Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)
جلد ٦، شماره ٤، زمستان ١٣٩٤، ٥٣٢-٥٢٣

مقایسه پارامترهای اسپرمی و ویژگی‌های عملکردی آن بین افراد بارور و نابارور مبتلا به واریکوسل

فروغ برکت .M.Sc[1]، مرضیه تولایی.M.Sc[1*]،لیلا آزادی .M.Sc[1]، محمد حسین نصراصفهانی .Ph.D[1و2]

۱- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری تولید مثل، اصفهان، ایران
۲- مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Tavalaee.royan@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۲۴

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه، مقایسه پارامترهای اسپرمی(غلظت، تحرک و مورفولوژی)، آسیب DNA، درصد و شدت ROS (Reactive Oxygen Species) و همچنین ارتباط بین این پارامترها، در افراد بارور و نابارور مبتلا به واریکوسل می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی نمونه مایع منی ۸۳ فرد مبتلا به واریکوسل و ۳۲ فرد بارور می‌باشد. پارامترهای اسپرمی بر اساس معیار سازمان بهداشت جهانی (WHO: World Health Organization)، درصد کمبود پروتامین (رنگ آمیزی کرومایسین A3)، آسیب DNA اسپرم (روش TUNEL)، درصد و شدت ROS (رنگ‌آمیزی H2DCFDA) در افراد بارور و نابارور مبتلا به واریکوسل مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که غلظت، درصد تحرک و مورفولوژی طبیعی اسپرم در افراد مبتلا به واریکوسل نسبت به افراد بارور به‌طور معنی‌داری کمتر است. علاوه بر این، درصد آسیب DNA، کمبود پروتامین و درصد اسپرم های ROS مثبت به‌طور معنی‌داری در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل بالاتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری: افزایش استرس اکسیداتیو و دمای بیضه در افراد مبتلا به واریکوسل علاوه بر کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی، بر سلامت کروماتین اسپرم نیز تاثیر منفی داشته و در نتیجه، روند اسپرماتوژنز و میزان باروری را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

واژگان کلیدی: واریکوسل، آسیب DNA، پارامترهای اسپرمی، استرس اکسیداتیو

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

دستگاه تناسلی در مردان مسئول تولید، بلوغ و انتقال اسپرم است که هر گونه ناهنجاری ساختاری و مولکولی در این سیستم موجب ناباروری می‌شود (۱). یکی از رایج‌ترین ناهنجاری‌های ساختاری دستگاه تناسلی که می‌تواند در روند اسپرماتوژنز اختلال ایجاد کند، اتساع و پیچش غیرطبیعی وریدهای طناب اسپرماتیک بیضه است که واریکوسل نامیده می‌شود (۲). مکانیسم‌های پاتولوژیکی پیشنهادی برای افراد مبتلا به واریکوسل شامل هیپوکسی بیضه، اتساع وریدها، افزایش دمای بیضه، افزایش استرس اکسیداتیو و غیره می‌باشد. طبق مطالعات گذشته روند اسپرماتوژنز به افزایش دمای بیضه حساس می‌باشد. با توجه به اینکه در افراد مبتلا به واریکوسل افزایش دما به میزان ۲/۶ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است، لذا این افزایش دما بر روی تکوین اسپرم تاثیر گذاشته و می‌تواند منجر به تولید اسپرم-های نابالغ و احتمالا با آسیب ساختار کروماتین شود (۳). یکی از رویدادهای مهم در روند اسپرماتوژنز جایگزینی هیستون با پروتامین است که نقش مهمی در بسته‌بندی کروماتین اسپرم ایفا می‌کند (۴). همچنین یکی از دلایل آسیب DNA اسپرم، ناشی از نقص در بسته‌بندی کروماتین است که می‌تواند منجر به آپوپتوزیس ناقص و تولید بیش از حد استرس اکسیداتیو شود (۵).

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS: Reactive Oxygen Species)، از مولکول‌های اکسیژن مشتق شده‌اند که در صورت فعالیت بیش از حد، جزء اکسیدانت‌های مضر در نظر گرفته می-شوند و شامل آنیون سوپراکسید ($O2^{\circ}$)، پرکسیدهیدروژن(H_2O_2)، رادیکال پرکسیل (ROO°)، یون هیپوکلریت (ClO°) و رادیکال بسیار فعال هیدروکسیل (OH°) می‌باشند (۶).

در شرایط فیزیولوژیک، مقادیر کمی از استرس اکسیداتیو توسط اسپرم تولید می‌شود که برای ظرفیت‌یابی، واکنش آکروزومی و نهایتا لقاح لازم است. اما تولید بیش از حد استرس اکسیداتیو توسط اسپرم و سایر سلول‌ها مانند لوکوسیت‌ها می‌تواند منجر به آسیب DNA، کاهش تحرک و اختلال در سلامت غشای اسپرم شود (۷ و ۸). لکوسیت‌ها به‌طور طبیعی در پروستات و سمینال وزیکول وجود دارند و مسئول بخشی از استرس اکسیداتیو ایجاد شده در انزال می‌باشد. همچنین در افراد مبتلا به واریکوسل، افزایش سلول‌های التهابی موجود در بیضه مانند سلول‌های ماست‌سل، به‌عنوان منبع مهم دیگر ایجادکننده استرس اکسیداتیو در این افراد است (۹).

