

## اثر پرتو لیزر کم توان با طیف قرمز و مادون قرمز روی لوله‌های اسپرم‌ساز موش آزمایشگاهی

دکتر غلامرضا حسن زاده<sup>۱</sup>، محمد دیهیمی<sup>۲</sup>، دکتر مهناز آذرنیا<sup>۳</sup>، دکتر مجید رجبی<sup>۴</sup>، نسرين تک زارع<sup>۵\*</sup>

۱- دانشیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۲- کارشناس ارشد بیولوژی. ۳- دانشیار گروه بیولوژی، دانشگاه تربیت معلم تهران.

۴- پزشک عمومی. ۵- مربی و عضو هیأت علمی گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** لیزر نوعی منبع تابش امواج الکترومغناطیسی است. لیزر تراپی نوعی تأثیر بافتی به صورت طبیعی و تحریک بیولوژیک با کمک انرژی و توان نور محسوب می‌شود. امروزه بیشترین و پرکاربردترین لیزرهای کم‌توان در درمان بیماری‌ها، لیزرهای با پرتوهای مادون قرمز (infrared) و قرمز (red) می‌باشند. این مطالعه به منظور تعیین اثر پرتو لیزر کم‌توان با طیف قرمز و مادون قرمز روی لوله‌های اسپرم‌ساز موش آزمایشگاهی انجام شد.

**روش بررسی:** این مطالعه تجربی روی ۴۰ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم و سن متوسط ۸ هفته انجام شد. موش‌ها به ۴ گروه ده تایی تقسیم شدند که شامل یک گروه شاهد و سه گروه تجربی (مورد) بود. گروه شاهد فقط تحت بیهوشی روزانه قرار گرفت. در گروه تجربی ۱، بیضه راست موش‌ها در معرض تابش مخلوطی از طیف مادون قرمز با فرکانس ۳۰۰ هرتز (۷ دقیقه) و طیف قرمز (۱ دقیقه) قرار گرفت. در گروه تجربی ۲، بیضه راست موش‌ها در معرض تابش پرتو مادون قرمز با فرکانس ۳۰۰ هرتز (۸ دقیقه و ۴۰ ثانیه) واقع شد. در گروه تجربی ۳، بیضه راست موش‌ها در معرض تابش پرتو مادون قرمز با فرکانس ۸۰ هرتز (۵ دقیقه) و طیف قرمز (۱ دقیقه) به طور روزانه قرار گرفت. پس از ۱۵ روز، بیضه‌ها از بدن موش‌ها خارج گردید و پس از مراحل فیکساسیون و رنگ‌آمیزی نمونه‌ها مورد بررسی و مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند. قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و قطر لومن و همچنین قطر و مساحت بخش سلولی اپی‌تلیوم اسپرم‌ساز در موش‌ها تعیین شد. میزان تستوسترون با روش رادیوایمنواسی مورد سنجش قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری با کمک نرم‌افزار SPSS-13 و آنالیز واریانس یک طرفه انجام گردید.

**یافته‌ها:** قطر لوله اسپرم‌ساز، فضای لومن و ضخامت اپی‌تلیال بین گروه‌های آزمایشی ۱، ۲ و ۳ تفاوت آماری معنی‌داری داشت ( $P < 0/05$ ). این شاخص‌ها بین گروه‌های تجربی و شاهد تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. همچنین تفاوت آماری معنی‌داری در تستوسترون اندازه‌گیری شده بین گروه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که تغییرات مورفولوژیک و مورفومتریک لوله‌های اسپرم‌ساز ارتباط مستقیم با دانسیته انرژی لیزر دارد و استفاده از لیزر کم‌توان طیف مادون قرمز با فرکانس ۳۰۰ هرتز یا به حالت ترکیبی طیف مادون قرمز با فرکانس ۸۰ هرتز همراه با طیف قرمز در افزایش قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و افزایش سلول‌های ژرمینال و اسپرم‌ها موثر می‌باشد.

**کلید واژه‌ها:** لوله‌های اسپرم‌ساز، طیف مادون قرمز، لیزر کم‌توان، اسپرماتوژنز

\* نویسنده مسؤول: نسرين تک زارع، پست الکترونیکی: [takzaree@yahoo.com](mailto:takzaree@yahoo.com)

نشانی: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح، تلفن: ۸۸۹۵۳۰۰۸ (۰۲۱)، نامبر: ۸۸۹۵۳۰۰۷

وصول مقاله: ۸۸/۱۲/۱۶، اصلاح نهایی: ۸۹/۲/۲۹، پذیرش مقاله: ۸۹/۵/۱۰

## مقدمه

لیزر تراپی یا به کارگیری لیزرهای کم توان در درمان بیماری‌ها بر اساس شناخت امواج نورانی و تأثیر آن بر مولکول‌ها، سلول‌ها و بافت‌های زنده سالم و بیمار، بنا نهاده شده است و به عنوان شاخه‌ای نوین در پزشکی امروز مطرح می‌باشد. به عبارت دیگر، لیزر تراپی نوعی تأثیر بافتی به صورت طبیعی و بیولوژیک با کمک انرژی و توان نور محسوب می‌شود. لیزر باعث ایجاد ساختارها و واکنش‌های جدید در بافت‌های زنده می‌گردد. تاکنون لیزرهای متعددی ساخته شده‌اند که بر اساس عوامل مختلفی چون ماده فعال، منبع تحریک، توان خروجی و محدوده طیف گروه‌بندی می‌شوند. یکی از جدیدترین کاربردهای لیزر در پزشکی، امکان تسکین درد و درمان بیماری با استفاده از لیزرهای کم توان است (۱).

