بررسی تاثیر برخی از اختلالات کروماتین اسپرم بر میزان لقاح پس از انجام ICSI

محمدحسین نصراصفهانی Ph.D.☆★♦، شهناز رضوی Ph.D.*، محمد مردانی Ph.D.*
افسانه مافی M.Sc.*، عباس مقدم M.Sc.*

☆پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

★مرکز باروری و ناباروری اصفهان

* دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه جنین شناسی

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

چکیده

دریافت مقاله: ۸۲/۸/۲۹، پذیرش مقاله: ۸۲/۱۱/۷

* **هدف:** ارزیابی تاثیر برخی از آنومالیهای کروماتین اسپرم بر روی میزان موفقیت در لقاح به طریق ICSI است.

* **مواد و روشها:** با جمع‌آوری نمونه سمن ۵۵ نفر از مراجعین به مرکز باروری و ناباروری اصفهان جهت درمان به طریق ICSI، علاوه بر آنالیز سمن رنگ‌آمیزی CMA_3، آنیلین بلو، تست SDS و SDS+EDTA انجام گرفت. با توجه به درصد اسپرمهای CMA_3 مثبت در هر نمونه، بیماران به دو گروه کمتر و بیشتر از ۳۰درصد CMA_3 مثبت تفکیک شدند. همچنین بر اساس درصد لقاح، به دو گروه بیماران کمتر و بیشتر از ۵۰درصد لقاح تفکیک شدند.

* **یافته‌ها:** نتایج حاصله نشان داد که از بین تست‌های فوق‌الذکر و پارامترهای اسپرمی صرفاً بین اسپرمهای دارای کمبود پروتامین با میزان لقاح به روش ICSI ارتباط معنی‌داری وجود دارد. همچنین درصد لقاح بین بیماران در دو گروه کمتر و بیشتر از ۳۰درصد CMA_3 مثبت به طور چشمگیری متفاوت بود. بعلاوه اختلاف میانگین درصد CMA_3 مثبت در دو گروه بیماران کمتر و بیشتر از ۵۰درصد لقاح معنی‌دار بود. ناحیه زیر منحنی ROC(0.82) حاکی از آن است که تست CMA_3، بعلت حساسیت و اختصاصی بودن بالا، تست مناسبی جهت پیشگویی میزان موفقیت در لقاح به روش ICSI است.

* **نتیجه‌گیری:** از نتایج فوق می‌توان دریافت که کمبود پروتامین اسپرم تاثیر اساسی بر میزان موفقیت در لقاح به طریق ICSI دارد.

کلواژگان: ICSI، کروماتین اسپرم، CMA_3، کمبود پروتامین

مقدمه

لقاح فرآیندی است که فاکتورهای متعددی روی آن تاثیر دارد. طی این فرآیند ساختار کروماتین گامتهای مذکر و مؤنث به صورت هماهنگ جهت تشکیل پیش هسته به شکل جدیدی سازماندهی می‌گردد، با توجه به اینکه لقاح بعنوان یک سد انتخابی مانع از ورود اسپرمهای غیر طبیعی به داخل اووسیت می‌شود، طی پروسه لقاح در بدن (In vivo) احتمال رسیدن اسپرمهای غیرطبیعی به تخمک بسیار اندک است در حالیکه با انجام لقاح آزمایشگاهی همراه با اسپرمهای طبیعی تعدادی اسپرم غیرطبیعی به اووسیت دسترسی می‌یابند و ممکن است قادر به تلقیح اووسیت باشند و در روش ICSI بر خلاف لقاح طبیعی و یا لقاح آزمایشگاهی (IVF) امکان تزریق اسپرمهای غیر طبیعی به داخل تخمک بیشتر است (۱، ۲).

