فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۵ (۳)، ۴۱۵ – ۴۲۶
پاییز ۱۳۹۰

فیزیولوژی و فارماکولوژی

بررسی اثر بذر کتان بر وضعیت استرس اکسیداتیو در موشهای صحرایی نابالغ مبتلا به واریکوسل

شهلا سهرابی پور[۱]، عادله جعفری[۲]، محمد کمالی نژاد[۳]، عبدالفتاح صراف نژاد[۴]، طاهره شهرستانی[۴]، حمیدرضا صادقی پور[۵*]
۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمز گان، بندر عباس
۲. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
۳. گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
۴. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
۵. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

دریافت: ۱۸ خرداد ۸۹ پذیرش: ۱۹ شهریور ۹۰

چکیده

مقدمه: واریکوسل اطفال منجر به کاهش حجم بیضه، آسیب دیدن اسپرمها و کاهش عملکرد سلولهای لیدیگ در آینده می گردد. مکانیسم دقیقی که واریکوسل سبب ناباروری می گردد به خوبی شناخته نشده است اما افزایش گونه های فعال اکسیژن در مایع منی، یکی ازعوامل اصلی می باشد. نحوه درمان واریکوسل اطفال موضوعی بحث انگیز است. بذر کتان منبع غنی از لیگنانهای دارای خاصیت آنتی اکسیدانی است. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر آنتی اکسیدانی بذرکتان بر وضعیت استرس اکسیداتیو ناشی از واریکوسل در رتهای نابالغ می باشد.

روش ها: دراین مطالعه ۳۵ سر موش صحرایی نر نابالغ در پنج گروه کنترل، شم، شم که بذر کتان دریافت نموده، واریکوسل و واریکوسل که بذر کتان دریافت نموده است مورد بررسی قرار گرفت. شش هفته پس از القا واریکوسل تولید آنیون سوپراکساید، پراکسید هیدروژن، فعالیت آنتی اکسیدانی مایع منی و MDA (malondialdehyde) بافت بیضوی بررسی شد.

یافته ها: این تحقیق نشان داد که به دنبال القای واریکوسل تولید آنیون سوپراکساید و پراکسید هیدروژن داخل اسپرم افزایش می یابد ولی بذرکتان بطور معنی داری باعث کاهش آنها گردید (P<۰/۰۰۱) اما بر فعالیت آنتی اکسیدانی مایع منی تاثیری نداشت. (P>۰/۰۵) MDA سمت چپ در گروه واریکوسل افزایش یافته بود که مصرف بذرکتان ۱۰٪ باعث کاهش معنادار آن گردید.(P<۰/۰۵)

نتیجه گیری: بذر کتان بعنوان یک آنتی اکسیدان محلول در چربی می تواند در حفاظت اسپرم در برابر استرس اکسیداتیو نقش داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: آنیون سوپراکساید، واریکوسل، استرس اکسیداتیو، بذر کتان، ظرفیت کل آنتی اکسیدانی

مقدمه

به اتساع پاتولوژیک شبکه وریدی پامپینیفرم طناب اسپرماتیک واریکوسل اطلاق می شود[۴۱،۸]. شیوع آن در کل جامعه تقریباً ۱۵٪ بوده [۴۶،۱۰،۹] و شایعترین علت مراجعه مردان به مراکز ناباروری می باشد [۴۹].

شیوع واریکوسل در پسران نابالغ ٪۱۱-۲ و در زمان adolescent[۱] ۱۷/۸٪ گزارش شده است [۴۸]. مکانیسم دقیقی که واریکوسل از طریق آن سبب ناباروری می گردد به خوبی شناخته نشده است [۳۳،۲۵،۱۶،۱۳]. علی رغم تئوریهای

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: sadeghipour@tums.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj
۱. دوره ی زمانی تکامل بین شروع بلوغ و adulthood (adulthood: بلوغ جسمی و ذهنی)

Archive of SID
www.SID.ir

متعددی که در این زمینه مطرح می باشد، در سالهای اخیر نقش استرس اکسیداتیو بعنوان عامل واسطه ای در اغلب این مکانیسمها بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۱۵] استرس اکسیداتیو به شرایطی گفته می شود که بین تولید اکسیدانها و دفاع آنتی اکسیدانی عدم تعادل ایجاد شود.

از جمله عوامل اکسیدکننده می توان به گونه های فعال اکسیژن (ROS,Reactive Oxygen Species) از قبیل آنیون سوپراکساید و پراکسید هیدروژن اشاره کرد. [۴۱،۲۴] در بررسی های مختلف وجود سطوح بالایی از ROS در سیمن ۸۰٪ بیماران واریکوسلی نابارور گزارش شده است [۱۹] و بنظر می رسد که بخشی از اختلال عملکرد اسپرم بدلیل استرس اکسیداتیو باشد [۲۱،۵].

بررسی های اخیر بر روی درمان با آنتی اکسیدانها (آنتی اکسیدان تراپی) مطرح کننده نقش موثر این عوامل در کاهش استرس اکسیداتیو بوده و گزارش شده است که سبب بهبود کیفیت اسپرمها از جمله بهبود تحرک و مورفولوژی آنها،هم در انسانها و هم در حیوانات می گردد. اگرچه نوع آنتی اکسیدان و مقدار آن، نیازمند مطالعات بیشتری می باشد [۱۲].

Flax یا کتان با نام علمی *linum.usitatisimum* ازقدیمی ترین گیاهان است که درمناطق مختلفی از جهان کشت می شود. بذر کتان(*Flaxseed;Fs*) سرشار از امگا ۳ می باشد که باعث سرکوب گونه های فعال اکسیژن می شود. همچنین حاوی لیگنان هایی است که خاصیت آنتی اکسیدانی دارند [۷]. *FS* منبع غنی از لیگنانهای secoisolariciresinol diglucoside) SDG) [۷] و (Secoisolariciresinol (SECO) [۲۰] و مقادیرکمتری از لیگنان Matairesinol می باشد. SDG و Matairesinol می توانند توسط باکتریهای کولون به لیگنانهای انترودیول و انترولاکتون تبدیل گردند [۲۰].

در مطالعات in vitro نشان داده شده که بذر کتان نه تنها به عنوان رفتگر (scavenger) رادیکالهای هیدروکسیل عمل می کند بلکه پراکسیداسیون لیپیدی را نیز مهار می کند. خصوصیات آنتی اکسیدانی لیگنانهای بذر کتان در استرس اکسیداتیو ناشی از مدل حیوانی شوک آندوتوکسیک، دیابت و پولمونواری ایسکمیک ری پرفیوژن و بیماریهای قلبی عروقی به اثبات رسیده است ونتایج موثر آن گزارش شده است [۳۲،۳۱ ،۲۶، ۲۳، ۲۰].