در مطالعه‌ای که توسط Taha (۲) با استفاده از لیزر مادون قرمز انجام شد؛ مشخص گردید که لیزر با دوز پایین  $2.8/0.5 \text{ j/cm}$  دارای اثرات تحریکی بر روی اسپرما توژنز در موش‌ها می‌باشد (۲). مطالعات نشان داده است که هرگونه تغییر مورفولوژیکی و یا بیوشیمیایی در سلول‌های اپی‌تلیوم بیضه موجب تغییر در روند اسپرما توژنز و تغییر در میزان باروری موش‌ها می‌شود (۳و۴). تابش نور با برخی طول موج‌های خاص (ماده جاذب نور حساس به طول موج) در سلول قادر است؛ بعضی از اجزاء سلولی مانند فیبروبلاست‌ها را فعال کرده و به این ترتیب واکنش‌های شیمیایی و متابولیسم سلولی را تغییر دهد. به نظر می‌رسد این دسته واکنش‌ها اساس تأثیرات لیزر کم توان را تشکیل می‌دهند. به طور مسلم هرگونه تغییر مورفولوژیکی و یا بیوشیمیایی در سلول‌های اپی‌تلیوم بیضه موجب تغییر در روند اسپرما توژنز و تغییر در میزان باروری موش‌ها می‌شود (۲). در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردید که تولید تستوسترون در پاسخ به افزایش LH توسط سلول‌های لایدیگ موش تحت اثر لیزر هلیوم - نئون با دوز  $4/2 \text{ j/cm}^2$  بسیار بالاتر از گروه شاهد بوده است (۵). علاوه بر این لیزر موجب بروز گرما در بافت‌ها و افزایش آپوپتوزیس در سلول‌ها شده است (۶). امروزه این باور وجود دارد که تحریکات خارج سلولی، پاسخ‌هایی از جمله تکثیر، تمایز و حتی آپوپتوز را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۷و۸).

در مطالعاتی اثرات لیزر بر تخمدان‌های موش مورد بررسی قرار گرفت که نتیجه آن افزایش استروئید دهیدروژناز و به دنبال آن افزایش استروژن و پروژسترون بود. همچنین افزایش تشکیل مجدد بستر رگی بین تخمدانی و تشکیل عروق کوچک و افزایش قطر مویرگی مشاهده گردید (۹و۱۰). همچنین لیزر کم توان حتی در دوزهای بسیار پائین سبب افزایش سنتز DNA و افزایش درصد تعداد سلول‌های اسپرما توگونی و اسپرما توسیت‌های اولیه می‌شود؛ ولی تأثیری بر درصد DNA اسپرما تیدها ندارد (۱۱و۱۲).

امروزه در پزشکی استفاده از پرتو لیزر کم توان با طیف قرمز و مادون قرمز متداول و رایج است و در عین حال اختلاف نظرهایی بین متخصصین در ارتباط با میزان مؤثر بودن هر یک از آنها یا ترکیبی از هر دو وجود دارد. با توجه به اهمیت باروری در مردان و مشکلات ناشی از اولیگو اسپرمی یا آرو اسپرمی که موجب ناباروری می‌شود؛ این مطالعه به منظور تعیین اثر پرتو لیزر کم توان با طیف قرمز و مادون قرمز روی لوله‌های اسپرم‌ساز موش آزمایشگاهی انجام شد.

## روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۴۰ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم و سن متوسط ۸ هفته (دوماه) انجام شد. موش‌ها در حیوان‌خانه نگهداری شدند. در هر قفس ۱۰ موش نر قرار گرفت. موش‌ها از نظر نور، دما، تغذیه، رطوبت و سایر عوامل زیستی تحت کنترل بودند. روشنایی محیط به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود. غذای مورد نیاز موش‌ها به ازاء هر ۱۰۰ گرم وزن بدن ۶-۵ گرم در روز محاسبه شد و در اختیار موش‌ها قرار گرفت.

