

لکوسیتواسپرمی و اثرات آن بر پارامترهای اسپرم در مردان مراجعه‌کننده برای درمان ناباروری

حسن حسینی بافرانی (Ph.D.)^۱، محمداسماعیل شهاب‌الدین (M.Sc.)^۲

۱- گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی کاشان، کاشان، ایران

۲- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی کاشان، کاشان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: لکوسیت‌های پراکسیداز مثبت، منبع اصلی تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) در مایع سمینال می‌باشند. استرس اکسیداتیو در نتیجه افزایش ROS از دو منبع لکوسیت‌های مایع سمینال و اسپرم‌های معیوب، تولید می‌شود که منجر به پراکسیداسیون لیپیدها، اختلال در تحرک و کاهش توانایی باروری اسپرم می‌شود. هدف از این مطالعه، مقایسه پارامترهای اسپرم (تعداد، تحرک و مورفولوژی اسپرم) در مردان نابارور مبتلا به لکوسیتواسپرمی و بدون لکوسیتواسپرمی و اندازه‌گیری میزان ملان دی‌آلدئید (MDA) و قدرت تام آنتی‌اکسیدانی ایجاد شده در مایع سمینال می‌باشد.

روش بررسی: تعداد ۱۱۰ مرد مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری کاشان، طی سال‌های ۸۷-۱۳۸۶ بر اساس نتایج آنالیز مایع سمینال در گروه‌های لکوسیتواسپرمی و بدون لکوسیتواسپرمی تقسیم شدند. ۴۵ مرد با پارامترهای نرمال (براساس معیارهای WHO) به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. پس از ارزیابی اسپرم، مایع سمینال برای اندازه‌گیری MDA و TAC در دمای 8°C - ذخیره شد. میزان ملان دی‌آلدئید و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدان در مایع سمینال، به روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. با استفاده از آزمون‌های کروسکال والیس، χ^2 و فیشر نتایج دو گروه مقایسه شد. $p < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج: براساس نتایج اسپرموگرام ۳۰ نفر در گروه لکوسیتواسپرمی و ۳۵ نفر علیرغم وجود لکوسیت در مایع سمینال (کمتر از $10^6 \times 20$ در میلی‌لیتر)، در گروه غیر لکوسیتواسپرمی قرار گرفتند. تحرک اسپرم (a+b) در گروه لکوسیتواسپرمی در مقایسه با گروه غیر لکوسیتواسپرمی و گروه افراد سالم، اختلاف معنی‌داری را نشان داد (به ترتیب $p < 0/05$ و $p < 0/001$). میزان MDA در گروه لکوسیتواسپرمی ($178 \pm 18/48 \mu\text{mol/L}$) به مقدار زیادی بیشتر از گروه غیر لکوسیتواسپرمی ($2/7 \pm 1/72 \mu\text{mol/L}$) و افراد سالم ($0/4 \pm 0/14 \mu\text{mol/L}$) بود (به ترتیب $p < 0/001$ و $p < 0/001$). همچنین میزان TAC در گروه لکوسیتواسپرمی ($636 \pm 70/58$) در مقایسه با گروه غیر لکوسیتواسپرمی ($986 \pm 105/56 \mu\text{mol/L}$) و کنترل ($989 \pm 95/95 \mu\text{mol/L}$) به طور معنی‌داری ($p < 0/001$) پایین‌تر بود.

نتیجه‌گیری: وجود مقادیر بالای لکوسیت منجر به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) در مایع سمینال می‌شود. رادیکال‌های آزاد و محصولات پایدار ناشی از آن (MDA)، باعث کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (TAC) مایع سمینال می‌گردد. کاهش TAC و افزایش میزان MDA، باعث اختلال در عملکرد اسپرم به ویژه تحرک آن می‌گردد. با توجه به تأثیر مستقیم پارامترهای اسپرم بر قدرت باروری اسپرم و لقاح، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً لکوسیتواسپرمی منجر به اختلال در قدرت باروری مردان می‌گردد.

کلید واژگان: اسپرموگرام، استرس اکسیداتیو، پارامترهای اسپرم، گونه‌های فعال اکسیژن، لکوسیتواسپرمی، ناباروری مردان.

مسئول مکاتبه: دکتر حسن حسینی بافرانی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی کاشان، کاشان، ایران

پست الکترونیک: hassani@kaums.ac.ir

دریافت: ۸۷/۹/۱۷ پذیرش: ۸۷/۱۰/۲۳

Leukocytospermia and its Correlation with Sperm Parameters in Male Infertility

Hassani Bafrani, Hassan* (Ph.D.)¹; Shahaboddin, Mohamad Esmail (M.Sc.)²

1. Department of Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.

2. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.