مطالعات اندکی در مورد واریکوسل قبل از بلوغ (pre pubertal) انجام شده و مطالعات حیوانی هم در این گروه سنی کافی نمی باشد [۱۸] در مطالعه Zampieri و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داده شد که گاید لاین های درمان واریکوسل اطفال الزاماً منجر به حفظ قدرت باروری در آینده نمی شود [۵۰]. درمان واریکوسل اطفال در دهه اخیر بر روی درمان درجات بالای آن تاکید دارد که همراه با هیپوتروفی بیضه هستند [۱۲] و کودکانی با درجات کوچک واریکوسل کاندید عمل جراحی نمی باشند و سیاست انتظار (wait & watch) برای آن ها توصیه می گردد [۴۷]. از طرفی جراحی در اطفال با خطراتی از قبیل آتروفی بیضه ها، آسیب برگشت ناپذیر به سلولهای ژرمینال و عوارض دیگر همراه است، بنابراین درمان در کودکان و شاخصهای انتخاب کودک برای عمل جراحی همچنان موضوعی بحث انگیز می باشد [۶] زیرا با دانش موجود هیچ شاخصی وجود ندارد که بتواند از دست رفتن باروری کودکان را در آینده پیش بینی کند [۵۰].

با توجه به میزان شیوع واریکوسل در کودکان و بحث انگیز بودن درمان در آنها و نیز با توجه به نقش تغییرات اکسیدانها و آنتی اکسیدانها در شرایط واریکوسل و اهمیت روزافزون درمان آنتی اکسیدانی، و از آنجایکه مطالعات انسانی بخصوص بر روی کودکان با موانع اخلاقی بسیاری همراه است، بر آن شدیم تا با القای واریکوسل بر موشهای صحرایی نابالغ، تاثیر واریکوسل بر شاخصهای اکسیداتیو و نیز اثرات آنتی اکسیدانی بذر کتان را پس از بلوغ مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش ها

در این مطالعه تعداد ۳۵ سر موش صحرایی نر نابالغ (PrePubertal) ۲۵ روزه در محدوده وزنی ۷۰-۳۰ گرم مورد استفاده قرار گرفتند. این حیوانات بطور تصادفی به ۵ گروه ۷ تایی تقسیم شدند.

تمام حیوانات در شرایط استاندارد دمایی (۲۰-۲۲°C)، سیکل روشنایی/ تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند و دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند. هر گروه شامل ۷ رت نابالغ بود. گروهها به قرار زیر بودند:

www.SID.ir
Archive of SID

گروه کنترل: موشهایی را شامل می شدند که هیچگونه جراحی برروی آنها صورت نگرفت. گروه شم (Sham): موشهایی بودند که تحت عمل جراحی لاپاراتومی قرار گرفتند. گروه واریکوسل (Varicocele): شامل موشهای صحرایی بودند که در آنها با انسداد نسبی ورید کلیوی چپ، واریکوسل القا گردید و پس از طی ۶ هفته از جراحی، نمونه گیری انجام شد.

گروه شم همراه با دریافت بذر کتان ۱۰٪ : موشهایی بودند که تحت عمل جراحی لاپاراتومی قرار گرفتند و بذر کتان ۱۰٪، بصورت خوراکی بمدت ۶ هفته پس از عمل جراحی به غذای پایه آنها اضافه شد. گروه واریکوسل همراه با دریافت بذر کتان ۱۰٪ : شامل موشهای صحرایی بودند که در آنها واریکوسل القاء شده و بذر کتان ۱۰٪ ، بصورت خوراکی بمدت ۶ هفته پس از عمل جراحی به غذای آنها اضافه شد.

برای تهیه غذای حاوی بذر کتان ۱۰٪ ، به این ترتیب عمل کردیم:۱۰ گرم بذر کتان آسیاب شده را با ۹۰ گرم غذای پایه آسیاب شده موجود در حیوانخانه گروه فیزیولوژی، با هم مخلوط کرده با آب مقطر به شکل خمیر در می آوریم. خمیر را در یک قیف خامه ریخته و بصورت رول قیچی میکنیم و اجازه می دهیم در دمای اتاق خشک شود. غذا را در $4^{o}C$ نگه داشته و بصورت هفتگی تهیه می گردید.

با توجه به مطالعات انجام شده در مورد اثرات آنتی اکسیدانی بذرکتان، مصرف حداقل ۳ هفته بذرکتان ۱۰٪، حداکثر خاصیت آنتی اکسیدانی بدون عوارض جانبی را دارد [۳۱،۲۶،۳۲]. بنابراین دوز ۱۰٪ انتخاب شد.

برای القای واریکوسل از متد Koksal و همکاران [۲۷] استفاده شد. پس از بیهوشی با ketamin (IP بصورت 60mg/kg) و xylasin (7mg/kg) موشها در وضعیت سوپاین قرار داده شده و یک برش میدلاین عمودی در شکم در حدود ۴-۳ سانتی متر ایجاد شد. پس از یافتن ورید کلیوی چپ و محل ورود ورید اسپرماتیک داخلی به آن، به آرامی اطراف ورید کلیوی چپ با Tearing آزاد گردید، سپس کاتتر آنژیوکت نمره ۲۴ به موازات ورید قرار داده شده و بوسیله نخ بخیه سیلک ۴ صفر آنژیوکت روی ورید گره زده شد به طوریکه محل گره بعد از محل ورود ورید اسپرماتیک داخلی به ورید کلیوی باشد . بعد از زدن گره، آنژیوکت به آرامی خارج شده و به ورید اجازه داده شد که re-expand شود. طبق این روش قطر ورید کلیوی چپ حدود ۵۰٪ کاهش خواهد یافت. سپس محل برش شکمی بخیه زده شد.

نمونه گیری: پس از طی ۶ هفته در گرو ه های واریکوسل، دیلاتاسیون ورید اسپرماتیک داخلی درحیوانات از طریق مشاهده مورد بررسی قرار گر فت، ورید اورترال چپ به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. سپس از موش های صحرایی که اتساع ورید اسپرماتیک در آنها مشاهده گردید، نمونه گیری از اپیدیدیم دمی سمت راست و چپ انجام گردید. پس از ۶ هفته رتها به بلوغ کامل جنسی رسیده بودند.

بررسی فلوسایتومتری: برای بررسی تولید آنیون سوپراکساید و H_2O_2 اسپرمها از طریق فلوسایتومتری به ترتیب از رنگهای دی هیدرواتیدیوم (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)، و دی کلروفلوروسین دی استات,(Sigma-Aldrich)[۱۷] استفاده شد.

به این منظور ابتدا نمونه گرفته شده از اپیدیدیم دمی به مدت ۳ دقیقه (500×g) سانتریفوژ شده تا سرم از pellet سلولی جدا شود. سرم حاصله جهت اندازه گیری ظرفیت کل آنتی اکسیدانی در فریزر $-70^{\circ}C$ نگهداری شد. به Pellet سلولی محلول PBS(phosphate-buffered saline) اضافه گردید تا محلولی با تعداد حدود 1×10^{6} اسپرم در هر میلی لیتر حاصل شود. عوامل ناخواسته مانند debris از جمعیت مورد مطالعه حذف شد. در هر نمونه تقریباً ۱۰۰۰۰ سلول مورد بررسی قرار گرفت.

