یک روش نوین برای بررسی حیات اسپرم با استفاده از MTT

روشنک ابوترابی M.Sc.☆، ابراهیم اسفندیاری Ph.D.☆، محمدحسین نصراصفهانی Ph.D.★♦، محمد مردانی Ph.D.☆

☆ دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

★گروه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان

♦آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

چکیده

* **هدف:** ارائه یک روش نوین برای بررسی حیات اسپرم

* **مواد و روشها:** نمونه‌های اسپرمی در محیط Ham´s F-10 + 10% HSA به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۵۰۰ شستشوداده شد و سپس آزمونهای Eosin-nigrosin (E&N)، Hypo-osmotic Swelling Test (HOST) و MTT assay (3-(4.5-dimethyl thiasol-2yl)2.5 diphenyl tetrazolium bromid) به طور همزمان روی هر یک از نمونه‌ها انجام شد. نمونه‌های اسپرمی در محیطهای مختلف با MTT مجاور شده و تأثیر محیطهای مختلف، pH محیط و زمان مورد بررسی قرارگرفت. سپس ضریب واریانس در روش MTT محاسبه و پس از به‌دست آوردن میزان اعتبار MTT با آزمونهای HOST و E&N مقایسه شد. در نهایت حساسیت و اختصاصی بودن این سه روش بررسی شد.

* **یافته‌ها:** مناسبترین محیط برای MTT، Ham´s F-10+15mM Hepes+10% HSA در pH= ۷/۴ و زمان ۲ ساعت تعیین شد. سپس ضریب همبستگی معنی دار و بالایی بین آزمونهای MTT و HOST و E&N به دست آمد و نشان داده شد که هر سه روش از میزان حساسیت و اختصاصی بودن بالایی برخوردار هستند ولی درصد اختصاصی بودن روشهای MTT و E&N از HOST بالاتر بود.

* **نتیجه‌گیری:** آزمون MTT به‌عنوان یک روش مناسب برای تشخیص، تفکیک و جدا نمودن اسپرمهای زنده از اسپرم مرده شناخته شد. استفاده از این روش در تشخیص و تفکیک اسپرمهای زنده بدون حرکت در روش درمانی ICSI پیشنهاد می‌گردد.

* **گل واژگان:** حیات اسپرم، MTT Assay، E&N، HOST

مقدمه

با تولد اولین نوزاد به روش ICSI گامی مهم در درمان ناباروری مردان برداشته شد (۱). در روش ICSI با توجه به محدود بودن تعداد تخمک، تشخیص و انتخاب اسپرمهای زنده و مناسب برای تزریق به تخمک از اهمیت بسیاری برخوردار است (۲)، به ویژه در مواردی که نمونه اسپرمی، تنها دارای اسپرمهای کم حرکت یا بدون حرکت باشد. روشهای تشخیص و تفکیک اسپرمهای زنده از مرده را می‌توان به دو دسته تقسیم نمود: دسته اول روشهایی هستند که تنها جنبه تشخیصی داشته و نمی‌توان اسپرمهای زنده تشخیص داده شده را برای تزریق به تخمک به کار برد. دسته دوم روشهایی هستند که در آن علاوه بر تشخیص اسپرمهای زنده از مرده، می‌توان اسپرمهای زنده را تفکیک نمود و برای درمان از آنها استفاده کرد.

از جمله روشهایی که می‌توان آنها را در دسته اول بررسی کرد، روشهای dye exclusion مانند روشهای ائوزین، ائوزین - نگروزین است. در این روشها اسپرم زنده مانند دیگر سلولهای زنده اجازه ورود رنگ حیاتی را به درون سیتوپلاسم خود را نمی‌دهد و به همین دلیل در این رنگ‌آمیزیها سلولهای زنده سفید و اسپرمهای غیر زنده قرمز رنگ مشاهده می‌شوند. برای تسهیل شمارش اسپرمهای زنده در این رنگ‌آمیزی از نگروزین استفاده می‌شود که با ایجاد زمینه تیره، اسپرمهای با رنگ سفید را متمایز می‌نماید. روش ائوزین - نگروزین به‌عنوان یکی از بهترین آزمونهای تشخیصی اسپرمهای زنده از مرده مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳). با توجه به ثابت شدن اسپرمهای زنده تشخیص داده شده در طول رنگ‌آمیزی، استفاده از آنها برای تزریق به تخمک امکان‌پذیر نیست.

