Archive of SID

بررسی کارایی دو روش دانسیته گرادیان (Percoll, Sill-Select) در جداسازی اسپرمهای باکروماتین و مرفولوژی نرمال و اثر این پارامترها بر روی لقاح، ضریب کلیواژ و کیفیت جنین

صفورا توفیق حسابی M.Sc.*، محمدحسین نصراصفهانی Ph.D.☆♦، شهناز رضوی Ph.D.*، محمد مردانی Ph.D.*

☆ جهاد دانشگاهی علوم پزشکی ایران، پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

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

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

چکیده

* **هدف:** ارزیابی و مقایسه کارآیی دو روش دانسیته گرادیان به نام (Percoll, Sil-Select) در رابطه با جداسازی اسپرمهای باکروماتین و مرفولوژی طبیعی و بررسی اثرات پارامترها بر روی درصد لقاح، ضریب کلیواژ و کیفیت جنین

* **مواد و روشها:** بر روی مایع سمن ۴۶ نمونه کاندیدای IVF از بین مراجعین به مرکز باروری و ناباروری اصفهان ارزیابی پارامترهای سمن (غلظت، تحرک، مورفولوژی، حجم)، کمبود پروتامین (درصد CMA_3 مثبت) و وجود هیستون اضافی (رنگ‌آمیزی با آنیلین بلو) قبل و بعد از مرحله آماده سازی اسپرم انجام گرفت.

* **نتایج:** هر دو روش (Sil-Select و Percoll) در حذف اسپرمهای باکروماتین و مرفولوژی غیرطبیعی در طی آماده سازی اسپرم به طور موثر عمل می‌نمایند. یک رابطه معناداری بین مورفولوژی اسپرم، کمبود پروتامین و هیستون اضافی با میزان لقاح آزمایشگاهی مشاهده شد. از بین پارامترهای اسپرمی صرفاً مرفولوژی اسپرم با کیفیت جنین و ضریب کلیواژ رابطه معناداری را نشان می‌دهد.

* **نتیجه‌گیری:** روش Sil-Select یک جایگزین مناسب برای پرکل جهت جداسازی اسپرم باکروماتین و مرفولوژی طبیعی است. علاوه بر این تکنیکهای گرادیان دانسیته برای آماده سازی اسپرم جهت IVF و خصوصاً ICSI توصیه می‌شود.

کل واژگان: کروماتین، مرفولوژی اسپرم، Sil-Select، Percoll، CMA_3، آنیلین بلو

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در طی اسپرمیوژنز، هستهٔ اسپرماتید متراکم و پروماتین جایگزین هیستون می‌شود و با تشکیل باندهای دی سولفیدی بین گروههای تیول موجود در پروماتین میزان پایداری افزایش می‌یابد. این عمل باعث القاء تراکم کروماتین تسهیل در انتقال اسپرم می‌شود. این ساختمان بعداً طی عبور اسپرم از اپیدیدم و در طی انزال تثبیت می‌شود (۱، ۲). این نوع بسته بندی (Packaging) جهت عملکرد نرمال اسپرم به شرح ذیل ضروری است:

۱) مرفولوژی نرمال اسپرم، ۲) باروری طبیعی، ۳) حفاظت DNA (ژنوم) در برابر عوامل مخرب، ۴) همزمانی سیکل سلولی بعد از لقاح (۶-۳).

مطالعات قبلی نشان داده است که وضعیت کروماتین اسپرمهای مردان بارور و نابارور متفاوت است و تاکنون تاثیر آنومالیهای مختلف کروماتین بر باروری به خوبی مشخص شده است (۷، ۸). آنومالیهای کروماتین بر اساس آنالیز استاندارد سمن طبق دستورالعمل WHO، قابل تشخیص نیست. از این رو نقش آنها بر روی باروری قابل پیش بینی نیست (۹). روشهای ذیل برای تعیین آنومالیهای کروماتین پیشنهاد شده است: تعیین کمبود پروماتین به وسیله کروموماپسین A3(CMA_3)، تعیین افزایش هیستون توسط رنگ‌آمیزی آنیلین بلو، Dodecyl Sulfate Sodium (SDS) جهت ارزیابی پایداری کروماتین اسپرم، اکریدین اورانژ برای تعیین وضعیت سلامتی DNA (تمایز DNA دو رشته‌ای از تک رشته‌ای) (۱۰).

تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که در بین موارد مذکور کمبود پروماتین و افزایش هیستون دارای ارتباط معناداری با میزان لقاح آزمایشگاهی (IVF) است (۴، ۱۱، ۱۲، ۱۳).

