مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد
دوره سیزدهم ، شماره اول، بهار ۱۳۸٤ ، صفحات ٤٦-۳۸

بررسی تأثیر عملکرد غده سمینال وزیکل و دی تیوتریتول (DTT) بر پایداری کروماتین اسپرم در زوجهای تحت درمان به دو روش IVF و ICSI

دکتر محمد مردانی* [1]،دکتر محمد حسین نصر اصفهانی [2] ،دکتر شهناز رضوی [3] ، ایمانه شمایلی یگانه [4]

چکیده

مقدمه: تحقیقات نشان می‌دهد که بین پایداری کروماتین اسپرم‌های افراد مختلف ودرصد لقاح دربیماران IVF و ICSI رابطه‌ای وجود ندارد .اما لازم به ذکر است که رابطه بین تست SDS بعنوان یک دیترجنت همراه با DTT به عنوان احیا کننده پیوندهای دی سولفیدی با لقاح در بیماران ICSI مورد مطالعه قرارنگرفته است. با توجه به اینکه پیش بینی می‌شود، غلظتهای مختلف DTT درجات متفاوتی از تورم کروماتین (NCD) را ایجاد می‌نماید واز آنجایی‌که مطالعات قبلی غلظت‌های متفاوت DTT را مورد بررسی قرار نداده‌اند هدف از این مطالعه بررسی میزان تورم کروماتین اسپرم با غلظت‌های مختلف DTTدر دو گروه بیماران IVF وICSI می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه ۸۵ بیمار، بر اساس شیوه درمان به دو گروه IVF و ICSI تقسیم گردیدند .در این افراد به طور جداگانه کیفیت سیمن توسط تستهای ارزیابی کیفیت کروماتین از جمله: SDS , SDS+EDTA و SDS+DTT که به ترتیب بیانگر میزان گروههای تیولی آزاد(SH-) ، میزان باندهای غیر کووالانسی (-SH…Zn…SH-) و تعداد باندهای دی سولفیدی (-S-S-) موجود در کروماتین اسپرم می‌باشد مورد بررسی قرارگرفت، ضمنا غلظت فروکتوز سیمن، سطح فروکتوز تصحیح شده وسطح فروکتوز تصحیح شده حقیقی به عنوان شاخص عملکرد غده سمینال بر پایداری کروماتین مورد ارزیابی قرارگرفت.

نتایج : مشخص گردید که بین تستهای ارزیابی کیفیت کروماتین و درصد لقاح در دو گروه IVF,ICSI رابطه‌ای وجود ندارد.ولی‌در بیماران IVF بین تست‌های SDS+DTT،SDS و تست‌های فروکتوز سیمن رابطه معنی‌داری دیده شد.در حالی‌که در گروهICSIاین رابطه تنها بین تست SDS+DTT (از غلظت ۱/۲۵ میلی مولار به بالا) با سطح فروکتوز تصحیح شده و سطح فروکتوز تصحیح شده حقیقی مشاهده شد.

نتیجه گیری: هر چند پایداری مطلوب کروماتین برای ایجاد لقاح ضروری است اما از آنجایی که بین هیچ‌یک از تستهای ارزیابی کروماتین ودر صد لقاح در دو گروه IVF,ICSI رابطه‌ای دیده نشد. لذا چنین نتیجه می‌گیریم که تفاوت پایداری کروماتین بین نمونه‌های مختلف تاثیری بر میزان لقاح ندارد. از سوی دیگر باوجود آنکه میزان Zn در هسته اسپرم عامل مهمی برای ایجاد ثبات در کروماتین است اما با توجه به نتایج به دست آمده در این بررسی مشخص شد که در گروه IVF پیوندهای غیر کوالانت بین Zn وگروههای سولفیدریلی نسبت به بیماران ICSI بیشتر است در صورتی که در بیماران ICSI باندهای دی سولفیدی نسبت به بیماران IVF بیشتر است .

واژه‌های کلیدی: کروماتین‌اسپرم،SDS-SDS+EDTA-SDS+DTT فروکتوز سیمن، فروکتوز تصحیح شده، فروکتوز تصحیح شده حقیقی، ICSI و IVF

مقدمه

کروماتین اسپرم در طی مرحله اسپرمیوژنزبه دنبال جایگزینی پروتامین به جای هیستون متراکم می‌گردد [1] پروتامین دارای عوامل تیولی یا سولفیدریلی(SH-) زیادی است که با عبور

۱*-نویسنده مسئول: استادیار گروه جنین شناسی، اصفهان ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ، دانشکده پزشکی، بخش جنین شناسی، تلفن- ۰۶۶۸۲۸۸۹-۰۳۱۱، نمابر ۶۶۸۲۰۰۶-۰۳۱۱
E mail: mardani@ mui .ac.ir
۲و۳ - استادیار گروه جنین شناسی
٤- مربی گروه جنین شناسی
۳،۲ و ٤- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی اصفهان
تاریخ دریافت ۱۴ دی ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش ۲۰ اسفند ۱۳۸۳

www.SID.ir

اسپرم از اپیدیدیم تعدادی از این عوامل اکسیده شده وبه پیوندهای دی‌سولفیدی(S-S) تبدیل می‌شوند این تبدیل باعث افزایش پایداری کروماتین می‌گردد[۲].

