بررسی تولید آنیون سوپراکساید و پتانسیل غشای میتوکندری در اسپرم موش‌های صحرایی مبتلا به واریکوسل: روش فلوسایتومتری

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۰۹/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۱۱/۰۲

عادله جعفری[۱]
مریم زحمتکش[۱]
حمیدرضا صادقی‌پور[۱*]
عبدالمحمد کجباف‌زاده[۲]
عبدالفتاح صراف‌نژاد[۳]

۱- گروه فیزیولوژی،دانشکده پزشکی
۲- مرکز تحقیقات اورولوژی اطفال، مرکز طبی کودکان
۳-گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

*نویسنده مسئول، تهران، خیابان قدس، ثانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی
تلفن: ۶۶۴۱۹۴۸۴
email: sadeghipour@tums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: اگرچه واریکوسل یکی از علل عمده ناباروری مردان است اما مکانیسم دقیقی که از طریق آن سبب اختلال عملکرد بیضه و ناباروری می‌شود به درستی شناخته نشده است. مطالعات اخیر به نقش استرس اکسیداتیو به‌عنوان عامل واسطه‌ای مهم در اختلال عملکرد اسپرم در افراد واریکوسلی پرداخته‌اند. اگرچه گزارشات متعددی به افزایش آنیون سوپراکساید در مایع منی و بافت بیضه افراد واریکوسلی و نیز در مطالعات حیوانی اشاره کرده‌اند، اما هنوز منبع تولید گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط واریکوسل مشخص نیست. هدف از انجام این مطالعه بررسی تولید آنیون سوپراکساید داخل سلولی به‌عنوان یکی از گونه‌های فعال اکسیژن عمده تولید شده در اسپرم می‌باشد. ***روش بررسی:*** در این مطالعه ۲۸ سر موش صحرایی نر در چهار گروه کنترل، sham، واریکوسل یک و واریکوسل دو مورد بررسی قرار گرفت. از طریق انسداد نسبی ورید کلیه چپ، واریکوسل القا شد. پس از طی دو و شش ماه نمونه‌گیری انجام شد. تولید آنیون سوپراکساید، پتانسیل غشای میتوکندری، فعالیت آنتی‌اکسیدانی مایع منی و خصوصیات اسپرم بررسی شد. برای بررسی آنیون سوپراکساید داخل سلولی و پتانسیل غشای میتوکندری به ترتیب از فلوروکروم‌های دی‌هیدرواتیدیوم و رودامین ۱۲۳ استفاده شد و آنالیز با فلوسایتومتری انجام شد. ***یافته‌ها:*** این تحقیق نشان داد که به‌دنبال القای واریکوسل تولید آنیون سوپراکساید داخل سلولی افزایش (۱/۸۹±۱۲/۰۴) ($p\leq ۰/۰۵$) و پتانسیل غشای میتوکندری (۰/۴۵±۲/۸۰)، درصد سلول‌های زنده، تعداد اسپرم (۱/۰۵±۱۲/۲۸)، تحرک اسپرم (۴/۲۷±۳۱/۲۸) کاهش می‌یابد ($p\leq ۰/۰۵$). ***نتیجه‌گیری:*** منبع تولید ROS، داخل سلول می‌باشد که باید در انتخاب آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان راهکار درمانی مدنظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: آنیون‌سوپراکساید، واریکوسل، پتانسیل غشای میتوکندری، فلوسایتومتری

مقدمه

واریکوسل (Varicocele) اتساع پاتولوژیک شبکه وریدی پامپینیفرم طناب اسپرماتیک است که شیوع آن در کل جامعه تقریباً ۱۵٪ می‌باشد، این در حالی است که ۴۱٪ مردان مراجعه‌کننده به مراکز ناباروری مبتلا به واریکوسل می‌باشند.[۱] مکانیسم دقیقی که واریکوسل از طریق آن سبب ناباروری می‌شود به خوبی شناخته نشده است، اما به تئوری‌های متعددی از قبیل نقص در محور هیپوتالاموسی-گنادی، هیپوکسی بیضه‌ها ناشی از استاز وریدی، افزایش درجه حرارت بیضه‌ها و ریفلاکس متابولیت‌های سمی از کلیه یا آدرنال اشاره شده است.[۲] مطالعات اخیر مطرح نموده‌اند که بسیاری از این مکانیسم‌ها با واسطه استرس اکسیداتیو سبب اختلال عملکرد بیضه می‌شوند.[۳] گونه فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species (ROS عمده تولید شده توسط اسپرم، آنیون سوپراکساید می‌باشد.[۴] گزارشات متعددی از افزایش آنیون سوپراکساید در سیمن و بافت بیضه افراد واریکوسلی و نیز در مطالعات حیوانی مطرح شده است[۵و۶] که پیشنهاد می‌کند اختلال عملکرد اسپرم شاید بخشی به‌دلیل افزایش گونه‌های فعال اکسیژن باشد. تولید ROS به‌وسیله اسپرم یک فرایند فیزیولوژیک است که نقش واسطه‌ای مهمی در مکانیسم‌های انتقال سیگنال، ظرفیت‌پذیری اسپرم، تسهیل واکنش آکروزومی و فیوژن اووسیت-اسپرم ایفا می‌کند.[۷] اما از آنجایی‌که اسپرم در غشای پلاسمایی خود مقادیر زیادی اسیدچرب غیراشباع دارد و نیز سیتوپلاسم آن آنزیم‌های رفتگر (scavanger) کمی دارد به آسیب‌های ناشی از استرس

