

# تأثیر روش ارزیابی حیاتی اسپرم انسانی توسط MTT بر نتایج حاصله از تزریق مستقیم اسپرم به داخل سیتوپلاسم تخمک

محمد حسین نصر اصفهانی (Ph.D.)<sup>۱</sup>، روشنک ابوترابی (M.S.)<sup>۲</sup>، ابراهیم اسفندیاری (Ph.D.)<sup>۳</sup>.

۱- استادیار، گروه جنین شناسی، پژوهشکده رویان، جهاددانشگاهی واحد علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۲- مسئول جنین شناسی مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران.

۳- مربی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی اصفهان، اصفهان، ایران.

۴- دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی اصفهان، اصفهان، ایران.

## چکیده

تحقیقات قبلی نشان داده است که روش ارزیابی حیاتی اسپرم توسط MTT، روشی مناسب برای تشخیص اسپرم‌های زنده از غیرزنده می‌باشد. در این روش نمونه اسپرمی در مجاورت MTT قرار گرفته و MTT توسط آنزیم دهیدروژناز میتوکندری اسپرم‌های زنده در ناحیه قطعه میانی به رنگدانه بنفش MTT Formazan تبدیل می‌شود. با توجه به مشاهده مستقیم دانه‌های تشکیل شده، می‌توان از این روش در تفکیک اسپرم‌های زنده توسط سوزن میکرواینجکشن و تزریق آنها به داخل تخمک استفاده کرد. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر روش ارزیابی حیاتی اسپرم توسط MTT بر روی لقاح، تسهیم و تشکیل بلاستوسیست می‌باشد. لذا تعداد ۱۰۹ عدد تخمک‌های انسانی که در متافاز II قرار داشتند به دو گروه تقسیم شد. یک گروه توسط اسپرم‌های MTT مثبت و یک گروه هم توسط بخش دیگری از همان نمونه اسپرمی بدون مجاورت با MTT تزریق شدند. مقایسه نتایج بین دو گروه مورد (آزمون) و گروه کنترل نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین درصد لقاح، تسهیم و بلاستوسیست، در هر دو گروه وجود ندارد. لذا در صورتی که بتوان ثابت کرد که روش ارزیابی حیاتی اسپرم توسط MTT تأثیرات میتوژنیک یا تراژنیک ندارد، می‌توان از این روش برای درمان به روش ICSI بخصوص در بیماران آستنواسپرمی دارای اختلالات ناحیه دم اسپرم سود جست.

کل واژگان: اسپرم انسان، MTT، میکرواینجکشن و ارزیابی حیاتی.

آدرس مکاتبه: دکتر محمدحسین نصر اصفهانی، پژوهشکده رویان، پلاک ۳۶، کوچه سیمین، تقاطع آصف، خیابان زعفرانیه، صندوق

پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، تهران، ایران.

پست الکترونیک: nasrmhn@yahoo.com

## مقدمه

یکی از روش‌های درمان ناباروری با علل مردانه، روش تزریق اسپرم به درون سیتوپلاسم تخمک (ICSI)<sup>۱</sup> می‌باشد. در این روش اسپرم توسط سوزن مخصوص با قطر  $4\mu m$  به داخل تخمک تزریق می‌شود. با در نظر گرفتن محدودیت تعداد تخمک‌های قابل دریافت از زن، انتخاب و تزریق اسپرم دارای مورفولوژی و تحرک مناسب از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از آنجا که از هر ۵۰۰۰ زوج نابارور یکی از آنها دارای اسپرم فاقد حرکت می‌باشد (۱)، در اینگونه موارد تشخیص و انتخاب اسپرم زنده برای تزریق موفق به داخل تخمک ضروری است. روش‌های تشخیص و تفکیک اسپرم‌های زنده از اسپرم‌های غیرزنده به دو دسته تقسیم می‌شوند:

۱- روش‌هایی که تنها جنبه تشخیصی داشته و نمی‌توان اسپرم‌های زنده تشخیص داده شده را برای تزریق به درون سیتوپلاسم تخمک بکار برد.

۲- روش‌هایی هستند که در آنها علاوه بر تشخیص اسپرم‌های زنده از اسپرم‌های غیرزنده، می‌توان اسپرم‌های زنده تشخیص داده شده را تفکیک و برای تزریق داخل سیتوپلاسمی تخمک از آنها استفاده کرد.

