مقایسه ارزیابی قدرت واکنش آکروزومی اسپرم انسانی به روش رنگ‌آمیزی دوگانه و سه‌گانه و روش فلورسانس کوئیناکرین

مرتضی انوری .Ph.D☆♦، سید مهدی کلانتر .Ph.D☆، محمدحسین نصراصفهانی .Ph.D★★

☆مرکز تحقیقاتی درمانی باروری ناباروری دانشگاه شهید صدوقی یزد

★مرکز باروری و ناباروری اصفهان

★پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

♦آدرس مکاتبه: یزد، صندوق پستی ۹۹۹-۸۹۱۹۵، مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری دانشگاه شهید صدوقی یزد

چکیده

* **هدف:** این مطالعه به منظور مقایسه روش فلورسانس کوئیناکرین با روشهای رایج رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی دو گانه و سه گانه انجام گرفت.

* **مواد و روشها:** در این پژوهش ده نمونه مایه انزالی نرمال بر اساس معیارهای ۹۹ WHO انتخاب شد و با روش Percoll اسپرمهای متحرک جدا شدند، سپس درصد واکنش آکروزومی قبل و بعد از ظرفیت‌گیری و همچنین پس از القاء در حضور A23187 به مدت یک و دو ساعت به سه روش کوئیناکرین، رنگ‌آمیزی دوگانه و سه گانه ارزیابی شد.

* **یافته‌ها:** درصد واکنش آکروزومی قبل از ظرفیت‌گیری در هر سه روش یکسان بود ($P> 0.05$) ولی پس از ظرفیت‌گیری و تحریک به وسیله A23187 افزایش معنی داری یافت ($P< 0.01$). همچنین در همه موارد درصد واکنش آکروزومی در ارزیابی با روش کوئیناکرین بیشتر از دو روش دیگر بود ($P< 0.01$) و ارتباط مستقیم و معنی داری بین نتایج حاصل از هر یک از روشها وجود داشت ($P< 0.001, r= ۷$).

* **نتیجه‌گیری:** اسپرمها، پس از ظرفیت‌گیری، در حضور A23187 تحریک شده و واکنش آکروزومی انجام می‌دهند این اسپرمها را می‌توان با روش فلورسانس کوئیناکرین به عنوان یک روش آسان و سریع شناسایی کرد.

کل واژگان: واکنش آکروزومی، رنگ‌آمیزی دوگانه، رنگ‌آمیزی سه گانه، کوئیناکرین

مقدمه

واکنش آکروزومی یک فرآیند اگزوسیتوزی است که طی آن غشاء پلاسمایی سر اسپرم و غشاء خارجی آکروزوم در چندین نقطه با یکدیگر ادغام می‌شود و به دنبال آن محتویات کیسه آکروزومی آزاد غشاء داخلی آکروزوم نمایان می‌شود (۱، ۲). این فرآیند برای عبور اسپرم از سدهای محافظ تخمک و باروری آن ضروری است. تحقیقات نشان داده است که واکنش آکروزومی خود به خودی با درصد لقاح در سیکلهای IVF ارتباطی ندارد (۲) ولی قدرت واکنش آکروزومی القایی احتمالاً با قدرت لقاح اسپرم در ارتباط است (۳). در دستگاه تناسلی زن، واکنش آکروزومی توسط موادی مانند مایع فولیکولی، پروژسترون و زونا‌پلوسیدا القاء می‌شود (۲، ۴، ۵). واکنش آکروزومی همچنین می‌تواند توسط مواد مصنوعی مانند کلسیم یونوفور (A23187) در محیط آزمایشگاه نیز القاء می‌شود (۳، ۶، ۷). این ماده باعث نفوذ کلسیم به داخل آکروزوم و در نتیجه القاء واکنش آکروزومی می‌شود. درصد این نوع واکنش آکروزومی با توانایی اسپرم در ارتباط است (۳). واکنشهای آکروزومی القاء شده به وسیله کلسیم یونوفور یکی از جنبه‌های مهم عملکرد اسپرم به شمار می‌رود و میتواند در تکنولوژی تولید مثل کمکی (ART) کاربرد داشته باشد. ظرفیت‌گیری اسپرمها برای انجام واکنش آکروزومی ضروری است. این فرآیند به طور فیزیولوژیک در دستگاه تولید مثل انجام می‌شود. در آزمایشگاه نیز اسپرمها می‌توانند با قرار گرفتن در محیطهای حاوی حلقه کربس و آلبومین این فرآیند را انجام دهند (۸، ۹).

