Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 23:22 +0330 on Tuesday December 11th 2018

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره هجدهم شماره ۶۳ فروردین و اردیبهشت سال ۱۳۸۷ (۹۹-۹۱)

# مقایسه میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) و لکوسیت در نمونه‌های انزالی نرمال و الیگوآستنوتراتواسپرمیا

**اعظم رهاوی**(M.D.) * **امیر علی حیدری** (M.D.)* **محمد علی خلیلی**(Ph.D.)**+
**جلال قاسم زاده**(B.S.)*** **نسیم طبیب نژاد**(M.D.)****

## چکیده

**سابقه و هدف :** از عوامل مداخله گر در ناباروری مردان می‌توان به‌گونه‌های فعال اکسیژن(reactive oxygen spicies:ROS) اشاره نمود. مواجهه اسپرماتوزوآ با ROS همراه باآسیب DNA و هم‌چنین پراکسیداسیون چربی است. ROS تحت تاثیر لکوسیت‌ها و در ارتباط با کاهش پارامترهای مایع منی (Semen) می‌باشد. هدف اصلی در این مطالعه مقایسه میزان ROS و همچنین لکوسیت در نمونه‌های انزالی طبیعی والیگوآستنوتراتواسپرمیا oligoasthenoteratospermia (OAT ) می باشد.

**مواد و روش‌ها :** ۷۵ مورد از مردان مراجعه کننده به مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری یزد که آزمایش آنالیز مایع منی برای آن‌ها انجام شده بود، وارد مطالعه شدند. این افراد شامل ۵۰ مورد با پارامترهای اسپرم طبیعی و ۲۵ مورد OAT بودند. این دو گروه از لحاظ سطح ROS و لکوسیت مقایسه شدند.

**یافته‌ها :** نتایج نشان داد که سطح ROS در گروه OAT به طور قابل توجهی نسبت به گروه شاهد بالاتر بود (۲۰۰۵/۹۵ ± ۱۲۵۳/۴۹ در مقابل ۷۲/۶۴ ± ۱۴۹/۵۲=). افراد گروه OAT از نظر تعداد اسپرم، به دو گروه کم‌تر از ۵ میلیون و بیش‌تر از ۵ میلیون در هر میلی‌لیتر منی و هر کدام از پارامتر های حرکت و شکل اسپرم نیز به دو گروه کم‌تر از ۵ درصد و بیش از ۵ درصد طبیعی تقسیم‌بندی شدند. تنها در مورد پارامتر تعداد اسپرم، سطح ROS در گروه کم‌تر از ۵ میلیون نسبت به گروه بیش از ۵ میلیون در هر میلی لیتر تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. (به ترتیب ۴۰۷۰/۷۹ ± ۳۶۲۷/۵۵ در مقابل ۱۰۰۰/۴۸ ± ۸۱/۲۹ ). از نظر تعداد لکوسیت تفاوت قابل توجهی بین دو گروه به دست نیامد (۰/۲۲ ± ۰/۰۷ در مقابل ۰/۲۰ ± ۰/۱۲).

**استنتاج :** نتایج این مطالعه نشان می‌دهد اگر چه سطح پایه ROS در نمونه‌های انزالی سالم وجود دارد، در افراد OAT این میزان، افزایش قابل ملاحظه‌ای دارد. این مورد نشانگر اهمیت گونه‌های فعال اکسیژن در باروری مردان ونقش آنتی اکسیدان‌ها در بهبود پارامترهای اسپرم است و نیاز به مطالعات بیش‌تر دارد.

**واژه های کلیدی :** ناباروری،الیگو آستنوتراتواسپرمیا ،رادیکال آزاد اکسیژن، لکوسیت، پارامترهای اسپرم

+ **مولف مسئول : دکتر محمدعلی خلیلی- یزد، صفاییه، خیابان بوعلی، مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد**
**E-mail : khalili59@hotmail.com**

* دانشجوی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
** متخصص جنین شناسی، عضو هیات علمی (دانشیار) مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
*** کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
**** پزشک عمومی، مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

تاریخ دریافت : ۸۶/۹/۲۸ تاریخ تصویب: ۸۷/۱/۲۱

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 23:22 +0330 on Tuesday December 11th 2018

