

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

حسین مزدارانی Ph.D.✱، فرین عقدایی M.Sc.✱

✱ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه رادیولوژی

✱ جهاد دانشگاهی علوم پزشکی ایران، پژوهشکده رویان

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

### چکیده

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

**\* مواد و روشها:** تعداد ۳۶۴ تخمک که ۴۸-۴۶ ساعت بعد از مجاورت یا تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم لقاح نیافتند، بررسی شدند. قشر شفاف تخمکها با استفاده از محلول اسید تایرود برداشته شد و سپس تحت تأثیر شوک هیپوتونیک، متشکل از کلرید پتاسیم، آب مقطر و سترات سدیم قرار گرفت. تخمکها در سه مرحله با گذراندن از محلولهای مختلف فیکساتیو، تثبیت شدند و با روش air-dry تارکروسکی، لام تهیه شد. لامهای تهیه شده با گیمنسای ده درصد رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی  $\times 1000$  بررسی شدند.

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

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

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



## مقدمه

در سلولهای گیاهی و جانوری کروموزومها را می‌توان به صورت اجسام سلولی مجزای از هم در یک دوره کوتاهی از چرخه سلول یعنی میتوز یا میوز مشاهده کرد. در سرتاسر دوره بین میتوزی که در سلولهای جانوری بین ۱۰ تا ۴۰ ساعت متغیر است، کروموزومها به صورت به هم آمیخته و غیرقابل تشخیص از یکدیگر، در هسته سلول قرار دارند. مولکول DNA همراه با پروتئینهای هستون و غیرهستون با پیچشهای متعددی، فبرکروماتین را با ضخامت ۲۳۰۰Å ایجاد می‌کند (۲،۱). این فبرها در زمان تقسیم سلول، به شکل کروموزوم فشرده، فرآیند توزیع مساوی مواد ژنتیکی را بین دو هسته دختر تسهیل می‌کنند.

برای اولین بار Johnson و Rao (۳) نشان دادند که تلفیق یک سلول انترفازی با یک سلول متافازی منجر به تراکم سریع کروموزومهای سلول انترفازی می‌شود. این القای تراکم کروموزومی در یک هسته انترفازی تراکم پیش‌رس کروموزوم (PCC) نامیده شد. مورفولوژی کروموزومهای تراکم شده پیش‌رس، بر اساس مرحله سلولهای انترفازی در زمان تلفیق سلول، متفاوت است. بنابراین PCC سلولها در مرحله G<sub>1</sub> بسیار طویل و تک کروماتیدی است؛ درحالی‌که کروموزومهای G<sub>2</sub> طویل و دو کروماتیدی هستند. PCC در مرحله S، ظاهری قطعه قطعه دارد.

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

بررسی کروموزومهای سلولهای جنسی در مراحل تقسیمهای میتوزی اسپرماتوگونی یا اووگونی میر است. Johnson و همکاران پس از معرفی روش PCC، برای بررسی کروموزومهای سلولهای متمايز، به بررسی تلفیق اسپرم گاو و سلولهای میتوزی پرداختند و مشاهده کردند که سلول میتوزی حاوی یک مجموعه هاپلوئید PCC، از نوع G<sub>1</sub> است. دیگر آزمایشهای مستلزم تلفیق سلولهای میتوزی و تخمکها (۴) و همچنین تزریق عصاره سلولهای میتوزی به تخمکها (۵)، نشان می‌دهد که سلولهای ژرمینال می‌توانند به عوامل میتوزی پاسخ دهند؛ همان‌گونه که سلولهای سوماتیک توانایی پاسخ به عوامل میوزی را دارا هستند (۶).

موفقیت لقاح آزمایشگاهی به تراکم صحیح و کامل کروموزومهای اسپرم در تخمک متوقف شده در مرحله متافاز II بستگی دارد. در لقاح آزمایشگاهی معمولی (IVF)، تلفیق اسپرم - تخمک نتیجه مشارکت هسته اسپرم بدون غشاء است که فوراً برای عوامل اووپلاسمی، مانند عامل تسریع بلوغ (MPF)<sup>۱</sup>، قابل دسترسی است (۸،۷).