آماده سازی اسپرم یکی از مهمترین مراحل در تکنیکهای باروری آزمایشگاهی است. هدف از آماده سازی اسپرم جداسازی اسپرمهای نرمال از جمعیت هتروژن در مایع منی است. تکنیکهای مختلفی برای آماده سازی اسپرم وجود دارد که مهمترین آنها عبارتند از: سانتریفوژ از طریق دانسیته گرادیان، Swim up, Glass Wool Filtrtion در کلینیکهای باروری آزمایشگاهی معمولاً از روش دانسیته گرادیان استفاده می‌شود.

روشهای دانسیته گرادیان شامل Percoll، PureSperm، Sil-Select و Ixa Prep است. از Percoll به عنوان اولین دانسیته گرادیان برای جداسازی اسپرم استفاده و حذف باکتریها و لکوسیتها، جلوگیری از تولید رادیکالهای آزاد (ROS) به عنوان مزایایی ذکر شده است. اما در برخی از گزارشات جدید وجود مقادیر زیادی آندوتوکسین، به میزان ۱۰ تا ۱۰۰ بار بیشتر از مقدار پیشنهاد شده توسط Ferdral Drug Administration (FDA) مطرح گردیده است. این عامل زمینه ساز Fragmentation جنین و کاهش میزان بارداری است (۱۴، ۱۵). به همین علت استفاده از روشهای دیگر دانسیته گرادیان با مقادیر پایین اندوتوکسین پیشنهاد می‌گردد (۱۶، ۱۷). با توجه به اینکه کروماتین اسپرم نقش مهمی بر میزان باروری، کیفیت جنین و لانه گزینی دارد (۱۸)، مطالعهٔ اثر تکنیکهای مختلف آماده سازی اسپرم با تکیه بر وضعیت کروماتین ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین ارزیابی کارایی دو روش فوق (Percoll, Sil-Select) در بهبود دانسیته، حرکت، مرفولوژی و کروماتین نرمال و همچنین نقش این پارامترها روی میزان لقاح، ضرب کلیواژ و کیفیت جنین مورد توجه قرار گرفت.

مواد و روشها

* آماده سازی اسپرم

۴۶ زوج نابارور داوطلب IVF بین ۴۰-۲۰ سال از مراجعین به مرکز باروری و ناباروری اصفهان انتخاب شدند. مایع سمن در روز تخمک‌گذاری، پس از ۴-۳ روز پرهیز از مقاربت جمع آوری و با استفاده از ۲ لایه غیر ممتد (۹۰-۴۵درصد) Percoll (Seromed-Germany) و (Fertipro-Belgivm) Sil-Select در دو لوله جداگانه آماده سازی شد (۱ml لایه بالایی و ۱ml لایه پایینی). بعد از آنالیز مایع سمن از نظر حجم، حرکت و دانسیته، بخش اعظم سمن به دو قسمت مساوی تقسیم شد، یک قسمت آن روی لایه بالایی Percoll و قسمت دیگر آن روی لایه بالایی Sil-Select قرار داده شد و از بخش باقیمانده از مایع سمن برای ارزیابی مرفولوژی و کروماتین استفاده شد. هر دو لوله (Percoll, Sil-Select) به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۳۰۰g سانتریفوژ شدند. سپس مایع رویی را خارج نموده و ته‌نشین را با ۰/۵ml محیط HSA(LFB France)۱۰درصد+Ham´sF10 و مخلوط سوسپانسیون به یک لوله استریل دیگر منتقل و پس از دو بار شستشو با HSA, ۴-۵ml۱۰درصد+Ham´sF10 به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۳۰۰g سانتریفوژ شد. در نهایت برای به دست آوردن رفت لازم ته‌نشین با مقدار مناسب HSA۱۰درصد+Ham´sF10 مخلوط شد.

* لقاح آزمایشگاهی

رشد فولیکولهای تخمدان در همسر بیماران با استفاده از آگونیستهای GnRH، HMG تحریک و وضعیت رشد فولیکولها توسط اولتراسونوگرافی ارزیابی شد و با تجویز HCG به میزان ۱۰۰۰۰IU تخمک‌گذاری القاء گردید و تخمکها پس از ۳۶-۳۲ ساعت از طریق تخلیه فولیکول، جمع آوری شد.

