مقایسه روشهای ارزیابی کیفیت کروماتین از لحاظ تراکم و پایداری در رابطه با میزان موفقیت در لقاح آزمایشگاهی IVF و ارایهٔ یک روش مناسب برای پیشگویی قدرت باروری

شهناز رضوی M.Sc.[☆]، محمدحسین نصراصفهانی Ph.D.[☆★♦]، محمد مردانی Ph.D.[☆]، سیدمهدی احمدی M.D.[★]

☆ دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکدهٔ پزشکی، گروه علوم تشریحی

★ مرکز باروری و ناباروری اصفهان

★ عضو هیئت علمی پژوهشکده رویان

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

چکیده

* **هدف:** مقایسهٔ روشهای ارزیابی کیفیت کروماتین از لحاظ تراکم و پایداری در رابطه با میزان موفقیت در لقاح آزمایشگاهی IVF (In Vitro Fertilization) و ارایهٔ یک روش مناسب برای پیشگویی قدرت باروری

* **مواد و روشها:** ۱۰۱ زوج نابارور کاندید، IVF به‌طور تصادفی انتخاب شدند و پس از جمع‌آوری مایع منی همزمان با انجام لقاح آزمایشگاهی بخشی از مایع منی برای تستهای کروموماپسین A_3، اکریدین اورانژ، اکریدین اورانژ همراه با شوک حرارتی، آنیلین‌بلو و روش SDS استفاده شد. در هر نمونه ۲۰۰ عدد اسپرم بررسی و درصد رنگ‌پذیری یا اندازهٔ سر اسپرم براساس نوع آزمایش انجام شده، محاسبه شد و ارتباط نتایج به‌دست آمده با درصد لقاح بررسی شد.

* **یافته‌ها:** نتایج حاصله نشانگر آن است که روش CMA_3 (Chromomycin A_3) و آنیلین‌بلو به ترتیب با میزان لقاح رابطه معنی‌دار نشان می‌دهد ($P<0.01$). با استفاده از مدل Logistic Regression مشخص شد که فقط ارزیابی کیفیت کروماتین به روش کروموماپسین A_3 به طور مستقل با لقاح ارتباط دارد. با مقایسه میانگین پارامترهای مختلف در دو گروه لقاح‌دار و بدون لقاح به روش t-test مشخص شد که اختلاف میانگین رنگ‌پذیری توسط کروموماپسین A_3 در دو گروه معنی‌دار است. علاوه بر آن منحنی ROC (Receiver Operating Curve) تستهای ارزیابی کروماتین نشان می‌دهد که روش کروموماپسین A_3 نسبت به سایر روشها از حساسیت بالاتری برخوردار بوده و اختصاصی‌تر است.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق بیانگر آن است که رنگ‌آمیزی کروموماپسین A_3 می‌تواند به‌عنوان یک تست مکمل همراه با آنالیز منی در ارزیابی قدرت باروری فرد IVF استفاده شود.

گل واژگان: بلوغ هستهٔ اسپرم، کروموماپسین A_3، باروری، لقاح آزمایشگاهی

مقدمه

آنالیز استاندارد مایع منی که شامل بررسی غلظت، تحرک و مرفولوژی اسپرم است شاخص مهمی در تعیین قدرت باروری فرد محسوب می‌شود. اما عده‌ای از محققین بر این باورند که نتایج این آنالیز به تنهایی نمی‌تواند قدرت باروری فرد را در حالت *In vitro* یا *In vivo* پیشگویی کند (۱، ۲، ۳) در مواردی مشاهده شده که یک فرد با وجود آنالیز منی طبیعی، نابارور است. همچنان‌که گزارش شده در افرادی با وجود آنالیز منی غیرطبیعی، باروری صورت گرفته است (۴، ۵). بنابراین نتایج حاصل از آنالیز منی در مواردی ارزش کلینیکی محدودی دارد و امروزه توجه بیشتری برروی تستهای عملکرد اسپرم متمرکز شده است. از جملهٔ این تستها تست بلوغ هستهٔ اسپرم[1] است که می‌تواند اطلاعات باارزشی در رابطه با تعیین قدرت باروری فرد در اختیار متخصصین قرار دهد (۴، ۶).

در مرحله اسپرمیوژنز هستهٔ اسپرماتید متراکم شده و پروتامین جایگزین هیستون می‌شود (۷). با تشکیل باندهای دی‌سولفید بین گروههای تیول اسید آمینه سیستئین موجود در پروتامین بر میزان پایداری افزوده می‌شود (۸، ۹).

تراکم کروماتین باعث تسهیل در انتقال اسپرم و محافظت ژنوم در برابر عوامل مخرب می‌شود (۷، ۱۴، ۱۸) و از آنجایی که ساختار آن بین افراد بارور و نابارور متفاوت است، اهمیت آن مشخص می‌شود (۱۰، ۱۱).

