

مقدمه

اسپرما توژنز فرآیند تکاملی پیچیده‌ای است که به گوناگونی و تروپین‌های هیپوفیز و تستوسترون وابسته است. این هورمون‌ها به‌طور غیرمستقیم و از طریق تولید موضعی تنظیم‌کننده‌ها، بر روی این مسیر اثر تنظیمی دارند. عقیده بر این است که مولکول‌هایی مانند فاکتور رشد شبه انسولین نوع I (IGF-I) در تکامل سلول‌های زایا^۲ نقش دارند. این فاکتور دارای اثرات مستقیم و غیرمستقیم بر روی استروئیدوژنز، متابولیسم، تکثیر^۳ سلولی و تمایز سلولی است که عمل آن به‌واسطه اثر هورمون رشد تعدیل‌می‌گردد (۱،۲). ارتباط پاراکرین بین سلول‌های سرتولی و سلول‌های زایا به واسطه IGF-I بسیار محتمل است. IGF-I در مایعات خارج سلولی به پروتئین‌هایی موسوم به پروتئین متصل شونده به IGF-I (IGFBPs)^۴ متصل می‌گردد که پروتئین اصلی این دسته IGFBP-3 است (۳-۵).

نقش فیزیولوژیک PSA^۵ در پلاسمای سمینال^۶ به‌طور کامل شناخته نشده است. این آنزیم، پروتئین^۷ اصلی این مایع بوده و باعث تجزیه سمینوزلین‌های^۸ I و II به پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین می‌شود. پیشنهاد شده است که این عملکرد PSA به‌طور قابل‌توجهی از اثر مهارکنندگی سمینوزلین‌ها بر روی قدرت تحرک اسپرم می‌کاهد (۶). PSA همچنین به‌عنوان یک IGFBP-3 پروتئین^۷ مطرح می‌باشد؛ بنابراین احتمالاً در تعدیل عملکرد IGF-I نیز نقش دارد (۷).

بنابراین IGF-I فاکتوری مهم در تکامل اسپرم

می‌باشد (۱). نقش PSA به‌عنوان IGFBP-3 پروتئین^۷، باعث می‌شود که میزان IGF-I آزاد پلاسمای سمینال افزایش یابد. بنابراین PSA به‌طور غیرمستقیم و از طریق افزایش سطح IGF-I در دسترس، در تکامل اسپرم‌ها نقش دارد (۷).

Lee و همکاران اختلاف معنی‌داری را در سطح IGF-I مایع سمینال بین افراد طبیعی و بیماران وازکتومی شده و یا دچار آزواسپرمی ایدیوپاتیک مشاهده نکردند (۸). Glander و همکاران همبستگی مثبت معنی‌داری بین غلظت IGF-I مایع سمینال با غلظت اسپرم و درصد اسپرم‌های دارای مورفولوژی طبیعی مشاهده نمودند؛ اما این همبستگی با غلظت PSA معکوس بود (۱). Macpherson و همکاران همبستگی معنی‌داری بین سطح IGF-I پلاسمای سمینال و تحرک و مورفولوژی اسپرم بدست آوردند (۳).

با توجه به نتایج متفاوتی که در زمینه بررسی سطوح IGF-I و PSA در پلاسمای سمینال و نیز ارتباط این دو با یکدیگر و با پارامترهای کیفیت اسپرم به خصوص در شرایط *in vivo* گزارش شده است، مطالعه مورد-شاهدی حاضر به روش نمونه‌گیری تصادفی ساده انجام شد تا تغییرات سطوح IGF-I و PSA به‌طور توأم در پلاسمای سمینال و سرم مردان نابارور ایدیوپاتیک بررسی گردد. به علت اینکه عمده مطالعات در این زمینه محدود به پلاسمای سمینال می‌باشد تغییرات سرمی این فاکتورها نیز در مطالعه حاضر بررسی شد. همچنین به‌جای استفاده از افراد بارور نرمواسپرم به‌عنوان شاهد، مردان نابارور نرمواسپرم انتخاب گردیدند.

