Downloaded from journal.rums.ac.ir at 14:26 IRST on Tuesday September 26th 2017

مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره هفتم، شماره اول، بهار ۱۳۸۷، ۵۶-۴۹

مقایسه اثر توکسیسیتی لیپوپلی ساکارید تعدادی از باکتری‌های گرم منفی از جمله کلامیدیا تراکوماتیس بر اسپرم انسانی

دکتر حمید حکیمی[۱]، دکتر ابوالقاسم مساوات[۲]، دکتر فرشید فرح‌بخش[۳]، دکتر سیدمهدی سیدمیرزایی[۴]، دکتر غلامحسین حسن‌شاهی[۵]، دکتر ادریا الی[۶]

دریافت مقاله: ۸۶/۴/۵ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۶/۸/۸ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۷/۰۲/۲۳ پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۸

چکیده

زمینه و هدف: کلامیدیا تراکوماتیس به عنوان یکی از شایع‌ترین علل بیماری‌های مقاربتی خصوصاً در دنیای غرب مطرح است. این باکتری به عنوان یکی از علل ناباروری در زنان نقش دارد گر چه ارتباط آن با ناباروری مردان مورد بحث است. علاوه بر کلامیدیا، بعضی از باکتری‌های خانواده آنتروباکتریاسهآ از قبیل ایکولای،کلبسیلا و سراشیا نیز در اختلال عملکرد اسپرم انسانی مطرح می‌باشند. هدف از این مطالعه مقایسه اثر توکسیسیتی لیپوپلی‌ساکاریدهای این باکتری‌ها بر اسپرم انسانی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی ۵۰ و ۲۵، ۱۰، ۱، ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکاریدهای تجاری ایکولای،کلبسیلا و سراشیا و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکاریدکلامیدیای ساخته شده و در گروه کنترل ۲۰ میکرولیترازEBSS ×۱در آزمایشگاه با۱۸۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپرم انسانی با غلظت ۵×۱۰^{۶} اسپرم در میلی‌لیتر که به روش percoll gradient تهیه شده بود به مدت ۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن ۵٪ نگهداری شدند. پس از طی این مدت میزان مرگ و حیات اسپرم‌ها با تست HOS ارزیابی شد.

یافته‌ها: هیچ‌یک از لیپوپلی‌ساکاریدهای تجاری ایکولای،کلبسیلا و سراشیا با غلظت‌های کمتر از ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تأثیر منفی بر حیات اسپرم‌ها نداشت در حالی که لیپوپلی‌ساکارید کلامیدیا با غلظت ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر قادر به مرگ تعداد قابل توجهی از اسپرم‌ها شد که نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: عفونت‌های کلامیدیایی اگر چه از لحاظ بالینی عمدتاً مزمن و بدون علامت هستند اما نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که این باکتری در شرایط آزمایشگاهی حدود پانصد بار قوی‌تر از باکتری‌های متعلق به خانواده آنتروباکتریاسهآ که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته‌اند قادر به مرگ اسپرم‌های انسانی می‌باشد. این مطالعه و دیگر مطالعات مشابه مؤید نقش کلیدی کلامیدیا تراکوماتیس به عنوان یکی از عوامل عفونی ناباروری مردان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: لیپوپلی‌ساکارید، کلامیدیا، آنتروباکتریاسهآ، اسپرم، ناباروری مردان

۱- استادیار گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

تلفن: ۰۳۹۱-۵۲۳۴۰۰۳، فاکس: ۰۳۹۱-۵۲۲۵۲۰۹، پست الکترونیکی: hamid.hakimi@gmail.com

۲- استادیار گروه آموزشی اطفال دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۳- استادیار گروه آموزشی بیهوشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۴- استادیار گروه آموزشی داخلی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۵- استادیار گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۶- دانشیار گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشگاه شفیلد انگلستان

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 14:26 IRST on Tuesday September 26th 2017