روش HOST یکی از روشهایی است که در تشخیص و تفکیک اسپرمهای زنده از مرده و در نتیجه درمان بیماران به روش ICSI قابل استفاده است (۳، ۴). در این روش با قرار دادن اسپرم در محیط هیپواسمولار، اسپرم زنده دچار تورم و افزایش مایع در سیتوپلاسم می‌شود که این تورم در ناحیه دم اسپرم با به وجود آوردن اشکال مختلف قابل مشاهده است (۵). در اسپرمهای مرده هیچگونه تغییر شکلی در ناحیه دمی اسپرم مشاهده نمی‌شود. پس از مشخص شدن اسپرمهای زنده می‌توان آنها را از سایر اسپرمها جدا نموده و با قرار دادن در محیط ایزواسمولار برای تلقیح با روش ICSI استفاده کرد. روش HOST تحت عناوین Single Sperm Curling Test (۴) یا Water Test (۳) با استفاده از محیطهای هیپواسمولار مختلف روی نمونه‌های اسپرمی مختلف انجام شده است (۳). اگر چه روش HOST تنها روش متداول برای تشخیص و تزریق اسپرمهای بی‌حرکت زنده در آزمایشگاههای نازایی است ولی این روش به علت مشکلات اجرایی متعدد مورد استقبال چندانی قرار نگرفته است. از جمله این مشکلات زمان کوتاهی است که اسپرم باید در مجاورت محیط هیپواسمولار قرار گیرد که خود محیط هیپواسمولار می‌تواند موجب مرگ سلولی شود (۳). همچنین شستشوهای مکرر که پس از تشخیص زنده بودن اسپرم انجام می‌شود تا اسپرم به وضعیت ایزواسمولار برگردد.

با توجه به مباحث فوق دستیابی به روشهای جدید، مناسب و قابل اجرا برای تفکیک و تزریق اسپرم زنده بی‌حرکت به درون سیتوپلاسم تخمک ضروری به نظر می‌رسد.

در این بررسی یکی از نمکهای تترازولیوم با علامت اختصاری MTT مطالعه شد. اولین بار Mosmann در سال ۱۹۸۲ از این نمک در ارزیابی حیاتی و تعیین سرعت رشد لنفوسیتها استفاده نمود. هم‌اکنون این روش ارزیابی به صورت یک روش روتین آزمایشگاهی بررسی تزاید لنفوسیتها (Cell Proliferation Cytotoxicity Assay) انجام می‌شود (۶).

MTT یکی از نمکهای تترازولیوم، پودری زرد رنگ و سوبسترای آنزیم دهیدورژناز میتوکندری است. آنزیم دهیدروژناز، برم موجود در MTT را با هیدروژن جایگزین می‌نماید و در نتیجه MTT به MTT Formazan تبدیل می‌شود. رسوب MTT Formazan بنفش رنگ بوده و به صورت دانه یا تیغه[1] در سلولها دیده می‌شود.

هدف این بررسی استفاده از MTT برای ارائه یک روش جدید در تشخیص اسپرمهای زنده بی‌حرکت است.

مواد و روشها

نمونه‌های مورد آزمایش از بین نمونه‌های بیماران که برای آزمایش روتین اسپرموگرام به آزمایشگاه آندرولوژی باروری و ناباروری اصفهان انتخاب شد. با توجه به توصیه‌های قبلی پزشکان نمونه‌های مورد آزمایش معمولاً بین سه تا هفت روز پس انزال قبلی جمع آوری شده بود.

نمونه‌گیری طبق توصیه سازمان بهداشت جهانی در ظروف مخصوص و دهانه گشاد و غیرتوکسیک انجام و سپس پارامترهای اسپرمی آنها تعیین شد. سپس اسپرمها را با محیط Ham´s F-10+10% HSA در دور ۲۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده و آزمونهای E&N و HOST و MTT روی آنها انجام شد.