مطالعات نشان می‌دهد که اسپرم افراد مبتلا به واریکوسل به‌دلیل کمبود آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در سیتوپلاسم و همچنین وجود اسیدهای چرب غیر اشباع در غشای پلاسمایی در برابر شوک‌های اکسیداتیو بسیار آسیب‌پذیر است. بنابراین استرس اکسیداتیو و آسیب DNA ناشی از استرس، از عوامل عمده کاهش کیفیت مایع منی در این افراد است، که در نهایت می‌تواند موفقیت در باروری را تحت تاثیر قرار دهد (۱۰ و ۱۱). همچنین علاوه بر کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی، افزایش خطر نقص‌های ژنتیکی در نسل‌های بعد را به‌همراه دارد (۱۲). بیشتر مطالعات در افراد مبتلا به واریکوسل، کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی و افزایش آسیب DNA را نشان می‌دهند. بنابراین، روش های مختلفی جهت درمان واریکوسل استفاده می شود، که در برخی موارد، واریکوسل را به هدف جلوگیری از پیشروی آن درمان می‌کنند ولی در بیشتر موارد، هدف از درمان واریکوسل افزایش میزان باروری از طریق بهبود عملکرد بیضه و پارامترهای مایع‌منی می باشد، به‌طوری‌که در برخی از مطالعات پس از درمان از طریق عمل جراحی، بهبودی در پارامترهای اسپرمی، کاهش در آسیب DNA و به‌دنبال آن ایجاد حاملگی در همسران این افراد مشاهده می‌شود (۱۳ و ۱۴).

با وجود نظریه‌های متعددی که مکانیسم پاتوژنز واریکوسل بر عملکرد بیضه را بیان می‌کند، اما هیچ یک نمی‌تواند به‌طور قطعی و واضح، اثر واریکوسل را بر روند اسپرماتوژنز و باروری مردان بیان کند (۱۵).

هدف از این مطالعه، مقایسه پارامترهای اسپرمی(غلظت، تحرک و مورفولوژی)، سلامت DNA و سطح استرس اکسیداتیو بین افراد بارور و نابارور مبتلا به واریکوسل می‌باشد. همچنین ارتباط بین پارامترهای اسپرمی با درصد آسیبDNA، کمبود پروتامین، درصد و شدت ROS در افراد بارور و نابارور مبتلا به واریکوسل مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

انتخاب بیماران: این مطالعه در کمیته اخلاق برای تحقیقات انسانی، در پژوهشکده رویان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان به تصویب رسیده است. افراد شرکت کننده در این مطالعه به دو گروه تقسیم شدند، که گروه اول شامل ۸۸ مرد نابارور مبتلا به

www.SID.ir

Archive of SID

واریکوسل می‌باشند. معیارهای ورود این افراد به مطالعه، شامل اندازه بیضه طبیعی و واریکوسل بالینی درجه II (در این حالت اتساع وریدهای بیضه قابل لمس است) و درجه III (در این حالت اتساع وریدهای بیضه قابل رؤیت است) می‌باشد. افراد آزواسپرمی، لوکوسیتواسپرمی، دارای سابقه عفونت ادراری، سندرم کلاین‌فلتر و ناباروری با فاکتور زنانه از مطالعه حذف شدند. گروه دوم شامل ۳۲ فرد بارور (افراد کاندید اهدای جنین یا تعیین جنسیت) می‌باشند که به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته می‌شوند. از افراد شرکت کننده در این مطالعه رضایت نامه کتبی گرفته شد و یک پرسشنامه حاوی اطلاعات شخصی، نوع ناباروری و مدت زمان ناباروری تکمیل گردید.

جمع‌آوری مایع منی: نمونه مایع منی افراد، بعد از ۳ تا ۴ روز پرهیز از مقاربت جمع‌آوری شد. نمونه مایع منی افراد از لحاظ پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک، مورفولوژی) بر اساس معیار سازمان بهداشت جهانی (WHO: World Health ۲۰۱۰ Organization)، کمبود پروتامین (رنگ آمیزی کرومایسین A3)، آسیب DNA (روش TUNEL) و سطح استرس اکسیداتیو (رنگH2DCFDA) مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی پارامترهای اسپرم: غلظت نمونه اسپرمی با استفاده از دستگاه شمارش اسپرم (Makler Counting Chumber) بر حسب میلیون بر لیتر و میزان تحرک اسپرم به‌وسیله نرم افزار CASA (Computer Aided Sperm Analysis)، بر اساس معیار سازمان بهداشت جهانی (۱۶) مورد ارزیابی قرار گرفت. مورفولوژی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی دیف‌کوئیک (Diff Quik) بررسی شد، که به‌صورت خلاصه به این ترتیب می‌باشد:

حدود ۲۰ تا ۳۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده را بر روی لام قرار داده و پس از تهیه اسمیر و خشک شدن در دمای اتاق، در سه محلول متانول (جهت تثبیت بر روی لام)، ائوزین (جهت رنگ‌آمیزی سیتوپلاسم) و Thiazine-like (جهت رنگ‌آمیزی DNA) به‌ترتیب به‌مدت ۳۰ ثانیه قرار می‌گیرد. پس از خشک شدن در دمای اتاق، در هر لام حدود ۲۰۰ اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری و نرم افزار CASA از لحاظ مورفولوژی بررسی می‌شود.

ارزیابی آسیب DNA با استفاده از روش TUNEL: میزان آسیب DNA با استفاده از روش TUNEL (Apoptosis Detection System Fluorescein, Promega, Mannheim, Germany) که توسط خیرالهی و همکاران (۱۷) قبلا توضیح داده شده، بررسی شد که به شرح زیر می‌باشد.

ابتدا مایع‌منی را توسط محلول بافر فسفات سالین (PBS: Phosphate Buffer Saline) شستشو داده و با تهیه اسمیر بر روی لام، طبق دستورالعمل کیت TUNEL رنگ‌آمیزی شد. بر اساس این روش رنگ فلئورسنت توسط آنزیم rTdT به انتهای 3DNA-OH (قطعات شکسته DNA) اتصال می‌یابد و fluorescein-12-dUTP، DNA را نشاندار می‌کند. بررسی رنگ سبز فلئورسنت مشاهده شده به‌وسیله میکروسکپ فلئورسانس با بزرگنمایی ۱۰۰ (BX51; Olympus; Japan) در ناحیه خلفی سر اسپرم، بیانگر TUNEL مثبت (اسپرم‌های دارای آسیبDNA) می‌باشد و رنگ قرمز نشان دهنده اسپرم‌های TUNEL منفی (اسپرم‌های با DNAسالم) می‌باشد که به‌صورت درصد گزارش می‌شود. برای هر نمونه در حدود ۵۰۰ اسپرم بررسی می‌شود.

