

بررسی اثر دوزهای مختلف آدنوزین بر پارامتر تحرک اسپرم مردان نابارور

دکتر علیرضا وحیدی^۱، دکتر محمدعلی خلیلی^۲، امید امینی‌راد^۳

نویسنده مسئول: یزد، مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری یزد khalili59@hotmail.com

دریافت: ۸۹/۶/۱۴ پذیرش: ۸۹/۱۱/۴

چکیده

زمینه و هدف: یکی از علل ناباروری مردان عدم تحرک مناسب اسپرم است. برای بهبود آن می‌توان در تکنیک‌های آزمایشگاهی تولیدمثل (ART) آدنوزین را به محیط کشت اسپرم افزود. هدف از این مطالعه تعیین اثر دوزهای مختلف آدنوزین بر پارامتر تحرک در نمونه‌های انزالی افراد بارور و نابارور بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی از نوع آزمایشگاهی، تعداد ۶۰ نمونه مایع منی مردان مراجعه کننده به مرکز ناباروری یزد، طبق دستورالعمل WHO آنالیز و پارامترهای تعداد، مورفولوژی و تحرک اسپرم (سریع، آهسته و بی‌تحرک) در آن‌ها بررسی شده و بر اساس آن به دو گروه بارور و نابارور تقسیم شدند. نمونه‌ها پس از شستشو به روش Swim-up به ۴ قسمت مساوی تقسیم و به هرکدام دوزهای ۰، ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم آدنوزین اضافه و مجدداً آنالیز میکروسکوپی شدند. نتایج با روش آماری Paired T-test و Independent T-test تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: در ارزیابی اولیه پارامترهای اسپرم به جز تحرک آهسته، تفاوت معنی‌داری داشتند. آدنوزین در گروه بارور سبب افزایش تعداد اسپرم در دوز ۵ میلی‌گرم و افزایش تحرک سریع و کاهش اسپرم‌های بی‌تحرک در دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم و نیز کاهش درصد اسپرم با تحرک آهسته شد. در گروه نابارور این افزایش دوز تنها سبب بهبود تعداد اسپرم در دوز ۵ نسبت به ۲ میلی‌گرم گردید، و بر تحرک آهسته بی‌تأثیر بود. در تحرک سریع فقط دوز ۵ موثر بود و دوز ۱۰ میلی‌گرم اثری نداشت. همچنین در دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم کاهش اسپرم‌های بی‌تحرک معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: افزودن ۵ میلی‌گرم آدنوزین به محیط کشت اسپرم می‌تواند سبب افزایش تحرک اسپرم پیشرونده‌ی مردان نابارور شود.

واژگان کلیدی: آدنوزین، تحرک اسپرم، ناباروری مردان

مقدمه

در ناباروری مردانه سه فاکتور عمده شامل تعداد کم اسپرم، مورفولوژی غیرطبیعی و تحرک پیشرونده‌ی ضعیف دخیل‌اند (۱). ۳۰ تا ۵۰ درصد از زوج‌هایی که تحت درمان In Vitro Fertilization (IVF) قرار می‌گیرند، حداقل در یکی از این پارامترها مشکل دارند. در این میان، نقایص

ناباروری یکی از دغدغه‌های مهم بهداشت جهانی می‌باشد (۱). ناباروری با علت مردان حدود ۵۰ درصد از علل ناباروری را در زوج‌ها تشکیل می‌دهد (۲). پارامترهای اسپرم که شامل تعداد، تحرک (پیشرونده و درجا) و مورفولوژی می‌باشد، جهت انجام لقاح، ضروری است (۳-۴).

۱- دکترای داروسازی، مربی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری یزد

۲- دکترای تخصصی جنین‌شناسی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری و گروه بیولوژی علوم تشریح

۳- دانشجوی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

گرچه فسفریلاسیون اکسیداتیو و تبدیل ADP به ATP و AMP با آدنیلات سیکلاز نیز شرکت دارد. ATP خارج سلولی (ATPe) یک مولکول سیگنالی مهم است چون در pH فیزیولوژیک چهار شارژ منفی قوی دارد که به آسانی از غشای پلاسمایی عبور نمی‌کند. نقش ATPe احتمالاً به طور غیرمستقیم و از طریق گیرنده‌های سطح سلولی پورینریک P2 است (۱۰). بر اساس مطالعات انجام شده سطح ATP بر تحرک خوب اسپرم اثر مثبت دارد. با توجه به نقش آدنوزین در بهبود تحرک اسپرم، هدف از این مطالعه تعیین اثر دوزهای مختلف آدنوزین بر روی پارامتر تحرک اسپرم، در نمونه‌های انزالی افراد بارور و نابارور بوده است. نهایتاً کارآمدی این روش آزمایشگاهی در مطالعه‌ای کنترل شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی

انتخاب بیماران: در این مطالعه‌ی تجربی از نوع آزمایشگاهی، تعداد ۶۰ نمونه مایع منی از مردان مراجعه کننده به مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری یزد به روش نمونه‌گیری آسان انتخاب شدند. از آنجا که سن و مدت ناباروری فاکتورهای دخیل در ناباروری مردان نیستند (۹)، در این مطالعه افراد با شرایط سنی متفاوت مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ها در شرایط یکسان و بر اساس معیارهای WHO مورد ارزیابی اولیه قرار گرفتند و با توجه به نتیجه آن به دو گروه ۳۰ نفری تقسیم شدند. یک گروه افراد بارور با آنالیز اسپرم طبیعی (تعداد بیشتر از ۲۰ میلیون اسپرم در ۱ میلی‌لیتر مایع انزال، تحرک پیشرونده ۵۰ درصد و مرفولوژی طبیعی ۳۰ درصد) (۲۴) و گروه دیگر افراد نابارور با آنالیز اسپرم غیرطبیعی را شامل می‌شد.

