اثر گلوتاتیون بر نامتراکم شدن کروماتین هسته اسپرم انسان

محسن سقا M.Sc.☆♦، محمدحسین نصراصفهانی Ph.D.★، مجتبی رضازاده Ph.D.★

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

★ دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه جنین‌شناسی و پژوهشکده رویان

★ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح و پژوهشکده رویان

♦آدرس مکاتبه: اردبیل، خیابان راه دانشگاه، بالاتر از دریاچه شورابیل، کدپستی ۵۶۱۹۷

چکیده

* **هدف:** بررسی تأثیر غلظتهای مختلف گلوتاتیون بر میزان نامتراکم شدن کروماتین اسپرم انسان

* **مواد و روشها:** پس از تهیه و آنالیز نمونه مایع منی، رسوب اسپرمی دوبار با محیط کشت Ham's F-10 شستشو و پس از آن محلول اسپرمی به دوگروه غیرشستشو و شستشو تقسیم شدند که در هر یک از این گروهها ۱۰۰ میکرولیتر از محلول اسپرمی در معرض ۱۰۰ میکرولیتر از غلظتهای مختلف گلوتاتیون ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌مولار قرار گرفت که هر یک از این غلظتها طی زمانهای ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه بر اسپرم تأثیر داده شدند. در گروه کنترل به‌جای گلوتاتیون از محیط کشت Ham's F-10 استفاده شد. در نهایت با استفاده از روش سدیم دودسیل سولفات میزان نامتراکم شدن کروماتین اسپرمها مطالعه شد.

* **یافته‌ها:**

گروه غیر شستشو: در این گروه غلظتهای ۱ تا ۱۰ میلی‌مولار گلوتاتیون تأثیر چندانی بر کروماتین اسپرم نداشتند و غلظتهای ۱۵ و ۲۰ میلی‌مولار تأثیر بهتری را بر کروماتین اسپرم نشان دادند. گلوتاتیون بهترین تأثیرش را در این گروه در غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی‌مولار نشان داد.

گروه شستشو: در این گروه، غلظتهای ۱ تا ۵ میلی‌مولار گلوتاتیون تأثیر ضعیفی را بر میزان نامتراکم شدن هسته اسپرم نشان دادند؛ در حالی که در غلظت ۲۰ میلی مولار اختلاف معنی داری با گروه کنترل مشاهده شد ($P<0.05$). در غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی مولار نیز بهترین تأثیر گلوتاتیون بر کروماتین اسپرمها دیده شد.

* **نتیجه‌گیری:** گلوتاتیون قادر است در محیط آزمایشگاهی سبب القای نامتراکم شدن اسپرمها شود که این تأثیر گلوتاتیون وابسته به غلظت بوده و در غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی‌مولار، این عدم تراکم بیشتر است. همچنین گلوتاتیون قادر است با عبور از غشای پلاسمایی نامتراکم شدن کروماتین اسپرمها را سبب شود و چنانچه بر اسپرمهایی که از کروماتین بسیار پایداری برخوردار هستند تأثیر داده شود ممکن است درصد لقاح را افزایش دهد.

گل واژگان: لقاح، گلوتاتیون، نامتراکم شدن کروماتین اسپرم

مقدمه

محققان تاکنون پارامترهای مختلفی را برای علل نازایی در مردان ذکر کرده‌اند که از آن جمله می‌توان به کاهش تعداد اسپرمها، غیرطبیعی بودن مرفولوژی اسپرم، کاهش قدرت تحرک آن، و غیرطبیعی بودن حجم، رنگ، pH، قوام مایع منی و... اشاره کرد. یکی از مهمترین علت نازایی مربوط به وضعیت پایداری کروماتین هسته اسپرم است (۱).

در شرایط طبیعی طی فرایند اسپرمیوژنز، مولکولهای پروتئینی کوچکی به‌نام پروتامینها جای هیستونهای متصل به DNA سلول اسپرماتید را گرفته و ۸۵ درصد از ساختمان نوکلئوپروتئینی اسپرمها را تشکیل می‌دهند که این امر سبب متراکم شدن[1] بیشتر کروماتین اسپرم می‌شود. ۱۵ درصد بقیه نوکلئوپروتئینها را هیستونها تشکیل می‌دهند (۲).

سپس در طی عبور اسپرم از اپی‌دیدیم به علت وجود اسید آمینه سیستئین (Cys) در ساختمان مولکول پروتامین بین این مولکولها پیوندهای دی‌سولفیدی به‌وجود می‌آید که این عمل سبب پایداری کروماتین متراکم شده اسپرم می‌شود (۳). تصور بر این است که اکسیداسیون گروههای تیولی (-SH) Cys در حفاظت کروماتین از اتولیز در دستگاه تناسلی ماده نقش مهمی دارد (۴)؛ از طرف دیگر بین همه گروههای تیولی مربوط به Cys پروتامینها پیوندهای دی‌سولفیدی به‌وجود نمی‌آید، بلکه تعدادی از این گروههای تیولی به Zn^{+} رها شده از پروستات متصل شده و بدین ترتیب از پایداری بیش از حد کروماتین اسپرم که می‌تواند یکی از عوامل مهم نازایی باشد جلوگیری می‌شود (۵، ۶).

در طی لقاح، هسته اسپرم نامتراکم شده و به پیش هسته نر تبدیل می‌شود (۷). بررسیهایی که با تزریق اسپرمها به درون تخمک (ICSI)[2] صورت گرفته نشان می‌دهد که احیای پیوندهای دی سولفیدی بین مولکولهای پروتامین برای نامتراکم شدن کروماتین اسپرم (NCD)[3] و تشکیل پیش هسته نر لازم است. مطالعات نشان می‌دهد که در محیط آزمایشگاهی دی‌تیوتریتول (DTT)[4] و (EDTA)[5] می‌توان (NCD) را در اسپرم القاء نمود. DTT باعث احیای پلهای دی‌سولفیدی گروه تیول در پروتئینها می‌شود و EDTA یک Zn کیلاتور است (۸، ۹). گلوتاتیون (GSH)، تیول آزاد و اصلی داخل سلولی، نقش مهمی در احیای پیوندهای دی سولفیدی بین مولکولهای پروتامینی و نامتراکم کردن کروماتین هسته اسپرم دارد (۷، ۱۰، ۱۱).

