

تأثیر ضایعه نخاعی مزمن بر فراساختار اسپرم‌های اپیدیدیمی رت

✍ **علیرضا طالبی Ph.D.*، محمد علی خلیلی Ph.D.**، مریم دهقان M.Sc.**، احمد حسینی Ph.D.*****
* گروه بیولوژی و علوم تشریحی و مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ایران
** گروه بیولوژی و علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ایران
*** گروه علوم تشریحی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
تاریخ وصول: خردادماه ۸۸، تاریخ پذیرش: مردادماه ۸۸

چکیده

هدف: مطالعه تأثیر ضایعه نخاعی مزمن بر فراساختار اسپرم‌های اپیدیدیمی در مدل حیوانی رت
مواد و روش‌ها: تعداد ۴۵ رت نر بالغ از نژاد ویستار انتخاب و به سه گروه SCI (spinal cord injury)، شم و کنترل تقسیم شدند. گروه SCI به دنبال لامینکتومی در سطح T10 و رهاسازی وزنه ۱۵ گرمی از ارتفاع ۱۰ سانتیمتری دچار ضایعه نخاعی شدند. در گروه شم تنها عمل لامینکتومی انجام شد و در گروه کنترل هیچ عملی انجام نشد. پس از هشت هفته اسپرم‌های اپیدیدیمی هر سه گروه به دست آمده وارد مراحل ثبوت اولیه و ثانویه، آبگیری، آغشته‌سازی، قالب‌گیری اولترامیکروتومی و رنگ‌آمیزی برای بررسی به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM: Transmission electron microscopy) شدند.
یافته‌ها: در بررسی میکروسکوپ الکترونی ناهنجاری خاصی در گروه‌های کنترل و شم مشاهده نشد. در گروه SCI طیف وسیعی از ناهنجاری‌ها همانند وجود نواحی متورم در غشا، پارگی و لیز شدن غشا، انجام واکنش آکروزومی، وجود قطرات سیتوپلاسمی، کاهش دانسیته الکترونی هسته، تورم میتوکندری، فقدان دو یا چند میکروتوبول آکسونمال، حذف دو یا چند فیبر متراکم خارجی، به هم ریختگی عناصر داخلی دم، تغییرات آپوپتیک و نکروتیک در سر و دم اغلب اسپرم‌ها مشاهده شد.
نتیجه‌گیری: مشاهدات میکروسکوپ الکترونی نشان داد که ضایعه نخاعی مزمن سبب ایجاد انواع ناهنجاری‌ها در اسپرم‌های اپیدیدیمی می‌شود. این تغییرات می‌تواند کاهش کیفیت اسپرم و در نتیجه کاهش پتانسیل باروری را در ضایعه نخاعی به دنبال داشته باشد.

کلید واژه‌ها: ضایعه نخاعی مزمن، فراساختار، اسپرم اپیدیدیمی، رت

مقدمه

دنبال ضایعه نخاعی، عصب‌دهی اتونوم اپیدیدیم نیز مختل می‌شود، اسپرم‌ها به مدت طولانی در این ارگان باقی مانده و فراساختار آن‌ها تحت تأثیر مخرب گونه‌های فعال اکسیژن Reactive oxygen species (ROS) قرار می‌گیرند. ضایعه نخاعی (SCI) حادثه‌ای همراه با عواقب متعدد و غیرقابل پیش‌بینی برای بیمار، خانواده و اجتماع است. بیماران

کاهش باروری به عنوان یکی از مشکلات اساسی بیماران ضایعه نخاعی (SCI) محسوب می‌شود. کاهش کیفیت اسپرم همانند کم شدن قابلیت حیات، کاهش میزان تحرک و افزایش درصد اسپرم‌هایی با مرفولوژی ناهنجار به عنوان دلایل اصلی ناباروری در وضعیت SCI عنوان می‌شوند. از آنجایی که به

✍ آدرس مکاتبه: یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری، گروه بیولوژی و علوم تشریحی
E-mail: prof_talebi@ssu.ac.ir

SCI اغلب مرد بوده و اغلب در سنین ۳۰-۱۹ سال یعنی سنین باروری قرار دارند [۱]. ناباروری یکی از مشکلات مردانی است که دچار SCI شده‌اند. عدم انزال مناسب و کاهش کیفیت مایع منی به عنوان دلایل اصلی ناباروری در این بیماران بیان می‌شود [۱ و ۲]. مطالعات انسانی و حیوانی نشان‌دهنده کاهش کیفیت اسپرم در وضعیت ضایعه نخاعی هستند [۳-۲]. پاتکی (Patki) و همکاران در سال ۲۰۰۷ پارامترهای مایع منی بیماران SCI را مطالعه کرده و اختلال در تولید اسپرم، بلوغ، ذخیره و انتقال اسپرم را به دلیل اختلالات نورواندوکراین در این افراد بیان کردند [۴]. کاهش قابلیت حیات و میزان تحرک، ضعف در نفوذ به موکوس سرویکس، بروز نکروز و آپوپتوز و افزایش ناهنجاری‌های مرفولوژیکی اسپرم از موارد قابل ذکر در نمونه‌های اسپرم مردان SCI هستند [۱، ۵، ۲ و ۶].

کاهش کیفیت مایع منی به دنبال ضایعه نخاعی به دلایل متعددی ایجاد می‌شود که عبارتند از: عدم انزال و کاهش تحرک مایع پروستاتی [۷ و ۸] عفونت مجاری ادراری - تناسلی [۷]، تماس ادرار و مایع منی [۸]، وجود آنتی‌بادی‌های ضداسپرم [۹]، استفاده مزمین از داروها [۲]، تغییر اجزای مایع منی [۱۰]، افزایش درجه حرارت بیضه [۱۱]، آپوپتوز فراوان [۱۲]، تغییرات هورمونی [۱۳]، قطع عصب‌دهی [۱۴] و اسپرماتوژنز ناهنجار [۱۵]. مسلماً تغییرات کیفی و کمی اسپرم در وضعیت SCI با اختلال در اسپرماتوژنز ارتباط مستقیم دارند [۱۴ و ۱۵]. مهمترین تأثیرات ضایعه نخاعی بر بافت بیضه، آتروفی لوله‌های منی‌ساز، اسکروز بافت بینابینی، کاهش اسپرماتوژنز، کاهش اسپرماتیدها، وجود اختلالات هسته‌ای در سلول‌های ژرمینال و اختلال در روند آزاد شدن اسپرم بیان شده است [۲].

طی روند اسپرمیوژنز، تجدید مرفولوژی سیتوپلاسم و هسته اسپرماتید صورت پذیرفته و سلولی کاملاً تخصص یافته و متحرک به نام اسپرماتوزوئید ایجاد می‌شود. در روند تمایزی

اسپرمیوژنز که در انسان ۲۱ روز و در رت ۱۲ روز به طول می‌انجامد، سلول گرد اسپرماتید متحمل تغییراتی همانند طول شدن هسته، متراکم شدن کروماتین، تشکیل قطعات میانی اصلی و انتهایی، دم، تشکیل آکروزوم و کاهش سیتوپلاسم می‌شود [۱۶]. هسته اسپرم در روند اسپرمیوژنز متراکم شده، اما تمام متراکم شدن هسته در این مرحله انجام نمی‌شود. به همین دلیل، در این مرحله واکوئل‌های هسته‌ای نیز مشاهده شده که نشانگر مناطقی از هسته هستند که عمل متراکم شدن در آنجا صورت نگرفته است. گردن اسپرم از ۹ ستون قطعه‌ای تشکیل شده، که هر ستون، خود نیز ۹ قطعه شده است. مجموعه دم شامل سه قسمت است: در قسمت میانی (middle piece)، ۹ ستون به نام رشته‌های متراکم خارجی (outer dens fiber) با ستون‌های قطعه‌ای ادامه یافته و در قطعه انتهایی نیز دیده می‌شوند. در مقابل هریک از رشته‌های متراکم خارجی یک جفت میکروتوبول محیطی آکسونم قرار گرفته که مجموعاً کمپلکس آکسونم- فیبرهای متراکم خارجی را تشکیل می‌دهند. در اطراف رشته‌های متراکم خارجی، میتوکندری‌هایی قرار گرفته‌اند که مجموعه‌ای به نام غلاف میتوکندریایی را در این بخش تشکیل می‌دهند. در انتهای مجموعه فوق غشای اسپرم چین خوردگی را به نام Retro Anulus Recess ایجاد می‌کند. خصوصیات ساختمانی قسمت اصلی (principal piece)، مشابه قسمت میانی اما فاقد میتوکندری است و قسمت اعظم دم را می‌سازد. بلافاصله در زیر غشای اسپرم حلقه‌های متحدالمرکزی به نام غلاف فیبرو (Fibrous Sheath) دیده شده است که رشته‌های متراکم خارجی شماره‌های ۳ و ۸ به این صفحه متصل شده و دو ستون به نام ستون‌های طولی قدامی و خلفی ایجاد می‌کنند. در اثر اتصال رشته‌های متراکم خارجی شماره ۳ و ۸ به این صفحه‌ها، دو بخش ایجاد می‌شود که به ترتیب اجزای کوچک و بزرگ (minor and major compartments) نامیده می‌شوند. در قسمت انتهایی دم اسپرم، رشته‌های متراکم

موضوع در SCI کمتر مورد توجه قرار گرفته است؛ در حالی که اطلاعات موجود نشان‌دهنده تأثیرات نامطلوب ضایعه نخاعی بر ساختار کروماتین و DNA هسته اسپرم هستند. افزایش گلوبول‌های سفید در مایع منی، افزایش میزان ROS و همچنین قطع عصب‌دهی بیضه و اپیدیدیم در این بیماران از مواردی هستند که هرکدام به تنهایی می‌توانند سبب بروز ناهنجاری‌های هسته و سایر بخش‌های اسپرم شوند. بنابراین، با توجه به اهمیت کیفیت کروماتین و فراساختار اسپرم در پتانسیل باروری و با در نظر گرفتن کاهش باروری در وضعیت SCI، انجام تحقیقی در این زمینه ضرورتی انکارناپذیر است. هدف اصلی مطالعه حاضر ایجاد ضایعه نخاعی مزمن در رت و بررسی مرفولوژی اسپرم‌های ناحیه اپیدیدیم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی، تعداد 45 رت نر بالغ (نژاد ویستار، سن ۱۲ هفته و میانگین وزنی ۳۰۰ گرم) را به سه گروه مساوی کنترل، شم و SCI تقسیم شدند. حیوانات به مدت حداقل چهار هفته قبل از شروع آزمایش در شرایط نوری و حرارتی کنترل شده نگهداری شدند [۲۳].

