تراکم پیش‌رس کروموزومی اسپرم و تخمک در تخمکهای لقاح‌نیافته با روشهای لقاح آزمایشگاهی

حسین مزدارانی Ph.D.☆♦، فرین عقدایی M.Sc.★

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه رادیولوژی

★ جهاد دانشگاهی علوم پزشکی ایران، پژوهشکده رویان

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

چکیده

* **هدف:** بررسی رخداد تراکم پیش‌رس کروموزومی (PCC: Premature Chromosome Condensation) اسپرم و تخمک در تخمکهای لقاح نیافته با روشهای لقاح آزمایشگاهی (IVF: In Vitro Fertilization) و تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI: Intracytoplasmic Sperm Injection) و مقایسه فراوانی PCC و وجود سر اسپرم دست نخورده در تخمک در دو روش.

* **مواد و روشها:** تعداد ۳۶۴ تخمک که ۴۸-۴۶ ساعت بعد از مجاورت یا تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم لقاح نیافتند، بررسی شدند. قشر شفاف تخمکها با استفاده از محلول اسید تایرود برداشته‌شد و سپس تحت‌تأثیر شوک هیپوتونیک، متشکل از کلریدپتاسیم، آب مقطر و سیترات سدیم قرار گرفت. تخمکها در سه مرحله با گذراندن از محلولهای مختلف فیکساتیو، تثبیت شدند و با روش air-dry تارکوسکی، لام تهیه شد. لامهای تهیه شده با گیمسای ده درصد رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰× بررسی شدند.

* **یافته‌ها:** مشاهدات مبین آن است که درصد بالایی از تخمکهای لقاح نیافته حاوی سر اسپرم دست نخورده یا با کروماتین باز نشده هستند (۳۹/۵ درصد برای IVF و ۴۶/۵ درصد برای ICSI). فراوانی وجود سر اسپرم در تخمکها در دو روش، از نظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند. همچنین در بسیاری از تخمکها، PCC اسپرم مشاهده شد که فراوانی آن در روش ICSI، دو برابر روش IVF بوده و از نظر آماری با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارد ($P<0.05$). همچنین در برخی موارد، تخمکهای باکروماتین نامتراکم و یا کروموزومهای در حال دژنراسیون مشاهده شد.

* **نتیجه‌گیری:** ممکن است پدیدهٔ غیرطبیعی بازنشدن کروماتین اسپرم و متراکم نشدن آن به شکل کروموزوم که منجر به لقاح نیافتن تخمک می‌شود، ناشی از عوامل متعددی باشد. احتمالاً مشاهده سر اسپرم دست‌نخوردهٔ بیشتر در تخمکها در روش ICSI نسبت به روش IVF، به دلیل آسیب ندیدن غشای پلاسمایی اسپرم و در نتیجه عدم دسترسی عوامل اووپلاسمی به هستهٔ اسپرم باشد. در صورتی که هسته اسپرم به عوامل متراکم‌کننده کروموزوم واکنش نشان دهد اما تخمک فعال نشده و در میتوز II باقی بماند، به القای PCC کروموزومها منجر می‌شود. همچنین فراوانی بالای PCC، ممکن است ناشی از عدم بلوغ تخمکها و یا تأخیر در ورود اسپرم به داخل تخمکهای در حال دژنراسیون باشد.

گل واژگان: تخمک انسان، لقاح آزمایشگاهی، تراکم پیش‌رس کروموزوم، سر اسپرم

مقدمه

در سلولهای گیاهی و جانوری کروموزومها را می‌توان به‌صورت اجسام سلولی مجزای از هم در یک دوره کوتاهی از چرخه سلول یعنی میتوز یا میوز مشاهده کرد. در سرتاسر دورهٔ بین میتوزی که در سلولهای جانوری بین ۱۰ تا ۴۰ ساعت متغیر است، کروموزومها به صورت به هم آمیخته و غیرقابل تشخیص از یکدیگر، در هستهٔ سلول قرار دارند. مولکول DNA همراه با پروتئینهای هیستون و غیرهیستون با پیچشهای متعددی، فیبرکروماتین را با ضخامت ۲۳۰A ایجاد می‌کند (۲،۱). این فیبرها در زمان تقسیم سلول، به شکل کروموزوم فشرده، فرآیند توزیع مساوی مواد ژنتیکی را بین دو هستهٔ دختر تسهیل می‌کنند.

برای اولین بار Johnson و Rao (۳) نشان دادند که تلفیق یک سلول انترفازی با یک سلول متافازی منجر به تراکم سریع کروموزومهای سلول انترفازی می‌شود. این القای تراکم کروموزومی در یک هستهٔ انترفازی تراکم پیش‌رس کروموزوم (PCC) نامیده شد. مورفولوژی کروموزومهای متراکم شدهٔ پیش‌رس، بر اساس مرحلهٔ سلولهای انترفازی در زمان تلفیق سلول، متفاوت است. بنابراین PCC سلولها در مرحله G_1 بسیار طویل و تک کروماتیدی است؛ درحالی‌که کروموزومهای G_2 طویل و دو کروماتیدی هستند. PCC در مرحلهٔ S، ظاهری قطعه قطعه دارد.

توسعهٔ روش PCC باعث شد که متخصصین سیتوژنتیک بتوانند تغییرات کروماتین را به همراه فعالیت عملکردی آن، ردیابی نموده و مفهوم چرخهٔ کروموزوم را در چرخهٔ سلول بیان کنند.