امروزه تکنیک ICSI جایگزین تکنیکهای قدیمی درمان نازایی نظیر SUZI و PZD شده است (۱۲، ۱۳). در این تکنیک چون اسپرم با غشای پلاسمایی سالم به درون تخمک تزریق می‌شود وجود کروماتین بسیار متراکم و غشای پلاسمایی در سر اسپرم تزریق شده به داخل تخمک ممکن است دلیلی برای کاهش درصد لقاح در فرایند ICSI باشد.

بنابراین تسهیل در فرآیند NCD در محیط آزمایشگاهی قبل از ICSI ممکن است با شکسته شدن پیوندهای دی سولفیدی بین مولکولهای پروتامینی اسپرمهای بسیار متراکم باعث افزایش درصد لقاح شود و NCD اسپرم قبل از ICSI توسط گلوتاتیون که یک عامل احیاء کننده پیوندهای دی سولفیدی است؛ ممکن است شانس تشکیل پیش هسته نر و درصد لقاح را افزایش دهد، به همین دلیل در تحقیق حاضر، تأثیر گلوتاتیون در محیط *in vitro* بر هسته اسپرم بررسی شد.

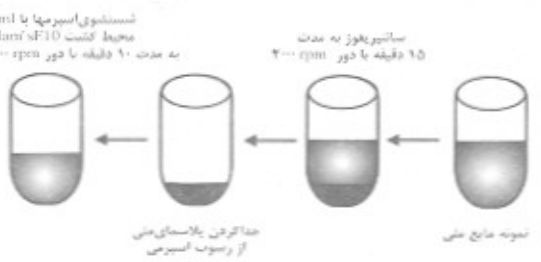
مواد و روشها

* تهیه نمونه مایع منی

نمونه مایع منی از افردی که به مدت ۷-۳ روز از مقاربت با همسر خویش خودداری کردند به دست آمده و در دمای معمولی اتاق پس از گذشت ۳۰-۲۰ دقیقه از حالت لخته درآمد و آبکی شد؛ سپس نمونه‌ها از نظر تعداد، میزان تحرک و مرفولوژی اسپرم، pH، ویسکوزیته و سایر پارامترهای آنالیز مایع منی بررسی شدند و فقط نمونه‌هایی که شاخصهای فوق را مطابق با سازمان جهانی بهداشت (WHO) در حد طبیعی دارا بودند برای انجام آزمایش انتخاب شدند.

* تأثیر گلوتاتیون بر اسپرم

ابتدا نمونه مایع منی به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰rpm سانتریفوژ شد تا پلاسمای منی از رسوب اسپرمی جدا شود، آنگاه این رسوب اسپرمی با محیط کشت Ham's F-10 دوبار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰rpm سانتریفوژ شستشو شد (دیاگرام ۱).

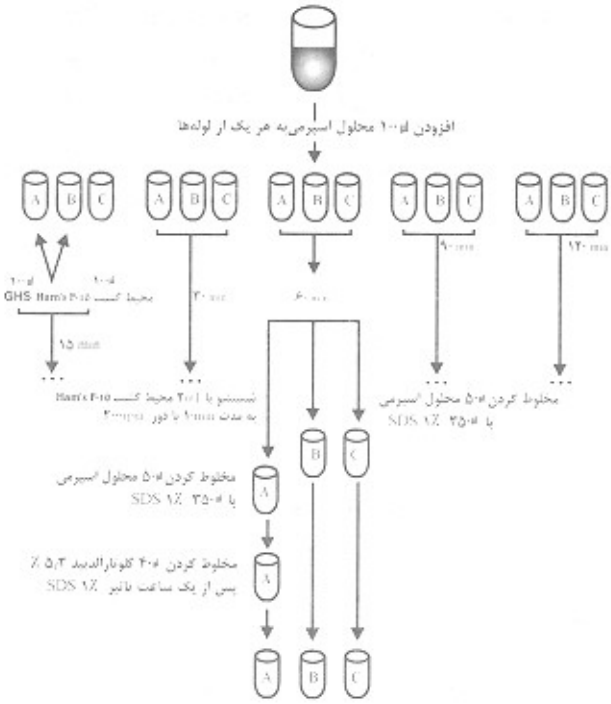


دیاگرام ۱: نحوهٔ تهیه محلول اسپرمی شسته شده از نمونه مایع منی

پس از شستشو ۱۰۰ میکرولیتر از محلول اسپرمی در معرض ۱۰۰ میکرولیتر از غلظتهای مختلف گلوتاتیون (۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۴۰، ۸۰ میلی‌مولار) قرار گرفت. گلوتاتیون در هر یک از غلظتهای فوق طی زمانهای ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه بر اسپرم تأثیر داده شد (دیاگرام ۲). در گروه کنترل به ۱۰۰ میکرولیتر محلول اسپرمی، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت Ham's F-10 اضافه شد (لوله C). محلولهای اسپرمی که به آنها گلوتاتیون اضافه شد به دو گروه تقسیم شدند: در گروه اول (لوله B) به ۵۰ میکرولیتر از محلول اسپرمی، ۳۵۰ میکرولیتر، سدیم دودسیل سولفات (SDS)[6] یک درصد حل شده در محلول بورات بافر ۰/۰۵ مولار (pH=۹) اضافه شد. این گروه به‌عنوان گروه غیر شستشو در نظر گرفته شد؛ در حالی که در گروه دوم (لوله A)

1. Condensation
2. Intra Cytoplasmic Sperm Injection
3. Nuclear Chromatin Decondensation
4. Dithiotheritol
5. Ethylenediamine Tetraacetic Acid
6. Sodium Dodecyle Sulfate

قبل از افزودن SDS یک درصد محلول اسپرم حاوی گلوتاتیون توسط محیط کشت Ham's F-10 به مدت ۱۰ دقیقه شستشو شد و بعد از شستشو به SDS ۱ درصد اضافه شد این گروه به‌عنوان شستشو در نظر گرفته شد. در گروه کنترل نیز به ۵۰ میکرولیتر از محلول اسپرمی، ۳۵۰ میکرولیتر SDS یک درصد اضافه شد (دیاگرام ۲).