گروه SCI: تعداد ۱۵ رت توسط تزریق داخل عضلانی (۱۰ mg/kg) زایلازین و (۸۰ mg/kg) کتامین بیهوش شدند [۶]. پس از مشخص شدن مهره T10 توسط لمس، پوست حیوان را تراشیده و تحت شرایط استریل با ایجاد برش، لایه‌های عضلانی و استخوان مهره‌های سینه‌ای برداشته شده و عمل لامینکتومی در زیر میکروسکوپ استریو (Zeiss, Germany) انجام شد. سپس با فورسپس مناسب مهره‌های T9-T11 ثابت شده و طناب نخاعی به همراه پوشش سخت شامه برای ایجاد ضایعه نخاعی مشخص شد [۱۴ و ۲۴]. برای انجام ضایعه

خارجی و غلاف فیبرو مشاهده نشده است و فقط ساختمان آکسونم دیده می‌شود [۱۷].

اسپرم پس از تولید در بیضه توانایی‌های لازم را برای باروری تخمک دارا نبوده و باید متحمل یک سری تغییرات شده تا برای انجام لقاح آماده شود [۱۷]. عبور از اپیدیدیم در اغلب گونه‌ها ۱۲-۶ روز طول کشیده و اسپرم متحمل تغییرات عمیقی می‌شود. اسپرم‌های وارد شده به سر اپیدیدیم تقریباً فاقد حرکت هستند اما اسپرم‌های موجود در دم این عضو فعال شده و دارای حرکت پیشرونده هستند. تغییرات مذکور هم در مرفولوژی و هم در بیوشیمی اسپرم انجام می‌شود. اپیدیدیم علاوه بر ایجاد تحرک، سبب ایجاد تراکم کروماتین در هسته اسپرم نیز می‌شود [۱۶]. در بیضه پستانداران طی فاز اسپرمیوژنز هیستون‌های متصل به DNA توسط پروتئین‌های بازی به نام پروتامین جایگزین شده و این امر سبب ایجاد تراکم در کروماتین و توقف نسخه‌برداری می‌شود. در فاز عبور اپیدیدیمی اسپرم، گروه‌های تیول (SH-) پروتامین اکسید شده و در بین و داخل این مولکول‌ها، باندهای دی‌سولفیدی فراوانی تشکیل می‌شود. وجود این پل‌های دی‌سولفیدی برای ایجاد تراکم نهایی و پایداری کروماتین اسپرم ضروری است [۱۸]. هر گونه اختلالی در پروسه ایجاد تراکم کروماتین اسپرم می‌تواند سبب ایجاد ضایعه در DNA شده و پتانسیل باروری اسپرم را متأثر سازد [۱۹]. مطالعات نشان‌دهنده افزایش درصد اسپرم‌هایی با کروماتین غیرطبیعی و DNA ناهنجار در افراد نابارور نسبت به افراد بارور است [۲۰]. اونسون (Evenson) نشان داده است که هرگاه در بیش از ۳۰ درصد اسپرم‌ها، ناهنجاری‌های کروماتین، مانند شکستگی DNA وجود داشته باشد، نمونه مذکور نابارور می‌شود [۲۱]. براکت (Brackett) و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که درصد زیادی از اسپرم‌های بیماران SCI دارای ضایعات DNA هستند [۲۲]. با وجود اهمیت فراوان فراساختار اسپرم و روند تراکم کروماتین در باروری، این

قرار گرفتند و در آن‌ها هیچ ضایعه نخاعی ایجاد نشد. کلیه مراحل عمل لامینکتومی نیز همانند گروه SCI بوده و مراقبت‌های ویژه پس از عمل، به‌جز تخلیه روزانه مثانه در این حیوانات نیز صورت پذیرفت. رت‌های گروه شم به مدت ۵۶ روز پس از عمل جراحی، به‌صورت انفرادی در قفس‌های تمیز نگهداری شدند.

گروه کنترل: در این گروه حیوانات بدون هیچ‌گونه عمل جراحی یا تزریق، به مدت ۵۶ روز در قفس‌های تمیز نگهداری شدند.

نمونه‌گیری

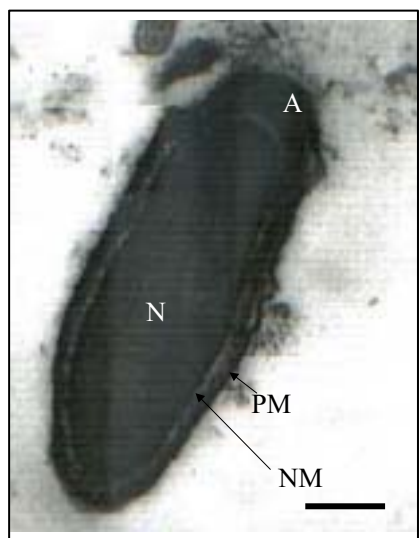
برای نمونه‌برداری، دم اپیدیدیم را به ابعاد 2×2 میلی‌مترکه محتوی تعداد بسیار زیادی اسپرم است، توسط عمل جراحی در هر سه گروه از بدن حیوانات خارج کرده و بلافاصله مراحل آماده سازی نمونه میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) به صورت زیر انجام شد [۲۵]:

بعد از تهیه نمونه‌ها، برای انجام ثبوت اولیه به مدت حداقل ۲ ساعت در محلول گلو تار آل‌دئید ۲/۵ درصد در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. در مرحله شستشو، برای خارج نمودن محلول گلو تار آل‌دئید از بافت، نمونه‌ها توسط بافر فسفات ۰/۱ مولار به مدت نیم ساعت شستشو داده شدند. برای ثبوت ثانویه، نمونه‌ها در محلول تتراکسیداسمیوم ۱ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار به مدت ۲ ساعت قرار داده شدند. سپس شستشوی سریع با بافر فسفات ۰/۱ مولار ۳ مرتبه انجام شد. در مرحله آبگیری برای خارج نمودن آب بافت، نمونه‌ها از غلظت‌های رو به افزایش استن عبور داده شدند و مدت توقف نمونه‌ها در هر استن به میزان ۳۰ دقیقه محاسبه شد. در مرحله آغشتگی با رزین، نمونه‌های آبگیری شده به تدریج و در سه مرحله توسط مونومرهای پلاستیکی مایع جایگزین شدند. در مرحله بعد قالب‌گیری نمونه‌ها انجام شد به‌طوری که در هر

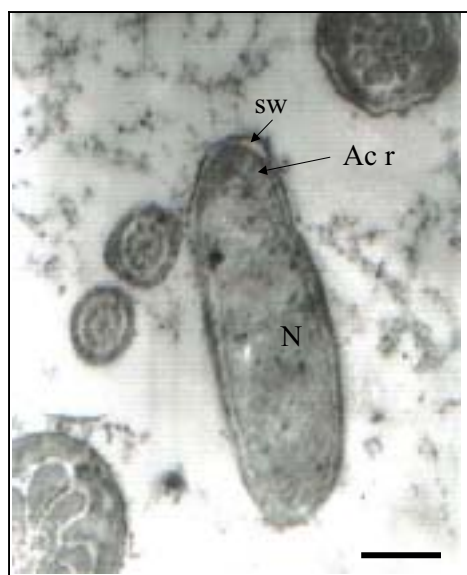
نخاعی، وزنه ۱۵ گرمی و با سطح مقطع ۲ میلی‌متری، از ارتفاع ۱۰ سانتیمتری در داخل یک استوانه توخالی رها شد و پس از برخورد با نخاع و بروز ضایعه، بلافاصله از محل برداشته شد. بروز صدمه به نخاع و پرده‌های پوشاننده این ارگان، با مشاهده کبودی توسط میکروسکوپ استریو تأیید شد [۱۴ و ۱۵]. محل ضایعه توسط سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و لایه‌های عضلانی، فاشیا و پوست پشت حیوان بخیه زده شد و سپس محل بخیه توسط محلول بتادین و آب اکسیژنه ۲ درصد ضد عفونی شد. به حیوان ۱۰ میلیلیتر سرم فیزیولوژیکی به صورت زیر جلدی و $3/33 \text{ mg/kg}$ آنتی‌بیوتیک سفازولین به‌صورت داخل عضلانی تزریق شد [۲۴] و تا به هوش آمدن کامل، حیوان روی تشک گرم قرار داده شد [۲۴]. عکس‌العمل اختلالات حسی و حرکتی در اندام‌های تحتانی با فرو بردن سوزن در پای حیوان مشاهده شد. همچنین حیوان را روی یک سطح صاف قرار داده و نحوه حرکت اندام‌های تحتانی ارزیابی شد. در ارتباط با میزان حرکت اندام‌های تحتانی و در نتیجه مشخص شدن شدت ضایعه، از رتبه‌بندی Tarlov استفاده شد. در این رتبه‌بندی حداکثر شدت ضایعه و در نتیجه پارالیز کامل اندام‌های تحتانی در رتبه صفر قرار گرفت و به ترتیب با کاهش شدت ضایعه و کم شدن میزان اختلالات حرکتی، رتبه مربوط به ۶ رسید [۱۵]. رت‌ها تحت مراقبت ویژه‌ای مانند تخلیه مثانه و ضد عفونی کردن آلت تناسلی، استریل نمودن محل زخم، استفاده از مولتی‌ویتامین در آب آشامیدنی و اضافه نمودن میوه به جیره غذایی، مشاهده حال عمومی و رنگ ادرار، پس از عمل جراحی برای یک تا دو هفته قرار گرفتند. در نهایت حیوانات گروه SCI به مدت ۵۶ روز (بیشتر از یک دوره اسپرماتوژنز در رت) به‌صورت انفرادی در قفس‌های تمیز تحت مراقبت قرار گرفتند [۱۵].