آماده سازی محیط آدنوزین: جهت بررسی اثر آدنوزین ۴ نوع محیط کشت با دوزهای مختلف آدنوزین تهیه شد. یکی محیط کشت Ham's F10 (Seromed Co., Germany)

مربوط به پارامتر تحرک یک علت مهم ناباروری مردان است. به طوری که این پارامتر با میزان موفقیت باروری آزمایشگاهی (IVF) رابطه مستقیم دارد (۵). امروزه استفاده از روش‌های آزمایشگاهی برای تشکیل جنین و ایجاد باروری گسترش یافته است. یکی از این روش‌ها Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) می‌باشد (۶) که اسپرم مورد نیاز برای این روش از نمونه‌های انزالی یا اپیدیدیم (روش PESA) (Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration) (۷) و یا به طریق تهاجمی از بیضه (روش TESE) (Testicular Sperm Extraction) تامین می‌شود (۸) ولی اسپرم‌های به دست آمده از این دو شیوه معمولاً فاقد تحرک مناسب و گاهی بی‌حرکتند (۶) در حالی که در این روش به تحرک مناسب اسپرم نیاز است زیرا علامت حیات اسپرم در زمان تزریق تحرک آن است (۹). از طرف دیگر از آنجا که نمی‌توان تعداد و مورفولوژی طبیعی اسپرم را در محیط آزمایشگاه و در محدوده‌ی زمانی کم بهبود بخشید، بهبود تحرک اسپرم تنها راه حل برای افزایش احتمال باروری به شمار می‌رود (۵). یکی از این راه‌ها افزودن ترکیبات افزایش دهنده ATP مثل پنتوکسی فیلین از خانواده‌ی کافئین‌ها به مایع منی در آزمایشگاه می‌باشد. در مطالعات صورت گرفته بر روی عوامل مهار کننده‌ی تجزیه cAMP مثل پنتوکسی فیلین مشاهده گردید که افزایش غلظت ATP از این طریق موجب تشدید تحرک اسپرم می‌شود (۵). ATPe در دستگاه تناسلی زن خصوصاً در زمان تخمک‌گذاری نیز وجود دارد (۱۲). پنتوکسی فیلین یک روش استاندارد برای افزایش تحرک اسپرم در آزمایشگاه می‌باشد. راه دیگر افزودن آدنوزین به مایع منی می‌باشد. ATP داخل سلولی مهم‌ترین منبع انرژی اسپرم برای تولید cAMP با آدنیل سیکلاز و به عنوان دهنده‌ی فسفات جهت فسفریلاسیون پروتئین می‌باشد. گلیکولیز عمده‌ترین راه متابولیکی برای تولید ATP در اسپرم است.

که حاوی ۱۰ درصد سرم آلبومین انسانی (0.3 mg/ml HAS, Irvine Scientific Co., USA) و بدون آدنوزین و محیط‌های دیگر شامل مخلوطی از محیط کشت Ham's F10 و دوزهای ۲ و ۵ و ۱۰ میلی‌مول آدنوزین بودند. جهت تهیه‌ی آدنوزین ۲mmol (فرمول شیمیایی $C_{10}H_{13}N_5O_4$ و شماره‌ی شناسایی A-9251) که از شرکت موک (Merck Chemical co., Germany) خریداری شده بود، میزان ۰/۰۵۳۴۴ گرم آدنورین در ۱۰ سی‌سی محیط کشت Ham's F10 ریخته، در انکوباتور حاوی CO_2 ۵ درصد و ۹۵ درصد هوا با درجه‌ی حرارت ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک ساعت گرم شد. برای تهیه‌ی آدنوزین با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مول به ترتیب از ۰/۰۱۳۳۶ و ۰/۰۲۶۷۲ گرم آدنوزین استفاده شد (۲۳).
آنالیز اسپرم: نمونه‌ها به صورت تازه و به روش خودانزالی در ظرف استریل جمع‌آوری شد. ابتدا ۱۰ میکرولیتر از مایع منی در زیر میکروسکوپ نوری (Nikon Co., Japan) با بزرگنمایی $400\times$ توسط یک نفر مورد ارزیابی قرار گرفت. با کمک لام ثنوبار و دستگاه کانتر پارامترهای تعداد، تحرک (میزان اسپرم‌های پیشرونده، غیرپیشرونده و تحرک درجا)، مورفولوژی (شکل و اندازه) اسپرم بررسی شد. به این منظور، در چند شان میکروسکوپی به صورت تصادفی، اسپرم‌ها بررسی و از اعداد حاصله میانگین گرفته شد. بر اساس تعریف WHO، اسپرم پیشرونده شامل اسپرم‌هایی است که با ضربات شلاقی دم خود حرکت رو به جلو دارند. اسپرم با حرکت غیر پیشرونده اسپرم‌هایی هستند با بقیه‌ی الگوهای حرکتی بدون پیشرفت و اسپرم بی‌تحرک هیچ حرکتی ندارد. همچنین اسپرم‌ها با سر بیضی شکل، دم صاف و هسته‌ی پررنگ، طبیعی تلقی شده، بقیه در دسته‌ی غیر طبیعی قرار می‌گیرند (۲۴ و ۱۱). برای بررسی مورفولوژی طبیعی اسپرم از رنگ آمیزی گیمسا (Merck Chemical co., Germany) استفاده شد. سپس ۲ سی‌سی از نمونه‌ی هر فرد را به

