

مقایسه کار آیی دو روش HA binding و Zeta در جداسازی اسپرم‌های بالغ از لحاظ مورفولوژی و ساختار کروماتین طبیعی

محمدرضا دیمه*، دکتر محمد حسین نصر اصفهانی***، دکتر شهناز رضوی****،
دکتر حبیب ا. ناظم*****، مهناز شایسته مقدم*، مرضیه تولایی**

*دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه پیام نور مرکز، تهران.

**عضو هیات علمی پژوهشکده‌ی رویان تهران، گروه آندروولوژی-جنین شناسی.

***دانشیار مرکز باروری و ناباروری اصفهان.

****دانشیار گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.

*****دانشیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور مرکز، تهران.

تاریخ دریافت: ۸۷/۴/۲۹

تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۲/۳

چکیده

در حال حاضر انتخاب اسپرم جهت ICSI بر اساس معیارهای مورفولوژی و تحرک است. اما این پارامترها وجود یا عدم وجود انواع ناهنجاری‌های کروماتین را پیشگویی نمی‌کند. بنابراین وجود روش‌هایی که بتوانند علاوه بر خصوصیات ظاهری، اسپرم‌های با کروماتین طبیعی را جدا کند، ضروری می‌باشد. در این تحقیق کار آیی دو روش جداسازی اسپرم HA-binding و Zeta در جداسازی اسپرم‌های بالغ از نظر میزان ناهنجاری‌های مورفولوژی، کمبود پروتامین و فراگمتاسیون DNA مورد بررسی قرار گرفت.

در این تحقیق از نمونه‌ی سمن ۷۰ زوج نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان استفاده شد. بر روی نمونه‌ی سمن دو روش جداسازی HA-binding و Zeta انجام گرفت و بر روی اسپرم‌های حاصل از دو روش جداسازی، رنگ‌آمیزی پاپانیکولاو (جهت ارزیابی مورفولوژی اسپرم)، رنگ‌آمیزی کرومومایسین A3 (جهت ارزیابی کمبود پروتامین) و تست SCD (جهت ارزیابی میزان فراگمتاسیون DNA) انجام شد. همچنین بر روی حجمی از نمونه به عنوان گروه شاهد، روش‌های مذکور انجام گردید.

اسپرم‌های جدا شده از طریق روش HA-binding و Zeta به طور معنی‌داری کاهش در میزان ناهنجاری‌های مورفولوژی و کمبود پروتامین را نشان دادند ($P < 0/05$). اما تنها روش Zeta میزان فراگمتاسیون DNA را به طور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0/05$).

هر دو روش HA-binding و Zeta می‌توانند اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی و میزان کمبود پروتامین کمتر را جدا کنند. ولی میزان فراگمتاسیون DNA تنها در Zeta به طور معنی‌داری کاهش یافته است. لذا می‌توان در بیمارانی که دارای فراگمتاسیون DNA بالا هستند، از Zeta جهت جداسازی اسپرم‌ها استفاده کرد.

واژگان کلیدی: اسید هیالورونیک، تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرمی (ICSI)، مورفولوژی اسپرم، پروتامین، فراگمتاسیون DNA.

مقدمه:

روش‌ها:

یافته‌ها:

نتیجه‌گیری:

واژگان کلیدی:

تعداد صفحات: ۱۱

تعداد جدول‌ها: ۲

تعداد نمودارها: ۱

تعداد منابع: ۳۱

آدرس نویسنده مسئول:

دکتر محمد حسین نصر اصفهانی، پژوهشکده‌ی رویان، گروه آندروولوژی-جنین‌شناسی، اصفهان، ایران.

E-mail: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

مقدمه

امروزه همراه با گسترش علوم در زمینه‌ی باروری و ناباروری، تکنیک تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم یا ICSI که در آن اسپرم به طور مستقیم به داخل تخمک تزریق می‌گردد، به طور گسترده‌ای جهت درمان ناباروری با علت مردانه به کار می‌رود (۱). در حال حاضر جنین‌شناسان با انتخاب بهترین اسپرم از لحاظ مورفولوژی و تحرک و تزریق آن به داخل تخمک شانس باروری را برای زوج‌های نابارور فراهم می‌سازند (۲). اما با وجود این پیشرفت‌ها نگرانی‌های بسیاری برای تزریق اسپرم‌های حاوی ناهنجاری‌های کروموزومی و یا فراگمتاسیون DNA به داخل تخمک وجود دارد. تحقیقات نشان داده است که مورفولوژی طبیعی اسپرم قادر به پیشگویی وجود یا عدم وجود اختلالات کروموزومی و سلامت DNA در اسپرم نمی‌باشد. بنابراین انتخاب اسپرم بر اساس مورفولوژی و تحرک طبیعی ممکن است شاخص مناسبی جهت انتخاب اسپرم بالغ دارای سلامت DNA و فاقد اختلالات کروموزومی که جهت ICSI استفاده می‌شود، نباشد (۳-۲).

