Original Article

The Comparison of Efficiency of Density Gradient Centrifugation and Zeta Methods in Separation of Mature Sperm with Normal Chromatin Structure

Mohammad Hossein Nasr Esfahani, Ph.D.[1, 2*], Shahnaz Razavi, Ph.D.[3], Mohammad Mardani, Ph.D.[3], Noush Afarin Khajavi, M.Sc.[3], Mohammad Reza Deemeh, M.Sc.[2], Marziyeh Tavalaee, M.Sc.[1]

1. Reproduction and Development Department, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
2. Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran
3. Anatomy Department, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

** Corresponding Address: P.O.Box: 19395-4644, Reproduction and Development Department, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran*
Email: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

Received: 16/Jun/2008, Accepted: 29/Sep/2008

Abstract

Objective: To examine the efficiency of both the Zeta and density gradient centrifugation (DGC) methods for the selection of normal chromatin sperm by TUNEL, sperm chromatin dispersion (SCD), acridine orange and chromomycin A3 (CMA3).

Materials and Methods: The study was performed on 63 patients. Semen analysis was carried out according to WHO criteria. Semen samples were divided into three equal portions. One portion was used as the control, the second portion was used for the Zeta method and the third portion underwent DGC method.

All portions were evaluated for sperm morphology (Diff Quick staining), protamine deficiency (CMA3) and DNA integrity (SCD, AO and TUNEL). Coefficients of correlation and students t test were carried out using SPSS 11.5.

Results: The mean percentage of abnormal sperm, protamine deficiency and DNA fragmentation in the Zeta and DGC methods were significantly decreased as compared to the control group ($p<0.005$). In addition, the DGC method was higher in comparison to the Zeta method in the selection of sperm with normal morphology ($p<0.005$). The Zeta method was higher in comparison to the DGC method in the selection of sperm with intact DNA ($p<0.005$).

Conclusion: Both Zeta and DGC methods were effective in the selection of sperm with better quality in terms of normal morphology, normal protamine content and DNA integrity. Therefore, we suggested that the combined Zeta and DGC method should be used for selection of normal sperm.

Keywords: Zeta Method, Protamine, Morphology, Sperm, DNA Fragmentation

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 2, Summer 2009, Pages: 168-175

مقایسه کارایی دو روش Zeta و Density Gradient Centrifugation جهت جداسازی اسپرم با ساختار کروماتین طبیعی

محمدحسین نصر اصفهانی Ph.D.[۱،۲]، شهناز رضوی Ph.D.[۲]، محمد مردانی Ph.D.[۳]، نوش‌آفرین خواجوی M.Sc.[۳]، محمدرضا دیمه M.Sc.[۲]، مرضیه تولایی M.Sc.[۱]

۱. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه تولید مثل و تکوین، اصفهان، ایران
۲. مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران
۳. دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، گروه علوم تشریح، اصفهان، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: اصفهان، ایران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه تولید مثل و تکوین
پست الکترونیک: Email: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

دریافت مقاله: ۸۷/۳/۲۷، پذیرش مقاله: ۸۷/۷/۷

چکیده

* **هدف:** ارزیابی کارایی دو روش Zeta و Density Gradient Centrifugation (DGC) جهت جداسازی اسپرم با ساختار کروماتین طبیعی با استفاده از آکریدین اورانژ (AO) TUNEL، پراکندگی کروماتین اسپرم (Sperm Chromatin Dispersion; SCD) و کروومومایسین A3 (Chromomycin A3; CMA3).

* **مواد و روش‌ها:** این مطالعه بر روی ۶۳ بیمار مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان صورت گرفت. آنالیز روتین مایع سمن طبق معیارهای WHO انجام شد. سپس نمونه سمن به سه بخش تقسیم گردید: کنترل، اسپرم‌های جداسازی شده به روش Zeta و اسپرم‌های جداسازی شده به روش DGC. سپس بر روی هریک از گروه‌های مذکور، ارزیابی مورفولوژی اسپرم (رنگ‌آمیزی Diff Quick)، کمبود پروتامین (رنگ‌آمیزی CMA3) و فراگمنتاسیون DNA (TUNEL, SCD و AO) انجام گرفت. نتایج با آزمون‌های آماری ضریب همبستگی و t test با استفاده از نرم افزار SPSS-۱۱/۵ بررسی و تحلیل شدند.

* **یافته‌ها:** درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی، کمبود پروتامین و درصد فراگمنتاسیون DNA در دو گروه اسپرم‌های جداسازی شده به روش Zeta و DGC نسبت به گروه کنترل از لحاظ آماری کاهش معنی‌داری یافته است ($p<۰/۰۰۵$). به علاوه روش DGC در جداسازی اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی نسبت به روش Zeta بهتر عمل نموده است ($p<۰/۰۰۵$) در حالی که روش Zeta در جداسازی اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA کمتر نسبت به روش DGC بهتر عمل نموده است ($p<۰/۰۰۵$).

* **نتیجه‌گیری:** هر دو روش Zeta و DGC به طور معنی‌داری قادر به جداسازی اسپرم‌های با مورفولوژی و ساختار کروماتین طبیعی می‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌گردد از هر دو روش DGC و Zeta برای جداسازی اسپرم‌های طبیعی استفاده شود.

* **کلیدواژگان:** روش زتا، پروتامین، مورفولوژی، اسپرم، فراگمنتاسیون DNA

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۸، صفحات: ۱۷۵-۱۶۸

مقدمه

امروزه تکنیک تزریق اسپرم به داخل سیتوپلاسم تخمک (Intra Cytoplasmic Sperm Injection; ICSI) به عنوان یک روش مناسب جهت درمان ناباروری به علت فاکتورهای مردانه در بیمارانی که در آنها روش IVF (*In Vitro* Fertilization) راهگشا نمی‌باشد، به کار می‌رود (۱). از آنجایی که در هنگام انجام ICSI، تنها اسپرمی توسط جنین‌شناس انتخاب می‌شود که دارای مورفولوژی و حرکت طبیعی باشد و سلامت هسته اسپرم توسط آنان قابل رویت نمی‌باشد. بنابراین امکان تزریق اسپرم دارای فراگمنتاسیون DNA به داخل تخمک نگرانی‌هایی را جهت انجام این تکنیک ایجاد نموده است (۲). لذا انتخاب اسپرم‌های طبیعی و بالغ و دارای حداقل میزان فراگمنتاسیون DNA در تمامی تکنیک‌های کمک باروری خصوصا ICSI ضروری به نظر می‌رسد (۳).