۴ قسمت مساوی تقسیم و ۳ سی‌سی از محیط کشت‌های فوق به هر یک از نمونه‌ها اضافه، به آرامی مخلوط و دو بار به روش swim-up شستشو داده شدند. به این صورت که در سانتیفریوژ با دور ۵۰۰ گرم و به مدت ۵ دقیقه گذاشته شد. محلول روی آن را دور ریخته، به رسوب تشکیل شده مجدداً ۳ سی‌سی محیط کشت مربوطه اضافه و سانتیفریوژ گردید. در مرحله‌ی آخر محلول روی آن را دور ریخته و میزان ۱ سی‌سی محیط را به آرامی از کنار لوله آزمایش به پلیت اضافه شد به گونه‌ای که پلیت تشکیل شده به هم نریزد. نمونه را در انکوباتور حاوی CO_2 ۵ درصد و ۹۵ درصد هوا با درجه‌ی حرارت ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه گذاشته، مجدداً از لحاظ پارامترهای اسپرم بررسی شدند (۲۳).
تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای تجزیه و تحلیل داده‌ها در یک گروه از روش آماری Paired T-test و برای مقایسه دو گروه Independent T-test استفاده شد.

یافته‌ها

مقایسه‌ی پارامترهای اسپرم دو گروه بارور و نابارور اختلاف معنی‌داری را در پارامترهای تعداد، تحرک سریع، تحرک درجا و مرفولوژی طبیعی اسپرم نشان داد ($P < 0/001$) ولی در مورد پارامتر تحرک آهسته تفاوتی مشاهده نشد (جدول ۱). تغییر هر یک از پارامترها در گروه بدون آدنوزین (۰) نسبت به ارزیابی اولیه مایع منی بیانگر اثر شستشو خواهد بود. در این مورد همه پارامترها به طور معنی‌داری تغییر داشتند که در جدول شماره ۲ به آن اشاره شده است ($P < 0/05$). کاهش ۳۴/۴ درصد و ۲۲/۸ درصد پارامتر تعداد اسپرم در گروه بارور و نابارور به دلیل رقیق شدن مایع منی در طی پروسه‌ی شستشو بوده است. با توجه به آزمون Repeated Measurement مشخص شد که بین دوزهای مختلف آدنوزین در افراد بارور ($P < 0/0001$) و نابارور ($P = 0/003$) اختلاف معنی‌داری وجود دارد که با مقایسه‌ی

نمونه‌های افراد بارور، دوز ۵ میلی‌لیتر نسبت به ۲ میلی‌لیتر و نیز H بهبود معنی‌داری داشت ولی دوز ۱۰ میلی‌لیتر تفاوتی با دوز ۵ میلی‌لیتر نداشت.

دو به دو بین ۴ گروه نتایج زیر به‌دست آمد. در مورد پارامتر تعداد اسپرم، هر کدام از گروه‌های حاوی آدنوزین با گروه صفر مقایسه شدند. همه نمونه‌هایی که حاوی آدنوزین بودند نسبت به گروه صفر بهبود معنی‌داری داشتند ($P=0/001$). در

جدول ۱: میزان فراوانی پارامترهای اسپرم در ارزیابی اولیه‌ی مایع منی در دو گروه بارور و نابارور

P Value	نابارور		بارور		پارامترهای اسپرم
	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	
$<0/0001$	۳۰/۰۲	۴۲/۷۶	۴۶/۱۴	۹۸/۴۳	تعداد (10^6)
$<0/0001$	۳/۶۲	۴/۷۰	۱۰/۰۴	۲۸/۸۰	تحرك سریع (%)
۰/۵۶	۱۱/۳۸	۳۰/۹۳	۵/۶۸	۳۲/۲۶	تحرك آهسته (%)
$<0/0001$	۴/۰۶	۱۵/۹۳	۳/۷۹	۱۰/۸۳	تحرك درجا (%)
$<0/0001$	۱۲/۲۳	۲۱/۹۳	۱۲/۲۹	۴۴/۱۰	مرفولوژی طبیعی (%)