اسپرمهایی که ظرفیت‌گیری کرده، طی واکنش آکروزومی کیسه آکروزومی خود را از دست می‌دهند. مشاهده اسپرمهای آکروزومی از دست داده توسط میکروسکوپ نوری در گونه‌هایی مانند خوکچه هندی و هامستر با آکروزوم بزرگ امکان‌پذیر است (۲). ولی در اکثر پستانداران از جمله انسان، آکروزوم کوچک است و به راحتی در زیر میکروسکوپ قابل مشاهده نیست. لذا روشهای گوناگونی برای مشاهده آن ارائه شده است. برخی از این روشها عبارتند از: رنگ‌آمیزی سه‌گانه (۱۰، ۱۱)، رنگ‌آمیزی دوگانه (۱۲)، آنتی‌بادی مونوکلونال (۱۳، ۱۴)، فلورسانس ایزوتیوسیانیت چسبیده به لکتینها مانند Pisum Sativum Agglutinin و Peanut Agglutinin (۱۵)، ماده فلورسانس کلرتتراسیکلین و کوئین اکرین (۱۶)، کاربرد همزمان رنگ‌آمیزی دوگانه و واکنش قدرت حیاتی اسپرم (HOST) (۱۷)، و کاربرد رنگ هیستوشیمیای Goomassie G۲۵۰ که برای رنگ‌آمیزی آکروزوم در گونه‌های مختلف اسپرم به کار می‌رود (۱۸)، ارزیابی واکنش آکروزومی به وسیله رنگ‌آمیزی با نشانگرهای فلورسانسی می‌تواند برای پیشگویی میزان موفقیت لقاح و تصمیم‌گیری درباره اتخاذ بهترین روش درمانی برای مردان نابارور مفید باشد (۱۹).

با توجه به روشهای گوناگون برای ارزیابی واکنش آکروزومی و امکانات دسترس در آزمایشگاه، برخی از محققین تعدادی از این روشها را با یکدیگر مقایسه کرده و نتایج متفاوتی ارائه کرده‌اند (۱۱، ۱۳، ۱۶، ۱۸). از آنجا که تاکنون روش رنگ‌آمیزی کوئیناکرین که روش نسبتاً ساده و سریعی است با روشها رنگ‌آمیزی هیستولوژیکی مقایسه نشده است، در این مطالعه استفاده از روش کوئیناکرین در تعیین درصد واکنش آکروزومی و مقایسه آن با روشهای استاندارد رنگ‌آمیزی سه گانه و دوگانه مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روشها

* جمع آوری و آماده سازی نمونه

از بین مراجعین به مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری یزد تعداد ده نمونه مایع انزالی بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی (WHO) انتخاب شد (۲۰). هر نمونه انزالی پس از اینکه به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور نگهداری شد با محیط Ham´s F10 به نسبت ۱ به ۳ مخلوط و در دور ۴۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و سپس به روش پرکل اسپرمهای متحرک جداسازی شد، به ته نشین حاصل از سانتریفوژ، یک سی‌سی محیط Ham´s F10 حاوی ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سرم آلبومین انسانی (HSA) اضافه شد. بخشی از سوسپانسیون اسپرمی جهت بررسی آکروزومی برداشته شد و بقیه به منظور ظرفیت‌گیری به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و CO_2 ۵درصد نگهداری شد.

* القاء واکنش آکروزومی

سوسپانسیون اسپرمی به دست آمده در سه لوله آزمایش (فالکون) ریخته شد، به لوله اول به عنوان کنترل هیچ ماده‌ای اضافه نشد و درصد واکنش آکروزومی در آن مورد بررسی شد. به لوله دوم و سوم به عنوان آزمایش به ازای هر ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپرم ۱۰ میکرولیتر محلول کار کلسیم یونوفور (Cat# Sigma, C7522) اضافه شد تا غلظت نهایی کلسیم ۱۰ میکرومولار باشد. این دو لوله به مدت یک و دو ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و $CO_2$۵درصد نگهداری شد و سپس درصد واکنش آکروزومی در آنها بررسی شد.