روش‌های جدید و متنوعی برای جداسازی اسپرم‌های بالغ و طبیعی تا کنون معرفی شده‌اند که هدف تمامی آنها جداسازی اسپرم‌های بالغ، از لحاظ مورفولوژی و تحرک می‌باشد. از جمله این روش‌ها می‌توان به روش Density Gradient Centrifugation (DGC) اشاره نمود (۴). در این روش اسپرم‌هایی که از لحاظ مورفولوژی و تحرک در محدوده طبیعی قرار دارند بر اساس اختلاف دانسیتی از اسپرم‌های غیرطبیعی جدا می‌شوند. چنانچه مطالعات گوناگون پیش از این نشان داده‌اند در اسپرم‌های طبیعی نسبت وزن به حجم بیشتر می‌باشد. لذا در حین سانتریفیوژ اسپرم‌های دارای ساختار کروماتین طبیعی که متراکم‌تر بوده و چگالی بیشتری دارند، سریع‌تر ته‌نشین می‌شوند (۵، ۶).

به دلیل محدودیت‌های روش DGC از لحاظ به‌کارگیری مواد شیمیایی مختلف، اخیرا محققین روش‌های دیگری را جهت جداسازی اسپرم‌های طبیعی ابداع نموده‌اند که از آن جمله می‌توان به جداسازی

اسپرم‌های طبیعی بر اساس بار الکتریکی اشاره نمود. دو روش الکتروفورز و Zeta امکان جداسازی اسپرم‌ها را بر اساس بار الکتریکی موجود بر سطح غشا فراهم می‌نماید. در روش Zeta که توسط چان و همکارانش در سال ۲۰۰۶ پیشنهاد شد، انتخاب اسپرم طبیعی بر اساس پتانسیل Zeta صورت می‌گیرد. پتانسیل Zeta وابسته به سیالوگلیکوپروتئین‌های باردار غشا اسپرم است که در طی فرایند بلوغ اسپرم، به سطح آن افزوده می‌شود (۷، ۸).

تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که برخی از گلیکوپروتئین‌های افزوده شده به سطح اسپرم برای حفاظت آن در دستگاه تناسلی مونث ضروری می‌باشد و به این گلیکوپروتئین‌ها در اصطلاح Maturation Antigen گفته می‌شود. از جمله پروتئین‌های اینتگرال اضافه شده به سطح غشای اسپرم می‌توان به Gp20 اشاره نمود که یک سیالوگلیکوپروتئین سطحی غشا می‌باشد و همولوگ با آنتی‌ژن CD52 درغشا لکوسیت است. Gp20 یکی ازگلیکوپروتئین‌های مسئول ایجاد بار الکتریکی منفی غشای اسپرم انزال شده از دستگاه تناسلی مذکر می‌باشد (۹).

پژوهش‌های گوناگون نشان می‌دهد که تغییر در ساختار گلیکوپروتئین‌های غشا پلاسمایی، تشکیل آکروزوم، طویل شدن دم و تغییر در ساختار کروماتین از جمله تغییراتی است که در فرایند اسپرمیوژنز رخ می‌دهد (۱۲-۱۰). چنانچه در فرایند تراکم ساختار کروماتین هسته، هر گونه اختلالی ایجاد شود، DNA اسپرم در معرض آسیب قرار می‌گیرد (۱۳). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که اسپرم مردان نابارور میزان آسیب DNA بالاتری در مقایسه با مردان بارور داشته است (۱۶-۱۴). هم‌چنین آریوین و همکارانش بیان کردند، میزان مقاومت نسبت به دناتوره شدن DNA تحت القای اسید نیز در افراد نابارور به میزان زیادی کاهش می‌یابد (۱۷). براساس نتایج به‌دست آمده از تحقیقات، فراگمنتاسیون DNA با میزان باروری ارتباط انکارناپذیری داشته است، بنابراین می‌تواند به عنوان یک فاکتور مستقل جهت پیش‌گویی قدرت باروری در مردان باشد (۱۵). از جمله عواملی که باعث به وجود آمدن فراگمنتاسیون DNA می‌شود، می‌توان به استرس‌های اکسیداتیو، آپوپتوز و اختلال در جایگزینی هیستون‌ها به وسیله پروتامین اشاره کرد (۱۵-۱۳، ۱۸).

رنگ‌آمیزی کروموماسین A3 جهت شناسایی اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین به کار می‌رود (۱۹). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که اسپرم مردان نابارور دارای میزان پروتامین کمتری نسبت به افراد طبیعی می‌باشد (۲۰، ۲۱).

جهت بررسی میزان فراگمنتاسیون DNA روش‌های متعددی وجود دارد که از مهم‌ترین آنها می‌توان به روش TUNEL (۱۴)، Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) (۱۶)، Sperm Chromatin Dispersion (SCD) (۲۲) و Acridin Orange Staining (AO) (۲۳) اشاره نمود.

در این مطالعه تصمیم گرفته شد پس از انجام دو روش جداسازی اسپرم DGC و Zeta بر روی نمونه سمن افراد نابارور، ساختار کروماتین اسپرم با استفاده از چهار تکنیک TUNEL و SCD و AO و CMA3 مورد بررسی قرار گیرد تا پس از تعیین درصد اسپرم های طبیعی در هر گروه میزان کارایی این دو روش مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

روش بررسی

انتخاب نمونه در این مطالعه به روش ساده بوده و از نمونه سمن ۶۳ فرد نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان استفاده شد. از بیماران فرم رضایت اخذ و نمونه های سمن، بعد از ۴-۳ روز خودداری زوجین از مقاربت، جمع آوری و آنالیز روتین مایع سمن(غلظت، تحرک و مورفولوژی) طبق معیار WHO (۲۴)، توسط میکروسکوپ نوری انجام گردید. قابل به ذکر است تمامی مواد مصرفی در این مطالعه به جز موارد اشاره شده در متن از شرکت سیگما تهیه گردیده است. این طرح مصوبه پژوهشکده رویان است.

