$) و در افراد سالم ($۸۰/۵\pm۱۰۴/۱\times۱۰^۶/ml$) تفاوت وجود داشت، ولی این اختلاف معنی‌دار نبود.

در این مطالعه، اختلاف معنی‌داری بین مورفولوژی و زنده ماندن اسپرم بین افراد مبتلا به لکوسیتواسپرمی و غیر لکوسیتواسپرمی با گروه افراد سالم مشاهده نشد (جدول ۱).

تحرک اسپرم در گروه لکوسیتواسپرمی در مقایسه با گروه غیر لکوسیتواسپرمی و گروه افراد سالم، اختلاف معنی‌داری را نشان داد (به ترتیب p>۰/۰۵ و p<۰/۰۰۱).

شاخص معرف استرس اکسیداتیو نیز در هر سه گروه اندازه‌گیری شد. تعداد لکوسیت‌های مایع سمینال با ایجاد MDA ارتباط مستقیم دارد. میزان MDA در گروه لکوسیتواسپرمی (۱۷۸±۱۸/۴۸ *µmol/L*) به مقدار زیادی بیشتر از گروه غیر لکوسیتواسپرمی (۲/۷±۱/۷۳ *µmol/L*) و افراد سالم (۰/۴±۰/۱۴ *µmol/L*) بود که این اختلاف بین گروه افراد سالم با گروه لکوسیتواسپرمی، و بین گروه غیر لکوسیتواسپرمی با گروه لکوسیتواسپرمی معنی‌داری می‌باشد (به ترتیب p<۰/۰۰۱ و p<۰/۰۰۰۱).

تحرک اسپرم (a+b) در گروه لکوسیتواسپرمی (۴۲±۲۱/۴۴) در مقایسه با افراد سالم (۷۴/۷۸±۱۱/۸۲) اختلاف معنی‌دار داشت (p<۰/۰۰۰۱).

میزان MDA موجود در مایع سمینال (۱۷۸±۱۸/۴۸ *µmol/L*) در گروه لکوسیتواسپرمی در مقایسه با افراد سالم (۰/۴±۰/۱۴ *µmol/L*) به طور معنی‌داری بیشتر بود (p<۰/۰۰۰۱). همچنین میزان TAC در گروه لکوسیتواسپرمی در مقایسه با گروه غیر لکوسیتواسپرمی و کنترل، به طور معنی‌داری (p<۰/۰۰۰۱) پایین‌تر بوده است (جدول ۱).

بحث

اگرچه مطالعات زیادی در ارتباط با لکوسیتواسپرمی انجام شده است، ولی اندازه‌گیری میزان MDA و همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (TAC)[1] مایع سمینال در

1- Total Antioxidant Capacity

Downloaded from http://www.jri.ir

مردان نابارور بدون لکوسیتواسپرمی، کمتر مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه، میزان MDA و TAC مایع سمینال در مردان نابارور مبتلا به لکوسیتو- اسپرمی یا بدون لکوسیتواسپرمی اندازه‌گیری شد. نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش میزان MDA روی تحرک اسپرم تأثیر منفی دارد. در مطالعه حاضر، در افراد مبتلا به لکوسیتواسپرمی درصد تحرک اسپرم با اختلاف معنی‌داری کمتر از بقیه افراد است ($p<0/01$). در موافقت با این مطالعه، محققین دیگر بیان نمودند که در افرادی که لکوسیت‌های بیشتری در مایع سمینال آنها بوده، درصد تحرک و مورفولوژی اسپرم آنها کمتر از بقیه بیماران بوده است (۱۳،۳۱). مطالعه حاضر در مغایرت با آن نشان داد که اگرچه درصد مورفولوژی طبیعی اسپرمها در مردان مبتلا به لکوسیتواسپرمی کمتر از افراد سالم بوده، ولی اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

در مطالعهٔ Moskovtsev و همکاران، نشان داده شد که در دو گروه با و بدون لکوسیتواسپرمی، تعداد، تحرک و مورفولوژی طبیعی اسپرم تفاوت معنی‌داری با افراد سالم دارد ($p<0/001$) (۲۱، ۹-۱۰).

Saleh و همکاران، بیان کردند که در افراد لکوسیتواسپرمی، درصد تحرک اسپرمها در مقایسه با افراد سالم تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد؛ در حالیکه این ارتباط بین تعداد لکوسیت و مورفولوژی اسپرم معنی‌دار نبوده است (۳۲).

مطالعه حاضر در تأیید مطالعه سایر محققین (۳۵-۳۳)، نشان داد که غلظت لکوسیت‌های مایع سمینال با ایجاد ROS ارتباط مستقیم دارد و میزان MDA در گروه لکوسیتواسپرمی به مقدار زیادی بیشتر از گروه غیر لکوسیتواسپرمی و افراد سالم است.