کمبود پروتامین با استفاده از رنگ‌آمیزی کرومایسین A3 (CMA3): درصد کمبود پروتامین اسپرم توسط رنگ‌آمیزی CMA3 که قبلا توسط نصر و همکاران (۱۸) بیان شده، مورد بررسی قرار گرفت که به‌شرح زیر می باشد. نمونه مایع‌منی را در محلول کارنوی (متانول و اسید استیک گلاسیال به نسبت ۳:۱) به‌مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد فیکس کرده و از آن اسمیر تهیه می‌شود. هر اسلاید توسط ۱۰۰ میکرو لیتر محلول کرومایسین A3(CMA3,Sigma, USA)، (۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی لیتر بافر مک‌الوین(Mcllvain Buffer) که حاوی ۱۰ میلی‌مولار کلرید منیزیم با pH=۷) به‌مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شده و برای حذف باقیمانده‌ی رنگ اضافی، لام‌ها را در محلول بافر فسفات سالین(PBS) شسته و توسط میکروسکوپ فلئورسانس با بزرگنمایی ×۱۰۰ بررسی می‌شود. برای هر نمونه در حدود ۵۰۰ اسپرم بررسی می‌شود. سر اسپرم-هایی که دارای کمبود پروتامین بوده، زرد درخشان(CMA3مثبت) که به‌صورت درصد اسپرم‌های CMA3+ گزارش می‌شود و آن‌هایی که دارای پروتامین طبیعی بوده، رنگ زرد کم رنگ (CMA3 منفی) می‌باشد و به‌صورت درصد اسپرم‌های CMA3- گزارش می‌شود.

ارزیابی سطح استرس اکسیداتیو: در این مطالعه ارزیابی اسپرم های ROS مثبت با استفاده از رنگ H2DCFDA (DCFH-DA: 2', 7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetat,

www.SID.ir

Archive of SID

Sigma Co, USA) و آنالیز با دستگاه فلوسایتومتری انجام شد که این نشان‌گر، حساسیت بالایی نسبت به H_2O_2 دارد. همان‌طور که قبلا در مطالعه کیانی و همکاران (۱۹) توضیح داده شده است، رنگ DCFH-DA به‌طور فعال به سلول وارد شده و با عمل استراز سلولی، گروه‌های دی‌استات از هم شکافته شده و ترکیب غیر فلوئورسنتی DCFH تشکیل می‌شود. در حضور پراکسید هیدروژن، DCFH به DCF اکسید می‌شود و رنگ فلوئورسنت سبز از خود ساطع می‌کند. این ترکیب قادر به خروج از سلول نیست و با دستگاه فلوسایتومتری قابل ارزیابی است.

آنالیز آماری

آنالیز آماری به‌وسیله نرم افزار SPSS۱۸ (SPSS, Chicago, IL, USA) با استفاده از آنالیز Descriptive، Correlation Coefficient، Independent- Sample T Test مورد ارزیابی قرار گرفت. pvalues<۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود.

نتایج

جمعیت مورد بررسی در این مطالعه شامل ۸۳ فرد مبتلا به واریکوسل با درجه II و III و ۳۲ فرد بارور می‌باشد. جدول ۱ اطلاعات مربوط به پارامترهای توصیفی افراد نابارور مبتلا به واریکوسل و بارور را نشان می‌دهد. در این مطالعه، میانگین سن افراد مبتلا به واریکوسل ۳۰/۷±۰/۵، میانگین سن افراد بارور ۳۶/۶±۱/۰۸ و میانگین سن همسران آن‌ها به‌ترتیب ۲۶/۷±۰/۵ و ۳۲/۲±۰/۸ سال می‌باشد. همچنین میانگین مدت زمان ناباروری افراد مبتلا به واریکوسل ۲/۱±۰/۱ سال است (جدول۱).

جدول ۱: پارامترهای توصیفی در افراد نابارور واریکوسل و بارور

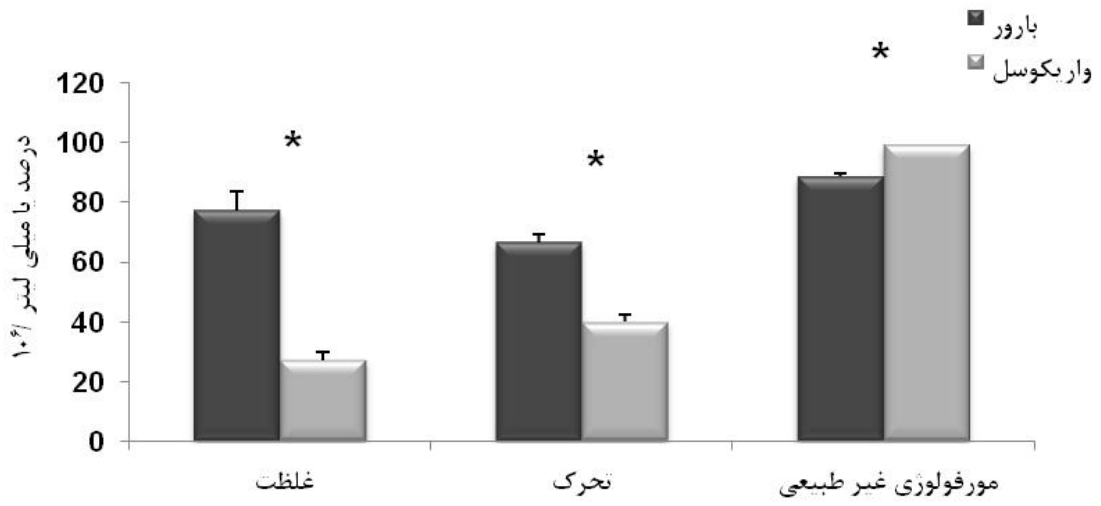
پارامترها	گروه	حداقل	حداکثر	میانگین ± خطای استاندارد
غلظت اسپرم(10^6میلیون / میلی‌لیتر)	واریکوسل	۰/۲	۱۲۷	۲۷/۱ ± ۲/۸
	بارور	۲۵	۲۰۰	۷۷/۳ ± ۶/۲
درصد تحرک اسپرم	واریکوسل	۰۰	۸۴/۶	۳۹/۹ ± ۲/۴
	بارور	۲۳/۹	۹۴/۴	۶۶/۵ ± ۲/۹
درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم	واریکوسل	۹۸	۱۰۰	۹۹/۲ ± ۰/۰۷
	بارور	۷۱	۹۷	۸۸/۵ ± ۰/۹
حجم (میلی لیتر)	واریکوسل	۰/۵	۹/۷	۳/۴ ± ۰/۱۹
	بارور	۱/۵	۸/۶	۳/۷ ± ۰/۲۸
سن مرد (سال)	واریکوسل	۲۲	۴۶	۳۰/۷ ± ۰/۵
	بارور	۲۸	۵۵	۳۶/۶ ± ۱/۰۸
سن خانم (سال)	واریکوسل	۱۷	۴۰	۲۶/۷ ± ۰/۵
	بارور	۲۶	۴۵	۳۲/۲ ± ۰/۸
مدت ازدواج (سال	واریکوسل	۲	۱۷	۳/۸ ± ۰/۳
	بارور	۲	۲۱	۱۱/۴ ± ۰/۹
مدت ناباروری (سال)	واریکوسل	۰/۰۸	۱۷	۲/۱ ± ۰/۱

