

# ارتباط درصد لقاح آزمایشگاهی با سطح سمینال آنتی‌بادی ضد اسپرمی اندازه‌گیری شده به روش فلوسیتومتری

عباس رضایی (Ph.D.)<sup>۱</sup>، محمدحسین نصرافهانی (Ph.D.)<sup>۲،۳</sup>، مینوادیب (M.D.)<sup>۱</sup>، فرهاد شاهسوار (M.Sc.)<sup>۴</sup>،  
فرزاد عریضی (M.Sc.)<sup>۵</sup>

- ۱- دانشیار، گروه ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی اصفهان، اصفهان، ایران.
- ۲- استادیار، گروه جنین‌شناسی و آندروولوژی، پژوهشکده رویان، تهران، ایران.
- ۳- جنین‌شناس، مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران.
- ۴- مربی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی لرستان، خرم‌آباد، ایران.
- ۵- مربی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی اصفهان، اصفهان، ایران.

## چکیده

**مقدمه:** آنتی‌بادی ضد اسپرم (ASA) در ۱۲-۸٪ مردان نابارور وجود دارد. در زوج‌های نابارور، ناشی از علل ایمونولوژیک در مردان، لقاح آزمایشگاهی (IVF) به عنوان روشی موثر در حصول باروری، پیشنهاد شده است. اگرچه روش IVF برای برطرف نمودن اثر مهای سطوح بالای ASA بر روی قدرت باروری بکار گرفته می‌شود، ولی میزان لقاح برای نمونه‌های دارای ASA تقریباً به میزان ۴۰٪ موارد کاهش می‌یابد. در این مطالعه ارتباط بین ASA اندازه‌گیری شده به روش فلوسیتومتری غیرمستقیم و درصد لقاح در زوج‌های نابارور کانید IVF مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روشها:** نمونه‌های مایع سمینال از مردان ۸۰ زوج نابارور کانید لقاح آزمایشگاهی (IVF) مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان دریافت گردید. زوجها بر اساس درصد لقاح به دو گروه دارای میزان لقاح بالا و میزان لقاح پایین تقسیم شدند. ۵۲ زوج میزان لقاح بالا (<۵۰٪) و ۲۸ زوج میزان لقاح پایین ( $\geq 50\%$ ) داشتند. نمونه‌های پلاسمای سمینال این افراد با اسپرم متحرک و طبیعی از یک فرد دهنده سالم و فاقد آنتی‌بادی ضد اسپرم انکوبه شدند. سپس آنتی‌بادی متصل به سطح اسپرم با ایمونوگلوبولین نشاندار با FITC علیه IgA و IgG انسانی به روش فلوسیتومتری تعیین گردید. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از آزمون‌های  $\chi^2$ ، T و همبستگی پیرسون انجام گرفت.

**نتایج:** اختلاف میانگین میزان ASA در گروه‌های با میزان لقاح بالا و پایین از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $P < 0.01$ ). از نظر آماری ارتباط معکوس معنی‌داری بین میزان ASA از کلاس IgA و میزان لقاح مشاهده شد ( $P < 0.01$ ,  $r = -0.47$ ). از نظر آماری ارتباط معنی‌داری بین سطح ASA از کلاس IgG و میزان لقاح مشاهده نشد ( $P = 0.08$ ,  $r = -0.2$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه به وضوح نشان می‌دهد که سطح بالای ASA از کلاس IgA میزان لقاح راکاهش می‌دهد. بنابراین پیشنهاد می‌گردد که بیماران با سطح بالای ASA از کلاس IgA کانید میکرواینجکشن (ICSI) گردند.

**کل واژگان:** ناباروری، اسپرم، مایع سمینال، آنتی‌بادی ضد اسپرم، لقاح آزمایشگاهی، و فلوسیتومتری.

**آدرس مکاتبه:** دکتر عباس رضایی، گروه ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی اصفهان، اصفهان، ایران.

پست الکترونیک: rezaei@mui.ac.ir

## مقدمه

برخی محققین بر شیوع آنتی‌بادی ضد اسپرم (ASA)<sup>۱</sup> در بیماران نابارور تاکید داشته‌اند (۱). مطالعات مختلف وجود ASA را در مردان و زنان بارور گزارش کرده‌اند (۲). با این وجود تحقیقات در مدل‌های حیوانی و انسانی نشان داده‌اند که وجود ASA می‌تواند با قدرت باروری اسپرم تداخل نماید. ASA روی سطح اسپرم و در ترشحات دستگاه تناسلی در اتیولوژی ناباروری دخیل است، در صورتی که اهمیت کلینیکی ASA سرم مورد بحث است. شیوع ASA در زوج‌های نابارور ۳۶-۹٪ و در جمعیت مردان نابارور ۲۱-۸٪ گزارش شده است (۳). ASA اثرات متنوعی روی باروری انسان دارد که از آن جمله می‌توان اختلال در حرکت پیش رونده اسپرم (۴،۵)، محبوس کردن و فاگوسیتوز اسپرم در موکوس سرویکس، کاهش اتصال و نفوذ اسپرم در زوناپلوسید، مهار ظرفیت‌پذیری و واکنش آکروزومی و همچنین مهار اتصال غشاء پلاسمایی اسپرم- تخمک (۵،۶) و نهایتاً لقاح را نام برد. بنابراین وجود ASA به عنوان یک فاکتور ایمنولوژیک و یکی از علل دخیل در ایجاد ناباروری مردان مطرح می‌باشد. در بیشتر زوج‌های دارای ASA استفاده از تکنیک‌های کمک باروری (ART)<sup>۲</sup> توصیه می‌شود؛ زیرا این تکنیک‌ها مسیرهای اختلال ASA در اتصال و ادغام گامت‌ها را حذف می‌کند. به همین علت IVF<sup>۳</sup> به عنوان ابزاری جهت درمان ناباروری ایمنولوژیک استفاده می‌شود (۷). با این وجود ASA می‌تواند در روش IVF در موارد ذیل شامل: الف) اتصال و نفوذ اسپرم به زوناپلوسید، ب) واکنش زونا، ج) ادغام اسپرم- تخمک، د) تسهیم و گسترش اولیه جنینی (۸) تداخل نماید.