بررسی کروموزومهای سلولهای جنسی در مراحل تقسیمهای میتوزی اسپرماتوگونی یا اووگونی میسر است. Johnson و همکاران پس از معرفی روش PCC، برای بررسی کروموزومهای سلولهای متمایز، به بررسی تلفیق اسپرم گاو و سلولهای میتوزی پرداختند و مشاهده کردند که سلول میتوزی حاوی یک مجموعه هاپلوئید PCC، از نوع G_1 است. دیگر آزمایشهای مستلزم تلفیق سلولهای میتوزی و تخمکها (۴) و همچنین تزریق عصارهٔ سلولهای میتوزی به تخمکها (۵)، نشان می‌دهد که سلولهای ژرمینال می‌توانند به عوامل میتوزی پاسخ دهند؛ همان‌گونه که سلولهای سوماتیک توانایی پاسخ به عوامل میوزی را دارا هستند (۶).

موفقیت لقاح آزمایشگاهی به تراکم صحیح و کامل کروموزومهای اسپرم در تخمک متوقف شده در مرحلهٔ متافاز II بستگی دارد. در لقاح آزمایشگاهی معمولی (IVF)، تلفیق اسپرم ـ تخمک نتیجه مشارکت هستهٔ اسپرم بدون غشاء است که فوراً برای عوامل اووپلاسمی، مانند عامل تسریع بلوغ (MPF)[1]، قابل دسترسی است (۸،۷).

در روش لقاح آزمایشگاهی با تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) که دریچه‌ای را برای درمان ناباروری male factor شدید، گشود (۱۱ـ۹)، اسپرم تزریق شده در تخمک در غشاء خود محصور بوده و با این شرایط تحت تأثیر اووپلاسم و عوامل آن قرار می‌گیرد. بدین دلیل، می‌توان انتظار داشت که رفتار اسپرم در اووپلاسم در روش ICSI و IVF، وقتی که لقاح صورت نمی‌گیرد، متفاوت باشد و در واقع مشاهدات گزارش شده نیز مبین وجود چنین تفاوتهایی است (۱۳،۱۲). در IVF معمولی، عوامل سیتوپلاسمی تراکم کروموزوم یک تخمک متوقف شده در متافاز II، می‌تواند تراکم پیش‌رس کروموزومی هسته اسپرم داخل شده به درون آن را القا نماید (۱۴)؛ مانند پدیده‌ای که Johnson و Rao برای تلفیق سلولها در مراحل مختلف چرخه سلولی (میتوز ـ اینترفاز) نشان دادند.

Calafell و همکاران در بررسیهایی که بر روی تخمکهای لقاح نیافته در IVF انجام شد، نشان دادند که وجود کروموزومهای پیش‌رس اسپرم در تخمک، نشانه‌ای از عدم بلوغ تخمک است (۱۵).

تحقیقات انجام شدهٔ اخیر مبنی بر استفاده از GnRHa برای تحریک تخمک‌گذاری کنترل شده نیز نشان می‌دهد که فراوانی و وجود کروموزومهای متراکم پیش‌رس اسپرم در تخمکهای لقاح نیافته، ممکن است ناشی از عدم بلوغ کامل هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک بعد از استفاده از این آگونیست باشد (۱۶).

قبلاً فراوانی PCC در روش IVF به‌طور متفاوت ۱۶ـ۴ درصد و در یک مورد وفور این ناهنجاری تا ۲۸ درصد هم گزارش شده است (۱۴، ۲۰ـ۱۷). این فراوانی برای روش ICSI حدود ۲۸ درصد مشاهده شد (۲۱).

هدف از انجام این بررسی، مقایسه فراوانی القای PCC در روشهای IVF و ICSI با شرایط مشابه تحریک تخمک‌گذاری بود که تخمکهای لقاح نیافته بعد از IVF و ICSI، برای وجود PCC اسپرم و تخمک بررسی شدند.

مواد و روشها

تخمکهایی که ۴۸ـ۴۶ ساعت بعد از مجاورت یا تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم، لقاح نیافته بودند، بررسی شدند. عدم تشکیل دو پرونوکلئای نر و ماده، نشانهٔ عدم لقاح است. تعداد ۹۱ تخمک لقاح نیافته با روش IVF و ۲۷۳ تخمک لقاح نیافته با روش ICSI برای مطالعات سیتوژنتیکی ـ سیتولوژیکی به آزمایشگاه منتقل شدند.

روش سیتوژنتیکی مورد استفاده، تلفیق روشهای Tarkowski (۲۲) و Kamiguchi و همکاران (۲۳) با انجام اصلاحاتی در برخی از مراحل بود. به‌طور خلاصه در این روش ابتدا تخمکها از محیط کشت به قطره‌ای از محلول اسید تایرود منتقل شدند تا قشر شفاف[2] برداشته شود. از بین رفتن قشر شفاف در زیر استریومیکروسکوپ تعقیب شد تا به غشای سیتوپلاسمی تخمک آسیبی وارد نیاید و به‌موقع به محلول هیپوتونیک منتقل شود. محلول هیپوتونیک مورد استفاده متشکل از مخلوط کلریدپتاسیم ۰/۵۶ درصد، آب مقطر و سیترات سدیم ۱/۹۳ درصد به نسبت ۳:۱:۱ بود. تخمک به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در این محلول قرار داده شد. پس از این مدت باید اندازه تخمک ۱/۵ برابر اندازهٔ اولیه‌اش باشد که در زیر میکروسکوپ، کاملاً قابل تشخیص است.