در روش لقاح آزمایشگاهی با تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) که دریچه‌ای را برای درمان نابرابری male factor شدید، گشود (۹-۱۱)، اسپرم تزریق شده در تخمک در غشاء خود محصور بوده و با این شرایط تحت تأثیر اووپلاسم و عوامل آن قرار می‌گیرد. بدین دلیل، می‌توان انتظار داشت که رفتار اسپرم در اووپلاسم در روش ICSI و IVF، وقتی که لقاح صورت نمی‌گیرد، متفاوت باشد و در واقع

مشاهدات گزارش شده نیز مبین وجود چنین تفاوتی است (۱۲،۱۳). در IVF معمولی، عوامل سیتوپلاسمی تراکم کروموزوم یک تخمک متوقف شده در متافاز II می‌تواند تراکم پیش‌رس کروموزومی هسته اسپرم داخل شده به درون آن را القا نماید (۱۴)؛ مانند پدیده‌ای که Rao و Johnson برای تلفیق سلولها در مراحل مختلف چرخه سلولی (میتوز - اینترفاز) نشان دادند.

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

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

قبلاً فراوانی PCC در روش IVF به‌طور متفاوت ۱۶-۴ درصد و در یک مورد وفور این ناهنجاری تا ۲۸ درصد هم گزارش شده است (۱۴، ۱۷، ۲۰). این فراوانی برای روش ICSI حدود ۲۸ درصد مشاهده شد (۲۱).

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

## مواد و روشها

تخمکهایی که ۴۸-۴۶ ساعت بعد از مجاورت یا تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم، لقاح نیافته بودند، بررسی شدند. عدم تشکیل دو پرونوکلئای نر و ماده، نشانه عدم لقاح است. تعداد ۹۱ تخمک لقاح نیافته با روش IVF و ۲۷۳ تخمک لقاح نیافته با روش ICSI برای مطالعات سیتوژنتیکی - سیتولوژیکی به آزمایشگاه منتقل شدند.

روش سیتوژنتیکی مورد استفاده، تلفیق روشهای Tarkowski (۲۲) و Kamiguchi و همکاران (۲۳) با انجام اصلاحاتی در برخی از مراحل بود. به‌طور خلاصه در این روش ابتدا تخمکها از محیط کشت به قطره‌ای از محلول اسید تایرود منتقل شدند تا قشر شفاف<sup>۲</sup> برداشته شود. از بین رفتن قشر شفاف در زیر استریومیکروسکوپ تعقیب شد تا به غشای سیتوپلاسمی تخمک آسیبی وارد نیاید و به‌موقع به محلول هیپوتونیک منتقل شود. محلول هیپوتونیک مورد استفاده متشکل از مخلوط کلریدپتاسیم ۵۶/۰ درصد، آب مقطر و سیترات سدیم ۱/۹۳ درصد به نسبت ۳:۱:۱ بود. تخمک به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در این محلول قرار داده شد. پس از ایسن مدت باید اندازه تخمک ۱/۵ برابر اندازه اولیه‌اش باشد که در زیر میکروسکوپ، کاملاً قابل تشخیص است.

1. Maturation Promoting Factor
2. Zona pellucida



### یافته‌ها

از ۳۶۴ تخمک آماده شده که فاقد پرونوکلئ بودند، ۹۱ مورد مربوط به بیماران IVF با میانگین سنی  $29/74 \pm 5/5$  سال و بقیه مربوط به بیماران ICSI با میانگین سنی  $31/27 \pm 5/3$  سال بود. نتایج کلی این بررسی سیتوژنتیکی - سیتولوژیکی در جدول ۱ خلاصه و یافته‌ها به این ترتیب نشان داده شده است:

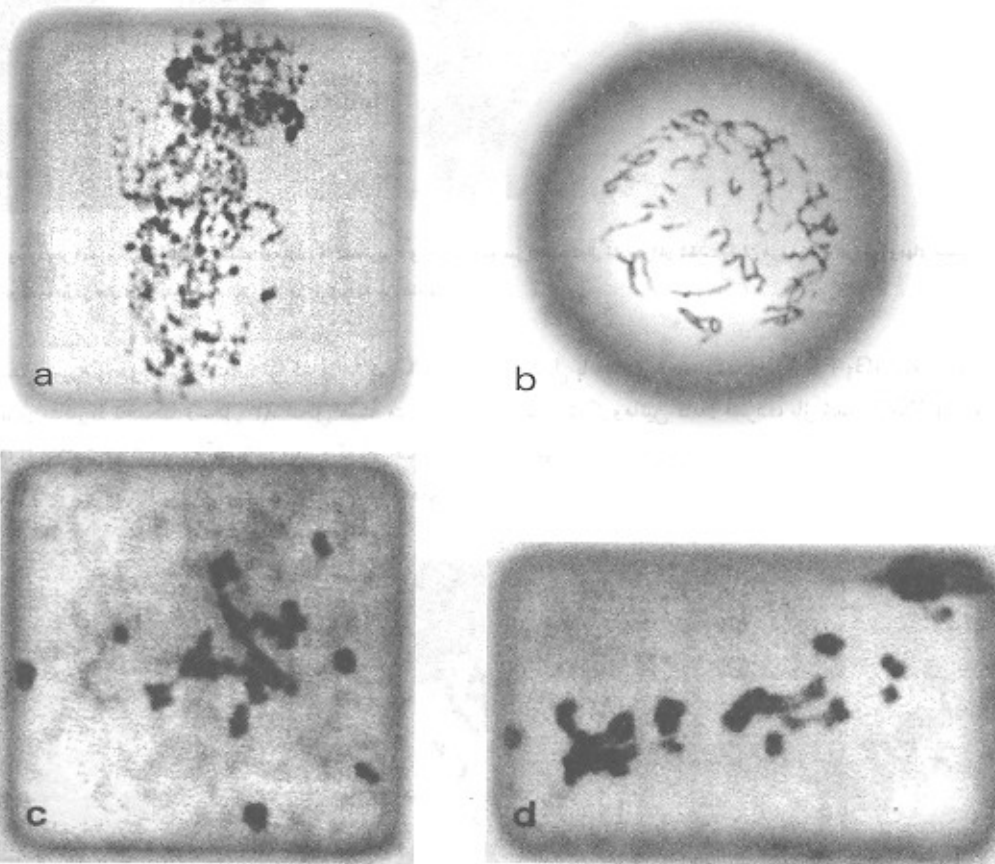
۱- تخمکهای با کروماتین نامتراکم و یا کروموزومهای در حال دژنراسیون (شکل ۱).