## مقدمه

علت ناباروری درتقریبا۵۰ درصد زوج‌های نابارور، فاکتور مردانه است(۱). آنالیز مایع منی (Semen) یکی از مهم‌ترین آزمایش‌ها برای بررسی ناباروری مردان است که شامل پارامترهای حجم، ظاهر، چسبندگی (Viscosity)، غلظت، حرکت و شکل اسپرم می‌باشد(۲). همچنین، غلظت سلول‌های غیر اسپرمی مانند گلبول‌های سفید در این آزمایش تعیین می‌گردد. طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی(WHO) نمونه‌های مایع منی براساس وضعیت پارامترهای اسپرم (تعداد، تحرک، ریخت‌شناسی) به ۹ دسته تقسیم شده‌اند(۳). نمونه‌های طبیعی (Normozoospermic) به نمونه‌هایی اطلاق می‌شودکه دارای حداقل۲۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر مایع انزال با تحرک پیشرونده ۵۰ درصد و شکل طبیعی ۳۰ درصد باشند. برای کاهش در تعداد اسپرم هر نمونه واژه "Oligo" و کاهش در تحرک و شکل آن به ترتیب واژه های "Astheno" و"Terato" به‌کار برده می‌شود. oligospermia شدید (Severe) نمونه‌هایی هستند که در آن‌ها، تعداد اسپرم در هر میلی‌لیتر مایع انزالی کم‌تر از ۴ میلیون باشد. هنگامی که یک نمونه دچار اختلال در هر سه مورد فوق باشد، اصطلاح oligoasthenoteratozoospermia(OAT) به کار می‌رود. این گونه نمونه‌ها معمولا از نظر قدرت باروری درحد بسیار پایینی قرار دارند(۴،۳).

عوامل متعددی باروری مردان را تحت تاثیر قرار می‌دهد که گونه‌های آزاد اکسیژن (Reactive Oxygen Species) یکی از آن‌ها است. ROS به‌وسیله روندهای فیزیولوژیک و آسیب‌شناختی مختلفی تولید می‌شود. اسپرم طبیعی قادر به تولید ROS می‌باشد که در وقایع زیست شناختی مانند واکنش آکروزوم، بیش فعالی (hyper activation) دخالت دارد. به علاوه سطوح کم ROS می‌تواند توانایی اسپرماتوزوآ انسانی را برای اتصال با زونا پلاسیدا افزایش‌دهد(۶،۵) و این‌توانایی در موارد اختلال عملکرد اسپرم افزایش می‌یابد(۷تا۹). سطح گونه‌های فعال وقتی زیاد می‌شود که تعادل بین تولیدROS وتوانایی آنتی‌اکسیدانی ازبین برود(۶،۱۰تا۱۴).

رفتارهایی مانند کشیدن سیگار، مصرف الکل، آلودگی‌های محیطی، تابش پرتوها (Radiation) و... تولید ROS را افزایش می‌دهند و اثرات مخربی بر روی اندام‌های سلولی مانند میتوکندری و DNA اسپرم می‌گذارد. مواجه شدن اسپرماتوزآ با ROS با آسیب DNA اسپرم و هم‌چنین پراکسیداسیون چربی همراه می‌باشد(۱۹،۷). مراحل متعدد آسیب DNA شامل حذف کروموزومی سلول، شکست درDNA و... می‌باشد. آنتی آکسیدان‌های پلاسمای منی شامل کاتالاز وTACو... نقش مهمی در سبب شناسی نقص عملکردی اسپرم دارد (۲۲،۲۱،۲۰،۱۵،۱۴،۸،۳). همه محتویات سلولی شامل چربی، پروتئین، اسید نوکلئیک و قندها به عنوان هدف‌های گونه‌های فعال‌اکسیژن هستند.عوامل عفونی وآسیب‌های موضعی بافتی هم می‌توانند باعث ارتشاح (Infiltration) لکوسیت به محل التهاب شوند که منجر به تولید و آزادسازی مقادیر زیادی گونه‌های فعال می‌شود. اگرچه ROS به‌طور واضح در بیماری‌زایی ناباروری مردان موثر است، مطالعات اندکی وجود سطوح پایه ROS را در افراد بارور نشان می‌دهد. سطح ROS تحت تاثیر وجود لکوسیت‌ها است و در ارتباط باکاهش پارامترهای مایع منی می‌باشد(۷،۸). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که اسپرم قادر به‌تولیدROS می‌باشد و این توانایی درموارد اختلال عملکردی اسپرم افزایش می‌یابد(۲۳،۲۲). این نتایج نشان دهنده این نکته است که بین لکوسیت موجود در مایع منی و مقادیر ROS و تاثیر آن برروی پارامترهای اسپرم رابطه معنی‌داری وجود دارد. بابررسی مطالعات در این زمینه مشخص شد که تاکنون مطالعه‌ای در خصوص

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 23:22 +0330 on Tuesday December 11th 2018

میزان ROS و لکوسیت در نمونه‌های با اختلالات شدید اسپرمی OAT انجام نگرفته است.لذا، هدف از این مطالعه بررسی میزان ROS و لکوسیت در نمونه‌های انزالی OAT و مقایسه آن با نمونه‌های انزالی با پارامترهای اسپرم طبیعی می‌باشد.

