

تاثیر کمبود پروتامین در اسپرم انسان بر تراکم زودرس کروموزوم

ندا نقشی‌زادیان ^{M.Sc.}، حسین ایمانی ^{Ph.D.}، محمدحسین نصر اصفهانی ^{Ph.D.}، شهناز رضوی ^{Ph.D.}

حسین مژدارانی ^{Ph.D.}، محمد مردانی ^{Ph.D.}

* کارشناس ارشد گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

** استادیار گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی بقية الله و عضو گروه جنین شناسی

پژوهشکده رویان

*** استادیار پژوهش گروه جنین شناسی پژوهشکده رویان

**** استادیار گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

***** استاد گروه ژنتیک دانشگاه تربیت مدرس و عضو گروه ژنتیک پژوهشکده رویان

تاریخ وصول: شهریور ماه ۸۳، تاریخ پذیرش: آذر ماه ۸۳

چکیده

هدف: بعد از آنوپلوئیدی، عدم فعال شدن اووسیت منجر به القای تراکم زودرس کروموزوم (PCC: Prematur chromosomal condensation) می‌شود که شایع‌ترین علت عدم موفقیت لقاح در ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection) است. از آنجایی که کیفیت اووسیت در القای PCC نقش اساسی دارد و هدف این مطالعه صرفاً بررسی اثر فاکتورهای اسپرمی بر القای PCC است بنابراین در این مطالعه از اووسیت‌های موش استفاده شد.

مواد و روشها: اووسیت متافاز MII از موش سوری تهیه شد. همزمان اسپرم مردان نابارور از نظر کمبود پروتامین توسط رنگ‌آمیزی کرومومایسین A3 بررسی شد و به دو گروه با میزان طبیعی و کمبود پروتامین تقسیم‌بندی شد. سپس اووسیت‌های جمع‌آوری شده توسط اسپرم‌های دو گروه مذکور به روش درون سیتوپلاسمی (ICSI) تزریق شدند. پس از ۳ ساعت این اووسیت‌ها به محیط حاوی کالسی مید منتقل و ۱۹ ساعت بعد برای بررسی وضعیت کروماتین اسپرم و تخمک، اووسیت‌ها تثبیت و با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شدند.

یافته‌ها: درصد اسپرم‌های PCC و سر دست نخورده (Intact) در تخمک‌های متافاز II تزریق شده و همچنین درصد مرفولوژی غیرطبیعی سر اسپرم در دو گروه از نظر آماری اختلاف چشمگیری را نشان داد. در ضمن ارتباط معنی‌داری بین کمبود پروتامین و درصد PCC ($p=0.004$)، سرهای Intact ($p=0.015$) در تخمک‌های متافاز II تزریق شده و مرفولوژی غیرطبیعی سر اسپرم ($p=0.013$) مشاهده شد.

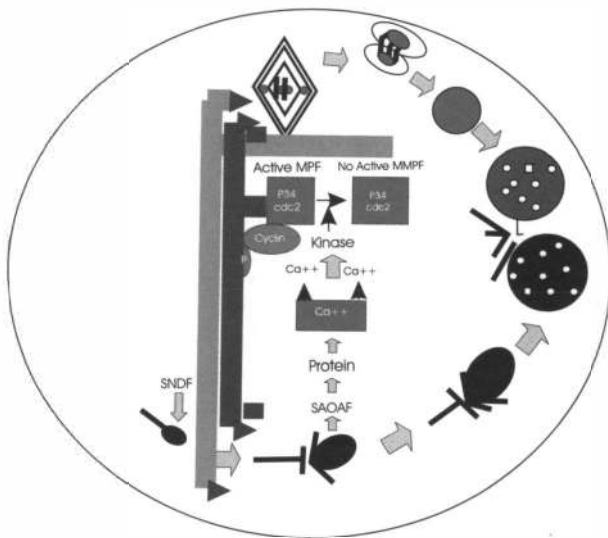
نتیجه‌گیری: کمبود پروتامین در اسپرم‌های تزریق شده به داخل تخمک‌های موش آنها را مستعد PCC می‌نماید و اسپرم‌هایی که کمبود پروتامین و یا هیستون اضافه دارند، شانس بیشتری برای ایجاد یا القای PCC دارند و هرچه درصد کمبود پروتامین سر اسپرم بیشتر باشد، درصد اسپرم‌های PCC در تخمک‌های تزریق شده افزایش می‌یابد و درصد سرهای دست نخورده کاهش می‌یابد که این امر احتمالاً منجر به کاهش درصد لقاح پس از ICSI می‌شود.

کلید واژه‌ها: کمبود پروتامین، تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم، لقاح، تراکم زودرس کروموزوم

مقدمه

با ابداع روش درمانی تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)، تحول عظیمی در درمان نازایی با فاکتور مردانه ایجاد شد [۱].

با ابداع روش درمانی تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم
آدرس مکاتبه: تهران، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی و آندرولوژی،
صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵ Email: info@royaninstitute.org



شکل ۱. تأثیر فاکتور SNDF بر آزاد شدن فاکتور SAOAF و فعال شدن اووسیت

در روش ICSI به علت تزریق مستقیم اسپرم به داخل اووسیت، مرحله ادغام شدن و اتصال غشای پلاسمایی اسپرم و اووسیت کنار گذاشته می‌شود. بنابراین اگر تخریبی به غشای پلاسمایی اسپرم وارد نشود، احتمالاً منجر به عدم یا تأخیر دستیابی فاکتور SNDF به اسپرم و عدم آزاد شدن SAOAF و در نهایت عدم فعال شدن اووسیت می‌شود [۱۷-۲۰].

اخيراً ناهنجاریهای کروماتین و بسته‌بندی ناقص کروماتین که می‌تواند ناشی از اختلال در جایگزینی پروتامین در خلال اسپرمیوزن باشد را به عنوان یکی از عوامل القاء کننده PCC مطرح می‌کنند [۲۱-۲۳].

در صورتی که اووسیت فعال نشود و سطح MPF بالا باقی بماند هسته اسپرمهای دارای کمبود پروتامین یا هیستون اضافه متعدد PCC می‌شوند.

مطالعات اخیر نشان داده است که میانگین درصد PCC در اووسیت‌های غیر لقاح یافته افرادی که دارای اسپرم‌های با کمبود پروتامین هستند بیشتر از میانگین درصد PCC در اووسیت‌هایی است که دارای اسپرم‌های با پروتامین طبیعی هستند [۲۳].

این محققین رابطه‌ای را بین کمبود پروتامین و PCC مشاهده

اگرچه در تکنیک ICSI انتظار می‌رود که کلیه اسپرمهای وارد شده به داخل اووسیت منجر به لقاح شوند اما میزان لقاح حدود ۷۰-۵۰ درصد مشابه IVF است [۲].

شایع‌ترین علت ممکن برای عدم موفقیت لقاح به روش ICSI بعد از آنوپلوئیدی، عدم فعال شدن اووسیت است که منجر به القای تراکم زودرس کروماتین اسپرم می‌شود. هنگامی که یک سلول انترفازی با یک سلول متافازی تلفیق شود، غشای هسته انترفازی ناپدید شده و کروموزومهای سلول انترفازی زودتر از موعد پیش‌بینی شده متراکم می‌شوند این پدیده را تراکم پیش‌رس کروموزومی (PCC) می‌نامند [۷].

مطالعات زمینه‌ای نشان می‌دهد که فاکتورهای متعددی در القای PCC نقش دارند که مهمترین آنها عدم فعال شدن اووسیت، شیوه تحریک تخمدانی که منجر به تولید اووسیت‌های نابالغ می‌شود و همچنین عدم بلوغ اووسیت است [۳، ۴، ۶، ۸ و ۹].

