Original Article

Efficiency of Sperm Gradient Processing and HA-binding Test for the Selection of Sperm with Normal Protamine, Intact DNA and Normal Morphology

MT. Taghadosi, M.Sc.[1], M. Tavalaee, M.Sc.[2], SH. Razavi, Ph.D.[1]
M. Mardani, Ph.D.[1], MH. Nasr Esfahani, Ph.D.[2, 3]

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

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

Abstract

Received: 13/Mar/2007, Accepted: 4/Sep/2007

Objective: The aim of this study was to examine the efficiency of HA-binding test and sperm gradient processing method for the selection of sperm with normal protamine, intact DNA and normal morphology.

Materials and Methods: The study was conducted on 29 patients undergoing ICSI. Semen analysis was carried out according to WHO criteria. Semen samples were divided into three equal portions. One portion was left untreated (control), the second portion was used for HA-binding (HA: Hyaluronic acid) and the third portion underwent PureSperm gradient processing. Then, the three portions were evaluated to examine protamine deficiency (Chromomycin A3 staining), sperm morphology (Papanicolaou staining) and DNA integrity (Sperm Chromatin Dispersion Test). Coefficients of correlation and student t-test were carried out using SPSS 11.5 and P-value lower than 0.05 was considered as significant.

Results: The mean number of sperm abnormality, protamin deficiency, and DNA fragmentation in HA binding and sperm gradient processing groups were significantly decreased as compared to the control group ($p<0.05$). In addition, sperm gradient processing was superior to HA-binding method in the selection of sperm with normal protamine, intact DNA and normal morphology.

Conclusion: Both HA-binding and sperm gradient processing methods were effective in the selection of sperm with better quality in terms of normal morphology, normal protamine content and DNA integrity. However, sperm gradient processing was superior to HA-binding method in the selection of normal sperm.

Keywords: HA-binding Assay, Semen Processing, Protamine Deficiency, Sperm Morphology, DNA Fragmentation

Yakhteh Medical Journal, Vol 9, No 4, Winter 2008, Pages: 226- 231

Archive of SID

www.SID.ir

ارزیابی کارایی آماده‌سازی اسپرم توسط گرادیان پیور اسپرم و تست HA-binding برای انتخاب اسپرم با پروتامین طبیعی، DNA سالم و مورفولوژی طبیعی

محمدطاهر تقدسی M.Sc.[1]، مرضیه تولایی M.Sc.[2]، شهناز رضوی Ph.D.[1]، محمد مردانی Ph.D.[1]، محمدحسین نصراصفهانی Ph.D.[2,3]

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

آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی: ۴۶۴۴- ۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی-آندرولوژی
پست الکترونیک: Email: mh_nasr@med.mui.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۱۲/۲۲، پذیرش مقاله: ۸۶/۶/۱۳

* **هدف:** ارزیابی کارایی دو روش HA-binding و گرادیان پیور اسپرم جهت جداسازی اسپرم با پروتامین طبیعی، DNA سالم و مورفولوژی طبیعی

* **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه ۲۹ زوج نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان جهت انجام عمل ICSI مورد بررسی قرار گرفتند. آنالیز روتین مایع سیمن طبق معیار WHO انجام شد. سپس نمونه‌های سیمن به سه بخش تقسیم شدند: گروه کنترل، گروه اسپرم‌های متصل به اسید هیالورونیک (Hyaluronic acid binding: HA) و گروه اسپرم‌های آماده‌سازی شده توسط گرادیان پیور اسپرم. سپس بر روی هر یک از گروه‌های مذکور، ارزیابی مورفولوژی اسپرم (توسط رنگ آمیزی پاپانیکولائو)، کمبود پروتامین (توسط رنگ آمیزی CMA_3) و فراگمنتاسیون DNA (با استفاده از تست SCD) انجام گرفت. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS11.5 آنالیز و مقایسه شد.

