Archive of SID

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

محمد مردانی .Ph.D☆، شهناز رضوی .M.Sc☆، محمد حسین نصراصفهانی .Ph.D☆★♦
سید اسدا... کلانتر .M.D★، ابراهیم اسفندیاری .Ph.D☆

☆ دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکدهٔ پزشکی، گروه علوم تشریح

★مرکز باروری و ناباروری اصفهان

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

چکیده

* **هدف:** بررسی ارتباط بین پارامترهای اسپرمی به‌ویژه مرفولوژی با میزان لقاح و اختلالات کروماتین

* **مواد و روشها:** در ۱۰۱ زوج نابارور مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان همزمان با انجام لقاح آزمایشگاهی IVF (In Vitro Fertilization) تستهای ارزیابی کیفیت کروماتین (تست اکریدین اورانژ، آنیلین بلو، کرومومایسین A_3 و سدیم دودسیل سولفات) و آنالیز سمن انجام گرفت؛ علاوه بر این با استفاده از رنگ‌آمیزی پاپانیکولا ناهنجاریهای مرفولوژیک طبق معیارهای WHO تعیین شد. در هر نمونه ۲۰۰ اسپرم بررسی و درصد رنگ پذیری در هر روش و ناهنجاریهای مرفولوژیک محاسبه شد.

* **یافته‌ها:** بالاترین رابطه معنی‌دار با مرفولوژی اسپرم به ترتیب مربوط به روش CMA_3(Chromomycin A_3) و آنیلین بلو است. روش logistic regression مشخص نمود که از بین پارامترهای بررسی شده اسپرمی به ترتیب مرفولوژی اسپرم و روش CMA_3 به طور مستقل بر لقاح تأثیر دارد؛ در حالی که از بین تستهای ارزیابی کروماتین، روش CMA_3 به عنوان یک فاکتور مستقل بر مرفولوژی اسپرم اثرگذار است. منحنی ROC: Reciever) (Operating Curve نیز مؤید این نکته است که روش CMA_3 در مقایسه با آنیلین بلو از حساسیت و اختصاصی بودن بالاتری برخوردار است.

* **نتیجه گیری:** با توجه به اهمیت مرفولوژی در میزان موفقیت لقاح و قدرت تست CMA_3 در شناسایی و تمایز مرفولوژی غیرطبیعی اسپرم پیشنهاد می‌شود که ارزیابی کروماتین به روش CMA_3 به‌عنوان یک تست تکمیلی برای پیشگویی میزان موفقیت در لقاح آزمایشگاهی انجام شود.

کل واژگان: مرفولوژی اسپرم، کروماتین، CMA_3، لقاح آزمایشگاهی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

غالباً قضاوت در مورد قدرت باروری بر اساس نتایج پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مرفولوژی) صورت می‌گیرد و مطالعات انجام شده حاکی از آن است که مرفولوژی اسپرم مهمترین فاکتور در تعیین میزان موفقیت در لقاح آزمایشگاهی IVFمحسوب می‌شود؛ اما در اسپرمهای با مرفولوژی طبیعی وجود آنومالیهای مخفی در کروماتین می‌تواند میزان موفقیت لقاح راکاهش دهد. با توجه به اهمیت مرفولوژی و وضعیت کروماتین در رابطه با میزان لقاح در طی مرحلهٔ اسپرمیوژنز تغییرات برجسته‌ای در مرفولوژی اسپرماتید رخ می‌دهد که این تغییرات مرفولوژیک همراه با یک سری تغییرات در ترکیب پروتئینهای متصل به DNA است؛ از جملهٔ این تغییرات قرارگرفتن پروتامین سرشار از آرژینین و سیستئین به جای هیستون سوماتیک غنی از لیزین است که تراکم کروماتین را به‌دنبال خواهد داشت (۱). پس از آن کروماتین با تشکیل باندهای دی‌سولفید بین ریشه‌های سیستئینِ پروتامین در طی عبور از اپی‌دیدیم به‌طور نسبی پایدار می‌شود (۲) و هنگامی‌که اسپرم در مجاورت با Zn^{+2} موجود در ترشحات غدهٔ پروستات قرار می‌گیرد پایداری کروماتین به‌طور مطلوب حاصل می‌شود (۳). این ساختار طبیعی کروماتین علاوه بر اینکه در حفاظت از محتویات ژنتیکی DNA در مقابل عواملی چون پروتئازها، نوکلئازها، دناتوره شدن DNA و کلیواژ DNA اهمیت دارد (۴، ۵) در مرفوژنز طبیعی (۱۰-۷)، تسهیل در انتقال اسپرم (۱) و جلوگیری از تراکم زودرس کروماتین پس از لقاح (۶) نیز تأثیر دارد.

