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.)[۱و۲]، روشنک ابوترابی (M.S.)[۳]، ابراهیم اسفندیاری (Ph.D.)[۴].

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

۲- مسئول جنین‌شناسی 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 نمونهٔ اسپرمی در مجاورت MTT قرار گرفته و MTT توسط آنزیم دهیدروژناز میتوکندری اسپرم‌های زنده در ناحیه قطعه میانی به رنگدانه بنفشMTT 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 برروی 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. مقایسهٔ 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 تراتوژنیک ندارد، می‌توان از این روش برای درمان به روش ICSI بخصوص در بیماران آستنواسپرمی دارای اختلالات ناحیه دم اسپرم سود جست.

گل واژگان: اسپرم انسان، MTT، میکرو اینجکشن و ارزیابی حیاتی.

آدرس مکاتبه: دکتر محمدحسین نصر اصفهانی، پژوهشکدهٔ رویان، پلاک ۳۶، کوچه سیمین، تقاطع آصف، خیابان زعفرانیه، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، تهران، ایران.

پست الکترونیک:nasrmhn@yahoo.com

Downloaded from http://www.jri.ir

مقدمه

یکی از روش‌های درمان ناباروری با علل مردانه، روش تزریق اسپرم به درون سیتوپلاسم تخمک(ICSI)[1] می‌باشد. در این روش اسپرم توسط سوزن مخصوص با قطر $٤\mu m$ 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[2] می‌باشند، مانند روشهای ائوزین، ائوزین ـ 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 ـ نگروزین برای تسهیل در شمارش اسپرمهای زنده از نگروزین استفاده می‌شود که با ایجاد زمینه تیره، اسپرمهای دارای رنگ سفید متمایزمی‌شوند(۳). روش ائوزین ـ نگروزین به عنوان یکی از بهترین آزمونهای تشخیصی اسپرمهای زنده از اسپرم‌های غیرزنده مورد استفاده قرار می‌گیرد. ولیکن به علت ثابت‌شدن[3] اسپرمهای زنده در طی رنگ‌آمیزی، استفاده از آنها برای تزریق به تخمک امکان‌پذیر نمی‌باشد.

روش HOST[4] یکی از روشهایی است که در تشخیص و تفکیک اسپرمهای زنده از مرده و در نتیجه درمان بیماران به روش ICSI قابل استفاده است(٤). 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 وجودآوردن اشکال مختلف قابل مشاهده است(٥) 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 (٤ و٣) تست آب[5] 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[6] توسط MTT[7] که قبلاً بعنوان یک روش تشخیصی برای این موضوع گزارش شده است(٧و٦)، 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 تتزازولیوم با علامت اختصاری MTT استفاده می‌شود. MTT پودری زرد رنگ است و سوبسترای آنزیم دهیدروژناز میتوکندری می‌باشد.

1)Intra Cytoplasmic Sperm Injection
2)Dye exclusion
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 ($C_{18}H_{16}N_5Br$)

Downloaded from http://www.jri.ir

آنزیم دهیدروژناز، برم موجود در MTT را با هیدروژن جایگزین کرده و در نتیجه MTT به Formazan[1] MTT تبدیل می‌شود(۸ و۹). 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 درناحیه گردن اسپرم و امکان جداسازی اینگونه اسپرم‌ها توسط سوزن میکرواینجکشن برآن 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 بلا ستوسیست بررسی کردیم.

مواد و روشها

آزمون MTT: اسپرم‌های مورد آزمایش از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه آندرولوژی 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+25*mM* 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+25*mM* Hepes (Gibco) تهیه و PH آن به میزان ۷/۴۵–۷/۴۰ تنظیم گردید، سپس محلول فیلتر شده (Millipore-0.22μm) در حجم‌های ۴۵۰μl 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 ۵۰μl اسپرم شستشو داده شده اضافه و به مدت ۱ الی ۲ ساعت سپس در انکوباتور ۳۷ ° C نگهداری شد(۶و۷).

