مقاله پژوهشی

مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال بیست و ششم/شماره ۸۹/تابستان ۱۳۸۷

بررسی کارایی روش انتخاب اسپرم بر اساس توانایی اتصال آن به اسید هیالورونیک بر نتایج تزریق اسپرم به درون سیتوپلاسم تخمک

فرهاد فتحی*، دکتر شهناز رضوی، دکتر اکبر وحدتی*****،**
دکتر محمدحسین نصر اصفهانی****، مرضیه تولایی*******

*دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.
** دانشیار جنین شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
*** استاد زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.
**** دانشیار گروه آندرولوژی و جنین شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی، پایگاه تحقیقات علوم سلولی اصفهان، مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران.
***** عضو هیئت علمی گروه آندرولوژی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده رویان اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۲/۱۸
تاریخ پذیرش: ۸۶/۶/۲۰

چکیده

مقدمه: پارامترهای مورفولوژی و تحرک، همیشه به منظور انتخاب اسپرم بالغ با DNA سالم برای تزریق اسپرم به درون سیتوپلاسم تخمک (ICSI) کافی نیستند. پیشنهاد شده است که نشانگرهای سطحی اسپرم از قبیل گیرنده‌های اسید هیالورونیک (HA) می‌توانند به منظور انتخاب اسپرم برای ICSI مفید باشند. در این پژوهش مقایسه‌ی کارایی روش انتخاب اسپرم بر اساس توانایی اتصال آن به اسید هیالورونیک با روش معمول ICSI برای هر زوج بررسی گردید.

روش‌ها: نمونه‌های سیمن از ۵۰ زوج در روز تخمک گیری جمع‌آوری و بررسی معمول طبق معیار WHO توسط میکروسکوپ نوری انجام گردید. با قرار دادن اسید هیالورونیک در هر دیش، تخمک‌ها ضمن تقسیم به دو بخش مساوی به طور تصادفی بین دو گروه HA و شاهد درون قطره‌های G-oocyte زیر روغن مینرال، در یک دیش توزیع شدند. گروه شاهد به روش معمول با انتخاب اسپرم دارای حرکت و مورفولوژی مناسب و گروه HA توسط اسپرم‌های متصل به اسید هیالورونیک که از نظر حرکت و مورفولوژی نیز اسپرم‌های مناسبی بودند، به وسیله‌ی پیپت مخصوص تزریق گردیدند. سپس میزان لقاح، درصد کلیواژ، کیفیت جنین، میزان حاملگی و لانه‌گزینی در هر دو گروه با استفاده از نرم افزار SPSS-۱۱/۵ و آزمون t-test بررسی شد.

یافته‌ها: برخلاف درصد لقاح که به طور معنی‌داری در گروه HA نسبت به گروه شاهد بالاتر است (P = ۰/۰۲۰)، درصد کلیواژ و کیفیت جنین بین دو گروه HA و شاهد، در روز دوم و سوم بعد از ICSI و میانگین تعداد جنین‌های انتقال داده شده به هر بیمار، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد درصد کلیواژ روز دوم در گروه HA نسبت به گروه شاهد بالاتر و نزدیک به معنی‌دار شدن بود (P = ۰/۰۶). میزان لانه‌گزینی و حاملگی نیز در گروه HA نسبت به گروه شاهد بالاتر بود ولی معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که انتخاب اسپرم بر اساس توانایی اتصال آن به اسید هیالورونیک می‌تواند نتایج ICSI را بهبود بخشد.

واژگان کلیدی: **اسید هیالورونیک (HA)، باروری، حاملگی، لانه گزینی، تزریق اسپرم به درون سیتوپلاسم تخمک.**

تعداد صفحات: ۱۰
تعداد جدول‌ها: ۲
تعداد نمودارها: ۲
تعداد منابع: ۳۵

آدرس نویسندهٔ مسئول: فرهاد فتحی، دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
E-mail: farhadfathi.370@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