برای اندازه گیری آنیون سوپراکساید داخل سلولی از فلوروکروم دی هیدرواتیدیوم استفاده شد. بدین منظور ۵ میکرولیتردی هیدراتیدیوم ۱۶۰ میکرومولار به محلول 1×10^{6} اسپرم در هر میلی لیتر اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه قرار دادن در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و اتاق تاریک، PBS wash انجام شد. سپس به یکی از نمونه ها ۵ میکرولیتر از منادیون ۱ میلی مول بر لیتر اضافه شد و پس از ۱ ساعت قرار دادن در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و اتاق تاریک آنالیز از طریق فلوسایتومتر انجام شد. ۵ دقیقه قبل از آنالیز ۵ میکرولیتر یدید پروپیدیوم ۱۰ µg/ml به لوله اضافه شد، تا سلولهای مرده مشخص شوند و فقط سلولهای زنده کنترل شوند. در هر گروه از نمونه ها یک لوله حاوی محلول اسپرم بدون رنگ به عنوان

www.SID.ir
Archive of SID

کنترل منفی در نظر گرفته شد. از منادیون که می تواند تولید آنیون سوپراکساید را در داخل سلول القا کند، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد [۲۲].

برای اندازه گیری H_2O_2 درون اسپرم ۱۰ µM فلروکروم دی کلروفلوروسین دی استات به محلول ۱×۱۰^{۶} اسپرم در هر میلی لیتر اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه قرار دادن در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و اتاق تاریک، PBS wash انجام شد. محلول ۵ میکرومولار H_2O_2 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. ۵ دقیقه قبل از آنالیز ۵ میکرولیتر یدید پروپیدیوم ۱۰ µg/ml به لوله اضافه شد ، تا فقط سلولهای زنده کنترل شوند [۱۷].

فلورسانس ساطع شده از هیدرواتیدیوم در باند FL2 با باند نوری ۵۸۵ نانومتر و فلورسانس ساطع شده از فلوروکروم دی کلروفلوروسین دی استات در باند FL1 در ۵۳۰ نانومتر از طریق فلوسایتومتر (DAKO Cytomation, Denmark) Partec PAS FacScan شناسایی شد. سیگنال های شناسایی شده توسط نرم افزار Flomax آنالیز شد. داده های فلوسایتومتری به صورت میانگین شدت فلورسانس Mean Fluorescence Intensity (MFI) گزارش شد [۲۳].

بررسی آنتی اکسیدانی: اندازه گیری ظرفیت کل آنتی اکسیدانی بر اساس روش [۲۸] Koracevic انجام شد. نتایج به صورت میلی مول بر لیتر ارائه شد. بر اساس این متد، توانایی مایع منی در مهار تولید ماده فعال اسید تیوباربیتوریک از بنزوات سدیم تحت اثر رادیکال های آزاد حاصل از واکنش Fenton ارزیابی شد. محلول یک میلی مول بر لیتر اسید اوریک به عنوان استاندارد در نظر گرفته شد. محلول استاندارد کمپلکس Fe-EDTA با پراکسید هیدروژن واکنش داده و سبب تشکیل رادیکال هیدروکسیل می شود. این رادیکال آزاد بنزوات را تجزیه کرده و سبب رهاسازی ماده فعال اسید تیوباربیتوریک(TBARS) می شود. آنتی اکسیدانهای موجود در نمونه سیمن اضافه شده سبب سرکوب تولید TBARS می شوند. این واکنش از طریق اسپکتروفتومتر اندازه گیری شده و به عنوان فعالیت آنتی اکسیدانی گزارش شد.

اندازه گیری MDA: MDA (malondialdehyde) شاخصی از پراکسیداسیون لیپید ها می باشد که در استرس اکسیداتیو میزان آن دربافت بالا می رود. در این آزمایش میزان MDA در بافت بیضه با استفاده از روش Ledwozyw و همکاران [۳۰] که بر اساس واکنش با تیوباربیتوریک اسید و اسپکتروفتومتری می باشد، بدین ترتیب اندازه گیری شد. ۰/۵mL از سوپرناتانت بافت هموژن شده بیضه را با ۲/۵ml از تری کلرواستیک اسید ۱/۲۲ mol/L و HCL۰/۶ mol/L را مخلوط کرده اجازه دادیم ۱۵ دقیقه بماند. به این مخلوط ۱/۵mLمحلول تیوباربیتوریک اضافه کرده و ۳۰ دقیقه این محلول را در حمام آب جوش گرم کردیم بعد از سرد شدن تا دمای اتاق ۴ میلی لیتر n-butanol به آن اضافه کرده و این مخلوط به شدت برای ۳ دقیقه تکان داده شد و به مدت ده دقیقه با دور g ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد. لایه ارگانیک این محلول برداشته شده و جذب آن در ۵۳۵ نانومتر اندازه گیری شد. نتایج بر حسب nmol/g tissue محاسبه گردید. [۳۰]

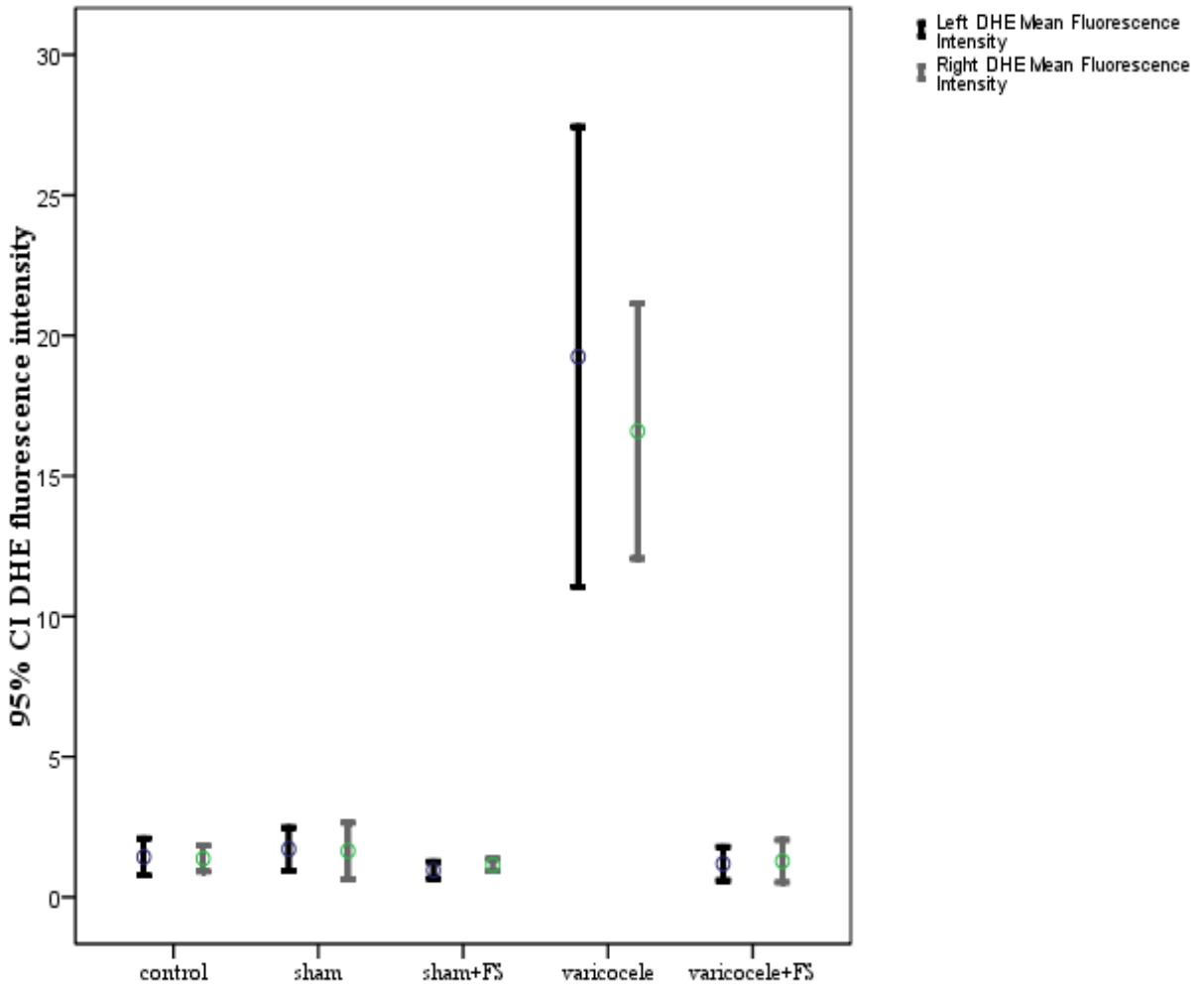
آنالیز آماری بر اساس برنامه SPSS ویراست ۱۳و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه انجام شد. داده هایی که توزیع نرمال داشتند از تست آنالیز واریانس یک طرفه، Post HOC توکی و برای مقایسه متغیرها در سمت راست با چپ از t test استفاده شد. داده هایی که توزیع نرمال نداشتند از کروسکالوالیس استفاده شد و نتایج به صورت Mean±SEM گزارش شد. اختلاف معنی داری در سطح$p\leq0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