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 نداشتند. در ضمن در بیمارانی که فاقد اسپرم بودند با توجه به احتمال بروز سندرم تحریک بیش از حد[2] 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[3] 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 انجام‌دادن روش ICSI سلول‌های اطراف تخمک‌ها به روش مکانیکی و شستشو در آ نزیم 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+ 25*mM* Hepes + 10% HSA Ham's) و نیز

1)$C_{18}H_{17}N_5$

2)Hyperstimulation Syndrome
3)Deformed

Downloaded from http://www.jri.ir

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)

گروه تخمکهای تزریق شده	تعداد تخمک		میزان باروری			
	کنترل	MTT	کنترل		MTT	
			تعداد	درصد	تعداد	درصد
۱	٦	٦	٥	۸۳/۳	٤	٦٦/٦
۲	٤	۳	٤	۱۰۰	۲	٦٦/٦
۳	۲	۳	۱	٥۰	۳	۱۰۰
۴	۷	٤	۲	۲۸/٥	۱	۲٥
٥	٤	٥	۳	۷٥	۲	٤۰
۶	۳	٤	۱	۳۳/۳	۳	۷٥
۷	۱	۲	۱	۱۰۰	۲	۱۰۰
۸	٤	٤	۱	۲٥	۳	۷٥
۹	٤	۳	٤	۱۰۰	۳	۱۰۰
۱۰	٥	٦	٤	۸۰	۱	٦٦/٦
۱۱	۹	۹	۹	۱۰۰	۷	۷۷/۷
۱۲	٥	٦	۲	٤۰	٤	٦٦/٦
M	٤/٥۰	٤/٥۸	۳	٦۷/۹	۲/۹	٦۷/٤
P	(NS) ۰/۹۲۱		(NS) ۰/۹٦۷			

NS: Not Significant

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

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)

گروه تخمکهای تزریق شده	رویانهای بیش از دو سلولی در روز دوم پس از لقاح			
	کنترل		MTT	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۱	٥	۱۰۰	۲	٥۰
۲	٤	۱۰۰	۲	۱۰۰
۳	۱	۱۰۰	۳	۱۰۰
۴	۲	۱۰۰	۱	۱۰۰
٥	۳	۱۰۰	۲	۱۰۰
۶	۱	۱۰۰	۳	۱۰۰
۷	۱	۱۰۰	۲	۱۰۰
۸	۱	۱۰۰	۳	۱۰۰
۹	٤	۱۰۰	۳	۱۰۰
۱۰	٤	۱۰۰	۱	۱۰۰
۱۱	۹	۱۰۰	۷	۱۰۰
۱۲	۲	۱۰۰	٤	۱۰۰
M	۳	۱۰۰	۲/۷	۹٥/۸
P	(NS) ۰/۳۳۹			

NS: Not Significant

Downloaded from http://www.jri.ir

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				
گروه تخمکهای تزریق شده	کنترل		MTT	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۱	٤	۸۰	۲	۵۰
۲	۲	۵۰	۲	۱۰۰
۳	۱	۱۰۰	۳	۱۰۰
۴	۱	۵۰	۱	۱۰۰
۵	۲	٦٦/٦	۱	۵۰
۶	۰	۰	۱	۳۳/۳
۷	۱	۱۰۰	۰	۰
۸	۰	۰	۲	٦٦/٦
۹	۲	۵۰	۳	۱۰۰
۱۰	۲	۵۰	۱	۱۰۰
۱۱	۹	۱۰۰	۲	۲۸/۵
۱۲	۱	۵۰	۳	۷۵
M	۲	۵۸	۱/۷	٦٦/۹
P	(NS) ۰/۵۳۳			

NS: Not Significant

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

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				
گروه تخمکهای تزریق شده	کنترل		MTT	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۱	۵	۱۰۰	۲	۵۰
۲	٤	۱۰۰	۲	۱۰۰
۳	۱	۱۰۰	۳	۱۰۰
۴	۰	۰	۱	۱۰۰
۵	۳	۱۰۰	۲	۱۰۰
۶	۱	۱۰۰	۳	۱۰۰
۷	۱	۱۰۰	۰	۰
۸	۰	۰	۳	۱۰۰
۹	٤	۱۰۰	۲	٦٦/٦
۱۰	۳	۷۵	۱	۱۰۰
۱۱	۹	۱۰۰	۷	۱۰۰
۱۲	۲	۱۰۰	٤	۱۰۰
M	۲/۷	۸۱/۲	۲/۵	۸٤/۷
P	(NS) ۰/۸۱۱			

NS: Not Significant

Downloaded from http://www.jri.ir

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				
گروه تخمکهای تزریق شده	کنترل		MTT	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۱	۵	۱۰۰	۲	۵۰
۲	٤	۱۰۰	۲	۱۰۰
۳	۱	۱۰۰	۲	٦٦/٦
۴	۰	۰	۰	۰
۵	۳	۱۰۰	۱	۵۰
۶	۱	۱۰۰	۰	۰
۷	۱	۱۰۰	۲	٦٦/٦
۸	۰	۰	۳	۱۰۰
۹	۱	۲۵	۲	٦٦/٦
۱۰	۳	۷۵	۱	۱۰۰
۱۱	۷	۷۷/۷	٦	۷۱/٤
۱۲	۲	۱۰۰	٤	۱۰۰
M	۲/۳	۷۳/۱	۲/۵	۸٤/۷
P	(NS) ۰/۵۷٤			