در طی انزال، با اضافه شدن ترشحات اسیدی و غنی از روی(Zn) پروستات به اسپرم، باعث می‌شود تا اسپرمها Zn را از این مایع برداشت نمایند[۳]. Zn تمایل زیادی برای اتصال به عوامل تیولی دارد و با ایجاد پیوند با این عوامل از اکسیده شدن آنها جلوگیری نموده و تراکم مطلوب را در کروماتین ایجاد می‌نماید[۴]. گزارش شده است که امکان دارد فوق پایداری یا ناپایداری در کروماتین با ناباروری همراه باشد[۵،۶،۷]. پس از انزال لیگاندهای با وزن مولکولی بالا (HMW) که منشا سمینال وزیکل دارند ونیز برداشت کننده (Chelator) قوی Zn هستند ، Zn اضافی را از مایع منی جذب نموده تا از تشکیل رادیکالهای آزاد جلوگیری نمایند.لازم به ذکر است در صورتی که اسپرم به مدت طولانی در مجاورت محتویات مایع منی قرار گیرد لیگاندهای HMW قادرند Zn را از کروماتین اسپرم نیز برداشت نموده ومنجر به فوق پایداری شوند[۳].

پس از جدا شدن اسپرم از مایع منی به تدریج Zn از کروماتین اسپرم جدا شده و بعد از ورود‌اسپرم به داخل اووسیت در حضور مقادیرزیاد گلوتاتیون (عامل کاهنده باندهای دی سولفیدی) باعث می‌گردد تا باندهای دی‌سولفیدی (S-S) شکسته شده وروند خروج از تراکم NCD (Nuclear Chromatin Decondensation) فعال گردد[۸].

در شرایط آزمایشگاهی با انجام تستهای ارزیابی کروماتین اسپرم می‌توان تأثیرعوامل تیولی، میزان باندهای دی سولفیدی و پیوندهای غیر کوالان را بر پایداری کروماتین مورد بررسی قرار داد. از جمله این تستها می‌توان به روشهای زیر اشاره نمود:

روشSDS : که جهت ارزیابی تعداد گروههای تیولی آزاد(SH-) به کار می‌رود. وقتی اسپرم در معرض یک دترژنت(پاک کننده) همانند SDS قرار می‌گیرد.غشای سیتوپلاسمی سر آن از هم گسیخته شده و به اسپرمهایی که دارای کروماتین ناپایدار هستند اجازه تورم داده می‌شودکه میزان این تورم به تعداد عوامل تیولی آزاد بستگی دارد[۱،۹]..

روش SDS+ EDTA : از این تست جهت ارزیابی تعداد باندهای غیر کوالانسی استفاده می‌شود.این نوع باند بین Zn و عوامل تیولی ازاد ایجاد می‌گردد. EDTA به عنوان یک کیلاته کننده Zn عمل می‌کند و Zn را از کروماتین اسپرم بر می‌دارد و باعث کاهش میزان روی (Zn) موجود در کروماتین می‌شود با کاهش Zn تورم در سر اسپرم ایجاد می‌گردد وشدت تورم به میزان باندهای دی سولفیدی بستگی دارد[۴،۷].

روش SDS+DTT : از این تست جهت ارزیابی باندهای دی‌سولفیدی استفاده می‌شود. هنگامی که اسپرم در معرض محلول SDS به اضافه یک عامل کاهنده باندهای دی سولفیدی همانند DTT قرار می‌گیرد با شکسته شدن باندهای S-S از تعداد این باندها کاسته شده و تورم در سر اسپرم ایجاد می‌گردد. مقاومت در برابر تورم در سر اسپرم بستگی به میزان پیوندهای غیر کوالانسی Zn با گروه‌های تیولی دارد[۱۰]. مطالعاتی که بر روی بیماران IVF انجام گردیده مشخص شده است که بین تست‌های فوق ودرصد لقاح رابطه‌ای وجود ندارد[۱۰]. اما در بیماران ICSI تنها رابطه بین درصد لقاح ودو تست SDS و SDS+EDTA مورد بررسی قرار گرفته است که درهر دو روش رابطه‌ای با لقاح گزارش نشده است[۸] و از آنجایی که پایداری کروماتین اسپرم در افراد مختلف متفاوت می‌باشد لذا مشخص نمودن ارتباط میزان پیوندهای دی سولفیدی (که بیانگر پایداری، فوق پایداری و ناپایداری می‌باشد) با لقاح از اهمیت خاصی بر خوردار است. بنابر این جهت دستیابی به این امر لازم است که اسپرمها در مجاورت غلظت‌های مختلف DTT قرار گیرند تا حد اقل میزان DTT برای القای NCD مشخص شود. بنابراین در این تحقیق اسپرم‌های افراد در دو گروه IVF وICSI در معرض SDS ,SDS+EDTA و SDS + غلظتهای مختلف DTT قرار گرفت و میزان NCD آنها بررسی گردید. در ضمن جهت بررسی عملکرد غده سمینال وزیکل یا میزان لیگاندهای HMW بر فرایند NCD مقدار فروکتوز مایع منی به عنوان شاخصی جهت عملکرد این غده اندازه گیری شد.