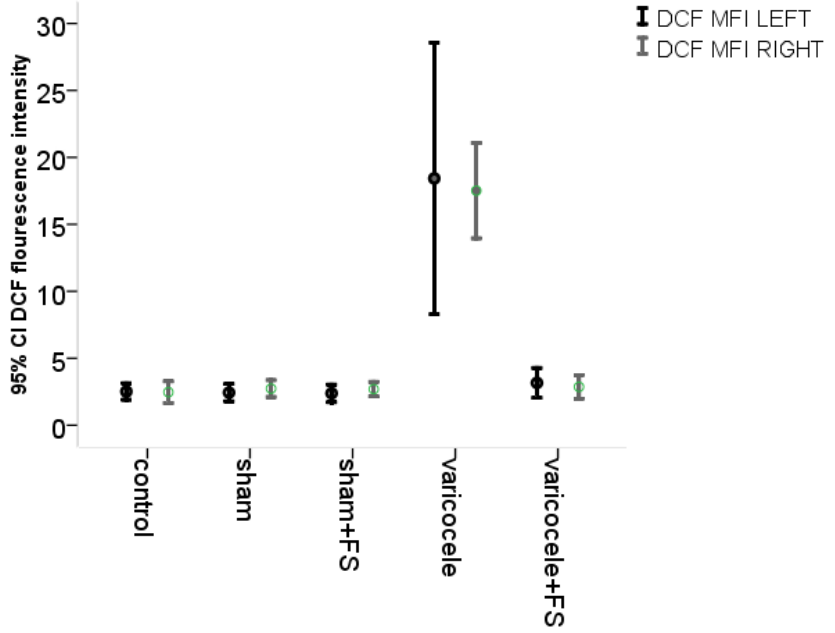
جهت بررسی اثر واریکوسل بر تولید آنیون سوپراکساید داخل سلولی از فلروکروم دی هیدرواتیدیوم استفاده شد و افزایش تولید آنیون سوپراکساید داخل سلولی از طریق افزایش ($P\leq0.001$) میانگین شدت فلورسانس فلروکروم دی هیدرواتیدیوم در گروه واریکوسل مشاهده شد. یافته های ما نشان داد که بذر کتان باعث کاهش معنی دار در تولید آنیون سوپراکساید می شود. ($P\leq0.001$). (شکل۱) بین داده های سمت راست و چپ تفاوتی مشاهده نشد ($P\geq0.05$).

جهت بررسی اثر واریکوسل و بذر کتان بر میزان H_2O_2 در اسپرم از فلروکروم دی کلروفلوروسین دی استات استفاده شد و مشاهده شد که بذر کتان توانسته بود افزایش H_2O_2 ناشی از واریکوسل ($P\leq0.001$) را بطور معنی داری از طریق کاهش شدت فلورسانس فلروکروم دی کلروفلوروسین دی استات در گروه واریکوسل ($P\leq0.001$) کاهش دهد. بین پراکسید

Archive of SID
www.SID.ir

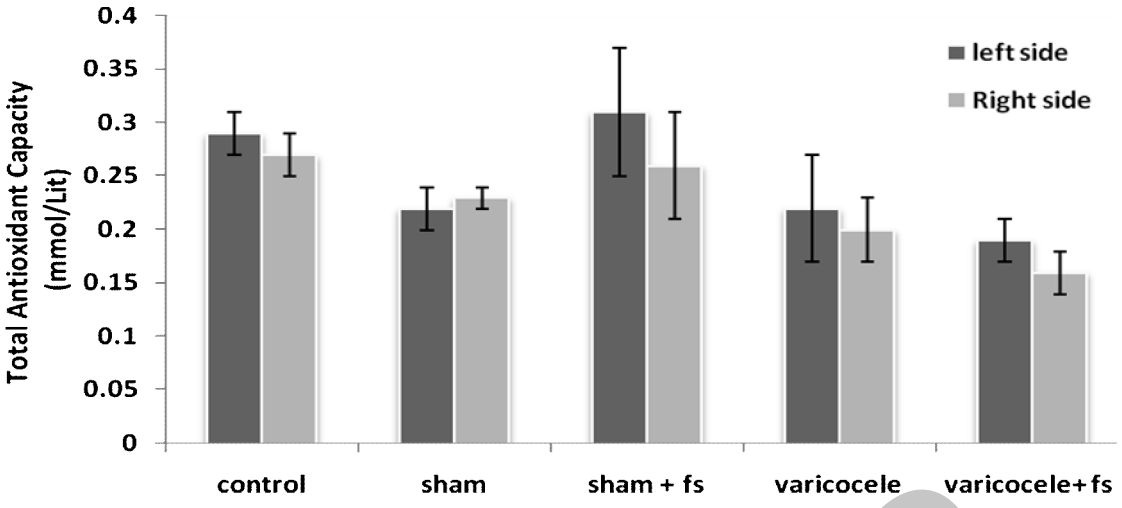


شکل ۱- اثر بذرکتان برتولید آنیون سوپراکساید در گروههای مختلف، محور Y نشاندهنده شدت فلورسانس ناشی از دهیدرواتیدیوم می باشد.