* آزمون HOST

در این مطالعه آزمون HOST بر اساس روش ارائه شده توسط Jiaen liu انجام شد. در ابتدا سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد را با حجم مساوی آب مقطر مخلوط کرده تا اسمولاریته مایع به حدود ۱۵۰ میلی اسمول برسد (۷). سپس نمونه آماده شده و مایع هیپواسمولار تهیه شده را به نسبت یک به دو مخلوط نموده و پس از نیم ساعت اسپرمها در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند. تغییرات ایجاد شده با الگوهای مختلف به‌عنوان HOST مثبت ثبت (۵) و به صورت درصد گزارش شد.

* روش ائوزین - نگروزین

در این مرحله بر اساس تکنیکهای WHO، محلول یک درصد ائوزین و محلول ده درصد نگروزین تهیه شد (۸). در این روش محلول ائوزین را به نسبت دو به یک با مایع منی مخلوط کرده و پس از ۳۰

1. Spike or dye grain

ثانیه محلول نکروین به اندازه مخلوط فوق اضافه شد. از محلول حاصل گسترش یافتی تهیه و پس از خشک شدن لام، با بزرگنمایی ۱۰۰۰× زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد. اسپرمهای زنده در این رنگ‌آمیزی به رنگ سفید و اسپرمهای مرده به رنگ قرمز مشاهده می‌شوند که رنگ قرمز درون سیتوپلاسم به علت عبور اتوزین از غشای اسپرم مرده است. در اینجا نیز درصد اسپرمهای زنده گزارش شد.

* روش MTT

در روش معمول MTT برای ارزیابی حیات سلولهای سوماتیک، ابتدا از PBS[1] به‌عنوان حلال MTT استفاده می‌شود و سپس این محلول را به محیط RPMI 1640 که حاوی سلول است اضافه می‌کنند (۶). برای ارزیابی حیات اسپرم و یافتن بهترین محیط و نیز بهترین حلال MTT، محیطهای مختلفی که در آزمایشگاههای نازایی به صورت معمول استفاده می‌شوند، از جمله محیطهای Ham´s F-10، PBI، Ham´s F10+25mM Hepes و Ham s F-10+15mM Hepes آزمایش شده و طی تحقیقات اولیه مشخص شد که به دست آوردن نتیجه بهتر باید pH محیط ثابت باشد؛ در نتیجه از محیط Ham´sF-10 +25mM Hepes در طول مطالعه استفاده شد. لازم به ذکر است که در محیطهای دیگر نتایج غیر مطلوب و متغیر بود (Data not shown).

محلول MTT (Lobo chemie) به صورت هفتگی با غلظت ۰/۵mg در میلی لیتر در محیط Ham´s F-10+25mM Hepes (Gibco) تهیه و سپس pH آن به میزان ۷/۴۵ - ۷/۴۰ تنظیم شد. سپس محلول فوق فیلتر شده (0.22μm) و در حجمهای ۴۵۰ میکرولیتری در یخچال در دمای ۴ سانتی‌گراد حداکثر به مدت یک هفته نگهداری شد. در زمان انجام آزمایش دمای این ویالها به ۳۷ سانتی‌گراد رسانده شد و به هر یک از آنها ۵۰ میکرولیتر اسپرم شستشو شده اضافه گردید و سپس در انکوباتور ۳۷ سانتی‌گراد تا ۴ ساعت نگهداری شد. هر نیم ساعت نمونه به آرامی مخلوط و در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰× مورد مشاهده قرار گرفت. لازم به ذکر است که در حین انجام این آزمون بایستی شرایط استریل رعایت شود. اسپرمهای دارای دانه یا تیغه به‌عنوان MTT مثبت و اسپرمهای بدون دانه یا تیغه را به‌عنوان MTT منفی در نظر گرفته و درصد آنها در ۲۰۰ اسپرم محاسبه شد.