* **یافته‌ها:** نتایج نشان می‌دهد درصد اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی، کمبود پروتامین و درصد فراگمنتاسیون DNA در دو گروه اسپرم‌های متصل به HA و آماده‌سازی شده توسط گرادیان پیور اسپرم نسبت به گروه سیمن از لحاظ آماری کاهش یافته است (p=۰/۰۰۱). به علاوه روش آماده‌سازی اسپرم توسط گرادیان پیور نسبت به جداسازی اسپرم با مورفولوژی و پروتامین طبیعی و DNA سالم بهتر از روش HA-binding عمل کرده است.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج نشان می‌دهد که هر دو روش گرادیان پیور و HA-binding به طور معنی‌داری قادر به جدا نمودن اسپرم با مورفولوژی و پروتامین طبیعی و سلامت DNA می‌باشد. اگرچه روش گرادیان پیور اسپرم نسبت به روش HA-binding در جداسازی اسپرم با کیفیت بهتر، کارایی بیشتری دارد.

کلیدواژگان: تست HA-binding، آماده‌سازی اسپرم، کمبود پروتامین، مورفولوژی اسپرم، فراگمنتاسیون DNA

فصلنامه پزشکی یاخته، سال نهم، شماره ٤، زمستان ۸۶، صفحات: ۲۳۱-۲۲۶

مقدمه

امروزه تزریق اسپرم به داخل سیتوپلاسم تخمک (Intracytoplasmic Sperm Injection: ICSI) به عنوان یک روش مناسب جهت درمان ناباروری مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱). با وجود اینکه در روش ICSI، همه موانع طبیعی برای لقاح (ظرفیت پذیری و واکنش آکروزومی)، پشت سر گذاشته می‌شود، اما بلوغ اسپرم و سلامت کروماتین هسته اهمیت خاصی دارد و میزان موفقیت لقاح به طور عمده وابسته به انتخاب نوع اسپرمی است که طی این تکنیک جهت تزریق استفاده می شود (۴-۲). شاخص‌های متعددی جهت ارزیابی بلوغ اسپرم وجود دارد. کراتین کیناز (کراتین فسفوکیناز) و شوک حرارتی پروتئین A_2 (Heat shock protein A_2: $HspA_2$) از جمله این مارکرها است (۵، ۶). تحقیقات نشان می دهد فعالیت بالای کراتین کیناز و کاهش سطح بیان $HspA_2$ با ناباروری در مردان مرتبط است (۷، ۸). شاخص‌های دیگری نیز جهت ارزیابی بلوغ اسپرم وجود دارد. از جمله شاخص‌های بلوغ هسته اسپرم حضور هیستون اضافی یا کمبود پروتامین در هسته اسپرم است که به ترتیب با رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو و کروموماپسین A_3 مشخص می‌شوند (۹). مطالعات نشان می دهد قابلیت اتصال اسپرم به اسیدهیالورونیک می تواند یکی از علایم بلوغ غشای پلاسمایی اسپرم باشد (۴).

اسیدهیالورونیک یا هیالورونان یک پلیمر خطی دی ساکاریدی است که در دستگاه تناسلی زن، کمپلکس کومولوس اووفوروس و مایع سیمن وجود دارد (۸، ۱۰). اسپرم زنده توسط پروتیین PH-20 که روی غشای پلاسمایی آن وجود دارد، به اسیدهیالورونیک متصل می‌شود (۱۱، ۱۲). بنابراین اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک در محیط آزمایشگاه شاخص خوبی خواهد بود که می‌تواند بلوغ، قابلیت حیات و سلامت آکروزومی اسپرم را که با باروری مردان مرتبط است، نشان دهد (۴).

طی اسپرماتوژنز نیز تغییراتی در گلیکوپروتئین‌های سطحی غشای پلاسمایی اسپرم رخ می‌دهد که ایجاد رسپتورهایی برای اتصال به منطقه شفاف (Zona Pllucida: ZP) و اسیدهیالورونیک را تسهیل می‌کند. این تغییرات با از دست دادن سیتوپلاسم اضافی و جایگزینی هیستون توسط پروتامین در هسته اسپرم هم‌زمان است (۴، ۱۳، ۱۴).