## مواد و روش ها

***نمونه های انزالی:***

این مطالعه از فروردین تا آبان سال ۱۳۸۶ در آزمایشگاه اندرولوژی مرکز ناباروری یزد به صورت مقطعی (Cross sectional) انجام گرفت. نمونه‌های انزالی ۵۰ مرد با پارامترهای اسپرم طبیعی- که ناباروری آنها ناشی از فاکتور زنانه بوده است- و ۲۵ فرد با نمونه انزالی OAT جمع‌آوری و سطح ROS در آنها سنجیده شد. نمونه‌های OAT به صورت تعداد اسپرم کم‌تر از ۲۰ میلیون در هر میلی لیتر منی، ریخت شناسی کم‌تر از ۳۰ درصد و حرکت پیشرونده کم‌تر از ۵۰ درصد تعریف شدند و نمونه‌های طبیعی دارای تعداد اسپرم بیش از ۲۰ میلیون در میلی‌لیتر، ریخت شناسی بیش از ۳۰ درصد طبیعی و حرکت بیش از ۵۰ درصد طبیعی بودند. در این مطالعه افراد دو گروه از نظر پارامترهای میکروسکوپی اسپرم (تعداد، تحرک، ریخت شناسی، لکوسیت و سلول گرد) و همچنین پارامترهای ماکروسکوپی (حجم، ظاهر و چسبندگی) و میزان ROS مقایسه شدند.

نمونه‌ها به‌روش خود انزالی(Masturbation) بعد از ۴۸تا۷۲ساعت‌پرهیز از رابطه‌جنسی(Sexual Abstinence) جمع‌آوری و پس از تحویل، داخل دستگاه پرورش (Incubator) ۳۷ درجه(Behdad Co.,Iran)گذاشته شد. بعد از۱۵ دقیقه، مایع منی، لیکوفاژ و مقدار۱۰ میکرولیتر از آن انتخاب‌گردید. با استفاده از میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۲۰۰ (Axiostar Plus Zaiss,Germany) بر روی Makler chamber تعداد وحرکت اسپرم درنمونه‌ها تعیین شد. همچنین، جهت تعیین درصد شکل طبیعی اسپرم، تعداد یکصد اسپرم پس از رنگ‌آمیزی با گیمسا(Merck Co.,Germany,5-10%concentration) بررسی شدند.

***اندازه گیری میزان ROS:***

روش‌های متفاوتی برای اندازه‌گیری ROS معرفی شده‌اند که در این مطالعه برای اندازه‌گیری ROS از روش Agarwal (Chemiluminescence assay) استفاده شد. از آن‌جایی‌که میزان ROS با گذشت زمان کاهش می‌یابد (۳۱ درصد در ۱۲۰ دقیقه و ۶۲ درصد در ۱۸۰ دقیقه بعد از جمع‌آوری نمونه) (۲۴) در این مطالعه میزان ROS در اولین ساعت بعد از جمع‌آوری نمونه سنجیده شد. بسته به شمارش اسپرم، حجمی از نمونه برداشته (هر چه تعداد اسپرم بیش‌تر باشد حجم کم‌تری نیاز است) و با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ (HERMLE Co. , Germany) محلول رویی (seminal plasma) دور ریخته شد و رسوب نمونه با دستگاه تکان گر shaker ( Ls_100 Labtron, Iran) مخلوط گردید. شمارش اسپرم به وسیله رقیق کردن با محیط کشت Hams F10 (Biochrom, AG) به ۲۰ میلیون رسانده شد به این صورت که آنقدر از نمونه به محیط اضافه شد تا شمارش نهایی به ۲۰ میلیون در میلی‌لیتر رسید.

