

بررسی رابطه پارامترهای اسپرمی با پایداری کروماتین اسپرم با روش رنگ آمیزی آنیلین بلو در بیماران نابارور ضایعه نخاعی و نابارور غیر ضایعه نخاعی

* بهشته ابوحمزه^۱، دکتر راحله علیمرادزاده^۲، دکتر محمدرضا صفری نژاد^۳، دکتر منصوره موحدین^۴، دکتر نادر مرکزی مقدم^۵
دکتر سیروس جعفریان^۶

خلاصه:

سابقه و هدف: باروری در اغلب مردانی که دارای ضایعه نخاعی هستند به میزان زیادی کاهش می یابد. بدلیل کافی نبودن ارزش پیشگیری پارامترهای اسپرمی بعنوان شاخص های لقاح، تست های عملکرد اسپرم از جمله پایداری یا تراکم کروماتین هسته اسپرم نیز مورد بررسی قرار می گیرد. این مطالعه با هدف تعیین رابطه پارامترهای اسپرمی با پایداری کروماتین اسپرم با روش رنگ آمیزی آنیلین بلو در بیماران نابارور ضایعه نخاعی و نابارور غیر ضایعه نخاعی انجام شد.

مواد و روش ها: در این تحقیق ۲۰ بیمار نابارور ضایعه نخاعی و ۲۰ بیمار نابارور غیر ضایعه نخاعی را لحاظ پارامترهای اسپرمی و میزان تراکم کروماتین هسته اسپرم با روش رنگ آمیزی آنیلین بلو بررسی شدند. با استفاده از آزمونهای آماری t و من ویتنی یو، پارامترهای اسپرمی بین دو گروه مورد مقایسه و قضاوت آماری قرار گرفت.

یافته ها: مقایسه میانگین پارامترهای اسپرمی نظیر غلظت، سلامتی، حرکت کل و حرکت پیشرونده و ابنورمالیتی گردن اسپرم بین بیماران ضایعه نخاعی و غیر ضایعه نخاعی رابطه معنی داری وجود داشت ولی بین رنگ آمیزی کروماتین اسپرم و تعداد لکوسیت بین دو گروه مورد مطالعه رابطه معنی داری وجود نداشت.

نتیجه گیری و توصیه ها: ضایعه نخاعی باعث اختلال پارامترهای اسپرمی می شود ولی بر پایداری کروماتین اسپرم تاثیر بیشتری نسبت به گروه نابارور غیر ضایعه نخاعی ندارد.

کلمات کلیدی: آنیلین بلو، پارامترهای اسپرمی، تراکم کروماتین اسپرم، ضایعه نخاعی، ناباروری

مقدمه:

۱۵ سال تشکیل می دهند و اکثر این بیماران تمایل به بچه دار شدن خواهند داشت بیماران ضایعه نخاعی در جوامع مختلف به تعداد زیادی دیده می شود و در ایران نیز بعد از جنگ تحمیل تعداد آن ها افزایش یافت.

عوامل مختلفی باعث کاهش کیفیت مایع منی در افراد ضایعه نخاعی می شوند از جمله این عوامل اختلال در بافت بیضه می باشد. با استفاده از روش الکتروواکولیشن (Electro ejaculation) معمولاً در ۶۰٪ تا ۸۰٪ از این افراد مایع منی بدست می آید که در بررسی مایع

ضایعات نخاعی معمولاً مشکلات عدیده ای را برای بیماران به دنبال دارند که از جمله آن ها مشکلات جسمی، اجتماعی، اقتصادی و ناباروری را نام برد. در اکثر مردان که دارای ضایعه نخاعی هستند باروری به میزان زیادی کاهش می یابد.