با توجه به اینکه تولید MTT Formazan وابسته به آنزیم دهیدروژناز است پس عامل زمان در میزان تولید رسوب آن نقش مهمی دارد، بنابراین برای بررسی اثر زمان بر درصد اسپرمهای زنده تشخیص داده شده، ۱۷ نمونهٔ اسپرمی تحت آزمون MTT گرفتند. این بررسی طی ۴ ساعت و به فواصل هر نیم ساعت انجام شد. با توجه به اینکه آزمونهای آزمایشگاهی از نظر تشخیصی در موارد بالینی بسیار با اهمیت هستند، بنابراین حساسیت و اختصاصی بودن این سه آزمون بررسی شد. پس از پرکل کردن ده نمونهٔ خوب اسپرمی، نمونه‌ای به دست آمد که دارای بیش از ۹۹ درصد اسپرم با حرکت پیش رونده بود. این نمونه به‌عنوان gold standard اسپرم زنده قرار داده شد. مقداری از همین نمونه توسط ازت مایع سه بار منجمد و ذوب شد تا نمونه ۱۰۰ درصد نکرواسپرمی به دست آید. لازم به ذکر است که در این روش اجزای سلولی از جمله میتوکندری و غشای اسپرم تخریب می‌شوند (۹). این نمونه به‌عنوان gold standard اسپرم غیر زنده انتخاب شد. سپس سه آزمون E&N، HOST و MTT روی این دو نمونه انجام و حساسیت اختصاصی بودن آزمونها بر طبق فرمولهای زیر محاسبه شد:

sensitivity= MTT+or HOST+or $E\&N^{+}$/total alive

specificity= MTT-or HOST-or $E\&N^{-}$/total dead

برای تعیین واریانس آزمون MTT، ۲ ساعت پس از مجاورت MTT با نمونه‌های اسپرمی، یک قطره از نمونه را روی لام قرار داده و ۱۰۰ اسپرم در نواحی مختلف بررسی شد. این آزمایش روی نمونه انجام و درصد اسپرمهای زنده در هر ناحیه ثبت و سپس با استفاده از فرمول $CV\% = (SD/mean)\times 100$ ضریب واریانس محاسبه شد. پس از بررسی اعتبار این آزمون، رابطهٔ آن با آزمونهای دیگر بررسی گردید. روی ۵۷ نمونه آزمونهای HOST، E&N و MTT به صورت همزمان انجام گرفت و ضریب همبستگی بین این آزمونها و درصد حرکت اسپرمی با استفاده از نرم‌افزار SPSS محاسبه شد (جدول ۱).

جدول ۱: ضریب همبستگی بین آزمونهای E&N، HOST، MTT و درصد حرکت اسپرمی

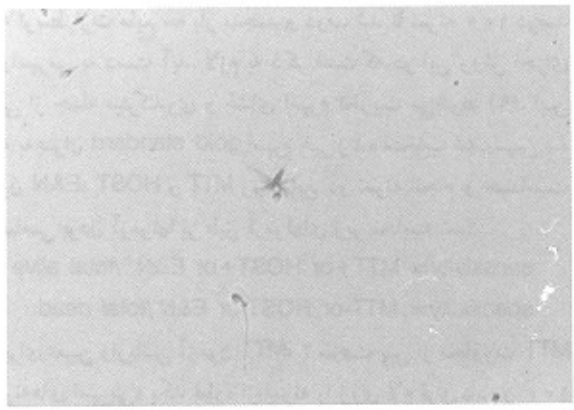
	E&N	HOST	MTT	MOT
E&N	۱/۰۰ P=0.00	۰/۸۹ P=0.00	۰/۷۵ P=0.00	۰/۰۶ P=0.00
HOST	۰/۸۹ P=0.00	۱/۰۰ P=0.00	۰/۷۳ P=0.00	۰/۵۹ P=0.00
MTT	۰/۷۵ P=0.00	۰/۷۳ P=0.00	۱/۰۰ P=0.00	۰/۴۰ P=0.00
MOT	۰/۶۰ P=0.00	۰/۵۹ P=0.00	۰/۰۴ P=0.00	۱/۰۰ P=0.00

یافته‌ها

نمای حاصل از انجام آزمون MTT روی نمونه اسپرمی در شکل ۱ دیده می‌شود. همان طور که مشاهده می‌شود در مجاورت گردن اسپرم زنده دانه‌هایی (شبیه گوشواره) در زیر سر اسپرم یا در قسمت گردنی قرار دارند که بیانگر تجمع و رسوب MTT Formazan تولید شده توسط میتوکندریهای فعال آن اسپرم هستند. این اسپرمها MTT مثبت و زنده محسوب می‌شوند. گاهی رسوب MTT Formazan به صورت تیغه دیده می‌شوند که این اسپرمها نیز زنده محسوب می‌شوند.