Abstract

Introduction: Reactive oxygen species (ROS) in the seminal fluid are derived from abnormal sperm, white blood cells or both. Oxidative stress will cause lipid peroxidation, decreased sperm motility and abnormalities in sperm fertilizing capacity. The aims of this study were to compare sperm parameters (Sperm count, motility and morphology) in infertile men with or without leukocytospermia and to measure both seminal total antioxidant capacity (TAC) and malondialdehyde (MDA) concentration.

Materials and Methods: This case-control study included 110 male subjects referring to Kashan Infertility Center during 2007-2008. Regarding the World Health Organization criteria and following sperm analysis and seminal leukocyte counts, the cases were divided into two leukocytospermic and non-leukocytospermic groups and a third group composed of 45 men with normal test results were selected as the controls. Seminal plasma MDA and TAC levels were spectrophotometrically measured.

Results: Upon semen analyses of 110 subjects, 45 individuals were classified as healthy, 30 as leukocytospermic and 35 as non-leukocytospermic; although there were $<0.25 \times 10^6$ leukocytes in the semen of the latter group. Sperm motility (a+b) had a significant difference in the leukocytospermic individuals compared to non-leukocytospermic or healthy subjects ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively). MDA levels in the leukocytospermic group ($178 \pm 18.48 \mu\text{mol/L}$) were higher than those of the non-leukocytospermic ($2.7 \pm 1.73 \mu\text{mol/L}$) and the control group ($0.4 \pm 0.14 \mu\text{mol/L}$). Additionally, TAC levels in the leukocytospermic group ($636 \pm 75.58 \mu\text{mol/L}$) were significantly lower than the non-leukocytospermic ($986 \pm 105.56 \mu\text{mol/L}$) or the controls ($989 \pm 95.95 \mu\text{mol/L}$), ($p < 0.0001$).

Conclusions: High counts of leukocytes in the seminal fluid results in the increased production of ROS and their stable byproducts (MDA) in semen with subsequent depletion of its antioxidant capacity. Decreased TAC and increased MDA levels influence sperm parameters, especially its motility. Regarding the direct effects of sperm parameters on sperm fertilizing capacity, it is concluded that leukocytospermia may deleteriously influence male fertility.

Key Words: Leukocytospermia, Lipid peroxidation, Male infertility, Oxidative stress, Reactive oxygen
Semen analysis, species, Sperm parameters.

Corresponding Author: Hassan Hassani Bafrani, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.

E-mail: hhassani@kaums.ac.ir

Received: Dec 7, 2008; **Accepted:** Jan 12, 2009

زمینه و هدف

نیمی از موارد ناباروری، به علت ناهنجاریهای مربوط به مایع سمینال^۱ است (۱). ناباروری مردان ناشی از علل متعددی از جمله اختلالات هورمونی، اختلالات کروموزومی، ناهنجاریهای ساختاری بیضه و اختلال در روند اسپرماتوژنز، سموم، داروها، تشعشعات رادیواکتیو، بیماریهای کلیوی، کبدی یا خونی، اورکیت، ترومای بیضه، تورشن بیضه، عدم نزول بیضه، واریکوسل، بیماریهای انسدادی مادرزادی یا اکتسابی مسیر انتقال اسپرم و در نهایت اختلال عملکرد اسپرم می باشد و در بعضی موارد نیز علت خاصی برای ناباروری مرد یافت نمی شود (۲).

یکی از مکانیسمهای دخیل در ناباروری مردان، اختلال عملکرد اسپرم به علت واکنشهای التهابی می باشد. این واکنشها ناشی از علل عفونی و غیرعفونی می باشد و ویژگی آنها وجود تعداد زیاد لکوسیت در مایع سمینال است؛ این وضعیت لکوسیتواسپریمی^۲ نامیده می شود. با وجود شیوع بالای لکوسیتواسپریمی در مردان نابارور (۲۰-۱۰٪)، هنوز نقش آن در پاتوژنز ناباروری نامشخص است (۳).

بر اساس تعریف WHO، لکوسیتواسپریمی به وجود لکوسیت های پراکسیداز مثبت بیش از 1×10^6 در هر میلی لیتر از مایع سمینال گفته می شود (۴). برخی از مطالعات، لکوسیتواسپریمی را وجود 0.5×10^6 یا 0.25×10^6 لکوسیت در هر میلی لیتر مطرح کرده اند (۵، ۶). ۶۰-۵۰٪ لکوسیت های پراکسیداز مثبت را لکوسیت های پلی مورفونوکلئار^۳ (۷) و ۳۰-۲۰٪ بقیه را ماکروفاژها به خود اختصاص می دهند (۸).