اکسیداتیو که در شرایط غیرفیزیولوژیک به‌وجود می‌آید، حساس می‌باشد.[۸] پراکسیداسیون لیپید اسیدهای چرب غیر اشباع در سر و قطعه میانی اسپرم، سبب تغییر مورفولوژی اسپرم و کاهش موتیلیتی و ناکارآمدی واکنش فیوژن اسپرم- اووسیت می‌شود.[۹] استرس اکسیداتیو به یک‌پارچگی DNA در هسته اسپرم نیز آسیب می‌رساند. بخشی از افزایش حساسیت به استرس اکسیداتیو در مبتلایان به واریکوسل ممکن است به‌دلیل اختلال در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی Total Antioxidant Capacity; (TAC) پلاسمای سمن باشد.[۱۰و۱۱] مکانیسم دقیقی که واریکوسل سبب آسیب اسپرماتوژنز می‌گردد، تاکنون مشخص نشده است. محققان استرس اکسیداتیو را به عنوان عامل اختلال عملکرد اسپرم در این شرایط مطرح کرده‌اند. این در حالی است که اطلاعات اندکی در مورد سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی اسپرم در شرایط واریکوسل وجود دارد و در تحقیقات مختلف نتایج متناقضی ارائه شده است. انجام تحقیقات با استفاده از نمونه‌های انسانی بسیار مشکل است، زیرا دسترسی به نمونه‌های بافتی از نظر اخلاقی امکان‌پذیر نیست و شرایط ایجاد واریکوسل، سن بیمار، باروری و ناباروری و تفاوت‌های ژنتیکی محدودیت‌هایی هستند که امروزه محققان را به سوی مطالعه مکانیسم ایجاد اختلالات در واریکوسل در حیوانات آزمایشگاهی سوق داده‌اند. با توجه به توضیحات فوق، ما در این مطالعه بر آن شدیم تا ابتدا در موش صحرایی به‌طور تجربی، واریکوسل را القا نموده و سپس بر روی نمونه اسپرم آنها شاخص‌های مختلف را ارزیابی کنیم. علی‌رغم مطالعاتی که در این زمینه انجام پذیرفته و افزایش استرس اکسیداتیو در بیماران واریکوسل را مطرح نموده‌اند، اما بیشتر این مطالعات محدود به بررسی شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بیضه بوده و تاکنون اندازه‌گیری تولید ROS به‌طور مستقیم در اسپرم موش‌های صحرایی مبتلا به واریکوسل گزارش نشده است و همچنان منبع تولید گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط واریکوسل مورد سوال می‌باشد.

