

رابطه بین پارامترهای اسپرمی با میزان لقاح آزمایشگاهی و وضعیت کروماتین اسپرم

محمد مردانی ^{Ph.D.}، شهناز رضوی ^{M.Sc.}، محمد حسین نصرافهانی ^{Ph.D.} *

سید اسدا... کلانتر ^{M.D.}، ابراهیم اسفندیاری ^{Ph.D.} *

دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

* مرکز باروری و ناباروری اصفهان

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

چکیده

هدف: بررسی ارتباط بین پارامترهای اسپرمی به‌ویژه مرفولوژی با میزان لقاح و اختلالات کروماتین
مواد و روشها: در ۱۰۱ زوج نابارور مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان همزمان با انجام لقاح
آزمایشگاهی (IVF (In Vitro Fertilization) تست‌های ارزیابی کیفیت کروماتین (تست اکریدین اورانژ، آنیلین بلو،
کرومومایسین A₃ و مدیم دودسیل سولفات) و آنالیز سمن انجام گرفت؛ علاوه بر این با استفاده از رنگ آمیزی
پاپانیکولا ناهنجاریهای مرفولوژیک طبق معیارهای WHO تعیین شد. در هر نمونه ۲۰۰ اسپرم بررسی و درصد
رنگ پذیری در هر روش و ناهنجاریهای مرفولوژیک محاسبه شد.

یافته‌ها: بالاترین رابطه معنی‌دار با مرفولوژی اسپرم به ترتیب مربوط به روش CMA₃ (Chromomycin A₃)
و آنیلین بلو است. روش logistic regression مشخص نمود که از بین پارامترهای بررسی شده اسپرمی به ترتیب
مرفولوژی اسپرم و روش CMA₃ به طور مستقل بر لقاح تأثیر دارد؛ در حالی که از بین تست‌های ارزیابی کروماتین،
روش CMA₃ به عنوان یک فاکتور مستقل بر مرفولوژی اسپرم اثرگذار است. منحنی (ROC: Receiver
Operating Curve) نیز مؤید این نکته است که روش CMA₃ در مقایسه با آنیلین بلو از حساسیت و اختصاصی
بودن بالاتری برخوردار است.

نتیجه‌گیری: با توجه به اهمیت مرفولوژی در میزان موفقیت لقاح و قدرت تست CMA₃ در شناسایی و تمایز
مرفولوژی غیرطبیعی اسپرم پیشنهاد می‌شود که ارزیابی کروماتین به روش CMA₃ به‌عنوان یک تست تکمیلی برای
پیشگویی میزان موفقیت در لقاح آزمایشگاهی انجام شود.

کل واژگان: مرفولوژی اسپرم، کروماتین، CMA₃، لقاح آزمایشگاهی

مقدمه

غالباً قضاوت در مورد قدرت باروری بر اساس نتایج پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مرفولوژی) صورت می‌گیرد و مطالعات انجام شده حاکی از آن است که مرفولوژی اسپرم مهمترین فاکتور در تعیین میزان موفقیت در لقاح آزمایشگاهی IVF محسوب می‌شود؛ اما در اسپرمهای با مرفولوژی طبیعی وجود آنومیالیهای مخفی در کروماتین می‌تواند میزان موفقیت لقاح را کاهش دهد. با توجه به اهمیت مرفولوژی و وضعیت کروماتین در رابطه با میزان لقاح در طی مرحله اسپرمیوژن تغییرات برجسته‌ای در مرفولوژی اسپرماتید رخ می‌دهد که این تغییرات مرفولوژیک همراه با یک سری تغییرات در ترکیب پروتئینهای متصل به DNA است؛ از جمله این تغییرات قرار گرفتن پرونومین سرشار از آرژینین و سیستین به جای هیستون سوماتیک غنی از لیزین است که تراکم کروماتین را به دنبال خواهد داشت (۱). پس از آن کروماتین با تشکیل باندهای دی‌سولفید بین ریشه‌های سیستین پروتامین در طی عبور از ایمی دیدیم به‌طور نسبی پایدار می‌شود (۲) و هنگامی که اسپرم در مجاورت با Zn^{+2} موجود در ترشحات غده پروستات قرار می‌گیرد پایداری کروماتین به‌طور مطلوب حاصل می‌شود (۳). این ساختار طبیعی کروماتین علاوه بر اینکه در حفاظت از محتویات ژنتیکی DNA در مقابل عواملی چون پروتازها، نوکلئازها، دنا توره شدن DNA و کلیواژ DNA اهمیت دارد (۴، ۵) در مرفوژن طبیعی (۱۰-۷)، تسهیل در انتقال اسپرم (۱) و جلوگیری از تراکم زودرس کروماتین پس از لقاح (۶) نیز تأثیر دارد.