مهمترین رخداد در پدیده فعال شدن اووسیت^۱ از سرگیری میوز II است که شامل انتقال کروماتیدها به قطبین و ورود به آنافاز و ظاهر شدن دومین جسم قطبی است [۱۰].

قبل از لقاح سلولهای میوزی به خاطر وجود سطح بالای فاکتور پیش‌برنده میوز^۲ (MPF) فعال در متافاز II متوقف هستند [۱۱]. MPF از دو زیرواحد $P34^{cdc2}$ و سایکلین B1 تشکیل شده است که باعث القای تشکیل دوک، تراکم کروماتین و شکستگی غشای هسته می‌شود [۱۲]. طی متافاز II، MPF به خاطر وجود فاکتور سایتو استاتیک فعال باقی می‌ماند [۱۳ و ۱۴]. این فاکتور از تخریب سایکلین B1 جلوگیری می‌کند و با ادغام شدن اسپرم - اووسیت، افزایش کلسیم داخل سلولی منجر به القای تخریب سایکلین B1 می‌شود [۱۵]. و با غیرفعال شدن فاکتور سایتو استاتیک MPF هم غیرفعال می‌شود [۱۲]. بدین ترتیب چرخه میوزی تکمیل شده و اووسیت وارد فاز G1 می‌شود شواهد زیادی وجود دارد که فعال شدن اووسیت به دنبال ICSI ناشی از آزاد شدن فاکتور فعال کننده اووسیت مترشحه از اسپرم (SAOAF)^۳ است. این فاکتور در لایه تکای دور هسته‌ای قرار دارد و برای آزاد شدن نیاز به فاکتور نامتراکم کننده هسته اسپرم (SNDF)^۴ دارد (شکل ۱) [۱۶ و ۱۷].

1. Oocyte activation
2. Meiosis Promoting Factor
3. Sperm Associated Oocyte Activated Factor
4. Sperm Nuclear Decondensation Factor

اسپرم طبق معیار WHO ارزیابی شد [۴۱].

آماده‌سازی اووسیت

برای آماده‌سازی تخمکها برای انجام ICSI، تخمکها با آنزیم هیالورنیداز تیمار شدند (۲ دقیقه - ۸۰ واحد در هر سی سی - Sigma). ۳ ساعت بعد تخمکهای MII آماده شده توسط اسپرمهای دو گروه تحت تزریق داخل سیتوپلاسمی به صورت روتین قرار گرفتند.

اووسیت‌های تزریق شده پس از ۲-۳ ساعت انکوبه شدن به محیط حاوی کالسی مید به مدت ۱۶ ساعت منتقل شدند. اووسیت‌های نابالغ از این مطالعه حذف شدند.

مطالعه سیتوژنتیکی اووسیتها

۳۱۷ اووسیت تزریق شده موش برای آنالیز سیتوژنتیکی بدین ترتیب آماده شدند که ابتدا اووسیتها به مدت کوتاهی در اسید تایرود برای برداشته شدن زونا قرار گرفتند. سپس اووسیتها به محلول هیپوتونیک سترات سدیم ۵/۰ درصد برای ۵ دقیقه در هوای اتاق انتقال داده شدند. هر اووسیت با حداقل مقدار هیپوتونیک روی لام منتقل شد و توسط محلول تثبیت‌کننده (متانول، اسیداستیک ۱:۳) تثبیت شد. لامهای آماده شده با محلول گیمسای ۱۰ درصد در بافر فسفات (pH=7.4) برای ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شده و در زیر میکروسکوپ $\times 1000$ بررسی شدند.

ارزیابی کمبود پروتئامین

مایع سیمن در محلول کارنوی (متانول، اسیداستیک گلاسیال ۱:۳) در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه تثبیت و پس از تهیه اسمیر از نمونه‌های تثبیت شده رنگ‌آمیزی CMA3 با ۱۰۰ میکرولیتر محلول CMA3 با غلظت ۰/۲۵mg/ml در بافر مک‌الوین (۰/۲M Na₂HPO₄ + 7H₂O ۳۲/۹ml + ۰/۱M اسیداستیک ۷ml) با pH=۷ حاوی ۱۰ میلی مولار کلرید منیزیم به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت. سپس اسمیر با بافر شسته شده و با استفاده از بافر گلیسرول (۱:۱) مونت شد. آنالیز میکروسکوپی لامها با

نکردند و چنین بیان نمودند که اگرچه کمبود پروتئامین PCC را در تخمکهای لقاح نیافته القاء می‌نماید اما نیاز به بررسی بیشتری است که بتوان با حذف فاکتورهای مربوط به اووسیت، تاثیر فاکتورهای اسپرمی از جمله کمبود پروتئامین و مرفولوژی را در القای PCC بررسی کرد [۲۳].

بنابراین در این مطالعه از اووسیت موش به عنوان یک مدل مناسب استفاده شد و در این بررسی اووسیت‌های موش توسط اسپرم‌های انسانی با کمبود پروتئامین و اسپرمهای با پروتئامین طبیعی تزریق شدند. ۲-۳ ساعت بعد از تزریق با استفاده از کالسی مید از فعال شدن اووسیت از طریق بالا نگه داشتن سطح MPF جلوگیری کرده تا بتوان تأثیر کمبود پروتئامین بر القای PCC را بررسی کرد.

مواد و روشها

برای حصول به تعدادی اووسیت در متافاز II از موش‌های سوری (۵-۸ هفته) نژاد NMRI (مؤسسه رازی) استفاده شد. برای تحریک و القای تخمک گذاری، ۷/۵ واحد بین‌المللی PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin) به روش درون صفاقی و ۵۰ ساعت بعد، ۷/۵ واحد بین‌المللی hCG (human Chorionic Gonadotropin) تزریق شد. ۱۷ ساعت بعد از تزریق hCG موشها قطع نخاع شده و اووسیتها از ناحیه اوویداکت موش خارج شدند.

مراحل آماده‌سازی اسپرم

نمونه‌های سیمن در روز آزمایش توسط بیماران جمع‌آوری شد. بخشی از نمونه به دنبال ۲ بار شستشو با محیط Ham's F10 (۳۰۰۰ rpm - ۶ دقیقه) برای انجام روش ICSI آماده و بخشی دیگر از نمونه سیمن برای رنگ‌آمیزی با CMA3 توسط PBS^۱ دو بار شستشو شد (۳۰۰۰ rpm - ۶ دقیقه) و برای رنگ‌آمیزی با CMA3 دو اسمیر از هر نمونه تهیه شد. باقیمانده نمونه سیمن برای آنالیز روتین اسپرم استفاده شد.

ارزیابی مرفولوژی اسپرم

اسمیر تهیه شده با پاپانیکولاو رنگ‌آمیزی شد و مرفولوژی

1. Phosphate Buffer Salin

استفاده از میکروسکوپ فلورسنت انجام شد. اسپرم‌های با رنگ زرد درخشان CMA3 مثبت و اسپرم‌های با رنگ زرد تیره CMA3 منفی ارزیابی شدند.

نتایج از طریق تعیین ضریب همبستگی و *t*-test با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۱/۵ بررسی شد.

