

مقدمه

با پیشرفت تکنولوژی‌های جدید در زمینه درمان ناباروری، امید به درمان ناباروری افزایش یافته است و در این عرصه معرفی روش میکرواینجکشن (ICSI)^۱ برای درمان مردان آزواسپرم تحول بزرگی محسوب می‌گردد. در این روش با استفاده از اسپرم حاصل از اپیدیدیم (PESA)^۲ و یا بیضه (TESE)^۳ امکان باروری میسر خواهد بود. با چنین امکاناتی درمان بیماران آزواسپرم غیر انسدادی که قبلاً بدون درمان رها می‌شدند امروزه کاملاً میسر می‌باشد. آزواسپرمی غیرانسدادی در واقع نارسایی اولیه بیضه است که به دلایل اختلالات کروموزومی، مادرزادی، عفونی، بدخیمی، شیمی درمانی و یا علل ناشناخته دیگر ایجاد می‌شود. در این عارضه اسپرم‌سازی تا حد زیادی متوقف شده و اگر تعداد کمی اسپرم هم در کانون‌هایی از بیضه وجود داشته باشد در حدی نیست که امکان مشاهده و بررسی آن در مایع انزال باشد. لذا روش یافتن اسپرم‌های معدودی که احتمالاً در بیضه وجود دارد اهمیت پیدا می‌کند. Silber در مقالات متعددی نشان داد (۳-۵) که حداقل در ۵۰٪ موارد آزواسپرمی غیرانسدادی (NOA)^۴ کانون‌های اسپرماتوژنز پراکنده وجود دارد. در بیوپسی تشخیصی بیضه در مردان با آزواسپرمی غیرانسدادی بطور میانگین در هر توبول سمینی‌فروس ۶-۱۰ اسپرماتید بالغ دیده می‌شود درحالی‌که در مردان با آزواسپرمی انسدادی این میزان ۳۵-۱۷ عدد می‌باشد. از طرفی بیوپسی به روش معمولی یا TESE بطور بالقوه می‌تواند دارای عوارضی باشد. به خصوص اینکه ممکن است چند بار تکرار شود (۶) و از طرف دیگر نیافتن اسپرم در زمانی که زوجین برای TESE-ICSI آماده می‌شوند هم از نظر روانی و هم اقتصادی می‌تواند باعث

آسیب به زوجین شود. علاوه بر این همسر این افراد نیز متحمل مسائل تجویز داروهای تحریک تخمک‌گذاری شده است. تمام این موارد موجب می‌شود که جهت دست یافتن به فاکتورهای پیشگویی کننده وجود اسپرم در بیضه تلاش شود. در این راستا و برای پی‌بردن به وجود اسپرم و کانون‌های اسپرماتوژنز تحقیقاتی انجام شده است که آیا عواملی چون خصوصیات بالینی، هورمونی و تصویری می‌توانند عامل پیش‌گویی‌کننده در میزان موفقیت استحصال اسپرم از بیضه باشد؟ (۱۱، ۱۰، ۵). بررسی‌های انجام شده برای تعیین رابطه خصوصیات فیزیکی مثل قد، وزن و حتی حجم بیضه با میزان موفقیت TESE نتیجه رضایت بخشی نداشته است (۷). البته در مواردی که حجم بیضه کمتر از ۵ml باشد امکان دستیابی به اسپرم به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. برای دست‌یافتن به فاکتورهای پیشگویی‌کننده وجود اسپرم در بیضه روی فاکتورهای هورمونی چون FSH و Inhibin B بررسی‌هایی انجام شده است (۷، ۱۰). البته میزان طبیعی هورمون‌های Inhibin B, LH, FSH و تستوسترون برای اسپرماتوژنز فعال ضروری است و در آزواسپرمی غیرانسدادی ممکن است تغییراتی در میزان سرمی این هورمون‌ها مشاهده شود؛ ولی در بسیاری از این موارد با وجود تغییرات سرمی، اسپرم در کانون‌هایی از بیضه وجود داشته است و میزان این هورمون‌ها نمی‌تواند فاکتور پیشگویی‌کننده مناسبی باشد (۷، ۱۰). این شرایط نشان می‌دهد که برای پیدا کردن فاکتورهای تعیین‌کننده، احتیاج به تحقیقات بیشتری است. در این راستا آیا می‌شود از سیستم ایمنی برای ردیابی وجود اسپرماتوژنز در بیضه استفاده کرد؟

سیستم ایمنی نسبت به آنتی‌ژن‌های اسپرماتوژنیک که در زمان بلوغ بارز می‌شوند شناختی ندارد و در صورت مواجهه با آن مانند برخورد با یک ماده

- 1- Intra Cytoplasmic Sperm Injection
- 2- Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration
- 3- Testicular Sperm Extraction
- 4- Non- Obstructive Azoospermia

لازم به ذکر است که در این افراد مایع انزالی حتی پس از انجام سانتریفیوژ فاقد اسپرم بود.

اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین‌ها در آزمایشگاه مرکز درمان ناباروری رویان انجام گردید. آنتی‌بادی زیر کلاس‌های IgG و IgA ضد اسپرم (ASA) در مایع انزالی و سرم به روش تست Mar غیرمستقیم^۳ و با استفاده از کیت‌های ساخت شرکت Fertipro (Belgium) انجام شد.

براساس آزمایش Mar به روش غیرمستقیم اسپرم‌های شستشو شده و متحرک از فرد دیگر^۴ به محیط کشت حاوی سرم یا مایع انزالی اضافه می‌شود. در صورت وجود آنتی‌بادی ضد اسپرم به آن متصل می‌گردد و آنگاه ذرات لاتکس^۵ متصل به آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبولین انسانی باعث اتصال ذرات لاتکس به اسپرم می‌گردد و سپس تعداد این اسپرم‌های حاوی ذرات لاتکس حداقل برای تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش می‌شود. براساس معیار سنجش این کیت‌ها که برای تعیین میزان ASA در سطح اسپرم و سرم و مایع سمینال افراد نابارور تهیه شده است میزان کمتر از ۱۰٪ منفی تلقی می‌شود و در صورتیکه این میزان ۱۱-۳۹٪ باشد احتمال ناباروری ایمونولوژیکی وجود دارد و بیش از ۴۰٪ این احتمال تقویت می‌گردد. در این بررسی با توجه به موضوع مورد نظر مقادیر بیشتر از ۱۰٪ مثبت تلقی گردیدند.

روش TESE: نمونه‌برداری از بیضه در این بیماران به روش سرپایی و در صورت لزوم دوطرفه و با تزریق موضعی لیدوکائین به داخل اسکروتوم و بلوک طناب اسپرماتیک انجام شد که با ایجاد برشی^۶ کوچک (۱cm) روی اسکروتوم مثل بیوپسی باز و شکاف روی تونیکا آلبوژینه مقدار کمی از نسج بیضه که از این شکاف

خارجی، تحریک شده و باعث تولید آنتی‌بادی ضد اسپرم (ASA)^۱ می‌شود (۱۱).

این مطالعه با این فرض انجام گرفت که وجود ASA در سرم و مایع انزالی می‌تواند دلیل بر مواجهه سیستم ایمنی با اسپرم و بنابراین وجود اسپرماتوژنز و اسپرماتوزوئید در بیضه باشد. آنتی‌بادی تولید شده علیه اسپرم از کلاس IgA و IgA است و وجود آن در ترشحات انزالی در اتصال با اسپرم در کاهش باروری موثر است؛ ولی چنانچه هدف از اندازه‌گیری آن در جهت عامل پیشگویی کننده موفقیت TESE باشد، با توجه به سهولت اندازه‌گیری آنتی‌بادی در سرم، می‌توان برای تشخیص وضعیت اسپرماتوژنز در بیضه افراد نابارور مبتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی از آن بهره جست.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت مقطعی طی سال‌های ۱۳۸۱-۱۳۸۲ انجام گردید. نمونه‌گیری (به روش آسان) از افراد آزواسپرم مراجعه‌کننده به مراکز درمان ناباروری رویان و ولیعصر در شهر تهران انجام شد که برای تشخیص ویا درمان ناباروری احتیاج به نمونه‌برداری از بیضه داشتند و در روش درمانی آن‌ها، این نمونه‌برداری به روش سیتولوژی TESE تعیین شده بود. تمایل و همکاری بیمار، عدم سابقه عمل جراحی در ناحیه ژنیتال و اینگوینال در طی کمتر از یکسال گذشته، نداشتن بیماری خود ایمنی^۲ و عدم مصرف داروهای تضعیف‌کننده سیستم ایمنی مثل کورتون از شرایط انتخاب افراد بود.

