

## ارزیابی کارایی روش ترکیبی زتا و سانتریفیوژ شیب غلظت (پیور - زتا) برای جداسازی اسپرم با ساختار کروماتین طبیعی

مهسا خیراللهی کوهستانی<sup>۱</sup>؛ سیدجمال مشتاقیان<sup>۱</sup>؛ شهناز رضوی<sup>۲</sup>؛ محمدحسین نصرافهانی<sup>۳\*</sup>؛ محمدرضا دیمه<sup>۴</sup>

### چکیده

**زمینه:** از آنجا که انتخاب اسپرم با محتوای کروماتین طبیعی برای تزریق مستقیم اسپرم به درون سیتوپلاسم تخمک (ICSI) دارای اهمیت وافری است، امروزه محققین در پی یافتن روش‌هایی نوین برای جداسازی اسپرمی با سلامت ساختار کروماتین و مورفولوژی مناسب می‌باشند. هدف از انجام این مطالعه کارایی روش جدید زتا، روش رایج سانتریفیوژ شیب غلظت Pure Sperm و نیز روش ترکیبی پیور-زتا (Zeta) از لحاظ جداسازی اسپرم با ساختار کروماتین طبیعی که با استفاده از روش‌های پراکنندگی کروماتین اسپرم (SCD) و کرومومایسین A3 (CMA3) مورد ارزیابی قرار گیرد.

**روش‌ها:** این مطالعه در روی ۲۸ بیمار مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان صورت گرفت. آنالیز معمول مایع منی طبق معیارهای WHO انجام شد. سپس نمونه مایع منی به چهار بخش شامل: گروه کنترل، اسپرم‌های جداسازی شده به روش زتا، اسپرم‌های جداسازی شده به روش سانتریفیوژ شیب غلظت (پیور) و اسپرم‌های جداسازی شده به روش پیور-زتا تقسیم گردید. سپس در روی هر یک از گروه‌های مذکور، ارزیابی مورفولوژی اسپرم (رنگ آمیزی Diff Quick)، کمبود پروتامین (رنگ آمیزی CMA3) و فرگمنتاسیون DNA (با استفاده از آزمایش SCD) انجام گرفت. نتایج با آزمون آنوا بررسی و تحلیل شدند و  $P < 0/05$  معنادار در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** درصد اسپرم‌های با کمبود پروتامین و نیز فرگمنتاسیون DNA در سه گروه اسپرم‌های جداسازی شده به روش زتا، پیور و پیور-زتا نسبت به گروه کنترل از لحاظ آماری کاهش معناداری یافته است ( $P < 0/05$ ). همچنین از لحاظ انتخاب اسپرم با مورفولوژی مناسب اختلاف معناداری بین اسپرم‌های انتخاب شده توسط روش پیور و نیز روش ترکیبی پیور-زتا نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید ( $P < 0/05$ ). بین روش زتا، روش پیور و روش پیور-زتا تفاوت معناداری از لحاظ جداسازی اسپرم - با مورفولوژی و محتوای پروتامین طبیعی و فرگمنتاسیون DNA وجود نداشت ( $P > 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان می‌دهد که هر دو روش پیور و زتا در جداسازی اسپرم با کیفیت مناسب از لحاظ مورفولوژی، محتوای پروتامین و سلامت DNA مؤثر بوده است، لیکن روش ترکیبی پیور-زتا تأثیر بیشتری را در جداسازی اسپرم با مورفولوژی، محتوای پروتامین و سلامت DNA نسبت به به کارگیری دو روش پیور و زتا به صورت انفرادی دارا می‌باشد.

**کلیدواژه‌ها:** روش زتا، روش پیور، روش پیور-زتا، مورفولوژی اسپرم، کمبود پروتامین، فرگمنتاسیون DNA

«دریافت: ۱۳۸۷/۷/۲۲ پذیرش: ۱۳۸۸/۳/۱۲»

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

۲. گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۳. گروه آندروولوژی - جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده رویان، جهاد دانشگاهی (پایگاه تحقیقات علوم سلولی اصفهان)

تهران - ایران و مرکز باروری و ناباروری اصفهان

۴. مرکز باروری و ناباروری اصفهان

\*عهده‌ارمکاتبات: تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه آندروولوژی - جنین‌شناسی، تلفن: ۳-۲۶۱۲۹۰۰-۰۳۱۱

## مقدمه

به مراتب بیشتر است (۳ و ۴)، از سوی دیگر نقص در محتوای پروتامین در مردان نابارور با عدم تراکم صحیح کروماتین برای فرایند لقاح طبیعی، مستعد شدن DNA به آسیب دیدگی و همچنین تراکم زودرس کروماتین (PCC)<sup>۱</sup> بعد از انجام ICSI که منجر به عدم فعال شدن تخمک می گردد، همراه می باشد (۵-۸). با توجه به مواردی که ذکر گردید انتخاب اسپرم سالم در درمان بیماران نابارور با روش ICSI، اهمیت قابل ملاحظه ای را داراست.