آماده‌سازی اسپرم

مایع سمن را پس از جمع‌آوری به مدت ده دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ نموده تا رسوبی از اسپرم‌ها تشکیل شود. مایع رویی تخلیه، سپس محیط ۱۰ درصد Ham's+FCS روی رسوب ریخته و پس از پیپت نمودن، محلول را به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی را تخلیه و محیط Ham's به رسوب اضافه گردید. نمونه سمن این بیماران به سه بخش تقسیم شد که یک بخش به عنوان گروه کنترل و دو بخش دیگر جهت مقایسه دو روش جداسازی اسپرم DGC و Zeta مورد استفاده قرار گرفت. سپس بر روی هر کدام از گروه‌ها به طور جداگانه، ارزیابی مورفولوژی اسپرم توسط رنگ‌آمیزی Diff Quick (۲۵)، کمبود پروتامین توسط رنگ‌آمیزی کروموماسین A3 (۱۹) و سه تست SCD، TUNEL و Acridine Orange جهت تعیین میزان فراگمنتاسیون DNA مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۴، ۲۲، ۲۳).

روش جداسازی سانتریفیوژ شیب غلظت (Density Gradient Centrifugation; DGC)

یک گرادیان دو لایه ای از محلول Pure Sperm ۸۰ درصد و ۴۰ درصد در لوله فالکون ۱۰ سی‌سی تهیه می‌گردد تا یک ستون ممتد از Pure Sperm دو لایه با دو شیب غلظت مجزا ایجاد شود. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از مایع سمن روی آن ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ می‌شود. در این مطالعه، جهت انجام روش DGC از ماده تجاری Pure sperm (کشور سازنده سوئد) استفاده گردید. پس از سانتریفیوژ، مایع موجود در بالای لوله با پیپت پاستور آسپیره شده و باقی‌مانده محتویات لوله به یک لوله فالکون ۵ سی‌سی منتقل گردیده و با محیط Sperm Rinse، مخلوط شد. سپس سوسپانسیون ایجاد شده به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. مجددا پس از سانتریفیوژ، مایع رویی برداشته شده و پلیت تشکیل شده در انتهای لوله که محتوی اسپرم‌های جداسازی شده است جهت انجام ICSI استفاده گردید (۴).

روش Zeta

ابتدا نمونه سمن در لوله مخصوص سانتریفیوژ ریخته و پس از دو بار شست‌وشو، سریع سه مرتبه درون دستکش لاتکس چرخانده شده و بیرون کشیده می‌شود تا باردار گردد. لوله باردارحاوی نمونه به مدت یک دقیقه در دمای آزمایشگاه (۲۲ درجه) گذاشته می‌شود تا اسپرم‌های بالغ دارای بار منفی به جدار لوله بچسبند. لوله فوق به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و بعد پلیت تشکیل شده و محلول اسپرم‌های درونش با پیپت پاستور به آرامی از ته لوله خارج می‌شود. سپس محیط Ham's به داخل آن ریخته و مجددا خارج می‌گردد تا سلولی ته لوله باقی نماند. پس از آن ۵۰۰ میکرو لیتر محیط Ham's در لوله ریخته و جدار لوله با آن شست‌وشو داده می‌شود تا جدار لوله بدون بار گردد. با اضافه کردن این محیط،

اسپرم‌های چسبیده به جدار لوله جدا شده و در پایین لوله قرار می‌گیرد. سپس از این سلول‌ها برای ارزیابی مورفولوژی، کمبود پروتامین و تعیین میزان فراگمنتاسیون DNA استفاده شد (۸).

TUNEL assay

در ابتدا از نمونه سمن شسته شده، اسمیری تهیه می‌شود که اسمیرهای تهیه شده باید در معرض هوا خشک شوند در مرحله بعد اسلایدها در فرمالدهید ۴ درصد برای مدت ۲۵ دقیقه فیکس می‌شوند. پس از شست‌وشو در Phosphate Buffered Saline (PBS) اسلایدها در تریتون x-100 ۰/۲ درصد برای مدت ۵ دقیقه قرار گرفته مجددا در PBS شست‌وشو می‌گردند. اسلایدها در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TUNEL به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه قرار گرفته سپس با استفاده از محلول rTdT نشان‌دار می‌شوند. پس از این مرحله اسلایدها در کاور پلاستیکی مخصوص قرار گرفته، به مدت ۶۰ دقیقه دور از نور و در دمای ۳۷ درجه انکوبه می‌شوند. سپس کاور پلاستیکی برداشته شده، اسلایدها در 2xssc به مدت ۱۵ دقیقه قرار می‌گیرند پس از مرحله شست‌وشوی اسلایدها با استفاده از PBS موجب برداشته شدن Fluorescein-12-dUTP اضافی از روی اسلایدها می‌گردد. سپس رنگ‌آمیزی اسلایدها توسط رنگ فلورسنت Propidium Iodide (PI) انجام می‌گیرد. اسلایدها با PBS مونت شده و سپس در زیر میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار می‌گیرند رنگ PI تمامی سلول‌های فاقد فراگمنتاسیون DNA را به رنگ قرمز در می‌آورد و رنگ سبز در سلول‌هایی که هسته آپوپتیک دارند، مشاهده می‌شوند. در هر نمونه ۲۰۰ سلول شمارش و به صورت درصد فراگمنتاسیون DNA گزارش می‌گردد (۱۴).