لکوسیت های پراکسیداز مثبت، منبع عمده تولید رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS)^۴ در مایع سمینال

می باشند (۹، ۱۰). علاوه بر لکوسیت های مایع سمینال، اسپرم های معیوب بویژه اسپرم های حاوی بقایای سیتوپلاسمی نیز می توانند به عنوان تولید کننده ROS عمل نمایند (۱۱).

سلول های ژرمینال در مردان، در همه مراحل تکاملی خود پتانسیل ایجاد ROS را دارند (۱۲). عده ای از محققان، با توجه به نقش لکوسیتها در فاگوسیتوز اسپرم های غیر طبیعی، اثر لکوسیتواسپریمی را بر پارامترهای اسپرم (تعداد، تحرک و مورفولوژی)، مثبت می دانند؛ این اثر مثبت در برخی مطالعات نیز مشاهده شده است (۱۳، ۱۴). گروهی دیگر در مطالعات خود، تأثیر منفی لکوسیتواسپریمی را بر پارامترهای اسپرم نشان داده اند. در برخی از مطالعات نیز ارتباطی میان لکوسیتواسپریمی و پارامترهای اسپرم مشاهده نشده است (۱۵، ۱۶).

در مطالعه Gomez و همکاران، ارتباط منفی بین میزان ROS تولیدی توسط اسپرم و کیفیت اسپرم در مایع سمینال نشان داده شده است (۱۷). Huszar و همکاران، بیان کردند که کیفیت ضعیف اسپرم و افزایش ROS ایجاد شده، با وجود بقایای سیتوپلاسم در اسپرم مرتبط است. این محققین بیان کردند که وقتی اسپرماتوژنز دچار آسیب شود، در مکانیسم حذف سیتوپلاسم نیز اختلال بروز می کند، در نتیجه اسپرم که از اپی تلیوم ژرمینال آزاد می شود، مقداری از سیتوپلاسم اضافی را نیز با خود دارد. آنها خاطر نشان نمودند که ارتباط معنی داری بین وجود سیتوپلاسم اضافی با میزان فعالیت آنزیم کراتین فسفوکیناز وجود دارد (۱۸). Aitken بیان نموده اسپرم هایی که سیتوپلاسم اضافی دارند، ممکن است توسط آنزیم گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز، ROS بیشتری تولید نمایند (۱۹). همچنین اسپرم های نابالغ در پاسخ به اثر تحریکی استرهای فوربول^۵ مانند فوربول-۱۲-

1- Semen

2- Leukocytospermia

3- Polymorphonuclear

4- Reactive Oxygen Species

5- Phorbol esters

سمینال در آزمایشگاه آندرولوژی مرکز ناباروری، براساس معیارهای WHO انجام شد.

بر اساس نتایج آنالیز مایع سمینال، نمونه‌های مایع سمینال به گروه‌های لکوسیتواسپرمی (تعداد لکوسیت پراکسیداز مثبت بیشتر از $10^6 \times 10^6/ml$) و بدون لکوسیتواسپرمی (لکوسیت پراکسیداز مثبت با تعداد کمتر از $10^6 \times 10^6/ml$) تقسیم شدند.

گروهی از مردان که به علت ناباروری همسرشان به مرکز درمان ناباروری مراجعه نموده بودند و پارامترهای مایع سمینال آنها طبق معیارهای WHO نرمال بود، به عنوان گروه کنترل (تعداد ۴۵ نفر) انتخاب شدند.

آزمایش کشت ادرار و مایع سمینال افراد شرکت کننده در مطالعه، برای تشخیص وجود اشریشیا کلی^۴، استرپتوکوک^۵ و اوروپلازما اورالیٹیکوم^۶ انجام شد. تعداد کلونی‌های تشکیل شده بیشتر یا مساوی $10^4/ml$ ، به عنوان کشت باکتریایی مثبت در نظر گرفته شد.

آنالیز مایع سمینال: نمونه مایع سمینال به روش خودارضایی^۷ پس از ۳ تا ۵ روز پرهیز جنسی تهیه گردید. پس از مایع شدن^۸ مایع سمینال، آنالیز پارامترهای اسپرم (حجم، تعداد، تحرک و مورفولوژی اسپرم) براساس استانداردهای WHO اندازه‌گیری شد. حجم مایع سمینال با پی‌پت مدرج مشخص شد. با استفاده از لام نئوبار (Conception Technologies, san Diego, CA) تعداد اسپرم به ازای واحد حجم تعیین گردید. لام اسمیر مایع سمینال با استفاده از روش پاپانیکولا^۹ رنگ‌آمیزی شد و طبق معیارهای WHO، مورفولوژی اسپرم ارزیابی شد. معیار نرمال برای

میریستات ۱۳- استات (PMA)^۱، میزان زیادی ROS ایجاد می‌کنند (۲۱، ۲۰، ۱۷).