مقدمه

نقش عفونت‌های باکتریایی از جمله کلامیدیا تراکوماتیس در ایجاد ناباروری خصوصاً در زنان به اثبات رسیده است [۱]. باکتری‌ها هم‌چنین قادر به تجمع و بی‌حرکت کردن اسپرم می‌باشند [۲]. در باکتری‌های گرم منفی لیپوپلی‌ساکارید، (LPS) به عنوان بخش بیولوژیک فعال و آسیب‌زای اندوتوکسین، یکی از ساختمان‌های عمده و تحریک کننده سیستم ایمنی میزبان است که در غشاء خارجی دیواره سلولی قرار گرفته است. LPS با چندین مکانیسم در حیات و آسیب‌زایی باکتری‌های گرم منفی نقش دارد. اولاً LPS سدی است که صرفاً در مقابل مولکول‌های هیدروفیلیک با وزن کم نفوذپذیر می‌باشد. ثانیاً از باکتری در مقابل سیستم دفاعی میزبان محافظت می‌کند و ثالثاً نقش مهمی در تقابل پاتوژن با میزبان دارد [۳]. ساختمان بیوشیمیایی LPS از سه قسمت تشکیل شده است: ۱) Ag-O که حاوی مولکول‌های تکراری اولیگوساکارید می‌باشد ۲) Core region متشکل از هترواولیگوساکارید و ۳) Lipid A متشکل از دی‌ساکاریدهای گلوکوزآمینی .Lipid A به عنوان بخش توکسیک و زنجیره پلی‌ساکارید و عامل محرک سیستم ایمنی از اجزاء اصلی و بیماری‌زای LPS می‌باشد [۴]. در این مطالعه تأثیر LPS چهار باکتری گرام منفی شامل کلامیدیا تراکوماتیس، اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیا و سراشیا بر اسپرم انسانی در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است. دلیل انتخاب این باکتری‌ها، استخراج LPS آن‌ها از دستگاه ادراری تناسلی مردان و تشابه نسبی ساختمان بیوشیمیایی آن‌ها می‌باشد [۵]. نتایج تحقیقات در دانشگاه شفیلد انگلستان نشان داد که LPS مشتق شده از *C. trachomatis* قادر به از بین بردن اسپرم انسانی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد [۷-۶].

اشرشیاکلی علاوه بر این که شایع‌ترین علت عفونت دستگاه ادراری است، در ایجاد اسهال‌های عفونی هم نقش دارد و در ایجاد ناباروری نیز بی‌تأثیر نیست [۸]. کلبسیلا پنومونیا به عنوان یک باکتری فرصت طلب در عفونت‌های بیمارستانی، باکتریمی، پنومونی و عفونت‌های دستگاه ادراری دخیل می‌باشد و هم‌چون اشرشیاکلی در ایجاد ناباروری نقش دارد [۹-۸]. *S. marcescens* نیز مانند کلبسیلا پنومونیا، باکتری فرصت طلبی است که به عنوان عامل ایجاد پنومونی، سپتی‌سمی، مننژیت و عفونت‌های دستگاه ادراری شناخته شده است [۱۰]. با استناد به منابع ذکر شده، باکتری‌های مورد اشاره در ایجاد عفونت‌های ادراری و گاهی در ایجاد ناباروری نقش دارند. اما این که آیا این باکتری‌ها قدرت آسیب‌زایی یکسانی بر پارامترهای اسپرم انسانی خصوصاً حیات آن‌ها دارند سوالی است که پاسخ دادن به آن، هدف این مطالعه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، ابتدا نمونه‌های مایع منی داوطلبین سالم مراجعه کننده به بیمارستانHallamshire (شفیلد، انگلستان) که بر اساس استانداردهای سازمان جهانی بهداشت [۱۱] نرمال تشخیص داده شدند جمع‌آوری شد (با در نظر گرفتن ملاحظات اخلاقی مصوب South Research Ethics Committee, project number 02/337). از هر ۱ میلی‌لیتر نمونه منی مایع شده با استفاده از روش Percoll gradient[۱۲] سوسپانسیونی از اسپرم‌های با تحرک بالا و کمترین آلودگی از نظر وجود لکوسیت تهیه شد. بدین منظور ابتدا از پرکول ۱۰۰٪ با استفاده از محلول 1 x Earl's balanced salt solution (EBSS) (Invitrogen Ltd, Paisley, UK) containing 0.3% (w/v) Bovine serum albumin (BSA) دو غلظت ۴۰٪ و ۸۰٪ تهیه شد. ۱ میلی‌لیتر از محلول ۸۰٪ در یک لوله استریل ۱۵ میلی‌لیتری مخروطی شکل ریخته شد و به آرامی ۱ میلی‌لیتر از محلول ۴۰٪ ، روی محلول اولی اضافه شد و سرانجام ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپرم به تدریج روی محلول ۴۰٪ اضافه گردید به گونه‌ای که در نهایت این دو محلول و سوسپانسیون بدون ادغام در یکدیگر با مرز مشخصی در لوله از یکدیگر مجزا شدند. لوله به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه گذاشته شد. پس از طی این مدت لایه روی سوسپانسیون بیرون ریخته شد و مابقی در ۱ میلی‌لیتر از EBSS حاوی BSA ۰/۳٪ رقیق شد به گونه‌ای که غلظت اسپرم در سوسپانسویون ۵×۱۰^{۶} اسپرم در میلی‌لیتر تنظیم شد.