از جمله روش‌هایی که می‌توان آنها را در دسته اول قرار داد، روش‌های حذف توسط رنگ‌آمیزی<sup>۲</sup> می‌باشند، مانند روش‌های ائوزین، ائوزین - نگروزین و تریپان بلو. در این روش‌ها اسپرم‌های زنده مانند دیگر سلول‌های زنده اجازه ورود رنگ حیاتی را به درون سیتوپلاسم خود نمی‌دهند و به همین دلیل در این رنگ‌آمیزیها اسپرم‌های زنده فاقد رنگ هستند و رنگ حیاتی به داخل اسپرم غیرزنده نفوذ می‌کند (۲). در روش ائوزین - نگروزین برای تسهیل در شمارش اسپرم‌های زنده از نگروزین استفاده می‌شود که با ایجاد زمینه تیره، اسپرم‌های دارای رنگ سفید متمایز می‌شوند (۳). روش ائوزین - نگروزین به عنوان یکی از بهترین آزمون‌های تشخیصی

1) Intra Cytoplasmic Sperm Injection

2) Dye exclusion

اسپرم‌های زنده از اسپرم‌های غیرزنده مورد استفاده قرار می‌گیرد. ولیکن به علت ثابت شدن<sup>۳</sup> اسپرم‌های زنده در طی رنگ‌آمیزی، استفاده از آنها برای تزریق به تخمک امکان‌پذیر نمی‌باشد.

روش HOST<sup>۴</sup> یکی از روش‌هایی است که در تشخیص و تفکیک اسپرم‌های زنده از مرده و در نتیجه درمان بیماران به روش ICSI قابل استفاده است (۴). در این روش با قرار دادن اسپرم در محیط هیپواسمولار، اسپرم زنده دچار تورم و افزایش مایع در سیتوپلاسم می‌شود که این تورم در ناحیه دم اسپرم با به وجود آوردن اشکال مختلف قابل مشاهده است (۵) ولی در اسپرم‌های غیرزنده هیچ‌گونه تغییر شکلی در ناحیه دم مشاهده نمی‌شود. پس از تشخیص اسپرم‌های زنده می‌توان آنها را از سایر اسپرم‌ها جدا و با قرار دادن در محیط ایزواسمولار برای تلقیح در روش ICSI از آنها استفاده کرد. روش HOST برای ICSI تحت عناوین Single Sperm Curling Test (۴ و ۳) تست آب<sup>۵</sup> با استفاده از محیط‌های هیپواسمولار مختلف انجام شده است. لازم به ذکر است که روش HOST-ICSI جهت بیمارانی که اسپرم‌های آنها در ناحیه دمی آمورف می‌باشند و یا دارای اسپرم‌های فاقد حرکت می‌باشند. به نظر می‌رسد روش ارزیابی حیاتی اسپرم<sup>۶</sup> توسط MTT<sup>۷</sup> که قبلاً<sup>۸</sup> بعنوان یک روش تشخیصی برای این موضوع گزارش شده است (۶ و ۷)، نه تنها قابلیت تشخیص اسپرم‌های زنده از مرده را دارا می‌باشد بلکه احتمالاً برای تزریق اسپرم زنده تشخیص داده شده به داخل سیتوپلاسم تخمک در روش ICSI نیز مناسب است. در این روش یکی از نمک‌های تترازولیوم با علامت اختصاری MTT استفاده می‌شود. MTT پودری زرد رنگ است و سوبسترای آنزیم دهیدروژناز میتوکندری می‌باشد.

3) Fixation

4) Hypo Osmotic Swelling Test

5) Water test

6) Sperm viability assay

7) 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium Bromide (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>Br)

Hepes (Gibco) تهیه و PH آن به میزان ۷/۴۵-۷/۴۰ تنظیم گردید، سپس محلول فیلتر شده (Millipore-0.22 $\mu$ m) در حجم‌های ۴۵۰ $\mu$ l در یخچال در دمای ۴°C حداکثر به مدت یک هفته نگهداری می‌گردید. در زمان انجام آزمایش پس از رسیدن دمای ویال‌ها به ۳۷°C به هر یک از آنها ۵۰ $\mu$ l اسپرم شستشو داده شده اضافه و به مدت ۱ الی ۲ ساعت سپس در انکوباتور ۳۷°C نگهداری شد (۶ و ۷).

روش ICSI: جهت انجام روش ICSI تخمک‌های اضافه از بیماران مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان تهیه شد. این تخمک‌ها اکثراً از بیمارانی بدست آمد که جهت درمان با روش ICSI-TESE به این مرکز مراجعه کرده بودند. پس از انجام بیوپسی بیضه به تعداد کافی اسپرم برای تزریق به تمام یا تعدادی از تخمک‌ها داشتند. در ضمن در بیمارانی که فاقد اسپرم بودند با توجه به احتمال بروز سندرم تحریک بیش از حد<sup>۲</sup> بیماران، تخمک‌گیری انجام می‌شد. حال با توجه به اینکه تخمک‌های بدست آمده بطور معمول دور ریخته می‌شدند، از آنها با رضایت شفاهی بیماران در این تحقیق استفاده شد.