در موافقت با مطالعات Gambera (۲۲) و Lackner (۲۳)، مطالعه ما نشان داد که افزایش میزان MDA با افزایش تعداد لوکوسیتها ارتباط مستقیم و بر تحرک اسپرم تأثیر منفی دارد. تحرک اسپرم در گروه لکوسیتواسپرمی در مقایسه با افراد سالم، به طور معنی‌داری پایین‌تر است. همچنین میزان MDA موجود در مایع سمینال در گروه لکوسیتواسپرمی در مقایسه با افراد سالم به طور معنی‌داری بیشتر بود، ولی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) در گروه لکوسیتواسپرمی در مقایسه با گروه غیر لکوسیتواسپرمی و کنترل، به طور معنی‌داری پایین‌تر می‌باشد که با مطالعه Saleh و همکاران (۳۲) مطابقت دارد.

اساس مولکولی ناباروری با عامل ناشناخته همچنان مورد بحث است (۳۳). بسیاری از مطالعات توجه خود را بر استرس اکسیداتیو در مردان نابارور متمرکز نموده‌اند (۳۵). استرس اکسیداتیو به علت عدم تعادل بین ایجاد ROS و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مایع سمینال بوجود می‌آید (۱۲). مکانیسم آنتی‌اکسیدانی اسپرم را در برابر اکسیدانها محافظت می‌نماید و گزارش شده که میزان آنتی‌اکسیدان‌های مایع سمینال در مردان نابارور به طور معنی‌داری پایین‌تر از افراد بارور می‌باشد. به هر حال اسپرم فاقد سیستم آنزیمی سیتوپلاسمی لازم برای ترمیم ضایعهٔ ناشی از میزان بالای ROS می‌باشد. این یکی از عواملی است اسپرم را در برابر استرس اکسیداتیو ناتوان می‌کند (۳۲).

لکوسیت‌های موجود در مایع سمینال، یکی از مهمترین منابع ایجاد ROS در مایع سمینال هستند (۳۵). نتایج ما در موافقت با مطالعه Alvarez و همکاران (۳۵) نشان داد که لکوسیت‌های پراکسیداز مثبت به عنوان منبع عمده ایجاد ROS در مایع سمینال می‌باشد. نتایج مطالعه ما نشان داد که در مایع سمینال مردان نابارور مبتلا به لکوسیتواسپرمی در مقایسه با مایع سمینال مردان نابارور بدون لکوسیتواسپرمی و مردان نرمال در گروه کنترل، MDA بیشتری وجود دارد که اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد.

Downloaded from http://www.jri.ir

محققین بیان نموده‌اند کـه لکوسـیت‌هـای مـایع سـمینال ممکـن اسـت اسـپرمها را نیـز تحریـک کننـد تـا ROS بیشتری تولید نمایند. به هر حال مکانیسم ایـن تحریـک مشخص نبوده و ممکن است به تماس مستقیم اسپرم با لکوسیت مربوط شود یا توسط موادی کـه از لکوسـیتها آزاد می‌شود تنظیم گردد (۲۸،۳۵).

نتیجه‌گیری

ایجاد رادیکال‌های آزاد (ROS) در مایع سمینال با وجود مقـادیر بـالای لکوسـیت، افـزایش مـی یابـد. ROS و محـصولات پایـدار ناشـی از آن نظیـر مـلان دی‌آلدئیـد (MDA)، باعث اکسیداسیون ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و در نتیجـه کـاهش ظرفیـت آنتـی‌اکسیدانی (TAC) مـایع سمینال می‌گردد. کاهش TAC و افـزایش میـزان MDA در مایع سمینال، عملکرد اسپرم بـه ویـژه تحـرک آن را دچار اختلال می‌کند. با توجه به ارتباط تحرک اسپرم بـا لکوسیتواسپرمی و نقش اصلی تحرک اسپرم بـر قـدرت لقـاح و بـاروری آن، مـی‌تـوان نتیجـه گرفـت احتمـالاً لکوسیتواسپرمی در بروز ناباروری زوجین مؤثر است. اگر چه گزارش شـده کـه اسـتفاده از آنتـی‌اکسیدان در درمان لکوسیتواسپرمی در بسیاری از مطالعات توصیه شـــده اســـت؛ ولـــی تـــأثیر نهـــایی آن در بهبـــودی لکوسیتواسپرمی هنوز مورد بحث می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از همکاری سرکار خانم دکتـر مرضـیه افـروغ، سـرکار خـانم دکتـر فاطمـه فروزانفـرد، پرسـنل مرکـز درمـان ناباروری کاشان و همچنـین کارکنـان گـروه بیوشـیمی دانشگاه علوم پزشکی کاشان، تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1- Schmidt L, Münster K, Helm P. Infertility and the seeking of infertility treatment in a representative population. Br J Obstet Gynaecol. 1995; 102(12): 978-84.

2- Paul j, Turek MD, editors. Male infertility. New York: McGraw-Hill companies; 2004. 678 p. (Tanagho EA, McAninch JW, editors. Smith's General Urology, Vol. 42).