در حال حاضر روش‌های متعددی برای جداسازی اسپرم‌های بالغ و مناسب وجود دارد که از این تکنیک‌ها می‌توان به روش Swim Up، (بر اساس تحرک اسپرم) (۴)، روش Sperm Density Gradient (بر اساس شیب دانسیته) (۵)، روش HA-binding (بر اساس اتصال اسپرم به گیرنده‌های اختصاصی اسید هیالورونیک) (۶) و همچنین روش الکتروفورز (بر اساس بار الکتریکی غشای اسپرم) (۷-۹)، اشاره کرد. یکی از روش‌های انتخاب اسپرم بر اساس خاصیت

اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک توسط گیرنده HA می‌باشد (۶). اسپرم زنده توسط پروتئین PH-20 که روی غشای پلاسمایی آن وجود دارد، به اسید هیالورونیک متصل می‌شود (۱۱-۱۰). بنابراین اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک در محیط آزمایشگاهی شاخص خوبی خواهد بود که وضعیت بلوغ، قابلیت حیات و سلامت آکروزومی اسپرم را که با باروری مردان مرتبط است، نشان می‌دهد (۱۲). مطالعات نشان داده است که اسپرم‌های انتخاب شده توسط گیرنده HA تعداد کمتری از مارکرهای مرگ سلولی (آپوپتوز) و نقص‌های کروموزومی را دارا هستند (۱۳-۱۴).

به تازگی روش Zeta جهت جداسازی اسپرم‌های بالغ و مناسب بر اساس وجود اختلاف بار الکتریکی سطح غشای اسپرم مطرح شده است (۱۵). غشای اسپرم سالم حاوی اختلاف پتانسیل الکتریکی حدود منفی ۱۶ تا منفی ۲۰ میلی‌ولت می‌باشد که اختلاف بار در سطح غشاء، پتانسیل Zeta نام دارد (۱۶). این بار الکتریکی که به دلیل وجود سیالوگلیکوپروتئین‌های فراوان در سطح غشای اسپرم می‌باشد باعث ایجاد یک پتانسیل در اطراف غشای اسپرم می‌شود که پتانسیل Zeta نام دارد (۱۶). در مطالعه‌ای که در این زمینه انجام شده است مشاهده شد که اسپرم‌های انتخاب شده بر اساس شارژ الکتریکی سطح غشای خود، دارای میزان کمتری از هیستون اضافی، فراگمتاسیون DNA و ناهنجاری‌های مورفولوژی می‌باشند (۱۵).

هدف از انجام این مطالعه، مقایسه‌ی کارایی دو روش HA-binding و Zeta در جداسازی اسپرم‌های بالغ از نظر میزان ناهنجاری‌های مورفولوژی، کمبود پروتامین و فراگمتاسیون DNA اسپرم بود.

روش‌ها

در این مطالعه، از باقیمانده‌ی نمونه‌های سمن از ۷۰ زوج نابارور مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان استفاده شد. نمونه‌های سمن، بعد از ۳-۴ روز خودداری زوجین از مقاربت، جمع‌آوری و آنالیز روتین مایع سمن طبق معیار WHO (۱۷)، توسط میکروسکوپ نوری انجام گردید. نمونه‌گیری به روش ساده انجام شد. در این مطالعه نمونه‌هایی که غلظت آنها کمتر از ۵ میلیون اسپرم در میلی‌لیتر و یا حرکت آنها کمتر از ۵٪ بود، از مطالعه حذف گردید.

آماده‌سازی اسپرم

مایع سمن پس از جمع‌آوری، به مدت ده دقیقه با دور ۲۰۰ سانتریفیوژ شد تا رسوبی از اسپرم‌ها تشکیل شود. مایع رویی تخلیه، سپس محلول Ham's+FCS 10% روی رسوب ریخته و پس از پیپت نمودن، محلول به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی تخلیه و با اضافه نمودن محلول Ham's به رسوب، دانسیته‌ی محلول اسپرمی به ۵ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر رسانده شد. سپس نمونه به سه بخش تقسیم شد. بخشی از نمونه به عنوان گروه شاهد و باقیمانده آن جهت انجام روش‌های Zeta و HA binding استفاده شد. ارزیابی مورفولوژی اسپرم توسط رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو بر اساس معیار Strict criteria (۱۸)، کمبود پروتئین توسط رنگ‌آمیزی کرومومایسین A₃ (۱۹) و میزان فراگمتاسیون DNA با استفاده از تست Sperm Chromatin Dispersion (SCD) تعیین گردید (۲۰).