روش بررسی

این تحقیق، نوعی مطالعه تجربی (Experimental) می‌باشد که در سال ۸۷ در گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام پذیرفت. کلیه آزمایشات و تمامی روش‌های مطالعه بر روی حیوانات به تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی رسید. در این مطالعه تعداد ۲۸ سر موش صحرایی نر از نژاد Sprague-Dawley در محدوده وزنی ۱۸۰-۱۶۰ گرم مورد استفاده قرار گرفت. تمام حیوانات در شرایط استاندارد دمایی ($^{\circ}C$ ۲۲-۲۰)، سیکل روشنایی/ تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند و دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند. حیوانات در چهار گروه مورد بررسی قرار گرفتند: گروه واریکوسل یک: شامل موش‌های صحرایی بود که در آنها با انسداد نسبی ورید کلیوی چپ، واریکوسل القا گردید و پس از طی دو ماه از جراحی، نمونه‌گیری انجام شد. گروه واریکوسل دو: شامل موش‌های صحرایی بود که شش ماه پس از القای واریکوسل، نمونه‌گیری انجام شد. گروه sham: موش‌هایی بودند که تحت عمل جراحی لاپاراتومی قرار گرفتند. گروه کنترل: موش‌هایی را شامل می‌شدند که هیچگونه جراحی بر روی آنها صورت نگرفت. لازم به ذکر است که در هر دو گروه کنترل و sham زمان‌های دو و شش ماه در نظر گرفته شد. روش جراحی (القای واریکوسل): برای القای واریکوسل، پس از بیهوشی با پنتوباربیتال سدیم (۵۰mg/kg به صورت ip) موش‌ها در وضعیت سوپاین قرار داده شده و یک برش میدلاین عمودی در شکم در حدود ۴-۳ سانتی‌متر ایجاد شد. پس از یافتن ورید کلیوی چپ و محل ورود ورید اسپرماتیک داخلی به آن، به آرامی اطراف ورید کلیوی چپ با Tearing آزاد گردید، سپس کاتتر آنژیوکت نمره ۲۰ به موازات ورید قرار داده شده و به‌وسیله نخ بخیه سیلک ۴- صفر آنژیوکت روی ورید گره زده شد به طوری‌که محل گره بعد از محل ورود ورید اسپرماتیک داخلی به ورید کلیوی باشد (در نزدیکی ورید اجوف تحتانی). بعد از زدن گره، آنژیوکت به آرامی خارج شده و به ورید اجازه داده شد که re-expand شود. این امر قطر ورید کلیه چپ را حدود ۵۰٪ کاهش خواهد داد. سپس محل برش شکمی در دو لایه (عضله و پوست) بخیه زده شد.[۱۲] نمونه‌گیری: پس از طی دو و شش ماه در گروه‌های واریکوسل، دیلاتاسیون ورید اسپرماتیک داخلی در حیوانات از طریق مشاهده مورد بررسی قرار گرفت، ورید اورترال چپ به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد.[۱۳] سپس از موش‌های صحرایی که اتساع ورید اسپرماتیک در آنها مشاهده گردید، نمونه‌گیری از اپیدیدیم دمی سمت راست و چپ صورت گرفت. تعداد اسپرم و تحرک طبق روش WHO بررسی شد.[۱۴]

بررسی فلوسایتومتری: جهت بررسی تولید آنیون سوپراکساید، پتانسیل غشای میتوکندری و viability سلول‌ها از طریق

فلوسایتومتری، محلول حاصل از اپیدیدیم دمی به مدت سه دقیقه (g×۵۰۰) سانتریفوژ شده تا پلاسما از pellet سلولی جدا شود. پلاسمای حاصله جهت اندازه‌گیری ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی در فریزر $^{\circ}C$ ۷۰- نگهداری شد. Pellet سلولی در PBS (فسفات بافر سالین، pH=۷/۴) غوطه‌ور شد تا محلولی با تعداد حدود ۱×۱۰^{۶} اسپرم در هر میلی‌لیتر حاصل شود. جهت بررسی تولید آنیون سوپراکساید، پتانسیل غشای میتوکندری، viability سلول‌ها به‌ترتیب از رنگ‌های دی‌هیدرواتیدیوم، رودامین ۱۲۳ و یدید پروپیدیوم استفاده نمودیم. فلوروکروم‌ها از sigma خریداری شد. داده‌ها از طریق فلوسایتومتر مدل Partec PAS (دانمارک) که مجهز به لیزر آرگون ۴۸۸ می‌باشد، ارزیابی شد. اطلاعات مربوط به اندازه سلول از طریق (FSC) Forward Scatter و اطلاعات مربوط به گرانولیتی سلول از طریق Side Scatter (SCC) فراهم شد. به کمک پلات دو بعدی هر دو پارامتر یک gate برای جمعیت مورد نظر انتخاب شده تعریف شد و عوامل ناخواسته مانند debris از جمعیت مورد مطالعه حذف شد. در هر نمونه تقریباً ۱۰۰۰۰ سلول مورد بررسی قرار گرفت. فلورسانس ساطع شده از فلوروکروم های یدید پروپیدیوم Propidium Iodide (PI) در باند FL3 با باند نوری ۶۲۰ نانومتر و دی‌هیدرواتیدیوم و رودامین ۱۲۳ در FL2 با باند نوری ۵۸۵ نانومتر شناسایی شد. سیگنال‌های شناسایی شده توسط نرم‌افزار Flomax آنالیز شد. جهت جداسازی روی‌هم افتادگی سیگنال‌ها در باندهای FL3 و FL2 از Colour Compensation استفاده شد. داده‌های فلوسایتومتری به صورت میانگین شدت فلورسانس Mean Fluorescence Intensity (MFI) گزارش شد. بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی: اندازه‌گیری ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی بر اساس روش Koracevic انجام شد.[۱۵] نتایج به‌صورت میلی‌مول بر لیتر ارائه شد. بر اساس این متد، توانایی مایع منی در مهار تولید ماده فعال اسید تیوباربیتوریک از بنزوات سدیم تحت اثر رادیکال‌های آزاد حاصل از واکنش Fenton ارزیابی شد. محلول یک میلی‌مول بر لیتر اسید اوریک به عنوان استاندارد در نظر گرفته شد. داده‌ها بر اساس برنامه آماری SPSS ویراست ۱۶ و تست آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد بررسی قرار گرفت و برای مقایسه چندگانه از شاخص توکی استفاده شد. برای مقایسه اختلاف بین داده‌های سمت راست و چپ از Paired t-test استفاده شد. داده‌ها به صورت Mean±SEM گزارش شده است. اختلاف معنی‌داری در سطح $p\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