* روشهای بررسی آکروزوم

الف) روش رنگ‌آمیزی سه‌گانه

در این روش ابتدا به فراکسیون متحرک به نسبت حجمی ۱ به ۱ محلول ترپان‌بلو (Sigma, Cat#T 6146) ۲درصد اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور نگهداری شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در دور ۶۰۰g و در دمای آزمایشگاه سانتریفوژ شد. به ته‌نشین لوله محیط فاقد HSA اضافه شد و یک الی چهار مرتبه شستشو شد تا سوسپانسیون اسپرمی شفاف گردید. سپس اسپرمها در گلوتار آلدهید (Merck) ۳درصد به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه فیکس شدند و پس از دو بار سانتریفوژ در آب مقطر، از آنها اسمیر تهیه شد. پس از خشک شدن، هر یک از لامها به مدت ۵ دقیقه در محلول بیسمارک براون (Sigma,Cat#B 5263) در PH نهایی ۱/۸ در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و پس از شستشوی مجدد به مدت ۳۰ دقیقه در محلول رنگی رزینگال ۰/۸ درصد با PH نهایی ۵/۳ در دمای ۲۴ درجه سانتیگراد نگهداری و پس از انجام مراحل شستشو، آبگیری؛

شفاف سازی و مونته کردن، به وسیله میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰ بررسی شدند. درصد اسپرمهای زنده که به رنگ قهوه‌ای کمرنگ بودند و ناحیه آکروزومی در آنها فاقد رنگ صورتی (قرمز) بود به عنوان اسپرمهای زنده دارای واکنش آکروزومی ثبت شدند.

ب) روش رنگ‌آمیزی دوگانه

در رنگ‌آمیزی دوگانه رنگ حیاتی تریپان‌بلو حذف گردید و سایر مراحل رنگ‌آمیزی که به ترتیب شامل فیکس کردن در گلوتارآلدهید ۳ درصد، رنگ‌آمیزی در بیسمارک براون و رزبنگال، و نهایتاً تهیه اسلاید میکروسکوپی، انجام شد و با بزرگنمایی ۱۰۰۰، درصد اسپرمهایی که واکنش آکروزومی داده‌اند، ثبت شد.

ج) روش کوئیناکرین

ابتدا از محلول ذخیره ۱۰ میلی مولار کوئیناکرین (Sigma, Cat#C3251)، محلول کار ۰/۵mM تهیه شد، سپس به ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپرم یک میکرولیتر محلول کار کوئیناکرین اضافه شد. یک قطره از سوسپانسیون اسپرم روی لامل قرار داده شده و بلافاصله به وسیله میکروسکوپ فلورسانس (Axiophot Zeiss Germany) با استفاده از یک فیلتر N با قدرت عبور طول موجهای ۵۶۰nm-۵۳۰ بررسی شد. در این روش اسپرمهایی که ناحیه آکروزومی آنها فاقد ناحیه فلورانسی روشن بود بعنوان اسپرمهای بدون آکروزوم در نظر گرفته شد.

در هر مورد از روشها فوق یکصد اسپرم از هر نمونه مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به صورت درصد ثبت شد. این مشاهدات توسط دو نفر انجام گرفت و در صورتی که اختلاف شمارش کمتر از ۱۰ درصد بود میانگین آنها ثبت در غیر این صورت تکرار گردید.

* روش آماری

با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS نسخه ۹ نتایج به دست آمده به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد و با استفاده از آزمون Paired t-test و ANOVA از لحاظ معنی‌دار بودن یا نبودن مقایسه و چنانچه مقدار P کمتر از ۰/۰۵ بود اختلاف داده‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار محسوب شد. همچنین با استفاده از آزمون پیرسون ضریب همبستگی بین داده‌ها بررسی شد.

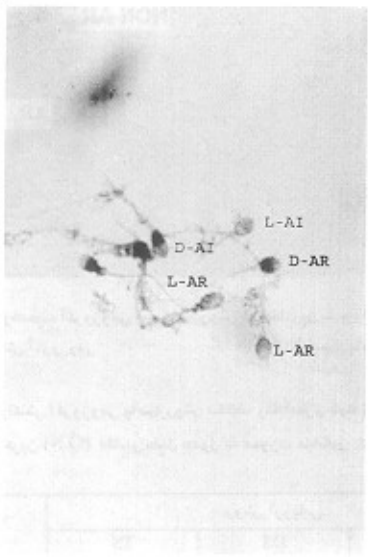
یافته‌ها

مایع انزالی به دست آمده از ۱۰ فرد سالم مراجعه کننده به مرکز ناباروری بر طبق معیارهای WHO99 مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج زیر به دست آمد:

حجم مایع منی: ۱/۸ml±۴/۵، غلظت اسپرم 10^6*۳۲/۵±۱۰۵/۲ml، حرکت (مجموع حرکتهای نوع a، b و c طبق WHO99): ٪۱۲/۳±۷۱/۴، مرفولوژی طبیعی: ٪۱۱/۳±۵۴/۸ و حرکت اسپرم پس از پرکان: ٪۶/۵±۹۲ بود.