جدول ۱. جزئیات تعداد، انواع اووسیت‌های به دست آمده، تزریق شده و آنالیز سیتوژنتیکی اووسیت‌های تزریق شده به روش ICSI

درصد	تعداد / کل	تعداد	
-	-	۳۷	تعداد بیمار مرد
-	-	۲۷۸۰	تعداد کل اووسیت‌های به دست آمده
۴۱/۹۴	۱۱۶۶/۲۷۸۰	۱۱۶۶	تعداد کل اووسیت‌های متافاز I
۲۶/۱۱	۷۲۶/۲۷۸۰	۷۲۶	تعداد کل اووسیت‌های متافاز II
۳۱/۹۴	۸۸۸/۲۷۸۰	۸۸۸	تعداد کل اووسیت‌های متافاز II دژنره
۲۶/۱۱	۷۲۶/۲۷۸۰	۷۲۶	تعداد اووسیت‌های تزریق شده
۱۳/۱۳	۴۰۹/۲۷۸۰	۴۰۹	تعداد اووسیت‌های دژنره بعد از تزریق
-	-	۳۱۷	تعداد اووسیت‌های آنالیز شده
۱۸/۹۲	۶۰/۳۱۷	۶۰	تعداد اووسیت‌های خالی از اسپرم
۹۸/۴۲	۳۱۲/۳۱۷	۳۱۲	تعداد اووسیت‌های متافاز II
۱/۲۸	۴/۳۱۷	۴	تعداد اووسیت‌های دژنره
۰/۳۲	۱/۳۱۷	۱	تعداد اووسیت‌های نامتراکم شده
-	-	۲۵۷	تعداد اسپرم مشاهده شده در اووسیت
۵۸/۳۶	۱۵۰/۲۵۷	۱۵۰	تعداد Intact اسپرم
۲۶/۸۵	۶۹/۲۵۷	۶۹	تعداد PCC اسپرم
۸/۵۶	۲۲/۲۵۷	۲۲	تعداد PNCD اسپرم
۶/۲۲	۱۶/۲۵۷	۱۶	تعداد NCD اسپرم
۷۹/۷۲	۵۵/۶۹	۵۵	تعداد PCC در CMA3 ⁺ اسپرم
۲۰/۲۸	۱۴/۶۹	۱۴	تعداد PCC در CMA3 ⁻ اسپرم

جدول ۲. مقایسه فاکتورهای مختلف در بیماران CMA3 مثبت کمتر و بیشتر از ۲۰٪ در بیماران ICSI از طریق آزمون *t*-test و Mann Whitney

P - Value	گروه B CMA3>30% Mean $\pm$ SD	گروه A CMAC<30% Mean $\pm$ SD	
۰/۲۴	۲/۵۲ $\pm$ ۰/۲۲	۳ $\pm$ ۰/۳۸	تعداد اووسیت‌های متافاز II آنالیز شده
۰/۰۳۳	۶۶/۶۱ $\pm$ ۳/۶۶	۵۳/۷۱ $\pm$ ۴/۴۱	درصد اسپرم با مرفولوژی غیرطبیعی سر
۰/۰۰۰	۵۳/۷۴ $\pm$ ۳/۳۳	۲۱/۳۶ $\pm$ ۱/۴۳	درصد اسپرم CMA3 مثبت
۰/۰۰۲	۴۸/۱۱ $\pm$ ۴/۲۶	۷۰/۲۵ $\pm$ ۴/۶۲	درصد Intact اسپرم در اووسیت‌های متافاز II
۰/۰۰۰	۳۶/۴۳ $\pm$ ۴/۴۶	۱۱/۹۹ $\pm$ ۳/۵۴	درصد PCC اسپرم در اووسیت‌های متافاز II
۰/۳۶	۷/۰۹ $\pm$ ۲/۴۱	۱۱/۸۹ $\pm$ ۴/۲۱	درصد PNCD اسپرم در اووسیت‌های متافاز II
۰/۸۴	۸/۳۷ $\pm$ ۳/۴	۵/۸۶ $\pm$ ۳/۱۳	درصد NCD اسپرم در اووسیت‌های متافاز II

جدول ۳. رابطه بین کمبود پروتئین CMA3⁺ و درصد PCC اسپرم با یکدیگر و هریک از آنها با مرفولوژی اسپرم INTACT، PNCD، NCD اسپرم و تعداد اووسیت

P- Value	r - % CMA3 positive	P - Value	r - % PCC	
۰/۰۱۳	۰/۴۰۶	۰/۴۲۱	۰/۱۳۶	درصد مرفولوژی غیرطبیعی سراسپرم
۰/۲۶۸	- ۰/۱۸۷	۰/۸۳۷	- ۰/۰۳۵	درصد تعداد اووسیت‌ها
۰/۰۰۴	۰/۴۶۰	-	-	درصد PCC اسپرم
۰/۰۱۵	۰/۳۹۷	۰/۰۰۰	- ۰/۷۲۹	درصد Intact اسپرم
۰/۸۶۹	۰/۰۲۸	۰/۰۵۲	- ۰/۳۲۲	درصد PNCD اسپرم
۰/۶۶۵	۰/۰۷۴	۰/۴۶۰	- ۰/۱۲۵	درصد NCD اسپرم

یافته‌ها

جزئیات تعداد و انواع اووسیت‌های به دست آمده، تزریق شده، همچنین آنالیز سیتوژنتیکی اووسیت‌های تزریق شده موش بعد از انجام ICSI در جدول ۱ خلاصه شده است.

در این مطالعه از ۷۲۶ اووسیت تزریق شده، ۴۰۹ اووسیت دژنره و ۳۱۷ اووسیت آنالیز شدند. ۳۱۲ اووسیت متافاز II (۹۸/۴۲ درصد) و ۴ اووسیت پس از تزریق دژنره (۱/۲۸ درصد) و یک اووسیت نامتراکم (۰/۳۲ درصد) بوده و از ۳۱۷ اووسیت قابل آنالیز، ۶۰ اووسیت خالی از اسپرم بودند (۱۸/۹۲ درصد) و ۲۵۷ اووسیت حاوی اسپرم بودند. که از این تعداد ۱۵۰ اسپرم به صورت دست نخورده (۵۸/۳۶ درصد) (شکل ۲)، ۲۲ اسپرم به صورت نامتراکم شدن جزئی کروماتین هسته (PNCD)^۱ (۸/۵۶ درصد) (شکل ۳) و ۱۶ اسپرم به صورت نامتراکم شدن کروماتین هسته (NCD)^۲ (۶/۲۲ درصد) و ۶۹ اسپرم به صورت PCC (۲۶/۸۵ درصد) در اووسیت‌ها مشاهده شدند (جدول ۱). از اشکال PCC مشاهده شده یک مورد PCC فاز S (شکل ۴) و بقیه موارد PCC در فاز G1 (شکل ۵-۷) دیده شد.

PCC در ابتدای فاز G1 به صورت یک توده کروماتینی کاملاً متراکم با یک حاشیه مضرس که به سختی علائمی از یک یا دو رشته از توده به سمت خارج کشیده شده است، دیده می‌شود. در صورتی که در انتهای فاز G1 به صورت تک کروماتیدی بلند و نخی شکل قابل مشاهده است. بیشترین اشکال PCC مشاهده شده مربوط به ابتدای فاز G1 می‌باشد که با توجه به این که اسپرم در فاز G1 است چنین مشاهده‌ای منطقی به نظر می‌رسد. در این مطالعه بیماران بر اساس درصد CMA3 مثبت بیشتر و کمتر از ۳۰ درصد گروه‌بندی شدند و میانگین پارامترهای مختلف در دو گروه با استفاده از آزمون *t*-test مشخص و مقایسه شدند.

جدول ۲ نشان می‌دهد که میانگین درصد PCC اسپرم، Intact و مرفولوژی غیرطبیعی سر اسپرم در اووسیت‌های متافاز II آنالیز شده بین دو گروه اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهد.