روش HA-binding

با قرار دادن یک قطره اسید هیالورونیک (Biocoat Inc; Fort Washington, PA) روی سطح لام و خشک شدن قطره HA، ۵۰ میکرولیتر از

سوسپانسیون اسپرم روی آن قرار داده می‌شد. پس از ۱۰ دقیقه سطح لام با محیط مناسب (Ham's) به آرامی شسته شد تا اسپرم‌های نچسبیده به اسید هیالورونیک از سطح لام جدا شوند. لام مذکور را در دمای اتاق قرار داده تا خشک گردد. پس از آن بر روی لام‌های آماده شده، تست SCD، رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو و CMA₃ انجام گردید (۶).

روش Zeta

لوله‌ی حاوی محلول اسپرمی با دانسیته‌ی ۵ میلیون در میلی‌لیتر سه مرتبه درون دستکش لاتکس چرخانده و سریع بیرون کشیده می‌شد تا باردار شود و لوله‌ی باردار حاوی نمونه، به مدت یک دقیقه در محیط آزمایشگاه گذاشته شد تا اسپرم‌های بالغ دارای بار منفی به دیواره‌ی لوله بچسبند. پس از سانتریفیوژ نمودن به مدت ۵ دقیقه، اسپرم‌های رسوب یافته به آرامی از ته لوله خارج گردید. سپس توسط Ham's + FCS 10% دیواره‌ی لوله شستشو داده شد تا جدار لوله بدون بار شود و اسپرم‌های چسبیده به دیواره‌ی لوله جدا شوند. اسپرم‌های جدا شده جهت بررسی مورفولوژی، کمبود پروتئین و فراگمتاسیون DNA آماده شدند (۱۵).

ارزیابی کمبود پروتئین (رنگ‌آمیزی کرومومایسین A₃)

پس از اضافه نمودن محلول فیکساتیو کارنوی (متانول و اسید استیک به نسبت ۳ به ۱) به نمونه‌ی اسپرم بر روی لام‌های آماده شده جهت رنگ‌آمیزی، لام‌ها در هوای اتاق قرار داده شد تا خشک شوند. به منظور انجام رنگ‌آمیزی CMA₃، هر لام به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول CMA₃ رنگ‌آمیزی شد (۲۵/۰ گرم بر میلی‌لیتر در بافر مک الوین: ۷ میلی‌لیتر اسید استیک ۰/۱ مولار و ۳۲/۹ میلی‌لیتر از Na₂HPO₄ و 7H₂O و با

فراگمتاسیون DNA (هسته‌ی اسپرم با هاله‌ی کوچک، بدون هاله و سلول اسپرم degrade شده) و بدون فراگمتاسیون DNA (هسته‌ی اسپرم با هاله‌ی بزرگ و هاله‌ی متوسط) تعیین شد، که در مجموع به صورت درصد فراگمتاسیون DNA گزارش گردید (۲۰).

آنالیز آماری

آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری توصیفی، ضریب همبستگی (Correlation Coefficient) و t-test توسط نرم‌افزار (SPSS Inc., Chicago, IL) انجام گرفت و در صورتی که $P < 0/05$ بود، از لحاظ آماری معنی‌دار محسوب شد.

یافته‌ها

جدول ۱ اطلاعات توصیفی حاصل از این مطالعه را نشان می‌دهد. در این مطالعه، نمونه‌هایی که غلظت آنها کمتر از ۵ میلیون اسپرم در میلی‌لیتر و یا حرکت آنها کمتر از ۵٪ بود، از مطالعه حذف گردید. نمودار ۱ کارایی روش‌های Zeta و HA-binding را در جداسازی اسپرم‌ها از نظر میزان کمبود پروتئین، فراگمتاسیون DNA اسپرم و ناهنجاری‌های مورفولوژی، نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهد.