اسپرم نسبت به ROS حساس است؛ چرا که غشای پلاسمایی آن حاوی مقدار زیادی اسیدهای چرب غیراشباع است (۲۲) و با توجه به عدم وجود سیتوپلاسم در آن، فاقد آنزیم‌های محافظتی است یا آنزیم‌های محافظتی آن خیلی کم است (۲۳)؛ همچنین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی داخل سلولی قادر به محافظت از غشای پلاسمایی اسپرم در نواحی آکروزوم و دم اسپرم نیست (۲۴).

تولید ROS توسط دو منبع لکوسیتها، اسپرم یا هر دو، در مایع سمینال، استرس اکسیداتیو ایجاد می‌گردد که به پراکسیداسیون لیپید، اختلال در تحرک اسپرم و کاهش توانایی باروری آن منجر می‌شود (۲۵)؛ بنابراین تعیین منشاء تولید ROS اضافی در مایع سمینال انسان اهمیت فوق‌العاده‌ای دارد.

اگرچه مطالعات زیادی در ارتباط با لکوسیتواسپرمی انجام شده است، ولی اندازه‌گیری میزان ملان دی‌آلدئید (MDA)^۲ و همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (TAC)^۳ مایع سمینال در مردان نابارور بدون لکوسیتواسپرمی، در مطالعات محدودی بررسی شده است. هدف از این مطالعه، اندازه‌گیری میزان ملان دی‌آلدئید و همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مایع سمینال در مردان نابارور مبتلا به لکوسیتواسپرمی یا بدون لکوسیتواسپرمی، و ارتباط آن با پارامترهای اسپرم (تعداد، تحرک و مورفولوژی اسپرم) می‌باشد.

روش بررسی

نمونه مایع سمینال از تعداد ۱۱۰ نفر از مردان مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری کاشان طی سال‌های ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۷ دریافت شد. آنالیز استاندارد مایع

4- Escherichia coli
5- Streptococcus
6- Ureaplasma urealyticum
7- Masturbation
8- Liquefaction
9- Papanicola

1- Phorbol 12-myristate 13-acetate
2- Malonyldialdehyde
3- Total Antioxidant Capacity

اسپکتروفتومتر و در طول موج $534nm$ اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت میکرومول در هر لیتر مایع سمینال بیان شده است.

اندازه‌گیری قدرت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC): آزمایش FRAP^۱ با استفاده از متد Benzie و Strain قدرت آنتی‌اکسیدانی مایع سمینال (TAC)، اندازه‌گیری و نتایج به صورت میکرومول یون فریک در هر لیتر مایع سمینال بیان شد (۳۰). آزمایش FRAP یک روش ساده برای اندازه‌گیری توانایی احیاکنندگی یون فریک است و اخیراً به‌عنوان یک روش جدید در ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی معرفی شده است. معرف FRAP حاوی $2/0ml$ از یک محلول $10mM$ تری پیریدیل تریازین (TPTZ) (Sigma alderich corp; USA) در $40mM$ اسید کلریدریک (Merck, Germany) به اضافه $2/0ml$ از بافر استات $0/3M$ با $pH=3/6$ می‌باشد. برای این آزمایش $50\mu l$ از مایع سمینال به معرف FRAP اضافه شده و پس از تشکیل کمپلکس رنگی، مقادیر با استفاده از مقایسه تغییرات جذب نوری در $593nm$ بین نمونه تحت آزمایش و استاندارد حاوی $FeSO_4$ در مقادیر مشخص بدست می‌آید.

آنالیز آماری: با استفاده از آزمون کروسکال والیس متغیرهای پیوسته بین سه گروه آنالیز شد. برای آنالیز سایر متغیرها از آزمون‌های χ^2 و فیشر استفاده گردید و ارتباط بین متغیرها با ضریب همبستگی اسپیرمن بررسی شد. محاسبات آماری با نرم‌افزار SPSS انجام شده است و $p < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه، ۱۱۰ زوج نابارور مراجعه کننده به مرکز ناباروری کاشان طی سال‌های ۸۷-۱۳۸۶ مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سن افراد مورد مطالعه، ۳۵

پارامترهای اسپرم، عبارت از تعداد اسپرم $20 \times 10^6/ml$ ، تحرک $\geq 50\%$ و مورفولوژی نرمال $\geq 30\%$ (۲۶) بود.