تحقیقات نشان می‌دهد که محتویات DNA اسپرماتوزوآ ممکن است تغییراتی را در مرفولوژی اسپرم القا نماید و شکل نهایی هسته اسپرم که در هر گونه اختصاصی است بستگی به تراکم کروماتین دارد. ساختار کروماتین در طی فرآیند اسپرمیوژن به‌طور دقیق در داخل هسته اسپرم سازماندهی می‌شود (۷، ۱۰). وجود اسپرمهای با مرفولوژی غیرطبیعی بیانگر نقص در تکمیل فرایند اسپرمیوژن است و ممکن است اختلالاتی را در بسته‌بندی و تراکم کروماتین به‌همراه داشته باشد. Evenson (۱۱) و Ballachey (۱۲) نیز اظهار داشتند که افزایش نسبت ناهنجاریهای مرفولوژیک اسپرماتوزوآ با افزایش اختلالات کروماتین در ارتباط است. برای بررسی وضعیت کروماتین روشهای متعددی وجود دارد؛ مانند روش سدیم دو سیل سولفات (SDS) که وضعیت پایداری کروماتین را بر حسب میزان باندهای دی‌سولفید مشخص می‌نماید (۱۳). روش اکریدین اورانژ، یک رنگ آمیزی فلوروسنت برای تمایز DNA سالم دو رشته‌ای از DNA دنا توره شده تک رشته‌ای است و به عنوان تست مقاومت اسپرم در مقابل دنا توره شدن مطرح می‌شود (۱۴). روش آنیلین بلو معرف میزان هیستون موجود در هسته است (۱۵). ولی روش کروموماسین A3 (GMA3) بیانگر کمبود پروتامین در هسته اسپرم است (۱۶).

در این مطالعه تمامی روشهای مذکور همزمان بر روی ۱۰۱ نمونه انجام گرفت و نتایج به‌دست آمده در رابطه با تمامی پارامترهای اسپرمی مانند مرفولوژی اسپرم بررسی شد. لازم به یادآوری است که برای ارزیابی مرفولوژی اسپرم معیارهای مختلفی وجود دارد؛ در این بررسی

معیارهای WHO (۱۷) برای تعیین ناهنجاریهای مرفولوژی استفاده شد.

مواد و روشها

۱۲۴ زوج نابارور کاندیدای IVF از بین مراجعین به مرکز باروری و ناباروری اصفهان به‌طور تصادفی انتخاب شدند. پس از جمع‌آوری مایع سمن در روز تخمک‌گیری، با استفاده از روش gradients percoll بخشی از اسپرمهای متحرک جدا شده برای مجاورسازی^۲ در لقاح آزمایشگاهی IVF به کار رفت. از باقیمانده آن برای رنگ آمیزی آنیلین بلو و اکریدین اورانژ گسترش تهیه شد.

رشد فولیکولهای تخمدان در همسر بیماران با استفاده از آگونیست GnRH^۳ و hMG^۴ تحریک و سپس وضعیت رشد فولیکولها توسط اولتراسوند ارزیابی شد و با تجویز hCG^۵ به میزان ۱۰۰۰۰ IU تخمک‌گذاری القا شد. پس از گذشت ۳۶-۳۲ ساعت از طریق تخلیه فولیکولی اووسیتها جمع آوری شدند. برای کاهش اثرهای فاکتورهای زنانه^۶ بیمارانی که کمتر از ۴ اووسیت داشته یا کیفیت اووسیت آنها نامطلوب بود، از این مطالعه حذف شدند و بدین ترتیب از ۱۲۴ نمونه بررسی شده فقط ۱۰۱ زوج در مطالعه وارد شدند. اسپرماتوزوای متحرک را در مجاورت اووسیتها قرار داده و پس از گذشت ۱۸ ساعت، وجود یا عدم وجود لقاح با توجه به تشکیل پرونوکلئوسها ارزیابی شد.

