

## ارتباط بین کیفیت DNA اسپرم و میزان موفقیت IVF در زوج‌های نابارور

محمود دهقانی اشکذری (Ph.D.)<sup>۱</sup>، سید مهدی کلانتر (Ph.D.)<sup>۲</sup>، کاظم پریور (Ph.D.)<sup>۳</sup>، عباس افلاطونیان (Ph.D.)<sup>۴</sup>

۱- استادیار، گروه سلولی-مولکولی، مرکز تحقیقات مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی اشکذر، یزد، ایران.

۲- دانشیار، واحد تولید مثل و ژنتیک، مرکز تحقیقاتی-درمانی ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

۳- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران.

۴- دانشیار، گروه زنان و زایمان و نازایی، مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** امروزه استفاده از تکنیک‌های کمک باروری (ART) مشکل بسیاری از افرادی که از ناباروری رنج می‌برند را برطرف نموده است. تکرار سیکل‌های درمانی، صرف وقت و هزینه نسبتاً زیاد درمان، مشکلات احتمالی ناشی از بیهوشی‌های مکرر، محققین را به سمت یافتن راه‌هایی برای پیش‌بینی میزان موفقیت استفاده از هر یک از تکنیک‌های مورد استفاده برای هر فرد نموده است. بیش از نیمی از موارد ناباروری با علت مردانه می‌باشند. هرچند آنالیز مایع منی به عنوان یکی از آزمایشات اولیه جهت تشخیص علل قدرت باروری اسپرم ضروری می‌باشد؛ ولی با این وجود آنالیز اسپرم در درصد قابل توجهی از بیماران قدرت پیش‌بینی نتایج لقاح را نداشته و استفاده از تست‌های عملکردی اسپرم در کنار آنالیز مایع منی پیشنهاد می‌شود. یکی از این تست‌های عملکردی، بررسی وضعیت DNA دو رشته‌ای اسپرم می‌باشد. در این تحقیق ارزش تشخیصی میزان DNA دو رشته‌ای اسپرم در پیش‌بینی موفقیت لقاح خارج رحمی (IVF) مورد ارزیابی قرار گرفته است.

**روش بررسی:** طی این مطالعه ۱۰۰ مرد نابارور که همسران آنها ناباروری با علت مشخص زنانه نداشتند مورد مطالعه قرار گرفتند. آنالیز استاندارد مایع منی شامل تعداد، تحرک و مورفولوژی اسپرم بر روی نمونه منی انجام شد. آزمایش عملکردی سنجش طبیعی بودن DNA اسپرم به کمک رنگ‌آمیزی Acridin Orange صورت گرفت و با توجه به طیف رنگی در زیر میکروسکوپ اپی‌فلورسانس با طول موج ۴۹۰-۴۵۰ nm مورد ارزیابی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. براساس نتایج لقاح، افراد به سه گروه لقاح کمتر از ۵۰٪ و گروه بیش از ۵۰٪ و نیز شکست کامل لقاح (TFF) دسته‌بندی شد. جهت تجزیه و تحلیل نتایج از آنالیز واریانس یک طرفه و محاسبه ضریب همبستگی و سطح زیر منحنی ROC استفاده شد و مقدار  $p < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد. به منظور سطح قابل پیش‌بینی، از منحنی ROC استفاده گردید.

**نتایج:** آنالیز اطلاعات نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین درصد لقاح در IVF و تعداد اسپرم، میزان تحرک آنها وجود نداشت ولی ارتباط آن با تعداد اسپرم دارای حرکت درجه معنی‌دار بود. در این مطالعه مورفولوژی پس از رنگ‌آمیزی نمونه‌ها با روش پاپانیکولا فقط ارتباط معنی‌داری بین نقائص ناحیه دم و درصد لقاح وجود داشت. آنالیز واریانس میانگین‌های DNA دو رشته‌ای افراد با درصد لقاح مساوی یا کمتر از پنجاه درصد و بیشتر از پنجاه درصد و موارد شکست در لقاح نشان می‌دهد که اختلاف در  $p < 0.05$  معنی‌دار است. آنالیز ROC نشان داد که در لقاح ۵۰٪، نقطهٔ برش برای طبیعی بودن DNA ۴۷/۲۵٪ می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** آزمایش‌های آنالیز مایع منی اگرچه برای تشخیص ناباروری ضروری هستند؛ ولی برای پیش‌بینی نتایج IVF کافی نیستند. استفاده از آزمایش‌های عملکردی ارزیابی DNA اسپرم برای پیش‌بینی میزان موفقیت و یا شکست لقاح در سیکل‌های ART مفید می‌باشد. براساس این نتایج در مواردی که میزان اسپرم‌های دارای DNA طبیعی کمتر از ۴۷/۲۵٪ باشد میزان موفقیت نتایج لقاح نیز پایین خواهد بود و قبل از شروع سیکل درمانی و تحمیل هزینه به زوج، باید با روش‌های مناسب کیفیت DNA اسپرم را بهبود بخشید.