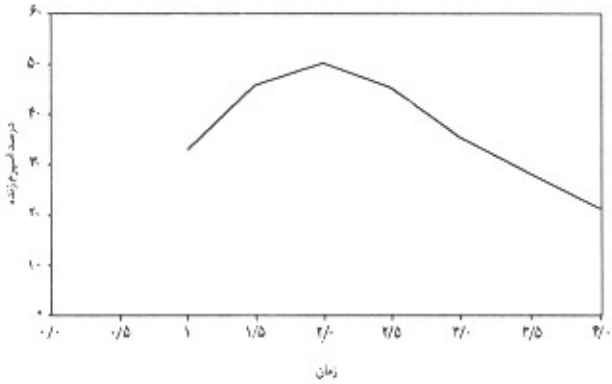
با توجه به اینکه تولید MTT Formazan وابسته به آنزیم دهیدروژناز است بنابراین تشکیل رسوب (به صورت دانه یا تیغه) وابسته به زمان است. لذا در ۱۷ نمونه پس از مجاورت اسپرمها با MTT، درصد اسپرمهای زنده در طی ۴ ساعت یعنی پس از ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵ و ۴ ساعت در ۲۰۰ اسپرم محاسبه شد.

1. Phosphat Buffer Saline
2. Coefficient of variation



شکل ۱: تشکیل دانه‌ها یا تیغه‌های MTT Formazan در ناحیه قطعه میانی اسپرم

همان طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، حداکثر درصد زنده بودن اسپرم در زمان ۱/۵-۲/۵ ساعت است. بنابراین زمان ۲ ساعت برای قرائت نمونه‌ها در نظر گرفته شد (نمودار ۱).



نمودار ۱: درصد اسپرمهای زنده در آزمون MTT طی ۴ ساعت

برای مشخص نمودن اعتبار این روش، ۱۰ نمونه اسپرمی با MTT مجاور و پس از ۲ ساعت قطره‌ای از هر یک از نمونه‌ها روی لام گذاشته شد. برای هر کدام درصد زنده بودن اسپرمها در ۱۰ ناحیه مختلف محاسبه شد. سپس ضریب واریانس آن به مقدار ۷ درصد محاسبه و با توجه به اینکه این مقدار کمتر از ۱۰ درصد است، اعتبار این آزمون تایید شد.

در مرحلهٔ بعد ۵۷ نمونه پس از تعیین پارامترهای اسپرمی (بر طبق تکنیکهای WHO) به مدت دو ساعت مورد آزمونهای MTT، E&N و HOST قرار گرفتند. به ترتیب مقادیر ۲۸/۸۸±۵۹/۵۹، ۲۲/۶۳±۶۶/۴۵ و ۲۴/۲۶±۷۱/۹۱ بود. با توجه به اینکه این سه روش هر کدام بر اساس پایه‌های مختلفی برای تشخیص اسپرمهای زنده طراحی شده‌اند، ضریب همبستگی آزمونها و درصد حرکت اسپرمی محاسبه گردید که در جدول ۱ گزارش شده است. با استفاده از نمونه‌هایی که بیش از ۹۹ درصد زنده یا ۱۰۰ درصد مرده بودند، میزان حساسیت و اختصاصی بودن هر آزمون محاسبه شد (جدول ۲).