تخمکها پس از شستشو در HSA۱۰درصد+Ham´sF10 به دو گروه تقسیم شده و به محیط کشت Vitrolife-Goteberg-Sweden IVF-20 منتقل شدند. پس از ۲ ساعت تعداد ۱۰۰۰۰۰-۵۰۰۰۰ اسپرم متحرک که به روش پرکل و یا Sil-Select آماده شده بود، در مجاور هر تخمک قرار گرفت. بعد از گذشت ۱۹-۱۷ ساعت وجود یا عدم لقاح با توجه به تشکیل پیش هسته‌ها ارزیابی و درصد لقاح و میزان کلیواژ در هر گروه ثبت شد. اووسیتهای لقاح یافته به محیط G1.2(Vitrolife) منتقل و بعد از ۲۴ ساعت کیفیت جنینها ارزیابی شد و در همان روز جنینها به رحم بیمار منتقل و جنینهای اضافه پس از ۲۴ ساعت منجمد گردیدند.

* ارزیابی جنین

ضرایب کلیواژ و کیفیت جنینهای آنها در روز دوم پس از تلقیح به

www.SID.ir

Archive of SID

شرح زیر محاسبه و تعیین گردید.

* تعیین ضریب کلیواژ

در روز دوم تلقیح، ضریب کلیواژ جنینها با بررسی مرحله سلولی مشخص گردید. برای جنینهای دو سلولی Score۱، جنینهای ۴-۳ سلولی Score۲، جنینهای ۶-۵ سلولی Score۳ و جنینهای ۸-۷ سلولی Score۴ در نظر گرفته شد. ضریب کلیواژ برای هر نمونه و در گروه به طریق زیر محاسبه و تعیین شد.

ضریب کلیواژ = مجموع ضریب کلیواژ جنینها / تعداد کل جنینها

* تعیین ضریب کیفیت

کیفیت جنینها به سه درجهٔ A و B و C تقسیم بندی شد:

درجهٔ A: جنینهایی دارای بلاستومرهای یکسان، Fragmentation کمتر از ۱۰درصد (Score۳).

درجهٔ B : جنینهایی دارای بلاستومرهای یکسان و دارای، ۵۰-۱۰درصد Fragmentation (Score۲).

درجهٔ C : جنینهای دارای بلاستومرهایی با اندازه‌های نامساوی و Fragmentation بیش از ۵۰ درصد (Score۱).

سپس ضریب کیفیت نهایی بر اساس فرمول زیر برای هر گروه محاسبه شد.

ضریب کیفیت = مجموع ضریب کیفیت جنینها / تعداد کل جنینها

ارزیابی پارامترهای اسپرمی

شمارش اسپرمها قبل و بعد از آماده سازی و پس از بی حرکت کردن آنها با محلول فیکساتیو و با استفاده از لام مکلر انجام گرفت و بر اساس milion/ml بیان شد. حرکت اسپرمها با مشاهده مستقیم از طریق میکروسکوپ و مرفولوژی با رنگ‌آمیزی Modified Papanicolau طبق روش Strict Criteria بررسی شد. مرفولوژی اسپرم تحت عنوان مرفولوژی نرمال و مرفولوژی ایندکس (مجموع اسپرمهای نرمال و اسپرمهای آمورف جزیی) بیان شد (۱۹).

* ارزیابی کروماتین

روش رنگ‌آمیزی آنیلین بلو

اسمیرهای تهیه شده با استفاده از گلوتارالوئید ۳درصد در بافر فسفات ۰/۲ مولار، PH=۷ به مدت ۳۰ دقیقه فیکس شد، سپس توسط محلول آنیلین بلو (merck) در اسید استیک ۴درصد با PH=۳/۵ به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شد و پس از شستشو با آب جاری میکروسکوپ نوری (zesis-آلمان) ارزیابی شد و اسپرمها به دو گروه رنگ گرفته (شامل بخشی تا تماماً رنگ گرفته) و رنگ نگرفته تقسیم شد (۱۱).

روش رنگ‌آمیزی کروموماپسین A3

بخشی از مایع سمن در دالبکو فسفات با فرمالین (PBS) عاری از یون کلسیم و منیزیم به نسبت ۱ به ۲ به مدت ده دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه شستشو داده شد و با تکرار این عمل اسپرمهای شسته شده در محلول فیکساتیوکارنوی (متانول و اسید استیک به نسبت ۳ به ۱) به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد فیکس و سپس اسمیر تهیه گردید، جهت رنگ‌آمیزی هر اسلاید ۱۰۰µl محلول کروموماپسین A3 (۰/۲۵mg در یک میلی‌لیتر بافر مک الوین با PH=۷ حاوی ۱۰mM کلرید منیزیم) به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. برای حذف رنگ اضافی، اسلایدها به وسیله PBS شستشو شد و با استفاده از بافر گلیسرول مونتینگ انجام گرفت. بررسی میکروسکوپی اسلایدها در همان روز با فیلترهای مناسب توسط میکروسکوپ فلورسنت (Nikon - ژاپن) انجام شد. ارزیابی رنگ‌آمیزی CMA_3 با تعیین درصد اسپرمهای رنگ گرفته (زرد درخشان = CMA_3 مثبت) و اسپرمهای رنگ نگرفته (زرد کدر = CMA_3 منفی) صورت گرفت (۱۰).