همچنین اختلالات در ساختار کروماتین و یا آسیب به DNA می‌تواند با موارد زیر ارتباط داشته باشد: حساسیت بیشتر به دناتوره شدن (۳۱)، آپوپتوزیس یا فراگمانتاسیون DNA در جنین (۱۷)، کاهش تشکیل درصد بلاستوسیست و تأخیر در نموجنینی (۱۵) و افزایش میزان سقط (۴)، عاملی برای ناباروریهای با علت ناشناخته است (۵).

روش SDS[2] برای ارزیابی NCD[3] (۴۴) و آکریدین اورانژ برای تعیین وضعیت سلامتی DNA (تمایز دو رشته‌ای از تک رشته‌ای) (۱۹) استفاده می‌شود. در حالی که فلوئوروکروم CMA_3 با پروتامین برای قرار گرفتن در شیار کوچک DNA رقابت می‌کند و نمایانگر کمبود پروتامین در کروماتین (۲۰) و آنیلین‌بلو معرف میزان هیستون در کروماتین است (۲۲). با اینکه روشهای متعددی جهت تعیین وضعیت کروماتین اسپرم از لحاظ تراکم و پایداری وجود دارد. اما هنوز بر روی هیچ‌یک از روشهای موجود به عنوان یک تست کلینیکی مناسب جهت پیشگویی میزان موفقیت در لقاح IVF اتفاق‌نظر وجود ندارد.

در این بررسی تمامی روشهای فوق‌الذکر همزمان بر روی ۱۰۱ نمونه انجام شد و نتایج حاصله در ارتباط با درصد لقاح ارزیابی شد.

مواد و روشها

۱۰۱ زوج نابارور کاندیدای IVF از بین مراجعین به مرکز باروری و ناباروری اصفهان به‌طور تصادفی انتخاب شدند. با جمع‌آوری مایع منی در روز تخمک‌گیری، بخشی از مایع منی برای جداسازی اسپرمهای متحرک و مجاورسازی در لقاح آزمایشگاهی IVF با استفاده از روش Percoll gradiants به‌کار رفت. از باقیماندهٔ آن گسترشهایی جهت روش رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو و آکریدین اورانژ تهیه شد.

رشد فولیکولهای تخمدان در همسر بیماران با استفاده از آگونیست GnRH و hMG[4] تحریک و سپس وضعیت رشد فولیکولها توسط اولتراسوند ارزیابی و با تجویز hCG[5] به میزان ۱۰۰۰۰IU تخمک‌گذاری القا شد. پس از گذشت ۳۶-۳۲ ساعت از طریق تخلیهٔ فولیکولی اووسیتها جمع‌آوری شدند. برای کاهش اثرات فاکتورهای زنانه بیمارانی که کمتر از ۴ اووسیت داشته یا کیفیت اووسیت آنها نامطلوب بود، از این مطالعه حذف شدند. اسپرماتوزوای متحرک را در مجاورت اووسیتها قرار داده و پس از گذشت ۱۸ ساعت وجود یا عدم وجود لقاح با توجه به تشکیل پرونوکلئوسها ارزیابی شد.

* روش رنگ‌آمیزی کروموماپسین A_3

بخشی از مایع منی در دالبکوفسفات بافر سالین عاری از یون کلسیم و منیزیم به مدت ده دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و با تکرار این عمل اسپرمهای شسته شده در محلول متانول و اسید استیک گلاسیال به نسبت ۳:۱ به مدت ۵ دقیقه در ۴° سانتی‌گراد فیکس شده و سپس چندین اسمیر از آن تهیه شد. برای رنگ‌آمیزی هر اسلاید از ۱۰۰ میکرولیتر محلول کروموماپسین A_3 (۰/۲۵ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر با فرمک الوین McIlvain buffer با pH=۷ حاوی ۱۰ میلی‌مولار کلرید منیزیم) به مدت ۲۰ دقیقه استفاده نموده و برای حذف باقیمانده رنگ اضافی اسلایدها را در محلول با فرمک الوین شسته و با استفاده از یک قطره بافر گلیسرول، لامل روی آن چسبانده شد. بررسی میکروسکپی اسلایدها در همان روز و با فیلترهای مناسب توسط میکروسکوپ Axioplan (شرکت Zeiss - آلمان) صورت گرفت. در هر اسلاید ۲۰۰ اسپرم ارزیابی و درصد اسپرمهای رنگ گرفته (به رنگ زرد درخشان) و رنگ نگرفته محاسبه شد (۲۳).