NS: Not Significant

وجود پیش هسته‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. سپس تخمک‌های لقاح یافته از تخمک‌های غیرلقاح یافته تفکیک و به مدت ٤۸ ساعت دیگر در محیط RS1 کشت داده شد. در انتهای روز سوم (حدود ۷۲ ساعت پس از لقاح) جنین‌ها برروی سلول‌های vero در داخل محیط Ham's F10+ 25*mM* Bicarbonate + 10% FCS کشت داده شدند.

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

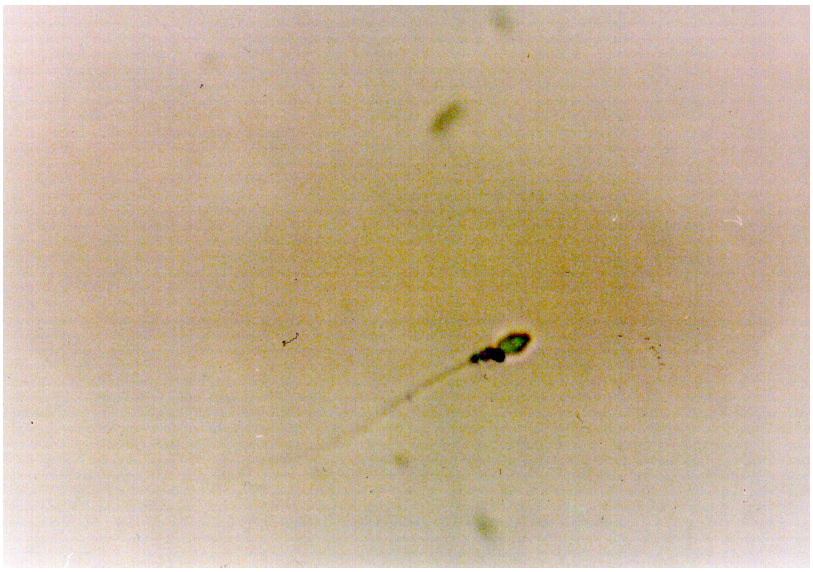
تهیه و هم کشتی جنین‌ها برروی سلول‌های vero: رده سلول‌های vero به صورت منجمد از مؤسسهٔ رویان تهیه شد. در ابتدا ویال‌های حاوی سلول ذوب (دمای ۳۷°C) و سپس دو بار با محیط کشت Ham's F10+ 25*Mm*

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				
گروه تخمکهای تزریق شده	کنترل		MTT	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۱	٤	۸۰	۲	۵۰
۲	۳	۷۵	۱	۵۰
۳	۱	۱۰۰	۲	٦٦/٦
۴	۰	۰	۰	۰
۵	۳	۱۰۰	۰	۰
۶	۱	۱۰۰	۲	٦٦/٦
۷	۰	۰	۰	۰
۸	۰	۰	۲	٦٦/٦
۹	۰	۰	۱	۳۳/۳
۱۰	۱	۲۵	۰	۰
۱۱	۷	۷۷/۷	٦	۷۱/٤
۱۲	۲	۱۰۰	۳	۷۵
M	۱/۸	۵٤/۸	۱/۵	۳۹/۹
P	(NS) ۰/۳٦۳			