در این مطالعه حیوانات به طور تصادفی به چهار گروه (یک گروه شاهد و سه گروه تجربی) تقسیم شدند. در هر گروه ۱۰ سر موش قرار داده شد. گروه شاهد فقط تحت بیهوشی روزانه قرار گرفت؛ ولی سه گروه تجربی پس از بیهوشی تحت اثر پرتوهای لیزر قرار گرفتند. در این مطالعه دوز لیزر مورد استفاده به میزان ۲ ژول بر سانتی متر مربع (مؤثرترین دوز) انتخاب شد. پرتوهای قرمز که از نوع پیوسته (Continue) بودند؛ با توان ماکزیمم ۸ میلی‌وات انتخاب شد

۸۷ وات و میزان فرکانس برای مادون قرمز ۳۰۰ هرتز و ۸۰ هرتز تنظیم شد. در ابتدا و انتهای پرتوتابی، آینه خروجی Beam لیزر توسط پنبه و الکل با دقت تمیز شد.

۲۴ ساعت پس از آخرین پرتوتابی حیوانات بیهوش شدند و ۲ سی‌سی نمونه خون از قلب هر یک از موش‌ها گرفته شد. نمونه‌های خون به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۵۰۰ pm سانتریفوژ شدند. سرم توسط Sampler جداسازی شد و آزمایش رادیوایمنواسی برای اندازه‌گیری تستوسترون انجام گردید. همچنین پس از خونگیری بیضه راست موش‌ها خارج گردید و به وسیله محلول بوئن فیکس و نمونه‌های بافتی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد. پس از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین-اوتزین و تولوئیدین بلو مطالعه میکروسکوپی صورت گرفت و تصاویری که توسط دوربین (Canon Power Shut S50) تهیه گردید؛ با استفاده از نرم افزار Image tools 2 مورد ارزیابی قرار گرفتند. در هر یک از گروه‌ها قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، قطر اپی‌تلیوم و مساحت بخش سلولی اپی‌تلیوم در لوله‌های اسپرم‌ساز و قطر مجرای اسپرم‌ساز اندازه‌گیری شد. از هر گروه ۴۰ لوله اسپرم‌ساز تقریباً مدور با بزرگ‌نمایی‌های ۱۰۰ برابر و ۴۰۰ برابر مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. این مقایسه بین هر یک از گروه‌های تجربی با گروه شاهد و نیز بین خود گروه‌های تجربی با یکدیگر از نظر اندازه قطر لوله‌های اسپرم‌ساز (Tubules)، قطر مجرا (Lumen) و ضخامت بخش سلولی انجام گرفت. برای همه گروه‌ها، میانگین و انحراف معیار و خطای استاندارد محاسبه گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و نرم‌افزار آماری SPSS-13 تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

##### یافته‌های مورفومتریک

قطر لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه‌های تجربی ۲ و ۳ هر کدام در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ( $P < 0/05$ )؛ ولی بین اندازه قطر لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه‌های شاهد و تجربی ۱ اختلاف آماری معنی‌داری دیده نشد. همچنین مقایسه این شاخص در گروه‌های تجربی ۲ و ۳ نسبت به هم اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ).

و پرتوهای مادون قرمز از نوع پالسی با توان ماکزیمم ۸۷ وات انتخاب گردید.

دستگاه مورد استفاده Mustang 2000 با لیزر از نوع Ga.Al.As (گالیم - آلومینیوم - آرسناید) با طول موج حداکثر ۸۳۰ nm بود. موش‌ها هر روز پس از انجام پرتوتابی به محل نگهداری برگردانده شدند و در شرایط عادی قرار گرفتند.

در ابتدای آزمایش موش‌های گروه شاهد و سه گروه تجربی به وسیله ترازوی دیجیتالی آزمایشگاهی توزین شدند. همین‌طور مشخصات مورفولوژیکی موش‌ها نیز کنترل گردید. در هر روز ابتدا موش‌های شاهد و تجربی توسط داروی کتامین (۴۰ mg/kg) و داروی زایلازین (۵ mg/kg) که به صورت IP به حیوان تزریق گردید؛ بیهوش شدند. موهای بیضه موش‌ها تراشیده و شستشو گردید. سپس نقطه‌ای در وسط بیضه راست علامت‌گذاری و موش‌ها روی یک سطح صاف خوابانده شدند و پرتو لیزر (Beam) روی بیضه راست و درست روی همان نقطه علامت‌گذاری شده تابانده شد.

در گروه تجربی ۱ بیضه راست موش‌ها به مدت ۷ دقیقه پرتو مادون قرمز با فرکانس ۳۰۰ هرتز دریافت کرد و سپس بلافاصله به مدت ۱ دقیقه پرتو لیزر قرمز به آنها تابانده شد. در گروه تجربی ۲ به مدت ۸ دقیقه و ۴۰ ثانیه بیضه راست آنها تحت تابش پرتوهای مادون قرمز با فرکانس ۳۰۰ هرتز قرار گرفت. در گروه تجربی ۳ بیضه راست موش‌ها به مدت ۵ دقیقه تحت تأثیر پرتو مادون قرمز با فرکانس ۸۰ هرتز و سپس بلافاصله ۱ دقیقه تحت پرتو لیزر قرمز قرار گرفت. موش‌ها به مدت ۱۵ روز تحت اثر پرتو لیزر بودند؛ به صورتی که در گروه تجربی ۱ در مجموع ۱۰۵ دقیقه لیزر مادون قرمز (IR) با فرکانس ۳۰۰ هرتز و ۱۵ دقیقه لیزر قرمز (R) و در گروه تجربی ۲ در کل ۱۳۰ دقیقه لیزر مادون قرمز با فرکانس ۳۰۰ هرتز و در گروه تجربی ۳ در مجموع ۷۵ دقیقه لیزر مادون قرمز با فرکانس ۸۰ هرتز و ۱۵ دقیقه لیزر قرمز به بیضه راست موش‌ها تابانده شد. موش‌های گروه شاهد هیچ‌گونه اشعه‌ای دریافت نکردند.