در هر نمونه سمن آنومالیهای اسپرمی متعددی وجود دارد منجمله: مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم (۳)، ساختار کروماتین غیر طبیعی اسپرم (۴)، نقایص آکروزومی (۵)، عوامل ایمونولوژیک (۶) و... این عوامل می‌توانند بر روی میزان موفقیت در لقاح تاثیر داشته باشند. تحقیقات انجام شده در زمینه لقاح آزمایشگاهی (IVF) حاکی از آن است که از بین آنومالیهای اسپرم، مورفولوژی و ساختار کروماتین اسپرم تاثیر اساسی بر میزان موفقیت در لقاح دارد (۷، ۸). روشهای متعددی جهت بررسی وضعیت کروماتین اسپرم وجود دارد، منجمله روش SDS که بیانگر پایداری کروماتین است، SDS+EDTA که قدرت خروج از تراکم کروماتین اسپرم را نشان می‌دهد (۹)، رنگ‌آمیزی آنیلین بلو که بیانگر وجود هیستون اضافی در ساختار کروماتین است (۱۰)، CMA_3 که وسیله مناسبی جهت تعیین کمبود پروتامین است (۱۱). ارزیابی Comet که میزان فراگمانتاسیون DNA را مشخص می‌نماید (۱۲) و اکریدین اورانژ که میزان مقاومت DNA را نسبت به دنیچره شدن در مقابل اسید یا حرارت نشان می‌دهد (۱۳، ۱۴). اگر چه رابطه برخی از تست‌های ارزیابی کروماتین با میزان موفقیت لقاح در ICSI به طور جداگانه انجام شده است ولی رابطه چندین تست ارزیابی کروماتین به طور همزمان با میزان موفقیت لقاح در روش ICSI مورد بررسی قرار نگرفته است و از آنجا که در طی روش ICSI سدهای طبیعی که مانع ورود اسپرم غیرطبیعی به داخل اووسیت می‌شود وجود ندارد ضروری است که تاثیر اختلالات کروماتین، همچنین پارامترهای اسپرمی بر روی میزان موفقیت در لقاح بطریق ICSI بررسی شود. لذا در این مطالعه روشهای SDS، SDS+EDTA، آنیلین بلو و CMA_3 به طور همزمان بر روی نمونه سمن قبل و بعد از شستشو مورد بررسی قرار گرفت و رابطه تست‌های مذکور و پارامترهای اسپرمی با میزان لقاح ارزیابی شد.

مواد و روشها

* روش آماده سازی اسپرم

نمونه‌های سمن از ۵۵ زوج مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان جهت انجام ICSI مورد مطالعه قرار گرفت. پس از ۳-۴ روز پرهیز از مقاربت مایع سمن بیماران جمع آوری شد. بخش اعظم مایع سمن جهت آماده سازی بر روی گرادیان ناپیوسته پرکل (۹۰: ۷۰: ۵۰) قرار گرفت و به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس با پیپت استریل اسپرمهای ته‌نشین شده برداشته و به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت Hams-F10 و آلبومین ۱۰درصد اضافه نموده و به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید و این مرحله سه بار تکرار گردید تا محلول پرکل از محیط اطراف اسپرم کاملاً حذف گردد و هر بار اسپرمهای ته نشین شده را نگه داشته و محلول رویی تخلیه می‌شد. در نهایت رسوب ته لوله را که حاوی اسپرمهای متحرک است به ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه می‌شد، بخشی از اسپرمهای شستشو داده شده جهت انجام ICSI و باقیمانده آن جهت، ارزیابی مورفولوژی و ساختار کروماتین با استفاده از رنگ آمیزهای پاپانیکولا، آنیلین بلو، CMA_3 و روشهای سدیم‌دودسیل (SDS) و SDS+EDTA استفاده شد. برای هر تست در هر نمونه ۲۰۰ اسپرم بررسی گردید.

* ارزیابی هیستون اضافی (رنگ‌آمیزی آنیلین بلو)

گسترش‌های تهیه شده از هر نمونه در گلوتارالدئید ۳درصد در بافر فسفات ۰/۲ مولار (Na_2HPO_4 ۳۳cc ۰/۲ مولار + NaH_2PO_4 ۱۴cc ۰/۲ مولار) به مدت ۳۰ دقیقه جهت فیکاسیون قرار گرفت. سپس با استفاده از محلول آنیلین بلو ۵درصد در اسید استیک ۴درصد (PH3.5) به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی انجام گرفت (۱۰).

* ارزیابی کمبود پروتامین (رنگ‌آمیزی کروموماپسین A3)

پس از تهیه گسترش از نمونه هایی که به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۴ درجه سانتیگراد در محلول فیکساتیو کارنوی (متانول و اسیداستیک گلاسیال به نسبت ۳ به ۱) قرار گرفته بود، جهت رنگ‌آمیزی هر اسلاید از ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگ CMA_3 (۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بافر مک الوین: ۷cc اسید سیتریک ۰/۱ مولار + ۳۲/۹cc Na_2HPO_4 ۰/۲ مولار با PH=۷ که حاوی ۱۰ میلی‌مولار کلرید منیزیم) به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. پس از شستشوی هر اسلاید با بافر و مونت آن توسط محلول بافر گلیسرول (به نسبت ۱ به ۱) آنالیز میکروسکوپی اسلاید با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت با فیلتر مناسب (۴۶۰-۴۷۰nm) انجام گرفت. ارزیابی بدین ترتیب بود که اسپرمهای زرد رنگ و درخشان به عنوان CMA_3 مثبت و اسپرمهای زرد فاقد درخشندگی بعنوان CMA_3 منفی در نظر گرفته شد (۸).