* روش رنگ‌آمیزی آکریدین اورانژ

اسمیرهای تهیه شده در محلول تثبیت کننده کارنوی (متانول و اسید استیک گلاسیال به نسبت ۳:۱) به مدت ۱۴ ساعت تثبیت شدند. سپس تعدادی از اسلایدها توسط ۳-۲ محلول اکریدین اورانژ ۰/۱۹ درصد در بافر سیترات فسفات با pH=۲/۵ به مدت ده دقیقه رنگ‌آمیزی شد و رنگ اضافی با شستشوی در آب جاری حذف شد. اسلایدها در طی همان روز با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت Axioplan (شرکت Zeiss - آلمان) و با فیلترهای مناسب بررسی شد. با شمارش ۲۰۰ عدد اسپرم در هر اسلاید درصد اسپرمهای با DNA طبیعی (سبز رنگ) با DNA دناتوره (قرمز رنگ) و حالت حد واسط (زرد رنگ) ثبت شد (۱۹).

باقیماندهٔ اسلایدها را قبل از رنگ‌آمیزی در محلول (۸۰ میلی‌مولار

1. Nuclear maturation
2. Sodium Dodecyl Sulfate
3. Nuclear Chromatin Decondensation
4. Human Menoposal Gonadotrophin
5. human Chrotonic Gonadotropin

اسید سیتریک + ۱۵ میلی‌مولار Na_2HPo_4 با pH=۲/۵) در حرارت ۸۷° سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه قرارداده و سپس مراحل رنگ‌آمیزی و بررسی مطابق دستورالعمل فوق انجام شد. در این روش با استفاده از شوک حرارتی میزان مقاومت سلولها نسبت به دناتوره شدن توسط گرما بررسی می‌شود (۳۷).

* روش رنگ‌آمیزی آنیلین بلو

اسمیرهای تهیه شده در گلوتارآلدئید ۳ درصد در بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH=۷ به مدت ۳۰ دقیقه تثبیت شدند و سپس توسط محلول آنیلین بلو ۵ درصد در بافر اسئات با pH=۳/۵ به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. اسلایدها با استفاده از میکروسکپ نوری (Zeiss - آلمان) توسط عدسی ایژکتیو ۱۰۰× ارزیابی شد. در هر اسلاید ۲۰۰ عدد اسپرم بررسی و درصد سلولهای رنگ‌گرفته و رنگ نگرفته محاسبه شد (۲۱).

* روش SDS

۵۰ میکرولیتر از مایع منی را با ۳۵۰ میکرولیتر محلول SDS ۱ درصد در بورات بافر ۵ درصد مولار با pH=۹ به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اطاق قرار داده و سپس ۴۰۰ میکرولیتر گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد به آن اضافه نموده تا از روند واکنش جلوگیری شود و اسپرمها تثبیت شوند. پس از تهیهٔ اسمیر از این محلول و رنگ‌آمیزی آن با آنیلین‌بلو (طبق دستورالعمل مذکور)، در هر اسلاید ۲۰۰ عدد اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری (Zeiss - آلمان) و توسط عدسی ایژکتیو ۱۰۰× برای بررسی اندازهٔ سر (NCD) ارزیابی شد (۴۴).

* روشهای بررسی آماری

نتایج حاصله با استفاده از نرم‌افزار (SPSS-9) بررسی و ضریب همبستگی تمامی پارامترها با یکدیگر ارزیابی شد و میانگین نتایج در دو گروه بارور و نابارور از طریق آزمون Student-t-test مقایسه شد. همچنین رابطهٔ بین تستهای ارزیابی کروماتین با درصد لقاح از طریق Logistic Regression بررسی گردید و با محاسبهٔ مساحت زیرمنحنی ROC میزان حساسیت و اختصاصی بودن هر تست تعیین شد.

یافته‌ها

در بررسی رابطهٔ بین تستهای ارزیابی کروماتین و درصد لقاح مشخص شد که از بین تستهای مذکور، روش کروموماپسین A_3 و آنیلین‌بلو به ترتیب رابطهٔ معنی‌داری را با میزان لقاح نشان می‌دهند در صورتی که هیچ‌یک از روشهای اکریدین اورانژ و SDS ارتباط معنی‌داری را با لقاح نشان ندادند؛ خلاصهٔ نتایج در جدول ۱ ذکر شده است.

با توجه به اینکه لقاح یک فرایند مولتی‌فاکتوریال است و فاکتورهای متعددی بر روند آن تأثیر دارد. لذا برای تعیین اینکه کدام‌یک از این عوامل به‌طور مستقل بر میزان باروری تأثیر دارد، نتایج به‌دست آمده را با روش Logistic Regression که توسط Liu در سال ۱۹۹۲ پیشنهاد شده است (۱۱) بررسی شد و مشخص گردید که فقط ارزیابی کروماتین به روش کروموماپسین A_3 به عنوان یک فاکتور مستقل با لقاح رابطه دارد ($P\leq 0.004$). اگر چه روشهای دیگری ممکن است ضریب همبستگی معنی‌داری را با لقاح داشته باشند ولیکن در این مدل به‌عنوان فاکتور مستقل محسوب نشدند.