جدول ۳ ارتباط بین کمبود پروتئین (CMA3⁺) و درصد PCC اسپرم با یکدیگر و هریک از آنها با مرفولوژی اسپرم،

PNCD، Intact، NCD اسپرم و تعداد اووسیت را نشان می‌دهد. از بین این پارامترها، درصد PCC، Intact و مرفولوژی غیرطبیعی سر اسپرم ارتباط معنی‌داری را با کمبود پروتئین نشان می‌دهند.

بحث

PCC در واقع یک میتوز آپیکال بدون تشکیل دوک میتوزی است، چنانچه سلولهای انترفازی (G1-S- G2) با سلول میتوتیک فیوز شوند می‌تواند منجر به PCC شود [۲۴].

القای میتوز در هسته سلولهایی که در فاز M قرار ندارند منجر به القای PCC می‌شود که مرفولوژی PCC بر اساس اینکه سلول انترفازی در چه مرحله‌ای از انترفاز در زمان تلفیق با سلول در فاز M قرار گرفته باشد متفاوت است. به طوری که مرفولوژی PCC در فاز G1 به صورت تک کروماتیدی بلند، در فاز S به صورت قطعه قطعه و در فاز G2 به صورت دو کروماتیدی بلند است [۲۵].

مرفولوژی PCC در ICSI با IVF متفاوت است. در IVF به صورت رشته‌های تک کروماتیدی بلند است در حالی که در ICSI به صورت توده کروماتینی مشخص که ممکن است رشته‌های بسیار کمی از آن به سمت خارج کشیده شده باشد مشاهده و تحت عنوان PCC فاز G1 شناخته می‌شود. این تفاوت به علت موقعیت اسپرم در IVF و ICSI است. در ICSI کل اسپرم محصور در غشای پلاسمایی به داخل اووسیت تزریق می‌شود، در حالی که در IVF پس از واکنش آکروزومی و ادغام اسپرمولما با اوولما صرفاً هسته اسپرم وارد اووپلاسم می‌شود و این روند سرعت خروج پیامهای لازم برای فعال شدن اووسیت را تسهیل می‌نماید [۴، ۲۶ و ۲۷].

از علل عمده‌ای که در القای PCC نقش دارد می‌توان به نقص در فعال شدن اووسیت و وجود MPF بالا در اووپلاسم و بدنبال آن نقص در اتمام میوز II اشاره کرد [۳، ۶ و ۲۰].

اولین حادثه‌ای که در فعال شدن اووسیت رخ می‌دهد ناشی از افزایش کلسیم داخل سلولی است که با وارد شدن اسپرم به داخل اووسیت تحت تأثیر فاکتور نامتراکم کننده هسته اسپرم

غشای پلاسمایی اسپرم و لایه تکای دور هسته‌ای برداشته شده و به دنبال آن فاکتور فعال کننده اووسیت (SAOAF) از اسپرم آزاد می‌شود. این فاکتور باعث خروج کلسیم از مخازن داخل سلولی می‌شود و یون کلسیم به نوبه خود روی کینازها اثر گذاشته و منجر به تخریب سایکلین B1 می‌شود [۲۸].

با غیرفعال شدن MPF، چرخه سلولی از سر گرفته شده و میوز II به اتمام می‌رسد. در صورتی که SNDF توانایی دستیابی به هسته اسپرم را نداشته باشد (که می‌تواند ناشی از تخریب ناکافی غشای پلاسمایی اسپرم باشد) منجر به عدم آزاد شدن SAOAF از اسپرم و به دنبال آن عدم فعال شدن اووسیت می‌شود [۱۷، ۲۰ و ۲۶].

امروزه عدم بلوغ سیتوپلاسم که می‌تواند ناشی از شیوه تحریک تخمدانی هم باشد به عنوان یکی از عوامل القاء کننده PCC مطرح می‌شود. با این وجود مطالعات اخیر ناهنجاری‌های کروماتین اسپرم را به عنوان عامل دیگری برای القای PCC مطرح می‌نمایند. بدین معنا که اگر اسپرمیوزن به طور طبیعی انجام نشود، اسپرم مستعد PCC می‌شود [۲۱ و ۲۳]. اما تحقیقات بیشتری برای تأیید این مطلب لازم است.

یکی از عمده‌ترین اختلالات کروماتین مربوط به نقص در قرارگیری پروتامین در مرحله اسپرمیوزن است [۲۸ و ۳۰].

در مطالعات انجام شده توسط برخی از محققین درصد پائینی از لقاح پس از تزریق اسپرماتید گزارش شده است و بررسی سیتوژنتیکی این اووسیت‌های لقاح نیافته میزان بالایی از PCC را نشان داده است که علت این امر می‌تواند انتقال ناقص پروتامین به جای هیستون در مرحله اسپرمیوزن باشد [۳۱، ۳۲ و ۳۳]. فقدان پروتامین باعث می‌شود که هسته اسپرم تحت تاثیر MPF قرار گرفته و به دنبال آن PCC رخ دهد.

اسپرمهایی که در فاز G1 قرار دارند وقتی به اووسیت متافازی وارد می‌شوند دارای ساختار پروتامینی هستند و اووسیت به علت توقف در MII دارای سطح بالایی از MPF است و به علت اینکه MPF روی ساختار پروتامینی تاثیر ندارد به محض ورود هسته اسپرم به داخل اووسیت DNA اسپرم در برابر PCC محافظت می‌شود. تحت تاثیر فاکتورهای اووپلاسمیک دو مرحله قابل تشخیص در تغییر ساختار هسته

اسپرم اتفاق می‌افتد که عبارتند از تورم و نامتراکم شدن سر اسپرم. برخلاف فرایند نامتراکم شدن سر اسپرم، تورم (Swelling) در ساعات اولیه مستقل از فعال شدن اووسیت و تحت تاثیر SNDF است در صورتی که فرایند نامتراکم شدن وابسته به فعال شدن اووسیت است که این فرایند با فعال شدن تخمک شروع و تا تلوفاز ادامه می‌یابد [۳۴]. در مرحله تورم، هسته اسپرم تحت تاثیر SNDF کمی متورم شده، لایه تکای دور هسته‌ای برداشته می‌شود و SAOAF آزاد می‌شود که منجر به غیرفعال شدن MPF می‌شود و بدین ترتیب با فعال شدن اووسیت چرخه میوزی از سر گرفته شده و کروموزومها به سوی قطبین هدایت می‌شوند، در نهایت چرخه سلولی به سوی آنافاز و تلوفاز پیش رفته و اووسیت وارد فاز G1 می‌شود. طی این روند غشای هسته در اواخر تلوفاز برداشته می‌شود [۳۵]. و فاکتورهای نامتراکم کننده هسته اسپرم از جمله گلوکوتایون باعث شکسته شدن پلهای دی‌سولفیدی بین اجزای سیستمین شده و به دنبال آن هیستونهای منشاء گرفته از اووسیت جایگزین پروتامینها می‌شوند. حال اگر روند نامتراکم شدن هسته اسپرم وابسته به فعال شدن تخمک نبود یعنی در زمانی که MPF در سطح بالایی قرار دارد و اووسیت هنوز فعال نشده بود هیستونها توسط پروتامینها جایگزین می‌شدند؛ بنابراین بایستی در کلیه افراد CMA3 مثبت بیشتر و کمتر از ۳۰ درصد PCC رخ می‌داد. زیرا همگی ساختار هیستونی داشته و تحت تاثیر MPF فعال و بالا قرار می‌گرفتند با این وجود چون جابه جایی پروتامینها توسط هیستونها در مرحله اواخر تلوفاز صورت می‌گیرد که سطح MPF پایین آمده و غیرفعال شده است. بنابراین فقط در اسپرمهایی که کمبود پروتامین دارند یا دارای هیستون اضافه هستند به محض ورود به داخل اووپلاسم تحت تاثیر MPF فعال و بالا قرار گرفته و PCC در آنها القاء می‌شود، و آنهایی که پروتامین در حد مناسب دارند از تاثیر MPF محفوظ می‌مانند.