لیپوپلی‌ساکارید باکتری‌های ایکولای،کلبسیلا و سراشیا به صورت تجاری تهیه شد (سیگما، انگلستان). از آن جا که

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 14:26 IRST on Tuesday September 26th 2017

لیپوپلی‌ساکارید تجاری کلامیدیا موجود نبود فرم عفونی اما غیرفعال (از لحاظ متابولیک) کلامیدیاتراکوماتیس EBs (Serovar Serovar Lymphogranvloma Venereum (LGV) در محیط آزمایشگاهی و با کشت مکرر و انبوه در بیش از ۲۰۰ فلاسک کشت اختصاصی ۷۵میلی‌لیتر حاوی سلول‌های McCoy تهیه شد [۱۳]. محیط کشت اختصاصی جهت رشد EBs حاوی Minimum Essential Medium Eagle ([EMEM], در foetal calf serum ۱۰٪ و ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر از محلول سیکلوهگزامید (سیگما، انگلستان) مورد استفاده قرار گرفت .EBs سپس با روش کالدول از سلول‌های McCoy جدا شدند [۱۴]. پس از جمع‌آوری، شستشو و تغلیظ EBs در محلول PBS، با استفاده از روش Nurminen لیپوپلی‌ساکارید جدا شد [۱۵]. در این روش ابتدا سوسپانسیون EBs به کمک ۸ سی‌سی محلول اوروگرافین و سانتریفیوژ با سرعت۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد از سلول‌های McCoy جدا شد. EBs تصفیه شده در ۲/۵ میلی‌لیتر محلول فنل ۹۰٪ به مدت نیم ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد با همزن مغناطیسی مخلوط شدند. در مرحله بعد ۴ میلی‌لیتر اتر و ۲/۵ میلی‌لیتر کلروفرم به مخلوط اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق با همزن مغناطیسی مخلوط شدند. سپس با سرعت g × ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت نیم ساعت سانتریفیوژ شدند. محلول حاصله در استون ۲۰- درجه سانتی‌گراد رسوب داده شد. رسوب نهایی در استون سرد شستشو داده شد و در دستگاه واکیوم خشک شد و در ۲۰۰ میکرومول محلول ۲SP٪ +۰/۱٪ تری‌اتیل آمین حل شد. جهت اثبات جداسازی موفقیت‌آمیز لیپو پلی‌ساکارید، ۲۰ میکرومول از محلول حاصله را بر روی ژل پولی‌آکریل آمید ۱۴٪ با ولتاژ ۱۵۰-۱۰۰ عبور داده و پس از اتمام کار ژل در متانول و اسید استیک خشک و رنگ‌آمیزی نقره به عمل آمد. به کمک Limulus Amebocyte Lysate (LAL) (Cambrex Biosciences, UK) میزان کمی لیپوپلی ساکارید حاصله محاسبه شد.

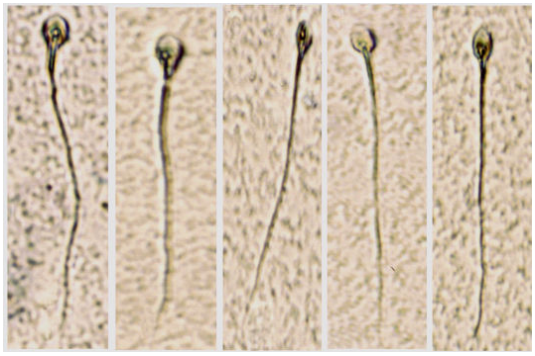
به ۲۲ اپندورف ،۱۸۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم با غلظت ۵×۱۰^{۶} اسپرم در میلی‌لیتر ریخته شد. به یک اپندورف ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر (بر اساس تجارب قبلی) از لیپوپلی‌ساکارید کلامیدیای تولید شده به شرح فوق، به ۱۵ اپندورف غلظت های ۲۵، ۱۰، ۱، ۰/۱ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکاریدهای تجاری ذکر شده هر یک به حجم ۲۰ میکرولیتر اضافه شد. به یک اپندورف ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکارید کلامیدیا به همراه ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پلی‌میکسین‌بی (PMB) و به سه اپندورف ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکاریدهای تجاری به همراه ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر PMB اضافه شد. به دو اپندورف آخر نیز ۲۰ میکرولیتر از EBSS ×۱ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر PMB به عنوان گروه کنترل اضافه شد. اپندورف‌ها به مدت ۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسیدکربن نگهداری شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر اپندورف با ۲۰۰ میکرولیتر محلول Hypo-Osmotic Swelling test (HOS) حاوی دی‌هیدرات‌سیترات سدیم و فروکتوز مخلوط و به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته شدند تا میزان حیات و مرگ اسپرم‌ها بررسی شود [۱۱]. اساس این تست بر نفوذپذیری نسبی غشاء پلاسمایی اسپرم زنده در برابر محلول هیپو اسمولار می‌باشد. به گونه‌ای که غشاءپلاسمایی اسپرم زنده در مجاورت این محلول متورم شده و از نا حیه دم پیچ می‌خورد در حالی که اسپرم مرده دمی صاف و کشیده دارد.