هر بار قبل از پرتوتابی دستگاه کالیبره شده و میزان توان (Power) برای پرتو قرمز ۸ میلی‌وات و برای مادون قرمز

در گروه تجربی ۱ فضاهای بینابینی کم تراکم بوده و سلول‌های لایدیگ کمتری مشاهده شد. هسته‌های مثلی شکل سرتولی نزدیک به غشاء پایه مشاهده شد و برخی توبول‌ها اسپرما توزوئید کمتری (کمتر از حد معمول) داشتند (تصویر یک).



تصویر ۲: نمای فتومیکروسکوپی لوله‌های منی ساز گروه تجربی دوم، رنگ‌آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر

افزایش قطر مجرای لوله‌های اسپرم‌ساز نسبت به گروه شاهد چندان محسوس نبود و حتی در مواردی کمتر نیز شده بود. اسپرما توگونی‌ها و اسپرما توسیت‌های اولیه و اسپرما تیدها نیز تفاوت چندانی با گروه شاهد نشان ندادند.

در گروه تجربی ۲ در اکثر فضاهای بینابینی سلول‌های لایدیگ قابل مشاهده بود. در داخل برخی توبول‌ها اسپرما توگونی و اسپرما توسیت اولیه و اسپرما تید به تعداد فراوان‌تر از گروه شاهد و با تراکم بیشتر قابل مشاهده بود (تصویر ۲).

در گروه تجربی ۳ تعداد سلول‌های لایدیگ در فضای بینابینی کمتر بود. قطر بخش سلولی و تراکم سلول‌های ژرمینال نسبت به گروه‌های دیگر بیشتر بود.

از نظر میزان هورمون تستوسترون موش‌ها بین گروه‌ها اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد.

### بحث

این مطالعه نشان داد که استفاده از لیزر کم توان طیف مادون قرمز با فرکانس ۳۰۰ هرتز و یا به حالت ترکیبی طیف مادون قرمز با فرکانس ۸۰ هرتز همراه با طیف قرمز در افزایش قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و افزایش سلول‌های ژرمینال و اسپرم‌ها مؤثر می‌باشد؛ ولی پس از استفاده از طیف مادون قرمز

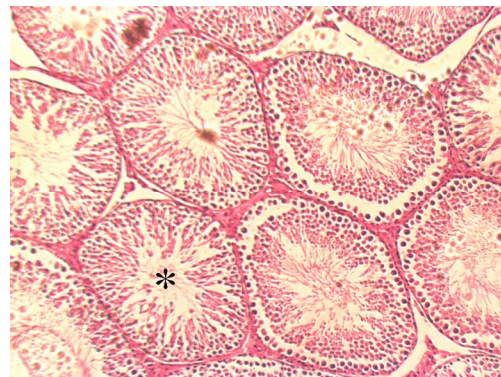
همچنین براساس یافته‌های این مطالعه، اختلاف معنی‌داری در اندازه فضای داخلی لوله‌های اسپرم‌ساز گروه تجربی ۱ با گروه شاهد یافت نشد؛ ولی بین هر یک از گروه‌های تجربی ۲ و ۳ با گروه شاهد و نیز در مقایسه با گروه‌های تجربی ۲ و ۳ با یکدیگر به وسیله آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ).

ضخامت اپی‌تلیوم لوله اسپرم‌ساز در گروه تجربی ۱ در مقایسه با گروه شاهد از لحاظ عددی کاهش اندکی را نشان داد و آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه اختلاف آماری معنی‌داری بین این دو گروه را نشان نداد. در مقایسه بین گروه‌های تجربی ۲ و ۳ اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ).

بین گروه‌های تجربی ۲ و ۳ با گروه تجربی ۱ اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده گردید. بدین معنی که لیزر مادون قرمز با فرکانس ۳۰۰ هرتز به تنهایی و لیزر ترکیبی قرمز و مادون قرمز با فرکانس ۸۰ هرتز سبب تحریک اسپرما توزوئز و افزایش سلول‌های ژرمینال شده؛ ولی ترکیب لیزر قرمز با مادون قرمز با فرکانس ۳۰۰ هرتز دارای اثرات بازدارنده در تحریکات بیولوژیک داشت ( $P < 0.05$ ).