جدول ۲: میزان فراوانی پارامترهای اسپرم قبل و بعد از شستشو به روش Swim-up در دو گروه بارور و نابارور

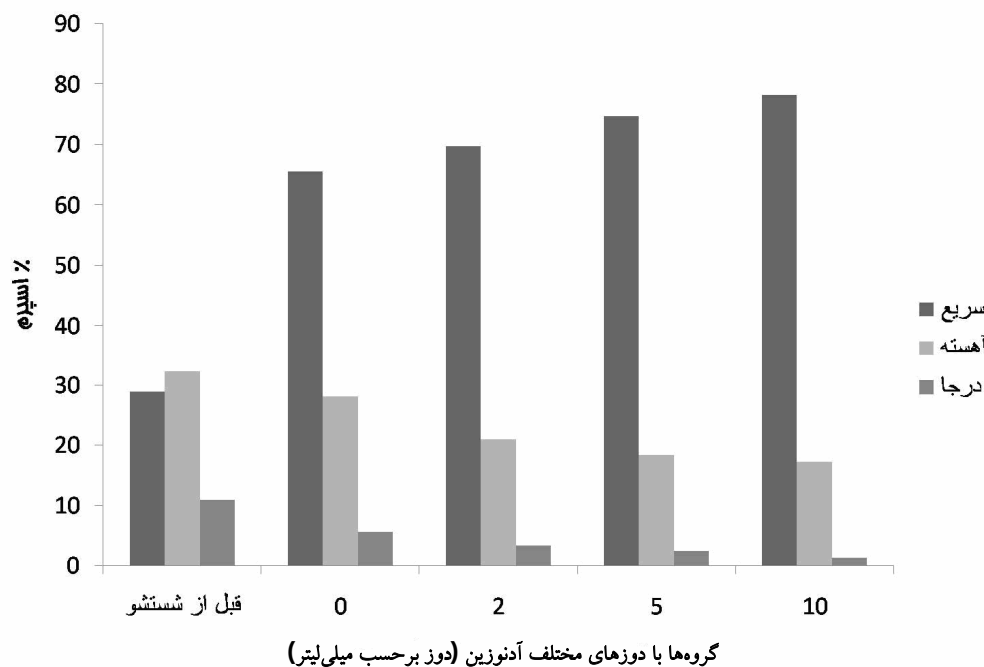
P-Value	قبل از شستشو		پارامترهای اسپرم
	بعد از شستشو (0)	میانگین $\pm$ انحراف معیار	
$<0/0001$	۶۴/۰۶ $\pm$ ۳۷/۱۷	۹۸/۴۳ $\pm$ ۴۶/۱۴	بارور
$<0/0001$	۱۹/۹۶ $\pm$ ۱۱/۱۷	۴۲/۷۶ $\pm$ ۳۰/۰۲	نابارور
$<0/0001$	۶۵/۴۳ $\pm$ ۱۴/۰۳	۲۸/۸۰ $\pm$ ۱۰/۰۴	بارور
$<0/0001$	۱۹/۹۰ $\pm$ ۱۴/۲۴	۴/۷۰ $\pm$ ۳/۶۲	نابارور
۰/۰۴	۲۸/۰۳ $\pm$ ۱۲/۴۰	۳۲/۲۶ $\pm$ ۵/۶۸	بارور
$<0/0001$	۴۵/۲۳ $\pm$ ۱۳/۷۵	۳۰/۹۳ $\pm$ ۱۱/۳۸	نابارور
$<0/0001$	۵/۵۰ $\pm$ ۷/۷۶	۱۰/۸۳ $\pm$ ۳/۷۹	بارور
۰/۴۵	۱۴/۵۶ $\pm$ ۱۰/۰۸	۱۵/۹۳ $\pm$ ۴/۰۶	نابارور

۲ میلی‌لیتر تاثیر چشمگیری ندارد ($P=0/08$). در حالی که دوزهای ۵ میلی‌لیتر نسبت به ۲ میلی‌لیتر و صفر و همچنین دوز ۱۰ میلی‌لیتر نسبت به سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0/0001$). در گروه نابارور نیز نتایج مشابه‌ای وجود داشت به این صورت که با افزایش دوز آدنوزین تحرك سریع اسپرم بهبود یافت. با این تفاوت که دوز ۱۰ میلی‌لیتر

این درحالی است که در گروه نمونه‌های نابارور فقط دوز ۵ میلی‌لیتر نسبت به دوز ۲ میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری داشت ($P=0/001$) و بیشترین تعداد اسپرم مربوط به این دوز می‌باشد ($21/6 \times 10^6$) ولی دوزهای مختلف با یکدیگر اختلاف چشمگیری نداشتند. این مطالعه در مورد پارامتر تحرك سریع اسپرم در گروه بارور نشان داد که دوز