امروزه تعیین ASA یکی از مهمترین مراحل در ارزیابی ناباروری مردان است که به ویژه در موارد وجود

آگلوتیناسیون بالای اسپرم و نیز آستنواسپرمی با سایر پارامترهای طبیعی اسپرموگرام توصیه می‌شود. تعیین میزان ASA از طریق تست‌های متعددی انجام می‌شود. بیشتر مطالعات، استفاده از روش واکنش آگلوتیناسیون مختلط (MAR)<sup>۴</sup> را برای ارزیابی وجود ASA و ایزوتیپ آن تأیید می‌نمایند (۹). فلوسیتومتری (FCM)<sup>۵</sup> نیز یکی از روش‌های دیگر جهت تعیین کمی ASA در سطح اسپرم می‌باشد. تعیین ASA به وسیله روش فلوسیتومتری اولین بار توسط Haas و Cunningham گزارش گردید (۱۰). در این روش اسپرم با آنتی‌بادی متصل به سطح آن با یک آنتی‌بادی ثانویه ضد آنتی‌بادی انسانی کونژوگه با فلورسئین انکوبه می‌گردد. سپس نسبت اسپرم‌های حاوی آنتی‌بادی متصل به فلورسئین ایزوتیوسیانات (FITC)<sup>۶</sup> در سطح آن با عبور اسپرم‌ها از طریق یک جدا کننده سلولی مشخص می‌گردد. به علاوه تعداد مولکول‌های آنتی‌بادی متصل به سطح اسپرم می‌تواند با استفاده از نمونه حاوی بیدهای فلورسنت و انجام کالیبراسیون محاسبه گردد (۱۱،۱۲).

Lahteenmaki درصد لقاح ۴۲٪، ۲۵٪ و ۱۷٪ در IVF را بترتیب در بیماران با نتایج MAR مثبت ضعیف (۴۰٪-۱۰٪)، مثبت (۹۰٪-۴۰٪) و مثبت قوی (بیش از ۹۰٪) گزارش کرد (۱۳). در مطالعه‌ای دیگر توسط Rajah و همکاران به روش MAR مستقیم، بیماران با سطوح پایین ASA (۲۰٪-۰٪) میزان لقاحی از ۶۰٪-۴۳٪ داشتند، بیماران با سطوح متوسط ASA (۸۰٪-۲۱٪) میزان لقاح ۱۰۰٪-۰٪ و بیماران با سطوح بالای ASA (بیش از ۸۰٪) میزان لقاح ۸۳٪-۰٪ داشتند (۱۴).

با توجه به اینکه اکثر مطالعات ارتباط ASA اندازه‌گیری شده به روش‌های مستقیم با میزان لقاح را بررسی کرده‌اند، ما در این مطالعه ما از روش غیرمستقیم جهت تعیین ASA و بررسی ارتباط آن با درصد لقاح

4- Mixed Agglutination Reaction  
5- Flow Cytometry  
6- Fluorescein Isothiocyanate

1- Antisperm Antibody  
2- Assisted Reproductive Technology  
3- In Vitro Fertilization

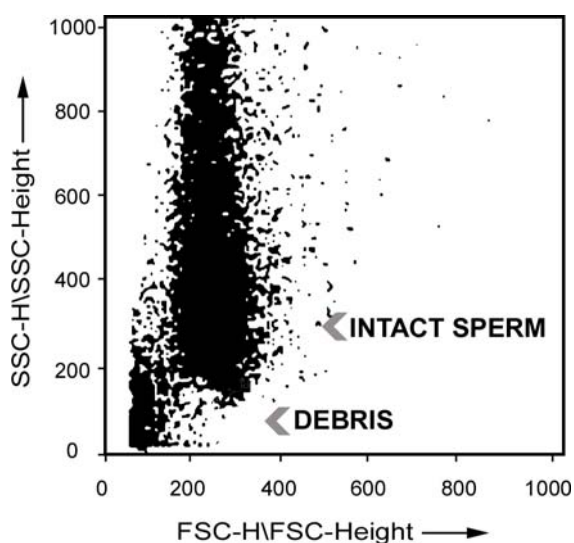
آزمایشگاهی استفاده کردیم. روش‌های غیرمستقیم برای بررسی ASA در سرم، موکوس سرویکس و پلاسمای سمینال ضروری هستند، بخصوص هنگامی که پارامترهای اسپرم خیلی پایین‌تر از معیارهای طبیعی باشند. این روش‌ها نیازی به آنالیز در همان روز جمع‌آوری نمونه ندارند، زیرا نمونه‌های پلاسمای سمینال پس از جدا کردن می‌توانند منجمد شده و در یک روز دیگر و با سایر نمونه‌ها آنالیز گردند. در ادامه اهمیت کلینیکی ایزوتیپ‌های IgG و IgA در پیشگویی درصد لقاح بررسی گردید.