* تستهای پایداری کروماتین اسپرم (SDS) و قدرت خروج از تراکم کروماتین (SDS+EDTA)

به ۵۰ میکرولیتر اسپرم آماده سازی شده توسط پرکل و همچنین نمونه سمن قبل از شستشو، ۳۵۰ میکرولیتر محلول SDS یک درصد در بافر بورات ۰/۰۵ مولار (NaOH ۸۸cc ۰/۱ مولار + ۴/۲cc سدیم تترابورات ۰/۲۵ مولار با ۴۰۰cc آب؛ PH=9) اضافه شده و

پس از انکوباسیون در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد، به مدت ۶۰ دقیقه، ۲۰۰ میکرولیتر گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد در بوراث باقر ۰/۰۵ مولار جهت توقف واکنش محلول اضافه شد. اسپرمهای با سر متورم پس از رنگ‌آمیزی با محلول گیمسا ارزیابی شد. و درصد اسپرمهای تاپایدار (نسبتاً یاکاملاً متورم) محاسبه گردید. جهت انجام تست SDS+EDTA، به SDS ۱درصد، ۶ میلی مولار EDTA اضافه شد. بقیه مراحل مانند SDS انجام شد (۹).

* ارزیابی اسپرم

با استفاده از یک محلول فیکساتیو جهت از بین بردن تحرک اسپرم از شمارش گرمکلر جهت تعیین غلظت اسپرم استفاده شد و غلظت اسپرم بر اساس میلیون در هر میلی‌لیتر تعیین گردید. تحریک اسپرم توسط مشاهده مستقیم در زیر میکروسکوپ بررسی شد. با استفاده از رنگ‌آمیزی پاپانیکولا و مطابق با معیار Strict Criteria مورفولوژی اسپرم‌ها ارزیابی شد (۱۵).

* تزریق اسپرم به داخل سیتوپلاسم تخمک (ICSI)

بعد از جمع آوری اووسیت‌ها، در محیط IVF 20 به آنها هیالورونیداز اضافه شد، یک دقیقه انکوبه شد. پس از شستشوی آنها در IVF-20 به محیط حاوی HEPES زیر روغن منتقل گردیدند. از اسپرمهای آماده شده‌ای که به داخل یک قطره PVP منتقل شده بود در زیر میکروسکوپ اینورت Nikon یک اسپرم با مورفولوژی طبیعی انتخاب و توسط سوزن مخصوص به داخل اووسیت تزریق شد. سپس اووسیت‌ها در محیط G1.2 (Vitrolife) انکوبه شد. لازم به یادآوری است که اووسیت‌های مسن و یا نارس از این مطالعه حذف گردیدند و بیمارانی که حداقل ۴ اووسیت رسیده داشتند در این مطالعه وارد شدند.

* آنالیزآماری

تمامی محاسبات آماری شامل آزمون t-tst، ضریب همبستگی و آنالیز ROC با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS-10 انجام گرفت.

یافته‌ها

محدوده رنگ پذیری با استفاده از رنگ‌آمیزی CMA_3 و با رنگ‌آمیزی آنیلین بلو به ترتیب ۶۵-۷۰درصد و ۵/۹۰-۹/۵درصد بود در حالیکه درصد اسپرمهای متورم در تست SDS و SDS+EDTA به ترتیب ۷۴-۶درصد و ۹۳-۲۱/۵درصد بود. هیچ یک از پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی) با میزان لقاح به طریق ICSI رابطه معنی داری نشان ندادند. در حالیکه از بین تست‌های ارزیابی کیفیت کروماتین صرفاً درصد اسپرمهای CMA_3 مثبت یک رابطه معنی‌دار و معکوس را با میزان لقاح نشان داد، بدین معناکه در نمونه‌هایی که درصد اسپرمهای دارای کمبود پروتامین (CMA_3 مثبت) بالا است احتمال میزان موفقیت در لقاح به طریق ICSI پایین خواهد بود (جدول ۱).