در ضمن تخمک‌های با کیفیت نامناسب از جمله تغییر شکل یافته<sup>۳</sup> و نیز تخمک‌های GV و متافاز I از مطالعه حذف شدند. سپس تخمک‌های هر بیمار به دو گروه تقسیم گردیدند و در نتیجه با توجه به این امر، کیفیت تخمک‌ها نمی‌تواند بر نتایج حاصل تأثیری داشته باشد. بطور خلاصه برای انجام دادن روش ICSI سلول‌های اطراف تخمک‌ها به روش مکانیکی و شستشو در آنزیم هیالورونیداز (Seromed, Germany) (با غلظت ۱۰۰ واحد در هر میلی‌لیتر) حذف و سپس تخمک‌ها به دو دسته تقسیم و هر دسته به یک ظرف مخصوص میکرواینجکشن حاوی چند قطره محیط (Ham's F10+25mM Hepes + 10% HSA Ham's) و نیز

آنزیم دهیدروژناز، برم موجود در MTT را با هیدروژن جایگزین کرده و در نتیجه MTT به Formazan<sup>۱</sup> تبدیل می‌شود (۸ و ۹). رسوب MTT Formazan بنفش رنگ است و به علت تجمع میتوکندری‌ها در ناحیه قطعه میانی اسپرم، دانه‌ها و یا تیغه‌های تولید شده در این ناحیه قابل رؤیت می‌باشند (شکل ۱). لذا با توجه به مشاهده دانه‌های MTT Formazan در ناحیه گردن اسپرم و امکان جداسازی اینگونه اسپرم‌ها توسط سوزن میکرواینجکشن بر آن شدیم تا کارآیی روش ارزیابی حیاتی اسپرم به روش MTT را در روش ICSI مورد بررسی قرار دهیم. لذا اسپرم‌های زنده و متحرک را پس از شستشو به دو قسمت تقسیم کردیم. قسمتی از آن را بر طبق پروتکل در مجاورت MTT قرار داده و قسمت باقیمانده را بعنوان گروه کنترل نگه داشتیم. اسپرم‌های MTT مثبت و اسپرم‌های گروه کنترل را به دو گروه تخمک که از یک بیمار بدست آمده بود تزریق و پیشرفت رویانهای تولید شده را از مرحله لقاح تا مرحله بلاستوسیت بررسی کردیم.

## مواد و روشها

آزمون MTT: اسپرم‌های مورد آزمایش از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه آندروولوژی مرکز باروری و ناباروری اصفهان انتخاب و بر طبق توصیه سازمان بهداشت جهانی در ظروف مخصوص و دهانه گشاد و غیرسمی جمع‌آوری شدند. سپس اسپرم‌ها با محیط Ham's F10+25mM Bicarbonate +10% HSA دو بار، در دور ۲۵۰۰RPM به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شد و پس از تقسیم هر نمونه به دو قسمت، یک قسمت بعنوان گروه کنترل نگهداری گردید و قسمت دیگر مورد آزمون ارزیابی MTT قرار گرفت. در این آزمون محلول MTT (Lobo chemie- India) به صورت هفتگی با غلظت ۰/۵ mg در میلی لیتر در محیط Ham's F10+25mM

2)Hyperstimulation Syndrome

3)Deformed

1)C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>

جدول ۱- مقایسه فراوانی مطلق و نسبی و میانگین تعداد و درصد تخمک‌های تزریق شده و میزان لقاح در دو گروه کنترل و مورد آزمون (MTT)

میزان باروری				تعداد تخمک		گروه تخمک‌های تزریق شده
MTT		کنترل		MTT	کنترل	
درصد	تعداد	درصد	تعداد			
۶۶/۶	۴	۸۳/۳	۵	۶	۶	۱
۶۶/۶	۲	۱۰۰	۴	۳	۴	۲
۱۰۰	۳	۵۰	۱	۳	۲	۳
۲۵	۱	۲۸/۵	۲	۴	۷	۴
۴۰	۲	۷۵	۳	۵	۴	۵
۷۵	۳	۳۳/۳	۱	۴	۳	۶
۱۰۰	۲	۱۰۰	۱	۲	۱	۷
۷۵	۳	۲۵	۱	۴	۴	۸
۱۰۰	۳	۱۰۰	۴	۳	۴	۹
۶۶/۶	۱	۸۰	۴	۶	۵	۱۰
۷۷/۷	۷	۱۰۰	۹	۹	۹	۱۱
۶۶/۶	۴	۴۰	۲	۶	۵	۱۲
۶۷/۴	۲/۹	۶۷/۹	۳	۴/۵۸	۴/۵۰	<b>M</b>
(NS) ۰/۹۶۷				(NS) ۰/۹۲۱		<b>P</b>

NS: Not Significant

اسپرم‌های MTT مثبت به تخمک‌ها تزریق شدند. لازم به ذکر است که درصد اسپرم‌های MTT مثبت پس از انتقال به قطره‌های Ham's F10+25Mm Bicarbonate کاهش می‌یافت که این مسئله می‌تواند به علت جداسدن

یک قطره PVP منتقل و پس از آن اسپرم‌های گروه کنترل و اسپرم‌هایی که مجاور شده با MTT بصورت تصادفی به داخل یکی از ظرفها در داخل یک یا دو قطره Ham's F10 منتقل و سپس اسپرم‌های گروه کنترل و