برای موفقیت فرآیند لقاح در محیط آزمایشگاه (invitro) و در محیط طبیعی درون بدن موجود زنده (invivo) اسپرم می‌بایست تمام سدهای طبیعی در اطراف تخمک را طی نماید. به هر حال روش تزریق اسپرم به درون سیتوپلاسم تخمک (ICSI) همه‌ی این سدهای طبیعی را پشت سر می‌گذارد. میزان موفقیت در لقاح با استفاده از این روش به میزان زیادی تحت تأثیر کیفیت اسپرم انتخاب شده برای تزریق قرار می‌گیرد (۳-۱). بررسی معمول سیمن فقط می‌تواند غلظت، تحرک و مورفولوژی اسپرم را تعیین کند و قادر به آشکار نمودن جنبه‌های دیگر عملکرد اسپرم مثل بلوغ هسته، سلامت DNA و توانایی اسپرم در واکنش با تخمک نیست (۷-٤). بنابراین پارامترهای یاد شده به تنهایی برای ارزیابی قدرت باروری اسپرم کافی نمی‌باشند (۸). افزون بر این در برخی از موارد کاهش غلظت، تحرک و مورفولوژی اسپرم می‌تواند منجر به تولید جنین‌های معیوب، کاهش میزان حاملگی و سقط جنین‌ها گردد (۹). از طرفی، در حال حاضر انتخاب اسپرم برای ICSI وابسته به یافتن بهترین اسپرم از لحاظ مورفولوژی و تحرک می‌باشد (۱۱-۱۰)، اما این روش قادر به شناسایی اسپرم هاپلوئید طبیعی یا اسپرمی با ساختار کروماتین و DNA سالم و دست نخورده نیست (۱۳-۱۲). بنابر این یک روش مؤثر برای انتخاب اسپرم طبیعی برای ICSI مورد نیاز است که بر پایه‌ی بلوغ هسته، سیتوپلاسم و غشای اسپرم بنا نهاده شده باشد (۵-٤).

از هنگام معرفی روش‌های کمک باروری (ART) در درمان ناباروری، تست‌های تشخیصی متفاوتی برای ارزیابی عملکرد و بلوغ اسپرم مطرح گردیده که به طور اساسی بر پایه ارزیابی بلوغ هسته، سیتوپلاسم و غشای اسپرم طراحی شده‌اند (۱۵-٦،۱٤). پژوهش‌های فراوانی بر روی نشانگرهای بیوشیمیایی بلوغ و عملکرد اسپرم انجام شده است تا بتوان با استفاده از آنها قدرت باروری اسپرم را مستقل از بررسی معمول پارامترهای سیمن مانند مورفولوژی، غلظت و تحرک اسپرم ارزیابی و پیش‌بینی نمود که نشانگرهای بیوشیمیایی بلوغ اسپرم، تغییر در غشای پلاسمایی اسپرم، حذف زوائد سیتوپلاسمی و بیان HspA2 (پروتئین شوک حرارتی مخصوص بیضه که در طی میوز با کمپلکس سیناپتونمال مرتبط است) از آن جمله می‌باشند (٤،۱٦).

تغییر در غشای پلاسمایی اسپرم، یک روند مرتبط با بلوغ اسپرم است. یک ارتباط وسیع بین تغییرات بلوغی سیتوپلاسم و غشای پلاسمایی اسپرم وجود دارد و این تغییر در غشا، همزمان با از دست رفتن سیتوپلاسم اضافی در اسپرم می‌باشد (۱۷). همچنین ثابت شده است که اسپرم نابالغ همراه با زائده‌ی سیتوپلاسمی قابلیت اتصال به منطقه‌ی شفاف (Zona pellucida) را ندارد، بنابر این گفته می‌شود که پدید آمدن رسپتورهایی برای اتصال به منطقه شفاف (ZP) قسمتی از فرآیند تغییر در ساختار غشاء پلاسمایی اسپرم است (۱۸-۱۷). یکی از پروتئین‌هایی که در این تغییرات در سطح غشاء پلاسمایی اسپرم پدید می‌آید پروتئین PH-20 بوده که یک رسپتور برای اسید هیالورونیک (HA) است (۲۰-۱۹). اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک از راه این گیرنده که بر روی سر اسپرم قرار دارد، انجام می‌شود (۲۱). یکی دیگر از نشانگرهای بیوشیمیایی بلوغ اسپرم، HspA2 می‌باشد. بیان HspA2 در اواخر مرحله‌ی اسپرمیوژنز صورت می‌گیرد که با نقل و انتقال پروتئین‌های اصلی در اسپرم همزمان می‌باشد و برای از دست دادن سیتوپلاسم اضافی و تغییر در

Archive of SID
www.SID.ir

غشای پلاسمایی اسپرم مورد نیاز است. بنابر این باقی ماندن زائده‌ی سیتوپلاسمی و فقدان رسپتورهایی برای اتصال به منطقه‌ی شفاف و اسید هیالورونیک در اسپرم نابالغ، با کاهش بیان HspA2 و پس از آن تغییر نکردن غشای پلاسمایی اسپرم ارتباط مستقیم دارد (۲۲). همچنین سطح پائین بیان HspA2 میزان آنوپلوئیدی کروموزومی را افزایش داده و موجب حضور آپوپتوز و تخریب DNA می‌شود (۶،۱۸،۲۳-۲۴). از این رو اسپرم بالغی که به اسید هیالورونیک متصل می‌شود، تغییر در برخی از گلیکوپروتئین‌های غشاء پلاسمایی آن کامل گردیده و دارای تعداد زیادی رسپتور برای اسید هیالورونیک است و احتمالا سطح بیان کراتین کیناز در آن پائین بوده و دارای مورفولوژی طبیعی می‌باشد، همچنین از نظر سلامت DNA در سطح بالایی قرار داشته و میزان آنوپلوئیدی کروموزومی در آن پایین است (۶،۱۶).