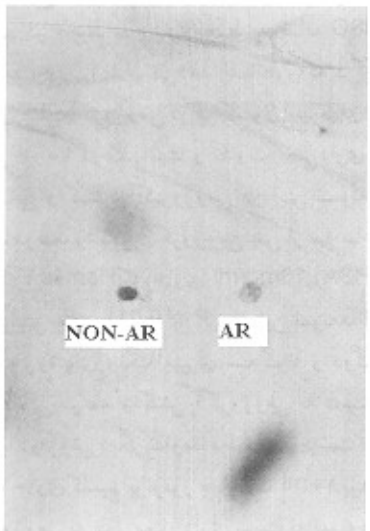
* مشاهدات میکروسکوپی وضعیت آکروزومی اسپرم

الف: در روش رنگ‌آمیزی سه‌گانه، اسپرمهای مرده به رنگ آبی و اسپرمهای زنده به قهوه‌ای کمرنگ مشاهده و اسپرمهایی که دارای آکروزوم سالم بودند، ناحیه آکروزومی در آنها صورتی تا قرمز مشاهده شد ولی در اسپرمهای بدون آکروزوم فاقد رنگ قرمز بود (شکل ۱).



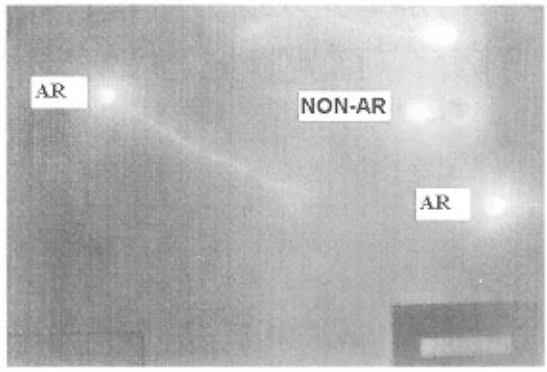
شکل ۱: مشاهده وضعیت آکروزومی اسپرم در روش رنگ‌آمیزی سه گانه با بزرگنمایی ۱۰۰۰
L-AI: اسپرم زنده با آکروزوم سالم — D-AI: اسپرم مرده با آکروزوم سالم
L-AR: اسپرم زنده بدون آکروزوم — D-AR: اسپرم مرده بدون آکروزوم

ب: در روش رنگ آمیزی دوگانه، اسپرمها در دو وضعیت مشاهده شدند. یکی اسپرمهای با آکروزوم سالم که ناحیه آکروزومی در آنها قرمز رنگ بود و دیگری اسپرمهای بدون آکروزوم که ناحیه آکروزوم آنها رنگ قرمز به خود گرفته بود (شکل ۲).



شکل ۲: مشاهده وضعیت آکروزومی اسپرم در روش رنگ‌آمیزی دو گانه با بزرگنمایی ۱۰۰۰
AR: اسپرم با واکنش آکروزومی — NON-AR: اسپرم بدون واکنش آکروزومی

ج: در روش کوئیناکرین ناحیه قدامی سر در اسپرمهایی که واکنش آکروزومی داده‌اند تیره، و در اسپرمهایی که واکنش آکروزومی نداده‌اند روشن است (شکل ۳).



شکل ۳: مشاهده وضعیت آکروزومی اسپرم، در روش کوئیناکرین با بزرگنمایی ۱۰۰۰×
AR: اسپرم با واکنش آکروزومی NON-AR: اسپرم بدون واکنش آکروزومی

جدول ۱: درصد واکنش آکروزومی با سه روش مختلف رنگ‌آمیزی سه گانه (T.S)، دوگانه (D.S) و کوئیناکرین (Q.N). مقادیر داخل جدول به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است.

نوع واکنش	روش ارزیابی		
	TS	DS	QN
قبل از ظرفیت‌گیری	۴/۸۹±۱/۰۲[a]	۶/۲۹±۲/۲۸[a]	۹/۵۱±۲/۹[a]
خود به خودی (بعد از ظرفیت‌گیری)	۱۱/۷±۳/۴[b]	۱۳/۶±۳/۳۱[b]	۱۸/۴۳±۳/۸[c]
Ca.ionophore(1h)	۲۹/۶۵±۳/۶۶[d]	۳۲/۸۲±۳/۳۳[d]	۶۸/۰۷±۳/۱۲[e]
Ca.ionophore(2h)	۲۵/۲۳±۳/۵۳[d]	۲۰/۲۲±۳/۹۳[d]	۶۹/۶۰±۴/۵۱[e]

QN کوئیناکرین، DS رنگ آکریزی دوگانه، TS رنگ‌آمیزی سه‌گانه
داده‌های دارای نشان حروفی مشابه (مانند a و a) از لحاظ آماری معنی دار نیستند ($P > 0.05$)
داده‌های دارای نشان حروفی مشابه (مانند a و b) از لحاظ آماری معنی دار هستند ($P < 0.01$)