جدول ۱: مقایسه رابطه هر یک از تستهای ارزیابی کروماتین با میزان لقاح

Test	r	P value
کروموماپسین A3	۰/۵۶۴	<۰/۰۱
آنیلین بلو	۰/۳۴۲	<۰/۰۱
اکریدین اورانژ	۰/۰۳۷	N.S
اکریدین اورانژ + حرارت	۰/۰۷۱	N.S
سدیم دودسیل سولفات	۰/۰۸۶	N.S

N.S=Non Significant

مقایسهٔ میانگین پارامترهای مختلف در دو گروه لقاح‌دار و بدون لقاح با استفاده از روش t-test نشان داد که اختلاف میانگین اختلالات تراکم کروماتین با استفاده از کروموماپسین A_3 در دو گروه معنی‌دار است؛ خلاصهٔ نتایج به دست آمده در جدول ۲ مشخص شده است.

جدول ۲: مقایسه میانگین پارامترهای مختلف در دو گروه لقاح‌دار و بدون لقاح با استفاده از t-test

پارامتر اسپرمی	لقاح‌دار Mean±SD	بدون‌لقاح Mean±SD	P value
تعداد نمونه	۹۲	۹	-
لقاح (درصد)	۶۲/۸±۲۵	-	P<۰/۰۰۱
کروموماپسین A_3 (درصد)	۷۸/۲±۹	۵۹/۸±۱۰	P<۰/۰۰۱
آنیلین‌بلو (درصد)	۸۰/۵±۱۳	۷۵/۵±۱۵	N.S
اکریدین‌اورانژ (درصد)	۶۸/۱±۲۲	۶۷±۱۷	N.S
اکریدین‌اورانژ+حرارت (درصد)	۷۰/۱±۲۰	۶۳/۲±۱۷	N.S
سدیم‌دودسیل سولفات (درصد)	۸۰/۲±۱۶	۷۰/۶±۲۴	N.S

N.S=Non Significant

منحنی ROC برای مقایسهٔ تستهای ارزیابی کروماتین در ارتباط با پیشگویی میزان موفقیت در لقاح نشان می‌دهد که روش کروموماپسین A_3 در صورتی که وجود یا فقدان لقاح (لقاح=۰ یا لقاح >۰) با درصد لقاح موردنظر باشد از حساسیت و اختصاصی بودن بالاتری برخوردار است؛ خلاصهٔ نتایج به‌دست آمده در جدول ۳ ذکر شده است.

جدول ۳: نتایج آنالیز Roc تستهای مختلف در رابطه با پیشگویی میزان موفقیت در IVF

تست	مساحت زیرمنحنی ROC	
	لقاح ٪۱۰۰-۰	لقاح <۰
کروموماپیسین	۰/۷۶۱	۰/۹۱۱
آنیلین‌بلو	۰/۷۲۲	۰/۶۱۴
اکریدین‌اورانژ	۰/۵۲۹	۰/۵۴۳
اکریدین اورانژ + حرارت	۰/۴۷۶	۰/۶۱۵
سدیم‌دوسیل سولفات	۰/۴۰۶	۰/۳۹۱

بحث

اگر چه آنالیز استاندارد مایع منی برای پیشگویی توانایی باروری فرد ضروری است، اما کافی نیست و برای صحت بیشتر قضاوت در مورد قدرت باروری، انجام تستهای مربوط به عملکرد اسپرم لازم است. در واقع آنالیز منی ابتدایی‌ترین وسیله برای بررسی توانایی باروری فرد محسوب می‌شود و اخیراً توجه عده‌ای از محققین به استفاده از تستهای عملکرد اسپرم خصوصاً تست بلوغ هسته درکنار آنالیز منی متمرکز شده است. ارزیابی اسپرمهای با هستهٔ نارس و یا با کروماتین غیرطبیعی اطلاعات با ارزشی را در رابطه با قدرت باروری فرد در اختیار متخصصین قرار می‌دهد (۶، ۸).

اسپرماتوزوای پستانداران در طی فرایند بلوغ دچار یک سری تغییرات مرفولوژیک و بیوشیمیایی می‌شود که برای کسب قدرت باروری ضروری است. از جملهٔ این تغییرات می‌توان به بسته‌بندی و متراکم شدن کروماتین در هستهٔ اسپرم در طی مرحلهٔ اسپرمیوژنز اشاره کرد. عامل اصلی در متراکم شدن کروماتین جایگزینی پروتامین به جای هیستون است که با تشکیل باندهای عرضی دی‌سولفید بین گروههای تیول آزاد ریشه‌های سیستئین پروتامین، بر این تراکم و پایداری افزوده می‌شود (۲۵).

در بررسی انجام شده ارتباط بین تستهای معمول ارزیابی کیفیت کروماتین اسپرم و میزان موفقیت در لقاح آزمایشگاهی IVF تعیین شد. یکی از این تستها، رنگ‌آمیزی با فلوئوروکروم کروموماپیسین A_3 است. این رنگ‌آمیزی معرف کمبود پروتامین در کروماتین است. تحقیقات متعددی در این زمینه انجام شده است ولی در نتایج حاصل از این رنگ‌آمیزی در رابطه با پیش‌بینی شانس لقاح، اختلافاتی وجود دارد (۲۳، ۲۶، ۲۷).