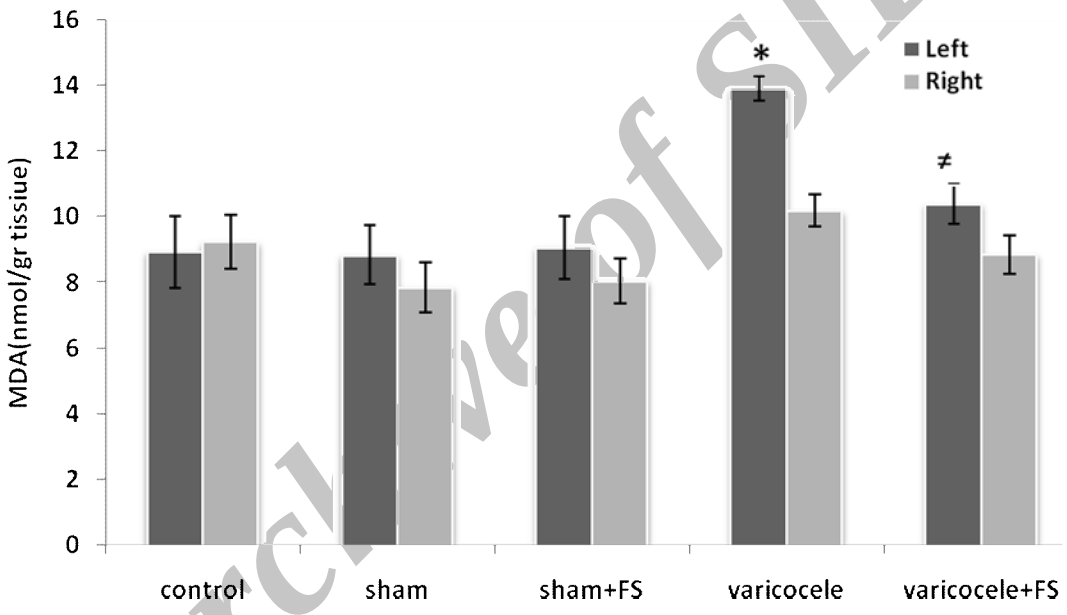


شکل ۲- اثر بذرکتان برتولید پراکسید هیدروژن در گروههای مختلف، محور Y نشاندهنده شدت فلورسانس ناشی از دی کلروفلوروسین دی استات می باشد.

www.SID.ir



شکل ۳- مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی کل در گروههای مختلف. هریک از ستونها نمایانگر میانگین ± خطای معیار می باشد.



شکل ٤- مقایسه میزان MDA بافت بیضوی در گروههای مختلف. هریک از ستونها نمایانگر میانگین ± خطای معیار می باشد. *اختلاف معنی دار در مقایسه با گروههای کنترل، شم و شم + بذر کتان P< 0.05، # اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه واریکوسل P< 0.05

هیدروژن تولید شده در سمت راست و چپ در هیچکدام از گروهها تفاوتی دیده نشد (P≥0.05). (شکل ۲).

جهت بررسی اثر بذر کتان بر فعالیت آنتی اکسیدانی کل در واریکوسل از متد Koracevic و همکارانش [۲۷] استفاده شد. نتایج به صورت میلی مول بر لیتر ارائه شد. در این آزمون هیچگونه تفاوت معنی داری بین فعالیت آنتی اکسیدانی در گروههای مختلف مشاهده نشد. نتایج سمت چپ و راست نیز تفاوت معنی داری نداشتند. (P≥0.05) (شکل ۳).

اثر بذر کتان بر MDA بافت بیضوی در واریکوسل: تولید MDA در بافت بیضوی با استفاده از روش Ledwozyw و همکاران که بر اساس واکنش با تیوباربیتوریک اسید و اسپکتروفتومتری می باشد، اندازه گیری شد. و تفاوتی بین گروهها در سمت راست مشاهده نشد. اما در سمت چپ در گروه واریکوسل افزایش MDA مشاهده شد. (1.04 ± 13.93) (P≤0.05) و در گروه واریکوسلی که بمدت ۶ هفته بذر کتان ۱۰٪ به غذای آنها اضافه شده بود کاهش MDA نشان داده شد (1.63 ±10.42) (P≤0. 05). نتایج بصورت نانومول در هر گرم بافت بیضه گزارش شد. نتایج سمت چپ و راست نیز

www.SID.ir

تفاوت معنی داری نداشتند. ($P\geq0.05$) (شکل ۴).

بحث

مطالعات بالینی متعددی که در مورد اثر واریکوسل بر رشد بیضه و تغییرات هیستولوژیک آن در زمان بلوغ انجام شده، همگی اثرات پیشرونده صدمات بیضوی را نشان داده اند و تاکید کرده اند که ابتلا به واریکوسل در ابتدای بلوغ، با احتمال بیشتری منجر به ناباروری در آینده می گردد. هرچند که مطالعات در افراد نابالغ بسیار اندک می باشد [۲۷].

بعضی مکانیسمهای پیشنهادی ایجاد ناباروری در واریکوسل را، شامل اختلال سلولهای لیدیگ و سرتولی، افزایش تولید ROS در بیضه و اپیدیدیم و اختلال عملکرد اپیدیدیم می دانند [۱۰] زیرا القاء واریکوسل باعث تخریب پیشرونده عملکرد بیضه و افزایش آپوپتوز می گردد [۵۱]. Choi و همکاران در سال ۱۹۹۰ گزارش کردند که واریکوسل در زمان بلوغ اثرات مخرب تری بر بیضه رتها دارد [۱۱].

در مطالعه ای دیگر که توسط shooke و همکاران انجام شد مشاهده شد که واریکوسل در رتهای نابالغ باعث کاهش بیشتری در عملکرد لوله های سمینوفر و سلولهای ژرمینال سمت چپ می گردد. اما در بیضه های راست تغییری دیده نشد [۴۵] با وجود اینکه مطالعات فراوانی بر روی رتهای بالغ واریکوسلی انجام شده اما در مورد رتهای نابالغ مطالعات چندانی وجود ندارد.

اصطلاح استرس اکسیداتیو یا از تولید بیش از اندازه ROS و یا از تخلیه آنتی اکسیدانها ایجاد می شود. اگر این تغییرات به آهستگی ایجاد شود، سلول تاحدی با آن سازگاری می‌یابد. اما اگر شدید باشد باعث آسیب و مرگ سلولی به صورت نکروز یا آپوپتوز می‌شود [۳].

در این مطالعه پس از القای واریکوسل افزایش آنیون سوپراکساید و H_2O_2 مشاهده شد. مطالعات انسانی [۴۴،۳۴،۱] و حیوانی [۲۳] زیادی این افزایش ROS را گزارش کرده اند.

Aitken و همکارانش در سال ۱۹۸۷ نشان دادند که اسپرم افراد نابارور ۴۰ برابر تولید ROS بیشتری نسبت به افراد بارور دارند. همچنین کاهش عملکرد اسپرم در افراد اولیگواسپرمیک ۱۰۰٪ با تولید ROS رابطه داشت.در بیماران واریکوسلی ۵۲٪ و در بیماران نابارور با علت نامعلوم این رابطه ۵۸٪ بود [۴].

در مطالعه Agarawal و همکاران در سال ۲۰۰۹ افزایش تولید ROS داخل سلولی در رتهایی که از زمان قبل از بلوغ مبتلا به واریکوسل شده اند بخوبی نشان داده شد که با مطالعه ما همخوانی داشت [۲].