تست پراکسیداز: میزان لکوسیت مایع سمینال با رنگ‌آمیزی پراکسیداز بررسی شد (۲۷). حجم $20\mu l$ مایع سمینال به ویال ۲ میلی‌لیتری (Corning Costar Crop., UK) منتقل شد و سپس $20\mu l$ بافر فسفات (PBS; $pH=7/0$) و $40\mu l$ محلول بنزیدین به آن اضافه شد. پس از مخلوط کردن محلول فوق ۵ دقیقه در درجه حرارت آزمایشگاه قرار داده شد. لکوسیت‌های پراکسیداز مثبت به رنگ قهوه‌ای، با لام نئوبار و میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $20 \times$ شمارش شدند. به طور میانگین ۵ تا ۱۰ میدان میکروسکوپی شمارش شد. نتایج حاصل از شمارش، پس از محاسبه میزان رقت مایع سمینال طبق معیار WHO مشخص شد. اگر تعداد لکوسیت پراکسیداز مثبت بیشتر از $0/25 \times 10^6/ml$ بود، در گروه لکوسیتواسپریمی قرار می‌گرفت (۲۸). منظور از لکوسیتها در این مطالعه تمام لکوسیت‌های پلی‌مورفونوکئار و ماکروفازها می‌باشد.

اندازه‌گیری MDA: میزان ملان دی‌آلدئید طبق پروتکل Rao و همکاران (۲۹) اندازه‌گیری شد. در این روش میزان ملان دی‌آلدئید توسط روش تیوباربیتوریک اسید (TBA)^۱ مورد بررسی قرار گرفت. در این روش $100\mu l$ از مایع سمینال به $900\mu l$ آب مقطر اضافه شد. سپس $0/0ml$ از معرف TBA (Sigma alderich corp; USA) به نمونه رقیق شده اضافه شده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای $100^\circ C$ قرار داده شد. برای تهیه معرف TBA: در $100ml$ آب مقطر محتوی $0/5$ گرم $NaOH$ ، $0/67g$ از $2-$ تیوباربیتوریک اسید و $100ml$ اسید استیک گلاسیال اضافه شد. پس از سرد شدن نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و در $4000g$ سانتریفیوژ شد. در نهایت مایع رویی جدا گردید و میزان جذب نوری آن با دستگاه

2- Ferric Reducing Antioxidant Power

1- Thiobarbituric Acid

جدول ۱- مقایسه پارامترهای مایع منی شامل تعداد لوکوسیت، میزان MDA و TAC و پارامترهای اسپرم در گروه‌های کنترل، لکوسیتواسپریمی و غیر لکوسیتواسپریمی مراجعه کننده به مرکز ناباروری کاشان، ۸۷-۱۳۸۶

منغیر	گروهها (M±SD)		
	کنترل (n=۴۵)	غیرلکوسیتواسپریمی (n=۳۵)	لکوسیتواسپریمی (n=۳۰)
حجم مایع منی (ml)	۴/۰±۱/۷	۴/۱±۱/۶	۲/۸±۱/۶
شمارش اسپرم (×۱۰ ^۶ /ml)	۸۰/۵±۱۰/۴۱	۷۷/۴±۱۱/۲	۷۶/۴±۱۱/۵
درصد زنده ماندن اسپرم (%)	۶۷±۱۷	۷۲±۱۵	۷۳±۱۸
مورفولوژی طبیعی (%)	۱۹±۱۳	۲۰±۱۶	۲۷±۱۶
تحرك اسپرم (a+b) (%)	۷۴/۷۸±۱۱/۸۲	۶۸/۵۷±۱۳/۸۶ ^b	۴۲±۲۱/۴۴ ^a
تعداد لوکوسیت (×۱۰ ^۶ /ml)	۰	۰/۲۳±۰/۱۵	۰/۷۵±۰/۱۱ ^c
میزان MDA (μmol/L)	۰/۴±۰/۱۴ ^c	۲/۷±۱/۷۳ ^d	۱۷۸±۱۸/۴۸ ^c
TAC (μmol/L)	۹۸۹±۹۵/۹۵	۹۸۶±۱۰۵/۵۶ ^d	۶۳۶±۷۵/۵۸ ^c

a: اختلاف معنی دار بین گروه‌های افراد سالم با لکوسیتواسپریمی $p < 0.001$; b: اختلاف معنی دار بین گروه‌های غیر لکوسیتواسپریمی با لکوسیتواسپریمی $p < 0.05$; c: اختلاف معنی دار در تعداد لوکوسیت، میزان MDA و TAC بین گروه‌های افراد سالم با لکوسیتواسپریمی $p < 0.001$; d: اختلاف معنی دار در تعداد لوکوسیت، میزان MDA و TAC بین گروه‌های غیرلکوسیتواسپریمی با لکوسیتواسپریمی $p < 0.001$.