روش بررسی

در این مطالعه ۸۵ بیمار که جهت درمان ناباروری به

Archive of SID
www.SID.ir

مرکز باروری و ناباروری اصفهان مراجعه کردند مورد بررسی قرارگرفتند. از این تعداد بیماربه ترتیب ۴۲ و ۴۳ نفر کاندید درمان به روش IVF و ICSI بودند.برای هر یک از بیماران در هرگروه پارامترهای زیر ارزیابی گردید.

۱- ارزیابی کیفیت سیمن : نمونه سیمن از افراد تحت مطالعه (پس از خودداری از مقاربت به مدت حد اقل ۴۸ تا ۷۲ ساعت و حد اکثر ۷ روز) گرفته شد و پس از ۲۰ تا ۳۰ دقیقه پارامترهای مختلف مثل ویسکوزیتی، حجم سیمن، حرکت، شکل وتعداد اسپرم بر اساس معیارهای WHO بررسی گردید[۱۱].

۲- بررسی ثبات کروماتین اسپرم: ابتدا ۲۰ میکرولیتر سیمن تازه را به طور جداگانه در دو لوله فالکون ۵ میلی‌لیتری قرار داده سپس به لوله اول ۱۸۰ میکرولیتر SDS ۱٪ وبه لوله دوم ۱۸۰ میکرولیتر محلول SDS که حاوی ۶ میلی مولار EDTA بود اضافه شد. .لوله‌ها به مدت ۶۰ دقیقه ودر حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس ۲۰۰ میکرو لیتر گلوتارالدئید ۲/۵ ٪ جهت توقف روند NCD به هر لوله اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه از هر لوله یک اسمیر تهیه گردید و بعد لامها با متانول فیکس شد سپس با رنگ گیمسا لامها به مدت ۴۰ دقیقه رنگ آمیزی گردید. پس از طی مراحل آبگیری و مونتاژ، لامها با استفاده از میکروسکوپ نوری و درشت نمایی ۴۰۰ × مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شدکه اندازه سر برخی از اسپرمها تغییر کرده و متورم شده است. لذا اسپرمها به ترتیب به چهار گروه تقسیم شدند.

اسپرم‌های با اندازه طبیعی سروبدون تورم (Score -0) ، اسپرم‌های با سر مختصر بزرگ و اندکی تورم(Score-1)، اسپرم‌های با سر نسبتاً بزرگ وتورم متوسط(Score-2)، اسپرمهای با سرخیلی بزرگ وتورم خیلی زیاد (Score-3) که با افزایش اسکور، کرماتین اسپرم روشن‌تر دیده می‌شد.

در این بررسی برای هر لام تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و با توجه به چهار گروه فوق اسکورکلی(توتال) آنها به شرح زیر محاسبه گردید[۷].

Total Score = (S0 × 0) +(S1 ×1) +(S2 ×2)+(S3 ×3) در روش SDS+DTT از محلول SDS که حاوی ۲۰ میلی مولار DTT بود، ۱۸۰ میکرولیتر برداشته شدوبا استفاده ازSDS ۱٪ آن را رقیق کرده تا غلظت‌های۰/۳۳، ۰/۶۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی مولار به دست آمد. بعد از این مراحل به هر یک از غلظت‌های فوق ۲۰ میکرولیتر سیمن تازه اضافه شد و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید و بقیه مراحل مشابه روش SDS انجام شد.

۳-اندازه گیری فروکتوز سیمن: برای اندازه گیری غلظت فروکتوز سیمن(FC : Fructose Consenteration) از روش اسپکترو فتومتری استفاده شد[۱۰].در مطالعات مختلف مشخص شده است که اسپرم پس از انزال در طی فرایندی به نام فروکتولیز، فروکتوز را مصرف می‌کند. لذا غلظت فروکتوز با تعداد اسپرم رابطه دارد[۱۲] بنابراین جهت رفع این نقص از پارامتری به نام سطح فروکتوز تصحیح شده (CFL : Corrected Fructose Level) استفاده می‌شود از آنجایی‌که اسپرم‌های بدون تحرک فروکتوز را مصرف نمی‌کنند پس باید غلظت فروکتوز را بر اساس تعداد اسپرم‌های متحرک هم اصلاح نمود که این پارامتر تحت عنوان سطح فروکتوز تصحیح شده حقیقی (TCFL:True Corrected Fructose Level) می‌باشد[۱۳]. در مطالعه حاضر دو پارامتر فوق از طریق فرمول‌های زیر به دست آمد:

سطح فروکتوز تصحیح شده= لگاریتم تعداد اسپرمهای موجود در سیمن× غلظت فروکتوز سمینال

سطح فروکتوز تصحیح شده حقیقی = لگاریتم تعداد اسپرمهای متحرک موجود در سیمن× غلظت فروکتوز سمینال