تحقیقات نشان می‌دهد که محتویات DNA اسپرماتوزوآ ممکن است تغییراتی را در مرفولوژی اسپرم القا نماید و شکل نهایی هستهٔ اسپرم که در هر گونه اختصاصی است بستگی به تراکم کروماتین دارد. ساختار کروماتین در طی فرآیند اسپرمیوژنز به‌طور دقیق در داخل هستهٔ اسپرم سازماندهی می‌شود (۷، ۱۰). وجود اسپرمهای با مرفولوژی غیرطبیعی بیانگر نقص در تکمیل فرایند اسپرمیوژنز است و ممکن است اختلالاتی را در بسته‌بندی و تراکم کروماتین به‌همراه داشته باشد. Evenson (۱۱) و Ballachey (۱۲) نیز اظهار داشتند که افزایش نسبت ناهنجاریهای مرفولوژیک اسپرماتوزوآ با افزایش اختلالات کروماتین در ارتباط است. برای بررسی وضعیت کروماتین روشهای متعددی وجود دارد؛ مانند روش سدیم دو دسیل سولفات (SDS)[1] که وضعیت پایداری کروماتین را بر حسب میزان باندهای دی سولفید مشخص می‌نماید (۱۳). روش اکریدین اورانژ، یک رنگ‌آمیزی فلوئورسنت برای تمایز DNA سالم دو رشته‌ای از DNA دناتوره شدهٔ تک رشته‌ای است و به عنوان تست مقاومت اسپرم در مقابل دناتوره شدن مطرح می‌شود (۱۴). روش آنیلین‌بلو معرف میزان هیستون موجود در هسته است (۱۵). ولی روش کروموماسین A_3 (CMA_3) بیانگر کمبود پروتامین در هستهٔ اسپرم است (۱۶).

در این مطالعه تمامی روشهای مذکور همزمان بر روی ۱۰۱ نمونه انجام گرفت و نتایج به‌دست آمده در رابطه با تمامی پارامترهای اسپرمی مانند مرفولوژی اسپرم بررسی شد. لازم به یادآوری است که برای ارزیابی مرفولوژی اسپرم معیارهای مختلفی وجود دارد؛ در این بررسی معیارهای WHO (۱۷) برای تعیین ناهنجاریهای مرفولوژی استفاده شد.

مواد و روشها

۱۲۴ زوج نابارور کاندیدای IVF از بین مراجعین به مرکز باروری و ناباروری اصفهان به‌طور تصادفی انتخاب شدند. پس از جمع‌آوری مایع سمن در روز تخمک‌گیری، با استفاده از روش gradiants percoll بخشی از اسپرمهای متحرک جدا شده برای مجاورسازی[2] در لقاح آزمایشگاهی IVF به‌کار رفت. از باقیماندهٔ آن برای رنگ‌آمیزی آنیلین بلو و آکریدین اورانژ گسترش تهیه شد.

رشد فولیکولهای تخمدان در همسر بیماران با استفاده از آگونیست GnRH[3] و hMG[4] تحریک و سپس وضعیت رشد فولیکولها توسط اولتراسوند ارزیابی شد و با تجویز hCG[5] به میزان IU ۱۰۰۰۰ تخمک‌گذاری القا شد. پس از گذشت ۳۶-۳۲ ساعت از طریق تخلیهٔ فولیکولی اووسیتها جمع آوری شدند. برای کاهش اثرهای فاکتورهای زنانه[6] بیمارانی که کمتر از ۴ اووسیت داشته یا کیفیت اووسیت آنها نامطلوب بود؛ از این مطالعه حذف شدند و بدین ترتیب از ۱۲۴ نمونه بررسی شده فقط ۱۰۱ زوج در مطالعه وارد شدند. اسپرماتوزوای متحرک را در مجاورت اووسیتها قرار داده و پس از گذشت ۱۸ ساعت، وجود یا عدم وجود لقاح با توجه به تشکیل پرونوکلئوسها ارزیابی شد.