ارزیابی پارامترهای اسپرمی و کروماتین اسپرم قبل و بعد از آماده سازی با روش Percoll و Sil-Select انجام شد.

* آنالیز آماری

نتایج حاصله با استفاده از نرم‌افزار (SPSS - ۱۰) بررسی و ضریب همبستگی پیرسون پارامترها با یکدیگر مقایسه شد و میانگین نتایج بین دو گروه قبل و بعد از شستشو و همچنین بین دو گروه شسته شده با Percoll و Sil-Select از طریق T-test مقایسه گردید.

یافته‌ها

مقایسه دو روش مختلف آماده سازی اسپرم در ارتباط با کاهش میزان اسپرمهای CMA_3 مثبت نشان داد: درصد اسپرمهای CMA_3 مثبت قبل از آماده‌سازی اسپرم به میزان ۱۱/۰±۳۶/۳، و بعد از شستشو با Percoll و Sil-Select به ترتیب ۴/۱۰±۲۶/۳ و ۲/۱۱±۲۸/۳ کاهش یافت (جدول ۱) که این نتایج کاهش معناداری را در میزان اسپرمهای CMA_3 مثبت بعد از آماده سازی با Percoll و Sil-Select نشان می‌دهد. ولی اختلاف معنادار بین دو روش Percoll و Sil-Select وجود نداشت. در رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو نیز نتایج مشابهی مشاهده شد. درصد اسپرمهای رنگ گرفته قبل از آماده سازی اسپرم از ۱۲/۹±۴۴/۰، بعد از شستشو با Percoll و Sil-Select این درصد به ترتیب به ۱۲/۶±۳۵/۰ و ۱۱/۷±۳۷/۳ کاهش یافت (جدول ۱).

مقایسه توانایی بهبود پارامترهای اسپرم با دو روش مختلف آماده سازی نشان می‌دهد: که غلظت اسپرم به دست آمده توسط Sil-Select در مقایسه با Percoll بیشتر است (جدول ۱). جدول ۱ همچنین نشان می‌دهد که هر دو روش در کاهش اسپرمهای با مورفولوژی غیرطبیعی و انتخاب اسپرمهایی با حرکات پیش رونده موثرند، اما Percoll نسبت به Sil-Select در انتخاب اسپرمهایی با حرکات پیشرونده مؤثرتر است.

به منظور تبیین ارتباط بین پارامترهای سمن، کمبود پروتامین و افزایش هیستون با درصد لقاح، اسکورکلیواژ و اسکور کیفیت جنین از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد (جدول ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: مقایسه بین پارامترهای اسپرمی، کروماتین اسپرم، درصد لقاح، ضریب کلیواژ و کیفیت جنین قبل و بعد از آماده سازی با دو روش Percoll و Sil-Select

	قبل از آماده سازی (الف) میانگین±انحراف‌معیار	بعد از آماده سازی با (ب) میانگین±انحراف‌معیار	بعد از آماده سازی (ج) میانگین±انحراف‌معیار	الف و ب P-Value	الف و ج P-Value	ب و ج P-Value
دانسیته ($x10^6$/ml)	۱۴۰±۱۲۵/۵	۶۵/۵±۳۱/۹	۸۲/۹±۵۲/۳	۰/۰۰۰	۰/۰۰۷	۰/۰۵۲
٪ تحرک	۵۲/۰±۱۵/۶	۸۱/۸±۷/۸	۷۲/۹±۱۲/۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
٪ مرفولوژی نرمال	۱۳/۴±۸/۵	۲۲/۴±۱۲/۷	۲۰/۶±۱۲/۶	۰/۰۰۱	۰/۰۰۸	NS
٪ مرفولوژی ایندکس	۷۱/۵±۱۱/۲	۸۱/۸±۹/۴۸	۷۹/۱۱±۹/۷۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	NS
CMA3٪	۲۶/۲±۱۱/۰	۱۲۶/۴±۱۰/۲	۲۸/۲±۱۱/۲	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	NS
٪ اسپرمای رنگ گرفته با آنیلین بلو	۴۲/۰±۱۲/۹	۲۵/۰±۱۲/۶	۲۷/۴±۱۱/۷	۰/۰۰۱	۰/۰۱۰	NS
٪ لقاح	۶۸/۵±۲۳/۶	۶۸/۸±۲۶/۵	۶۹/۲±۲۵/۸	-	-	NS
ضریب کلیواژ	۱/۸±۰۰/۸	۱/۷±۰/۹	۱/۸±۱/۰	-	-	NS
ضریب کیفیت	۲/۲±۰۱/۰	۲/۲±۱/۱	۲/۲±۱/۱	-	-	NS

Not Significant :NS

بحث

حرکت اسپرم، مورفولوژی، درصد CMA_3 مثبت و اسپرمهای رنگ گرفته با آنیلین بلو با درصد لقاح ارتباط معناداری نشان می‌دهد. اما با این حال از بین پارامترهای فوق تنها ارتباط مرفولوژی اسپرم با اسکور کلیواژ معنادار است (جدول ۲).