قبل از نمونه‌برداری از بیضه از سرم خون و مایع انزالی نمونه‌گیری و سنجش سطح سرمی هورمون‌های LH، FSH، تستوسترون و آنتی‌بادی ضد اسپرم انجام شد،

3- Indirect Sperm Mar test

4- Donor

5- Bead

6- Incision

1- Anti Sperm Antibody

2- Auto Immune Disease

ASA و پیشگویی موفقیت استخراج اسپرم از بیضه

دکتر کاظمینی و

میانگین ۱/۶ احتی با سانتریفوژ فاقد اسپرم بود و
آزواسپرم بودن این افراد کاملاً مورد تایید قرار گرفت.
۴۵ نفر آنها دارای سابقه عمل جراحی در ناحیه

به بیرون زده شده برداشت گردید. سپس در آزمایشگاه
جنین‌شناسی نمونه روی یک ظرف استریل حاوی محیط
کشت Ham's F10 (Sigma) قرار داده شد. خرد کردن نسج

**جدول ۱- ضرایب همبستگی یافتن اسپرم با میزان ایمونوگلوبولین زیرکلاس‌های IgA و IgG در افراد
تحت عمل بیوپسی بیضه جهت استحصال اسپرم**

متغیرها	IgG در سرم خون	IgA در مایع انزالی
نتیجه TESE	۰/۳۶۰	۰/۱۰۱
rho اسپرم	۰/۰۰۰	۰/۳۳۹
P-value		

اسکروتوم و اینگوینال در فاصله بیش از یکسال از این
بررسی بودند. در بررسی‌های هورمونی به طور متوسط
میزان هورمون FSH برابر $17mIU/ml$ ، هورمون LH
برابر با $10/6 mIU/ml$ و تستوسترون برابر
 $4/4 ng/ml$ بود.

در نتایج حاصل از انجام عمل TESE در این افراد،
در ۶۰ مورد (۶۴٪) اسپرم استحصال شد و در ۳۴ مورد
(۳۶٪) اسپرم مشاهده نگردید.

هیچکدام از فاکتورهای سن و مدت ازدواج و اعمال
جراحی قبلی در یافتن اسپرم به روش TESE تاثیر
معنی‌داری نداشتند و از میان انواع آنتی‌بادی ضداسپرم
در سرم و مایع انزالی میزان IgG در سرم به‌طور مشخص

بیضه و جداسازی لوله‌های سمینی‌فروس با دو سرنگ
انسولین انجام گردید و با استفاده از میکروسکوپ
معکوس^۱ در محتویات خارج شده از لوله‌های
سمینی‌فروس وجود اسپرم جستجو شد. در صورت عدم
بازیافت اسپرم حداقل تا ۳ محل دیگر از آن بیضه و در
صورت لزوم از بیضه طرف دیگر برای استحصال اسپرم
تلاش گردید.

نتایج

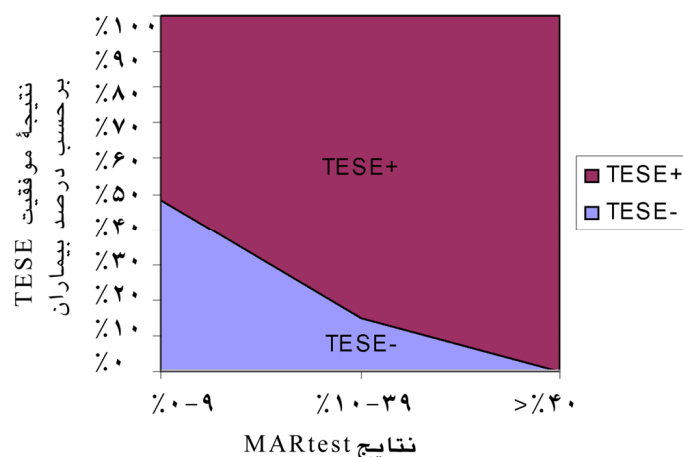
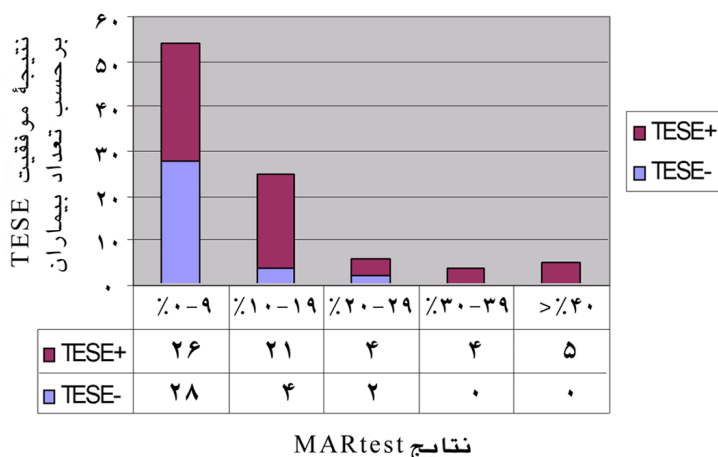
در این مطالعه ۹۴ مرد نابارور مورد بررسی قرار گرفتند
که میانگین سنی آنها ۳۲ سال و میانگین مدت ازدواج آنها
۶/۹ سال بود. آزمایش مایع انزالی با حجم