امروزه در بسیاری از مراکز کمک باروری برای جداسازی اسپرم های سالم از روش هایی از جمله روش مهاجرت اسپرم که سلول های اسپرمی را بر اساس تحرک جدا می نماید و نیز روش سانتریفیوژ شیب غلظت که اسپرم ها را بر اساس چگالی جداسازی می کند و قادر به جدا نمودن اسپرم هایی با تحرک بیشتر و مورفولوژی طبیعی می باشد، استفاده می نمایند (۹). روش های مذکور منجر به جداسازی اسپرم های متحرک از باکتری ها و اسپرم های مرده می گردد، همچنین درصد تحرک و مورفولوژی اسپرم های جداسازی شده در محدوده طبیعی می باشد. حال آن که همان گونه که ذکر گردید خصوصیات ظاهری اسپرم از جمله تحرک و مورفولوژی، گویای سلامت ساختار کروماتینی این سلول نبوده و لذا امروزه محققین با به کارگیری ویژگی های مولکولی و عملکردی اسپرم برای جداسازی و انتخاب این سلول در حال انجام تحقیقاتی هستند که از آن جمله می توان به روش الکتروفوروز و زتا مبتنی بر بار الکتریکی سطح

روش های کمک باروری به طور گسترده برای درمان افراد نابارور به کار گرفته می شوند. در میان این روش ها، روش تزریق اسپرم به داخل تخمک (ICSI)<sup>۱</sup> به عنوان گزینه ای مناسب برای حل مشکل ناباروری زوجین با علل مردانه مطرح می گردد. لیکن میزان سلامت این روش درمانی مورد تردید قرار گرفته است چرا که در روش مذکور تمامی سدهایی که در مراحل لقاح طبیعی و آزمایشگاهی (IVF)<sup>۲</sup>، در مسیر رسیدن اسپرم به تخمک قرار دارند برداشته شده و اسپرم مستقیماً به درون تخمک تزریق می گردد، از این رو، این امر موجب بروز نگرانی هایی در مورد احتمال ایجاد عوارضی از جمله عدم موفقیت در بارداری، ایجاد نقایص کروموزومی و همچنین ناهنجاری های مادرزادی و تکوینی در جنین گردیده است (۱).

در حال حاضر معیار انتخاب اسپرم در روش ICSI تحرک و مورفولوژی این سلول بوده و جنین شناس با توجه به این دو معیار اسپرم را انتخاب می نماید و سپس آن را به درون تخمک تزریق می کند. لیکن از آنجایی که این دو معیار، بازگوکننده سلامت ساختار کروماتینی اسپرم نمی باشد، لزوم به کارگیری روش هایی جدید برای ارزیابی سلامت اسپرم، یک ضرورت به نظر می رسد (۲). شواهد و مدارک کلینیکی نشان می دهد که آسیب های DNA اسپرم بر نتایج باروری، اثر مضر و مخرب داشته و میزان این آسیب ها در مردان نابارور نسبت به مردان بارور

1. Intra Cytoplasmic Sperm Injection

3. Premature Chromatin Condensation

2. In Vitro Fertilization

اسپرم اشاره نمود (۱۰ و ۱۱).

روش زتا در سال ۲۰۰۶ توسط چان و همکارانش به عنوان یک روش نوین جداسازی اسپرم معرفی گردید (۱۱). تحقیقات نشان داده که اسپرم بالغ دارای بار الکتریکی در حدود ۱۶- تا ۲۰- میلی ولت است (۱۲). این بار الکتریکی در اثر ظرفیت یابی اسپرم و یا مواجهه با نورامینیداز رحمی یا مایع فولیکولی کاهش می یابد (۱۳) که این بار الکتریکی پتانسیل زتا نامیده می شود (۱۶-۱۲) و با تشکیل سیالوگلیکوپروتئین های باردار در سطح غشای اسپرم ایجاد می گردد. در طی عبور اسپرم از اپیدیدیم، سه شکل مختلف گلیکوپروتئین Gp20-CD52 به غشای پلاسمایی اسپرم توسط پیوندهای گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول اتصال می یابند (۱۳ و ۱۸-۱۶). کارایی این روش جدید در انتخاب سلول های اسپرم با مورفولوژی طبیعی، سلامت آکروزومی و نیز سلامت ساختار کروماتین به اثبات رسیده است. میزان آپتوز، نکروز و آسیب ماده ژنتیکی در اسپرم های انتخاب شده در این روش به مقدار قابل توجهی کاهش می یابد (۱۹ و ۲۰). لذا به کارگیری این روش انتخاب اسپرم می تواند به عنوان گزینه ای جدید در روش های آماده سازی اسپرم مطرح گردد. این در حالی است که روش زتا به قدر کافی قادر به جدا نمودن اسپرم ها از مایع منی و باکتری های موجود در آن بوده و در این مورد به اندازه روش پیور کارایی ندارد.