نتایج این مطالعه نیز تأیید کننده مطلب فوق است زیرا بین درصد کمبود پروتامین و درصد PCC سر اسپرم رابطه مستقیم معنی داری وجود دارد ($p=0.004$). همچنین با مقایسه میانگین PCC در دو گروه CMA3 مثبت بیشتر و کمتر از ۳۰ درصد مشخص شد که بین میزان PCC در این دو گروه اختلاف

معنی‌داری وجود دارد ($p < 0.001$). در افرادی که میزان کمبود پروتامین آنها بیش از ۳۰ درصد است میانگین درصد PCC ($4/46 \pm 36/43$) می‌باشد که بیشتر از افرادی است که کمبود پروتامین آنها کمتر از ۳۰ درصد ($3/54 \pm 11/99$) است.

مطالعاتی که توسط نصر و همکارانش در سال ۲۰۰۴ روی تخمکهای انسانی غیر لقاح یافته پس از ICSI انجام شد تفاوت معنی‌داری را بین میانگین PCC در دو گروه CMA3 مثبت بیشتر و کمتر از ۳۰ درصد گزارش نمودند. که نتایج بررسی حاضر با این مطالعه مطابقت دارد اما این محققین رابطه معنی‌داری بین PCC سر اسپرم با کمبود پروتامین به دست نیاوردند [۲۳]. و عنوان نمودند که احتمالاً کمبود پروتامین می‌تواند اسپرمها را مستعد PCC نماید و پیشنهاد نمودند که برای تأیید این امر نیاز به تحقیقات بیشتری است. ضریب همبستگی بین میزان PCC و کمبود پروتامین و اختلاف میانگین PCC در اسپرمهای بیشتر و کمتر از ۳۰ درصد در مطالعه حاضر بیانگر این است که کمبود پروتامین اسپرمها را مستعد PCC می‌نماید. در این مطالعه رابطه منفی معنی‌داری بین درصد کمبود پروتامین و درصد اسپرمهای با سر Intact به دست آمد ($p = 0.015$). و مقایسه میانگین سر Intact در بین دو گروه CMA3 مثبت بیشتر و کمتر از ۳۰ درصد اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p = 0.002$) در افرادی که میزان کمبود پروتامین در آنها بیشتر از ۳۰ درصد است میانگین درصد سر Intact ($4/26 \pm 48/11$) کمتر از افرادی است که کمبود پروتامین آنها کمتر از ۳۰ درصد است ($4/62 \pm 70/25$).

همان طور که در قسمت قبل اشاره شد طی روند طبیعی پس از ورود اسپرم به داخل اووسیت و نفوذ SNDF و به دنبال آن تورم اسپرم، فاکتور SAOAF از اسپرم رها شده و منجر به فعال شدن اووسیت می‌شود، و بعد از تشکیل NCD هسته اسپرم به سمت تشکیل پیش هسته پیش می‌رود.

در صورتی که فعال شدن اووسیت رخ ندهد که این امر می‌تواند به علت عدم رها شدن SAOAF از اسپرم یا به علت عدم پاسخگویی اووسیت به این فاکتور باشد. سر اسپرم بر اساس میزان پروتامین موجود به صورت Intact یا PNCD یا روند PCC پیش می‌رود. در این مطالعه با قرار دادن اووسیت‌های تزریق شده در داخل کالسی مید از غیرفعال شدن

MPF و به دنبال آن از فعال شدن تخمک جلوگیری شد. در صورتی که SNDF نتواند به داخل اسپرم نفوذ نماید که این امر می‌تواند ناشی از تخریب ناکافی غشای پلاسمایی یا تزریق مقادیر بالای PVP^۱ باشد، منجر به اختلال در روند نامتراکم شدن اسپرم می‌شود و سر اسپرم به صورت Intact باقی خواهد ماند [۱۹-۲۱]. در حالی که اگر SNDF بتواند به داخل اسپرم نفوذ نماید سر اسپرم در صورت داشتن پروتامین در حد طبیعی به صورت سر اسپرم متورم یا دست نخورده (Intact) باقی می‌ماند و در صورتی که اسپرم دارای هستون اضافی یا کمبود پروتامین باشد MPF روی ساختار نوکلئو هیستونی تأثیر گذاشته و آن را به سمت PCC پیش می‌برد.

در این مطالعه درصد شیوع Intact بالاتر از PCC است. ($58/36$ درصد در مقابل $26/85$ درصد) و میانگین سر Intact در هر دو گروه CMA3 مثبت کمتر و بیشتر از ۳۰ درصد بیشتر از میانگین PCC در این دو گروه است که با توجه به مطالب ذکر شده شیوع بالای Intact در این مطالعه می‌تواند به علت تخریب ناکافی غشای پلاسمایی اسپرم و عدم دستیابی SNDF به اسپرم باشد یا می‌تواند به دلیل این باشد که با قرار دادن اووسیت در کالسی مید مانع از فعال شدن اووسیت شده که این می‌تواند منجر به جلوگیری از پیشرفت سر اسپرمهای با پروتامین نرمال به سمت تشکیل NCD و پرونوکلئوس شود. بنابراین در هر دو حالت احتمال درصد اسپرمهای با سر Intact بالا می‌رود.

برخی از محققین معتقدند که وجود ناهنجاریهای کروماتینی اسپرم هم نقش عمده‌ای در شیوع بالای Intact دارند. Sakkas و همکارانش در سال ۱۹۹۶ یکی از علل عمده تعداد بالای اسپرمهای Intact را در رابطه با میزان بالای آسیب DNA اسپرم و ناهنجاریهای کروماتینی مطرح کردند [۳۶]. این محققین درصد لقاح را در اووسیت‌های انسانی بررسی کردند و در مطالعاتشان درصد بالایی از Intact را در بیماران CMA3 مثبت نسبت به گروه کنترل گزارش نمودند.

این محققین در مطالعه خود به بررسی وضعیت PCC نپرداخته بودند و فقط درصد اسپرمهای Intact را بررسی کردند. اما در مطالعه حاضر هر دو مورد Intact و PCC بررسی شد.

شود. و از آنجایی که اسپرم در فاز G1 و اووسیت در متافاز II است، انتظار می‌رود که این روند برای هسته اسپرم رخ دهد ولی به علت ساختار کروماتین اسپرم MPF نمی‌تواند بر ساختار نوکلئوپروتامینی تأثیر بگذارد و هسته اسپرم را در برابر فرآیند PCC حفاظت می‌نماید. ولی از آنجایی که روند اسپرمیونز در افراد نابارور به طور طبیعی رخ نمی‌دهد و در بسیاری از اسپرمها هیستون به میزان کافی توسط پروتامین جایگزین نمی‌شود این امر اسپرمهای افراد نابارور را مستعد PCC می‌نماید. ولی نکته‌ای که مطرح می‌شود این است که در روند طبیعی کالسی میدی وجود ندارد و اگر به هر علتی تخمک فعال نشود در این مورد PCC رخ می‌دهد. شاید بتوان نتیجه‌گیری کرد که در اسپرمهایی که پروتامین به اندازه کافی جایگزین نشده در ساعتهای اولیه ورود اسپرم قبل از فعال شدن اووسیت این گونه اسپرمها تحت تأثیر MPF فعال قرار گرفته و دچار PCC می‌شوند و بسته به میزان کمبود پروتامین اگر میزان کمبود پروتامین کم باشد مدت زمانی طول می‌کشد تا از PCC خارج شود. در این صورت منجر به تأخیر در تشکیل پیش هسته می‌شود و اگر میزان کمبود پروتامین زیاد باشد احتمال خروج از PCC کم و در هر دو صورت منجر به کاهش میزان لقاح می‌شود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از همکاری مسئولین پژوهشکده رویان و همکاران بخش علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که زمینه اجرای این تحقیق را فراهم آوردند و همچنین از جناب آقای دکتر عشرتی که زحمت تجزیه و تحلیل آماری پژوهش را به عهده گرفتند تقدیر و تشکر می‌نمایم. این مطالعه طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشکده رویان به شماره ۲۳۴-۲ است.