جدول ۲- مقایسه فراوانی نسبی و مطلق و میانگین تعداد و درصد رویانهای بیش از ۲ سلولی تشکیل شده در روز دوم پس از تزریق اسپرم در دو گروه کنترل و مورد آزمون (MTT)

رویانه‌های بیش از دو سلولی در روز دوم پس از لقاح				گروه تخمک‌های تزریق شده
MTT		کنترل		
درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۵۰	۲	۱۰۰	۵	۱
۱۰۰	۲	۱۰۰	۴	۲
۱۰۰	۳	۱۰۰	۱	۳
۱۰۰	۱	۱۰۰	۲	۴
۱۰۰	۲	۱۰۰	۳	۵
۱۰۰	۳	۱۰۰	۱	۶
۱۰۰	۲	۱۰۰	۱	۷
۱۰۰	۳	۱۰۰	۱	۸
۱۰۰	۳	۱۰۰	۴	۹
۱۰۰	۱	۱۰۰	۴	۱۰
۱۰۰	۷	۱۰۰	۹	۱۱
۱۰۰	۴	۱۰۰	۲	۱۲
۹۵/۸	۲/۷	۱۰۰	۳	<b>M</b>
(NS) ۰/۳۳۹				<b>P</b>

NS: Not Significant

جدول ۳- مقایسه فراوانی نسبی و مطلق و میانگین تعداد و درصد رویانهای بیش از ۴ سلولی تشکیل شده در انتهای روز دوم پس از تزریق در دو گروه کنترل و مورد آزمون (MTT)

رویانهای بیش از چهار سلول در انتهای روز دوم پس از لقاح				
MTT		کنترل		گروه تخمکهای تزریق شده
درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۵۰	۲	۸۰	۴	۱
۱۰۰	۲	۵۰	۲	۲
۱۰۰	۳	۱۰۰	۱	۳
۱۰۰	۱	۵۰	۱	۴
۵۰	۱	۶۶/۶	۲	۵
۳۳/۳	۱	۰	۰	۶
۰	۰	۱۰۰	۱	۷
۶۶/۶	۲	۰	۰	۸
۱۰۰	۳	۵۰	۲	۹
۱۰۰	۱	۵۰	۲	۱۰
۲۸/۵	۲	۱۰۰	۹	۱۱
۷۵	۳	۵۰	۱	۱۲
۶۶/۹	۱/۷	۵۸	۲	M
(NS) ۰/۵۳۳				P

NS: Not Significant

این وجود از بین اسپرم‌ها، تنها اسپرم‌های MTT مثبت برای تزریق در گروه آزمون مورد استفاده قرار گرفت. سپس تخمک‌های تزریق شده به محیط RS1 (Vitrolife, Sweden) منتقل و پس از ۱۸ ساعت برای

دانه‌های MTT از گردن و قطعه میانی اسپرم هنگام قرار گرفتن در محیط مجاور روغن باشد، زیرا روغن یک حلال مناسب برای MTT Formazan باشد. این مسئله به عنوان یک مشکل اجرایی در روش کار مطرح است. با

جدول ۴- مقایسه فراوانی نسبی و مطلق و میانگین تعداد و درصد رویانهای ۱۶-۸ سلولی تشکیل شده در انتهای روز سوم پس از لقاح در دو گروه کنترل و مورد آزمون (MTT)

رویانهای ۸-۶ سلولی در انتهای روز سوم پس از لقاح				
MTT		کنترل		گروه تخمکهای تزریق شده
درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۵۰	۲	۱۰۰	۵	۱
۱۰۰	۲	۱۰۰	۴	۲
۱۰۰	۳	۱۰۰	۱	۳
۱۰۰	۱	۰	۰	۴
۱۰۰	۲	۱۰۰	۳	۵
۱۰۰	۳	۱۰۰	۱	۶
۰	۰	۱۰۰	۱	۷
۱۰۰	۳	۰	۰	۸
۶۶/۶	۲	۱۰۰	۴	۹
۱۰۰	۱	۷۵	۳	۱۰
۱۰۰	۷	۱۰۰	۹	۱۱
۱۰۰	۴	۱۰۰	۲	۱۲
۸۴/۷	۲/۵	۸۱/۲	۲/۷	M
(NS) ۰/۸۱۱				P

NS: Not Significant

جدول ۵- مقایسه فراوانی نسبی و مطلق و میانگین تعداد و درصد تشکیل مورولا در روز چهارم پس از تزریق در دو گروه کنترل و مورد آزمون (MTT)

مورولا در روز چهارم پس از لقاح				
MTT		کنترل		گروه تخمکهای تزریق شده
درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۵۰	۲	۱۰۰	۵	۱
۱۰۰	۲	۱۰۰	۴	۲
۶۶/۶	۲	۱۰۰	۱	۳
.	.	.	.	۴
۵۰	۱	۱۰۰	۳	۵
.	.	۱۰۰	۱	۶
۶۶/۶	۲	۱۰۰	۱	۷
۱۰۰	۳	.	.	۸
۶۶/۶	۲	۲۵	۱	۹
۱۰۰	۱	۷۵	۳	۱۰
۷۱/۴	۶	۷۷/۷	۷	۱۱
۱۰۰	۴	۱۰۰	۲	۱۲
۸۴/۷	۲/۵	۷۳/۱	۲/۳	<b>M</b>
(NS) ۰/۵۷۴				<b>P</b>

NS: Not Significant

آنالیز آماری این مطالعه با استفاده از آزمون Independent t-test و نرم افزار SPSS ویرایش ۱۰/۰ انجام گرفت.