از اسپرم‌ها پس از مجاورت با محلول هیپواسمولار اسلاید تهیه شد و پس از فیکس شدن در متانول به مدت ۴۵ دقیقه، با میکروسکوپ نوری، ۱۰۰ اسپرم از هر اپندورف شمارش و بر اساس شکل دم درصد اسپرم های مرده (شکل ۱) و زنده (شکل ۲) مشخص شد. هر آزمایش شش بار تکرار و نتایج حاصل از این مطالعه با نرم افزار آماری GraphPad InStat software version 3.0 (GraphPad Software, Inc. USA). مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. معنی دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها با Student's t test بررسی شد.

نتایج

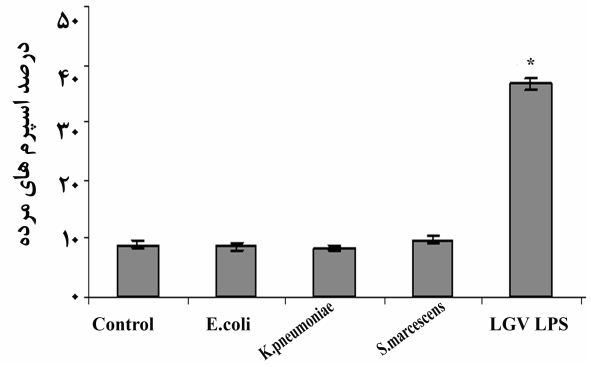
میانگین مرگ اسپرم‌ها در زمان صفر و قبل از مجاورت با لیپوپلی‌ساکاریدها، ۰/۹±۸/۷٪ بود (کلیه اعداد بعد از علامت ± و همچنین Error bar نمودارها نشان‌دهنده انحراف معیار است). ۶ ساعت پس از انکوباسیون، میزان مرگ اسپرم در

گروه کنترل تغییر قابل ملاحظه‌ای نداشت (p>۰/۰۵، ۸/۹±۰/۶). اما درصد قابل توجهی از اسپرم‌هایی که در مجاورت ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکارید کلامیدیا قرار گرفته بودند مردند، (p<۰/۰۰۱، ۳۸/۶±۱٪). در صورتی که میزان مرگ اسپرم در اپندورف‌های با غلظت‌های ۲۵، ۱۰، ۱، و ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکاریدهای تجاری ایکولای (۸/۸±۰/۶٪)، کلبسیلا (۸/۷±۰/۵) و سراشیا (۹/۱±۰/۶٪) تغییر معنی‌داری پیدا نکرد (نمودار۱) اما تنها در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، لیپوپلی‌ساکاریدهای تجاری قادر به افزایش معنی‌دار در میزان مرگ اسپرم به شرح ذیل شدند: ایکولای (۲۱±۰/۵٪)، کلبسیلا (۲۲/۳±۱/۹٪) و سراشیا (۲۲/۳±۱/۱٪) (نمودار۲). اثر توکسیک لیپوپلی‌ساکاریدها در حضور PMB به صورت معنی‌داری کاهش یافت (کلبسیلا، ۲۴±۰/۵٪ و ایکولای، ۱۳±۰/۴٪) (نمودار۳). درصد اسپرم‌های مرده در اپندورف‌های حاوی صرفاً EBSS و PMB تغییر قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل بعد از شش ساعت نداشت (۹/۷±۰/۶٪ و ۱۰±۰/۲٪).



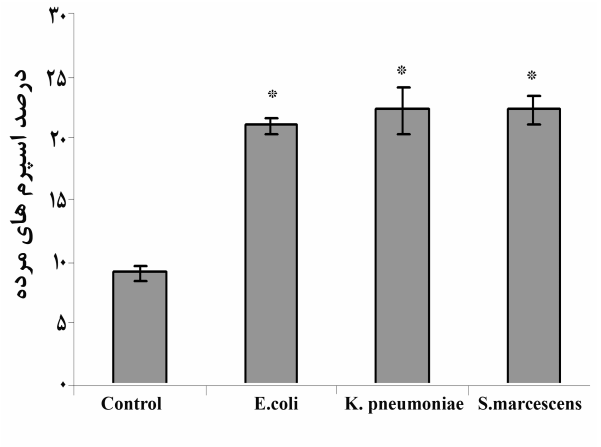
شکل ۱- اسپرم‌های مرده در مجاورت محلول هیپواسمولار. دم اسپرم کشیده و صاف می‌شود.