جدول ۱ نتایج مربوط به ارزیابی درصد واکنش آکروزومی به سه روش مختلف، در محیط سرم دار، محیط به اضافه DMSO و محیط به اضافه کلسیم یونوفور را نشان می‌دهد. همانطور که در جدول مشخص است درصد واکنش آکروزومی در فراکسیون اسپرمهای متحرک حاصل از پرکل کمتر از ۱۰ درصد است و تفاوت معنی‌داری بین روشهای مختلف ارزیابی واکنش آکروزومی در این نمونه وجود ندارد ($P > 0.05$). درصد واکنش آکروزومی پس از سه ساعت انکوباسیون در محیط Ham´s F-10 که حاوی 10mg/ml (HSA) بود به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.01$). در این نمونه‌ها ارزیابی واکنش آکروزومی به روشهای رنگ‌آمیزی سه‌گانه و دوگانه مشابه بود ($P > 0.05$). ولی درصد واکنش آکروزومی به دست آمده از روش کوئیناکرین با دو روش دیگر تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.01$). در نمونه‌هایی که حاوی کلسیم یونوفور با غلظت ۱۰ml بودند میزان درصد واکنش آکروزومی به طور معنی داری نسبت به نمونه‌های بدون کلسیم افزایش نشان می‌دهد ($P < 0.01$). درصد واکنش آکروزومی در نمونه‌هایی که یک ساعت در مجاورت کلسیم یونوفور بودند در مقایسه با نمونه‌هایی که دو ساعت در مجاورت این ماده بودند تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P > 0.05$). ولی در همین نمونه‌ها روش کوئیناکرین در مقایسه با روش دیگر درصد بیشتری از واکنش آکروزومی را نشان داد ($P < 0.01$).

ارتباط بین نتایج روشهای مختلف رنگ‌آمیزی با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون، نشان داد که ارتباط مستقیم و معنی‌داری بین نتایج حاصل از هر یک از روشها وجود دارد ($P < 0.001$). ضریب همبستگی بین رنگ‌آمیزی سه گانه و دوگانه $r = 0/723$. بین رنگ‌آمیزی سه گانه و کوئیناکرین $r = 0/745$ و بین رنگ‌آمیزی دوگانه و کوئیناکرین $r = 0/794$ است که نشان دهنده یک پیوستگی بین نتایج هر یک از روشها می‌باشد.

بحث

واکنش آکروزومی، یکی از عملکردهای مهم اسپرم برای لقاح است و ارزیابی آن می‌تواند نقش مهمی در پیش گویی میزان باروری اسپرم داشته باشد (۲۱). روشهای مختلفی برای مشاهده وضعیت آکروزومی اسپرم ارائه شده است. در این مطالعه سه روش رنگ‌آمیزی سه گانه و دوگانه و روش اپی فلورسانس کوئیناکرین برای ارزیابی وضعیت واکنش آکروزومی اسپرم بررسی شد.

روش کوئیناکرین به طور پیوسته در تمام مراحل نسبت به دو روش دیگر درصد واکنش آکروزومی بیشتری را نشان داد. این موضوع مشخص می‌کند که کوئیناکرین مرحله شروع واکنش آکروزومی را نمایان می‌سازد. کوئیناکرین یک باز ضعیف است و بر روی قسمت آکروزومی اسپرمهای با آکروزوم سالم تجمع پیدا می‌کند. قسمت درونی کیسه آکروزومی اسیدی است و بنابراین PH آن با PH محیط متفاوت است. تجمع مواد فلورسانسی بر روی آکروزوم موجب تشعشع نور فلورسانسی از قسمت قدامی سر اسپرم (که توسط آکروزوم در برگرفته شده است) می‌شود (۱۶).

در شروع واکنش آکروزومی غشاء خارجی آکروزوم در چندین نقطه به غشاء پلاسمایی سر اسپرم متصل می‌شود در اثر این اتصال سوراخهایی در ناحیه آکروزومی سر اسپرم ایجاد می‌شود (۲). و ترکیبات یونی ماتریکس آکروزوم به راحتی با محیط اطراف خود مبادله می‌شد. در اثر این تبادل، PH داخل کیسه آکروزوم با محیط اطراف یکسان می‌شود و به دنبال آن آکروزوم ماده فلورسانسی کوئیناکرین از قسمت قدامی ناحیه سر پراکنده می‌شود و بنابراین قسمت قدامی سر اسپرم پرتوهای فلورسانسی خود را از دست می‌دهد.