جدول ۱. اطلاعات توصیفی مربوط به پارامترهای اسپرمی، کمبود

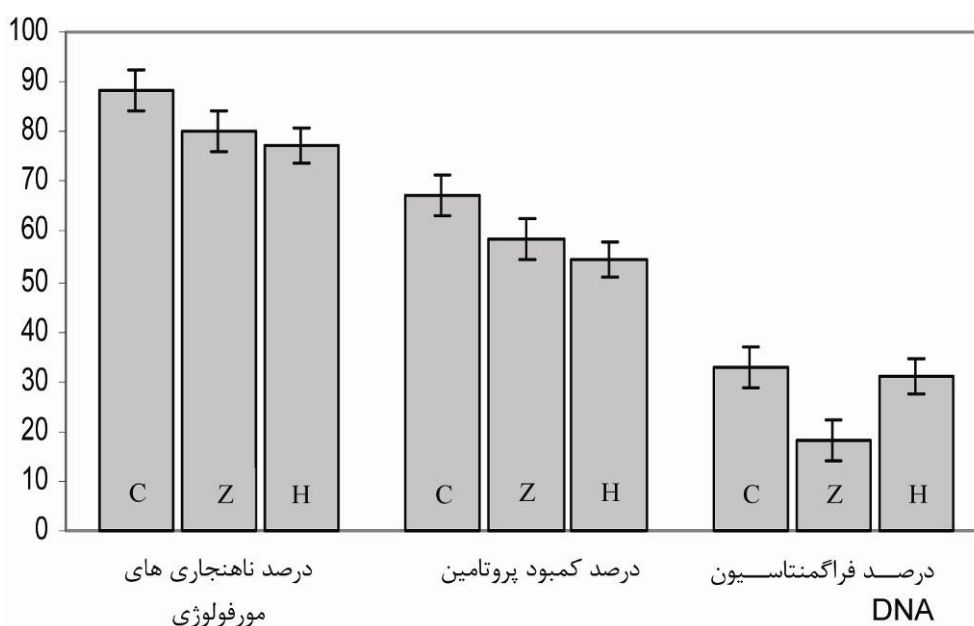
پروتئین و فراگمتاسیون DNA

متغیرها	میانگین \pm انحراف	تعداد	حداقل	حداکثر
غلظت (میلیون/میلی‌لیتر)	$53/68 \pm 32/90$	۷۰	۵/۰۰	۱۸۷/۰۰
حجم نمونه (سی‌سی)	$4/24 \pm 3/07$	۷۰	۱/۰۰	۹/۵۰
درصد تحرک اسپرم	$46/90 \pm 17/46$	۷۰	۵/۰۰	۸۶/۷۰
درصد ناهنجاری‌های مورفولوژی	$88/19 \pm 7/19$	۷۰	۶۴/۰۰	۱۰۰/۰۰
درصد اسپرم‌های مثبت CMA ₃	$67/17 \pm 17/34$	۷۰	۲۱/۰۰	۹۸/۰۰
درصد فراگمتاسیون DNA	$32/87 \pm 8/65$	۷۰	۱۳/۰۰	۶۸/۰۰

غلظت ۰/۲ مولار pH = ۷ حاوی ۱۰ میلی‌مول (MgCl₂) سپس اسلایدها توسط PBS شستشو داده شدند و روی آنها لامل قرار داده شد. با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسسانت Olympus (BX51, Tokyo, Japan) توسط فیلتر ۴۶۰-۴۷۰ در همان روز ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. درصد اسپرم‌های با رنگ زرد درخشان (CMA₃⁺) که دارای کمبود پروتئین هستند و اسپرم‌های با رنگ زرد کم‌رنگ (CMA₃⁻) که دارای محتوای پروتئین طبیعی هستند با استفاده از نرم‌افزار Olysia Bioreport محاسبه گردید (۱۹).

ارزیابی فراگمتاسیون DNA

۷۰ میکرو لیتر از آگاروز (با درجه‌ی ذوب پایین) ۱٪ در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد با ۳۰ میکرو لیتر از نمونه‌ی اسپرمی مخلوط گردید. سپس بر روی لامی که از قبل با آگاروز ۰/۶۵٪ پوشیده شده بود، قرار داده شد. با قرار دادن یک لامل بر روی آن، به مدت ۴ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتیگراد گذاشته شد. در مرحله‌ی بعد با دقت لامل را از سطح لام جدا کرده، هر لام به صورت افقی در محلول اسید کلریدریک ۰/۰۸ نرمال در دمای اتاق و در تاریکی به مدت ۷ دقیقه، قرار داده شد. سپس به مدت ۲۵ دقیقه در محلول لیزکننده قرار گرفت. هر لام با آب مقطر به مدت ۵ دقیقه شسته و به ترتیب در الکل ۷۰٪، ۹۰٪ و ۱۰۰٪ به مدت ۲ دقیقه آب‌گیری گردید و پس از خشک شدن، با محلول رنگ Wright رنگ‌آمیزی و بعد از ۱۰ دقیقه با آب معمولی شستشو داده شد و توسط میکروسکوپ نوری بررسی گردید. با استفاده از این روش می‌توان میزان فراگمتاسیون DNA را به صورت ۵ حالت با توجه به وجود هاله‌ی اطراف هسته و اندازه‌ی آن بررسی نمود. درصد اسپرم‌های با



نمودار ۱. مقایسه‌ی میانگین درصد ناهنجاری مورفولوژی، کمبود پروتئین و فراگمتاسیون DNA در سه گروه شاهد (C) و اسپرم های جدا شده از طریق روش های Zeta (Z) و HA binding (H)

اختلاف بین این دو روش جداسازی کم و از نظر آماری معنی دار نبود ($P > 0/05$).

انجام تست SCD بر روی نمونه‌های به دست آمده از هر دو روش نشان داد که بر خلاف روش HA binding، روش Zeta به طور معنی داری اسپرم‌های با میزان فراگمتاسیون DNA کمتر را نسبت به گروه شاهد جدا کرده است ($P < 0/05$). همچنین اسپرم‌های جدا شده به روش Zeta به طور معنی داری میزان کمتری از فراگمتاسیون DNA را نسبت به اسپرم‌های جدا شده از طریق HA binding داشتند ($P < 0/05$).