سنجش کمبود پروتامین

اسمیرهای آماده شده از مایع اسپرمی که در محلول کارنوی (متانول و اسید استیک با نسبت ۳ : ۱) به طور هم حجم فیکس شده‌اند، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد. به منظور انجام رنگ‌آمیزی CMA3 هراسلاید به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول CMA3 رنگ‌آمیزی شده (۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر مک کلوین: که شامل ۷ سی‌سی اسیداستیک ۰/۱ و ۳۲/۹ سی‌سی از H_2O ۷ و Na_2HPO ۴ و با غلظت ۰/۲ مولار pH=۷ و ۹۵ میلی‌گرم $Mgcl_2$ ۱۰ میلی‌مولار می‌باشد). اسلایدها را با بافر PBS شست‌وشو داده، سپس اسلایدها به کمک گلیسرول مونت می‌شوند. آنالیز میکروسکوپی اسلایدها توسط میکروسکوپ فلورسنت و در هر نمونه ۲۰۰ سلول ارزیابی گردید. پس از رنگ‌آمیزی CMA3، اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین با رنگ زرد درخشان و اسپرم‌های طبیعی با رنگ زرد کم رنگ قابل مشاهده می‌باشند(۱۹) .

Sperm Chromatin Dispersion (SCD)

مقدار ۳۰ میکرولیتر از نمونه اسپرمی آماده شده (غلظت ۵ تا ۱۰ میلیون) با ۷۰ میکرولیتر از آگاروز ۱درصد با درجه ذوب پایین (Low Melting Agaros) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مخلوط می‌گردد. سپس نمونه مخلوط شده بر روی لامی که از قبل با آگاروز ۰/۶۵ درصد پوشیده شده، قرار می‌گیرد و با گذاشتن یک لامل بر روی آن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، گذاشته می‌شود. با دقت لامل را از سطح لام جدا کرده و هر لام به صورت افقی در محلول اسیدکلریدریک ۰/۰۸ نرمال به مدت ۷ دقیقه قرار داده می‌شود. بعد از این مرحله در محلول لیزکننده (pH=۷/۵) به مدت ۲۵ دقیقه گذاشته می‌شود (۲۲). پس از دو بار شست‌وشو در آب مقطر به ترتیب در الکل ۷۰ درصد و ۹۰ درصد و ۱۰۰ درصد هر کدام به مدت ۲ دقیقه آب‌گیری می‌گیرد، بعد از خشک شدن لام‌ها با محلول رنگ Wright و PBS به نسبت ۱:۱ رنگ‌آمیزی صورت می‌گیرد. سپس لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری بررسی و در هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش می‌شود. با استفاده از این روش می‌توان میزان فراگمانتاسیون DNA را به صورت ۵ نوع سلول با توجه به وجود هاله اطراف هسته و اندازه آن نسبت به هسته بررسی نمود. درصد اسپرم‌های با فراگمنتاسیونDNA (هسته اسپرم با هاله کوچک، بدون هاله و سلول اسپرم Degrade شده) و بدون فراگمنتاسیون DNA (هسته اسپرم با هاله بزرگ و هاله متوسط) در هر نمونه ارزیابی شده و به صورت درصد فراگمنتاسیون DNA در هر نمونه گزارش می‌شود (شکل ۱).

Acridin orange staining

در این روش اسمیر ها پس از خشک شدن در معرض هوا ، در محلول فیکساتیو کارنوی (متانول و اسید استیک با نسبت ۳ : ۱) دور از نور و در دمای ۴ درجه به مدت ۲ ساعت فیکس شده، سپس با محلول آکریدین اورنج (۱۰ سی‌سی اکریدین اورنج ۰/۱درصد رقیق شده در آب مقطر، ۴۰ سی‌سی اسیداستیک ۰/۱ مولار و ۲/۵ سی‌سی از محلول Na_2HPO_4 ۰/۳ مولار) به مدت ۷ تا ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی می‌شوند. سپس اسلایدها شست‌وشو داده شده و به وسیله PBS مونت می‌گردید. اسلایدها در زیر میکروسکوپ فلورسنت بررسی و در هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. در این رنگ‌آمیزی DNA تک رشته‌ای به رنگ قرمز و DNA طبیعی دو رشته‌ای به رنگ سبز مشاهده می‌گردد (۲۳).

آنالیز آماری

پس ازجمع‌آوری نتایج، آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار ۱۱/۵ SPSS و آزمون t test انجام گرفت وجهت بررسی ضریب همبستگی از Correlation Coefficient استفاده شد. هم‌چنین درصد بهبودی فراگمنتاسیون DNA در اسپرم‌های جداسازی شده با دو روش Zeta و DGC به صورت زیر محاسبه گردید:

Control-Zeta/Zeta×100 Control-DGC/DGC×100

یافته‌ها

در این مطالعه از ۶۳ فرد نابارور مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان استفاده شد. میانگین پارامترهای اسپرمی شامل غلظت اسپرم ۲۰/۳۷ ± ۵۵/۷، تحرک اسپرم ۱۳/۱۸ ± ۴۹/۶۱ و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی ۱۱/۲۴±۶۹/۸۳ است.

با توجه به جدول شماره ۱، میانگین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی در گروه کنترل۵/۳۳ ± ۸۶/۰۶، گروه Zeta ۶/۰۱ ± ۸۰/۹۲ و گروه DGC ۱۲/۱۴ ± ۷۶/۸۲ است. به علاوه میانگین اسپرم‌های CMA3 مثبت در گروه کنترل ۱۱/۰۳ ± ۴۱/۳۷، گروه Zeta ۹/۲۹ ± ۳۲/۰۷ و گروه DGC ۱۰/۳۴ ± ۳۲/۴۹ می‌باشد. میانگین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و CMA3 مثبت در اسپرم‌های جداسازی شده به دو روش Zeta و DGC نسبت به گروه کنترل کاهش یافته که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار است($p\leq$۰/۰۰۱). همچنین در صورت مقایسه میانگین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی، در اسپرم‌های جداسازی شده به روش DGC و Zeta مشخص می‌شود که درصد

اسپرم‌های غیرطبیعی در روش DGC نسبت به روش Zeta کاهش معنی‌داری را نشان داده است (p≤۰/۰۰۵).