* روش رنگ آمیزی Chromomycin A3

بخشی از مایع سمن در دالبکوفسفات بافرسالین عاری از یون کلسیم و منیزیم به مدت ده دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و با تکرار این عمل اسپرمهای شسته شده در محلول متانول و اسید استیک گلاسیال به نسبت ۳:۱ به مدت ۵ دقیقه در ۴ سانتی‌گراد تثبیت شده و سپس از آن چندین اسپیر تهیه شد. برای رنگ آمیزی هر اسلاید از ۱۰۰ میکرولیتر محلول کروموماسین A3 (۲۵) / میلی گرم در یک میلی لیتر بافر مک‌الوین^۷ با pH=۷ که حاوی ۱۰ میلی مولار کلرید منیزیم است) به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. اسلایدها برای حذف رنگ اضافی در محلول بافر مک‌الوین شسته شدند و با استفاده از یک قطره بافر گلیسرول روی آنها لامل چسباندند. بررسی میکروسکوپی اسلایدها در همان روز و با فیلترهای مناسب توسط میکروسکوپ Axioplan (شرکت Zeiss - آلمان) صورت گرفت. در هر اسلاید ۲۰۰ اسپرم ارزیابی و درصد اسپرمهای رنگ گرفته (به رنگ زرد درخشان) و رنگ نگرفته محاسبه شد (۱۸).

* روش رنگ آمیزی (AO) Acridine Orange

اسپرمهای تهیه شده در محلول فیکسایتوکانونی (متانول و اسیداستیک گلاسیال به نسبت ۳:۱) به مدت ۱۴ ساعت تثبیت شدند.

- | | |
|-----------------------------------|------------------|
| 1. Sodium Dodecyle Sulfate | 6. Female factor |
| 2. Insemination | 7. MCI/IVain |
| 3. Gonadotropin Releasing Hormone | |
| 4. Human Menopausal Gonadotropin | |
| 5. human Chronic Gonadotropin | |



همبستگی تمامی پارامترها با بکدیگر ارزیابی شد. میانگین نتایج در دو گروه بارور و نابارور از طریق آزمون Student-t-test مقایسه شد. همچنین رابطه بین تستهای ارزیابی کروماتین و لقاح در رابطه با مرفولوژی از طریق logistic regression بررسی و با محاسبه مساحت زیر منحنی ROC، میزان حساسیت^۲ و اختصاصی بودن^۳ هر تست در رابطه با مرفولوژی تعیین شد.

یافته‌ها

با استفاده از جدول ۱ می‌توان دریافت که از بین پارامترهای اسپرمی، مرفولوژی بالاترین رابطه معنی‌دار با میزان لقاح را نشان می‌دهد. علاوه بر این قویترین رابطه معنی‌دار با میزان لقاح مرفولوژی سر اسپرم است. با استفاده از معیارهای WHO درصد انواع ناهنجاریهای مرفولوژیک سراسپرم مشخص شد که به ترتیب ناهنجاریهای سرآمورف، سرکشیده، گلابی شکل و سرکروی با میزان لقاح رابطه دارد. در این بررسی میانگین تعداد اووسیت و لقاح به ترتیب ۱۲/۸ و ۵۶/۹ بود.

جدول ۱: رابطه بین پارامترهای اسپرمی و میزان لقاح

پارامترهای اسپرمی (برصد)	r	Pvalue
غلظت اسپرم ($\times 10^6/ml$)	۰/۸۹۰	N.S.
تحرك اسپرم	۰/۱۹۶	<۰/۰۵
حرکت پیشرونده	۰/۱۹۸	<۰/۰۵
کل ناهنجاریهای مرفولوژیک	-۰/۶۶۵	<۰/۰۱
ناهنجاریهای مرفولوژیک سر	-۰/۷۸۰	<۰/۰۱
سرآمورف	-۰/۴۴۵	<۰/۰۱
سرکشیده گلابی شکل	-۰/۴۵۱	<۰/۰۱
سرکروی	-۰/۳۵۷	<۰/۰۱
ماکروسفال	-۰/۳۶۳	<۰/۰۱
میکروسفال	-۰/۲۸۰	<۰/۰۱
سردونایی	-۰/۱۴۱	N.S.
سرسوزنی شکل	-۰/۰۰۳	N.S.
ناهنجاریهای مرفولوژیک گردن	-۰/۲۱۶	<۰/۰۵
ناهنجاریهای مرفولوژیک دم	-۰/۳۷۲	<۰/۰۱

N.S.: Non Significant

جدول (۲) نشان می‌دهد که تستهای کروماتین A3 و آنیلین بلو به ترتیب بالاترین رابطه معنی‌دار را با مرفولوژی اسپرم دارد. این دو روش با غلظت اسپرم نیز رابطه دارد در حالی که هیچ‌یک از روشهای ارزیابی کروماتین با تحرک اسپرم رابطه معنی‌داری نشان نمی‌دهد. سایر تستهای ارزیابی کروماتین (SDS، اکریدین اورانژ و آنیلین بلو) با هیچ‌یک از پارامترهای اسپرمی از لحاظ آماری رابطه ندارد. با استفاده از مدل logistic regression مشخص شد که از بین تمامی پارامترهای مورد

سپس تعدادی از اسلایدها توسط ۲-۳ سی سی محلول اکریدین اورانژ ۰/۱۹ درصد در بافر فسفات با $pH=2/5$ به مدت ده دقیقه رنگ آمیزی و رنگ اضافی با شستشو در آب جاری حذف شد. اسلایدها در طی همان روز با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت Axioplan (شرکت Zeiss - آلمان) و با فیلترهای مناسب بررسی شد. با شمارش ۲۰۰ عدد اسپرم در هر اسلاید، درصد اسپرمهای با DNA طبیعی (سبز رنگ)، با DNA دناتوره (قرمز رنگ) و حالت حد واسط (زرد رنگ) ثبت شد (۱۴).