### یافته‌های هیستوپاتولوژیک

در بررسی اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه شاهد تعداد سلول‌های لایدیگ طبیعی است و اسپرما توگونی A و اسپرما توسیت اولیه و اسپرما تید فراوان مشاهده شد و در برخی توبول‌ها احتمالاً به علت به‌سر بردن در فاز استراحت اسپرما توزوآی کمتری دیده شد و هسته سلول‌های سرتولی نیز قابل تشخیص بود.



تصویر ۱: نمای فتومیکروسکوپی لوله‌های اسپرم‌ساز گروه تجربی اول، رنگ‌آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر

داده‌اند که بسیاری از مسیرهای سلولی از طریق وضعیت Redox سلول تنظیم می‌شود. تحریکات خارج سلولی پاسخ‌هایی از جمله تکثیر، تمایز و حتی آپوپتوز را تحت تأثیر قرار می‌دهند. تعدیل وضعیت Redox سلولی از طریق عامل نسخه‌برداری NF-KB و فسفولیپاز A2 سنتز DNA را افزایش می‌دهند. بنابراین لیزر کم توان ریتم تقسیمات میتوزی و میوزی را در اسپرماتوژنز سرعت می‌بخشد و در تعداد سلول‌های ژرمینال به خصوص اسپرماتوسیت‌های اولیه، افزایش ایجاد می‌نماید (۱۴).

یکی دیگر از انواع لیزرهای کم توان مورد استفاده در پزشکی طیف مادون قرمز با فرکانس ۸۰ هرتز است که البته اغلب توسط پزشکان به صورت ترکیبی با طیف قرمز استفاده می‌شود (۱۶). از طیف قرمز بیشتر برای درمان در موارد سطحی تر استفاده می‌شود؛ در حالی که برای موارد عمقی تر از طیف مادون قرمز استفاده می‌گردد (۱۱). هنگامی که این دو طیف به صورت ترکیبی البته با فرکانس پائین مادون قرمز (۸۰ هرتز) استفاده می‌شود؛ اثرات تحریکی بیشتر و مؤثرتری را نشان می‌دهد. دلیل این وضعیت می‌تواند آن باشد که هر کدام از این طیف‌ها اثرات بیولوژیک خاصی را کنترل می‌نمایند. بنابراین استفاده ترکیبی از هر دو نوع طیف اثرات بیولوژیک وسیع‌تری را ایجاد می‌نماید. به عنوان مثال پرتوهای لیزر کم توان علاوه بر تأثیر بر فسفوریلاسیون اکسیداتیو در میتوکنندری‌ها و افزایش تولید ATP میکروسیر کولاسیون (گردش خون میکروسکوپی) را افزایش می‌دهند.

لیزر با آزادسازی مواد شیمیایی مانند هیستامین سبب انقباض عروقی می‌شود که همراه با افزایش فسفوریلاسیون اکسیداتیو سلول‌ها سبب افزایش متابولیسم سلولی می‌گردد (۱). افزایش میکروسیر کولاسیون در بیضه وضعیت متابولیسمی را بهبود می‌بخشد که پس تابش لیزر اثر تحریکی بیولوژیک مهم در اسپرماتوژنز را توجیه می‌کند (۱۷).

تحت تأثیر پرتوهای لیزر کم توان تغییراتی در مرحله پاکی تن اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتیدها در درجات مختلف ایجاد می‌شود و در نتیجه طول فاز سیکل سلولی در انواع سلول‌های ژرمینال تغییر می‌نماید (۱۵).

از طرف دیگر پرتو لیزر کم توان به ویژه با طیف مادون قرمز

۳۰۰ هرتز همراه با طیف قرمز اثرات چندانی مطلوبی در وضعیت اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز مشاهده نشد. بنابراین از دو گروه تجربی فرکانس ۳۰۰ هرتز و فرکانس ۸۰ هرتز همراه با طیف قرمز در درمان الیگواسپرمی‌ها می‌توان استفاده مؤثرتری نمود. به دلیل پرتوتابی فقط به یک بیضه موش تفاوت معنی‌داری در میزان تستوسترون خون موش در گروه تجربی مشاهده نگردید. به علت تأثیرات نامشخص اشعه لیزر روی بیضه‌ها، در مورد استفاده از لیزر تراپی در ارولوژی اختلاف نظر وجود دارد. گرچه گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد؛ اشعه لیزر به دلیل اثرات تحریک کیفیت، تحرک اسپرم‌ها را تقویت می‌کند (۱۳).

در مطالعات انجام شده در ارتباط با اثر لیزر هلیوم - نئون با طول موج ۶۳۰ نانومتر روی اسپرم‌های موش، مشاهده گردید که افزایش تحرک قابل توجهی در اسپرم‌ها پدید آمده است. مطالعه‌ای نشان داد که پرتو لیزر سبب افزایش سطح کلسیم بین سلولی می‌شود و نتیجه آن افزایش پتانسیل لقاح در این سلول‌ها می‌باشد. لیزر احتمالاً بر مکانیسم‌های  $Ca^{2+}$  ترانسپورت میتوکنندری اثر می‌گذارد (۱۴). همچنین لیزر کم توان روی سنتز اسیدنوکلئیک و تمایز سلولی تأثیر گذار می‌باشد (۱۵).