جهت بررسی اثر واریکوسل بر تولید آنیون سوپراکساید داخل سلولی از فلوروکروم دی‌هیدرواتیدیوم استفاده شد و افزایش معنی‌دار ($p\leq ۰/۰۵$) تولید آنیون سوپراکساید داخل سلولی از طریق افزایش میانگین شدت فلورسانس فلوروکروم دی‌هیدرواتیدیوم در هر دو گروه واریکوسل نسبت به کنترل و sham مشاهده شد (جدول ۱ و شکل ۱). جهت بررسی اثر واریکوسل بر پتانسیل غشای میتوکندری از فلوروکروم رودامین ۱۲۳ استفاده شد و کاهش معنی‌داری ($p\leq ۰/۰۵$) در پتانسیل غشای میتوکندری از طریق کاهش میانگین شدت فلورسانس فلوروکروم رودامین ۱۲۳ در هر دو گروه واریکوسل در مقایسه با کنترل و sham مشاهده شد (جدول ۱ و شکل ۲). برای بررسی زنده بودن سلول‌ها از یدید پروپیدیوم (PI) استفاده شد. در سلول‌های مرده

جدول- ۱: میانگین شدت فلورسانس سلول‌های DHE - مثبت، Rh- مثبت/ PI منفی و درصد سلول‌های PI - مثبت و در گروه‌های مختلف. (داده‌ها: میانگین±انحراف‌معیار)

گروه	طرف	میانگین شدت فلورسانس در سلول‌های DHE مثبت	میانگین شدت فلورسانس در سلول‌های Rh مثبت	میانگین سلول‌های PI مثبت	فعالیت آنتی‌اکسیدانی
کنترل	راست	۲/۷±۰/۴۱	۱۷/۳۲±۳/۰۵	۱۳/۱۰±۱/۶۱	۰/۱۴۱±۰/۰۴۳
	چپ	۲/۵۲±۰/۰۶	۱۶/۵۴±۲/۱۹	۱۱/۳۶±۱/۸۲	۰/۱۵۰±۰/۰۵۴
Sham	راست	۳/۲±۰/۴۳	۲۵/۱۶±۴/۷۴	۱۲/۳۱±۱/۵۰	۰/۲۰۹±۰/۰۶۸
	چپ	۳/۲±۰/۶۷	۲۴/۱۲±۵/۹۷	۱۲/۳۱±۱/۵۰	۰/۱۶۸±۰/۰۴۸
واریکوسل ۱	راست	*۱۲/۰۴±۱/۸۹	*۲/۸۰±۰/۴۵	*۱۶/۲۸±۱/۴۴	۰/۱۷۷±۰/۰۲۹
	چپ	*۱۲/۳۳±۲/۴۸	*۱/۸۰±۰/۳۰	*۱۵/۹۱±۱/۲۷	۰/۲۰۷±۰/۰۴۳
واریکوسل ۲	راست	*۱۹/۴۲±۴/۰۷	*۱/۲۱±۰/۰۴	#*۳۱/۶۶±۷/۳۲	۰/۲۶۱±۰/۰۳۰
	چپ	*۱۸/۴۱±۲/۹۵	*۱/۲۹±۰/۰۷	#*۳۰/۴۰±/۷۶	۰/۲۴۱±۰/۰۳۸

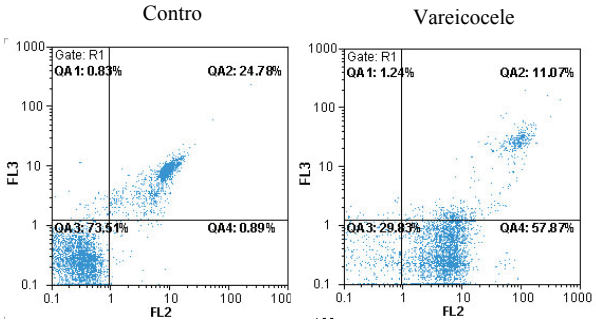
*اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل و sham با $p\leq ۰/۰۵$، #اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه واریکوسل یک با $p\leq ۰/۰۵$

جدول- ۲: میانگین شدت فلورسانس سلول‌های DHE- مثبت، RH- مثبت/ PI منفی و درصد سلول‌های PI- مثبت و تعداد و تحرک اسپرم در گروه‌های مختلف.

