Archive of SID

استفاده از اسپرم‌های تیمار شده با ترکیبات مؤثر بر ساختار کروماتین در روند تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم

عارفه گلستان‌فر[۱]، ابوالفضل شیرازی[۲، ۳، ۴*]، ناصر شمس اسفندآبادی[۵]، ابراهیم احمدی[۳]

۱. دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲. استاد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاه ابن سینا، تهران- ایران.
۳. پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۴. استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۵. دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.

دریافت: ۲۴ بهمن ماه ۹۴ **پذیرش:** ۲۰ تیرماه ۹۵

چکیده

با توجه به میزان پایین اتساع و تراکم‌زدایی کروماتین اسپرم گوسفند در فرآیند تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم به داخل تخمک (ICSI) و متعاقباً کاهش شکل‌گیری پیش‌هسته‌ی (پرونوکلئوس) نر و جنین‌های طبیعی، در پژوهش حاضر تأثیر برخی تیمارهای مؤثر بر روند تراکم‌زدایی اسپرم قبل از تزریق، در شکل‌گیری پیش‌هسته‌ی نر و همچنین میزان فعال‌سازی تخمک در طی روند ICSI بررسی شد. در این پژوهش گروه‌های آزمایشی متشکل از: ۱) تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (گروه کنترل) ۲) تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم تیمار شده با گلوتاتیون و هپارین (گروه GSH+Hep)، ۳) تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم تیمار شده با گلوتاتیون و هپارین به همراه تزریق داخل سیتوپلاسمی گلوتاتیون (گروه GSH+Hep+inj.GSH)، ۴) تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم تیمار شده با گلوتاتیون و هپارین به همراه تزریق داخل سیتوپلاسمی عصاره‌ی اسپرم (SE)، بودند. متعاقب ICSI تخمک‌ها توسط یونومایسین و ۶-دی متیل آمینو پورین (Io+6-DMAP) فعال و پس از ۱۶ ساعت به منظور بررسی شکل‌گیری پیش‌هسته‌ی نر بررسی شدند. نتایج بیانگر بالاتر بودن میزان شکل‌گیری پیش‌هسته‌ی نر در گروه GSH+Hep+inj.GSH در قیاس با سایر گروهاست ($P<0.001$). از حیث میزان فعال‌سازی تخمک نیز، گروه GSH+Hep نسبت به سایر گروه‌ها بیشترین درصد تخمک‌های فعال شده را به خود اختصاص می‌دهد ($P<0.05$). در مجموع تیمار اسپرم با GSH+Hep به همراه تزریق GSH تأثیر به‌سزایی در شکل‌گیری پیش‌هسته‌ی نر در گونه‌ی گوسفند دارد.

واژه‌های کلیدی: اتساع کروماتین اسپرم، فعال‌سازی تخمک، ICSI، گلوتاتیون، عصاره‌ی اسپرم.

مقدمه

روش تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) در تخمک بیشتر به منظور درمان ناباروری‌های مردان استفاده می‌شود. در روند ICSI تنها یک اسپرم به داخل سیتوپلاسم تخمک تزریق می‌شود و با توجه به آنکه موفقیت در آن وابسته به تحرک و مورفولوژی اسپرم نیست، بهترین روش درمانی برای موارد الیگواسپرمی، تراتواسپرمی و استنواسپرمی محسوب می‌شود. در بسیاری از گونه‌ها مانند انسان، خرگوش، همستر و موش روند تزریق اسپرم به تنهایی برای فعال شدن تخمک، باز شدن هسته‌ی اسپرم (decondensation) و شکل‌گیری پیش‌هسته‌ی (pronucleous) نر و ماده کافی است؛ این در حالی است که در برخی گونه‌ها همچون گاو، خوک، بز و گوسفند تزریق اسپرم به تنهایی، حتی با وجود

* پست الکترونیک نویسنده‌ی مسؤول: shiraziabbas@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

فعال‌سازی مصنوعی تخمک، منجر به دکاندنس شدن سر اسپرم و تشکیل پیش‌هسته نر نمی‌شود؛ از این رو پیشنهاد می‌شود چنانچه اسپرم قبل از انجام ICSI در شرایط آزمایشگاهی تحت تأثیر ترکیباتی همانند هپارین، گلوتاتیون (GSH)، دی تیو تریتول (DTT)، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، درماتان سولفات (DS) و غیره قرار گیرد، احتمال تشکیل پیش‌هسته‌ی نر و تلفیق آن با پیش‌هسته‌ی ماده افزایش می‌یابد و امکان تشکیل جنین‌های طبیعی (غیر پارتنوژن) نیز افزایش می‌یابد (۱۴). در شرایط طبیعی طی روند اسپرماتوژنز، به دلیل جایگزینی پروتئین پروتامین با پروتئین هیستون DNA اسپرم و نیز اکسیداسیون گروه‌های تیول (-SH) سیستئین موجود در پروتامین، کروماتین اسپرم به شدت متراکم می‌شود. پس از لقاح، به دلیل مواجهه‌ی کروماتین اسپرم با فاکتورهای احیاکننده موجود در سیتوپلاسم تخمک از جمله گلوتاتیون، اسپرم طی دو مرحله یعنی احیای باندهای دی‌سولفید پروتامین به گروه‌های تیول آزاد و دیگری، جابه‌جایی پروتامین با هیستون، دکاندنس شده و پیش‌هسته‌ی نر شروع به شکل‌گیری می‌کند (۱۳). از سوی دیگر در هنگام تخمک‌گذاری بالا بودن مقادیر فکتور محرک بلوغ (MPF) و فاکتور سیتواستاتیک (CSF) موجب توقف تخمک در مرحله متافاز II از تقسیمات هسته می‌شود؛ ایجاد سیگنال‌های کلسیمی به دنبال نفوذ اسپرم موجب فعال‌سازی پروتئین کینازهایی می‌شود که این آنزیم‌ها با فسفوریلاسیون، MPF و CSF آن‌ها را غیرفعال کرده و موجبات از سرگیری تقسیم میوزی و فعال شدن تخمک را فراهم می‌کنند (۱۶). در روند ICSI فعال نشدن تخمک متعاقب انجام ICSI یکی از دلایل اصلی عدم موفقیت در لقاح محسوب می‌گردد. به این منظور برای بهبود روند لقاح، از روش‌های الکتریکی، مکانیکی یا شیمیایی مثل کلسیم‌یونوفر، اتانول، یونومایسین، ۶ دی متیل آمینو پورین (6-DMAP) به منظور فعال‌سازی تخمک استفاده می‌شود (۱۵). مشکل استفاده از چنین ترکیبات شیمیایی ایجاد جنین‌های پارتنوژن است که به طرز چشم‌گیری میزان تولید جنین طبیعی را کاهش می‌دهد. هدف این پژوهش کمک به تشکیل بهتر و مناسب‌تر پیش‌هسته‌ی نر و نیز فعال‌سازی (activation) تخمک با تزریق اسپرم‌های دکاندنس شده در شرایط آزمایشگاهی و متعاقباً کاهش میزان تولید جنین‌های پارتنوژن است.

مواد و روش کار

در این مطالعه تخمدان‌ها از گوسفندان کشتار شده اخذ و پس از شست وشو در سرم فیزیولوژی حاوی آنتی‌بیوتیک در دمای ۳۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه انتقال داده می‌شدند؛ سپس فولیکول‌های ۶-۲ میلی‌متری آسپیره می‌شدند. بعد از شست‌وشو، تخمک‌های جدا شده به محیط بلوغ شامل B-TCM حاوی ۱۰ درصد FCS و ۰/۱ واحد در میلی‌لیتر FSH انتقال داده می‌شدند و سپس به منظور طی شدن روند بلوغ به مدت ۲۲ ساعت درانکوباتور قرار می‌گرفتند.

تخمک‌های کشتارگاهی پس از طی بلوغ آزمایشگاهی به صورت تصادفی در چهار گروه آزمایشی توزیع شدند. ۱. تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (گروه کنترل) ۲. تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم تیمار شده با گلوتاتیون و هپارین (گروه GSH+Hep)، ۳. تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم تیمار شده با گلوتاتیون و هپارین به همراه تزریق داخل سیتوپلاسمی گلوتاتیون (گروه GSH+Hep+inj.GSH)، ۴. تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم تیمار شده با گلوتاتیون و هپارین به همراه تزریق داخل سیتوپلاسمی عصاره‌ی اسپرم (SE).

به منظور آماده‌سازی اسپرم، از شیب غلظتی پرکل ٪۹۰ و پرکل ٪۴۰ استفاده شد؛ به این منظور پس از ذوب اسپرم منجمد، اسپرم به آرامی و با شیبی ملایم روی دو غلظت پرکل ۴۰ و ۹۰ درصد تخلیه و سپس به مدت ۷ دقیقه با دور g۷۰۰-۸۰۰ سانتریفوژ شد. پس از اتمام

www.SID.ir

Archive of SID

سانتریفیوژ و تخلیه‌ی روشناور به منظور پاکسازی اسپرم از پرکل از سانتریفیوژ اسپرم در محیط HTCM استفاده گردید. پس از تخلیه روشناور، ۱۰μl از سوسپانسیون اسپرم به دست آمده به هر یک از گروه‌های آزمایشی مورد نظر اضافه می‌شد.

۲۲ ساعت پس از قرارگیری تخمک‌ها در محیط IVM، به منظور برداشت سلول‌های کومولوس، تخمک‌ها به میکروتیوبی حاوی ۳۰۰ $\mu g/ml$ آنزیم هیالورونیداز منتقل و حدود ۵ دقیقه ورتکس می‌شدند. این عمل موجب برهنه شدن کامل تخمک ها از سلول‌های کومولوس می‌شد و سپس تخمک‌های برهنه شده پس از چند بار شستوشو در محیط HTCM، تا زمان انجام ICSI در محیط IVM قرار داده می‌شدند.

پس از شستوشو و آماده‌سازی اسپرم به منظور تراکم‌زدایی کروماتین، میزان ۱۰μl از اسپرم به میکروتیوب حاوی محیط Hep+GSH اضافه شده و میکروتیوب در انکوباتور حاوی ۵٪ CO2 و دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت قرار می‌گرفت.

مراحل زیر به منظور آماده‌سازی محیط Hep+GSH انجام شد:

۱- استوک هپارین (Hep) (۱۰x): ۸۰ میکرومولار (۰/۰۰۰۶۲۵ گرم هپارین در ۱۲۵ میکرولیتر بافر تریس) (۳).

۲- استوک گلوتاتیون (GSH) (۱۰x): ۱۵ میلی‌مولار (۰/۰۰۵۷۵ گرم گلوتاتیون در ۱۲۵ میکرولیتر بافر تریس) (۳).

سپس گروه پایه‌ی مورد آزمایش نیز به شیوه‌ی زیر آماده شد:

Hep+GSH: ۱۲/۵μl از استوک هپارین + ۱۲/۵μl استوک گلوتاتیون + ۹۰μl بافر تریس

به منظور تهیه‌ی عصاره‌ی اسپرم از روش Perry و همکاران- در سال ۱۹۹۹ (تحت عنوان protocol Core)- استفاده شد (۱۲). مراحل مختلف روش یاد شده به اختصار به شرح زیر است:

۱- ابتدا اسپرم مورد نظر (اسپرم منجمد و سپس ذوب شده) در محیط جداسازی هسته (nuclear isolation medium) سه مرتبه، شسته شد (هر بار ۳ دقیقه در ۱۵۰۰g). ادامه مراحل باید در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شوند.

۲- اضافه کردن ۰/۱٪ -۰/۰۵٪ از X-100 Triton به اسپرم با هدف آسیب شدید به غشای اسپرم.

۳- سونیکاسیون ترکیب اسپرم و تریتون در دستگاه سونیکاتور (FAPAN ultrasound Prob-400R)؛ به این ترتیب که پس از استقرار الکترود دستگاه در میکروتیوب حاوی اسپرم و تریتون، محتویات تحت تأثیر سه ارتعاش، هر کدام به مدت ۱۰ ثانیه (با خروجی ۶۰٪) قرار گرفتند. در این روش ۹۹/۹٪ اسپرماتوزوئیدها، دم خود را از دست می‌دهند و غشای اطراف سر اسپرم نیز نابود می‌شود.

۴- به منظور رسوب قطعات اسپرم (سر و دم)، پس از سونیکاسیون، میکروتیوب حاوی اجزای اسپرمی و تریتون به مدت ۳ دقیقه با دور ۲۰۰۰۰ g و در دمای ۲ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. پس از تخلیه‌ی روشناور به منظور شستوشوی بیشتر، این بار محیط NIM به رسوب حاصل اضافه و در طی دو مرحله به مدت ۶ و ۲۵ دقیقه در ۲۰۰۰۰g سانتریفیوژ شد.

۵- در گام بعد به منظور محلول ساختن SOAF موجود در تکای اطراف هسته، محیط NIM حاوی DTT ۱۵mM به رسوب به دست آمده اضافه شد تا در پایان غلظت $2\text{-}5\times10^{6}$Sperm/100µl به دست آید، سپس به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۲۷-۳۵°c انکوبه شد.

۶- پس از انکوباسیون، به منظور رسوب اجزای اسپرم و جدایی SOAF از آن‌ها، میکروتیوب حاوی اسپرم و NIM/DTT بار دیگر در دمای ۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۸۰-۵۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰۰g سانتریفیوژ شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

۷- با پایان سانتریفیوژ، روشناور که اکنون حاوی SOAF است به میکروتیوب دیگری منتقل و سپس به بخش‌های ۲۰μl تقسیم و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری می‌شد.

انجام تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) در درون پلیت ۶ سانتی‌متری و محیط H-TCM حاوی ۱۰ درصد سرم و در زیر روغن پارافین استریل مطابق روش ارائه شده در مطالعه شیرازی و همکاران در سال ۲۰۱۱ صورت گرفت (۱۴). به طور خلاصه بسته به قطر سر اسپرم با سوزن‌های تزریق با قطر داخلی بین ۶ الی ۱۲ میکرون، اسپرم با حداقل مدیا (کمتر از ۵ پیکو لیتر) در وضعیت ساعت ۳ به داخل تخمک تزریق می‌شد (جسم قطبی در وضعیت ساعت ۶ و یا ۱۲). در موارد تزریق هم‌زمان گلوتاتیون و یا عصاره‌ی اسپرم (SE)، حدود 5pl (تقریباً به اندازه‌ی یک طول اسپرم در نیدل تزریق) از محلول آماده شده به داخل تخمک‌های مذکور تزریق شد.

به منظور فعال‌سازی تخمک‌ها پس از ICSI، تخمک‌ها به مدت ۵ دقیقه در معرض محیط H-SOF حاوی ۵ میکرومول یونومایسین و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی-لیتر BSA قرار گرفتند و سپس به منظور شست‌وشوی یونومایسین در محیطی حاوی ۳۰ میلی گرم در میلی لیتر BSA به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند. بعد از دو مرتبه شست‌وشو در محیط H-TCM حاوی ۱۰ درصد سرم به منظور دفع دومین جسم قطبی، تخمک‌ها به مدت سه ساعت در محیط IVF–SOF حاوی ۱۰ درصد سرم گوسفندی serum قرار داده شدند؛ آن‌گاه به منظور تحریک ازسرگیری میوز، به مدت ۲ ساعت نیز در معرض محیط IVC-SOF حاوی ۲ میلی مول 6-DMAP قرار گرفتند؛ پس از آن، تخمک‌ها مجدداً شست‌وشو داده شده و به قطره‌های IVC منتقل شدند.

پس از فعال‌سازی تخمک‌ها، زیگوت‌ها به منظور ارزیابی تشکیل پیش هسته نر در محیط IVC-SOF کشت داده شدند و ۱۶ ساعت پس از ICSI به منظور مشاهده‌ی پیش‌هسته‌ی نر زیگوت‌ها ابتدا به مدت ده دقیقه در اتانول حاوی ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر Hoescht و روی یخ در مکان تاریک قرار داده شده و سپس به قطره‌ی گلیسرول روی لام منتقل می‌شدند، پس از استقرار لامل بر روی لام با فشار دادن لامل، زیگوت‌ها بین لام و لامل ثابت شده و سپس با میکروسکوپ فلورسنت ارزیابی می‌شدند.

برای ارزیابی آماری اختلافات مشاهده شده میان گروه‌های تحت بررسی، از آزمون آماری One way ANOVA و Chi- square استفاده شد. در صورت مشاهده اختلاف بین گروه‌ها با P<۰/۰۵، این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار محسوب می‌شد. در این تجزیه و تحلیل از نرم‌افزار Sigma STAT استفاده گردید.

نتایج

در مطالعه‌ی حاضر به منظور ترغیب روند شکل‌گیری پرونوکلئوس نر و نیز جنین‌های حقیقی متعاقب انجام ICSI از ۴ گروه درمانی (همان‌طور که در مبحث قبل توضیح داده شده است) استفاده گردید.

علی‌رغم استفاده از 6DMAP+IO به منظور فعالسازی تخمک‌ها در تمامی گروه‌ها، برخی از تخمک‌ها فعال نشده و همچنان در مرحله‌ی متافاز میوز دوم باقی می‌ماندند (تخمک‌های غیرفعال شده). تخمک‌هایی که روند فعال‌سازی را طی کرده بودند (تخمک‌های فعال شده)، نیز دربردارنده‌ی دو زیرگروه بودند:

۱. تخمک‌هایی که از مرحله‌ی متافاز خارج شده و در مرحله‌ی آنافاز-تلوفاز بودند و یا پرونوکلئوس ماده در آن‌ها شکل گرفته بود؛ لیکن فاقد پرونوکلئوس نر بودند (یک توده کروماتینی).

۲. تخمک‌هایی با دو توده‌ی کروماتینی که حاوی هر دو پرونوکلئوس نر و ماده بوده و یا اینکه پرونوکلئوس‌ها متراکم شده و به نوکلئوس تبدیل شده‌اند.

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود میزان

www.SID.ir

Archive of SID

فعال‌سازی تخمک تنها در گروه GSH+Hep (۹۲/۲ درصد) به شکل معنی‌داری بیشتر از سایر گروهاست. لیکن میزان شکل‌گیری پرونوکلئوس نر در گروه GSH+Hep+inj.GSH (۶۱/۹ درصد) به شکل معنی‌داری بالاتر از سایر گروه‌ها بود.

جدول ۱– تأثیر تیمار اسپرم با گلوتاتیون در گروه‌های مرتبط بر میزان شکل‌گیری پرونوکلئوس نر در روند ICSI

گروه آزمایشی	تعداد تخمک	تعداد تخمک فعال نشده (درصد)	تعداد تخمک فعال شده (درصد)		
			۱ توده کروماتینی (PN, Ana)	۲ توده کروماتینی (PN, nucleous)	کل تخمک‌های فعال شده
کنترل	۶۲	۱۴(۲۱/۳)	۳۲	۱۶(۲۶/۲± ۵/۷)[a]	۴۸(۷۸/۶± ۸/۸)[a]
GSH+Hep	۶۴	۵(۷/۸)	۴۰	۱۹(۳۱/۱± ۴)[a]	۵۹(۹۳±۳)[b]
GSH+Hep+ inj.GSH	۸۴	۱۸(۲۱/۴)	۱۴	۵۲(۵۵/۹± ۱۱/۸)[b]	۶۶(۷۴/۴± ۸/۹)[a]
GSH+Hep+ inj.SE	۵۵	۱۳(۲۳/۶)	۲۸	[a]۱۴(۲۵/۲±۷)	۴۲(۷۶/۲± ۷/۵)[a]

[a] و [b]، بیانگر اختلاف معنی‌دار میان اعداد یک ستون هستند (P<۰/۰۵).

بحث

با توجه به عدم اتساع کامل کروماتین اسپرم در گونه‌هایی همچون گاو، گوسفند و خوک، طی روند ICSI (۴)، در پژوهش‌های مختلف سعی بر آن است تا به کمک روش‌هایی مانند مجاورت اسپرم با درجنت‌های مختلف، امواج اولتراسوند (sonication) و غیره که می‌توانند تخریب غشای اسپرم را در پی داشته باشند و یا استفاده از ترکیبات احیاکننده‌ای همچون DTT، GSH و ... به منظور تراکم‌زدایی کروماتین اسپرم، روند تولید پرونوکلئوس نر و سایر مراحل رشد و تقسیمات جنینی را بهبود بخشند (۱۳). احتمالاً روش‌های یاد شده به شکل مؤثرتری دسترسی تخمک به فاکتور فعال‌کننده‌ی تخمک در اسپرم (SOAF) را نیز، افزایش می‌دهند که این مسأله خود در بهبود نوسانات‌کلسیمی در تخمک و فعال‌سازی آن اهمیت بسیاری دارد (۹).

در مطالعه‌ی حاضر نیز به منظور القای تراکم‌زدایی و اتساع (دکاندس) کروماتین اسپرم از یک گروه درمانی اصلی و پایه (گلوتاتیون و هپارین (GSH + Hep) مورد استفاده قرار گرفت. در این گروه، GSH به عنوان ترکیب احیاکننده‌ی باندهای دی‌سولفید و هپارین به عنوان پذیرنده‌ی پروتامین عمل می‌کند.

مطابق با پژوهش قبلی ما، انکوباسیون اسپرم در گروه درمانی فوق، با غلظت‌هایی که قبلاً به آن‌ها اشاره شده است و نیز به مدت زمان دو ساعت، بهترین تأثیر را چه از لحاظ اتساع کروماتین اسپرم و چه از حیث کمترین میزان آسیب‌رسانی به DNA اسپرم‌دارا است. همان‌طور که در بخش روش کار نیز اشاره شد انتظار بر آن است که تزریق مضاعف گلوتاتیون به عنوان یک ترکیب احیاکننده و نیز یک آنتی‌اکسیدان فیزیولوژیک و همچنین عصاره‌ی اسپرم حاوی PLC_{ζ}، بتوانند در بهبود نتایج حاصل از انجام ICSI در گوسفند مؤثر واقع شوند. روند فعال‌سازی تخمک و افزایش کلسیم داخل سلولی نیز به کمک روش فعال‌سازی مصنوعی (Io+6-DMAP) در تخمک‌ها القا گردید. هدف از تمامی روش‌های فعال‌سازی مصنوعی، القای نوسانات کلسیم در داخل سلول و متعاقبا کاهش سطح MPF، از سرگیری میوز، اگزوسیتوز گرانول‌های قشری و مهار پلی‌اسپری، کمک به شکل‌گیری پرونوکلئوس‌های نر و ماده، آغاز تقسیمات جنینی (۷) و

www.SID.ir

Archive of SID

نیز تأثیر بر رویدادهای قبل و بعد از لانه‌گزینی (۱۰) است.

طی مقایسه‌ی گروه‌های درمان شده‌ی این مطالعه با گروه کنترل (اسپرم بدون درمان)، میزان تشکیل پرونوکلئوس نر در گروه GSH+Hep+inj.GSH به صورت معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها افزایش یافته بود.

Delgado و همکاران در سال ۲۰۰۱ میزان اتساع کروماتین اسپرم را در گاو، پس از مجاورت آن با هپارین و گلوتاتیون بررسی کردند. بر اساس مطالعه‌ی این گروه، چنانچه غلظت هپارین به اندازه‌ی ۸۰µM و غلظت گلوتاتیون ۱۵mMباشد، حداکثر میزان تراکم‌زدایی و اتساع در کروماتین اسپرم حاصل می‌شود (۳). در پژوهش حاضر نیز غلظت هپارین و گلوتاتیون به ترتیب ۸۰µM و ۱۵mM انتخاب شد و استفاده‌ی توأمان آن‌ها طی دو ساعت انکوباسیون با اسپرم، اتساع و دکاندس کروماتین اسپرم را تا اندازه‌ی حدود ۱۴ میکرون در پی داشت. با وجود آن‌که درمان اسپرم در محیط‌های GSH + Hep در این پژوهش، اتساع زیاد کروماتین اسپرم را به دنبال دارد تا آنجا که گاه قطر سراسپرم به حدود ۱۵-۱۴ میکرون نیز می‌رسد، به دلیل افزایش میزان آسیب و به هم‌ریختگی کروموزومی در این اندازه، در پژوهش حاضر از اسپرماتوزوئیدهایی با قطر ۱۱-۸ میکرون که آسیب کمتری داشتند برای انجام ICSI استفاده شد.

در سال ۲۰۱۲، سخاوتی و همکاران برای نخستین بار از محیط حاوی GSH و هپارین به منظور القای تراکم‌زدایی در اسپرم گاو استفاده کردند. نتایج آنان نشان داد میزان تولید هر دو پرونوکلئوس نر و ماده به دنبال تزریق اسپرماتوزوئیدهای کاملاً دکاندس (قطری بیش از ۱۲ میکرون) به شکل معنی‌داری در مقایسه باگروه کنترل بیشتر است (۱۳). برخلاف نتایج این گروه، در پژوهش حاضر درمان اسپرم با گلوتاتیون و هپارین نتوانست از نظر میزان دست یابی به هر دو پرونوکلئوس نر و ماده (۲۹/۷٪)، تفاوت معنی‌داری را با گروه کنترل (۲۵/۸٪) ایجاد کند. معالوصف تزریق گلوتاتیون به تخمک پس از تزریق اسپرم تیمار شده با محیط‌های GSH+ Hep، (GSH + Hep + inj.GSH (۶۱/۹٪)) میزان تولید پرونوکلئوس نر را به طرز چشم‌گیری نسبت به گروه کنترل (۲۵/۸٪) و سایر گروه‌ها افزایش داده بود. به نظر می‌رسد افزایش سطح گلوتاتیون در سیتوپلاسم تخمک به دنبال تزریق مجدد آن پس از تزریق اسپرم، که برای نخستین بار در مورد گوسفند مورد ارزیابی قرار می‌گرفت، از لحاظ حمایت تخمک و اسپرم در برابر آسیب‌های اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدهای موجود در سلول و غشای پلاسمایی و نیز شکست آنزیم‌های داخل سلولی مؤثر باشد (۱۱)؛ همچنین یافته‌های Cheng و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داد میزان باروری طبیعی (حضور یک پیش‌هسته‌ی نر، یک پیش‌هسته‌ی ماده و دو جسم قطبی) در تخمک‌های تزریق شده با اسپرم درمان شده با GSH، GSH+ Hep، DTT+Hep به شکل معنی‌داری بیش از گروه کنترل و یا اسپرمی که تنها با DTT درمان شده است، می‌باشد (۲). با توجه به نتایج به دست آمده، در گونه‌ی گوسفند تنها پیش‌درمانی اسپرم با گوتاتیون و هپارین نمی‌تواند تأثیر قابل توجهی بر شکل‌گیری پیش‌هسته‌ی نر داشته باشد لیکن افزایش سطح گلوتاتیون در سلول به دنبال تزریق مجدد آن در کنار درمان اسپرم با ترکیبات احیاکننده نقش به‌سزایی در بهبود نتایج حاصل از ICSI خواهد داشت.

در یکی از گروه‌های درمانی مطالعه حاضر، علاوه بر تیمار اسپرم با روش‌های متفاوت، عصاره‌ی اسپرم نیز به داخل تخمک تزریق شد. انتظار می‌رود فاکتور فعال‌کننده‌ی تخمک موجود در اسپرم (SOAF) که PLC_Z یکی از پروتئین‌های اصلی آن است با تحریک تولید IP_3 (Inosiol 1,4,5 Triphosphate) در افزایش سطح کلسیم داخل سلولی و سایر فرآیندهای وابسته به آن تأثیرگذار باشد (۱۲). پژوهش‌های مختلف نشان داده است، تزریق عصاره‌ی اسپرم به تخمک‌های بالغ درگونه‌های مختلف می‌تواند منجر به القای نوسانات

www.SID.ir

Archive of SID

کلسیم در داخل تخمک و فعال شدن آن به طور کامل گردد؛ بنابراین نیازی به استفاده از سایر روش‌های مصنوعی فعال‌سازی همچون اتانول، یونومایسین، 6DMAP و ... نخواهد بود (۱).

برخلاف پژوهش‌های صورت گرفته استفاده از عصاره‌ی اسپرم در همراهی با گروه درمانی این مطالعه نتوانست روند فعال‌سازی تخمک و شکل‌گیری پرونوکلئوس‌ها را متأثر سازد. عوامل متعددی می‌توانند به عنوان علت این مسأله مطرح باشند از جمله عدم‌کفایت روش تهیه‌ی عصاره‌ی اسپرم و نیاز به اعمال اصلاحات در راستای تولید عصاره‌ی با کیفیت و با خلوص بالاتر؛ همچنین در مطالعات Jason و همکاران در سال ۲۰۰۲ تزریق تنها یک بار از عصاره‌ی اسپرم قادر به تحریک آزادسازی کلسیم از شبکه‌ی آندوپلاسمی، فعال‌سازی تخمک و نیز کمک به دکاندس‌شدن کروماتین اسپرم و شکل‌گیری پرونوکلئوس‌ها نبوده است (۸).

در بررسی حاضر تمامی تخمک‌ها پس از تزریق به صورت مصنوعی نیز فعال شدند. اگرچه در گونه‌هایی همچون موش، همستر، خرگوش و انسان تحریک اعمال شده به تخمک به هنگام تزریق اسپرم، برای فعال‌سازی تخمک کفایت می‌کند (۵)، لیکن در تمامی گروه‌های درمانی این مطالعه، فعال‌سازی مصنوعی تخمک پس از انجام ICSI لازم و ضروری بود.

در مجموع با توجه به نتایج مطالعه حاضر استفاده توأم از روش تراکم‌زدایی سر اسپرم قبل از انجام روند ICSI به همراه تزریق گلوتاتیون به داخل تخمک، شانس تشکیل پیش هسته نر و لقاح طبیعی را به طور مؤثری در گونه‌ی گوسفند تحت تأثیر قرار می‌دهد.

منابع

1- Bedford, S; Kurokawa, M; Hinrichs, K. and Fissore, R; Intracellular calcium oscillations and activation in horse oocytes injected with stallion sperm extracts or spermatozoa. Reproduction; 2003; 126(4): 489-499.

2- Cheng, W.-M; An, L; Wu, Z.-H; Zhu, Y. B; Liu, J. H; Gao, H. M; Li, X. H; Zheng, S. J; Chen, D. B. and Tian, J. H; Effects of disulfide bond reducing agents on sperm chromatin structural integrity and developmental competence of in vitro matured oocytes after intracytoplasmic sperm injection in pigs. Reproduction; 2009; 137(4): 633-643.

3- Delgado, N; Flores-Alonso, J; Rodriguez-Hernandez, H.; Merchant-Larios, H. and Reyes, R; Heparin and glutathione II: correlation between decondensation of bull sperm cells and its nucleons. Syst. Biol. Reprod. Med; 2001; 47(1): 47-58.

4- Galli, C; Vassiliev, I; Lagutina, I; Galli, A. and Lazzari, G; Bovine embryo development following ICSI: effect of activation, sperm capacitation and pre-treatment with dithiothreitol. Theriogenology; 2003; 60(8): 1467-1480.

5- Gomez, M; Catt, J; Evans, G. and Maxwell, W; Sheep oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Reprod. Fert.

www.SID.ir

Archive of SID

Develop; 1997; 10(2): 197-205.

6- Jiménez-Macedo, A. R; Izquierdo, D; Anguita, B. and Paramio, M. T; Comparison between intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilisation employing oocytes derived from prepubertal goats. Theriogenology; 2005; 64(6): 1249-1262.

7- Kline, D. and Kline, J. T; Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. Develop. Biol; 1992; 149(1): 80-89.

8- Knott, J. G; Poothapillai, K; Wu, H; He, C. L; Fissore, R. A. and Robl, J.M; Porcine sperm factor supports activation and development of bovine nuclear transfer embryos. Biol Reprod; 2002; 66(4): 1095-1103.

9- Morozumi, K; Shikano, T; Miyazaki, S. and Yanagimachi, R; Simultaneous removal of sperm plasma membrane and acrosome before intracytoplasmic sperm injection improves oocyte activation/embryonic development. Proceed. National Academ. Sci; 2006; 103(47): 17661-17666.

10- Ozil, J. P. and Huneau, D; Activation of rabbit oocytes: the impact of the Ca2+ signal regime on development. Development; 2001; 128(6): 917-928.

11- Perreault, S. D; Barbee, R. R; Elstein, K. H; Zucker, R. M. and Keefer, C. L; Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm microinjection and in vitro by flow cytometry. Biol. Reprod; 1988; 39(1): 157-167.

12- Perry, A; Wakayama, T. and Yanagimachi, R; A novel trans-complementation assay suggests full mammalian oocyte activation is coordinately initiated by multiple, submembrane sperm components. Biol. Reprod; 1999; 60(3): 747-755.

13- Sekhavati, M. H; Shadanloo, F; Hosseini, M. S; Tahmoorespur, M; Nasiri, M. R; Hajian, M. and Nasr-Esfahani, M. H; Improved bovine ICSI outcomes by sperm selected after combined heparin-glutathione treatment. Cell. Reprogram. (Formerly "Cloning Stem Cells"); 2012; 14(4): 295-304.

14- Shirazi, A; Derakhshan-Horeh, M; Pilvarian, A; Ahmadi, E; Nazari, H. and Heidari, B; Effect of Pre-Treatment of Ovine Sperm on Male Pronuclear Formation and Subsequent Embryo Development Following Intracytoplasmic Sperm

www.SID.ir

Archive of SID

Injection. Reprod Domest. Anim; 2011; 46(1): 87-94.

15- Tasripoo, K; Srisakwattana, K; Nualchuen, W. and Sophon, S; Effects of Various Activators on Bovine Embryonic Development Following Intracytoplasmic Sperm Injection. Iranian Journal of Applied Anim. Sci; 2012; 2(2): 167-173.

16- Williams, C. J; Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. Hum. Reprod. Update; 2002; 8(4): 313-321.

www.SID.ir

Archive of SID

Using effective compounds on sperm chromatin structure in intracytoplasmic sperm injection (ICSI) procedure

Golestanfar, A.[1]; Shirazi, A.[2,3,4*]; Shams-Esfandabadi, N.[5]; Ahmadi, E.[3]

1. DVM Graduated Student, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.
2. Professor, Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran-Iran.
3. Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.
4. Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.
5. Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.

Recieved: 13 February 2015 ***Accepted:*** 11 July 2016

Summary

Considering the low percentages of sperm chromatin decondensation and male pronuclear formation following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in ovine species which decrease the chance of normal fertilization, the current study was designed to assess the effects of some methods of sperm pretreatment on male pronuclear (MPN) formation and oocyte activation in ovine ICSI procedure. The experimental groups of this study were comprised of: I) ICSI of untreated sperm (control), II) ICSI of pretreated sperm with GSH+Hep (GSH+Hep), III) ICSI of pretreated sperm with GSH+Hep coinjected with GSH (GSH+Hep+inj.GSH), and IV) ICSI of pretreated sperm with GSH+Hep coinjected with sperm extract (GSH+Hep+inj.SE). The injected oocytes were activated with Io+6-DAMP and after 16h, they were examined for prenuclear formation. The MPN formation in GSH+Hep+inj.GSH was higher ($P<0.001$) than other groups. The rate of activated ICSI oocytes in GSH + Hep group was higher ($P<0.05$) than other groups. In conclusion, ICSI of pretreated sperm with GSH + Hep accompanied with GSH injection has dramatic effect on MPN formation in ovine species.

Keywords**:** Sperm decondensation, Oocyte activation, ICSI, Glutathione, Sperm extract.

* Corresponding Author E-mail: shiraziabbas@yahoo.com

www.SID.ir