References

1. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 340: 17-8.
2. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H. High fertilization and implantation after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1993; 8:1061-6.

یکی از علل درصد بالای سر Intact می‌تواند ناشی از ناهنجاریهای آکروزوم که همزمان با جایگزینی هیستون‌ها با پروتامین‌ها طی روند اسپرمیونز است، باشد چرا که ناهنجاریهای آکروزومی می‌تواند منجر به عدم فعال شدن تخمک شود.

همچنین در مطالعه حاضر رابطه مستقیم معنی‌داری بین درصد کمبود پروتامین و درصد مرفولوژی غیرطبیعی سر اسپرم مشاهده شد ($p=0.013$) و مقایسه میانگین مرفولوژی غیرطبیعی سر اسپرم در دو گروه CMA3 مثبت کمتر و بیشتر از ۳۰ درصد مشخص شد که بین دو گروه اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p = 0.033$). در افرادی که کمبود پروتامین در آنها بیشتر از ۳۰ درصد است میانگین درصد مرفولوژی غیرطبیعی سر اسپرم ($3/66 \pm 6/61$) از افرادی با کمبود پروتامین کمتر از ۳۰ درصد بیشتر است ($4/41 \pm 3/71$)، بسیاری از گزارشها اشاره بر این مطلب دارد که بین اختلال در تراکم کروماتین، مرفولوژی اسپرم و نازائی مردان ارتباط وجود دارد [۳۷ و ۳۸].

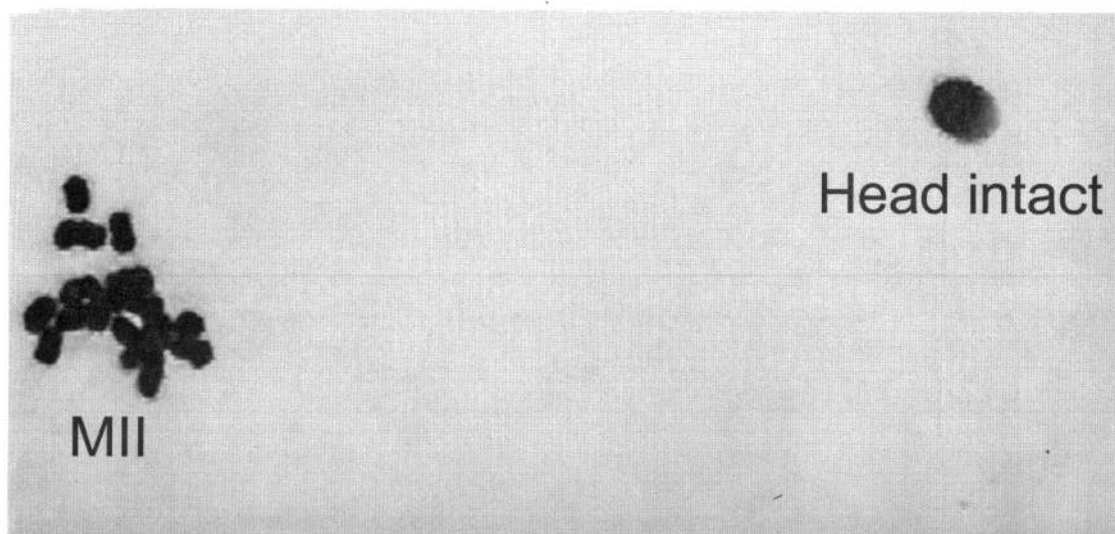
تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که بین مرفولوژی اسپرم و میزان لقاح رابطه مستقیم و مستقل وجود دارد [۳۹]. در صورتی که در روش ICSI با توجه به امکان انتخاب اسپرم طبیعی رابطه معنی‌داری بین این دو پارامتر مشاهده نشده است. در مطالعات اخیر رابطه مستقیمی بین کمبود پروتامین و درصد لقاح به دنبال روش ICSI گزارش شده است [۴۰]. در این مطالعه نیز همانند سایر مطالعات بین میزان کمبود پروتامین و مرفولوژی اسپرم رابطه معنی‌دار به دست آمد ولی ارتباطی بین میزان PCC و مرفولوژی غیرطبیعی سر اسپرم مشاهده نشد.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که هرگاه یک سلول در فاز G1 با یک سلول در فاز M ادغام شود انتظار می‌رود که هسته سلول G1 به طور زودرس متراکم شده و منجر به ایجاد PCC

3. W Rohini Edirisingle, Ashleigh R Murch, Stephen M Junk. Cytogenetic analysis of unfertilized oocytes following intracytoplasmic sperm injection using spermatozoa from a globozoospermic man. Hum Reprod 1998; 13(11):3094-98.
4. Schmiady H, Tandler-Schneider A, Heribert K.