براساس آنچه که از ویژگی‌های اسپرم‌های متصل به اسید هیالورونیک ذکر گردید، ممکن است روش توانایی اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک انتخاب اسپرمی بالغ برای ICSI را تسهیل کند. بنابر این هدف از انجام این پژوهش مقایسه کارایی روش معمول انتخاب اسپرم با روش توانایی اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک بر روی میزان لقاح، کیفیت جنین، حاملگی و لانه‌گزینی در جریان ICSI می‌باشد.

روش‌ها

این پژوهش در کمیسیون علمی و اخلاقی مرکز باروری و ناباروری اصفهان و پژوهشکده‌ی رویان به تصویب رسیده است.

انتخاب بیماران:

زوج‌های نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان جهت انجام عمل ICSI نسبت به کارایی روش انتخاب اسپرم براساس توانایی اتصال آن به اسید هیالورونیک توجیه و آگاه شدند و زوج‌هایی که برای انجام این روش موافق بودند، برگه‌های پذیرش را امضاء نمودند. به تعدادی از همسران زوج‌ها، جنین‌های حاصل از روش HA، به تعدادی دیگر جنین‌های حاصل از روش معمول ICSI و به تعدادی دیگر جنین‌های حاصل از دو روش (HA/ICSI) انتقال داده شد.

نمونه‌گیری و آماده‌سازی اسپرم:

در این پژوهش از نمونه سیمن ۵۰ زوج نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان برای انجام عمل ICSI استفاده شد. نمونه‌های سیمن در روز تخمک گیری، بعد از ۳-۴ روز خودداری زوجین از مقاربت، از بیماران جمع‌آوری شد. بررسی معمول مایع سیمن طبق معیار WHO (۲۵)، با میکروسکوپ نوری انجام گردید. تحرک اسپرم با شمارش ۲۰۰ اسپرم در هر نمونه‌ی اسپرمی ارزیابی شد. تعداد اسپرم با استفاده از دستگاه مکلر چمبر اندازه‌گیری گردید. مورفولوژی اسپرم بر اساس معیار strict criteria سنجیده شد (۲۶). نمونه سیمن با استفاده از گرادیان پیور اسپرم (Nidacon, Gothenburg, Sweden) با غلظت ۴۰:۸۰ برای انجام روش ICSI آماده گردید و در آخر اسپرم‌ها در G-Rinse (Vitrolife, Gothenburg , Sweden) شستشو شدند. برای روش معمول ICSI یا روش HA، تزریق اسپرم ۴۵-۳۰ دقیقه بعد از آماده‌سازی نمونه اسپرمی انجام شد.

Archive of SID
www.SID.ir

آماده‌سازی دیش‌های مورد نیاز جهت انجام ICSI:

در هر دیش قطره‌ای ۵۰ میکرولیتری از اسید هیالورونیک (LEA Derm, France) قرار داده شد. تحت شرایط استریل این قطره‌ها خشک شدند. علاوه بر این قطراتی از محیط کشت G-oocyte (برای قرار دادن تخمک‌ها در آن) و ICSI-100 (محلولی چسبناک برای تسهیل کار بر روی اسپرم) در دیش مورد نظر قرار داده شد. همچنین قطره HA با قطره‌ای ۵۰ میکرولیتری از محیط کشت G-oocyte پوشیده گردید. پس از تحریک و القای تخمک گذاری با داروهای حاوی HCG و FSH، فولیکول‌ها به وسیله‌ی عمل سونوگرافی تخلیه شده، تخمک‌های به دست آمده، در محیط شستشو داده شدند. به تخمک‌ها آنزیم هیالورونیداز اضافه شد تا سلول‌های اطراف تخمک جدا گردند. پس از چندین شستشو، تخمک‌ها ضمن تقسیم به دو بخش تقریباً مساوی به طور تصادفی درون قطره‌های G-oocyte زیر روغن مینرال، در یک دیش HA توزیع شدند. اسپرم‌های شستشو شده به وسیله‌ی گرادیانت‌های Pure Sperm هم به داخل قطره ICSI-100 و هم به داخل قطره HA در دیش انتقال داده شدند. پس از گذشت ۱۰ دقیقه اسپرم‌ها به HA متصل شدند. با استفاده از دستگاه میکرومانیپولار عمل تزریق انجام شد. گروه شاهد به روش معمول با انتخاب اسپرم دارای حرکت و مورفولوژی مناسب و گروه HA به وسیله‌ی اسپرم‌های متصل به اسید هیالورونیک که از نظر حرکت و مورفولوژی نیز اسپرم‌های مناسبی بودند با پیپت مخصوص تزریق گردیدند. بنابر این در این پژوهش از بیمارانی استفاده شده است که تعداد تخمک کافی برای تقسیم بین دو گروه را داشته باشند. پس از تزریق، تخمک‌های هر گروه به طور جداگانه به محیط G.1 منتقل شدند.