### مواد و روشها

افراد مورد مطالعه، ۸۰ زوج نابارور کاندید IVF مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان بین مهرماه ۱۳۸۰ تا فروردین ماه ۱۳۸۱ بودند که IVF به عنوان روش درمان ناباروری آنها انتخاب گردیده بود. مردان شرکت کننده در این مطالعه طیف سنی ۴۰-۲۴ سال داشتند و از نظر حرکت، تعداد و مرفولوژی اسپرم براساس معیارهای WHO (حجم بیشتر از ۲ ml، تعداد بیشتر از ۲۰ میلیون در میلی‌لیتر، حرکت رو به جلو بیشتر از ۵۰٪ و مرفولوژی طبیعی بیشتر از ۳۰٪) طبیعی بودند. همسران مردان مورد مطالعه طیف سنی ۳۶-۱۹ سال داشتند، تمامی این خانم‌ها از نظر وجود آندومتریوز منفی بودند و پس از تحریک تخمک‌گذاری و دریافت تخمک در صورت عدم دریافت تخمک و یا داشتن تخمک‌های نامناسب از مطالعه حذف شدند. نمونه‌های مایع منی (براساس معیارهای WHO) از مردان این زوج‌ها بدست آمد و حداقل ۲۰۰ μl مایع منی در یک لوله اپندورف به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. سپس مایع رویی برداشت و جهت غیرفعال نمودن سیستم کمپلمان در دمای ۵۶°C به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس پلاسمای سمینال عاری از سلول در دمای

۲۰°C ذخیره شد تا برای تعیین ASA به روش فلوسیتومتری غیرمستقیم استفاده گردد (۱۵). جهت انجام فلوسیتومتری غیرمستقیم از نمونه‌های مایع سمینال استفاده شد که دارای حداقل معیار WHO برای یک نمونه طبیعی باشند و از نظر ASA به روش MAR منفی باشند (نمونه‌ها با ASA کمتر یا مساوی ۱۰٪ منفی و ASA بیشتر از ۱۰٪ مثبت در نظر گرفته شدند). ۱ ml مایع سمینال با ε ml محیط PVP+<sup>1</sup> F10+<sup>1</sup> Ham's ۲۰۰۰ rpm (Seromed, Germany) شستشو و در دور ۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از آنکه مایع رویی حذف و به رسوب اسپرم‌ها ۱ ml محیط Ham's F10+PVP اضافه شد، اسپرم‌ها در دمای ۳۷°C بمدت ۶۰ دقیقه انکوبه گردیدند. پس از این مدت، اسپرم‌های متحرک از مایع رویی برای آنالیز استفاده شدند. از طرفی پلاسمای سیمین بیماران کاندید IVF که قبلاً در دمای ۲۰°C منجمد شده بود در حرارت اتاق ذوب شد. سپس ۱۰۰ μl از نمونه حاوی اسپرم‌های متحرک آماده شده به روش فوق، به ۱۰۰ μl پلاسمای سمینال ذوب شده اضافه گردید و در دمای ۳۷°C به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شد. سپس سوسپانسیون اسپرم با ۱۰ ml محیط Ham's F10+PVP شسته شد. پس از سانتریفوژ رسوب اسپرمی مجدداً در ۲۰۰ μl محیط فوق سوسپانسیون گردید. در این مطالعه از قطعه F(ab)<sub>2</sub> آنتی‌بادی‌های خرگوشی ضد IgA (۱۰۰ μg/ml) یا IgG (۲۰۰ μg/ml) انسانی کونژوگه با FITC مخصوص فلوسیتومتری (DAKO, Denmark) جهت تعیین ASA استفاده گردید. از این آنتی‌بادی ۱۰ μl به یک میلیون اسپرم انکوبه شده با پلاسمای اضافه شد. پس از انکوباسیون در دمای ۴°C و فاقد نور نمونه‌ها با ۲ ml PBS<sup>۲</sup> شسته شدند و در دور ۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. رسوب اسپرمی مجدداً در ۰/۵ ml محلول PBS سوسپانسیون گردید و

1- Polyvinyl Pyrrolidone  
2- Phosphate Buffered Saline



شکل ۱- آنالیز خطی FSC و SSC اسپرم‌های سالم و طبیعی

محدوده ۲ قرار می‌گیرند. سلول‌های زنده (PI منفی) و ASA مثبت در محدوده ۴ قرار می‌گیرند (شکل شماره ۲). برای بررسی اسپرم‌های دارای ASA هنگامی که بیشتر از ۱۰٪ اسپرم‌ها در محدوده ۴ قرار گرفتند، نتیجه مثبت در نظر گرفته شد (۱۱،۱۶،۱۷).