مواد و روشها

نمونه‌های مورد مطالعه، مردان مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک مراجعه‌کننده به بخش IVF بیمارستان الزهراء دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی،

- 1- Insulin-Like Growth Factor-I
- 2- Germ Cells
- 3- Proliferation
- 4- IGF Binding Proteins
- 5- Prostate- Specific Antigen
- 6- Seminal Plasma
- 7- Proteinase
- 8- Seminogelin

در دسترس، اندازه گیری شدند. اندازه گیری IGF-I با استفاده از کیت DSL (Texas, USA) انجام شد. ابتدا دو لوله میکروسانتریفوژ به ازای هر نمونه انتخاب گردید (یکی جهت استخراج و دیگری برای خنثی سازی). سپس $50 \mu l$ از نمونه در لوله اول ریخته شد و به دنبال آن $200 \mu l$ از محلول استخراج به آن اضافه گردید که پس از هم زدن، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. زمان انکوبه کردن نباید بیش از ۶۰ دقیقه طول بکشد. سپس عمل میکروسانتریفوژ با دور 10000rpm و به مدت سه دقیقه در درجه حرارت اتاق انجام گرفت. $100 \mu l$ از محلول رویی را به لوله دوم (لوله خنثی سازی) منتقل کرده و $500 \mu l$ از محلول خنثی کننده به آن افزوده شد. از این نمونه خنثی شده، پس از استخراج جهت تست استفاده گردید. سپس $50 \mu l$ از هر یک از استانداردها، کنترل ها و نمونه های استخراج شده را به لوله های پوشیده شده از آنتی بادی ضد IGF-I منتقل کرده و بلافاصله $200 \mu l$ از آنتی بادی دوم نشاندار شده با ^{125}I به لوله ها اضافه گردید و پس از هم زدن روی شیکر با سرعت 180rpm به مدت ۳ ساعت، مایع رویی را تخلیه کرده و بعد از شستشو با بافر آنها را خشک و در دستگاه گاما کانتر (Kontron II, Switzerland) به مدت یک دقیقه میزان رادیواکتیویته بر حسب CPM اندازه گیری شد، سپس با تعیین میزان CPM برای نمونه های استاندارد و رسم منحنی استاندارد، میزان غلظت IGF-I در نمونه های بیماران تعیین گردید. برای اندازه گیری PSA با استفاده از کیت شرکت Immunotech (Montreal, Canada) به این طریق عمل شد که $100 \mu l$ از استانداردها، کنترل ها و نمونه ها به لوله های مربوطه اضافه و سپس به هر یک از لوله ها $100 \mu l$ از نشانگر اضافه گردید. همه لوله ها در درجه حرارت اتاق و روی شیکر به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. سپس مایع رویی تخلیه و لوله ها با آب دیونیزه شستشو داده شد. میزان