امروزه به صورت گسترده ای در مراکز باروری و ناباروری، روش سانتریفیوژ شیب غلظت (پیور) برای جداسازی و آماده نمودن اسپرم مورد استفاده قرار

می گیرد، روش مذکور راهی مناسب برای جداسازی اسپرم از مایع منی می باشد. در این روش مایع منی بر روی لایه هایی با غلظت های مختلف از پیور اسپرم قرار گرفته و پس از سانتریفیوژ، اسپرم های مناسب بر اساس چگالی جداسازی می شوند. با توجه به تفاوت موجود در چگالی و باکتری ها، اسپرم های مرده و زنده به ترتیب در لایه ها از بالا به پایین قرار می گیرند و اسپرم های زنده به واسطه داشتن چگالی بیشتر به انتهای لوله رسیده و ته نشین می گردند (۲۱). مواد مورد استفاده در روش سانتریفیوژ در شیب غلظت با عناوین مختلف تجاری شناخته می شوند که عبارتند از: Percoll، Sil-Select، Ixaprep و Pure Sperm که امروزه Pure Sperm به طور معمول در روش های کمک باروری و آزمایشگاه های آندروولوژی مورد استفاده قرار می گیرد (۲۲).

اکنون این سؤال مطرح می شود که آیا به کارگیری هم زمان دو روش پیور و زتا می تواند میزان بازدهی مراحل آماده سازی اسپرم را بالاتر برده و از محاسن هر دو روش برای جداسازی بهتر اسپرم هایی با مورفولوژی طبیعی و ساختار کروماتینی سالم استفاده شود؟ از این رو هدف از مطالعه حاضر این است که فرضیه مذکور را مورد ارزیابی قرار دهد. لذا میزان کارایی روش زتا و پیور، هم به صورت جداگانه و هم به صورت روش ترکیبی پیور- زتا برای جداسازی سلول های اسپرم با مورفولوژی و ساختار کروماتین طبیعی ارزیابی گردید و نتایج به دست آمده از روش های مذکور نسبت به یکدیگر مقایسه شد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه در روی نمونه‌های مایع منی ۲۸ زوج نابارور مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان برای انجام عمل ICSI، بررسی به عمل آمد. تحقیق مذکور از مهرماه سال ۱۳۸۶ تا خردادماه سال ۱۳۸۷ انجام پذیرفت. پس از اخذ رضایت‌نامه از بیماران، نمونه‌های مایع منی در روز تخمک‌گیری، بعد از ۳-۴ روز خودداری زوجین از مقاربت، جمع‌آوری گردید. میانگین سن برای مردان  $32/5 \pm 35/5$  و برای همسران آنها  $30/7 \pm 35/14$  و میانگین تعداد دفعات درمان قبلی این بیماران برابر با  $28/1 \pm 54/1$  بود. ۲۲/۲۳ درصد بیماران با علت ناباروری مردانه، ۱۴/۸۱ درصد با علت ناباروری زنانه و ۶۲/۹۶ درصد بیماران با هر دو علت ناباروری مردانه و زنانه به این مرکز مراجعه کردند. آنالیز معمول مایع منی (بررسی غلظت، تحرک و مورفولوژی) طبق معیار WHO، توسط میکروسکوپ نوری انجام گرفت (۲۳). ذکر این نکته ضروری است که در این مطالعه از نمونه‌های منی با غلظت پایین استفاده نشد و دلیل این امر آن است که در روش زتا تعداد اسپرم محدودی جمع‌آوری می‌گردد، همچنین انتخاب نمونه‌ها به روش ساده انجام پذیرفت. تمامی مواد مصرفی در این مطالعه به‌جز موارد اشاره شده در متن از شرکت سیگما تهیه گردیده است.

● آماده‌سازی اسپرم: در این مطالعه، نمونه مایع منی بیماران به ۴ بخش تقسیم گردید. گروه اول با روش پیور، گروه دوم با استفاده از روش زتا و گروه سوم با

به‌کارگیری هم‌زمان هر دو روش پیور و زتا (روش ترکیبی پیور- زتا) جداسازی شدند. گروه چهارم، با نمونه مایع منی دو بار شستشو داده‌شده با محیط Ham's بود که به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. نمونه‌های آماده‌سازی‌شده از هر گروه به‌طور مجزا از لحاظ مورفولوژی، میزان کمبود پروتئین و مقدار فرگمنتاسیون DNA به‌ترتیب با استفاده از روش رنگ‌آمیزی Diff Quick (۲۴)، رنگ‌آمیزی کرومومایسین A<sub>3</sub> (CMA3) (۲۵) و (SCD)<sup>۱</sup> (۲۶) مورد بررسی قرار گرفت.