برای انجام IVF تحریک تخمک‌گذاری در همسر بیماران با استفاده از آگونیست‌های GnRH، hMG انجام شد. سپس وضعیت رشد فولیکول‌ها توسط سونوگرافی و ژینال ارزیابی شد و با تجویز ۸۰۰۰ IU hCG تخمک‌گذاری القاء گردید و پس از گذشت ۳۶-۳۲ ساعت از طریق تخلیه فولیکول‌ها، اووسیت‌ها جمع‌آوری شدند. اووسیت‌ها پس از شستشو در HSA ۱۰٪<sup>۸</sup> Ham's F10 +، به محیط کشت IVF-20 (Vitrolife, Sweden) منتقل شدند. پس از ۲ ساعت انکوباسیون تعداد ۱۰۰۰۰-۵۰۰۰۰ اسپرم متحرک که به روش سانتریفوژ با استفاده از گرایانت Pure Sperm آماده شده بود، در مجاور هر اووسیت قرار گرفت. بعد از گذشت ۱۹-۱۷ ساعت انجام لقاح با توجه به تشکیل پرونوکلئوس‌ها (PN)، ارزیابی و درصد لقاح ثبت شد. زوج‌ها با میزان

برای حذف اسپرم‌های مرده از آنالیز  $5 \mu l$  از محلول PI<sup>۱</sup> (Sigma, USA) با غلظت  $2 mg/ml$  به آن اضافه گردید. ایمونوگلوبولین خرگوشی کونژوگه با FITC به عنوان کنترل منفی استفاده شد. این قطعه در صورت وجود ASA نیز توانایی اتصال به آن را ندارد. سپس اسپرم‌ها توسط فلوسیتومتر FACS-Star (Becton Dickinson, USA) با استفاده از لیزر یون آرگون با طول موج  $488 nm$  آنالیز شدند. اطلاعات حداقل ۱۰۰۰۰ سلول توسط FSC<sup>۲</sup> جمع‌آوری گردید. با استفاده از ترکیب FSC و SSC<sup>۳</sup> جمعیت اسپرم‌ها محدود سازی<sup>۴</sup> شدند و میزان فلورسانس آنها تعیین گردید، درحالی‌که بقایای سلولی و ذرات غیرسلولی و دیگر سلول‌ها از قبیل گلبول‌های سفید حذف گردیدند (شکل شماره ۱).

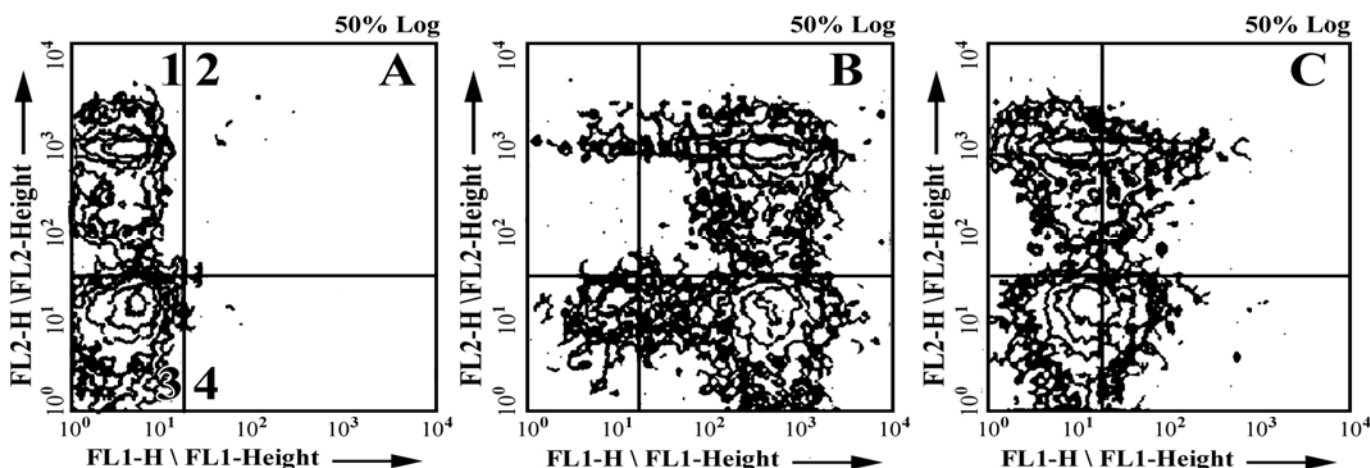
سیگنال‌های فلورسانس FITC با استفاده از فیلترهای استاندارد FITC (DF ۵۳۰/۳۰)° و فلورسانس PI با استفاده از فیلترهای استاندارد PE (DF ۵۸۵/۴۲)<sup>۱</sup> (Becton Dickinson, USA) مشخص گردید.

نتایج فلورسانس با استفاده از تقویت کننده لگاریتمیک جمع‌آوری گردید. FL<sub>1</sub>-H نشانگر فلورنس FITC اندازه‌گیری شده توسط دکتوراول و FL<sub>2</sub>-H نشانگر فلورسانس PI اندازه‌گیری شده توسط دکتور دوم بود. محدوده<sup>۵</sup> کنترل با استفاده از کنترل منفی علامت‌گذاری شد به نحوی که کمتر از ۱٪ سلول‌های مثبت در محدوده‌های ۴، ۲، ۱ قرار گرفتند.

در آنالیز فلوسیتومتری سلول‌های مرده (PI مثبت) در محدوده ۱ دیده می‌شوند. سلول‌های مرده (PI مثبت) حاوی آنتی‌بادی‌های غیراختصاصی در محدوده ۲ دیده می‌شوند. سلول‌های زنده (PI منفی) ASA منفی در

- 1- Propidium Iodide
- 2- Forward Scatter
- 3- Side Scatter
- 4- Gating
- 5- Dichroic Filter
- 6- Phycoerytherin
- 7 - Qudrant

8- Human Serum Albumin



شکل ۲- آنالیز فلوسیتومتریک دو رنگی یک نمونه اسپرم. A- (کنترل منفی) در محدوده ۱ اسپرم‌های مرده PI مثبت. در محدوده ۲ اسپرم‌های مرده (PI مثبت) حاوی آنتی بادی غیر اختصاصی. در محدوده ۳ اسپرم‌های زنده (PI منفی) و در محدوده ۴ سلول‌های زنده ASA مثبت. B- اسپرم‌های IgG مثبت و C- اسپرم‌های IgA مثبت دیده می‌شوند.

