Archive of SID

Original Article

Effects of Spermiogenic Defects on Fertilization and Pregnancy Rate in IVF Patients

M. Tavalaee, M.Sc.[1], Sh. Razavi, Ph.D.[2], M.H. Nasr-Esfahani, Ph.D.[1,3]*

1. Embryology & Andrology Department, Royan Institute
2. Anatomy Department, Faculty of Medicine, Isfahan University
3. Isfahan Fertility and Infertility Center

*Corresponding Address: P.O.Box:19395-4644, Embryology & Andrology Department, Royan Institute, Tehran, Iran
Email: mh_nasr@med.mui.ac.ir

Abstract

Received: 27/Jan/2007, Accepted: 20/Jun/2007

Objective: The objective of this study was to evaluate the relationship between spermiogenic defects such as protamine deficiency, and acrosomal integrity with fertilization and pregnancy rate in IVF patients.

Materials and Methods: Density, motility and morpology of semen samples from 70 infertile couples undergoing IVF at Isfahan Fertility and Infertility center were analyzed according to WHO criteria. Protamine deficiency and acrosin activity were assessed by Chromomycin A3 (CMA3) and Gelatinolysis test. Statistical analysis was carried out using the Statistical Package for the Social Studies (SPSS 11.5) and P-value lower than 0.05 was considered to be significant.

Results: CMA3 positivity, percentage halo formation, means halo diameter and sperm morphology showed a significant correlation with fertilization rate. The rate of halo formation and mean halo diameter showed a significant correlation with CMA3 positivity. None of the parameters were significantly different between pregnant and non - pregnant patients. However, the rate of halo formation showed a closely significant difference (r=0.306; P=0.058).

Conclusion: The results of the present study indicate that sperm acrosomal integrity assessed by percentage halo formation has profound effects on pregnancy outcome in IVF procedure.

Keywords: Chromomycin A3 (CMA3), Gelatinolysis Test, Pregnancy, *In Vitro* Fertilization

Yakhteh Medical Journal, Vol 9, No 2, Summer 2007, Pages:103-110

www.SID.ir

Archive of SID

تاثیر نقایص اسپرمیوژنز بر نتایج لقاح و حاملگی در بیماران کاندید IVF

مرضیه تولایی .M.Sc[1]، شهناز رضوی .Ph.D[2]، محمدحسین نصراصفهانی .Ph.D[3,1]*

۱. پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی و آندرولوژی
۲. دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح
۳. مرکز باروری و ناباروری اصفهان

* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق‌پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی و آندرولوژی
پست الکترونیک: Email: mh_nasr@med.mui.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۱۱/۷، پذیرش مقاله: ۸۶/۳/۳۰

* **هدف:** بررسی رابطه بین نقایص اسپرمیوژنز از جمله کمبود پروتامین و سلامت آکروزوم با میزان لقاح و حاملگی در بیماران کاندید IVF

* **مواد و روش‌ها:** نمونه‌های سمن از ۷۰ زوج نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان جهت انجام IVF جمع‌آوری شد. بخشی از نمونه‌های سمن جهت آنالیز پارامترهای اسپرمی(غلظت، تحرک، مورفولوژی) بر اساس معیار WHO و بخش اعظم آن جهت انجام IVF آماده گردید. باقی‌مانده نمونه جهت رنگ‌آمیزی کروموماپسین A3 و تست ژلاتینولیز به ترتیب برای ارزیابی کمبود پروتامین و فعالیت آکروزین به عنوان شاخص سلامت آکروزوم (میانگین قطر هاله و درصد تشکیل هاله) مورد استفاده قرار گرفت. نتایج با آزمون‌های آماری ضریب همبستگی و T-Test با استفاده از نرم‌افزار SPSS-11.5 بررسی و تحلیل شدند.

* **یافته‌ها:** از لحاظ آماری میزان لقاح رابطه معنی‌داری را با درصد اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین (CMA3 مثبت)، درصد تشکیل هاله، میانگین قطر هاله و ناهنجاری‌های مورفولوژیک نشان داد که بالاترین ضریب همبستگی مربوط به درصد تشکیل هاله است. به علاوه از لحاظ آماری بین درصد اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین با درصد تشکیل هاله و میانگین قطر هاله رابطه معنی‌داری وجود دارد. در مطالعه حاضر، اختلاف معنی‌داری بین میانگین پارامترهای مذکور در دو گروه افراد واجد حاملگی و فاقد حاملگی مشاهده نشد. اگرچه درصد تشکیل هاله بسیار نزدیک به معنی‌دار شدن است (p=۰/۰۵۸؛ r=۰/۳۰۶).

* **نتیجه‌گیری:** نتایج بیانگر آن است که اگرچه در طی اسپرمیوژنز تشکیل ساختار آکروزوم و جایگزینی پروتامین در ساختار کروماتین همزمان انجام می‌گیرد، اما به علت نقش اساسی که آکروزوم در طی روند اتصال به زونا، نفوذ به داخل زونا و همچنین فعال کردن تخمک دارد، احتمالا سلامت آکروزوم نسبت به کمبود پروتامین تاثیر بارزتری را طی روند لقاح به طریق IVF نشان می‌دهد.