● روش جداسازی سانتریفیوژ شیب غلظت (پیور): یک گرادیان دولایه‌ای از محلول Pure sperm (۸۰ و ۴۰ درصد در لوله فالكون ۱۰cc تهیه گردید تا یک ستون ممتد از Pure sperm دو لایه با دو شیب غلظت مجزا ایجاد شود. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از مایع منی روی آن قرار داده شد و به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰۰g سانتریفیوژ گردید. در این مطالعه، برای انجام روش DGC از ماده تجاری Pure sperm (کشور سازنده سوئد) استفاده گردید. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی با پپت پاستور آسپیره شده و باقی‌مانده محتویات لوله به یک لوله فالكون ۵cc منتقل شد و با محیط Sperm Rinse، مخلوط گردید. سپس سوسپانسیون ایجاد شده به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰g سانتریفیوژ شد. مجدداً پس از سانتریفیوژ، مایع رویی برداشته و رسوب تشکیل‌شده در انتهای لوله که محتوی اسپرم‌های جداسازی‌شده است برای انجام آزمایش‌های موردنظر مورد استفاده قرار گرفت (۲۲).

گلیسرول مونت گردید. آنالیز میکروسکوپی اسلایدها توسط میکروسکوپ فلورسنت (BX51, Tokyo, Japan) صورت گرفت. پس از رنگ آمیزی CMA3 اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین با رنگ زرد درخشان (CMA3 مثبت) و اسپرم‌های طبیعی با رنگ زرد کم‌رنگ (CMA3 منفی) قابل مشاهده بود. در این مطالعه در هر نمونه، ۲۰۰ اسپرم آنالیز گردید و درصد اسپرم‌های CMA3 مثبت (کمبود پروتامین) گزارش شد (۲۵).

● ارزیابی فرگمانتاسیون DNA بر اساس آزمایش SCD: ۳۰ میکرولیتر از نمونه اسپرمی آماده شده (غلظت ۱۰-۵ میلیون) با ۷۰ میکرولیتر از آگاروز ۱ درصد با درجه ذوب پایین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مخلوط می‌گردید. سپس نمونه مخلوط شده بر روی لامی که از قبل با آگاروز ۰/۶۵ درصد پوشیده شده بود، قرار داده شد و با گذاشتن یک لامل بر روی آن، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس با دقت لامل از سطح لام جدا گردیده و هر لام به صورت افقی در محلول اسیدکلریدریک ۰/۰۸ طبیعی به مدت ۷ دقیقه قرار داده شد. در مرحله بعد لام در محلول لیزکننده اسپرم (pH 7.5) به مدت ۲۵ دقیقه قرار گرفت و پس از دو بار شستشو در آب مقطر، به ترتیب در الکل‌های ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد هر یک به مدت ۲ دقیقه آگیری می‌شد. لام‌ها بعد از خشک شدن، با محلول رنگ Wright در PBS به نسبت ۱:۱ رنگ آمیزی گردید و با میکروسکوپ نوری بررسی شد. با استفاده از این روش می‌توان میزان فرگمانتاسیون DNA را به صورت ۵ نوع سلول با توجه به وجود هاله اطراف هسته و اندازه آن نسبت به هسته

● روش جداسازی زتا: ابتدا نمونه اسپرمی در لوله مخصوص سانتریفوژ ریخته شده و با محیط Ham's شستشو گردید، سپس لوله سریعاً سه مرتبه درون دستکش لاتکس چرخیده و بیرون کشیده شد تا باردار گردد. لوله باردار حاوی نمونه به مدت یک دقیقه در دمای آزمایشگاه (۲۲ درجه) قرار داده شد تا اسپرم‌های بالغ دارای بار منفی به جدار لوله بچسبند. لوله مذکور به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردیده و بعد رسوب تشکیل شده و سوسپانسیون سلولی با پیپت پاستور به آرامی از ته لوله خارج گردید. سپس محیط کشت Ham's به داخل آن ریخته و مجدداً خارج شده تا سلولی ته لوله باقی نماند. پس از آن ۵۰۰ میکرولیتر محیط Sperm Rinse حاوی سرم در لوله ریخته و جدار لوله با آن شستشو داده شد تا جدار لوله بدون بار گردد و اسپرم‌های چسبیده به جدار لوله جدا شده و به داخل آن ریخته شود (۱۱).