آنالیز آماری: پس از وارد کردن اطلاعات مربوط به بیماران دو گروه IVF و ICSI از طریق برنامه نرم افزاری SPSS-10 رابطه بین داده‌هابررسی گردید. جهت ارزیابی رابطه بین درصد لقاح وتست‌های SDS, SDS+EDTA, SDS+DTT در هر یک از گروه‌ها از آزمون ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. از همین آزمون جهت ارزیابی رابطه بین FC، CFL و TCFL با تست‌های فوق نیز استفاده شد. جهت تعیین اختلاف میانگین FC,CFL, TCFL و درصد لقاح در بیماران IVF, ICSI و در دو گروه از بیمارانی که جهت ایجاد ۹۰٪ تورم به حد اقل و حد اکثر

Archive of SID
www.SID.ir

غلظت DTT نیاز داشتند، ازآزمون t مستقل استفاده شد. از همین آزمون جهت تعیین اختلاف میانگین خروج از تراکم به روش SDS در دو گروه IVF و ICSI استفاده گردید. زمانی که مقدار p-value<0.05 بود ، رابطه از نظر آماری معنی‌دار محسوب شد.

نتایج

با توجه به جدول(۱) مشخص شد که بین تست‌های فوق و درصد لقاح در دو گروه IVF و ICSI رابطه‌ای وجود ندارد. به منظور ارزیابی رابطه بین درصدهای مختلف NCD و درصد لقاح ، از غلظت‌های مختلف DTT استفاده شد و سپس رابطه بین غلظت‌های مختلف DTT (که باعث ایجاد درصدهای مختلفی از NCD می‌شوند) و درصد لقاح بررسی گردید و مشخص شد بین این دو پارامتر رابطه‌ای وجود ندارد(جدول ۱) ، در نمودار (۱) مقایسه در صد لقاح درسه گروه از بیمارانی‌که نیاز به غلظت‌های متفاوتDTT داشتند که این غلظت‌ها باعث القا بیش از ۷۵٪ NCD در اسپرم گردید را نشان می‌دهد که بین سه گروه تفاوت معنی داری دیده نشد.

با توجه به جدول (۲) مشخص گردید که در افراد IVF بین اکثر تست‌های SDS+EDTA,SDS وغلظت‌های مختلف SDS+DTT با FC ، CFL و TCFL در سطح P<0.05 و در بقیه موارد در سطح P<0.1 رابطه معنی‌داری وجود دارد در حالی که جدول (۳) نشان می‌دهد که در بیماران ICSI تنها بین تست SDS+DTT از غلظت ۱/۲۵ میلی مولار به بالا با CFL و TCFL رابطه معنی‌داری وجود دارد.

دراین مطالعه، بیماران IVF و ICSI براساس غلظت کمتر از ۱/۵ میلی مولار و بیشتر از ۵ میلی مولار DTT جهت القای حداقل ۹۰ درصد NCD، به دو گروه تقسیم شدند و سپس اختلاف میانگین TCFL, CFL,FC و در صد لقاح در دو گروه(با حداقل و حداکثر غلظت DTT مورد نیاز) بررسی گردید، با توجه به جدول (۴) مشخص شد که در گروه IVF اختلاف میانگین TCFL, CFL,FC معنی‌دار بود ، اما در گروه ICSI تنها سطح CFL بین دو گروه اختلاف معنی‌داری داشت. در ضمن میانگین درصد اسکور توتال برای کلیه تست‌ها بین دو گروه IVF وICSI مقایسه شد که نتایج به دست آمده حاکی از آن است که میانگین ناپایداری کروماتین در دو گروه اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد (جدول۵).

جدول (۱): رابطه بین میزان خروج از تراکم یا ناپایداری کروماتین(اسکور توتال) باروشهای SDS+DTT,SDS+EDTA.SDS با درصد لقاح در دو گروه IVF,ICSI

تستهای ارزیابی کیفیت کروماتین	IVF		ICSI	
	P-Value	R	P-Value	R
SDS	۰/۶۷۹	-۰/۰۶۶	۰/۷۵۲	-۰/۰۵۰
SDS+EDTA	۰/۴۹۲	۰/۱۰۹	۰/۲۷۵	-۰/۱۷۰
SDS+DTT (۰/۳۳ میلی‌مولار)	۰/۶۹۸	-۰/۰۶۲	۰/۶۰۸	-۰/۰۸۰
SDS+DTT (۰/۶۵ میلی‌مولار)	۰/۵۵۰	-۰/۰۹۵	۰/۸۷۹	-۰/۰۲۴
SDS+DTT (۱/۲۵ میلی‌مولار)	۰/۴۰۲	-۰/۱۳۳	۰/۷۰۰	-۰/۰۶۱
SDS+DTT (۲/۵ میلی‌مولار)	۰/۳۶۳	-۰/۱۴۴	۰/۷۲۹	-۰/۰۵۴
SDS+DTT (۵ میلی‌مولار)	۰/۳۹۳	-۰/۱۳۵	۰/۶۰۰	-۰/۰۸۲
SDS+DTT (۱۰ میلی‌مولار)	۰/۳۵۸	-۰/۱۴۵	۰/۵۸۵	-۰/۰۸۶
SDS+DTT (۲۰میلی‌مولار)	۰/۴۱۴	-۰/۱۲۹	۰/۵۵۰	-۰/۰۹۴