کلیدواژگان: کروموماپسین A3، تست ژلاتینولیز، حاملگی، لقاح آزمایشگاهی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال نهم، شماره ۲، تابستان ۸۶، صفحات: ۱۱۰-۱۰۳

مقدمه

اسپرمیوژنز یک روند پیچیده‌ای است که در طی آن اسپرماتوگونی به اسپرماتوزوای بالغ تبدیل می‌شود. در طی این پروسه تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی رخ می‌دهد. از جمله این تغییرات جایگزینی ۸۵ درصد پروتامین با هیستون است (۱). پروتامین‌ها، پروتیین‌هایی با وزن مولکولی کم و بار مثبت زیاد هستند که تراکم و بسته بندی کروماتین اسپرم را با تشکیل باندهای دی سولفید در بین ریشه‌های سیستئین پایدار می‌کند (۲). تراکم DNA در هسته اسپرم باعث (۳) هیدرودینامیک شدن سر اسپرم، تسریع حرکت اسپرم در دستگاه ژنیتال مونث و در نهایت عبور از زونا، حفاظت ماده ژنتیکی از آسیب‌های فیزیکی و شیمیایی و برنامه‌ریزی مجدد ژنومی می‌شود. به طوری که باعث بیان ژن‌های خاص کروموزوم‌های پدری در مراحل اولیه جنینی می‌شود و نهایتا در هماهنگی سیکل سلولی اسپرم و تخمک نقش دارد.

تحقیقات نشان می‌دهد کمبود پروتامین با ناباروری مردان ارتباط دارد و بیمارانی که با کمبود پروتامین مواجه هستند معمولا با کاهش پارامترهای اسپرمی، ازجمله: تعداد، تحرک و مورفولوژی طبیعی سر اسپرم مواجه هستند (۹-۴).

مطالعات بر روی اووسیت‌های لقاح نیافته پس از ICSI نشان داده است که درصد تراکم زودرس کروماتین (Premature chromosome condensation: PCC) در افرادی که کمبود پروتامین یا هیستون اضافی دارند بیشتر از افرادی است که پروتامین آنها طبیعی است (۱۰). در لقاح طبیعی، اسپرم در مرحله انترفاز یا G1 با اووسیت در مرحله متافاز ادغام می‌شود. در این حالت PCC رخ نمی‌دهد چرا که اسپرم فاقد هیستون اضافی است و عامل تراکم کروماتین در سلول متافازی نمی‌تواند بر روی پروتامین تاثیر بگذارد (۱۳-۱۱). از دیگر عواملی که در جلوگیری از PCC موثر است، فاکتور پیش برنده میتوزی (Mitotic Promoting Factor: MPF)

www.SID.ir

Archive of SID

است. با ورود اسپرم به داخل اووسیت و آزاد شدن (Sperm Associated Oocyte Activating Factors: SAOAF) از ناحیه غلاف خلف آکروزومی، MPF غیرفعال می‌شود. طی غیرفعال شدن MPF، پروتامین مجددا با هیستون جایگزین می‌شود و در این زمان تخمک تقسیم میوز را تمام و وارد فاز G1 شده و سیکل سلولی بین اسپرم و تخمک هماهنگ می‌شود (۱۴، ۱۵). وضعیت PCC در طی پروسه IVF و ICSI با یکدیگر فرق دارد. در ICSI کل اسپرم که محصور در غشای پلاسمایی است به داخل تخمک تزریق می‌شود در حالی که در IVF صرفا هسته اسپرم وارد اووپلاسم می‌شود. بنابراین در طی روند IVF برخلاف ICSI آزاد شدن فاکتور SAOAF تسهیل می‌شود و امکان PCC کاهش می‌یابد (۱۱، ۱۶، ۱۷).

در اواخر اسپرمیوژنز همزمان با جایگزینی پروتامین، ساختار آکروزوم نیز شکل می‌گیرد. آکروزوم به هنگام فرایند لقاح در محل اتصال به زونا پلوسیدا دچار واکنش آکروزومی می‌گردد (۱۸). این اندامک شامل چندین آنزیم از جمله هیالورونیداز، استراز، اسید فسفاتاز و آکروزین است. آکروزین یک تریپسین شبیه سرین پروتئاز است که در آکروزوم اسپرم پستانداران قرار دارد. این آنزیم نقش مهمی در اتصال به زونا پلوسیدا و نفوذ به داخل آن را دارد (۱۹، ۲۰). به علاوه این آنزیم در ارتباط با ظرفیت یابی، واکنش آکروزومی و فرآیند خروج از تراکم کروماتین در طی تشکیل پرونوکلئوس مذکر نقش دارد (۲۱). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که عدم موفقیت لقاح در روش IVF را می‌توان به کاهش فعالیت آکروزین در آکروزوم سر اسپرم و یا کاهش میزان پروتامین در DNA هسته اسپرم نسبت داد (۲۵-۲۱).

با توجه به اینکه تراکم کروماتین و تشکیل ساختار آکروزوم طی فرآیند اسپرمیوژنز صورت می‌گیرد، تصمیم گرفته شد، با ارزیابی تراکم کروماتین به روش رنگ‌آمیزی CMA3 و سلامت آکروزوم به روش تست ژلاتینولیز، رابطه ایندو پارامتر با میزان لقاح و حاملگی در بیماران کاندید IVF مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی اسپرم

نمونه‌های سمن از ۷۰ زوج نابارور که از مهر ماه سال ۱۳۸۴ تا اردیبهشت ماه ۱۳۸۵ جهت انجام IVF به مرکز باروری و ناباروری اصفهان مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری شد. از ۷۰ بیمار مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اطلاعات حاملگی ۳۹ بیمار در دسترس است. از این ۳۹ بیمار، ۲۰ مورد حاملگی و ۱۹ مورد عدم حاملگی گزارش شده است. مایع سمن در روز تخمک‌گذاری، پس از ۴-۳ روز پرهیز از مقاربت آماده شد و با ثبت فرم رضایت بیمار، نمونه‌های سمن برای انجام این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. بخشی از نمونه‌های سمن جهت آنالیز پارامترهای اسپرمی (غلظت،تحرک و مورفولوژی) با استفاده از میکروسکوپ نوری بر اساس معیار WHO بررسی (۲۶) و بخش اعظم آن با استفاده از (Pure Sperm Gradients) (۴۰:۸۰) جهت انجام IVF آماده شد. لازم به ذکر است تمامی مواد مصرفی در این مطالعه به جز موارد اشاره شده در متن از شرکت سیگما (U.S.A) تهیه شده است.