در روش رنگ‌آمیزی سه گانه، با استفاده از رنگ تریپان بلو اسپرمهای مرده از زنده قابل تشخیص هستند. غشاء اسپرمهای زنده اجازه نفوذ رنگ به داخل سلول را نمی‌دهد ولی غشاء اسپرمهای مرده توانایی جلوگیری از نفوذ رنگ را ندارند. بنابراین در این رنگ‌آمیزی اسپرمهای مرده آبی رنگ می‌شوند. به نظر می‌رسد مکانیسم عمل تریپان بلو به مانند رنگ‌آمیزی ائوزین Y است. روش رنگ‌آمیزی سه گانه اولین بار توسط Talbot و همکارانش ارائه شد، آنها ثابت کردند که تریپان‌بلو اسپرمهای مرده را رنگ می‌کند و رنگ

رزبنگال فقط اسپرمهای دارای آکروزوم سالم را رنگ می‌کند، آنها همچنین گزارش دادند که نتایج حاصل از بررسی آکروزوم به روش Fluorescen-Ricinus Communis agglutinin Conjugated (FITC-RCA) با رنگ‌آمیزی سه‌گانه کاملاً مطابقت دارد (۱۹). مکانیسم روش رنگ‌آمیزی دوگانه نیز مانند رنگ‌آمیزی سه‌گانه‌است، با این تفاوت که در این روش اسپرمهای زنده از مرده قابل تفکیک نیستند (۱۲). با توجه به اینکه قبل از ارزیابی واکنش آکروزومی، با عمل پرکل یا Swim up اسپرمهای زنده و متحرک از سایر اسپرمها جدا می‌شوند، لذا معمولاً نتایج حاصل از روش رنگ‌آمیزی دوگانه با نتایج حاصل از روش سه گانه تفاوت معنی‌داری ندارد (۱۲، ۲۲). این مطلب با نتایج تحقیق حاضر نیز مطابقت دارد. مطالعات مشابه دیگری که توسط Risopatron و همکاران در سال ۲۰۰۱ بر روی ارزیابی واکنش آکروزومی اسپرم انسانی با استفاده از روش هیستوشیمیایی مانند رنگ‌آمیزی دوگانه (گیمسا-تریپان بلو) و رنگ‌آمیزی سه‌گانه (بیسمارک بروان - رزبنگال - تریپان بلو) در مقایسه با روش فلورسانس دوگانه (Double fluorescence) نشان داده است که درصد اسپرمهای زنده‌ای که واکنش آکروزومی داده‌اند در ارزیابی با روشهای فلورسانس دوگانه و رنگ آمیزی سه‌گانه مشابه است. ولی نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی سیتوشیمیایی دوگانه با دو روش دیگر متفاوت است (۱۰). این مشاهدات با یافته‌های این تحقیق یکسان نیست، به نظر می‌رسد علت آن مربوط به رنگهای به کار رفته در رنگ‌آمیزی سیتوشیمیایی دوگانه است. از آنجاکه به طور قطع مشخص شده است که رزبنگال ناحیه آکروزومی را رنگ می‌کند لذا توانایی رنگ گیمسا در شناسایی اسپرمهای آکروزوم دار می‌تواند مورد تردید قرار گیرد. تحقیقات دیگری نیز در مقایسه روش رنگ‌آمیزی دوگانه با سایر روشها از جمله مطالعات Kohn و همکاران در سال ۱۹۹۷ مبنی بر مقایسه روشهای رنگ‌آمیزی دوگانه، Pisum sativum agglutinin، Concanavalin A و میکروسکوپ الکترونی ترانس میشن (TEM) نشان داد که بعد از القاء واکنش آکروزومی به وسیله کلسیم یونوفور، درصد اسپرمهای آکروزوم از دست داده در هر یک از روشهای رنگ‌آمیزی دوگانه FITC، PSA و TEM یکسان است. آنها چنین پیشنهاد کردند که روشهای رنگ‌آمیزی