Archive of SID

مقاله تحقیقی

جدا سازی اسپرمهای انسانی حامل کروموزوم XوY به وسیله شیب غلظت Puresperm و ارزیابی آن به روش هیبریدکردن در جا با استفاده از مواد فلورسنت (FISH)

◎ حمید گورابی Ph.D.*، فاطمه آل احمد B.Sc.**، بهمن زینلی Ph.D.**، سعید کاظمی آشتیانی Ph.D.***، حسین بهاروند Ph.D.****

* گروه ژنتیک پژوهشکده رویان

** دانشکده زیست‌شناسی پردیس علوم دانشگاه تهران

*** گروه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان

**** گروه سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان

تاریخ وصول: اسفند ۸۴ ، تاریخ پذیرش: فروردین ۸۵

چکیده

هدف: ارزیابی شیب غلظت ناپیوسته Puresperm در جداسازی اسپرمهای انسانی براساس کرموزوم جنسی به روش دورگ گیری فلورسانس درجا Fluorescent in Situ by Hybridization (FISH).

مواد و روشها: نمونه مایع منی از سه نفر بااسپرموگرام طبیعی از مراجعه کنندگان به پژوهشکده رویان انتخاب شد. هر نمونه به دو بخش تقسیم شد، بخشی از آن (کنترل)با با فرفسفات شسته شد و بخش دیگر برای عبور از شیب غلظت ۸ لایه‌ای از غلظت ۳۵ درصد تا ۸٤ درصد (با اختلاف ۷ درصد بین لایه‌های متوالی) آماده شد. بعد از سانتریفیوژ اسپرم از بالاترین و پایین‌ترین لایه جدا و بر روی اسلاید تثبیت شده و دو رگ‌گیری در جا با استفاده از پروبهای خاص کرموزومهای X و Y انجام گرفت. پروب به نواحی ماهواره‌ای آلفا بر روی سانترومرکروموزوم X یا Y متصل می‌شود.

بیش از ۱۰۰۰ اسپرم برای هر نمونه شمارش و بر حسب وجود سیگنالهای نارنجی و سبز که به ترتیب معرف اسپرمهای حامل کروموزوم‌های X و Y است، طبقه‌بندی شدند. درصد اسپرمهای حامل کروموزوم های X و Y در گروه کنترل و نمونه‌های عبور یافته از شیب غلظتPuresperm با آزمون مجذور کای (Chi Square) مقایسه آماری شدند.

یافته‌ها: اختلاف معنی‌داری در نسبت اسپرمهای حامل X وY بعد از جداسازی در لایه ۸٤ درصد نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. تفاوت درصد اسپرمهای حامل کروموزوم X و Y در لایه ۳۵ درصد نسبت به لایه ۸٤ درصد و گروه کنترل معنی دار بود(به ترتیب P=0.001 و P=0.006) ودرصد اسپرم حامل کروموزوم X درلایه ۸٤ درصد اندکی افزایش یافته بود.

نتیجه‌گیری: اگر چه اسپرمهای حامل کروموزوم Y در لایه ۳۵ درصد به شکل معنی‌داری بیش از کنترل و لایه ۸٤ درصد است اما هنوز نمی‌توان گفت که روش جداسازی اسپرمهای انسانی حامل کروموزوم X و Y توسط شیب غلظت Puresperm روش مناسبی در کلینیک است.

کلید واژه‌ها: کروموزومهای جنسی، اسپرم، FISH ، Puresperm

◎ تهران، پژوهشکده رویان، گروه ژنتیک ناباروری، صندوق پستی ٤٦٤٤-۱۹۳۹۵

E-mail: gourabi@royaninstitute.org

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

پس از شناسایی نقش کروموزومهای جنسی اسپرم در تعیین جنسیت جنین در سال ۱۹۲۰ [۱]. روشهای مختلفی برای تعیین نوع کروموزوم جنسی اسپرم استفاده شده است. روشهای تعیین جنسیت جنین مانند تشخیص ژنتیکی پیش از لانه گزینی ممکن است به سبب محدودیت در تعداد جنینهای با جنسیت مورد نظر به موفقیت نرسند. از آنجائی‌که بیش از ۵۰۰ نوع بیماری وابسته به جنس شناخته شده است، جداسازی اسپرمهای حامل کروموزومهای X و Y در مواردی که مادر ناقل بیماری است، برای جلوگیری از تولد نوزاد پسر حایز اهمیت است. اولین گزارش مبنی بر افزایش تعداد اسپرمهای حامل کروموزوم Y با استفاده از شیب غلظت آلبومین توسط (Ericsson) اعلام شد [۲].