* روش رنگ آمیزی Chromomycin A_3

بخشی از مایع سمن در دالبکوفسفات بافرسالین عاری از یون کلسیم و منیزیم به مدت ده دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و با تکرار این عمل اسپرمهای شسته شده در محلول متانول و اسید استیک گلاسیال به نسبت ۳:۱ به‌مدت ۵ دقیقه در ۴° سانتی‌گراد تثبیت شده و سپس از آن چندین اسمیر تهیه شد. برای رنگ‌آمیزی هر اسلاید از ۱۰۰ میکرولیتر محلول کروموماسین A_3 (۰/۲۵ میلی گرم در یک میلی‌لیتر بافر مک‌الوین[7] با pH=۷ که حاوی ۱۰ میلی مولار کلرید منیزیم است) به‌مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. اسلایدها برای حذف رنگ اضافی در محلول بافر مک‌الوین شسته شدند و با استفاده از یک قطره بافر گلیسرول روی آنها لامل چسبانده شد. بررسی میکروسکوپی اسلایدها در همان روز و با فیلترهای مناسب توسط میکروسکوپ Axioplan (شرکت Zeiss ـ آلمان) صورت گرفت. در هر اسلاید ۲۰۰ اسپرم ارزیابی و درصد اسپرمهای رنگ گرفته (به رنگ زرد درخشان) و رنگ نگرفته محاسبه شد (۱۸).

* روش رنگ آمیزی Acridine Orange (AO)

اسمیرهای تهیه شده در محلول فیکساتیوکارنوی (متانول و اسیداستیک گلاسیال به نسبت ۳:۱) به‌مدت ۱۴ ساعت تثبیت شدند.

1. Sodium Dodecyle Sulfate
2. Insemination
3. Gonadotropin Rleasing Hormone
4. Human Menopausal Gonadotropin
5. human Chronic Gonadotropin
6. Female factor
7. MCIlvain

www.SID.ir

Archive of SID

سپس تعدادی از اسلایدها توسط ۳-۲ سی‌سی محلول اکریدین اورانژ ۰/۱۹ درصد در بافر سیترات فسفات با pH=۲/۵ به مدت ده دقیقه رنگ آمیزی و رنگ اضافی با شستشو در آب جاری حذف شد. اسلایدها در طی همان روز با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت Axioplan (شرکت Zeiss ـ آلمان) و با فیلترهای مناسب بررسی شد. با شمارش ۲۰۰ عدد اسپرم در هر اسلاید، درصد اسپرمهای با DNA طبیعی (سبز رنگ)، با DNA دناتوره (قرمز رنگ) و حالت حد واسط (زرد رنگ) ثبت شد (۱۴).

باقیمانده اسلایدها را قبل از رنگ‌آمیزی در محلول (۸۰ میلی مولار اسید سیتریک +۱۵۰ میلی مولار NaH_2PO_4 با pH=۲/۵) در حرارت ۸۷° سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه قرار داده و سپس مراحل رنگ آمیزی و بررسی مطابق دستورالعمل فوق انجام شد. در این روش با استفاده از شوک حرارتی، میزان مقاومت سلولها نسبت به دناتوره شدن توسط گرما بررسی شد (۱۹).

* روش رنگ آمیزی Aniline Blue (AB)

اسمیرهای تهیه شده در گلوتارآلدئید ۳ درصد در بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH=۷ به مدت ۳۰ دقیقه تثبیت شد و سپس توسط محلول آنیلین بلو ۵ درصد در بافر فسفات با pH=۳/۵ به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. اسلایدها با استفاده از میکروسکوپ نوری (Zeiss ـ آلمان) توسط عدسی شیئی ۱۰۰× ارزیابی شد. در هر اسلاید ۲۰۰ عدد اسپرم بررسی و از لحاظ شدت رنگ پذیری درصد سلولهای رنگ گرفته و رنگ نگرفته محاسبه شد (۱۵).