مقایسه پارامترهای اسپرمی در افراد بارور و نابارور واریکوسل

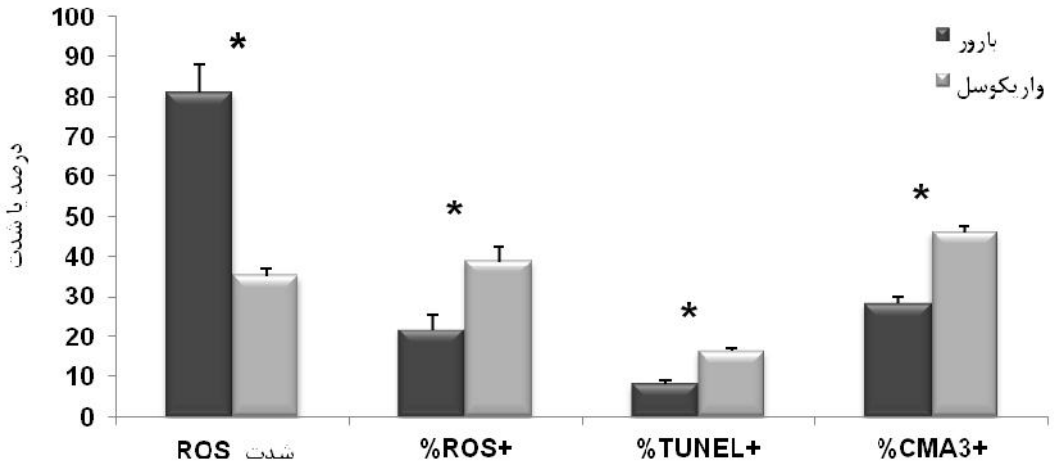
نمودار ۱ میانگین پارامترهای اسپرمی شامل غلظت، درصد تحرک و درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم را در افراد بارور و نابارور مبتلا به واریکوسل نشان می‌دهد. غلظت اسپرم در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل (۲۷/۱±۲/۸) به‌طور معنی‌داری کمتر از افراد بارور (۷۷/۳±۶/۲) می‌باشد (p<۰/۰۰۱). همچنین درصد تحرک اسپرم در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل (۳۹/۹±۲/۴) به‌طور معنی‌داری کمتر از افراد بارور (۶۶/۵±۲/۹) است (p<۰/۰۰۱). به‌علاوه درصد مورفولوژی غیرطبیعی در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل (۹۹/۲±۰/۰۷) به‌طور معنی‌داری بیشتر از افراد بارور (۸۸/۵±۰/۹) می‌باشد (p<۰/۰۰۱).

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱: مقایسه پارامترهای اسپرم بین افراد بارور و نابارور واریکوسل (میانگین ±انحراف معیار، p<۰/۰۵)*



نمودار۲: مقایسه شدت و درصد ROS، درصد اسپرم های CMA3 مثبت و TUNL مثبت بین افراد بارور و نابارور واریکوسل (میانگین ±انحراف معیار، p<۰/۰۵)*

مقایسه آسیب DNA، کمبود پروتامین و استرس اکسیداتیو اسپرم بین افراد بارور و نابارور مبتلا به واریکوسل

درصد آسیب DNA اسپرم با استفاده روش TUNEL ارزیابی شد. درصد اسپرم‌های دارای آسیب DNA (TUNEL مثبت) در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل و بارور به‌ترتیب ۱۶/۲±۰/۹ و ۸/۱±۰/۷ است. بنابراین درصد آسیب DNA در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل نسبت به افراد بارور به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) بیشتر می‌باشد. نتایج بررسی کمبود پروتامین با استفاده از رنگ‌آمیزی CMA3 نشان می‌دهد که درصد اسپرم های CMA3 مثبت در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل و بارور به‌ترتیب ۴۶/۰۷±۱/۶ و ۲۸/۱±۱/۹ می‌باشد که این پارامتر نیز در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل نسبت به افراد بارور به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) بالاتر است.