گروه شم: در این گروه حیوانات تنها مورد عمل لامینکتومی

میکروتوبول‌ها به فرم (۲+۹) و فیبرهای متراکم خارجی به صورت طبیعی و در ۹ دسته مشاهده شدند. (شکل ۲)



شکل ۱. میکروگراف سر یک اسپرم اپیدیدی در گروه کنترل: در این تصویر، غشای سیتوپلاسمی اطراف سر به فرم طبیعی و یکدست (P.M)، آکروزوم مشخص با غشای سالم در ناحیه قدام سر (A) کروماتین کاملاً متراکم و یکدست (N) و غشای هسته (NM) به صورت طبیعی قابل مشاهده است (بار: ۰/۳۳ میکرون).



شکل ۲. میکروگراف برش طولی قطعه میانی اسپرم اپیدیدی در گروه کنترل: در این تصویر غشای سیتوپلاسمی به فرم طبیعی و یکدست، میتوکندری‌ها به صورت مارپیچ و بدون فاصله در زیر غشاء سیتوپلاسمی، کمپلکس میکروتوبولهای آکسونمال و فیبرهای متراکم خارجی قابل تشخیص هستند (بار: ۰/۴ میکرون).

قالب یک نمونه از بافت قرار داده و رزین در قالب‌ها ریخته شد، سپس برای پلیمریزاسیون رزین و تهیه بلوک، قالب‌ها در آون ۶۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. پس از پلیمریزاسیون، بلوک‌های تهیه شده از قالب خارج و با استفاده از تیغ در زیر استریومیکروسکوپ اصلاح شدند. بدین ترتیب که رزین‌های اضافه اطراف نمونه به تدریج برداشته شدند تا اینکه بافت داخل رزین به صورت یک دوزنقه کوچک درآید. در مرحله برش‌گیری توسط اولترامیکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۵۰ نانومتر تهیه شدند (به رنگ نقره‌ای) و روی گریدهای ۲۰۰ مش منتقل شدند. سپس برای رنگ‌آمیزی گریدها از سترات سرب و اورانیل استات استفاده شد و پس از رنگ‌آمیزی مقاطع روی گریدها و خشک شدن آنها، نمونه‌ها برای مشاهده و بررسی به میکروسکوپ الکترونی انتقالی منتقل شدند. نمونه‌ها با بزرگنمایی‌های متفاوت بررسی و از مناطق مختلف مقاطع عکسبرداری شد.

یافته‌ها

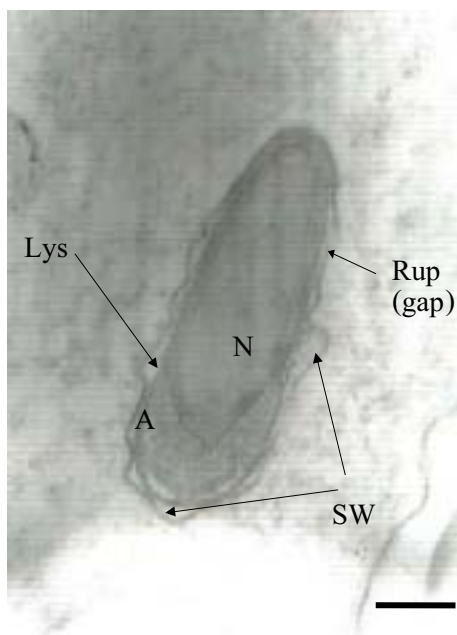
مشاهدات میکروسکوپ الکترونی در سه گروه کنترل، شم و SCI به شرح زیر انجام شد:

گروه کنترل

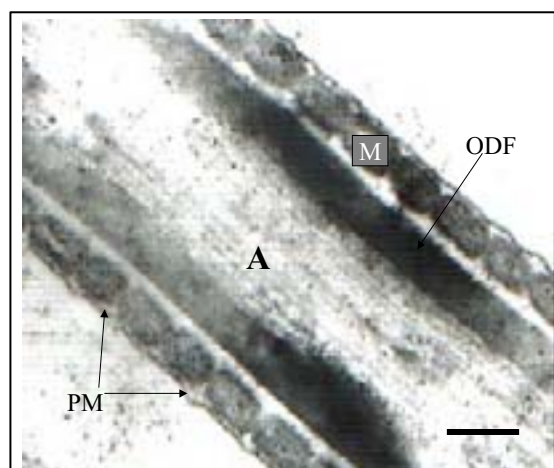
اسپرم‌های مربوط به نمونه‌های این گروه، در بررسی با TEM کلیه خصوصیات یک اسپرم طبیعی را از نقطه نظر فراساختار سر، قطعه میانی و دم نشان دادند. سر به فرم کشیده و داسی شکل با غشای سیتوپلاسمی سالم به همراه آکروزوم طبیعی و هسته‌ای با کروماتین یکدست و کاملاً متراکم به همراه غشای هسته‌ای سالم قابل تشخیص بود. (شکل ۱)

در قطعه میانی نیز میتوکندری‌ها به صورت مارپیچ و به فرم یکدست و بدون فاصله در زیر غشای سیتوپلاسمی طبیعی قابل مشاهده بوده و در مرکز این قسمت نیز کمپلکس

مختلف سر قابل تشخیص بود (شکل ۴).



شکل ۳: میکروگراف از مقطع سر اسپرم اپیدیدیمی در گروه SCI: در این شکل، غشای سیتوپلاسمی در ناحیه قدام سر و در جلو آکروزوم (Acr) به صورت کمی متورم (SW: Slightly swollen area) بوده و هسته (N) این اسپرم نیز به فرم گرانولار با دانسیته کم قابل تشخیص است. در اطراف نیز، برش‌های عرضی از نواحی پروگزیمال و دیستال قطعه اصلی دم دیده می‌شوند. (بار: ۰/۴ میکرون).



شکل ۴: میکروگراف مقطع سر اسپرم اپیدیدیمی در گروه SCI: در این تصویر غشای سیتوپلاسمی سر در نواحی چندگانه به صورت متورم (SW) مشاهده شده که در چند نقطه نیز در حال پارگی (Rup)، لیز (Lysis) و ایجاد (gap) فاصله است. آکروزوم (A) گرانولار با دانسیته کم و هسته‌ای با تراکم کم کروماتین (N) قابل تشخیص هستند. (بار: ۰/۲ میکرون).

در قطعه اصلی دم، در مرکز کمپلکس میکروتوبول‌های آکسونمال و فیبرهای متراکم خارجی در ۹ دسته و در محیط غلاف فیبر و به صورت کاملاً یکدست در زیر غشای سیتوپلاسمی طبیعی قابل مشاهده بودند. قطعه انتهایی دم نیز شامل میکروتوبول‌های آکسونمال (۹+۲) بوده که توسط غشای سیتوپلاسمی پوشیده شده بودند.

گروه شش

اسپرم‌های مربوط به نمونه‌های این گروه در بررسی با TEM همانند اسپرم‌های گروه کنترل بوده و وضعیت طبیعی را در نواحی سر، قطعه میانی و دم نشان دادند. به عبارتی تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان دادند که عمل لامینکتومی به تنهایی سبب بروز ناهنجاری‌هایی در فراساختار اسپرم‌های اپیدیدیمی رت نشده است.

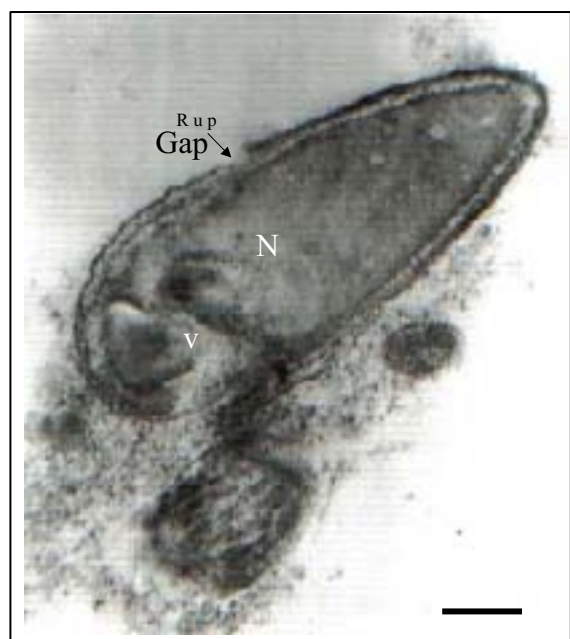
گروه SCI

در اسپرم‌های مربوط به نمونه‌های این گروه، انواع ناهنجاری‌ها از فرم بسیار خفیف تا ناهنجاری‌های بسیار شدید و در نهایت آپوپتوز، نکروز و لیز سلولی مشاهده شدند که در زیر به آن‌ها اشاره شده است.

الف) ناهنجاری‌های سر

نواحی کمی متورم (Slightly Swollen Area) در غشای سیتوپلاسمی سر: در این حالت غشای سیتوپلاسمی به میزان کمی از محل طبیعی خود جدا شده و به صورت نواحی متورم قابل مشاهده بود (شکل ۳).