* روش SDS

۵۰ میکرولیتر از مایع سمن را با ۳۵۰ میکرولیتر محلول SDS یک درصد در بورات بافر ۵ درصد با pH=۹ به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اطاق قرار داده و سپس ۴۰۰ میکرولیتر گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد به آن اضافه نموده تا از روند واکنش جلوگیری شود و اسپرمها تثبیت شوند. پس از تهیهٔ اسمیر از این محلول و رنگ‌آمیزی آن با آنیلین بلو (طبق دستورالعمل مذکور)، در هر اسلاید ۲۰۰ عدد اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری (Zeiss ـ آلمان) و توسط عدسی شیئی ۱۰۰× برای بررسی اندازهٔ سر (NCD)[1] ارزیابی شد (۱۳).

* روش رنگ‌آمیزی Papanicolaou

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

* روشهای بررسی آماری

نتایج حاصله با استفاده از نرم افزار SPSS-9 بررسی و ضریب همبستگی تمامی پارامترها با یکدیگر ارزیابی شد. میانگین نتایج در دو گروه بارور و نابارور از طریق آزمون Student-*t*-test مقایسه شد. همچنین رابطهٔ بین تستهای ارزیابی کروماتین و لقاح در رابطه با مرفولوژی از طریق logistic regression بررسی و با محاسبهٔ مساحت زیر منحنی ROC، میزان حساسیت[2] و اختصاصی بودن[3] هر تست در رابطه با مرفولوژی تعیین شد.

یافته‌ها

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

جدول ۱: رابطهٔ بین پارامترهای اسپرمی و میزان لقاح

پارامترهای اسپرمی (درصد)	r	Pvalue
غلظت اسپرم (×۱۰۶/ml)	۰/۱۹۰	N.S.
تحرک اسپرم	۰/۱۹۶	<۰/۰۵
حرکت پیشرونده	۰/۱۹۸	<۰/۰۵
کل ناهنجاریهای مرفولوژیک	-۰/۶۶۵	<۰/۰۱
ناهنجاریهای مرفولوژیک سر	-۰/۷۸۰	<۰/۰۱
سرآمورف	-۰/۴۴۵	<۰/۰۱
سرکشیده گلابی شکل	-۰/۴۵۱	<۰/۰۱
سرکروی	-۰/۳۵۷	<۰/۰۱
ماکروسفال	-۰/۳۶۳	<۰/۰۱
میکروسفال	-۰/۲۸۰	<۰/۰۱
سردوتایی	-۰/۱۴۱	N.S.
سرسوزنی شکل	-۰/۰۰۴	N.S.
ناهنجاریهای مرفولوژیک گردن	-۰/۲۱۶	<۰/۰۵
ناهنجاریهای مرفولوژیک دم	-۰/۳۷۲	<۰/۰۱

N.S.: Non Significaint

جدول (۲) نشان می‌دهد که تستهای کروموماپسین A_3 و آنیلین‌بلو به ترتیب بالاترین رابطهٔ معنی‌دار را با مرفولوژی اسپرم دارد. این دو روش با غلظت اسپرم نیز رابطه دارد در حالی‌که هیچ‌یک از روشهای ارزیابی کروماتین با تحرک اسپرم رابطهٔ معنی‌داری نشان نمی‌دهد. سایر تستهای ارزیابی کروماتین (SDS، اکریدین اورانژ و آنیلین بلو) با هیچ یک از پارامترهای اسپرمی از لحاظ آماری رابطه ندارد. با استفاده از مدل logistic regression مشخص شد که از بین تمامی پارامترهای مورد

1. Nuclear Chromatin Decondensation
2. Sensitivity
3. Specifity

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی به ترتیب مرفولوژی اسپرم ($P<0.001$) و CMA_3 ($P<0.04$) به‌عنوان فاکتورهای مستقل بر میزان لقاح تأثیر دارد؛ در حالی‌که از بین تمامی روشهای ارزیابی کروماتین فقط تست CMA_3 به‌عنوان یک فاکتور مستقل بر مرفولوژی اسپرم تأثیر دارد ($P<0.001$).