درمانی تبریز از مهرماه تا اسفند ماه ۱۳۸۱ بودند که به طور تصادفی و براساس شمارش کامل^۱ اسپرم و قدرت تحرک آن طبق معیار سازمان جهانی بهداشت (WHO) انتخاب گردیدند (۹). براساس داده های حاصل از مطالعات قبلی و با استفاده از α برابر 0.05 و β برابر 0.1 (توان ۹۰٪) حداقل حجم نمونه مورد نیاز در هر گروه ۲۰ نمونه محاسبه گردید. گروه مورد و شاهد به ترتیب شامل ۲۹ و ۲۳ مرد مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک بود. براساس معیار سازمان بهداشت جهانی (WHO) مردان با شمارش کامل اسپرم کمتر از ۲۰ میلیون به عنوان الیگواسپرم و بالاتر از این حد به عنوان نرمواسپرم در نظر گرفته شدند. از نظر قدرت تحرک اسپرم نیز نمونه های با قدرت تحرک بالاتر از ۵۰٪ طبیعی در نظر گرفته شدند. مردان با شمارش کامل اسپرم کمتر از ۵ میلیون و نیز مردان آزواسپرم از مطالعه خارج شدند. نمونه سیمین بعد از ۷۲-۴۸ ساعت پرهیز از تماس جنسی و به وسیله استمناء^۲ از هر دو گروه مورد مطالعه جمع آوری گردید. همچنین به طور همزمان نمونه های خون از هر دو گروه گرفته شد. نمونه سیمین در دمای 37°C و به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد تا به طور کامل به مایع تبدیل شوند. سپس با استفاده از دستگاه Sperm Quality Analyzer (SQAIC, USA) پارامترهای کیفیت اسپرم یعنی تحرک، تعداد و مورفولوژی ارزیابی گردید. نمونه سیمین مایع شده به مدت ۵ دقیقه در 4000 دور در دقیقه سانتریفوژ شد و سپس مایع رویی که پلاسمای سمینال است جدا گردید و جهت انجام آزمایش های مورد نظر در دمای 20°C منجمد شد. سرم نیز پس از سانتریفوژ 3000 دور و به مدت ۵ دقیقه، از نمونه خون جدا و در همین دما نگهداری گردید. IGF-I و PSA با استفاده از کیت های تجاری ایمنورادیومتری کاسی (IRMA)^۳

1- Total
2- Masturbation
3- Immuno Radio Metric Assay

نرمواسپرم) مردان نابارور ایدیوپاتیک آستنواسپرم^۲ و گروه نمونه (الیگواسپرم) مردان نابارور ایدیوپاتیک الیگواسپرم^۳ بودند. سپس میزان سطح کامل IGF-I و PSA در سرم و پلاسمای سمینال این دو گروه ارزیابی گردید که میانگین و انحراف معیار از آن در جدول شماره ۲ آورده شده است. میانگین سنی هر دو گروه نیز 32 ± 2 سال بود. با توجه به جدول شماره ۱ تعداد کامل و قدرت تحرک اسپرم‌ها در گروه الیگواسپرم به طور معنی داری کمتر از گروه نرمواسپرم بود ($p < 0.05$). قدرت تحرک اسپرم در هر دو گروه کمتر از حد طبیعی (طبق معیار WHO) بود؛ ولی در گروه الیگواسپرم این مقدار بسیار کمتر از حد طبیعی (طبق معیار WHO) مشاهده گردید. مورفولوژی اسپرم‌ها در هر دو گروه در حد طبیعی بود و بین این دو گروه تفاوت معنی داری مشاهده نگردید.

از نظر مقایسه میزان سطح کامل IGF-I و PSA در سرم و پلاسمای سمینال بین دو گروه مورد مطالعه نتایج مشاهده شده به این ترتیب گزارش گردید: میانگین سطح کامل IGF-I پلاسمای سمینال در مردان الیگواسپرم ($142/39 \pm 24/06 \text{ ng/ml}$) به طور معنی داری کمتر از گروه نرمواسپرم ($247/86 \pm 32/62 \text{ ng/ml}$) بود

رادیواکتیویته به مدت یک دقیقه در گاماکانتر برحسب CPM تعیین گردید که با رسم منحنی استاندارد میزان غلظت PSA در نمونه‌های بیماران مشخص شد. به منظور آنالیز داده‌ها از آزمون t-test جهت مقایسه میانگین پارامترهای کیفیت اسپرم (مورفولوژی و تعداد اسپرم) و سطح سرمی و پلاسمای سمینال IGF-I و PSA بین افراد مورد و شاهد استفاده گردید. مقایسه تحرک اسپرم بین دو گروه با استفاده از آزمون آماری غیرپارامتری Mann-Whitney انجام شد. کلیه آزمون‌های آماری به صورت دو دنباله‌ای با $\alpha = 0.05$ در نظر گرفته شد. میزان سطح IGF-I و PSA و نیز پارامترهای کیفیت اسپرم به صورت میانگین، گزارش شده است. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار ۱۰ SPSS انجام گرفت.