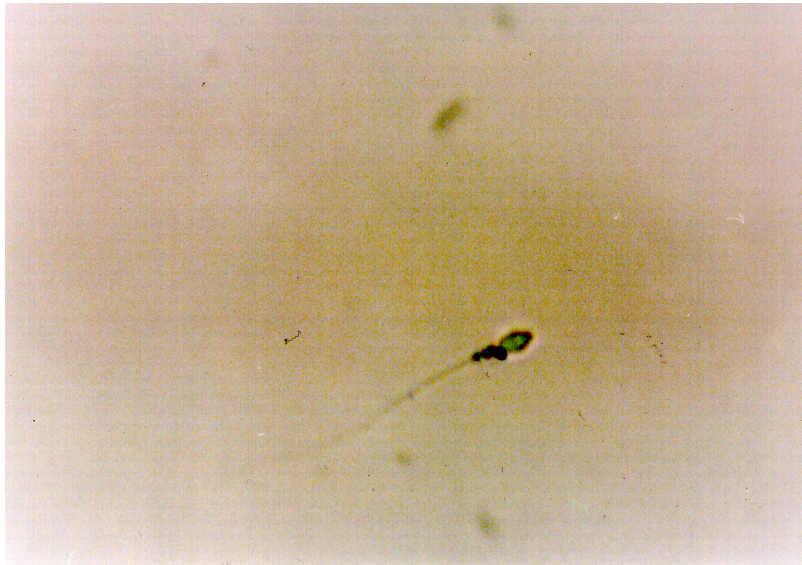
تهیه و هم کشتی جنین‌ها بر روی سلول‌های vero: رده سلول‌های vero به صورت منجمد از مؤسسه رویان تهیه شد. در ابتدا ویال‌های حاوی سلول ذوب (دمای ۳۷°C) و سپس دو بار با محیط کشت Ham's F10+ 25Mm

وجود پیش هسته‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. سپس تخمک‌های لقاح یافته از تخمک‌های غیرلقاح یافته تفکیک و به مدت ۴۸ ساعت دیگر در محیط RS1 کشت داده شد. در انتهای روز سوم (حدود ۷۲ ساعت پس از لقاح) جنین‌ها بر روی سلول‌های vero در داخل محیط Ham's F10+ 25mM Bicarbonate + 10% FCS کشت داده شدند.

جدول ۶- مقایسه فراوانی نسبی و مطلق و میانگین تعداد و درصد تشکیل بلاستوسیست در روز پنجم پس از تزریق در دو گروه کنترل و مورد آزمون (MTT)

بلاستوسیست در روز پنجم پس از لقاح				
MTT		کنترل		گروه تخمکهای تزریق شده
درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۵۰	۲	۸۰	۴	۱
۵۰	۱	۷۵	۳	۲
۶۶/۶	۲	۱۰۰	۱	۳
.	.	.	.	۴
.	.	۱۰۰	۳	۵
۶۶/۶	۲	۱۰۰	۱	۶
.	.	.	.	۷
۶۶/۶	۲	.	.	۸
۳۳/۳	۱	.	.	۹
.	.	۲۵	۱	۱۰
۷۱/۴	۶	۷۷/۷	۷	۱۱
۷۵	۳	۱۰۰	۲	۱۲
۳۹/۹	۱/۵	۵۴/۸	۱/۸	<b>M</b>
(NS) ۰/۳۶۳				<b>P</b>