امروزه در مراکز درمان ناباروری پس از آنالیز روتین سیمن، با توجه به این که کیفیت سیمن در افراد مختلف هتروژن است و حتی در انزال‌های یک فرد نیز این هتروژنیته وجود دارد، مایع سیمن را جهت جداسازی اسپرم‌های سالم (با تحرک بیشتر و مورفولوژی طبیعی) شستشو می‌دهند و آماده‌سازی می‌کنند که یکی از مهمترین مراحل در تکنیک‌های لقاح آزمایشگاهی است (۱۵). روش‌های مختلفی برای این منظور وجود دارد که می‌توان به

Archive of SID
www.SID.ir

Swim-up، Density gradient centrifugation، glass wool filtration اشاره کرد (۱۵)، با وجود روش‌های متفاوت آماده‌سازی اسپرم، تکنیک گرادیان پیور اسپرم یکی از معمول‌ترین روش‌های مورد استفاده در مراکز درمان ناباروری است که توانایی جداسازی اسپرم‌های طبیعی را دارد و باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در درصد اسپرم‌های CMA_3^+ و دارای آسیب DNA می‌شود (۱۶). مطالعات اخیر، علاوه بر روش‌های مختلف آماده‌سازی اسپرم، روش‌های دیگری را پیشنهاد می‌کنند که اساس آنها بر ساختار مولکولی و عملکردی اسپرم است، از جمله، روش جداسازی الکتروفورتیک اسپرم (۱۷)، روش Zeta (۱۸) و تست HA-binding (۱۹). بنابراین هدف از این مطالعه، مقایسه اثر تست HA-binding و روش گرادیان اسپرم برای جداسازی اسپرم با پروتامین طبیعی، DNA سالم و مورفولوژی طبیعی است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه نمونه‌های سیمن از ۲۹ زوج نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان جهت انجام عمل ICSI به دست آمد. مایع سیمن در روز تخمک گذاری، پس از ۴-۳ روز پرهیز از مقاربت آماده شد و با ثبت فرم رضایت بیمار، نمونه‌های سیمن برای انجام این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز روتین مایع سیمن طبق معیار WHO (۲۰)، توسط میکروسکوپ نوری انجام 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.

آماده‌سازی اسپرم

نمونه‌های سیمن به سه بخش تقسیم شد. یک بخش آن با استفاده از گرادیان Pure Sperm (Nidacone, Guthenburg, Sweden) با غلظت‌های ۴۰ :۸۰ برای انجام روش ICSI آماده شد (تجربی I) و دو بخش دیگر آن، با محیط Ham's+FCS٪۱۰ شستشو (سانتریفیوژ ۲۰۰۰دور به مدت ۵ دقیقه) و به دو گروه تقسیم شد که عبارتند از گروه اسپرم‌های متصل به اسیدهیالورونیک (تجربی II) که تست HA-binding بر روی آنها انجام گرفت و گروه دیگر سیمن تحت عنوان گروه کنترل. سپس بر روی هر یک از گروه‌های مذکور، ارزیابی مورفولوژی اسپرم (توسط رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو) بر اساس معیار WHO (۲۰)، کمبود پروتامین (توسط رنگ‌آمیزی کروموماپسین A_3 (۹) و فراگمنتاسیون DNA با استفاده از تست (Sperm Chromatin Dispersion: SCD) انجام گرفت (۲۱).

تست HA-binding

ابتدا یک قطره ۴۰ میکرولیتری اسیدهیالورونیک (**Biocoat Inc; Fort Washington, PA**) روی سطح لام گذاشته، پس از خشک شدن، ۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم ($۲۰*۱۰^۶$ میلیون در هر میلی‌لیتر) روی آن قرار داده شد. لام به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس سطح لام با محیط مناسب (Ham's) به آرامی شسته شد تا اسپرم نچسبیده به اسیدهیالورونیک از سطح لام جدا شود. لام مذکور در دمای اتاق قرار گرفت تا خشک شود.

ارزیابی کمبود پروتامین (رنگ آمیزی کروموماپسین A_3)

محلول فیکساتیوکارنوی (متانول و اسید استیک به نسبت ۳ به ۱) به نسبت مساوی با نمونه سیمن با غلظت ۱۰ میلیون در هر میلی‌لیتر به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر بر روی لام‌های آماده شده جهت رنگ‌آمیزی، گذاشته و در هوای اتاق قرار داده شد تا خشک شود. به منظور انجام رنگ‌آمیزی CMA_3، هر اسلاید به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول CMA_3 رنگ‌آمیزی شد (۰/۲۵گرم بر میلی‌لیتر در بافرمک الوین: ۷ میلی‌لیتراسید استیک ۰/۱ مولار و ۳۲/۹ میلی‌لیتر از $7H_2O$ و Na_2HPO_4 و با غلظت ۰/۲ مولار pH=۷ شامل ۱۰ میلی‌مولار از $MgCl_2$) سپس اسلایدها توسط بافر گلیسرول شستشو و با همین بافر به نسبت مساوی (۱ :۱) مونت شدند و با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت Olympous (BX51, Tokyo, Japan) با فیلتر ۴۷۰-۴۶۰ در همان روز ۱۰۰ اسپرم شمارش شد. درصد اسپرم با رنگ زرد درخشان (CMA_3^+) و اسپرم با رنگ زرد تیره (CMA_3^-) با استفاده از نرم افزار Olysia محاسبه شد (۹).