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

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

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

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

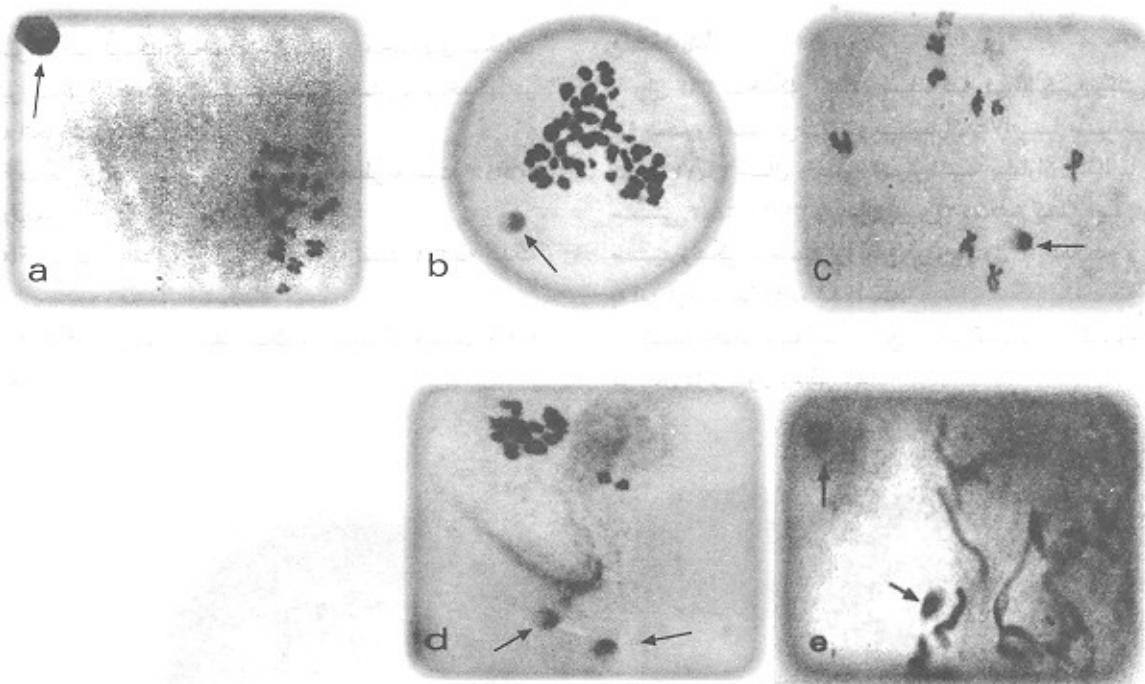


شکل ۱: تخمکهای با کروماتین نامتراکم (a) PCC کروموزوم (b) و کروموزومهای در حال دژنراسیون (c) (رنگ‌آمیزی گیمسا، بزرگنمایی  $\times 1000$ )

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

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

کلیه مراحل تثبیت در مجاورت هوای گرم و مرطوب انجام شد. سپس لامها به مدت ۵ دقیقه در هوای اتاق قرار داده شد تا کاملاً خشک شوند. لامهای خشک شده در محلول گیمسای ده درصد رنگ‌آمیزی شدند. بررسی تخمکها زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی  $\times 1000$  انجام شد. آنالیز نتایج بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و روش آماری  $\chi^2$  انجام شد.

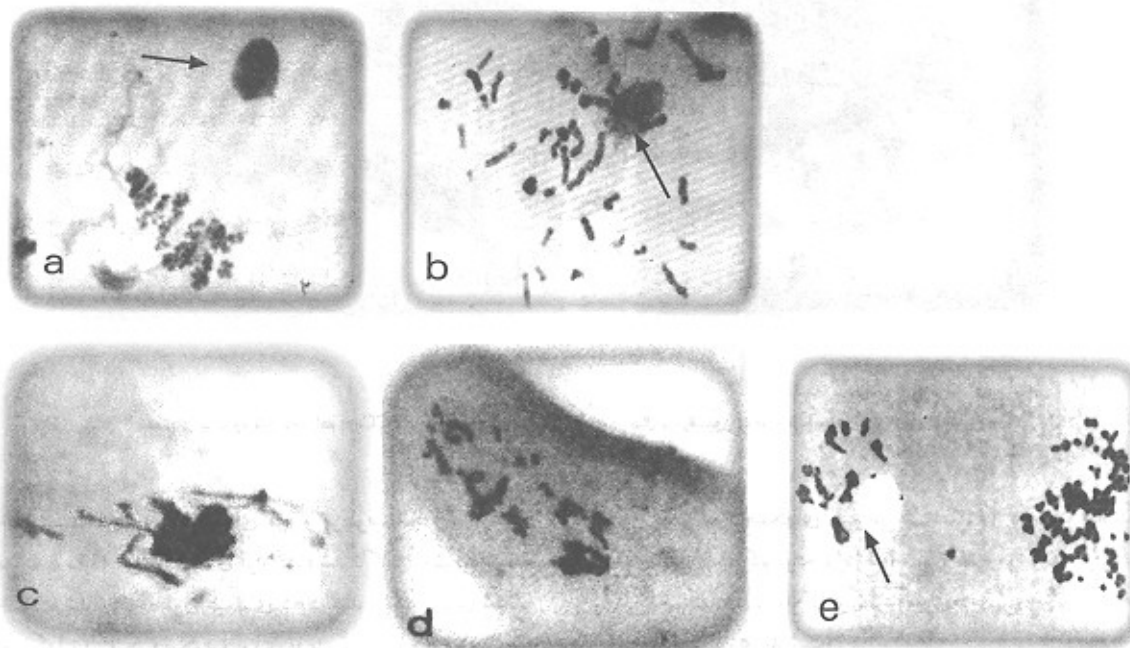


شکل ۲: وجود سر اسپرم فعال نشده در تخمکهای متافاز II. تصاویر c و d وجود دو سر اسپرم فعال نشده را در تخمک نشان می‌دهند که کروموزومهای تخمک نیز در این دو تصویر در حال دزتراسیون هستند (رنگ‌آمیزی گیمسا، بزرگنمایی  $\times 1000$ ).

طویل با عناصر تک رشته‌ای ( $G_1$ -PCC)، متغیر است. این تغییرات به صورت کروماتین کاملاً فشرده، باز شده،  $G_1$ -PCC و کاملاً  $G_2$ -PCC مشهود است (شکل ۳).