با توجه به نتایج، داده‌ها بیماران بر حسب میزان لقاح به دو گروه لقاح کمتر و بیشتر از ۵۰درصد تفکیک شدند (جدول ۲).

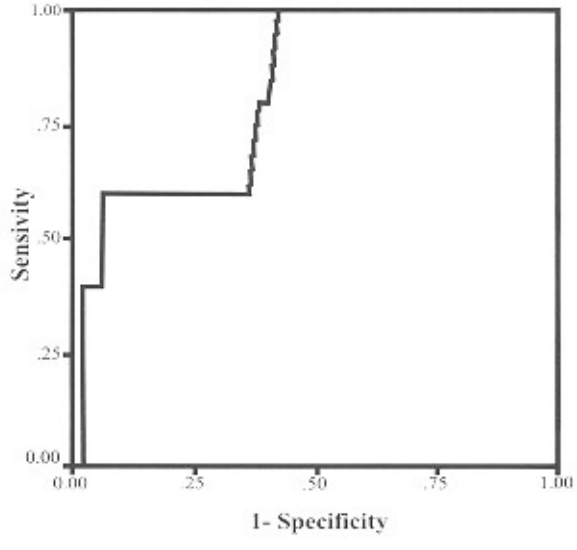
جدول ۱: رابطه بین تستهای ارزیابی وضعیت کروماتین با میزان لقاح در روش ICSI

تست ارزیابی کروماتین	ضریب همبستگی	P-Value
کروموماسین A3	-۰/۴۰۱	۰/۰۰۲
رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو	۰/۱۷۶	۰/۱۷۴
تدیم دودسیل سولفات	-۰/۰۹۲	۰/۵۰۴
تدیم دودسیل سولفات+EDTA	-۰/۲۰۸	۰/۱۲۷

با استفاده از آزمون t-test می‌توان دریافت که از بین تست‌های ارزیابی وضعیت کروماتین صرفاً اختلاف میانگین درصد اسپرمهای CMA_3 مثبت در دو گروه با لقاح کمتر و بیشتر از ۵۰درصد از لحاظ آماری معنی‌داری است. همچنین در صورتیکه بیماران بر اساس درصد CMA_3 مثبت کمتر یا بیشتر از ۳۰درصد به دو گروه تفکیک شوند. می‌توان مشاهده نمود که اختلاف میانگین لقاح در این دو گروه از لحاظ آماری معنی‌دار است (جدول ۳).

* قدرت تشخیصی تست CMA3 در پیشگویی میزان موفقیت لقاح به روش ICSI

با توجه به این که کمبود پروتامین اسپرم به طور مستقل بر میزان لقاح تاثیر دارد، جهت ارزیابی قدرت تمایز این تست در پیشگویی میزان لقاح در روش ICSI از منحنی ROC استفاده شد. با استفاده از این آزمون مشخص گردید که مساحت ناحیه زیر منحنی ROC ۰/۸۲ است. از آنجا که هر چه مساحت این منحنی به عدد یک نزدیکتر باشد ارزش تشخیصی و تمایز بالاتری جهت پیشگوئی میزان موفقیت در لقاح دارد. نتایج نشان می‌دهد که این تست از حساسیت و اختصاصی بودن بالایی جهت پیشگوئی میزان موفقیت در لقاح به طریق ICSI برخوردار است (نمودار ۱).



نمودار ۱: منحنی ROC رنگ‌آمیزی CMA3 برای درصد لقاح کمتر یا بیشتر از ۵۰درصد

جدول ۲: مقایسه میانگین تستهای ارزیابی وضعیت کروماتین در دو گروه با لقاح کمتر و بیشتر از ۵۰درصد

تست ارزیابی کروماتین	لقاح > 50% mean±SD	لقاح < 50% mean±SD	P-Value
تعداد نمونه	۲۲	۹	
کرومومایسین A3	۱۸/۷۶±۱۲/۵۷	۳۶±۲۲/۶۷	۰/۰۰۲
آنیلین‌بلو	۳۱/۵۷±۲۱/۶۰	۴۵/۲۲±۳۲/۶	۰/۹۱۹
سدیم دودسیل سولفات	۴۴/۲۶±۲۱/۵۶	۳۶/۶۶±۲۰/۷۱	۰/۸۹۵
سدیم دودسیل سولفات + EDTA	۵۸/۲۳±۲۲/۵۴	۴۱/۵۰±۲۱/۸۲	۰/۷۶۸