از دیگر روشها ستون سفادکس[1] [۳]، گرادیان ناپیوسته پرکل [٤] و روش swim up [٥] را میتوان نام برد .هیچ یک از این روشها برای جداسازی اسپرم حامل کروموزوم X از Y به موفقیت کامل نرسیده‌اند و در حال حاضر فلوسایتومتری به عنوان تنها روش مناسب برای جداسازی اسپرم براساس کروموزومهای جنسی به کار گرفته می‌شود [٦]، هر چند که این روش به علت استفاده از پرتوی لیزری و رنگ فلورسنت می تواند مضراتی را در بر داشته باشد.

از جمله مشکلات پژوهشهایی که در این زمینه صورت گرفته است، دقت روشهای ارزیابی آنها است که منجر به نتایج ضد و نقیض شده است.

اولین روشی که برای ارزیابی به کار رفته است استفاده از رنگ فلورسنت کوئیناکرین[2] است که بازوی بلند کروموزوم Y را درخشان می‌کند[۷]. نتایج تحقیقات دال بر غیر اختصاصی بودن و غیر مطمئن بودن این روش به سبب اتصال آن علاوه بر کروموزوم Y به سایر کروموزومها است [۸].

پیشرفتهای اخیر در زیست شناسی مولکولی و ساخت پروبهای اختصاصی برای کروموزومهای جنسی فرصت مناسبی برای ارزیابی روشهای جداسازی اسپرم فراهم ساخته است. در روش FISH توالی مکمل رشته DNA به‌وسیله مواد فلورسنت نشان دارشده و پس از اتصال به توالی هدف، محل مربوط روی کروموزوم توسط میکروسکوپ فلورسنت قابل مشاهده و شناسایی است. این روش برای مطالعه آنوپلوئیدی و تعیین کروموزوم جنسی دراسپرم می تواند استفاده قرارگیرد [۹].

با استفاده از این روش مشخص شد که روشهای گرادیان آلبومین [۱۰]، ستون سفارکس[۳] و Swim up [۱۱] نمی‌توانند نسبت اسپرم حامل X به اسپرم حامل Y را به طور معنی داری تغییر دهند. هر چند شیب غلظت ناپیوسته پرکل را در افزایش اسپرم حامل کروموزم X با استفاده از روش FISH موثر ارزیابی کرده‌اند؛ با این حال مقدار افزایش آن به حدی نیست که در موارد کلینیکی مورد استفاده قرار گیرد [۱۲]. پرکل به دلیل سمیت از مصارف پزشکی حذف و موادی چون Ixaprep و Puresperm و... جایگزین آن شده است[۱۳] .

در مطالعه حاضر محلولPuresperm به عنوان ماده ای که در آزمایشگاههای کمک باروری به منظور شستشوی مایع منی و حذف سلولهای مرده و سایر مواد اضافی از اسپرم استفاده می‌شود، برای جداسازی اسپرمهای حامل کروموزوم X و Y استفاده شده است و نتایج آن با استفاده از روش FISH ارزیابی شد.

مواد و روشها

معیارهای انتخاب نمونه

نمونه‌های مورد استفاده در این تحقیق از بین نمونه‌های مراجعین به پژوهشکده رویان که بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی[3] طبیعی تشخیص داده شده بود، انتخاب شد. انجام تحقیق به وسیله شورای اخلاق پژوهشکده مورد

1. Sephadex
2. Quinacrine

3. World Health Organization

www.SID.ir

Archive of SID

تصویب قرار گرفت و از بیماران رضایت نامه کتبی دریافت شد.

هر نمونه به دو بخش تقسیم شد، نیمی از آن بدون هر گونه تیمار پس از شستشوی اولیه با PBS[1] برای روش FISH آماده شد و بخش دیگر آن بعد از عبوراز شیب غلظت ۸ لایه‌ای Puresperm، از بالاترین و پایین‌ترین لایه (به ترتیب ۳۵ و ۸٤ درصد) جداسازی شده و برای انجام روشFISH استفاده شد.

شیب غلظت ناپیوسته Puresperm

Puresperm محلولی ایزو تونیک است که جهت تخلیص و جداسازی اسپرم انسان قبل از روشهای کمک باروری استفاده می‌شود. به وسیله این محلول اسپرمهای با مور فولوژی طبیعی و تحرک بالا جداسازی می‌شوند همچنین سایر سلولهای اپیتلیالی و گلبولهای سفید و سلولهای نابالغ بدین طریق حذف می گردند.