Archive of SID
www.SID.ir

جدول(۲): رابطه نا پایداری کروماتین(TS)با روشSDS،SDS+DTT,SDS+EDTA با غلظت فروکتوزسیمن ، سطح فروکتوز تصحیح شده و سطح فروکتوز تصحیح شده حقیقی در گروهIVF

تستهای ارزیابی	سطح فروکتوزتصحیح شده حقیقی TCFL		سطح فروکتوز تصحیح شده CFL		غلظت فروکتوز سیمن FC	
	r	P-Value	r	P-Value	r	P-Value
SDS	۰/۳۰۳	۰/۰۵۱	۰/۳۰۷	۰/۰۴۸	۰/۲۹۶	۰/۰۵۷
SDS+EDTA	۰/۲۸۷	۰/۰۶۵	۰/۲۷۳	۰/۰۸۱	۰/۲۶۴	۰/۰۹۲
SDS+DTT (۳۳/.میلی مولار)	۰/۳۱۲	۰/۰۴۴	۰/۲۸۱	۰/۰۷۱	۰/۲۸۳	۰/۰۷
SDS+DT(۶۵/. میلی مولار)	۰/۳۹۴	۰/۰۱۰	۰/۳۹۲	۰/۰۱۰	۰/۴۲۴	۰/۰۰۵
SDS+DTT(۱/۲۵ میلیمولار)	۰/۳۷۸	۰/۰۱۳	۰/۳۷۹	۰/۰۱۳	۰/۴۲۷	۰/۰۰۵
SDS+DTT (۲/۵ میلی مولار)	۰/۳۷۴	۰/۰۱۵	۰/۳۸۱	۰/۰۱۳	۰/۴۲۶	۰/۰۰۵
SDS+DTT (۵ میلی مولار)	۰/۳۴۳	۰/۰۲۶	۰/۳۵۱	۰/۰۲۲	۰/۳۹۹	۰/۰۰۹
SDS+DTT (۱۰ میلی مولار)	۰/۳۱۸	۰/۰۴۰	۰/۳۲۹	۰/۰۳۴	۰/۳۸۱	۰/۰۱۳
SDS+DTT (۲۰ میلی مولار)	۰/۳۱۱	۰/۰۴۵	۰/۳۲۲	۰/۰۳۷	۰/۳۷۶	۰/۰۱۴

جدول(۳): رابطه ناپایداری کروماتین(TS)با روشSDS ، SDS+DTT,SDS+EDTA با غلظت فروکتوزسیمن ، سطح فروکتوز تصحیح شده وسطح فروکتوز تصحیح شده حقیقی در گروهICSI

تستهای ارزیابی	سطح فروکتوزتصحیح شده حقیقی TCFL		سطح فروکتوز تصحیح شده CFL		غلظت فروکتوز سیمن FC	
	R	PV	R	PV	R	PV
SDS	−۰/۰۴۵	۰/۷۷۵	۰/۰۰۳	۰/۹۸۶	−۰/۰۳۳	۰/۸۴۱
SDS+EDTA	−۰/۰۰۹	۰/۹۵۶	۰/۰۳۰	۰/۸۴۸	−۰/۰۴۸	۰/۷۶۱
SDS+DTT (۳۳/.میلی مولار)	۰/۲۰۸	۰/۱۸۰	۰/۲۲۳	۰/۱۵۱	۰/۱۰۰	۰/۵۲۳
SDS+DTT (۶۵/. میلی مولار)	۰/۲۴۷	۰/۱۱۱	۰/۲۶۴	۰/۰۸۷	۰/۱۴۰	۰/۳۷۰
SDS+DTT (۱/۲۵ میلی مولار)	۰/۳۳۲	۰/۰۳۰	۰/۳۶۲	۰/۰۱۷	۰/۲۲۵	۰/۱۴۸
SDS+DTT (۲/۵ میلی مولار)	۰/۳۳۱	۰/۰۳۰	۰/۳۶۷	۰/۰۱۶	۰/۲۳۲	۰/۱۳۴
SDS+DTT (۵ میلی مولار)	۰/۳۲۸	۰/۰۳۲	۰/۳۶۰	۰/۰۱۸	۰/۲۲۵	۰/۱۴۶
SDS+DTT (۱۰ میلی مولار)	۰/۳۳۰	۰/۰۳۰	۰/۳۷۰	۰/۰۱۵	۰/۲۴۰	۰/۱۲۱
SDS+DTT (۲۰ میلی مولار)	۰/۳۱۶	۰/۰۳۹	۰/۳۶۰	۰/۰۱۸	۰/۲۴۰	۰/۱۲۰