سطح استرس اکسیداتیو با رنگ‌آمیزی DCF و با استفاده از آنالیز فلوسایتومتری ارزیابی شده است. درصد اسپرم‌های ROS مثبت در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل و بارور به‌ترتیب ۳۸/۷±۳/۶ و ۲۱/۷±۳/۶ بود که در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل نسبت به افراد بارور به‌طور معنی‌داری بالاتر بوده (p<۰/۰۰۱)، اما شدت ROS در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل (۳۵/۰۴±۱/۹) در مقایسه با افراد بارور (۸۰/۹۲±۷/۰۵) به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) پایین‌تر است (نمودار ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

ارتباط پارامترهای اسپرمی با درصد آسیب DNA، کمبود پروتامین، درصد و شدت استرس اکسیداتیو

ارتباط بین پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک، مورفولوژی غیرطبیعی) با درصد آسیب DNA، کمبود پروتامین، درصد و شدت استرس اکسیداتیو در افراد بارور و نابارور مبتلا به واریکوسل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ارائه شده در جدول ۲ نشان می‌دهد که در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل، بین غلظت اسپرم با درصد و شدت ROS ارتباط مثبت و معنی‌داری وجود دارد ($p<0/05$). همچنین بین درصد تحرک اسپرم و درصد اسپرم های ROS مثبت ارتباط مثبت و معنی‌داری وجود دارد ($p<0/05$). به‌علاوه ارتباط منفی و معنی‌داری بین درصد تحرک اسپرم با آسیب DNA وجود دارد ($p<0/01$) (جدول۲). در افراد بارور فقط بین درصد کمبود پروتامین (اسپرم‌های CMA3مثبت) با غلظت و تحرک اسپرم ارتباط منفی و معنی‌داری وجود دارد ($p<0/01$).

جدول ۳ ارتباط بین میزان آسیب DNA (درصد اسپرم‌های TUNEL مثبت)، کمبود پروتامین (درصد اسپرم‌های CMA3 مثبت)، درصد و شدت ROS را با یکدیگر نشان می‌دهد. در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل، رابطه مثبت و معنی‌داری بین درصد اسپرم‌های ROS مثبت و شدت ROS ($p<0/01$) وجود دارد. همچنین در این افراد، رابطه معنی‌دار و منفی بین درصد آسیب DNA و درصد ROS مثبت ($p<0/05$) وجود دارد. به‌علاوه ارتباط معنی‌دار و مثبت بین درصد کمبود پروتامین و شدت ROS در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل مشاهده شد ($p<0/05$)(جدول۳).

جدول ۲: ارتباط بین پارامترهای اسپرمی با درصد و شدت ROS، درصد اسپرم‌های TUNEL مثبت و CMA3 مثبت اسپرم در افراد بارور و نابارور واریکوسل.

پارامترها	گروه	غلظت (۱۰^۶میلیون در هر میلی‌لیتر)	درصد تحرک	درصد مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم
درصد اسپرم های ROS مثبت	واریکوسل	۰/۴ **	۰/۳ **	- ۰/۰۳
	بارور	۰/۰۳	۰/۱	- ۰/۰۵
شدت ROS	واریکوسل	۰/۲ *	۰/۰۲	۰/۰۱
	بارور	۰/۰۷	- ۰/۳	- ۰/۰۶
درصد اسپرمTUNELمثبت	واریکوسل	- ۰/۰۹	- ۰/۲ *	۰/۱
	بارور	- ۰/۲	- ۰/۲	۰/۳
درصد اسپرمCMA_3مثبت	واریکوسل	- ۰/۱	-۰/۱	۰/۰۶
	بارور	- ۰/۴ *	- ۰/۴ *	۰/۲

***$p<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود. * $p<0/01$ معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود.*

جدول ۳: ارتباط بین درصد اسپرم‌های TUNEL مثبت، CMA3 مثبت، درصد و شدت ROS با یکدیگر در افراد نابارور واریکوسل و بارور.

پارامترها	گروه	ROS شدت	درصد اسپرم‌های	درصد اسپرم‌های مثبت CMA_3
درصد اسپرم های ROS مثبت	واریکوسل	۰/۲ *	-۰/۳ **	۰/۰۷
	بارور	- ۰/۳	۰/۰۳	۰/۱
شدت ROS	واریکوسل	--------	۰/۲	۰/۴ **
	بارور	--------	-۰/۰۴	۰/۱
درصد اسپرمCMA_3مثبت	واریکوسل	۰/۲	--------	۰/۲
	بارور	-۰/۰۴	--------	۰/۲

***$p<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود. * $p<0/01$ معنی‌دار در نظرگرفته می‌شود.*

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

واریکوسل به اتساع وریدهای شبکه پامپینی فرم طناب اسپرماتیک اطلاق می‌شود (۳). در دهه‌های گذشته تا حدودی ارتباط بین ناباروری و واریکوسل مشخص شده، اما تحقیقات اخیر، بیشتر بر اساس مطالعات مولکولی و ژنتیکی می‌باشد، به این امید که با بررسی‌های بیشتر در این زمینه افق‌های جدیدی برای درمان ناباروری در مردان مبتلا به واریکوسل، باز شود. مهم‌ترین نظریه در مورد تاثیر واریکوسل بر روی عملکرد بیضه، تغییر در کارایی تبادل دما در داخل بیضه و اختلال در فرآیند اسپرماتوژنز می‌باشد (۳ و ۱۱). یکی از عوامل اختلال در عملکرد اسپرم در افراد مبتلا به واریکوسل، استرس اکسیداتیو ناشی از استرس دمایی در این افراد است (۲۰). تولید بیش از حد ROS باعث آسیب به غشای اسپرم، کاهش تحرک و توانایی اسپرم در اتصال به تخمک شده و همچنین آسیب مستقیم به DNA اسپرم و اثرات غیرمستقیم بر سلامت ژنوم جنین و در نهایت کاهش باروری را به همراه دارد (۲۰ و ۲۱).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در افراد مبتلا به واریکوسل غلظت، تحرک و مورفولوژی طبیعی اسپرم به‌طور معنی‌داری نسبت به افراد بارور پایین‌تر است که با نتایج مطالعات دیگر مطابقت دارد (۲۲ و ۲۳). این نتایج تاکید بیشتری بر این تئوری دارد که افزایش دمای بیضه می‌تواند منجر به نقص در روند اسپرماتوژنز و در نتیجه مختل شدن تولید و تمایز اسپرم در بیضه‌ها شود. مطالعات نشان می‌دهد که در افراد مبتلا به واریکوسل، با افزایش میزان آپوپتوزیس، جمعیت رده‌های مختلف سلول‌های زایا، مانند اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و اسپرم کاهش می‌یابد. به‌علاوه، عبور اسپرم‌های تولید شده از لوله‌های منی ساز، تحت تاثیر واریکوسل قرار گرفته و در نهایت، باعث کاهش تعداد اسپرم انزالی در این افراد می شود (۲۶-۲۴). از طرفی واریکوسل می‌تواند با تاثیر بر سلول‌های سرتولی باعث واکوئله شدن و آزاد شدن اسپرم‌ها قبل از بلوغ کامل شده، که از این طریق باعث حضور اسپرم‌های نابالغ و دارای مورفولوژی غیر طبیعی در انزال می‌شود (۲۲). همچنین در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل، افزایش سطح رادیکال‌های آزاد، باعث پراکسیداسیون اسید های چرب غیر اشباع در ساختار غشای سر اسپرم و قطعه میانی شده و با تغییر در سیالیت غشا، باعث کاهش میزان تحرک اسپرم می‌شود (۲۷).