دیاگرام ۲: نحوهٔ تأثیر غلظت ثابتی از گلوتاتیون در طی زمانهای مختلف

A= گروه شستشو (W)، B= گروه غیرشستشو (NW) و C= گروه کنترل. برای سهولت فقط یک گروه سه‌تایی از لوله‌های A، B و C نشان داده شده‌اند که به آنها SDS یک درصد و گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد اضافه شده است. W=Wash، NW=NonWash، C=Control

پس از افزودن SDS یک درصد به هر سه گروه فوق (کنترل، شستشو و غیرشستشو) پس از یک ساعت به همه آنها ۴۰۰ میکرولیتر گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد حل شده در بورات بافر ۰/۰۵ مولار (pH=۹) اضافه شد. سپس یک قطره از محلول اسپرمی هر یک از گروههای فوق روی لام قرار گرفته و پس از رنگ‌آمیزی پاپانیکولا روی آن با لامل پوشانده شد.

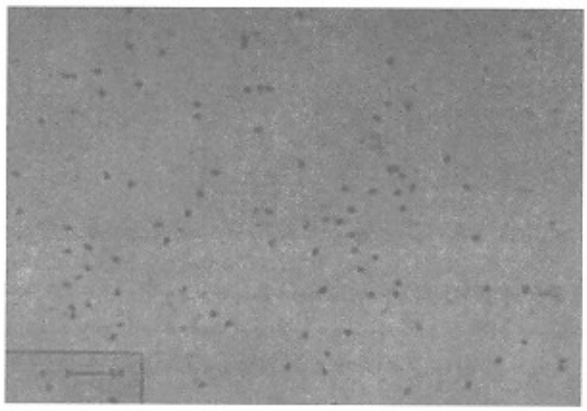
در این رنگ‌آمیزی، گسترشهای تهیه شده پس از تثبیت در محلولی با حجمهای مساوی اتانول ۹۵ درصد واتر به مدت ۵ تا ۱۵ دقیقه با درجات نزولی الکل آبدهی شده و پس از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین به کمک درجات صعودی الکل آبگیری به‌عمل آمد. پس از آن گسترشها با محلول اورنج G و سپس محلول EA-50 رنگ‌آمیزی شدند (۱۴). پس از رنگ‌آمیزی ۱۰۰ اسپرم از هر قطره با بزرگنمایی ۴۰۰× میکروسکوپ نوری مطابق روش زیر درجه‌بندی شدند:

درجه[1] ۰: اسپرم با سر کاملاً طبیعی، درجه ۱: اسپرم با سر نسبتاً متورم، درجه ۲: اسپرم با سر کاملاً متورم،

درجه‌بندی کلی اسپرمها با توجه به فرمول زیر بود:

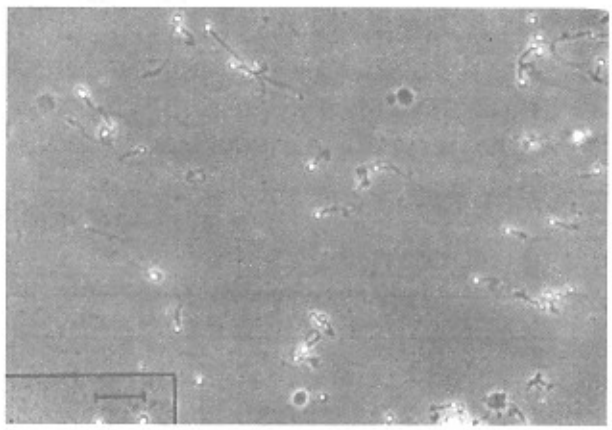
(اسپرمهای دارای درجه ۲)×۲+(اسپرمهای دارای درجه ۱)=درجه‌بندی کلی

بنابراین بر اساس درجه بندی فوق درجه بندی کلی صد اسپرم بین صفر تا دویست خواهد بود (۱۵، ۱۶).



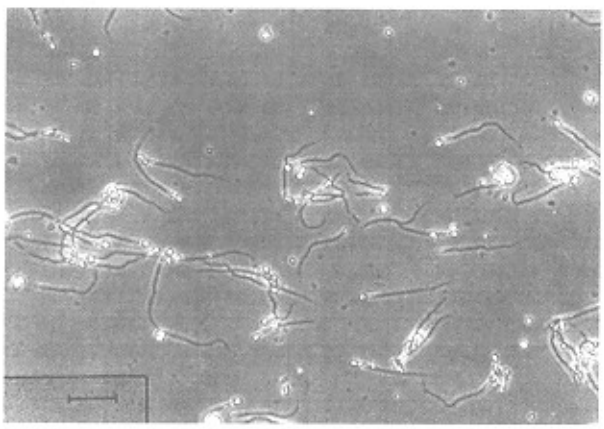
شکل ۱: فتومیکروگراف از اسپرمهای طبیعی

(فاز کنتراست، رنگ‌آمیزی: پاپانیکولا، بزرگنمایی: ×۴۰۰)



شکل ۲: فتومیکروگراف از اسپرمی که بر آن SDS یک درصد تأثیر داده شده است.

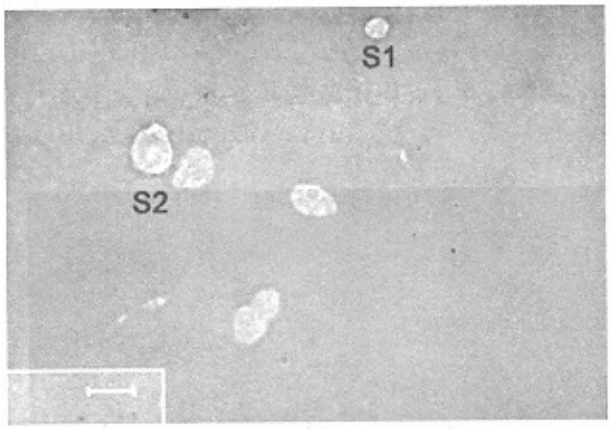
(فاز کنتراست، رنگ‌آمیزی: پاپانیکولا، بزرگنمایی: ×۴۰۰)



شکل ۳: فتومیکروگراف از اسپرمی که بر آن گلوتاتیون تأثیر داده شده است.