جدول ۲ رابطه‌ی بین میزان ناهنجاری‌های مورفولوژی، درصد کمبود پروتئین و درصد فراگمتاسیون DNA را در گروه شاهد نشان می‌دهد. نتایج بیانگر آن است که بین میزان کمبود پروتئین و ناهنجاری‌های مورفولوژی ($P < 0/05$) و همچنین بین میزان کمبود پروتئین و فراگمتاسیون DNA رابطه‌ی معنی دار وجود دارد ($P < 0/05$).

نتایج به دست آمده پس از رنگ‌آمیزی پاپانیکولاو نشان می‌دهد که میزان ناهنجاری‌های مورفولوژی در اسپرم‌های جداسازی شده در هر دو روش نسبت به گروه شاهد به طور معنی داری کاهش یافته است ($P < 0/05$). هر چند اسپرم‌های جدا شده از طریق HA-binding نسبت به اسپرم‌های جدا شده به روش Zeta میزان کمتری از ناهنجاری‌های مورفولوژی را نشان می‌دادند ولی تفاوت بین این دو روش از نظر آماری معنی دار نبود ($P > 0/05$).

همچنین نتایج به دست آمده از رنگ‌آمیزی CMA₃ نشان می‌دهد که اسپرم‌های جدا شده توسط هر دو روش منجر به کاهش معنی داری در درصد اسپرم‌های دارای کمبود پروتئین می‌شود ($P < 0/05$) (نمودار ۱). اگر چه اسپرم‌های جدا شده از طریق HA-binding نسبت به اسپرم‌های جداسازی شده از روش Zeta میزان کمتری از کمبود پروتئین را نشان می‌دادند ولی

جدول ۲. رابطه بین ناهنجاری های مورفولوژی، کمبود پروتامین و فراگمتاسیون DNA اسپرم در گروه شاهد

متغیرها	درصد ناهنجاریهای مورفولوژی اسپرم	درصد اسپرم های CMA3 مثبت	درصد فراگمتاسیون DNA
	r (P-Value)	r (P-Value)	r (P-Value)
درصد ناهنجاریهای مورفولوژی	---	۰/۴۴۱ (۰/۰۱۵)*	۰/۲۰۵ (۰/۳۱۶)
درصد اسپرم های CMA3 مثبت	۰/۴۴۱ (۰/۰۱۵)*	---	۰/۴۰۸ (۰/۰۳۵)*
درصد فراگمتاسیون DNA	۰/۲۰۵ (۰/۳۱۶)	۰/۴۰۸ (۰/۰۳۵)*	---

بحث

وجود نگرانی در رابطه با سلامت اسپرم انتخاب شده برای عمل ICSI باعث شده است که بسیاری از محققان مطالعات خود را بر روی روش های انتخاب اسپرم سالم متمرکز کنند. در این مطالعه دو روش جداسازی Zeta و HA binding از نظر میزان ناهنجاری های مورفولوژی، کمبود پروتامین و فراگمتاسیون DNA اسپرم مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند.

یک اسپرم بالغ در سطح غشای خود دارای منفی ۱۶ تا منفی ۲۰ میلی ولت بار الکتریکی می باشد (۱۶) که این بار الکتریکی در هنگام ظرفیت یابی اسپرم (۲۱-۲۳)، مواجه شدن با مایع فولیکولی و یا آنزیم نورآمینیداز رحمی کاهش می یابد (۲۴). این بار الکتریکی که به دلیل وجود سیالوگلیکوپروتئین های فراوان در سطح غشای اسپرم می باشد باعث ایجاد پتانسیل در اطراف غشای اسپرم می شود که پتانسیل Zeta نام دارد (۱۶). در اپیدیدیم فرم هایی از گلیکوپروتئین های CD-52 و GP 20 که حاوی بار منفی زیادی هستند که از طریق گیرنده های گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول (GPI) به سطح غشای اسپرم متصل می شوند (۲۵). از این رو Chan و همکاران از وجود پتانسیل الکتریکی به وجود آمده در سطح غشای اسپرم استفاده کرده و نشان دادند که اسپرم هایی که بر اساس این وجود پتانسیل Zeta

جدا شوند، حاوی ناهنجاری های مورفولوژی و آسیب DNA کمتر توسط رنگ آمیزی آکریدین اورانژ و عدم وجود هیستون اضافی توسط رنگ آمیزی آنیلین بلو می باشند (۱۵).