ارزیابی فراگمنتاسیون DNA

۰/۷ درصد از آگاروز ۱درصد (با درجه ذوب پایین: low melting) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با نمونه سیمن با غلظت ۱۰-۵ میلیون در هر میلی‌لیتر مخلوط و بر روی لامی که از قبل با آگاروز ۰/۶۵درصد پوشیده بود گذاشته شد و با گذاشتن یک لامل بر روی آن، به مدت ۴ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس با جدا کردن لامل‌ها، هر لام به صورت افقی در محلول اسیدکلریدریک ۰/۰۸ نرمال به مدت ۷ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شد و به مدت ۲۵ دقیقه در محلول lysing قرار گرفت. در ادامه به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر شستشو و به ترتیب در الکل ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰درصد، ۲ دقیقه دهیدراته شد و بعد از خشک شدن، با محلول رنگ Wright و PBS به نسبت ۱ :۱ رنگ‌آمیزی و بعد از ۱۰ دقیقه با آب معمولی شستشو و توسط میکروسکوپ نوری بررسی شد. با استفاده از این روش می‌توان میزان فراگمنتاسیون DNA را به صورت ۵ نوع سلول با توجه به وجود هاله اطراف هسته و اندازه آن بررسی کرد. درصد اسپرم‌های با فراگمنتاسیون DNA (هسته اسپرم با هاله کوچک، بدون هاله و سلول اسپرم degrade شده) و بدون فراگمنتاسیون DNA (هسته اسپرم با هاله بزرگ و هاله متوسط) ارزیابی شد که در مجموع به صورت DFI (اندیکس فراگمنتاسیون DNA) تعیین شد (۲۱).

آنالیز آماری

آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری ضریب همبستگی (Correlation Coefficient، Descriptive و t-test) توسط نرم‌افزار SPSS11.5 انجام گرفت و در صورتی که $p<۰/۰۵$ بود، از لحاظ آماری معنی‌دار محسوب شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از ارزیابی پارامترهای اسپرمی، کمبود پروتامین (CMA_3^+) و فراگمنتاسیون DNA (DFI)، در جدول ۱ مشخص شده است.

مقایسه میانگین اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی، دارای کمبود پروتامین (CMA_3^+) و فراگمنتاسیون DNA در سه گروه کنترل، تجربی I و تجربی II، در نمودار ۱، نشان داده شده است.

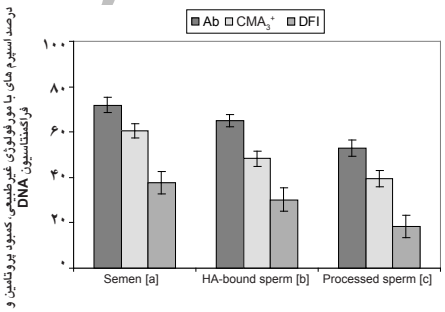
با توجه به این نمودار، درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی در دو گروه تجربی I و تجربی II نسبت به گروه کنترل کاهش یافته که به ترتیب در هر دو مورد از لحاظ آماری معنی‌دار است ($p=۰/۰۰۱$ و $p=۰/۰۰۹$). به علاوه مقایسه میانگین اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی در دو گروه تجربی I و تجربی II نشان

Archive of SID
www.SID.ir

می‌دهد از لحاظ آماری دارای اختلاف معنی‌داری است به طوری که درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیک اسپرم در گروه تجربی I نسبت به گروه تجربی II، در مقایسه با گروه کنترل کاهش بیشتری یافته است (p<۰/۰۱).