باقیمانده اسلایدها را قبل از رنگ آمیزی در محلول (۸۰ میلی مولار اسید سیتریک + ۱۵ میلی مولار NaH_2PO_4 با $pH=2/5$) در حرارت ۸۷ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده و سپس مراحل رنگ آمیزی و بررسی مطابق دستورالعمل فوق انجام شد. در این روش با استفاده از شوک حرارتی، میزان مقاومت سلولها نسبت به دناتوره شدن توسط گرما بررسی شد (۱۹).

* روش رنگ آمیزی (AB) Aniline Blue

اسمیرهای تهیه شده در گلو تار آلدئید ۳ درصد در بافر فسفات ۰/۲ مولار با $pH=7$ به مدت ۳۰ دقیقه تثبیت شد و سپس توسط محلول آنیلین بلو ۵ درصد در بافر فسفات با $pH=3/5$ به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شد. اسلایدها با استفاده از میکروسکوپ نوری (Zeiss - آلمان) توسط عدسی شیئی $\times 100$ ارزیابی شد. در هر اسلاید ۲۰۰ عدد اسپرم بررسی و از لحاظ شدت رنگ پذیری درصد سلولهای رنگ گرفته و رنگ نگرفته محاسبه شد (۱۵).

* روش SDS

۵۰ میکرولیتر از مایع سمن را با ۳۵۰ میکرولیتر محلول SDS یک درصد در بورات بافر ۵ درصد با $pH=9$ به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اطاق قرار داده و سپس ۴۰۰ میکرولیتر گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد به آن اضافه نموده تا از روند واکنش جلوگیری شود و اسپرمها تثبیت شوند. پس از تهیه اسمیر از این محلول و رنگ آمیزی آن با آنیلین بلو (طبق دستورالعمل مذکور)، در هر اسلاید ۲۰۰ عدد اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری (Zeiss - آلمان) و توسط عدسی شیئی $\times 100$ برای بررسی اندازه^۱ (NCD) ارزیابی شد (۱۳).

* روش رنگ آمیزی Papanicolaou

برای بررسی مرفولوژی اسپرم طبق دستورالعمل WHO از رنگ آمیزی پاپانیکولا استفاده شد (۱۷) و درصد ناهنجاریهای مختلف مانند ناهنجاریهای سر اسپرم که عبارتند از سرهای آمورف، کروی، دونایی، سرسوزنی شکل، میکروسفال، ماکروسفال، سرکشیده و گلابی شکل به طور مجزا محاسبه شد. همچنین سایر پارامترهای اسپرمی (غلظت و تحرک) با استفاده از معیارهای WHO تعیین شد (۲۰).

* روشهای بررسی آماری

نتایج حاصله با استفاده از نرم افزار SPSS-9 بررسی و ضریب

1. Nuclear Chromatin Decondensation
2. Sensitivity
3. Specificity

اختصاصی بودن ۷۵ درصد) برتری دارد (نمودار ۱).

بحث

اگرچه Bartoov (۳۱) دریافت که مرفولوژی طبیعی اسپرم به تنهایی برای پیش‌بینی قدرت باروری مرد کافی نیست، اما در اغلب مطالعات انجام گرفته مرفولوژی اسپرم به‌عنوان یک شاخص مهم در تعیین میزان موفقیت لقاح آزمایشگاهی (IVF) مطرح می‌شود (۲۴-۲۱). اخیراً ارزش کلینیکی مرفولوژی اسپرم در رابطه با تشخیص ناباروری در بین عده‌ای از دانشمندان مورد بحث است (۳۲-۳۴).