در گروه با میزان لقاح بالا (درصد لقاح  $< 50\%$ ) قرار گرفتند. ASA از کلاس IgA به روش FCM غیرمستقیم، در گروه با میزان لقاح آزمایشگاهی پایین در ۱۰ زوج (۳۶٪) منفی و در ۱۸ زوج (۶۴٪) مثبت گردید. در حالیکه، در گروه با میزان لقاح آزمایشگاهی بالا در ۴۶ زوج (۸۸٪) منفی و در ۶ زوج (۱۲٪) مثبت شد. آزمون  $\chi^2$  نشان می‌دهد که میزان موارد ASA مثبت در گروه با میزان لقاح پایین نسبت به گروه با میزان لقاح بالا تفاوت معنی‌داری داشت ( $P < 0.001$ ) (جدول شماره ۱).

مقادیر میانگین و انحراف معیار ( $M \pm SD$ ) سطح ASA از کلاس IgA به روش FCM غیر مستقیم، در گروه با میزان لقاح پایین  $12 \pm 15\%$  و در گروه با میزان لقاح آزمایشگاهی بالا  $6 \pm 5/4\%$  می‌باشد. آزمون  $t$  نشان

لقاح  $\geq 50\%$  در گروه با میزان لقاح پایین و زوجها با میزان لقاح  $< 50\%$  در گروه با میزان لقاح بالا قرار گرفتند. اطلاعات جمع‌آوری شده توسط نرم‌افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. جهت تعیین استقلال یا وابستگی دو متغیر از آزمون  $\chi^2$ ، جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون  $T$  و جهت تعیین ضریب همبستگی از آزمون همبستگی پیرسون استفاده گردید.

## نتایج

با توجه به اینکه تقسیم بیماران به دو گروه با میزان لقاح بالا و با میزان لقاح پایین حائز اهمیت بود، پس از ثبت نتایج IVF بر اساس درصد لقاح، ۲۸ زوج (۳۵٪) در گروه با میزان لقاح پایین (درصد لقاح  $\geq 50\%$ ) و ۵۲ زوج (۶۵٪)

جدول ۱- مقایسه سطح ASA از کلاس IgA به روش FCM غیر مستقیم در گروه با درصد لقاح پایین و گروه با درصد لقاح بالا در افراد نابارور کاندید IVF مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان ( $P < 0.001$ )

کل	Indirect-FCM-IgA		گروهها بر حسب میزان ASA
	$\leq 10\%$	$> 10\%$	
۲۸	۱۰	۱۸	گروهها بر حسب میزان لقاح
۵۲	۴۶	۶	زوج‌های نابارور با درصد لقاح پائین
۸۰	۵۶	۲۴	زوج‌های نابارور با درصد لقاح بالا
			کل زوج‌های نابارور

Cut off = 10%،  $\leq 10\%$  منفی و  $> 10\%$  مثبت

Test) نشان می‌دهد که میزان موارد مثبت در گروه دارای میزان لقاح پایین نسبت به گروه با میزان لقاح بالا تفاوت معنی‌داری دارد ( $P=0/007$ ) (جدول شماره ۲).

میانگین سطح ASA از کلاس IgG به روش FCM غیرمستقیم، در گروه دارای میزان لقاح آزمایشگاهی پایین  $6\pm 1/8\%$  و در گروه با میزان لقاح آزمایشگاهی بالا

می‌دهد که، میانگین سطح ASA از کلاس IgA به روش FCM غیر مستقیم در گروه با میزان لقاح آزمایشگاهی پایین، بیشتر از گروه با میزان لقاح آزمایشگاهی بالا می‌باشد ( $P<0/001$ ). آزمون همبستگی پیرسون نیز نشان می‌دهد که، بین میزان لقاح با سطح ASA از کلاس IgA به روش FCM غیرمستقیم رابطه خطی معکوس وجود

جدول ۲- سطح ASA از کلاس IgG به روش FCM غیر مستقیم در گروه با درصد لقاح پایین و گروه با درصد

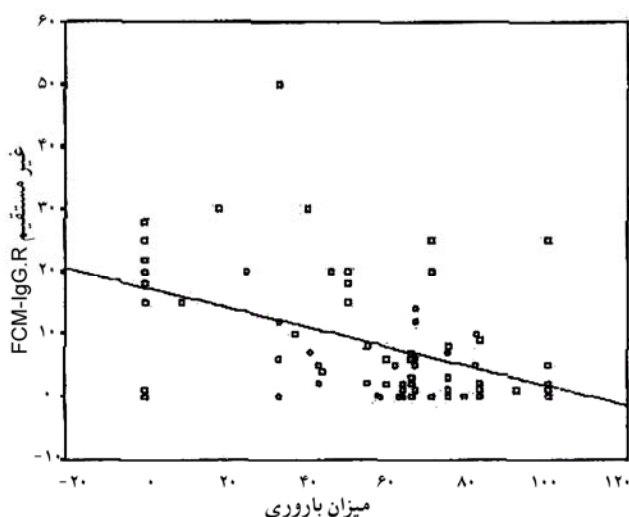
لقاح بالا در افراد نابارور کاندید IVF مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان ( $P=0/007$ )