استرس اکسیداتیو باعث شکستن لیپید ها می شودکه محصول نهایی آن MDA می باشدکه از طریق واکنش تیوباربیتوریک اسید بررسی می شود [۳۸]. در این مطالعه در بیضه سمت چپ در گروه واریکوسل افزایش MDA مشاهده شد. (13.93 ± 1.04) ($P\leq0.05$) و در گروه واریکوسلی که بمدت ۶ هفته بذر کتان ۱۰٪ به غذای آنها اضافه شده بود کاهش MDA نشان داده شد (10.42 ± 1.63) ($P\leq0.05$). اما تفاوتی بین گروهها در سمت راست مشاهده نشد. اما Koksal و همکارانش در سال ۲۰۰۲ در یک مطالعه بر روی رتهای واریکوسلی (در ۷ هفتگی) adolscent با اندازه گیری MDA، SOD و کاتالاز در بافت بیضه، افزایش شدید MDA را درهر دو طرف نشان دادند [۲۷]. شاید اگر مدت زمان بیشتری از القا واریکوسل می گذشت سمت راست هم علائم این افزایش را بروز می داد.

در مورد وضعیت آنتی اکسیدانی در بیماران واریکوسلی گزارشات متناقض و متعددی وجود دارد. در این مطالعه هیچگونه تغییر قابل ملاحظه ای در مورد وضعیت آنتی اکسیدانی سیمن رتهای واریکوسلی مشاهده نشد. قدرت آنتی اکسیدانی مایعات بیولوژیک از طریق اندازه گیری اختصاصی آنتی اکسیدانها یا از طریق اندازه گیری اثر سینرژیک آنها بررسی می شود.به این اثر سینرژیک، ظرفیت کل آنتی اکسیدانی (TAC;Total antioxidant capacity) گویند. اندازه گیری تک تک آنتی اکسیدانها، کاری مشکل، گران و زمان بر می باشد.ولی اندازه گیری TAC آسانتر است [۱۴].

بررسی میزان MDA ، NO و TAS (Total) antioxidant status در بافت بیضوی رتهای adolescent واریکوسلی (رتهای ۶ هفته ای) توسط ozdamar و همکاران در سال ۲۰۰۴ صورت گرفت. MDA و NO افزایش معنی داری در گروه واریکوسلی داشت. TAC هم در رتهای واریکوسلی کاهش یافته بود. اما رابطه ای بین MDA، NO و TAC وجود نداشت. در این مطالعه که میزان TAS در گروه

Archive of SID
www.SID.ir

واریکوسل کمتر از گروه کنترل بود نشان داد که واریکوسل ممکن است باعث تخریب مکانیسمهای دفاعی بیضه گردد [۳۷]. در مطالعه mancini و همکاران در سال ۲۰۰۹، TAC در بیماران واریکوسلی بالاتر از گروه کنترل بود [۳۵]. در مطالعه Fingerova و همکارانش در سال ۲۰۰۷ که بر روی سیمن و پلاسمای خون مردان نابارور و سالم انجام گردید، دیده شد که میزان تولید ROS در هر دو گروه مساوی بود. میزان TAC سیمن در گروه نابارورکمتر بود در حالی که میزان TAC پلاسما در هر دو گروه مشابه بود. ارتباط مثبتی بین TAC در مایع سیمن و سرم یافت شد و میزان TAC سیمن ۱/۴ برابر پلاسما بود [۱۴]. درمطالعه جعفری و همکاران که در سال ۲۰۰۹ بر روی رتهای بالغ واریکوسلی انجام شد گزارش شد که TAC در گروه واریکوسلی تغییری نداشت [۲۳] که با مطالعه ما همخوانی داشت. بنابراین اکثر مطالعات اثرات مخرب ROS را در واریکوسل تایید می کنند [۳۶].

آنتی اکسیدانها ترکیباتی هستند که از تشکیل ROS جلو گیری کرده یا آنها را سرکوب و یا scavenge می کنند و گاهی هم با عملکرد مخرب ROS مقابله می کنند[۲۷].

بذرکتان دانه غذایی است که حاوی مقادیرزیادی اسیدهای چرب امگا ۳ و لیگنانهایی با خاصیت ضد التهابی و آنتی اکسیدانی می باشد. لیگنانهای بذرکتان منبع غنی از آنتی اکسیدانها هستند [۷].

این مطالعه نشان داد که مصرف بذر کتان ۱۰ ٪ پس از القا واریکوسل باعث کاهش آنیون سوپراکساید، H_2O_2 و MDA گردید.

اثرات آنتی اکسیدانی بذر کتان ۱۰ ٪ در واریکوسل بررسی نشده است اما در اختلالات دیگری که ناشی از استرس اکسیداتیو هستند مطالعات فراوانی صورت گرفته است.

در مطالعه Lee و همکارانش در سال ۲۰۰۸ اثر آنتی اکسیدانی بذر کتان ۱۰ ٪ در ایسکمی ریه در موشها بررسی شد و گزارش شد این موشها ROS کمتری از بافت آندوتلیوم عروق ریه آزاد کردند. که این نتایج هم بصورت invitro و هم بصورت invivo گزارش شد. قسمتی از این عملکرد با مهار heme oxygenase 1(OH) می باشد. MDA در بافت ریه این رتها که سه هفته قبل با بذر کتان ۱۰٪ تغذیه شده بودند کاهش یافته بود.

تولید H_2O_2 در سلولهای آندوتلیال ریوی با فلوروکروم دی کلروفلوروسین دی استات اندازه گیری شد و دیده شد که لیگنان انترودیول بذر کتان اثرات مستقیم Scavenge کننده ROS را دارد و باعث کاهش H_20_2 می گردد. کاهش در تولید آنیون سوپراکساید هم گزارش شد. این مطالعه نشان داد که بذر کتان باعث افزایش بیان ژنی nuclear factor – E_2- related factor – 2 –(Nrf_2) می شود که تنظیم کننده antioxidant promoter response element (ARE) است و کد کننده آنتی اکسیدانها می باشد. که یافته های این مطالعه را مبنی بر آنتی اکسیدان بودن بذر کتان تایید می کند [۳۱].

در نمونه خون گرفته شده ازرتهایی که کلسترول خون شان بالا بود ولی SDG دوماه بصورت خوراکی مصرف کرده بودند از پیشرفت دیابت و آترواسکلروز همراه با استرس اکسیداتیو جلوگیری کرده بود همچنین MDA بافت جداره آئورت در آنها نسبت به گروه دیابت و هیپرکلسترول کاهش و ذخیره آنتی اکسیدانی آن افزایش نشان داد [۴۰]. اما در این مطالعه تغییری در TAC یافت نشد.

در مطالعه Prasad و همکاران در سال ۲۰۰۰ جهت بررسی اثر SDG بر استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت، MDA سرمی و پانکراس، ذخیره آنتی کسیدانی پانکراس، و رادیکالهای آزاد ناشی از گلبولهای سفید اندازه گیری شد. SDG سه روز قبل از القاء دیابت و ۲۱ روز بعد بصورت خوراکی با دوز 22mg/kg به آب مصرفی اضافه شد. SDG از پیشرفت دیابت جلوگیری کرده و MDA سرمی و پانکراتیک و ROS ناشی از گلبولهای سفید را کاهش داد. ذخیره آنتی کسیدانی پانکراس افزایش نشان داد. مصرف SDG در گروه کنترل باعث کاهش ذخیره آنتی کسیدانی شد که توجیه خاصی برای آن وجود نداشت [۳۹].