(داده‌ها: میانگین ±انحراف معیار)

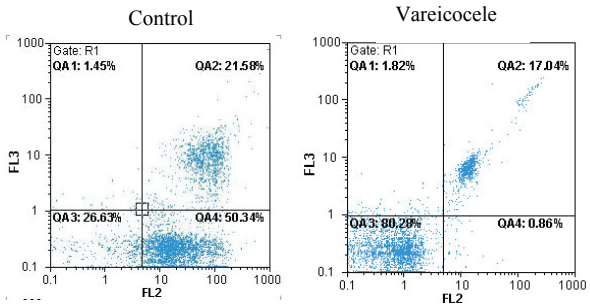
گروه	طرف	تعداد اسپرم ×۱۰^۶	تحرک اسپرم
کنترل	راست	۳۰/۹۲±۰/۴۶	۵۱/۲۸±۲/۲۷
	چپ	۳۰/۵۸±۲/۴۷	۵۰/۲۸±۳/۰۳
sham	راست	۳۲/۴۲±۱/۰۲	۵۰/۱۴±۳/۰۴
	چپ	۳۱/۷۱±۱/۷۹	۵۳±۳/۹۴
واریکوسل ۱	راست	*۱۲/۲۸±۱/۰۵	*۲۷±۲/۶۳
	چپ	*۱۳/۳۵±۱/۳۱	*۳۱/۲۸±۴/۲۷
واریکوسل ۲	راست	*۱۰±۱/۷۰	*۳۳/۱۴±۴/۱۲
	چپ	*۹/۰۷±۱/۶۳	*۳۰/۵۷±۴/۱۵

*اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل و sham با p≤۰/۰۵، #اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه واریکوسل یک با p≤۰/۰۵

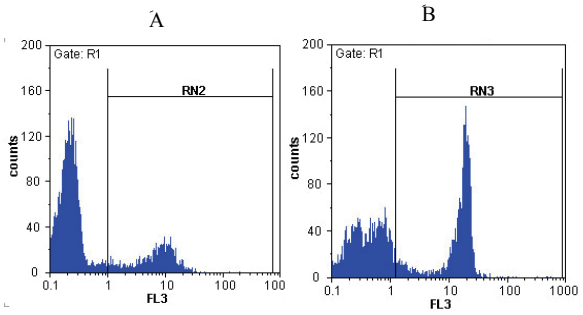


شکل- ۱: پلات دو بعدی مقایسه شدت فلورسانس DHE در گروه کنترل و گروه واریکوسل. شکل چپ پلات دو بعدی مربوط به گروه کنترل و شکل راست مربوط به گروه واریکوسل می‌باشد. شیفت به راست جمعیت سلولی در گروه واریکوسل نشاندهنده سلول‌های DHE- مثبت با میانگین شدت فلورسانس بالا می‌باشد. (FL2 در محور x ها نمایانگر کانال‌های مربوط به شدت فلورسانس DHE. FL3 در محور y ها نمایانگر کانال‌های مربوط به شدت فلورسانس PI).

PI از غشای آسیب دیده سلول عبور کرده و سبب ایجاد فلورسانس قرمز می‌شود. بنابراین سلول‌های PI- مثبت نشانه سلول‌های مرده و سلول‌های PI- منفی نشانه سلول‌های زنده می‌باشند. نتایج به صورت درصد نشان داده شد. در این آزمایش درصد سلول‌های PI- مثبت در گروه واریکوسل یک و گروه واریکوسل دو افزایش معنی‌داری (p≤۰/۰۵) با گروه کنترل و شم داشت (جدول ۱ و شکل ۳). در مورد اثر واریکوسل بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل مایع منی، تفاوت معنی‌داری در گروه‌های مختلف مشاهده نشد (جدول ۱). تعداد و تحرک اسپرم‌ها در گروه‌های واریکوسلی کاهش معنی‌دار (p≤۰/۰۵)



شکل- ۲: پلات دو بعدی مقایسه شدت‌فلورسانس Rh در گروه کنترل و گروه‌واریکوسل. شکل چپ پلات دو بعدی مربوط به گروه‌کنترل و شکل راست مربوط به گروه‌واریکوسل می‌باشد. شیفت به چپ جمعیت سلولی در گروه واریکوسل نشاندهنده کاهش تعداد و شدت فلورسانس سلول‌های Rh- مثبت در گروه واریکوسل می‌باشد.(FL2 در محور x ها نمایانگر کانال‌های مربوط به شدت فلورسانس Rh. FL3 در محور y ها نمایانگر کانال‌های مربوط به شدت فلورسانس PI)



شکل- ۳ : هیستوگرام مقایسه میانگین شدت فلورسانس PI. شکل A نشاندهنده میانگین شدت فلورسانس PI در گروه کنترل و شکل B مربوط به میانگین شدت فلورسانس PI در گروه واریکوسل می‌باشد. (FL3 در محور y ها نمایانگر کانال‌های مربوط به شدت فلورسانس PI. Counts در محور x ها نشاندهنده تعداد اسپرم‌ها).