لقاح آزمایشگاهی (IVF) و انتقال جنین

تخمک‌گیری به روش روتین سونوگرافی واژینال صورت پذیرفت. تخمک همراه با کومولوس‌های اطراف آن (Cumulus Oocyte Complex: COC) از مایع فولیکولی جدا و در محیط G-MOPS شستشو داده شد. سپس هر COC به داخل قطرات ۵۰ میکرولیتری در زیر روغن Mineral Oil منتقل شد. اسپرم آماده‌سازی شده توسط گرادیان پیور با محیط G-Rinse شستشو و به هر COC، حدود ۱۰۰۰۰۰-۵۰۰۰۰ اسپرم اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد اکسیژن، ۵ درصد Co_2 و ۹۵ درصد رطوبت به مدت ۱۸ ساعت نگهداری شد. در این زمان تخمک‌ها از توده کومولوسی جدا شدند و از نظر وجود پیش هسته‌ها در زیر میکروسکوپ معکوس (Nikon) بررسی شدند. تخمک‌های لقاح یافته به قطرات محیط G1 در زیر روغن Mineral Oil منتقل شده و پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از جداسازی توده کومولوسی، مراحل کلیواژ تعیین و ثبت شد. میزان لقاح بر اساس نسبت تخمک PN2 به تخمک بالغ نیز مشخص شد. تخمک‌های دژنره و وزیکول ژرمینال از این مطالعه حذف شدند. لازم به ذکر است که تمام محیط‌های IVF از شرکت Gothenburg, Sweden و Vitrolife تهیه شد (۲۴).

تست ژلاتینولیز

فعالیت آکروزین به عنوان شاخص سلامت آکروزوم توسط تست ژلاتینولیز ارزیابی شد (۲۱). بر اساس این آزمایش ۲۰ میکرولیتر از ژلاتین ۵ درصد بر روی اسلایدها کشیده، سپس در هوا خشک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب نگهداری شد. بعد از آن اسلایدها با گلوتارآلدهید ۰/۵ درصد (Merck) فیکس و دوبار با PBS شستشو داده شد. ۲۰ میکرولیتر محلول سمن شستشو شده را با نسبت ۱:۱۰ در PBS که حاوی ۱۵/۷ میلی‌مول در لیتر گلوکز است، رقیق کرده و اسمیری از این محلول بر روی اسلایدهایی که قبلا توسط ژلاتین پوشیده شده است تهیه و در محیط مرطوب و دمای ۳۷ درجه به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. برای هر نمونه، ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های دارای هاله و قطر آنها (بر حسب میکرومتر) با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست و توسط نرم افزار Olysia مشخص شد. قطر هاله‌ها پس از تصویربرداری، با مقیاس میکرومتر مشخص و در جدول ثبت شد. سپس میانگین آن توسط نرم افزار محاسبه شد.

سنجش کمبود پروتامین (رنگ‌آمیزی کرومایسین A3)

اسمیرهای آماده شده از مایع اسپرمی در محلول کارنوی (متانول و اسید استیک با نسبت ۳:۱) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد فیکس شد. به منظور انجام رنگ‌آمیزی CMA3، هراسلاید به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول CMA3 رنگ آمیزی شد (۰/۲۵ گرم بر میلی‌لیتر در بافر مک الوین: ۷ میلی‌لیتراسیداستیک ۰/۱ مولار و ۳۲/۹ میلی‌لیتر از $7H_2O$ و Na_2HPO_4 و با غلظت ۰/۲ مولار pH=۷

www.SID.ir

Archive of SID

شامل ۱۰ میلی مولاراز $MgCl_2$). سپس اسلایدها توسط بافر گلیسرول شستشو و با همین بافر (۱:۱) مونت شدند. با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس Olympus (BX51, Tokyo, Japan) با فیلتر ۴۷۰-۴۶۰ در همان روز ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. درصد اسپرم‌های با رنگ زرد درخشان (CMA_3^+) و اسپرم‌های با رنگ زرد تیره (CMA_3^-) با استفاده از نرم‌افزار Olysia محاسبه شد (۲۲).

آنالیز آماری

آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری ضریب همبستگی (Correlation Coefficient)، Descriptive و T-Test توسط نرم‌افزار SPSS-11/5 انجام گرفت و در صورتی که $p<0/05$ بود از لحاظ آماری معنی‌دار محسوب شد.