در مطالعه دیگری اثر پیشگیرانه بذر کتان ۱۰٪ بر آسیب اکسیداتیو ریوی ناشی از اشعه در رتها با اندازه گیری MDA بافت ریوی انجام شد. و نتیجه کاهش MDA گزارش گردید همچنین H_2O_2 تولید شده توسط سلولهای اندوتلیال ریوی بصورت invitro توسط دی کلروفلورسین دی استات بررسی شده و نهایتا آن را کاهش داد. همچنین باعث کاهش BAX هم شد. یعنی مانع آپوپتوز می گردد [۳۲].

در مطالعه دیگری دیده شد که بذر کتان ۱۰٪ توانست

Archive of SID
www.SID.ir

باعث scavenge کردن آنیونهای سوپر اکساید و پراکسید هیدروژن و همینطور باعث کاهش MDA گردد. در حالیکه برذخیره آنتی اکسیدانی اثری نداشت [۲۹].

بنابراین مطالعات دیگران هم می تواند در مورد آنتی اکسیدان بودن بذر کتان تاییدی بر مطالعه ما باشد.

از آنجایی که آنتی اکسیدانها باعث سرکوب عملکرد ROS میگردند، می توانند در درمان ناباروری مردان استفاده شوند یا به محیط کشت اسپرم اضافه گردند. اما اثر بخشی این درمانها طبق مقالات محدود می باشد. بطور کلی گزارشات نشان می دهد که استفاده از آنتی اکسیدانها بصورت تکی قادر به بهبود باروری نمی باشد در حالی که استفاده ترکیبی از آنها نتیجه بهتری ایجاد می کند [۲۹].

اینکه آیا مقدار بذر کتان خورانده شده به موشها قابل مقایسه با انسان است یا خیر در مطالعه ای نشان داده شده که غلظت پلاسمایی لیگنانهای آن در انسان مشابه خوردن ۸ روز کیک حاوی بذر کتان میباشد که حدود ۲۵ گرم بذر کتان دارد. علاوه بر این لیگنانهای بذر کتان قابل ایزوله شدن و تجویز کردن به بیماران می باشد. لیگنانهای گیاهی که خاصیت آنتی اکسیدانی دارند از طریق تحریک تولید آنزیمهایی مثل گلوتاتیون S ترانسفراز، SOD، و کاتالاز عمل می کنند [۳۱].

واریکوسل اطفال باعث تغییرات برگشت ناپذیر در سلولهای بنیادی ژرمینال شده و منجر به هیپو اسپرماتوژنزیس می گردد حتی اگر در زمان بلوغ نیز ترمیم شود [۴۷]. افزایش گونه های فعال اکسیژن در واریکوسل باعث صدمه اکسیداتیو شده و عملکرد اسپرم را تحت تاثیر قرار می دهد. آنتی اکسیدانهای محلول در چربی مانند بذر کتان یا لیگنانهای آن می توانند اثرات درمانی در واریکوسل اطفال داشته باشند و باعث حفاظت اسپرم در برابر صدمات ناشی از ROS گردند و در پیشگیری یا درمان این کودکان مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است که نویسندگان مقاله به این وسیله تقدیر و تشکر خود را اعلام می کنند.

References

[1] Abd-Elmoaty MA, Saleh R, Sharma R, Agarwal A, Increased levels of oxidants and reduced antioxidants in semen of infertile men with varicocele. ***Fertil Steril*** 94(2010)1531-34.

[2] Agarwal A, Sharma RK, Desai NR, Prabakaran S, Tavares A, Sabanegh E, Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. ***Urology*** 73 (2009) 461-9.

[3] Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA, Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. ***Fertil Steril*** 79 (2003) 829-43.

[4] Aitken RJ, Clarkson JS, Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa, ***Reproduction*** 81 (1987) 459-69.

[5] Barbieri ER, Hidalgo ME, Venegas A, Smith R, Lissi EA, Varicocele-associated decrease in antioxidant defenses. ***J Androl*** 20 (1999) 713-17.

[6] Barroso U Jr, Andrade DM, Novaes H, Netto JM, Andrade J, Surgical Treatment of Varicocele in Children With Open and Laparoscopic Palomo Technique: A Systematic Review of the Literature. ***J Urol*** 181 (2009) 2724-28.

[7] Basch E, Bent S, Collins J, Dacey C, Hammerness P, Harrison M, Smith M, Szapary P, Ulbricht C ,Vora M, Weissner W. Flax and Flaxseed Oil (Linum usitatissimum): A Review by the Natural Standard Research Collaboration, ***J Soc Integr Oncol*** 5 (2007) 92-105.

[8] Cam K, Simsek F, Yuksel M, Turker L, Haklar G, Yalcin S, Akdas A, The role of reactive oxygen species and apoptosis in the pathogenesis of varicocele in a rat model and efficiency of vitamin E treatment. **Int *J Andrology*** 27 (2004) 228-233.

[9] Celik-Ozenci C, Bayram Z, Akkoyunlu G, Korgun ET, Erdogru T, Seval Y, Ustunel I, Baykara M, Demir R, Localization of NGF and nNOS in varicocele-induced rat testis. ***Acta histochemica*** 107(2006) 435-442.

[10] Cheng D, Zheng XM, Li SW, Yang ZW, Hu LQ,

www.SID.ir
Archive of SID

Effects of epidermal growth factor on sperm content and motility of rats with surgically induced varicoceles. ***Asian J Andrology*** 8 (2006) 713-717.

[11] Choi H, Kim KS, Kim KM, The effect of experimental varicocele on the testis of adolescent rats. ***J Urol*** 144 (1990) 499-501.

[12] Diamond DA, Adolescent varicocele: emerging understanding. ***BJU Int*** 92(2003) 48-51.

[13] Fideleff HL, Boquete HR, Suarez MG, Ruibal GF, Sobrado PG, Azaretsky M, Pujol AB, Sequera AM, Giuseppucci J, Ponzio R, Controversies in the evolution of paediatric-adolescent varicocele: clinical, biochemical and histological studies. ***Eur J Endocrinology*** 143 (2000) 775-781.

[14] Fingerova H, Novotny J, Barborik J, Brezinova J, Svobodova M, Krskova M,Oborna I, Antioxidant capacity of seminal plasma measured by TAS Randox (R). ***Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*** 151 (2007) 37- 40.

[15] French DB, Desai NR, Agarwal A, Varicocele repair: does it still have a role in infertility treatment?. ***Curr Opin Obstet Gynecol*** 20(2008) 269-274.

[16] Gat Y, Gornish M, Belenky A, Bachar GN, Elevation of serum testosterone and free testosterone after embolization of the internal spermatic vein for the treatment of varicocele in infertile men. ***Hum Reprod*** 19 (2004) 2303-2306.

[17] Guthrie HD, Welch GR, Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. ***J anim sci*** 84 (2006) 2089-2100.