در مقایسه با کنترل و شم نشان داد (جدول ۲). تفاوت معنی‌داری بین داده‌های حاصل از سمت راست و چپ در کلیه گروه‌ها و در کلیه شاخص‌های مورد ارزیابی مشاهده نشد (جدول ۱ و ۲).

بحث

تحقیقات متعددی افزایش آنیون سوپراکساید را در واریکوسل گزارش نموده‌اند. مطالعه‌ای که بر روی بافت بیضه در مدل حیوانی موش صحرایی انجام گرفته، وجود آنیون سوپراکساید را در بافت از طریق روش Chemiluminescence مورد بررسی قرار داده و افزایش آن پس از القای واریکوسل را گزارش نموده است.[۶] همچنین افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در مایع منی افراد واریکوسلی نیز گزارش شده

است.[۵] بررسی سطوح malondeaddehyde (MDA) که شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشد در بافت بیضه مردان مبتلا به واریکوسل توسط Koksal بررسی شد. آنها گزارش کردند اگرچه تفاوت معنی‌داری در سطوح MDA در بافت بیضه در میان افراد واریکوسلی وجود ندارد، اما در بیماران با درجه سه واریکوسل در مقایسه با درجات پایینتر افزایش سطوح ROS مشاهده می‌شود که پیشنهاد می‌کند اثرات ناباروری همراه با واریکوسل شاید بخشی به‌دلیل ROS باشد.[۱۶] در تمامی این مطالعات میزان گونه‌های فعال اکسیژن در خارج از سلول اسپرم مورد بررسی قرار گرفت، با توجه به حساسیت اسپرم به آسیب‌های ناشی از ROS دانستن این مطلب که منبع تولید ROS، سلول اسپرم بوده یا توسط منابع خارج سلولی مانند لکوسیت‌ها ایجاد می‌شود، چه بسا در تصمیم‌گیری‌های بعدی جهت درمان کمک‌کننده باشد. در مطالعه ما تولید آنیون سوپراکساید داخل سلول از طریق رنگ‌آمیزی با دی‌هیدرواتیدیوم مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که MFI در گروه واریکوسل شده پس از دو ماه نسبت به گروه کنترل چهار برابر افزایش یافت. اگرچه این افزایش با افزایش زمان ادامه داشت اما تفاوت معنی‌داری بین گروه واریکوسل شش ماه نسبت به دو ماه مشاهده نشد. این مطلب نشان می‌دهد که احتمالاً منبع تولید ROS در شرایط واریکوسل می‌تواند داخل سلول باشد و عامل آسیب‌های مشاهده شده به صورت تغییر پارامترهای سیمن یعنی کاهش تعداد، تحرک، پتانسیل غشای میتوکندری به دلیل آنیون سوپراکساید داخل سلول می‌باشد. Hendin میزان گونه‌های آزاد اکسیژن و ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی مایع منی را در ۲۱ بیمار واریکوسلی نابارور با ۱۵ فرد سالم مقایسه کرده و مشاهده نمود که در بیماران واریکوسلی نسبت به گروه کنترل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل کاهش می‌یابد.[۱۷] البته مطالعات دیگری نیز وجود دارند که چنین رابطه‌ای را مشاهده نکرده‌اند. در سال ۲۰۰۲ Koksal سطوح MDA و سوپراکساید دسموتاز Super Oxide Desmutase (SOD) و فعالیت کاتالاز را در بافت بیضه موش صحرایی اندازه‌گیری نموده و گزارش کرد که هیچ تغییری در سطوح این آنتی‌اکسیدان‌ها دیده نشد. آنها پیشنهاد کردند که استرس اکسیداتیو مسئول ایجاد اختلال عملکرد بیضه‌ها همراه با واریکوسل ایجاد شده در موش صحرایی نمی‌باشد.[۱۲] در این تحقیق فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل طبق متد Koracevic بررسی شد. نتایج حاصله نشان داد که تفاوت معنی‌داری از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گروه‌های واریکوسل نسبت به کنترل وجود ندارد. به‌نظر می‌رسد که در مطالعه کنونی افزایش تولید آنیون سوپراکساید داخل سلولی نتوانسته است سبب تغییر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مایع منی در حیوانات واریکوسلی شود اگرچه کاهش تعداد، تحرک، پتانسیل غشای میتوکندری و Viability به‌خوبی قابل مشاهده بود. پتانسیل غشای میتوکندری شاخص باارزشی جهت تعیین سلامت و عملکرد سلول است. در مطالعه‌ای که بر روی رابطه بین پتانسیل غشای میتوکندری و کیفیت اسپرم و توانایی باروری انجام گرفته، نشان داده شد که پتانسیل غشای میتوکندری بالا نشاندهنده اسپرم‌های طبیعی با حرکت بیشتر می‌باشد.[۱۸] میتوکندری منبع عمده تولید ROS داخل سلولی می‌باشد.[۱۹] مزدوج شدن انتقال الکترون با فسفریلاسیون اکسیداتیو سبب حفظ پتانسیل غشای بالا در میتوکندری می‌شود که نیازمند تولید ATP در سلول‌های سوماتیک می‌باشد. این فرایند در اسپرم در اثر تولید ROS آسیب می‌بیند، بنابراین پتانسیل غشای میتوکندری کاهش می‌یابد. در مطالعه کنونی پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم توسط فلوروکروم رودامین ۱۲۳ مورد بررسی قرار گرفت. رودامین ۱۲۳ رنگ فلورسانت کاتیونی است که بدون اثر سایتوتوکسیک توسط میتوکندری فعال گرفته می‌شود و تولید فلورسانس سبز رنگ می‌کند. گرفته شدن آن به‌وسیله میتوکندری به پتانسیل بین غشایی transemembrane potential بستگی دارد. فقدان فلورسانس نشاندهنده نقص در پتانسیل غشای میتوکندری است. نتایج به صورت میانگین شدت فلورسانس رودامین گزارش شد و مشاهده گردید که به‌دنبال ایجاد واریکوسل در حیوانات این شاخص کاهش می‌یابد. با توجه به مطالعات انجام گرفته در این مورد به‌نظر می‌رسد کاهش پتانسیل غشای میتوکندری ناشی از افزایش ROS در سلول ممکن است مسئول بخشی از اختلالات عملکرد اسپرم (ناباروری) در افراد واریکوسلی باشد. جهت بررسی Viability اسپرم‌ها از دو روش در مطالعات مختلف استفاده شده است. در برخی مطالعات سلول‌های Viable با استفاده از فلوروکروم SYBR-14 بررسی شده که به‌طور اختصاصی سلول‌های زنده را مشخص می‌کند[۲۰] و در برخی مطالعات اندازه‌گیری سلول‌های مرده از طریق یدید پروپیدیوم انجام شده است.[۱۹] در سلول‌های مرده PI از غشای آسیب دیده سلول عبور کرده و سبب ایجاد فلورسانس قرمز می‌شود. بنابراین سلول‌های PI- مثبت نشانه سلول‌های مرده و سلول‌های PI-