3- Aziz N, Agarwal A, Lewis-Jones I, Sharma RK, Thomas AJ Jr. Novel associations between specific sperm morphological defects and leukocytospermia. Fertil Steril. 2004; 82(3): 621-7.

4- Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. J Urol. 1999; 161(6): 1831-4.

5- Menkveld R, Kruger TF. Sperm morphology and male urogenital infections. Andrologia. 1998; 30 Suppl 1: 49-53.

6- Menkveld R. Leukocytospermia. International Congress Series (ICG). 2004; 1266: 218-24.

7- Steckel J, Dicker AP, Goldstein M. Relationship between varicocele size and response to varicocelectomy. J Urol. 1993; 149(4): 769-71.

8- Kursh ED. What is the incidence of varicocele in a fertile population? Fertil Steril. 1987; 48(3): 510-1.

9- Yanushpolsky EH, Politch JA, Hill JA, Anderson DJ. Is leukocytospermia clinically relevant? Fertil Steril. 1996; 66(5): 822-5.

10- Thomas J, Fishel SB, Hall JA, Green S, Newton TA, Thornton SJ. Increased polymorphonuclear granulocytes in seminal plasma in relation to sperm morphology. Hum Reprod. 1997; 12(11): 2418-21.

11- Koksal IT, Usta M, Orhan I, Abbasoglu S, Kadioglu A. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. Asian J Androl. 2003; 5(2): 95-9.

12- Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. Hum Reprod. 1999; 14(11): 2801-7.

13- Kiessling AA, Lamparelli N, Yin HZ, Seibel MM, Eyre RC. Semen leukocytes: friends or foes? Fertil Steril. 1995; 64(1): 196-8.

14- Tomlinson MJ, White A, Barratt CL, Bolton AE, Cooke ID. The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leukocytes? Hum Reprod. 1992; 7(4): 517-22.

Downloaded from http://www.jri.ir

15- Van der Ven HH, Jeyendran RS, Perez-Pelaez M, Al-Hasani S, Diedrich K, Krebs D. Leucospermia and the fertilizing capacity of spermatozoa. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1987; 24(1): 49-52.

16- Fedder J, Askjaer SA, Hjort T. Nonspermatozoal cells in semen: relationship to other semen parameters and fertility status of the couple. Arch Androl. 1993; 31(2): 95-103.

17- Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. Int J Androl. 1998; 21(2): 81-94.

18- Huszar G, Vigue L. Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. J Androl. 1994; 15(1): 71-7.

19- Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon -- a cell in crisis? J Reprod Fertil. 1999;115(1): 1-7.

20- Krausz C, Mills C, Rogers S, Tan SL, Aitken RJ. Stimulation of oxidant generation by human sperm suspensions using phorbol esters and formyl peptides: relationships with motility and fertilization in vitro. Fertil Steril. 1994; 62(3): 599-605.

21- Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JB. Leukocytospermia: relationship to sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male factor infertility. Fertil Steril. 2007; 88(3): 737-40.

22- Gambera L, Serafini F, Morgante G, Focarelli R, De Leo V, Piomboni P. Sperm quality and pregnancy rate after COX-2 inhibitor therapy of infertile males with abacterial leukocytospermia. Hum Reprod. 2007;22(4): 1047-51.

23- Lackner JE, Herwig R, Schmidbauer J, Schatzl G, Kratzik C, Marberger M. Correlation of leukocytospermia with clinical infection and the positive effect of antiinflammatory treatment on semen quality. Fertil Steril. 2006; 86(3): 601-5.

24- Cavallini G, Ferraretti AP, Gianaroli L, Biagiotti G, Vitali G. Cinnoxicam and L-carnitine / acetyl-L-carnitine treatment for idiopathic and varicocele-associated oligoasthenospermia. J Androl. 2004; 25(5): 761-70.

25- Sheweita SA, Tilmisany AM, Al-Sawaf H. Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. Curr Drug Metab. 2005; 6(5): 495-501. Review.

26- Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF, Swanson RJ, Brugo SS, Acosta AA. A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. Arch Androl. 1987; 18(3): 275-7.

27- Shekarriz M, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Positive myeloperoxidase staining (Endtz test) as an indicator of excessive reactive oxygen species formation in semen. J Assist Reprod Genet. 1995; 12(2): 70-4.

28- World Health Organisation. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 4th Edition. New York: Cambridge University Press, 1999.

29- Rao B, Soufir JC, Martin M, David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. Gamete Res. 1989; 24(2): 127-34.

30- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem. 1996; 239(1): 70-6.

31- Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. Biol Reprod. 1997; 56(4): 1020-4.

32- Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Anthony J, Thomas AJ, et al. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. Fertil steril. 2002; 78(6): 1215-24.

33- Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, et al. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. Fertil Steril. 2002; 78(6): 1215-24.

34- Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. J Androl. 2004; 25(1): 5-18. Review.

35- Alvarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. Mol Reprod Dev. 1995; 42(3): 334-46.

Downloaded from http://www.jri.ir