مقاله پژوهشی

لیزرپزشکی؛ ۱۳۸۴، دوره ۴، شماره ۳: صفحات ۲۱-۱۸.

بررسی اثر پرتو لیزر گالیوم آلومینیوم آرسناید با طول موج ۸۱۰ nm بر تحرک، سرعت و میرایی اسپرم

احسان عباس‌نیا[۱]
دکتر افسانه خادمی[۲]
جواد قاسمی[۱]
مجتبی عاملی[۱]

[۱] گروه پژوهشی لیزر پزشکی، مرکز پژوهشهای علمی دانشجویان، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۲] گروه زنان بیمارستان شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

زمینه و هدف: حرکت اسپرم و سرعت رو به جلوی آن نقش کلیدی در فرآیند باروری تخمک در محیط کشت و در بدن انسان ایفا می‌کند. اثر پرتوی لیزرهای کم توان در فرآیندهای زیستی سلولی به طور واضحی در تحریک زنجیره‌های تنفسی که با تحریک سیتوکروم‌های میتوکندری‌هایی در سلول و همچنین با تاثیر بر میزان کلیسم داخل سلولی مشخص شده است. در این مطالعه سعی شده است اثر تابش لیزر کم توان بر تحرک، سرعت و میرایی اسپرم‌های طبیعی و غیرطبیعی مورد بررسی قرار گیرد.

روش بررسی: اثر لیزرهای کم توان گالیوم آلومینیوم آرسناید (GaAlAs) (طول‌موج ۸۱۰ nm و توان خروجی ۵۰ mW) در دوزهای مختلف ۲، ۴ و ۸ ژول بر سانتی‌متر مربع بر روی حرکت، سرعت و میرایی سلول‌های گرفته شده از ۱۷ مرد (۱۲ نفر با اسپرموگرام طبیعی و ۵ نفر مرد مبتلا به عقیمی با اسپرموگرام غیرطبیعی) بررسی شد. سرعت حرکت اسپرم‌ها با عکس‌های متعدد از نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ و فیلمبرداری از آنها اندازه‌گیری شدند. کلیه اندازه‌گیری پس از سه دوره تابش در گروههای مختلف و کنترل بعد از ۲۴ ساعت انجام شد.

یافته‌ها: حرکت اسپرم‌هایی که دوز J/cm^2 ۲ و J/cm^2 ۴ تحت تابش قرار گرفته بودند بطور قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود (p=۰/۰۳). میزان سلولهای مرده در تمام گروههای مورد تابش با دوز J/cm^2 ۲ و J/cm^2 ۴ کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل داشت (p=۰/۰۱). هیچگونه تفاوت معنی‌داری بین گروه دوز J/cm^2 ۸ با گروه کنترل بدست نیامد.

نتیجه‌گیری: تابش لیزر گالیوم آلومینیوم آرسناید با طول موج ۸۱۰ nm در دوزهای J/cm^2 ۲ و J/cm^2 ۴ سرعت و حرکت اسپرم‌ها را افزایش داده و میزان میرایی آنها را کاهش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: لیزر کم توان، اسپرم، میزان حرکت، میزان میرایی

نویسنده مسئول: احسان عباس‌نیا، مرکز پژوهشهای علمی دانشجویان، خیابان پورسینا، دانشکده پزشکی، طبقه سوم، دانشگاه علوم پزشکی تهران تلفن:۶۶۴۹۸۵۸۸، پست الکترونیک: oyan_968@yahoo.com

مقدمه

تحرک اسپرم یک از پارامترهای اساسی آنالیز سمن است که از روی آن توانایی باروری شخص را می‌توان پیش‌گویی کرد. طبق مطالعات پوش، میزان حرکت (motility) و حرکت رو به جلوی اسپرم نقش کلیدی و مهمی در باروری دارد.[۱] در واقع، عدم تحرک کافی اسپرم یکی از علل شکست در ناباوری بیماران نابارور و باروری‌های محیط آزمایشگاهی (in vitro fertility) می‌باشد.

