مقاله پژوهشی

مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال بیست و هفتم/شماره ۹۲/فروردین ۱۳۸۸

مقایسه کارآیی 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 هیأت علمی پژوهشکده‌ی رویان تهران، گروه آندرولوژی-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

مقدمه: در حال حاضر انتخاب اسپرم جهت ICSI بر اساس معیارهای مورفولوژی و تحرک است. امّا 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 کارآیی دو روش جداسازی اسپرم HA-binding و Zeta در جداسازی اسپرم‌های بالغ از نظر میزان ناهنجاری‌های مورفولوژی، کمبود پروتامین و فراگمنتاسیون DNA مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: 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 پاپانیکولائو (جهت ارزیابی مورفولوژی اسپرم)، رنگ‌آمیزی کروموماپسین A3 (جهت ارزیابی کمبود پروتامین) و تست SCD (جهت ارزیابی میزان فراگمنتاسیون DNA) انجام شد. همچنین بر روی حجمی از نمونه به عنوان گروه شاهد، روش‌های مذکور انجام گردید.

یافته‌ها: اسپرم‌های جدا شده از طریق روش HA-binding و Zeta به طور معنی‌داری کاهش در میزان ناهنجاری‌های مورفولوژی و کمبود پروتامین را نشان دادند ($P < ۰/۰۵$). اما تنها روش Zeta میزان فراگمنتاسیون DNA را به طور معنی‌داری کاهش داد ($P < ۰/۰۵$).

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

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

تعداد صفحات: ۱۱

تعداد جدول‌ها: ۲

تعداد نمودارها: ۱

تعداد منابع: ۳۱

آدرس نویسندهٔ مسئول: دکتر محمد حسین نصر اصفهانی، پژوهشکده‌ی رویان، گروه آندرولوژی-جنین‌شناسی، اصفهان، ایران.

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

www.mui.ac.ir

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). امّا با وجود این پیشرفت‌ها نگرانی‌های بسیاری برای تزریق اسپرم‌های حاوی ناهنجاری‌های کروموزومی و یا فراگمنتاسیون 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) (۹- ۷)، 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 (۱۴-۱۳).

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، فراگمنتاسیون DNA و ناهنجاری‌های مورفولوژی می‌باشند (۱۵).

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

www.mui.ac.ir

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 ۴-۳ روز خودداری زوجین از مقاربت، جمع‌آوری و آنالیز روتین مایع سمن طبق معیار WHO (۱۷)، توسط میکروسکوپ نوری انجام گردید. نمونه گیری 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 پروتامین توسط رنگ‌آمیزی کروموما یسین A_3 (۱۹) و میزان فراگمنتاسیون 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 CMA_3 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 پروتامین و فراگمنتاسیون DNA آماده شدند (۱۵).

ارزیابی کمبود پروتامین (رنگ‌آمیزی کروموما یسین A_3)

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 CMA_3، هر لام به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول CMA_3 رنگ‌آمیزی شد (۰/۲۵ گرم بر میلی‌لیتر در بافر مک الوین: ۷ میلی‌لیتر اسید استیک ۰/۱ مولار و ۳۲/۹ میلی‌لیتر از $7H_2O$ و Na_2HPO_4 و با

www.mui.ac.ir

غلظت ۰/۲ مولار pH = ۷ حاوی ۱۰ میلی‌مول ($MgCl_2$) سپس اسلایدها توسط PBS شستشو داده شدند و روی آنها لامل قرار داده شد. با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسانت Olympus (BX51, Tokyo, Japan) توسط فیلتر ۴۷۰-۴۶۰ در همان روز ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. درصد اسپرم‌های با رنگ زرد درخشان (CMA_3^+) که دارای کمبود پروتامین هستند و اسپرم‌های با رنگ زرد کمرنگ (CMA_3^-) که دارای محتوای پروتامین طبیعی هستند با استفاده از نرم‌افزار Olysia Bioreport محاسبه گردید (۱۹).

ارزیابی فراگمنتاسیون DNA

۷۰ میکرو لیتر از آگاروز (با درجه‌ی ذوب پایین) ۱٪ در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد با ۳۰ میکرولیتر 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 فراگمنتاسیون DNA را به صورت ۵ حالت با توجه به وجود هاله‌ی اطراف هسته و اندازه‌ی آن بررسی نمود. درصد اسپرم‌های با فراگمنتاسیون DNA (هسته‌ی اسپرم با هاله‌ی کوچک، بدون هاله و سلول اسپرم degrade شده) و بدون فراگمنتاسیون DNA (هسته‌ی اسپرم با هاله‌ی بزرگ و هاله‌ی متوسط) تعیین شد، که در مجموع به صورت درصد فراگمنتاسیون 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 < ۰/۰۵ بود، از لحاظ آماری معنی‌دار محسوب شد.

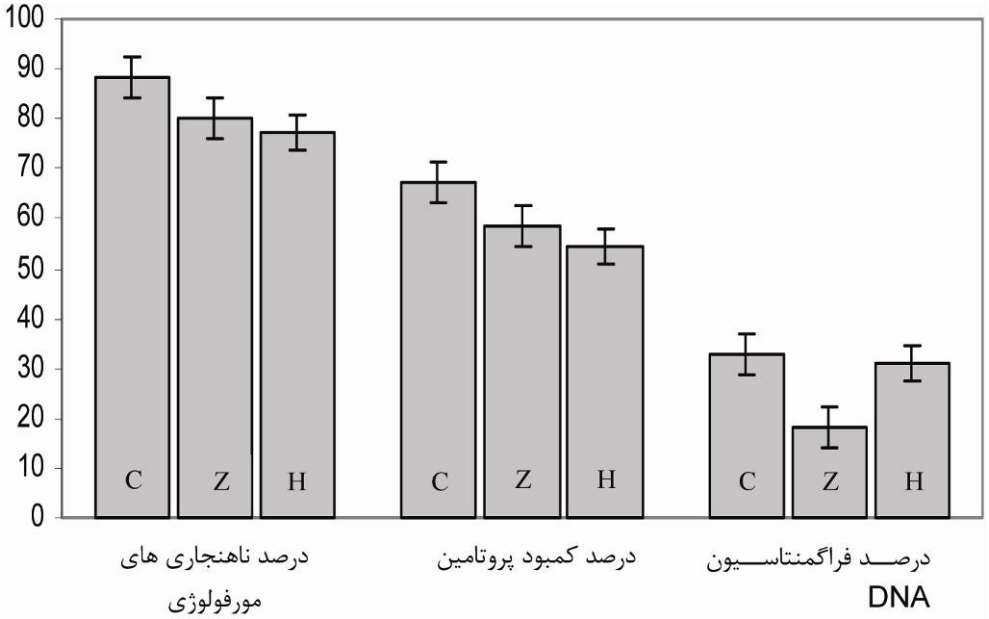
یافته‌ها

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 کارآیی روش‌های Zeta و HA-binding را در جداسازی اسپرم‌ها از نظر میزان کمبود پروتامین، فراگمنتاسیون DNA اسپرم و ناهنجاری‌های مورفولوژی، نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهد.

جدول ۱. اطلاعات توصیفی مربوط به پارامترهای اسپرمی، کمبود پروتامین و فراگمنتاسیون DNA

متغیرها	میانگین± انحراف استاندارد	تعداد	حداقل	حداکثر
غلظت (میلیون/میلی‌لیتر)	۵۳/۶۸ ± ۳۲/۹۰	۷۰	۵/۰۰	۱۸۷/۰۰
حجم نمونه (سی‌سی)	۴/۲۴ ± ۳/۰۷	۷۰	۱/۰۰	۹/۵۰
درصد تحرک اسپرم	۴۶/۹۰ ± ۱۷/۴۶	۷۰	۵/۰۰	۸۶/۷۰
درصد ناهنجاری‌های مورفولوژی	۸۸/۱۹ ± ۷/۱۹	۷۰	۶۴/۰۰	۱۰۰/۰۰
درصد اسپرم‌های CMA_3 مثبت	۶۷/۱۷ ± ۱۷/۳۴	۷۰	۲۱/۰۰	۹۸/۰۰
درصد فراگمنتاسیون DNA	۳۲/۸۷ ± ۸/۶۵	۷۰	۱۳/۰۰	۶۸/۰۰

www.mui.ac.ir



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

نتایج به دست آمده پس از رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو نشان می‌دهد که میزان ناهنجاری‌های مورفولوژی در اسپرم‌های جداسازی شده در هر دو روش نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافته است ($P < ۰/۰۵$). 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 معنی‌دار نبود ($P > ۰/۰۵$).

همچنین نتایج به دست آمده از رنگ‌آمیزی CMA_3 نشان می‌دهد که اسپرم‌های جدا شده توسط هر دو روش منجر به کاهش معنی‌داری در درصد اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین می‌شود ($P < ۰/۰۵$) (نمودار ۱). اگر چه اسپرم‌های جدا شده از طریق HA-binding نسبت به اسپرم‌های جداسازی شده از روش Zeta میزان کمتری از کمبود پروتامین را نشان می‌دادند ولی اختلاف بین این دو روش جداسازی کم و از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > ۰/۰۵$).

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 معنی‌داری اسپرم‌های با میزان فراگمنتاسیون DNA کمتر را نسبت به گروه شاهد جدا کرده است ($P < ۰/۰۵$). همچنین اسپرم‌های جدا شده به روش Zeta به طور معنی‌داری میزان کمتری از فراگمنتاسیون DNA را نسبت به اسپرم‌های جدا شده از طریق HA binding داشتند ($P < ۰/۰۵$).

جدول ۲ رابطه‌ی بین میزان ناهنجاری‌های مورفولوژی، درصد کمبود پروتامین و درصد فراگمنتاسیون DNA را در گروه شاهد نشان می‌دهد. نتایج بیانگر آن است که بین میزان کمبود پروتامین و ناهنجاری‌های مورفولوژی ($P < ۰/۰۵$) و همچنین بین میزان کمبود پروتامین و فراگمنتاسیون DNA رابطه‌ی معنی‌دار وجود دارد ($P < ۰/۰۵$).

www.mui.ac.ir

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

متغیرها	درصد ناهنجاریهای مورفولوژی اسپرم r (P -Value)	درصد اسپرم های CMA3 مثبت r (P- Value)	درصد فراگمنتاسیون DNA r (P- Value)
درصد ناهنجاریهای مورفولوژی	---	۰/۴۴۱ (۰/۰۱۵)*	۰/۲۰۵ (۰/۳۱۶)
درصد اسپرم های CMA_3 مثبت	۰/۴۴۱ (۰/۰۱۵)*	---	۰/۴۰۸ (۰/۰۳۵)*
درصد فراگمنتاسیون 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 روش‌های انتخاب اسپرم سالم متمرکز کنند. در این مطالعه دو روش جداسازی Zeta و HA binding از نظر میزان ناهنجاری‌های مورفولوژی، کمبود پروتامین و فراگمنتاسیون DNA اسپرم مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند.

یک اسپرم بالغ در سطح غشای خود دارای منفی ۱۶ تا منفی ۲۰ میلی‌ولت بار الکتریکی می‌باشد (۱۶) که این بار الکتریکی در هنگام ظرفیت‌یابی اسپرم (۲۳-۲۱)، مواجه شدن با مایع فولیکولی و یا آنزیم نورآمینیداز رحمی کاهش می‌یابد (۲۴). این بار الکتریکی که به دلیل وجود سیالوگلیکوپروتئین‌های فراوان در سطح غشای اسپرم می‌باشد باعث ایجاد پتانسیل در اطراف غشای اسپرم می‌شود که پتانسیل Zeta نام دارد (۱۶). در اپیدیدیم فرم‌هایی از گلیکوپروتئین‌های CD-52 و GP 20 که حاوی بار منفی زیادی هستند که از طریق گیرنده‌های گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول (GPI) به سطح غشای اسپرم متصل می‌شوند (۲۵). از این رو Chan و همکاران از وجود پتانسیل الکتریکی به وجود آمده در سطح غشای اسپرم استفاده کرده و نشان دادند که اسپرم‌هایی که بر اساس این وجود پتانسیل Zeta جدا شوند، حاوی ناهنجاری های مورفولوژی و آسیب DNA کمتر توسط رنگ‌آمیزی آکریدین اورانژ و عدم وجود هیستون اضافی توسط رنگ‌آمیزی آنیلین بلو می‌باشند (۱۵).

در طی اسپرمیوژنز، همزمان با تغییرات غشاء که باعث ایجاد گیرنده‌های خاصی جهت اتصال اسپرم به منطقه‌ی شفاف تخمک می‌شود، گیرنده‌های اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک نیز تشکیل می‌شوند (۱۱-۱۰). Jakab و همکاران اسپرم‌ها را بر اساس قدرت اتصالشان به گیرنده‌ی اختصاصی اسید هیالورونیک، جداسازی کرده و از آن جهت عمل ICSI استفاده نمودند (۶). اسید هیالورونیک یا هیالورونان یک پلی‌مر خطی دی‌ساکاریدی است که در دستگاه تناسلی مؤنث، کمپلکس کومولوس اووفوروس و مایع سمن وجود دارد (۲۶). اسپرم زنده توسط پروتئین PH-20 که روی غشای پلاسمایی آن وجود دارد، به اسید هیالورونیک متصل می‌شود (۱۱-۱۰). در این روش اسپرم از طریق وجود گیرنده‌ی موجود در سر خود با اسید هیالورونیک اتصال برقرار می‌کند به طوری که پس از اتصال، دم اسپرم به طور آزادانه حرکت می‌کند. به علاوه اسپرم‌های متصل شده به اسید هیالورونیک از نظر مورفولوژی دارای شکل طبیعی می‌باشند (۱۲). مطالعات نشان داده است که اسپرم‌های جداشده از

www.mui.ac.ir

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 فراگمنتاسیون 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 ناهنجاری های مورفولوژی، کمبود پروتامین و فراگمنتاسیون 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 اسپرمیوژنز و همچنین در طی بلوغ در اپیدیدیم رخ می‌دهد و به دلیل این که وجود این پتانسیل Zeta اساس جداسازی اسپرم‌ها در روش Zeta می‌باشد، هر گونه نقصی در روند اسپرمیوژنز 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 پروتامین طبیعی می‌باشند. همچنین نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که روش Zeta باعث کاهش معنی‌داری در میزان فراگمنتاسیون DNA اسپرم‌ها می‌شود. به دلیل آن که قسمتی از تکامل غشاء در مرحله‌ی بلوغ اپیدیدیمی طی می‌شود، به نظر می‌رسد که اسپرم‌های فاقد فراگمنتاسیون در DNA توانایی و استعداد بیشتری برای طی روند تکامل غشای خود در اپیدیدم 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 پروتامین نسبت به گروه شاهد می‌شود. هرچند میزان فراگمنتاسیون 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 (۳۰-۲۸). 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 اسپرمیوژنز رخ می‌دهد، هر گونه نقصی در روند اسپرمیوژنز 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

www.mui.ac.ir

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 پروتامین 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 فراگمنتاسیون 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 فراگمنتاسیون DNA اسپرم می‌باشد. در این مطالعه، جهت بررسی میزان فراگمنتاسیون از تست SCD استفاده شد ولی در مطالعه‌ی دیگری روش DNA-nick translation جهت بررسی میزان فراگمنتاسیون DNA بررسی شده است (۲۷).

بررسی رابطه‌ی بین ناهنجاری‌های مورفولوژی، کمبود پروتامین و فراگمنتاسیون DNA در گروه شاهد نشان می‌دهد که مانند سایر مطالعات یک رابطه‌ی مستقیم و معنی‌دار بین میزان کمبود پروتامین و ناهنجاری‌های مورفولوژی وجود دارد. همچنین بین میزان کمبود پروتامین و فراگمنتاسیون DNA رابطه‌ی معنی‌دار و مستقیم وجود دارد که نشان می‌دهد جایگزینی پروتامین در ساختار کروماتین که منجر به تراکم و بسته‌بندی صحیح کروماتین اسپرم می‌شود، می‌تواند از ایجاد فراگمنتاسیون 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 پروتامین مؤثرند، امّا با بررسی فراگمنتاسیون DNA توسط تست SCD مشخص شد که روش Zeta جهت جداسازی اسپرم‌های با DNA سالم کارآیی 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، کارآیی ندارد (۶). همچنین، انجام عمل Zeta روی اسپرم‌هایی که از ناحیه بیضه استخراج می‌گردد کارآیی 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 پروتامین طبیعی مناسب می‌باشد، امّا روش Zeta جهت جداسازی اسپرم‌ها با میزان فراگمنتاسیون 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 مسؤولین و پرسنل مراکز فوق کمال تشکر و قدردانی را داریم.

www.mui.ac.ir

References

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Lopata A, Patullo MJ, Chang A, James B. A method for collecting motile spermatozoa from human semen. Fertil Steril 1976; 27(6): 677-84.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Ishijima SA, Okuno M, Mohri H. Zeta potential of human X- and Y-bearing sperm. Int J Androl 1991; 14(5): 340-7.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. Focarelli R, Rosati F, Terrana B. Sialyglycoconjugates release during in vitro capacitation of human spermatozoa. J Androl 1990; 11(2): 97-104.
22. 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.
23. 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.
24. Srivastava PN, Farooqui AA. Studies on neuraminidase activity of the rabbit endometrium. Biol Reprod 1980; 22(4): 858-63.
25. 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.

www.mui.ac.ir

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.

www.mui.ac.ir

Original Article

Journal of Isfahan Medical School
Vol 27, No 92, April 2009

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 Tavalaee**

*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

Abstract

Background: 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 A_3 (CMA_3) 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

www.mui.ac.ir