Archive of SID

مقاله تحقیقی

تمایز بین اثر کمبود پروتامین و عدم فعال شدن اووسیت در موارد عدم لقاح پس از ICSI

محمد مردانی Ph.D.* ، ◎ محمد حسین نصر اصفهانی Ph.D. **، شهناز رضوی Ph.D.*، رضا شیرازی M.Sc.*

* گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

** دانشیارگروه جنین شناسی و سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان پایگاه اصفهان، مرکز باروری و ناباروری اصفهان

تاریخ وصول: اسفندماه ۸۴، تاریخ پذیرش: اردیبهشت‌ماه ۸۵

چکیده

هدف: بررسی میزان تأثیر هر یک از عوامل ذکر شده بر ایجاد PCC (Premature Chromosomal Condensation) (در اووسیتهای لقاح نیافته حاصل از روش ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) است و همچنین در این بررسی مشخص می‌شود که آیا این عوامل با یکدیگر و یا به طور مستقل باعث عدم موفقیت در لقاح می‌شوند یا خیر؟

مواد و روشها: این مطالعه به‌روش تجربی در دو گروه از بیماران صورت گرفت، به‌طوری‌که در گروه اول ٥٦ زوج و در گروه دوم ٨٦ زوج کاندید ICSI بودند. اووسیتهای جمع‌آوری شده توسط اسپرمهایی که قبلاً شستشو داده شده بودند، تزریق شدند. ١٦–١٨ ساعت پس از تزریق، اووسیتها از لحاظ وجود یا نبودن پیش هسته‌ها، بررسی شدند. در گروه دوم اووسیتهای لقاح نیافته توسط یونومایسین فعال شدند که پس از ارزیابی مجدد وقوع لقاح در این گروه، در نهایت اووسیتهای لقاح نیافته در هر دو گروه برای بررسی وضعیت کروماتین اسپرم و اووسیت تثبیت و رنگ آمیزی شدند.

یافته‌ها: میزان لقاح در دو گروه اول و دوم به ترتیب ٦٠/٢٠ و ٥٩/٩٤ درصد بود که در گروه دوم به علت فعال سازی میزان لقاح به ٨٣/٧٢ درصد افزایش یافت. در هر دو گروه ارتباط معنی داری بین درصد CMA3 مثبت و لقاح دیده شد. در این مطالعه در گروه اول، بین درصد PCC و لقاح و در گروه دوم، بین درصد PCC و CMA3 مثبت رابطه معنی داری دیده شد. آنالیز آماری اطلاعات در این دو گروه از بیماران نشان داد که نه تنها میزان لقاح در دو گروه CMA3 مثبت بیشتر و کمتر از ٣٠درصد متفاوت است، بلکه درصد PCC اسپرم و اسپرمهای سالم و دست نخورده (Intact) نیز در دو گروه متفاوت هستند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که بعد از عدم فعال شدن اووسیت، کمبود پروتامین با القاء PCC، دلیل اصلی عدم موفقیت در لقاح در موارد پس از ICSI بوده و به‌طور مستقل از هم می‌توانند بر روند لقاح تأثیر داشته باشند.

کلیدواژه‌ها: فعال نشدن اووسیت، کمبود پروتامین، تزریق داخل سیتوپلاسمی اووسیت، یونومایسین، تراکم زودرس کروموزومی

◎ تهران، گروه جنین‌شناسی، پژوهشکده رویان، صندوق پستی ٤٦٤٤–١٩٣٩٥

E-mail: mardani@mui.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

آنالیز کروماتین اووسیتهای لقاح نیافته در موارد تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (Intracytoplasmic Sperm Injection : ICSI) نشان می‌دهد که پس از آنوپلوئیدی، تراکم زودرس کروموزومی (PCC) اسپرم دلیل اصلی عدم موفقیت در لقاح است [۱ و ۳]. هنگامی‌که یک سلول انترفازی با یک سلول متافازی تلفیق شود غشای هسته سلول انترفازی ناپدید شده و کروموزومهای سلول انترفازی زودتر از موعد پیش بینی شده متراکم می‌شوند که به این پدیده تراکم پیش رس کروموزومی (PCC) گفته می‌شود [٤]. در سال ۲۰۰۰، رسن‌باخ (Rosenbuch) اعلام کرد که ناهنجاریهای کروماتین اسپرم نیز می‌تواند با PCC در ارتباط باشد و بنابراین بررسی کروماتین اسپرم ضروری به نظر می‌رسد [۵]. مطالعات قبلی نشان داد که درصد PCC اسپرم در اووسیتهای لقاح نیافته که با اسپرمهای دارای کمبود پروتامین تزریق شده بودند در مقایسه با اووسیتهایی که توسط اسپرمهایی با مقدار پروتامین طبیعی تزریق شده بودند، بالاتر است [٦]. از آنجایی‌که در آن مطالعه اووسیتها از بیماران مختلف به دست آمده بود و از طرف دیگر عدم بلوغ اووسیت نیز به عنوان یک عامل مؤثر در القای PCC مطرح شده بود [۲، ۷ و ۸]، بنابراین انجام مطالعه ای دیگر ضروری به نظر می‌رسید. بنابراین در مطالعه بعدی که با تزریق اسپرمهای انسانی به داخل اووسیتهای به دست آمده از یک رده موش سوری انجام گرفت، نشان داده شد که کمبود پروتامین قادر است به‌طور مستقل از کیفیت اووسیت، PCC را در اسپرمهای دارای کمبود پروتامین القاء کند [۹]. نتیجه گیری حاصل از مطالعات متعدد نشان می‌دهد که اگر اسپرمی با کمبود پروتامین به یک محیطی با میزانMPF (Mitotic Promoting Factor) بالا همانند اووسیت متافازII وارد شود، امکان ایجاد PCC و در نهایت عدم موفقیت در لقاح وجود دارد [۹]. لازم به ذکر است که کمبود پروتامین می‌تواند مستقیماً روی روند لقاح از طریق ایجاد PCC تأثیر گذارد یا کاهش لقاح می‌تواند ناشی از اختلال در سایر فاکتورهای اسپرمی همانند ساختار آکروزوم و تکای دور هسته‌ای، نوسازی غشای پلاسمایی و سایر وقایع مورفولوژیک و بیوشیمیایی که همزمان با جایگزینی هیستون و پروتامین رخ می‌دهد، باشد [۱۰،٦ و ۱۱].

بیش از ۸۰ درصد اووسیتهای لقاح نیافته پس از انجام روش ICSI، دارای اسپرم هستند [۱۲] ولی با این وجود هنوز مشخص نشده است که علت عدم موفقیت در لقاح در این اووسیتها مربوط به عوامل اسپرمی نظیر کمبود پروتامین یا ناتوانی اسپرم در فعال ساختن اووسیت است یا اینکه عوامل اووسیتی همانند عدم توانایی اووسیت در فعال شدن توسط اسپرم موجب عدم لقاح می‌شود. بنابراین در این مطالعه با ارزیابی و بررسی وضعیت کروماتین اووسیتهای فعال شده لقاح نیافته، سعی شده است علت اصلی عدم موفقیت در لقاح در موارد پس از انجام روش ICSI مشخص شود.

مواد و روشها

در این مطالعه نمونه‌های مایع منی از زوجهای نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان برای انجام عمل ICSI به‌دست آمد. نمونه‌های مایع منی در روز تخمک گیری، بعد از ۳-٤ روز خودداری زوجین از مقاربت، از بیماران جمع آوری شد. آنالیز روتین مایع مایع منی طبق معیار WHO [۱۳]، توسط میکروسکوپ نوری انجام شد. در این مطالعه بیماران در ۲ گروه قرار گرفتند :

گروه اول

اووسیتهای ٥٦ بیمار کاندید ICSI ، توسط اسپرم تزریق شدند و ١٦-۱۸ بعد اووسیتها از لحاظ وجود یا نبودن پیش هسته‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند، سپس اووسیتهای لقاح نیافته برای بررسی وقوع کلیواژ و وجود احتمالی پیش هسته به مدت ۷-۱۰ ساعت در محیط G1 قرار داده شدند. در نهایت اووسیتهای لقاح نیافته برای آنالیز وضعیت کروماتین، تثبیت و رنگ آمیزی شدند که نتایج حاصل از آن در جدول ۱ نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

گروه دوم

اووسیتهای ۸٦ بیمار کاندید ICSI، توسط اسپرم تزریق شدند و ۱٦–۱۸ بعد از لحاظ وجود یا نبودن پیش هسته‌ها ارزیابی شدند، سپس اووسیتهای لقاح نیافته برای بررسی وقوع کلیواژ و وجود احتمالی پیش هسته به مدت ۷ تا۱۰ ساعت در محیط G1 قرار داده شدند. در نهایت اووسیتهای لقاح نیافته به مدت ۱۰ دقیقه توسط ماده شیمیائی یونومایسین به‌صورت مصنوعی فعال شدند [۱٦–۱٤]، سپس اووسیتها در محیط G1 شستشو داده شده و برای ارزیابی مجدد وقوع لقاح، ۱٦ ساعت در همان محیط نگهداری شدند. در پایان پس از بررسی اووسیتها از لحاظ وجود یا نبودن پیش هسته، اووسیتهای فعال شده لقاح نیافته برای آنالیز وضعیت کروماتین، تثبیت و رنگ آمیزی شدند که نتایج آن در جدول ۱ گردآوری شده است.

آماده سازی اسپرم

نمونه‌های مایع منی با استفاده از گرادیان Pure Sperm (Nidacone, Guthenburg, Sweden) و با غلظتهای ٤۰ و ۸۰ برای انجام روش ICSI تهیه و باقیمانده نمونه شستشو شده برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم (رنگ آمیزی پاپانیکولائو) بر اساس معیار WHO [۱۳] و کمبود پروتامین (رنگ آمیزی کروموماپسین A3) استفاده شد [۱۷]. در هر اسمیر ۱۰۰ اسپرم برای هر دو نوع رنگ آمیزی بررسی شدند.

تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)

پس از تحریک و القای تخمک گذاری توسط داروهای حاوی FSH و HCG، فولیکولها توسط سونوگرافی واژینال تخلیه شده و در محیط (G-MOPS) شستشو داده شدند. برای انجام ICSI، به تخمکها آنزیم هیالورونیداز اضافه شد تا سلولهای اطراف تخمک جدا شدند. پس از چندین بار شستشو، تخمکها به ظروف کشت [falcan, 1006]، که حاوی قطرات G-MOPS بودند، منتقل شدند. اسپرمهای شستشو داده شده توسط گرادیانتهای pure sperm نیز به داخل قطره pvp به همان ظرف انتقال داده شدند، سپس با استفاده از دستگاه میکرومانیپولار، اسپرم با حرکت و مورفولوژی مناسب انتخاب و توسط پیپت مخصوص به داخل اووسیت تزریق شد. برای حذف یا کاهش فاکتورهای زنانه بیمارانی که کمتر از ٤ اووسیت داشتند، از مطالعه حذف شدند. در ضمن اووسیتهای نابالغ، دفورم، پیر و غیر طبیعی تزریق نشدند.

ارزیابی کمبود پروتامین (رنگ آمیزی کروموماپسین A3: CMA3)

اسمیرهای آماده شده از مایع منی که در محلول کارنوی (متانل و اسید استیک گلاسیال با نسبت ۳ به ۱) تثبیت شده بودند، به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. به منظور انجام رنگ آمیزی CMA3، هر اسلاید به‌مدت ۲۰ دقیقه با ۱۰۰ میکرولیتر محلول CMA3 (سیگما USA) با غلظت ۰/۲۵ mg/ml درصد در بافر مک الوین (۷ml اسید استیک M ۰/۱ به اضافه ۳۲/۹ ml از پودر دی سدیم فسفات هیدراته (Na2HPo4–7H2O) M ۰/۲ با pH=۷ حاوی ۱۰mM کلرید منیزیم(MgCl2)) رنگ‌آمیزی شد. سپس اسلایدها توسط بافر شستشو شده و با استفاده از بافر گلیسرول (۱:۱) مونت شدند. با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنت Olympus(BX51, Tokyo, Japan) با فیلترهای ٤٦۰–٤۷۰nm در همان روز ۱۰۰ اسپرم شمارش شد. برای تعیین درصد اسپرمهای با رنگ زرد درخشان(CMA3 مثبت) و اسپرمهای با رنگ زرد تیره (CMA3 منفی) از نرم افزار اولیسیا (Olysia) استفاده شد(۱۷).

مطالعه سیتوژنتیکی اووسیتهای لقاح نیافته

۱۷۹ اووسیت به دست آمده از گروه اول و ۱۱۲ اووسیت به‌دست آمده از گروه دوم برای آنالیز سیتوژنتیکی آماده شدند. بدین ترتیب که اووسیتها به مدت ۹ دقیقه در دمای اتاق به محلول هیپوتونیک سیترات سدیم ۰/۵ درصد منتقل شدند، سپس هر اووسیت با حداقل مقدار محلول هیپوتونیک روی

www.SID.ir

Archive of SID

لام منتقل و توسط محلول تثبیت کننده کارنوی تثبیت شد. در نهایت لامهای آماده شده با محلول گیمسای ۱۰ درصد در بافر فسفات با pH=٦/٨ به مدت ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی شده و در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰۰× بررسی شدند [۱۸]. در این مطالعه اووسیتها به‌صورت اووسیتهای واقع در متافاز II، دژنره و فاقد اسپرم دسته بندی شدند. اسپرمها به‌صورت اسپرمهای دست نخورده(Intact)، نامتراکم (Nuclear Chromatin Decondensation: NCD)، بخشی نامتراکم (Partial Nuclear Chromatin Decondensation: PNCD) و PCC مشاهده شدند.

آنالیز آماری

نتایج با آزمونهای آماری ضریب همبستگی و t-test با استفاده از نرم افزار SPSS (Version 11.5) بررسی شدند.

یافته‌ها

جزئیات تعداد و انواع اووسیتهای به‌دست آمده و تزریق شده و اووسیتهای لقاح یافته و لقاح نیافته و کیفیت کروماتین اووسیتهای آنالیز شده در گروه اول در جدول ۱ خلاصه شده است. در گروه دوم علاوه بر موارد فوق، اطلاعات مربوط به اووسیتهای فعال شده لقاح یافته و فعال شده لقاح نیافته در جدول ۱ نشان داده شده است. مقایسه اطلاعات دو گروه نشان می‌دهد که: ۱) میزان لقاح در گروه اول و دوم به ترتیب ٦۰/۲۰ و ۵۹/۹٤ درصد است. در گروه دوم ۳۰۰ اووسیت لقاح نیافته، به‌طور مصنوعی فعال شدند که از این بین، ۱۷۸ اووسیت یا به عبارتی ۵۹/۳٤ درصد آنها در اثر فعال سازی لقاح یافتند. ۲) میزان عدم لقاح در اووسیتهای تزریق شده در گروه اول ۳۹/۸۰ درصد است، در حالی‌که این میزان در گروه دوم قبل از فعال سازی ٤۰/۰٦ درصد و بعد از فعال سازی نسبت به اووسیتهای فعال شده و اووسیتهای تزریق شده به ترتیب ٤۰/٦٦ و ۱٦/۲۸ درصد است. ۳) در گروه اول درصد اسپرمهای با وضعیت کروماتین دست نخورده (Intact)، نامتراکم (NCD)، و بخشی نامتراکم (PNCD)، مجموعاً ٤۰/۹۰ درصد و اسپرمهای PCC، ۵۹/۱۰ درصد می‌باشد. در حالی‌که این مقادیر در گروه دوم به ترتیب ٤۲/۰٦ و ۵۳/۲۸ درصد است. علاوه بر این در گروه دوم به علت فعال سازی مصنوعی، ٤/٦٦ درصد اسپرمها چرخه سلولی خود را ادامه داده و در اولین تقسیم میتوز متوقف شده‌اند.

نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که بین درصد CMA3 مثبت و لقاح در هر دو گروه بیماران رابطه معنی داری وجود دارد (گروه اول: r=-۰/۵۹۸، p=۰/۰۰۱ و گروه دوم: r=-۰/۳۳٤، p=۰/۰۰٦)، در حالی‌که بین درصد لقاح در اووسیتهای فعال شده با درصد CMA3 مثبت رابطه معنی داری دیده نمی‌شود (r=۰/۰٤۰، p=۰/۷٤۹). در گروه اول یک رابطه معنی داری بین درصد PCC و میزان لقاح وجود دارد (r=-۰/۳۵۷، p=۰/۰۰۹) در حالی‌که این رابطه در اووسیتهای لقاح یافته فعال شده در گروه دوم (r=-۰/۰۵۳، p=۰/۷۰۷) وجود ندارد. در گروه اول رابطه معنی داری بین درصد CMA3 مثبت و درصد PCC دیده نشد(r=۰/۱٤۵، p=۰/۲۹٤) در حالی‌که در اووسیتهای فعال شده بین درصد CMA3 مثبت و درصد PCC رابطه مستقیم معنی داری دیده شد (r=۰/۳٤۵، p=۰/۰۳٤). در اووسیتهای لقاح نیافته تحریک شده بین اسپرمهای دست نخورده (Intact)، نامتراکم (NCD) و بخشی نامتراکم (PNCD) با درصد CMA3 مثبت (r=-۰/۳٤۱، p=۰/۰۳٦) و درصد PCC (r=-۰/۸٤٦، p=۰/۰۰۱) رابطه معکوس معنی داری وجود دارد ولی چنین رابطه ای در گروه اول مشاهده نشد.

در این مطالعه بیماران بر اساس درصد CMA3 مثبت بیشتر و کمتر از ۳۰درصد در جدول ۳ گروه بندی شدند و میانگین پارامترهای مختلف در دو گروه با استفاده از آزمون t-test مقایسه شدند. آنالیز اطلاعات در این دو گروه از بیماران نشان می‌دهد که نه تنها میانگین میزان لقاح در دو گروه CMA3 مثبت بیشتر و کمتر از ۳۰درصد متفاوت است بلکه درصد اسپرمهای دست نخورده (Intact) و PCC نیز در دو گروه متفاوت هستند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ تعداد و انواع اووسیتهای به دست آمده، تزریق شده، لقاح یافته، فعال شده و آنالیز شده

گروه‌ها / اطلاعات مربوط به اووسیتها	گروه اول			گروه دوم		
	تعداد	کل/تعداد	درصد	تعداد	کل/تعداد	درصد
اووسیتهای به دست آمده از بیماران	۷٦٥	---	---	۹۲۰	---	---
اووسیتهای دارای ژرمینال وزیکل	٤٦	٤٦/۷٦٥	٦/۰۲	٥۹	٥۹/۹۲۰	٦/٤۲
اووسیتهای متافازI	۲۰	۲۰/۷٦٥	۲/٦۱	۲۰	۲۰/۹۲۰	۲/۱۸
اووسیتهای متافازII	٦۹۰	٦۹۰/۷٦٥	۹۰/۱۹	۸۰۱	۸۰۱/۹۲۰	۸۷/۰٦
اووسیتهای دژنره قبل از ICSI	۹	۹/۷٦٥	۱/۱۸	٤۰	٤۰/۹۲۰	٤/۳٤
اووسیتهای تزریق شده	٦۹۰	٦۹۰/۷٦٥	۹۰/۱۹	۸۰۱	۸۰۱/۹۲۰	۸۷/۰٦
اووسیتهای دژنره پس از ICSI	۱۹	۱۹/٦۹۰	۲/۷٦	٥۲	٥۲/۸۰۱	٦/٥۰
اووسیتهای باقیمانده پس از تزریق	٦۷۱	٦۷۱/٦۹۰	۹۷/۲٤	۷٤۹	۷٤۹/۸۰۱	۹۳/٥۰
اووسیتهای لقاح یافته	٤۰٤	٤۰٤/٦۷۱	٦۰/۲۰	٤٤۹	٤٤۹/۷٤۹	٥۹/۹٤
اووسیتهای لقاح نیافته	۲٦۷	۲٦۷/٦۷۱	۳۹/۸۰	۳۰۰	۳۰۰/۷٤۹	٤۰/۰٦
اووسیتهای لقاح یافته پس از فعال سازی	---	---	---	۱۷۸	۱۷۸/۳۰۰	٥۹/۳٤
اووسیتهای لقاح نیافته پس از فعال سازی	---	---	---	۱۲۲	۱۲۲/۳۰۰	٤۰/٦٦
اووسیتهای لقاح نیافته آنالیز شده	۱۷۹	۱۷۹/۲٦۷	٦۷/۰٤	۱۲۲	۱۲۲/۳۰۰	٤۰/٦٦
اووسیتهای متافاز۲	۱۳٤	۱۳٤/۱۷۹	۷٤/۸٦	٥۷	٥۷/۱۲۲	٤٦/۷۲
اووسیتهای متوقف شده در اولین تقسیم میتوزی	۰	۰/۰	۰	۳۷	۳۷/۱۲۲	۳۰/۳۲
اووسیتهای دژنره	۲٦	۲٦/۱۷۹	۱٤/٥۲	۲۸	۲۸/۱۲۲	۲۲/۹٦
اووسیتهای بدون اسپرم	۱٦	۱٦/۱۷۹	۸/۹۳	۱٥	۱٥/۱۲۲	۱۲/۲۹
اسپرمهای مشاهده شده در اووسیتهای لقاح نیافته	۱٥٤	۱٥٤/۱۷۹	۸٦/۰۳	۱۰۷	۱۰۷/۱۲۲	۸۷/۷۰
اسپرمهای Intact، NCD و PNCD	٦۳	٦۳/۱٥٤	٤۰/۹۰	٤٥	٤٥/۱۰۷	٤۲/۰٦
اسپرمهای PCC	۹۱	۹۱/۱٥٤	٥۹/۱۰	٥۷	٥۷/۱۰۷	٥۳/۲۸
اسپرمهای متوقف شده در اولین تقسیم میتوزی	۰	۰/۰	۰	٥	٥/۱۰۷	٤/٦٦

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. ارتباط بین CMA3 مثبت و درصد لقاح با پارامترهای مختلف در گروه اول و دوم

متغیرها / پارامترها	گروه اول				گروه دوم			
	درصد CMA3 مثبت		درصد لقاح		درصد CMA3 مثبت		درصد لقاح	
	R	P-value	R	P-value	R	P-value	R	P-value
درصد لقاح	-۰/۵۹۸	۰/۰۰۱*	---	---	-۰/۳۳٤	۰/۰۰٦	---	---
درصد لقاح پس از فعال سازی	---	---	---	---	۰/۰٤۰	۰/۷٤۹	۰/۰٤٤	۰/٦۹۰
درصد اسپرمهای PCC	۰/۱٤٥	۰/۲۹٤	-۰/۳٥۷	۰/۰۰۹	۰/۳٤٥	۰/۰۳٤	-۰/۰٥۳	۰/۷۰۷
درصد اسپرمهای Intact، NCD و PNCD	۰/۱٥٤	۰/۲٥٤	-۰/۲٥٤	۰/۰٦۹	-۰/۳٤۱	۰/۰۳٦	۰/۱۸۱	۰/۱۹٤

* is significant

جدول ۳. مقایسه پارامترهای مختلف در بیماران با CMA3 مثبت کمتر و بیشتر از ۳۰ درصد

بیماران / پارامترها	گروه اول			گروه دوم		
	CMA3<30% Mean ± SD	CMA3>30% Mean ± SD	P-value	CMA3<30% Mean ± SD	CMA3>30% Mean ± SD	P-value
درصد لقاح	٦٤/٦۹±۱۰/۰۰	۳٦/۸۷±۱۲/۸۰	۰/۰۰۱*	٦۹/۸۹±۱۷/۳۸	٥٥/۹۹±۲٤/٦۸	۰/۰۱۰
درصد اووسیتهای لقاح یافته پس از فعال سازی	---	---	---	٦٦/٦٦±٤۲/۱۰	٥۹/۷۸±۳۸/۹۸	۰/٥۱۱
درصد اووسیتهای آنالیز شده	۲/۰۷±۱/٦۰	۲/۱٤±۲/۱۰	۰/٤۸۰	۳۳/۳۳±٤۲/۱۰	٤۰/۲۱±۳۸/۹۸	۰/٥۱۱
درصد اسپرمهای CMA3 مثبت	۲۳/٦٦±٥/۹۰	٤٥/۸٤±۱۲/٤۰	۰/۰۰۱*	۲۱/۳٦±٦/۳٤	٥٤/٦٤±۱٥/٤۲	۰/۰۰۱*
درصد اسپرمهای Intact، NCD و PNCD	۱/۰۳±۰/۹۰	۱/۳۳±۱/۱۰	۰/۳۰۰	٦٥/۰۰±٤۷/٤۳	۲۷/۹٥±۳٥/۱۲	۰/۰۱۳
درصد اسپرمهای PCC	۱/۳٦±۱/۱۰	۲/۰۸±۱/۸۰	۰/۰٤۰	۲٥/۰۰±٤۲/٤۹	٦۱/۷۸±٤۲/۲٥	۰/۰۲٤

* is significant

بحث

با ورود اسپرم به داخل اووپلاسم فاکتور نامتراکم کننده هسته اسپرم (Sperm Nuclear Decondensation Factor : SNDF) وارد اسپرم شده و نامتراکم شدن سر اسپرم آغاز می‌شود. پس از ورود SNDF، سر اسپرم متورم شده و فاکتور فعال کننده اووسیت مترشحه از اسپرم نیز (Sperm Associated Oocyte Activating Factor : SAOAF) که در لایه تکای دور هسته ای قرار دارد به داخل اووسیت رها می‌شود و باعث غیر فعال شدن MPF می‌شود [۱۹و۲۰]. ٤-٥ ساعت پس از ورود اسپرم تقسیم میوز اووسیت کامل شده و سر اسپرم از تراکم خارج می‌شود که نیازمند جایگزینی پروتامین با هیستون است که به دنبال این وقایع پیش هسته‌ها نیز تشکیل می‌شوند [۱۹]. عدم لقاح می‌تواند در اثر ناتوانی اووسیت در القاء SNDF، فقدان جزئی یا کامل SAOAF اسپرم، غیر فعال نشدن MPF و وجود هیستون اضافی که منجر به ایجاد PCC می‌شود، رخ دهد. از دلایل اصلی عدم موفقیت در لقاح، عدم فعال شدن اووسیت و

www.SID.ir

Archive of SID

PCC است [۱-۳ و ۲۱].

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که میزان لقاح در گروه‌های اول و دوم بیماران به ترتیب ۶۰/۲۰ و ۵۹/۹۴ درصد است. آنالیز اووسیتهای لقاح نیافته نشان داد که ۸۷/۷۰ درصد آنها بعد از انجام ICSI دارای اسپرم هستند که این مطلب با گزارش فلاهرتی (Flaherty) در سال ۱۹۹۵ مطابقت دارد [۱۲]. درصد لقاح در گروه دوم بیماران به علت فعال سازی از ۵۹/۹۴ درصد(۷۴۹ / ۴۴۹) به ۸۳/۷۲ درصد (۷۴۹ / ۱۷۸+۴۴۹) افزایش یافته است که این مطلب تأیید نتایج محققان دیگر است [۱۶-۱۴] و نشان می‌دهد عدم فعال شدن اووسیت علت اصلی عدم موفقیت در لقاح در موارد درمانی به روش ICSI است. آنالیز کروماتین اووسیتهای لقاح نیافته فعال شده نشان داد که ۵۳/۲۸ درصد اووسیتها دارای اسپرم با وضعیت کروماتینی PCC بودند در حالی‌که در مابقی اووسیتها، اسپرم دارای وضعیتهای Intact، NCD، PNCD، متوقف شده در اولین تقسیم میتوزی و فاقد اسپرم بودند که این امر نشان می‌دهد که پس از عدم فعال شدن اووسیت، علت اصلی در عدم موفقیت لقاح در موارد پس از ICSI، PCC اسپرم است.

در هر دو گروه از بیماران یک رابطه معکوس بین CMA3 مثبت و لقاح دیده شد که همچون مطالعات قبلی [۶، ۲۲ و ۲۳] نشان می‌دهد که کمبود پروتامین در عدم لقاح نقش دارد، هر چند که عدم وجود نداشتن رابطه معنی‌دار بین PCC و CMA3 مثبت در گروه اول بیماران نشان می‌دهد که احتمالاً عوامل دیگری در القاء PCC نقش دارند. نتایج گروه دوم نشان می‌دهد که احتمالاً یکی از این عوامل عدم فعال شدن اووسیت است. با این وجود زمانی‌که عدم فعال شدن اووسیت با فعال سازی رفع شد یک رابطه معنی داری بین PCC و CMA3 مثبت دیده شد که نشان می‌دهد که بعد از عدم فعال شدن اووسیتها، PCC علت اصلی عدم لقاح است. آنالیز درصد PCC در بیماران با CMA3 مثبت کمتر یا بیشتر از ۳۰درصد با فرضیه بالا مطابقت دارد. علاوه بر آن در این دو زیر گروه از بیماران درصد لقاح و درصد اسپرم با سر دست نخورده اسپرم در اووسیتهای لقاح نیافته فعال شده به طور معنی داری متفاوت هستند. در بیماران با CMA3 مثبت کمتر از ۳۰درصد، متوسط تعداد اسپرم با سر دست نخورده بیشتر ولی در عوض متوسط درصد اسپرمهای PCC پایین بود. در حالی‌که در بیماران با CMA3 مثبت بیشتر از ۳۰درصد، متوسط تعداد اسپرم با سر دست نخورده کمتر ولی درصد اسپرم PCC بالاتر بود، که این یافته نیز با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد [۶ و ۹]. احتمالاً این نتایج نشان می‌دهد که در نمونه‌های دارای کمبود پروتامین، PCC دلیل اصلی عدم لقاح است.

همزمانی چرخه سلولی بین اسپرم و اووسیت بستگی به وضعیت کروماتین اسپرم دارد. زمانیکه اسپرم با ساختار نوکلئوپروتامین هسته خود وارد اووسیت با MPF فعال می‌شود و فعال شدن اووسیت آغاز می‌شود، MPF شروع به غیر فعال شدن می‌کند. در طی ساعات اولیه فعال شدن اووسیت با جایگزینی پروتامین با هیستون، سر اسپرم نامتراکم می‌شود و زمانیکه MPF غیر فعال شده است، اسپرم و اووسیت هر دو دارای ساختار نوکلئوهیستون بوده و در فاز G1 قرار دارند. بنابراین اگر اسپرمی با کمبود پروتامین جزئی یا کامل همانند گلوبواسپرمیا وارد اووسیت شود [۲۴]، PCC اتفاق افتاده و باعث عدم همزمانی بین چرخه سلولی اسپرم و اووسیت می‌شود که این وقایع در نهایت منجر به عدم موفقیت در لقاح می‌شود.

تحقیقات نشان داده است که اسپرم موشی که فاقد پروتامین نوع II (PII) است قادر به فعال نمودن اووسیت پس از انجام ICSI است [۲۵ و ۲۶]. این مطلب بیانگر این نکته است که امکان دارد هر یک از فاکتورها بطور مستقل از یکدیگر بر روند بیانگر لقاح تأثیر بگذارند.

در پایان می‌توان نتیجه گیری کرد که بعد از عدم فعال شدن اووسیت، کمبود پروتامین با القای PCC دلیل اصلی عدم موفقیت در لقاح در موارد پس از ICSI بوده و بطور مستقل از

www.SID.ir

Archive of SID

هم می‌توانند بر روند لقاح تأثیر داشته باشند.

تقدیر و تشکر

این مطالعه طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشکده رویان به شماره ۸-۸۰۰ است. نویسندگان بدینوسیله از همکاری مسئولین پژوهشکده رویان و بخش علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان که زمینه اجرای این تحقیق را فراهم آوردند، تقدیر و تشکر می‌نمایند.

References

1. Schmiady H, Sperling K, Kentenich H, Stauber M. Prematurely condensed human sperm chromosomes after in vitro fertilization (IVF). Hum Genet 1986; 74:441–443.
2. Tejada MI, Mendoza MR, Corcostegui B, Benito JA. Factors associated with premature chromosome condensation (PCC) following in vitro fertilization. J Assist Reprod Genet 1992; 9:61–67.
3. Mozdarani H, Aghdaei F. Cytogenetic analysis of failed fertilized oocytes from Iranian infertile women after in vitro fertilization (IVF) and Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) procedures. Middle East Fertil Soci J. 2001; 6: 216–225.
4. Johnson RT, Rao PN. Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. Nature 1970; 226: 717–722.
5. Rosenbuch BE. Frequency and patterns of premature sperm chromosome condensation in oocytes failing to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. J Assist Reprod Genet 2000; 17:253–259.
6. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mozdarani H, Mardani M, Azvagi H. Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. J Androl 2004a; 36:95–100.
7. Schmiady H., Tandler-Schneider A.,Kentenich H. Premature chromosome condensation of the sperm nucleus after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1996; 11(10) : 2239-2245.
8. Racowsky C, et al. Prematurely condensed chromosome and meiotic abnormalities in unfertilized human oocytes after ovarian stimulation with gonadotropin relasing hormone agonist. Fertil. Steril 1997; 67: 932-938.
9. Nasr-Esfahani MH, Naghshizadian N, Imani H, Razavi S, Mardani M, Kazemi S, Shahverdi H. Can sperm protamine deficiency induce sperm premature chromosomal condensation? J Androl 2006; 38:92-98.
10. Manicardi CC. Galli E., Malavasi A, Bonvinci Pogliai AM. DNA content in the nurse cell nuclei of viviparous and oviparous females of Megoura viciae (Homoptera, Aphididae). Invert Reprod Dev 1995; 28:1-6.
11. Carrel DT, Liu L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of know fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. J Androl 2001; 23:604–610.
12. Flaherty SP, Payne D, Mattews CD. Fertilization failures and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1998; 13(1): 155-64.
13. World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 1999.

www.SID.ir

Archive of SID

14. De Sutter P, Dozortsev D, Cieslak J, Wolf G, Verlinsky Y, Dyban A. Parthenogenetic activation of human oocytes by puromycin. J Assist Reprod Genet 1992; 9:328-37.
15. De Sutter P, Dozortsev D, Wolf G, Vrijens P, Desmet R, Dhont M. Cytogenetic analysis of human oocytes parthenogenetically activated by puromycin. J Assist Reprod Genet 1994;11:382-88.
16. Araki Y, Yoshizawa M, Abe H, Murase Y. Use of mouse oocytes to evaluate the ability of human sperm to activate oocytes after failure of activation by intracytoplasmic sperm injection.Zygote 2004; 12(2):111-6
17. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M. Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. J Assist Reprod Genet 2001; 18:219–225.
18. Tarkowski AK: An air drying method for chromosome preparations from mouse eggs. Cytogenetics 1996; 5: 394-400.
19. Dozortsev D, De Sutter P, Rybouchkin A, Dhont M. Timing of sperm and oocyte nuclear progression after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1995;10: 3012–3017.
20. Dozortsev D, Qian C, Ermilov A, Rybouchkin A, De Sutter P, Dhont M. Sperm-associated oocyte-activating factor is released from the spermatozoon within 30 minutes after injection as a result of the sperm-oocyte interaction. Hum Reprod 1997;12:2792-6.
21. Rawe VY, Brugo Olmedo S, Nodar F.N, Doncel G.D, Acosta A.A, Vitullo AD. Cytoskeletal organization defects and abortive activation in human oocytes after IVF and ICSI failure. Mol Hum Reprod 2000; 6(6):510-6.
22. Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A and Moghdam A. Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. Andrologia 2003; 35(2):38–243.
23. Esterhuizen AD, Franken DR, Becker PJ, Lourens JGH, Muller II, Van Rooyen LH. Defective sperm decondensation: a cause for fertilization failure. Andrology 2002; 34:1–7.
24. Blanchard Y, Lescoat D and Le Lannou D. Anomalous distribution of nuclear basic proteins in round-headed human spermatozoa. Andrologia 1990; 22: 549-55.
25. Cho C, Jung-Ha H, Willis WD, Goulding EH, Stein P, Xu Z, Schultz RM, Hecht NB and Eddy EM. Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. Biol Reprod 2003; 69, 211-17.
26. Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, Eddy EM. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. Nat Genet 2001; 28: 82-6.

www.SID.ir