ارزیابی کارایی روش ترکیبی زتا و سانتریفیوژ شیب غلظت (پیور– زتا) برای جداسازی اسپرم با ساختار کروماتین طبیعی

مهسا خیراللهی کوهستانی[۱]؛ سیدجمال مشتاقیان[۱]؛ شهناز رضوی[۲]؛ محمدحسین نصراصفهانی[۳*]؛ محمدرضا دیمه[۴]

چکیده

زمینه: *از آن‌جا که انتخاب اسپرم با محتوای کروماتین طبیعی برای تزریق مستقیم اسپرم به درون سیتوپلاسم تخمک (ICSI) دارای اهمیت وافری است، امروزه محققین در پی یافتن روش‌هایی نوین برای جداسازی اسپرمی با سلامت ساختار کروماتین و مورفولوژی مناسب می‌باشند. هدف از انجام این مطالعه کارایی روش جدید زتا، روش رایج سانتریفیوژ شیب غلظت Pure Sperm و نیز روش ترکیبی پیور–زتا (Zeta) از لحاظ جداسازی اسپرم با ساختار کروماتین طبیعی که با استفاده از روش‌های پراکندگی کروماتین اسپرم (SCD) و کروموما یسین A3 (CMA3) مورد ارزیابی قرار گیرد.*

روش‌ها: *این مطالعه در روی ۲۸ بیمار مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان صورت گرفت. آنالیز معمول مایع منی طبق معیارهای WHO انجام شد. سپس نمونه مایع منی به چهار بخش شامل: گروه کنترل، اسپرم‌های جداسازی‌شده به روش زتا، اسپرم‌های جداسازی‌شده به روش سانتریفیوژ شیب غلظت (پیور) و اسپرم های جداسازی شده به روش پیور- زتا تقسیم گردید. سپس در روی هریک از گروه‌های مذکور، ارزیابی مورفولوژی اسپرم (رنگ‌آمیزی Diff Quick)، کمبود پروتامین (رنگ‌آمیزی CMA3) و فرگمنتاسیون DNA (با استفاده از آزمایش SCD) انجام گرفت. نتایج با آزمون آنوا بررسی و تحلیل شدند و P< ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.*

یافته‌ها: *درصد اسپرم‌های با کمبود پروتامین و نیز فرگمنتاسیون DNA در سه گروه اسپرم‌های جداسازی‌شده به روش زتا، پیور و پیور–زتا نسبت به گروه کنترل از لحاظ آماری کاهش معناداری یافته است (P<۰/۰۵). همچنین از لحاظ انتخاب اسپرم با مورفولوژی مناسب اختلاف معناداری بین اسپرم‌های انتخاب‌شده توسط روش پیور و نیز روش ترکیبی پیور–زتا نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید (P<۰/۰۵). بین روش زتا، روش پیور و روش پیور- زتا تفاوت معناداری از لحاظ جداسازی اسپرم - با مورفولوژی و محتوای پروتامین طبیعی و فرگمنتاسیون DNA وجود نداشت (P>۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری: *نتایج نشان می‌دهد که هر دو روش پیور و زتا در جداسازی اسپرم با کیفیت مناسب از لحاظ مورفولوژی، محتوای پروتامین و سلامت DNA مؤثر بوده است، لیکن روش ترکیبی پیور- زتا تأثیر بیشتری را در جداسازی اسپرم با مورفولوژی، محتوای پروتامین و سلامت DNA نسبت به به‌کارگیری دو روش پیور و زتا به‌صورت انفرادی دارا می‌باشد.*

کلیدواژه‌ها: *روش زتا، روش پیور، روش پیور- زتا، مورفولوژی اسپرم، کمبود پروتامین، فرگمنتاسیون DNA*

«دریافت: ۱۳۸۷/۷/۲۲ پذیرش: ۱۳۸۸/۳/۱۲»

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

۲. گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۳. گروه آندرولوژی – جنین شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده رویان، جهاد دانشگاهی (پایگاه تحقیقات علوم سلولی اصفهان) تهران– ایران و مرکز باروری و ناباروری اصفهان

۴. مرکز باروری و ناباروری اصفهان

***عهده‌ارمکاتبات:** تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴– ۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه آندرولوژی– جنین شناسی، تلفن: ۳–۲۶۱۲۹۰۰ –۰۳۱۱

Email: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

روش‌های کمک‌باروری به‌طور گسترده برای درمان افراد نابارور به‌کارگرفته می‌شوند. در میان این روش‌ها، روش تزریق اسپرم به داخل تخمک (ICSI)[1] به‌عنوان گزینه‌ای مناسب برای حل مشکل ناباروری زوجین با علل مردانه مطرح می‌گردد. لیکن میزان سلامت این روش درمانی مورد تردید قرار گرفته است چرا که در روش مذکور تمامی سدهایی که در مراحل لقاح طبیعی و آزمایشگاهی (IVF)[2]، در مسیر رسیدن اسپرم به تخمک قرار دارند برداشته شده و اسپرم مستقیماً به درون تخمک تزریق می‌گردد، از این‌رو، این امر موجب بروز نگرانی‌هایی در مورد احتمال ایجاد عوارضی از جمله عدم موفقیت در بارداری، ایجاد نقایص کروموزومی و همچنین ناهنجاری‌های مادرزادی و تکوینی در جنین گردیده است (۱).