در این بررسی مشخص شد که بین درصد سلولهای رنگ گرفته توسط کروموماپیسین A_3 و میزان موفقیت در لقاح رابطه وجود دارد. علاوه بر این، از بین تستهای انجام شده بالاترین رابطهٔ معنی‌دار با درصد لقاح مربوط به این روش است. نتایج حاصله با گزارشهای Lolis و همکارانش (۲۳) و Franken (۳۲) مطابقت دارد.

Sakkas و همکارانش اظهار داشتند که وجود درصد بالای سلولهای رنگ گرفته با کروموماپیسین A_3 و اختلال در تراکم کروماتین نمی‌تواند در توانایی قدرت باروری به روش IVF تأثیر داشته باشد (۲۷).

در مطالعه‌ای که Sakkas در سال ۱۹۹۸ انجام داد نتیجه گرفت که در بیماران ICSI در مقایسه با بیمارانی که به‌طریق IVF درمان می‌شوند آنومالیهای کروماتین اسپرماتوزوا می‌تواند بر میزان خروج از تراکم هستهٔ اسپرم در روش ICSI تأثیر داشته باشد (۱۶). با توجه به اهمیت ساختار طبیعی کروماتین در حفاظت از محتویات کروماتین، هرگونه اختلال در بسته‌بندی و تراکم کروماتین بر میزان لقاح تأثیر دارد. مکانیسم ایجاد آنومالیهای بسته‌بندی کروماتین در اسپرماتوزوا متعدد بوده و یکی از فاکتورهای مهم نقص در جایگزینی پروتامین است (۲۹) تغییر در نسبت پروتامین $P_1:P_2$ (۲۸)، همچنین تغییر در میزان هیستون نیز می‌تواند اختلالات بسته‌بندی کروماتین را به‌دنبال داشته باشد. این آنومالیها ممکن است اسپرماتوزوا را نسبت به فاکتورهای خارجی مانند مواد اکسیدانت آسیب‌پذیرتر نماید (۴۸). علاوه بر این در ایجاد بریدگی رشتهٔ DNA (۳۰) نقش دارد.

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که هرگونه اختلال در تراکم کروماتین ناشی از کمبود پروتامین می‌تواند بر میزان لقاح تأثیر داشته باشد. استفاده از روش Logistic Regression مؤید آن است که اختلال در تراکم کروماتین با استفاده از روش کروموماپیسین A_3 به‌عنوان یک فاکتور مستقل بر لقاح تأثیر دارد.

رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو با هیستون سرشار از لیزین واکنش می‌دهد و به‌علت وجود هیستون در هستهٔ اسپرم نارس می‌تواند روش مناسبی برای ارزیابی کروماتین تلقی شود (۲۱). نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد که بین درصد رنگ‌پذیری توسط آنیلین‌بلو و میزان لقاح رابطه وجود دارد نتایج حاصله با گزارشهایی که توسط Daudoune (۳۵) Haidl-schil (۱۳) و همچنین Foresta (۲۲) Hammadeh (۲۴) ارایه شد مطابقت دارد، در حالی که با نتایج Liu (۳۴) و Hammadeh (۳۳) در سال ۱۹۹۶ مغایرت دارد.

اختلاف در نتایج ممکن است مربوط به تعداد نمونه، روش تحلیل داده‌ها، روش انتخاب درمان بیماران (IVF یا ICSI) باشد.

لازم به یادآوری است که روش آنیلین بلو معرف میزان هیستون در هسته است در حالی که روش کروموماپیسین A_3 بیانگر کمبود پروتامین در کروماتین است. این نقص می‌تواند ناشی از باقی ماندن هیستون در کروماتین و یا جدا شدن آن از کروماتین بدون جایگزینی با پروتامین، ایجاد شود و احتمالاً بدین علت روش کروموماپیسین A_3 اختصاصی‌تر عمل می‌کند و ارتباط مستقلی را با لقاح نشان می‌دهد.