جدول ۲: رابطه پیرسون بین پارامترهای اسپرمی و کروماتین اسپرم با درصد لقاح و ضریب کلیواژ و کیفیت جنین

	٪ لقاح		ضریب کلیواژ		ضریب کیفیت	
	r	P-value	r	P-value	r	P-value
دانسیته ($x10^6$/ml)	-۰/۱۸۵	۰/۲۷۲	۰/۰۵۰	۰/۷۲۹	۰/۰۵۵	۰/۷۱۲
٪تحرک اسپرم	۰/۳۰۰	۰/۰۳۲	۰/۱۲۰	۰/۴۲۴	۰/۰۹۲	۰/۵۳۰
٪مرفولوژی نرمال	۰/۲۹۰	۰/۰۰۷	۰/۲۶۳	/۰۷۰۰	۰/۲۸۰	۰/۰۰۹
٪مرفولوژی‌ایندکس	۰/۴۱۲	۰/۰۰۲	۰/۲۱۷	۰/۰۲۲	۰/۲۲۰	۰/۱۲۶
٪اسپرمهای رنگ گرفته با آنیلین‌بلو	-۰/۲۹۹	۰/۰۳۲	-۰/۲۳۷	۰/۰۹۷	-۰/۲۵۵	۰/۰۸۷
٪CMA3مثبت	-۰/۲۸۰	۰/۰۱۰	-۰/۱۷۱	۰/۲۵۶	-۰/۱۸۶	۰/۲۱۵

ارتباط کمبود پروتامین و افزایش هیستون با پارامترهای سمن در جدول (۳) نشان داده شده است. بین پارامترهای اسپرمی، مرفولوژی هم با درصد اسپرمهای CMA_3 مثبت و هم با درصد اسپرمهای رنگ گرفته با آنیلین بلو دارای ارتباط معنادار است و حرکت اسپرم صرفاً با درصد اسپرمهای رنگ گرفته با آنیلین بلو ارتباط معنادار نشان می‌دهد.

جدول ۳: رابطه پیرسون بین پارامترهای اسپرمی و کروماتین اسپرم

پارامترهای اسپرمی	٪CMA3مثبت		٪ اسپرمهای رنگ‌گرفته با آنیلین‌بلو	
	r	P-value	r	P-value
دانسیته ($x10^6$/ml)	-۰/۰۶	۰/۶۷۶	-۰/۰۸	۰/۵۶۷
٪تحرک اسپرم	-۰/۱۰	۰/۴۸۶	-۰/۲۲	۰/۰۲۲
٪مرفولوژی‌ایندکس	-۰/۴۵	۰/۰۰۲	-۰/۴۲	۰/۰۰۲
٪ مرفولوژی نرمال	-۰/۲۲	۰/۱۲۰	-۰/۳۶	۰/۰۰۱

گزارشات اخیر پیشنهاد می‌کند که آنومالی کروماتین اسپرم به وسیله آنالیز روتین مایع سمن قابل تشخیص نیست و در نتیجه نقش کروماتین اسپرم بر روی میزان لقاح نامشخص خواهد ماند. مطالعه، اهمیت ویژهٔ وضعیت کروماتین اسپرم در تکنیکهای لقاح آزمایشگاهی را روشن می‌سازد (۴، ۷). از آن جایی که اسپرمهای مورد استفاده در این تکنیکها قبل از تزریق شستشو می‌شوند در نتیجه ارزیابی توانائی روشهای آماده‌سازی اسپرم در خارج نمودن اسپرمهایی با آنومالی کروماتین دارای اهمیت است.

سه روش اصلی آماده سازی اسپرم که در کلینیکهای ART مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارتند از: Swim up، glass wool filtration، سانتریفوژ از طریق دانسیته گرادیان (۲۰).