(فاز کنتراست، رنگ‌آمیزی: پاپانیکولا، بزرگنمایی ×۴۰۰)

1. Score



شکل ۴: فتومیکروگراف از اسپرمی که بر آن گلوتاتیون با غلظت ۸۰mM و SDS یک درصد تأثیر داده شده است. اسپرمها با درجات یک (S1) و دو (S2) دیده می‌شوند.
(فاز کنتراست، رنگ‌آمیزی: پاپانیکولا، بزرگنمایی: ×۴۰۰)

یافته‌ها

❋ تأثیر غلظتهای مختلف گلوتاتیون بر اسپرم در گروه غیر شستشو

غلظتهای مختلف ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۴۰، ۸۰ میلی مولار بر اسپرم تأثیر داشته و نتایج حاصل از این تحقیق در گروه غیرشستشو نشان داد که گلوتاتیون در غلظتهای ۱ و ۵ میلی مولار بر نامتراکم شدن کروماتین هسته اسپرم (NCD) نسبت به گروه کنترل تأثیر چندانی نداشت. همچنین بین این دو غلظت نیز تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P>0.05$) (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱: مقایسه بین میانگین و انحراف معیار score غلظتهای مختلف گلوتاتیون در طی زمانهای مختلف در سه گروه غیرشستشو (NW)، شستشو (W) و کنترل (C).

غلظت GSH / Min زمان Min		۱۵	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰
۱	NW	۱۶/۲ ±۸/۵	۱۱ ±۵/۸	۹/۶ ±۶/۸	۱۲/۶ ±۸/۲	۱۲/۶ ±۷/۶
	W	۱۶/۲ ±۸/۸	۱۲/۲ ±۷/۲	۱۱/۹ ±۹/۲	۱۲/۶ ±۷/۸	۱۰/۶ ±۶/۶
	C	۱۱/۵ ±۷/۲	۶/۵ ±۵/۸	۱۱/۲ ±۹/۵	۹/۸ ±۸/۹	۹/۲ ±۵/۷
۵	NW	۱۷/۲ ±۱۰/۶	۲۳/۱ ±۱۶/۷	۲۱/۷ ±۱۲/۶	۲۲/۹ ±۱۲/۸	۲۵ ±۱۱/۵
	W	۲۴ ±۱۱/۲	۱۸/۷ ±۱۲/۸	۱۹ ±۱۱/۶	۲۳ ±۱۱/۷	۲۳/۸ ±۲۱/۷
	C	۱۱/۸ ±۱۰/۱	۱۵/۲ ±۱۰/۷	۱۴/۶ ±۹/۶	۱۰/۲ ±۶/۱	۱۵ ±۱۰/۲
۱۰	NW	۲۲/۵ ±۲۱/۸ ●	۲۲/۲ ±۲۲/۱ ●	۲۲/۲ ±۲۱/۷ ●	۲۰/۸ ±۲۱/۵ ●	۲۲/۸ ±۱۷/۱ ●
	W	۲۴/۴ ±۱۲/۸	۱۶/۱ ±۱۸/۷	۲۴/۸ ±۲۲/۱ ●	۲۲/۱ ±۱۷/۲ ●	۲۸/۶ ±۱۶/۴ ●
	C	۷/۵ ±۵/۶	۷/۸ ±۵/۹	۱۰/۶ ±۸/۳	۱۰/۱ ±۴/۹	۱۱/۱ ±۶/۵
۱۵	NW	۶۸ ±۴۷/۶ ●	۶۵/۵ ±۴۱/۲ ●	۸۱/۴ ±۵۱/۸ ●	۷۹/۶ ±۴۰/۲ ●	۶۸/۲ ±۴۱/۸ ●
	W	۴۲ ±۲۰/۶	۴۷/۱ ±۲۵/۲	۴۷/۲ ±۲۸/۸	۵۷/۲ ±۲۶/۸	۵۶/۲ ±۲۹/۵
	C	۲۱/۶ ±۱۱/۲	۲۲/۴ ±۱۲/۸	۲۷/۵ ±۱۷/۲	۲۴ ±۱۰/۸	۲۳/۸ ±۱۲
۲۰	NW	۶۸/۲ ±۳۵/۲ ●	۶۲/۱ ±۲۲/۸ ●	۸۴/۲ ±۲۸/۶ ●	۸۲/۸ ±۲۸/۷ ●	۷۶/۵ ±۲۲/۹ ●
	W	۳۲/۲ ±۱۵/۷	۴۸/۷ ±۲۴ ●	۵۶/۷ ±۲۹/۲ ●	۵۵/۲ ±۱۱ ●	۶۰/۸ ±۲۴/۶ ●
	C	۲۰/۴ ±۱۲/۴	۲۱/۸ ±۱۲/۷	۲۶/۶ ±۱۲/۵	۲۲/۲ ±۱۰	۲۲/۴ ±۱۴/۱
۴۰	NW	۱۲۰/۲ ±۱۹/۱ ●	۱۲۷/۶ ±۱۱/۸ ●	۱۳۲/۲ ±۱۰ ●	۱۲۹/۱ ±۱۰/۴ ●	۱۲۶/۱ ±۲۱/۶ ●
	W	۹۷/۵ ±۴۱/۷ ● ●●	۹۲/۲ ±۲۲/۳ ● ●●	۱۱۶/۲ ±۲۵/۸ ● ●●	۱۰۱/۱ ±۲۱/۸ ● ●●	۱۰۸/۲ ±۲۶/۵ ● ●●
	C	۱۱/۸ ±۲/۷	۱۱/۲ ±۴/۲	۱۲ ±۷/۱	۱۴/۶ ±۶/۱	۱۴/۱ ±۶
۸۰	NW	۱۸۰/۲ ±۱۶/۷ ●	۱۸۶ ±۶/۷ ●	۱۸۵/۲ ±۱۰/۲ ●	۱۸۵/۷ ±۶/۸ ●	۱۸۷/۵ ±۷ ●
	W	۱۱۲/۵ ±۲۶/۱ ● ●●	۱۱۲/۷ ±۲۵/۶ ● ●●	۱۲۱/۲ ±۲۱/۵ ● ●●	۱۰۷/۲ ±۱۲/۸ ● ●●	۱۱۸/۵ ±۱۵/۶ ● ●●
	C	۱۲/۲ ±۸/۲	۸/۲ ±۴	۹/۲ ±۶/۸	۹/۲ ±۲/۸	۱۰ ±۲

● اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل (C) ($P<0.05$)
●● اختلاف معنی‌دار با گروه غیرشستشو (NW) ($P<0.05$)

در غلظت ۱۰ میلی مولار گلوتاتیون، بین گروههای غیرشستشو و کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ولی بین این غلظت و غلظتهای ۱ و ۵ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. غلظتهای ۱۵ و ۲۰ میلی‌مولار گلوتاتیون تأثیر بهتری بر کروماتین اسپرم داشته و اختلاف معنی‌داری را نسبت به غلظتهای ۱، ۵ و ۱۰ میلی مولار نشان دادند ($P<0.05$) (جدول ۲). همچنین در غلظتهای ۱۵ و ۲۰ میلی مولار بین گروههای غیر شستشو و کنترل اختلاف معنی‌دار بود. در گروه غیرشستشو بین این دو غلظت تفاوتها معنی‌داری نبودند (جدول ۱ و ۲).

جدول ۲: مقایسه بین میانگین و انحراف معیار Score غلظتهای مختلف گلوتاتیون در طی زمانهای مختلف در گروه غیرشستشو (NW)

غلظت mM / زمان min	۱۵	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰
۱	۱۶/۲± ۸/۵	۱۱± ۵/۸	۹/۶± ۶/۸	۱۲/۶± ۸/۲	۱۲/۶± ۷/۶
۵	۱۷/۴± ۱۲/۶	۲۳/۱± ۱۶/۷	۲۱/۷± ۱۴/۶	۲۷/۹± ۱۲/۸	۲۵± ۱۱/۵
۱۰	۳۲/۵± ۲۱/۸	۳۳/۳± ۲۳/۹	۳۹/۴± ۲۹/۷	۳۰/۸± ۲۱/۵	۳۲/۸± ۱۷/۱
۱۵	● ۶۸± ۳۷/۶ ■	● ۶۵± ۴۲/۴ ■	● ۸۱/۴± ۵۱/۹ ■	● ۷۹/۶± ۴۰/۲ ■	● ۶۸/۲± ۴۱/۹ ■
۲۰	● ۶۹/۴± ۳۵/۴ ■	● ۶۶/۱± ۲۳/۸ ■	● ۸۴/۲± ۲۸/۶ ■	● ۸۲/۱± ۲۸/۷ ■	● ۷۶/۵± ۲۲/۹ ■
۴۰	● ۱۳۰/۲± ۱۹ □ ○ ■	● ۱۳۷/۶± ۱۹/۸ □ ○ ■	● ۱۴۳/۲± ۱۰ □ ○ ■	● ۱۴۴/۱± ۱۰/۴ □ ○ ■	● ۱۳۹/۱± ۲۱/۶ □ ○ ■
۸۰	● ۱۸۰/۲± ۱۶/۷ □ ■	● ۱۸۶± ۶/۷ □ ■	● ۱۸۵/۲± ۱۰/۴ □ ■	● ۱۸۵/۷± ۶/۸ □ ■	● ۱۸۶/۲± ۷ □ ■

● اختلاف معنی‌دار با غلظتهای ۱ و ۵mM ($P<0.05$). ● اختلاف معنی دار با غلظت ۱۰mM ($P<0.05$). ■ اختلاف معنی‌دار با غلظت ۱۵mM ($P<0.05$). □ اختلاف معنی‌داربا غلظت ۲۰mM ($P<0.05$). ○ اختلاف معنی‌داربا غلظت ۸۰mM ($P<0.05$)

گلوتاتیون بهترین تأثیرش را در گروه غیرشستشو در غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی مولار بر اسپرم گذاشته و در این غلظتها میزان نامتراکم شدن کروماتین اسپرم (NCD) نسبت به سایر غلظتهای گلوتاتیون تفاوت چشمگیری را نشان داده است که از نظر آماری این تفاوتها معنی‌دار بود ($P<0.05$). حتی بین این دو غلظت نیز اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۲). در این بررسی مشخص شد که در غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی مولار بین گروه غیرشستشو و کنترل اختلاف فراوانی وجود داشت که از نظر آماری معنی‌دار بودند ($P<0.05$) (جدول ۱).

❋ تأثیر غلظتهای مختلف گلوتاتیون بر اسپرم در گروه شستشو

در گروه شستشو غلظتهای ۱، ۵ و ۱۰ میلی مولار گلوتاتیون نتوانستند تأثیر چندانی بر میزان نامتراکم شدن کروماتین اسپرم (NCD) بگذارند (جدول ۱ و ۳). در غلظتهای ۱ و ۵ میلی‌مولار بین گروههای

شستشو و کنترل هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری دیده نشد ولی این اختلاف در غلظت ۱۰ میلی‌مولار پس از گذشت ۶۰ دقیقه معنی‌دار بود (جدول ۱). در گروه شستشو بین این سه غلظت تفاوت معنی داری در سطح $P>0.05$ دیده نشد. در غلظت ۱۵ میلی مولار گلوتاتیون، تفاوت معنی‌داری بین گروههای شستشو و کنترل دیده نشد در حالی که در غلظت ۲۰ میلی مولار پس از گذشت ۳۰ دقیقه این اختلاف معنی‌دار بود (جدول ۱). بین این غلظتها (۱۵ و ۲۰ میلی مولار) نیز تفاوت معنی‌دار در گروه شستشو مشاهده نشد ($P>0.05$) (جدول ۳).