۱۰ میلی لیتر نسبت به ۲ میلی لیتر و صفر توانست اسپرم‌های بی‌تحرک را به‌طور معنی‌داری کاهش دهند. در گروه نابارور، دوزهای ۵ میلی لیتر و ۱۰ میلی لیتر نسبت به صفر و نیز دوز ۵ میلی لیتر نسبت به ۲ میلی لیتر اختلاف معنی‌داری را نشان داد و در بقیه‌ی دوزها با یکدیگر رابطه‌ای نداشتند. داده‌ها در این پارامتر نشان داد که آدنوزین برای تاثیر بر اسپرم‌های بی‌تحرک در نمونه‌های افراد نابارور نیاز به دوزهای بالاتری دارد. با افزایش دوز آدنوزین، شاهد افزایش درصد اسپرم با تحرک سریع بودیم. نکته‌ی قابل توجه این‌که با افزودن ۲ میلی لیتر آدنوزین، در هر گروه ۶ مورد کاهش درصد و ۵ مورد عدم تغییر را شاهد بودیم که با افزایش دوز به ۵ میلی لیتر، ۲ مورد کاهش درصد تحرک سریع و ۲ مورد عدم تغییر در هر دو گروه تقلیل یافت.

نسبت به دوزهای ۲ و ۵ میلی لیتر تفاوتی نداشت و بیشترین اثر آدنوزین در دوز ۵ میلی لیتر مشاهده شد ($28/3 \pm 3$ درصد). در این مطالعه آدنوزین میزان درصد اسپرم با تحرک آهسته در گروه بارور را به صورت چشمگیری کاهش داد و این کاهش با افزایش دوز آدنوزین شدت کمتری یافت، به‌طوری‌که در دوز ۱۰ میلی لیتر نسبت به ۵ میلی لیتر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P=0/34$). اگرچه این میزان در دوز ۱۰ میلی لیتر ($17/2 \pm 2$) کمتر از ۵ میلی لیتر ($18/3 \pm 1/9$) بود. در گروه نابارور آدنوزین هیچ تاثیری بر این پارامتر نداشته، حتی دوز ۱۰ میلی لیتر نیز توانست از میزان درصد اسپرم با تحرک آهسته بکاهد. این درحالی‌است که دوز ۱۰ میلی لیتر بیشترین تاثیر را در بین سایر دوزها نشان داد ($P=0/09$). در گروه بارور، آدنوزین در دوز ۵ میلی لیتر نسبت به صفر و نیز دوز



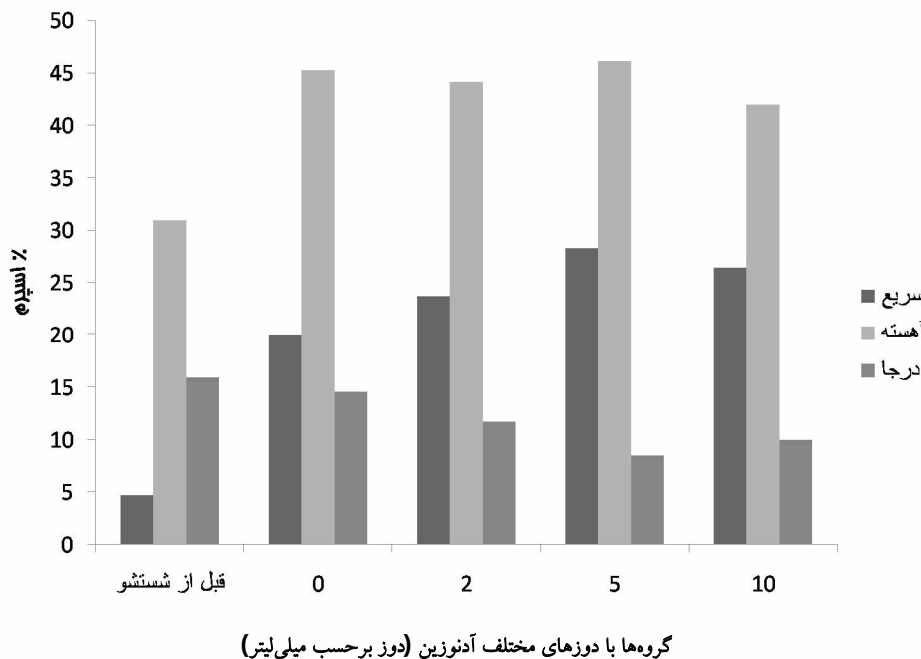
نمودار ۱: نمودار میانگین‌های پارامترهای تحرک در دوزهای مختلف آدنوزین در گروه بارور

تحرک سریع وجود داشت (۷ مورد در گروه بارور و ۱۶ مورد در گروه نابارور) که در گروه ۲ میلی لیتر نسبت به صفر و نیز ۵ میلی لیتر نسبت به ۲ میلی لیتر این تعداد انگشت شمار بود

این مورد با دوز ۱۰ میلی لیتر بسیار کمتر شد ولی در گروه نابارور به ۵ مورد افزایش یافت. همچنین در افزایش دوز از ۵ میلی لیتر به ۱۰ میلی لیتر، ۲۳ مورد کاهش درصد اسپرم با