گزارشات اخیر Sakkas و همکاران (۲۱) پیشنهاد می‌کند که تکنیک Swim up در حذف اسپرمهایی با CMA_3 مثبت مؤثر به نظر نمی‌رسد، اما با این حال توانایی Swim up در جداسازی اسپرمهای با کروماتین نرمال با توجه به روشهای مختلف ارزیابی آنومالیهای کروماتین جای بحث دارد (۲۳-۲۱). اگر چه بسیاری از گزارشات نشان می‌دهد که تکنیکهای دانسیته گرایان در حذف اسپرمهایی با آنومالی کروماتین موثرترند. با این حال مؤلفین دیگر هنوز استفاده از Swim up را به دلیل فقدان مواد شیمیایی ترجیح می‌دهند (۲۰). مطالعات نشان داده است که: Glass wool filtration در ارزیابی کروماتین و حذف اسپرمهایی با آنومالی کروماتین موثر است (۲۴). تکنیکهای سانتریفوژ از طریق دانسیته گرادیان یکی از معمول‌ترین روشهای آماده سازی اسپرم در کلینیکهای ART است. Percoll و Sil-Select و Pure Sperm و Ixa Prep با استفاده از روشهای ارزیابی کروماتین CMA_3, acridine orange نشان داده است که Percoll در جداسازی اسپرمهای با آنومالی کروماتین پایین موثر است (۲۳، ۲۵) اما با این حال اعتقاد بر این است که پرکال حاوی مقادیر زیادی آندوتوکسین است که ممکن است منجر به Fragmentation جنین و در نتیجه کاهش میزان بارداری می‌گردد (۴). بنابراین محصولاتی همچون Pure Sperm، Sil-Select، Ixa Prep به جای پرکل توصیه می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

Sakkas و همکاران (۲۱) نشان دادند که Pure Sperm و Percoll به میزان قابل ملاحظه‌ای درصد اسپرمهایی با کمبود پروتامین را کاهش می‌دهد. به دلیل عدم گزارشهایی در ارتباط با تأثیر Sil-Select، در این تحقیق بررسی و مقایسه آن با Percoll مورد توجه قرار گرفت. نتایج نشان داد Sil-Select نیز مانند Percoll به طور قابل ملاحظه‌ای درصد اسپرمها با کمبود پروتامین (CMA_3 مثبت) و یا افزایش هیستون (Stained aniline blue) را کاهش می‌دهد. به هر حال تاثیر هر دو روش در کاهش درصد اسپرمهای با آنومالی کروماتین یکسان است. توانایی دو روش Percoll، Sil-Select در بهبود اسپرمهای مرفولوژی نرمال نیز ارزیابی شد. نتایج نشان داد که هر دو روش به طور قابل ملاحظه‌ای درصد اسپرمهای غیر طبیعی را کاهش می‌دهد و تفاوتی در نقش این دو روش مشاهده نشد. این نتایج با نتایج Soderlund و Lundin (۲۰) مطابق است. در ارتباط با بهبود دانسیته و تحرک اسپرم، اسپرمها پس از شستشو با Percoll تحرک بالاتری را نسبت به Sil-Select نشان داد که این امر احتمالاً به علت اسپرم بیشتر حاصل در روش Sil-Select است. بنابراین به نظر می‌رسد که در این روش سانتریفوژ باید به اندازه‌ای کاهش یابد که اسپرم کافی جهت تلقیح جداسازی شود و بدین وسیله افزایش کیفیت اسپرمهای انتخاب شده جهت تلقیح با توجه به کروماتین و مرفولوژی و تحرک اسپرم صورت گیرد.

در ارتباط با در صد لقاح، ضریب کلیواژ و کیفیت جنین نیز بین دو روش تفاوت معناداری مشاهده نشد. درصد لقاح، ضریب کلیواژ و کیفیت بین دو روش یکسان بود. برخی از مطالعات نشانگر نقش اساسی وضعیت غیر طبیعی کروماتین اسپرم بر روی لقاح، تکامل جنین و نتیجه بارداری است (۱۰، ۱۸، ۲۶). مطالعه حاضر نشان داد: که بین درصد مرفولوژی نرمال اسپرم، درصد CMA_3 مثبت و درصد اسپرمهای رنگ گرفته به وسیله آنیلین بلو رابطه معناداری با درصد لقاح دارد. این نتایج، گزارشات قبلی در این زمینه را تایید می‌کند (۱۰، ۱۲، ۱۳). اما از بین موارد فوق مرفولوژی اسپرم رابطه معناداری با ضریب کلیواژ و کیفیت جنین دارد. این مشاهدات با نتایج Esterhuizen و همکاران (۱۳) و Hammadeh و همکاران (۱۱) مطابقت دارد، این مولفین نشان دادند که فقط درصد اسپرمهای CMA_3 مثبت بر روی میزان لقاح، لانه گزینی و نتیجه بارداری تاثیر دارد. Hammadeh و همکاران (۱۱) بر خلاف یافته‌های این پژوهش هیچ ارتباط معناداری را بین مرفولوژی اسپرم با ضریب کلیواژ مشاهده نکردند. تحقیقات دیگر نیز نشان داده که در بیمارانی با آنومالیهای کروماتین اسپرم میزان دستیابی به بارداری کاهش می‌یابد (۷).