**جدول ۲- نتایج استخراج اسپرم به روش TESE در ارتباط با میزان IgG سرم* در افراد تحت
عمل بیوپسی بیضه**

نتایج TESE	مثبت	منفی	مجموع
نتایج IgG سرم	مثبت	۳۴	۶
	منفی	۲۶	۲۸
	مجموع	۶۰	۳۴

*بیش از ۱۰٪ مثبت تلقی شده است.

1-Inverted microscope



نمودار ۲- موفقیت استخراج اسپرم به روش TESE و فراوانی آن نسبت به میزان IgG سرم در افراد تحت عمل بیوپسی جهت استحصال اسپرم

نمودار ۱- موفقیت استخراج اسپرم به روش TESE نسبت به میزان IgG سرم در افراد تحت عمل بیوپسی بیضه جهت استحصال اسپرم

جداول شماره ۲ و ۳ و نمودارهای ۱ و ۲ نتایج IgG سرم را در رابطه با TESE نشان می‌دهد. براساس جداول فوق که در آن مقادیر $IgG > 10\%$ را مثبت و یا حد تعیین کننده در نظر گرفته شده است مشخصات این روش تشخیصی به شرح ذیل است:

با موفقیت استحصال اسپرم از بافت بیضه رابطه داشته است که جدول شماره ۱ ضرایب همبستگی را در مورد ایمونوگلوبولین‌ها نشان می‌دهد. این نتایج به روش رگرسیون لجستیک مورد تایید قرار گرفت. به این صورت که مدل لجستیک حاصل تنها متغیر

جدول شماره ۳- میزان آنتی بادی ضد اسپرم (IgG) و استخراج اسپرم به روش TESE در افراد تحت عمل بیوپسی بیضه

نتیجه TESE	نتیجه MAR Test		
	بیش از ۴۰٪	۱۰-۳۹٪	۰-۹٪
وجود اسپرم	۵	۲۹	۲۶
عدم وجود اسپرم	۰	۶	۲۸
مجموع	۵ (%۵)	۳۵ (%۳۷)	۵۴ (%۵۸)

ارزش اخباری مثبت^۱ برابر با $34/40 = 85\%$
 ارزش اخباری منفی^۲ برابر با $28/54 = 52\%$

IgG سرم را با احتمال $p=0/0085$ در برگرفت و سایر عوامل در آن تاثیر نداشتند (وارد مدل نشدند). IgA مایع انزالی هر چند با میزان موفقیت TESE رابطه نداشت؛ ولی با IgG سرم رابطه معنی‌داری نشان داد. $\rho P = 0.298, P < 0.003$ رگرسیون پیرسون).

1- Positive Predictive Value
 2- Negative Predictive Value

وجود اسپرماتوژنز را پیش‌بینی خواهد نمود. این میزان در ۴۰ نفر (۴۳٪) از افراد در این مطالعه وجود داشته است. منفی بودن تست ASA نمی‌تواند راهنمایی برای عدم امکان استحصال اسپرم از بیضه باشد چرا که ارزش اخباری منفی آن ۵۲٪ است. اما نکته‌ای که در این بیماران وجود دارد این است که جراحی‌های مختلف روی بیضه که ممکن است به روش‌های مختلف از جمله بیوپسی باشد موجب در معرض قرار گرفتن اسپرم به سیستم ایمنی و افزایش آنتی‌بادی ضد اسپرم شده و لذا بهره‌وری بیشتر از این آزمایش گردد.

با توجه به افزایش استفاده از روش میکرواینجکشن در درمان باروری مردان آزواسپرم و تلاش در جهت افزایش موفقیت میزان باروری در این افراد لزوم دستیابی به فاکتورهای پیشگویی کننده حضور اسپرم در بیضه بیشتر مشخص می‌گردد و از آنجا که هنوز روشی مناسب با حساسیت و ویژگی خیلی زیاد وجود ندارد لذا می‌توان از فاکتورهای ایمونولوژیک برای این منظور استفاده کرد و استفاده زیر کلاس IgG ایمونوگلوبولین‌ها بر علیه اسپرم (ASA) در سرم که آزمایش نسبتاً آسان و غیر تهاجمی است می‌تواند در این بیمار مفید باشد.