لیزرهای کم توان یا لیزرهای سرد بیش از سی سال است که به عرصه پزشکی وارد شده است. اولین اثر درمانی لیزر توسط آقای ماستر در بهبود زخم شرح داده شد. پس از آن نتایج مطالعات گسترده‌ای در زمینه‌های مختلف اثرات بیولوژیکی لیزرهای کم توان انتشار یافته است که می‌توان به اثرات بهبود زخم، کاهش درد و آلتهاب در بافت‌های آسیب دیده، افزایش تکثیر فیبروبلاستی، اندوتلیالی، عصبی و سلولهای کندورال و استئوبلاستی اشاره کرد.[۲] تئوری که در مورد مکانیسم اثرات بیولوژیکی پرتوهای لیزر کم توان مطرح است آن است که این دسته از پرتوها گیرنده‌های نوری سلول را تحت تاثیر قرار می‌دهد و با تحریک زنجیره‌های انتقال الکترون بر روی فعالیت سلولی اثر تحریکی خود را القاء می‌کند.[۳-۵] مطالعاتی نیز در خصوص تاثیر پرتوی لیزر کم توان بر روی سلولهای اسپرم نیز انجام شده است. ساتو و همکاران نشان دادند که پرتوی لیزر کم توان، تحرک اسپرم‌ها نرمال را افزایش می‌دهد ولی در سرعت اسپرم‌ها بی‌تاثیر است.[۶] تابش لیزر هلیوم-نئون در طیف قرمز (۶۳۲/۸ nm) میزان کلسیم داخل سلولی و میزان باروری در اسپرم‌های موش را افزایش می‌دهد. لبورت و همکاران نشان دادند که پرتوی لیزر کم توان بازجذب (uptake) کلسیم را توسط میتوکندری مهار می‌کند و اتصال یون کلسیم به وزیکول غشای پلاسما را افزایش می‌دهد.[۷] هر

Archive of SID
www.SID.ir

چند که این دسته مطالعات تاکنون اثر پرتوهای لیزر کم توان بر روی نمونه اسپرم‌های غیر طبیعی صورت نپذیرفته است.

در این مطالعه سعی شده است اثر پرتوی لیزر کم توان را در اسپرم افراد بیمار و سالم را با در نظر گرفتن سه پارامتر اصلی تعیین کننده کیفیت اسپرم یعنی تحرک، سرعت و میرایی را بررسی و با گروه کنترل مقایسه شود.

روش بررسی

نمونه‌ها از بیماران مراجعه کننده به بخش نازایی بیمارستان شریعتی تهران بدست آمد. در ابتدا ۴۰-۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه و فشار اتمسفر ۱ و 5% CO_2 انکوباسیون شدند. سپس در شرایط آزمایشگاه با استفاده از میکروسکوپ نوری تعداد و درصد سلول‌های زنده و درصد میزان تحرک (motility) آنها توسط کارشناس آزمایشگاه که نسبت به مطالعه کاملاً کور (blind) بود مشخص شد. نمونه از اسپرم‌های اضافه‌ای که مورد نیاز نبود با کسب رضایت بیماران از ۱۷ نفر که ۱۲ نفر آنها نرمال و ۷ نفر که درصد تحرکشان زیر ۱۰٪ بود و سابقه شکست در روش‌های باروری آزمایشگاهی (IVF) قبلی داشتند تهیه شد.

شستشوی اسپرم ها به روش swin-up انجام شد. نمونه‌ها در سانتریفوژ قرار گرفت و با دور g ۷۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت سپس مایع سمن روی نمونه‌ها دور ریخته شد و بجای آن cc ۲ محیط مدیا ریخته شد و این کار دوبار دیگر تکرار شد. بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون آنها را به ۵ گروه مساوی تقسیم کرده و در پلیت های ۹۶ و در محیط کشت مدیا که شامل natrium hudrogen carbout calcium lacta، F10، HAMS (Sigma, USA) و پنی‌سیلین mg ۱۰۰ و استرپتومایسین و همچنین سرم بند ناف جنین تهیه شده بود، مورد مطالعه قرار گرفتند.