سال (از ۲۸ تا ۴۱ سال) بود. از بین ۱۱۰ مرد مراجعه کننده، ۳۰ نفر لکوسیتواسپریمی داشتند و تعداد ۳۵ نفر، اگر چه در مایع سمینال آنها لکوسیت وجود داشت، تعداد لکوسیت‌های آنان کمتر از $10^6/ml$ بود.

سال (از ۲۸ تا ۴۱ سال) بود. از بین ۱۱۰ مرد مراجعه کننده، ۳۰ نفر لکوسیتواسپریمی داشتند و تعداد ۳۵ نفر، اگر چه در مایع سمینال آنها لکوسیت وجود داشت، تعداد لکوسیت‌های آنان کمتر از $10^6/ml$ بود.

اگر چه بین میانگین تعداد اسپرم در افراد لکوسیتواسپریمی ($76/4 \pm 11/5 \times 10^6/ml$) و در افراد سالم ($80/5 \pm 10/4 \times 10^6/ml$) تفاوت وجود داشت، ولی این اختلاف معنی دار نبود. در این مطالعه، اختلاف معنی داری بین مورفولوژی و زنده ماندن اسپرم بین افراد مبتلا به لکوسیتواسپریمی و غیر لکوسیتواسپریمی با گروه افراد سالم مشاهده نشد (جدول ۱).
تحرك اسپرم در گروه لکوسیتواسپریمی در مقایسه با گروه غیر لکوسیتواسپریمی و گروه افراد سالم، اختلاف معنی داری را نشان داد (به ترتیب $p > 0.05$ و $p < 0.001$).
شاخص معرف استرس اکسیداتیو نیز در هر سه گروه اندازه گیری شد. تعداد لکوسیت‌های مایع سمینال با ایجاد ارتباط مستقیم دارد. میزان MDA در گروه لکوسیتواسپریمی ($178 \pm 18/48 \mu mol/L$) به مقدار زیادی بیشتر از گروه غیر لکوسیتواسپریمی

اگر چه بین میانگین تعداد اسپرم در افراد لکوسیتواسپریمی ($76/4 \pm 11/5 \times 10^6/ml$) و در افراد سالم ($80/5 \pm 10/4 \times 10^6/ml$) تفاوت وجود داشت، ولی این اختلاف معنی دار نبود.

در این مطالعه، اختلاف معنی داری بین مورفولوژی و زنده ماندن اسپرم بین افراد مبتلا به لکوسیتواسپریمی و غیر لکوسیتواسپریمی با گروه افراد سالم مشاهده نشد (جدول ۱).

تحرك اسپرم در گروه لکوسیتواسپریمی در مقایسه با گروه غیر لکوسیتواسپریمی و گروه افراد سالم، اختلاف معنی داری را نشان داد (به ترتیب $p > 0.05$ و $p < 0.001$).
شاخص معرف استرس اکسیداتیو نیز در هر سه گروه اندازه گیری شد. تعداد لکوسیت‌های مایع سمینال با ایجاد ارتباط مستقیم دارد. میزان MDA در گروه لکوسیتواسپریمی ($178 \pm 18/48 \mu mol/L$) به مقدار زیادی بیشتر از گروه غیر لکوسیتواسپریمی

بحث

اگرچه مطالعات زیادی در ارتباط با لکوسیتواسپریمی انجام شده است، ولی اندازه گیری میزان MDA و همچنین ظرفیت آنتی اکسیدانی (TAC) مایع سمینال در

1- Total Antioxidant Capacity

تأثیر منفی دارد. تحرک اسپرم در گروه لکوسیتواسپریمی در مقایسه با افراد سالم، به طور معنی داری پایین تر است. همچنین میزان MDA موجود در مایع سمینال در گروه لکوسیتواسپریمی در مقایسه با افراد سالم به طور معنی داری بیشتر بود، ولی ظرفیت تام آنتی اکسیدانی (TAC) در گروه لکوسیتواسپریمی در مقایسه با گروه غیر لکوسیتواسپریمی و کنترل، به طور معنی داری پایین تر می باشد که با مطالعه Saleh و همکاران (۳۲) مطابقت دارد.

اساس مولکولی ناباروری با عامل ناشناخته همچنان مورد بحث است (۳۳). بسیاری از مطالعات توجه خود را بر استرس اکسیداتیو در مردان نابارور متمرکز نموده اند (۳۵). استرس اکسیداتیو به علت عدم تعادل بین ایجاد ROS و فعالیت آنتی اکسیدانی در مایع سمینال بوجود می آید (۱۲). مکانیسم آنتی اکسیدانی اسپرم را در برابر اکسیدانها محافظت می نماید و گزارش شده که میزان آنتی اکسیدانهای مایع سمینال در مردان نابارور به طور معنی داری پایین تر از افراد بارور می باشد. به هر حال اسپرم فاقد سیستم آنزیمی سیتوپلاسمی لازم برای ترمیم ضایعه ناشی از میزان بالای ROS می باشد. این یکی از عواملی است اسپرم را در برابر استرس اکسیداتیو ناتوان می کند (۳۲).