Archive of SID

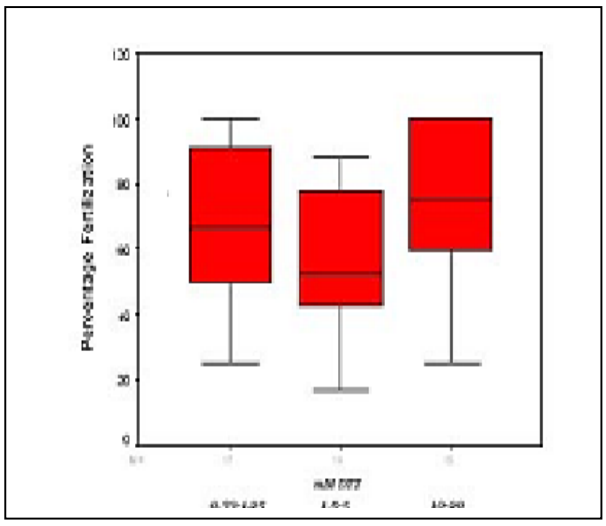
www.SID.ir

جدول (٤): مقایسه میانگین ، FC، CFL , TCFL ودرصد لقاح در بیماران IVF و ICFI و در دو گروه از بیمارانی که جهت ۹۰ درصد NCD به کمتر از ۱/۵ میلی مولار و بیشتر از ۵ میلی مولار DTT نیاز دارند

	۱/۵ میلی مولار >DTT	۵ میلی مولار >DTT	P-value
غلظت فروکتوز در IVF	۳/۱۵ ± ۲/۱۷	۱/۵۴ ± ۰/۹۳	۰/۰۱۱
غلظت فروکتوز در ICSI	۴/۲ ± ۳/۲۶	۲/۹ ± ۲/۳۴	۰/۱۸
سطح فروکتوز تصحیح شده در IVF	۵/۳۸ ± ۳/۸۸	۲/۸ ± ۱/۶۱	۰/۰۲۰
سطح فروکتوز تصحیح شده در ICSI	۶/۶۲ ± ۵/۳۷	۵/۳ ± ۴/۲۵	۰/۰۴۱
سطح فروکتوز تصحیح شده حقیقی در IVF	۴/۳۱ ± ۳/۱۴	۲/۲۳ ± ۱/۲۹	۰/۰۲۱
سطح فروکتوز تصحیح شده حقیقی در ICSI	۳/۵۹ ± ۴/۲۴	۲/۳۹ ± ۲/۳۱	۰/۰۶۸
درصد لقاح درIVF	۶۸/۹ ± ۲۶/۸	۷۳/۵ ± ۲۵/۱۵	۰/۶۲۱
درصد لقاح درICSI	۷۲/۲۶ ± ۱۸/۴	۶۸/۶ ± ۲۷/۰۵	۰/۶۳۸

جدول(۵):اختلاف میانگین اسکور توتال(TS) با روشهای SDS , SDS+EDTAوSDS+DTT در دو گروه IVF,ICSI

	IVF Mean ± SD	ICSI Mean ± SD	P- Value
SDS	۹۷/۶ ± ۳۶/۱	۴۲/۵ ± ۸۰/۲	۰/.۳۳
SDS+EDTA	۱۳۱/۲ ± ۴۵/۹	۴۶/۴ ± ۱۰۸/۰۱	۰/۰۲۳
SDS+DTT(۳۳/.میلی مولار))	۱۲۰/۸ ± ۶۰/۹	۵۹/۴ ± ۹۹/۷	۰/۱۱
SDS+DTT(۶۵/..میلی مولار)	۱۶۱/۴ ± ۸۰	۸۲/۶ ± ۱۳۳/۷	۰/۱۲
SDS+DTT (۱/۲۵ میلی مولار)	۱۹۳/۲ ± ۹۰/۱	۹۶/۹ ± ۱۵۸/۴	۰/۰۹
SDS+DTT(۲/۵ میلی مولار)	۲۱۴/۹ ± ۹۲/۹	۱۰۴/۲ ± ۱۷۲/۷	۰/۰۵۲
SDS+DTT(۵ میلی مولار)	۲۲۳/۹ ± ۹۳/۸	۱۰۹/۷ ± ۱۸۵/۷	۰/۰۸۸
SDS+DTT(۱۰ میلی مولار)	۲۲۹/۴ ± ۹۴/۴	۱۰۸/۶ ± ۱۰۹/۷	۰/۰۸۳
SDS+DTT(۲۰ میلی مولار)	۲۳۲/۲ ± ۹۱/۹	۱۰۸/۹ ± ۱۹۶/۶	۰/۱۰



نمودار(۱): میزان درصد لقاح در بیماران IVF که اسپرم آنها با غلظت‌های متفاوت DTT بیش از ۷۵ ٪ NCD داشته اند

بحث

تحقیقات نشان داده است که ثبات کروماتین در افراد بارور و نابارور متفاوت است. هر چند فوق پایداری یا ناپایداری ممکن است یکی از دلایل ناباروری محسوب گردد[۵،۶،۷] امامطالعات مختلف نشان داده است که بین تست‌های ارزیابی ثبات کروماتین از جمله SDS, SDS+EDTA با درصد لقاح به روش IVF و ICSI و DTT +SDS با درصد لقاح به روش IVF رابطه‌ای وجود ندارد [۸،۱۰،۱۲].ولی آنچه که تا به حال در بیماران ICSI مورد بررسی قرار نگرفته بررسی میزان پیوندهای دی سولفیدی با درصد لقاح می‌باشد.