● ارزیابی کمبود پروتامین بر اساس رنگ آمیزی کرومومایسین A<sub>3</sub>: اسمیرهای آماده شده از اسپرم‌های جداسازی شده که در محلول کارنوی (متانول و اسید استیک با نسبت ۳:۱) به صورت هم حجم، ثابت گردیده به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به منظور انجام رنگ آمیزی CMA3 هر اسلاید به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول CMA3 رنگ آمیزی شده (۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر مک کلونین، که شامل ۷cc اسید استیک ۰/۱ مولار و ۳۲/۹cc از VH2O و Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> و با غلظت ۰/۲ مولار PH=7 و ۹۵ میلی‌گرم ۱۰MgCl<sub>2</sub> میلی‌مولار می‌باشد). سپس اسلایدها با بافر PBS شستشو داده شد، در مرحله بعد اسلایدها با

بیمار مورد مطالعه شامل غلظت، درصد تحرک و مورفولوژی نمایش داده شده است. میانگین غلظت اسپرم  $49/14 \pm 3/34$ ، درصد تحرک  $43/28 \pm 2/23$  و درصد مورفولوژی غیرطبیعی برابر با  $78/57 \pm 1/65$  بوده است.

مقایسه درصد کمبود پروتامین، درصد فرگمنتاسیون DNA و نیز درصد مورفولوژی غیرطبیعی بین ۴ گروه مذکور در نمودارها نشان داده شده است. علایم اختصاری نشانگر گروه‌های موردنظر می‌باشند (گروه کنترل C، روش زتا Z، روش پیور P، روش ترکیبی پیور- زتا P.Z).

همان‌گونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود میزان

درصد کمبود پروتامین در اسپرم‌های انتخاب‌شده به روش

بررسی نمود. درصد اسپرم‌های با فرگمنتاسیون DNA (هسته اسپرم با هاله کوچک، بدون هاله و سلول اسپرم درجه‌بندی شده) و بدون فرگمنتاسیون DNA (هسته اسپرم با هاله بزرگ و هاله متوسط) ارزیابی گردید (۲۶)، در هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش و به‌صورت درصد فرگمنتاسیون گزارش شد.

نتایج با آزمون آنوا تجزیه و تحلیل شدند و در صورتی که عدد P کم‌تر از ۰/۰۵ بود از لحاظ آماری معنادار تلقی گردید.

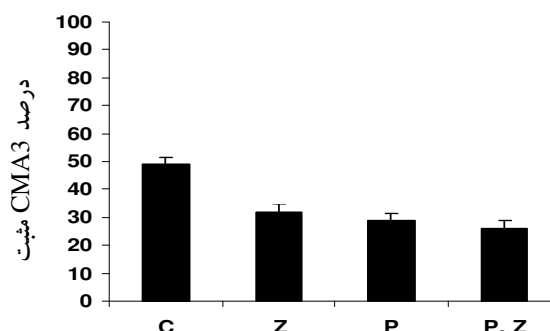
## یافته‌ها

در جدول ۱ اطلاعات توصیفی متغیرهای اسپرمی ۲۸

جدول ۱- میانگین غلظت، درصد تحرک و مورفولوژی غیرطبیعی در نمونه‌های منی ۲۸ بیمار

متغیرها	میانگین	حداقل	حداکثر	تعداد
غلظت (میلیون/میلی لیتر)	$49/14 \pm 3/34$	۱۰/۰۰	۹۰/۰۰	۲۸
درصد تحرک	$43/28 \pm 2/23$	۱۵/۰۰	۶۵/۰۰	۲۸
درصد مورفولوژی غیرطبیعی	$78/57 \pm 1/65$	۵۸/۰۰	۹۶/۰۰	۲۸

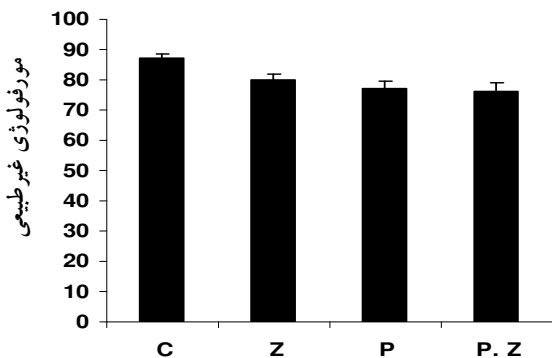
زتا و پیور و نیز روش ترکیبی پیور- زتا در مقایسه با نمونه کنترل کاهش معناداری را نشان می‌دهد. لیکن تفاوت معناداری بین درصد کمبود پروتامین اسپرم‌های انتخاب‌شده با روش پیور و زتا ( $P=0/820$ ) و نیز روش ترکیبی پیور- زتا و پیور وجود ندارد ( $P=0/913$ ). علاوه بر این اختلاف معناداری بین میزان کمبود پروتامین اسپرم‌های انتخاب‌شده به روش زتا و روش ترکیبی پیور- زتا مشاهده نگردید ( $P<0/421$ ).



نمودار ۱- مقایسه درصد کمبود پروتامین بین گروه‌های کنترل، زتا،

پیور و پیور-زتا. هر سه روش در سطح  $p<0/05$  اختلاف معناداری را

با گروه کنترل نشان داده است.



نمودار ۳- مقایسه درصد مورفولوژی غیرطبیعی گروه‌های کنترل، زتا، پیور و پیور-زتا. روش پیور و روش ترکیبی پیور-زتا در سطح  $p < 0.05$  اختلاف معناداری را با گروه کنترل نشان داده است.