در مرحله اسپرمیوزن علاوه بر تغییرات مرفولوژیک تغییراتی در محتویات پروتئینی کروماتین نیز صورت می‌گیرد و با قرار گرفتن پروتئین به‌جای هیستون، تراکم کروماتین مشاهده می‌شود. در واقع اسپرم با ناهنجاری مرفولوژیک نشانه‌ای از نقص در تکمیل روند اسپرمیوزن است و هرگونه نقص در مرفولوژی اسپرم می‌تواند با اختلالات بسته‌بندی کروماتین در ارتباط باشد (۹، ۱۰، ۲۴). با توجه به اینکه بسیاری از تحقیقات نشان می‌دهد که اختلالات کروماتین در هسته اسپرم با قدرت باروری فرد در ارتباط است (۱۲، ۲۵، ۲۶، ۲۷)، از طرف دیگر، روشهای متعددی برای ارزیابی کیفیت کروماتین وجود دارد؛ در این تحقیق رابطه تمامی روشهای معمول در ارزیابی کروماتین با پارامترهای اسپرمی مانند مرفولوژی بررسی و مشخص شد که بالاترین رابطه معنی‌دار در ارتباط با مرفولوژی به ترتیب مربوط به CMA3 و آنیلین‌بلو است. از آنجاکه هر یک از روشهای ارزیابی کروماتین اختصاصی عمل می‌کند به‌طوری که روش CMA3 بیانگر کمبود پروتئین و آنیلین‌بلو معرف هیستون موجود در هسته است؛ از نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان دریافت که غالباً اختلالات مرفولوژیک اسپرم در رابطه با اختلال در تراکم و بسته‌بندی کروماتین است. همچنین در بررسی که Franken و همکارانش در سال ۱۹۹۹ (۱۰) بر روی بیماران تحت درمان به روش ICSI انجام دادند، مشخص شد که روش CMA3 ($r=0/4, P<0.001$) و آنیلین‌بلو ($r=0/33, P<0.001$) به‌ترتیب با مرفولوژی اسپرم ارتباط دارد. علاوه بر آن، با استفاده از منحنی ROC مشخص نمود که روش CMA3 با حساسیت ۷۵ درصد و اختصاصی بودن ۸۲ درصد در مقایسه با آنیلین‌بلو با حساسیت ۶۰ درصد و اختصاصی بودن ۹۰ درصد در تمایز ناهنجاریهای مرفولوژیک قوی‌تر عمل می‌نماید. یافته‌های حاصل از بررسیهای حاضر نیز با این نتایج مطابقت دارد و علاوه بر آن نشان می‌دهد که مرفولوژی سر اسپرم به‌طور مستقل، میزان لقاح را تحت تأثیر قرار می‌دهد و تست CMA3 نیز به‌طور مستقل بر میزان لقاح و مرفولوژی اسپرم مؤثر است.

نتایج حاصل از تحقیقات Esterhuizen و همکارانش در سال ۲۰۰۰ نشان می‌دهد که ارزش CMA3 در رابطه با میزان لقاح به طریق IVF ($r=0/5, P<0.001$) و مساحت زیر منحنی ROC در رابطه با مرفولوژی ۸۶٪ است (۳۶)؛ در حالی که در این بررسی ضریب همبستگی بین CMA3 و میزان لقاح ($r=0/56, P<0.001$) و مساحت زیر منحنی ROC در رابطه با مرفولوژی ۷۶٪ است.

بررسی به ترتیب مرفولوژی اسپرم ($P<0.001$) و CMA3 ($P<0.04$) به‌عنوان فاکتورهای مستقل بر میزان لقاح تأثیر دارد؛ در حالی که از بین تمامی روشهای ارزیابی کروماتین فقط تست CMA3 به‌عنوان یک فاکتور مستقل بر مرفولوژی اسپرم تأثیر دارد ($P<0.001$).

جدول ۲: رابطه بین تستهای ارزیابی کیفیت کروماتین اسپرم و پارامترهای اسپرمی

پارامترهای اسپرمی (درصد)	CMA3 $r(p)$	AB $r(p)$	SDS $r(p)$	Ao $r(p)$	Ao+heat $r(p)$
غلظت اسپرم ($\times 10^6/ml$)	۰/۲۳۶ ^{**}	۰/۲۳۳ ^{**}	۰/۱۹۰	۰/۰۰۹	۰/۰۶۴
تحرک اسپرم	۰/۱۵۰	۰/۰۰۹	۰/۰۵۳	۰/۰۳۷	۰/۰۱۳
حرکت پیشرونده	۰/۱۳	۰/۰۰۸	۰/۲۳۰ ^{**}	۰/۱۰۳	۰/۰۵۹
مرفولوژی اسپرم	-۰/۵۲۴ ^{**}	-۰/۳۸۴ ^{**}	-۰/۱۵۵	-۰/۰۳۳	۰/۰۳۳