۳- هسته قابل تشخیص اسپرم با درجات مختلف تراکم و علائم PCC در کنار کروموزومهای متافاز II تخمک (شکل ۳). شکل هسته متراکم شده پیش‌رس اسپرم، از یک توده کروماتین کاملاً متراکم (که اطراف آن ناحیه نسبتاً نامتراکمی وجود دارد) تا یک ساختار نامتراکم با رشته‌های

۱۴



شکل ۳: کروماتین اسپرم با درجات متفاوت تراکم در تخمک. سر اسپرم با کروماتین متراکم (a)، کروماتین متراکم در حال باز شدن در اطراف (b)، کروماتین نامتراکم با رشته‌های طویل در اطراف (c)،  $G_1$ -PCC (d) و  $G_2$ -PCC (e) (رنگ‌آمیزی گیمسا، بزرگنمایی  $\times 1000$ ).

ورود به غشای پلاسمایی باید تحت واکنش آکروزوم تخمک قرار گیرد و این تلفیق می‌تواند منجر به ایجاد علامتی برای فعال شدن شود. در هر حال اگر تخمک فعال نشود و در متافاز II باقی بماند، عوامل تراکم کننده کروموزوم در اوپلاسم، به داخل هسته اسپرم مهاجرت نموده و PCC را القا می‌نماید (۳). از طرف دیگر، روش بی‌حرکت کردن اسپرم (با شکستن فلازل) در حین ICSI منجر به آسیب غشای پلاسمایی شده و به نظر می‌رسد که یکی از دلایل نامتراکم شدن (بازشدن) هسته اسپرم و لقاح طبیعی باشد (۲۷-۲۴، ۱۲). این مطلب مبین آن است که عوامل اوپلاسمی قادر به نفوذ به درون غشای پلاسمایی اسپرم دست نخورده نیستند و لذا تغییری در شکل سر اسپرم ایجاد نمی‌شود (شکل ۲). اینکه آیا درجه آسیب غشای اسپرم می‌تواند در تراکم نسبی هسته اسپرم متراکم شده پیش‌رس تأثیری داشته باشد یا خیر، مشخص نشده است، اما احتمال دارد آسیب جزئی باعث شود عوامل اوپلاسمی فقط در اطراف هسته، PCC را القا کنند؛ در حالی که بخش داخلی دست نخورده و متراکم باقی بماند. این پدیده که مشابه آن در شکل ۳ نشان داده شد، با بررسیهای میکروسکوپ الکترونی Tesarik و Sousa (۲۸) که نشان دادند کروماتین هسته اسپرم بعد از ICSI به استثنای لایه نازک و کم تراکم اطراف آن بسیار متراکم است، مطابقت دارد.

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

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

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

PCC کروموزومهای اسپرم که اغلب در مرحله G<sub>1</sub> بود با دامنه‌ای بین ۵ تا ۲۱/۴ درصد مشاهده شد که بیشترین موارد مربوط به تخمکهای بیمارانی بود که عارضه عدم تخمک‌گذاری داشته‌اند (۲۱/۴ درصد). در بعضی از موارد PCC-G<sub>2</sub> نیز مشاهده شد (شکل ۳). در تخمکهای لقاح نیافته بعد از روش ICSI، در ۱۲۷ تخمک (۴۶/۵ درصد) سر اسپرم به وضوح مشاهده شد (جدول ۱).

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

مشاهده	روش لقاح آزمایشگاهی	
	IVF	ICSI
تعداد تخمکهای بررسی شده	۹۱	۲۷۳
تخمکها با کروماتین نامتراکم	۶(۶/۶)	۱۸(۶/۶)
تخمکها با کروموزومهای در حال دناتوراسیون	۸(۸/۸)	۱۳(۴/۸)
تخمکها همراه با سر اسپرم	۲۶(۲۹/۵)	۱۲۷(۴۶/۵)
PCC اسپرم	۸(۸/۸)	۴۲(۱۶/۱)

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

## بحث

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

چنانکه در جدول ۱ دیده می‌شود، فراوانی تخمکهای دارای سر اسپرم دست نخورده در تخمکهای لقاح نیافته با روش ICSI بیشتر از روش IVF است. در روش ICSI، کل اسپرماتوزوآ در غشای خود به داخل تخمک وارد می‌شود، در حالی که در IVF اسپرماتوزوآ قبل از