Yaung و همکارانش در سال ۱۹۹۲ در بررسی آماری بیماران دارای ضایعه نخاعی، گزارش داده اند که از ۱۰ هزار بیماری که سالانه دچار ضایعه طناب نخاعی می شوند ۸۰٪ آنها را افراد جوان بین ۲۹-

۱- مربی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح (* نویسنده مسئول)

۲- دکترای حرفه ای پزشکی فارغ التحصیل دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران

۳- استادیار دانشگاه علوم پزشکی جمهوری اسلامی ایران، دانشکده پزشکی، گروه اورولوژی

۴- استادیار دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم تشریح

۵- دکترای حرفه ای پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، مدیر پژوهش دانشگاه

۶- دکترای حرفه ای پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، دانشکده پزشکی، کارشناس معاونت پژوهش

میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $\times 400$ انجام شد و درصد اسپرم های بدون حرکت Go اسپرم های با حرکت در جا (G_2) محاسبه شد. (۵) مجموع حرکت های یادشده تحت عنوان حرکت کل و مجموع G_3+G_4 بعنوان شاخص حرکت مؤثر محاسبه شده است.

پایداری کروماتین اسپرم

یکی از روش های بررسی پایداری کروماتین اسپرم رنگ آمیزی آنیلین بلو است در اسپرم هایی که در طی اسپر میوزن، هیستون هایشان توسط پروتئین جایگزین نشده است در این رنگ آمیزی هیستون ها که دارای مقدار زیادی اسید آمینه لیزین هستند به رنگ آبی در آمده و می تواند این اختلال را مشخص نماید. (۶) بررسی های انجام شده نشان دهنده وجود ارتباط مستقیم و معنی دار بین درصد پایداری کروماتین اسپرم و میزان لقاح آزمایشگاهی است. (۹) برای تهیه آنیلین بلو ۵ درصد، ۵ گرم آنیلین بلو به ۱۰۰ میلی لیتر محلول بافر استات با $PH=3/5$ افزوده شده (۷). گسترش های تهیه شده از نمونه های بیماران با آنیلین بلو رنگ آمیزی شده و درصد اسپرم های بی رنگ ($S_0=$ گرید صفر) اسپرم های نیمه رنگ شده (S_1) و اسپرم های کاملاً رنگ شده (S_2) مشخص شد و سپس ToTal به این ترتیب به دست می آید: $(S_0 \times 0) + (S_1 \times 1) + (S_2 \times 2)$ بررسی ها با استفاده از نرم افزار windows-SPSS و روش آماری Independent T student و Man-whitney U انجام شد.

یافته ها:

نتایج بدست آمده در ۲ جدول به شرح زیر ارائه شده است:

جدول شماره ۱) مقایسه میانگین پارامترهای اسپرمی

P.Value	بیماران نابارور غیر ضایعه نخاعی	بیماران نابارور ضایعه نخاعی	پارامترها
۰/۰۰۱	$3/5 \pm 0/6$	$7/59 \pm 0/58$	حجم
۰/۰۳۹	$3/5 \pm 0/6$	$7/59 \pm 0/58$	غلظت
۰/۰۲۲	$33/3 \pm 5$	$8/3 \pm 6/2$	حرکت کل
۰/۰۴۱	$9/8 \pm 3$	$7/5 \pm 2$	G3+G4
۰/۰۳۸	$66/8 \pm 7/4$	$16/9 \pm 13$	Validity
N.S*	$14/3 \pm 12/6$	$37/7 \pm 18/22$	WBC
N.S	$47/2 \pm 8$	$45/4 \pm 2/4$	ابنورمالیتی سر
N.S	$117 \pm 5/2$	$117/5 \pm 2/4$	ابنورمالیتی دم
۰/۰۴۹	$15/7 \pm 2/8$	$23/6 \pm 3$	ابنورمالیتی گردن

* ($p\text{-value} > 0/05$)