اختلال در فرآیند اسپرماتوژنز منجر به تولید اسپرم‌هایی می‌شود که علاوه بر نقص در پارامترهای اسپرمی، سطوح متفاوتی از میزان نقص در ساختار کروماتین و افزایش سطح استرس اکسیداتیو را نشان می‌دهند. بنابراین در این مطالعه سلامت کروماتین اسپرم و سطح استرس اکسیداتیو نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه، سلامت ژنوم اسپرم با استفاده از روش TUNEL و CMA3 بررسی شد و اختلاف معنی‌داری در گروه واریکوسل و بارور مشاهده شد، به‌طوری‌که میزان آسیب DNA و کمبود پروتامین در افراد مبتلا به واریکوسل در مقایسه با افراد بارور بیشتر است که با نتایج مطالعات دیگران در این زمینه مطابقت دارد. بر طبق نتایج Blumer و همکاران (۲۸)، مردان مبتلا به واریکوسل درصد بالاتری از آسیب DNA در مقایسه با افراد سالم دارند. همچنین Fuse و همکاران (۲۹) گزارش کردند که میزان آسیب DNA، در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل در مقایسه با افراد نابارور بدون واریکوسل و افراد بارور، به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر است. در تایید موارد فوق می‌توان بیان کرد که در افراد مبتلا به واریکوسل فاکتورهای مختلفی منجر به آسیب DNA می‌شود که ممکن است در هر یک از مراحل اسپرماتوژنز رخ دهد. در این رابطه فرضیه‌های متعددی وجود دارد که به‌شرح زیر می‌باشد: ۱) کمبود پروتامین در هسته اسپرم و یا عدم جایگزینی مناسب پروتامین به‌جای هیستون در مرحله اسپرمیوژنز، DNA را مستعد آسیب می‌کند. ۲)گونه‌های فعال اکسیژن می‌تواند مستقیما به بازهای DNA اسپرم متصل شده و یا با فعال کردن آپوپتوزیس سبب آسیب DNA شود (۴ و ۱۱).

مطالعات مختلف نشان می‌دهد که چندین روش برای بررسی استرس اکسیداتیو وجود دارد که از آن جمله می‌توان به اندازه‌گیری مارکرهای اختصاصی و کلی افزایش ROS (مانند مالون دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن، نیتریک اکساید و پراکسید هیدروژن) و یا اندازه‌گیری ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانت‌های پلاسما (TAC: Total Antioxidant Capacity) (اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیر آنزیمی) اشاره کرد (۳۰). در این مطالعه، ارزیابی اسپرم‌های ROS مثبت با استفاده از نشان‌گر H2DCFDA و آنالیز فلوسایتومتری انجام شد که این نشان‌گر حساسیت بالایی نسبت به H_2O_2 دارد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که درصد اسپرم های ROS مثبت به‌عنوان شاخص تولید ROS، در گروه واریکوسل نسبت به افراد بارور به‌طور معنی‌داری بالاتر است. این نتیجه مطابق با نتایج مطالعات دیگری می‌باشد که نشان می‌دهند در مردان نابارور مبتلا به واریکوسل، افزایش سطح استرس اکسیداتیو، نیتریک اکساید و

www.SID.ir

Archive of SID

پراکسیداسیون لیپید بیش از افراد نابارور بدون واریکوسل می‌باشد (۲۱ و ۳۱). همچنین بسیاری از مطالعات بیان کردند که در افراد واریکوسل علاوه بر افزایش سطح استرس اکسیداتیو، میزان آنتی‌اکسیدانت‌ها در مایع‌منی نیز نسبت به افراد بارور کاهش می‌یابد. بنابراین می‌توان بیان کرد که احتمالا کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی می‌تواند باعث افزایش سطح استرس اکسیداتیو و بر هم خوردن تعادل در مایع منی افراد نابارور مبتلا به واریکوسل شود (۳۱ و ۳۲). برای مثال، آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز گلوتاتیون که وظیفه سم زدایی H_2O_2 را بر عهده دارند، حساس به حرارت می باشند که افزایش دمای اسکروتوم می‌تواند منجر به کاهش فعالیت و یا غیر فعال شدن آن‌ها شود. در نتیجه کاهش فعالیت آنزیمی ممکن است که توجیهی برای افزایش سطح H_2O_2 مشاهده شده در مایع منی افراد نابارور مبتلا به واریکوسل باشد (۳۳).

در مطالعه حاضر، شدت ROS در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل نسبت به افراد بارور به‌طور معنی‌داری پائین‌تر است. طبق مطالعه‌ای که Aitken و همکاران (۳۴) بر روی افراد نابارور انجام دادند، اسپرم‌هایی که ROS مثبت هستند به‌تدریج به سمت TUNEL مثبت و مرحله آخر آپوپتوزیس پیش می‌روند و در نتیجه تولید بیش از حد ROS باعث مرگ سلولی شده که در نهایت در این افراد، شدت ROS کاهش می‌یابد.

در این مطالعه، در افراد مبتلا به واریکوسل، ارتباط مثبت و معنی‌داری بین شدت ROS با کمبود پروتامین وجود دارد. از مهم‌ترین عملکردهای پروتامین، حفاظت و حمایت ژنوم اسپرم می‌باشد، که نقص در جایگزین شدن پروتامین به‌جای هیستون، می‌تواند ژنوم را نسبت به عوامل اندوژن و اگزوژن نظیر نوکلئازها، موتاژنها و رادیکال‌های آزاد آسیب‌پذیر نماید و در نتیجه باعث افزایش شدت استرس اکسیداتیو شود (۱۰).