شکل ۲- اسپرم‌های زنده در مجاورت محلول هیپواسمولار. دم اسپرم به صور مختلف پیچ می‌خورد.

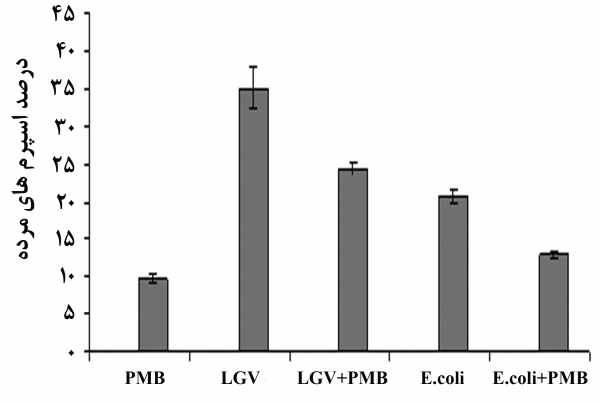


نمودار ۱- درصد مرگ اسپرم طی ٦ ساعت مجاورت با ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید کلامیدیا و ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر (به عنوان نمونه‌ای از غلظت‌های کمتر از ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) لیپوپلی‌ساکاریدهای تجاری ایکولای، کلبسیلا و سراشیا.

**** = اختلاف معنی‌دار***



نمودار۲- توزیع فراوانی نسبی مرگ اسپرم طی ٦ ساعت مجاورت با ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر لیپوپلی‌ساکاریدهای تجاری ایکولای، کلبسیلا و سراشیا، * = اختلاف معنی‌دار.



نمودار۳- توزیع فراوانی نسبی مرگ اسپرم طی ٦ ساعت مجاورت با ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید کلامیدیا و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر لیپوپلی‌ساکارید تجاری ایکولای (به عنوان نمونه) در حضور و غیاب ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر PMB.

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 14:26 IRST on Tuesday September 26th 2017

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 14:26 IRST on Tuesday September 26th 2017

بحث

ارتباط بین عفونت‌های باکتریایی و ناباروری مردان از نظر محققینی که در زمینه باروری و عقیمی فعالیت می‌کنند حایز اهمیت می‌باشد. Matthews و Buxton جزو اولین کسانی بودند که نشان دادند باکتری‌های جداشده از گردن رحم قادر به از بین بردن اسپرم‌های انسانی می‌باشند [۱۶]. در سال ۱۹۷۱، Teague و همکارانش باکتری ایکولای را از کشت ترشحات گردن رحم جدا نموده و با اسپرم انسانی مجاور کرده و نشان دادند که این باکتری اثر توکسیک بر اسپرم‌ها دارد [۱۶]. مطالعه مشابهی نیز توسط Diemer در سال ۱۹۹۶ انجام شد و بر تأثیر منفی ایکولای بر میزان تحرک اسپرم صحه گذاشت [۱۷].