نتایج

میانگین و انحراف معیار از میانگین^۱ (SEM) پارامترهای کمی و کیفی اسپرم شامل تعداد اسپرم، تحرک و مورفولوژی آن که در مردان نابارور ایدیوپاتیک اندازه‌گیری شده است در جدول شماره ۱ گزارش شده است.

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار از میانگین پارامترهای کیفیت اسپرم در مردان نابارور الیگواسپرم و

نرمواسپرم مراجعه‌کننده به بخش IVF بیمارستان الزهراء دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز

P.Value	الیگواسپرم (M±SEM)	نرمواسپرم (M±SEM)	گروه - میانگین
			پارامترهای کیفیت اسپرم تعداد کل (میلیون)
<0.0001	27/50 ± 4/08	53/43 ± 4/22	تحرک (%)
<0.05	30/34 ± 6/94	43/69 ± 9/39	مورفولوژی (%)
>0.05	59/31 ± 2/41	58/04 ± 2/66	

($p < 0.05$). میانگین سطح سرمی IGF-I در مردان نابارور الیگواسپرم ($142/39 \pm 24/06 \text{ ng/ml}$) تفاوت معنی داری را با مردان نابارور نرمواسپرم

این مردان فقط بر اساس تعداد کامل اسپرم، طبق معیار سازمان جهانی بهداشت، به دو گروه الیگواسپرم و نرمواسپرم تقسیم‌بندی شدند. در واقع گروه شاهد

2- Asthenospermic
3- Oligoasthenospermic

1- Standard Error of Mean

از نظر مقایسه نشان‌نداد. از نظر مقایسه میانگین سطح کامل IGF-I پلاسمای سمینال و سرم در هر کدام از گروه‌های مورد مطالعه مشاهده شد که در گروه نرمواسپرم IGF-I پلاسمای سمینال در حدود ۱/۵ برابر آن در سرم بود. اما در گروه الیگواسپرم این حالت برعکس مشاهده شد، به طوری که میانگین سطح کامل IGF-I سرم در این گروه در حدود ۱/۷ برابر پلاسمای سمینال بود. میانگین سطح کامل PSA پلاسمای سمینال بین دو گروه نرمواسپرم ($1282/34 \pm 247/07 \mu\text{g/ml}$) و الیگواسپرم ($1630/69 \pm 259/36 \mu\text{g/ml}$) تفاوت معنی‌داری را بین دو گروه نشان‌نداد ($p > 0/05$). اختلاف میانگین سطح کامل PSA سرم بین دو گروه الیگواسپرم ($1/94 \pm 0/15 \text{ ng/ml}$) و نرمواسپرم ($2/43 \pm 0/33 \text{ ng/ml}$) نیز از نظر آماری معنی‌دار نبود.

در مقایسه میانگین سطوح کامل PSA پلاسمای سمینال و سرم در هر کدام از گروه‌های مورد مطالعه مشاهده شد که در هر دو گروه میزان آن در پلاسمای سمینال بسیار بیشتر از سرم بود.

سطح کامل IGF-I پلاسمای سمینال در گروه الیگواسپرمی به میزان معنی‌داری پایین‌تر از گروه نرمواسپرم بود. IGF-I به عنوان یک فاکتور مهم در عملکرد دستگاه تناسلی مطرح است. این فاکتور یک پلی‌پپتید میتوتیک است که علاوه بر نقش متابولیکی، اثر تحریکی بر تکثیر و تمایز سلولی دارد. ترشح IGF-I به وسیله سلول‌های لیدیک، سرتولی و پری‌توبولار نشان داده شده است. الگوهای سلولی بیان ژن این پلی‌پپتید، اشاره بر این موضوع دارد که ممکن است IGF-I نقش مهمی را در عملکرد بیضه‌ها و تکامل سلول‌های زایا داشته باشد (۱-۳). Glander و همکاران نشان دادند که در مردان نابارور و ازکتومی شده میزان سطح IGF-I پلاسمای سمینال به طور معنی‌داری پایین‌تر از مردان بارور است و نتیجه گرفتند که این پلی‌پپتید ممکن است به عنوان مشخصه^۱ در تمایز سلول‌های زایای مردان عمل نماید (۱). همچنین آنها نتیجه گرفتند که این یافته می‌تواند تأییدکننده این فرض باشد که منشا IGF-I پلاسمای سمینال، اپیدیدیم و یا بیضه‌ها هستند. در مطالعه حاضر نیز میزان سطح IGF-I