در این مطالعه، در افراد مبتلا به واریکوسل، ارتباط مثبت و معنی‌داری بین درصد اسپرم‌های ROS مثبت و درصد تحرک اسپرم وجود دارد، همچنین ارتباط منفی و معنی‌داری بین درصد اسپرم‌های ROS مثبت با آسیب DNA وجود دارد. بر اساس تئوری پیشنهاد شده در مقالات قبلی، اسپرم متحرک، توانایی تولید ROS تا سطح فیزیولوژیک، جهت انجام عملکردهای فیزیولوژیک مانند فرآیند ظرفیت یابی، تحرک هایپراکتیو و واکنش آکروزومی را دارد (۷ و ۳۴). بنابراین رابطه به‌دست آمده از نتایج این مطالعه، می‌تواند نشان‌دهنده حالت فیزیولوژیک خود اسپرم باشد و بیانگر این مسئله است که، اسپرمی که متحرک تر است از تولید ROS بالاتری جهت انجام فرآیند های فیزیولوژیک برخوردار می‌باشد، به‌علاوه اسپرم‌هایی با ROS بیشتر از آسیب DNA کمتری برخوردارند. بنابراین ROS تولید شده احتمالا در سطح فیزیولوژیک بوده و در صورتی‌که در سطح غیر فیزیولوژیک بود، احتمالا ارتباط عکس مشاهده می‌شد.

همچنین در این مطالعه، در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل، ارتباط مثبت و معنی‌داری بین کمبود پروتامین و آسیب DNA مشاهده شد. در این رابطه می‌توان بیان کرد که احتمالا در این افراد کمبود پروتامین در هسته اسپرم و یا نقص در جایگزینی پروتامین به‌جای هیستون سبب کاهش تراکم کروماتین شده و در نتیجه DNA اسپرم مستعد آسیب می‌شود. به‌عبارت دیگر میزان آسیب DNA در افراد دارای نقص‌های پروتامین بیشتر است و می‌توان بیان کرد که کمبود پروتامین منجر به کاهش باندهای دی سولفیدی شده که این امر موجب آسیب پذیرتر شدن DNA می‌شود (۴). بنابراین می‌توان به نقش حفاظتی پروتامین در جهت جلوگیری از آسیب به DNA هسته اسپرم اشاره کرد.

در این مطالعه، در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل، ارتباط منفی و معنی‌داری بین تحرک اسپرم و آسیب DNA وجود دارد. کروماتین هسته اسپرم به‌وسیله جایگزینی پروتامین‌ها به جای هیستون کاملا متراکم شده و باعث ایجاد سر هیدرودینامیک در اسپرم می‌شود که می‌تواند در افزایش سرعت حرکت اسپرم نقش داشته باشد. در نتیجه می‌توان بیان کرد که کاهش تراکم و آسیب DNA، تاثیر منفی بر تحرک اسپرم دارد (۳۵).

در این مطالعه، در افراد بارور، فقط بین درصد کمبود پروتامین (اسپرم‌های CMA3 مثبت) با غلظت و تحرک اسپرم ارتباط منفی و معنی‌داری وجود دارد، که نشان دهنده این مسئله است که انجام روند صحیح اسپرماتوژنز و جایگزینی مناسب پروتامین به‌جای هیستون، باعث تولید تعداد بیشتر اسپرم در بیضه می‌شود، همچنین روند صحیح جابجایی هیستون با پروتامین منجر به تراکم صحیح کروماتین و در نتیجه تحرک مناسب اسپرم می‌شود (۱۳).

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که در افراد مبتلا به واریکوسل پارامترهای اسپرمی از جمله غلظت، درصد تحرک اسپرم و

www.SID.ir

Archive of SID

مورفولوژی طبیعی نسبت بـه افـراد بـارور پـائین تـر مـی‌باشـد. همچنین میزان آسیب DNA، کمبود پروتامین و سطح اسـترس اکسیداتیو نسبت به افراد بارور بالاتر است. افزایش دما و اخـتلال در روند اسپرماتوژنز، استرس اکسیداتیو و آسیب DNA ناشـی از استرس، از عوامل عمده کاهش کیفیت مـایع منـی درایـن افـراد است که در نهایت می تواند موفقیت در باروری را تحت تاثیر قرار دهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین پژوهشـکده رویان اصفهان ابراز می‌دارند.

منابع

1. Chemes HE, Rawe VY. The making of abnormal spermatozoa: cellular and molecular mechanisms underlying pathological spermiogenesis. Cell Tissue Res. 2010; 341(3): 349-357.

2. Redmon JB, Carey P, Pryor JL. Varicocele- the most common cause of male factor infertility? Hum Reprod Update. 2002; 8(1):53-58.

3. Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. athophysiology of varicocele in male infertility. Hum Reprod Update. 2001; 7(5):473-481.

4. Tavalaee M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. Fertil Steril. 2009; 91(4): 1119-1126.

5. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, et al. Relationship between ROS production, apoptosisand DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. Hum Reprod. 2004; 19 (1):129–138.

6. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press; 1999: 617–783.

7. Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. Int J Androl. 1997; 20(2): 61-69.

8. Henkel RR. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. Asian J Androl. 2011; 13(1): 43-52.

9. Yamanaka K, Fujisawa M, Tanaka H, Okada H, et al. Significance of human testicular mast cells and their subtypes in male infertility. Hum Reprod. 2000; 15(7): 1543–1547.

10. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil Steril. 2003; 79(4):829-843.

11. Shiraishi K, Matsuyama H, Takihara H. Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. Int J Urol. 2012; 19(6): 538-550.

12. Zini A, Dohle G. Are varicoceles associated with increased deoxyribonucleic acid fragmentation? Fertil Steril. 2011; 96(6): 1283-1287.