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

پارامترهای اسپرمی (درصد)	CMA_3 r(p)	AB r(p)	SDS r(p)	Ao r(p)	Ao+heat r(p)
غلظت اسپرم ($\times 10^6$/ml)	۰/۲۴۶*	۰/۲۴۳*	۰/۱۹۰	۰/۰۰۹	۰/۰۶۴
تحرک اسپرم	۰/۱۵۰	۰/۰۰۹	۰/۰۵۲	۰/۰۳۷	۰/۰۱۳
حرکت پیشرونده	۰/۱۳	۰/۰۰۸	۰/۲۳۰*	۰/۱۰۳	۰/۰۵۹
مرفولوژی اسپرم	-۰/۵۲۴*	-۰/۳۸۴*	-۰/۱۵۵	-۰/۰۴۳	۰/۰۴۳

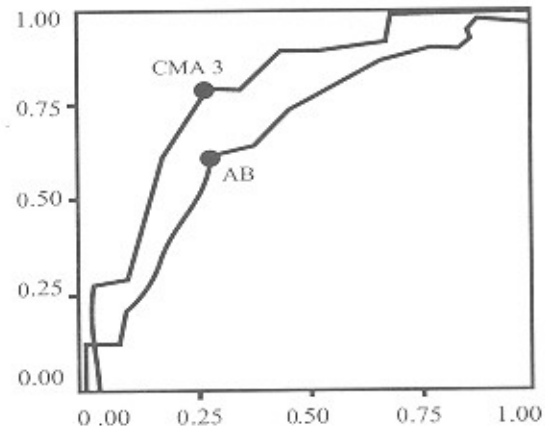
* $P<0.05$, ** $P<0.01$

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

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

پارامترهای اسپرمی (درصد)	لقاح‌دار Mean±SD	بدون لقاح Mean±SD	Pvalue
تعداد	۹۲	۹	-
لقاح	۶۲/۸۴±۲۵	-	۰/۰۰۱
ناهنجاریهای مرفولوژیک	۴۲/۵۴±۸	۵۲/۱۱±۷	۰/۰۰۱
ناهنجاری‌مرفولوژیک(سر)	۳۹/۲±۹	۵۱/۳±۷	۰/۰۲۲
ناهنجاری سر آمورف	۱۴/۵±۵	۲۰/۰±۵	۰/۰۶۰
ناهنجاری سر کروی	۳/۱۵±۲	۴/۷۷±۲	۰/۰۵۴
سر کشیده و گلابی شکل	۱۴/۲۰±۵	۱۹/۲۲±۶	۰/۰۱۵

با استفاده از نتایج آنالیز ROC برای تعیین قدرت تمایزی بلوغ هسته به روشهای CMA_3 و آنیلین بلو در شناسایی مرفولوژی



نمودار ۱: مقایسه منحنی ROC تستهای CMA_3 و آنیلین بلو در رابطه با مرفولوژی اسپرم

غیرطبیعی، مشخص شد که تست CMA_3 با حساسیت ۸۰ درصد و اختصاصی بودن ۷۲ درصد نسبت به آنیلین‌بلو (حساسیت ۶۲ درصد و اختصاصی بودن ۷۵ درصد) برتری دارد (نمودار ۱).