**کلید واژگان:** کروماتین اسپرم، ناباروری مردان، لقاح خارجی رحمی، طبیعی بودن DNA، DNA دو رشته‌ای، اکریدین نارنجی.

**مسئول مکاتبه:** دکتر سید مهدی کلانتر، واحد ژنتیک و تولید مثل، مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری یزد، یزد، ایران.

پست الکترونیک: smkalantar@yahoo.com

## زمینه و هدف

۱۵-۱۰٪ از زوجها در سنین باروری با مشکل ناباروری مواجه هستند. ناباروری با علت مردانه حدود ۵۰٪ از علل این ناباروریها می باشد (۱،۲). هرچند بیش از یک قرن، آنالیز مایع منی (SA)<sup>۱</sup> به عنوان آزمایشی روتین و ساده جهت ارزیابی توانایی باروری مردان به کار رفته است؛ با این وجود در بسیاری از موارد پارامترهای تعداد، قدرت تحرک و مورفولوژی اسپرم، (براساس روش‌های استاندارد سازمان جهانی بهداشت (WHO) (۳))، نمی‌توانند به عنوان فاکتورهای پیش‌بینی کننده توانایی باروری مردان محسوب گردند و در تصمیم‌گیری درمان زوج‌های نابارور و انتخاب نوع درمان به کار روند. بنابراین طی مطالعات متعدد، به کارگیری آزمایشات عملکردی اسپرم (SFT)<sup>۲</sup> پیشنهاد شده و در موارد ارزیابی کلینیکی در خصوص پیش‌بینی قدرت باروری افراد پیشنهاد شده است. تست‌های متعددی بر مبنای عملکرد فیزیولوژی و مولکولی اسپرم در روند لقاح معرفی شده‌اند، از جمله توانایی اتصال اسپرم به لایه شفاف اطراف تخمک<sup>۳</sup> در اولین مرحله لقاح، قدرت نفوذ شیمیایی اسپرم و به عبارتی توانایی انجام واکنش اکروزومی (AR)<sup>۴</sup>، ارزیابی وضعیت DNA و کروماتین اسپرم را می‌توان نام برد. در تحقیقات متعددی ارزش کلینیکی و قدرت پیش‌گویی کننده این تستها با میزان لقاح و توان باروری اسپرم به اثبات رسیده است (۸-۴). به نظر می‌رسد عملکرد مناسب اسپرم دارای ارتباط کامل با کروماتین طبیعی<sup>۵</sup> آن باشد. روش‌هایی که روی غلظت و پایداری کروماتین اسپرم می‌باشد از سایر تست‌های عملکردی مورد توجه بیشتری قرار گرفته است (۹). در این بین استفاده از رنگ

فلوروکروم اکریدین نارنجی<sup>۶</sup> به روش معمولی و نیز بررسی ساختار کروماتینی اسپرم (SCSA)<sup>۷</sup> مورد توجه قرار گرفته است.

از آزمایش‌های عملکردی اسپرم که برای پیش‌آگهی از درصد لقاح کاربرد دارد، آزمایش طبیعی بودن DNA اسپرم با روش معمولی است. اساس این روش بر این نکته متکی است که اگر افزایش تراکم کروماتین در طی مراحل ساخته شدن اسپرم به درستی انجام نگرفته باشد، هنگامی که در معرض مواد اسیدی نظیر اسید استیک قرار می‌گیرد. دو رشته DNA و اسپرم از یکدیگر جدا شده<sup>۸</sup> و به DNA تک رشته‌ای<sup>۹</sup> تبدیل می‌شود. اسپرم‌های دارای این خصوصیت قابلیت لقاح کمتری دارند (۱۰).