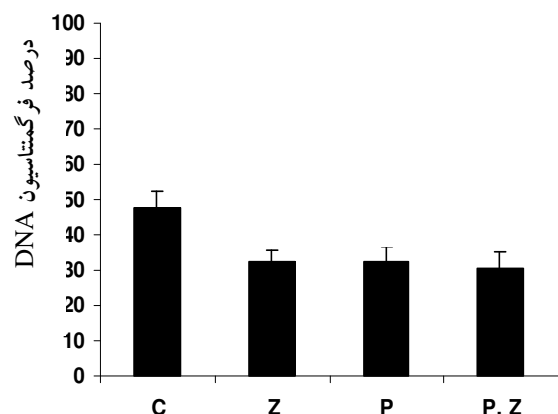
### بحث

در حال حاضر روش‌های گوناگونی برای جداسازی اسپرم توسط محققین معرفی گردیده است که هدف تمامی آن‌ها جداسازی اسپرم‌های بالغ و طبیعی از لحاظ مورفولوژی با ساختار طبیعی کروماتین هسته می‌باشد (۱۰، ۱۱ و ۲۷). از میان این روش‌های جداسازی، روشی که به‌طور معمول مورد استفاده قرار می‌گیرد روش ساتریفیوژ شیب غلظت (پیور) می‌باشد. در این روش اسپرم‌هایی که از لحاظ مورفولوژی و حرکت در محدوده طبیعی قرار دارند بر اساس اختلاف در چگالی از اسپرم‌های غیرطبیعی جدا می‌شوند (۲۲).

تحقیقات ساکس و همکارانش در سال ۲۰۰۰ نشان داده که استفاده از روش ساتریفیوژ شیب غلظت در آماده‌سازی اسپرم موجب کاهش قابل‌ملاحظه درصد اسپرم‌های با کمبود محتوای پروتامین و نیز کاهش تعداد سلول‌های اسپرمی با ماده ژنتیکی تخریب‌شده می‌گردد (۹) و همچنین نسبت اسپرم‌هایی با مورفولوژی طبیعی،

همان‌گونه که در نمودار ۲ نشان داده شده است، میزان فرگمتاسیون DNA اسپرم‌های انتخاب‌شده به روش زتا، پیور و نیز روش ترکیبی پیور-زتا در مقایسه با نمونه کنترل کاهش معناداری را نشان می‌دهد. مقادیر P value به ترتیب  $P = 0.50$ ،  $P = 0.057$  و  $P = 0.023$  می‌باشند. لیکن روش زتا و پیور ( $P = 1.000$ )، روش زتا و روش ترکیبی پیور-زتا ( $P = 0.992$ ) و نیز روش پیور و روش ترکیبی پیور-زتا ( $P = 0.986$ ) از لحاظ انتخاب اسپرم‌هایی با درصد پایین‌تر فرگمتاسیون DNA، اختلاف معناداری را نسبت به یکدیگر نشان ندادند.

در نمودار ۳، اسپرم‌های انتخاب‌شده به روش پیور و روش ترکیبی پیور-زتا در مقایسه با نمونه کنترل کاهش معناداری را از لحاظ جداسازی اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی نشان می‌دهند و مقادیر P value به ترتیب  $P = 0.021$  و  $P = 0.011$  می‌باشند. لیکن تفاوت معناداری بین درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم‌های انتخاب‌شده توسط زتا نسبت به نمونه کنترل وجود ندارد ( $P = 0.162$ ).



نمودار ۲- مقایسه درصد فرگمتاسیون DNA بین گروه‌های کنترل، زتا، پیور و پیور-زتا. هر سه روش در سطح  $p < 0.05$  اختلاف معناداری را با گروه کنترل نشان داده است.

می‌باشد. بر طبق نتایج حاصل از این تحقیق هرچند اختلاف معناداری بین روش ترکیبی پیور-زتا با روش‌های پیور و زتا وجود ندارد، لیکن این روش ترکیبی با به‌کاربردن محاسن هر دو روش پیور و زتا تا حد بیشتری قادر به جداسازی اسپرم‌هایی با ناهنجاری‌های مورفولوژیکی کم‌تر و سلامت ژنتیکی بیشتر بوده و در صورت افزایش تعداد نمونه‌ها اختلاف معناداری نیز قابل مشاهده خواهد بود.