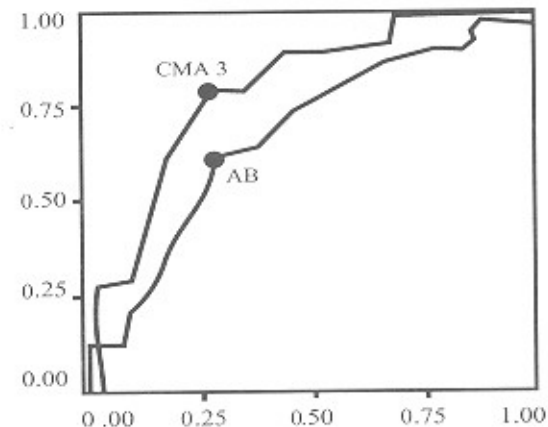
* $P<0.05$, ** $P<0.01$

افراد مورد مطالعه در این تحقیق به دو گروه بارور (لقاح بیش از صفر) و نابارور (لقاح برابر صفر) تفکیک شدند و میانگین ناهنجاریهای مرفولوژیک در این دو گروه بررسی شد. جدول ۳ نشان می‌دهد که اختلاف میانگین ناهنجاریهای سرآمورف، سرکروی، کشیده و گلایی شکل در دو گروه معنی‌دار است.

جدول ۳: اختلاف میانگین ناهنجاریهای مرفولوژیک اسپرم بر دو گروه بارور و نابارور

پارامترهای اسپرمی (درصد)	لقاح‌دار Mean \pm SD	بدون لقاح Mean \pm SD	Pvalue
تعداد	۹۲	۹	-
لقاح	۶۲/۸۳ \pm ۲۵	-	۰/۰۰۱
ناهنجاریهای مرفولوژیک	۴۲/۵۴ \pm ۸	۵۲/۱۱ \pm ۷	۰/۰۰۱
ناهنجاری مرفولوژیک (سر)	۳۹/۲ \pm ۹	۵۱/۳ \pm ۷	۰/۰۲۲
ناهنجاری سرآمورف	۱۳/۵ \pm ۵	۲۰/۰ \pm ۵	۰/۰۶۰
ناهنجاری سرکروی	۲/۱۵ \pm ۲	۴/۷۷ \pm ۲	۰/۰۵۴
سر کشیده و گلایی شکل	۱۴/۲۰ \pm ۵	۱۹/۲۲ \pm ۶	۰/۰۱۵

با استفاده از نتایج آنالیز ROC برای تعیین قدرت تمایزی بلوغ هسته به روشهای CMA3 و آنیلین‌بلو در شناسایی مرفولوژی



نمودار ۱: مقایسه منحنی ROC تستهای CMA3 و آنیلین‌بلو در رابطه با مرفولوژی اسپرم

غیرطبیعی، مشخص شد که تست CMA3 با حساسیت ۸۰ درصد و اختصاصی بودن ۷۲ درصد نسبت به آنیلین‌بلو (حساسیت ۶۲ درصد و

جایگزینی با پروتئین باشد.

در این بررسی از بین ناهنجاریهای مرفولوژیک سر اسپرم، ناهنجاریهای سر آمورف و کروی به طور مستقل با روش CMA3 رابطه دارد؛ در حالی که روش آنیلین بلو فقط با ناهنجاری سر آمورف به طور مستقل مرتبط است. همچنین اختلاف میانگین ناهنجاریهای سر آمورف، کروی، کشیده و گلابی شکل بین دو گروه بارور و نابارور معنی دار بود. Baccetti در این باره گزارش کرد که اسپرمهای با سر کروی در طی مورفوزنر دچار تغییراتی در تراکم کروماتین می شوند (۲۹).

بیانچی (۱۶) نیز گزارش نموده که ۷۵ درصد از ماکروسفالها و ۵۰ درصد از سلولهای آمورف، CMA3 مثبت هستند. همچنین آقای گلشن ایراتور (۳۵) اظهار داشت که افزایش سلولهای آمورف، ماکروسفال و مجموع آنها با افزایش درصد سلولهای رنگ گرفته توسط CMA3 همراه است. به عبارتی با افزایش نسبت هر یک از ناهنجاریهای مرفولوژی می توان افزایش در نقابص بسته بندی و تراکم کروماتین را انتظار داشت.

در این تحقیق علاوه بر مرفولوژی اسپرم ارتباط اختلالات کروماتین با پارامترهای غلظت و تحرک اسپرم بررسی و مشخص شد که هر دو روش CMA3 و آنیلین بلو با غلظت اسپرم رابطه مثبت دارند در حالی که با تحرک اسپرم هیچ گونه رابطه معنی داری ندارند. این یافته ها در نتایج حاصل از تحقیقات Lolis (۱۸) نیز بدست آمده است. تفاوت در نتایج حاصل از بررسی انجام شده در مقایسه با سایر مطالعات می تواند مربوط به حجم نمونه، نحوه در مان بیماران (IVF-ICSI) و معیارهای مورد نظر در بررسی مرفولوژی اسپرم (WHO-Strict Criteria) باشد (۲۰، ۳۰).