در حال حاضر معیار انتخاب اسپرم در روش ICSI تحرک و مورفولوژی این سلول بوده و جنین‌شناس با توجه به این دو معیار اسپرم را انتخاب می‌نماید و سپس آن را به درون تخمک تزریق می‌کند. لیکن از آن‌جایی که این دو معیار، بازگوکننده سلامت ساختار کروماتینی اسپرم نمی‌باشد، لزوم به‌کارگیری روش‌هایی جدید برای ارزیابی سلامت اسپرم، یک ضرورت به‌نظر می‌رسد (۲). شواهد و مدارک کلینیکی نشان می‌دهد که آسیب‌های DNA اسپرم بر نتایج باروری، اثر مضر و مخرب داشته و میزان این آسیب‌ها در مردان نابارور نسبت به مردان بارور به‌مراتب بیشتراست (۳ و ۴)، از سوی دیگر نقص در محتوای پروتامین در مردان نابارور با عدم تراکم صحیح کروماتین برای فرایند لقاح طبیعی، مستعد شدن DNA به آسیب‌دیدگی و همچنین تراکم زودرس کروماتین (PCC)[3] بعد از انجام ICSI که منجربه عدم فعال شدن تخمک می‌گردد، همراه می‌باشد (۸-۵). با توجه به مواردی که ذکر گردید انتخاب اسپرم سالم در درمان بیماران نابارور با روش ICSI ، اهمیت قابل‌ملاحظه‌ای را داراست.

امروزه در بسیاری از مراکز کمک‌باروری برای جداسازی اسپرم‌های سالم از روش‌هایی از جمله روش مهاجرت اسپرم که سلول‌های اسپرمی را براساس تحرک جدا می‌نماید و نیز روش سانتریفیوژ شیب غلظت که اسپرم‌ها را بر اساس چگالی جداسازی می‌کند و قادر به جدا نمودن اسپرم‌هایی با تحرک بیشتر و مورفولوژی طبیعی می‌باشد، استفاده می‌نمایند (۹). روش‌های مذکور منجر به جداسازی اسپرم‌های متحرک از باکتری‌ها و اسپرم‌های مرده می‌گردد، همچنین درصد تحرک و مورفولوژی اسپرم‌های جداسازی‌شده در محدوده طبیعی می‌باشد. حال آن که همان‌گونه که ذکر گردید خصوصیات ظاهری اسپرم از جمله تحرک و مورفولوژی، گویای سلامت ساختار کروماتینی این سلول نبوده و لذا امروزه محققین با به‌کارگیری ویژگی‌های مولکولی و عملکردی اسپرم برای جداسازی و انتخاب این سلول در حال انجام تحقیقاتی هستند که از آن جمله می‌توان به‌روش الکتروفورز و زتا مبتنی بر بار الکتریکی سطح

1. Intra Cytoplasmic Sperm Injection

2. In Vitro Fertilization

3. Premature Chromatin Condensation

Archive of SID

www.SID.ir

اسپرم اشاره نمود (۱۰ و ۱۱).

روش زتا در سا ل ۲۰۰۶ توسط چان وهمکارانش به‌عنوان یک روش نوین جداسازی اسپرم معرفی گردید (۱۱). تحقیقات نشان داده که اسپرم بالغ دارای بار الکتریکی در حدود ۱۶- تا۲۰- میلی‌ولت است (۱۲). این بار الکتریکی در اثر ظرفیت‌یابی اسپرم و یا مواجهه با نورامینیداز رحمی یا مایع فولیکولی کاهش می‌یابد (۱۳) که این بار الکتریکی پتانسیل زتا نامیده می‌شود (۱۶-۱۲) و با تشکیل سیالوگلیکوپروتئین‌های باردار در سطح غشای اسپرم ایجاد می‌گردد. در طی عبور اسپرم از اپیدیدیم، سه شکل مختلف گلیکوپروتئین Gp20-CD52 به غشای پلاسمایی اسپرم توسط پیوندهای گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول اتصال می‌یابند (۱۳ و ۱۸-۱۶). کارایی این روش جدید در انتخاب سلول‌های اسپرم با مورفولوژی طبیعی، سلامت آکروزومی و نیز سلامت ساختار کروماتین به اثبات رسیده است. میزان آپپتوز، نکروز و آسیب ماده ژنتیکی در اسپرم‌های انتخاب‌شده در این روش به‌مقدار قابل‌توجهی کاهش می‌یابد (۱۹ و۲۰). لذا به‌کارگیری این روش انتخاب اسپرم می‌تواند به‌عنوان گزینه‌ای جدید در روش‌های آماده‌سازی اسپرم مطرح گردد. این در حالی است که روش زتا به قدرکافی قادر به جدا نمودن اسپرم‌ها از مایع منی و باکتری‌های موجود در آن نبوده و دراین مورد به اندازه روش پیور کارایی ندارد.