1. Maturation Promoting Factor
2. Zona pellucida

پس از شوک هیپوتونیک، تخمکها با گذر از محلولهای مختلف فیکساتیو به‌طور تدریجی تثبیت شدند. تثبیت تخمکها در سه مرحله انجام شد:

Fix I متشکل از متانول، اسید استیک و آب مقطر به نسبت ۵:۱:۴ به مدت ۳ دقیقه؛

Fix II متشکل از متانول و اسید استیک به نسبت ۳:۱ به مدت ده دقیقه؛

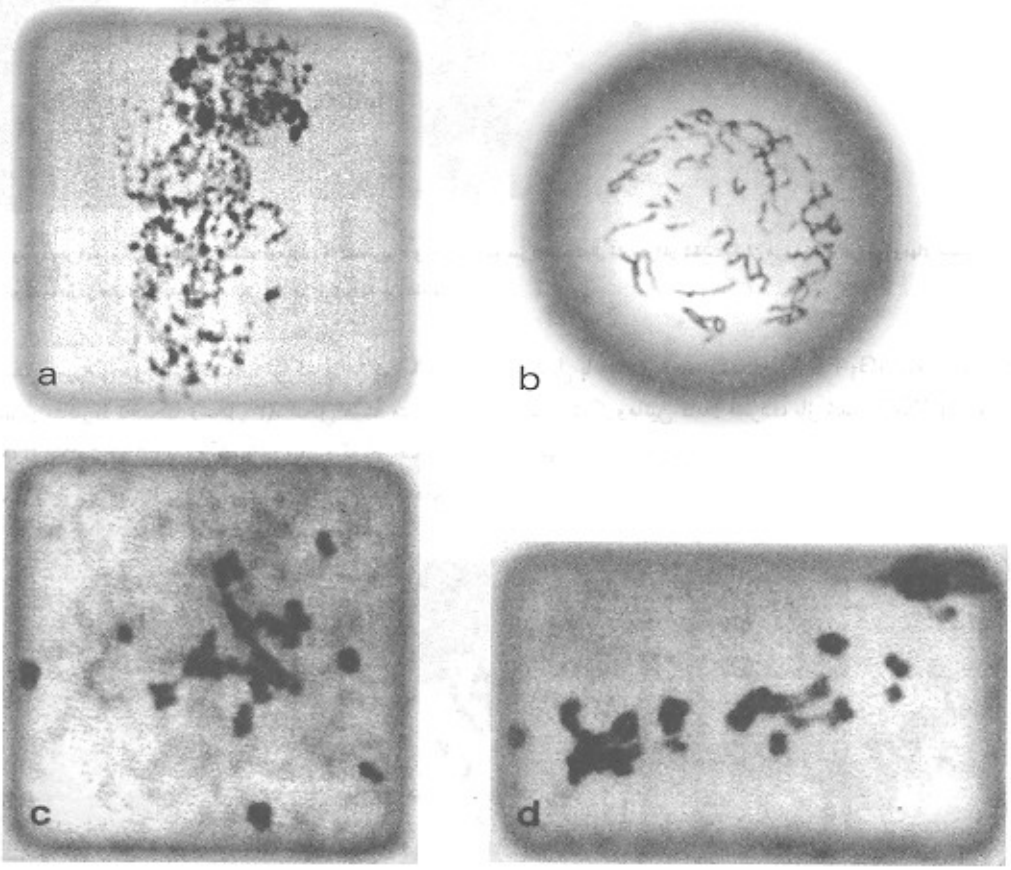
Fix III متشکل از متانول، اسید استیک و آب مقطر به نسبت ۳:۱:۱ به مدت ۶۰ ثانیه.

کلیهٔ مراحل تثبیت در مجاورت هوای گرم و مرطوب انجام شد. سپس لامها به مدت ۵ دقیقه در هوای اتاق قرار داده شد تاکاملاً خشک شوند. لامهای خشک شده در محلول گیمسای ده درصد رنگ‌آمیزی شدند. بررسی تخمکها زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰× انجام شد. آنالیز نتایج بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و روش آماری χ^2 انجام شد.

یافته‌ها

از ۳۶۴ تخمک آماده شده که فاقد پرونوکلئی بودند، ۹۱ مورد مربوط به بیماران IVF با میانگین سنی ۵/۵±۲۹/۷۴ سال و بقیه مربوط به بیماران ICSI با میانگین سنی ۵/۳±۳۱/۲۷ سال بود. نتایج کلی این بررسی سیتوژنتیکی ـ سیتولوژیکی در جدول ۱ خلاصه و یافته‌ها به این ترتیب نشان داده شده است:

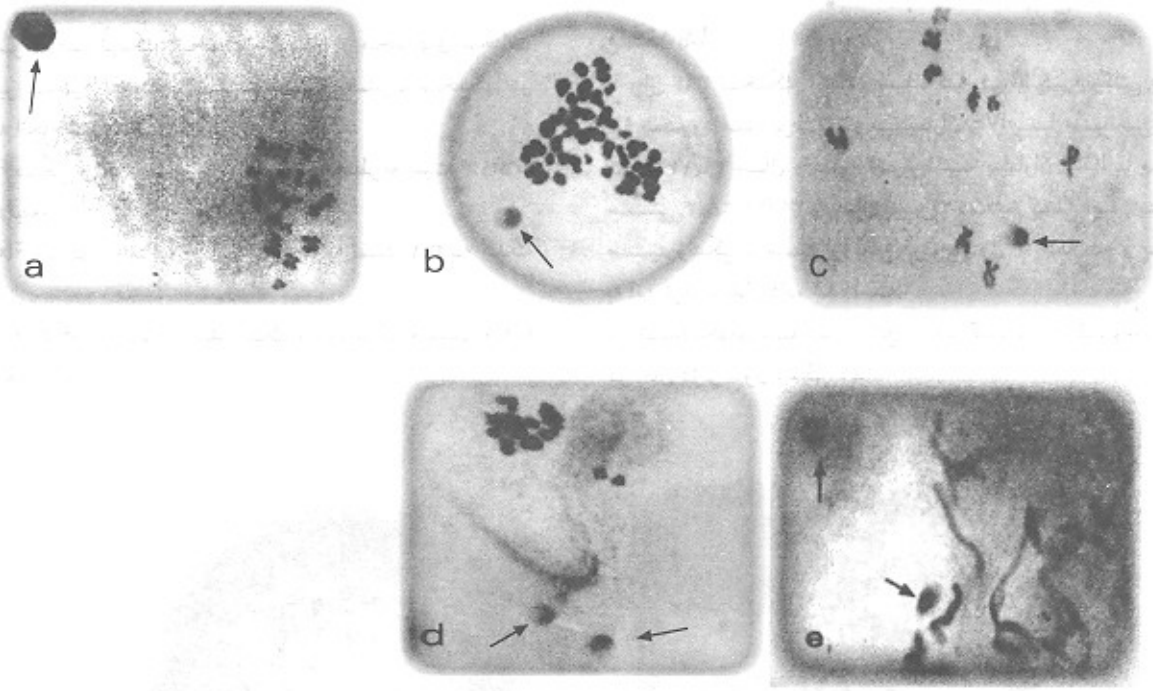
۱ـ تخمکهای با کروماتین نامتراکم و یا کروموزومهای در حال دژنراسیون (شکل ۱).



شکل ۱: تخمکهای با کروماتین نامتراکم PCC (a) کروموزوم (b) و کروموزومهای در حال دژنراسیون (d,c) (رنگ‌آمیزی گیمسا، بزرگنمایی ۱۰۰۰×)

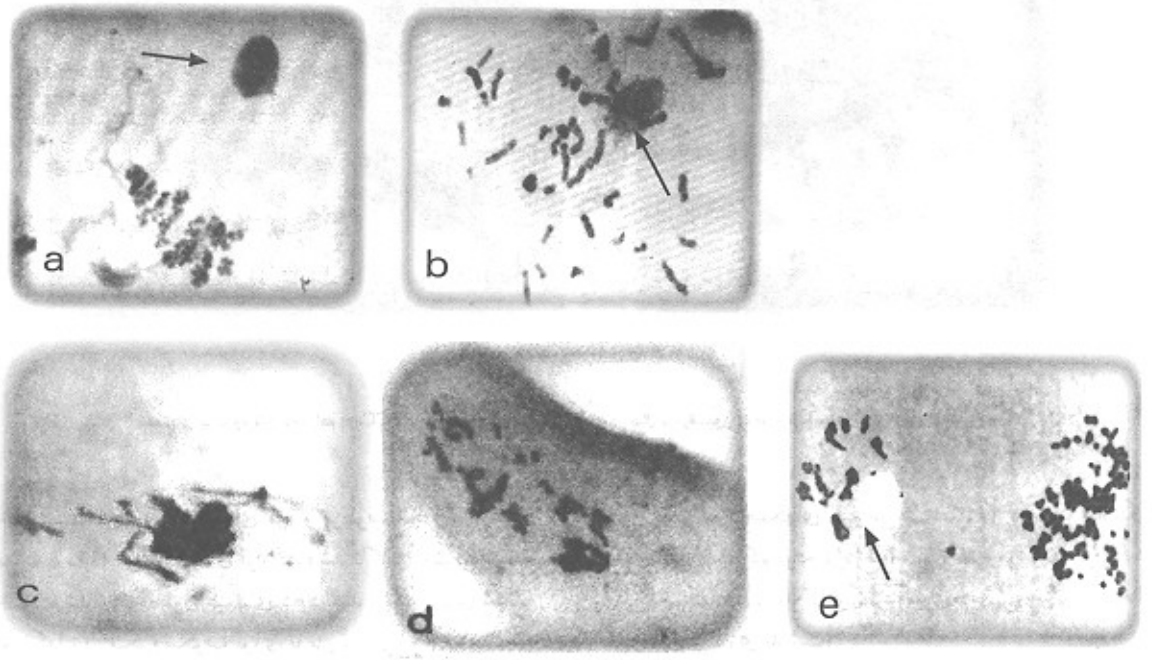
در مجموعه تخمکهای بررسی شده، ۶/۶ درصد تخمکها دارای کروماتین نامتراکم بوده و دژنراسیون کروموزومها در ۸/۸ درصد کل تخمکها دیده شد که از نظر آماری در بین دو گروه IVF و ICSI تفاوت معنی‌داری نداشت؛

۲ـ سر اسپرم فعال نشده در سیتوپلاسم تخمک که در اکثر موارد دور از گستره متافازی تخمک قرار گرفته بود (شکل ۲)؛



شکل ۲: وجود سر اسپرم فعال نشده در تخمکهای متافاز II. تصاویر e و d وجود دو سر اسپرم فعال نشده را در تخمک نشان می‌دهند که کروموزومهای تخمک نیز در این دو تصویر در حال دژنراسیون هستند (رنگ‌آمیزی گیمسا، بزرگنمایی ۱۰۰۰×).