جدول شماره۲ میانگین درصد اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA با استفاده از تکنیک SCD، TUNEL و AO در اسپرم‌های جداسازی شده به دو روش DGC و Zeta نسبت به گروه کنترل را نشان می‌دهد. میانگین درصد اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA به روش TUNEL در گروه کنترل ۸/۱۴ ± ۱۵/۸۳، گروه Zeta ۳/۹۲ ± ۵/۸۹ و گروه DGC ۴/۲۳ ± ۸/۱۷ است. در صورتی که در روش SCD، میانگین درصد اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA در گروه کنترل ۱۵/۵۸ ± ۵۰/۴۳، در گروه Zeta ۱۴/۹۵ ± ۲۹/۲۱ و در گروه DGC ۱۶/۲۴ ± ۳۳/۵۸ است. به علاوه میانگین درصد اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA به روش AO در گروه کنترل ۱۵/۱ ± ۴۹/۶۵، گروه Zeta ۱۵/۸۳ ± ۲۸/۸۵ و در گروه DGC ۱۴/۳۸ ± ۳۲/۵۶ است. با توجه به این نتایج میانگین درصد اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA با استفاده از سه تکنیک TUNEL، SCD و AO در اسپرم‌های جداسازی شده به روش Zeta نسبت به اسپرم‌های جداسازی شده به روش DGC اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد (p≤۰/۰۰۵).

بر اساس جدول ۳ از میان پارامترهای اسپرمی، ارتباط معنی‌داری بین پارامترهای اسپرمی (غلظت و تحرک) با فراگمنتاسیون DNA وجود ندارد. هم‌چنین رابطه بین غلظت اسپرم با کمبود پروتامین نیز معنی‌دار نیست. در حالی که تحرک اسپرم با میزان کمبود پروتامین ارتباط معنی‌داری دارد (p=۰/۰۰۱).

جدول۱: مقایسه میانگین اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی و کمبود پروتامین در سه گروه کنترل، اسپرم‌های جداسازی شده به دو روش زتا و پیور

پارامترها	کنترل (C)	زتا (Z)	پیور (P)	P-value
	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	
درصد اسپرم‌های غیرطبیعی (Diff Quick)	۸۶/۰۶ ± ۵/۳۳	۸۰/۹۲ ± ۶/۰۱	۷۶/۸۲ ± ۱۲/۱۴	C-Z: ۰/۰۰۱ C-P: ۰/۰۰۱ Z-P: ۰/۰۰۵
درصد اسپرم‌های +CMA3	۴۱/۳۷ ± ۱۱/۰۳	۳۲/۰۷ ± ۹/۲۹	۳۲/۴۹ ± ۱۰/۳۴	C-Z: ۰/۰۰۱ C-P: ۰/۰۰۱ Z-P: ۰/۹۱۷

جدول۲: مقایسه میانگین اسپرم‌های دارای فراگمانتاسیون DNA در سه گروه کنترل، اسپرم‌های جداسازی شده به دو روش زتا و پیور

پارامترها	کنترل (C)	زتا (Z)	پیور (P)	P-value
	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	
درصد اسپرم‌های دارای فراگمانتاسیون DNA (TUNEL)	۱۵/۸۳ ± ۸/۱۴	۵/۸۹± ۳/۹۲	۸/۱۷ ± ۴/۲۳	C-Z: ۰/۰۰۱ C-P: ۰/۰۰۱ Z-P: ۰/۰۰۱
درصد اسپرم‌های دارای فراگمانتاسیون DNA (AO)	۴۹/۶۵ ± ۱۵/۱	۲۸/۸۵± ۱۵/۸۳	۳۲/۵۶ ± ۱۴/۳۸	C-Z: ۰/۰۰۱ C-P: ۰/۰۰۱ Z-P: ۰/۰۰۱
درصد اسپرمهای دارای فراگمانتاسیون DNA (SCD)	۵۰/۴۳ ± ۱۵/۵۸	۲۹/۲۱ ±۱۴/۹۵	۳۳/۵۸ ±۱۶/۲۴	C-Z: ۰/۰۰۲ C-P: ۰/۰۰۱ Z-P: ۰/۰۰۱

جدول۳: ارتباط بین پارامترهای اسپرمی با کمبود پروتامین و فراگمانتاسیون DNA

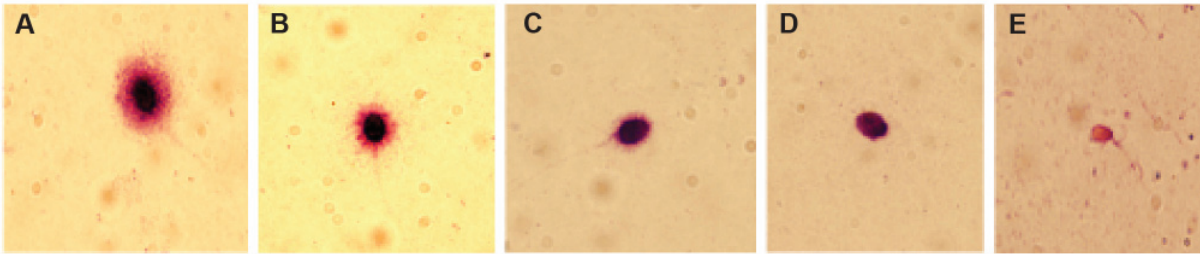
پارامترهای اسپرمی	درصد اسپرم‌های +CMA3		درصد اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA (TUNEL)		درصد اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA (AO)		درصد اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA (SCD)	
	ضریب همبستگی (r)	P-value	ضریب همبستگی (r)	P-value	ضریب همبستگی (r)	P-value	ضریب همبستگی (r)	P-value
غلظت اسپرم 10^6/ml	-۰/۱۲۲	۰/۴۰۴	۰/۱۳۰	۰/۳۵۹	۰/۱۳۵	۰/۳۱۴	۰/۲۸۱	۰/۰۵۳
درصد تحرک اسپرم	-۰/۴۴۵	۰/۰۰۱**	۰/۱۴۵	۰/۳۰۵	-۰/۰۹۸	۰/۴۶۶	۰/۰۸۱	۰/۵۸۳
درصد اسپرم‌های غیرطبیعی WHO	۰/۷۸۲	۰/۰۰۱**	۰/۵۴۱	۰/۰۰۱**	۰/۵۶۶	۰/۰۰۱**	۰/۷۷۷	۰/۰۰۱**
درصد اسپرم‌های غیرطبیعی Diff Quick	۰/۰۷۷	۰/۵۹۰	-۰/۱۴۶	۰/۲۹۸	۰/۱۰۹	۰/۴۱۰	-۰/۰۸۴	۰/۵۶۱

* بیانگر معنی‌دار بودن ارتباط بین دو پارامتر با p<۰/۰۵ است. ** بیانگر معنی‌دار بودن ارتباط بین دو پارامتر با p<۰/۰۱ است.