Galdiero و همکارانش در سال ۱۹۸۸ نشان دادند که لیپوپلی‌ساکارید ایکولای با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پس از یک ساعت مجاورت تا ۸۰٪ اسپرم‌های انسانی را از بین می‌برد [۱۸]. اما این که آیا کلامیدیا اثر مستقیم بر پارامترهای اسپرم انسانی و نتیجتاً ناباروری دارد هنوز مورد بحث می‌باشد. مطالعات انجام شده بر پایه روش‌های سرولوژیک نشان داده است که عفونت‌های کلامیدیایی اثر قابل توجهی بر ناباروری مردان ندارند [۲۰-۱۹]. در حالی که Galdiero [۲۱] و تیم تحقیقاتی ما نشان دادند که کلامیدیا تراکوماتیس در شرایط آزمایشگاهی عملکرد اسپرم انسانی را مختل می‌کند. با تهیه لیپوپلی‌ساکارید کلامیدیا و انکوباسیون آن با اسپرم‌ها هم چنین مشخص شد که کلامیدیا اثر تخریبی خود را با واسطه لیپوپلی‌ساکارید و نه دیگر ساختارهای بیوشیمیایی دیواره سلولی اعمال می‌کند به طوری که لیپوپلی‌ساکارید در حضور PMB قادر به اعمال اثر توکسیک خود نبود PMB آنتی‌بیوتیک پلی‌کاتیونیک است که ضمن نفوذ به غشاء سلولی، به لیپید A به عنوان جزء فعال و سمی لیپوپلی‌ساکارید متصل شده و آن را غیرفعال می‌کند [۲۲]. در این مطالعه نه تنها اثر لیپوپلی‌ساکارید کلامیدیای ساخت آزمایشگاه، بلکه سه لیپوپلی‌ساکارید تجاری دیگر، ایکولای، کلبسیلا و سراشیا، بر اسپرم انسانی بررسی شد. وجه اشتراک سه باکتری اخیر تعلق آن‌ها به خانواده آنتروباکتریاسه‌آ، مشارکت در ایجاد عفونت‌های ادراری و تا حدی اثر توکسیک بر اسپرم انسانی می‌باشد. نتایج بررسی میزان حیات و مرگ اسپرم‌ها با استفاده از تست HOS، شش ساعت پس از انکوباسیون اسپرم با این چهار لیپوپلی‌ساکارید نشان داد که لیپوپلی‌ساکارید کلامیدیا با مقدار ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر اثر سمی قابل توجهی بر حیات اسپرم‌ها دارد در حالی که سه لیپوپلی‌ساکارید دیگر تنها با افزایش میزان غلظت تا حد ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر قادر به اعمال اثر توکسیک خود می‌باشند. همان‌طور که قبلاً ذکر شد مطالعات عدیده‌ای در خصوص تأثیر منفی ایکولای و به ویژه کلامیدیا بر اسپرم انسانی وجود دارد اما تحقیقات چندانی در خصوص اثر لیپوپلی‌ساکارید کلبسیلا و سراشیا بر اسپرم انسانی صورت نگرفته است. به عنوان مثال، برای اولین بار تیم تحقیقاتی Dumoulin در سال ۱۹۹۱ اثر لیپوپلی‌ساکارید سراشیا را بر اسپرم انسانی بررسی نمودند. مطالعه آن‌ها نشان داد که این لیپوپلی‌ساکارید حتی با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تأثیر منفی بر اسپرم ندارد [۲۳] که بر خلاف نتایج مطالعه ما می‌باشد. دو فرق عمده بین نحوه انجام این دو مطالعه شاید توجیه کننده نتایج متناقض حاصله باشد. اول این که تیم Dumoulin محیط کشت Whittingham's T6 و مکمل آلبومین سرم گاوی را جهت آماده‌سازی اسپرم استفاده نمود در حالی که در این مطالعه percoll gradient به کار گرفته شد. از طرفی روش شمارش اسپرم در مطالعه اول Makler counting chamber بود که با روش HOS در این مطالعه کاملاً متفاوت می‌باشد.

اختلاف در ساختار بیوشیمیایی لیپوپلی‌ساکاریدهای مورد استفاده در این مطالعه تا حدی می‌تواند توجیه کننده اختلاف در غلظت‌های به کار رفته باشد. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد کلامیدیا دارای یک لیپوپلی‌ساکارید ضعیف با فعالیت کم، البته نه در مقابل اسپرم و در شرایط آزمایشگاهی، از لحاظ کلینیکی می‌باشد. لیپوپلی‌ساکارید کلامیدیا واجد زنجیره طویل و غیرمعمولی از اسیدهای چرب (C۱۴-C۲۱) به صورت penta-acyl و دیکلوکوزامین مونوفسفوریلاسیون می‌باشد در شرایطی که لیپوپلی‌ساکارید باکتری‌های دیگر بین ۱۰ تا ۲۰ قند به لیپید A آن‌ها متصل است. کلامیدیا یک قند منحصر به فرد تری- ساکاریدی متصل به لیپید A دارد [۲۴]. هم‌چنین

لیپوپلی‌ساکارید این باکتری فاقد O-chain است که دلیل احتمالی دیگری بر فعالیت ضعیف آندوتوکسین آن و در نتیجه سیر مزمن و بعضاً بدون علایم بیماری‌های حاصل از عفونت کلامیدیایی می‌باشد. لیپوپلی‌ساکارید ایکولای دارای لیپید A دی‌فسفوریلیتد hexa-acyl می‌باشد که از این لحاظ با لیپوپلی‌ساکارید کلامیدیا تفاوت دارد. لیپوپلی‌ساکارید کلبسیلا نیز متشکل از هموپلی‌ساکارید در زنجیره O و زنجیره‌های آسیلی ۱۶-۱۲ کربنه که جایگزین لیپید A دی فسفوریلیتد شده، می‌باشد. ساختمان بیوشیمیایی لیپوپلی‌ساکارید سراشیا نیز از لحاظ وزن مولکلولی، وجود گلوکرونیک اسید، گالاکتویورونیک اسید و پیرووات، تشابه نزدیکی با کلبسیلا و ایکولای دارد [۲۴].