با توجه به اهمیت مرفولوژی در میزان موفقیت لقاح و قدرت تست CMA3 در شناسایی و تمایز مرفولوژی غیر طبیعی اسپرم پیشنهاد می شود که ارزیابی کروماتین به روش CMA3 به عنوان یک تست تکمیلی برای پیشگویی میزان موفقیت در لقاح آزمایشگاهی انجام گیرد.

همچنین Bianchi (۱۶) در سال ۱۹۹۳ گزارش کرد که اسپرماتوزوآهای با مرفولوژی طبیعی ممکن است دارای حالتی غیر طبیعی مخفی در کروماتین باشند که در طی پروتئین شدن کروماتین ایجاد شده و قدرت باروری اووسیت را محدود می کند. وی معتقد بود که رنگ آمیزی CMA3 را می توان به عنوان یک تست مناسب برای شناسایی اسپرمهای دارای آنومالیهای غیر طبیعی مخفی و با مرفولوژی طبیعی به کار برد. نتایج حاصل از تحقیقات Lolis (۱۸) نیز تأیید کننده این مطلب است. یکی دیگر از روشهایی که با مرفولوژی اسپرم رابطه دارد روش آنیلین بلو است که معرف میزان هیستون در هسته است. به عبارت دیگر؛ این تست بیانگر باقیماندن هیستون در هسته و عدم جایگزینی توسط پروتئین است.

Silverstroni و همکارانش (۲۸) اظهار داشتند که احتمالاً باقیماندن هیستونهای سوماتیک و عدم تشکیل باندهای عرضی دی سولفید، مهمترین عاملی است که می تواند موجب اختلال در مرفولوژی و عملکرد سر اسپرم شود.

Hammadeh و همکارانش در سال ۱۹۹۸ اظهار داشتند که ارزیابی کروماتین به روش آنیلین بلو تست مناسبی برای پیشگویی میزان لقاح است و استفاده از این روش را همراه با مرفولوژی اسپرم در بیماران IVF توصیه نمودند (۹).

اگر چه این روش نیز بیانگر اختلالات در فرایند بلوغ اسپرماتید در طی مرحله اسپرمیوزنر است؛ اما با توجه به موارد زیر ارزیابی کروماتین به روش CMA3 نسبت به آنیلین بلو برتری دارد:

۱) فقط روش CMA3 به عنوان یک فاکتور مستقل بر مرفولوژی اسپرم تأثیر دارد؛

۲) با توجه به منحنی ROC، این روش در مقایسه با آنیلین بلو از حساسیت و اختصاصی بودن بالاتری برخوردار است؛

۳) CMA3 معرف کمبود پروتئین در هسته است که این کمبود ممکن است ناشی از باقیماندن هیستون در هسته یا برداشته شدن هیستون بدون

References

1. Balhorn RA: Modele for the structure of chromatin in mammalian sperm. J cell Boil 1982; 93: 298-305
2. Bedford JM, calvin H, cooper GW: The maturation of spermatozoa in the human epididymis. J Repord Fertil 1973; 18: 199-213
3. Kvist U, Kjellberg S, Bjorndahl L, Soufir JC, Arver S: Seminal fluid from men with agenesis of the wolffian ducts: Zinc-binding Prperties and effects on sperm chromatin stability. Int J Androl 1990; 13: 245-252
4. Marushig Y, Marushig K: Enzymatic unPacking of bull sperm chromaton. J Biophys Acta 1975; 403: 180-191
5. Karmmer J, krawctz S: Nuclear matrix interactions tithin the sperm genome. J Biol chem 1996; 24: 11619-11622

6. Johnson RT, Rao PN, Mammalian cell Fusion: Induction of premature chrom- osone condensation in interphase nuclei. Nature 1970; 226: 717-722
7. Fawcett DW, Anderson WA, Phillips DM: Mrophgenic factors influencing the shape of sperm head. Dev Biol 1971; 26: 220-251
8. Meistrich ML, Reid BO, Barcellona WJ: Changes in sperm nuclei during spermato- genesis and epididymal maturation. Exp cell Res 1976; 19: 72-78
9. Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G and schmidt W: Association between sperm cell chromatin condenstion, morphology based on strict criteria and fertilization cleavage and Pregnancy rates in an IVF Program. J Androl 1998; 30: 29-35
10. Franken DR, Franken CJ, de la Guerre H, Devillier S: Normal sperm morphology and chromatin

- Packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A₃ staining. *J Androl* 1999; 31: 361-366
11. Evenson DP, Klein FA, Whitmore WF, Melamed MR: Flow cytometric evaluation of semen from patients with testicular carcinoma. *J Urol* 1984; 132: 1220-1225
 12. Ballachey BE, Hohenbken WD, Evenson DP: Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *J Biol Reprod* 1987; 36: 921-925
 13. Gopalkrishnan K, Hinduja IN, Anand kumar Tc: In vitro decondensation of nuclear chromatin of human spermatozoa: Assessing Fertilizing Potential. *Arch Androl* 1991; 27: 43-50
 14. Tejada RI, Mitchell JC, Noman A: A Test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (Ao) Fluorescence. *Fertil Steril* 1984; 42: 87-91
 15. Terquem A, Dadoune JP: Aniline blue staining of human spermatozoa chromatin. Evaluation of nuclear maturation. *J sperm cell* 1983; 249-252
 16. Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzar D, Bianchi U, Sakkas D: Effect of deoxyribonucleic acid protamination of fluorochrome staining and in situ nick translation of murine and human spermatozoa. *Biol Reprod* 1993; 49: 1083-1088
 17. World health organization. WHO laboratory Manual for the examination of human semen and semen - cervical mucus Interaction. 3ed. Cambridge university press, Cambridge, 1992
 18. Lolis D, Georgiou I, Syrrou M, Zikopoulos K: Chromomycin A₃ staining as an indicator of protamine deficiency and fertilization. *Int Androl* 1996; 19: 23-27
 19. Duran EH, Gurgon T, Gunaple S: A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1998; 13(39): 1235-1239
 20. Comhaire Fc, Vermeulen L: Human semen analysis. *Hum Reprod* 1995; 1: 343-362
 21. Jeulin C, Feneux D, Serres C, Jouannet P, Guillet-Rosso F, Belaisch-Allart J, Frydman R, Testart J: Sperm Factors related to Failure of human in vitro fertilization. *J Reprod Fertil* 1986; 76: 735-744
 22. Liu Dy, Lopata A, Johnson WI, Baker HW: Human sperm Zona binding, sperm characteristics and in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1989; 4: 696-701
 23. Baker HW, Liu Dy, Bourme H, Lopata A: Diagnosis of sperm defects in selecting patients for assisted fertilization. *Hum Reprod* 1993; 8: 177-178
 24. Angelopoulos T, Yaron A, Moshel BSC: Condensation and morphology before and after separation procedures: effect on the clinical outcome after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998; 69: 740-747
 25. de Yebra L, Bullesca JL, Vanrell JA, Bassas L, Oliva R: Complete selective absence of protamine 2 in humans. *J Biol Biochem* 1993; 268: 10553-10557
 26. Janny L, Menezo YJR: Evidence for a strong paternal effect of human preimplantation embryo development and blastocyst. Formation. *Mol Reprod Dev* 1994; 38: 36-42
 27. Ibrahim ME, Pederson J: Acridine orange Fluorescence as male fertility test. *Arch Androl* 1988; 20: 125-129
 28. Silverstroni L, Frajese G, Fabrizio M: Histones instead of Protamines in terminal germ cells of infertile, oligospermic men. *Fertil Steril* 1976; 27: 1428-1437
 29. Baccetti T, Renieri F, Rosati MG: Further observation in the morphogenesis of the rounded-headed spermatozoa. *Andrologia* 1977; 8: 1779-1780
 30. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S: Prediction value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988; 48: 112-117
 31. Bartoov B, Elters F, Pansky M, Lederman H, Caspi E, Soffer Y: Estimating fertility Potential via semen analysis. *Hum Reprod* 1993; 8: 65-70
 32. Aitken J, Baker HWG, Irvine Ds: On the nature of semen quality and fertility. *Hum Reprod* 1995; 10: 247-248
 33. Barrat CLR: On the accuracy and clinical value of semen laboratory tests. *Hum Reprod* 1995; 10: 250-252
 34. Oehninger S, Kruger T: The diagnosis of male infertility by semen quality. Clinical significance of sperm morphology assessment. *Hum Reprod* 1995; 10: 1037-1038
 35. Iranpour FG, Nasr-Esfahani MH, Valojerdi MR, al-Taraihi TM: Chromomycin A₃ staining as a useful tool for evaluation of male fertility. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17(1): 60-66
 36. Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JGHL, Prinsloo E, Van Rooyen LH: Sperm chromatin Packaging as an indicator of in-vitro fertilization rates. *Hum Reprod* 2000; 15: 657-661