جدول ۱: مشخصات پارامترهای سیمن اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین و اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA در بیماران کاندید ICSI

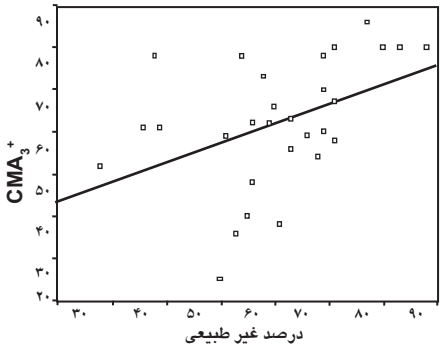
پارامتر	حداقل	حداکثر	میانگین±خطای معیار
غلظت اسپرم (۱۰^۶ میلیون در هر میلی‌لیتر)	۱۰	۱۶۰	۷۵/۰۳±۶/۲
درصد تحرک اسپرم	۵	۶۵	۴۸/۲۷ ±۲/۷۷
درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیر طبیعی	۳۸	۹۸	۷۰/۷۵±۲/۶۱
درصد اسپرم‌های دارای ناهنجاری های مورفولوژیک سر اسپرم	۲۸	۹۸	۶۰/۶۸±۲/۹۹
درصد اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین (CMA_3^+)	۲۵	۸۶	۶۲/۴۱±۲/۸
درصد اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA (DFI)	۱۰	۶۷	۳۵/۷۳±۴/۹۲



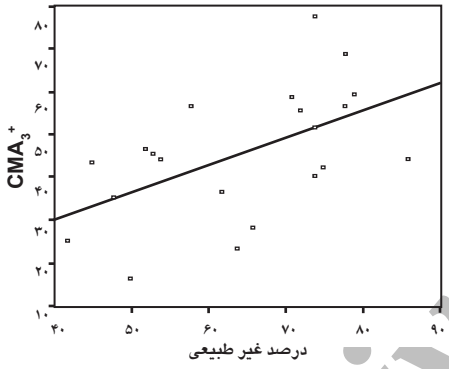
نمودار۱: مقایسه میانگین درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی، کمبود پروتامین (CMA_3^+) و فراگمنتاسیون DNA در سه گروه: a, b, c
(a&b: Significant, b&c:Significant, a&c: Significant)

همچنین در نمودار ۱ ملاحظه می‌شود اختلاف میانگین اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین (CMA_3^+) در دو گروه تجربی I (p=۰/۰۰۱) و تجربی II (p=۰/۰۰۲) با گروه کنترل، از لحاظ آماری معنی‌دار است. به علاوه میانگین اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین (CMA_3^+) در دو گروه تجربی I و تجربی II نیز دارای اختلاف معنی‌داری است، به طوری که میزان کمبود پروتامین در گروه تجربی I نسبت به گروه تجربی II، کاهش بیشتری یافته است (p=۰/۰۰۴). مقایسه میانگین درصد اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA در سه گروه مذکور (نمودار۱) نیز نشان می‌دهد درصد اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA در دو گروه تجربی I و تجربی II نسبت به گروه کنترل کاهش یافته که به ترتیب در هر دو مورد از لحاظ آماری معنی‌دار است (p=۰/۰۰۱) و (p=۰/۰۱). همچنین مقایسه میانگین اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA در دو گروه تجربی I و تجربی II نشان می‌دهد از لحاظ آماری دارای اختلاف معنی‌داری هستند. به طوری که درصد اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA در گروه تجربی I نسبت به تجربی II، کاهش بیشتری یافته است (p=۰/۰۱).

در نمودارهای ۲، ۳ و ۴ رابطه بین کمبود پروتامین (CMA_3^+) و ناهنجاری‌های مورفولوژیک اسپرم در هر یک از گروه‌های مذکور نشان داده شده است. نمودار ۲ بیانگر رابطه بین میزان کمبود پروتامین و مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم در گروه کنترل است که به لحاظ آماری معنی‌دار است (r=۰/۴۳۶ و p=۰/۰۱۸). همچنین در گروه تجربی II، این ارتباط معنی‌دار است (r=۰/۵۳۸ و p=۰/۰۱۲) (نمودار۳). اما این ارتباط همان‌طور که در نمودار ۴ ملاحظه می‌شود، در گروه تجربی I از لحاظ آماری معنی‌دار نیست (r=۰/۲۰۱ و p=۰/۳۳۵).