در گروه دیگری از این اسپرم‌ها، این تورم و جدایی غشای سیتوپلاسمی سر به تدریج از نظر اندازه و تعداد افزایش یافته بود (شکل ۴). ناهنجاری غشا در مرحله بعد به شکل پارگی و وجود گسستگی و ایجاد فاصله در امتداد غشا، در نواحی



شکل ۶. میکروگراف مقطع سر اسپرم اپیدیمی گروه SCI: در این تصویر، هسته اسپرم (N) دچار کاهش تراکم کروماتین شده و علاوه بر این ساختارهای واکوئل ماندی (V) از کروماتین در هسته قابل مشاهده هستند. غشای سیتوپلاسمی در اثر شکست (Rup)، تمامیت خود را در بعضی از نواحی از دست داده و در امتداد آن فاصله (Gap) به وجود آمده است (بار: ۰/۳۳ میکرون).

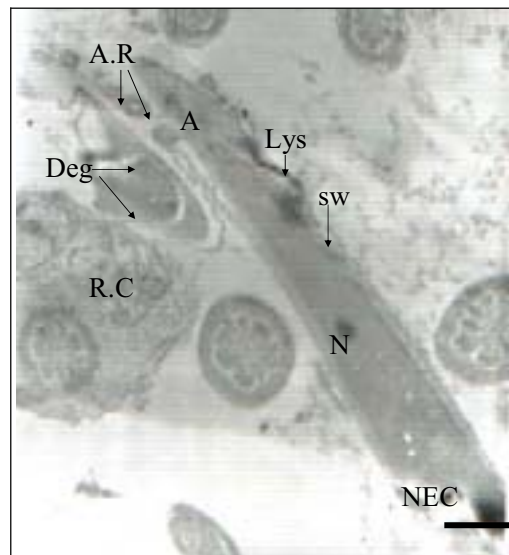
در کروماتین هسته اسپرم‌های این گروه، ناهنجاری‌های زیر مشاهده شد: وجود واکوئل در اندازه‌های مختلف در هسته به همراه کاهش تراکم کروماتین به فرم کاهش تراکم الکترونی در هسته (شکل ۵). همچنین تبدیل کروماتین به قطعات واکوئل مانند در هسته (شکل ۶) و تخلیه کروماتین از مرکز و حاشیه نشینی کروماتین در زیر غشای هسته، تبدیل کروماتین یکدست و متراکم به فرم میکروگرانولار و فیبریلار و نیز لیز کامل هسته و ایجاد آپوپتوز سلولی به همراه مشاهده اجسام آپوپتیک (شکل ۷).

ب) ناهنجاری‌های قطعه میانی (middle piece)

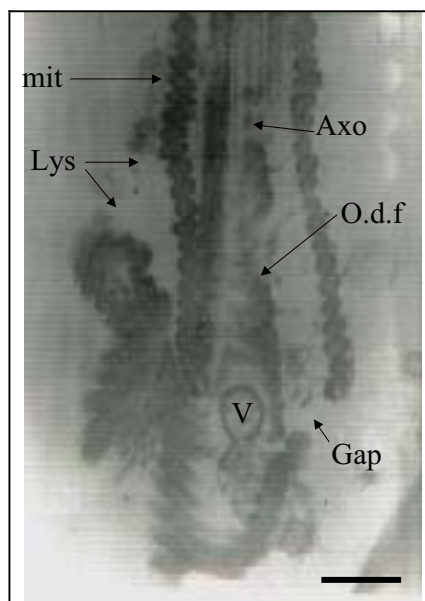
ناهنجاری‌های مشاهده شده در قطعه میانی دم اسپرم‌های گروه SCI، اغلب مربوط به کمپلکس آکسونوم-فیبرهای

همزمان با پارگی غشا، لیز غشای سلولی به صورت محوشدگی تراکم الکترونی این ساختار به فرم نقطه‌ای (Focal) یا ناحیه ای مشاهده شد (شکل ۴). ناهنجاری دیگر غشای سیتوپلاسمی سر اسپرم، انجام واکنش آکروزومی به صورت اتصال غشای سیتوپلاسمی به غشای آکروزومی بوده که به شکل پیچ خوردگی غشا در ناحیه قدام سر مشاهده شد (شکل ۵).

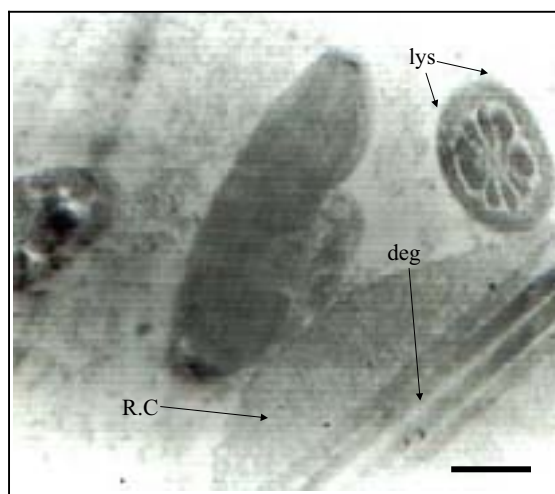
در این موارد غشای آکروزوم دچار پارگی شده و محتویات آن به بیرون تخلیه می‌شوند (شکل ۵). از موارد غیرطبیعی دیگر که در فراساختار ناحیه سر اسپرم در نمونه‌های SCI مشاهده شد، وجود سیتوپلاسم باقیمانده (Residual Cytoplasm) به میزان نسبتاً زیاد بود. در این سیتوپلاسم اضافی، قطعاتی از ارگانل‌ها به همراه واکوئل‌های متعدد سیتوپلاسمی وجود داشته و غشای سیتوپلاسمی نیز از سر فاصله زیادی گرفته بود (شکل ۵).



شکل ۵. میکروگراف مقاطع سر و دم‌های اسپرم‌های گروه SCI: در این تصویر علاوه بر نواحی متورم (SW) و لیز غشا (Lys) وجود پیچ خوردگی‌هایی در غشای ناحیه آکروزوم که نشان‌دهنده واکنش آکروزومی (A.R) هستند، جلب توجه می‌نماید. ناحیه گردن (NEC) و هسته‌ای با دانسیته کم (N)، دژنراسانس (Deg) در ناحیه سر، قطره سیتوپلاسمی (R.C) و آکروزوم پاره (A) از موارد دیگر این تصویر هستند (بار: ۰/۵ میکرون).

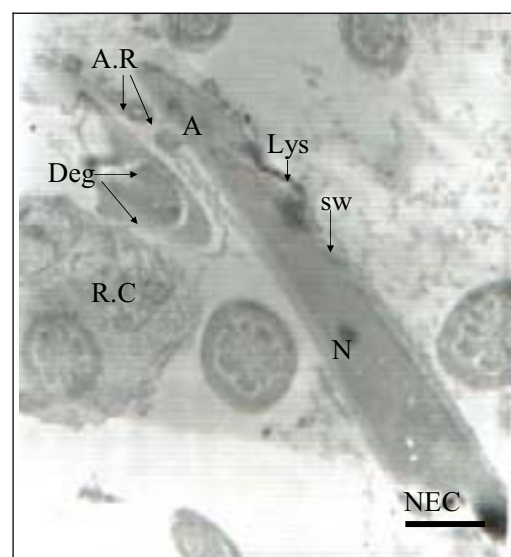


شکل ۸. میکروگراف از مقطع طولی قطعه میانی دم اسپرم در گروه SCI: در این تصویر به هم ریختگی شدیدی در ساختار قطعه میانی دم دیده می‌شود. میتوکندری‌ها (mit) نظم خود را از دست داده و در بین آن‌ها فاصله زیادی (gap) مشاهده می‌شود. آکسون مرکزی (Axo) به همراه فیبرهای متراکم خارجی (o.d.f) حذف شده و به جای آن‌ها واکوئل‌های (V) متعددی در مرکز دم مشاهده می‌شود. غشای سیتوپلاسمی قطعه میانی به‌طور کامل لیز (Lysis) شده و از بین رفته است (بار: ۰/۵ میکرون).



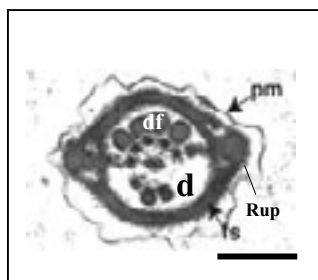
شکل ۹. میکروگراف برش طولی و عرضی قطعه میانی دم اسپرم در گروه SCI: در برش طولی مقدار زیادی سیتوپلاسم متصل به دم تحت عنوان قطرات سیتوپلاسمی (R.C) و همچنین حذف و دژنره شدن (deg) ساختار آکسون جلب توجه می‌نمایند. برش عرضی قطعه میانی دم که در مجاورت برش طولی قرار دارد، در ناحیه وسیعی دچار لیز غشا (Lys) شده است (بار: ۰/۸۳ میکرون).

متراکم خارجی، میتوکندری‌ها و غشای سیتوپلاسمی بودند. در مورد آکسون و فیبرهای متراکم خارجی ناهنجاری‌های زیر مشاهده شد. اسپرم‌هایی که فاقد طرح میکروتوبولی ۲+۹ بودند. خفیف‌ترین فرم این ناهنجاری به‌صورت فقدان یک جفت میکروتوبول محیطی در ساختار آکسون بود. علاوه بر این اسپرم‌هایی که تقریباً نیمی از کمپلکس آکسون-فیبرهای متراکم خارجی خود را از دست داده بودند و همچنین فقدان ۲-۳ دسته از فیبرهای متراکم خارجی در قطعه میانی و به‌هم ریختگی نظم کمپلکس آکسون-فیبرهای متراکم خارجی و فقدان ساختار آکسون مشاهده شد (شکل‌های ۸ و ۹).