هنگام استفاده از لیزر کم توان از نوع پرتو مادون قرمز با فرکانس ۳۰۰ هرتز که یکی از فرکانس‌های متداول درمانی است؛ تغییرات شیمیایی در مولکول گیرنده‌های نوری و اجزاء زنجیره تنفسی مثل سیتوکروم اکسیداز C و NADH دهیدروژناز رخ می‌دهد. به علت تغییر در فعالیت بیوشیمیایی کروموفورها، آزاد شدن NO از وضعیت مهارتی در مرکز سیتوکروم اکسیداز C، اتواکسیداسیون یک الکترون و تولید  $O_2^-$ ،  $H_2O_2$  و  $O_2$  رخ می‌دهد. آزاد شدن این عوامل پیامدهایی از جمله افزایش غلظت داخل سلولی کلسیم، افزایش PH (قلیایی شدن)، آزاد شدن آراشیدونات و فعال شدن آنتی‌به‌دنبال‌دارد پورتهای  $Na^+/H^+$  و  $Ca^{2+}$ -ATPase به‌دنبال دارد. تحقیقات نشان می‌دهند که میتوکنندری‌ها با مکانیسمی که در آن قدرت باز جذب  $O_2^-$  را داشته باشند؛ منبعی برای فسفوریلاسیون اکسیداتیو ADP در شرایط فیزیولوژیک محسوب می‌شوند (۱۳). همچنین مطالعات نشان

می خورد. علت این تغییرات را می توان این گونه تفسیر نمود که طیف مادون قرمز با فرکانس ۳۰۰ هرتز هنگامی که به صورت ترکیبی با طیف قرمز مورد استفاده قرار می گیرد؛ میزان بالاتری از انرژی را به اپی تلیوم وارد می نماید که از جنبه های زیر می تواند بررسی شود:

انرژی ایجاد شده به مقدار زیاد بر اتصال سلول های لایدیگ و سلول های ژرمینال تأثیر داشته و سبب چرخش و لرزش مولکول های غشایی سلول ها و در نتیجه موجب تخریب سلول ها می شود. همچنین انرژی زیاد تولید شده اثرات منفی روی سلول های لایدیگ و ترشح تستوسترون گذاشته و این تغییرات بر اتصال بین سلول های سرتولی و سلول های ژرمینال در اسپرماتوزن تأثیرات منفی گذاشته و از حداکثر چسبندگی بین اسپرماتیدها و اجزاء سلولی سرتولی جلوگیری می نماید (۱۶). علاوه بر این مشخص شده است که افزایش دمای بیضه ها سبب آشفستگی در اسپرماتوزن می شود (۶).

البته در این تحقیق دمای بیضه ثبت نشده بود؛ ولی محققین اشاره کرده اند که پرتو لیزر مادون قرمز توسط مایع بیضه ای (Testicular Water) جذب شده و حرارت موضعی تولید نمی شود (۱۴).

در گروه تجربی ۱ که فرکانس ۳۰۰ هرتز مادون قرمز همراه پرتو قرمز استفاده گردید؛ احتمالاً متابولیسم سلولی به مقدار زیادی افزایش یافته و حرارت حاصل از افزایش بیش از حد متابولیسم مکانیسم آپوپتوزیس را در برخی سلول ها فعال کرده است.

مسیر آپوپتوزیس شامل آزاد شدن سیتوکروم C به داخل سیتوزول است که در آنجا به پروتئاز آپوپتیک عامل فعال شونده ۱ (Apaf-1) متصل می شود و به دنبال آن پروتئین های Caspase شماره های ۹ و ۳ و ۶ و ۷ به ترتیب (به صورت واکنش های آبشاری) فعال می شوند که سه پروتئین آخر (Caspase 3,6,7) آنزیم های پروتئولیتیک هستند. همچنین پروتئین Bcl-2 نقش مهمی در مسیر آپوپتوتیک وابسته به میتوکندری دارد (۷).

برای آپوپتوزیس وابسته به میتوکندری ترانسلوکاسیون سیتوزولی سیتوکروم C ضروری است و ضمن این آزادسازی مرگ برنامه ریزی سلول های ژرمینال انجام می شود. چون