امروزه به‌صورت گسترده‌ای در مراکز باروری و ناباروری، روش سانتریفیوژشیب غلظت (پیور) برای جداسازی و آماده نمودن اسپرم مورد استفاده قرار می‌گیرد، روش مذکور راهی مناسب برای جداسازی اسپرم از مایع منی می‌باشد. در این روش مایع منی بر روی لایه‌هایی با غلظت‌های مختلف از پیور اسپرم قرار گرفته و پس از سانتریفوژ، اسپرم‌های مناسب بر اساس چگالی جداسازی می‌شوند. باتوجه به تفاوت موجود در چگالی و باکتری‌ها، اسپرم‌های مرده و زنده به‌ترتیب در لایه‌ها از بالا به پایین قرار می‌گیرند و اسپرم‌های زنده به‌واسطه داشتن چگالی بیشتر به انتهای لوله رسیده و ته‌نشین می‌گردند (۲۱). مواد مورد استفاده در روش سانتریفوژ در شیب غلظت با عناوین مختلف تجاری شناخته می‌شوند که عبارتند از: Percoll ، Sil-Select، Ixaprep و Pure Sperm که امروزه Pure Sperm به‌طور معمول در روش‌های کمک‌باروری وآزمایشگاه‌های آندرولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۲).

اکنون این سؤال مطرح می‌شود که آیا به‌کارگیری هم‌زمان دو روش پیور و زتا می‌تواند میزان بازدهی مراحل آماده‌سازی اسپرم را بالاتر برده و از محاسن هر دو روش برای جداسازی بهتر اسپرم‌هایی با مورفولوژی طبیعی و ساختار کروماتینی سالم استفاده شود؟ از این رو هدف از مطالعه حاضر این است که فرضیه مذکور را مورد ارزیابی قرار دهد. لذا میزان کارایی روش زتا و پیور، هم به‌صورت جداگانه و هم به‌صورت روش ترکیبی پیور- زتا برای جداسازی سلول‌های اسپرم با مورفولوژی و ساختار کروماتین طبیعی ارزیابی گردید و نتایج به‌دست‌آمده از روش‌های مذکور نسبت به یکدیگر مقایسه شد.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

در این مطالعه در روی نمونه‌های مایع منی ۲۸ زوج نابارور مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان برای انجام عمل ICSI، بررسی به عمل آمد. تحقیق مذکور از مهرماه سال ۱۳۸۶ تا خردادماه سال ۱۳۸۷ انجام پذیرفت. پس از اخذ رضایت‌نامه از بیماران، نمونه‌های مایع منی در روز تخمک‌گیری، بعد از ۴-۳ روز خودداری زوجین از مقاربت، جمع‌آوری گردید. میانگین سن برای مردان ۶/۳۲±۳۵/۵۰ و برای همسران آن‌ها ۵/۱۴±۳۰/۰۷ و میانگین تعداد دفعات درمان قبلی این بیماران برابر با ۰/۲۸±۱/۵۴ بود. ۲۲/۲۳ درصد بیماران با علت ناباروری مردانه، ۱۴/۸۱ درصد با علت ناباروری زنانه و ۶۲/۹۶ درصد بیماران با هر دو علت ناباروری مردانه و زنانه به این مرکز مراجعه کردند. آنالیز معمول مایع منی (بررسی غلظت، تحرک و مورفولوژی) طبق معیار WHO، توسط میکروسکوپ نوری انجام گرفت (۲۳) . ذکر این نکته ضروری است که در این مطالعه از نمونه‌های منی با غلظت پایین استفاده نشد و دلیل این امر آن است که در روش زتا تعداد اسپرم محدودی جمع‌آوری می‌گردد، همچنین انتخاب نمونه‌ها به روش ساده انجام پذیرفت. تمامی مواد مصرفی در این مطالعه به‌جز موارد اشاره شده در متن از شرکت سیگما تهیه گردیده است.

● **آماده‌سازی اسپرم:** دراین مطالعه، نمونه مایع منی بیماران به ۴ بخش تقسیم گردید. گروه اول با روش پیور، گروه دوم با استفاده از روش زتا و گروه سوم با به‌کارگیری هم‌زمان هر دو روش پیور و زتا (روش ترکیبی پیور- زتا) جداسازی شدند. گروه چهارم، با نمونه مایع منی دو بار شستشو داده‌شده با محیط Ham's بود که به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. نمونه‌های آماده‌سازی‌شده از هر گروه به‌طور مجزا از لحاظ مورفولوژی، میزان کمبود پروتامین و مقدار فرگمنتاسیون DNA به‌ترتیب با استفاده از روش رنگ‌آمیزی Diff Quick (۲۴)، رنگ‌آمیزی کروموماپسین A_3 (CMA3) (۲۵) و (SCD)[1] (۲۶) مورد بررسی قرار گرفت.