لوله‌های ROS لوله‌های پلی استرنی به قطر ۱۲ و طول ۷۵ میلی‌متر می‌باشد. برای هر نمونه دو لوله خالی (Blank)، دو لوله شاهد و دو لوله آزمون (sample) استفاده شد. به لوله‌های خالی، شاهد ۱ و شاهد ۲، مقدار ۴۰۰میکرولیتر فسفات بافرسالین(PH=7.2) و به لوله‌های آزمون ۴۰۰ میکرولیتر نمونه اضافه شد. در مرحله بعد به لوله‌های شاهد۱، شاهد۲ و آزمون (S1وS2) ۱۰ میکرو لیتر محلول Working Luminol( محلول ۵ میلی مول (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione,Sigma

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 23:22 +0330 on Tuesday December 11th 2018

اضافه شد. working Luminol شامل ۱۹۰ میکرو لیتر DMSO (دی متیل سولفاکساید) ( Sigma , Germany) به اضافه ۱۰ میکرو لیتر Luminol stock (با رقت ۱/۲۰) می‌باشد. پس از اضافه کردن لومینول، لوله‌ها داخل دستگاه(Luminometer(Berthold,autolumat,Germany گذاشته شد. برای سنجش ROS به وسیله دستگاه لومینومتر و روش chemiluminescence از پروب Luminal یا پروب Lucigenin استفاده می‌شود که در این مطالعه به علت مزیت‌های پروب لومینول بر لوسیژنین از جمله اندازه‌گیری‌های ROS داخل و خارج سلولی، از پروب لومینول استفاده شده است. اساس کار دستگاه بدین صورت است که لومینول با گونه‌های فعال موجود در نمونه ترکیب شده و ایجاد سیگنال نوری می‌کند. این سیگنال در لومینومتر به سیگنال الکتریکی (فوتون) تبدیل می‌شود و نهایتا لومینومتر فوتون‌های شمرده شده در دقیقه را اندازه‌گیری می‌کند. بعد از خوانده شدن ROS و برای از بین بردن اثرات زمینه‌ای ROS میانگین ROS نمونه‌ها از میانگین ROS شاهد کم می‌شود تا ROS حقیقی به دست آید(۵). در این مطالعه گونه‌های آزاد اکسیژن مانند آنیون‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، هیپوکلریت و رادیکال هیدروکسیل اندازه‌گیری شد.

*روش اندازه‌گیری لکوسیت*

***(Endtz test: leukocytospermia quantification):***

مقدار ۲۰ میکرولیتر از مایع منی لیکوفاژ شده در ویال‌های ۱ سی‌سی ریخته و ۲۰ میکرولیتر PBS (فسفات بافر سالین PH=۷) به آن اضافه گردید و با ۴۰ میکرو لیتر محلول بنزیدین مخلوط و ۵ دقیقه در دمای اتاق گذاشته شد. بعد از این مدت ۱۰ میکرولیتر از محلول روی Makler chamber گذاشته و با عدسی ۲۰ میکروسکوپ (Axiostar Plus Zaiss, Germany) بررسی شد. تعداد سلول‌های به رنگ قهوه‌ای تیره در ۱۰۰ مربع Makler شمارش گردید(۲۵).

*آنالیز آماری:*

اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS پانزده به کامپیوتر وارد شد. برای مقایسه پارامترهای اسپرم، سطح ROS و میزان لکوسیت بین دو گروه از آنالیز یک‌طرفه متغیرها (ANOVA) استفاده و سطح معنی‌دار بودن کم‌تر از ۰/۰۵ انتخاب شد.

## یافته ها

بررسی ماکروسکوپی نمونه‌ها نشان داد که میانگین حجم مایع منی در هر دوگروه ۳/۴۷ میلی‌لیتر بود (p=۰/۹۹۶). از نظر خصوصیات ماکروسکوپی مانند چسبندگی در گروه OAT ۴ نفر دارای چسبندگی بالا، ۴ نفر دارای چسبندگی پایین و بقیه طبیعی بودند و در گروه مردان طبیعی ۲ مورد چسبندگی بالا و بقیه چسبندگی طبیعی داشتند. از نظر ظاهر نمونه مایع منی (appearance) هر دو گروه طبیعی بودند.

درصدشکل طبیعی اسپرم‌گروه سالم۴۸/۴۶ گزارش شد که درگروه OAT این پارامتر شدیدا کاهش یافته و به میزان ۵/۶۸ درصد بود (p=۰/۰۰۰). درصد تحرک پیشرونده اسپرم در گروه سالم ۶۳/۲۰ و در گروه OAT ۱۶/۶۸ به دست آمد(p=۰/۰۰۰). تعداد اسپرم در گروه سالم $۱۲۹/۱۰ \times ۱۰^{۶}$ در هر میلی لیتر مایع منی گزارش شد که در گروه OAT به میزان $۸/۶۹ \times ۱۰^{۶}$ کاهش یافته بود (p=۰/۰۰۱). نتایج همچنین نشان داد که سطح لکوسیت در گروه طبیعی ۰/۰۷ و در گروه OAT ۰/۱۲ بود (p=۰/۳۵۳). میزان ROS در گروه طبیعی mIU/ml ۷۲/۶۴ و در مردان OAT mIU/ml ۱۲۵۳/۴۹ به دست آمد(p= ۰/۰۰۰) (جدول شماره ۱).