جدول۴: ارتباط بین میزان فراگمنتاسیون DNA با استفاده از سه تکنیک SCD, TUNEL, AO

پارامترهای اسپرمی	درصد اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA (AO)		درصد اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA (SCD)		درصد اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA (TUNEL)	
	ضریب همبستگی (r)	P-value	ضریب همبستگی (r)	P-value	ضریب همبستگی (r)	P-value
درصد اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA (TUNEL)	۱	.	۰/۷۲۵	۰/۰۰۱**	۰/۶۳۰	۰/۰۰۱**
درصد اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA (SCD)	۰/۷۲۵	۰/۰۰۱**	۱	.	۰/۸۸۹	۰/۰۰۱**
درصد اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA (AO)	۰/۶۳۰	۰/۰۰۱**	۰/۸۸۹	۰/۰۰۱**	۱	.

** بیانگر معنی‌دار بودن ارتباط بین دو پارامتر با p<۰/۰۱ است.



شکل۱: تست Sperm Chromatin Dispersion: A، B: اسپرم با هاله بزرگ و متوسط (بدون فراگمنتاسیون DNA)، C، D، E: حالت‌های متفاوتی از فراگمنتاسیون DNA

درصد اسپرم‌های غیرطبیعی بر اساس معیارهای WHO ارتباط معنی‌داری را با کمبود پروتامین و فراگمنتاسیون DNA نشان داده است (p=۰/۰۰۱)، اما درصد اسپرم‌های غیرطبیعی به روش Diff Quick هیچ ارتباط معنی‌داری را با میزان کمبود پروتامین و فراگمنتاسیون DNA نشان نمی‌دهد. به علاوه در این مطالعه ارتباط بین میزان کمبود پروتامین و فراگمنتاسیون DNA در هر سه تکنیک AO، TUNEL و SCD معنی‌دار است (p<۰/۰۰۱).

هم‌چنین بر اساس جدول شماره ۴ ارتباط بین فراگمنتاسیون DNA در هر سه تکنیک AO، TUNEL و SCD نسبت به یکدیگر نیز معنی‌دار است (p=۰/۰۰۱).

نتایج حاصل از این مطالعه مطابق جدول شماره ۵ نشان داد که درصد بهبودی فراگمنتاسیون DNA در اسپرم‌های جداسازی شده به روش Zeta در مقایسه با گروه کنترل کاهش قابل ملاحظه‌ای را نسبت به اسپرم‌های جداسازی شده به روش DGC، نشان می‌دهد.

جدول۵: درصد بهبودی فراگمنتاسیون DNA در اسپرم‌های جداسازی شده به دو روش زتا و پیور نسبت به گروه کنترل

پارامتر	زتا	پیور
TUNEL	۶۲%	۴۶%
SCD	۴۲%	۳۴%
AOT	۴۱%	۳۴%

بحث

از میان مواد تجاری گوناگونی که در روش DGC به کار برده می‌شود، Pure Sperm به طور معمول در تکنیک‌های کمک باروری و آزمایشگاه‌های آندرولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). تحقیقات ساکاس و همکارانش در سال ۲۰۰۰ نشان داد که استفاده از Pure Sperm در آماده‌سازی اسپرم، کاهش قابل ملاحظه‌ای را در درصد اسپرم‌های CMA3 مثبت و دارای فراگمنتاسیون DNA ایجاد می‌نماید (۵) و هم‌چنین نسبت اسپرم ها با مورفولوژی طبیعی، درجداسازی اسپرم‌ها به روش DGC در مقایسه با سایر روش‌های جداسازی اسپرم از جمله Swim-up به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (۵).

در روش Zeta که توسط چان و همکارانش در سال ۲۰۰۶ معرفی گردید، انتخاب اسپرم بالغ بر اساس پتانسیل الکتریکی روی غشای اسپرم صورت می‌گیرد (۸). مطالعات چان و همکارانش نشان داد که جداسازی اسپرم‌ها به روش Zeta، امکان انتخاب اسپرم‌های با مورفولوژی بهتر و تحرک بیشتر را فراهم می‌نماید (۸). از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ای به بررسی و مقایسه دقیق کارایی دو روش DGC و Zeta در جداسازی اسپرم‌های بالغ و طبیعی بپردازد، صورت نگرفته بود، در این مطالعه تصمیم گرفته شد اسپرم‌های به دست آمده از این دو روش جداسازی از لحاظ مورفولوژی، کمبود پروتامین و فراگمنتاسیون DNA مورد ارزیابی قرار گیرد و پس از مقایسه با گروه کنترل میزان کارایی این دو روش جداسازی در بهبود هر یک از پارامترهای ذکر شده تعیین گردد.

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که درصد اسپرم‌های غیرطبیعی به روش DGC جداسازی گردیده‌اند، نسبت به گروه کنترل به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد (p=۰/۰۰۱) و همچنین میزان کمبود پروتامین (+CMA3) در اسپرم‌های جداسازی شده به این روش نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (p=۰/۰۰۱). این یافته‌ها با مطالعات ساکاس و همکارانش

در سال ۲۰۰۰ مطابقت دارد (۵). هم‌چنین در اسپرم‌های جدا شده به روش DGC میزان فراگمنتاسیون DNA با استفاده از سه تکنیک TUNEL و SCD و AO ارزیابی گردید و هر سه تکنیک کاهش معنی‌داری را در میزان فراگمنتاسیون DNA نسبت به گروه کنترل نشان داد (p=۰/۰۰۱).