علاوه بر تفاوت‌های ذکر شده، نوع و ویژگی‌های سلول میزبان و شرایط محیطی که سلول میزبان با باکتری‌های بیماری‌زا مواجه می‌شود از دیگر علل پیشنهادی است که می‌تواند توجیه کننده شدت و ضعف اثر توکسیک باکتری‌ها در مقابل اسپرم و نهایتاً ناباروری مردان باشند.

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این مطالعه، در شرایطی که عفونت‌های کلامیدیایی از لحاظ بالینی عمدتاً مزمن و یا بدون علامت هستند در شرایط آزمایشگاهی و در مواجه با سلول میزبانی هم‌چون اسپرم قادرند تا حدود پانصد بار قویتر ازحداقل سه باکتری خانواده باکتریاسه آ که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته‌اند ظاهر شوند. نتایج این تحقیق به همراه نتایج دیگر مطالعات مشابه تأییدی بر اهمیت این باکتری به عنوان یکی از علل احتمالی ناباروری در مردان می‌باشد و شناخت بیش از پیش مکانیسم آسیب‌زایی این باکتری را می‌طلبد.

References

[1] Malik A, Jain S, Hakim S, Shukla I, Rizvi M. Chlamydia trachomatis infection and female infertility. *Indian J Med Res,* 2006; 123(6): 770-5.

[2] Del Porto GB, Derrick FC JR, Bannister ER. Bacterial effect on sperm motility. *Urolog,* 1975; 5(5): 638-9.

[3] Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J,* 1994; 8(2): 217-25.

[4] Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infec*t, 2002; 4(8): 837-51.

[5] Haeffner-Cavaillon N, Caroff M, Cavaillon JM. Interleukin-1 induction by lipopolysaccharides: structural requirements of the 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO). *Mol Immunol*, 1989; 26(5): 485-94.

[6] Hosseinzadeh S, Brewis IA, Eley A, Pacey AA. Co-incubation of human spermatozoa with Chlamydia trachomatis serovar E causes premature sperm death. *Hum Reprod,* 2001; 16(2): 293-9.

[7] Hakimi H, Geary I, Pacey A, Eley A. Spermicidal activity of bacterial lipopolysaccharide is only partly due to lipid A. *J Androl*, 2006; 27(6): 774-9.

[8] Rodriguez R, Hernandez R, Fuster F, Torres A, Prieto P, Alberto J. Genital infection and infertility. *Enferm Infecc Microbiol Clin,* 2001; 19(6): 261-6.

[9] Hansen DS, Gottschau A, Kolmos HJ. Epidemiology of Klebsiella bacteraemia: a case control study using Escherichia coli bacteraemia as control. *J Hosp Infect,* 1998; 38(2): 119-32.

[10] Bollmann R, Halle E, Sokolowska-Kohler W, Grauel EL, Buchholz P, Klare I, et al. Nosocomial infections due to *Serratia marcescens*--clinical findings, antibiotic susceptibility patterns and fine typing. *Infection*, 1989; 17(5): 294-300.

[11] WHO. *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction,* 2000; Cambridge University Press, Cambridge, UK.

[12] Hosseinzadeh S, Brewis IA, Pacey AA, Moore HD, Eley A. Coincubation of human spermatozoa with Chlamydia trachomatis in vitro causes increased tyrosine phosphorylation of sperm proteins. *Infect Immun,* 2000; 68(9): 4872-6.

[13] Tjiam KH, van Heijst BY, de Roo JC, de Beer A, van Joost T, Michel MF, et al. Survival of Chlamydia trachomatis in

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 14:26 IRST on Tuesday September 26th 2017

different transport media and at different temperatures: diagnostic implications. *Br J Vener Dis*, 1984; 60(2): 92–4.

[14] Caldwell HD, Kromhout J, Schachter J. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis. *Infect Immun*, 1981; 31(3): 1161–76.

[15] Nurminen M, Rietschel ET, Brade H. Chemical characterization of Chlamydia trachomatis lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 1985; 48(2): 573–5.

[16] Teague NS, Boyarsky S, Glenn JF. Interference of human spermatozoa motility by Escherichia coli. *Fertil Steril,* 1971; 22(5): 281-5.

[17] Diemer T, Weidner W, Michelmann HW, Schiefer HG, Rovan E, Mayer F. Influence of Escherichia coli on motility parameters of human spermatozoa in vitro. *Int J Androl*, 1996; 19(5): 271-7.