در طی اسپرمیوزن، همزمان با تغییرات غشاء که باعث ایجاد گیرنده های خاصی جهت اتصال اسپرم به منطقه ی شفاف تخمک می شود، گیرنده های اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک نیز تشکیل می شوند (۱۱-۱۰). Jakab و همکاران اسپرم ها را بر اساس قدرت اتصالشان به گیرنده ی اختصاصی اسید هیالورونیک، جداسازی کرده و از آن جهت عمل ICSI استفاده نمودند (۶). اسید هیالورونیک یا هیالورونان یک پلی مر خطی دی ساکاریدی است که در دستگاه تناسلی مؤنث، کمپلکس کومولوس اووفوروس و مایع سمن وجود دارد (۲۶). اسپرم زننده توسط پروتئین PH-20 که روی غشای پلاسمایی آن وجود دارد، به اسید هیالورونیک متصل می شود (۱۱-۱۰). در این روش اسپرم از طریق وجود گیرنده ی موجود در سر خود با اسید هیالورونیک اتصال برقرار می کند به طوری که پس از اتصال، دم اسپرم به طور آزادانه حرکت می کند. به علاوه اسپرم های متصل شده به اسید هیالورونیک از نظر مورفولوژی دارای شکل طبیعی می باشند (۱۲). مطالعات نشان داده است که اسپرم های جدا شده از

معنی داری در میزان فراگمتاسیون DNA اسپرم‌ها می‌شود. به دلیل آن که قسمتی از تکامل غشاء در مرحله‌ی بلوغ اپیدیمی طی می‌شود، به نظر می‌رسد که اسپرم‌های فاقد فراگمتاسیون در DNA توانایی و استعداد بیشتری برای طی روند تکامل غشای خود در اپیدیم را دارند. این مسأله نشانگر وجود رابطه‌ی نزدیک بین تکامل ساختار هسته و غشای اسپرم می‌باشد، زیرا روش Zeta اسپرم‌ها را بر اساس شارژ الکتریکی موجود در سطح غشاء که وابسته به وجود گلیکوپروتئین‌های افزوده شده به سطح غشاء در روند تکامل است جدا می‌کند.

همچنین نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که روش HA-binding به طور معنی‌داری باعث جداسازی اسپرم‌های با میزان کمتر ناهنجاری‌های مورفولوژی و کمبود پروتئین نسبت به گروه شاهد می‌شود. هرچند میزان فراگمتاسیون DNA در اسپرم‌های جدا شده کاهش یافته بود ولی این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود (نمودار ۱). میزان بهبود اسپرم‌ها با مورفولوژی طبیعی در روش HA-binding با مطالعات دیگر در این زمینه همخوانی دارد (۲۸-۳۰). در اسپرم‌هایی که بلوغ ناقص دارند، زواید سیتوپلاسمی افزایش یافته است. به علاوه اسپرم‌های نابالغ در فرآیند تغییر وضعیت ساختار (Remodeling) غشاء ناتوان هستند و نمی‌توانند به HA متصل شوند (۳۰). از آن جایی که تشکیل گیرنده برای اسید هیالورونیک در مرحله‌ی اسپرمیوژن رخ می‌دهد، هر گونه نقصی در روند اسپرمیوژن ممکن است باعث عدم تکامل و بلوغ غشای پلاسمایی اسپرم شود و همچنین بسته‌بندی و تراکم کروماتین اسپرم نیز در این مرحله اتفاق می‌افتد و عدم تراکم صحیح کروماتین اسپرم در این مرحله، ممکن است با نقص در تکامل

طریق روش HA-binding واجد خصوصیات یک اسپرم بالغ مانند عدم وجود زواید سیتوپلاسمی (۱۲)، عدم وجود هیستون‌های اضافی و مارکرهای آپوپتوز کمتری (۲۷-۲۶، ۱۳) هستند. همچنین نشان داده شده است که اسپرم‌های جدا شده به روش HA-binding میزان کمتری از فراگمتاسیون DNA و ناهنجاری کروموزومی را از خود نشان می‌دهند (۲۷، ۱۴).

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که روش Zeta نیز به طور معنی‌داری باعث جداسازی اسپرم‌های با میزان کمتر ناهنجاری‌های مورفولوژی، کمبود پروتئین و فراگمتاسیون DNA نسبت به گروه شاهد می‌شود (نمودار ۱). این نتایج با نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی دیگر همخوانی دارد (۱۵). نتایج این مطالعه می‌تواند گویای این حقیقت باشد که اضافه شدن گلیکوپروتئین‌ها بر روی سطح خارجی غشای اسپرم که عامل به وجود آورنده اختلاف الکتریکی و پتانسیل Zeta می‌شود، در مرحله اسپرمیوژن و همچنین در طی بلوغ در اپیدیم رخ می‌دهد و به دلیل این که وجود این پتانسیل Zeta اساس جداسازی اسپرم‌ها در روش Zeta می‌باشد، هر گونه نقصی در روند اسپرمیوژن ممکن است باعث عدم بلوغ ابتدایی غشای پلاسمایی اسپرم شود. به علاوه بسته‌بندی و تراکم کروماتین اسپرم نیز در این مرحله اتفاق می‌افتد و عدم تراکم صحیح کروماتین اسپرم در این مرحله، ممکن است با تغییر در پروتئین‌های سطحی غشای پلاسمایی اسپرم همزمان باشد. بنابراین اسپرم‌های جداسازی شده بر اساس بار الکتریکی سطح غشاء، واجد ناهنجاری‌های مورفولوژی کمتر و محتوای پروتئین طبیعی می‌باشند. همچنین نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که روش Zeta باعث کاهش