در توجیه کارایی روش زتا، می‌توان به این نکته اشاره نمود که همان‌گونه که تحقیقات گوناگون پیش از این نشان داده‌اند، اضافه شدن سیالوگلیکوپروتئین‌ها بر سطح خارجی غشای اسپرم که عامل به‌وجودآورنده اختلاف بار الکتریکی بین سطح غشای اسپرم و محیط خارج می‌باشد، در مرحله اسپرمیوژنز رخ می‌دهد (۱۳). لذا هرگونه اختلال در روند اسپرمیوژنز ممکن است منجر به عدم تکامل صحیح غشاء پلاسمایی اسپرم شود و هم‌زمان در بسته‌بندی و تراکم کروماتین نیز اختلال ایجاد نماید (۲۸-۳۲). از آنجایی که تراکم صحیح کروماتین اسپرم در این مرحله، ممکن است با تکامل پروتئین‌های سطحی غشاء پلاسمایی اسپرم هم‌زمان باشد این امر می‌تواند توجیه‌کننده این مطلب باشد که اسپرم‌های دارای محتوای صحیح گلیکوپروتئین‌های سطحی غشای پلاسمایی که بر اساس بار الکتریکی طبیعی خود در روش زتا جداسازی شده‌اند، احتمالاً دارای محتوای پروتئین طبیعی نیز می‌باشند. محتوای پروتئین طبیعی منجر به بسته‌بندی صحیح کروماتین گشته و از آسیب DNA ممانعت به‌عمل می‌آورد، بنابراین این نکته می‌تواند

در جداسازی اسپرم‌ها به‌روش سانتریفیوژشیب غلظت در مقایسه با سایر روش‌های جداسازی اسپرم از جمله روش مهاجرت اسپرم به‌طور معناداری افزایش می‌یابد (۹). نتایج حاصله از این مطالعه نیز حاکی از آن است که روش پیور، قادر به جداسازی درصد قابل‌توجهی از سلول‌های اسپرم با مورفولوژی و ساختار کروماتین طبیعی می‌باشد، از جمله روش‌های نوین جداسازی اسپرم می‌توان به روش زتا اشاره نمود. در این روش انتخاب اسپرم بالغ بر اساس پتانسیل الکتریکی روی غشای اسپرم صورت می‌گیرد (۱۱). بر اساس مطالعه چان و همکاران جداسازی اسپرم‌ها به‌روش زتا، امکان انتخاب اسپرم‌های با مورفولوژی بهتر و تحرک بیشتر را فراهم می‌نماید (۱۱). مطالعات پیشین نصراصفهبانی و همکاران و نیز نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه حاکی از آن است که روش زتا قادر به جداسازی سلول‌های اسپرم با مورفولوژی و محتوای پروتئینی طبیعی بوده و نیز میزان درصد تخریب DNA در اسپرم‌های انتخاب‌شده به‌مقدار قابل‌توجهی کاهش می‌یابد (۲۰).

در نتایج حاصله از این تحقیق، بین روش پیور، روش زتا و روش ترکیبی پیور-زتا در انتخاب و جداسازی اسپرم‌ها با درصد بالاتر مورفولوژی طبیعی و همچنین سلامت ساختار کروماتین تفاوت معناداری مشاهده نشد. یافته‌های حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که روش زتا کارایی مشابه با روش پیور را دارا بوده و می‌تواند همانند روش پیور، اسپرم‌هایی با سلامت ساختار کروماتین را جداسازی نماید. این در حالی است که روش ترکیبی نیز قادر به جداسازی اسپرم‌های طبیعی



مؤید این مطلب باشد که اسپرم‌های جداسازی‌شده به روش زتا دارای درصد پایین‌تری از تخریب ماده ژنتیکی نسبت به گروه کنترل می‌باشند.

به‌رغم این که روش زتا ساده است، ولی محدودیت‌های خاص خود را نیز دارد. در این روش، جداسازی اسپرم‌ها باید به سرعت و پیش از ظرفیت‌یابی اسپرم انجام گیرد، زیرا ظرفیت‌یابی اسپرم موجب حذف برخی از گلیکوپروتئین‌ها و سیالوگلیکوپروتئین‌ها از سطح خارجی غشای اسپرم‌ها می‌گردد و همین امر منجر به کاهش بار منفی سطح غشا می‌شود که نتیجه آن اتصال تعداد کم‌تر و سست‌تر اسپرم‌ها به جدار شیشه می‌شود. بنابراین برای جداسازی بهینه اسپرم‌ها از طریق روش زتا بایستی به‌طور سریع عمل نمود (۱۴ و ۱۵).

### نتیجه‌گیری

هدف از مطالعه حاضر، این بود که روش‌های جداسازی زتا و پیور به‌طور جداگانه و نیز به‌صورت ترکیب با

یکدیگر مورد ارزیابی قرار گیرند. علاوه بر این مشخص گردید که روش زتا کارایی مشابه با کارایی روش پیور دارد و نیز روش ترکیبی پیور-زتا با به‌کار بستن محاسن هر دو روش، منجر به جداسازی بهترین اسپرم‌ها از لحاظ سلامت ماده ژنتیکی و ساختار کروماتینی و نیز مورفولوژی می‌شود. لذا استفاده از این روش ترکیبی منجر به بازدهی بالاتر در روند جداسازی و آماده‌سازی اسپرم‌ها می‌شود و گزینه بهتری را پیش روی محققین در انتخاب صحیح‌تر اسپرم‌ها برای انجام ICSI قرار می‌دهد.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق با همکاری پژوهشکده رویان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان انجام گرفته است. لذا از کلیه مسئولین و کارکنان مراکز مذکور کمال تشکر و قدردانی را داریم. بودجه این تحقیق توسط پژوهشکده رویان پرداخت گردید.