ناهنجاریهای دوک یا اسکلت سلولی در بخشی از تخمک روی دهد که منجر به توقف آن در متافاز II و عدم رهاسازی دومین گویچه قطبی شود. به علاوه، شرایط کشت نامناسب در حین انجام روش ICSI (مثل تغییر pH محیط) ممکن است موجب عدم پیشرفت بیشتر تخمک شود. اگرچه احتمال دارد مشاهده PCC به غیر طبیعی بودن اسپرم، ربط داده شود، بویژه آنکه در بیشتر موارد بیماران مرد از تعداد کافی اسپرم برخوردار نبودند، اما مواردی وجود دارد که می‌تواند این تصور را کم‌رنگ نماید؛ از جمله انجام ICSI بعد از عدم موفقیت با IVF (علیرغم کیفیت طبیعی اسپرم) و انتخاب اسپرم با ظاهر طبیعی برای تزریق. به علاوه، نشان داده شد که با روش ICSI، اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی می‌توانند جئینهای طبیعی پدید آورند (۴۲،۲۵).

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

### تقدیر و تشکر

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

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

شواهد بسیاری نیز وجود دارد که نشان می‌دهد تحرکات یونهای کلسیم  $Ca^{2+}$  در محیط لازمه فعال شدن تخم برای لقاح است (۳۸). به عبارت دیگر، اثر اسپرم بر تخمکهای انسان، بعد از ICSI به جنبش یونهای کلسیم بستگی دارد. بنابراین شاید بتوان گفت که فعال نشدن تخمک، ناشی از عدم رهایی یک عامل فعال کننده از سوی اسپرم است. اگر اجزای میتوزولی اسپرم برای فعال شدن تخمک بعد از ICSI ضروری باشد، فقدان این عامل در بعضی از اسپرمها مانع فعال شدن می‌شود (۲۶،۱۳). از طرف دیگر، دلایلی وجود دارد که نشان می‌دهد طول کروموزومهای متراکم شده پیش‌رس بیانگر وضعیت هسته سلول در چرخه سلول است (۳۹). وجود  $G_1$ -PCC می‌تواند مبتنی بر عدم بلوغ تخمک باشد (۴۰، ۱۸). با در نظر گرفتن  $G_1$ -PCCهای مشاهده شده در روش ICSI می‌توان این پدیده را به تولید غیرطبیعی تخمکهای نابالغ از نظر سیتوپلاسمی نسبت داد (۴۱). اخیراً نشان داده شده است که روش تحریک با GnRHα منجر به افزایش فراوانی این پدیده می‌شود (۱۶). این نقص در باروری، در ۲۰ درصد تخمکها مشاهده شد، در حالی که فقط در ۳ درصد تخمکهایی که از بیماران بدون درمان با آگونیست گرفته شده بود، مشاهده شد. همچنین با مشاهده فراوانی بیشتر PCC در روش ICSI نسبت به IVF در این مطالعه، باید به آسیبهای تخمک در انجام ICSI توجه داشت؛ احتمال دارد در نتیجه ورود پسیت،

4

### References

1. Ris H: A study of chromosomes with the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol* 1956; 2: 385-391
2. Abuelo JG, Moore DE: The human chromosome. Electron microscopic observations on chromatin fiber organization. *J Cell Biol* 1969; 41: 73-90
3. Johnson RT, Rao PN: Mammalian cell fusion: Induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature, London* 1970; 226: 717-722
4. Balaker H: Induction of maturation in small oocytes from sexually immature mice by fusion with meiotic or mitotic cells. *Exp Cell Res* 1978; 112: 137-141
5. Sunkara PS, Wright DA, Rao PN: Mitotic factors from

- mammalian cells induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in amphibian oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 2799-2802
6. Ziegler P, Masui Y: Control of chromosome behavior in amphibian oocytes I. The activity of maturation oocytes inducing chromosome condensation in transplanted brain nuclei. *Dev Biol* 1973; 35: 283-292
7. Masui Y, Markert CL: Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 1971; 117: 129-146
8. Murray AW, Kirschner MW: Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 1989; 339: 275-280



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



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