مشخص شد که روش Zeta جهت جداسازی اسپرم‌های با DNA سالم کارایی بیشتری دارد. تفاوت موجود در این دو روش ممکن است به دلیل اختلاف در مکانیسم‌های عمل آنها باشد. در روش Zeta اسپرم‌ها بر اساس بار الکتریکی غشاء که ناشی از تمامی گلیکوپروتئین‌های موجود در ساختار غشاء می‌باشد، انتخاب می‌شوند، در حالی که در روش HA-binding اسپرم‌ها بر پایه‌ی وجود گیرنده‌ی اختصاصی اسید هیالورونیک موجود در سطح غشاء جدا می‌شوند.

لازم به ذکر است که هر دو روش محدودیت‌های خاص خود را دارا می‌باشد. جداسازی اسپرم‌ها در هر دو روش باید سریع و قبل از این که دچار ظرفیت‌یابی شوند انجام بگیرد. به علاوه روش HA-binding جهت جدا کردن اسپرم‌هایی که غیر متحرک هستند، کارایی ندارد (۶). همچنین، انجام عمل Zeta روی اسپرم‌هایی که از ناحیه بیضه استخراج می‌گردد کارایی ندارد؛ چرا که این اسپرم‌ها بلوغ خود را کامل نکرده‌اند و میزان بار الکتریکی سطح غشای آنها کم می‌باشد (۱۵). نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که اگر چه HA-binding جهت جداسازی اسپرم‌ها با مورفولوژی و محتوای کمبود پروتئین طبیعی مناسب می‌باشد، اما روش Zeta جهت جداسازی اسپرم‌ها با میزان فراگمتاسیون DNA کمتر بسیار مناسب می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بودجه‌ی این تحقیق توسط پژوهشکده‌ی رویان پرداخت گردید. این تحقیق با همکاری پژوهشکده‌ی رویان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان انجام گرفته است. لذا از کلیه‌ی مسئولین و پرسنل مراکز فوق کمال تشکر و قدردانی را داریم.

پروتئین‌های سطحی و گیرنده‌های غشای پلاسمایی اسپرم همزمان باشد و می‌تواند مؤید این مطلب باشد که اسپرم‌هایی که به اسید هیالورونیک متصل می‌شوند، درصد کمبود پروتئین در آنها کمتر است. هر چند نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که اسپرم‌های جدا شده از طریق HA-binding دارای میزان فراگمتاسیون DNA کمتری می‌باشند، ولی این کاهش نسبت به گروه شاهد از نظر آماری معنی‌دار نبوده، با نتایج به دست آمده قبلی همخوانی ندارد. یکی از دلایل این اختلاف تفاوت در روش‌های مورد استفاده برای ارزیابی فراگمتاسیون DNA اسپرم می‌باشد. در این مطالعه، جهت بررسی میزان فراگمتاسیون از تست SCD استفاده شد ولی در مطالعه‌ی دیگری روش DNA-nick translation جهت بررسی میزان فراگمتاسیون DNA بررسی شده است (۲۷).

بررسی رابطه‌ی بین ناهنجاری‌های مورفولوژی، کمبود پروتئین و فراگمتاسیون DNA در گروه شاهد نشان می‌دهد که مانند سایر مطالعات یک رابطه‌ی مستقیم و معنی‌دار بین میزان کمبود پروتئین و ناهنجاری‌های مورفولوژی وجود دارد. همچنین بین میزان کمبود پروتئین و فراگمتاسیون DNA رابطه‌ی معنی‌دار و مستقیم وجود دارد که نشان می‌دهد جایگزینی پروتئین در ساختار کروماتین که منجر به تراکم و بسته‌بندی صحیح کروماتین اسپرم می‌شود، می‌تواند از ایجاد فراگمتاسیون DNA جلوگیری کند (جدول ۲) (۳۱-۳۰).