● **روش جداسازی سانتریفیوژ شیب غلظت (پیور):** یک گرادیان دولایه‌ای از محلول Pure sperm ۸۰ و ۴۰ درصد در لوله فالکون ۱۰cc تهیه گردید تا یک ستون ممتد از Pure sperm دو لایه با دو شیب غلظت مجزا ایجاد شود. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از مایع منی روی آن قرار داده شد و به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰۰۰g سانتریفوژ گردید. در این مطالعه، برای انجام روش DGC از ماده تجاری Pure sperm (کشور سازنده سوئد) استفاده گردید. پس از سانتریفوژ، مایع رویی با پیپت پاستور آسپیره شده و باقی‌مانده محتویات لوله به یک لوله فالکون 5cc منتقل شد و با محیط Sperm Rinse، مخلوط گردید. سپس سوسپانسیون ایجاد شده به مدت ۱۰ دقیقه در g ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مجدداً پس از سانتریفیوژ، مایع رویی برداشته و رسوب تشکیل‌شده در انتهای لوله که محتوی اسپرم‌های جداسازی‌شده است برای انجام آزمایش‌های موردنظر مورد استفاده قرار گرفت (۲۲).

1. Sperm Chromatin Dispersion

Archive of SID

www.SID.ir

● **روش جداسازی زتا:** ابتدا نمونه اسپرمی در لوله مخصوص سانتریفوژ ریخته شده و با محیط Ham's شستشو گردید، سپس لوله سریعاً سه مرتبه درون دستکش لاتکس چرخیده و بیرون کشیده شد تا باردار گردد. لوله باردارحاوی نمونه به‌مدت یک‌دقیقه در دمای آزمایشگاه (۲۲ درجه) قرار داده شد تا اسپرم‌های بالغ دارای بار منفی به جدار لوله بچسبند. لوله مذکور به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژگردیده وبعد رسوب تشکیل شده و سوسپانسیون سلولی با پیپت پاستور به آرامی از ته لوله خارج‌گردید. سپس محیط کشت Ham's به‌داخل آن ریخته و مجدداً خارج شده تا سلولی ته لوله باقی نماند. پس از آن ۵۰۰ میکرولیتر محیط Sperm Rinse حاوی سرم در لوله ریخته و جدار لوله با آن شستشو داده شد تا جدار لوله بدون بار گردد و اسپرم‌های چسبیده به جدار لوله جدا شده و به داخل آن ریخته شود (۱۱).

● **ارزیابی کمبود پروتامین بر اساس رنگ‌آمیزی کروموماسین A_3:** اسمیرهای آماده‌شده از اسپرم‌های جداسازی شده که در محلول کارنوی (متانول و اسید استیک با نسبت ۳:۱) به‌صورت هم‌حجم، ثابت گردیده به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به‌منظور انجام رنگ‌آمیزی CMA3 هر اسلاید به‌مدت ۲۰ دقیقه با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول CMA3 رنگ‌آمیزی‌شده (۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر مک‌کلوین، که شامل ۷cc اسید استیک ۱/ ۰ مولار و ۳۲/۹cc از VH2O و Na2HPO4 و با غلظت ۰/۲ مولار PH=7 و ۹۵ میلی‌گرم ۱۰Mgcl2 میلی‌مولار می‌باشد). سپس اسلایدها با بافر PBS شستشو داده شد، در مرحله بعد اسلایدها با گلیسرول مونت گردید. آنالیز میکروسکوپی اسلایدها توسط میکروسکوپ فلورسنت (BX51,Tokyo,Japan) صورت گرفت. پس از رنگ‌آمیزی CMA3 اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین با رنگ زرد درخشان (CMA3 مثبت) و اسپرم‌های طبیعی با رنگ زرد کم‌رنگ (CMA3 منفی) قابل مشاهده بود. در این مطالعه در هر نمونه، ۲۰۰ اسپرم آنالیز گردید و درصد اسپرم‌های CMA3، مثبت (کمبود پروتامین) گزارش شد (۲۵).

● **ارزیابی فرگمانتاسیون DNA بر اساس آزمایش SCD:** ۳۰ میکرولیتر از نمونه اسپرمی آماده‌شده (غلظت ۱۰-۵ میلیون) با ۷۰ میکرولیتر از آگاروز ۱ درصد با درجه ذوب پایین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مخلوط می‌گردید. سپس نمونه مخلوط‌شده بر روی لامی که از قبل با آگاروز ۰/۶۵ درصد پوشیده شده بود، قرار داده شد و با گذاشتن یک لامل بر روی آن، به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس با دقت لامل از سطح لام جدا گردیده و هر لام به‌صورت افقی در محلول اسیدکلریدریک ۰/۰۸ طبیعی به‌مدت ۷ دقیقه قرار داده شد. در مرحله بعد لام در محلول لیزکننده اسپرم (pH7.5) به‌مدت ۲۵ دقیقه قرار گرفت و پس از دو بار شستشو در آب مقطر، به ترتیب در الکل‌های ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد هر یک به‌مدت ۲ دقیقه آبگیری می‌شد. لام‌ها بعد از خشک شدن، با محلول رنگ Wright در PBS به نسبت ۱:۱ رنگ‌آمیزی گردید و با میکروسکوپ نوری بررسی شد. با استفاده از این روش می‌توان میزان فرگمانتاسیون DNA را به‌صورت ۵ نوع سلول با توجه به وجود هاله اطراف هسته و اندازه آن نسبت به هسته

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی نمود. درصد اسپرم‌های با فرگمنتاسیون DNA (هسته اسپرم با هاله کوچک، بدون هاله و سلول اسپرم درجه‌بندی‌شده) و بدون فرگمنتاسیونDNA (هسته اسپرم با هاله بزرگ و هاله متوسط) ارزیابی گردید (۲۶)، در هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش و به‌صورت درصد فرگمنتاسیون گزارش شد.