تحقیقات قبلی بیانگر آن است که امکان تاثیر آنومالیهای کروماتین اسپرم در چندین مرحله دورهٔ تکامل جنین وجود دارد. این حقیقت که میزان لقاح آزمایشگاهی با افزایش آنومالیهای کروماتین اسپرم مثل کمبود پروتامین کاهش می‌یابد، نشان می‌دهد که لقاح از جمله مراحلی است که آنومالیهای کروماتین اسپرم بر روی آن تاثیر می‌گذارد. به علاوه مرفولوژی اسپرم از مهمترین فاکتورهای مؤثر بر لقاح است و ارتباط معنادار بالایی با آنومالیهای کروماتین دارد (جدول شماره ۲). این امکان وجود دارد که آنومالیهای کروماتین اسپرم روی لقاح از طریق مرفولوژی اسپرم صورت پذیرد. به هر حال مطالعات قبلی نشان داده است نقش آنومالیهای کروماتین اسپرم، به ویژه کمبود پروتامین بر روی میزان لقاح، مستقل از مرفولوژی اسپرم است و این امر ضرورت ارزیابی آنومالیهای کروماتین اسپرم را در طی آنالیز روتین سمن نشان می‌دهد (۱۰، ۱۳). همچنین امکان تاثیر آنومالیهای کروماتین بر روی میزان کلیواژ و کیفیت جنین اثر مطرح است. نتایج ما نشان می‌دهد که فقط درصد مرفولوژی نرمال بر روی کیفیت جنین تاثیر داشته و ارتباط معناداری بین کمبود پروتامین و ضریب کلیواژ و کیفیت جنین وجود ندارد (جدول ۲). کاهش درصد تشکیل بلاستوسیست در موارد ICSI نسبت به IVF ممکن است به علت درصد بالاتر اسپرمهای CMA_3 مثبت باشد (۱۸). شاید به این علت باشد که در IVF لقاح به عنوان یک سد در مقابل اسپرمهای دارای آنومالی کروماتین (CMA_3 مثبت) عمل می‌نماید (۲۷). از آنجایی که یافته‌های ما ارتباطی بین درصد اسپرمهای CMA_3 مثبت و ضریب کلیواژ و کیفیت جنین نشان نمی‌دهد این امکان وجود دارد که تاثیر آنومالیهای کروماتین بر روی تکامل جنینی بعد از بروز ژنوم جنینی (۸-۴ سلولی) صورت گیرد (۲۸). میزان اندک بارداری در بیماران با نقایص کروماتین اسپرمی احتمال اختلال در تکامل بعد از لانه گزینی را مطرح می‌کند (۱۲، ۱۳، ۲۹). یک احتمال در ارتباط با اثر آنومالیهای کروماتین روی تکامل جنینی، متیلاسیون DNA برای Imprinting طی اسپرمیوژنز است (۳۰). کاهش میزان بلاستوسیستها ناشی از نقص DNA با Fragmentation بلاستومرها با ضایعات کروماتینی اسپرم قابل توجیه است (۲۱).

از این رو نقش آنومالیهای کروماتین اسپرم بر روی لقاح و تکامل جنین مشهود می‌گردد. بنابراین انتخاب اسپرمهایی با مورفولوژی و وضعیت کروماتین نرمال برای لقاح و ادامه تکامل ضروری به نظر می‌رسد، به ویژه در روش ICSI که امکان عبور اسپرمهای با کروماتین یا مرفولوژی غیر طبیعی از سد انتخابی لقاح وجود دارد. لذا در روش ICSI آماده سازی اسپرم به منظور انتخاب اسپرم با کروماتین و مرفولوژی طبیعی توصیه می‌شود. نتایج حاصله از این مطالعه و سایر تحقیقات انجام شده مؤید این نکته است که تکنیکهای گرادیان دانسیته منجمله Sperm Sil-Select، Pure-Filrtation، Glass-Wool به عنوان یک جایگزین برای پرکل در روش ICSI مناسب به نظر می‌رسند.