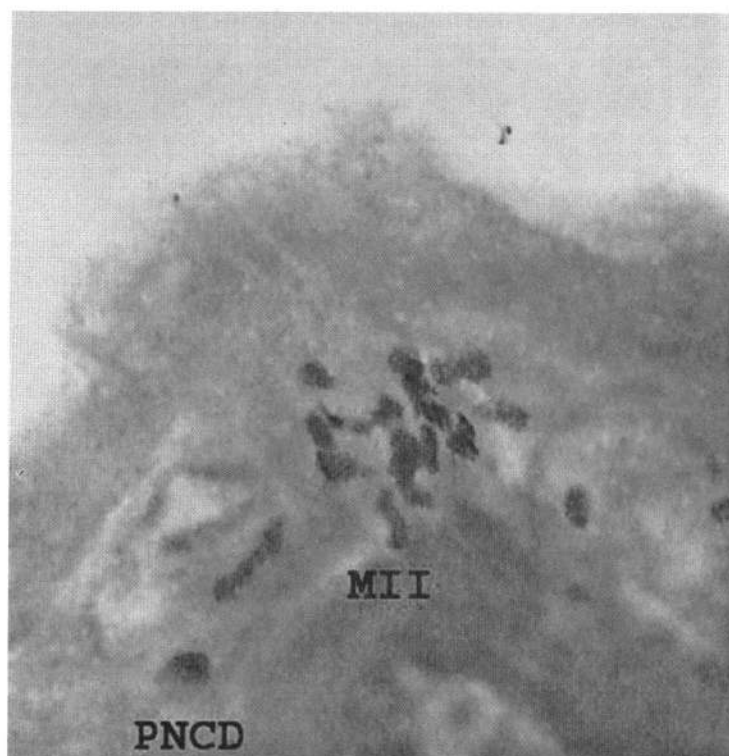
- premature chromosome condensation of the sperm nucleus after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996; 11(10): 2239 - 45.
5. **Mozdarani H, Aghdaei F.** cytogenetic analysis of failed Fertilization oocytes from Iranian infertile women after in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) procedures. *MEFS J* 2001; 6(3): 216 - 25.
 6. **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): 61-7.
 7. **Johnson RT, Rao PN.** Mammalian cell Fusion, Induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* 1970; 226:717-22.
 8. **Sai Ma and Basil Ho Yuen.** intracytoplasmic sperm injection could minimize the incidence of prematurely condensed human sperm chromosome. *fertil Steril* 2001; 75(16):1095-1101.
 9. **Calafell JM, Badenas J, Egozcue J, Santalo J.** Premature chromosome condensation as a sign of oocyte immaturity. *Human Reprod* 1991; 6:1017 - 21.
 10. **Carmen J williams.** Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Hum Reprod update* 2002; 8(4): 313-21.
 11. **Verlhac MH, de Pennart H, Maro B, Cobb M H, Clarke HJ.** MAP Kinase becomes Stably activated at metaphase and is associated with microtubule - organizing Centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol* 1993; 158:330 - 40.
 12. **Murray A, Hunt T.** The cell cycle. Oxford university Press, oxford, UK 1993; p: 251.
 13. **Colledge WH, carlton MB, udy GB, Evans MJ.** Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* 1994; 370:65 - 8.
 14. **Reimann JD, Jackson PK.** Emi1 is required for cytostatic factor arrest in vertebrate eggs. *Nature* 2002; 416:850-54.
 15. **Lorca T, cruzalegui FH, fesquet D, Caradore J-C, Mery J, Means A, et al.** calmodulin-dependent protein kinas II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* 1993; 366: 270 - 73.
 16. **Kimura Y, Yanagimachi R, Kuretake S, Bortkiewicz H, Perry AC, Yanagimachi H.** Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biol Reprod* 1998; 58: 1407 - 15.
 17. **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: 2792-96.
 18. **Dozortsev D, De sutter P, Dhont M.** Behaviour of spermatozoa in human oocyte displaying no or one pronucleus after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994; 9: 2139-44.
 19. **Flaherty SP, Payne D, Matthews CD.** fertilization failures and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13(suppl 1): 155-64.
 20. **Flaherty SP, payne D, swann NJ, Matthews CD.** Assesment of fertilization failure and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod Fertile. Dev* 1995; 7: 197-10.
 21. **Bernd E Rosenbusch.** Frequency and patterns of premature sperm chromosome condensation in oocytes failing to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod. Genet* 2000; 17: 253-59.
 22. **Bianchi PG, Manicardi GC, Urner F, Campana A, Sakkas D.** chromatin Packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1996a; 2: 139-44.
 23. **Razavi SH, Mozdarani H, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Azvagi H.** Effect of protamine deficiency on fertilization out come and incidence of sperm premature chromosome condensation post ICSI. *Andrologia* 2004 ; 39: 95-100.
 24. **Irfan Aslam, Simon Fishel.** Evaluation of the fertilization potential of freshly isolated, in-Vitro Cultured and cryopreserved human spermatids by injection into hamster oocytes. *Hum Reprod* 1999; 14(6): 1-14.
 25. **Schmiady H, Kentenich H.** Premature chromosome condensation after in-vitro Fertilization. *Hum Reprod* 1989; 4:689-95.
 26. **Dozortsev D, Rybouchkin A, De sutter P, Qian C, Dhont M.** Human oocyte activation following intracytoplasmic sperm injection: role of the sperm cell. *Hum Reprod* 1995; 10: 403-7.

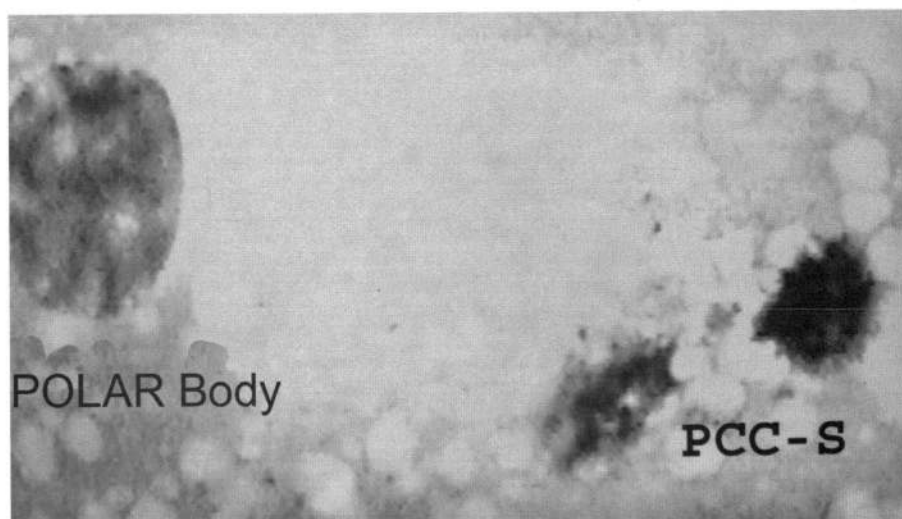
27. Schmiady H, Sperling K, Kententich H, Stauber M. Prematurely condensed human sperm chromosome after in vitro fertilization (IVF). *Hum Reprod* 1986; 74: 441-3.
28. Y.Rawe VY, Brugo Olmed S, Nodar FN, Doncel GD, Acosta AA, Vitullo AD. Cytoskeletal organization defects and abortive activation in human oocytes after IVF and ICSI failure. *Molecular Hum Reprod* 2000; 6: 510-16.
29. Balhorn R, Reed S. Protamine 1\ Protamin 2 ratios in sperm in infertile human males. *Experientia* 1988; 44: 52-5.
30. De Yerba L, Ballesca JL, Vanrell JA, Bassas L, Oliva R. Complete Selective absence of protamine in humans. *J Biol Chem* 1993; 268: 10553-7.
31. Tesarik J, Nondosa C. Spermatid injection into human oocytes. 1 Laboratory techniques and special features of zygotes development. *Hum Reprod* 1996; 11:772-9.
32. Kahraman S, Polat G, Samil M, Sozen E, Ozgun OD, Dirican K, Ozbicer T. Multiple pregnancies obtained by testicular spermatid injection in combination with intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 104-10.
33. Aslam I, Fishel S, Green S, Campbell A, Garrett L, Mc Dermott H, et al. Can we justify spermatid microinjection for sever male factor infertility? *Hum Reprod Update* 1998; 4:213-22.
34. Dozortsev D, De sutter P, Rybouchkin A, Dhnot M. Timing of sperm and oocyte nuclear progression after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995; 10: 3012-17.
35. Szollosi MS, Borsuk E, Szollosi M. Relationship between sperm nuclus remodeling and cell cycle progression of fragments of mouse parthenogenotes. *Mol Reprod Dev* 1994; 37: 146-56.
36. Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, et al. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996; 11:837-43.
37. Bach O, Glander HJ, Scholz G. Electrophoretic patterns of spermatozoa nucleoproteins (NP) in fertile men and infertile patients and comparison with NP of somatic cells. *Andrologia* 1990; 22: 217-24.
38. Foresta C, Zorzi M, Rossato M. Sperm nuclear instability and Staining with aniline blue: abnormal persistance of histonein spermatozoa in Infertile men. *Int J Androl* 1992; 15: 330-37.
39. Nasr-Esfahani MH, Razavi SH, Mardani M. Relation between different human nuclear maturity tests and in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18(4) 1999 - 2005.
40. Silvestroni I, Frajese G, Fabrizio M. Histon instead of protamines in germ cells of infertile oligospermic men. *Fertil Steril* 1976; 27: 1428-37.
41. Comhaire F, Vermeulen I. Human Semen Analysis. *J Hum Reprod update* 1995; 1(4): 343-62.