شکل ۷. میکروگراف از مقطع سر اسپرم اپیدیدیمی و یک سلول گرد در گروه SCI: در این تصویر به علت لیز سلولی (Lys) نواحی مختلف سر اسپرم از جمله هسته (N) در حال دژنراسیون بوده و ساختارهای واکوئل ماندنی تحت عنوان Apoptotic Bodies (A.B) که نشان‌دهنده مرگ سلولی طی روند آپوپتوز است قابل تشخیص هستند. Sw نشان‌دهنده نواحی متورم در غشا است. در کنار سر اسپرم، هسته‌ای از سلول‌های گرد موجود در مایع منی با کروماتین غیریکنواخت و گرانولار دیده می‌شود (بار: ۰/۵ میکرون).

در ضمن، ناهنجاری‌های میتوکندری‌ها عبارت بودند از: به هم ریختگی نظم میتوکندری‌ها و ایجاد فاصله در بین میتوکندری‌ها (شکل ۸).



شکل ۱۱. میکروگراف برش عرضی قطعه دم اسپرم گروه SCI: دژنرسانس دو جفت میکروتوبول محیطی در ساختار آکسونم به همراه دژنرسانس (d) دو فیبر متراکم خارجی (df)، جدایی گسترده غشای سیتوپلاسمی (pm) و پارگی در این غشا (Rup) از ناهنجاری‌های این مقطع هستند (بار: ۳ میکرون).

د) قطعه انتهایی دم (end piece)

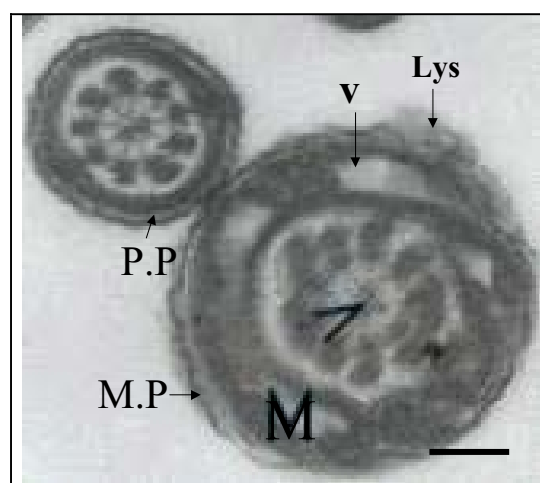
در قطعه انتهایی دم ناهنجاری خاصی مشاهده نشد. اما جدایی غشای سیتوپلاسمی و تشکیل نواحی متورم مشاهده شد.

بمث

از آنجایی که بیماران ضایعه نخاعی از نظر عوامل ایجادکننده، شدت ضایعه و مدت زمان بیماری در وضعیت مشابهی نیستند و با توجه به شباهت زیاد روند اسپرماتوژنز و بلوغ اسپرم در انسان و رت، و بالاخره با در نظر گرفتن به کارگیری رت در مطالعات سم شناسی [۲۶] برای انجام یک بررسی کنترل شده از مدل حیوانی رت استفاده شد. در مورد مدت زمان آزمایش نیز، با دانستن زمان ۴۸ روز برای یک دوره کامل اسپرماتوژنز در رت [۱۷]، برای اطمینان از این که اسپرم‌ها در زمان نمونه‌گیری باید از مرحله اسپرماتوگونی تا بلوغ از آثار ضایعه نخاعی برخوردار شده باشند، مدت زمان آزمایش ۸ هفته در نظر گرفته شد. در مطالعات حیوانی مشابه نیز مدت زمان ۸ هفته تحت عنوان فاز مزمن بیان شده و پس از این مدت تأثیرات ضایعه نخاعی بر اسپرماتوژنز و نیز کیفیت اسپرم مطالعه شده است [۱۴ و ۱۵]. برای ایجاد ضایعه نخاعی، روش استوانه توخالی و رها سازی وزنه فلزی طبق روش استاندارد

وجود تورم در میتوکندری‌ها و انحراف کریستالها (شکل ۱۰)، لیز شدن میتوکندری‌ها و سایر اجزا همانند غشا و آکسونم، افزایش حجم میتوکندری‌ها (شکل ۱۰) از ناهنجاری‌های دیگر میتوکندری‌ها است.

در مورد غشای سیتوپلاسمی قطعه میانی، ناهنجاری‌های زیر مشاهده شد: تورم و جدایی غشای سیتوپلاسمی به فرم خفیف یا شدید، لیز شدن غشای سیتوپلاسمی به صورت نقطه‌ای یا وسیع (شکل ۸)، اتصال چند دم و قرار گرفتن آن‌ها در یک غشای مشترک به همراه قطره سیتوپلاسمی و وجود قطرات سیتوپلاسمی متصل به قطعه میانی دم (شکل ۹).



شکل ۱۰. میکروگراف برش عرضی قطعه میانی و قطعه اصلی دم اسپرم در گروه SCI: در برش عرضی قطعه میانی (M.P)، میتوکندری‌ها (M) متورم گشته و دارای واکوئل (V) شده‌اند. لیز غشای سیتوپلاسمی (Lys) کاملاً واضح است. نوک پیکان نشان‌دهنده ساختار طبیعی آکسونم است. مقطع عرضی قطعه اصلی دم (P.P) به صورت طبیعی قابل مشاهده است (بار: ۲ میکرون).

ج) ناهنجاری‌های قطعه اصلی دم (Principle piece)

ناهنجاری‌های قطعه اصلی دم نسبت به قطعه میانی کمتر بوده و ناهنجاری‌های زیر مشاهده شدند: فقدان دو یا چند میکروتوبول آکسونمال به همراه فقدان فیبرهای متراکم خارجی (شکل ۱۱). جدایی و تورم غشای سیتوپلاسمی به صورت جزئی یا وسیع، پارگی در غشای سیتوپلاسمی و همچنین لیز شدن غشا به صورت نقطه‌ای یا وسیع (شکل ۱۱).

اسپرم مفید است [۲۹]. گونه‌های فعال اکسیژن با تأثیر بر غشای سیتوپلاسمی و همچنین ساختار کروماتین اسپرم، می‌توانند سبب بروز ضایعات در کروماتین و DNA اسپرم شوند [۳۰ و ۳۱]. در مطالعه حاضر، گرچه میزان ROS اندازه‌گیری نشده است ولی با توجه به نتایج دیگر محققان درباره تأثیرات مخرب ROS، ایجاد اختلال در تراکم کروماتین و افزایش ناهنجاری‌های هسته‌ای در اسپرم رت‌های SCI را می‌توان به افزایش ROS نسبت داد. قطع عصب‌دهی بیضه نیز به دنبال ضایعه نخاعی می‌تواند بر پروسه اسپرماتوژنز تأثیر نامطلوب گذاشته و سبب بروز ضایعاتی در ساختار DNA شود [۱۵ و ۳۲]. از طرفی به دنبال قطع عصب‌دهی بیضه، درجه حرارت این عضو بالا رفته و می‌تواند علاوه بر اختلال در اسپرماتوژنز [۱۴ و ۱۵]، با تأثیر بر نوکلئوپروتئین‌ها سبب تغییر در ساختار طبیعی کروماتین شده و حساسیت DNA را نسبت به عوامل دنا توره کننده افزایش دهد [۳۳]. در مطالعه حاضر نیز به دنبال ایجاد SCI و قطع عصب‌دهی اتونوم بیضه، تعداد اسپرم‌ها با هسته ناهنجار، افزایش قابل توجهی را در مقاطع میکروسکوپ الکترونی نشان دادند. Patki و همکاران در سال ۲۰۰۷ پارامترهای مایع منی را در بیماران SCI بررسی نمودند و اختلال در تولید اسپرم، بلوغ، ذخیره و انتقال اسپرم را به علت اختلالات نورواندوکراین گزارش کردند [۴]. همچنین نادری (Naderi) و همکاران بیان کردند که کمبود گنادوتروپین در بیماران SCI به دنبال تغییرات ارتباط بین غده هیپوفیز و تالاموس ایجاد می‌شود. در نتیجه، کیفیت مایع منی به علت عملکرد اندوکرینی غیرطبیعی کاهش می‌یابد [۳۴]. در مطالعه اخیر مشخص شد که کیفیت اسپرم پس از گذشت چند روز از ضایعه، کاهش قابل ملاحظه‌ای پیدا می‌کند. به‌طوری‌که اگر در فاز حاد ضایعه نخاعی از اسپرم در روش‌های ART استفاده شود، نتیجه بارداری کاهش می‌یابد. در این بررسی علت تغییر ایجاد شده، اختلالات هورمون‌های جنسی و هیپوفیزی بیان شد [۳۵].

Hirsch انجام شد. در این روش به دلیل نگهداری دراز مدت حیوان آسیب دیده، مشکلات بسیاری مانند عفونت مجاری ادراری و پارگی مثانه به دنبال تخلیه ادرار سبب افزایش مرگ و میر حیوانات می‌شود. بدین منظور در این مطالعه از تعداد بیشتری رت استفاده شد. پس از ایجاد ضایعه نخاعی، به دلیل تفاوت در میزان تخریب بافت نخاع در حیوانات مذکور، رت‌هایی که در اسکورهایی به غیر از صفر و یک از رتبه‌بندی Tarlov قرار داشتند [۱۵] یا دچار فلج یک‌طرفه بودند از مطالعه حذف شدند.