نتایج با آزمون آنوا تجزیه و تحلیل شدند و در صورتی که عدد P کم‌تراز ۰/۰۵ بود از لحاظ آماری معنادار تلقی‌گردید.

یافته‌ها

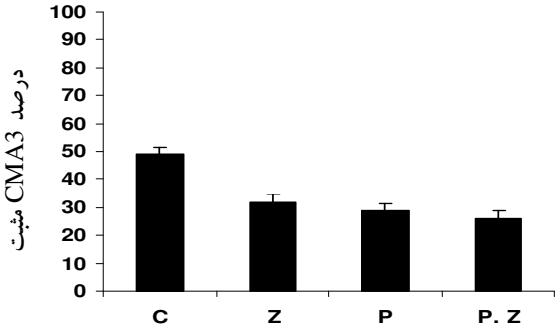
در جدول ۱ اطلاعات توصیفی متغیرهای اسپرمی ۲۸ بیمار مورد مطالعه شامل غلظت، درصد تحرک و مورفولوژی نمایش داده شده است. میانگین غلظت اسپرم۳/۳۴±۴۹/۱۴، درصد تحرک ۲/۲۳±۴۳/۲۸ و درصد مورفولوژی غیرطبیعی برابر با ۱/۶۵±۷۸/۵۷ بوده است.

مقایسه درصد کمبود پروتامین، درصد فرگمنتاسیون DNA و نیز درصد مورفولوژی غیرطبیعی بین ۴ گروه مذکور در نمودارها نشان داده شده است. علایم اختصاری نشان‌گر گروه‌های موردنظر می‌باشند (گروه کنترل C، روش زتا Z ، روش پیورP ، روش ترکیبی پیور– زتا P.Z).

همان‌گونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود میزان درصد کمبود پروتامین در اسپرم‌های انتخاب‌شده به‌روش

جدول ۱– میانگین غلظت، درصد تحرک و مورفولوژی غیرطبیعی در نمونه‌های منی ۲۸ بیمار

متغیرها	میانگین	حداقل	حداکثر	تعداد
غلظت (میلیون/میلی‌لیتر)	۴۹/۱۴ ± ۳/۳۴	۱۰/۰۰	۹۰/۰۰	۲۸
درصد تحرک	۴۳/۲۸ ± ۲/۲۳	۱۵/۰۰	۶۵/۰۰	۲۸
درصد مورفولوژی غیرطبیعی	۷۸/۵۷ ± ۱/۶۵	۵۸/۰۰	۹۶/۰۰	۲۸



نمودار ۱–مقایسه درصد کمبود پروتامین بین گروه‌های کنترل، زتا، پیور و پیور–زتا. هر سه‌روش در سطح p<۰/۰۵ اختلاف معناداری را با گروه کنترل نشان داده است.

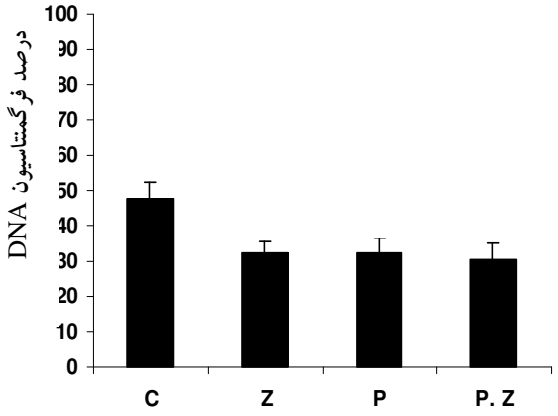
زتا و پیور و نیز روش ترکیبی پیور– زتا در مقایسه با نمونه کنترل کاهش معناداری را نشان می‌دهد. لیکن تفاوت معناداری بین درصد کمبود پروتامین اسپرم‌های انتخاب‌شده با روش پیور و زتا (P=۰/۸۲۰) و نیز روش ترکیبی پیور– زتا و پیور وجود ندارد (P= ۰/۹۱۳). علاوه بر این اختلاف معناداری بین میزان کمبود پروتامین اسپرم‌های انتخاب‌شده به روش زتا و روش ترکیبی پیور– زتا مشاهده نگردید (P<۰/۴۲۱).