تشکر و قدردانی

از همکاری و مساعدت مسئولین محترم مراکز ناباروری ولی عصر (عج) و موسسه رویان، سرکار خانم دکتر رمضان‌زاده و جناب آقای دکتر کاظمی و همچنین جناب آقای لک‌پور کارشناس آزمایشگاه رویان تشکر می‌گردد.

میزان مثبت کاذب^۱ برابر با $6/34 = 18\%$ *

حساسیت^۲ روش برابر با $34/60 = 57\%$

ویژگی^۳ روش برابر با $28/34 = 82\%$

* (هرگاه مقادیر بیش از ۴۰٪ را به عنوان مثبت در نظر بگیریم صفر است).

بحث

دستیابی به فاکتورهای پیشگویی کننده در این مطالعه ارتباط میزان ASA و یافتن اسپرم به روش TESE را در بیماران آزواسپرم نشان می‌دهد. با توجه به ارزش اخباری مثبت ۸۵٪ سنجش آنتی اسپرم آنتی‌بادی در سرم و مایع سمینال می‌تواند به عنوان یک عامل پیشگویی کننده در موفقیت TESE جایگاهی داشته باشد که این آزمایش دارای حساسیت ۵۷٪ و ویژگی ۸۲٪ است. البته اگر میزان ASA را در این روش که با کیت‌های Sperm MAR انجام شده در حدی که برای ایجاد ناباروری ناشی از اتوآنتی‌بادی کاملاً موثر دانسته شده یعنی بیش از ۴۰٪ مثبت در نظر بگیریم، از تمام موارد TESE انجام شده اسپرم بدست آمده و ویژگی ۱۰۰٪ خواهد داشت. اما این میزان تیتراژ آنتی‌بادی فقط در ۵ نفر از بیماران ما (حدود ۵٪) دیده شده است و در مطالعات دیگر در کل بیماران نابارور این میزان حداکثر ۱۲٪ می‌باشد. ولی از آنجا که در اینجا منظور تاثیر ASA بر باروری نیست بلکه استفاده از آن برای ردیابی و پیش‌گویی وجود اسپرماتوژنز در بیضه می‌باشد می‌توان برای استفاده بیشتر از این تست، میزان تیتراژ ASA را در حد پائین‌تر قرار داد که اگر آن را بالاتر از ۱۰٪ مثبت در نظر بگیریم با ارزش اخباری مثبت ۸۵٪

1- False Positive

2- Sensitivity

3- Specificity

References

- 1-Tournaye H., Devroey P., Liu J., Nagy Z., Lissens W., Van Steirteghem A. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intercytoplasmic injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil Steril.* 1994;61:1045-1051.
- 2-Craft I., Tsirigotis M. Simplified recovery, preparation and cryopreservation of testicular spermatozoa. *Hum Reprod.* 1995;1623-1627.
- 3- Siber S.J. Quantitative analysis of testicular Biopsy. *Fertil Steril.* 1981;36:480-485.
- 4- Siber S.J. Sertoli cell-only syndrome. *Hum Reprod.* 1996;11:229-233.
- 5- Silber S.J. Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intercytoplasmic sperm injection for azoospermic due to maturation arrest. *Fertil Steril.* 1996;66:110-117.
- 6- Tournaye H., Verheyen G., Nagy P., Ubaldi F., Goossens A., Silber S.J., Van Steirteghem A.C., Devroey P. Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients? *Hum Reprod.* 1997;12:80-86.
- 7-Ezeh U. I., Moore H.D., Cooke I. D. Correlation of testicular sperm extraction with morphological, biophysical and endocrine profiles in men with azoospermia due to primary gonadal failure. *Hum Reprod.* 1998;13:3066-3074.
- 8- Jensen T.K., Andersson A.M., Hjollund N.H.I., et al. Inhibin B as a serum marker of spermatogenesis: correlation to differences in sperm concentration and follicle-stimulating hormone levels. A study of 349 Danish men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:4059-4063.
- 9- Pierik F.H., Vreeburg J.T., Stijnen T., De Jong F.H., Weber R.F.A. Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:3110-3114.
- 10- Sigrid V., Eckardstein M. S., Martin. Bergmann., Gerhard F., Weinbauer Paul Gassner, Andreas G., Schepers., Eberhard N. Serum Inhibin B in Combination with Serum Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Is a More Sensitive Marker Than Serum FSH Alone for Impaired Spermatogenesis in Men, But Cannot Predict the Presence of Sperm in Testicular Tissue Samples. *J Clin Endo Metab.* 1999;84(7)2496-2501.
- 11- Turek P.J. Infections, Immunology, and male infertility *Clinics of north America.* 1999;10: 435-470