به منظور تهیه شیب غلظت ابتدا محیط کشت Ham' s F10 (Sigma,N6635) حاوی ۱۰ درصد سرم آلبومین انسانی (سازمان انتقال خون ایران)آماده و با Puresperm خالص با درصدهای مورد نظر مخلوط شدند. به عنوان مثال برای تهیه لایه با غلظت ۸٤ درصد به ۸٤۰µl از Puresperm، ۱٦۰ µl محیط کشت سرم دار اضافه شد. به این ترتیب ۸ لایه با غلظتهای ۳۵ تا ۸٤ درصد با اختلاف ۷ درصد بین هر لایه تهیه گردید. در لوله‌ای باانتهای مخروطی (Falcon) یک میلی‌لیتر از هر غلظت از ۸٤٪ تا کمترین غلظت به وسیله پی‌پت پاستور به آرامی اضافه شد و در نهایت ۱ میلی‌لیتر از نمونه اسپرم نیز بر روی بالاترین لایه ریخته شده و با سرعت ۱۵۰۰دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سلولها در حین سانتریفیوژ براساس چگالی و میزان تحرکشان در بین لایه‌های مختلف توزیع شدند. در انتها نمونه مربوط به بالاترین و پایین ترین لایه به آرامی به وسیله پی‌پت پاستور جداسازی شدند.

Puresperm از نمونه بدست آمده از دو لایه، از طریق شستشو با بافر فسفات حذف شد (۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه)، و بر روی رسوب انتهای لوله که حاوی اسپرم است محلول متانول / اسید استیک به نسبت ۳ به۱ ریخته شده و یکنواخت می گردد و بعد از ۲۰ دقیقه نگهداری در دمای ٤- درجه سانتی‌گراد سلولهای معلق در محلول بر روی اسلاید تثبیت شدند. سلولها بر روی اسلاید بایستی به نحوی تثبیت گردندکه حداکثر تعداد را با عدم همپوشانی داشته باشند تا شمارش سلولها بعد از هیبریداسیون به سهولت انجام شود. اسلایدها تا زمان انجام روش FISH در دمای ۲۰ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

مراحل انجام FISH

از تراکم خارج کردن هسته اسپرم[2]

از آنجایی‌که هسته اسپرم بسیار متراکم است به منظور دسترسی پروب به توالی DNA قبل از انجام مراحلFISH، می‌بایست هسته از تراکم خارج شود. به این منظور اسلایدها به مدت ۵ دقیقه در محلولTris 0.1M Hcl (gma,T5941[3] حاوی(Sigma,D9779[4] DTT(0.01M) (PH=8) و سپس در محلول Tris Hcl 0.1M که حاوی (Sigma,D3635)[5] LIS 0.01M و(0.001M) DTT است به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از آن اسلایدها در(PH=7) 2X SSC[6] شسته شده و به ترتیب در سری اتانول ۷۰ و ۸۵ و ۱۰۰ درصد به مدت ۲ تا ۳ دقیقه آبگیری و در دمای اتاق خشک شدند.

1. Phosphate Buffer Saline

2. Nucleuse decondensation
3. Trisma Hydrocholoride
4. Dithiothreitol
5. Lithium Diiodosalisilicacid
6. Standard Sodium Citrate

www.SID.ir

Archive of SID

آماده سازی پروب

پروب DNA (Qbiogene) استفاده شده در این مطالعه مربوط به نواحی ماهواره‌ای آلفا[1] بر روی کروموزوم X و Y است. که به وسیله مواد فلورسنت به ترتیب با رنگهای سبز و نارنجی نشان دار شده‌اند.

مقدار ۱۰µl از کوکتل آماده شده از پروبهایX و Y بر روی سطح اسلاید که از قبل مشخص شده ریخته شد و لامل به آرامی بر روی آن قرار داده شده و بعد از پخش شدن کامل پروب برای جلوگیری از تبخیرپروب در هنگام وا سرشت شدن DNA، لبه‌های لامل به وسیله چسب (Rubber cement) کاملاً پوشانده و مسدود گردید.

واسرشت شدن همزمان[2] و دو رگ گیری

به منظور تک رشته‌ای شدن DNA در هسته اسپرم و همچنین پروب،اسلایدها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد بر روی صفحه فلزی حرارتی قرار داده شدند و نهایتاً در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٤ تا ۵ ساعت انکوبه شد.

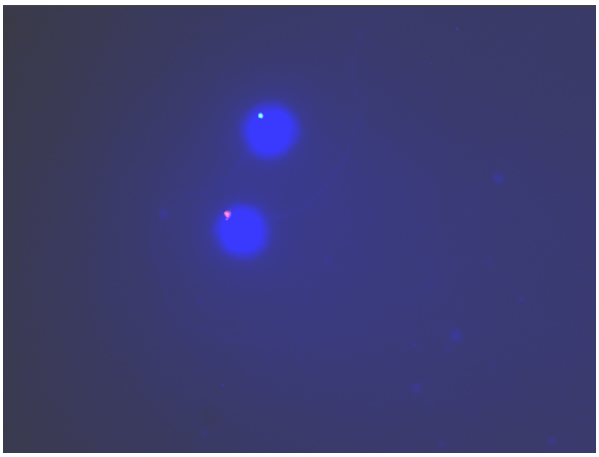
مراحل شستشو بعد از دو رگ گیری

بعد از اتمام زمان هیبریداسیون و برداشتن لامل، اسلاید به آرامی درون محلول حاوی 0.4×SSC/0.3% NP40 با دمای ۷۳ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه قرار داده شدند در نهایت به مدت یک دقیقه در محلول حاویSSC×2/NP40 0.1% دردمای اتاق قرارداده شده و بعد از خشک شدن اسلاید مقدار۷µl محلول- Antifade[3] (Aquarius)DAPI برای رنگ آمیزی زمینه هسته بر روی آن اضافه شد.

ارزیابی اسلاید و شمارش سیگنال

با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Nikon,E8oo,Japan) مجهز به فیلترهای تک باند و سه باند و نرم‌افزار Cytovision کروموزومهای X و Y در اسپرم که به صورت نقاط سبز و نارنجی قابل تشخیص هستند، شمارش شدند. به ازای هر نمونه تعداد بیش از ۱۰۰۰ سلول شمارش شد.

هسته سلولهایی شمارش شد که با یکدیگر همپوشانی نداشته و زیاد متورم نبوده و دارای شکل طبیعی و حاشیه مشخص بودند. اسپرم هاپلوئید طبیعی دارای یک سیگنال نشانگر کروموزوم Y یا یک سیگنال نشانگرکروموزومX است (شکل ۱).



شکل ۱. اسپرم هاپلوئید طبیعی دارای یک سیگنال قرمز (حامل کروموزوم γ) یا یک سیگنال سبز (حامل کرومزوم α)

یافته‌ها

مجموع اسپرم در ۳ نمونه مورد مطالعه شمارش شد. در تمامی موارد بازده دو رگ گیری بیش از ۹۸ درصد بود. نتایج حاصل از شمارش در جدول ۱ خلاصه شده است . درصد اسپرمهای حامل کروموزوم X یا Y در نمونه کنترل با درصد این سلولها در لایه بالا (۳۵ درصد) و لایه پایین (۸٤ درصد) بعد از عبور از شیب غلظت ناپیوسته Puresperm با استفاده از آزمون مجذور کای مقایسه شدند. نسبت بین اسپرمهای حامل کروموزومX به Y در نمونه‌های کنترل و لایه پایین اختلاف

1. Alpha satellite
2. Co denaturation
3. 4, 6-diamidino-2-phenylindole counter stain

www.SID.ir

Archive of SID

معنی داری وجود نداشت (جدول ۲).

درصد اسپرمهای حامل کروموزوم X به‌Y در لایه بالا نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P=0.006) که به صورت اندک افزایش در اسپرم حامل کروموزومY در لایه بالا است.

همچنین نسبت X به Y بعد از عبور از شیب غلظت ناپیوسته Puresperm در لایه بالا نسبت به لایه پایین اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P=0.001) که به صورت افزایش اندک در تعداد اسپرمهای حامل X در لایه پایین و افزایش اسپرمهای حامل Y در لایه بالا است.

جدول ۱. درصد اسپرمهای حامل کروموزوم X و Y در مایع منی قبل و بعد از جداسازی با شیب ناپیوستهٔ Puresperm، ارزیابی شده به وسیلهٔ روش FISH

گروه	تعداد کل اسپرم شمارش شده	تعداد اسپرم با کروموزوم Y(درصد)	تعداد اسپرم با کروموزوم X(درصد)
کنترل	۹۹۱۶	٤٨٤٣ (٤٨/٨٤)	٥٠٧٣ (٥١/١٥)
لایهٔ پایین	٦٧١١	٣٢٢٦ (٤٨/٠٧)	٣٤٨٥ (٥١/٩)
لایهٔ بالا	٧٨٢٢	٣٩٨٣ (٥٠/٩)	٣٨٣٩ (٤٩/٠٧)

جدول۲. نتایج مربوط به مقایسهٔ نسبت X:Yدر نمونهٔ کنترل با لایهٔ بالا و پایین شیب غلظت

نسبت	مقدار P	سطح معنی داری
کنترل/ لایه بالا	۰/۰۰٦	معنی دار
کنترل / لایه پایین	۰/۳۳	بی معنی
لایه بالا /لایه پایین	۰/۰۰۱	معنی دار

بحث

بعد از شناسایی کروموزومهای X و Y در اسپرم [۱] روشهای جداسازی اسپرم حامل کروموزوم X از اسپرم حامل کروموزوم Yحاصل پیشرفت در زمینه‌های کاریوتیپ کروموزومها، لقاح مصنوعی و تداوم قدرت باروری اسپرم در محیط آزمایشگاه، رنگ آمیزی اختصاصی DNA و فلوسایتومتری و تفکیک سلولها است. علاوه بر کاربردهایی که تعیین جنسیت قبل از لقاح در علوم دامپزشکی در بهبود کیفیت حیوانات دامی و به‌دست آوردن جنینهایی با جنسیت مورد نظر دارد، در انسان از کاربردهای اصلی آن به منظور جلوگیری از بیماریهای وابسته به جنس است. دربرخی از این روشها جداسازی براساس خصوصیات فیزیکی و حرکتی اسپرم است و دسته‌ای از روشها مبتنی بر تفاوت در کروموزومهای جنسی و خصوصیات هسته در اسپرم های حاوی کروموزومX و Y است.

آیزوکا (Iizukaiz) و همکاران [۱۵] گزارش کردند که سانتریفیوژ اسپرم انسان در شیب غلظت پرکل منجر به افزایش ۹٤ درصدی در اسپرم حامل کرموزوم X می‌شود. آنها از رنگ فلورسنت کوئینا کرین برای ارزیابی اسپرمهای جداسازی شده استفاده کردند. نتایج مطالعات نشان می‌دهد که این نوع رنگ غیر اختصاصی و غیر مطمئن بوده و علاوه بر اتصال به کروموزومY به طور غیر اختصاصی به سایر کروموزومهای آتوزوم نیز متصل می‌شود [۸].

ونگ (Wang) و همکارانش [۱۲] بیان کردند که استفاده از گرادیان پرکل منجر به افزایش در اسپرمهای حامل کروموزوم X به مقدار اندک می‌شود. آنها برای ارزیابی نتایج جداسازی از روش FISH استفاده کردند. آنها نسبت اسپرم حامل X به Y در لایه پایین پرکل (لایه ۸۰ درصد) را ٤٤/۱ : ٥٥/۱ بیان کردند. از روشهای دیگری چون واکنش زنجیره ای پلی مرازی[1] وکاریوتیپ از طریق نفوذ اسپرم به درون تخمکهامستر نیز برای ارزیابی دقت روشهای جداسازی اسپرم حامل X ازY استفاده شده است، که محدودیتهایی دارند[١٦]. روش FISH به عنوان مطمئن ترین روش برای مطالعه نسبت

1. Polymerase Chain Reaction

www.SID.ir

Archive of SID

جنسی و آنوپلوئیدی در اسپرم انسانی است [۱۷].

در مطالعه حاضر از شیب غلظت ناپیوسته ۸ لایه‌ای Puresperm که محلولی برای آماده سازی اسپرم در آزمایشگاه کمک باروری است استفاده شد. برای تعیین درصد اسپرمهای حاملX و Y بعد از جداسازی، در بالاترین و پایین ترین لایه از روشFISH و پروبهای خاص کروموزوم X و Y استفاده شد. بین نسبت X به Y در نمونه کنترل نسبت به لایه پایین تفاوت معنی دار مشاهده نشد، اما در نمونه کنترل در مقایسه با لایه بالایی تفاوت معنی‌دار از این نظر وجود داشت. همچنین نسبت بین اسپرمهای حاملX به Yدر لایه بالا نسبت به لایه پایین نیز تفاوت معنی‌دار همراه با افزایش تعداد اسپرمهای حامل کروموزوم X داشت. هر چند این اختلاف به اندازه ۹۴درصد افزایش اسپرم حامل X در لایه پایین در شیب غلظت پرکل که توسط آیزوکا گزارش شد، نیست. البته به علت استفاده از کوئیناکرین برای ارزیابی نتایج و غیراختصاصی بودن این روش نتایج آنها قابل استناد نیست [۱٤].

از طرفی بیان شده است که احتمالاً پرکل در عملکرد رنگ کوئیناکرین تداخل ایجاد کرده و منجر به افزایش کاذب در تعداد اسپرم حامل کروموزوم X می‌شود [۸].

با استفاده از PCR کمی[1] لبل(Lobel) و همکارانش تفاوتی در نسبت جنسی اسپرمها مشاهده نکردند. با این حال از جمله محدودیتهای این روش عدم تمایز بین اسپرمهای دیپلوئید ازهاپلوئید است [۱۷].

مشابه ونگ (Wang) و همکاران توهیاما (Tohyama) و همکارانش با استفاده از روش FISH نشان دادند که نسبت اسپرم حامل کروموزوم X در لایهٔ 80 درصد از گرادیان ناپیوستهٔ ۱۲ لایه ای پرکل افزایش یافته است [۱۸]. هرچند میزان این افزایش به حدی نیست که برای تشخیص پیش از لقاح به کار گرفته شود. لین(Lin) و همکاران نیز نظر مشابهی را بیان کردند. به علاوه آنها عنوان کردند که احتمالاً بعد از سانتریفیوژ با پرکل اسپرم حامل X و Y توانایی باروری متفاوتی خواهند یافت و پرکل کاهش قدرت باروری اسپرم حامل کروموزوم Y را سبب می شود. همچنین تخمکهایی که با اسپرمهای حامل X یا Y لقاح می یابد از نظر تکوین و لانه گزینی می توانند متفاوت باشند [۱۹].مطالعات متعددی بیان می کند که جنینهایی که سریعتر به تسهیم می رسند اغلب جنسیت مذکر دارند[۲۰] .

اسامو (Osamu) و همکاران بیان کردند که جداسازی اسپرمهای پر تحرک با استفاده از روش swim-up و شیب غلظت پرکل تغییری در نسبت اسپرمهای حامل X و Y ایجاد نمی‌کند به علاوه با استفاده از روش FISH و با استفاده از ۳ پروب مربوط به کروموزومهای جنسی و کروموزوم آتوزوم نشان دادند که شیب پرکل ۲ لایه ای اسپرمهای حامل کروموزوم X را در حد کم افزایش می دهد و به علاوه اسپرمهای حامل X و Y را در گروه با تحرک بالا و اسپرمهای با تحرک کم مقایسه کردند .٪۸۳ ± ۵۰ اسپرم حامل کروموزوم X در لایهٔ پایین که پرتحرک هستند در مقایسه با .٪٤۹ ± ٤۹/۳ در گروه کنترل) [۲۱].

در نتایج تحقیق حاضر نیز مانند تحقیق فوق تفاوتی در اسپرمهای حامل کروموزوم X و Y در لایه پایین نسبت به کنترل مشاهده نشد.

همچنین فلاهرتی(Flaherty) بیان کرد که آلبومین نمی تواند اسپرمها را بر اساس کروموزومهای جنسی جدا کند هر چند ونگ (Wang) و همکارانش اندکی افزایش در تعداد اسپرمهای حامل کروموزوم X را با این روش گزارش کرده بودند [۱۰و۱۲].

در مطالعه حاضر بین لایه‌های بالا و پایین شیب غلظت افزایش معنی داری در اسپرمهای حامل کروموزوم X مشاهده شد . مکانیسم جداسازی اسپرمهای حامل X و Y توسط شیب غلظت ناپیوسته دقیقاً مشخص نیست. کانکو (Kaneko) و

1. Quantitative PCR

www.SID.ir

Archive of SID

همکاران پیشنهاد کردند کـه جداسـازی اسـپرم توسـط پرکـل براساس تفاوت در سرعت رسوب اسپرم است کـه مـی‌توانـد تحت تاثیر اندازه سر اسپرم وتحـرک آن باشـد [٤]. هـر چنـد واتکینز (Watkins) و همکـاران تفـاوتی در انـدازه قطـر سـر اسپرم در لایه بالا و پایین مشاهده نکردند[۲۲].

از طرفی با استفاده از فلوسیتومتری، نشان داده شده اسـت کـه اسـپرمهای حامـل کرومـوزوم Xدر گـاو دارای حرکـت سریعتر از اسپرم حامل کروموزوم Yاست [۲۳] و با استناد بـه این نظریات کوبایاشی (Kobayashi) و همکاران بیان کردند که تفـاوت در تحـرک اسـپرمهای حامـل کرومـوزوم XوY روی سرعت رسوب آنها تاثیر گذاشـته و جداسـازی بـا اسـتفاده از پرکل را بر این اساس دانسته اند[٢٤].

بر اساس گزارشـهایی کـه اسـپرم حامـل X را دارای سـر بزرگتـر از Y مـی دانـستند [١٤]، محققـان علـت افـزایش اسپرمهای حامل کروموزوم X را چنین توجیه می‌کنند که چون اندازهٔ سر بیشتر از چگالی بر جداسازی اسپرم به‌وسیلهٔ شـیب پرکل نقش دارد، بنابراین اسپرم حامل X با سر بزرگتـر و وزن بیشتر سریعتر رسوب می کند [۱۳] با این حال نتـایج امجـد (Amjad) و همکـــارانش و همچنـــین زالـــتن (Zaltan) و همکارانش نشان داد که تفاوتی در اندازه سـر اسـپرم حامـل کروموزومهای X یا Y وجود ندارد [۲۵ و ۲٦].

هرچند اریکسون (Ericsson) و همکاران افزایش اسپرمهای حامل Y را با استفاده از آلبومین بیان کردند[۲] امـا تحقیقـات مشابه خلاف این را نشان دادند و آنها معتقدند نیاز به بررسـی و آزمایشهای بیشتری در ایـن زمینـه اسـت و ایـن احتمـال را دادند که با استفاده از آلبومین، اسپرمهای حامـل کرومـوزوم Y بیشتر از اسپرم حامل کروموزوم X غیرفعال می شوند[۲۷].

به علاوه سطح اسپرم حامل X را دارای بار منفی بیـشتری می دانند [۲۸] و این احتمال را می دهند که بـرهمکنش بـین سطح اسـپرم و محـیط جداسـازی مـی توانـد بـر جداسـازی اسپـرمهای حـاوی X از Y با استفاده از شیب ناپیوسـتهٔ پـرکل نقش داشته باشد. احتمالاً افزایش معنی دار مـشاهده شـده در اسپرمهای حامل X در لایهٔ پایینی شیب غلظـت Puresperm را نیز میتوان به مکانیسم مشابهی نسبت داد. با این حال نیـاز بـه تحقیقات بیشتر در این زمینه است.

تقدیر و تشکر

این مطالعه طـرح تحقیقـاتی مـصوب پژوهـشکده رویـان بـا شماره ۲-۲٤۱ است. بدین وسیله از کلیه مـسئولین و پرسـنل محترم پژوهشکده رویان که زمینه اجرای این تحقیق را فراهم آوردندکمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. **Painter TS.** Study in mammalian spermatogenesis 2 .The spermatogenesis of man. J Exp Zool 1923; 37:291-321.
2. **Ericsson RJ, Langevin CN, Nishino M.** Isolation of fractions rich in Y spermatozoa . Nature 1973; 246: 421-4.
3. **Vidal F, Morgas M, Catala V, Torello M.J.** Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome:afluorescentin-situ hybridization study. Hum Reprod 1993; 8:1740-43.
4. **Kaneko S, Oshio S, Kobanawa K, Kobayashi T.** Purification of human sperm by a discontinuous percoll density gradient with an inner column .Biol. O. Reprod. 1986;35:1059-63 .
5. **Check JH, Katsoff D.** A prospective study to evaluate the efficacy of modified swim-up preparation for male sex selection. Hum. Reprod 1993; 8 :211-4.
6. **Johnson LA, Welch GR, KeyVanfar K.** Gender pre selection in humans? Flow cytometric separation of X & Y sperm

www.SID.ir

Archive of SID

Reprod 1993; 8: 1733-9.

7. **Pearson PL, Bobrow M.** Fluorescent staining of the Y chromosome in miotic stages of the human male. J Reprod Fertil 1970; 22:177-9.
8. **Van Kooij RJ, Van Oost BA.** Determination of sex ratio of spermatozoa with a deoxyribonucleic acid-probe & quinacaine staining: a comparison, Fertil. Steril 1992; 58: 384-6.
9. **Guttenbach M, Wolfgang E ,Schmid M.** Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitiutional chromosome aberrations .Hum Genet 1997; 100 :1-21.
10. **Flaherty SP, Michalowska J, Swann NJ, Dmowski WP, Matthews CD, AitkenRJ.** Albumin gradients do not enrich Y-bearing human spermatozoa Hum Reprod 1997; 12: 938-42.
11. **Han TL, Flaherty SP, Food JH, Matthews CD.** Detection of X & Y bearing human spermatozoa following motile sperm isolation by swim-up, Fert Steril 1993; 60: 1046-51.
12. **Wang HX, Flaherty SP, Mathews CD, Swann NJ.** Discontinuous percoll gradient enrich X-bearing human spermatozoa: a study using double – label FISH. Hum Reprod 1994; 9: 1265-70.
13. **Svalander P.C., Lundin K., Holmes P.V** Endotoxin level in percoll density gradient media used to prepare sperm for human IVF treatment, Hum Reprod 1995; 10 (abstract for the prevention of X-linked disease. Hum book 2): 130.
14. **Cui KH.** Size differences between human X and Y spermatozoa and prefertilization diagnosis. Mol Hum Reprod 1997; 13: 61-7.
15. **Iizukaiz R, Kaneko S, Aoki R, Kobayashi T** Sexing of human sperm by discontinuous percoll density gradient & its clinical application. Hum Reprod 1987; 2:573-5.
16. **Lobel SM, Pomponio RJ, Mutter Gl.** The sex ratio of normal and manipulated human sperm quantitated by the polymerase chain reaction. Fertil Steril 1993; 59:387-92.
17. **Flaherty SP, Mathews CD.** Application of modern molecular techniques to evaluate sperm sex selection methods. Mol. Hum Reprod 1996; 2: 937-42.
18. **Tohyama Y, Oshio S, Yotsukura M, Umeda T, Mohri H.** Percoll density gradients centrifugation can separate human X-bearing sperm. J Assist Reprod. Genet 1997; 14 (Suppl):194s.
19. **Lin SP, Lee RK, Tsai YJ, Hwa YM, Lhn MH.** Separating X-bearing human spermatozoa through a discontinuous Percoll density gradient proved to be inefficient by double-label fluorescent in situ hybridization. **J Assist Reprod Genet.** 1998; 15: 565-9.
20. **Milki AA, Jun SH, Hinckley M.D, Westphal L.W.** Comparison of the sex ratio with blastocyst transfer and cleavage stage transfer. **J Assist Reprod Genet** 2003; 20(8):323-6.
21. **Osamu S, Miharu N,Okamoto E, Ohama K.** Assessment of sex chromosome ratio and

www.SID.ir

Archive of SID

aneuploidy rate in motile spermatozoa selected by three different methods Hum Reprod 1997; 12: 2437-42.

22. **Watkins AM, Chan PJ, Patton WC.** Sperm kinetics and morphology before and after fractionation on discontinuous Percoll gradient for sex preselection: computerized analyses. Arch Androl 1996; 37(1):1-5.
23. **Penfold LM, Holt C, Holt WV,Welch CR, Cran DG, Johnson LA.** Comparative motility of X and Y chromosome bearing bovine sperm separated on the basis of DNA content by flow sorting . Mol Rep Dev 1998; 50 :323-7.
24. **Kobayashi J, Histoshi O, Hiroshi U, Tetsuya K.** Assesment of bovine X and Y bearing spermatozoa in fractions by discontinuos percoll gradient with rapid FISH. J O Reprod Dev 2004; 50:463-9.
25. **Amjad MH,Sailen B, Pandurancg kulkarni M.** Lack of significant morphological differences between human X and Y spermatozoa and their precursor cells (spermatid) exposed to different prehybridization treatment. J O Androl 2001; 22: 119-23.
26. **Zaltan Z, Celik Ozenci C, Ovari L,Jakab A, Sati JL, Ward DC, Huszar G.** Dimensional assessment of X-bearing and Y-bearing haploid and disomic human sperm with the use of fluorescence in situ hybridization and objective morphometry. Fertil Steril 2006; 85:121-7.
27. **Rose GA, Wong A.** Experiences in Hong Kong with the though & practice of the albumin column method of sperm separation for set selection. Hum Reprod 1998; 13: 146-9.
28. **Kaneko S, Oshio S, Kobayashi T, Lizuka R.** (1984) Human X and Y bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. Biochem Biophys Res Commun 1984; 124 : 950-5.

www.SID.ir