جدول ۳: مقایسه میانگین تستهای ارزیابی وضعیت کروماتین در دو گروه با CMA_3 کمتر و بیشتر از ۳۰درصد

تست ارزیابی کروماتین	CMA3<30% مثبت mean±SD	CMA3>30% مثبت mean±SD	P-Value
تعداد نمونه	۲۱	۱۳	
درصد لقاح	۷۹/۲±۱۶/۷	۶۶±۲۵/۲	۰/۰۳
آنیلین‌بلو	۲۷/۳±۱۸/۴	۵۵/۱±۲۱/۹	۰/۹۰۳
سدیم دودسیل سولفات	۴۱/۸±۲۲۷/	۴۶/۸±۱۷/۳	۰/۱۸۶
سدیم دودسیل سولفات + EDTA	۵۷/۷±۲۲/۸	۴۸/۳±۲۳/۷	۰/۹۲۲

بحث

روش ICSI روش مناسبی جهت درمان ناباروری با علت مردانه است و با توجه به اینکه بطور طبیعی غشای تخمک در واکنش با غشاء اسپرم به عنوان یک سد انتخابی عمل می‌کند در روش ICSI این سد مطرح نمی‌شود، بنابراین پارامترهای اسپرمی مانند تحرک، غلظت، مورفولوژی و حتی برخی از تستهای عملکردهای اسپرمی با لقاح ارتباط ندارد (۱۶). ساختار کروماتین اسپرم یکی از فاکتورهای مهمی است که ممکن است علاوه بر میزان موفقیت در لقاح، در رشد و تکامل بعدی جنین تاثیر گذارد (۱۷)، لذا هدف از این مطالعه ارزیابی تاثیر اختلالات کروماتین اسپرم بر روی میزان لقاح به روش ICSI است. در این مطالعه هیچ یک از پارامترهای سمن با میزان لقاح رابطه معنی‌داری نشان نداد و از بین تستهای ارزیابی وضعیت کروماتین اسپرم صرفاً کمبود پروتامین یک رابطه معکوس و معنی‌دار با میزان لقاح نشان داد (جدول ۱). نتایج حاصله بیانگر آن است که هر قدر درصد CMA_3 مثبت یا کمبود پروتامین در اسپرمها بالاتر باشد شانس لقاح پایین‌تر می‌آید. در مطالعه‌ای که بر روی ۱۰۱ مورد نمونه IVF انجام گرفت مشخص گردید که به ترتیب، مورفولوژی اسپرم و کمبود پروتامین در ساختار کروماتین به طور مستقل بر میزان موفقیت در لقاح آزمایشگاهی تاثیر دارند، در حالیکه رابطه معنی‌داری بین رنگ‌آمیزی اکریدین اورانژ و میزان لقاح مشاهده نشد و این عدم ارتباط ممکن است ناشی از اختلاف در روشی باشد که در بررسی نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده وجود داشت (۱۴). در یافته‌های این مطالعه اگر چه مورفولوژی اسپرم و کمبود پروتامین به طور مستقل بر میزان لقاح تاثیر نشان داد اما مورفولوژی اسپرم در مقایسه با کمبود پروتامین رابطه بالاتری نشان داد (۸). در حالیکه بر خلاف روش IVF در روش ICSI صرفاً کمبود پروتامین تاثیر اساسی بر میزان لقاح دارد. با توجه به اینکه در طی انجام روش ICSI سعی می‌شود اسپرم با بهترین مورفولوژی انتخاب و به داخل سیتوپلاسم تخمک تزریق شود. آقای Batroove و همکارانش نشان دادند که با استفاده از روش مخصوص پردازش تصویری، در طی ICSI بین مورفولوژی اسپرمهای تزریق شده با میزان موفقیت در لقاح رابطه مثبت دارند (با مساحت زیر منحنی ROC ۸۸درصد). جالب است بدانیم که آقای Bartoove نشان داد هر قدر مرفولوژی هسته اسپرم (سر) طبیعی‌تر باشد علاوه بر افزایش میزان موفقیت لقاح در نتایج حاملگی نیز موثر است. آنها دریافتند که اختلالات مورفولوژیک جزیی هسته اسپرم که طی انتخاب اسپرم قابل تشخیص نیست، ممکن است بر میزان لقاح و حاملگی تاثیر داشته باشد (۱۸). این نتایج مؤید یافته‌های تحقیق حاضر در رابطه با تاثیر کمبود پروتامین بر میزان لقاح به روش ICSI است.