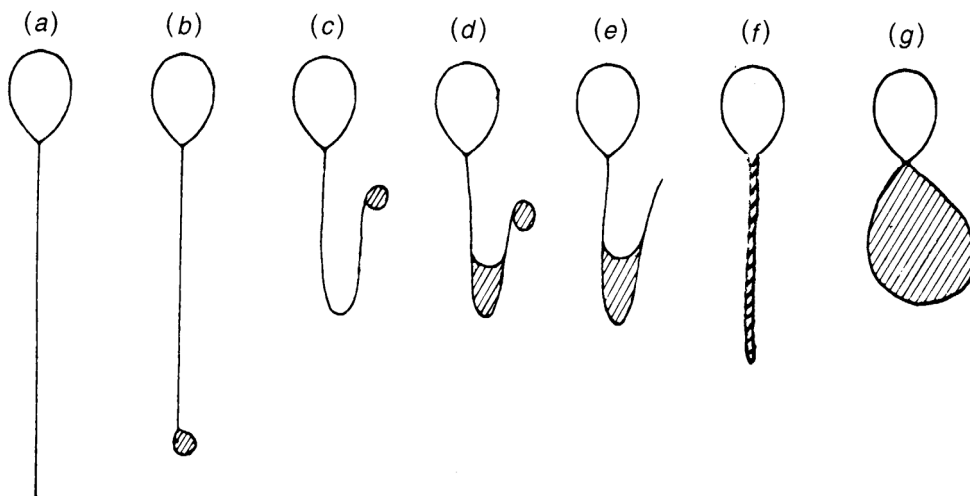
NS: Not Significant



شکل ۱- تشکیل دانه‌های MTT Formazan در ناحیه قطعه میانی اسپرم مجاورشده با MTT

۱۰۰۰ سلول در کف ظرف کشت<sup>۱</sup> گذاشته شد. دو تا سه روز بعد بیش از ۷۰٪ کف قطره توسط سلول‌ها

Bicarbonate + 10% FCS شستشو و در فلاسک کشت داده شدند. ۳ روز بعد از کشت سلول‌ها و کف ظرف را



شکل ۲- الگوهای مختلف تورم ناحیه دم اسپرم زنده انسان پس از انجام آزمون HOST

اشغال شده و آماده هم کشتی با جنین‌ها بود. حداکثر تعداد چهار کشت متوالی<sup>۲</sup> از هر فلاسک برای هم کشتی مناسب گزارش شده است و بدنبال چهارمین کشت

پوشاندند. بدنبال آن و پس از حذف محیط کشت ۳ ml آنزیم Trypsin /EDTA (Gibco) به فلاسک افزوده شد. با جداسدن سلول‌ها از کف ظرف به آن Ham's F10 +10% FCS +25mM Bicarbonate اضافه و پس از دو بار شستشوی سلول‌ها، قطراتی حدود ۵۰ μl و حاوی حدود

1) Petridish  
2) Subculture

وجود ندارد. پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب درصد مورولا و بلاستوسیست نیز ثبت و نتایج بین دو گروه مقایسه شد. نتایج در جداول شماره ۶-۱ گزارش شده است. همانطوری که این جداول نشان می‌دهد، به نظر می‌رسد که با گذشت زمان، درصد پیشرفت رویانه‌های حاصل از تزریق تخمک‌های با اسپرم‌های MTT کاهش می‌یابد ولیکن این تفاوت نسبت به گروهی که با اسپرم‌های باز تزریق شده گروه کنترل چشم‌گیر نبود.

### بحث

برای انجام دادن ICSI موفق، نیاز به تخمک و اسپرم مناسب می‌باشد و از آنجایی که در دسته‌ای از بیماران تحت درمان توسط روش ICSI، اسپرم‌های متحرک و یا زنده درصد کمی از جمعیت اسپرم‌های نمونه را تشکیل می‌دهد، لذا استفاده از روش‌های تشخیصی، برای تفکیک اسپرم‌های زنده و متحرک از اسپرم‌های غیرزنده و بی‌حرکت ضروری می‌باشد. مرور مطالعات گذشته<sup>۱</sup> بیانگر این مطلب است که تنها روش موجود برای تفکیک و تزریق اسپرم زنده ولیکن بدون حرکت به داخل تخمک روش HOST-ICSI می‌باشد (۱۰). در این روش، دم اسپرم‌های زنده بدلیل قرار گرفتن در محیط هیپواسمولار، متورم می‌شود و این تورم با بوجود آوردن اشکال متعدد، قابل مشاهده است (۵) (شکل ۲). در روش HOST-ICSI اسپرم‌های زنده تشخیص داده شده توسط آزمون HOST، به محیط ایزواسمولار منتقل و پس از طی چند مرحله شستشو بوسیله سوزن بدون سیتوپلاسم تخمک تزریق می‌شود. اگرچه استفاده از پنتوکسی‌فیلین<sup>۲</sup> (۱۱) برای القاء حرکت و یا بررسی انعطاف‌پذیری دم اسپرم بدون حرکت با استفاده از سوزن میکرواینجکشن برای تشخیص تجربی اسپرم زنده از غیرزنده استفاده شده است؛ ولیکن تنها روش مورد استفاده و معتبر روش HOST-ICSI می‌باشد.

متوالی لازم است که سلول‌ها را منجمد کرده و بعد از انجماد مورد استفاده قرار داد. لازم به ذکر است که کشت این سلول‌ها در زیر روغن معدنی (Merck d=۰/۸۸ g/ml) انجام و روز قبل از هم کشتی محیط کشت قطره‌ها با Ham's F10 +25Mm Bicarbonate +10% HSA تعویض شد. پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت به ترتیب درصد مورولا و بلاستوسیست نیز ثبت و با استفاده از نرم افزار SPSS و آنالیز آماری Independent t-test نتایج بین دو گروه مقایسه می‌شد.