سنجش طبیعی بودن DNA اسپرم با روش‌های مختلفی چون استفاده از تکنیک‌های رنگ‌آمیزی با آنیلین بلو اسیدی (۱۱)، آکریدین نارنجی (۱۲)، مطالعات میکروسکوپ الکترونی (۱۳)، سنجش پایداری هسته اسپرم توسط فلوسیتومتری<sup>۱۰</sup> (۱۴) و استفاده از برومید اتیدیوم<sup>۱۱</sup> (۱۵) نیز امکان‌پذیر می‌باشد. در تحقیق حاضر از الگوی اتصال DNA اسپرم با ترکیب فلوروکروم آکریدین نارنجی به عنوان معرف طبیعی یا غیرطبیعی بودن DNA اسپرم استفاده گردید. علاوه بر این در این تحقیق ارزش تشخیصی میزان DNA دو رشته‌ای اسپرم در پیش‌بینی موفقیت IVF مورد ارزیابی قرار گرفت.

## روش بررسی

این مطالعه مقطعی-تحلیلی طی مدت ۱۰ ماه (آبان ۱۳۸۱ تا مرداد ماه ۱۳۸۲)، روی افراد مراجعه‌کننده

6- Acridine orange

7- Sperm Chromatin Structure Assay

8- Denaturated

9- Single stranded DNA

10- Flocytometry

11- Etidium bromide

1- Semen analysis

2- Sperm Function Tests

3- Zona pellucida

4- Acrosome reaction

5- Chromatin integrity

مورفولوژی طبیعی در دو بار بیش از ۱۰٪ بود نمونه مجدداً به وسیله فرد دومی شمارش می‌شد و در صورتی که تفاوت میانگین ۳ بررسی، کمتر از ۱۰٪ بود، میانگین آنها گزارش می‌شد.

جهت بررسی طبیعی بودن DNA اسپرم، از هر نمونه تعداد ۲ اسمیر نازک، تهیه شد. گسترشها در هوای آزاد با فیکساتور کارنوی (Merck, Germany) تثبیت گردید. سپس درون بافری متشکل از ۳۰ ml اسید سیتریک ۰/۱M با ۲/۵ ml از ۲/۳M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O با pH=۲/۵ قرار گرفتند. آنگاه با استفاده از نارنجی آکریدین (Sigma, USA) به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و با استفاده میکروسکوپ فلورسانس با بزرگنمایی ۴۰۰ و با طول موج ۴۹۰-۴۵۰ nm اسپرم‌های رنگ‌آمیزی شده برای هر نمونه حداقل ۲۰۰ اسپرم مورد شمارش قرار گرفت (Ziess, AxioPhot, Germany). اسپرم‌های دارای DNA طبیعی (دو رشته‌ای) سبز و آنهایی که DNA تک رشته‌ای داشتند قرمز یا نارنجی دیده می‌شدند اما حالت‌های DNA بینابینی، رنگی حد واسط سبز و قرمز داشتند (Liu, ۱۹۹۲) (۱۶).

محاسبه درصد لقاح با تقسیم تعداد سلول‌های تخم حاصل بر تعداد تخمک‌های متافاز II اولیه و ضرب نتیجه حاصل در عدد ۱۰۰ به دست آمد. این بخش توسط پرسنل آزمایشگاه جنین‌شناسی مرکز انجام شد و در طول تحقیق بدون اطلاع از نتایج لقاح، آزمایشات بخش اول روی اسپرم مردان انجام می‌گرفت و در پایان نتایج حاصله با نتایج لقاح مقایسه می‌گردید.

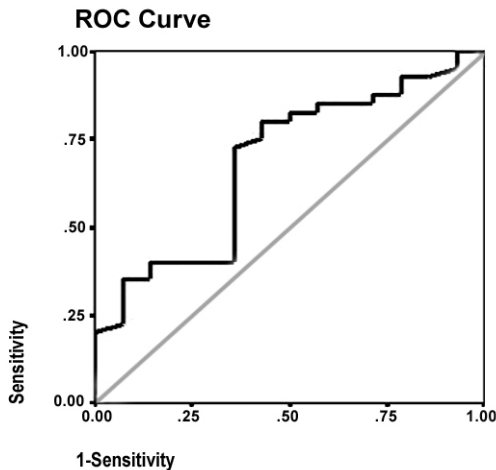
برای آنالیز نتایج حاصل از نرم افزار SPSS نسخه ۱۱/۵ استفاده شد. ابتدا همبستگی<sup>۳</sup> بین لقاح و هر یک از فاکتورهای اسپرمی به دست آمد. سپس نمونه‌های با لقاح موفق به دو گروه با لقاح مساوی یا کمتر از ۵۰٪ و بیشتر از ۵۰٪ دسته‌بندی شده و آنگاه

به مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد و بیمارستان مادر یزد انجام شد. زوجین پس از ارائه توضیحات در مورد مطالعه و اخذ رضایت برحسب میزان لقاح بیش از ۵۰٪ و یا کمتر از ۵۰٪ وارد مطالعه شدند. مجموعاً ۱۰۰ سیکل درمانی IVF ارزیابی شد. معیارهای ورود به مطالعه شامل آنالیز اسپرم طبیعی براساس معیارهای سازمان جهانی بهداشت (۱۹۹۹) عدم وجود، ناباروری با علت زنانه داشتن حداقل ۳ تخمک در مرحله متافاز II بود. هر نمونه پس از حداقل ۲ و حداکثر ۷ روز خودداری از تماس جنسی در ظروف پلاستیکی استریل جمع‌آوری و در انکوباتور ۳۷°C نگهداری شد. با استفاده از سرنگ یک بار مصرف، حجم نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید. بلافاصله پس از مایع شدن<sup>۱</sup>، یک قطره از مایع منی که به خوبی مخلوط شده بود، بین لام و لامل قرار گرفت و در زیر میکروسکوپ، با بزرگنمایی ۱۰۰ و ۴۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. تعداد کل اسپرم به کمک لام نئوبار محاسبه گردید. تحرک (کل، سریع، آهسته و درجا) و مورفولوژی چشمی اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی مورفولوژی اسپرم علاوه بر روش چشمی، یک گسترش نازک بر روی لام از هر بیمار ۲ لام تهیه گردید. پس از خشک شدن نمونه‌ها در مجاورت هوا و تثبیت آنها براساس روش پاپانیکولا<sup>۲</sup> رنگ‌آمیزی صورت گرفته و پس از کدگذاری در زمان مشخص به لحاظ مورفولوژی با بزرگنمایی ۱۰۰۰× مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه مورفولوژی اسپرمها براساس تقسیم‌بندی سازمان جهانی بهداشت به چهار گروه طبیعی، دارای ناهنجاری‌های سر، دم و قطعه میانی تقسیم شد.

هنگام شمارش اسپرمها، هر نمونه توسط محقق دو بار و در طی روزهای متوالی مورد بررسی قرار گرفت و در صورتی که تفاوت میزان درصد اسپرم‌های دارای

1- Liquefaction  
2- Papanicolao

3- Correlation



نمودار ۱- ارزش پیش بینی کنندگی با استفاده از منحنی (ROC) Receiver operating characteristic

گردید. از میان فاکتورهای مختلف آنالیز مایع منی در بررسی مورفولوژی با رنگ آمیزی پاپانیکولا، اسپرم‌های دارای ناهنجاری‌های دم و اسپرم‌های دارای حرکت درجا دارای ارتباط معنی‌داری با لقاح IVF بودند ( $p < 0.05$ ) نتایج مربوط به سیکل‌های TFF در مقایسه با دو نمونه دارای لقاح  $FR < 50\%$  و لقاح  $FR > 50\%$  در ارتباط با ناهنجاری‌های دم در سطح  $p < 0.05$  اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول شماره ۱). DNA در ۵۵٪ نمونه‌ها از نوع دو رشته‌ای، ۲۸٪ تک رشته‌ای و ۱۷٪ در وضعیت بینابینی قرار داشتند. نتایج حاصل از

آنالیز واریانس بین میانگین‌های هر پارامتر در سه نمونه انجام شد. همچنین برای پیشگویی لقاح از آنالیز ROC استفاده گردید.