یافته‌ها

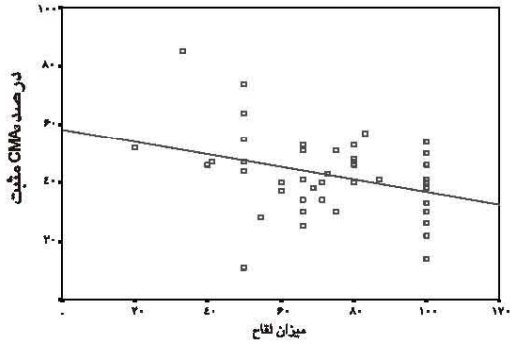
نمونه‌های سمن از ۷۰ زوج نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان که کاندید IVF بودند، به دست آمد. میانگین سن افراد مورد مطالعه ۴/۵±۳۵ و همسران آنها ۴/۷±۳۰ بود. نتایج حاصل از ارزیابی پارامترهای سمن، تست ژلاتینولیز (درصد تشکیل هاله- میانگین قطر هاله)، کمبود پروتامین و میزان لقاح در جدول ۱ نشان داده شده است.

در این مطالعه محدوده لقاح بین ۱۰۰-۲۰ درصد و میانگین آن ۲۳/۴۱ ± ۷۱/۶۲ بود. حداقل غلظت اسپرم ۵ میلیون در هر میلی‌لیتر بود و درصد کمبود پروتامین به وسیله کروموما‌یسین A3 ارزیابی شد که ۱۰۰-۱۱ درصد و میانگین آن ۱۷/۲۴±۴۲/۱۰ بود.

رابطه بین پارامترهای سمن، درصد تشکیل هاله، میانگین قطر هاله، درصد اسپرم‌های CMA3 مثبت و میزان لقاح در جدول ۲ مشخص شده است. از لحاظ آماری بین درصد اسپرم‌های CMA3 مثبت با میزان لقاح، درصد تشکیل هاله، میانگین قطر هاله و ناهنجاری‌های مورفولوژیک رابطه معنی‌داری وجود دارد. به علاوه میزان لقاح از لحاظ آماری رابطه معنی‌داری با درصد تشکیل هاله، میانگین قطر هاله و ناهنجاری‌های مورفولوژیک نشان داده است (نمودار ۱ و ۲). نتایج این مطالعه بیانگر یک رابطه معنی‌داری بین میانگین قطر هاله با درصد تشکیل هاله، ناهنجاری‌های مورفولوژیک، تحرک و غلظت اسپرم است. همچنین در این مطالعه از لحاظ آماری رابطه معنی‌داری بین درصد تشکیل هاله و ناهنجاری‌های مورفولوژیک وجود دارد.

در این مطالعه بیماران به دو گروه واجد حاملگی و فاقد حاملگی تقسیم شدند و پارامترهای اسپرمی، درصد تشکیل هاله، میانگین قطر هاله، درصد اسپرم‌های CMA3 مثبت و میزان لقاح در این دو گروه بررسی شد که در جدول ۳ نشان داده شده است. از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه به لحاظ پارامترهای ذکر شده، مشاهده نشد ولی درصد تشکیل هاله در بین این دو گروه از نظر آماری بسیار نزدیک به معنی‌دار شدن است (r=۰/۳۰۶، p=۰/۰۵۵۸).

در این مطالعه، بیماران بر اساس درصد تشکیل هاله به دو گروه کمتر و بیشتر از ۶۰درصد تقسیم شدند و تعداد جنین با کیفیت مناسب در این دو گروه مورد ارزیابی قرار گرفت. در گروهی که درصد هاله بیشتر از ۶۰درصد بود، میانگین تعداد جنین با کیفیت مناسب ۰/۴۲±۲/۴۱ و در گروهی که درصد هاله کمتر از ۶۰ در صد بود، میانگین تعداد جنین با کیفیت مناسب ۱/۵۶±۱/۳ است.



نمودار ۱: رابطه بین درصد اسپرم‌های CMA3 مثبت با میزان لقاح IVF (r=۰/۳۴۰، p=۰/۰۲۱).

جدول ۱: مشخصات پارامترهای سمن، تست ژلاتینولیز، کمبود پروتامین و میزان لقاح در بیماران کاندید IVF

پارامترها	تعداد نمونه	حداقل	حداکثر	انحراف معیار ± میانگین
غلظت اسپرم (10^6× میلی‌لیتر)	۶۸	۵	۱۲۰	۵۵/۲۳±۲۵/۷۰
درصد مورفولوژی غیر طبیعی	۶۸	۳۸	۱۰۰	۶۵/۰۷±۱۲/۸۴
درصد تحرک	۶۸	۵	۷۰	۳۷/۵۷±۱۳/۷۶
درصد تشکیل هاله	۷۰	۴۲	۱۰۰	۷۷/۶۷±۱۲/۹۲
میانگین قطر هاله (میکرومتر)	۷۰	۵/۵۳	۱۷/۹۰	۱۲/۳۱±۲/۹۲
درصد CMA_3^+	۶۰	۱۱	۱۰۰	۴۲/۱۰±۱۷/۲۴
درصد لقاح IVF	۵۰	۲۰	۱۰۰	۷۱/۶۲±۲۳/۴۱

جدول ۲: رابطه بین پارامترهای مختلف با میزان لقاح، درصد اسپرم‌های CMA_3^+، درصد تشکیل هاله و میانگین قطر هاله