### نتایج

پس از تقسیم تخمک‌های هر فرد به دو گروه و تزریق بوسیله اسپرم‌های گروه شاهد و اسپرم‌های در معرض MTT میزان لقاح در هر دسته مورد بررسی قرار گرفت. ۱۸ ساعت پس از تزریق اسپرم‌ها، گروه کنترل و آزمون مورد مشاهده قرار گرفت و درصد لقاح آنها ثبت شد (جدول شماره ۱). همانطور که در جدول مشاهده می‌شود تفاوت معنی‌داری بین درصد لقاح در دو گروه کنترل و مورد آزمون وجود ندارد. ۲۴ ساعت پس از مشاهده پیش هسته‌ها تعداد رویانه‌های دو سلولی، چهار سلولی و بیش از چهار سلولی ثبت و درصد رویانه‌های دو سلولی و یا بیشتر از دو سلولی نسبت به تخمک‌های لقاح یافته ثبت می‌شد (جدول شماره ۲ و ۳). این نتایج بیانگر این مطلب است که تفاوتی بین درصد رویانه‌های دو سلولی و یا بیشتر در طی روز دوم پس از تزریق در دو گروه کنترل و آزمون وجود ندارد. پس از گذشت ۲۴ ساعت دیگر، رویانه‌ها در محیط Ham's F10+25Mm Bicarbonate+10% HSA در مجاورت سلول‌های vero کشت داده شدند. در این زمان نیز درصد رویانه‌های بین ۸-۱۶ سلولی نسبت به تخمک‌های لقاح یافته ثبت شد (جدول شماره ۴). همانطوری که در این جدول مشاهده می‌شود تفاوت معنی‌داری بین دو گروه کنترل و آزمون بین درصد تشکیل رویانه‌های ۸-۱۶ سلولی

1) Literature review

2) Pentoxifylline



از روش HOST-ICSI به عنوان یک روش موفق در درمان بیماران دارای اسپرم‌های کم حرکت<sup>۱</sup> و یا کاملاً بی حرکت<sup>۲</sup> نامبرده می‌شود ولی مزایا و معایبی نیز برای این روش گزارش شده است. از مزایای آن، انجام ساده این روش و عدم نیاز به زمان طولانی است؛ ولی عده‌ای از محققین معتقدند که مجاور کردن اسپرم با محیط هیپواسمولار، موجب تخریب غشاء در طی این آزمون می‌شود (۱۲) و نیز برخی محققین از نتایج حاصل از روش درمانی HOST-ICSI ابراز عدم رضایت نموده‌اند (۲). اگرچه جدیدترین گزارش بیانگر آن است که روش HOST-ICSI باعث افزایش درصد حاملگی می‌شود (۱۰) ولیکن تفاوت معنی‌داری بین درصد حاملگی و لانه‌گزینی<sup>۳</sup> و نیز بین شاخصهای لقاح و تعداد جنین‌ها در دو گروه آزمون و کنترل مشاهده نشده است. در ضمن روش HOST-ICSI در درمان بیماران دارای اسپرم‌هایی با دم‌های آمورف نیز مناسب نمی‌باشد.

قبلاً روش ارزیابی حیاتی اسپرم به روش MTT به عنوان یک آزمون تشخیصی گزارش شده است. بر اساس نتایج این مطالعات آزمون MTT از درصد حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار می‌باشد (۷ و ۶). لذا در این مطالعه کارایی آن در روش درمانی ICSI مورد بررسی قرار گرفت. در هر نوبت تزریق اسپرم به درون سیتوپلاسم تخمک، ابتدا تخمک‌های حاصل به دو گروه تقسیم شدند. نمونه اسپرمی نیز به دو قسمت تقسیم و یک قسمت به عنوان گروه کنترل و قسمت دیگر آن مورد آزمون ارزیابی حیاتی اسپرم به روش MTT قرار گرفت. نتایج حاصله بیانگر آن است (جدول شماره ۱) که بین تعداد تخمک‌های تزریق شده در گروه مورد آزمایش و گروه کنترل اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و نیز بین میانگین درصد لقاح و درصد رویانهای بیش از دو سلولی و رویانهای بیش از چهارسلولی در طی

روز دوم رشد و میانگین درصد رویانهای هشت تا شانزده سلولی در طی روز سوم و نیز میانگین درصد مورولا و میانگین درصد بلاستوسیست‌های تولید شده به ترتیب در طی روزهای چهارم و پنجم رشد، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. با وجود این، بین میانگین درصد رشد جنین‌ها در دو گروه کنترل و آزمون، از ابتدا تا مرحله بلاستوسیست یک سیر و روند نزولی در گروه تحت تزریق با اسپرم‌های MTT مثبت، نسبت به گروه کنترل مشاهده می‌شود. موارد زیر احتمالاً می‌توانند از علل وجود این اختلاف غیرمعنی‌دار باشد:

۱- کوچک بودن سایز و اندازه نمونه، مورد مطالعه بدین معنا که تعداد افرادی که از آنها تخمک بدست آمده است و در برخی موارد تعداد تخمک‌های حاصل از یک فرد کم بوده که خود بیانگر این مطلب است که به مطالعه وسیع‌تری نیاز می‌باشد.