## نتایج

در این مطالعه مجموعاً ۱۰۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفت؛ ولی از آنجایی که تفسیر نتایج تابع آزمایش‌های متعددی در مراحل مختلف بود، حدود ۱۶ نمونه در پایان تحقیق از مطالعه خارج شدند که مناسب نبودن نمونه‌های تهیه شده جهت آنالیز DNA، لغو سیکل درمانی به علت عدم استحصال تخمک و یا بدست آمدن تخمک‌های نامناسب از علل آن بودند، بنابراین تجزیه و تحلیل‌های آماری روی ۸۴ نمونه صورت پذیرفت. اگر پس از تمام آزمایشات به دلایلی، IVF صورت نگرفته و یا نتیجه لقاح مشخص نبود، نمونه از روند تجزیه و تحلیل خارج می‌شد. ارتباط معنی‌داری بین سن افراد بیمار (مردان  $33/2 \pm 3/2$  سال) و میزان لقاح IVF (متوسط  $72/3 \pm 35/6$ ) وجود نداشت. براساس نتایج لقاح، نمونه‌ها به سه گروه با عدم موفقیت کامل لقاح (TFF) و در مواردیکه لقاح وجود داشت به گروه موفقیت بالای ۵۰٪ و گروه با لقاح کمتر از ۵۰٪ تقسیم

جدول ۱- نتایج کلی آنالیز سیمین در ۸۴ مرد نابارور با درمان IVF مراجعه کننده به مرکز

تحقیقاتی- درمانی ناباروری شهید صدوقی یزد و بیمارستان مادر یزد ۸۲-۱۳۸۱

P- value*	FR>50% (n=40)	FR<50% (n=20)	TFF (n=24)	نتایج کلی آنالیز مایع منی	
				پارامتر	
$p > 0.05$	$3/9 \pm 2/2$	$4/8 \pm 3/3$	$3/3 \pm 1/2$	حجم (ml)	
$p = 0.040$	$126/3 \pm 83$	$114/0.4 \pm 58/1$	$77/0.2 \pm 45/6$	شمارش اسپرم ( $\times 10^6/ml$ )	
$p > 0.05$	$28/6 \pm 14/3$	$29/5 \pm 11/3$	$21/5 \pm 16/7$	مورفولوژی اسپرم (%)	
$p > 0.05$	$75/5 \pm 22/8$	$71/7 \pm 22/3$	$65/6 \pm 44/7$	میزان حرکت (**%)	
$p = 0.029^{**}$	$60/2 \pm 27/4$	$42/16 \pm 28/7$	$36/6 \pm 25/8$	DNA integrity ***	

\* آزمون تعقیبی نشان داد که تنها اختلاف معنی‌دار بین  $FR > 50\%$  و دو گروه دیگر می‌باشد.

\*\* میزان حرکت بر مبنای حرکت درجه I+II.

\*\*\* DNA دو رشته‌ای

در گروه‌های نابارور گزارش نمودند. در مطالعه اخیر نتایج نشان داد که در سیکل‌های درمانی با لقاح ۵۰٪ و بیشتر، سطح طبیعی بودن DNA حدود ۴۷٪ می‌باشد. که با در نظر گرفتن نتایج حاصله از منحنی ROC (نمودار شماره ۱) و سطح ۳۰٪ قادر به پیش‌بینی موفقیت و یا عدم موفقیت لقاح در سیکل‌های درمانی، موافق با یافته‌های فوق می‌باشد؛ هرچند در تحقیق مورد اشاره از روش ارزیابی با استفاده از فلوسایتومتری استفاده شده بود. در تحقیق حاضر در خصوص شمارش اسپرم و درصد DNA تک رشته‌ای در گروه‌های مختلف ارتباط ضعیفی وجود داشت، ولی با توجه به اینکه در هر سه گروه به لحاظ شمارش نرمواسپرم بودند شاید نتوان به عنوان یک پارامتر جهت پیش‌بینی کیفیت DNA استفاده نمود. این نتیجه شبیه یافته‌های Irvine و همکاران در سال ۲۰۰۰ می‌باشد که در مطالعه آنها کیفیت پارامترهای اسپرمی با روش‌های مختلف تعیین و وضعیت DNA اسپرم مورد بررسی قرار گرفته است. درحالی‌که در مطالعات دیگر ارتباطی بین کیفیت اسپرم بر مبنای معیارهای استاندارد سازمان جهانی بهداشت و نیز وضعیت DNA اسپرم دیده نشده و به عبارتی با استفاده از پارامترهای اسپرمی امکان پیش‌بینی کیفیت DNA و برعکس نبوده است (۲۱، ۲۲).