بحث

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

در مرحلهٔ اسپرمیوژنز علاوه بر تغییرات مرفولوژیک تغییراتی در محتویات پروتئینی کروماتین نیز صورت می‌گیرد و با قرار گرفتن پروتامین به‌جای هیستون، تراکم کروماتین مشاهده می‌شود. در واقع اسپرم با ناهنجاری مرفولوژیک نشانه‌ای از نقص در تکمیل روند اسپرمیوژنز است و هرگونه نقص در مرفولوژی اسپرم می‌تواند با اختلالات بسته‌بندی کروماتین در ارتباط باشد (۹، ۱۰، ۲۴). با توجه به اینکه بسیاری از تحقیقات نشان می‌دهد که اختلالات کروماتین در هستهٔ اسپرم با قدرت باروری فرد در ارتباط است (۱۲، ۲۵، ۲۶، ۲۷)، از طرف دیگر؛ روشهای متعددی برای ارزیابی کیفیت کروماتین وجود دارد؛ در این تحقیق رابطهٔ تمامی روشهای معمول در ارزیابی کروماتین با پارامترهای اسپرمی مانند مرفولوژی بررسی و مشخص شد که بالاترین رابطهٔ معنی‌دار در ارتباط با مرفولوژی به ترتیب مربوط به CMA_3 و آنیلین‌بلو است. از آنجا که هر یک از روشهای ارزیابی کروماتین اختصاصی عمل می‌کند به‌طوری که روش CMA_3 بیانگر کمبود پروتامین و آنیلین‌بلو معرف هیستون موجود در هسته است؛ از نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان دریافت که غالباً اختلالات مرفولوژیک اسپرم در رابطه با اختلال در تراکم و بسته‌بندی کروماتین است. همچنین در بررسی که Franken و همکارانش در سال ۱۹۹۹ (۱۰) بر روی بیماران تحت درمان به روش ICSI انجام دادند، مشخص شد که روش CMA_3 ($P<0.001$، $r=0/4$) و آنیلین‌بلو ($P<0.001$، $r=0/33$) به‌ترتیب با مرفولوژی اسپرم ارتباط دارد. علاوه بر آن؛ با استفاده از منحنی ROC مشخص نمود که روش CMA_3 با حساسیت ۷۵ درصد و اختصاصی بودن ۸۲ درصد در مقایسه با آنیلین‌بلو با حساسیت ۶۰ درصد و اختصاصی بودن ۹۰ درصد در تمایز ناهنجاریهای مورفولوژیک قوی‌تر عمل می‌نماید. یافته‌های حاصل از بررسیهای حاضر نیز با این نتایج مطابقت دارد و علاوه بر آن نشان می‌دهد که مرفولوژی سر اسپرم به‌طور مستقل، میزان لقاح را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد و تست CMA_3 نیز به طور مستقل بر میزان لقاح و مرفولوژی اسپرم مؤثر است.

نتایج حاصل از تحقیقات Esterhuizen و همکارانش در سال ۲۰۰۰ نشان می‌دهد که ارزش CMA_3 در رابطهٔ با میزان لقاح به طریق IVF ($P<0.001$، $r=0/5$) و مساحت زیر منحنی ROC در رابطه با مرفولوژی ۰/۸۶ است (۳۶)؛ در حالی‌که در این بررسی ضریب همبستگی بین CMA_3 و میزان لقاح ($P<0.001$، $r=0/56$) و مساحت زیر منحنی ROC در رابطه با مرفولوژی ۰/۷۶ است.

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین Bianchi (۱۶) در سال ۱۹۹۳ گزارش کرد که اسپرماتوزوآهای با مرفولوژی طبیعی ممکن است دارای حالتهای غیرطبیعی مخفی در کروماتین باشند که در طی پروتامینه شدن کروماتین ایجاد شده و قدرت باروری اووسیت را محدود می‌کند. وی معتقد بود که رنگ آمیزی CMA_3 را می‌توان به‌عنوان یک تست مناسب برای شناسایی اسپرمهای دارای آنومالیهای غیرطبیعی مخفی و با مرفولوژی طبیعی به کار برد. نتایج حاصل از تحقیقات Lolis (۱۸) نیز تأییدکننده این مطلب است.یکی دیگر از روشهایی که با مرفولوژی اسپرم رابطه دارد روش آنیلین‌بلو است که معرف میزان هیستون در هسته است. به عبارت دیگر؛ این تست بیانگر باقیماندن هیستون در هسته و عدم جایگزینی توسط پروتامین است.

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

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

اگر چه این روش نیز بیانگر اختلالات در فرایند بلوغ اسپرماتید در طی مرحلهٔ اسپرمیوژنز است؛ اما با توجه به موارد زیر ارزیابی کروماتین به روش CMA_3 نسبت به آنیلین‌بلو برتری دارد:

۱) فقط روش CMA_3 به‌عنوان یک فاکتور مستقل بر مرفولوژی اسپرم تأثیر دارد؛

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

۳) CMA_3 معرف کمبود پروتامین در هسته است که این کمبود ممکن است ناشی از باقیماندن هیستون در هسته یا برداشته شدن هیستون بدون جایگزینی با پروتامین باشد.

در این بررسی از بین ناهنجاریهای مرفولوژیک سر اسپرم، ناهنجاریهای سر آمورف و کروی به‌طور مستقل با روش CMA_3 رابطه دارد؛ در حالی‌که روش آنیلین‌بلو فقط با ناهنجاری سر آمورف به‌طور مستقل مرتبط است. همچنین اختلاف میانگین ناهنجاریهای سر آمورف، کروی، کشیده و گلابی شکل بین دو گروه بارور و نابارور معنی‌دار بود. Baccetti در این باره گزارش کرد که اسپرمهای با سر کروی در طی مورفوژنز دچار تغییراتی در تراکم کروماتین می‌شوند (۲۹).

بیانچی (۱۶) نیز گزارش نمود که ۷۵ درصد از ماکروسفالها و ۵۰ درصد از سلولهای آمورف، CMA_3 مثبت هستند. همچنین آقای گلشن ایرانپور (۳۵) اظهار داشت که افزایش سلولهای آمورف، ماکروسفال و مجموع آنها با افزایش درصد سلولهای رنگ گرفته توسط CMA_3 همراه است. به عبارتی با افزایش نسبت هر یک از ناهنجاریهای مرفولوژی می‌توان افزایش در نقایص بسته‌بندی و تراکم کروماتین را انتظار داشت.

در این تحقیق علاوه بر مرفولوژی اسپرم ارتباط اختلالات کروماتین با پارامترهای غلظت و تحرک اسپرم بررسی و مشخص شد که هر دو روش CMA_3 و آنیلین بلو با غلظت اسپرم رابطه مثبت دارند در حالی‌که با تحرک اسپرم هیچ‌گونه رابطهٔ معنی‌داری ندارند. این یافته‌ها در نتایج حاصل از تحقیقات Lolis (۱۸) نیز بدست آمده است. تفاوت در نتایج حاصل از بررسی انجام شده در مقایسه با سایر مطالعات می‌تواند مربوط به حجم نمونه؛ نحوهٔ درمان بیماران (IVF-ICSI) و معیارهای مورد نظر در بررسی مرفولوژی اسپرم (WHo-Strict Criteria) باشد (۲۰، ۳۰).

با توجه به اهمیت مرفولوژی در میزان موفقیت لقاح و قدرت تست CMA_3 در شناسایی و تمایز مرفولوژی غیر طبیعی اسپرم پیشنهاد می‌شود که ارزیابی کروماتین به روش CMA_3 به‌عنوان یک تست تکمیلی برای پیشگویی میزان موفقیت در لقاح آزمایشگاهی انجام گیرد.

References

1. Balhorn RA: Modele for the structure of chromatin in mammalian sperm. J cell Boil 1982; 93: 298-305
2. Bedford JM, calvin H, cooper GW: The maturation of spermatozoa in the human epididymis. J Repord Fertil 1973; 18: 199-213
3. Kvist U, Kjellberg S, Bjorndahl L, Soufir JC, Arver S: Seminal fluid from men with agenesis of the wolffian ducts: Zinc-binding Prperties and effects on sperm chromatin stability. Int J Androl 1990; 13: 245-252
4. Marushig Y, Marushig K: Enzymatic unPacking of bull sperm chromaton. J Biophys Acta 1975; 403: 180-191
5. Karrmer J, krawctz S: Nuclear matrix interactions tithin the sperm genome. J Biol chem 1996; 24: 11619-11622
6. Johnson RT, Rao PN, Mammalian cell Fusion: Induction of premature chrom- osone condensation in interphase nuclei. Nature 1970; 226: 717-722
7. Fawcett DW, Anderson WA, Phillips DM: Mrophgentic factors influencing the shape of sperm head. Dev Biol 1971; 26: 220-251
8. Meistrich ML, Reid BO, Barcellona WJ: Changes in sperm nuclei during spermato- genesis and epididymal maturation. Exp cell Res 1976; 19: 72-78
9. Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G and schmidt W: Association between sperm cell chromatin condenstion, morphology based on strict criteria and fertilization cleavage and Pregnancy rates in an IVF Program. J Androl 1998; 30: 29-35
10. Franken DR, Franken CJ, de la Guerre H, Devillier S: Normal sperm morphology and chromation