[18] Galdiero F, Gorga F, Bentivoglio C, Mancuso R, Galdiero E, Tufano MA. The action of LPS porins and peptidoglycan fragments on human spermatozoa. *Infection*. 1988; 16(6): 349-53.

[19] Eggert-Kruse W, Rohr G, Demirakca T, Rusu R, Naher H, Petzoldt D. et al. Chlamydial serology in 1303 asymptomatic subfertile couples. *Hum Reprod*, 1997; 12(7): 1464-75.

[20] Rezacova J, Masata J, Pribylova M, Drazd'akova M. Chlamydia trachomatis in men with impaired fertility. *Ceska Gynekol*, 1999; 64(6): 371-5.

[21] Galdiero F, Sommese L, Gorga F, Galdiero E, Rizzo A, Ajello M. Toxic effect on human spermatozoa by Chlamydia trachomatis purified lipopolysaccharide. *FEMS Microbiol Lett,* 1994; 115(2-3): 197-200.

[22] Warner SJ, Mitchell D, Savage N, McClain E. Dose-dependent reduction of lipopolysaccharide pyrogenicity by polymyxin B. *Biochem Pharmacol*, 1985; 34(22): 3995-8.

[23] Dumoulin JC, Menheere PP, Evers JL, Kleukers AP, Pieters MH, Bras M, et al. The effects of endotoxins on gametes and preimplantation embryos cultured in vitro. *Hum Reprod,* 1991; 6(5): 730-4.

[24] Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect,* 2002; 4(8):837-51.

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 14:26 IRST on Tuesday September 26th 2017

Comparison of the Toxicity Spermicidal Effect of Some Gram Negative Bacteria's Lipopolysocharides, Including that from *Chlamydia Trachomatis* on Human Sperm

H. Hakimi PhD[1], **A. Mosavat** MD[2], **F. Farahbakhsh** MD[3], **S.M. Seyed Mirzaei** MD[4], **GH. Hasanshahi** PhD[5], **A.R. Eley** PhD[6]

Received: 26/06/07 **Sent for Revision: 30/10/07** **Received Revised Manuscript: 12/05/08** **Accepted: 28/05/08**

Background and Objective: *Chlamydia trachomatis* infection is one of the most common sexually transmitted diseases especially in western countries. While there is agreement on the manifestations and, in particular, the negative effects of *Chlamydia* infection on female fertility, the role of this organism in male fertility is still controversial. In addition to *Chlamydia*, some bacteria belong to the enterobacteriaceae family, including; *E.coli, Klebsiella, and Serattia* have been suggested in human sperm dysfunction. The purpose of the present study was to compare the *in vitro* toxic effects of lipopolysaccharides (LPSs) extracted from these bacteria on human sperm.

Materials and Methods: In this labratory study, 5×10^6 sperm/ml of prepared sperm using percoll gradient method were treated with 0.1, 1, 10, 25, and 50µg/ml of commercial LPSs from *E.coli, Klebsiella, and Serattia* and 0.1µg/ml of lab-made *Chlamydia* LPS at 37ºC in 5% CO_2 for 6 hours. After 6h incubation the sperm viability was measured using the HOS test.

Results: Commercial LPSs used in this study had no significant detrimental effects on human sperm at lower than 50µg/ml while *Chlamydia* LPS at 0.1µg/ml showed a significant toxic effects against sperm compare to control group (38.6±1%, $p<0.05$).

Conclusion: Although, *chlamydia* infections are almost clinically chronic and asymptomatic, our findings showed that the *in vitro* spermicidal activity of this bacterium is about 500 times more potent than the LPS of *E.coli, Klebsiella, and Serattia*. These results and the findings from the other relevant studies confirm the key role of *C.trachomatis* as one of the infectious factors causing male infertility.

Key words: Lipopolysaccharides, *Chlamydia*, Enterobacteriaceae, Sperm, Male Infertility

Funding: This research was funded by Rafsanjan University of Medical Science and conducted at the University of Sheffiled.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Rafsanjan University of Medical Sciences and Sheffiled University jointly approved the study.

1- Assistant Prof., Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran (Corresponding Author) Tel:(0391) 5234003, Fax: (0391) 5225209, E- mail: hamid.hakimi@gmail.com
2- Assistant Prof., Dept. of Pediatrics, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
3- Assistant Prof., Dept. of Anesthesiology, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
4- Assistant Prof. Dept Internal Medicine, Faculty of Medicine University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
5- Assistant Prof., Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
6- Senior Lecture in Medical Microbiology at the University of Sheffield, UK

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 14:26 IRST on Tuesday September 26th 2017