تست اکریدین اورانژ در شناسایی DNA سالم دو رشته‌ای از DNA تک‌رشته‌ای به‌کار می‌رود. این روش می‌تواند اطلاعات مربوط به آنالیز منی را در پیشگویی قدرت باروری تکمیل کند (۵، ۱۹) و به‌عنوان یک تست با ارزش برای تعیین قدرت باروری فرد معرفی شود (۱۹). در این رنگ‌آمیزی میزان مقاومت DNA اسپرم به دناتوره شدن در مقابل اسید، حرارت یا هر دو ارزیابی می‌شود. مشخص شده است که درصد اسپرمهایی که مقاومت بیشتری به دناتوره شدن نشان می‌دهند در افراد بارور بیشتر است (۳۶). باتوجه به اینکه ارزیابی مقاومت DNA اسپرم به حرارت یک تکنیک حساس‌تری شناخته شده است (۳۷). در این پروژه هر دو روش رنگ‌آمیزی اکریدین اورانژ به‌طور معمول و همراه

با شوک حرارتی برروی نمونه‌ها انجام شد و نتایج به‌دست آمده از لحاظ آماری ارتباط معنی‌داری را با لقاح نشان نداد. اگرچه رنگ‌آمیزی اکریدین اورانژ همراه با شوک حرارتی ارتباط بیشتری با میزان لقاح داشت. نتایج حاصله در این بررسی با تحقیقات Egger-Kruse (۳۸) و Angelopoulos (۴۸) مطابقت دارد در حالی که با اظهارات Tejada (۱۹)، Evenson (۵) و Sukharoen (۳۹) مبنی بر استفاده از آکریدین اورانژ به‌عنوان یک تست مکمل در پیشگویی میزان موفقیت لقاح در IVF مغایرت دارد.

در انسان، عبور اسپرم از اپیدیدیم بسیار سریعتر از سایر پستانداران صورت می‌گیرد (در برخی موارد کمتر از ۲ روز) (۴۰). علاوه بر این مدت زمان عبور از اپیدیدیم در افراد مختلف متفاوت است (۴۱)، بنابراین مشاهدهٔ نسبتهای متغیر اسپرم نارس در منی، می‌تواند به عوامل طرح شده مربوط باشد.

یکی از تغییرات بلوغی هسته در طی عبور از اپیدیدیم تشکیل باندهای دی‌سولفید بین ریشهٔ سیستئین پروتامینهای موجود در هسته است که باعث افزایش پایداری کروماتین (۹) و کاهش گروههای تیول آزاد در هسته می‌شود (۱۲). تحقیقات نشان می‌دهد که عامل مقاومت DNA نسبت به دناتوره شدن توسط اسید یا گرما ناشی از میزان باندهای دی سولفید در کروماتین است (۳۹). با توجه به تفاوت مدت زمان عبور از اپیدیدیم در افراد مختلف، احتمال می‌رود که میزان مقاومت اسپرم در افراد یکسان نباشد. شستشو با پرکل قبل از رنگ‌آمیزی (۴۶)، وجود عفونت در دستگاه تناسلی (۴۲) و بالا رفتن میزان آسیب‌پذیری DNA با افزایش سن (۴۳) از جمله فاکتورهایی است که می‌تواند به عنوان عوامل مخدوش کننده بر نتایج این تست، تأثیر داشته باشد.

روش دیگری که در این تحقیق برای ارزیابی کیفیت پایداری کروماتین اسپرم استفاده شد، روش SDS بود. هنگامی که اسپرم در مجاورت یک دترژنت مانند SDS قرار می‌گیرد، غشای سیتوپلاسمی سر اسپرم از بین می‌رود و سر اسپرمهای با هستهٔ نارس به تناسب عدم بلوغ بزرگ می‌شوند. نقش SDS برروی اسپرم می‌تواند بدین شکل بیان شود که علاوه بر شکستن غشای سیتوپلاسمی وارد هسته شده و با توجه به اینکه یک مادهٔ پلی‌آنیونی است می‌تواند با پروتامین بر سر اتصال با DNA رقابت کرده و موجب جدا شدن پروتامین از DNA شده، جایگزین آن گردد که این تغییر باعث تورم سر اسپرم می‌شود (۴۴).

در بررسی انجام شده بین روش SDS و میزان موفقیت در لقاح آزمایشگاهی رابطهٔ معنی‌داری مشاهده نشده است. نتایج به‌دست آمده از تحقیقات Liu و همکارانش نیز مؤید این مطلب است (۳۴).

Gopalkrishnan اظهار داشت برای باروری طبیعی بایستی حداقل ۷۰ درصد اسپرمها در حضور SDS و EDTA[1] از تراکم خارج شوند (NCD) (۴۴). Foresta و همکارانش گزارش کردند که درصد ناپایداری کروماتین اسپرم و درصد رنگ‌پذیری آن توسط آنیلین‌بلو در مردان نابارور بیش از افراد بارور است. این محققین همچنین معتقدند که افزایش هیستون باعث کاهش پایداری اسپرم می‌شود و قرار گرفتن اسپرم به مدت طولانی در محیط فوق پایداری کروماتین را به‌همراه دارد (۲۹).

باتوجه به اینکه میزان پایداری کروماتین و توانایی خروج از تراکم (NCD) هنگام استفاده از SDS در حضور DTT (احیاءباندهای دی سولفید) و EDTA (برداشتن یون Zn^{+2}) با نسبت مطلوب باندهای دی‌سولفید و گروههای تیول آزاد در ارتباط است (۴۵) و همچنین جایگزینی پروتامین به جای هیستون در این روند بسیار اهمیت دارد؛ هرگونه تغییر در این نسبت، موجب کاهش پایداری و یا فوق پایداری کروماتین اسپرم می‌شود که در روند لقاح و تشکیل پرونوکلئوس مؤثر است.