لکوسیت‌های موجود در مایع سمینال، یکی از مهمترین منابع ایجاد ROS در مایع سمینال هستند (۳۵). نتایج ما در موافقت با مطالعه Alvarez و همکاران (۳۵) نشان داد که لکوسیت‌های پراکسیداز مثبت به عنوان منبع عمده ایجاد ROS در مایع سمینال می باشد. نتایج مطالعه ما نشان داد که در مایع سمینال مردان نابارور مبتلا به لکوسیتواسپریمی در مقایسه با مایع سمینال مردان نابارور بدون لکوسیتواسپریمی و مردان نرمال در گروه کنترل، MDA بیشتری وجود دارد که اختلاف معنی داری را نشان می دهد.

مردان نابارور بدون لکوسیتواسپریمی، کمتر مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه، میزان MDA و TAC مایع سمینال در مردان نابارور مبتلا به لکوسیتواسپریمی یا بدون لکوسیتواسپریمی اندازه گیری شد. نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش میزان MDA روی تحرک اسپرم تأثیر منفی دارد. در مطالعه حاضر، در افراد مبتلا به لکوسیتواسپریمی درصد تحرک اسپرم با اختلاف معنی داری کمتر از بقیه افراد است ($p < 0.01$). در موافقت با این مطالعه، محققین دیگر بیان نمودند که در افرادی که لکوسیت‌های بیشتری در مایع سمینال آنها بوده، درصد تحرک و مورفولوژی اسپرم آنها کمتر از بقیه بیماران بوده است (۱۳، ۳۱). مطالعه حاضر در مغایرت با آن نشان داد که اگرچه درصد مورفولوژی طبیعی اسپرمها در مردان مبتلا به لکوسیتواسپریمی کمتر از افراد سالم بوده، ولی اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند.

در مطالعه Moskovtsev و همکاران، نشان داده شد که در دو گروه با و بدون لکوسیتواسپریمی، تعداد، تحرک و مورفولوژی طبیعی اسپرم تفاوت معنی داری با افراد سالم دارد ($p < 0.01$) (۲۱، ۹-۱۰).

Saleh و همکاران، بیان کردند که در افراد لکوسیتواسپریمی، درصد تحرک اسپرمها در مقایسه با افراد سالم تفاوت معنی داری را نشان می دهد؛ در حالیکه این ارتباط بین تعداد لکوسیت و مورفولوژی اسپرم معنی دار نبوده است (۳۲).

مطالعه حاضر در تأیید مطالعه سایر محققین (۳۵-۳۳)، نشان داد که غلظت لکوسیت‌های مایع سمینال با ایجاد ROS ارتباط مستقیم دارد و میزان MDA در گروه لکوسیتواسپریمی به مقدار زیادی بیشتر از گروه غیر لکوسیتواسپریمی و افراد سالم است.

در موافقت با مطالعات Gambera (۲۲) و Lackner (۲۳)، مطالعه ما نشان داد که افزایش میزان MDA با افزایش تعداد لکوسیتها ارتباط مستقیم و بر تحرک اسپرم

دچار اختلال می‌کند. با توجه به ارتباط تحرک اسپرم با لکوسیتواسپرمی و نقش اصلی تحرک اسپرم بر قدرت لقاح و باروری آن، می‌توان نتیجه گرفت احتمالاً لکوسیتواسپرمی در بروز ناباروری زوجین مؤثر است. اگر چه گزارش شده که استفاده از آنتی‌اکسیدان در درمان لکوسیتواسپرمی در بسیاری از مطالعات توصیه شده است؛ ولی تأثیر نهایی آن در بهبودی لکوسیتواسپرمی هنوز مورد بحث می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از همکاری سرکار خانم دکتر مرضیه افروغ، سرکار خانم دکتر فاطمه فروزانفرد، پرسنل مرکز درمان ناباروری کاشان و همچنین کارکنان گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی کاشان، تشکر و قدردانی می‌شود.