در توجیه این نتایج می‌توان به این نکته اشاره نمود که نمونه سمن هتروژنیتی بالایی دارا می‌باشد و علاوه بر تعدادی لکوسیت، محتوی زیر مجموعه‌ای از اسپرم‌های طبیعی و غیرطبیعی است. آماده‌سازی سمن به روش DGC امکان کاهش این هتروژنیتی را فراهم می‌نماید (۳). مطالعات گوناگونی پیش از این نشان داده‌اند که در اسپرم‌های طبیعی نسبت وزن به حجم بیشتر می‌باشد. لذا پس از سانتریفیوژ در لایه‌های گرادیان پیور اسپرم، اسپرم‌های دارای ساختار کروماتین طبیعی که متراکم‌تر بوده و چگالی بیشتری دارند، سریع‌تر ته‌نشین می‌شوند که این امر خود منجر به همگن شدن نمونه اسپرمی می‌گردد (۵-۳).

نتایج به دست آمده ازجدول ۵ نشان می‌دهد که میزان بهبودی DNA اسپرم اندازه‌گیری شده به سه روش AO، TUNEL و SCD در روش جداسازی Zeta بهتر از DGC عمل کرده است. اگر چه هر دو روش قادر به جداسازی اسپرم با DNA سالم هستند (۲۶).

هم‌چنین نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که درصد اسپرم‌های غیرطبیعی که به روش Zeta جداسازی گردیده‌اند نسبت به گروه کنترل به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد (p=۰/۰۰۱). این یافته‌ها با مطالعات چان و همکارانش در سال ۲۰۰۶ مطابقت دارد (۸). میزان کمبود پروتامین (+CMA3) نیز در اسپرم‌های جداسازی شده به این روش در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (p=۰/۰۰۱). هم‌چنین در اسپرم‌های جدا شده به روش Zeta میزان فراگمنتاسیون DNA با استفاده از سه تکنیک TUNEL و SCD و Acridin orange ارزیابی گردید و هر سه تکنیک کاهش معنی‌داری را در میزان فراگمنتاسیون DNA نسبت به گروه کنترل نشان دادند (p≤۰/۰۰۱).

در توجیه یافته‌های به دست آمده در این مطالعه می‌توان به این نکته اشاره نمود که چنانچه تحقیقات گوناگون پیش از این نشان داده‌اند، اضافه شدن سیالوگلیکوپروتئین‌ها بر سطح خارجی غشای اسپرم که عامل به وجود آورنده اختلاف بار الکتریکی بین غشا و محیط خارج می‌باشد، در مرحله اسپرمیوژنز رخ می‌دهد (۹). لذا هر گونه اختلال در روند اسپرمیوژنز ممکن است منجر به عدم تکامل غشا پلاسمایی اسپرم گردیده، در بسته‌بندی و تراکم کروماتین نیز اختلال ایجاد نماید (۱۱). از آنجایی که تراکم صحیح کروماتین اسپرم در این مرحله، ممکن است با تکامل پروتئین‌های سطحی غشا پلاسمایی اسپرم هم‌زمان باشد، این امر می‌تواند توجیه کننده این مطلب باشد که اسپرم‌های دارای محتوای صحیح گلیکوپروتئین‌های سطحی غشای پلاسمایی که بر اساس بار الکتریکی طبیعی خود در روش Zeta جداسازی گردیده‌اند احتمالا دارای محتوای پروتامین طبیعی نیز می‌باشند. از آنجایی که محتوای پروتامین طبیعی منجر به بسته‌بندی صحیح کروماتین و جلوگیری از آسیب DNA می‌گردد این نکته می‌تواند بیان کننده این مطلب باشد که اسپرم‌های جداسازی شده به روش Zeta دارای درصد پایین‌تری از فراگمنتاسیون DNA نیز می‌باشند.

هم‌چنین در مطالعه آینسورس و همکارانش که در آن جداسازی اسپرم‌های طبیعی بر اساس بار الکتریکی سطح غشا توسط دستگاه الکتروفورز صورت گرفت، نشان داده شد که میزان فراگمنتاسیون DNA با استفاده از تست TUNEL در اسپرم‌های جداسازی شده به این روش، کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد که این یافته خود می‌تواند دلیل دیگری بر وجود یک ارتباط قوی میان بار الکتریکی موجود بر سطح غشا و ساختار هسته اسپرم باشد (۷).

در این مطالعه بررسی رابطه بین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی، کمبود پروتامین و آسیب DNA در گروه کنترل صورت گرفت و بررسی‌ها نشان داد که ارتباط مستقیم و معنی‌داری بین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و کمبود پروتامین وجود دارد (p=۰/۰۰۱). همچنین ارتباط بین کمبود پروتامین و فراگمنتاسیون DNA نیز مستقیم و معنی‌دار می‌باشد (p=۰/۰۰۱). در توجیه این مطلب می‌توان به این نکته اشاره نمود که یکی از علل ایجاد فراگمنتاسیون DNA، نقص در بسته‌بندی کروماتین می‌باشد و کمبود پروتامین در این مرحله از اسپرمیوژنز می‌تواند منجر به عدم تراکم صحیح کروماتین و ایجاد آسیب DNA در مسیر دستگاه تناسلی گردد (۲۷). وجود این رابطه نشانگر نقش حفاظتی پروتامین جهت جلوگیری از رسیدن آسیب به DNA هسته اسپرم می‌باشد (۳۰-۲۸).