منفی نشانه سلول‌های زنده می‌باشند. از طرفی نشان داده شده که میزان تولید ROS داخل سلولی در سلول‌های Viable کم می‌باشد و نشاندهنده میزانی است که به‌طور فیزیولوژیک در اسپرم تولید می‌شود. با توجه به موارد فوق به‌نظر می‌رسد کاهش Viability که از طریق افزایش سلول‌های مرده در مطالعه ما نشان داده شد، به‌دلیل افزایش آنیون سوپراکساید در داخل سلول باشد. در مورد اثرات واریکوسل بر پارامترهای مایع منی از قبیل تعداد و تحرک اسپرم و تاثیر بر حجم بیضه‌ها مطالعات بسیاری انجام شده است. مطالعه‌ای که WHO در سال ۹۲ بر روی مردان مبتلا به واریکوسل در ۲۴ کشور انجام داد گزارش نمود که تعداد کل اسپرم و حجم بیضه‌ها در این افراد کاهش یافته است اگرچه تغییر معنی‌داری در تحرک اسپرم در این افراد مشاهده نشد. مطالعه دیگری که پارامترهای سیمن را در ۴۰ فرد مبتلا به واریکوسل با افراد سالم مقایسه کرده بود، گزارش نمود که تعداد و حرکت اسپرم‌ها در افراد واریکوسلی کاهش یافته است.[۲۱] تناقض موجود در مطالعات مختلف شاید از طریق تفاوت در اندازه گروه و تنوع آزمون‌های ارزیابی قابل توجیه باشد. در این مطالعه القای واریکوسل سبب کاهش تعداد و تحرک اسپرم در گروه‌های واریکوسل نسبت به کنترل شد. همانطور که ذکر شد افزایش ROS سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشای پلاسمایی اسپرم شده که سیالیت غشا را کاهش داده و در نتیجه سبب کاهش تحرک اسپرم می‌شود. یافته‌های حاصل از این مطالعه پیشنهاد می‌کند که یکی از منابع تولید گونه‌های فعال اکسیژن، داخل سلول می‌باشد که باید در انتخاب آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان راهکار درمانی در شرایط واریکوسل مدنظر قرار گیرد.