اگر چه برخی از مطالعات انجام شده اهمیت خاصی را برای روش SDS درنظر می‌گیرد، اما در نتایج حاصل از این بررسی و تحقیقات دیگر رابطهٔ معنی‌داری بین روش SDS و میزان لقاح مشاهده نشد. این اختلاف در نتایج ممکن است مربوط به تعداد نمونه، شستشوی نمونه با پرکل و تأخیر در انجام آزمایش باشد (۴۸).

با استفاده از منحنی ROC برای مقایسهٔ ارزش تستهای مذکور در پیشگویی میزان لقاح در IVF مشخص شد که روش کروموماسین A_3 نسبت به سایر تستها از حساسیت و اختصاصی بودن بیشتری برخوردار است.

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که در آنالیز منی، روش کروماسین A_3 نیز می‌تواند به‌عنوان یک تست مکمل در ارزیابی قدرت باروری فرد استفاده شود.

References

1. Silber SJ: The Relationship of abnormal Parameters to male fertiliry. Hum Reprod 1989; 4: 947-953
2. polanski FF, Lamb EJ: Do the results of semen analysis predict future fertility? A survival analysis study. Fertil Steril 1988; 49: 1059-1065
3. Dunphy B, Neal LM, Cook ID: The clinical Value of Conventional semen analysis. Fertil Steril 1989; 51: 324-329
4. Ibrahim ME, Pederson J: Acridine orange Fleuorescence as Male fertility test. Arch Androl 1988; 20: 125-129
5. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR: Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. Science 1980; 210: 1131-1133
6. Calvin HI, Yuc C, Bedford JM: Effects of epididymal maturation Zinc (II) and copper (II) on the Reactive sulphydryl content of structural elements in rat spermatozoa. Exp cell Res 1973; 81; 333-341
7. Balhorn RA: Model for the structure of chromatin in

1. Ethylenediamine Tetraacetic Acid
2. Dithiothreitol

Mammalian sperm. J Cell Biol 1982; 93, 298-305
8. Sakkas D, urner F, Bianchi PG: Sperm chromatin anomalies can Influence decondensation after intra cytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1994; 837-843
9. Bedford JM, Calvin H, Cooper GW: The maturation of Spermatozoa in the human eipididymis. J Reprod Fertil 1973; 18: 199-213
10. Claassens OE, Menkveld R, Franken Dr: The Acridine orange test: Determinig the Relationship Between sperm morphology and Fertilization in vitro. Hum Reprod 1992; 7: 242-247
11. Liu DY, Baker HWG: Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, Sperm-Zona Pellucida binding and fertilization rates in vitro. Fertil Steril 1992; 1178-1181
12. Sawarosw, Panyiums: The formation of disulfide bonds in human Protamines duriny sperm maturatiom. Experientia 1978; 35: 191-192
13. Haidl G, Schill WB: Assessment of sperm chromatin condensation: An important test for prediction of IVF outcome 1994; 32: 263-266
14. Thanki KH, Gagliardi CL, Schmidt CL: Poor in vitro fertilization outcome with semen yielding low sperm density 'Swim up' is not because of alterd sperm motion Parameters. Fertil Steril 1992; 58: 770-775
15. Janny L, Menezo YJR: Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. Mol Reprod 1994; 38: 36-42
16. Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG: shoukiry sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. Hum Reprod 1998; 4: 11-9
17. Hwang K, yang H, Kwon H: Detection of reactive oxygen Species and apoptosis in human fragmented elmbryo Abstracts of the European society of Human Reoroduction and Embryology Hum Reprod 1997; 12: 135
18. Marushig Y, Marushig K: Enzymatic unpacking of bull sperm chromatin. J Biochem Biophys Acta 1975; 403: 180-191
19. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman SA: Test for the Practical evaluation of male fertility by acridine orange (Ao) Fluorescence. Fertil Steril 1984; 42: 87-91
20. Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzar D, Bianchi U, and Sakkas D: Effect of deoxyribonucleic acid Protamination of fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human spermatozoa. Biol Reprod 1993; 49: 1083-1088
21. Terquem A, Dadoune JP: Aniline blue staining of human Spermatozoa chromatin. Evaluation of nuclear maturation. J Androl (ed). J Sperm Cell 1983; 249-252
22. Foresta C, Zorzi M, Rossato M, Varoh O: Sperm unclear Instability and staining with aniline blue: Abnormal Persistence of histones in spermatozoa in infertil men. Int J Andro 1992; 15: 330-337
23. Lolis D, Georgiou I, Syrrou M, Zikopoulos K, Konstantelli M, Messinis I: Chromomycin A3 staining as an indicator of protamine deficiency and fertilization. Int Androl 1996; 19: 23-27
24. Hammadeh MF, al-Hasani S, Doerrs, stieber M, Rosenbaum P, Schmidt W, Diedrich K: Comparison between chromatin and Morphology form biopsy extracted and ejaculated spermatozoa and their relationship to ICSI outcome. Hum Reprod 1999; 14: 363-367
25. Saowaros W, Panyim S: The formation of disufide bonds in human protamine during sperm maturation. Experimentia 1979; 35: 191-192
26. Bianchi PG, Manicardi GC, Urner F: chromatin Packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal Spermatozoa. Mol Hum Reprod 1996; 2: 139-144
27. Sakkas D, umer F, Bianchi PG, Bizzaro D: Sperm chromatin anomalies can influence decondensatin after intracytoplasmic sperm in Jection. Hum Reprod 1996; 11: 837-843
28. Belokopytova IA, Kostyleva EI, Tomilin AN, Vorobi ev VL: Human male Infertiliy may be due to a decrease of the protamine P2 content of sperm chromatin. Mol Reprod 1993; 34: 53-57
29. Balhorn R, Reed S, Phaichitr, N: Aberrant Protamine 1/2 Ratios in sperm of infertil human males. Experientia 1988; 44: 52-55
30. Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S: Under Protamination and niking of DNA in ejaculated human Spermatozoa are highly Related Phenomena. Biol Reprod 1995; 25: 864-867
31. Sailer BL, Jost LK, Evenson DP: Mammalian Sperm DNA Suceptibility to in situ denaturation associated with impaired deoxynucleotidyl transferase assay. J Androl 1995; 16: 80-87
32. Franken DR, Franken CJ, Dela Guerre H, De Villiers A: Normal Sperm morphology and chromatin