۱۸-۱۶ ساعت پس از انجام ICSI، وجود یا عدم وجود لقاح با توجه به تشکیل دو پیش هسته درون تخم ارزیابی شد. درصد لقاح با محاسبه‌ی نسبت تخمک‌های لقاح یافته به تعداد کل تخمک‌های تزریق شده در مرحله متافاز ۲ ضربدر ۱۰۰ در هر گروه ثبت گردید. درصد کلیواژ روز دوم با تقسیم تعداد جنین‌های روز دوم بر تعداد تخمک‌های دارای دو پیش هسته ضربدر ۱۰۰ و درصد کلیواژ روز سوم با تقسیم مجموع جنین‌های بیش از ٤ سلولی روز سوم بر مجموع جنین‌های روز دوم ضربدر ۱۰۰ محاسبه شد. در روز سوم با توجه به کیفیت جنین‌های تشکیل شده در دو گروه، جنین‌های دارای کیفیت بالا برای انتقال به داخل رحم مادران انتخاب شدند.

جنین‌ها از نظر کیفیت به سه گروه A، B و C درجه‌بندی شدند. گروه A بیانگر جنین‌هایی با اندازه‌ی یکسان بلاستومرها و میزان تخریب آنها کم‌تر از ۱۰٪ می‌باشد. گروه B، جنین‌هایی با اندازه یکسان بلاستومرها و تخریب بین ۵۰-۱۰٪ و گروه C، جنین‌هایی با اندازه‌ی نامساوی بلاستومرها و تخریب بیش از ۵۰٪ است. برای تعیین درصد کیفیت جنین، مجموع جنین‌های گروه A و B را بر تعداد کل جنین‌ها تقسیم می‌کنند.

رخداد حاملگی با توجه به تست HCG و وضعیت لانه‌گزینی با توجه به سونوگرافی تعیین گردید. در نهایت نتایج حاملگی و به دنبال آن نتایج لانه‌گزینی در رحم در دو گروه ارزیابی شد و به این منظور، درصد حاملگی با تعداد مواردی از انتقال جنین که منجر به حاملگی شده (جواب آزمایش HCG خون مثبت بوده است) تقسیم بر تعداد کل موارد انتقال جنین، ضربدر ۱۰۰ و درصد لانه‌گزینی با تعداد جنین‌های لانه‌گزینی شده (جواب سونوگرافی مثبت بوده است) تقسیم بر تعداد کل جنین انتقال داده شده ضربدر ۱۰۰ محاسبه شد.

Archive of SID
www.SID.ir

در این پژوهش ۱۵ نفر از گروه HA جنین دریافت کردند، در ضمن ۱۵ نفر به عنوان گروه شاهد و ۲۰ نفر در گروهی که به روش مشترک از HA و شاهد جنین دریافت کردند، مشارکت داشتند.

آنالیز تحلیل آماری:

آنالیز تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS-۱۱/۵ (SPSS Inc. Chicago, IL) و آزمون آماری t–test انجام شد.

یافته‌ها

جدول ۱ میانگین تعداد تخمک‌ها، درصد لقاح، درصد کلیواژ، کیفیت جنین در روز دوم و سوم پس از ICSI و میانگین تعداد جنین‌های انتقال داده شده به هر بیمار در گروه‌های اسید هیالورونیک (HA) و شاهد (Control) را نشان می‌دهد. یافته‌ها در این جدول نشان می‌دهد که میانگین تعداد تخمک‌های اختصاص داده شده به هر یک از گروه‌های HA و شاهد مشابه است و از این لحاظ بین دو گروه هیچ تفاوتی وجود ندارد (P = ۰/٤٦٥). از طرف دیگر، درصد لقاح به طور معنی‌داری در گروه HA نسبت به گروه شاهد بالاتر است (P = ۰/۰۲۰). اگر چه درصد کلیواژ و کیفیت جنین به طور معنی‌داری بین دو گروه HA و شاهد در روز دوم و سوم پس از ICSI متفاوت نبود (P > ۰/۰۵)، اما درصد کلیواژ روز دوم در گروه HA نسبت به گروه شاهد بالاتر بوده و نزدیک به معنی‌دار شدن است (P = ۰/۰٦٦). میانگین تعداد جنین‌های انتقال داده شده به هر بیمار از گروه HA یا شاهد به طور معنی‌داری متفاوت نبود (P = ۰/٥۳۹). تعداد افرادی که از گروه HA جنین دریافت کرده‌اند ۱۵ نفر، تعداد افرادی که از گروه شاهد جنین دریافت کرده‌اند ۱۵ نفر و تعداد افرادی که از گروه HA و شاهد به روش مشترک جنین دریافت کرده‌اند ۲۰ نفر بود. به علاوه میانگین تعداد جنین‌های انتقال داده شده به بیمارانی که از گروه HA جنین دریافت کرده‌اند ۰/۷ ± ۲/۷، در بیمارانی که از گروه شاهد جنین دریافت کرده‌اند ۰/٦۳ ± ۲/٦ و در بیمارانی که از هر دو گروه HA و شاهد جنین دریافت کرده‌اند ۰/٦٥ ± ۳/۳ بود.