افراد گروه OAT از نظر تعداد اسپرم به دو گروه کم‌تر از ۵ میلیون اسپرم در میلی‌لیتر و بیش از ۵ میلیون اسپرم در میلی‌لیتر تقسیم شدند. ۴ بیمار OAT کم‌تر از ۵ میلیون در میلی‌لیتر و ۲۱ بیمار بیش از ۵ میلیون در

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 23:22 +0330 on Tuesday December 11th 2018

میلی‌لیتر اسپرم داشتند که سطح ROS در گروه اول ۳۶۲۷/۵۵±۴۰۷۰/۷۹ و درگروه دوم ۸۰۱/۲۹±۱۰۰۰/۴۸ به‌دست آمد(p=۰/۰۰۷).گروه OAT ازنظر ریخت‌شناسی و حرکت نیز به دو گروه کم‌تر از ۵ درصد و بیش‌تر از ۵ درصد تقسیم شدند. سطح ROS (گونه های فعال اکسیژن) در دو گروه از نظر هر دو شاخص مقایسه شد و نتایج تفاوت معنی‌داری را بین دو گروه نشان نداد (جدول شماره۲).

**جدول شماره۱:** میانگین و انحراف معیار پارامترهای اسپرم دردو گروه نمونه های انزالی نرمال ونمونه های الیگو آستنوتراتوزوسپرمی

| متغیر | گروه OAT n = 25 | گروه نرمال n =50 | p-value |
|---|---|---|---|
| حجم سیمن | ۳/۴۷±۱/۹۹ | ۳/۴۷±۱/۵۸ | ۰/۹۹۶ |
| تعداد اسپرم (×۱۰^۶) | ۸/۶۸±۴/۲۲ | ۱۲۹/۱۰±۱۶۶/۲۸ | ۰/۰۰۱ |
| مورفولوژی طبیعی (٪) | ۵/۶۸±۵/۷۶ | ۴۸/۴۶±۱۱/۳۱ | ۰/۰۰۰ |
| حرکت پیشرونده (٪) | ۱۶/۶۸±۱۳/۲۱ | ۶۳/۲۰±۹/۱۴ | ۰/۰۰۰ |
| تعداد لکوسیت (×۱۰^۶) | ۰/۱۲±۰/۲۰ | ۰/۰۷±۰/۲۲ | ۰/۳۵۳ |
| ROS (mIU/ml) | ۱۲۵۳/۴۹±۲۰۰۵/۹۵ | ۷۲/۶۴±۱۴۹/۵۲ | ۰/۰۰۰ |

**جدول شماره ۲:** میانگین و انحراف معیارادیکال های آزاد اکسیژن بر حسب پارامترهای اسپرم در گروه الیگو آستنوتراتوزوسپرمی

| متغیر | | ROS(mIU/ml) | p-value |
|---|---|---|---|
| تعداد اسپرم | ۵> میلیون در لیتر | ۸۰۱/۲۹±۱۰۰۰/۴۸ | **۰/۰۰۷** |
| | ۵ ≤ میلیون در لیتر | ۳۶۲۷/۵۵±۴۰۷۰/۷۹ | |
| حرکت اسپرم | ٪۵> | ۱۰۷۱/۶۰±۱۱۳۱/۰۴ | ۰/۵۲۰ |
| | ٪۵ ≤ | ۱۶۴۰/۰۱±۳۲۵۸/۹۷ | |
| مورفولوژی اسپرم | ٪۵> | ۱۰۶۶/۲۷±۱۰۶۰/۶۶ | ۰/۷۵۶ |
| | ٪۵ ≤ | ۱۳۴۱/۶۰±۲۳۴۸/۹۹ | |