Archive of SID

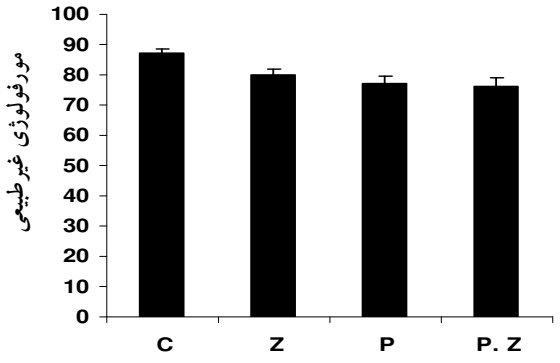
www.SID.ir

همان‌گونه که در نمودار ۲ نشان داده شده است، میزان فرگمنتاسیون DNA اسپرم‌های انتخاب‌شده به روش زتا، پیور و نیز روش ترکیبی پیور- زتا در مقایسه با نمونه کنترل کاهش معناداری را نشان می‌دهد. مقادیر P value به‌ترتیب P=۰/۵۰ ، P=۰/۰۵۷ و P=۰/۰۲۳ می‌باشند. لیکن روش زتا و پیور (P=۱/۰۰۰)، روش زتا و روش ترکیبی پیور- زتا (P=۰/۹۹۲) و نیز روش پیور و روش ترکیبی پیور-زتا (P=۰/۹۸۶) از لحاظ انتخاب اسپرم‌هایی با درصد پایین‌تر فرگمنتاسیون DNA ، اختلاف معناداری را نسبت به یکدیگر نشان ندادند.

در نمودار ۳، اسپرم‌های انتخاب‌شده به روش پیور و روش ترکیبی پیور- زتا در مقایسه با نمونه کنترل کاهش معناداری را از لحاظ جداسازی اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی نشان می‌دهند و مقادیر P value به‌ترتیب P=۰/۰۲۱ و P=۰/۰۱۱ می‌باشند. لیکن تفاوت معناداری بین درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم‌های انتخاب‌شده توسط زتا نسبت به نمونه کنترل وجود ندارد (P=۰/۱۶۲).



نمودار ۲– مقایسه درصد فرگمنتاسیون DNA بین گروه‌های کنترل، زتا، پیور و پیور-زتا. هر سه‌روش در سطح p<۰/۰۵ اختلاف معناداری را با گروه کنترل نشان داده است.



نمودار ۳– مقایسه درصد مورفولوژی غیرطبیعی گروه‌های کنترل، زتا، پیور و پیور-زتا. روش پیور و روش ترکیبی پیور-زتا در سطح p<۰/۰۵ اختلاف معناداری را با گروه کنترل نشان داده است.

بحث

در حال حاضر روش‌های گوناگونی برای جداسازی اسپرم توسط محققین معرفی گردیده است که هدف تمامی آن‌ها جداسازی اسپرم‌های بالغ و طبیعی از لحاظ مورفولوژی با ساختار طبیعی کروماتین هسته می‌باشد (۱۰، ۱۱ و ۲۷). از میان این روش‌های جداسازی، روشی که به‌طور معمول مورد استفاده قرار می‌گیرد روش سانتریفیوژشیب غلظت (پیور) می‌باشد. در این روش اسپرم‌هایی که از لحاظ مورفولوژی و حرکت در محدوده طبیعی قرار دارند بر اساس اختلاف در چگالی از اسپرم‌های غیرطبیعی جدا می‌شوند (۲۲).

تحقیقات ساکس و همکارانش در سال ۲۰۰۰ نشان داده که استفاده از روش سانتریفیوژشیب غلظت در آماده‌سازی اسپرم موجب کاهش قابل‌ملاحظه درصد اسپرم‌های با کمبود محتوای پروتامین و نیز کاهش تعداد سلول‌های اسپرمی با ماده ژنتیکی تخریب‌شده می‌گردد (۹) و همچنین نسبت اسپرم‌هایی با مورفولوژی طبیعی،

Archive of SID
www.SID.ir

در جداسازی اسپرم‌ها به‌روش سانتریفیوژشیب غلظت در مقایسه با سایر روش‌های جداسازی اسپرم از جمله روش مهاجرت اسپرم به‌طور معناداری افزایش می‌یابد (۹). نتایج حاصله از این مطالعه نیز حاکی از آن است که روش پیور، قادر به جداسازی درصد قابل‌توجهی از سلول‌های اسپرم با مورفولوژی و ساختار کروماتین طبیعی می‌باشد، از جمله روش‌های نوین جداسازی اسپرم می‌توان به روش زتا اشاره نمود. دراین روش انتخاب اسپرم بالغ بر اساس پتانسیل الکتریکی روی غشای اسپرم صورت می‌گیرد (۱۱). بر اساس مطالعه چان و همکاران جداسازی اسپرم‌ها به‌روش زتا، امکان انتخاب اسپرم‌های با مورفولوژی بهتر و تحرک بیشتر را فراهم می‌نماید (۱۱). مطالعات پیشین نصراصفهانی و همکاران و نیز نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه حاکی از آن است که روش زتا قادر به جداسازی سلول‌های اسپرم با مورفولوژی و محتوای پروتامینی طبیعی بوده ونیز میزان درصد تخریب DNA دراسپرم‌های انتخاب‌شده به‌مقدار قابل‌توجهی کاهش می‌یابد (۲۰).