www.SID.ir

Archive of SID

Packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A_3 staining. J Androl 1999; 31: 361-366
11. Evenson DP,Klein FA, whitmore WF, Melamed MR: Flow cytometric evlauation of semen from patients with testicular carcinoma. J Urol 1984; 132: 1220-1225
12. Ballachey BE, Hohenbken WD, Evenson DP: Heterogenicity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. J Biol Reprod 1987; 36: 921-925
13. Gopalkrishnan K, Hinduja IN, Anand kumar Tc: Invitro decon-densation of nuclear chromatin of human spermatozoa: Assessing Fertilizing Potential. Arch Androl 1991; 27: 43-50
14. Tejada RI, Mitchell JC, Noman A: A Test for the practical evaluation of male fertility by acridine arange (Ao) Fluore- scence. Fertil steril 1984;42: 87-91
15. Terquem A, Dadoune JP: Aniline blue staining of human spermatozoa choromatin. Evaluation of nuclear maturation. J sperm cell 1983; 249-252
16. Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzar D, Bianchi U, Sakkas D: Effect of deoxyriboucleic acid protamination of flueorochrome staining and in situ nick - translation of murine and human spermatozoa. Biol Reprod 1993; 49: 1083-1088
17. World health organization. WHo labratory Manual for the examination of human semen and semen - cervical musus Interaction. 3ed. Cambridge university press, Cambridge, 1992
18. Lolis D, Georgiou I, Syrrou M, Zikopoulos K: Chromomycin A_3 staining as an indicator of protamine deficiency and fertilization. Int Andral 1996; 19: 23-27
19. Duran EH, Gurgon T, Gunaple S: A logistic regression model including DNA status amd morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro. Hum Reprod 1998; 13(39): 1235-1239
20. Comhaire Fc, Vermeulen L: Human semen analysis. Hum Reprode 1995; 1: 343-362
21. Jeulin C, Feneux D, serres C, Jouannet P, Guillet-Rosso F, Belaisch-Allart J, Frydman R, Testart J: Sperm Factors related to Failure of human in vitro fertilization . J Reprod Fertil 1986; 76: 735-744
22. Liu Dy, Lopata A, Johnson WI, Baker HW: Human sperm Zona binding, sperm characteristics and in-vitro fertilization. Hum Reporod 1989; 4: 696-701
23. Baker HW, liu Dy, Bourme H, lopata A: Diagnosis of sperm defects in selecting patients for assisted fertilization. Hum Reprod 1993; 8: 177-178
24. Angelopoulos T, Yaron A, Moshel BSC: Condensation and morphology before and after separation procedures: effect on the clinical out come after in vitro fertilization. Fertil Steril 1998; 69: 740-747
25. de Yebra L, Bullesca JL, Vanrell JA, Bassas L, Oliva R: Complete selective abscence of protamine 2 in humans, J Biol Biochem 1993; 268: 10553-10557
26. Janny L, Menezo YJR: Evidence for a strong paternal effect of human preimplantation embryo development and blastocyst. Formation. Mol Reprod Dev 1994; 38: 36-42
27. Ibrhim ME, Pederson J: Acridine orange Fleuorescence as male fertility test. Arch Androl 1988; 20: 125-129
28. Silverstroni L, Frajese G: Fabrizio M: Histiones in stead of Protamines in terminal germ cells of infertile, oligospermic men. Fertil Steril 1976. 27; 1428-1437
29. Baccetti T, Renieri F, Rosati MG: Further observation in the morphogenesis of the rounded-headed spermatozoa. Andrologia 1977; 8: 1779-1780
30. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Ochninger S: Prediction value of abonormal sperm morphology in in vitro fertilization. Fertil steril 1988; 48: 112-117
31. Bartoov B, Elters F, Pansky M, Lederman H, Caspi E, Soffer Y: Estimating fertility Potential via semen analysis. Hum reporod 1993; 8: 65-70
32. Aitken J, Baker HWG, Irvine Ds: On the nature of semen quality and fertility. Hum Reprod 1995; 10: 247-248
33. Barrat CLR: On the accuracy and clinical value of semen laboratory tests. Hum Reprod 1995; 10: 250-252
34. Oehninger S, kruger T: The diagnosis of male infertility by semen quality. Clinical significance of sperm morphology assessment. Hum Reprod 1995; 10: 1037-1038
35. Iranpour FG, Nasr-Esfahani MH, Valojerdi MR, al-Taraihi TM: Chromo-mycin A_3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility. J Assist Reprod Genet 2000; 17(1): 60-66
36. Esterhuizen AD, Franken DR, lourens JGHL, Prinsloo E, Van Rooyen LH: Sperm chromatin Packaging as an indicator of in-vitro fertilization rates. Hum Reprod 2000; 15: 657-661

www.SID.ir