شکل ۲. نمای میکروسکوپی اووسیت تزریق شده موش. MII: اووسیت متافاز II موش، Head intact: سر دست نخورده اسپرم، بزرگنمایی: $\times 1000$

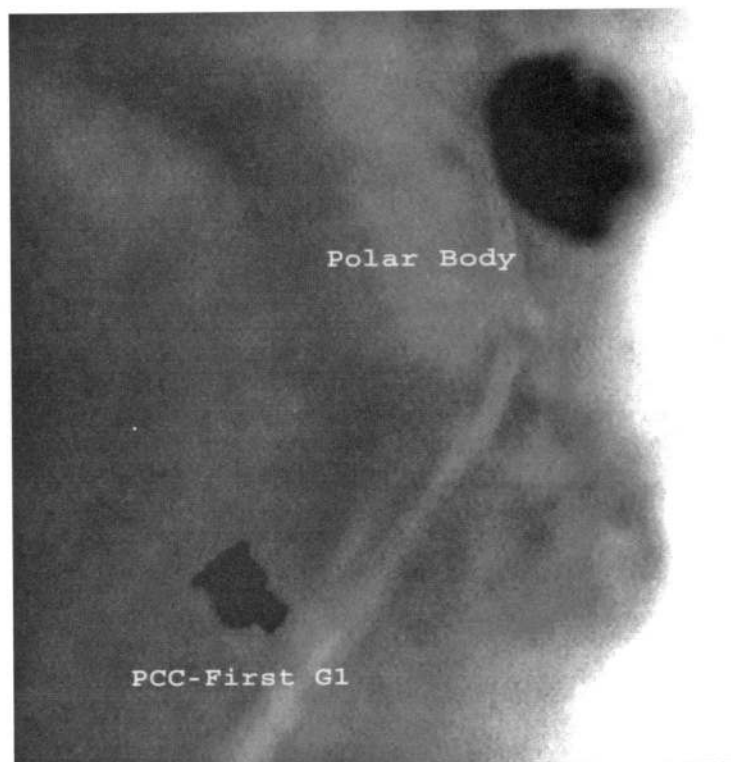
شکل ۳. نمای میکروسکوپی اووسیت تزریق شده موش. MII: اووسیت متافاز II موش، PNCD (Partial Nuclear Chromatin Decondensation): نامتراکم شدن جزئی کروماتین هسته اسپرم، بزرگنمایی: $\times 1000$

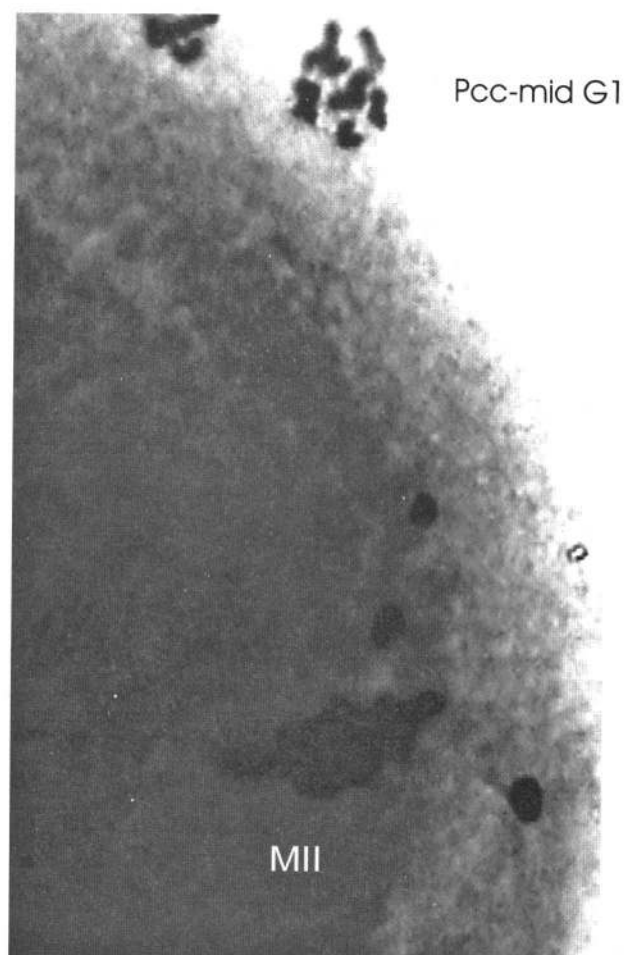




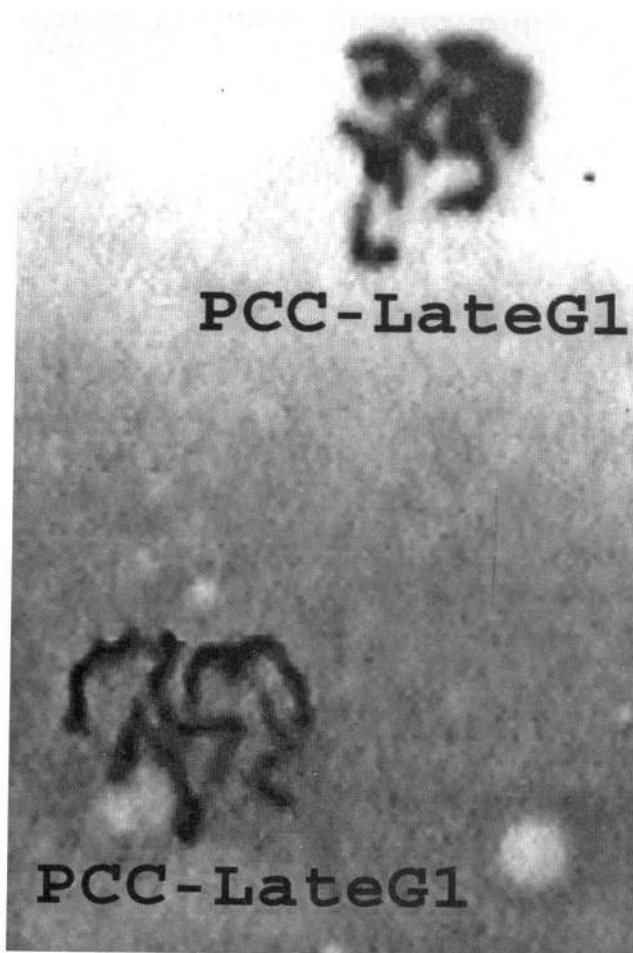
شکل ۴. نمای میکروسکوپی اووسیت تزریق شده موش. Polar Body، PCC - S: تراکم پیش‌رس کروموزوم اسپرم در فاز S، بزرگنمایی: $\times 1000$

شکل ۵. نمای میکروسکوپی اووسیت تزریق شده موش. Polar Body، PCC - First G1: تراکم پیش‌رس کروموزوم اسپرم در ابتدای فاز G1، بزرگنمایی: $\times 1000$





▲ شکل ۶. نمای میکروسکوپی اووسیت تزریق شده موش. PCC-Mid. G1: تراکم پیش‌رس کروموزوم اسپرم در اواسط فاز MII، G1: اووسیت متافاز II موش، بزرگمایی: ۱۰۰۰ ×



▲ شکل ۷. نمای میکروسکوپی اووسیت تزریق شده موش. PCC-Late G1: تراکم پیش‌رس کروموزوم اسپرم در اواخر فاز G1، بزرگمایی: ۱۰۰۰ ×