۳ـ هسته قابل تشخیص اسپرم با درجات مختلف تراکم و علایم PCC در کنار کروموزومهای متافاز II تخمک (شکل ۳). شکل هستهٔ متراکم شده پیش‌رس اسپرم، از یک توده کروماتین کاملاً متراکم (که اطراف آن ناحیهٔ نسبتاً نامتراکمی وجود دارد) تا یک ساختار نامتراکم با رشته‌های طویل با عناصر تک رشته‌ای (G_1-PCC)، متغیر است. این تغییرات به صورت کروماتین کاملاً فشرده، باز شده، G_1-PCC و G_2-PCC کاملاً مشهود است (شکل ۳).



شکل ۳: کروماتین اسپرم با درجات متفاوت تراکم در تخمک. سر اسپرم با کروماتین متراکم (a)، کروماتین متراکم در حال باز شدن در اطراف (b)، کروماتین نامتراکم با رشته‌های طویل در اطراف (c)، G_1-PCC (d) و G_2-PCC (e) (رنگ‌آمیزی گیمسا، بزرگنمایی ۱۰۰۰×).

در کل تخمکهای بررسی شده، ۴۴/۸ درصد تخمکها دارای PCC کروموزومهای اسپرم بود. همانطور که در جدول ۱ آمده است در بررسی تخمکهای مربوط به IVF، در ۶/۶ درصد تخمکها کروماتین نامتراکم مشاهده شد که ۸/۸ درصد این موارد، همراه با PCC کروموزومهای اسپرم بود. عدم تراکم کروماتین تخمک در بیماران IVF که دلیل ناباروری آنان male factor گزارش شده بود، ۱۵ درصد و در افراد نابارور به دلیل tubal factor، ۱۰/۵ درصد بود. در ۳۶ تخمک (۳۹/۵ درصد) هسته اسپرم وجودداشت (جدول ۱) که در بعضی از تخمکها بیش از یک سر اسپرم دیده شد (شکل ۲).

PCC کروموزومهای اسپرم که اغلب در مرحله G_1 بود با دامنه‌ای بین ۵ تا ۲۱/۴ درصد مشاهده شد که بیشترین موارد مربوط به تخمکهای بیمارانی بود که عارضهٔ عدم تخمک‌گذاری داشته‌اند (۲۱/۴ درصد). در بعضی از موارد G_2-PCC نیز مشاهده شد (شکل ۳). در تخمکهای لقاح نیافته بعد از روش ICSI، در ۱۲۷ تخمک (۴۶/۵ درصد) سر اسپرم به وضوح مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱: خلاصه‌ای از مشاهدات تغییرات سیتوژنتیکی ـ سیتولوژیکی در تخمکهای لقاح نیافته با روشهای IVF و ICSI. اعداد داخل پرانتز درصد را نشان می‌دهد.

مشاهده	روش لقاح آزمایشگاهی	
	IVF	ICSI
تعداد تخمکهای بررسی شده	۹۱	۲۷۳
تخمکها با کروماتین نامتراکم	۶(۶/۶)	۱۸(۶/۶)
تخمکها با کروموزومهای در حال دژنراسیون	۸(۸/۸)	۱۳(۴/۸)
تخمکها همراه با سر اسپرم	۳۶(۳۹/۵)	۱۲۷(۴۶/۵)
PCC اسپرم	۸(۸/۸)	۴۲(۱۶/۱)

در ۶/۶ درصد تخمکها، کروماتین نامتراکم شده و در ۴/۸ درصد دژنراسیون کروموزومهای تخمک مشاهده شد. PCC کروموزومهای اسپرم در تخمکهای لقاح نیافته در این روش دو برابر روش IVF بود و به ۱۶/۱ درصد رسید (در مقایسه با ۸/۸ درصد روش IVF).

بحث

نتایج بررسی تخمکهای بارور نشدهٔ انسان پس از روشهای لقاح آزمایشگاهی IVF و ICSI نمایانگر دو رخداد مهم است: وجود سر اسپرم غیرفعال شده در سیتوپلاسم تخمک (۴۳ درصد) (شکل ۲) و PCC با درجه‌های متفاوت تراکم هسته اسپرم (۴۴/۸ درصد) (شکل ۳). این نتایج نشان می‌دهد که ورود اسپرم به داخل اووپلاسم یک تخمک متوقف شده در متافاز II، شرایط کافی برای دستیابی به لقاح موفق را فراهم نمی‌آورد.