بنابراین در این مطالعه از غلظت‌های مختلف DTT جهت تعیین

Archive of SID
www.SID.ir

میزان پیوندهای دی سولفیدی استفاده شد و ارتباط بین درصد لقاح و درجات مختلف خروج از تراکم(NCD) توسط غلظت‌های هفت گانه DTT بررسی گردید طبق جدول (۱) مشاهده شد که در دو گروه IVF و ICSI بین لقاح و غلظت‌های DTT رابطه‌ای وجود ندارد. همچنین بین درصد لقاح و تست‌های SDS و EDTA+ SDS نیز در دو گروه IVFو ICSI رابطه‌ای وجود ندارد که این نتایج با مطالعات قبلی مطابقت دارد[۸،۱۰،۱۳] حماده و همکارانش در سال ۲۰۰۱ با استفاده از تست SDS+heparin به این نتیجه رسیدند که بین میزان خروج از تراکم با استفاده از این تست و میزان لقاح در بیماران ICSI رابطه‌ای وجودندارد که این امر مؤید نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر می‌باشد[۱۴].

همچنان که قبلاً ذکر شد حضور Zn در کروماتین اسپرم و همچنین ثبات کروماتین بر روند NCD نقش مهمی دارد. جهت بررسی این امر، از اندازه گیری غلظت فروکتوز سیمن استفاده شد همچنان که در مقدمه ذکر شد چون میزان فروکتوز و HMW دارای منشأ سمینال وزیکل می‌باشند لذا افزایش فروکتوز همراه با افزایش HMW بوده که افزایش HMW باعث کاهش Zn آزاد یا قابل دسترسی کروماتین می‌شود. بنابراین سطح FC و مقدار Zn رابطه معکوسی با هم دارند پس می‌توان به طور غیر مستقیم با اندازه گیری FC میزان Zn موجود در هسته اسپرم را نیز ارزیابی نمود[۷،۱۴].

در این تحقیق مشخص شد که با استفاده از تست SDS، بین میزان ناپایداری کروماتین (TS) و سطح تست‌های فروکتوز در بیماران ICSI رابطه‌ای مشاهده نشد ولی در بیماران IVF رابطه معنی‌دار و مستقیم وجود داشت. (جداول ۲ و ۳) قابل ذکر است که در روش SDS، توتال اسکور (میزان NCD کروماتین) به دست آمده بیانگر تعداد باندهای S-S و غیر کوالانت است در ضمن با توجه به اینکه در بیماران ICSI میزان NCD نسبت به بیماران IVF کمتر است لذا چنین نتیجه گرفته می‌شود که مجموع دو باند دی سولفیدی و غیر کوالانسی در افراد ICSI نسبت به IVF بیشتر می باشد(جدول۵) و عدم وجود رابطه بین سطح فروکتوز و توتال اسکور (میزان NCD) احتمالاً به دلیل زیاد بودن باندهای دی سولفیدی در بیماران ICSI می‌باشد(جدول۳) زیرا در این بیماران به علت کم بودن باندهای غیر کوالانسی و درنتیجه وجود مقادیر کم Zn در کروماتین رابطه‌ای بین تستهای فروکتوز(که شاخصی برای Zn است) و توتال اسکور دیده نشد.

در روش SDS +EDTA بین اسکور توتال و سطح فروکتوز سیمن در دو گروه IVF و ICSI رابطه‌ای دیده نشد (جداول ۳و۲) و این امر بیانگر آن است که با وجود EDTA ،Zn موجود در کروماتین کیلاته شده و لذا بین سطح فروکتوز و توتال اسکور (میزان NCD) رابطه‌ای مشاهده نمی‌شود. اما در بیماران IVF نسبت به بیماران ICSI ضریب همبستگی بین توتال اسکور (SDS +EDTA) با تست‌های فروکتوز بیشتر بوده و این امر موید مطلب فوق می‌باشد که در بیماران IVF مقدار پیوندهای غیرکوالانت نسبت به بیماران ICSI بیشتر است بدین معنا که در بیماران ICSI پیوندهای دی سولفیدی بیشتر می‌باشد.

در روش SDS+DTT در افراد IVF بین اسکور توتال به دست آمده در این روش و سطح فروکتوز رابطه معنی‌دار و مثبت به دست آمد (جدول ۲). در بیماران ICSI نیز بین توتال اسکور (میزان NCD) و CFL و TCFL از غلظت ۱/۲۵ به بعد رابطه معنی‌دار و مستقیمی مشاهده شد. در روش SDS+DTT ، مقدار تورم ایجاد شده (میزان NCD) بستگی به تعداد باندهای S-S دارد لذا با استفاده از DTT و شکسته شدن باندهای دی‌سولفیدی، تورم در سر اسپرم ایجاد می‌شود که میزان این تورم به غلظت DTT استفاده شده بستگی دارد در بیماران IVF ، این رابطه با حداقل غلظت (۰/۳۳ میلی مولار) DTT مشاهده شد در حالی که در بیماران ICSI با استفاده از غلظت‌های بالاتر DTT (۱/۲۵ میلی مولار و بیشتر) ، NCD رخ می‌دهد و توتال اسکور به دست آمده در این غلظت‌ها با سطح فروکتوز رابطه معنی‌داری را نشان می‌دهد و این امر مؤید مطالب قبلی این مطالعه است که در بیماران ICSI تعداد باندهای S-S بیشتر از IVF است و لذا جهت مشاهده ارتباط بین فروکتوز به عنوان شاخصی برای Zn و توتال اسکور نیاز به غلظت‌های بالاتر DTT جهت شکستن باندهای اضافی S-S در بیماران ICSI می‌باشد.