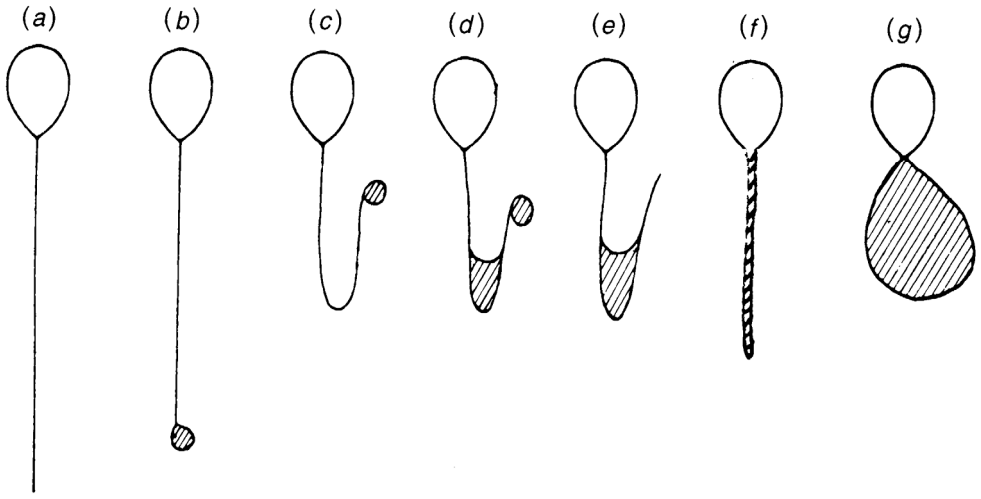
NS: Not Significant

Downloaded from http://www.jri.ir



شکل۱- تشکیل دانه‌های MTT Formazan در ناحیه قطعه میانی اسپرم مجاورشده با MTT

Bicarbonate + 10% FCS شستشو و در فلاسک کشت داده شدند. ۳ روز بعد از کشت سلول‌ها و کف ظرف را ۱۰۰۰ سلول در کف ظرف کشت [1] گذاشته شد. دو تا سه روزبعد بیش از ۷۰٪ کف قطره توسط سلول‌ها



شکل۲- الگوهای مختلف تورم ناحیه دم اسپرم زنده انسان پس از انجام آزمون HOST

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

اشغال شده و آماده هم کشتی با جنین‌ها بود. حداکثر تعداد چهار کشت متوالی [2] از هر فلاسک برای هم کشتی مناسب گزارش شده است و بدنبال چهارمین کشت

1)Petridish
2)Subculture

Downloaded from http://www.jri.ir

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 +25*Mm* Bicarbonate +10% HSA تعویض شد. پس از ۲٤ تا ٤۸ 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. ۲٤ ساعت پس از مشاهده پیش هسته‌ها تعداد رویانهای دو سلولی، چهار سلولی و بیش از چهار سلولی ثبت و درصد رویانهای 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 رویانهای دو سلولی و یا بیشتر در طی روز دوم پس از تزریق در دو گروه کنترل و آزمون وجود ندارد. پس از گذشت ۲٤ ساعت دیگر، رویانها در محیط Ham's F10+25*Mm* Bicarbonate+10% HSA در مجاورت سلول‌های vero کشت داده شدند. در این زمان نیز درصد رویانهای بین ۱٦-۸ سلولی نسبت به تخمک‌های لقاح یافته ثبت شد(جدول شماره ٤). همانطوری که در این جدول مشاهده می‌شود تفاوت معنی‌داری بین دو گروه کنترل و آزمون بین درصد تشکیل رویانهای ۱٦-۸ سلولی وجود ندارد. پس از ۲٤ و ٤۸ ساعت به ترتیب درصد مورولا و بلاستوسیست نیز ثبت و نتایج بین دو گروه مقایسه شد. نتایج در جداول شماره ٦-۱ گزارش شده است. همانطوری که این جداول نشان می‌دهد، به نظر می‌رسد که با گذشت زمان، درصد پیشرفت رویانهای 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 انجام‌دادن 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[1] 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 بوسیلهٔ سوزن بدرون سیتوپلاسم تخمک تزریق می‌شود. اگرچه استفاده از پنتوکسی‌فیلین[2] (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.

1)Literature review
2)Pentoxifylline

Downloaded from http://www.jri.ir

از روش HOST-ICSI بـه عنـوان یـک روش موفـق در درمان بیماران دارای اسپرم‌های کم حرکت[1] و یـا کـاملاً بی‌حرکت[2] 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 مجـاور کـردن اسـپرم بـا محـیط هیپواسمولار، موجب تخریب غشاء در طی ایـن آزمـون می‌شود(۱۲) و نیـز برخـی محققـین از نتـایج حاصـل از روش درمانی HOST-ICSI ابراز عدم رضایت نموده‌انـد (۲). اگرچه جدیدترین گزارش بیانگر آن است کـه روش HOST-ICSI باعث افزایش درصد حاملگی می‌شـود(۱۰) ولـیکن تفـاوت معنـی‌داری بـین درصـد حـاملگی و لانه‌گزینی[3] و نیز بین شاخصهای لقاح و تعداد جنـین‌هـا در دو گروه آزمون و کنتـرل مـشاهده نـشده اسـت. در ضـمن روش HOST-ICSI در درمـان بیمـاران دارای اسپرم‌هایی با دم‌های آمورف نیز مناسب نمی‌باشد.