جدول ۱. مقایسه‌ی میانگین تعداد تخمک‌ها، درصد باروری، درصد کلیواژ و کیفیت جنین‌ها در روز دوم و سوم بعد از ICSI و نسبت تعداد جنین‌های تشکیل شده به تعداد جنین‌های انتقال داده شده در گروه اسید هیالورونیک (HA) و شاهد

پارامترها	HA انحراف معیار ± میانگین	Control انحراف معیار ± میانگین	P-Value
میانگین تعداد تخمک‌ها	۲/٥۷ ± ٤/۹۸	۲/٤۲ ± ٥/۳٤	۰/٤٦٥
درصد لقاح	۲٦/۰ ± ۷۹/٤	۲۳/٥ ± ٦۷/۷	*۰/۰۲۰
درصد کلیواژ روز دوم	٤/٥ ± ۹۹/٤	۱٥/۸ ± ۹٥/۲	۰/۰٦٦
درصد کلیواژ روز سوم	۲۲/۲ ± ۸۸/۸	۲۰/۸ ± ۸۹/۸	۰/۸۱۷
درصد کیفیت جنین‌های خوب در روز دوم	۹/۲ ± ۹۷/۸	٤/٦ ± ۹۹/٤	۰/۲۷۹
درصد کیفیت جنین‌های خوب در روز سوم	۱٤/۱ ± ۹٦/٤	۸/۷ ± ۹۷/٦	۰/٥۹۷
میانگین تعداد جنین‌های انتقال داده شده به هر بیمار	۰/۷ ± ۲/۷	۰/٦۳ ± ۲/٦	۰/٥۳۹

* ارتباط در سطح ۰/۰٥ معنی دار است.

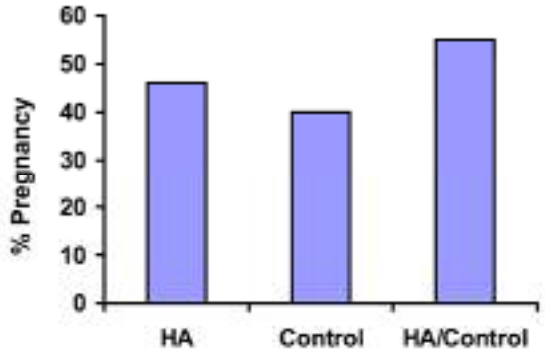
Archive of SID
www.SID.ir

لازم به یادآوری است که در جدول ۲، اتیولوژی ناباروری افراد مورد بررسی در این پژوهش نشان می‌دهد که بین دو گروه تقریباً مشابه می‌باشد.

درصد حاملگی در بیمارانی که از گروه HA، شاهد و یا از هر دو گروه جنین دریافت کرده‌اند، در نمودار ۱ نشان داده شده است. یافته‌ها در این نمودار نشان می‌دهد که میزان حاملگی کلینیکی به ترتیب ٤٦، ٤٠ و ٥٥ درصد، در بیمارانی است که از گروه HA، شاهد و یا از هر دو گروه (HA/ICSI) جنین دریافت کرده‌اند. تفاوت بین آنها در سطح کم‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار نبود.

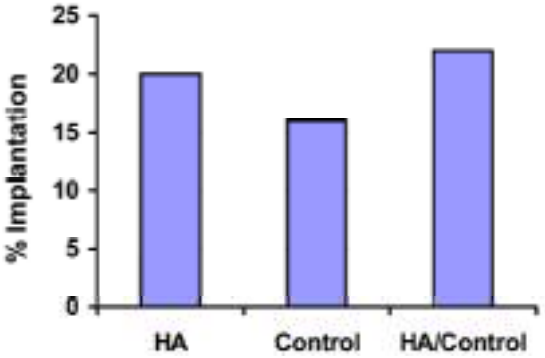
جدول۲. اتیولوژی افراد نابارور کاندیدا ICSI

پارامترها	تعداد گروه ICSI (%)	تعداد گروه HA (%)
سندرم پلی‌کیست تخمدان	۱(٦/٦)	۱(٦/٦)
اندومتریوز	۱(٦/٦)	–
فاکتور Tubal	۳(۲۰)	۳(۲۰)
فاکتور مردانه	٦(٤۰)	٦(٤۰)
فاکتورهای نامشخص	۲(۱۳/۳)	۳(۲۰)
تعداد سیکل‌های قبلی	۲(۱۳/۳)	۲(۱۳/۳)



نمودار ۱. مقایسه‌ی درصد حاملگی بین گروه‌های HA، Control و HA/Control (P>۰/۰۵)

درصد لانه‌گزینی در بیمارانی که از گروه HA، شاهد و یا از هر دو گروه جنین دریافت کرده‌اند در نمودار ۲ نشان داده شده است.