منی آن ها کاهش تعداد اسپرم (oligospermia) و کاهش تحرک اسپرم (asthenospermia) مشاهده می شود (۳-۱) برای درمان این بیماران در مراکز باروری و ناباروری از روش های گوناگون لقاح مصنوعی استفاده می شود که میزان موفقیت این درمان حدود ۲۰ درصدی باشد و مخارج زیادی را برای بیمار و خانواده او به همراه دارد. لذا پیشگویی موقعیت درمان آن ها حائز اهمیت است. امروزه پارامترهای اسپرمی نظیر غلظت حرکت، مورفولوژی و vitality به عنوان شاخص های لقاح می باشند ولی بعضی از متخصصین بر این باورند که به جز موارد محدودی پارامترهای فوق به تنهایی برای پیش بینی لقاح کافی نیست. (۴) لذا به علت کافی نبودن ارزش پیشگویی این پارامترها، لازم است در بررسی پارامترهای اسپرم تست های عملکرد اسپرم، نیز بررسی شود. از میان این تست ها می توان به بررسی پایداری یا تراکم کروماتین هسته اسپرم اشاره کرد. با توجه به این که ضایعه طناب نخاعی ممکن است علاوه بر ایجاد اختلال در پارامترهای اسپرمی، تست های عملکردی اسپرم را نیز تحت تاثیر قرار داده و ایجاد ناباروری کند، در این بررسی که بر روی بیماران نابارور ضایعه نخاعی و نابارور غیر ضایعه نخاعی انجام شده است علاوه بر پارامترهای اسپرمی تست فوق الذکر نیز مورد مطالعه قرار گرفته است.

پایداری یا تراکم کروماتین هسته به روش های مختلفی بررسی می شود و یکی از این روش ها، روش رنگ آمیزی با آنیلین بلو است و ارتباط مستقیمی بین میزان باروری مردان و رنگ پذیری اسپرم را با آنیلین بلو مشاهده شده است.

مواد و روشها:

بررسی بر روی ۲۰ بیمار نابارور ضایعه نخاعی و ۲۰ بیمار نابارور غیر ضایعه نخاعی انجام شد.

مایع منی در ظرف مخصوص جمع آوری شد و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت تا فرآیند مایع شدن در آن رخ دهد.

پارامترهای اسپرمی

پارامترهای اسپرمی نظیر غلظت اسپرم (میلیون در میلی متر)، حرکت اسپرم (درصد) مورفولوژی (درصد انواع غیر طبیعی) در مورد هر نمونه انجام گرفت. غلظت اسپرم با استفاده از یک لام Makler شمارش شد و مورفولوژی با استفاده از رنگ آمیزی پاپانیکولانو و حرکت اسپرم نیز با روش مرسوم و با مشاهده مستقیم به وسیله یک

جدول شماره ۲- مقایسه میانگین رنگ پذیری با Aniline blue

پورنگ (s2)	کم رنگ (s1)	بی رنگ (s0)	
بیماران نابارور ضایعه نخاعی	۳۷/۰۳ ± ۶/۴	۳۰/۵۲ ± ۸/۴	۳۰/۸۶ ± ۹
بیماران نابارور غیر ضایعه نخاعی	۳۵/۲۰ ± ۱۷/۲	۲۰/۴۲ ± ۱۰	۴۴/۳۳ ± ۱۶
	N.S	N.S	N.S*
			p-value
			(p-value > ۰/۰۵)*

همانطور که مشاهده می شود در جدول ۱ به جز WBC، مایع منی و ابنورمالیتی سر و دم، بقیه پارامترها کاهش معنی داری در بیماران نابارور ضایعه نخاعی نسبت به نابارور غیر ضایعه نخاعی نشان می دهد. همچنین در جدول ۲ نشان داده شده است که تفاوت معنی داری در تراکم کروماتین اسپرم به روش آنیلین بلو در بیماران ۲ گروه مورد مطالعه وجود نداشته است.

بحث:

غلظت کل اسپرم در بیماران نابارور غیر ضایعه نخاعی بیشتر از بیماران نابارور ضایعه نخاعی نشان داده شده است که نتایج بدست آمده با مطالعات انجام شده بر بیماران ضایعه نخاعی هماهنگی دارد. در مطالعه BENSMAN و همکارانش در سال ۱۹۹۶ بر روی ۱۹۰ بیمار دارای ضایعه نخاعی متوجه شدند که از این مقدار فقط در ۲۵ مورد تعداد اسپرم ها بیشتر از ۲۰ میلیون در میلی لیتر مکعب بوده یعنی حدود ۱۳٪ نتایج مشابهی نیز توسط Brindly (۱۹۸۱) و Martin (۱۹۸۳) و Sarkanati (۱۹۸۱) گزارش شده است. این مطالعه هم نشان داد که حجم مایع Semen افراد نابارور ضایعه نخاعی نسبت به افراد نابارور غیر ضایعه نخاعی کاهش بیشتری دارد که این کاهش حجم به دلایل زیر می باشد:

توقف مایع پروستات، افزایش درجه حرارت بیضه، عفونت مجاری ادراری و وضعیت مثانه، بافت غیر طبیعی بیضه، تماس اسپرم با ادرار، تغییرات محور هورمونی، هیپوتالاموس-هیپوفیز-بیضه، آنتی بادی های اسپرم و استفاده طولانی مدت از دارو می باشد. میزان اسپرم های با مورفولوژی طبیعی در مایع Semen قابل توجه ترین عامل جهت تعیین میزان باروری در محیط invitro می باشد (۸) این مطالعه نشان داد که ابنورمالیتی کل در دو گروه رابطه معنی داری دارد به طوری که در بیماران نابارور ضایعه نخاعی بیشتر از نابارور غیر ضایعه نخاعی بود اما در سمت، ابنورمالیتی سر و گردن

این رابطه بی معنی بود و از لحاظ انبورمالیتی گردن در گروه نابارور ضایعه نخاعی بیشتر از نابارور غیر ضایعه نخاعی نشان داده شد. در مطالعات Hirsch و همکارانش در سال ۱۹۹۴ مشخص شد که در آنالیز مایع منی افراد ضایعه نخاعی به طور مشخصی ضعف حرکت اسپرم (asthenospermia) وجود دارد مطالعات مشابهی نیز تاکنون انجام شده است. در این مطالعه هم مشاهده شد که حرکت پیشرونده در بیماران ضایعه نخاعی نسبت نابارور غیر ضایعه نخاعی به طور معنی داری کاهش دارد. که دلایل آن به شرح زیر می باشد. ۱- عدم فعالیت اپی دیدیم ۲- فقدان تونوسیت اپی دیدیم به دنبال قطع اعصاب مجاری تناسلی ۳- اختلال عملکرد پروستات به دنبال التهاب ناشی از قطع نخاعی ۴- تغییرات اساسی در ترکیب مایع منی بر اساس مطالعات انجام شده در سال ۱۹۸۵ kuhlemeier در معاینات سالیانه بیماران دارای ضایعه نخاعی متوجه شد که ۷۰٪-۶۰٪ این بیماران دارای عفونت ادراری می باشند (۱۰)

Berger و همکارانش در سال ۱۹۸۲ عواملی را که سبب کاهش قدرت نفوذ اسپرم به تخمک می شوند را مورد بررسی قرار دادند و عنوان کردند که مهم ترین عامل وجود لکوسیت در مایع منی است. اما تاکنون مقایسه ای بین بیماران نابارور غیر ضایعه نخاعی با نابارور در ضایعه نخاعی انجام نشده است در مطالعه حاضر تفاوت معنی داری بین دو گروه مورد مطالعه وجود نداشت.

بررسی پایداری کروماتین نیز یکی دیگر از تست های مطرح است. در بررسی هایی که توسط Hofman , Dawdone روی بیماران نابارور و بارور انجام شد، چنین گزارش شد که یک نمونه طبیعی کمتر از ۷۵ درصد رنگ پذیر است (۶) بررسی های دیگری که در این زمینه انجام شده نشان داده است که در صورتی که اسپرم های رنگ گرفته شده با آنیلین بلو بیش از ۳۰ درصد به صورت پررنگ بوده است، میزان لقاح به مقدار قابل توجهی کاهش می یابد. و ضمناً گزارش شده است که بین مورفولوژی و رنگ آمیزی سر اسپرم (پایداری کروماتین اسپرم) ارتباط معنی داری وجود دارد. (۶) بر اساس این مطالعه هم از آنجایی که بین ابنورمالیتی سر بین دو گروه تفاوت معنی داری وجود نداشت قابل انتظار بود که از لحاظ پایداری کروماتین اسپرم هم تفاوت معنی داری بین دو گروه وجود نداشته باشد و طرح کننده این است که احتمالاً ضایعه نخاعی تاثیر بیشتری بر پایداری اسپرم نسبت به گروه نابارور غیر ضایعه نخاعی ندارد.