۲- عدم دسترسی به MTT از نوع کاملاً خالص. احتمالاً ماده مصرفی از خلوص بالایی برخوردار نبوده است.  
 ۳- با گذشت زمان از مجاورت اسپرم‌ها با MTT، کاهش درصد حرکت در آنها مشاهده می‌شود که می‌تواند به علت سمیت<sup>۴</sup> MTT و یا مهار آنزیم دهیدروژناز میتوکندری باشد. نهایتاً این مطالعه اولیه بیانگر آن است که ارزیابی حیاتی اسپرم به روش MTT در روش ICSI می‌تواند علاوه بر تشخیص اسپرم زنده از اسپرم غیرزنده، در تفکیک اسپرم‌های زنده تشخیص داده شده به منظور کاربرد در روش درمانی ICSI مورد استفاده قرار گیرد. بویژه در بیمارانی که اسپرم‌های آنها از نظر مورفولوژی دم، آمورف می‌باشند، این روش نسبت به روش HOST-ICSI کارایی بیشتری دارد ولی به مطالعه و بررسی بیشتری نیاز است. این روش باید پیش از کاربرد بالینی برای درمان انسان، بر روی حیوانات آزمایشگاهی آزمایش شود تا اثرات میتوژنیک و یا تراژنیک احتمالی آن نیز مورد بررسی قرار گیرد.

1)Sever asthenospermia  
 2)Asolute asthenospermia  
 3)Implantation

4)Toxicity

**تشکر و قدردانی**

بدینوسیله از کلیه همکاران مرکز باروری و ناباروری اصفهان بویژه سرکار خانم فریبا مولوی و سرکار خانم فرحناز مولوی، پژوهشکده رویان و دانشکده پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که در این مطالعه ما را یاری کردند، کمال تشکر و سپاس را داریم. در ضمن این تحقیق بخشی از طرح پژوهشی پژوهشکده رویان به شماره ۴۰۴ - ۷۹ / پ می باشد.

**References**

- 1-Eliasson R., Mossberg B., Camner P., Afzelius BA. The immotile-cilia syndrom. A congenital ciliary abnormality as an etiologic factor in chronic airway infections and male sterility. *N Engl J Med.* 1977;297:1-6.
- 2-Yieh-Loong T., Jiaen L., Jairo E., Garcia E., Eugene K., Campton G., Baramki T.A. Establishment of an optimal hypo-osmotic swelling test by examining single spermatozoa in four different htpo-osmotic solutions. *Hum Reprod.* 1997;12(5):1111-3.
- 3-WHO laboratory manual for the examination of human semen sperm-cervical mucus interaction. 3<sup>th</sup> Edition, Cambridge University Press. 1992; PP52.
- 4-Ahmadi A., Soon-Chye N.G. The single sperm curling test, a modified hypo-osmotic swelling test, as a potential technique for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1997;68(2):346-50.
- 5-Hossein A.M., Rizk B, Bairk S., Huff C., Thorneycroft I.H. Time course of hypo-osmotic swelling test of human spermatozoa; evidence of ordered transition between swelling subtypes. *Hum Reprod.* 1998;13(6):1578-83.
- ۶-ابوترابی ر، اسفندیاری ا، نصراصفحانی م ح، مردانی م. یک روش نوین جهت بررسی حیات اسپرم با استفاده از MTT. نشریه پزشکی یاخته، سال ۳، شماره ۹، ۱۳۸۰، ص ۶-۱.
- 7-Knars-Esfahani M.H., Aboutorabi R., Esfandiari E., Mardani M. Sperm MTT viability assay: a new method for evaluation of human sperm viability. *J Assist Reprod Genet.* 2002;19(10):475-80.
- 8-Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Method.* 1983;65:55-63.
- 9-Hansen M.B., Nielsen S.E., and Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods.* 1989; 119: 203-10.
- 10-El-Nour A.M., Al Mayman H.A., Jaroudi K.A., Coskun S. Effects of the hypo-osmotic swelling test on the outcome of intracytoplasmic sperm injection for patients with only nonmotile spermatozoa available for injection; a prospective randomized trial. *Fertil Steril.* 2001;75(3):480-4.
- 11-Tasdemir I., Tasdemir M., Tavukculoglu S. Effect of pentoxifylline on immotile testicular spermatozoa. *J Assist Reprod Genet.* 1998;15: 90-2.
- 12- Ramirez J.P., Carreras A., Mendoza C Sperm plasma membrane integrity in fertile and infertile men. *Andrologia.* 1992;24:141-4.