(به ترتیب ۵ و ۳ مورد برای هر گروه از نمونه‌ها). نتایج مقایسه‌ی روابط بین گروه‌ها حاکی از تاثیر بیشتر آدنوزین در پارامتر تعداد اسپرم در گروه نمونه‌های بارور است ($P=0/03$) همچنین آدنوزین در دوزهای ۵ میلی‌لیتر نسبت به صفر تاثیر بیشتری در کاهش درصد اسپرم با تحرک آهسته نشان داد

(به ترتیب ۵ و ۳ مورد برای هر گروه از نمونه‌ها). نتایج مقایسه‌ی روابط بین گروه‌ها حاکی از تاثیر بیشتر آدنوزین در پارامتر تعداد اسپرم در گروه نمونه‌های بارور است ($P=0/03$) همچنین آدنوزین در دوزهای ۵ میلی‌لیتر نسبت به صفر تاثیر بیشتری در کاهش درصد اسپرم با تحرک آهسته نشان داد



نمودار ۲: نمودار میانگین‌های پارامترهای تحرک در دوزهای مختلف آدنوزین در گروه نابارور

بحث

پارامترهای تحرک را بهبود می‌بخشد. آن‌ها دریافتند که ۲ دئوکسی آدنوزین اثر بیشتری نسبت به آدنوزین داشت و تحرک پیشرونده را بیشتر بهبود بخشید (۲۵)، ادواردز و همکاران در مطالعه‌ای مشابه به این نتیجه رسیدند که افزودن ۲/۵ میلی‌مول آدنوزین تری فسفات باعث افزایش درصد اسپرم‌های متحرک می‌شود. ولی این تاثیر در اسپرم‌های غیرطبیعی کمتر از اسپرم‌های طبیعی بود. این گروه که اثر ATPe را در افراد سالم، آستروزاسپرمی و اسپرم‌های گرم شده بعد از فریز مطالعه می‌کردند، دریافتند که ATPe بر روی آگروسیتوز آکروزومی و فسفوریلاسیون تیروزین اثری ندارد.

در این مطالعه شاهد بهبود پارامتر تعداد در هر دو گروه به‌ویژه گروه افراد نابارور بودیم. ممکن است آدنوزین با اثر بر تحرک اسپرم‌ها و بهبود آن باعث شود اسپرم بیشتری در مرحله‌ی Swim-up انتخاب شود و این مساله را توجیه کند. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن آدنوزین باعث بهبود وضعیت تحرک پیشرونده‌ی اسپرم می‌شود و این اثر در اسپرم افراد بارور بیشتر از گروه نابارور می‌باشد. در مطالعه‌ی Romac آدنوزین یک افزایش ملایم در تحرک اسپرم در همه‌ی نمونه‌های نرموزواسپرمی ایجاد کرد. آن‌ها اثر مشابه‌ای را در گروه آتروزواسپرمی نیز مشاهده کردند که آدنوزین

ولی می‌تواند سرعت حرکت اسپرم در مسیر مستقیم را در افراد با نمونه‌ی اسپرمی با ضعف تحرک افزایش دهد (۱۳). در مطالعه‌ی حاضر اثر دوزهای مختلف آدنوزین بر تحرک اسپرم بررسی شد که بر اساس جستجوهای به‌عمل آمده، اولین مطالعه در نوع خود می‌باشد. یک فاکتور اصلی در موفقیت سیکل‌های ART (Assisted Reproductive Technology) فعالیت حرکتی اسپرم می‌باشد. بهبود این پارامتر سبب افزایش درصد موفقیت سیکل درمانی به‌خصوص روش‌های IUI (Intra Uterine Injection) و IVF (In Vitro Fertilization) خواهد بود (۹). در روشی دیگر جهت تشکیل جنین در آزمایشگاه، از فریز و گرم کردن مجدد اسپرم استفاده می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند که این فرآیند سبب کاهش معنی‌دار در تحرک و میزان ATP اسپرم می‌شود ولی رابطه‌ای بین میزان ATP اسپرم و میزان باروری مشاهده نشده است (۱۴). یافته‌های چان و همکاران نیز این مطلب را تایید می‌کند (۱۵). ادواردز و همکاران نیز با افزودن ATP به اسپرم‌های گرم شده بعد از فریز شاهد بهبود تحرک آن‌ها بودند (۱۳). گوته‌لیب و همکاران که میزان ATP را در اسپرم با تحرک خوب و ضعیف سنجیدند، دریافتند که این میزان را در اسپرم با تحرک ضعیف به طور معنی‌داری بیشتر است. همچنین غلظت ATP نسبت به اسپرماتوزوای زنده در گروه با تحرک خوب کمتر می‌باشد. آن‌ها دلیل آنرا افزایش مصرف ATP در اسپرم‌ها با تحرک مناسب می‌دانند (۱۶). حال اینکه اسپرم با از دست دادن ATP سرعت خود را از دست می‌دهد یا در اثر نقصی نمی‌تواند ATP خود را مصرف کند جای بررسی بیشتر دارد. سطح ATPe متغیر و وابسته به فاکتورهایی از جمله آدنوزین و حضور Ecto-ATPases که ATP را به ADP هیدرولیز می‌کند، بستگی دارد. در اپیدیدیم که اسپرم قابلیت تحرک می‌یابد سلول‌های اپیتلیال، اسپرم و نوروئیدهای اپیدیدیم منبع ATPe هستند (۱۷). لوریا این مکانیسم را پیشنهاد می‌دهد که ATPe گیرنده‌های پورینریک P2 را فعال می‌کنند