پارامترها	میزان لقاح P-Value	درصد CMA_3^+ (P-Value)	درصد تشکیل هاله (P-Value)	میانگین قطر هاله (P-Value)
غلظت اسپرم (10^6× میلی‌لیتر)	-۰/۰۶۵(۰/۶۵۱)	-۰/۰۹۹(۰/۴۵۱)	۰/۱۰۳(۰/۴۰۱)	۰/۲۵۹(۰/۳۳۰)*
درصد مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم	-۰/۳۳۰(۰/۰۲۲)*	۰/۲۷۴(۰/۰۳۳)*	-۰/۳۳۹(۰/۰۰۵)**	۰/۳۰۸(۰/۰۱۱)*
درصد تحرک	-۰/۰۲۳(۰/۸۷۲)	-۰/۲۲۳(۰/۰۸۷)	۰/۲۰۳(۰/۹۷)	۰/۲۸۲(۰/۰۲۰)
درصد تشکیل هاله	-۰/۴۴۵(۰/۰۰۱)**	-۰/۲۹۰(۰/۰۲۵)*	-	۰/۷۸۹(۰/۰۰۰)**
میانگین قطر هاله (میکرومتر)	۰/۳۲۲(۰/۰۲۳)*	-۰/۳۴۳(۰/۰۰۳)**	۰/۷۸۹(۰/۰۰۰)**	-
درصد CMA_3^+	-۰/۳۳۰(۰/۰۲۲)*	-	-۰/۲۹۰(۰/۰۲۵)*	-۰/۳۴۳(۰/۰۰۶)**

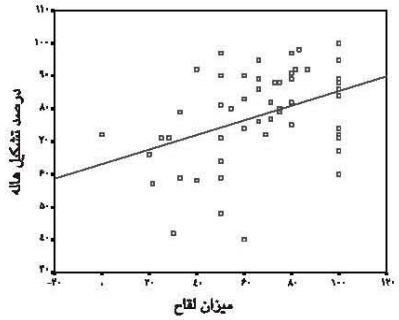
* ارتباط معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ ** ارتباط معنی‌دار در سطح p<۰/۰۱

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳: مقایسه میانگین پارامترهای مختلف بین دو گروه حاملگی و عدم حاملگی

پارامترها	عدم حاملگی	حاملگی	P-Value
غلظت اسپرم (10^6× میلی‌لیتر)	۵۱/۹۴±۲۶/۹۷	۵۷/۲۱±۲۶/۵۲	۰/۵۲۸
درصد مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم	۶۴/۰۰±۱۵/۲۷	۶۱/۷۸±۱۰/۳۲	۰/۶۰۵
درصد تحرک	۱۱/۸۹±۱۷/۱۱	۴۶/۰۵±۱۱/۳۷	۰/۹۷۳
درصد تشکیل هاله	۷۴/۱۰±۱۶/۸۴	۸۲/۵۰±۸/۹۵	۰/۰۵۸
میانگین قطر هاله (میکرومتر)	۱۱/۸۹±۳/۴۳	۱۳/۲۹±۲/۴۲	۰/۱۵۳
درصد CMA_3^+	۳۷/۱۸±۱۶/۳۳	۴۰/۶۱±۱۳/۹۵	۰/۵۱۹
درصد لقاح IVF	۷۰/۲۹±۲۳/۲۸	۷۵/۳۰±۲۲/۲۳	۰/۵۸۱



نمودار ۲: رابطه بین درصد تشکیل هاله با میزان لقاح IVF (r=۰/۳۳۵، p=۰/۰۰۱).

بحث

دست‌یابی به لقاح و تکامل جنین نیازمند تعامل متقابل اسپرم و تخمک و به دنبال آن وقوع یک سری وقایع متوالی است. بخشی از این وقایع مربوط به ادغام اسپرم و تخمک است که منجر به آمیختن کروموزوم‌های موجود در اسپرم و تخمک می‌شود و لازمه آن فعال شدن تخمک توسط فاکتورهای موجود در اسپرم است. عدم موفقیت در لقاح را می‌توان به فاکتورهای اسپرمی، تخمکی و یا هر دو نسبت داد. از جمله این فاکتورها می‌توان به تعداد و کیفیت تخمک و حیات، مورفولوژی، وضعیت کروماتین و نقایص آکروزومی اسپرم اشاره کرد (۲۹-۲۷).

در این مطالعه وضعیت کروماتین اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی CMA3 که معرف کمبود پروتامین در کروماتین هسته اسپرم است مورد ارزیابی قرار گرفت. از نظر آماری رابطه معنی‌داری بین کمبود پروتامین و میزان لقاح IVF وجود دارد (جدول۲) که با نتایج مطالعه آوکی و همکاران و نصراصفهانی و همکاران مطابقت دارد (۲۲،۳۰). رابطه بین میزان لقاح با کمبود پروتامین را می‌توان از ابعاد مختلفی مورد بررسی قرار داد که در قسمت زیر به آن می‌پردازیم:

آوکی و همکاران و کارل و همکاران نشان داده‌اند کیفیت سمن با کمبود پروتامین رابطه معکوس معنی‌داری دارد (۳۱، ۳۲)، از میان پارامترهای اسپرمی بیشترین ارتباط با ناهنجاری‌های مورفولوژی است. علاوه بر این در مطالعات قبلی با استفاده از رگرسیون منطقی نشان داده شد که مورفولوژی اسپرم تاثیر بیشتری نسبت به کمبود پروتامین بر روند لقاح IVF دارد. اگرچه کمبود پروتامین به صورت مستقل بر فرآیند لقاح تاثیرپذیر است (۲۲). در این مطالعه نیز رابطه معنی‌داری بین کمبود پروتامین و ناهنجاری‌های مورفولوژی با میزان لقاح مشاهده شد (جدول ۲).