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار از میانگین سطح IGF-I و PSA در مردان نابارور الیگواسپرم و نرمواسپرم

مراجعه‌کننده به بخش IVF بیمارستان الزهراء دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز

متغیر	گروه - میانگین	نرمواسپرم (M±SEM)	الیگواسپرم (M±SEM)	P.Value
IGF-I سرم (ng/mL)	۱۹۳/۸۹±۱۵/۵۰	۲۳۵/۰۶±۱۷/۰۷	>۰/۰۵	
IGF-I سمینال (ng/mL)	۲۴۷/۸۶±۳۳/۶۲	۱۴۲/۳۹±۲۴/۰۶	<۰/۰۱	
PSA سرم (ng/mL)	۱/۹۴±۰/۱۵	۲/۴۳±۰/۳۳	>۰/۰۵	
PSA سمینال (μg/mL)	۱۲۸۲/۳۴±۲۴۷/۰۷	۱۶۳۰/۶۹±۲۵۹/۳۶	>۰/۰۵	

پلاسمای سمینال در گروه الیگواسپرم به طور معنی‌داری پایین‌تر از مردان نرمواسپرم بود با این تفاوت که در مطالعه ما هر دو گروه نابارور ایدیوپاتیک بودند. در برخی مطالعات نشان داده

بحث

این مطالعه جهت بررسی سطح کامل IGF-I و PSA در سرم و پلاسمای سمینال افراد نابارور ایدیوپاتیک انجام پذیرفت. در این تحقیق مشاهده شد که میانگین

انجام دادند نشان داده شد. در مطالعه ذکر شده همبستگی مثبت معنی داری بین میزان سطوح PSA پلاسمای سمینال و قدرت تحرک اسپرم‌ها مشاهده گردید (۷). در مطالعه حاضر نیز PSA پلاسمای سمینال تفاوت معنی داری را بین دو گروه مورد بررسی نشان نداد. با توجه به اینکه در این مطالعه به جای استفاده از افراد طبیعی به عنوان گروه شاهد، از افراد ناباروری استفاده گردید که قدرت تحرک اسپرم در آنها نظیر گروه مورد پایین تر از حد طبیعی بود، بنابراین این نتیجه به طور غیرمستقیم می تواند دلیلی بر نقش احتمالی PSA در تحرک اسپرم‌ها باشد. در واقع علت اینکه از مردان نابارور ایدیوپاتیک آستنوزواسپرمیک به عنوان گروه شاهد و از مردان نابارور ایدیوپاتیک الیگواستنوزواسپرمیک به عنوان گروه شاهد استفاده شد نیز به همین منظور بود. با توجه به نتایج حاصل از سایر تحقیقات و این مطالعه، به علت اینکه موارد مجهول زیادی در رابطه با نقش و عملکرد فاکتورهای رشد شبه انسولین در اسپرمیوژنز و اسپرماتوژنز وجود دارد پیشنهاد می گردد که هر دو فاکتور IGF-I و IGF-II به همراه انواع IGFBP هم از نظر تغییرات غلظت آنها و هم از جنبه بیان ژن‌های مربوطه در بیضه مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری همکاران محترم بخش IVF بیمارستان الزهراء دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز تشکر و قدردانی می گردد.