و باعث افزایش سطح کلسیم داخل سلولی می‌شوند (۱۸). در حالی که فورستا گیرنده‌های سدیمی وابسته به ATPe را عامل موثر می‌داند (۱۹). در سال ۱۹۸۷ مطالعه‌ای گسترده در خصوص میزان ATP و ارتباط آن با تحرک اسپرم انسانی توسط بیلگری انجام گرفت. او و همکارانش تحرک پیشرونده را وابسته به سطح ATP می‌دانند (۲۰) که گوته‌لیب آنرا تایید می‌کند (۲۱). ولی در جمعیت عمومی رابطه‌ی مستقیمی بین درصد تحرک، پیشرفت روبه جلو، درصد حیات و سطح ATP قایل نیستند. زیرا فاکتورهایی مثل نقص میکروتوبول‌ها و چسبندگی مایع منی را دخیل می‌دانند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که ۴ ساعت انکوباسیون غلظت ATP، درصد تحرک و حیات را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (۲۰). گوته‌لیب نیز به این نتیجه رسیده بود که ۳ تا ۵ ساعت انکوباسیون می‌تواند محتوی ATP را تا ۲۱ درصد کاهش دهد (۱۶). دی‌لامیناد و همکاران در مطالعه‌ی خود به این نتیجه رسیدند که Reactive Oxygen Species (ROS) گونه‌های واکنشی اکسیژن، تحرک اسپرم را پس از مدتی انکوباسیون کاهش می‌دهد. آن‌ها پس از افزودن ROS شاهد کاهش سریع ضربات شلاقی دم اسپرم در کمتر از یک ساعت بودند که با افت سریع ATP سلولی همراه بود. آن‌ها به این دلیل ROS را مسبب کاهش ATP می‌دانند که پس از افزودن پیرووات لاکتاز به مایع منی و انکوباسیون آن شاهد حفظ ATP در سطح نرمال بودند. بدین سبب ROS را عامل آسیب آکسونم از طریق کاهش ATP می‌دانند (۲۲). روستاتو در مطالعات خود دریافت که درصد باروری در گروهی که از اسپرم درمان شده با ATPe استفاده شده بود به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل است. اگرچه مشخص نیست که اسپرم درمان شده با ATPe مسوول موفقیت باروری باشد ولی این نتایج نشان می‌دهند که استفاده از ATPe برای اسپرم انسانی در پروسه IVF می‌تواند تضمین کننده باشد (۱۲).

نتیجه‌گیری

در نهایت، با توجه به یافته‌های این مطالعه به نظر می‌رسد که افزودن ۵ میلی گرم آدنوزین به مایع منی در محیط آزمایشگاه می‌تواند روش موثری برای بهبود پارامتر تحرک اسپرم مردان نابارور باشد. شاید بتوان در مواردی، تحرک ضعیف اسپرم مردان نابارور را به حد نرمال رساند و پروسه درمانی ساده‌تر و کم‌هزینه‌تری را به آن‌ها توصیه نمود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از زحمات کلیه پرسنل آزمایشگاه آندرولوژی مرکز ناباروری یزد، خصوصاً آقای قاسم‌زاده، خانم حبیبه قیصری و نیز آقای زارع بابت مشاوره‌ی آماری صمیمانه تشکر می‌شود.

References

- 1- World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction. England: Cambridge University Press; 1999.
- 2- Kalantar SM, Lenton EA. Evaluating the ability of biological substances for induction of acrosome reaction in normospermic sample. *Midd East Fertil Soci J*. 2000; 5: 71-8.
- 3- Bongso TA, Ng SC, Mok H, Lim MN, Teo HI, Wong PC. The influence of sperm motility on human in vitro fertilization. *Arch Andro*. 1989; 22: 158-90
- 4- Tucker MJ, Chan YM, Wong CYJ, Leong MKH, Leung CKM. Routine intrauterine insemination and the effect of spermatozoa washing as assessed by computer assisted semen analyzer. *Int J Fertile*. 1991; 36: 113-20.
- 5- Khalili MA, Vahidi S, Fallahzade H. The effect of pentoxifylline on motility of spermatozoa from asthenozoospermic samples: fresh ejaculates, cryopreserved ejaculates, epididymal and testicular. *Midd East Fertil soci J*. 2001; 144-51.
- 6- Tasdemir I, Tasdemir M, Tavukcuoglu S. Effect of pentoxifylline on immotile testicular spermatozoa. *J assist reprod genet* 1998; 15: 90-2.
- 7- Temple-Smith PD, Southwick GJ, Yates CA, Trounson AO, Dekretser DM. Human pregnancy by in vitro fertilization using sperm aspirated from epididymis. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1985; 2: 119-22.
- 8- Tournaye H, Liu J, Nagy PZ. Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Hum Reprod*. 1996; 11: 127-32.
- 9- Khalili MA, Vahidi S. The effect of pentoxifylline on motility and morphology of spermatozoa from epididymal and testicular samples of infertile men. *J Reprod Infertil*. 2000; 1: 64.
- 10- Burnstock G. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol*. 2006; 147: S172-181.
- 11- Zheng RL, Zhang H. Effects of ferulic acid on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm motility, viability, lipid peroxidation, and cyclic nucleotides. *Free Radic Biol Med*. 1997; 22: 581-6.