اندازه‌گیری تحرک، سرعت و میرایی اسپرم

تحرک اسپرم‌ها توسط کارشناس آزمایشگاه که نسبت به مطالعه کور بود بر اساس اسپرم‌های که در یک فیلد میکروسکوپی متحرک بودند و تعداد آنهایی که حرکت رو به جلو داشتند و اسپرم‌های بدون حرکت نمره داده شد. همچنین این کار را در ۴ فیلد دیگر محاسبه و سپس از آنها میانگین گرفته شده و حاصل آن به عنوان نمره تحرک آن نمونه محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری سرعت از هر نمونه توسط دوربین فیلمبرداری که بر روی میکروسکوپ معکوس (invert) آزمایشگاه نصب شده بود فیلم تهیه شد و بعد از تبدیل به نوار ویدیویی VHS سپس به VCD، فیلم مورد نظر توسط نرم افزار Win DVD و AutoCad میزان جابجایی اسپرم در ثانیه محاسبه شد. برای هر نمونه بطور تصادفی ۵ اسپرم انتخاب و بعد میانگین جابجایی‌ها برای آن نمونه ثبت شد. به منظور بررسی میرایی اسپرم، میانگین تعداد سلول‌های مرده در چند فیلد میکروسکوپی در هر نمونه نسبت به سلولهای مرده را در آن نمونه اندازه‌گیری شد. کلیه مراحل جمع آوری داده‌ها کاملا بصورت کور انجام پذیرفت.

نحوهٔ تابش لیزر

تابش سلول‌ها در شرایط کاملاً استریل و با استفاده از لیزر گالیوم، آلومینیوم، آرسناید (GaAlAs) با طول موج ۸۱۰ nm و پرتوی پیوسته با توان ۵۰ mW و قطر پرتوی خروجی ۶ mm (50 amm، ساخت روسیه) به مدت ۱۲، ۲۳و ۴۶ ثانیه برای رساندن به ترتیب ۲، ۴ و ۸ ژول بر سانتی‌متر مربع (J/cm^2) در هر ول انجام گرفت. این کار به فاصله هر ۸ ساعت یک بار تکرار شد. لیزر تابی یک ساعت بعد از انکوباسیون نهایی و پس از ثبت تحرک و سرعت اولیه اسپرم‌ها و از فاصله cm ۱ بالای نمونه‌ها انجام شد. سپس سلول‌ها در انکوباسیون قرار گرفتند. سلول‌های کنترل نیز در شرایطی مشابه گروه درمان بودند ولی دستگاه در آن لحظه خاموش می‌شد. (جدول ۱)

نحوه تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزارآماری SPSS 11.5 انجام شد. داده‌ها بصورت میانگین± انحراف معیار نمایش داده شده است. برای مقایسه بین دو گروه از روش آماری t-test استفاده شد. سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد ($p<۰/۰۵$).

یافته‌ها

در این مطالعه از نمونه‌های ۱۲ بیمار با میانگین سنی ۷/۴± ۳۹/۴ استفاده شد. تحرک اسپرم‌ها از ۵۶-۵٪ متغیر بود. همانگونه که در نمودار ۱ مشخص شده است بررسی تحرک اسپرم در گروه‌های مورد مطالعه، میانگین تحرک در گروهی که تحت تابش با دوز $4\ J/cm^2$ و $2\ J/cm^2$ قرار گرفته بودند بالاترین میزان تحرک را دارا بودند و تفاوت بین آنها با دو گروه دیگر معنی‌دار بود ($p<۰/۰۱$) و در گروهی که $4\ J/cm^2$ را دریافت کرده بودند بیشترین میانگین را به خود اختصاص دادند (۱۶/۵±۳۱/۷) . همچنین میزان تحرک آنها نسبت به ۲۴ ساعت قبل بطور معنی‌داری کاهش یافته بود ($p<۰/۰۱$). میزان سرعت نیز در گروه‌های $4\ J/cm^2$ و $2\ J/cm^2$ نسبت به گروه کنترل و گروهی که با $8\ J/cm^2$ مورد تابش قرار گرفته بودند بطور معنی‌داری بیشتر بود