دوگانه و FITC-PSA اسپرمهایی راکه به طور کامل یا ناقص آکروزوم خود را از دست داده‌اند مشخص می‌کنند (۲۲). مکانیسم عمل و محل دقیق اتصال رنگ رزبنگال به ناحیه آکروزومی هنوز به خوبی مشخص نیست، ولی معلوم شده است که همزمان با ترشح ماتریکس آکروزومی به خارج رنگ شدن ناحیه آکروزومی توسط رزبنگال کاهش می‌یابد (۱۱). رزبنگال بر روی نواحی هیدروفوبیک غشاء پلاسمایی جذب می‌شود در حالی که غشاء آکروزومی داخلی نمایان شده اسپرم سرشار از گلیکوپروتئینهای هیدروفیلیک است و توانایی جذب رنگ رزبنگال را ندارد (۲۳). لذا به نظر می‌رسد این روش یک نوع رنگ‌آمیزی منفی برای شناسایی واکنش آکروزومی است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در صد واکنش آکروزومی در روش رنگ‌آمیزی دوگانه کمی بیشتر از روش سه‌گانه است و به نظر می‌رسد دلیل آن شمارش اسپرمهای مرده‌ای است که در اثر دژنراسیون آکروزوم خود را از دست داده‌اند. البته با توجه به اینکه بیش از ۹۰درصد از اسپرمها پس از انجام پرکال متحرک می‌باشند. تعداد اسپرمهای مرده‌ای که ممکن است در اثر مرگ سلولی غشاء آکروزومی خود را از دست داده باشند نیز زیاد نیست و از لحاظ آماری روش دوگانه و سه‌گانه تفاوت معنی داری را در ارزیابی آکروزوم نشان نمی‌دهد. در این راستا مطالعات Baker و Liu در سال ۱۹۹۸ نیز نشان داد که یک ارتباط قوی بین نتایج حاصل از واکنش آکروزومی القاء شده توسط کلسیم یونوفور در اسپرمهای مرده با میزان واکنش آکروزومی القایی درکل اسپرمهای موجود در نمونه (زنده و غیر زنده) وجود دارد (۲۱). درصد واکنش آکروزومی پس از ظرفیت‌گیری اسپرمها و همچنین پس از یک ساعت مجاورت با کلسیم یونوفور افزایش می‌یابد، این نتایج نشان می‌دهد ظرفیت‌گیری باعث افزایش القاء واکنش آکروزومی می‌شود. این موضوع مؤید این نظریه است که اسپرمها جهت انجام واکنش آکروزومی باید متحمل فرایند ظرفیت‌گیری شوند و بدین منظور لازم است برای مدت معلومی در محیط سرم دار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شوند (۱۲، ۲۲). حضور کلسیم خارج سلولی برای انجام واکنش آکروزومی ضروری است. مایع فولیکولی و پروژسترون از راههای فیزیولوژیکی باعث افزایش کلسیم داخل سلولی می‌شوند (۲، ۴، ۵، ۲۳، ۲۴، ۲۵). ولی کلسیم یونوفور (A23187) با میان بر (by pass) مکانیسمهای تنظیم داخل سلولی باعث ورود کلسیم به درون سلول می‌شود. مکانیسم اسپرمهایی که در معرض کلسیم یونوفرر قرار می‌گیرند و برای انجام واکنش آکروزومی احتیاج به ظرفیت‌گیری دارند، هنوز مورد بحث است (۸). در مورد غلظت و مدت زمان لازم برای القاء واکنش آکروزومی توسط کلسیم یونوفور گزارشات متفاوتی وجود دارد (۱۲، ۱۳، ۲۲، ۲۶). ولی مشخص است که ورود کلسیم از محیط خارج سلولی به سیتوزول اسپرم برای انجام واکنش آکروزومی ضروری است (۲، ۲۷).