همچنین یافته‌های ما با نتایج کار Esterhuizen و همکارانش مطابقت دارد. زیرا ایشان نیز معتقدند، در صورتی که از اسپرم نمونه‌های دارای CMA_3 مثبت بالا جهت تزریق استفاده شود میزان لقاح پایین‌تر است. این محققین گزارش دادند که عدم خروج از تراکم کروماتین اسپرم در اووسیت در مواردی که از اسپرم نمونه‌هایی که CMA_3 مثبت آنها بیش از ۶۰درصد است نسبت به نمونه‌هایی که CMA_3 مثبت آنها کمتر است ۴۴درصد است، ۱۵/۶ برابر افزایش می‌یابد (۱۹).

بین اختلال در بسته‌بندی کروماتین و وجود شکستگی در رشته DNA رابطه وجود دارد واین رابطه ممکن است از اختلال در مکانیسم بسته بندی کروماتین باشد. آنومالی‌هایی که در بسته بندی کروماتین در طی مرحله اسپرماتوژنز رخ می‌دهد، ممکن است منجر به نارسایی خروج از تراکم کروماتین اسپرم شود که این عامل یک فاکتور اساسی جهت عدم موفقیت در لقاح به روش ICSI است (۲۰).

در روش IVF بین هیستون اضافی و میزان لقاح رابطه معنی دار مشاهده شده است در حالی که در روش ICSI این ارتباط دیده نشد. Hammahed و همکارانش (۲۱) نیز اختلافی در میزان لقاح بیمارانی که اسپرم به طریق انزال و یا استخراج از بیضه بدست آمده و با استفاده از رنگ‌آمیزی آنیلین بلو شده بود بدست نیاوردند (۲۱). اگر چه اختلاف میانگین درصد اسپرمهای رنگ گرفته توسط آنیلین‌بلو در این

دو گروه با یکدیگر معنی دار بود، (در بیمارانی که به طریق انزال اسپرم بدست آمد ۱۸/۹±۳۳/۱، در بیوپسی بیضه ۱۷/۷±۷۰/۷، P<۰/۰۰۱).

یافته‌های ما در جدول ۲ نشان می‌دهد که اختلاف میانگین درصد اسپرمهای رنگ گرفته با آنیلین‌بلو در دو گروه دارای لقاح کمتر و بیشتر از ۵۰درصد معنی‌دار نیست در حالی که این اختلاف در رابطه با درصد اسپرمهای CMA_3 مثبت بین دو گروه معنی‌دار است. این تفاوت می‌تواند ناشی از این مطلب باشد که رنگ‌آمیزی CMA_3، تست حساس‌تر و اختصاصی‌تر محسوب می‌شود و این تست نه تنها وجود هیستون اضافی بلکه کمبود پروتامین را نیز نشان می‌دهد (۸). بدین سبب عده‌ای از محققین استفاده از رنگ‌آمیزی CMA_3 را در آزمایشگاههای مراکز ناباروری به عنوان یک تست مناسب جهت پیشگویی قدرت باروری پیشنهاد می‌نمایند (۱۱، ۸، ۷). نکته دیگری که بایستی در نظر داشت این است که اگر DNA توسط هیستون یا پروتامین محافظت و بسته بندی نشود، آسیب‌پذیرتر خواهد بود و نهایتاً منجر به عدم خروج از تراکم کروماتین و عدم لقاح می‌شود (۲۰).

با توجه به اینکه توانایی خروج از تراکم کروماتین هسته وبدنبال آن تشکیل پرونوکلئوس جهت انجام لقاح و تکامل طبیعی جنین ضروریست در این مطالعه پایداری و قدرت خروج از تراکم کروماتین اسپرم توسط SDS، SDS+EDTA ارزیابی شد. نتایج حاصل از این مطالعه مانند گزارشات موجود در مورد IVF نشان می‌دهد که بین تست‌های مذکور و میزان لقاح در روش ICSI رابطه معنی‌داری وجود ندارد، بعلاوه اختلاف میانگین درصد اسپرمهای با سر متورم با استفاده از SDS یا SDS+EDTA در دو گروه لقاح کمتر و بیشتر از ۵۰درصد معنی‌دار نیست. در این مطالعه بیماران بر اساس درصد CAM_3 مثبت به دو گروه تفکیک شدند با توجه به مطالعه قبلی ما و تحقیقات انجام شده توسط آقای ساکاس و همکارانش (Cut off Value) CAM3 مثبت ۳۰درصد مرز بین افراد بارور از افراد نابارور می‌باشد (۸، ۲۰).