## References

- Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G et al., Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod* 2004; 19(6):1409-17.
- Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M. The role of sperm chromatin anomalies on the outcome of assisted reproduction techniques. *Yakhteh* 2006; 7(4): 206-266.
- Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, et al. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril* 2004; 81(4):965-972.
- Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, et al. Sperm DNA fragmentation Decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003; 18(5): 1023-28.
- Nasr-Esfahani MH, Razavi SH, Tavalae M. Failed Fertilization post ICSI and Spermogenic Defects. *Fertil Steril* 2008; 89(4):892-8.
- 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. *Andrologia* 2004; 36(3): 95-100.
- Mardani M, Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Shirazi R, Tavalae M. Differentiation between the effect of protamine deficiency and failed oocyte activation on fertilization post ICSI. *Journal of Iranian Anatomical Sciences* 2006; 4(1): 95-103.
- Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M, Shirazi R, Javanmardi S. Effects of failed oocyte activation and sperm protamine deficiency on fertilization post-ICSI. *Reprod Biomed Online* 2007; 14(4): 422-9.
- Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG et al., 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):1112-6.
- 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.
- 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.
- Ishijima SA, Okuno M, Mohri H. Zeta potential of human X- and Y-bearing sperm. *Int J Androl.* 1991; 14(5): 340-7.
- Della Giovampaola C, 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 cap citation. *Mol Reprod Dev.* 2001; 60(1):89-96.
- Focarelli R, Rosati F, Terrana B. Sialyglycoconjugates release during in vitro capacitation of human Spermatozoa. *J Androl.* 1990; 11(2):97-104.
- 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.
- Srivastava PN, Farooqui AA. Studies on neuraminidase activity of the rabbit endometrium. *Biol Reprod.* 1980; 22(4):858-63.
- Carlini E, Palmerini CA, Cosmi EV, Arienti G. Fusion of sperm with prostasomes: effects on Membrane fluidity. *Arch Biochem Biophys.* 1997; 343(1):6-12.
- Kirchhoff C, Hale G. Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol- anchored membrane proteins during sperm maturation. *Mol Hum Reprod.* 1996; 2(3):177-84. Review.
- Kam TL, Jacobson JD, Patton WC, Corselli JU, Chan PJ. Retention of membrane charge attributes by cryopreserved-thawed sperm and zeta selection. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24(9):429-34.
- Shayesteh Moghadam M, Nasr-Esfahani MH, Razavi Sh., Nazem HA, Deemeh MR, Tavalae M [The efficiency of zeta method in separation of sperm with normal morphology and chromatin structure (Persian)] *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences.* 2008; 10(1):20-27.
- Makler A., Stoller J, Makler-Shiran, E. Dynamic aspects concerned with the mechanism of separating motile sperm from nonmotile sperm, leukocyte and debris with the use of high-density Percoll gradients. *Fertil Steril.* 1998; 70(5):961-6.
- Ming JC, Ariff. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. *Hum. Reprod* 1999; 14(3):759-764.
- World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 1999
- Mercan R, Nassar A, Ozgur K, Srisombut C. Assessment of Sperm Morphology by Strict Criteria: A Comparison of Two Different Staining Techniques and Manual Versus Computer Analysis. *Fertil Steril* 1997; 1997(1): 133-134.
- 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.

26. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2005; 84(4):833-842.
27. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vahdati D, Fathi F, Tavalae M. Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25(5):197-203.
28. Tavalae M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Effects of spermiogenesis defecys on Fertilization and pregnancy rate in IVF patients. *Yakhteh* 2007; 9(2):103-110.
29. Salehi M, Nasr-Esfahani MH, Razavi SH, Mardani M, Bahramian H, Oreizi F. [The relation between sperm protamine aberrations with protamine P1/P2 ratio (Persian)] *Yakhteh* 2005;6(4):212-217.
30. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vaezi GH, Shiravi AH, Tavalae M. Effect acrosome activity and morphology on fertilization post ICSI. *Medical Journal of reproduction & infertility* 2006; 7(3):217-224.
31. Ribes E, Giménez-Bonafé P, Martínez-Soler F, Gonzalez A, Saperas N, Kasinsky HE et al., Chromatin Organization During Spermiogenesis in Octopus vulgaris: Morphological Structures. *Mol Reprod* 2004; 68(2): 223- 231.
32. Tavalae M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2009; 91(4):1119-26.