## بحث

ناباروری یکی ازمهم‌ترین عوامل تنش‌زا در زندگی زوج‌ها می‌باشد و ناباروری با علل مردانه تقریبا نیمی از این موارد را تشکیل می‌دهد(۱). از آن‌جایی‌که طبق تحقیقات اخیر افزایش سطح ROS در نمونه‌های منی ۲۵ تا ۴۲ درصد ازافراد نابارور وجود دارد(۶)، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به عنوان یک عامل بسیار مهم در اختلال عملکرد اسپرم شناخته شده‌اند. اگرچه این گونه‌ها در بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیکی اسپرماتوزوآ دخیل هستند، افزایش بیش از حد آنها باعث تخریب DNA اسپرم و درنتیجه برنامه مرگ سلولی(Apoptosis) می‌گردد. درجه‌آسیب استرس اکسیداتیو نه تنها به مقدار ROS بلکه به مدت مواجهه و فاکتورهای خارجی مانند فشار اکسیژن، دما و ... بستگی دارد(۶). گونه‌های فعال اکسیژن به وسیله گلبول‌های سفید (به ویژه گرانولوسیت‌ها) و اسپرم غیر طبیعی تولید می‌شوند. دو منبع مهم تولید ROS، میتوکندری و غشای پلاسمایی اسپرم است. میتوکندری با تولید نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید وابسته به راه اکسیدوردوکتاز به عنوان منبع اصلی ROS می‌باشد. غشای پلاسمایی نیز با تولید نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید فسفات وابسته به سیستم اکسیداز در تولید ROS نقش دارد(۱۵). اسپرم‌ها به علت وجود پلی اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در غشای پلاسمایی به ROS حساس هستند. آن‌ها هم‌چنین سیتوپلاسم خود را برای ترمیم مکانیسم در مقابل ROS از دست می‌دهند( ۳، ۱۴،۱۶،۱۷،۱۸).

بر این اساس در مطالعه حاضر سطح گونه‌هال فعال اکسیژن در مایع منی مردان نابارور اولیگو آستنوتراتو اسپرمیک با مردان دارای پارامترهای اسپرم طبیعی مقایسه شد. در این مطالعه پارامترهای مایع منی شامل تعداد، حرکت و شکل در گروه OAT تفاوت قابل توجهی با گروه سالم داشت و تعداد اسپرم، درصد شکل و حرکت نسبت به گروه سالم کاهش یافته بود. همچنین سطح ROS در بیماران OAT نسبت به گروه سالم به صورت معنی‌داری بالاتر بود که این با مطالعات مشابهی که در این زمینه انجام شده است، مطابقت دارد. برای مثال Pasqualotto و همکارانش (۲۰۰۰) در امریکا در مطالعه‌ای ارتباط بین اکسیداتیو استرس وپارامترهای مایع

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 23:22 +0330 on Tuesday December 11th 2018

منی را در۴گروه واریکوسل، عقیم‌سازی (Vasectomy) قابل برگشت، ناباروری ناشناخته (Idiopathie) و واریکوسل همراه با عفونت بررسی کردند. در گروه نابارور به جز گروه چهارم، تعداد، شکل و تحرک اسپرم به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافته بود. اما سطح ROS در بیماران بیش‌تر از افراد گروه شاهد به دست آمد(۲۱).

اسپرم‌ها با شکل غیر طبیعی سر، قطعه میانی و نقص دم نیز دارای تولید بیشتر ROS هستند که در مطالعات متعددی این مورد ثابت شده است(۱۴). تاثیر گونه‌های فعال اکسیژن بر کاهش حرکت مربوط به کاهش فسفریلاسیون پروتئین axonemal و بی تحرکی اسپرم است که هر دومنجر به کاهش توانایی لازم برای ترکیب اسپرم با اووسیت می‌شوند(۶). در این مطالعه شکل غیر طبیعی در گروه OAT در مقایسه با گروه طبیعی بیش‌تر بود. ریخت شناسی اسپرم در گروه OAT به دو دسته کم‌تر از ۵ درصد و بیش‌تر از ۵ درصد تقسیم شد که سطح ROS در این دو دسته تفاوت قابل توجهی نداشت و این در صورتی است که Said و همکارانش (۲۰۰۵) در انگلستان در مطالعه خود به نتیجه متفاوتی دست یافتند. آنها اثر شکل غیر طبیعی اسپرم بر تولید ROS و ارتباط آن با آسیب DNA اسپرم را سنجیدند. نتایج نشان داد که اختلالات شکل اسپرم در ارتباط با افزایش میزان ROS می‌باشد(۲۰).