در حالیکه آقای Esterhuizen و همکارانش این مرز را ۱۳±۴۴/۵درصد در نظر گرفتند (۷). جدول ۳ نشان می‌دهد که صرفاً میانگین درصد لقاح بین دو گروه CAM_3 مثبت کمتر و بیشتر از ۳۰درصد به طور معنی‌دار اختلاف دارد.

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که در طی فرآیند اسپرمیوژنز ۸۵درصد هیستون موجود در ساختار کروماتین توسط پروتامین جایگزین می‌شود (۲۲) و هرگونه اختلال در طی این جایگزینی احتمالاً منجر به عدم موفقیت در لقاح یا ناباروری می‌شود (۲). از جمله این اختلالات که می‌توان به آن اشاره نمود عبارتند از:

۱- بیان زودرس پروتامین که منجر به تراکم پیش رس هسته و توقف در تمایز اسپرماتید می‌شود (۲۳).

۲- کاهش بیان پروتئین انتقالی منجر به توقف در بلوغ اسپرماتید می‌شود (۲۴).

۳- در بیماران با درصد بالای CMA_3 مثبت و بریدگیهای اندوژنوس DNA میزان لقاح کمتر است (۲۵).

۴- در بیمارانی که نسبت پروتامین ۱ به پروتامین ۲ افزایش یابد ناباروری وجود دارد (۲۲).

۵- درصد بیان mRNA پروتامین ۱ و II در بیماران نابارور در مقایسه با افراد طبیعی کمتر است (۲۶).

۶- عدم تشکیل پرونوکلئوس پس از لقاح می‌تواند مربوط به تراکم پیش‌رس کروماتین در اسپرمهای دارای کمبود پروتامین و یا هیستون اضافی باشد (۲۷).

بنابراین می‌توان دریافت که حذف یا کاهش اسپرمهای دارای نقص در بسته بندی کروماتین (خصوصاً CAM_3 مثبت بالا) و یا مورفولوژی غیر طبیعی جهت دستیابی به لقاح بیشتر در روش IVF یا ICSI ضروریست و برای رسیدن به این هدف درمان کلینیکی یا جراحی قبل از ART و یا شستشوی نمونه در طی ART توصیه می‌شود (۲۸، ۲۹). امروزه با استفاده از روش فلوسیتومتری اسپرمهای دارای کروموزوم Y را از اسپرمهای حاوی کروموزوم X جداسازی می‌نمایند (۳۰). در آینده نه چندان دور ممکن است متخصصین با ابداع روشهای جدید بتوانند از طریق فلوسیتومتری اسپرمهای سالم را از اسپرمهای غیرطبیعی جدا نمایند و شانس موفقیت در لقاح را افزایش دهند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری متخصصین زنان و نازایی و پرسنل آزمایشگاه نازایی مرکز باروری و و ناباروری اصفهان همچنین از همکاری مسئولین پژوهشکده رویان و همکاران بخش علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که زمینه اجرای این تحقیق را فراهم آوردند تقدیر و تشکر می‌نماییم. کلیه هزینه‌های مصرفی و غیرمصرفی این تحقیق بر بنای قرارداد شماره ۲۲۲-۲ از بودجه تحقیقاتی پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی تامین گردیده است.

References

1. Palermo G, Joris H, Devrory P, Van Steirteghem AC: Pregnancy after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte. Lancet. 1992; 3(40): 17-18

2. Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenwillen C, Tournay H, Deroey PC: Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection by subzonal insemination: Report of a second series of 300 consecutive treatment. Hum Reprod. 1993; 8: 1055-1060

3. Franken DR, Franken CJ, de la Guerre H, de Villiers A: Normal sperm morphology and chromatin packaging: Comparison between aniline blue and chromomaycin A3 staining. Androl 1999; 31: 361-366

4. Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JGH Prinsloo

van Rooyen LH: Sperm chromatin packaging as an indicator of in vitro fertilization rates. Hum Reprod. 2000; 15: 657-661
5. Liu DY, Baker H: Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro: Fertil Steril. 1992; 58(6): 1178-1184
6. Hjort T: Antisperm antibodies and infertility: an unsolvable question? Hum Reprod. 1999; 14: 2423-2426
7. Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JGH, Van Zyl C, Muller II, Van Rooyen LH: Chromatin packaging as an indicator of human sperm dysfunction. J Assist Reprod Genet 2000; 17(9): 508-514
8. Nasr Esfahani MH, Razavi S, Mardani M: Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilizatin. J Assist Reprod Genet. 2001; 18(4): 199-205
9. Gonzales GF, Salirrosas A, Dicina-Torres LN, Sanchez A, Villena A: Use of clomiphene citrate in the treatment of men with high sperm chromatin stability. Fertil Steril. 1998; 69: 1109-11114
10. Terquem A, Dadoune JP: Aniline blue staining of human spermatozoa chromatin: Evaluation of nuclear maturation. In Andr J (editor), The sperm cell, J andr (ed), London, Martinus Nijhoff publishers 1983, pp 696-701
11. Iranpour FG, Nasr Esfahani MH, Valojerdi MR, al-Taraihi TM: Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility. J Assisst. Reprod Gene. 2000; 17(1): 60-66
12. Hughes CM, Lewis SEM, Mckelvey-Martin VJ, Thompson W: The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation of human sperm DNA integrity. Hum Reprod. 1998; 2: 613-619
13. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S: A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. Fertil Steril. 1984; 42(1): 87-91
14. Spano M, Cordelli E, Leter G, Lombardo F, Lenzi I, Gandini L: Nuclear chromatin variation in human spermatozoa undergoing swim up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structural assay. Mol Hum Reprod. 1999; 5: 29-37
15. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S: Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. Fertil Steril. 1988; 49: 112-117
16. Liu DY, Johnton W, Ian H, Yrone P, Duplessis YP, Baker HWG, Nayudu PL: The use in vitro fertilization to evaluate putative tests of human sperm function. Fertil Steril. 1988; 49: 272-277
17. Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi U, Shoukir Y, Campana A: Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: Effect on fertilization and embryo development. Hum Reprod 1998; 13: 11-19
18. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y: Real-time fine morphology of motile human sperm cell is associated with IVF-ICSI outcome. J Androl. 2002; 23(1): 18
19. Esterhuizen AD, Franken DR, Becker PJ, Lourens JGH, Muller II, Van Rooyen LH: Defective sperm decondensation: a cause for fertilization failure. Androl. 2002; 34, 1-7
20. Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, BizzaroD, Wagnar I, Jaquenoud N, Manicardi G, Campana I: Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1996; 11: 837-843
21. Hammadeh ME, AL-Hassani S, Doerr S, Stiber M, Rosenbaum P, Schmidt W, Diedrich K: Comparison between chromatin condensation and morphology from testis biopsy extracted and ejaculated spermatozoa and their relationship to ICSI outcome. Hum Reprod. 1999; 14: 363-367
22. Balhorn R: A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. J Cell Biol 1982; 93: 298-305
23. Douglas T, Carrel, Lihu LIU: Altered Protamine 2 expression is uncommon in donors of know fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may relect other abnormalities of spermiogenesis. J Androl. 2001; 23(4): 604-610
24. Lee K, Haugen HS, Clegg CH, Braun RE: Premature transition of protamine 1 mRNA cause precocious nuclear condensation and arrests spermatid differentiation in mice. Proc Natl Acad Sci USA1995; 92: 12451-1245
25. Bianchi PG, Mancadri GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D: Effect of DNA protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. Biol Reprod, 1993; 49: 1038-1043
26. Steger K, Fink L, Klonisch T, Bohle RM, Bergman M: Protamine-1 and 2 mRNA in round spermatids is

associated with RNA-binding proteins. Histochem Cell Biol. 2002; 117(3): 227-234
27. Rosenbuch B: Frequency and patterns of premature sperm chromosome condensation in oocytes facility to fertilize after ICSI. J. Assist Reprod Genet. 2000; 17(5): 253-259
28. Cayan S, Erdemir F, Ozbey I, Turek PJ, Kadioglu A, Tellaloglu S: Can varicocelectomy significantly change the way couples use assisted reproductive technologies? J Urol 2002; 167(4): 1749-1752
29. Hammadeh ME, Kuhnen A, Amer AS, Rosenbaum P, Schmidt W: Comparison of sperm preparation methods: effect on chromatin and morphology recovery rate and their consequences on the clinical outcome after in vitro fertilization embryo transfer. Inter J Androl. 2001; 24: 360-368
30. Fugger EF: Clinical experience with flow cytometric separation of human X and Y chromosomes bearing sperm, Theriogenol, 1999; 52(8): 1435-1440