نمودار ۲. مقایسه‌ی درصد لانه‌گزینی بین گروه‌های HA، Control و HA/Control (P>۰/۰۵)

این نمودار نشان می‌دهد که میزان لانه‌گزینی به ترتیب ۲۰، ١٦ و ۲۲ درصد در بیمارانی است که از گروه HA، شاهد و یا از هر دو گروه (HA/ICSI) جنین دریافت کرده‌اند. تفاوت بین این گروه‌ها نیز در سطح کم‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار نبود.

بحث

توسعه و گسترش این روش جدید انتخاب اسپرم بر اساس توانایی اتصال آن به اسید هیالورونیک و بر پایه‌ی تغییراتی است که در طول اسپرماتوژنز در ساختار غشای پلاسمایی اسپرم رخ می‌دهد. این تغییرات شکل‌گیری گیرنده‌ای را برای اتصال به منطقه‌ی شفاف تخمک و اسید هیالورونیک تسهیل می‌کند. به علاوه مشخص شده است که اسپرم بالغ انتخاب شده بر اساس روش توانایی اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک فراوانی کم‌تری از ناهنجاری‌های کروموزومی را در مقایسه با اسپرم انتخاب شده در روش معمول ICSI از خود نشان می‌دهد (۲۷). لذا در این پژوهش اولیه، تصمیم گرفته شد که کارآیی این روش انتخاب اسپرم بر روی نتایج ICSI ارزیابی شود.

در این پژوهش سعی گردید بیمارانی انتخاب شوند که تعداد کافی تخمک جهت توزیع بین دو گروه داشته باشند. همان طوری که جدول ۱ نشان می‌دهد

Archive of SID
www.SID.ir

تعداد تخمک‌های توزیع شده بین دو گروه HA و شاهد تقریباً برابر بوده، تفاوت معنی‌داری در این زمینه مشاهده نمی‌شود. یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که انتخاب اسپرم بر اساس توانایی اتصال آن به اسید هیالورونیک میزان باروری را به طور معنی‌داری بهبود می‌بخشد ولی تأثیر مهم و معنی‌داری بر روی تسهیم (کلیواژ) و کیفیت جنین در روز دوم و سوم پس از ICSI ندارد. از بین پارامترهای اخیر میزان تسهیم در روز دوم نزدیک به معنی‌دار شدن بود. این واقعیت که کیفیت جنین بین دو گروه HA و شاهد تفاوت معنی‌داری ندارد با پژوهش‌های پیشین همسو می‌باشد که پیشنهاد می‌کنند ناهنجاری‌های موجود در DNA پدری، پس از فعال سازی ژنوم و در طول لانه‌گزینی خودش را آشکار می‌سازد (۳۰-۲۸).

پیگیری‌های انجام شده برای کسب اطلاع از نتایج انتقال جنین، میزان حاملگی و لانه‌گزینی بالاتر اما نه معنی‌دار را، در گروه HA در مقایسه با بیمارانی که از گروه شاهد جنین دریافت کرده‌اند نشان می‌دهد. به علاوه میزان حاملگی و لانه‌گزینی در آن دسته از بیمارانی که از هر دو گروه HA و شاهد به روش ترکیبی جنین دریافت کرده‌اند، بالاتر است (نمودار ۱). احتمال می‌رود تفاوت ناچیز و غیر معنی‌دار در این یافته‌ها، می‌تواند به علت تعداد کم بیماران بررسی شده باشد.

به منظور کاهش حاملگی چند قلویی سعی می‌شود تعداد جنین کم‌تر با کیفیت مناسب به درون رحم مادر انتقال داده شود (۳۱) بنابراین یکی از تصمیم‌گیری‌های مهم در مراکز ART تشخیص و انتخاب جنینی است که بالاترین کیفیت را داشته، برای انتقال به درون رحم مناسب باشد (۳۲). لذا در این بررسی میانگین تعداد جنین‌های انتقال داده شده به رحم هر بیمار در هر گروه ارزیابی شد که ارتباط معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده نگردید. در واقع با توزیع یکسان تخمک‌ها بین دو گروه، همچنین با انتقال جنین‌های کمتر، دارای کیفیت بالاتر و با تعداد تقریباً برابر (۲ تا ۳ جنین) شرایط همسانی در گروه‌ها برای بررسی نتایج فراهم شد.