جدول ۱- گروه‌های مورد آزمایش

گروه‌های مورد مقایسه (n=۱۲)	دوز لیزر (J/cm^2)	زمان تابش لیزر (s)
گروه ۱ (کنترل)	صفر	صفر
گروه ۲	۲	۱۲
گروه ۳	٤	۲۳
گروه ٤	۸	٤٦

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- یافته‌های بدست آمده از اسپرموگرام ٤ گروه مورد مقایسه به تفکیک دوز تابش

گروه‌های مورد مقایسه (n=۱۲)	دوز تابش لیزر nm ۸۱۰ (J/cm^2)	تحرک (motility)	سرعت (velocity)	میرایی (mortality)
گروه ۱ (کنترل)	صفر	۲٤/٤±٤/۹	۲٤/۱±۷/۱	۲۲±٤/۲
گروه ۲	۲	۳۳/۳±۹/٤	۳۳/۸±۹/٤	۱٦±۳/٦
گروه ۳	٤	۳۳/٤±۸/۱	۳٤/۲±۸/۱	۱۵/٦±٤/۳
گروه ٤	۸	۲۵/۵±۵/۹	۲۱/۵±۷/۸	۲۱/۵±٤/٦

* داده‌ها بر حسب میانگین و انحراف معیار نمایش داده شده است.

($p<۰/۰۰۱$) (نمودار ۲). میزان سلولهای مرده بعد از ۲۴ ساعت در گروه‌های مختلف در جدول ۱ آورده شده است. کمترین میزان مرگ مربوط به گروه J/cm^2 ۴ بود (۲۲/۳٪). در مجموع درصد سلولهای مرده در گروه‌های J/cm^2 ۸ و گروه کنترل نسبت به دو گروه دیگر بطور معنی‌داری بالا بود (نمودار ۳).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که لیزر با یک رفتار وابسته به دوز در تحرک، سرعت و میرایی تاثیر می‌گذارد. در گروه‌هایی که با دوز J/cm^2 ۲ و J/cm^2 ۴ تحت تابش قرار گرفته بودند بیشترین تحرک و کمترین میرایی را نسبت به دیگر گروه‌ها داشته‌اند و در دوز J/cm^2 ۸ تفاوت معنی‌داری با گروه گنترل پیدا نشد. همچنین در دوز J/cm^2 ۴ بیشترین تحرک و کمترین میرایی در اسپرم‌ها وجود داشت که به نظر می‌سد این دوز تابش مناسب‌تر و موثرتر از دیگر دوزهای مورد مطالعه بوده است. تحرک اسپرم ها پس از ۲۴ ساعت نسبت به میزان تحرک ساعت اول مطالعه کاهش معنی‌داری را نشان می‌دادکه این کاهش می‌تواند ناشی از شرایط محیط کشت و مهیا نبودن شرایط همانند بدن باشد. در این مطالعه سرعت اسپرم‌ها در ساعات اولیه مطالعه محاسبه نشد و این موضوع یکی از محدودیتهای مطالعه به شمار می‌رود چرا که به دلیل حجم نمونه کم و کم بودن نمونه اسپرم‌های تهیه شده امکان اندازه‌گیری تحرک و سرعت اسپرم‌ها به صورت سریال و در زمان‌های مختلف وجود نداشت.

امروزه تمایل به استفاده از لیزر های کم‌توان در در شرایط مختلف بالینی افزایش یافته است. تابش لیزرکم توان با توانایی‌های وابسته به دوز خود، بدون تغییری قابل ملاحظه‌ای در دمای بافت، موجب تغییراتی در رفتار سلول می‌شود. تاثیر پرتوی لیزر کم توان بر روی سلول‌ها و اثرات مکانیسم دقیق عملکرد آن‌ها هنوز در دست تحقیق است. محققان در ابتدا معتقد بودند که تابش لیزر پروسه‌های بیولوژیکی را تحریک می کند که اصطلاحاً آن را تحریک زیستی (Biostimulation) نام نهادند. تابش پرتوی لیزر کم توان بطور مستقیم یا غیر مستقیم با تحت تاثیر قرار دادن میتوکندری و زنجیره تنفسی و همچنین واکنشهای اکسیداسیون واحیا با تحریک ترکیبات پورفرین و سیتوکروم‌های موجود در میتوکندری‌ها، موجب افزایش تولید ATP سلولی می شود.[۹،۲]