چنانکه در جدول ۱ دیده می‌شود، فراوانی تخمکهای دارای سر اسپرم دست نخورده در تخمکهای لقاح نیافته با روش ICSI بیشتر از روش IVF است. در روش ICSI، کل اسپرماتوزوآ در غشای خود به داخل تخمک وارد می‌شود، در حالی‌که در IVF اسپرماتوزوآ قبل از ورود به غشای پلاسمایی باید تحت واکنش آکروزوم تخمک قرارگیرد و این تلفیق می‌تواند منجر به ایجاد علامتی برای فعال شدن شود. درهرحال اگر تخمک فعال نشود و در متافاز II باقی بماند، عوامل متراکم کننده کروموزوم در اووپلاسم، به داخل هسته اسپرم مهاجرت نموده و PCC را القا می‌نماید (۳). از طرف دیگر، روش بی‌حرکت کردن اسپرم (با شکستن فلاژل) در حین ICSI منجر به آسیب غشای پلاسمایی شده و به نظر می‌رسد که یکی از دلایل نامتراکم شدن (بازشدن) هسته اسپرم و لقاح طبیعی باشد (۱۲،۲۴-۲۷). این مطلب مبین آن است که عوامل اووپلاسمی قادر به نفوذ به درون غشای پلاسمایی اسپرم دست نخورده نیستند و لذا تغییری در شکل سر اسپرم ایجاد نمی‌شود (شکل ۲). اینکه آیا درجهٔ آسیب غشای اسپرم می‌تواند در تراکم نسبی هسته اسپرم متراکم شده پیش‌رس تأثیری داشته باشد یا خیر، مشخص نشده است، اما احتمال دارد آسیب جزئی باعث شود عوامل اووپلاسمی فقط در اطراف هسته، PCC را القا کنند؛ در حالی که بخش داخلی دست نخورده و متراکم باقی بماند. این پدیده که مشابه آن در شکل ۳ نشان داده شد، با بررسیهای میکروسکوپ الکترونی Tesarik و Sousa (۲۸) که نشان دادند کروماتین هسته اسپرم بعد از ICSI به استثنای لایهٔ نازک و کم‌تراکم اطراف آن بسیار متراکم است، مطابقت دارد.

عدم توانایی تخمک برای فعال شدن نیز عامل عمده‌ای برای مشاهدهٔ سر اسپرم دست نخورده در کنار کروموزومهای متافاز II تخمک است. علت دیگری که می‌توان برای باز نشدن کروماتین اسپرم در نظر گرفت، غیرطبیعی بودن کروماتین اسپرم است که توسط Sakkas و همکارانش نشان داده شد (۲۹). این محققین مشاهده کردند که رابطه‌ای بین عدم لقاح بعد از ICSI و تعداد اسپرمهایی که متراکم باقی می‌مانند وجود دارد و پیشنهاد کردند که بسته‌بندی ناقص کروماتین و یا DNA آسیب دیده ممکن است در بازنشدن کروماتین اسپرم دخالت داشته باشد. همچنین ممکن است وجود مقدار کمی از پروتئینهای هیستون در کروماتین اسپرم عامل بازنشدن کروماتین اسپرم باشد (۳۰)؛ زیرا برخلاف بیشتر گونه‌های پستانداران که در حین فرآیند اسپرماتوژنز تقریباً تمامی پروتئینهای هیستون هسته‌ای با پروتامین جایگزین می‌شود(۳۱)؛ حدود ۱۰ درصد DNA اسپرم بالغ انسان متصل به هیستون باقی می‌ماند(۳۲). بنابراین احتمال دارد که هیستونهای اسپرم به‌طور کامل در حین توسعهٔ پرونوکلئای نر برداشته نشود. در هر حال، ممکن است وجود مقادیر غیرطبیعی هیستون در سلولهای نر و ماده همراه با مقادیر متغیر پروتامین، روند طبیعی عملکرد کروماتین در مراحل اولیه بعد از لقاح را تغییر دهد؛ مانند فعالیت ترجمه‌ای اولیه که در پرونوکلئای زیگوتهای انسان شناسایی شده است(۳۳). احتمال دارد این تغییرات مسئول بروز ناهنجاریهای توسعهٔ پرونوکلئای مشاهده شده در هر یک از روشها بویژه روش ICSI باشد.

تفاوت عمدهٔ دیگری که در بررسی تخمکهای لقاح نیافته مشاهده می‌شود وجود PCC بیشتر کروماتین اسپرم بعد از ICSI (۱۶/۱ درصد) نسبت به IVF (۸/۸ درصد) است که مؤید گزارشهای Schmiady و

همکارانش (۲۱،۱۴) است. همچنین درجات متفاوت بیشتری از PCC بعد از ICSI نسبت به IVF وجود دارد (۱۳،۱۲). مطالعات متعددی وجود کروموزومهای متراکم شدهٔ پیش‌رس اسپرم در تخمکهای انسان را با روش air-dry، روشی که برای تثبیت تخمکها در این مطالعه استفاده شد، نشان داد. لازمهٔ القای PCC آن است که بعد از ورود اسپرم به تخمک، تخمک فعال نشده، در متافاز II متوقف شده و حامل عوامل متراکم کنندهٔ کروموزوم باشد. مسلماً این عوامل در سلولهای میتوزی و میوزی مشابه هم عمل می‌کنند (۳۵،۳۴). این عوامل مشابه عامل تسریع بلوغ (MPF) هستند (۳۶،۸)؛ مجموعه‌ای از پروتئین کیناز $P34^{cdc2}$ و سیکلین B که با عامل سیتواستاتیک تنظیم می‌شوند (۳۷).