در نتایج حاصله از این تحقیق، بین روش پیور، روش زتا و روش ترکیبی پیور-زتا در انتخاب و جداسازی اسپرم‌ها با درصد بالاتر مورفولوژی طبیعی و همچنین سلامت ساختار کروماتین تفاوت معناداری مشاهده نشد. یافته‌های حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که روش زتا کارایی مشابه با روش پیور را دارا بوده و می‌تواند همانند روش پیور، اسپرم‌هایی با سلامت ساختار کروماتین را جداسازی نماید. این در حالی است که روش ترکیبی نیز قادر به جداسازی اسپرم‌های طبیعی می‌باشد. بر طبق نتایج حاصل از این تحقیق هرچند اختلاف معناداری بین روش ترکیبی پیور-زتا با روش‌های پیور و زتا وجود ندارد، لیکن این روش ترکیبی با به‌کاربردن محاسن هر دو روش پیور و زتا تا حد بیشتری قادر به جداسازی اسپرم‌هایی با ناهنجاری‌های مورفولوژیکی کم‌تر و سلامت ژنتیکی بیشتر بوده و در صورت افزایش تعداد نمونه‌ها اختلاف معناداری نیز قابل مشاهده خواهد بود.

در توجیه کارایی روش زتا، می‌توان به این نکته اشاره نمود که همان‌گونه که تحقیقات گوناگون پیش از این نشان داده‌اند، اضافه شدن سیالوگلیکوپروتئین‌ها بر سطح خارجی غشای اسپرم که عامل به‌وجودآورنده اختلاف بار الکتریکی بین سطح غشای اسپرم و محیط خارج می‌باشد، در مرحله اسپرمیوژنز رخ می‌دهد (۱۳). لذا هرگونه اختلال در روند اسپرمیوژنز ممکن است منجر به عدم تکامل صحیح غشاء پلاسمایی اسپرم شود و هم‌زمان در بسته‌بندی و تراکم کروماتین نیز اختلال ایجاد نماید (۳۲-۲۸). از آن‌جایی که تراکم صحیح کروماتین اسپرم در این مرحله، ممکن است با تکامل پروتئین‌های سطحی غشاء پلاسمایی اسپرم هم‌زمان باشد این امر می‌تواند توجیه‌کننده این مطلب باشد که اسپرم‌های دارای محتوای صحیح گلیکوپروتئین‌های سطحی غشای پلاسمایی که بر اساس بار الکتریکی طبیعی خود در روش زتا جداسازی شده‌اند، احتمالاً دارای محتوای پروتامین طبیعی نیز می‌باشند. محتوای پروتامین طبیعی منجر به بسته‌بندی صحیح کروماتین گشته و از آسیب DNA ممانعت به‌عمل می‌آورد، بنابراین این نکته می‌تواند

Archive of SID

www.SID.ir

مؤید این مطلب باشد که اسپرم‌های جداسازی‌شده به روش زتا دارای درصد پایین‌تری از تخریب ماده ژنتیکی نسبت به گروه کنترل می‌باشند.

به‌رغم این که روش زتا ساده است، ولی محدودیت‌های خاص خود را نیزدارد. در این روش، جداسازی اسپرم‌ها باید به سرعت و پیش از ظرفیت‌یابی اسپرم انجام گیرد، زیرا ظرفیت‌یابی اسپرم موجب حذف برخی از گلیکوپروتئین‌ها و سیالوگلیکوپروتئین‌ها از سطح خارجی غشای اسپرم‌ها می‌گردد و همین امر منجر به کاهش بار منفی سطح غشا می‌شود که نتیجه آن اتصال تعداد کم‌تر و سست‌تر اسپرم‌ها به جدار شیشه می‌شود. بنابراین برای جداسازی بهینه اسپرم‌ها از طریق روش زتا بایستی به‌طور سریع عمل نمود (۱۴ و ۱۵).