مقایسه نتایج بررسی اسپرم‌های به دست آمده از این دو روش با گروه کنترل و با یکدیگر نشان می‌دهد که هر دو روش در جداسازی اسپرم‌های بالغ، با محتوای پروتامین طبیعی و DNA سالم نسبت به گروه کنترل بسیار موثر می‌باشد. درحالی که بررسی درصد اسپرم‌های غیرطبیعی جداسازی شده به روش DGC نسبت به اسپرم‌های جداسازی شده به روش Zeta کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد و فراگمنتاسیون DNA در اسپرم‌های جداسازی شده به روش Zeta در هر سه تکنیک TUNEL و SCD و AO کاهش معنی‌داری را نسبت به اسپرم‌های جداسازی شده به روش DGC نشان می‌دهند (p<۰/۰۰۱). در توجیه این مطلب می‌توان به این نکته اشاره کرد که اسپرم‌های دارای چگالی بیشتر احتمالا دارای درصد پایین‌تری از اسپرم‌های غیرطبیعی نسبت به اسپرم‌های دارای بار الکتریکی طبیعی می‌باشند، درحالی که چنانچه پیش از این نیز اشاره شد وجود ارتباط قوی بین سیالوگلیکوپروتئین‌های ایجادکننده بارالکتریکی سطح غشا و سلامت کروماتین هسته اسپرم، می‌تواند نشان دهنده میزان پایین تر فراگمنتاسیون DNA در اسپرم‌های جداسازی شده به روش Zeta نسبت به روش DGC باشد.

نتیجه گیری

هر دو روش Zeta و DGC به طور معنی‌داری قادر به جداسازی اسپرم‌های با مورفولوژی و ساختار کروماتین طبیعی می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش و مطالعاتی که پیش از این پیرامون دو روش Zeta و DGC انجام گرفته است، ارزشمند خواهد بود که به صورت ترکیبی از هر دو روش Centrifugation Density Gradient و Zeta، جهت جداسازی اسپرم‌های طبیعی استفاده گردد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق باهمکاری پژوهشکده رویان و مرکز باروری ونابارووری اصفهان انجام گرفته است. لذا از کلیه مسئولین و پرسنل مراکز فوق کمال تشکر و قدردانی را داریم. بودجه این تحقیق توسط پژوهشکده رویان پرداخت گردید.

References

1. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC.Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet. 1992; 4; 340(8810): 17-18.
2. Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Bray-Ward P, et al. Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations.Hum Reprod. 2004; 19(9): 2052-209.
3. Kaneko S, Oshio S, Kobanawa K, Kobayashi T, Mohri H, Iizuka R. Purification of human sperm by a discontinuous Percoll Density Gradient with an innercolumn. Biol Reprod. 1986; 35(4): 1059-63.
4. Chen MJ, Bongso A. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. Hum Reprod. 1999; 14(3): 759-764.
5. Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG, et al. The use of the Density Gradient Centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies . Hum Reprod. 2000; 15(5): 1112-1116.
6. Söderlund B, Lundin K. The use of silane-coated silica particles for Density Gradient Centrifugation in in-vitro fertilization. Hum Reprod. 2000; 15(4): 857-860.
7. Ainsworth C, Nixon B, Aitken RJ. Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa. Hum Reprod. 2005; 20(8): 2261-2270
8. Chan PJ, Jacobson JD, Corselli JU, Patton WC. A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge. Fertil Steril. 2006; 85(2): 481-486.
9. Della Giovampaola C, Flori F, Sabatini L, Incerti L, La Sala GB, Rosati F, et al. Surface of human sperm bears three differently charged CD52 forms, two of which remain stably bound to sperm after capacitation. Mol Reprod Dev. 2001; 60(1): 89-96.
10. Razavi SH, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Javanmardi S. Relation between protamine deficiency and sperm parameters, pronuclear morphology, cleavage and embryo quality. Yakhteh. 2006; 2: 80-87.
11. Ribes E, Giménez-Bonafé P, Martínez-Soler F, Gonzalez A, Saperas N, Kasinsky HE, et al. Chromatin Organization During Spermiogenesis in Octopus vulgaris. Morphological Structures. Mol Reprod Dev. 2004; 68(2): 223-231.
12. Tavalaee M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Effects of sperm acrosomal integrity and protamine deficiency on In Vitro Fertilization and pregnancy rate. IJFS. 2007; 1(1): 27-34.
13. Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghdam A. Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. Andrologia. 2003; 35(4): 238-243.
14. Zhang HB, Lu SM, Ma CY, Wang L, Li X, Chen ZJ. Early apoptotic changes in human spermatozoa and their relationships with conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation. Asian J Androl. 2008; 10(2): 227-235.
15. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of Chromatin Assays for DNA Fragmentation Evaluation in Human Sperm. J Androl. 2006; 27(1): 53-59.
16. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. Hum Reprod. 2000; 15(8): 1717-1722.
17. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. J Androl. 2000; 21(1): 33-44.
18. Bizzaro D, Manicardi GC, Bianchi PG, Bianchi U, Mariethoz E, Sakkas D. In-situ competition between protamine and fluorochromes for sperm DNA. Mol Hum Reprod. 1998; 4(2): 127-132.
19. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M. Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. J Assist Reprod Genet. 2001; 18: 219-225.
20. Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, et al. Effect of sperm DNA damage and sperm CMA3 staining on fertilization and embryo development post-ICSI. Reprod Biomed Online. 2005; 11(2): 198-205.
21. Tavalaee M, Razavi R, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. Fertil Steril. 2009; 91(4): 119-126
22. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. Fertil Steril. 2005; 84: 833-842.
23. Ralf Henkel, marjam hajimohammad, Thomas stalf. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. Fertil Steril. 2005; 84(4): 846-849.
24. World Health Organization1999 Laboratory manual for the examination of human semen and semen–cervical mucus interaction. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1999.
25. Mercan R. Nassar A. Ozgur K. Srisombut C. Assessment of Sperm Morphology by Strict Criteria: A Comparison of Two Different Staining Techniques and Manual Versus Computer Analysis.Fertil Steril. 1997; (2): 133-134.
26. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. Hum Reprod. 2001; 16(10): 2160-2165.
27. Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M. The role of sperm chromatin anomalies on the outcome of assisted reproduction techniques. Yakhteh. 2006; 28: 206-266.
28. Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. J Androl. 2006; 27(6): 890-898.
29. Deemeh MR, Tavalaee M, Razave S, Nasr-Esfahani MH. Evaluation of protamine deficiency and DNA fragmentation in two globozoospermia patients undergoing ICSI. IJFS. 2007; 1(2): 85-88.
30. Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghdam A. Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. Andrologia. 2003; 35(4): 238-243.