نمودار۲: رابطه بین درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی و کمبود پروتامین (CMA_3^+) در گروه سیمن (r=۰/۴۳۶ و p=۰/۰۱۸)



نمودار۳: رابطه بین درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی و کمبود پروتامین (CMA_3^+) در گروه اسپرم‌های متصل به اسید هیالورونیک (r=۰/۵۳۸ و p=۰/۰۱۲)

نمودار۴: رابطه بین درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی و کمبود پروتامین (CMA_3^+) در گروه اسپرم‌های آماده سازی شده توسط گرادیان پیور اسپرم (r=۰/۲۰۱ و p=۰/۳۳۵)

بحث

امروزه به طور معمول آماده‌سازی سیمن جهت روش درمانی ICSI توسط تکنیک‌های گرادیان انجام می‌گیرد. با این وجود، مطالعات اخیر روش‌های جدید و متفاوتی را جهت انتخاب و جداسازی اسپرم معرفی کرده که اساس آنها، بر ساختار مولکولی و

Archive of SID

www.SID.ir

مشخصات عملکردی اسپرم است. یکی از این روش‌ها، تست اتصال اسپرم به اسیدهیالورونیک به عنوان یک روش جدید جهت انتخاب اسپرم برای درمان ICSI پیشنهاد شده است (۱۹). اما تا کنون، روش HA-binding با روش‌های گرادیان اسپرم که به صورت معمول در آماده‌سازی اسپرم استفاده می‌شوند، مورد ارزیابی قرار نگرفته است. لذا هدف از این مطالعه، مقایسه بین تست HA-binding و روش گرادیان پیور اسپرم است تا مشخص شود که کدام یک از این دو روش، کارایی بیشتری در انتخاب اسپرم جهت درمان ICSI دارد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که درصد اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی، کمبود پروتامین و همچنین فراگمنتاسیون DNA در تست HA-binding و روش گرادیان پیور اسپرم کاهش می‌یابد اما میزان این کاهش در روش گرادیان پیور اسپرم بیشتر است (نمودار ۱).

هوزار و همکاران نشان دادند، اسپرم‌های بالغ که قابلیت اتصال به اسیدهیالورونیک را دارند، زائده سیتوپلاسمیک ندارند و دارای مورفولوژی طبیعی و از نظر سلامت DNA در سطح بالایی هستند و آنوپلوییدی کروموزومی پایین‌تری را نشان می‌دهند (۴، ۱۴، ۲۲، ۲۳). در این مطالعه نیز، کاهش ناهنجاری‌های مورفولوژیک در اسپرم‌های متصل به اسیدهیالورونیک نسبت به سیمن مشاهده شد (p=۰/۰۰۹). از آنجایی که گیرنده‌های اسیدهیالورونیک در مرحله اسپرمیوژنز ایجاد می‌شود و هر گونه نقصی در روند اسپرمیوژنز ممکن است باعث عدم تکامل بلوغ غشای پلاسمایی اسپرم شود و همچنین بسته‌بندی و تراکم کروماتین اسپرم نیز در این مرحله اتفاق می‌افتد و عدم تراکم صحیح کروماتین اسپرم، ممکن است با تکامل پروتئین‌های سطحی غشا پلاسمایی اسپرم هم‌زمان باشد، بنابراین اسپرم‌هایی که به اسیدهیالورونیک متصل می‌شوند، نقص کمبود پروتامین در آنها کمتر خواهد بود (p=۰/۰۰۲).

مطالعات نشان می‌دهد یکی از علل فراگمنتاسیون DNA، نقص در بسته‌بندی کروماتین است و کاهش پروتامین در این مرحله از اسپرمیوژنز می‌تواند باعث عدم تراکم صحیح کروماتین شود و باعث آسیب DNA در مسیرهای دستگاه تناسلی گردد (۲۴). از این رو در گروه تجربی II، هم درصد اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین و هم درصد اسپرم‌های دارای فراگمنتاسیون DNA کاهش می‌یابد که با مطالعات قبلی درباره اسیدهیالورونیک توسط هوزار و کوانسی مطابقت دارد (۴، ۱۴، ۲۲، ۲۳).

با مشاهده نمودارهای مربوط به رابطه بین کمبود پروتامین و ناهنجاری‌های مورفولوژیک اسپرم در سه گروه، مشخص می‌شود بین جایگزینی هیستون توسط پروتامین و شکل‌گیری سر اسپرم هم‌زمانی وجود دارد که مربوط به مرحله اسپرمیوژنز است. اما این ارتباط در نمودار ۴، نشان دهنده کاهش هتروژنیتی کمبود پروتامین نسبت به مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم پس از آماده سازی اسپرم توسط گرادیان پیوراسپرم است.