مقایسه‌ی نتایج بین این دو روش نشان می‌دهد که اگر چه هر دو روش برای انتخاب اسپرم از نظر ناهنجاری‌های مورفولوژی و کمبود پروتئین مؤثرند، اما با بررسی فراگمتاسیون DNA توسط تست SCD

References

- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340(8810): 17-8.
- 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.
- 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.
- Lopata A, Patullo MJ, Chang A, James B. A method for collecting motile spermatozoa from human semen. *Fertil Steril* 1976; 27(6): 677-84.
- Pousette A, Akerlof E, Rosenborg L, Fredricsson B. Increase in progressive motility and improved morphology of human spermatozoa following their migration through Percoll gradients. *Int J Androl* 1986; 9(1): 1-3.
- 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.
- Kaneko S, Oshio S, Kobayashi T, Iizuka R, Mohri H. Human X- and Y-bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 124(3): 950-5.
- Engelmann U, Krassnigg F, Schatz H, Schill WB. Separation of human X and Y spermatozoa by free-flow electrophoresis. *Gamete Res* 1988; 19(2): 151-60.
- 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.
- 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.
- 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): 542-552.
- 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.
- 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.
- Kovanci E, Kovacs T, Moretti E, Vigue L, Bray-Ward P, Ward DC, et al. FISH assessment of aneuploidy frequencies in mature and immature human spermatozoa classified by the absence or presence of cytoplasmic retention. *Hum Reprod* 2001; 16(6): 1209-17.
- Chan PJ, Jacobson JD, Corselli JU, Patton WC. A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge. *Fertil Steril* 2006; 85(2): 481-6.
- Ishijima SA, Okuno M, Mohri H. Zeta potential of human X- and Y-bearing sperm. *Int J Androl* 1991; 14(5): 340-7.
- World Health Organisation. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4th ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 1999.
- 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.
- 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.
- Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2005; 84(4): 833-42.
- Focarelli R, Rosati F, Terrana B. Sialyglycoconjugates release during in vitro capacitation of human spermatozoa. *J Androl* 1990; 11(2): 97-104.
- Della GC, 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 capacitation. *Mol Reprod Dev* 2001; 60(1): 89-96.
- 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.
- Srivastava PN, Farooqui AA. Studies on neuraminidase activity of the rabbit endometrium. *Biol Reprod* 1980; 22(4): 858-63.
- Rooney IA, Heuser JE, Atkinson JP. GPI-anchored complement regulatory proteins in seminal plasma. An analysis of their physical condition and the mechanisms of their binding to exogenous cells. *J Clin Invest* 1996; 97(7): 1675-86.

26. 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.
27. Sati LG, Ovari L, Demir R, Ward C, Bray-Ward P, Huszar G. Persistent histones in immature sperm are associated with DNA fragmentation and affect paternal contribution of sperm: A study of aniline blue staining, fluorescence in situ hybridization (FISH) and DNA nick translation. *Fertility and Sterility* 2004; 82(2): S52.
28. 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; 25(4): 593-604.
29. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000; 21(1): 33-44.
30. 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.
31. Manicardi GC, Tombacco A, Bizzaro D, Bianchi U, Bianchi PG, Sakkas D. DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem J* 1998; 30(1): 33-9.

Archive of SID

Received: 19.7.2008

Accepted: 21.2.2009

The Comparison of HA Binding and Zeta Methods Efficiency in Selection of Sperm with Normal Morphology and Intact Chromatin

Mohammad Reza Deemeh Msc*, Mohammad Hossein Nasr-Esfahani PhD**, Shahnaz Razavi PhD****, Habib Nazem PhD*, Mahnaz Shayeste Moghadam*, Marziye Tavalae**

*Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran

**Andrology and Embryology Department, Royan Institute, Isfahan, Iran

***Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran .

****Anatomy Department, Faculty of Medicine, Isfahan University, Isfahan, Iran

Background:

Abstract

Sperm selection for ICSI is based on morphology and motility, but these parameters may not relevant chromatin integrity. One of the sperm selection methods for ICSI is based on sperm functional characteristics. This study was designed to compare two sperm selection methods (HA binding and Zeta method) for selection of spermatozoa with normal morphology and intact chromatin.

Methods:

Semen samples of 70 infertile couples referring to Isfahan Fertility and Infertility Center was assessed during this study. Semen analysis was carried out according to WHO criteria. Semen samples divided into 3 groups. A portion of neat semen considered as control group and remained of semen used for Zeta and HA binding procedures. Sperm morphology, protamine deficiency and DNA fragmentation were assessed by Papanicolaou staining, Chromomycin A₃ (CMA₃) staining, and SCD test, respectively in 3 group.

Findings:

Both HA binding assay and Zeta method are efficient to select sperm with normal morphology and lower protamine deficiency ($P < 0.05$). But in term of DNA fragmentation Zeta method appear to be more efficient to select sperm with low DNA fragmentation ($P < 0.05$).

Conclusion:

Our results suggest that these sperm selection methods can select spermatozoa with normal morphology and protamine content for ICSI. But Zeta method may be more efficient to select sperm with low DNA fragmentation. In patient with high DNA fragmentation, Zeta method can be useful to select spermatozoa for ICSI.

Key words:

Hyaluronic acid (HA), Zeta potential, Intra-Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI), Morphology, Protamine deficiency, DNA fragmentation.

Page count:

11

Tables:

2

Figures:

References:

131

Address of Correspondence:

Mohammad Hossein Nasr-Esfahani, MD, Royan Institute, Tehran, Iran.
E-mail: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org