در بخش نتایج، تأثیرات ضایعه نخاعی مزمن بر فراساختار اسپرم‌های اپیدیدی به تفصیل بیان شد. مواردی همچون پارگی و لیز شدن غشای سیتوپلاسمی، وجود سیتوپلاسم اضافی، پارگی غشای آکروزوم و تشکیل نواحی متورم در غشا، اختلال در تراکم کروماتین هسته، تشکیل مواد گرانولار و ایجاد واکوئل در هسته، دژنره شدن سر اسپرم، ایجاد تورم در میتوکندری و تخریب کریستاهای این ارگانل، دژنره شدن قطعه میانی دم، حذف میکروتوبول آکسونمال، دژنره شدن آکسونم، حذف فیبر متراکم خارجی و بالاخره به هم ریختگی ساختار دم اسپرم از ناهنجاری‌های ایجاد شده به دنبال ضایعه نخاعی هستند. با توجه به بررسی منابع اطلاعات موجود، مطالعات اندکی در زمینه آثار SCI بر فراساختار اسپرم صورت گرفته و در واقع مطالعه حاضر تنها بررسی انجام شده در مدل حیوانی است. دو عامل افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در پلاسمای مایع منی و قطع عصب‌دهی اتونوم می‌توانند در بروز اختلالات کروماتین/DNA اسپرم بیشترین سهم را داشته باشند. میزان ROS مایع منی در بیماران SCI نه تنها از افراد بارور بلکه از افراد نابارور نیز بیشتر است [۲۷ و ۲۸]. گروه تحقیقاتی وانگ (Wang) آثار آنتی‌اکسیدانی ویتامین E را روی اسپرم رت‌های ضایعه نخاعی بررسی کردند و با توجه به اینکه ROS به دنبال ضایعه نخاعی سبب کاهش کیفیت مایع منی می‌شود، نشان دادند که ویتامین E برای بهبود عملکرد

هیرش (Hirsch) و همکاران در تحقیقی مشابه تحقیق حاضر، با ایجاد ضایعه نخاعی در رت، روند اسپرماتوژنز را در فازهای حاد و مزمن SCI بررسی کردند. ایشان اختلالات اسپرم‌سازی را در دوره کوتاه مدت به علت تغییرات هورمونی و در دوره بلند مدت به علت قطع عصب‌دهی بیضه دانستند [۱۵]. نتیجه‌گیری گروه تحقیقاتی Hirsch توسط مطالعات دیگری نیز تأیید شد و به‌طور خلاصه علت اختلالات اسپرماتوژنز در فاز حاد را تغییرات هورمونی و در فاز مزمن را قطع عصب‌دهی بیان کردند [۱۴، ۳۶ و ۳۷]. در مطالعه حاضر به دنبال ایجاد ضایعه نخاعی، مرکز عصب‌دهی سمپاتیکی بیضه و اپیدیدیم دچار اختلال شده و این مطلب می‌تواند اولاً روند اسپرماتوژنز در بیضه را تحت تأثیر قرار داده و ثانیاً سبب اختلال در فعالیت طبیعی اپیدیدیم و تأخیر در انتقال اسپرم شود. اگرچه در تحقیق حاضر بافت شناسی بیضه بررسی نشده است، ولی وجود ضایعات متعدد در اسپرم، به‌طور غیرمستقیم نشان‌دهنده اختلال در اسپرماتوژنز در فاز مزمن ضایعه نخاعی است. بنابراین در صورت قطع عصب‌دهی اپیدیدیم و مختل شدن عملکرد طبیعی آن در وضعیت SCI، تراکم کروماتین و دیگر ساختارهای اسپرم دچار اختلال شده و می‌تواند بر پتانسیل باروری اسپرم تأثیر نامطلوب بگذارد.

در تحقیقات (۲۰۰۸) نشان داده شده است که درصد زیادی از اسپرم‌های بیماران SCI دارای کروماتین ناهنجار هستند و علت افزایش ضایعه DNA اسپرم در مایع منی این بیماران به‌طور ناشناخته بوده و به عدم انزال طولانی، نکرواسپرمی و لکوسیتواسپرمی نسبت داده نمی‌شود [۲۲]. گروه تحقیقاتی طالبی (Talebi) و همکاران نیز در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که SCI مزمن سبب اختلال در پارامترهای اسپرم، بلوغ هسته و DNA اسپرم شده و بنابراین می‌تواند بر باروری بالقوه گامت مردان به دنبال SCI اثر گذار باشد [۳۸]. در مطالعات کمپیناس (Kempinas) و همکاران با انجام عمل سمپاتکتومی در رت

نشان دادند که اسپرم‌ها به مدت طولانی‌تر در اپیدیدیم باقی مانده و در نهایت اسپرم‌های موجود در دم این عضو، دارای پارامترهای تحرک و مورفولوژی ضعیف‌تری نسبت به گروه شاهد هستند. آن‌ها قطع عصب‌دهی و طولانی شدن انتقال اپیدیدیمی اسپرم را دلیل اصلی کاهش کیفیت مایع منی بیان داشتند [۳۲]. در مطالعه دیگری طالبی (Talebi) و همکاران در سال ۲۰۰۷ وضعیت نکروسپرمی اپیدیدیمی در ضایعه نخاعی مزمن را مطالعه نمودند و گزارش کردند که SCI مزمن با نکروسپرمی اپیدیدیمی در پستاندارانی مانند موش در ارتباط است. همچنین استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی حیاتی مانند هوخست (Hochest) برای جداسازی اسپرم زنده از مرده را برای درمان ناباروری موثر دانستند [۶]. گروه تحقیقاتی کان مالیدوس (Con Mallidus) [۱۲] ضمن بررسی اسپرم مردان SCI، افزایش مرگ سلولی را مشاهده نمودند. آن‌ها پس از بررسی با TEM تغییرات دژنراتیو متعددی را در وضعیت نکروسپرمی گزارش نمودند. تغییراتی مانند تحلیل میکروتوبول‌های آکسونمال، حذف فیبر متراکم خارجی، ناهنجاری‌های میتوکندری و غشای سیتوپلاسمی در نواحی سر و دم اسپرم و ضایعات کروماتینی در هسته اسپرم از موارد مشاهده شده بود که در مطالعه فعلی نیز تأیید شد. نکته قابل توجه در مطالعه آن‌ها اینست که ضمن بررسی میکروسکوپ الکترونی اسپرم‌های موجود در لوله‌های منی‌ساز و همچنین قسمت پروگزیمال سر اپیدیدیم، ناهنجاری خاصی مشاهده نشد و آکسونم، میتوکندری‌ها، آکروزوم، هسته و غشای سیتوپلاسمی اسپرم‌های نواحی مذکور طبیعی بودند. در بررسی وضعیت کروماتین هسته در مطالعه حاضر بیان شد که به دلیل توقف طولانی مدت اسپرم‌ها در اپیدیدیم و در معرض قرار گرفتن این سلول‌ها نسبت به عوامل مخربی همچون ROS و تغییر فعالیت طبیعی اپیدیدیم، به‌نظر می‌رسد که در وضعیت ضایعه نخاعی، اغلب صدمات وارده بر اسپرم در این عضو صورت می‌پذیرد.

گروه Kempinas و Con Mallidus در مطالعاتی مطرح نمودند که اغلب ضایعات وارده بر اسپرم در اثر ذخیره شدن طولانی مدت در اپیدیدیم است که با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت دارد. در مطالعه مونگا (Monga) و همکاران (۲۰۰۱) ناهنجاریهای متابولیکی و فراساختار اسپرم بیماران SCI را با گروه شاهد مقایسه شد و بیان داشتند که تغییر اجزای متابولیکی پلاسمای مایع منی در بیماران مذکور بر پارامترهای تحرک و قابلیت زنده ماندن تأثیر نامطلوب گذاشته و سبب بروز ناهنجاری‌هایی در سطح فراساختار اسپرم می‌شود. ناهنجاری‌های مشاهده شده نیز تا حد زیادی همانند مشاهدات تحقیق حاضر بوده و شامل دژنراسانس آکسونم، غشای سیتوپلاسمی، غشای آکروزوم و فیبرهای متراکم خارجی هستند [۳۹]. اختلالات غشای سیتوپلاسمی مانند پارگی و دژنراسانس یکی از مهم‌ترین ضایعاتی بود که در اسپرم‌های اپیدیدیمی رت‌های SCI دیده شد که شواهدی بر بروز صدمات غشایی در وضعیت ضایعه نخاعی هستند. افزایش مرگ اسپرم‌ها و ایجاد نکروسپرمی به دنبال SIC به اثبات رسیده است [۱۲]. در تحقیقی که گروه تحقیقات موراتوری (Muratori) روی کروماتین و DNA اسپرم‌های افراد نابارور انجام دادند مشخص شد که یکی از علایم مهم آپوپتوز در اسپرم وجود قطعات DNA یا DNA fragmentation است که این قطعات معمولاً به همراه علایم دیگری بوده که همگی باعث کاهش کیفیت اسپرم و در نتیجه کاهش پتانسیل باروری می‌شوند. همچنین علایمی مانند کاهش تراکم کروماتین، افزایش حساسیت کروماتین به عوامل دنا توره کننده، ناهنجاری‌های آکسونم و دم، تورم میتوکندری و کاهش حساسیت در آزمون Hos که نشان‌دهنده اختلالات غشایی است، مشاهده می‌شوند [۴۰]. ناهنجاری‌های فراساختاری موجود در اسپرم‌های دچار آپوپتوز توسط گراندینی (Grandini) و همکاران نیز بررسی شد و علایمی همچون وجود واکوئل در هسته، ایجاد تراکم کروماتین در