در یک پژوهش منتشر شده به وسیله‌ی Huszar در سال ۲۰۰۷ میلادی به دو گزارش ارائه شده در همایش، بر استفاده از روش انتخاب اسپرم، بر اساس توانایی اتصال آن به اسید هیالورونیک برای ICSI اشاره شده است (۳۳). در یک گزارش برخلاف یافته‌های این پژوهش، آنها تفاوت معنی‌داری در میزان لقاح مشاهده نکردند، درحالی که یک افزایش معنی‌داری در میزان حاملگی را نشان دادند (۳٤). مقایسه‌ی این یافته‌ها با داده‌های ما یک میزان مشابهی از حاملگی را در بیمارانی که از گروه HA (٤٦٪ در مقابل ۵۷/۱٪) و یا از هر دو گروه HA و شاهد به صورت ترکیبی (۵۵٪ در مقابل ۵۷/۱٪) جنین دریافت کرده‌اند را نشان می‌دهد. بنابراین آنها در گروه شاهد میزان حاملگی پایین‌تری داشته‌اند (۲۵٪ در مقابل ٤۰٪) که منجر به تفاوت معنی‌دار در میزان حاملگی بین گروه HA و شاهد شده است.

در گزارشی دیگر که به وسیله‌ی Janssens و همکاران در سال ۲۰۰٦ میلادی انجام شد، آنها یک میزان لقاح بالاتر اما نه معنی‌دار را در گروه HA نسبت به گروه شاهد داشتند (۳۵).

اگرچه Huzsar و دیگر همکارانش فعالیت‌های وسیع و قابل توجهی در این زمینه به خصوص برای تولید دیش‌های مخصوص برای انتخاب

Archive of SID
www.SID.ir

اسپرم بر پایه‌ی توانایی اتصال آن به اسید هیالورونیک تحت عنوان "PICSI" انجام داده‌اند (۶،۱۷،۲۰،۲۲،۲۷،۳۳) اما با توجه به دانش و اطلاع ما، این اولین پژوهشی است که برای مقایسه‌ی روش انتخاب اسپرم بر اساس توانایی اتصال آن به اسید هیالورونیک برای ICSI با روش معمول ICSI منتشر شده است.

به طور کلی از یافته‌های حاصل از این پژوهش می‌توان دریافت که انتخاب اسپرم بر پایه‌ی توانایی اتصال آن به اسید هیالورونیک می‌تواند نتایج ICSI را بهبود بخشد.

تقدیر و تشکر: این مقاله از یافته‌های طرح پژوهشی مصوب پژوهشکده‌ی رویان است و نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسؤولین پژوهشکده‌ی رویان، همکاران بخش فیزیولوژی جانوری دانشکده‌ی علوم دانشگاه اصفهان و متخصصین و پرسنل محترم مرکز باروری و ناباروری اصفهان ابراز می‌دارند.

منابع

1. Foresta C, Rossato M, Garolla A, Ferlin A. Male infertility and ICSI: are there limits? Hum Reprod 1996; 11(11):2347-8.
2. te Velde ER, van Baar AL, van Kooij RJ. Concerns about assisted reproduction. Lancet 1998; 351(9115):1524-5.
3. O'Connell M, McClure N, Lewis SE. Mitochondrial DNA deletions and nuclear DNA fragmentation in testicular and epididymal human sperm. Hum Reprod 2002; 17(6):1565-70.
4. Cayli S, Jakab A, Ovari L, Delpiano E, Celik-Ozenci C, Sakkas D, et al. Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. Reprod Biomed Online 2003; 7(4):462-8.
5. Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir R, Huszar G. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. Mol Hum Reprod 2004; 10(5):365-72.
6. 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 3:1616-24.
7. Liu DY, Baker HW. Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. Fertil Steril 1992; 58(6):1178-84.
8. Ergur AR, Dokras A, Giraldo JL, Habana A, Kovanci E, Huszar G. Sperm maturity and treatment choice of in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection: diminished sperm HspA2 chaperone levels predict IVF failure. Fertil Steril 2002; 77(5):910-8.
9. Edirisinghe WR, Murch A, Junk S, Yovich JL. Cytogenetic abnormalities of unfertilized oocytes generated from in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a double-blind study. Hum Reprod 1997; 12(12):2784-91.
10. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F. Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. N Engl J Med 2001; 345(14):1067-8.
11. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. J Androl 2002; 23(1):1-8.
12. Celik-Ozenci C, Catalanotti J, Jakab A, Aksu C, Ward D, Bray-Ward P, et al. Human sperm maintain their shape following decondensation and denaturation for fluorescent in situ hybridization: shape analysis and objective morphometry. Biol Reprod 2003; 69(4):1347-55.
13. Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Bray-Ward P, et al. Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. Hum Reprod 2004; 19(9):2052-9.
14. Huszar G, Vigue L. Incomplete development of human spermatozoa is associated with increased creatine phosphokinase concentration and abnormal head morphology. Mol Reprod Dev 1993; 34(3):292-8.
15. 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.
16. Huszar G, Corrales M, Vigue L. Correlation between sperm creatine phosphokinase activity and