نتیجه‌گیری

هدف از مطالعه حاضر، این بود که روش‌های جداسازی زتا و پیور به‌طور جداگانه و نیز به‌صورت ترکیب با یکدیگر مورد ارزیابی قرار گیرند. علاوه بر این مشخص گردید که روش زتا کارایی مشابه با کارایی روش پیور دارد و نیز روش ترکیبی پیور–زتا با به‌کاربستن محاسن هر دو روش، منجر به جداسازی بهترین اسپرم‌ها از لحاظ سلامت ماده ژنتیکی و ساختار کروماتینی و نیز مورفولوژی می‌شود. لذا استفاده از این روش ترکیبی منجر به بازدهی بالاتر در روند جداسازی و آماده‌سازی اسپرم‌ها می‌شود و گزینه بهتری را پیش روی محققین در انتخاب صحیح‌تر اسپرم‌ها برای انجام ICSI قرار می‌دهد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با همکاری پژوهشکده رویان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان انجام گرفته است. لذا از کلیه مسئولین و کارکنان مراکز مذکور کمال تشکر و قدردانی را داریم. بودجه این تحقیق توسط پژوهشکده رویان پرداخت گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G et al., Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. Hum Reprod 2004; 19(6):1409-17.
2. Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M. The role of sperm chromatin anomalies on the outcome of assisted reproduction techniques. Yakhteh 2006; 7(4): 206-266.
3. Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C,Mehnert C, Menkveld R,Gips H, et al. Influence of deoxyribonucleiec acid damage on fertilization and pregnancy. Fertil Steril 2004; 81(4):965-972.
4. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, et al. Sperm DNA fragmentation Decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. Hum Reprod 2003; 18(5): 1023–28.
5. Nasr-Esfahani MH, Razavi SH, Tavalaee M. Failed Fertilization post ICSI and Spermiogenic Defects. Fertil Steril 2008; 89(4):892-8.
6. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mozdarani H, Mardani M, Azvagi H. Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. Andrologia 2004; 36(3): 95-100.
7. Mardani M, Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Shirazi R, Tavalaee M. Differentiation between the effect of protamine deficiency and failed oocyte activation on fertilization post ICSI. Journal of Iranian Anatomical Sciences 2006; 4(1): 95-103.
8. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M, Shirazi R, Javanmardi S. Effects of failed oocyte activation and sperm protamine deficiency on fertilization post-ICSI. Reprod Biomed Online 2007; 14(4): 422-9.
9. Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG et al., The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. Hum Reprod. 2000; 15(5):1112-6.
10. Ainsworth C, Nixon B, Aitken RJ. Development of a novel electrophoretic system for the isolation of Human spermatozoa. Hum Reprod. 2005; 20(8): 2261-70.
11. Chan PJ, Jacobson JD, Corselli JU, Patton WC. A simple zeta method for sperm selection based on Membrane charge. Fertili Steril. 2006; 85(2):481-6.
12. Ishijima SA, Okuno M, Mohri H. Zeta potential of human X- and Y-bearing sperm. Int J Androl. 1991; 14(5): 340-7.
13. Della Giovampaola C, Flori F, Sabatini L, Incerti L, La Sala GB, Rosati F, et al., Surface of human sperm bears three differently charged CD52 forms,two of which remain stably bound to sperm after cap citation. Mol Reprod Dev. 2001; 60(1):89-96.
14. Focarelli R, Rosati F, Terrana B. Sialyglycoconjugates release during in vitro capacitation of human Spermatozoa . J Androl. 1990; 11(2):97-104.
15. Iqbal N, Hunter AG. Comparison of various bovine sperm capacitation systems for their ability to alter the net negative surface charge of spermatozoa. J Dairy Sci. 1995; 78(1):84-90.
16. Srivastava PN, Farooqui AA. Studies on neuraminidase activity of the rabbit endometrium. Biol Reprod. 1980; 22(4):858-63.
17. Carlini E, Palmerini CA, Cosmi EV, Arienti G. Fusion of sperm with prostasomes: effects on Membrane fluidity. Arch Biochem Biophys. 1997; 343(1):6-12.
18. Kirchhoff C, Hale G. Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol- anchored membrane proteins during sperm maturation. Mol Hum Reprod. 1996; 2(3):177-84.Review.
19. Kam TL, Jacobson JD, Patton WC, Corselli JU, Chan PJ. Retention of membrane charge attributes by cryopreserved-thawed sperm and zeta selection. J Assist Reprod Genet 2007; 24(9):429-34.
20. Shayesteh Moghadam M, Nasr-Esfahani MH, Razavi Sh,, Nazem HA, Deemeh MR, Tavalaee M [The efficiency of zeta method in separation of sperm with normal morphology and chromatin structure (Persian)] Journal of Shahrekord University of Medical Sciences.2008; 10(1):20-27.
21. Makler A., Stoller J, Makler-Shiran, E. Dynamic aspects concerned with the mechanism of separating motile sperm from nonmotile sperm,leukocyte and debris with the use of high-density Percoll gradients. Fertil Steril.1998; 70(5):961-6.
22. Ming JC, Ariff. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. Hum.Reprod 1999; 14(3):759–764.
23. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen–cervical mucus interaction. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 1999
24. Mercan R, Nassar A, Ozgur K, Srisombut C. Assessment of Sperm Morphology by Strict Criteria: A Comparison of Two Different Staining Techniques and Manual Versus Computer Analysis. Fertil Steril1997; 1997(1): 133-134.
25. 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(4):219-25.

Archive of SID

www.SID.ir

26. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. Fertil Steril 2005; 84(4):833–842.
27. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vahdati D, Fathi F, Tavalaee M. Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. J Assist Reprod Genet 2008; 25(5):197-203.
28. Tavalaee M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Effects of spermiogenesis defecys on Fertilization and pregnancy rate in IVF patients. Yakhteh 2007; 9(2):103-110.
29. Salehi M, Nasr-Esfahani MH, Razavi SH, Mardani M, Bahramian H, Oreizi F. [The relation between sperm protamine aberrations with protamine P1/P2 ratio (Persian)] Yakhteh 2005;6(4):212-217.
30. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vaezi GH, Shiravi AH, Tavalaee M. Effect acrosome activity and morphology on fertilization post ICSI. Medical Journal of reproduction & infertility 2006; 7(3):217-224.
31. Ribes E, Giménez-Bonafé P, Martínez-Soler F, Gonzalez A, Saperas N, Kasinsky HE et al., Chromatin Organization During Spermiogenesis in Octopus vulgaris: Morphological Structures.Mol Reprod 2004; 68(2): 223– 231.
32. Tavalaee M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. Fertil Steril 2009; 91(4):1119-26.

Archive of SID

www.SID.ir