(IR) سبب افزایش تولید تستوسترون با اثر روی سلول های لایدیگ می شود (۴). تستوسترون و FSH برای اتصال اسپرماتید و اجزاء سلولی سرتولی ضروری است. اسپرماتوزوئیدهای در حال نمو توسط پل های سیتوپلاسمیک بهم متصل هستند. این شبکه سلولی، به طور فیزیکی توسط انشعابات سیتوپلاسمی وسیع سلول های سرتولی پشتیبانی می گردد. به علت این که اسپرماتوسیت ها، اسپرماتیدها و اسپرماتوزوئیدها از خون توسط سدخونی - بیضه ای جدا گشته اند؛ این سلول های اسپرماتوزنیک برای تبادل مواد غذایی و متابولیت ها، به سلول های سرتولی وابسته هستند. سدسلول های سرتولی، اسپرم های در حین رشد را از حمله ایمنونولوژیک نیز محافظت می نماید و هنگام اسپرمیوزن سیتوپلاسم اضافی اسپرماتید از آن جدا می شود و این قطعات سیتوپلاسمی توسط لیزوزوم های سلول های سرتولی فاگوسیته و منهدم می شوند (۱۸ و ۷). بنابراین واکنش بین سلول های سرتولی و سلول های ژرمینال به عوامل پاراکرین، عوامل سیتولوژیک، چرخه وقایع لوله های اسپرم ساز و طبیعت سدخونی - بیضه ای بستگی دارد. هنگام اسپرمیوزن اتصال اسکلت سلولی سلول های سرتولی به اسپرماتیدها ضروری است. هر سرتولی به ۸ اسپرماتید می چسبد و ترشح تستوسترون برای این عملکرد ضروری است (۱۹). در صورت استفاده از طیف مادون قرمز لیزر با فرکانس ۸۰ هرتز به صورت ترکیبی با طیف قرمز با توان ۸۰ میلی وات، مجموعه ای از اثرات بیولوژیک روی اپی تلیوم اسپرم ساز پدید می آید که آن را از گروه شاهد و گروه تجربی که طیف مادون قرمز با فرکانس ۳۰۰ هرتز به تنهایی به کار رفته بود؛ متمایز می سازد و این تفاوت در تعداد و تراکم اسپرماتوسیت ها و اسپرماتوزوئیدها، قطر بخش سلولی اپی تلیوم و قطر لوله اسپرم ساز مشهود می باشد.

در گروه تجربی ۱ که ترکیب طیف قرمز و مادون قرمز با فرکانس ۳۰۰ هرتز به کار برده شد؛ افزایش قطر لوله و قطر لومن نسبت به گروه شاهد دیده می شود؛ ولی قطر بخش سلولی نسبت به قطر بخش سلولی گروه شاهد اندکی کاهش یافت که البته این تفاوت ها معنی دار نبود. همچنین تعدادی سلول آپوپتوز شده در اپی تلیوم این گروه تجربی به چشم

همچنین تغییرات مورفولوژیک لوله‌های اسپرم‌ساز ارتباط مستقیم با دانسیته انرژی لیزر داشته و تابش لیزر با دوز مناسب باعث القای اثر تحریکی بر روند اسپرماتوژنز می‌گردد. لازم به ذکر است که در این تحقیق میزان توان و دوز پرتو لیزر ثابت در نظر گرفته شد و فقط اثر تغییر فرکانس بررسی گردید. با توجه به کاربرد لیزرهای کم‌توان در درمان بسیاری از اختلالات و بیماری‌ها به خصوص در درمان الیگواسپرمی و آزواسپرمی، بهتر است که فرکانس‌ها و دوزهای دیگر پرتوهای لیزر نیز بررسی شوند تا بهترین حالت انتخاب گردد. زیرا تغییرات مورفولوژیک و مورفومتریک لوله‌های اسپرم‌ساز ارتباط مستقیمی با دانسیته انرژی لیزر دارد. این نتایج می‌تواند زمینه بررسی‌ها و مطالعات جامع‌تر و آزمایش روی انسان برای حل مشکل ناباروری در مردان گردد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه آقای محمد دیهیمی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد بیولوژی بود. بدین وسیله از همه همکاران و اساتید بزرگوار که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند؛ کمال سپاس را داریم.

### References

1. Tunér J, Hode L. Laser therapy, clinical practice and scientific background. Sweden: Prima Books. 2002; pp:1-110.
2. Taha MF, Valojerdi MR. Quantitative and qualitative changes of the seminiferous epithelium induced by Ga. Al. As. (830 nm) laser radiation. *Lasers Surg Med.* 2004;34(4):352-9.
3. Nel-Themaat L, Vadakkan TJ, Wang Y, Dickinson ME, Akiyama H, Behringer RR. Morphometric analysis of testis cord formation in Sox9-EGFP mice. *Dev Dyn.* 2009 May; 238(5):1100-10.
4. Singh SK, Chakravarty S. Antispermatic and antifertility effects of 20,25-diazacholesterol dihydrochloride in mice. *Reprod Toxicol.* 2003 Jan-Feb;17(1):37-44.
5. Tanaka N, Takeuchi T, Neri QV, Sills ES, Palermo GD. Laser-assisted blastocyst dissection and subsequent cultivation of embryonic stem cells in a serum/cell free culture system: applications and preliminary results in a murine model. *J Transl Med.* 2006 May 8;4:20.
6. Wang Y, Song W, Li S, Guan X, Miao S, Zong S, et al. GC-1 mRHBDD1 knockdown spermatogonia cells lose their spermatogenic capacity in mouse seminiferous tubules. *BMC Cell Biol.* 2009 Apr 10;10:25.
7. Hikim AP, Lue Y, Yamamoto CM, Vera Y, Rodriguez S, Yen PH, Soeng K, Wang C, Swerdloff RS. Key apoptotic pathways for heat-induced programmed germ cell death in the testis.