قـبلاً روش ارزیـابی حیـاتی اسـپرم بـه روش MTT بـه عنوان یک آزمـون تشخیـصی گـزارش شـده اسـت. بـر اسـاس نتـایج ایـن مطالعـات آزمـون MTT از درصـد حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار می‌باشد(٦و٧). لـذا در این مطالعه کارایی آن در روش درمانی ICSI مـورد بررسی قرار گرفت. در هر نوبت تزریق اسپرم به درون سیتوپلاسم تخمک، ابتدا تخمک‌های حاصل به دو گـروه تقسیم شدند. نمونهٔ اسپرمی نیز به دو قـسمت تقـسیم و یک قسمت بـه عنـوان گـروه کنتـرل و قـسمت دیگـر آن مورد آزمون ارزیابی حیاتی اسپرم به روش MTT قرار گرفت. نتایج حاصله بیانگر آن است(جدول شماره ۱) که بـین تعـداد تخمـک‌هـای تزریـق شـده در گـروه مـورد آزمایش و گروه کنترل اختلاف معنی‌داری وجود نـدارد و نیز بین میانگین درصد لقاح و درصد رویانهـای بـیش از دو سلولی و رویانهای بـیش از چهارسـلولی در طـی روز دوم رشد و میـانگین درصـد رویانهـای هـشت تـا شانزده سلولی در طی روز سوم و نیز میانگین درصـد مورولا و میانگین درصد بلاستوسیست‌های تولید شـده به ترتیب در طی روزهای چهارم و پنجم رشد، اخـتلاف معنی‌داری مشاهده نـشد. بـا وجـود ایـن، بـین میـانگین درصد رشد جنـین‌هـا در دو گـروه کنتـرل وآزمـون، از ابتدا تا مرحلهٔ بلاستوسیست یک سیر و روند نزولی در گروه تحت تزریق با اسپرم‌های MTT مثبت، نـسبت بـه گـروه کنتـرل مـشاهده مـی‌شـود. مـوارد زیـر احتمـالاً می‌توانند از علل وجود این اختلاف غیرمعنی‌دار باشد:

۱ـ کوچک‌بودن سایز و اندازهٔ نمونه، مورد مطالعه بدین معنا که تعداد افرادی که از آنها تخمک بدست آمده است و در برخی موارد تعداد تخمک‌های حاصـل از یـک فـرد کم بوده که خود بیانگر این مطلب اسـت کـه بـه مطالعـه وسیع‌تری نیاز می‌باشد.

۲ـ عدم دسترسی به MTT از نوع کاملاً خالص. احتمـالاً ماده مصرفی از خلوص بالایی برخوردار نبوده است.

۳ـ با گذشت زمان از مجاورت اسپرم‌ها با MTT، کاهش درصد حرکت در آنها مشاهده می‌شود که می‌توانـد بـه علـت سـمیت[4] MTT و یـا مهـار آنـزیم دهیـدروژناز میتوکندری باشد. نهایتاً این مطالعهٔ اولیه بیانگر آن است که ارزیابی حیاتی اسپرم به روش MTT در روش ICSI می‌توانـد عـلاوه بـر تـشخیص اسـپرم زنـده از اسـپرم غیرزنده، در تفکیک اسپرم‌های زنده تشخیص داده شده به منظور کاربرد در روش درمانی ICSI مورد اسـتفاده قرار گیرد. بویژه در بیمارانی که اسپرم‌های آنها از نظر مورفولوژی دم، آمورف می‌باشند، این روش نـسبت بـه روش HOST-ICSI کارایی بیشتر دارد ولی به مطالعـه و بررسـی بیـشتری نیـاز اسـت. ایـن روش بایـد پـیش از کاربرد بـالینی بـرای درمـان انـسان، بـرروی حیوانـات آزمایشگاهی آزمـایش شـود تـا اثـرات میتوژنیـک و یـا تراتوژنیک احتمالی آن نیز مورد بررسی قرار گیرد.

1)Sever asthenospermia
2)Asolute asthenospermia
3)Implantation
4)Toxicity

Downloaded from http://www.jri.ir

تشکرو قدردانی

بدینوسیله از کلیه همکاران مـرکـز باروری و نـاباروری 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 تشکرو سپاس را داریم. در ضمن این تحقیق بخشی از طرح پژوهـشی پژوهـشکده رویـان بـه شماره ٤٠٤ – ٧٩/ پ می‌باشد.

References

1-Eliasson R., Mossberg B., Camner P., Afzelius BA. The immntile-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. 3th 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.

٦-ابوترابی ر، اسفندیاری ا، نصراصفهانی م ح، مردانی م. یک روش نوین جهت بررسی حیات اسپرم با استفاده از MTT. نشریه پزشکی یاخته، سال ٣، شماره ٩، ١٣٨٠، ص ٦-١.

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 cytotoxisity 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 sweelling 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.

Downloaded from http://www.jri.ir