جدول ۳: مقایسه میانگین و انحراف معیار Score غلظتهای مختلف گلوتاتیون طی زمانهای مختلف در گروه شستشو (W)

غلظت mM / زمان min	۱۵	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰
۱	۱۶/۲± ۸/۸	۱۲/۳± ۷/۱	۱۱/۹± ۹/۳	۱۲/۷± ۹/۹	۱۰/۶± ۶/۵
۵	۲۳± ۱۱/۲	۱۸/۷± ۱۲/۸	۱۹± ۱۱/۶	۲۴± ۱۱/۷	۲۳/۸± ۲۱/۷
۱۰	۲۴/۴± ۱۳/۹	۲۶/۱± ۱۸/۷	۳۴/۸± ۲۲	۲۹/۱± ۱۷/۴	۲۸/۶± ۱۶/۳
۱۵	۴۳± ۲۰/۶	۴۷/۱± ۳۵/۲ *	۶۹/۳± ۴۸/۸ *	۵۷/۲± ۳۶/۸ * ■	۵۳/۲± ۳۹/۵ * ■
۲۰	۴۳/۷± ۱۵/۷	۴۸/۷± ۳۴ *	۵۶/۷± ۲۹/۲ *	۵۵/۷± ۱۹ * ■	۶۰/۸± ۳۴/۶ * ■
۳۰	۹۲/۵± * ۴۱/۷± ■ ○	۹۷/۳± * ۲۳/۳± ■ ○	۱۱۳/۳± * ۳۵/۷± ■ ○	۱۰۱/۱± * ۲۱/۸± ■ ○	۱۰۸/۲± * ۲۶/۵± ■ ○
۸۰	۱۱۳/۵± * ۲۲/۱ ■ ○	۱۱۴/۷± * ۲۵/۶ ■ ○	۱۲۱/۲± * ۲۲/۵ ■ ○	۱۰۷/۹± * ۱۴/۸ ■ ○	۱۱۵/۲± * ۲۵/۶ ■ ○

* اختلاف معنی‌دار با غلظت ۱mM ($P<0.05$) ■ اختلاف معنی‌دار با غلظت ۵mM ($P<0.05$)، ○ اختلاف معنی‌دار با غلظتهای ۱۰، ۱۵ و ۲۰mM ($P<0.05$)

گلوتاتیون در غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی مولار تفاوتهای زیادی را نسبت به سایر غلظتهایش نشان داد که از نظر آماری معنی‌دار بود. همچنین در این غلظتها بین گروههای شستشو و کنترل تفاوتهای معنی‌داری در سطح $P<0.05$ مشاهده شد (جدول ۱). در گروه شستشو بر خلاف گروه غیرشستشو بین غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی مولار تفاوت معنی‌دار وجود نداشت و هر دو غلظت گلوتاتیون به یک اندازه سبب القای NCD شدند (جدول ۳).

* مقایسه گروههای شستشو و غیرشستشو در غلظتهای مختلف گلوتاتیون

در غلظتهای ۱ تا ۲۰ میلی مولار گلوتاتیون در طی زمانهای مختلف تأثیر گلوتاتیون (۱۵ تا ۲۰ دقیقه)، اگر چه با افزایش غلظت بر میزان تفاوت بین گروههای شستشو و غیرشستشو افزوده شد ولی این تفاوتها از نظر آماری معنی‌دار نبودند ($P>0.05$) (جدول ۱). فقط در غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی مولار گلوتاتیون اختلاف معنی داری وجود داشت که این اختلاف در همه زمانهای تأثیر گلوتاتیون (۱۵ تا ۲۰ دقیقه) در این غلظتها مشاهده شد ($P<0.05$) (جدول ۱).

د) تأثیر عامل زمان در غلظتهای مختلف گلوتاتیون

در هر دو گروه شستشو و غیرشستشو عامل زمان تأثیر چندانی بر میزان نامتراکم شدن کروماتین اسپرمها نداشته است و در غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی مولار گلوتاتیون حتی پس از گذشت ۱۵ دقیقه اسپرمها درجه بالایی از نامتراکم شدن را نشان دادند (جدول ۱، ۲ و ۳).

بحث

یکی از مهمترین عواملی که بر قدرت باروری اسپرم تأثیر می‌گذارد وضعیت تراکم و پایداری کروماتین[1] آن است و همان طوری که در مقدمه این مقاله ذکر شد کروماتین اسپرم پس از نفوذ به درون اووپلاسم نامتراکم شده که این امر سبب تشکیل پیش هسته نر می‌شود (۷، ۱۰). امروزه روشهای مختلفی برای ارزیابی وضعیت تراکم اسپرمها وجود دارد که از آن جمله می‌توان به روش رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو و اکریدین اورنج (AO)[2] (۱۷، ۱۸، ۱۹)، کرومومایسین A_3 (CMA_3)[3] (۲۰)، روش فلوسیتومتری[4] و سدیم دودسیل سولفات (۲۱، ۲۲) اشاره نمود.

مطالعات Bianchi و Sakkas در سال ۱۹۹۶ نشان می‌دهد که فرآیند لقاح و NCD پس از لقاح وابسته به وجود پایداری مطلوب کروماتین است و پایداری بیش از حد کروماتین اسپرم که در اثر تشکیل بیش از حد پیوندهای دی سولفیدی بین مولکولهای پروتامینی متصل به DNA اسپرم به وجود می‌آید یا عدم پایداری کروماتین می‌تواند در فرآیند لقاح و NCD اسپرم مؤثر باشد (۱۳، ۲۰). در طی تزریق اسپرم به درون اووسیت (ICSI) به‌دلیل انتقال اسپرم با غشای پلاسمایی شانس دسترسی فاکتورهای القاکننده NCD (اعم از آنزیمی یا شیمیایی در درون اووپلاسم) به کروماتین اسپرم کاهش می‌یابد. لذا در صورتی که فرآیند NCD را قبل از ICSI در اسپرم القا نماییم ممکن است درصد لقاح افزایش یابد.

Calvin و Bedford در سال ۱۹۷۱ برای القا NCD در اسپرمهای برخی از پستانداران نظیر موش، هامستر و گاو از SDS و دی‌تیوتریتول (DTT) به‌عنوان احیاکننده پلهای دی سولفیدی بین مولکولهای پروتامینی استفاده کردند (۲۴). پس از آن Gopalkrishnan, Bjorndahl, Kvist با استفاده از SDS و EDTA (به‌عنوان کیلات کننده Zn متصل به گروههای تیولی (-SH) پروتامین) سبب القای NCD اسپرم انسان شدند (۲۲، ۲۳، ۲۵).