تقدیر و تشکر

این مطالعه طرح تحقیقاتی مصوب شماره ۷۹۳۲۴ دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد و نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین محترم پژوهشی و گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، متخصصین و کارشناسان مرکز باروری و ناباوری اصفهان که امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند ابراز می‌دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Balhorn R: A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. J Cell Biol 1982; 93: 298-305
2. Golan R, Cooper TG, Oschry Y: Changes in chromatin condenstion of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry. Hum Rep 1996; 11: 1457-1462
3. Fawcett DY, Anderson WA, Phillips DM: Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. Dev Bio 1979; 26: 220-251
4. 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 Genet 2000; 17(1): 60-66
5. Fishel S, Aslam I, Tesarik J: Spermatid conception A stage early, or a time too soon? Hum Reprod 1996; 11(3): 1371-1375
6. Bianchi PG, Mancadri GC, Bizzaro 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
7. Evenson DP, Jost LK, Marshall D: Utility of sperm chromatin structure assay (SCSA) as a diagnostic and prognostic in the human fertility clinic. Hum Reprod 1999; 14: 1039-1149
8. Zini A, Bielecki R, Phang D: Correlatioms between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile men. Fertil Steril 2001; 75: 674-677
9. Sakkas D, Urner F, Bianchi PG: Sperm chromatin anomalies can influence decndensation after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1996; 11: 837-843
10. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M: Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. Assist Reprod Genet 2001: 18: 219-225
11. Hammadeh ME, Stieder M, Haidle G, Schmidt W: Assocciation between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict and fertlilizatiob, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. J Androl 1998; 30: 29-35
12. Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JGH: Sperm chromatin packaging as an indicator of in vitro fertilization rates. Hum Reprod 2001; 15: 657-661
13. Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JGH: Chromatin packaging as an indicator of human sperm disfunction. J Assisst Reprod Genet 2000; 17(9): 508-514
14. Fishel S, Jackson P, Webster J: Endotoxins in culture medium fro an in vitro fertilization. Fertil Steril 1988; 49: 108-111
15. Svalander PC, Lundin K, Holmes PV: Endotoxin levels in Percoll density gradient media used to prepare sperm for human IVF treatment. Hum Reprod 1995; 10: (Abstract book 2), 130
16. Bongso A: Hand book on blastocyst culture. Department of Obsterticr and Gynaecology, National University of Singapore 1996; 26
17. Bongso PR (2nd end): In-vitro Fertilization assisted Reproduction, The Bourn Hall Guide to Clinical and labratory practiceL Cambridge, 1999; 524
18. Sakkas D, Urner F, Bizzaro D: perm nuclear DNA damage and altered Chromatin structure: Effect on fertilization and embryo development. Hum Reprod 1998; 13: 11-19
19. Kruger TF, Acosta AA, Simmons: Predictive value of adnormal sperm morphology in vitro fertilization. Ferto Sterol 1988; 49: 112-117
20. Söderlund B, Lundin K: The use of silane-coated Silica particles fro density gradient centrifugation in in-vitro fertilization. Hum Reprod 2000; 15(4): 857-860
21. Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M: The use of two density gradient centrifugation techniques and swim up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. Hum Reprod 2000; 15: 1112-1116
22. Spano M, Cordelli E, Leter G: Nuclear chromation variations in human spermatozoa undergoing swim up and cryoperservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structural assay. Mol Hum Reprod 1999; 5: 29-37
23. Angelopoulos T, Yarn A, Moshel BSC: Simultaneous assessment of sperm chromatin condensation and morphology before and after separation procedure: Effect on the clinical outcome after in vitro fertilization. Fertil Steril 1998; 69: 740-747
24. Larson KI, Brannian JD, Timm BK: Density gradient centrifugation and glass wool filtration of semen remove spermatozoa with damaged chromatin structure. Hum Reprod 1999; 14: 2015-2019
25. Lolis D, Georgio I, Syrrou M: Chromomycin A3 ataining as an indicator of protamine dificiency and

www.SID.ir

Archive of SID

fertilization. int Androl 1996; 19: 23-27
26. Lopes S, Jurisicovai A, Casper RF: Gamete specific DNA fragmentation in Unfertilized huamn oocytes after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1998; 13: 703-708
27. Griffiths TI, Murdoch AP, Hebert M: Embryonic development in vitro is compromised by the ICSI procedure. Hum Reprod 2000; 1592-1596
28. Braund P, Bolton V, Moors S: HUamn gene expression first occurs between the four-and eight-cell stages of preimplantation development. Nature 1988;332: 459-461
29. Evanson DP, Jost LK, Marshal D: Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. Hum Reprod 1999; 14: 1039-1049
30. Reik W, Walter J: Genomic imprinting: Parental influence on the genome. Nature reviews Genet 2001; 2: 21-32

www.SID.ir