پرتوی لیزر هلیوم نئون با طول موج nm ۶۳۲/۸ با مدولیت کردن تولیدH_2O_2 توسط اسپرماتوزوا باعث افزایش توانایی باروری اسپرمها در محیط آزمایشگاهی می‌شود. علاوه بر آن انتقال یون کلسیم در میتوکندری اسپرم تاثیر تحت تاثیر قرار می‌دهد[۶،۷] اوکانا و همکاران نشان دادند که تابش لیزر باعث افزایش واکنش اکروزومال دراسپرم‌های گاو می‌شود بدین صورت که درصد اسپرم‌هایی که واکنش آکروزمال را خود نشان می‌دادند افزایش یافت.[۱۰] بر پایه این مطالعات به نظر می‌رسد که تابش پرتوی لیزر کم توان می‌تواند تحرک اسپرم را افزایش و میرایی آنها را کاهش دهد.

بطور خلاصه، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که لیزر با طیف فروسرخ با اثر وابسته به دوز خود سرعت و تحرک اسپرم را در نمونه‌های سالم افزایش داده و میزان میرایی آن را کاهش می‌دهد. با توجه به عدم گزارش عارضه جانبی خاص ناشی از تابش این دسته از پرتوها، شاید بتوان از آنها در درمان بیماران نابارور با علت کاهش تحرک اسپرم و کاهش میزان شکست بعد از روش‌های لقاح IVF و IUI استفاده کرد. همچنین اثر کاهش میرایی اسپرم می‌تواند در افزایش مدت نگهداری اسپرم‌ها و فریز کردن آنها مورد استفاده قرار گیرد. مطالعات بیشتر و با نمونه‌های بالا و اندازه‌گیری سریال سه فاکتور تحرک، سرعت و میرایی اسپرم‌ها در زمان‌های متوالی پیشنهاد می‌شود.

منابع

1. Pusch HH. The importance of sperm motility for the fertilization of human oocytes in vivo and in vitro. Andrologia 1987; 19:514-27.

2. Basford JR. Low level laser therapy. Laser Surg Med 1997; 6:195-205.

3. Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy

Archive of SID

www.SID.ir

laser Irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. Bone 1998; 22: 347-54.

4. van Breugel H, Bar PR. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. Lasers Surg Med 1992; 12:528-37.

5. van Breugel HH, Bar PR. He-Ne laser irradiation affects proliferation of cultured rat Schwann cells in a dose-dependent manner. J Neurocytol 1993; 22:185-90.

6. Sato H, Landthaler M, Haina D, et al.The effects of laser light on sperm motility and velocity in vitro. Andrologia 1984; 16:23-5.

7. Cohen N, Lubart R, Rubinstein S, et al. Light irradiation of mouse spermatozoa: stimulation of in vitro fertilization and calcium signals. Photochem Photobiol. 1998; 68:407-11.

8. Lubart R, Friedmann H, Sinyakov M. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membranes caused by 780 nm irradiation. Lasers Surg Med 1997; 21:493- 99.

9. Walker JB, Akhanjee LK, Cooney MM. Laser therapy for pain of rheumatoid arthritis. Clin J Pain 1987; 3:54-59.

10. Karu TI. Molecular mechanism of the therapeutic effects of low intensity laser radiation. Lasers Life Sci 1988; 2:53-74.

11. Ocana-Quero JM, Gomez-Villamandos R, Moreno-Millan M, et al .Biological effects of helium-neon (He-Ne) laser irradiation on acrosome reaction in bull sperm cells. J Photochem Photobiol B. 1997; 40:294-8.

Archive of SID

www.SID.ir