شواهد بسیاری نیز وجود دارد که نشان می‌دهد تحرکات یونهای کلسیم Ca^{2+} در محیط لازمهٔ فعال شدن تخم برای لقاح است (۳۸). به‌عبارت دیگر، اثر اسپرم بر تخمکهای انسان، بعد از ICSI به جنبش یونهای کلسیم بستگی دارد. بنابراین شاید بتوان گفت که فعال نشدن تخمک، ناشی از عدم رهایی یک عامل فعال کننده از سوی اسپرم است. اگر اجزای سیتوزولی اسپرم برای فعال شدن تخمک بعد از ICSI ضروری باشد، فقدان این عامل در بعضی از اسپرمها مانع فعال شدن می‌شود (۲۶،۱۳). از طرف دیگر، دلایلی وجود دارد که نشان می‌دهد طول کروموزومهای متراکم شده پیش‌رس بیانگر وضعیت هسته سلول در چرخه سلول است (۳۹). وجود G_1-PCC می‌تواند مبتنی بر عدم بلوغ تخمک باشد (۱۸، ۴۰). با درنظر گرفتن G_1-PCCهای مشاهده شده در روش ICSI می‌توان این پدیده را به تولید غیرطبیعی تخمکهای نابالغ از نظر سیتوپلاسمی نسبت داد (۴۱). اخیراً نشان داده شده است که روش تحریک با GnRHa منجر به افزایش فراوانی این پدیده می‌شود (۱۶). این نقص در باروری، در ۲۰ درصد تخمکها مشاهده شد، در حالی‌که فقط در ۳ درصد تخمکهایی که از بیماران بدون درمان با آگونیست گرفته شده بود، مشاهده شد. همچنین با مشاهده فراوانی بیشتر PCC در روش ICSI نسبت به IVF در این مطالعه، باید به آسیبهای تخمک در انجام ICSI توجه داشت؛ احتمال دارد در نتیجهٔ ورود پیپت، ناهنجاریهای دوک یا اسکلت سلولی در بخشی از تخمک روی دهد که منجر به توقف آن در متافاز II و عدم رهاسازی دومین گویچه قطبی شود. به علاوه، شرایط کشت نامناسب در حین انجام روش ICSI (مثل تغییر pH محیط) ممکن است موجب عدم پیشرفت بیشتر تخمک شود.

اگرچه احتمال دارد مشاهدهٔ PCC به غیر طبیعی بودن اسپرم، ربط داده شود، بویژه آنکه در بیشتر موارد بیماران مرد از تعداد کافی اسپرم برخوردار نبودند، اما مواردی وجود دارد که می‌تواند این تصور را کمرنگ نماید؛ از جمله انجام ICSI بعد از عدم موفقیت با IVF (علیرغم کیفیت طبیعی اسپرم) و انتخاب اسپرم با ظاهر طبیعی برای تزریق. به‌علاوه، نشان داده شد که با روش ICSI، اسپرمهای با مورفولوژی غیرطبیعی می‌توانند جنینهای طبیعی پدید آورند (۴۲،۲۵).

با توجه به بررسی تخمکهای تحریک شده انسان، فراوانی این پدیدهٔ غیرطبیعی از ۴ تا ۲۸ درصد تخمین زده شد؛ بن‌خلیفه و همکارانش (۴۳) بیشترین فراوانی را برای آن گزارش نمودند (۳۵/۴ درصد). اگر به دلیل آسیب ندیدن غشای پلاسمایی اسپرم عوامل اووپلاسمی در دسترس هسته اسپرم قرار نگیرند، سر اسپرم دست نخورده باقی می‌ماند و وقتی هسته اسپرم به عوامل متراکم کننده کروموزوم واکنش نشان دهد اما تخمک فعال نشده و در متافاز II متوقف باقی بماند، منجر به القای PCC می‌شود. فراوانی بالای PCC نیز ممکن است ناشی از عدم بلوغ تخمک و یا تأخیر در نفوذ اسپرم به داخل تخمکهای در حال دژنراسیون باشد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب شماره ۱۱-۴۶۴ دفتر مرکزی جهاد دانشگاهی است و محل اجرای آن، بخش تحقیقات پژوهشکده رویان بوده است. نویسندگان مراتب تقدیر خود را از آقایان دکتر مجتبی‌رضازاده و دکتر مهدی آخوندی برای دراختیار قراردادن تخمکهای لقاح نیافته و آقای باغستانی در امور آماری ابراز می‌دارند.

References

1. Ris H: A study of chromosomes with the electron microscope. J Biophys Biochem Cytol 1956; 2: 385-391

2. Abuelo JG, Moore DE: The human chromosome. Electron microscopic observations on chromatin fiber organization. J Cell Biol 1969; 41: 73-90

3. Johnson RT, Rao PN: Mammalian cell fusion: Induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. Nature, London 1970; 226: 717-722

4. Balaker H: Induction of maturation in small oocytes from sexually immature mice by fusion with meiotic or mitotic cells. Exp Cell Res 1978; 112: 137-141

5. Sunkara PS, Wright DA, Rao PN: Mitotic factors from mammalian cells induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in amphibian oocytes. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76: 2799-2802

6. Ziegler P, Masui Y: Control of chromosome behavior in amphibian oocytes I. The activity of maturation oocytes inducing chromosome condensation in transplanted brain nuclei. Dev Biol 1973; 35: 283-292