کل	Indirect-FCM-IgG		گروهها بر حسب میزان لقاح
	$\leq 10\%$	$> 10\%$	
۲۸	۱۰	۱۸	تعداد زوجهای نابارور با درصد لقاح پایین
۵۲	۴۶	۶	تعداد زوجهای نابارور با درصد لقاح بالا
۸۰	۵۶	۲۴	تعداد کل زوجهای نابارور

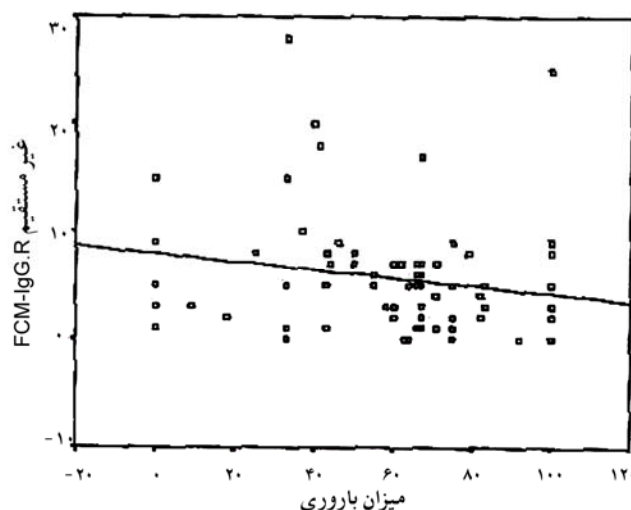
Cut off = 10% ،  $\leq 10\%$  منفی و  $> 10\%$  مثبت

$4\pm 0/5\%$  بود. آزمون T نشان می‌دهد که میانگین سطح ASA از کلاس IgG به روش FCM غیرمستقیم، در گروه با میزان لقاح آزمایشگاهی پایین بیشتر از گروه با درصد لقاح آزمایشگاهی بالا می‌باشد و اختلاف بین میانگین در دو گروه معنی‌دار است ( $P=0/004$ ). آزمون همبستگی پیرسون نیز نشان می‌دهد که، بین

دارد ( $P<0/001$  و  $r=-0/47$ ) (نمودار شماره ۱). ASA از کلاس IgG به روش FCM غیر مستقیم، در گروه با میزان لقاح آزمایشگاهی پایین در ۲۱ زوج (۷۵٪) منفی و در ۷ زوج (۲۵٪) مثبت گردید. در حالیکه، در گروه با میزان لقاح آزمایشگاهی بالا در ۵۰ زوج (۹۶٪) منفی و در ۲ زوج (۴٪) مثبت شد. آزمون  $\chi^2$  (Fisher's Exact)



نمودار ۲- پراکنش درصد ASA از کلاس IgA به روش FCM غیرمستقیم با درصد لقاح در افراد نابارور کاندید IVF مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان ( $r=-0/2$ ,  $p=0/008$ ).



نمودار ۱- پراکنش درصد ASA از کلاس IgA به روش FCM غیرمستقیم با درصد لقاح در افراد نابارور کاندید IVF مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان ( $r=-0/47$ ,  $P<0/001$ ).

میزان لقاح و سطح ASA از کلاس IgG به روش FCM غیرمستقیم، رابطه خطی معکوس اما غیر معنی‌داری وجود دارد ( $P=0/08$  و  $r=-0/2$ ) (نمودار شماره ۲).

### بحث

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که غلظت‌های بالای ASA، توانایی باروری اسپرم‌ها را کاهش می‌دهد. به عبارت دیگر سطوح بالای ASA روی سطح اسپرم و در پلاسمای سمینال با کاهش معنی‌داری در توانایی اسپرم جهت باروری تخمک مرتبط می‌باشد (۱۸،۱۹).

مطالعه Vazquez- Levin و همکاران به روش MAR مستقیم در زوج‌های کاندید IVF نشان داد که میزان باروری به طور معنی‌داری در بیماران با درصد بالای ASA متصل به سطح اسپرم کاهش می‌یابد (۱۸). Ford و همکاران بین میزان ASA به روش IBT غیرمستقیم و درصد لقاح در روش IVF، یک ارتباط معکوس را گزارش کردند. آنها دریافتند که میزان لقاح در روش IVF با افزایش سطح ASA کاهش می‌یابد (۲۰). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که بین سطح ASA اندازه‌گیری شده به روش FCM غیرمستقیم با میزان لقاح در روش IVF یک ارتباط معکوس وجود دارد. البته سطح ASA از کلاس IgG با میزان لقاح ارتباط معکوس ضعیف و غیر معنی‌داری را نشان داد. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که میانگین سطح ASA از کلاس IgA و IgG به روش FCM غیرمستقیم در گروه با میزان لقاح آزمایشگاهی پایین بیش از گروه با میزان لقاح آزمایشگاهی بالا بود.