همچنین درمطالعه‌گروه تحقیقاتیMustafa (۲۰۰۴) درصد برنامه مرگ سلولی (Apoptosis) دربیماران با ROS مثبت در مقایسه با افراد با پارامترهای مایع منی طبیعی و نیز بیماران با ROS منفی بیش‌تر بود. اختلالات پارامترهای اسپرم در افراد با ROS مثبت بیش‌تر از افراد با پارامترهای اسپرم طبیعی گزارش شد(۲۶). در تحقیق مشابه دیگری‌گروه Agarwal (۲۰۰۶) در انگلستان میزان ROS را در ۱۳۲ نفر با فاکتور ناباروری مردانه(MFI) اندازه‌گیری کردند. گروه(MFI) به۳ زیرگروه پارامترهای اسپرم طبیعی، پارامترهای اسپرم غیرطبیعی و بیماران با یک یا چند پارامتر غیرطبیعی تقسیم شدند. اسپرم افراد سالم دارای غلظت بیش‌تر، درصد حرکت وشکل طبیعی بیش‌تری بود و هم چنین سطح ROS در گروه MFI و تمام زیر گروه‌ها بالاتر بود. زیر گروهی که تمام پارامترهای اسپرم در آن غیر طبیعی بود، در مقایسه با زیرگروهی که پارامترهای اسپرم طبیعی داشت، از میزان ROS بالاتری برخوردار بود(۲۷).

برخلاف مطالعات قبلیWhittiongton و همکارانش (۱۹۹۹) در امریکا رابطه معنی داری بین حرکت اسپرم و سطح ROS پیدا نکردند(۲۸). در مطالعه حاضر سطح لکوسیت در گروه OAT افزایش یافته بود، که تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد. مطالعات مشابهی در این زمینه انجام شده است که نتایج مشابه و متفاوتی نسبت به مطالعه ما دارند، برای مثال در سال ۲۰۰۷ در مطالعه‌ای ثابت شدکه سطح ROS تحت تاثیرلکوسیت‌ها و در ارتباط با کاهش پارامترهای مایع منی می‌باشد. در نمونه‌های فاقد لکوسیت، سطح ROS به طور معنی‌دار در گروه بارور پایین‌تر از گروه subfertile گزارش شد (۰/۷۵ در نمونه‌های شسته شده در مقابل ۲/۰۰) و به طور مشابهی در نمونه‌های با لکوسیت کمتر از $۱۰^{۶}$ در میلی‌لیتر سطح ROS به‌طور قابل توجهی پایین‌تر از نمونه‌های با لکوسیت بالاتر از$۱۰^{۶}$ در میلی لیتر بود. در گروه بارور، سطح ROS در ارتباط مثبت با لکوسیت‌ها و در ارتباط منفی با تعداد و حرکت اسپرم بود(۲۹). در مطالعهTomlinson (۱۹۹۳) درامریکا تاثیر لکوسیت‌های مایع منی بر کیفیت اسپرم و توانایی حامله شدن در ۵۱۲ زوج بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد غلظت لکوسیت ارتباطی با کاهش کیفیت مایع منی یا میزان غلظت آن ندارد و میزان گونه‌های فعال اکسیژن یا آنتی‌بادی ضد اسپرم اثری بر نتایج نداشتند(۳۰).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 23:22 +0330 on Tuesday December 11th 2018

ازفاکتورهای موثر دیگر در افزایش میزان گونه‌های فعال، می‌توان به کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها اشاره کرد. پلاسمای مایع منی حاوی یک سری آنتی اکسیدان‌های آنزیمی شامل سوپر اکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و یک سری آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی مانند ویتامین E،C، پیروات، گلوتاتیون و کارنیتین می‌باشد(۱۵). اثرات آنتی اکسیدان‌ها بر روی سطح ROS در مطالعات مختلفی مورد بحث قرار گرفته است. طبق مطالعهAgarwal(۲۰۰۶) مصرف ویتامینC درترکیب با ویتامین E و گلوتاتیون به‌طور قابل توجهی آسیب DNA اسپرم به وسیله استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد. در تحقیقات دیگری نیز تاثیر ویتامین‌های C و E و کارنیتین در کاهش میزان ROS اثبات شده است(۳۱).

با توجه به مطالعه انجام شده، مشخص می‌شود اگر جه سطح پایه ROS در افراد با نمونه‌های انزالی طبیعی وجود دارد، افراد گروه OAT دارای سطح بیش‌تری از ROS هستند. میزانROS درگروه سالم mIU/ml ۷۲/۶۴ و در مردان OAT mIU/ml ۱۲۵۳/۴۹ به دست آمد (p= ۰/۰۰۰). اثبات این مطلب می‌تواند راه‌گشای درمان بسیاری از موارد ناباروری با استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها باشد که نیازمند مطالعات بیش‌تر در این زمینه است.