بر اساس گزارش‌های قبلی و مطالعه حاضر، چنین استنباط می‌شود که کمبود پروتامین می‌تواند باعث ناهنجاری‌های مورفولوژیک اسپرم شود و احتمالا چنین اسپرم‌هایی قابلیت نفوذ به زونا پلوسیدا را ندارند و بنابراین شانس موفقیت لقاح در آنها پایین است (۳۳، ۳۴). البته در این نمونه‌ها احتمالا اسپرم با مورفولوژی طبیعی نیز وجود دارد که توانایی نفوذ به زوناپلوسیدا را دارا است، در صورتی که چنین اسپرمی به داخل تخمک نفوذ کند به علت وجود هیستون اضافی که توسط پروتامین جایگزین نشده، تحت تاثیر MPF فعال تخمک قرار گرفته و دچار تراکم زودرس کروماتین یا PCC می‌شود که منجر به عدم لقاح می‌شود و این امر می‌تواند توجیهی برای ارتباط مستقل پروتامین از مورفولوژی بر فرآیند لقاح باشد. به علاوه طی روند IVF، اسپرم‌هایی قابلیت اتصال و نفوذ به زونا دارند که دارای ساختار آکروزوم طبیعی باشند. ساختار آکروزوم طبیعی نه تنها در اتصال و نفوذ به زونا اهمیت دارد بلکه در فعال شدن تخمک پس از ورود به آن نیز نقش دارد. عدم لقاح در روند ICSI و IVF توسط اسپرماتوزوا با سر گرد موید این مطلب است (۳۵).

کمبود پروتامین در اسپرم توسط شاخص CMA_3^+ مثبت و سلامت آکروزوم توسط تست ژلاتینولیز مورد ارزیابی قرار گرفت. این تست بر اساس آنزیم‌های موجود در آکروزوم جهت هیدرولیز کردن یک پروتیین با وزن مولکولی بالا شبیه ژلاتین به کار می‌رود. به علاوه این تست نمایانگر سلامت آکروزوم در اسپرم است (۲۱). در این مطالعه از نظر آماری رابطه معکوس معنی‌داری بین این دو پارامتر مشاهده شد (جدول ۲). نتایج حاکی از آن است که اسپرم‌هایی که دارای کمبود پروتامین هستند معمولا با کاهش سلامت آکروزوم مواجهند و قابلیت نفوذ به تخمک را ندارند که می‌تواند توجیهی برای کاهش میزان لقاح در این گونه بیماران باشد. ارتباط بین کمبود پروتامین و سلامت آکروزوم می‌تواند موید همزمانی بازسازی کروماتین اسپرم و تشکیل آکروزوم در طی مراحل آخر اسپرمیوژنز باشد (۳۶). با توجه به نمودار ۱ و ۲ می‌توان دریافت که رابطه بین میزان لقاح و درصد تشکیل هاله (سلامت آکروزوم) نسبت به رابطه بین میزان لقاح و کمبود پروتامین در بین بیماران IVF بیشتر است. در این گونه بیماران، اسپرم در مجاور تخمک قرار می‌گیرد و تنها اسپرمی که از لحاظ آکروزوم سالم باشد توانایی اتصال به زونا پلوسیدا و نفوذ به این ناحیه را دارد. لذا قادر است تخمک را نیز بارور کند. لذا در لقاح آزمایشگاهی، احتمالا ساختار آکروزومی که در طی اسپرمیوژنز تشکیل می‌شود از اهمیت بیشتری نسبت به کمبود پروتامین برخوردار است. ضمنا اگر از اسپرمی که کمبود پروتامین و نقص در سلامت آکروزوم دارد، جهت ICSI استفاده شود قادر به

www.SID.ir

Archive of SID

فعال‌سازی تخمک نبوده و سطح MPF در این تخمک، پس از ورود اسپرم کاهش نمی‌یابد و با وجود کمبود پروتامین و احتمالا هیستون اضافی با کاهش میزان لقاح مواجه می‌شود. بنابراین در بیماران ICSI احتمالا بازسازی کروماتین اسپرم اهمیت بیشتری نسبت به سلامت آکروزوم دارد (۳۷).

مطالعه‌ای که توسط تساریک و همکاران صورت گرفت، نشان داد طی روند ICSI اگر از اسپرماتید (که هنوز جایگزینی هیستون با پروتامین به طور کامل صورت نگرفته است) جهت تزریق استفاده شود، درصد میزان لقاح بسیار پایین است و پیشنهاد کردند که یکی از علل عدم لقاح در اسپرماتیدها کمبود پروتامین است که احتمالا منجربه القا PCC می شود (۳۸). به علاوه نتایج مطالعه‌ای که توسط اَسلام و همکاران انجام شد، موید این مطلب است که اسپرماتیدهای طویل کمتر از اسپرماتیدهای گرد دچار PCC می‌شوند. این مساله می‌تواند به علت جابه‌جایی بیشتر هیستون‌ها توسط پروتامین باشد (۳۹).

فعالیت آکروزین در اسپرم جهت پیشگویی توانایی باروری اسپرماتوزوا با تخمک، اهمیت دارد (۲۱). در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم آکروزین با استفاده از تست ژلاتینولیز که نمایانگر سلامت آکروزوم است، مورد ارزیابی قرار گرفت. هنکل و همکاران فعالیت آنزیم آکروزین را به دو صورت درصد تشکیل هاله و میانگین قطر هاله در بیماران کاندید IVF مورد ارزیابی قرار دادند و نشان دادند اگر درصد تشکیل هاله کمتر از ۶۰درصد یا میانگین قطر هاله کمتر از ۱۰میکرومتر باشد، احتمالا میزان لقاح کاهش می‌یابد (۲۱). در این مطالعه نیز از لحاظ آماری رابطه معنی‌داری بین میزان لقاح و سلامت آکروزوم (میانگین قطر هاله، درصد تشکیل هاله) مشاهده شدکه با توجه به نمودار۲ در افرادی که درصد تشکیل هاله بیشتر از ۶۰درصد داشته باشند، شانس موفقیت در لقاح افزایش یافته است. این موضوع تاکیدی بر نتایج هنکل و همکاران در سال ۱۹۹۵ می‌باشد.