جدول ۲: مقایسه میزان حساسیت و اختصاصی بودن آزمونهای E&N، HOST و MTT

	Sensitivity	Specificity
E&N	٪۹۸	٪۱۰۰
HOST	٪۹۹	٪۸۳
MTT	٪۹۷	٪۱۰۰

بحث

در حال حاضر روش ICSI به‌عنوان یک روش درمانی مؤثر در زوجهای نابارور با علت مردانه از جمله الیگواستنواسپرمی و آزواسپرمی شناخته شده است. اما در برخی موارد اسپرم متحرک در مایع منی و حتی در اسپرمهای تهیه شده از بیضه نیز یافت نمی‌شود. با این وجود مواردی از لقاح و بارداری پس از تزریق اسپرمهای بی‌حرکت گزارش شده است (۱۰). درصد لقاح و باروری در این گونه زوجها در مقایسه با لقاح و باروری در افرادی که اسپرمهای متحرک دارند پایین‌تر است. با در نظر گرفتن این موضوع که درصد شیوع اسپرمهای غیرمتحرک در جمعیت کشورهای غربی ۱ در ۵۰۰۰ مورد گزارش شده است (۱۱) و دانستن این مطلب که تعداد زیادی از این بیماران تحت درمان ICSI قرار می‌گیرند، یافتن روشی کار آمد برای تمایز و تشخیص اسپرمهای مرده از اسپرمهای زنده ولی بدون تحرک ضروری است. روشها و تکنیکهای مختلفی بدین منظور طراحی و پیشنهاد شده است. برای مثال Tasdemir از پنتوکسی فیلین برای القای حرکت استفاده نمود (۱۲) و نیز آزمون HOST برای انتخاب اسپرم زنده طراحی و اجرا شده است (۱۳). در این تحقیق با توجه به محدودیتهایی که در استفاده از آزمون HOST و استفاده از پنتوکسی فیلین وجود دارد، روش MTT که در مواردی مانند ارزیابی حیات و تکثیر سلولهای سوماتیک به کار می‌رود، در مورد ارزیابی حیات اسپرم بررسی شد (۱۴). نتایج به دست آمده نشان دهندهٔ آن است که MTT همچون سایر سلولهای سوماتیک در میتوکندری اسپرم نیز به‌وسیلهٔ آنزیم دهیدروژناز به MTT Formazan تبدیل می‌شود. با توجه به تجمع میتوکندریهای اسپرم در ناحیه گردنی آن، رسوب MTT Formazan در این ناحیه به شکل دانه یا تیغه قابل مشاهده است (شکل ۱).

نتایج به دست آمده در محیطهای مختلف برای انجام آزمون MTT نشان داد که این آزمون نسبت به تغییرات pH محیط حساس بوده و بنابراین بهترین محیط که از نظر فعالیت اسپرمی و به وجود آوردن محیطی با pH ثابت مناسب است، محیط Ham´s F-10 + 25mM Hepes + 10% HSA است. لازم به ذکر است که کار کردن در این محیط نیازی به انکوباتور گازکربنیک ندارد و تنها دما باید ثابت نگاه داشته شود.

یکی از فاکتورهای دیگری که در انجام این آزمون مؤثر است، زمان مجاورت اسپرم با MTT است. نمودار ۱ نشان می‌دهد که بهترین زمان برای انجام تست MTT، دو ساعت پس از مجاورت با اسپرم است و پس از آن به تدریج درصد اسپرمهای MTT مثبت کاهش می‌یابد. این کاهش می‌تواند به علت اثر سمی MTT Formazan یا اثر مهار کنندگی آن

بر آنزیم دهیدروژناز باشد.

پس از اینکه بهترین زمان و محیط برای این آزمون مشخص شد، برای بررسی اعتبار روش MTT، ضریب واریانس آن محاسبه شد که کمتر از ۷ درصد بود و نشانه اعتبار این آزمون است.

نتایج به دست آمده از آزمونهای E&N، HOST و MTT، بیانگر آن است که اگر چه این آزمونها بر اساس مبانی مختلفی پایه گذاری شده‌اند (E&N بر اساس عملکرد و سلامت غشا و HOST بر اساس ساختار و تراوایی غشا و MTT بر اساس آنزیم دهیدروژناز میتوکندری اسپرم) ولی در نهایت هر سه آزمون درصد اسپرم زنده را مشخص می‌نمایند (جدول ۱). مقدار میانگین درصد اسپرمهای زنده در این آزمون نزدیک و قابل قبول بودند (برای آزمون اثوزین، ۶۶/۴۵±۲۲/۶۳، در آزمون HOST، ۷۱/۹۱±۲۴/۲۶ و برای آزمون MTT، ۵۹/۵۹±۲۸/۸۸). همچنین آزمونها از میزان حساسیت و اختصاصی بودن بالایی برخوردار بودند (جدول ۲). بیشترین ضریب حساسیت و کمترین میزان اختصاصی بودن را آزمون HOST دارا بود. این مسئله می‌تواند به علت وارد آمدن شوک به دم اسپرم هنگام مرگ سلولی باشد که منجر به پدید آمدن نتایج مثبت کاذب می‌شود. دو آزمون دیگر از میزان حساسیت و اختصاصی بودن بالایی برخوردار بودند.