## References


1. Brugh VM 3rd, Lipsultz LI. Male factor infertility: evaluation and management. ***Med Clin North Am*** 2004; 88(2): 367-385.
2. McLachlan RI, Baker HW, Clarke GN, Harrison KL, Matson PL, Holden CA, et al. Semen analysis: its place in modern reproductive medical practice. ***Pathology*** 2003; 35(1): 25-33.
3. World Health Organization.***WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction.*** Cambridge: Cambridge University Press, 1992, pp. 107.
4. World Health Organization. ***WHO Manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple.*** Cambridge: Cambridge University Press, 1993, 83.
5. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. ***Urology*** 1996; 48(6): 835-850.
6. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. ***J Androl*** 2002; 23(6): 737-752.
7. Athayde KS, Cocuzza M, Agarwal A, Krajcir N, Lucon AM, Srougi M, Hallak J. Development of normal reference values for seminal reactive oxygen species and their correlation with leukocytes and semen parameters in a fertile population. ***J Androl*** 2007; 28(4): 613-620.
8. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction.***Curr Opin Urol*** 2006; 16(6): 428-434.
9. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. ***Fertil Steril*** 1992; 57(2): 409-416.
10. Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism,

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 23:22 +0330 on Tuesday December 11th 2018

measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. ***Indian J Exp Biol*** 2005; 43(11): 963-974.

11. Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. ***Urol Clin North Am*** 2002; 29(4): 817-827.
12. Agarwal A, Saleh RA. Utility of oxidative stress test in the male infertility clinic. ***Zhonghua Nan Ke Xue*** 2002; 8(1): 1-9.
13. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. ***Hum Reprod*** 1999; 14(11): 2801-2807.
14. Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. ***BJU Int*** 2005; 95(4): 503-507.
15. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. ***J Androl*** 2005; 26(6): 654-660.
16. Agarwal A,Gupta S, Sharma R. Oxidative stress and its implications in female infertility-a clinician's perspective. ***Reprod Biomed Online*** 2005; 11(5): 641-650.
17. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. ***CMAJ*** 2006; 175(5):495-500.
18. Agarwal A, Allamaneni SS. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. ***Minerva Ginecol*** 2004; 56(3): 235-245.
19. Kiziler AR, Aydemir B, Onaran I, Alici B, Ozkara H, Gulyasar T, Akyolcu MC. High levels of cadmium and lead in seminal fluid and blood of smoking men are associated with high oxidative stress and damage in infertile subjects. ***Biol Trace Elem Res*** 2007; 120(1-3): 82-91.
20. Said TM, Aziz N, Sharma RK, Lewis-Jones I, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Novel association between sperm deformity index and oxidative stress-induced DNA damage in infertile male patients. ***Asian J Androl*** 2005; 7(2): 121-126.
21. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Relationship between oxidative stress,semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. ***Fertil Steril*** 2000; 73(3): 459-464.
22. Khosrowbeygi A, Zarghami N. Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters. ***BMC Clin Pathol*** 2007; 7: 6.
23. Aitken RJ, De Iuliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. ***Reprod Biomed Online*** 2007; 14(6): 727-733.
24. Kobayashi H, Gil-Guzman E, Mahran AM, Rakesh , Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwa A. Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay. ***J Androl*** 2001; 22(4): 568-574.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 23:22 +0330 on Tuesday December 11th 2018

25. Aitken RJ, West K, Buckingham D. Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress, and sperm function. ***J Androl*** 1994; 15(4): 343-352.
26. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. ***Hum Reprod*** 2004; 19(1): 129.
27. Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ Jr, Alvarez JG, Sikka SC. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. ***Fertil Steril*** 2006; 86(4): 878-885.
28. Whittington K, Harrison SC, Williams KM, Day JL, McLaughlin EA, Hull MG, Ford WC. Reactive oxygen species (ROS) production and the outcome of diagnostic tests of sperm function.***Int J Androl*** 1999; 22(4): 236-242.
29. Athayde KS, Cocuzza M, Agarwal A, Krajcir N, Lucon AM, Srougi M, Hallak J. Development of normal reference values for seminal reactive oxygen species and their correlation with leukocytes and semen parameters in a fertile population. ***J Androl*** 2007; 28(4): 613-620.
30. Tomlinson MJ, Barratt CL, Cooke ID. Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. ***Fertil Steril*** 1993; 60(6): 1069-1075.
31. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. ***Reprod Biomed Online*** 2004; 8(6): 616-627.