در صورتی که بیماران، بر اساس درصد تشکیل هاله به دو گروه کمتر و بیشتر از ۶۰درصد تقسیم شوند، در گروهی که درصد هاله بیشتر از ۶۰درصد باشد، میانگین تعداد جنین با کیفیت مناسب بیشتر از گروه دیگر است (گروه کمتر از ۶۰درصد= ۱/۵۶±۱/۳، گروه بیشتر از ۶۰درصد=۲/۴۱±۰/۳۲). بنابراین می‌توان دریافت افرادی که درصد تشکیل هاله آنها بیشتر از ۶۰درصد است، میزان موفقیت در لقاح و تعداد جنین با کیفیت مناسب بیشتر است که در نهایت احتمالا منجر به موفقیت در میزان حاملگی می‌شود.

در این مطالعه بیمارانی که وضعیت حاملگی آنها گزارش شده بود به دو گروه واجد حاملگی وفاقد حاملگی تقسیم شدند (جدول۳). در هر دو گروه پارامترهای اسپرمی، کمبود پروتامین و سلامت آکروزوم آنها مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. اختلاف میانگین پارامترهای مذکور از لحاظ آماری بین این دو گروه معنی دار نیست. اگرچه درصد تشکیل هاله بسیار نزدیک به معنی‌دار شدن است (p=۰/۰۵۸ ،r=۰/۳۰۶) که توجیه خاصی جهت این ارتباط وجود ندارد.

به علاوه تاملینسون و همکاران پارامترهای اسپرمی، آسیب DNA و درصد اسپرم‌های CMA_3^+ را در دو گروه واجد حاملگی و فاقد حاملگی بررسی کردند (۴۰). آنها نیز اختلاف معنی‌داری از لحاظ پارامترهای اسپرمی، آسیب DNA و درصد اسپرم‌های CMA_3^+ بین دو گروه واجد حاملگی و فاقد حاملگی مشاهده نکردند. نتایج مطالعه حاضر با مطالعه تاملینسون مشابه است. لذا می‌توان دریافت که ویژگی‌های پارامترهای سمن و جایگزینی پروتامین مربوط به مرحله اسپرمیوژنز است که طی روند لقاح اهمیت آن بارز می گردد. در صورتی که وضعیت حاملگی در ارتباط با تغییرات پس از لقاح است یعنی زمانی که کروماتین اسپرم از تراکم خارج شده است. به علاوه آوکی و همکاران نیز میزان پروتامین ۱ و پروتامین ۲ را به روش ژل الکتروفورز بررسی کردند که از لحاظ آماری رابطه معنی‌داری بین نسبت پروتامین ۱ به پروتامین ۲ با میزان حاملگی مشاهده شد. در صورتی که رابطه معنی‌داری بین غلظت پروتامین ۱، پروتامین۲ و کل پروتامین با میزان حاملگی مشاهده نشده است (۳۰).

نتیجه گیری

به طور کلی می‌توان دریافت، اگرچه در طی اسپرمیوژنز تشکیل ساختار آکروزوم و جایگزینی پروتامین در ساختار کروماتین هم‌زمان انجام می گیرد، اما به علت نقش اساسی که آکروزوم طی روند اتصال به زونا، نفوذ به داخل زونا و همچنین فعال کردن تخمک دارد، احتمالا سلامت آکروزوم تاثیر بارزتری طی روند لقاح به طریق IVF نشان می‌دهد. در صورتی که ےطی پروسه ICSI اسپرم به داخل تخمک تزریق می‌شود و احتمالا کمبود پروتامین نقش بیشتری را نسبت به ساختار آکروزوم دارد.

تقدیر و تشکر

این مقاله نتایج طرح تحقیقاتی شماره ۸۴/۱۸۶ پ.ر.الف پژوهشکده رویان است و نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از پزشکان و پرسنل مرکز باروری و ناباروری اصفهان و مسئولین پژوهشکده رویان ابراز می دارند.

References

1. Oliva R, Dixon GH. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. Mol Biol.1991; 40: 25-94

2. Bloch DP. A catalog of sperm histones. Genetics. 1969; 61(1): 93-111

3. Berridge MJ. Inositol trisphosphate, calcium signaling. Nature. 1993; 361: 315-25

4. Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghdam A. Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. Andrologia 2003; 35: 238-43

5. Carrell DT, Liu L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect

www.SID.ir

Archive of SID

other abnormalities of spermiogenesis. J Androl. 2001; 22: 604-610

6. Aoki VW, Carrell DT. Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. Asian J Androl. 2003; 5: 315–24

7. Salehi M, Nasr-Esfahani MH, Razavi SH, Mardani M, Bahramian H, Oreizi F. The relation between sperm protamine aberrations with protamine P1/P2 ratio. Yakhteh. 2005; 24: 212-217