یکی از فاکتورهای موثر در میزان باروری IVF، جایگاه اتصال ASA به سطح اسپرم (۲۱،۲۲) و توانایی آن برای پوشاندن اپی‌توپ‌های درگیر در واکنش متقابل اسپرم و تخمک می‌باشد (۸). به عبارت دیگر حضور ASA در سر اسپرم باعث اختلال در قدرت باروری آن می‌شود. از طرف دیگر معمولاً ASA در یک فرد علیه طیفی از آنتی‌ژن‌ها می‌باشد. بنابراین تاثیر ASA، احتمالاً به

ملکول‌های اختصاصی آنها در سطح اسپرم بستگی دارد. در این مطالعه تعدادی از بیماران با میزان لقاح بالا، ASA مثبت بودند، در صورتی که این نتیجه بر خلاف تئوری فوق می‌باشد و این امر ناشی از اتصال ASA به محلی غیر از سر اسپرم و یا آنتی‌ژن‌های فاقد نقش موثر در قدرت باروری اسپرم و در نتیجه عدم توانایی ASA برای مهار کردن اپی‌توپ‌های درگیر در واکنش متقابل اسپرم و تخمک است (۲۰). در ضمن وجود میزان لقاح پایین در بیماران فاقد ASA نیز می‌تواند ناشی از علل غیرایمونولوژیک مربوط باشد.

یکی دیگر از فاکتورهای موثر در میزان باروری اسپرم در روش IVF، ایزوتیپ ASA است. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که سطوح بالای یکی از دو ایزوتیپ IgG و IgA جهت مهار اتصال اسپرم به زوناپلوسیدا کافی است. با این وجود پیشنهاد شده است که حضور هر دو ایزوتیپ IgG و IgA با هم اثر مهارتی سینرژیک بر روی اتصال اسپرم به زوناپلوسیدا و باروری IVF دارد (۲۳). مطالعه Ford و همکاران نشان داد که ASA از کلاس IgA و IgG اثرات مشابهی بر میزان باروری دارند زیرا به نواحی مشابهی در اسپرم تمایل دارند که پیشنهاد می‌کند آنها علیه آنتی‌ژن‌های مشابهی باشند (۲۰). بر خلاف این گزارش، مطالعات زیادی نشان می‌دهند که اهمیت بالینی ایزوتیپ IgA از ایزوتیپ IgG بیشتر می‌باشد. به نحوی که ایزوتیپ IgA در ایجاد ناباروری مردان مهمتر از IgG می‌باشد (۲۴). در این مطالعه از میان ایزوتیپ‌های IgG و IgA، ایزوتیپ IgA ارتباط بیشتری با میزان لقاح به روش IVF داشت. از این رو تعیین ASA از کلاس IgA بیشترین اهمیت را برای پیش‌آگهی از موفقیت روش IVF دارد. مطالعه Bronson و همکارانش نشان می‌دهد که آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی در مایع سمینال بیماران به اسپرم‌ها متصل می‌گردند. در نتیجه تنها آنتی‌بادی‌های غیرمتصل که توانایی اتصال به اسپرم‌های خود بیمار را نداشته‌اند بوسیله روش‌های غیرمستقیم تعیین می‌گردند.

به جای استفاده از روش IVF تحت عمل تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) اقرار گرفتند و از مطالعه حذف گردیدند. بنابراین، در این مطالعه کلیه نمونه‌ها دارای پارامترهای طبیعی بر اساس معیارهای WHO بودند و اثر پارامترهایی از قبیل حرکت، تعداد و مرفولوژی اسپرم بر میزان لقاح IVF حذف گردیده بود. بنابراین روش FCM غیر مستقیم می‌تواند روش مناسبی برای اندازه‌گیری ASA بخصوص ایزوتیپ IgA باشد.

در پایان انجام تست ASA پیش از انجام IVF توصیه می‌گردد و در صورتی که سطح ASA بالا باشد می‌توان از انجام درمان IVF و در نتیجه اتلاف هزینه و وقت بیماران جلوگیری کرد و ICSI را بجای آن پیشنهاد کرد که در رسیدن به باروری با وجود اسپرمهای پوشیده شده با آنتی‌بادی بسیار موفق است.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات پرسنل آزمایشگاه مرکز باروری و ناباروری اصفهان قدردانی می‌گردد.

به عبارت دیگر آنتی‌بادی‌های باقی مانده در پلاسما سمینال، در تمامی موارد بازتابی از آنتی‌بادی‌های متصل به سطح اسپرم نمی‌باشند (۲۵). از طرفی این موضوع با توجه به خصوصیات ایزوتیپ‌های ASA قابل بررسی است. ایزوتیپ IgA روی سطح اسپرم و اغلب در پلاسما سمینال یافت می‌شود و معمولاً در سرم یافت نمی‌شود. برخلاف IgA، ایزوتیپ IgG اغلب روی اسپرم و یا در سرم تعیین می‌گردد (۲۴). Rasanen و همکاران نیز با مقایسه روش‌های مستقیم و غیرمستقیم تعیین ASA نشان دادند که تقریباً تمامی آنتی‌بادی ضد اسپرم از کلاس IgG و مقداری از ASA از کلاس IgA در مایع سمینال به اسپرم‌ها متصل می‌گردند. در نتیجه احتمالاً تست‌های غیرمستقیم، اندازه‌گیری آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی‌های پلاسما سمینال از کلاس IgG را از دست می‌دهند و تنها مقداری از IgA را مشخص می‌نمایند (۱۷). از دیگر فاکتورهای موثر در میزان باروری در روش IVF می‌توان به حرکت و مرفولوژی (۴) اسپرم اشاره کرد. در این مطالعه زوج‌هایی که پارامترهای اسپرم آنها غیرطبیعی بود (بخصوص از نظر حرکت و مرفولوژی)