در این تحقیق، ما نیز از SDS که روش شناخته شده‌ای برای القای

1. Chromatin Stability
2. Acridine Orange
3. Chromomycin A3
4. Flowcytometry

NCD اسپرمها در محیط *in vitro* است و گلوتاتیون (GSH) به عنوان احیاکنندهٔ پلهای دی سولفیدی که به صورت یک بیوفاکتوز طبیعی در اووپلاسم به‌منظور القای NCD اسپرم مصرف می‌شود استفاده کردیم. در این بررسی نمونه‌ها در سه گروه شستشو، غیر شستشو و کنترل دسته‌بندی شدند و در گروههای اول و دوم (غیر شستشو و شستشو) گلوتاتیون با غلظتهای ۱ تا ۸۰ میلی مولار افزوده شد و سپس طی زمانهای ۱۵ تا ۱۲۰ دقیقه برای هر غلظت به آنها SDS اضافه شد. در گروه کنترل به جای GSH از محیط کشت Ham's F-10 استفاده شد. بعد از طی زمانهای فوق به نمونه‌های این گروه SDS افزوده شد (دیاگرام ۲).

Reyes و همکارانش در سال ۱۹۹۶ با بررسی که روی کروماتین اسپرم هامستر انجام دادند به این نتیجه رسیدند که GSH و هپارین (پلی آنیونی که بر سر اتصال با پروتامین به رقابت با DNA بر می‌خیزد) به‌تنهایی قادر به القای NCD در اسپرم هامستر نیستند ولی مخلوط این دو می‌تواند بر اسپرم این جانور تأثیر بگذارد که این تأثیر وابسته به زمان و حرارت است (۲۶). بررسیهای ما نیز که بر روی اسپرم انسان صورت گرفت مشخص که GSH در محیط *in vitro* می‌تواند سبب القای NCD و تورم سر اسپرم شود که این تورم با تأثیر SDS یک درصد بر اسپرم قابل مشاهده بود. تأثیر GSH بر اسپرم به این صورت است که GSH در گروه غیر شستشو در غلظتهای ۱ تا ۱۰ میلی مولار GSH، بر کروماتین اسپرم حتی پس از گذشت ۱۲۰ دقیقه تأثیر ناچیزی داشته است (Scoro<50) و در غلظتهای ۱۵ و ۲۰ میلی مولار تأثیر GSH بر کروماتین اسپرم نسبتاً خوب بود (80>Scoro>50). در حالی که غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی مولار GSH توانسته است میزان NCD بالایی را در اسپرمها القا نماید (Scoro>135) (جدول ۱ و ۲). در گروه شستشو نیز با افزایش غلظت GSH درصد بیشتری از اسپرمها نامتراکم شدند. (جدول ۱ و ۳). از طرف دیگر در تحقیقات ما مشخص شد که تأثیر GSH بر اسپرم انسان طی زمانهای ۱۵ تا ۱۲۰ دقیقه تغییر محسوسی در میزان NCD اسپرمها ایجاد نکرد (جدول ۱). بنابراین شاید بتوان گفت که تأثیر GSH بر کروماتین اسپرم وابسته به غلظت بوده ولی وابسته به زمان نیست. گرچه طبق بررسیهای Reyes و Sanchez هپارین و GSH به تنهایی و مستقل از هم قادر به القای NCD در کروماتین اسپرمهای هامستر، موش و موش صحرایی نبودند ولی طبق بررسیهای Reyes و همکارانش مشخص شد که هپارین با غلظت ۱۵۳/۸ میلی‌مولار به تنهایی و مستقل از تیولها قادر به القای NCD انسان پس از ۶ ساعت انکوباسیون است (۲۶، ۲۷). از طرف دیگر، نتایج حاصل از تحقیقات ما نیز نشان داد که GSH نیز به تنهایی و مستقل از هپارین می‌تواند سبب القای NCD در اسپرم انسان شود و این عمل را در غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی مولار به‌خوبی نشان داد. بنابراین شاید بتوان چنین نتیجه گرفت که در اسپرم انسان برخلاف اسپرم سایر پستانداران جونده GSH و هپارین به تنهایی و مستقل از یکدیگر قادر به القای NCD هستند. ممکن است این نکته مطرح شود که ابتدا SDS غشای پلاسمایی اسپرم را برداشته و بعد GSH وارد هستهٔ اسپرم می‌شود و آنرا نامتراکم می‌کند، به عبارت دیگر، GSH بدون شکسته شدن غشای پلاسمایی اسپرم توسط SDS قادر به نفوذ به داخل آن و القای NCD نیست و چنانچه قبل از ICSI اسپرمها را در معرض GSH دهیم به دلیل وجود اسپرمولیزا در اسپرم سالم و عدم نفوذ GSH به درون اسپرم پس از ICSI ممکن است هستهٔ اسپرم متورم نشده و همچنان متراکم باقی بماند. این پرسشی است که تاکنون هیچ منبعی به آن اشاره نکرده است.

برای پاسخ به چنین پرسشی ما در گروه شستشو پس از تأثیر GSH بر اسپرم نمونه‌ها را به‌مدت ۱۰ دقیقه با محیط کشت Ham's F-10 شستشو دادیم و بعد SDS به آنها افزودیم. این شستشو سبب پاک شدن محیط اطراف اسپرمها از GSH شد. نتایج به دست آمده نشان داد که در گروه شستشو با پاک شدن GSH از محیط اطراف اسپرم باز هم سر اسپرمها متورم شده و اختلاف آن با گروههای کنترل و غیرشستشو و در غلظتهای بالای GSH در سطح $P>0.05$ معنی‌دار بود (جدول ۱). معنی‌دار بودن این اختلاف به این مفهوم است که در گروه شستشو گلوتاتیون پس از افزوده شدن به اسپرمها، توانسته است که از غشای پلاسمایی اسپرمها عبور کرده و وارد هسته شود و پیوندهای دی‌سولفیدی را احیا کند و SDS با از بین بردن غشای پلاسمایی اسپرم فقط تورم سر اسپرم را به ما نشان می‌دهد، نه اینکه ابتدا SDS غشای پلاسمایی اسپرمها را از بین برده و بعد GSH به درون آن نفوذ کرده باشد. همچنین اگر چه پیوندهای دی سولفیدی بین پروتامینها در حضور GSH شکسته شدند ولی به علت وجود غشای پلاسمایی اسپرم فضای کافی برای باز شدن کروماتین اسپرمها در محیط *in vitro* وجود ندارد که این فضا با تأثیر SDS بر غشای پلاسمایی اسپرمها به دست می‌آید. از طرف دیگر از مقایسه بین گروههای شستشو و غیر شستشو می‌توان چنین نتیجه گرفت که وجود GSH در محیط اطراف اسپرمها تأثیر مضاعفی بر القای NCD اسپرمها می‌گذارد و این نشان می‌دهد که احتمالاً با برداشته شدن GSH از محیط اطراف اسپرمها، برخی از پیوندهای دی‌سولفیدی بین گروههای تیولی آزاد مجدداً ایجاد می‌شوند.