- 12- Miranda E, Buffone MG, Edwards SE, et al. Extracellular Adenosine 50-triphosphate alters motility and improves the fertilizing capability of mouse sperm. *Biol Reprod.* 2008; 79: 164-71.
- 13- Edwards SE, Buffone MG, Knee GR, et al. Effects of extracellular adenosine 5'-triphosphate on human sperm motility. *Reprod Sci.* 2007; 14: 655-66.
- 14- Bosman E, du Toit D, Wessels PH, Bornman MS, du Plessis DJ. Sperm adenosine triphosphate concentrations before and after freezing as a marker of cryolysis. *Arch Androl.* 1994; 33: 7-10.
- 15- Chan SY, Chan YM, Tucker MJ, Leong MK, Leung CK. The diagnostic value of seminal adenosine triphosphate (ATP) in an in vitro fertilization (IVF) program. *Andrologia.* 1990; 22: 531-7.
- 16- Gottlieb C, Svanborg K, Bygdeman M. Adenosine triphosphate (ATP) in human spermatozoa. *Andrologia.* 1991; 23: 421-5.
- 17- Shariatmadari R, Sipila P, Vierula M, Tornquist K, Huhtaniemi I, Poutanen M. Adenosine triphosphate induces Ca²⁺ signal in epithelial cells of the mouse caput epididymis through activation of P2X and P2Y purinergic receptors. *Biol Reprod.* 2003; 68: 1185-92.
- 18- Luria A, Rubinstein S, Lax Y, Breitbart H. Extracellular adenosine triphosphate stimulates acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa via P2 purinoceptor. *Biol Reprod.* 2002; 66:429-37.
- 19- Foresta C, Rossato M, Di Virgilio F. Extracellular ATP is a trigger for the acrosome reaction in human spermatozoa. *J Biol Chem.* 1992; 267: 19443-7.
- 20- Bilgeri YR, Winckelmann A, Berzin M, Lyons G, Reinach SG. Adenosine triphosphate levels in human spermatozoa. *Arch Androl.* 1987; 18: 183-8.
- 21- Gottlieb C, Svanborg K, Eneroth P, Bygdeman M. Adenosine triphosphate in human semen: a study on conditions for a bioluminescence assay. *Fertil Steril.* 1987; 47: 992-9.
- 22- de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl.* 1992; 13: 379-86.
- 23- Younglai EV, Holt D, Brown PB, Jurisicova A, Casper RF. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Human Reproduction.* 2001; 16: 1950-53
- 24- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 2010.
- 25- Romac P, Zanic-Grubftic T, Culic O, Cvitkovic P. and Flogel M. Sperm motility and kinetics of dynein ATPase in astheno- and normozoospermic samples after stimulation with adenosine and its analogues. *Human Reprod.* 1994; 9: 1474-8.

Effects of Different Doses of Adenosine on Sperm Motility in Infertile Men

Vahidi AR¹, Khalili MA¹, Amini-rad O²

¹Research and Clinical Center for Infertility, Shaheed Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

²Shaheed Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

Corresponding Author: Khalili MA, Research and Clinical Center for Infertility, Shaheed Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

E-mail: khalili59@hotmail.com

Received: 5 Sep 2010 **Accepted:** 24 Jan 2011

Background and objective: One of the causes of male infertility is the lack of proper mobility. One way to deal with this problem is to add adenosine to human sperms in the laboratory. Therefore, this study aimed to determine the effect of different doses of adenosine on sperm motility in the ejaculates of fertile and infertile individuals.

Materials and Methods: In this experimental laboratory study, 60 samples of seminal fluid of infertile and fertile men who referred to Yazd Infertility Center were analyzed according to WHO guidelines. Sperm counts, morphology and motility (fast, slow and immotile) were studied. After using Swim-up technique, the washed samples were divided into 4 groups, containing doses of 0, 2, 5 and 10 mg adenosine. The sperm parameters were evaluated after the addition of adenosine. Data were analyzed statistically using paired T-test and independent T-test.

Results: The initial assessment indicated significant differences in sperm parameters, except for slow motility between the two groups. In fertile group, dose of 5 mg adenosine increased sperm count, and rapid motility, but lowered the rates of sperm immotility at doses of 5 and 10 mg. In the infertile group, sperm count improved at dose of 5 mg adenosine, but it showed no effect on slow sperm motility. 5 mg adenosine also improved rapid sperm motility, but dose of 10 mg had no effect. Both 5 and 10 mg adenosine significantly lowered rates of immotile sperms.

Conclusion: Based on the results of this study, it can be concluded that addition of 5 mg adenosine to washed sperms can improve sperm motility of infertile men in vitro.

Keywords: Adenosine, Sperm motility, Male infertility