شده است که هورمون رشد در پلاسمای سمینال نیز وجود دارد. با توجه به اینکه IGF-I به عنوان میانجی اصلی در عملکرد هورمون رشد مطرح است، بنابراین احتمال می رود که عمده IGF-I موجود در پلاسمای سمینال ناشی از اثر هورمون رشد باشد. در افراد نابارور وازکتومی شده، نشان داده شده است که میزان هورمون رشد موجود در پلاسمای سمینال به طور معنی داری کمتر از افراد طبیعی است، بنابراین احتمال می رود که حداقل بخشی از آن از بیضه‌ها و یا اپیدیدیم ترشح شود (۱). در مطالعه حاضر سطح کامل IGF-I پلاسمای سمینال و سرم به طور توأم بررسی شد که تفاوت معنی داری در سطح سرمی IGF-I بین دو گروه مورد بررسی، علی‌رغم تفاوت معنی دار در پلاسمای سمینال، مشاهده نشد. این یافته می تواند تأییدی بر این امر باشد که بخشی از این فاکتور رشد از بیضه‌ها و یا اپیدیدیم ترشح می گردد. با توجه به اینکه پروتئین اصلی متصل شونده به IGF-I در مایعات خارج سلولی IGFBP-3 است، بنابراین انتظار می رود که بین سطح این دو پلی‌پپتید همبستگی معنی داری وجود داشته باشد (۸، ۱۰). این همبستگی در سرم نشان داده شده است، اما در پلاسمای سمینال این امر مشاهده نشده است (۱). این امر ناشی از عمل پروتئینازی PSA در پلاسمای سمینال است که بر روی پروتئین IGFBP-3، مهم‌ترین ناقل IGF-I، اثر کرده و مقدار قابل توجهی از آن را تجزیه می کند (۷، ۱). از طرف دیگر PSA با تاثیر بر روی سمینوژلین‌ها باعث افزایش قدرت تحرک اسپرم‌ها می گردد (۶). این امر در بررسی که Elzanaty و همکاران در مردان بارور

References

- 1- Glander H.J., Kartzseh J., Weiserich C.H., Birkenmeier G. Insulin-like growth factor-I and α_2 -macroglobulin in seminal plasma correlate with semen quality. Hum Reprod. 1996; 11: 2454-60.
- 2- Colombo J.B., Naz R.K. Modulation of insulin-like growth factor- I in the seminal plasma of infertile men. J Androl. 1999; 20: 118-25.
- 3- Macpherson M.L., Simmen R.C., Simmen F.A., Hernandez J., Sheerin B.R., Varner D.D., et

- al. Insulin-like growth factor-I and Insulin-like growth factor binding protein-2 and -5 in equine seminal plasma: association with sperm characteristics and fertility. *Biol Reprod.*2002; 67:648-54.
- 4- Henricks D.M., Kouba A.J., Lackey B.R., Boone W.R., Gray S.L. Identification of Insulin-like growth factor-I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. *Biol Reprod.*1998;59:330-7.
- 5- Minelli A., Liguori L., Collodel G., Lattaioli P., Castellini C. Effects of the purified IGF-I complex on the capacitation and acrosome reaction of rabbit spermatozoa. *J Exp Zool.*2001; 290:311-7.
- 6-Yoshida K., Yamasaki T., Yoshiike M., Takano S., Sato I., Iwamoto T. Quantification of seminal plasma motility inhibitor/semenogelin in human seminal plasma. *J Androl.*2003;24:878-84.
- 7- Elzanaty S., Richthoff J., Malm J., Giwercman A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum Reprod.* 2002;17:2904-11.
- 8- Lee K.O., Oh Y., Giudice L.C., Cohen P., Peehl D.M., Rosenfeld R.G. Identification of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) fragments and IGFBP-5 proteolytic activity in human seminal plasma: a comparison of normal and vasectomized patients. *J Clin Endocrinol Metab.*1994;79:1367-72.
- 9- World Health Organization: WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interactin. Cambridge University Press, Cambridge, UK,1999.
- 10- Hoeflich A., Reichenbach H.D., Schwartz J., Grupp T., Weber M.M., Foll J., Wolf E. Insulin-like growth factors and IGF-binding proteins in bovine seminal plasma. *Domest Anim Endocrinol.* 1999;17:39-51.