Packaging: Comparison between aniline blue and chromomycin A_3 Staining. J Androl 1999; 31: 361-366
33. Hammadeh ME, Hassani SA, stieber M, Rosenbaum P, Kupker D, Diedrich K, Schmidt W: The effect of chromatin Condensation (Aniline blue staining and morphology (Strict criteria) of human spermatozoa fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection program. Hum Reprod 1996; 2468-2471
34. Liu DY, Robert A, Eiton W, Ian H et al. Spermatozoal nuclear chromatin decondensation in vitro: A test for sperm immaturity comparison with results of human in vitro fertilization. clinical reproduction and fertility. 1987; 5: 191-207
35. Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-moscoto ML: Correlation between defects of chromatin condensation of human spermatozoa staining by aniline blue and semen characteristics. J Androl 1988; 20: 211-217
36. Roux C, Dadoune JP: Use of acridine orang staining on smears of human spermatozoa after heat-treatment: evaluation of the chromatin condensation. J Androl 1989; 21: 275-281
37. Duran EH, Gurgan T, Gunaple S: A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro. Hum Reprod 1998; 13: 1235-1239
38. Kruse WE, Rohr G, Kerbel H, Schwalbuch B: Acridine orange test a clinically relevant screening method for sperm quality duning Infertility investigation. Hum Reprod 1996; 11: 784-789
39. Sukcharoen N: Evaluation of sperm nuclear DNA normality by Acridine orange staining Technique. J Med Assoc Thai 1995; 78: 82-87
40. Johnson L, Varner DD: Effect of dialy Spermatozoa production but not age transit time of spermatozoa through the epididymis. Biol Reprod 1988; 39: 812-817
41. Rowley MJ, Teshima F, Heller CG: Duration of transit of spermatozoa Through The human male ductular sperm. Fertil Steril 1970; 21: 390-396
42. Eggert-Kruse W, Pohl S, Naher H: Microbial colonization and Sperm-mucus Interaction-results in 1000 infertil Couples. Hum Reprod 1992; 7: 612-620
43. Martin RH, Rademaker A: The Relationship between sperm Chromosomal abnormalities and sperm morphology in humans. Mutaion Res 1988; 207: 159-164
44. Gopalkrishnan K, Kinduja IN, Anand Kumar TC: In vitro decondensation of nuclear chromatin of human spermatozoa: Assessing Fertilizing Potential 1991; 27: 43-50
45. Kvist U, Bjorndahl L, and Rooman GM: Nuclear Zinc in human epididymal and ejaculated spermatozoa. Acta Physiol Sand 1985; 125: 297-303
46. Kosower NS, katayose H, Yanagimachi R: Thiol-disulfide status and acridine orange Fluorescence of mammalian sperm nuclei: 1992; 13: 338-342
47. Enright H, Miller WJ, Hays R: Prefrential targeting of oxidative base damage to internucleosomal DNA. carcinogenesis 1996; 17: 1175-1177
48. Angelopoulos T, Yaron A, Moshel LU: Simultaneous assessment of sperm chromatin condensation and morphology before and after separation procedures: effect on the clinical outcome after in vitro fertilization. Fertil Steril 1998; 69: 740-747