References

- Schmidt L, Münster K, Helm P. Infertility and the seeking of infertility treatment in a representative population. *Br J Obstet Gynaecol.* 1995; 102(12): 978-84.
- Paul j, Turek MD, editors. Male infertility. New York: McGraw-Hill companies; 2004. 678 p. (Tanagho EA, McAninch JW, editors. *Smith's General Urology*, Vol. 42).
- Aziz N, Agarwal A, Lewis-Jones I, Sharma RK, Thomas AJ Jr. Novel associations between specific sperm morphological defects and leukocytospermia. *Fertil Steril.* 2004; 82(3): 621-7.
- Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J Urol.* 1999; 161(6): 1831-4.
- Menkveld R, Kruger TF. Sperm morphology and male urogenital infections. *Andrologia.* 1998; 30 Suppl 1: 49-53.
- Menkveld R. Leukocytospermia. *International Congress Series (ICG).* 2004; 1266: 218-24.
- Steckel J, Dicker AP, Goldstein M. Relationship between varicocele size and response to varicolectomy. *J Urol.* 1993; 149(4): 769-71.
- Kursh ED. What is the incidence of varicocele in a fertile population? *Fertil Steril.* 1987; 48(3): 510-1.
- Yanushpolsky EH, Politch JA, Hill JA, Anderson DJ. Is leukocytospermia clinically relevant? *Fertil Steril.* 1996; 66(5): 822-5.
- Thomas J, Fishel SB, Hall JA, Green S, Newton TA, Thornton SJ. Increased polymorphonuclear granulocytes in seminal plasma in relation to sperm morphology. *Hum Reprod.* 1997; 12(11): 2418-21.
- Koksall IT, Usta M, Orhan I, Abbasoglu S, Kadioglu A. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian J Androl.* 2003; 5(2): 95-9.
- 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): 2801-7.
- Kiessling AA, Lamparelli N, Yin HZ, Seibel MM, Eyre RC. Semen leukocytes: friends or foes? *Fertil Steril.* 1995; 64(1): 196-8.
- Tomlinson MJ, White A, Barratt CL, Bolton AE, Cooke ID. The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leukocytes? *Hum Reprod.* 1992; 7(4): 517-22.

- 15- Van der Ven HH, Jeyendran RS, Perez-Pelaez M, Al-Hasani S, Diedrich K, Krebs D. Leucospermia and the fertilizing capacity of spermatozoa. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1987; 24(1): 49-52.
- 16- Fedder J, Askjaer SA, Hjort T. Nonspermatozoal cells in semen: relationship to other semen parameters and fertility status of the couple. *Arch Androl.* 1993; 31(2): 95-103.
- 17- Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Int J Androl.* 1998; 21(2): 81-94.
- 18- Huszar G, Vigue L. Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. *J Androl.* 1994; 15(1): 71-7.
- 19- Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon -- a cell in crisis? *J Reprod Fertil.* 1999; 115(1): 1-7.
- 20- Krausz C, Mills C, Rogers S, Tan SL, Aitken RJ. Stimulation of oxidant generation by human sperm suspensions using phorbol esters and formyl peptides: relationships with motility and fertilization in vitro. *Fertil Steril.* 1994; 62(3): 599-605.
- 21- Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JB. Leukocytospermia: relationship to sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male factor infertility. *Fertil Steril.* 2007; 88(3): 737-40.
- 22- Gambera L, Serafini F, Morgante G, Focarelli R, De Leo V, Piomboni P. Sperm quality and pregnancy rate after COX-2 inhibitor therapy of infertile males with abacterial leukocytospermia. *Hum Reprod.* 2007; 22(4): 1047-51.
- 23- Lackner JE, Herwig R, Schmidbauer J, Schatzl G, Kratzik C, Marberger M. Correlation of leukocytospermia with clinical infection and the positive effect of antiinflammatory treatment on semen quality. *Fertil Steril.* 2006; 86(3): 601-5.
- 24- Cavallini G, Ferraretti AP, Gianaroli L, Biagiotti G, Vitali G. Cinnoxicam and L-carnitine / acetyl-L-carnitine treatment for idiopathic and varicocele-associated oligoasthenospermia. *J Androl.* 2004; 25(5): 761-70.
- 25- Sheweita SA, Tilmisany AM, Al-Sawaf H. Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Curr Drug Metab.* 2005; 6(5): 495-501. Review.
- 26- Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF, Swanson RJ, Brugo SS, Acosta AA. A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Arch Androl.* 1987; 18(3): 275-7.
- 27- Shekarriz M, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Positive myeloperoxidase staining (Endtz test) as an indicator of excessive reactive oxygen species formation in semen. *J Assist Reprod Genet.* 1995; 12(2): 70-4.
- 28- World Health Organisation. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 4th Edition. New York: Cambridge University Press, 1999.
- 29- Rao B, Soufir JC, Martin M, David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Res.* 1989; 24(2): 127-34.
- 30- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996; 239(1): 70-6.
- 31- Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod.* 1997; 56(4): 1020-4.
- 32- Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Anthony J, Thomas AJ, et al. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2002; 78(6): 1215-24.
- 33- Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, et al. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2002; 78(6): 1215-24.
- 34- Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl.* 2004; 25(1): 5-18. Review.
- 35- Alvarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 1995; 42(3): 334-46.