## References

- 1-Bronson R. Detection of antisperm antibodies: an argument against therapeutic nihilism. Hum Reprod. 1999;14:1671-3.
- 2- Collins J.A., Burrows E.A., Yeo J. Frequency and predictive value of antisperm antibodies among infertile couples. Hum Reprod. 1993;8:592-8.
- 3- Gubin D.A., Dmochowski R., Kutteh W.H. Multivariate analysis of men from infertile couples with and without antisperm antibodies. Am J Reprod Immunol. 1998;39:157-60.
- 4- Muncie M.J., Berta C.L., Pauluzzi F., Caille A.M. Relationship between antisperm antibodies, Sperm movement, and semen quality. Urol Int. 2000; 65:200-3.
- 5-Taneichi A., Shibahara H., Hirano Y., Suzuki T., Obara H., Fujiwara H., Takamiza S., Sato I. Sperm immobilizing antibodies in the sera of infertile women cause low fertilization rates and poor embryo quality in vitro. Am J Reprod Immunol. 2002;47:46-51.
- 6- Fann C.H., Lee C.Y.G. Monoclonal antibodies affecting sperm-zona binding and/ or zona-induced acrosome reaction. J Reprod Immunol. 1992;21: 175-87.
- 7- Hjort T. Antisperm and infertility: an unsolvable question? Hum Reprod. 1999;14:2423-6.
- 8- Mardesic T., Ulcova- Gallova Z., Huttelova R., Muller P., Voboril J., Mikova M., Hulvert J. The influence of different types of antibodies on in vitro fertilization results. Am J Reprod Immunol. 2000; 43:1-5.



- 9- Mahmoud A., Comhaire F. Antisperm antibodies: use of the Mixed Agglutination Reaction (MAR) test using latex beads. *Hum Reprod.*2000; 15:231-3.
- 10- Haas G.C Jr., Cunningham M.E. Identification of antibody-laden sperm by cytofluorometry. *Fertil Steril.*1984;42:606-13.
- 11- Rasanen M., Hovata O.L., Penttila I.M. Detection and quantitation of sperm-bound antibodies by flow cytometry of human semen. *J Androl.*1992; 13:55-64.
- 12- KeR W., Dockter M.E., Majumdar G. Flow-cytometry provides rapid and highly accurate detection of antisperm antibodies. *Fertil Steril.*1995;63: 902-6.
- 13- Lahteenmaki A. In vitro fertilization in the presence of antisperm antibodies detected by the Mixed Antiglobulin Reaction(MAR) and the tray agglutination test(TAT). *Hum Reprod.*1993;8:84-8.
- 14- Rajah S.V., Parslow J.M., Howell R.J., Hendry W.F. The effects on in vitro fertilization of auto-antibodies to spermatozoa in subfertile men. *Hum Reprod.*1993;8:1079-82.
- 15- Nicholson S.C., Robinson J.N., Sargent I.L, Barlow D.H. Detection of antisperm antibodies in seminal plasma by flow cytometry: comparison with the indirect immunobead binding test. *Fertil Steril.*1997;68:1114-9.
- 16- Nikolaeva M.A., Kulakov V.I., Korotkova I.V., Golubeva E.L., Kuyavskaya D.V., Sukhikh G.T. Antisperm antibodies detection by flowcytometry is affected by aggregation of antigen-antibody complex on the surface of spermatozoa. *Hum Reprod.*2000;15:2545-53.
- 17- Rasanen M., Agrawal Y.P., Saarikoski S. Seminal fluid antisperm antibodies measured by direct flow cytometry donot correlate with those measured by indirect flow cytometry,the indirect immunobead test, and the indirect mixed anti-globulin reaction. *Fertil Steril.*1996;65:170-5.
- 18- Vazquez – Levin M.H., Notrica J.A., De Fried E.P. Male immunologic infertility: sperm performance on in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1997; 68:675-81.
- 19- Bohring G., Krause W. Immune infertility: towards a better understanding of sperm (auto)-immunity. *Hum Reprod.*2003;18:915-24.
- 20- Ford W.C.L., Williams K.M., McLaughlin E.A., Harrison S., Ray B., Hull M.G.R. The indirect immunobead test for seminal antisperm antibodies and fertilization rates at in-vitro fertilization. *Hum Reprod.*1996;11:1718-22.
- 21- Shibahara H., Shiraishi Y., Hirano Y., Suzuki T., Takamizawa S., Suzuki M. Diversity of the inhibitory effects on fertilization by antisperm antibodies bound to the surface of ejaculated human sperm. *Hum Reprod.*2003;18:1469-73.
- 22- Shibahara H., Tsunoda T., Taneichi A., Hirano Y., Ohno A., Takamizawa S., Yamaguchi C., Tsunoda H., Sato I . Diversity of antisperm antibodies bound to sperm surface in male immunological infertility. *Am J Reprod Immunol.*2002;47: 146-50.
- 23- Zouari R., De Almedia M. Effect of sperm associated antibodies on human sperm ability to bind to zona pellucida and penetrate zona-free hamster oocytes. *J Reprod Immunol.*1993;24: 175-86.
- 24- Kremer J., Jager S. The significance of anti-sperm antibodies for sperm-cervical mucus interaction. *Hum Reprod.*1992;7:781-4.
- 25- Bronson R.A., Cooper G.W., Rosenfeld D.L. Seminal fluid antisperm antibodies do not reflect those present on the sperm surface. *Fertil.*1987; 48:505-6.