حداقل سه مکانیزم جهت اختلال در DNA اسپرم پذیرفته شده است، که عبارتند از: ۱) اختلال در تراکم کروماتین اسپرم در خلال فرآیند اسپرماتوژنز ۲) شروع آپوپتوز در خلال فرآیند اسپرماتوژنز و یا در هنگام حرکت اسپرم در طول دستگاه تناسلی مردانه و یا زنانه ۳) صدمات ناشی از رادیکال‌های آزاد که بکارگیری آنتی‌اکسیدانها می‌تواند باعث کاهش رادیکال‌های آزاد و نهایتاً کاهش اثرات منفی ROS و متعاقب آن کاهش شکست DNA گردد. هرچند علاوه بر مکانیزم‌های فوق می‌توان خطر ژنتیکی در بروز لقاح خارج رحمی در درمان نابارور را نیز مورد

بررسی وضعیت DNA اسپرم نشان داد که بین میزان لقاح و DNA دو رشته‌ای ارتباط معنی‌داری وجود دارد ( $p < 0.05$ ). میزان DNA دورشته‌ای در دو گروه براساس نتایج لقاح IVF،  $42/2 + 28/8$  و  $27/4 + 60/2$  به ترتیب در سیکل‌های با لقاح کمتر از ۵۰٪ و لقاح بیش از ۵۰٪ مشاهده گردید ( $p < 0.05$ ).

بررسی اطلاعات حاصل از سنجش طبیعی بودن DNA اسپرم با استفاده از ROC نشان داد زمانی که نقطهٔ برش<sup>۱</sup> برای لقاح، ۵۰٪ در نظر گرفته شود، نقطهٔ برش برای DNA دو رشته‌ای ۴۷/۲۵٪ خواهد بود. بدین معنی که اگر میزان DNA دو رشته‌ای بیش از ۴۷/۲۵٪ باشد، میزان لقاح در IVF بیش از ۵۰٪ است (نمودار شماره ۱).

## بحث

ثابت شده است که اسپرم مردان نابارور میزان بالاتری در ناهنجاری کروموزومی، پایداری کمتری نسبت به دناتوره شدن توسط سدیم دودسیل سولفات (SDS) (۱۷)، عدم تراکم DNA و کروماتین (۱۸) و افزایش شکست DNA (۱۹) دارا می‌باشد.

در سال ۱۹۹۹، Evenson به این نتیجه رسید که وضعیت DNA و کروماتین اسپرم با باروری در محیط خارج از بدن مرتبط است. وی اعتقاد داشت که اگرچه این آزمون با پارامترهای غلظت، تحرک و مورفولوژی گزارش شده براساس معیارهای WHO مرتبط نیست؛ ولی می‌تواند به عنوان فاکتوری مستقل در پیش‌گویی لقاح مؤثر باشد. مطالعات متعددی نشان داده است که درصد سلول‌های اسپرمی با اختلالات DNA در دو گروه مردان نابارور و مردانی که توانایی باروری طبیعی دارند به طور معنی‌داری متفاوت است (۲۰، ۱۶، ۴، ۲). به طوریکه Evenson و همکاران آستانه ناباروری در سطح ۳۰٪ را در خصوص طبیعی بودن DNA

1- Cut off point

DNA دو رشته‌ای ۴۷/۲۵٪ می‌باشد. Hoshi در سال ۱۹۹۶ نشان داد هنگامی که میزان DNA دو رشته‌ای بیشتر از ۵۰٪ باشد معمولاً IVF موفقیت‌آمیز است. در تحقیق او هنگامی که میزان DNA دو رشته‌ای کمتر از ۵۰٪ بود، میزان موفقیت در ICSI نیز ۲۶٪ بود.

Jeulin در سال ۱۹۸۶ با استفاده از رنگ‌آمیزی آنیلین بلو، تفاوت معنی‌داری در DNA دو رشته‌ای افراد با نرخ لقاح کمتر از ۳۰٪ و بیشتر از ۳۰٪ مشاهده نمود. از آنالیز رگرسیون فاکتورهای اسپرم‌های دارای حرکت درجا، اسپرم‌های دارای ناهنجاری در ناحیه دم و طبیعی بودن DNA ارزش پیش‌گویی کنندگی طبیعی بودن DNA بالاتر از سایر موارد است. بنابراین در مواردی که اسپرم دارای وضعیت طبیعی و یا اختلال ضعیف است و یا در سیکل‌های با علت نامشخص و درمان‌های ناموفق متعدد، به نظر می‌رسد توصیه به انجام تست‌های عملکردی نظیر طبیعی بودن DNA مفید باشد.

### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج تحقیق اخیر و نیز مطالعات مشابه، هرچند ارزیابی کیفیت DNA اسپرم در ارتباط ضعیف تا متوسط با شمارش اسپرم و یا مرفولوژی اسپرم می‌باشد، و در تحقیقات انجام شده مشابهت نتایج یکسان نبوده است، با این وجود قدرت پیش‌بینی‌کنندگی میزان لقاح و حتی تکامل تا مرحله بلاستوسیت و متعاقباً بارداری را دارا می‌باشد. با این وجود به نظر می‌رسد با توجه به پیچیدگی فرآیند لقاح آزمایش عملکرد اسپرم به تنهایی قدرت پیش‌بینی‌کنندگی لقاح را دارا نباشد و نتایج تحقیق حاضر تنها پیش‌بینی لقاح بالاتر از ۵۰٪ و شکست کامل لقاح را متمایز می‌نمود، که با توجه به سادگی و ارزان بودن این تست می‌توان آن را در موارد شکست کامل و یا موفقیت با درصد کم در سیکل‌های درمانی به این قبیل زوجها پیشنهاد نمود.

توجه قرار داد و به این منظور استفاده از آنتی‌اکسیدانها در خلال سیکل درمانی بسیار مهم می‌باشد (۲۳، ۲۴).

مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر نشان داده است که آسیب DNA اسپرم انسان اثر معکوس بر روی تکامل جنین حاصله در سیکل‌های درمانی خارج از رحمی دارد (۷، ۲۵). در مطالعات ذکر شده اثرات آسیب DNA اسپرم بر تکوین بلاستوسیت در سیکل‌های درمانی IVF گزارش شده است؛ که درصد بالای آسیب اسپرم در سطح بالای ۳۰٪ با چند هسته‌ای بودن بلاستومرها در سیکل‌های درمانی مرتبط بوده است. کیفیت DNA اسپرم در ارتباط با نتایج باروری سیکل‌های کمک باروری و نیز سیکل‌های IUI بود که در سیکل‌های اخیر نمونه‌هایی که بیش از ۱۲٪ اسپرم‌های با DNA غیرطبیعی داشته‌اند بارداری صورت نگرفته است (۲۳). Hammadeh در سال ۲۰۰۱ گزارش نمود که DNA غیر متراکم قادر به لقاح نمی‌باشد. در مطالعات اخیر ثابت شده است که DNA نابالغ، حتی در صورتی که مستقیماً به داخل تخمک تزریق شود قادر به لقاح نمی‌باشد. در همین راستا Chapman در سال ۲۰۰۳ پیشنهاد نمود که متراکم شدن ناقص DNA فاکتور معنی‌داری در سنجش ناباروری مردانه می‌باشد. افزایش نرخ DNA تک رشته‌ای در افراد با باروری کمتر را می‌توان به نقص در عملکرد اپیدیدیم و بیضه ارتباط داد. نقص در عملکرد ژنها، سنتز پروتئینها و اختلال در انجام واکنش‌های بیوشیمیایی درگیر در فرآیند متراکم شدن DNA اسپرم از تئوری‌های پیشنهادی برای این پدیده از دیدگاه ملکولی است و شناخت مکانیسم‌های دقیقتر، احتیاج به مطالعات بیشتر دارد.

علاوه بر این، در تحقیق اخیر با استفاده از آنالیز ROC، ارتباط بین DNA دو رشته‌ای و میزان لقاح مساوی یا کمتر از ۵۰٪ و بیشتر از ۵۰٪ (نقطهٔ برش ۵۰٪) مورد بررسی قرار گرفت. در شرایطی که نقطهٔ برش برای لقاح ۵۰ در نظر گرفته شود بهترین نقطهٔ برش برای

## تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاری جناب آقایان مهرداد سلیمانی، حسین فضلی و سایر همکاران مرکز ناباروری یزد و آزمایشگاه امبریولوژی بیمارستان

مادر تشکر و قدردانی می‌نماید. ضمناً، از بیمارانی که با رضایت در این تحقیق مشارکت نمودند، سپاسگزاری می‌شود.