حاشیه هسته، تحلیل آکروزوم، وجود واکوئل‌های اتوفاژیک، تولید غشای اضافی هسته و بالاخره مشاهده اجسام آپوپتوتیک، کروماتین و آکسونم را دلیلی بر روند آپوپتوز بیان می‌کنند [۴۱]. بررسی روند آپوپتوز در اسپرم‌های افراد نابارور توسط گروه تحقیقاتی باستی (Bacetti) انجام شد و تغییرات غشای سیتوپلاسمی، کروماتین، غشای هسته و وجود اجسام آپوپتوتیک را نشانه مرگ برنامه‌ریزی شده اسپرم گزارش کردند و تغییرات فراساختاری ایجاد شده در اسپرم‌های افراد نابارور را دلیل اصلی کاهش پتانسیل باروری بیان کردند [۴۲]. از آنجایی که نتایج میکروسکوپ الکترونی مطالعه حاضر نیز تمام شواهد فوق را نشان دادند، می‌توان گفت که اسپرم‌های گروه SCI نیز در حد نسبتاً بالایی دچار آپوپتوز شده‌اند. مشاهده اجسام واکوئل ماندی به نام اجسام آپوپتوتیک در اسپرم‌های گروه SCI می‌تواند تأییدکننده نتیجه فوق باشد. ناهنجاری مهم دیگری که در تعداد زیادی از اسپرم‌های گروه SCI مشاهده شد، وجود سیتوپلاسم اضافی متصل به سر یا دم به نام قطرات سیتوپلاسمی بود. بررسی‌ها نشان می‌دهند که اسپرم‌های ناهنجار، با مقادیر قابل ملاحظه‌ای از قطرات سیتوپلاسمی در تولید Ros فعالتر هستند [۳۰ و ۳۱]. از طرفی مشخص شده است که ارتباط معنی‌داری در بین افزایش غلظت گلوبول‌های سفید مایع منی و افزایش ناهنجاری‌های مرفولوژیکی اسپرم، به‌ویژه قطرات سیتوپلاسمی، ضایعات آکسونم و آکروزومی وجود دارد [۴۳]. افزایش میزان Ros [۲۷ و ۲۸] و همچنین افزایش گلوبول‌های سفید [۴۴] نیز در مایع منی افراد SCI به اثبات رسیده است. از مجموع مطالب فوق می‌توان نتیجه گرفت که یکی از دلایل مهم وجود ضایعات فراساختاری در غشاها و کروماتین اسپرم‌های گروه ضایعه نخاعی افزایش میزان Ros بوده است که با تأثیر بر اسیدهای چرب غیراشباع و نوکلئوتیدهای ستون فسفودی استری DNA [۴۵] تأثیرات مخرب خود را به جای گذاشته و باعث مرگ سلولی به فرم نکروز یا آپوپتوز شده است.

در تصاویر TEM، درصد زیادی از اسپرم‌های گروه SCI دارای هسته‌ای با دانسیته کم الکترونی بوده و در بعضی نیز کروماتین به فرم گرانولار و واکوئل مانند دیده شدند. ناهنجاری‌های کروماتینی در مطالعات Con Mallidus و Monga نیز به عنوان آثار مخرب ضایعه نخاعی عنوان شدند [۱۲ و ۳۹] در مطالعه دیگری توسط فرانکاویلا (Francavilla) نشان داده شد که هرچه میزان باندهای دی سولفیدی (S-S) در کروماتین اسپرم بیشتر باشد، تراکم و پایداری هسته بیشتر بوده و در بررسی میکروسکوپ الکترونی میزان رنگ‌پذیری بیشتری دارد. در صورتی که با کاهش میزان S-S و در نتیجه کاهش پایداری کروماتین (وضعیتی شبیه به SCI)، میزان رنگ‌پذیری هسته کم می‌شود که با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت دارد [۴۶]. ناهنجاری مهم دیگری که در اغلب اسپرم‌های گروه SCI مشاهده شد، تحلیل میکروتوبول آکسونمال یا به‌طور کلی دژنراسانس آکسونم بود که سلامت این ساختار به همراه فیبرهای متراکم خارجی احاطه کننده آن در تحرک اسپرم اهمیت دارد [۱۷]. مؤمن (Momen) و همکاران پارامترهای مایع منی مردان دارای ضایعه نخاعی را بررسی و نشان دادند که حجم، تعداد و شکل اسپرم طبیعی بوده اما تحرک و قابلیت حیات اسپرم‌ها کاهش یافته است [۵]. تحقیقات نشان می‌دهند که کاهش تحرک اسپرم، مهمترین تأثیر ضایعه نخاعی بر فعالیت تولید مثلی محسوب می‌شود [۱ و ۳]. در مطالعه‌ای در تأیید ارتباط تغییرات فراساختاری اسپرم و کاهش پارامترهای مرفولوژی و تحرک اسپرم، نشان داده شد که همزمان با افزایش میزان شکست در DNA و در نتیجه بروز تغییرات آپوپتوتیک، درصد اسپرم‌هایی ناهنجار با ضایعات دمی افزایش می‌یابد. از طرفی ارتباط معکوسی در بین افزایش شکست DNA و میزان تحرک پیشرونده اسپرم به‌دست آمده است [۴۰]. در بررسی حاضر نیز با توجه به مشاهدات تغییرات دژنراتیو آکسونم در اسپرم‌های گروه SCI و همچنین تأیید افزایش ناهنجاری‌های DNA، می‌توان اظهار داشت که افزایش

ناهنجاری‌های مرفولوژیکی از آثار مهم ضایعه نخاعی هستند. در مشاهدات دیگری در بررسی TEM، کاهش تحرک اسپرم‌های گروه SCI و وجود ناهنجاری‌ها در غشا، کریستالها و فضای ماتریکس میتوکندری‌های اسپرم مطرح شده است و با توجه به وفور این ضایعات و با در نظر گرفتن میتوکندری به‌عنوان مولد انرژی برای حرکت، نقصان درصد اسپرم‌های متحرک کاملاً بدیهی است. اغلب صدمات مشاهده شده در اسپرم‌های اپیدیدیمی پس از ضایعه نخاعی مزمن در مطالعه حاضر، توسط سایر محققانی که تأثیر عوامل مخرب دیگری (به‌جز SCI) را بر اسپرم بررسی نموده‌اند نیز مشاهده شده است. در مطالعه‌ای که توسط پانایوتیس (Panayiotis) و همکاران انجام شد، ناهنجاری‌های دم اسپرم در افراد سیگاری بررسی شد. تغییر در تعداد و ترتیب قرار گرفتن میکروتوبول‌های آکسونمال در این افراد از مهمترین یافته‌ها محسوب می‌شود [۲۵]. در بررسی اسلان (Olson) و همکاران روی اسپرم اپیدیدیمی رت‌هایی که دچار فقر سلنیوم شده بودند، مشخص شد که این اسپرم‌ها دارای ناهنجاری‌های فراوانی در میکروتوبول‌های تاژک، میتوکندری‌ها و غشای سیتوپلاسمی قطعه میانی هستند. آنها علت بروز ناهنجاری‌های فوق را اهمیت سلنیوم در روند اسپرمیوژنز و بلوغ اپیدیدیمی اسپرم بیان نمودند که با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت دارد [۲۶]. مطالعه رحمی و ایوب (Rahmy and Ayoub) بر تأثیر سم مار بر فراساختار اسپرم‌های گاو نشان دهنده طیف وسیعی از ناهنجاری‌هایی است که توسط میکروسکوپ الکترونی در اسپرم دیده می‌شوند [۴۷] ناهنجاری‌هایی همانند ضایعات کروماتینی، جدایی و پارگی غشای سیتوپلاسمی، تورم میتوکندری و تحلیل آکسونم کاملاً مشهود بوده و بسیار شبیه به ضایعاتی است که توسط SCI بر اسپرم‌های رت وارد می‌شوند. در نهایت، مهمترین ضایعات ایجادشده در فراساختار اسپرم‌های اپیدیدیمی رت توسط Triptolide (یک نوع اپوکسی با اثر ضد باروری) را خروج از تراکم کروماتین، از

ناپایداری کروماتین و همچنین افزایش درصد اسپرم‌هایی با ناهنجاری DNA می‌شود. در بررسی میکروسکوپ الکترونی نیز ناهنجاری‌های متعددی ایجاد شده که همگی در راستای کاهش کیفیت اسپرم هستند. در بیان اتیولوژی، این وضعیت می‌توان به قطع عصب‌دهی اتونوم، تأخیر در انتقال اپیدیدیمی اسپرم و همچنین تأثیر نامطلوب Ros بر پارامترهای کیفیت کروماتین و DNA و فراساختار اسپرم اشاره نمود.

تقدیر و تشکر

با تشکر از پرسنل محترم بخش میکروسکوپ الکترونی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و همچنین با تشکر از سرکار خانم نیری کارشناس آزمایشگاه که در مراحل انجام طرح به اینجانب کمک شایانی نمودند

بین رفتن کامل غشای سیتوپلاسمی دم، به هم ریختگی غلاف میتوکندریایی، ایجاد واکوئل در میتوکندری‌ها و از بین رفتن بعضی از فیبرهای متراکم خارجی معرفی می‌نمایند [۴۸]. هدف، روش کار و حیوان مورد آزمایش شبیه به مطالعه حاضر بوده و تغییرات فراساختاری ایجاد شده توسط Triptolide نیز شباهت زیادی به مشاهدات تحقیق حاضر دارند. با توجه به مطالب ذکر شده، تغییرات فراساختاری در اسپرم‌های اپیدیدیمی رت به دنبال ضایعه نخاعی مزمن، تغییرات اختصاصی نبوده و همانند ضایعاتی است که توسط عوامل دیگری همانند سم مار، مصرف سیگار و ... در اسپرم ایجاد می‌شوند.