در این تحقیق برای القای NCD (تورم در سر اسپرم) در کلیه

Archive of SID
www.SID.ir

بیماران اعم از روش IVF و ICSI، غلظت‌های مختلف DTT مورد استفاده قرار گرفت. در برخی از بیماران جهت القا بیش از ۹۰٪ NCD در کروماتین اسپرم به غلظت کم (۰/۳۳ تا ۱/۵ میلی مولار) ودر برخی دیگربه غلظت‌های بالای (۱۰ تا ۲۰ میلی مولار) DTT نیاز بود. نتایج به دست آمده موید عدم اختلاف معنی‌دار بین درصد لقاح در این دو گروه می‌باشد(جدول ۴). هر چند سطح فروکتوز بین دو گروه اختلاف معنی‌داری دارند. در روش ICSI نیز تقسیم بندی دو گروه دقیقاً همانند روش IVF انجام شد ومشخص شد که سطح فروکتوز تصحیح شده (CFL) بین دو گروه اختلاف معنی‌داری دارند. این امر بیانگر آن است که فوق پایداری یا ناپایداری تأثیری بر میزان لقاح ندارد هر چند این موضوع می‌تواند ناشی ازاختلاف سطح فروکتوز باشد.

نتیجه گیری

هر چند افزایش سطح فروکتوز باعث ایجاد تورم در کروماتین می‌شود اما بین میزان NCD و درصد لقاح رابطه‌ای وجود ندارد نتایج این تحقیق با فرضیات برخی محققین از جمله Gonzales مغایر است زیرا در فرضیات این محققین احتمال ارتباط بین میزان NCD و درصد لقاح مطرح شده در حالی که نتایج تحقیق حاضر چنین ارتباطی را نقض می‌کند. نتایج این تحقیق را چنین می‌توان توجیه نمود که به دلیل وجود مقادیر زیاد گلوتاتیون در داخل اووسیت باندهای دی‌سولفیدیِ متراکم‌ترین کروماتینِ (کروماتین فوق پایدار) اسپرم را شکسته و تورم (NCD) را در آنها القاء می‌نماید.

سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب شماره ۸۱۲۳۰ دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین موسسه رویان، متخصصین وکارشناسان مرکز باروری و ناباروری اصفهان و مدیریت گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ابراز می‌دارند.

References

1- Balhorn R. ***Mammalian protamines : Structure and molecular interaction. In: Molecular Biology of chromosome Function.*** Adolph, K.W. (ed). Springer, New York 1989: 366 – 395.

2- Calvin HI , and Bedford JM: ***Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis.*** J Reprod Fertil 1971;13(supp1) : 65-75.

3- Arver S. ***Studies on zinc and Calcium in human seminal plasma.*** Acta Physiol Scand 1982; (supp1 507):1-21.

4- Kvist U. ***Importance of spermatozoal zinc as temporary inhibitor of sperm nuclear chromatin deconden sation ability in man.*** Acta physiol scand 1980;109-79.

5- Foresta C, Zorzi M, Rossato M, and VarottoA. ***Sperm nuclear in Stability and staining with aniline blue : abnormal Persistence of histones in Spermatozoa in infertilemen. Int.*** J. Androl 1992 ;15 :330-337.

6- Kjellberg L, Bjorndahl L, and Kvist U. ***Sperm chromatin stability and zinc binding properties in semen from men in barren unious.*** Int J.Androl 1992; 15:103-113.

7- Gonzales GF, Villena A. ***In fluence of low Corrected seminal fructose levels on sperm chromatin stabilite in semen from men attending an infertility service.*** Fertil Steril 1997; 67: 763-68.

8- Huret JL. ***Variability of the chromatin decondensation ability test on human Sperm.*** Arch Androl 1983;11:1-7.

9- Bed ford JM, Bent MJ, and Calvin HJ. ***Variations in the structural character and stability of***

Archive of SID
www.SID.ir

the nuclear chromatin in morphologically normal human spermatozoa. J Reprod Fert 1973; 33: 19-29

10- Liu Dy, Baker Hwj. ***Assessment of nuclear maturity.*** Human Spermatozoa in Assisted Reproduction 1987: 193-203

11- World Health Organization. ***Laboratory manual for the examination of human sperm on sperm – cervical mucus interaction***. 3rd edition. New York, Cambridge University press.1992.

12- Gonzales GF. ***Funtional structure and ultrastructure of seminal vesicles.*** Arch Androl 1989;22:1-13.

13- Hammadeh ME, Al- hasani S, Gaub C, Rosenbaum. P, Georg. T,Diedrich K, Schmidt W. ***Predictive value of chromatin decondensation in vitro on fertilization rate after intracytoplasmic sperm injection(ICSI)***. Int. J. Androl 2001;24:311-316.

14- Gonzales GF, Villena A. ***True corrected seminal fructose level : a better marker of the function of seminal vesicles in infertile men. Int.*** J. Androl 2001 ; 24: 255-260.

Archive of SID

www.SID.ir