13. Azadi L, Abbasi H, Deemeh MR, Tavalaee M, et al. Zaditen (Ketotifen), as mast cell blocker, improves sperm quality, chromatin integrity and pregnancy rate after varicocelectomy. Int J Androl. 2010; 34(5): 446–452.

14. Nasr-Esfahani MH, Abasi H, Razavi S, Ashrafi S, et al. Varicocelectomy: semen parameters and protamine deficiency. Int J Androl. 2009; 32(2):115-122.

15. Onozawa M, Endo F, Suetomi T, Takeshima H, et al. Clinical study of varicocele: statistical analysis and the results of long-term follow-up. Int Jurol. 2002; 9(8): 455-461.

16. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2010; 1-271. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. ISBN 9789241547789.

17. Kheirollahi-Kouhestani M, Razavi S, Tavalaee M, Deemeh MR, et al. Selection of sperm based on combined density gradient and Zeta method may improve ICSI outcome. Hum Reprod. 2009; 24(10): 2409-2416.

18. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M. Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. J Assist Reprod Genet. 2001; 18(4): 219-225.

19. Kiani-Esfahani A, Tavalaee M, Deemeh MR, Hamiditabar M, et al. DHR123: an alternativeprobe for assessment of ROS in humanspermatozoa. Syst Biol Reprod. 2012; 58(3): 168-174.

20. Agarwal A, Hamada A, Esteves SC. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. Nat Rev Urol. 2012; 9(12): 678-690.

21. Blumer CG, Restelli AE, Giudice PT, Soler TB, et al. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. BJU Int. 2012; 109(2):259-265.

22. Villanueva-Diaz CA, Vega-Hernandez EA, Diaz-Perez MA, Echavarria-Sanchez M, et al. Sperm dysfunction in subfertile patients with varicocele and

www.SID.ir

Archive of SID

marginal semen analysis. Andrologia. 1999; 31(5):263-267.

23. NavaeianKalat E, Tavalaee M, Abasi H, Nasr Esfahani MH. Comparison of sperm parameters and DNA integrity between fertile and varicocele individuals. Journal of Cell. 2012; 3(2): 171-177.

24. Wu GJ, Chang FW, Lee SS, Cheng YY, et al. Apoptosis-related phenotype of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. Fertil Steril. 2009; 91(3): 831-837.

25. Mann SL, Patton WC, King A, Chan PJ. Comparative genomic hybridization analysis of sperm DNA apoptosis after exposure to heat shock. J Assist Reprod Genet. 2002; 19(4): 195-200.

26. Hikim AP, Wang C, Lue Y, Johnson L, et al. Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. J Clin Endocrinol Metab. 1998 Jan; 83(1): 152-156.

27. Kemal Duru N, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. Fertil Steril. 2000; 74(6): 1200-1207.

28. Blumer CG, Fariello RM, Restelli AE, Spaine DM, et al. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele.Fertil Steril. 2008; 90(5): 1716-1722.

29. Fuse H, Akashi T, Mizuno I, Nozaki T, et al. Post-operative changes of sperm chromatin heterogeneity, using acridine orange staining, in varicocele patients. Arch Androl.2006; 52(3): 223-226.

30. Sakamoto Y, Ishikawa T, Kondo Y, Yamaguchi K, et al. The assessment of oxidative stress in infertile patients with varicocele. BJU Int. 2008; 101(12): 1547-1552.

31. Pasqualotto FF, Sundaram A, Sharma RK, Borges E Jr, et al. Semen quality and oxidative stress scores in fertile and infertile patients with varicocele. Fertil Steril. 2008; 89(3): 602-607.

32. Mostafa T, Anis T, Imam H, El-Nashar AR, et al. Seminal reactive oxygen species-antioxidant relationship in fertile males with and without varicocele.Andrologia.2009; 41(2): 125-129.

33. Mostafa T, Anis TH, El-Nashar A, Imam H, et al. Varicocelectomy reduces reactive oxygen species levels and increases antioxidant activity of seminal plasma from infertile men with varicocele. Int J Androl. 2001. 24(5): 261-265.

34. Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, et al. Analysis of the relationships between oxidative stresses, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. Hum Reprod. 2010; 25(10): 2415-2426.

35. Plastira K, Msaouel P, Angelopoulou R, Zanioti K, et al. The effects of age on DNA fragmentation, chromatin packaging and conventional semen parameters in spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic patients. J Assist Reprod Genet. 2007; 24(10): 437-443.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Winter 2016; 6(4): 523-532

Comparison of Sperm Parameters and its Functional Characteristics Between Fertile and Infertile Men with Varicocele

Barekat F, M.Sc.[1], Tavalaee M, M.Sc.[1*], Azadi L, M.Sc.[1], Nasr-Esfahani MH, Ph.D.[1, 2]

1. Department of Reproductive Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
2. Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran

* Email corresponding author: Tavalaee.royan@gmail.Com

Received: 7 Mar. 2015 Accepted: 19 Mar. 2015

Abstract

Aim: The aim of this study is to compare sperm parameters (concentration, motility and morphology), DNA damage, percentage and intensity of ROS (Reactive Oxygen Species) and relationship between these parameters in the fertile and infertile men with varicocele.

Material and Methods: In this study, the semen samples from 83 individuals with varicocele and 32 fertile men were studied. Sperm parameters according WHO (World Health Organization) guidelines, protamine deficiency (chromomycin A3 staining), sperm DNA damage (TUNEL assay), percentage and intensity of ROS (DCFH-DA staining) were assessed in fertile and infertile men with varicocele.

Results: The results of this study showed that sperm concentration, percentage of motility and normal morphology were significantly lower in individuals with varicocele compared to fertile individuals. In addition, percentage of sperm DNA damage, protamine deficiency and ROS positive were significantly higher in infertile men with varicocele.

Conclusion: The increase of stress oxidative and testicular temperature in infertile men with varicocele, lead to decrease the quality of sperm parameters as well as negative effects on sperm chromatin integrity. Therefore the process of spermatogenesis and the rate of fertility were affected in these individuals.

Keywords: Varicocele, DNA fragmentation, Sperm parameters, Stress oxidative

www.SID.ir