[18] Haidl G, Management strategies for male factor infertility. ***Drugs*** 62 (2002)1741-1753.

[19] Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas AJ, Agarwal A, Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. ***J urol*** 161 (1999) 1831-1834.

[20] Hosseinian FS, Muir AD, Westcott ND, Krol ES, AAPH-mediated antioxidant reactions of secoisolariciresinol and SDG. ***Org Biomol Chem*** 5 (2007) 644-654.

[21] Ilbey YO, Ozbek E, Cekmen M, Simsek A, Otunctemur A, Somay A, Protective effect of curcumin in cisplatin-induced oxidative injury in rat testis: mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. ***Hum Reprod*** 24 (2009) 1717-1725.

[22] Jafari A, Zahmatkesh M, Sadeghipour HR, Kajbafzadeh A, Sarrafnejd A, Shahrestany T, Noori SM, Flow Cytometric Evaluation of Sperm Superoxide Anion Production in Rats With Experimental Varicocele. ***Urology*** 75 (2010) 217-222.

[23] Adolphe JL, Whiting SJ, Juurlink BH, Thorpe LU , Alcorn J, Health effects with consumption of the flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. ***Br J Nutr*** 103(2010) 929-938.

[24] Kadkhodaie M, The role of oxygen free radicals in reperfusion injury. ***Physiology and Pharmacology*** 5 (2001) 97-105.

[25] Kilinc F, Kayaselcuk F, Aygun C, Guvel S, Egilmez T, Ozkardes H, Experimental varicocele induces hypoxia inducible factor-1a, vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in the rat testis. ***J urol*** 172(2004)1188-1191.

[26] Kinniry P, Amrani Y, Vachani A, Solomides CC, Arguiri E, Workman A, Carter J, Christofidou-Solomidou M, Dietary flaxseed supplementation ameliorates inflammation and oxidative tissue damage in experimental models of acute lung injury in mice. ***J Nutr*** 136 (2006)1545-1551.

[27] Koksal T, Erdogru T, Toptas B, Gulkesen KH, Usta M, Baykal A, Baykara M, Effect of experimental varicocele in rats on testicular oxidative stress status. ***Andrologia*** 34 (2002) 242-247.

[28] Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V, Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. ***J clin pathol*** 54 (2001) 356-361.

[29] Lanzafame FM, La Vignera S, Vicari E, Calogero AE, Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. ***Reprod biomed online*** 19 (2009) 638-659.

[30] Ledwozyw A, Michalak J, Stephen A, Kadziolka A, The relationship between plasma triglycerides, total lipids , and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. ***Clin Chem Acta*** 155 (1986) 275-283.

[31] Lee JC, Bhora F, Sun J, Cheng G, Arguiri E, Solomides CC, Chatterjee S, Christofidou-solomidou M, Dietary flaxseed enhances antioxidant defenses and is protective

www.SID.ir

in a mouse model of lung ischemia-reperfusion injury . ***Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*** 294 (2008) 255-265.

[32] Lee JC, Krochak R, Blouin A, Kanterakis S, Chatterjee S, Arguiri E, Vachani A, Solomides CC, Cengel KA, Christofidou-Solomidou M, Dietary flaxseed prevents radiation-induced oxidative lung damage, inflammation and fibrosis in a mouse model of thoracic radiation injury. ***Cancer biol ther*** 8 (2009) 47-53.

[33] Li H, Dubocq F, Jiang Y, Tiguert R, Gheiler EL, Dhabuwala CB, Effect of surgically induced varicocele on testicular blood flow and Sertoli cell function. ***Urology*** 53 (1999) 1258- 1262.

[34] Makker K, Agarwal A, Sharma R, Oxidative stress & male infertility**.** ***Indian J Med Res*** 129 (2009) 357-367.

[35] Mancini A, Festa R, Silvestrini A, Nicolotti N, Di Donna V, La Torre G, Pontecorvi A,Meucci E, Hormonal regulation of total antioxidant capacity in seminal plasma. ***J Androl*** 30 (2009) 534-540.

[36] Mostafa T, Anis T, Imam H, El-Nashar AR, Osman IA, Seminal reactive oxygen species-antioxidant relationship in fertile males with and without varicocele. ***Andrologia*** 41 (2009) 125-129.

[37] Ozdamar AS, Soylu AG, Culha M, Ozden M, Gokalp A, Testicular oxidative stress. Effects of experimental varicocele in adolescent rats. ***Urol Int*** 73 (2004) 343-347.

[38] Ozturk H, Tander. B., Aydin A,Okumus Z,Cetinkursun S, The effects of chemical sympathectomy on testicular injury in varicocele. ***BJU Int*** 87 (2001) 232- 234.

[39] Prasad K, Mantha SV, Muir AD, Westcott ND. Protective effect of secoisolariciresinol diglucoside against streptozotocin-induced diabetes and its mechanism. ***Mol cell biochem*** 206 (2000) 141-150.

[40] Prasad K, Regression of hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits by secoisolariciresinol diglucoside isolated from flaxseed. ***Atherosclerosis*** 197 (2008) 34-42.

[41] Rajeev K, Rupin SH, Varicocele and male infertility: current status. ***Obstet Gynecol India*** 55 (2005) 505-516.

[42] Sanocka D, Kurpisz M, Reactive oxygen species and sperm cells. ***Reprod Biol Endocrinol*** 2 (2004) 12-19.

[43] Shiraishi K, Naito K, Nitric oxide produced in the testis is involved in dilatation of internal spermatic vein that compromises spermatogenesis in infertile men with varicocele. ***BJU Int*** 99 (2007) 1086-1090.

[44] Shiraishi K, Takihara H, Matsuyama H, Elevated scrotal temperature, but not varicocele grade, reflects testicular oxidative stress-mediated apoptosis. ***World J Urol*** 28 (2010) 359-364.

[45] Shook TE, Nyberg LM, Collins BS, Mathur S, Pathological and immunological effects of surgically induced varicocele in juvenile and adult rats. ***Am J Reprod Immunol Microbiol*** 17(1988) 141-144.

[46] Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, Castro A, Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. ***Hum Reprod*** 21 (2006) 986-993.

[47] Tekgul S, Riedmiller H, Gerharz E, Hoebeke P, Kocvara R, Nijmam Chr, Radmayr R, Stein R, Guidelines on paediatric urology. European Society for Paediatric Urology, ***European Association of Urology*** (2008).

[48] Trigo RV, Bergada I, Rey R, Ballerini MG, Bedecarras P, Bergada C, Gottlieb S, Campo S, Altered serum profile of inhibin B, Pro-alphaC and anti-Mullerian hormone in prepubertal and pubertal boys with varicocele. ***Clin Endocrinol*** 60 (2004) 758-764.

[49] WH O, WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction: ***behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press***. united kingdom**,** (1999).

[50] Zampieri N, Cervellione RM, Varicocele in Adolescents: A 6-Year Longitudinal and Followup Observational Study. ***J Urol*** 180 (2008)1653-1656.

[51] Zheng Y, Zhang X, Zhou J, Cheng F, Zhou B, Effects on the ipsilateral testis during progression of experimental varicocele in rat. ***Med Sci Monit*** 14 (2008)122-126.

www.SID.ir