بر اساس مطالعات فوق می‌توان نتیجه گرفت که GSH قادر است در محیط *in vitro* سبب القای NCD در اسپرمها شود که این اثر GSH وابسته به غلظت بوده و در غلظتهای ۴۰ و ۸۰ میلی‌مولار، میزان NCD اسپرمها بیشتر است. همچنین GSH قادر است که از غشای پلاسمایی اسپرمها گذشته و سبب القای NCD شود و چنانچه قبل از ICSI، GSH بر اسپرمهایی که از کروماتین بسیار پایداری برخوردار هستند تأثیر داده شود، ممکن است درصد لقاح افزایش یابد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان بدینوسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی ایران که کلیه هزینه‌های مصرفی و غیرمصرفی این طرح را بر مبنای قرارداد شماره ۱۹۷۶/۲۰/۱۷/پ مورخ ۷۵/۱۲/۴ تأمین نمودند، ابراز می‌دارند.

References

1. De Yi Liu, HWG Baker: Tests of human sperm function and fertilization in vitro. Fert Steril 1992; 58(3): 465-483
2. Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW: Sequence- specific packaging of DNA in human sperm chromatin. Science 1987; 236: 962-964
3. Seligman J, Kosower NS, Weissenberg R, Shalgi R: Thiol-disulfide status of human sperm proteins. J Reprod Fert 1994; 101: 435-443
4. Marushige Y, Marushige K: Transformation of sperm histon during formation and maturation of rat sprmatozoa. J Biol Chem 1975; 250(1): 39-45
5. Kvist U: Importance of spermatozoal zinc as temporary inhibitor of sperm nuclear chromtin decondensation abitlity in man. Acta Physiol Scand 1980; 109: 79-84
6. Kvist U, Bjorndahl L: Zinc preserves an inherent capacity for human sperm chromatin decondensation. Acta Physiol Scand 1985; 124: 195-200
7. Perreault SD, Wolf RA, Zirkin BR: The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo: Dev Biol 1984; 101: 160-167
8. Gonzales Esterlla JA, Coney P, Ostash K, Karabirus D: Dithiotheritol effects on the viscosity and quality of human semen, Fert Ster, 1994; 62(6): 1238-1243
9. Japer S, Wichman J, Kremer J: Studies on the decondensation of human mouse and bull sperm nuclei by heparin and other polyanions J Exp Zool, 1990; 256: 315-322
10. Perreault SD, Barbee RR, Slott VL: Importance of glutathione in acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. Dev Biol 1988; 125: 181-186
11. Meister A, Anderson ME: Glutathione, Ann Rew Biochem 1983; 52: 711-760
12. Palermo GD, Cohen J, Rosenwaks Z: Intracytoplasmic sperm injection: A powerful tool to overcome fertilization failure. Fert Steril 1996; 65(5): 899-908
13. Sakkas D, Urner F, Bianchi PG: Chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1996; 11(4): 837-843
14. Drury RAB, Wallington D, Carleton S: Histological technique, 5ed. Oxford university press, 1980
15. Kjellberg S, Bjorndahl L, Kvist U: Sperm chromatin stability and zinc binding properties in semen from men in barren unions. Int J Androl 1992; 15: 103-113
16. Rosenberg L, Rao KM, Bjorndahl L: Changes in human sperm chromatin stability during preparation for in vitro fertilization. Int J Androl 1990; 13: 287-296
17. Foresta C, Zorzi M, Rossato M: Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistance of histones in spermatozoa in infertile men. Int J Androl 1992; 15: 330-337
18. Hingst O, Blottner S, Franz C: Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue and acridine orange staining. Andrologia 1995; 27: 275-279
19. Eggert-Kruse W, Rohr G, Kerbel H: The Acridine orange test: A clinically relevant screening method for sperm quality during infertility investigation? Hum Reprod 1996; 11: 784-789
20. Bianchi PG, Manicardi GC, Urner F: Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: Evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. Mol Hum Reprod 1996; 2(3): 139-144
21. Engh E, Clausen OPF, Scholberg A: Relationship between sperm quality and chromatin condensation measured by sperm DNA fluorescence using flow cytometry. Int J Androl 1992; 15:407-415
22. Kvist U: Sperm nuclear chromatin decondensation ability. An in vitro study on ejaculated human spermatozoa. Acta Physiol Scand Suppl 1980; 486,1-24
23. Gopalkrishnan K, Hinduga IN, Anand Kumar TC: In vitro decondensation of nuclear chromation of human spermatozoa: assessing fertilizing potential Arch. Androl 1991; 27: 43-50
24. Calvin HI, Bedford JM: Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. J Reprod Fert Suppl 1971; 13, 65-75
25. Bjorndahl L, Kjellberg S and Kvist U: Ejaculatory sequence in men with low sperm chromatin-zinc. Int J Androl 1991; 14: 174-178
26. Reyes R, Sanchez-Vazquez ML, Merchant-Larios H, Rosado A, Delgado NM: Effect of heparin-reduced glutathione on hasmter sperm DNA unpacking and nuclear swelling. Arch Androl 1996; 37: 33-45
27. Reyes R, Rosado A, Hernandez O, Delgado NM: Heparin and glutathione: Physiological decondensing agents of human sperm nuclei. Gamete Res 1996; 23: 39-47