8. Aoki VW, Liu L, Carrell DT. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. Hum Reprod. 2005; 20: 1298-1306

9. Nasr-Esfahani MH, Razavi SH, Mardani M, Mafi A, Moghadam A. Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post ICSI: Yakhteh. 2004; 21: 5-10

10. Nasr-Esfahani MH, Razavi SH, Mozdarani H, Mardani M, Azvagi H. Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. Andrologia. 2004a; 36: 95-100

11. Jahnson RT, Rao PN. Mammalian cell fusion, Induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. Nature. 1970; 226: 717-72

12. Halleck MS, Reed JA. Lumley-Sapanski SI: Injected miotic extracts induce condensation of interphase chromatin. EXP. Cell. Res. 1984; 153: 561-569

13. Rao PN, Adlkha RC. Chromosome condensation and decondensation factors in the life cycle of eeukaryotic cells.In ford R.J and Maizel A.L (eds) Mediators in cell growth and differentiation.Reven press. New York 1985; 45-69

14. Hardi S, Wolfgang S, Ingrid S, Bettina P. High rate of premature chromosome condensation in human oocytes following microinjection with round-headed sperm: Case repord. Hum Reprod ,2006: 10: 1-5

15. Ramiro A, Valeri Z, Jan M, Eckhard W. Mammalian oocyte activation: Lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. Int. J. Dev. Biol. 2001; 45: 797-809

16. Schmiady H, Sperling K, Kentenich H, Stauber M. Prematurely condensed human sperm chromosomes after in vitro fertilization (IVF). Hum Genet. 1986; 74(4): 441-443

17. Mozdarani H, Aghdaei F. Cytogenetic analysis of fialed fertilized oocytes from Iranian infertile women after IVF and ICSI procedure. Middle East Society J, 2001; 6(3): 216-225

18. Smith GD. Control of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation .In Wolf, D.P and Zelinski -Wooten, M. (eds).Assisted fertilization and nuclear transfer in mammals .Hum Press .to towa. 2001; 53-65

19. Longo FJ, Krohne G, Franke WW. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements.J Cell Biol. 1987; 105: 1105-1120

20. Brucker C, Lipford GB: The human sperm acrosome reaction: Physiology and regulatory mechanism. Hum Repord Update. 1995; 1: 51-62

21. Henkel R, Muller C, Miska W, Schill WB, Kleinstein J, Gips H. Acrosin activity of human spermatozoa by means of a simple gelatinolytic technique: a method useful for IVF. J Androl.1995; 16(3): 272-277

22. Nasr-Esfahani MH, Razavi S ,Mardani M. Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization .J Assist Reprod Genet. 2001; 18: 219-225

23. Razavi SH, Nasr-Esfahani MH, Mardani M. The Role of Sperm Chromatin Anomalies on the outcome of Assisted Reproduction Techniques. Yakhteh, 2006; 28: 206-266

24. Michel RL, Luc O, Frank V, Arnold C, Dirk B, Victor B. Discrepancy between sperm acrosin activity and sperm morphology: Significance for fertilization in vitro.Clinica Chimica Acta. 2005; 351: 121-129

25. Tofigh S, Nasr-Esfahani MH, Razavi SH, Mardani M. Efficiency of sil-select and percoll to recover sperm with normal cyromatin and morphology and effect of these parameters on fertilization, embryo quality and cleavage score. Yakhteh, 2002; 15: 133-140

26. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen–Cervical Mucus Interaction. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.1999

27. Menkveld R, El-Garem Y, Schill WB, Henkel R. Relationship between human sperm morphology and acrosomal function. J Assist Reprod Genet. 2003; 20: 432-438

28. Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. Reprod Biol Endocrinal. 2003; 14, 108

29. Emery BR, Wilcox AL, Aoki VW, Peterson CM, Carrell DT. In vitro oocyte maturation and subsequent

www.SID.ir

Archive of SID

delayed fertilization is associated with increased embryo aneuploidy. Fertil Steril. 2005; 8: 1027-1029
30. Aoki VW, Liu L, Jones KP, Hatasaka HH, Gibson M, Peterson CM, Carrell DT. Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. Fertil Steril. 2006; 86(5): 1408-1415
31. Aoki VW, Liu L, Carrell DT. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. Hum Reprod. 2005; 20: 1298-1306
32. Carrell DT, Liu L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. J Androl. 2001; 22: 604-610
33. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cell is associated with IVF-ICSI outcome. J Androl. 2002; 23: 1-8
34. Razavi SH, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Javanmardi S. Relation between protamine deficiency and sperm parameters, pronuclear morphology, cleavage and embryo quality. Yakhteh, 2006; 2: 80-87
35. Lalonde L, Langlais J, Antaki P, Chapdelaine A, Roberts KD, Bleau G. Male infertility associated with round-headed acrosomeless spermatozoa.Fertil Steril. 1988; 49: 316-321
36. Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. J Cell Biol. 1982; 93: 298-305
37. Nasr-Esfahani MH, Razavi SH, Tavalaee M. Failed Fertilization after ICSI and Spermiogenic Defects. Fertil Steril. 2007 (In press)
38. Tesarik J. Fertilization of oocytes by injecting spermatozoa, spermatids and spermatocytes. Rev Reprod. 1996; 1(3): 149-52
39. Aslam I, Fishel S. Evaluation of the fertilization potential of freshly isolated, in-vitro cultured and cryopreserved human spermatids by injection into hamster oocytes. Hum Reprod. 1999; 14(6): 1528-1533
40. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M. Tomlinson MJ40. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. Hum Reprod. 2001; 16(10): 2160-2165

www.SID.ir