اسپرمها پس از ظرفیت‌گیری در حضور A23187 تحریک شده و واکنش آکروزومی انجام می‌دهند. این اسپرمها را می‌توان علاوه بر روشهای رایج هیستوشیمیایی از طریق روش فلورسانس کوئیناکرین به عنوان یک روش سریع و آسان شناسایی کرد. بنابراین پیشنهاد می‌شود در مواردی که توانایی انجام واکنش آکروزومی اسپرم مورد سوال است به ویژه در سیکلهایی که مشکل زنانه وجود ندارد و نتایج لقاح کاملاً ناموفق (TFF) است و یا در مواردی که نتایج لقاح سیکلهای ICSI احتمالاً به دلیل کاهش میزان کلسیم مورد نیاز، پایین است از این روش برای شناسایی توانایی انجام واکنش آکروزومی اسپرمها استفاده نمود.

References

1. Brucker C, Lipford GB: The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanism. An update. Hum Reprod Update 1995; 1: 51-62

2. Yanagimachi R: Mamalian Fertilization in Knobil E,

and Neil ID (Eds) the physiology of Reproduction second Edition. Raven press New York 1994 PP 189-317
3. Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL, Hartmann PE: A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. Relationship to fertility and other seminal parameters. J Androl 1991; 12(2): 98-103
4. Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JG, Van Rooyen LH: Clinical importance of zona pellucida-induced acrosome reaction and its predictive value for IVF. Hum Reprod. 2001; 16(1): 138-144
5. Du Plessis SS, Page C, Franken DR: The zona pellucida-induced acrosome reaction of human spermatozoa involves extracellular signal-regulated kinase activation. Andrologia. 2001; 33(6): 337-342
6. Kalantar SM., Lenton EA, Cooke ID: Evaluating the ability of biological substances for induction of acrosome reaction in normozoospermic samples. MEFSJ. 2000; 5(2): 108-114
7. Calvo L, Dennison-Lagos L, Banks SM, Dorfmann A, Thorsell LP, Bustillo M, Schulman JD, and Sherins RJ: Acrosome reaction inducibility predicts fertilization success at in-vitro fertilization. Hum Reprod. 1994; 9(10): 1880-1886
8. Brewis IA, Moore HD: Molecular mechanisms of gamete recognition and fusion at fertilization. Hum Reprod. 1997; 12(11): 156-165
9. Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Forti G: Signal transduction pathways in human spermatozoa. J Reprod Immunol 2002. 53(1-2): 121-131
10. Risopatron J, Pena P, Miska W, and Sanchez R: Evaluation of the acrosome reaction in human spermatozoa: comparison of cytochemical and fluorescence techniques. Andrologia. 2001; 33(2): 63-67
11. Talbot P, Chacon RS: A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. J Exp Zool 1981; 215(2): 201-108
12. De Jonge CJ, Mack SR, Zaneveld LJ: Synchronous assay for human sperm capacitation and the acrosome reaction. J Androl. 1989; 10(3): 232-239
13. Fenichel P, Hsi BL, Farahifar D, Donzeau M, Barrier-Delpech D, Yehy CJ: Evaluation of the human sperm acrosome reaction using a monoclonal antibody, GB24, and fluorescence-activated cell sorter. J Rep Fertil 1989; 87(2): 699-706
14. Moore HD, Smith CA, Hartman TD, Bye AP: Visualization and characterization of the acrosome reaction of human spermatozoa by immunolocalization with monoclonal antibody. Gam Res 1987; 17: 245-249
15. Mortimer D, Curtis EF, Miller RG: Specific labeling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. J Rep Fertil 1987; 81: 127-136
16. Amin AH, Bailey JL, Storey BT, Blasco L, Heyner S: A comparison of three methods for detecting the acrosome reaction in human spermatozoa. Hum Rep 1996. 11(4): 741-745
17. Glazier DB, Marmar JL, Diamond SM, Gibbs M, Corson SL. Related Articles A modified acrosome induction test. Arch Androl 2000; 44(1): 59-64
18. Larson JL, Miller DJ: Simple histochemical stain for acrosome on sperm from several species. Mol Rep Dev 1999; 52(4): 445-449
19. Patrat C, Serres C, Jouannet P: The acrosome reaction in human spermatozoa. Biol Cell. 2000; 92(3-4): 255-266
20. Word health organization (WHO) manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction 4th ed. N. Y. Cambridge University press 1999, pp: 4-34
21. Liu DY, Baker HW: Calcium ionophore-induced acrosome reaction correlates with fertilization rates in vitro in patients with teratozoospermic semen. Hum Rep 1998; 13(4): 905-910
22. Kohn FM, Mack SR, Schill WB, Zaneveld LJ: Detection of human sperm acrosome reaction: comparison between methods using double staining, Pisum sativum agglutinin, concanavalin A and transmission electron microscopy. Hum Reprod. 1997; 12(4): 714-721
23. Kuroda Y, Kaneko S, Oda T, Yoshimura Y, Nozawa S: Quantitative assessment of human sperm acrosome reaction by using fluorescein isothiocyanate conjugated concanavalin A--comparison between highly purified acrosome reacted with non-acrosome reacted sperm. Arch Androl 1998; 40(3): 215-224
24. Franken DR, Bastiaan HS, and Oehninger SC: Physiological induction of the acrosome reaction in human sperm: validation of a micro assay using minimal volumes of solubilized, homologous zona pellucida. J Assist Rep Gen 2000; 17(7): 374-8
25. Kumar S, Ying YK, Hong P, Maddaiah VT: Potassium increases intracellular calcium simulating progesterone action in human sperm. Arch Androl

2000; 44(2): 93-101
26. Aitken RJ, Buckingham DW, Fang HG: Analysis of the responses of human spermatozoa to A23187 employing a novel technique for assessing the acrosome reaction. J Androl 1993; 14(2): 132-141
27. Zeginiadou T, Papadimas J, Mantalenakis S: Acrosome reaction: methods for detection and clinical significance Androl 2000; 32(6):335-343