در پایان می‌توان چنین نتیجه گرفت که MTT می‌تواند روش مناسبی برای تشخیص اسپرمهای زنده از مرده باشد. توانایی این روش به‌عنوان یک روش جداسازی اسپرم زنده برای ICSI نیاز به بررسیهای بیشتری دارد. از جمله مواردی که باید در نظر گرفت تاثیر MTT بر لقاح، رشد و تکامل است که در حال حاضر در دست بررسی است.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از مسئولین مرکز باروری و ناباروری اصفهان، همکاری پرسنل آزمایشگاه این موسسه و همکاران گروه علوم تشریح که ما را در این تحقیق یاری نمودند قدردانی می‌نمائیم. همچنین از مسئولین جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی ایران که کلیه هزینه‌های مصرفی و غیر مصرفی این طرح را بر مبنای قرار داد شماره ۷۹/۴۰۴/پ مورخ ۷۹/۱۱/۲۵ تامین نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

References

1.Palemo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC: Pregnancies after intracyoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 340: 8-17

2. Sallam HN, Farrag A, Aamaya AF, Ezzeldin F, Eid A, Sallam A: The use of a modified hypo-osmotic swelling test for the selection of viable ejaculated and testicular immotile spermatozoa in ICSI. Reproduction 2001; 16(2): 272-276

3. Yieh-Loong T, Jiaen L, Jairo E, Garcia E, Eugene K, Campton G, Baramki TA: Establishment of an optimal hypo-osmotic swelling test by examining single spermatozoa in four different hypo-osmotic solutions. Hum Reprod 1997; 12(5): 1111-1113

4. Ahmadi A, Soon-Chye Ng: The single sperm curling test, a modified hypo-osmotic swelling test, as a potential technique for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection. Fert Steril 1997; 68(2): 346-350

5. Hossain AM, Rizk B, Bairk S, Huff C, Thorneycroft IH: Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidance of ordered transition between swelling subtypes. Hum Reprod 1998; 13(6): 1578-1583

6.Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to prolifration and cytotoxicity assay. J Immunol Metod 1983; 65: 55-63

7. Jiaen L, Yieh-Loong T, Eugene K, Campton G, Garcia JE, Baramki TA: High fertilization rate obtained after intracytoplasmic sperm injection with 100% nonmotile spermatozoa selected by using a simple modified hypo-osmotic swelling test. Fert Steril 1997; 68(2): 373-376

8. WHO laboratory manoal for the examination of human semsn sperm-cervical mucus intr action. 3 ed, Cambridge University Press, 1992, p 52

9. Ahmadi A, Ng Sc: Development capacity of damaged spermatozoa. Hum Reprod 1999; 14(9): 2279-2285

10. Nagy ZP, Verheyen G, Tournaye H, Steirtegham AC: Spesial application of intracytoplasmic sperm injection: the influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI. Human Reprod 1998; 13: 143-154

11. Eliasson R, Mossberg B, Camner P, Afzelius BA: The immotile-cilia syndrome; Acongential ciliary abnormality as an etiologic factor in chronic airway infections and male sterility. N Engl J Med 1977; 297: 1-6

12. Tasdemir I, Tasdemir M, Tavukcuoglu S: Effect of Pentoxifylline on immotile testicular spermatozoa. J Assist Reprod Genet 1998; 15: pp 90-92

13. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, etal: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membranes and its relationship to other semen characteristics. J Reprod

Fert 1984; 70: 219-228
14. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K: Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J Immunol Method 1989; 119: 203-210