7. Masui Y, Markert CL: Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. J Exp Zool 1971; 117: 129-146

8. Murray AW, Kirschner MW: Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. Nature 1989; 339: 275-280

9. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 340: 17-18
10. Palermo G, Joris H, Derde MP; Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 1993; 59: 826-835
11. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H: High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1993; 8: 1061-1066
12. Dozortser D, Desutter P, Dhont M: Behavior of spermatozoa in human oocytes displaying no or one pronucleus after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1994; 9: 2139-2144
13. Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Matthews CD: Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1995; 10: 2623-2629
14. Schmiady H, Sperling K, Kentenich H, Stavber M: Prematurely condensed human sperm chromosomes after in vitro fertilization (IVF). Hum Genet 1986; 74: 441-443
15. Calafell JM, Badenas J, Egozcue J, Santalo J: Premature choromosome condensation as a sign of oocyte immaturity. Hum Reprod 1991; 67: 1017-1021
16. Racowsky C, Prather AL, Johnson MK, Olvera SP, Gelety TJ: Prematurely condensed chromosomes and meiotic abnormalities in unfertilized human oocytes after ovarian stimulation with and without gonadotropin-releasing hormone agonist. Fertil Steril 1997; 67: 932-938
17. Schimiady H, Kentenich H: Premature chromosome condensation after in vitro fertilization. Hum Reprod 1989; 4: 689-695
18. Zenses MT, De Geyter C, Bordt J: Abnormalities of sperm chromosome condensation in the cytoplasm of immature human oocytes. Hum Reprod 1990; 5: 842-846
19. Edirisinghe WR, Murch AR, Yovich JL: Cytogenetic and analysis of human oocytes and embryos in an in-vitro fertilization programme. Hum Reprod 1992; 7: 230-236
20. Plachot M, Crozet N: Fertilization abnormalities in human in vitro fertilization. Hum Reprod 1992; 7: 89-94
21. Schmiady H, Tandler-Schneider A, Kentenich H: Premature chromosome condensation of the sperm nucleus after intractytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1996; 11: 2239-2245
22. Tarkowski AK: An air drying method for chromosome preparations from mouse eggs. Cytogenetics 1996; 5: 394-400
23. Kamiguchi Y, Funaki K, Mikano K: A new technique for chromosome study of murine oocytes. Proc Jap Acad 1976; 52: 316-321
24. Fishel S, Dowell K, Timson J: Micro-assisted fertilization with human gametes. Hum Reprod 1993; 8: 1780-1783
25. Fishel S, Lisi F, Rinaldi L: Systematic examination of immobilizing spermatozoa before intracytoplasmic sperm injection in the human. Hum Reprod 1995; 10: 497-500
26. Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P, Dhont M: Sperm plasma membrane damage prior to intra-cytoplasmic sperm injection: a necessary condition for sperm nucleus decondensation. Hum Reprod 1995; 10: 2964-2940
27. Gerris J, Mangelschots K, Van Royen E: ICSI and severe male-factor infertility: breaking the sperm tail prior to injection. Hum Reprod 1995; 10: 481-486
28. Sousa M, Tesarik J: Ultrastractural analysis of fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1994; 6: 2374-2380
29. Sakkas D, Urner F, Bianchi PG: Sperm chromatin anormalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1994; 11: 837-843
30. Tesarik J, Sousa M, Greco E, Mendoza C: Spermatids as gametes: indications and limitations. Human Reproduction 1998; 13(3): 89-107
31. Meistrich ML: Histone and basic nuclear protein transitions in mammalian spermatogenesis. Histones and other Basic Nuclear Proteins, In Hnilica CS, Stein GS, Stein JL (eds). Boca Raton, FL, USA, 1989, pp 165-182
32. Choudhary SK, Wykes SM, Mohamed AK: A haploid expressed gene cluster exists as a single chromatin domain in human sperm. J Biol Chem 1995; 270: 8755-8762
33. Tesarik J, Kopecny V: Assembly of the nucleolar precursor bodies in human male pronuclei is correlated with an early RNA synthetic activity. Exp Cell Res 1990; 191: 153-156

34. Halleck MS, Reed JA, Lumely-Sapanski K, Schlegel RA: Injected mitotic extracts induce condensation of interphase chromatin. Exp Cell Res 1984; 153: 561-569
35. Rao PN, Adlakha RC: Chromosome condensation and decondensation factros in the life cycle of eukaryotic cells. Mediators in cell Growth and Differentiation, Ford RJ, Maizel AL (eds). New York, Raven Press, 1985, pp 45-69
36. Hirano T, Mitchison J: Cell cycle control of higher order chromatin assembly around naked DNA in vitro. J Cell Biol 1991; 115: 1479-1489
37. Kubiak JZ, Weber M, De Pennart H: The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclins B in the presence of CSF. EMBO J 1993; 12: 3773-3778
38. Swann K, Homa S, Carroll J: An inside job: the results of injecting whole sperms into eggs supports one view of signal transduction at fertilization. Hum Reprod 1994; 9: 978-980
39. Hittelman WN, Rao PN: Premature chromosome condensation. Conformational changes of chromatin associated with phytohemagglutinin stimulation of peripheral lymphocytes. Exp Cell Res 1976; 100: 219-222
40. Santalo J Badenas J, Calafell JM: The genetic risks of in-vitro fertilization techniques: The use of an animal model. J Assist Reprod Genet 1992; 9: 462-474
41. Tejada MI, Mendoza R, Corcostegui B, Benito JA: Factors associated with premature chromosome condensation (PCC) following in vitro fertilization. J Assist Reprod Genet 1992; 9: 61-67
42. Nagy ZP, Menezo Y, Janny L, Pouly JL, Qumsiyeh MB: The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. Hum Reprod 1995; 10: 1123-1129
43. Benkhalifa M, Menezo Y, Janny L, Pouly JL, Qumsiyeh MB: Cytogenetic of uncleaved oocytes and arrested zygotes in IVF programs. J Assist Reprod Genet 1996; 13: 140-148