نمونه سیمن دارای هتروژنیتی بالایی است و علاوه بر تعدادی از لکوسیت‌ها، دارای زیر مجموعه‌ای از اسپرم‌های طبیعی و غیرطبیعی است که آماده سازی اسپرم یکی از راه‌های از بین بردن این هتروژنیتی است (۱۶). در اسپرم‌های طبیعی نسبت وزن به حجم بیشتر است لذا پس از سانتریفوژ در لایه‌های گرادیان پیور اسپرم، اسپرم‌های دارای ساختار کروماتین طبیعی که متراکم‌ترند، سریع‌تر ته نشین می‌شوند و احتمال دارد در این میان اسپرم‌هایی نیز وجود داشته باشد که ساختار کروماتین آنها طبیعی است ولی از نظر شکل، غیرطبیعی هستند. به طوری که در نمونه اسپرمی آماده‌سازی شده توسط گرادیان پیوراسپرم نشان داده شده است میزان بهبود سلامت هسته بیشتر از میزان بهبود مورفولوژی طبیعی اسپرم است و با نتایج تومیلونسون مطابقت دارد (۲۵). بنابراین می‌توان انتظار داشت در نمونه اسپرمی آماده‌سازی شده توسط گرادیان پیوراسپرم، بین مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم و درصد اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین ارتباط معنی‌داری وجود نداشته باشد.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد روش گرادیان پیور اسپرم که به صورت معمول در مراکز کمک باروری استفاده می‌شود، می‌تواند در جداسازی اسپرم با مورفولوژی طبیعی و سلامت DNA، نسبت به تست HA-binding، بهتر عمل کند. در مطالعه‌ای که توسط هونگ‌یی و همکارانش در ارتباط با توانایی اتصال اسپرم به اسیدهیالورونیک و نتایج حاصل از تکنیک IVF انجام گرفت، نشان داده شد که مورفولوژی اسپرم نسبت به تست HA-binding، رابطه معنی‌داری با نتایج حاصل از IVF دارد و ارزش تست HA-binding، درباره پیش‌گویی وضعیت نتایج حاصل از لقاح نسبت به آنالیز روتین سیمن محدود است (۲۶). همچنین در مطالعه‌ای که توسط تومیلنسون بر روی رابطه بین پارامترهای اسپرمی و آسیب DNA قبل و بعد از روش گرادیان پیوراسپرم انجام گرفت، نشان داده شد میزان مورفولوژی طبیعی اسپرم بعد از آماده‌سازی به میزان ۱۳۸درصد بهبود یافته و درصد اسپرم‌های دارای سلامت DNA نیز به طور قابل ملاحظه‌ای پس از آماده‌سازی توسط گرادیان پیور اسپرم کاهش می‌یابد (۲۵). در حالی که در مطالعه حاضر، مورفولوژی اسپرم به میزان ۱۲۴درصد پس از انجام تست HA-binding و به میزان ۱۶۷درصد پس از آماده‌سازی توسط گرادیان پیوراسپرم بهبود یافت.

نتیجه‌گیری

در پایان می‌توان نتیجه گرفت که تست HA-binding می‌تواند باعث جداسازی اسپرم‌های با کیفیت بهتر شود ولی روش آماده‌سازی توسط گرادیان پیوراسپرم در این عمل (جداسازی اسپرم‌های با کیفیت بهتر)، کارایی بیشتری دارد. اما باید توجه داشت اسیدهیالورونیک به طور طبیعی در دستگاه تناسلی مونث و کومولوس اووفوروس وجود دارد. بنابراین انتظار می‌رود این ماده اثرات سویی بر روند لقاح نداشته باشد (۸، ۱۰)، در حالی که پیوراسپرم یک ماده سنتتیک (مصنوعی) است و اندکی نیز خاصیت سمی دارد (۱۹). از این رو تست HA-binding و ترکیبی از هر دو روش می‌تواند روش مناسبی جهت انتخاب اسپرم با کیفیت بهتر باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله نتایج طرح تحقیقاتی شماره «۸۵/۲۵۸۶۶ پ.ر» پژوهشکده رویان است و نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین پژوهشکده رویان، همکاران بخش علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، پزشکان و پرسنل مرکز باروری و ناباروری اصفهان ابراز می‌دارند.