پروتئین‌های Caspase را فعال می‌کند (۲۰). پروتئین‌های خانواده Bcl-2 اعضای دارند که یکی از آنها در ارتباط با آپوپتوزیس، پروتئین Bax می‌باشد و از سیتوزول به میتوکندری در ابتدای مراحل آپوپتوزیس انتقال می‌یابد. الحاق Bax به غشاء میتوکندری نقش مهمی در آزادسازی سیتوکروم C از فضای بین غشایی میتوکندری به سیتوزول را دارد که به دنبال آن پروتئین‌های Caspase فعال می‌شوند (۱۳).

### نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که استفاده از لیزر کم‌توان طیف مادون قرمز با فرکانس ۳۰۰ هرتز و یا به حالت ترکیبی طیف مادون قرمز با فرکانس ۸۰ هرتز همراه با طیف قرمز در افزایش قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و افزایش سلول‌های ژرمینال و اسپرم‌ها مؤثر می‌باشد؛ ولی پس از استفاده از طیف مادون قرمز ۳۰۰ هرتز همراه با طیف قرمز اثرات چندانی مطلوبی در وضعیت اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز مشاهده نشد. بنابراین از دو گروه تجربی فرکانس ۳۰۰ هرتز و فرکانس ۸۰ هرتز همراه با طیف قرمز در درمان الیگواسپرمی‌ها استفاده مؤثرتری می‌توان نمود.

*Endocrinology.* 2003 Jul;144(7):3167-75.

8. Sharma PK, Rehmani H, Rai AK, Gupta RS, Singh YP. Antispermatic activity of the benzothiazoline ligand and corresponding organoantimony(v) derivative in male albino rats. *Bioinorg Chem Appl.* 2006; 16895. doi: 10.1155/BCA/2006/16895.
9. Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000 Jul 18; 97(15):8346-51.
10. Raji Y, Akinsomisoye OS, Salman TM. Antispermatic activity of Morinda lucida extract in male rats. *Asian J Androl.* 2005 Dec;7(4):405-10.
11. Matthäus C, Bird B, Miljković M, Chernenko T, Romeo M, Diem M. Chapter 10: Infrared and Raman microscopy in cell biology. *Methods Cell Biol.* 2008;89:275-308.
12. Keshri G, Bajpai M, Lakshmi V, Setty BS, Gupta G. Role of energy metabolism in the pregnancy interceptive action of Ferula assafoetida and Melia azedarach extracts in rat. *Contraception.* 2004 Nov;70(5):429-32.
13. Giuliani A, Lorenzini L, Gallamini M, Massella A, Giardino L, Calzà L. Low infra red laser light irradiation on cultured neural cells: effects on mitochondria and cell viability after oxidative stress. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2009;

9:8.doi: 10.1186/1472-6882-9-8.

14. Cohen N, Lubart R, Rubinstein S, Breitbart H. Light irradiation of mouse spermatozoa: stimulation of in vitro fertilization and calcium signals. *Photochem Photobiol.* 1998 Sep;68(3):407-13.
15. Jørgensen A, Nielsen JE, Morthorst JE, Bjerregaard P, Leffers H. Laser capture microdissection of gonads from juvenile zebrafish. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009; 7: 97.
16. Terashima Y, Kitagawa M, Takeda O, Sago H, Onda T, Nomuro K. Clinical application of LLLT in the field of obstetrics and gynecology. In: Oshiro T, Calderhead RG, editors. *Progress in laser therapy.* 2<sup>nd</sup>. New York: Chichester. 1991;pp:191-6.
17. Morimoto H, Kanatsu-Shinohara M, Takashima S, Chuma Sh, Nakatsuji N, Takehashi M, et al. Phenotypic Plasticity of Mouse

Spermatogonial Stem Cells. *PLoS One.* 2009 Nov;4(11):e7909.

18. Johnson L, Neaves WB, Barnard JJ, Keillor GE, Brown SW, Yanagimachi R. A comparative morphological study of human germ cells in vitro or in situ within seminiferous tubules. *Biology of reproduction.* 1999; 61(4):927-34.
19. Muffly KE, Nazian SJ, Cameron DF. Junction-related Sertoli cell cytoskeleton in testosterone-treated hypophysectomized rats. *Biology of Reproduction.* 1993 Nov;49(5):1122-32.
20. Ocaña-Quero JM, Gomez-Villamandos R, Moreno-Millan M, Santisteban-Valenzuela JM. Biological effects of helium-neon (He-Ne) laser irradiation on acrosome reaction in bull sperm cells. *J Photochem Photobiol B.* 1997 Oct;40(3):294-8.