در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که ضایعه نخاعی مزمن اولاً سبب افزایش ناهنجاری‌های مرفولوژیکی و بروز نکروسپرمی شده، ثانیاً بر تراکم کروماتین اثر گذاشته و باعث افزایش

References

1. **Rajasekaran , Manga.** Cellular and molecular causes of male infertility in spinal cord injury. J Androl 1999; 20(3): 326–30.
2. **Linsenmeyer, Perkash.** Infertility in men with spinal cord injury. Arch phys Med Rehabil 1991; 79: 747–53.
3. **Huang HF, Ming, Tang LI.** Spinal cord Contusion impairs sperm motility in the rat without disrupting spermatogenesis. J Androl 2003; 24(3): 371–80.
4. **Patki P, Febu F, Woodhouse J, Hamid R, Craggs M, Shah J.** Effects of spinal cord injury on semen parameters. J Spinal Cord Me 2008; 31(1): 27-32.
5. **Momen MN, Fahmy I, Amer M, Arafa M, Zohdy W, Naser TA.** Semen parameters in men with spinal cord injury :changes and aetiology. Infertil Spinal Cord Injury 2007; 9(5): 684-9.
6. **Talebi AR, Khalili MA, Nahangi H, Abbasi A, Anvari M.** Evaluation of epididymal necrospemia following experimental chronic spinal cord injury in rat. Ir J Reprod Med 2007; 5(4): 171-6.
7. **Trabulsi EJ, Shupp D, Sedor J, Hirsch IH.** Leukocyte subtypes in electroejaculates of spinal cord injured men. Arch phys Med Rehabil 2002; 83(1): 31-4.
8. **Crich JP, Jequier AM.** Infertility in men with retrograde ejaculation. Fertil Steril 1978; 30(5): 572-6.
9. **Upadhyaya M, Walker SA.** Antisperm antibody and male infertility. Br J Urol 1984; 56: 531-6.
10. **Brackett NL, pardon OF, Lynne CM.** Seminal plasma of spinal cord injured men inhibits of sperm motility of normal men. J Urol 1996; 155: 1632-5.
11. **Brindley GS.** Deep scrotal temperature and the effect on it of clothing and paraplegia. Br J Urol 1982; 54: 49-55.
12. **Con Mallidis, Lim TC, Hill ST, Skinner DJ, Brown DJ, Johnston WI, et. al.** Necrospemia and chronic spinal cord injury. Fertil Steril 2000; 74(2): 221-7.
13. **Huang HF, Linsenmeyer TA.** Acute effects of

- spinal cord injury on the pituitary testicular hormone axis and sertoli cell function. *J Andrology* 1995; 16(2): 148-57.
14. **Huang HF, Linsenmeyer TA, Anesetti R.** Suppression and recovery of spermatogenesis following SCI in rat. *J Androl* 1998; 19(1): 72-9.
 15. **Hirsch IH, Bin Huang, Chancellor MB.** Spermatogenesis in early and late phases of experimental SCI in the rodent. *J Androl* 1999; 20(1): 63-71.
 16. **Jonson MH, Everitt BJ.** *Essential Reproduction*. 4th edition 1995; ch.3: pp 45-59
 17. **Williams R, Warwick P.** *Grays Anatomy*. 37th edition. Churchill livingstone 1989, pp 118 -23.
 18. **Sward WS, Coffey DS.** DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 1991; 44: 569-74.
 19. **Irvin DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ.** DNA integrity in human spermatozoa. *J Andrology* 2000; 23: 737-52 .
 20. **Suny, Jurisicora A, Casper RF.** Detection of DNA fragmentation in human sperm. *Biol Reprod* 1997; 56: 602-7.
 21. **Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR.** Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980; 210: 1131-3.
 22. **Brackett NL, Ibrahim E, Grotas JA, Aballa TC, Lynne CM.** Higher Sperm DNA Damage in Semen From Men With Spinal Cord Injuries Compared With Controls. *J Androl* 2008; 29: 93-9.
 23. **Kempinas WG, Suarez JD, Roberts NL, Strader LF, Ferrell J, Goldman JM, et al.** Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy. *Biol Reprod* 1998; 59(4): 897
 24. **Rabchovsky AG, Fugaccia I, Patrick G.** Efficacy of methyl prednisolone therapy for the spinal cord injured rat. *J Neurosci Res* 2002; 68: 7-18.
 25. **Panayiotis M, Correa JR, Karagounis CS, Ahparaki A, Phoroglou C, Hicks CL, et al..** An electron microscope study of the axonemal. ultra-structure in human spermatozoa from male smokers and non smokers. *Fertil Steril* 1998; 69: 430-5.
 26. **Olson GE, Winfrey VP, Hill KE.** Sequential development of flagellar defects in spermatids and epididymal spermatozoa of selenium-deficient rats. *Reproduction* 2004; 127: 335-42.
 27. **Pardon, Brackett NL, Agarwal A.** Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with SCI. *Steril Fertil* 1997; 67:1115-20.
 28. **de Lamirande E, Gagnon C.** Increased reactive oxygen species formation in semen of patients with SCI. *Fertil Steril* 1995; 63: 637-42.
 29. **Wang S, Wang G, Barton BE, Murphy TF, Huang HFS.** Beneficial effects of vitamin E in sperm functions in the rat after spinal cord injury. *Andrology* 2007; 28(2): 334-41.
 30. **Aitken RJ, Buckingham D, West K, Wu FC, Zikopoulos K, Richardson DW.** Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *J Reprod Fertil* 1992; 94: 451-6.
 31. **Saleh R, Agarwal A.** Oxidative stress and male infertility. *J Androl* 2002; 23: 737-52.
 32. **Linsenmeyer TA, Ottenweller JE, Huang HFS.** Epididymal sperm transport in normal and recent spinal cord injured sprague Dawley rats. *J Spinal Cord Med* 1999; 22: 102-6.
 33. **Charles C, Robert MK.** Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure . *Biol Reprod* 1999; 60: 615-20.
 34. **Naderi AR, Safarinejad MR.** Endocrine profiles and semen quality in spinal cord injured men. *Clin Endocrinol* 2003; 58: 177-84.
 35. **Das S, Soni BM, Sharma SD, Gazvani R.** A case

- of rapid deterioration in sperm quality following spinal cord injury. *Spinal Cord* 2006; 44: 56-58.
36. **Linsenmeyer TA, Huang HF.** Spermatogenesis and Pituitary testicular hormone axis in rats during acute phase of SCI. *J Urol* 1994; 152: 1303-07.
 37. **Naftchi NE, Viau AT, Sell GH.** Pituitary testicular axis dysfunction in SCI. *Arch phys Med Rehabil* 1980; 61: 402-5.
 38. **Talebi AR, Khalili MA, Hossaini A.** Assessment of nuclear DNA integrity of epididymal spermatozoa following experimental chronic spinal cord injury in the rat. *Int J Androl* 2007; 30: 163-9.
 39. **Monga M, Dunn K, Rajasekaran M.** Characterization of ultrastructural and metabolic abnormalities in semen from men with SCI. *J Spinal Cord Med* 2001; 24: 6-41.
 40. **Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, et al.** Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 2000; 21: 903-12.
 41. **Grandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, et al.** Study of apoptotic DNA fragmentation in human Spermatozoa. *Human Reprod* 2000; 15: 830-3.
 42. **Baccetti B, Collodel G, Piomboni P.** Apoptosis in human ejaculated sperm cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996; 28: 587-96.
 43. **Aziz N, Agarwal A, Lewis JI.** Novel association between specific sperm morphological defects and leukocytospermia. *Fertil Steril* 2004; 82: 621-7.
 44. **Aird IA, Vince GS, Bates MD, Johnson PM, Lewis-Jones ID.** Leukocytes in semen from men with Spinal cord injury. *Fertil Steril* 1999; 72: 97-103.
 45. **Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ J, et al.** Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 2004; 19: 129-38.
 46. **Francavilla S.** Bianco MA, Cordeschi G, D'Abrizio P, De Stefano C, Properzi G, et al. Ultrastructural analysis of chromatin defects in testicular spermatids in azoospermic men. *Hum Reprod* 2001; 16: 1440-8.
 47. **Rahmy TR, Ayoub MA.** In Vitro action of cobra venom on goat spermatozoa ultrastructure by TEM and SEM. *Venom Anim Toxins* 2002; 8: 1-20.

The Effect of Chronic Spinal Cord Injury on Ultrastructure of Epididymal Sperm in Rat

Talebi A.R., Ph.D.* , Khalili M.A., Ph.D., Dehghan M., M.Sc. Hoseini A., Ph.D.

** Department of Biology & Anatomy, Research & Clinical Center for Infertility, Shahid Sadoughi Medical University, Yazd, Iran*

Abstract

Purpose: The effects of chronic SCI on ultrastructure of spermatozoa aspirated from epididymis of rats.

Materials and Methods: 45 adults Wistar rats were divided into 3 groups of SCI, control and sham. Following laminectomy, SCI was induced with a 15g weight dropped from a distance of 10 cm, onto exposed dura matter at T10 level. Sham group underwent laminectomy of T10 only, while control was not exposed to any types of injury or medication. The epididymal sperms were aspirated after 8 weeks in each groups for transmission electron microscopy (TEM) preparation. After primary and secondary fixations, dehydration and embedding, and ultrathin sections were collected on grids and stained by uranyl acetate and lead citrate, the samples were examined with TEM.

Results: In electron microscopic study, no ultrastructural changes were observed in sham or control groups. In SCI animals, the majority of spermatozoa showed several alternations such as swollen area, rupture and lysis of plasmalemma, disintegration of acrosomal membranes, persistence of numerous cytoplasmic droplets, mitochondrial swelling, absence of axonemal microtubules, complete degeneration of axoneme, deletion of one or more outer dense fibers, absence of tail plasmalemma, reduction of nuclear electron density, irregularities in tail architecture, formation of apoptotic vacuoles and necrotic changes in heads and tails in their ultrastructures.

Conclusion: Our electron microscopic study showed that following chronic SCI, several ultrastructure abnormalities developed in epididymal sperms. These changes may impair sperm quality and directly reduce the fertility potentiality after SCI.

Keywords: Chronic spinal cord injury, Ultrastructure, Epididymal sperm, Rat