Archive of SID
www.SID.ir

sperm concentrations in normospermic and oligospermic men. Gamete Res 1988; 19(1):67-75.
17. 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(4):1020-4.
18. 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(1):136-42.
19. 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(3):211-22.
20. 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(4):542-52.
21. Jakab A, Sakkas D, Ozenci CC, Vigue L, Ward D, Bray-Ward P. Selection of sperm low aneuploidy frequencies for ICSI. Hum Reprod 2002; 17(1):100-2.
22. Huszar G, Ozkavukcu S, Jakab A, Celik-Ozenci C, Sati GL, Cayli S. Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. Curr Opin Obstet Gynecol 2006; 18(3):260-7.
23. Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L. Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identifiedas the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. Biol Reprod 2000; 63(3):925-32.
24. Seli E, Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. Hum Reprod Update 2005; 11(4):337-49.
25. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen–Cervical Mucus Interaction. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
26. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. Fertil Steril 1986; 46(6):1118-23.
27. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. Fertil Steril 2005; 84(6):1665-73.
28. 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.
29. Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, et al. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. Reprod Biomed Online 2005; 11(2):198-205.
30. 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.
31. Coetsier T, Dhont M. Avoiding multiple pregnancies in in-vitro fertilization: who's afraid of single embryo transfer? Hum Reprod 1998; 13(1O):2663-4.
32. Vayena E, Rowe PJ, Peterson HB. Assisted reproductive technology in developing countries: why should we care? Fertil Steril 2002; 78(1):13-5.
33. Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci CC, Cayli S, Delpiano E, et al. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. Reprod Biomed Online 2007; 14(5):650-63.
34. Sanchez M, Aran B, Blanco J. Preliminary clinical and FISH results on hyaluronic acid sperm selection to improve ICSI. In: Abstracts of the 21st Annual Meeting of the ESHRE, Copenhagen, Denmark 2005.p.556.
35. Janssens R, Verheyen G, Bocken G. Use of PICSI dishes for sperm selection in clinical ICSI practice: results of a pilot study. In: Abstracts of Annual Meeting of the Belgian Society Reproductive Medicine. 2006.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

Journal of Isfahan Medical School
Vol 26, No 89, Summer 2008

Received: 19.9.2007
Accepted: 12.4.2008

Evaluation of Sperm Selection Procedure Based on its Binding Ability to Hyaluronic Acid on ICSI Outcome

Farhad Fathi MSc*, Shahnaz Razavi MD**, Akbar Vahdati***, Mohamad Hosein Nasr-Esfahani****, Marzieh Tavalaee*****

*Student of MSc, Department of Biology, School of Sciences, Isfahan University, Isfahan, Iran.
**Associate Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
***Professor of Biology, School of Sciences, Isfahan University, Isfahan, Iran.
****Professor, Department of Andrology and Embryology, Reproductive Medicine Research Center, Royan Institute (Isfahan Campus), Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran.
*****Faculty Member of Andrology, Reproductive Medicince Research Center, Royan Institute, Isfahn, Iran.

Abstract

Background: Literature studies have suggested that morphology and motility parameters are not discriminatory value with respect to identification of normal mature sperm with intact DNA during Intra Cytoplasm Sperm Injection (ICSI). Thus, sperm surface markers, such as hyaluronic acid (HA) binding, have proposed to be useful for sperm selection for ICSI. Therefore, during this study the efficiency of HA sperm selection method was compared to routine ICSI procedure.

Methods: Semen samples from 50 couples were collected on the day of oocyte recovery. Semen analysis was carried out according to WHO criteria. For preparation dishes, hyaluronic acid was placed in dish. Denude oocytes were randomly divided to HA and control groups in G-oocyte drops under oil in a dish prepared for ICSI. For HA-ICSI, sperm were selected according to their binding ability to HA and the best morphology and motility. The percentage of fertilization, cleavage rate, embryo quality, implantation and pregnancy rate were compared between two groups with SPSS-11.5 software.

Findings: Unlike percentage fertilization which was significantly higher in the HA group compared to the control group (P = 0.020), cleavage and embryo quality rate in the HA group on the second and third day the mean number of embryos per transfer was not significantly different between the two groups (P = 0.06). However, the cleavage rate in HA group was, close to be significantly higher on the second day (P = 0.066). Implantation and pregnancy rates were also significantly higher in the HA group compared to the control group.

Conclusion: The results of this study suggest that HA sperm selection may improve the ICSI outcome.

Key words: **Hyaluronic acid (HA), Fertilization, Pregnancy, Implantation, Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI).**

Page count: 10
Tables: 2
Figures: 2
References: 35

Address of Correspondence: Farhad Fathi, Student of MSc, Department of Biology, School of Sciences, Isfahan University, Isfahan, Iran.
E-mail: farhadfathi.370@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir