مقاله تحقیقی

تأثیر کمبود پروتامین اسپرم بر میزان لقاح و شیوع تراکم پیش رس کروموزومی اسپرم پس از ICSI

شهناز رضوی .Ph.D*، حسین مزدارانی .Ph.D**، محمدحسین نصراصفهانی .Ph.D***، محمد مردانی .Ph.D*
حبیبه ازوجی .M.Sc*

*گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
**گروه ژنتیک دانشگاه تربیت مدرس و پژوهشکده رویان
***گروه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان

تاریخ وصول: اردیبهشت ماه ۸۲، تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۸۲

چکیده

هدف: بعد از آنوپلوئیدی، تراکم پیش رس کروماتین اسپرم (PCC: Premature Chromosome Condensation) مهمترین عامل عدم موفقیت لقاح است. بنابراین هدف از این مطالعه ارزیابی تأثیر کمبود پروتامین اسپرم بر PCC اسپرم پس از روش درمانی ICSI است.

مواد و روشها: شیوع PCC اسپرم در تخمکهای لقاح نیافته پس از ICSI (Intrasytoplasmic sperm injection) از طریق آنالیز سیتوژنتیک مشخص شد و نتایج به‌دست آمده با کمبود پروتامین که به‌وسیله رنگ‌آمیزی کروموماپسین A3 ارزیابی شده‌بود مقایسه گردید.

یافته‌ها: شیوع PCC اسپرم و میزان لقاح اختلاف معنی‌داری در دو گروه بیماران با CMA3 مثبت بیشتر و کمتر از ۳۰ درصد داشت. ارتباط معنی‌داری نیز بین کمبود پروتامین با میزان لقاح مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: کمبود پروتامین در اسپرمهای تزریق شده به داخل تخمکها می‌تواند آنها را مستعد PCC نماید و احتمالاً از این طریق منجر به کاهش درصد لقاح پس از ICSI شود.

واژه‌های کلیدی: کمبود پروتامین، PCC، ICSI، لقاح، CMA3

مقدمه

روش درمانی تزریق داخل سیتوپلاسمی اووسیت (ICSI)، که به‌عنوان یک روش مناسب برای درمان ناباروری در موارد ناباروری با فاکتور مردانه پیشنهاد می‌شود. با وجود تزریق مستقیم اسپرم به داخل اووسیت، تعداد زیادی از اووسیتها لقاح نیافته و میزان موفقت لقاح به روش ICSI مشابه روش IVF، بین ۵۰ تا ۷۰ درصد است [۱ و ۲].

آنالیز سیتوژنتیکی اووسیتهای لقاح نیافته انسان نشان می‌دهد که بعد از آنوپلوئیدی، تراکم پیش رس کروموزوم اسپرم مهمترین عامل عدم موفقیت لقاح در روشهای درمانی IVF یا ICSI است [۵-۳].

هنگامی که یک سلول متافازی مانند اووسیت بالغ با یک سلول انترفازی تلفیق می‌شود غشای هسته انترفازی ناپدید شده و کروموزومها متراکم می‌شوند. این پدیده را تراکم پیش رس کروموزومی (PCC) می‌نامند. فاکتور میتوتیک مسؤول ایجاد PCC پروتئینی است که در طول فاز G2 سنتز شده و با رسیدن به یک حد آستانه باعث شروع میوز می‌شود.

آدرس مکاتبه: اصفهان، دانشگاه علوم‌پزشکی اصفهان، گروه علوم‌تشریح
Email: Razavi@med.mui.ac.ir

این فاکتور مشابه یا همان فاکتور تسریع کننده بلوغ (MPF: Maturation Promoting Factor) است که از یک کمپلکس پروتئین کیناز P34cdc2 و سیکلین B تشکیل شده است [۶ و ۸].

طی تقسیم میوز، سطح MPF در طول میوز I و II افزایش یافته و بلافاصله پس از لقاح کاهش می‌یابد. این پروتئینها توانایی القای شکستن غشای وزیکول ژرمینال و تراکم کروموزومهای اووسیت را دارند [۹]. نفوذ اسپرم به داخل اووسیت باعث فعال شدن اووسیت شده که نتیجه آن تکمیل تقسیم میوز و تشکیل پرونوکلئوسهای نر و ماده است. اما اگر با وجود ورود اسپرم به داخل اووسیت در متافاز II، اووسیت فعال نشود و در متافاز II باقی بماند، سر اسپرم دچار تراکم پیش رس کروموزومی (PCC) می‌شود [۱۰ و ۱۱].

به جز موارد اندکی که عدم فعال شدن اووسیت با مسأله توارثی در اووسیت ارتباط دارند، عدم بلوغ سیتوپلاسمی اووسیت یکی از عوامل القای PCC است [۱۱]؛ اما اخیراً عوامل دیگری مانند آنومالیهای کروماتین اسپرم را به عنوان عامل ایجاد کننده PCC معرفی می‌کنند [۱۲]. یکی از آنومالیهای اسپرم، کمبود پروتامین است، مطالعات قبلی نشان داده است که کمبود پروتامین به طور مستقل بر میزان لقاح در IVF و ICSI تأثیر دارد [۱۶-۱۳] همچنین کمبود پروتامین با آنومالیهای مورفولوژیک اسپرم ارتباط دارد [۱۷ و ۱۸]. بنابراین هدف این مطالعه ارزیابی ارتباط بین کمبود پروتامین و اختلالات مورفولوژیکی اسپرم با میزان لقاح و شیوع PCC پس از انجام روش درمانی ICSI است.

مواد و روشها

اووسیتها از ۵۶ بیمار مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان که کاندید ICSI بودند، به دست آمد. میانگین سنی زنان (۳۰/۲۰±۶/۳) و میانگین سنی مردان (۳۵/۲۵±۴/۹) بود. همه بیماران در طول فاز لوتئال برای ساپرس غده هیپوفیز از آگونیست GnRH بنام Superfact (Burserilin acetate, Germany, Hoechst) و به دنبال آن از HMG (Germany, Ferring) برای سوپر اوولاسیون و از HCG (organon, Holland) برای تخمک‌گذاری استفاده نمودند و همچنین برای تقویت فاز لوئتال پروژسترون واژینال تجویز شد.

مراحل آماده‌سازی اسپرم

نمونه‌های سیمن در روز تخمک‌گذاری بعد از ۳ تا ۴ روز خودداری از مقاربت توسط بیماران جمع‌آوری شد. بخشی از نمونه سیمن با استفاده از Pure Sperm gradients (Nidacone, Gothenburg, Sweden) برای انجام روش ICSI آماده و باقیمانده نمونه سیمن برای آنالیز روتین استفاده شد. بعد از تزریق اووسیتها از باقیمانده نمونه اسپرم شستشو شده برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم و کمبود پروتامین (رنگ‌آمیزی کروموماپسین A3) استفاده شد. در هر اسمیر ۲۰۰ اسپرم برای هر دو نوع رنگ‌آمیزی بررسی شدند.

ارزیابی مورفولوژی اسپرم

اسمیر نمونه سیمن آماده شده با روش پاپانیکولائو رنگ شد و مورفولوژی اسپرم طبق معیار Strict Criteria ارزیابی شد [۲۰].

آماده‌سازی اووسیت

بعد از تخمک‌گیری، اووسیت‌ها در محیط IVF-20 حاوی هیالورونیداز (ST.Louis, Sigma, ۸۰Iu/ml) قرار گرفتند تا سلولهای کومولوس - کرونا از اووسیت‌ها جدا شوند. سپس اووسیت‌ها سه بار در محیط IVF-20 شستشو شده و اووسیتها و زونا پلوسیدا برای وجود وزیکول ژرمینال یا اولین جسم قطبی زیر میکروسکوپ اینورت (۲۰۰×) ارزیابی شدند. اووسیتهایی که دارای اولین جسم قطبی بوده و در متافاز II قرار داشتند برای انجام ICSI استفاده شدند.

تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)

بعد از جمع‌آوری اووسیتها و شستشوی آنها در محیط IVF-20 تخمک‌ها به قطرات محیط حاوی HEPES در زیر روغن در داخل یک دیش پتری فالکون ۱۰۰۶ منتقل شدند.

اسپرم شستشو شده هم به قطره PVP منتقل شد و از میکرومانیپیلاتور اپندروف نصب شده روی میکروسکوپ اینورت (Nikon) برای تزریق اسپرم استفاده شد. بدین ترتیب که اسپرم با بهترین مورفولوژی از جمعیت اسپرمی انتخاب شده و پس از بی‌حرکت شدن، اسپرم به داخل یک پیپت تزریق کشیده شده و به داخل اووسیت تزریق شد و اووسیتهای تزریق شده در محیط rsI (Vitro life, Gothenburg, Sweden) انکوبه شدند. اووسیتهای Post mature و Immature از این مطالعه حذف شدند.

ارزیابی لقاح و تکامل رویان

۱۲ تا ۱۸ ساعت پس از انجام ICSI، اووسیتهای تزریق شده برای وجود پیش هسته‌ها و اجسام قطبی مطالعه شدند. اگر دو پرونوکلئوس مجزا با هستک وجود داشت، اووسیت‌ها لقاح یافته محسوب می‌شدند. ارزیابی کلیواژ پس از ICSI، یک‌بار بعد از ۴۲ ساعت و بار دیگر پس از ۶۶ ساعت انجام شد.

مطالعه سیتوژنتیکی اووسیتهای لقاح نیافته

۱۷۹ اووسیت لقاح نیافته برای آنالیز سیتوژنتیکی طبق روش Ma و همکارانش آماده شد [۳]؛ بدین ترتیب که اووسیتهای لقاح نیافته در محلول هیپوتونیک سیترات سدیم ۱ درصد برای ۱۰ دقیقه در هوای اتاق قرار گرفتند. هر اووسیت با حداقل مقدار محلول هیپوتونیک در تثبیت‌کننده A (آب مقطر، اسید استیک، متانول به نسبتهای ۵:۴:۱) برای ۴۰-۳۰ دقیقه قرار گرفت، سپس به یک لام منتقل شده و سه قطره از تثبیت‌کننده B (متانول. اسید استیک ۳:۱) روی آن چکانده شد. لامهای آماده شده با گیمسای ۱۰ درصد در بافرفسفات (pH=۸/۶) برای ۲ دقیقه رنگ‌آمیزی و زیر میکروسکوپ نوری (۱۰۰۰×) بررسی شدند.

ارزیابی کمبود پروتامین (رنگ‌آمیزی کروموماپسین A3)

مایع سیمن در محلول کارنوی (متانل، اسید استیک گلاسیال ۳:۱ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه تثبیت و پس تهیه اسمیر از نمونه‌های تثبیت شده رنگ‌آمیزی CMA3 با ۱۰۰ میکرولیتر محلول CMA3 با غلظت ۰/۲۵mg/ml در بافر مک الوین (۷ml اسید استیک ۰/۲M $Na_2Hpo_4 - 7H_2O$ ۳۲/۹ml+۰/۱M بـا pH=۷، حاوی ۱۰mM کلرید منیزیم) به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت. سپس اسمیر با بافر شسته شده و با استفاده از بافر گلیسرول (۱:۱) مونت گردید. آنالیز میکروسکوپی لامها با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنت (Nikon, Eclipse 600 Japan) و با فیلترهای ۴۶۰-۴۷۰nm انجام شد. اسپرمهای با رنگ زرد درخشان CMA3 مثبت و اسپرمهای با رنگ زرد تیره CMA3 منفی ارزیابی شدند.

نتایج با آزمونهای آماری ضریب همبستگی و t-Test با استفاده از نرم‌افزار SPSS-10 بررسی و تحلیل شدند.

یافته‌ها

جزئیات تعداد و انواع اووسیتهای به دست آمده، تزریق شده و جزئیات آنالیز سیتوژنتیکی اووسیت‌های لقاح نیافته بعد از انجام ICSI در جدول ۱ خلاصه شده است. در این مطالعه ۷۵۶ اووسیت از ۵۶ بیمار به دست آمد که از ۶۹۰ اووسیت تزریق شده ۴۰۴ اووسیت لقاح یافتند. از ۲۶۷ اووسیت لقاح نیافته پس از انجام ICSI، ۱۷۹ اووسیت قابل آنالیز بودند. از این تعداد ۱۲۰ اووسیت در مرحله متافاز II (۶۷/۰۴٪) و ۱۴ اووسیت به صوت دیپلوئید (۷/۸٪) یک اووسیت به صورت PCC (۰/۵۵٪)، ۱۸ اووسیت به صورت متراکم (۱۰/۰۵٪)، ۷ اووسیت دژنره (۳/۹٪)، ۳ اووسیت نامتراکم (۱/۶٪) و ۱۶ اووسیت خالی (۸/۹٪) بودند.

از اووسیتهای لقاح نیافته قابل آنالیز ۱۵۴ اووسیت حاوی اسپرم بودند که ۶۳ اسپرم به صورت دست نخورده (Intact) (۴۰/۹٪) و ۹۱ اسپرم به حالت PCC (۵۹/۰۹٪) در اووسیتها مشاهده شدند (جدول ۱).

در این مطالعه بیماران براساس درصد CMA3 مثبت بیشتر و کمتر از ۳۰ درصد گروه‌بندی شدند و میانگین پارامترهای مختلف در دو گروه با استفاده از آزمون t-test مقایسه شدند. جدول ۲ نشان می‌دهد که فقط میانگین درصد لقاح و تعداد

PCC اسپرم در اووسیتهای متافاز II آنالیز شده اختلاف معنی‌داری را در بین دو گروه دارد (جدول ۲).

جدول ۱. تعداد و انواع اووسیتهای به‌دست آمده، تزریق شده و جزئیات آنالیز سیتوژنتیکی اووسیتهای لقاح نیافته بعد از روش ICSI

	تعداد	تعداد/ کل	درصد
تعداد بیماران	۵۶	–	–
تعداد کل اووسیت‌های به‌دست آمده	۷۶۵	–	–
تعداد اووسیتهای وزیکول ژرمینال	۴۶	۴۶/۷۶۵	۶/۰۱۳
تعداد اووسیتهای متافاز I	۲۰	۲۰/۷۶۵	۲/۶۱۴
تعداد اوسیتهای متافاز II	۶۹۰	۶۹۰/۷۶۵	۹۰/۱۹
تعداد اووسیتهای تغییرشکل یافته	۹	۹/۷۶۵	۱/۱۷۶
تعداد اووسیتهای تزریق شده	۶۹۰	–	–
تعداد اووسیتهای دژنره	۱۹	۱۹/۶۹۰	۲/۷۵
تعداد اووسیتهای لقاح یافته	۴۰۴	۴۰۴/۶۹۰	۵۸/۵۵
تعداد اووسیتهای لقاح نیافته	۲۶۷	۲۶۷/۶۹۰	۳۸/۷۰
تعداد اووسیتهای آنالیز شده	۱۷۹	–	–
تعداد اووسیتهای متافاز II	۱۲۰	۱۲۰/۱۷۹	۶۷/۰۴
تعداد اووسیتهای دیپلوئید	۱۴	۱۴/۱۷۹	۷/۸۲۱
تعداد اووسیتهای PCC	۱	۱/۱۷۹	۰/۰۵۵
تعداد اووسیتهای متراکم	۱۸	۱۸/۱۷۹	۱۰/۰۵
تعداد اووسیتهای تزریق‌شده	۷	۷/۱۷۹	۳/۹۱۰
تعداد اووسیتهای نامتراکم	۳	۳/۱۷۹	۱/۶۷۵
تعداد اووسیتهای خالی	۱۶	۱۶/۱۷۹	۸/۹۳۸
تعداد اسپرم مشاهده شده در اووسیت	۱۵۴	–	–
تعداد اسپرمهای دست نخورده	۶۳	۶۳/۱۵۴	۴۰/۹۱
تعداد اسپرمهای PCC	۹۱	۹۱/۱۵۴	۵۹/۰۹

جدول ۳ ارتباط بین میزان لقاح، کمبود پروتامین $CMA3^+$، مورفولوژی اسپرم، درصد PCC اسپرم و تعداد اووسیت را نشان می‌دهد. از بین این پارامترها، کمبود پروتامین ($CMA3^+$)، تعداد کل اووسیتها و درصد PCC اسپرم ارتباط معنی‌داری با میزان لقاح در ICSI دارند. همان‌طور که مشاهده می‌شود بین کمبود پروتامین اسپرم و درصد PCC آن ارتباط معنی‌داری وجود ندارد ($r=0.145$, $P=0.294$) (جدول ۳).

جدول ۲. مقایسه فاکتورهای مختلف در بیماران با CMA3 مثبت کمتر و بیشتر از ۳۰ درصد در بیماران ICSI

	گروه A CMA3<٪۳۰ Mean±SD	گروه B CMA3>٪۳۰ Mean±SD	P-Value
سن زن	۳۰/۵۸±۵/۹	۲۹/۷۶±۶/۷	۰/۶۳۹
سن مرد	۳۵/۴۸±۴/۳	۳۵±۵/۶	۰/۷۲۸
تعداد اووسیت متافاز II	۱۳/۴۴±۶/۵	۱۳/۱۶±۶/۶	۰/۸۷۵
تعداد اووسیت لقاح یافته	۹/۰۳±۴/۴	۵/۶۸±۴/۱	۰/۰۰۶
درصد لقاح	۶۴/۶۹±۱۰	۳۶/۸۷±۱۲/۸	۰/۰۰۰
درصد کلیواژ	۸۴/۱۳±۲۳/۶	۸۵/۶۱±۲۵/۶	۰/۸۳۰
درصد بارداری	۱۶/۱۲±۳۷/۳۸	۸/۰۰±۲۷/۶۸	۰/۰۶۶
درصد مجموع GV و اووسیتهای بدون جسم قطبی	۴/۴±۸/۳	۱۱/۲۰±۱۵/۶	۰/۰۵۸
تعداد اووسیتها متافاز II آنالیز شده	۲/۰۷±۱/۶	۲/۴۱±۲/۱	۰/۴۸۰
درصد اسپرم با مورفولوژی طبیعی	۲۹/۳۸±۱۴	۲۳/۶۶±۱۰/۵	۰/۰۹۹
درصد اسپرم با مورفولوژی سرطبیعی	۳۳/۳۳±۱۰/۶	۳۸/۴۴±۹/۷	۰/۰۶۹
درصد اسپرم CAM3 مثبت	۲۳/۶۶±۵/۹	۴۵/۸۴±۱۲/۴	۰/۰۰۰
درصد اسپرم intact در اووسیت‌های متافاز II	۱/۰۳±۰/۹۰	۱/۳۳±۱/۱	۰/۳۰۰
درصد PCC اسپرم در اووسیت‌های متافاز II	۱/۳۶±۱/۱	۲/۰۸±۱/۸	۰/۰۴۰

جدول ۳. ارتباط بین میزان لقاح با کمبود پروتامین ($CMA3^+$) و مورفولوژی اسپرم، درصد PCC اسپرم و تعداد اووسیتها.

Variants	r	P-Value
درصد تعداد اووسیتها	-۰/۳۴۳	۰/۰۱۳
درصد کلیواژ	۰/۱۲۶	۰/۳۶۳
درصد CAM3	-۰/۵۹۸	۰/۰۰۰
درصد PCC اسپرم	-۰/۳۵۷	۰/۰۰۹
درصد مورفولوژی نرمال اسپرم	۰/۱۶۱	۰/۲۴۵

بحث

در طول اسپرمیوژنز ۸۵ درصد هیستون هسته اسپرم با پروتامین جایگزین می‌شود که نتیجه آن تراکم کروماتین اسپرم است. چنین اسپرمهایی که در فاز G1 قرار دارند وقتی وارد اووسیت متافاز II می‌شوند، در برابر تشکیل PCC محافظت می‌شوند زیرا MPF فعال قادر به واکنش با پروتامین همراه DNA نیست. بعد از لقاح، MPF غیرفعال شده و با تکمیل تقسیم میوز اووسیت وارد فاز G1 می‌شود. در طول این مدت پروتامین به تدریج با هیستونها جایگزین شده و از طریق این مکانیسم سیکل سلولی در دو سال همزمان می‌شود. اگر اسپرم دارای هیستون اضافی باشد مستعد PCC است زیرا MPF روی نوکلئوهیستون تأثیر دارد و درجه PCC به میزان هیستون اضافی در هسته بستگی دارد. در مطالعه حاضر آنومالیهای کروماتین اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی کروموماپسین A3 ارزیابی شد که یک تست مفید و حساس برای ارزیابی آنومالی‌های کروماتین اسپرم به ویژه وجود هیستون اضافی و کمبود پروتامین است [۱۲ و ۱۳].

میزان شیوع PCC اسپرم در مطالعات قبلی بین ۱۰/۱ تا ۷۴/۴ درصد با میانگین ۴۱ درصد گزارش شده است [۱۲]. در مطالعه حاضر؛ آنالیز سیتوژنتیکی اووسیتهای لقاح نیافته انسان پس از ICSI نشان داد که در ۵۹/۰۹ درصد از اووسیتهای متافاز II درجات متفاوتی از PCC اسپرم وجود دارد، در حالی که بدشکلی‌های کروماتین اووسیت در درصد کمی از اووسیتهای لقاح نیافته مشاهده شده است (جدول ۱). یکی از علل فراوانی PCC اسپرم عدم بلوغ اووسیت است که می‌تواند به علت پروتکلهای مختلف تحریک تخمگذاری باشد [۱۲، ۲۲ و ۲۳].

اگرچه در این مطالعه ارتباط معنی داری بین کمبود پروتامین و درصد شیوع PCC اسپرم در اووسیت‌های لقاح نیافته مشاهده نشد ولی نتایج مطالعه حاضر نشان داد (جدول ۲) که میانگین تعداد PCC اسپرم در بیماران CMA3 مثبت بیشتر از ۳۰ درصد (کمبود پروتامین) در مقایسه با گروه CMA3 مثبت کمتر از ۳۰ درصد بیشتر است. در حالی که سایر پارامترها مانند تعداد اووسیت‌های متافاز II، درصد اووسیتهای متافاز I یا وزیکول ژرمینال (به جز میزان لقاح) در دو گروه مشابه هستند.

اگرچه افزایش شیوع PCC اسپرم می‌تواند تحت تأثیر درصد لقاح پایین در بیماران CMA3 مثبت بیشتر از ۳۰ درصد باشد اما همچنان شیوع PCC اسپرم در این گروه بالاتر است که نشان می‌دهد کمبود پروتامین اسپرم می‌تواند به‌عنوان یکی از فاکتورهای عدم موفقیت لقاح از طریق القای PCC اسپرم محسوب شود.

میزان شیوع PCC اسپرم بین دو روش درمانی ICSI, IVF در چندین مطالعه مقایسه شده است. بعضی از محققین معتقدند که اختلافی بین شیوع PCC در این دو روش درمانی وجود ندارد [۲۲ و ۲۴]. در حالی که عده‌ای دیگر معتقدند اختلاف معنی‌داری بین شیوع PCC در این دو روش درمانی وجود دارد [۴، ۲۵ و ۲۶]. این اختلاف می‌تواند به علت بیشتر بودن کمبود پروتامین در بیماران ICSI باشد زیرا احتمال تزریق اسپرم با کمبود پروتامین در روش ICSI بیشتر است؛ در حالی که در IVF، زوناپلوسیدا به‌عنوان یک سد فعال برای ورود اسپرمهای غیرطبیعی مانند اسپرمهای دارای کمبود پروتامین عمل می‌کند.

در مطالعات مختلف، حالتهای متفاوتی از PCC به صورت کاملاً متراکم، ساختمان‌گرد یا بیضوی با علایم خروج از تراکم در محیط تا تراکم پیش رس کروموزوم‌های قابل تفکیک اسپرم گزارش شده است [۲۷]. وجود رشته‌های بیرون زده کروموزوم از هسته (hatching pieces of chromosomses) در PCC اسپرم پس از ICSI نشان داده شده است در حالی که بعد از IVF این توده‌ها به ندرت دیده می‌شود و کروموزوم‌ها در PCC بیشتر به صورت مجزا وجود دارند [۲۸]. این اختلاف می‌تواند با وضعیت متفاوت اسپرم در روشهای IVF و ICSI ارتباط داشته باشد [۲۲]. در روش ICSI کل اسپرم محصور در غشای سیتوپلاسمی به داخل اووسیت تزریق می‌شود در حالی که در IVF، اسپرم قبل از ورود به اووسیت تحت واکنش آکروزومی قرار می‌گیرد و اتصال اسپرم با اوولما منجر به ایجاد علامتی برای فعال شدن اووسیت می‌شود. حال اگر اووسیت فعال نشود و رکود در مرحله متافاز II ادامه یابد فاکتور متراکم کننده کروموزوم موجود در اووپلاسم به داخل هسته اسپرم نفوذ کرده و PCC را القا می‌نماید [۴]. وجود درجات متفاوت PCC در IVF و ICSI می‌تواند به علت تفاوت در تکنیک لقاح یا به

علت انتخاب نوع بیمار باشد. اغلب بیماران تحت روش درمانی ICSI قرار می‌گیرند که دارای اختلاف فاکتورهای اسپرمی هستند، در حالی که بیمارانی کاندید روش IVF هستند که اکثراً دارای اسپرم با پارامترهای طبیعی‌اند [۲۹].

نتایج مطالعه حاضر (جدول ۳) و مطالعات قبلی ما نشان می‌دهد که بین میزان لقاح و درصد کمبود پروتامین پس از انجام ICSI ارتباط وجود دارد [۱۵].

این نتایج (جدول ۳) با نتایج آقای Esterhuizen و همکارانش مطابقت دارد. آنها نشان دادند که در هر دو روش IVF و ICSI استفاده از نمونه‌هایی که CMA3 مثبت بالاتر از ۶۰ درصد دارند میزان لقاح را کاهش می‌دهد [۳۰]. همچنین در مطالعات قبلی هیچ ارتباطی بین مورفولوژی اسپرم (در کل جمعیت اسپرمی) و میزان لقاح بعد از ICSI نشان داده نشده است. نتایج جدول ۳ نیز ارتباطی بین مورفولوژی اسپرم و میزان لقاح پس از ICSI را نشان نمی‌دهد [۳۱ و ۳۲]. عدم ارتباط بین این دو پارامتر احتمالاً به دلیل تزریق اسپرم با مورفولوژی طبیعی در روش ICSI است و اختلالات کروماتین اسپرم نیز صرفاً از طریق ارزیابی مورفولوژی اسپرم قابل بررسی نیستند [۱۳].

لازم به ذکر است که محققان برخلاف نتایج فوق گزارش داده‌اند که اگر مورفولوژی اسپرم به هنگام تزریق به داخل اووسیت بررسی شود، ارتباط بین مورفولوژی اسپرمهای تزریق شده و درصد لقاح مشاهده می‌شود [۳۳ و ۳۴]. Bartoov و همکارانش علاوه بر این نکات نشان دادند که بین طبیعی بودن هسته اسپرم نسبت به مورفولوژی کل اسپرم با میزان لقاح ارتباط قویتری وجود دارد [۳]. جایگزینی پروتامین به جای هیستون در طول اسپرمیوژنز نقش مهمی در تراکم کروماتین، تشکیل و مورفولوژی سر اسپرم دارد بنابراین وجود ارتباط معنی‌دار بین کمبود پروتامین و میزان لقاح تعجب‌آور نبوده و می‌توان گفت که کمبود پروتامین سبب القای PCC اسپرم و عدم موفقیت لقاح می‌شود [۲۰ و ۳۵]. بنابراین هر روش درمانی که بتواند اسپرمهای دارای کمبود پروتامین را حذف یا تعداد چنین اسپرمهایی را در نمونه کاهش دهد برای انجام IVF یا ICSI توصیه می‌شود [۳۶ و ۳۷].

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری متخصصین زنان و نازایی و پرسنل آزمایشگاه نازایی مرکز باروری و ناباروری اصفهان و همچنین از همکاری مسؤولین پژوهشکده رویان و همکاران بخش علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که زمینه اجرای این تحقیق را فراهم آوردند تقدیر و تشکر می‌نماییم. کلیه هزینه‌های مصرفی و غیرمصرفی این تحقیق بر مبنای قرارداد شماره ۸۱۱۳۸ از بودجه دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأمین شده است.

References

1. **Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC.** Pregnancy after intra-cytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte. Lancet. 1992; 340: 17-18
2. **Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenwillen C, Tournay H, Deroey PC.** Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection by subzonal insemination: Report of a second series of 300 consecutive treatment. Hum Reprod. 1993; 8: 1055-1060
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. MEFS J. 2001; 6(3): 216-225
4. **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
5. **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(1): 61-67
6. **Johnson RT, Rao PN.** Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. Nature, London. 1970; 226: 717-722
7. **Murray AW, Kirschner MW.** Dominoes and clocks:

the union of two views of the cell cycle. Sciences. 1989; 3; 246(4930): 614-621

8. **Hirano T, Mitchison TJ.** Cell cycle control of higher-order chromatin assembly around naked DNA in vitro. J Cell Biol. 1991; 115(6): 1479-1489
9. **Kubiak JZ, Weber M, de Pennart H, Winston NJ, Maro B.** The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. EMBO J. 1993; 12(10): 3773-3778
10. **Sunkara PS, Wright DA, Rao PN.** Mitotic factors from mammalian cells: a preliminary characterization. J Supramol Struct. 1979; 11(2): 189-195
11. **Calafell JM, Badenas J, Egozcue J, Santalo J.** Premature chromosome condensation as a sign of oocyte immaturity. Hum Reprod. 1991; 6(7): 1017-1021
12. **Schmiady H, Kentenich H.** Premature chromosome condensation after in-vitro fertilization. Hum Reprod. 1989; 4(6): 689-695
13. **Rosenbuch BE.** Frequency and patterns of permature sperm chromosome condensation in oocytes failing to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. J Assist Reprod Genet. 2000; 17(5): 253-259
14. **Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M.** Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilizatin. J Assist Reprod Genet. 2001; 18(4): 199-205
15. **Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghadam A.** Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post ICSI. J Androl. 2003; 35: 238-243
16. **Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagnar I, Jaquenoud N, Manicardi G, Campana I.** Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1996; 11: 837-843
17. **Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JGH, Van Zyl C, Muller II, Van Rooyen LH.** Chromatin packaging as an indicator of human sperm disfunction. J Assist Reprod Genet. 2000; 17(9): 508-514
18. **Franken DR, Franken CJ, de la Guerre H, de Villiers A.** Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. Andrologia. 1999; 31(6): 361-366
19. **Esterhuizen AD, Franken DR, Becker PJ, Lourens JG, Muller II, van Rooyen LH.** Defective sperm decondensation: a cause for fertilization failure. Andrologia. 2002; 34(1): 1-7
20. **Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S.** Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. Fertil Steril. 1988; 49: 112-117
21. **Ma S, Kalousek DK, Yuen BH, Gomel V, Katagiri S, Moon YS.** Chromosome investigation in in vitro fertilization failure. J Assist Reprod Genet. 1994; 11(9): 445-451
22. **Balhorn R.** A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. J Cell Biol. 1982 May; 93(2): 298-305
23. **Iranpour FG, Nasr-Esfahani MH, Valojerdi MR, al-Taraihi TM.** Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility. J Assist Reprod Genet. 2000; 17(1): 60-66
24. **Zenzes MT, de Geyter C, Bordt J, Schneider HP, Nieschlag E.** Abnormalities of sperm chromosome condensation in the cytoplasm of immature human oocytes. Hum Reprod. 1990; 5(7): 842-846
25. **Plachot M, Crozet N.** Fertilization abnormalities in human in-vitro fertilization. Hum Reprod. 1992; 7(Suppl 1): 89-94
26. **Ma S, Yuen BH.** Intracytoplasmic sperm injection could minimize the incidence of prematurely condensed human sperm chromosomes. Fertil Steril. 2001; 75(6): 1095-1101
27. **Bergere M, Selva J, Volante M, Dumont M, Hazout A, Olivennes F, Frydman R.** Cytogenetic analysis of uncleaved oocytes after intracytoplasmic sperm injection. J Assist Reprod Genet. 1995; 12(5): 322-325
28. **Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Mattews CD.** Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1995;

10(10): 2623-2629

29. **Dozortsev D, De Sutter P, Dhont MV.** Behaviour of spermatozoa in human oocytes displaying no or one pronucleus after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1994; 9(11): 2139-2144
30. **Edirisinghe WR, Murch A, Junk S, Yovich JL.** Cytogenetic abnormalities of unfertilized oocytes generated from in-vitro fertilization and intr-acytoplasmic sperm injection: a double-blind study. Hum Reprod. 1997; 12(12): 2784-2791
31. **Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JG, Prinsloo E, van Rooyen LH.** Sperm chromatin packaging as an indicator of in-vitro fertilization rates. Hum Reprod. 2000; 15(3): 657-661
32. **Svalander P, Jakobsson AH, Forsberg AS, Bengtsson AC, Wikland M.** The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to 'strict criteria' sperm morphology. Hum Reprod. 1996; 11(5): 1019-1022
33. **Lundin K, Soderlund B, Hamberger L.** The relationship between sperm morphology and rates of fertilization, pregnancy and spontaneous abortion in an in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection programme. Hum Reprod. 1997; 12(12): 2676-2681
34. **De Vos A, Van De Velde H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A.** Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 2003; 79(1): 42-48
35. **Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y.** Real-time fine morphology of motile human sperm cell is associated with IVF-ICSI outcome. J Androl. 2002; 23(1): 18-26
36. **Fawcett DW, Anderson WA, Phillips DM.** Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. Dev Biol. 1971; 26(2): 220-251
37. **Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M, Tofigh Hesabi S.** Efficiency of Sil-Select and Percoll to recover spermatozoa with normal chromatin and morphology and the effect of these parameters on fertilization, embryo quality and cleavage score. MEFS J. 2003; 8(1): 36-42
38. **Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U.** The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. Hum Reprod. 2000; 15(5): 1112-1116