## References

- 1- Franken D.R., Acosta A.A., Kruger T.F., et al. The hemizona assay: its diagnostic role in male factor infertility. *Fertil Steril.*1993;59:1075-1080.
- 2- Kalantar S.M., Lenton E.A., Cooke. Evaluating the ability of biological substances for induction of acrosome reaction in normospermic samples. *Midd East Fertil Soci J.*2000;5(2):71-78.
- 3- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. 4<sup>th</sup> Edition. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press;1999.
- 4- Hoshi K., Katayose H. The relationship acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilising ability of human sperm. *Fertil Steril.*1996;66:634-639.
- 5- Kalantar S.M. Dehghani Ashkezari M., Parivar K. Correlation between double stranded DNA and fertilization rate in infertile couples. 13<sup>th</sup> world congress on in vitro fertilization-Assisted Reproduction & Genetics. Istanbul, Turkey, May 26- 29, 2005.
- 6- Lopes S., Sun J.G., Jurisicova A. et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1998;69:528-532.
- 7- Sakkas D., Urner F., Bianchi P.G., et al. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1996;11:837-843.
- 8- Sun J.G., Jurisicova A., Casper R.F. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod.* 1997;56:602-607.
- 9- Spano M., Kolstad H., Larsen S.B., et al. The applicability of the flow cytometric sperm structure chromatin assay in epidemiological studies. *Hum Reprod.* 1998;13:2495-2505.
- 10- Evenson D.P., Jost L.K. Utility of sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.*1999;14:1039-1049.
- 11- Jeulin C., Feneux D., Serres C., et al. Sperm factors to failure of human in-vitro fertilization. *J Reprod Fertil.*1986;76:735-744.
- 12- Tejada R.I., Mitchell J.C., Norman A., Marik J.J. and Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril.*1984;42:8791.
- 13- Bartoov B., Etes F., Morphological characterization of abnormal human spermatozoa using transmission electron microscopy. *Arch Androl.*1980;5:305-322.
- 14- Molina J., Castilla J.A., Gil T., Hortas M.L., Vergara F., Herruzo A. Influence of incubation on the chromatin condensation and nuclear stability of human spermatozoa by flow cytometry. *Hum Reprod.*1995; 10:1280-6.
- 15- Engh E., Clausen O.P. Relationship between sperm quality and chromatin condensation measured by DNA fluorescence using flow cytometry. *Int J Androl.*1992; 1(15):407-415.
- 16- Liu D.Y., Baker H.W.G. Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertil Steril.*1992;58:465-483.
- 17- Colleu D., Lescoat D., Boujard D., Le Lannou D. Human sperm nuclear maturity in normozoospermia and sthenozoospermia. *Arch Androl.*1988;21:155-62.
- 18- Hofmann N., Hilscher B., Morchen B., et al. Comparative studies on various modes of classification of morphology of sperm heads and results in in vitro fertilization-a preliminary report. *Andrologia.*1995;27: 19-23.
- 19- Chapman J.C., Michael S.D., et al. Proposed mechanism for sperm chromatin condensation/ decondensation in the male rat. *Reprod Biol Endocrinol.*2003; 1(1):20.
- 20- Irvine D.S., Twigg J.P., Gordon E.L., Fulton N., Milne P.A., Aitken R.J. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl.* 2000;21:33-44.
- 21- Larson K.L., DeJonge C.J., Barnes A.M., Jost L.K., Evenson D.P. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod.*2000;15:1717-1722.

- 22- Liu D.Y., Baker H.W.G. A new test for the assessment of sperm-zona pellucida penetration: relationship with results of other sperm tests and fertilization in vitro. *Hum Reprod.*1994;9:489-496.
- 23- Duran E.H., Morshedi M., Taylor S., Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod.* 2002;17(12):3122-3128.
- 24- Erenpreiss J., Hlevicka S., Rauda R. High impact of male infertility in barren couples in Latvia, 1998-2001. *Proc Latv Acad Sci Ser B.*2002;56:48-51.
- 25- Seli E., Gardner D.K., Schoolcraft W.B., Moffatt O., Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2004;82:378-383.
- 26- Hammadeh M.E., Zeginiadv T., Rosenbaum P., Georg T., Schmidt W., Strehler E. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl.*2001;46: 99.
- 27- Zweig M.H., Campbell G. Receiver operating characteristic (ROC) plots: A fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem.*1993;9:561-577.