References

1. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet. 992; 340:17-18

2. Foresta C, Rossato M, Garolla A, Ferlin A. Male infertility and ICSI: are here limits? Hum Reprod. 1996; 11: 2347-2348

3. Connell MO, McClure N, Lewis SEM.

Archive of SID

www.SID.ir

Mitochondrial DNA deletions and nuclear DNA fragmentation in testicular and epididymal human sperm. Hum Reprod. 1997; 12: 2784-2791
4. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. Fertil Steril. 2003; 79(Suppl 3): 1616-1624
5. Huszar G, Vigue L. Spermatogenesis-related change in the synthesis of the creatine kinase B-type and M-type isoforme in human spermatozoa. Mol Reprod Dev. 1990; 25, 258-262.
6. Huszar G, Vigue L. Incomplete development of human spermatozoa is associated with increased phosphokinase concentration and abnormal head morphology. Mol Reprod Dev. 1993; 34: 292-298
7. Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L. Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. Biol Reprod. 2000; 63: 925-932
8. Huszar G, Celik-Ozenci C, Cayli S, Kovacs T, Vigue L, Kovanci E. Semen characteristics after overnight shipping: preservation of sperm concentrations, HspA2 ratios, CK activity, cytoplasmic retention, chromatin maturity, DNA integrity, and sperm shape .J Androl. 2004 Jul-Aug; 25(4): 593-604
9. 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
10. Cayli S, Jakab A, Ovari L, Delpiano E, Celik-Ozenci C, Sakkas D, Ward D, Huszar G. Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. Reprod Biomed Online. 2003; 7(4): 462-468
11. Cherr GN, Yudin AI, Li MW, Vines CA, Overstreet JW. Hyaluronic acid and the cumulus extracellular matrix induce increases in intracellular calcium in macaque sperm via the plasma membrane protein PH-20. Zygote. 1999; 7: 211-222
12. Vines CA, Li MW, Deng X, Yudin AI, Cherr GN, Overstreet JW. Identification of a hyaluronic acid (HA) binding domain in the PH-20 protein that may function in cell signaling. Mol Reprod Dev. 2001; 60: 542-552
13. Huszar G, Vigue L, Oehninger S. Creatine kinase immunocytochemistry of human sperm-hemizona complexes: selective binding of sperm with mature creatine kinase-staining pattern. Fertil Steril. 1994; 61: 136-142
14. Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1, 4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. Biol Reprod. 1997; 56: 1020-1024
15. Soderlund B, Lundin K. The use of Silane-coated silica particle for density gradient centifugation in in vitro fertilization. Human Reproduction. 2000; 15: 857-860
16. Sakkas D, Manicardi G, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianch U. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up methode to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. Human Reproduction. 2000; 15: 1112-1116
17. Ainsworth C, Nixon B, Aitken RJ. Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa. Hum Reprod. 2005; 20: 2261-2270
18. Philip J. Chan, John D. Jacobson, Johannah U. Corselli, William C. Patton. A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge. Fertil Steril. 2006; 85: 481-486
19. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, Ravelli A, Huszar G. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies Fertil Steril. 2005; 84(6): 1665-1673
20. World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 1999
21. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. Journal of Andrology. 2003; 24: 59-66
22. Huszar G, Corrales M, Vigue L. Correlation between sperm Creatine phosphokinase activity and sperm concentrations in normospermic and oligospermic men. Gamete Res. 1988; 19: 67-75
23. Kovanci E, Kovacs T, Moretti E, Bray-Ward P, Ward DC, Huszar G. FISH assessment of aneuploidy frequencies in mature and immature human spermatozoa classified by the absence or presence of cytoplasmic retention. Hum Reprod. 2001; 16: 1209-1217
24. Cho C, Jung-Ha H, Willis WD, Goulding EH, Stein P, Xu Z, et al. Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. Biol Reprod. 2003; 69: 211-217
25. Tomlinson M.J, Moffatt O, Manicardi G.C. Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and aftr density gradient centrifugation: implication for assisted conception. Hum Reprod. 2001; 10: 2160-2165
26. Hong Ye, Guo-ning Huang, Yang Gao1 and De Yi Liu. Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional in vitro fertilization. Hum Reprod. 2006; 21: 1545-1550

Archive of SID

www.SID.ir