References:

1. Young J S, Bukns PE, Bowen AM, Mccutcheon R. Spinal cord in injury statistics experience of the vibratory spinal cord injury systems. Good samartin medical center, Phoenix, Arizona. 1992.
2. Sarkarati, Mxrossier, Axfam BA. Experience in vibratory and electro ejaculation techniques in spinal cord injury patients. A Preliminary report J. urol.1987; 138: 59 -65.
3. Ohi DA, Bennett CJ, Mccobe M, Menge AC, Predictors of success in electro ejaculation of spinal cord injured men. J urol. 1987; 42:1483-6.
4. Hammadeh ME, Srieber M, Haidl G and Schmidt W. Association between sperm cell chromatin morphology based on strict criteria and fertilization cleavage and pregnancy rats in an IVF Program. J Androl.1988; 29-30
- ۵- افلاطونیان عباس ، سلیمانی مهرداد، کریمی الهه، تست های عملکرد اسپرم انسان و باروری خارج رحمی ، چاپ اول ، تهران: انتشارات فردابه، صفحات ۱۹-۹.
6. Dadoune JP, Mayaur MJ, Moscotomal: Correlation between defects of chromatin conden sation of human spermad to zo by aniline blue semen charactrstics. J Androl.1988; 20: 211
- ۷- رعیت شهربانو. رنگ آمیزی اسپرماتوزوئید با آنلین بلو و مقایسه بین میزان رنگ پذیری اسپرم های با میزان لقاح خارج رحمی. پایان نامه کارشناسی ارشد بافت شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
8. Linsenmeyer T A, Pogaeh LM, Otienweller. Spermatogenesis and the pituitary- testicular hormone axis matogesis and the pituitary testicular hormone axis in rats the acute phase of spinal cord injury the Journal of urology. 1994; 152. 1302-7.
9. Kikuchi TA, Skowsky WR, Eitraei I. The pituitary gonadel axis in spinal cord injury fertility sterility.1978; 27, 1142-5.
10. Kuhlemeir, KV, Stover, SL, Llyod, KL. Prophylactic antibacterial therapy for urinary tract infections in spinal cord injury pationts. J. wrol. 1985;134, 514-7.

Correlation Between semen characteristics and chromatin condensation in patients with spinal cord injury and without spinal cord injury

* Abuhamze, B; MS¹, Alimorad Zadeh' R; MD², Safari Nezhad, MR; MD³, Movahedine, M; MD⁴
Markazi Moghaddam, N; MD⁵, Jafarian,S;MD⁶

Abstract :

Background: Human sperm heads which present disturbances of choranatin condensation are stained by acidic aniline blue. To determine whether the proportion of unstained heads, i.e with well condensed chromatin, can be considered as an index of sperm quality.

Materials and Methods: stady was undertaken in 20 infertile patients with spinal cord injure and 20 intetile patients with non- spinal cord injure. In addition to the usual sperm characteristics, the percentages of unstained heads and of morphologically normal and abnormal forms were concomitantly evaluated.

Results: The results obtained in this research show a significant relationship between the mean of sperm volume, concentration, validity and motility.

Conclusion: In scipatients and the results taken by previous researchers. In addition the mean of sperm morphology and sperm condensation between the two groups was not significant so we can say that s.ci has no signiticant effected on condensation of chromatin of sperm.

Keywords: Aniline blue, Chromatin condensation, Infertility, Semen characteristics, Spinal cord injury

1-(*Correspondence author) Department of Anatomy, Army university of medical sciences.

2- General Practitioner.

3- Assistant professor, Department of urology, Army university of medical sciences.

4- Assistant professor, Department of Anatomy, Tarbiat Modarres university.

5- General Practitioner, Army university of medical sciences, Research Manager.

6- Army university of medical sciences, medical school, Research Department.