References

1. Hauser R, Paz G, Botchan A, Yogev L, Yavetz H. Varicocele: effect on sperm functions. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 482-5.
2. Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 473-81.
3. Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *J Androl* 2008; 29: 488-98.
4. Burnaugh L, Sabeur K, Ball BA. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology* 2007; 67: 580-9.
5. Allamaneni SS, Naughton CK, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Increased seminal reactive oxygen species levels in patients with varicoceles correlate with varicocele grade but not with testis size. *Fertil Steril* 2004; 82: 1684-6.
6. Cam K, Simsek F, Yuksel M, Turkeri L, Haklar G, Yalcin S, et al. The role of reactive oxygen species and apoptosis in the pathogenesis of varicocele in a rat model and efficiency of vitamin E treatment. *Int J Androl* 2004; 27: 228-33.
7. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 2002; 23: 737-52.
8. de Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 1995; 10 Suppl 1: 15-21.
9. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 1987; 8: 338-48.
10. Smith R, Vantman D, Ponce J, Escobar J, Lissi E. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Hum Reprod* 1996; 11: 1655-60.
11. 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: 878-85.
12. Köksal T, Erdoğru T, Toptaş B, Gülkesen KH, Usta M, Baykal A, et al. Effect of experimental varicocele in rats on testicular oxidative stress status. *Andrologia* 2002; 34: 242-7.
13. Turner TT. The study of varicocele through the use of animal models. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 78-84.
14. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen. Cambridge: University Press, 1999.
15. Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol* 2001; 54: 356-61.
16. Köksal IT, Tefekli A, Usta M, Erol H, Abbasoglu S, Kadioglu A. The role of reactive oxygen species in testicular dysfunction associated with varicocele. *BJU Int* 2000; 86: 549-52.
17. Mostafa T, Anis TH, El-Nashar A, Imam H, Othman IA. Varicocelectomy reduces reactive oxygen species levels and increases antioxidant activity of seminal plasma from infertile men with varicocele. *Int J Androl* 2001; 24: 261-5.
18. Gallon F, Marchetti C, Jouy N, Marchetti P. The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. *Fertil Steril* 2006; 86: 1526-30.
19. Guthrie HD, Welch GR. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J Anim Sci* 2006; 84: 2089-100.
20. Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, DeJarnette JM, Marshall CE. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 1997; 57: 1401-6.
21. Villanueva-Diaz CA, Vega-Hernandez EA, Diaz-Perez MA, Echavarria-Sanchez M, Karchmer-Krivitsky S. Sperm dysfunction in subfertile patients with varicocele and marginal semen analysis. *Andrologia* 1999; 31: 263-7.

Tehran University Medical Journal; Vol. 67, No. 2, May 2009: 87-93

Evaluation of sperm superoxide anion production and mitochondrial membrane potential: flowcytometry method in rats with experimental varicocele

Jafari A.[1]
Zahmatkesh M.[1]
Sadeghiour HR.[1*]
Kajbafzadeh AM.[2]
Sarrafnejad AF.[3]

1- Department of Physiology, School of Medicine
2- Pediatric Urology Research Center, Department of Pediatric Urology, Children's Hospital Medical Center
3- Department of Pathobiology, School of Medicine

Tehran University of Medical Sciences

*Corresponding author: Department of physiology School of Medicine
Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-66419484
email: sadeghipour@tums.ac.ir

Received: December 11, 2008 Accepted: Jun 21, 2009

Abstract

***Background*:** Varicocele is a major cause of male infertility, but its pathophysiology is unclear. Recent studies declare that fertile varicocele people with normal semen analysis are also at risk of loss of infertility. The exact mechanism by which varicocele damages spermatogenesis is still unknown. Some studies have reported increased Reactive Oxygen Species (ROS) is a major factor in semen of men with varicocele. The aim of this study was to investigate whether the source of elevated ROS is intracellular or not. In addition, we studied Mitochondrial Membrane Potential (MMP), viability, antioxidant activity, sperm count and motility in these rats.

***Methods*:** The study group consisted of 28 male rats divided in four groups: control, sham, varicocele 1, varicocele 2, Experimental varicocele was established by partial ligation of the left renal vein in last two groups. Animals were sacrificed two and six months after surgery and dilation of the internal spermatic veins was observed. Then, superoxide anion production and Mitochondrial Membrane Potential were evaluated by Flow cytometry sperm characteristics were evaluated by Flow cytometry. Sperm superoxide anion production was assessed by the dihydroethidium and Mitochondrial Membrane Potential with rhodamin 123.

***Results*:** Our results showed intracellular superoxide anion production significantly increased and Mitochondrial Membrane Potential, viability, sperm count and motility significantly decreased in rats with experimental left varicocele. However, there was no significant difference for seminal plasma antioxidant activity between all groups.

Conclusions: Consequently, our findings suggest that one of the main sources of ROS production is intracellular and we must consider it in treatment.

Keywords: Superoxide anion, mitochondrial membrane potential, varicocele, dihydroethidium, rhodamin 123.