

ارتباط بین کمبود پروتامین و فعالیت آکروزین با میزان لقاح پس از انجام ICSI

شهناز رضوی Ph.D.*، محمدحسین نصر اصفهانی Ph.D.*، مرضیه تولائی M.Sc.**، غلامحسن واعظی Ph.D.**،

عبدالحسین شیروی Ph.D.**

* گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

** گروه جنین شناسی پژوهشکده رویان پایگاه اصفهان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان

*** گروه جنین شناسی پژوهشکده رویان پایگاه اصفهان

**** گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

تاریخ وصول: دی ماه ۸۴، تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۸۴

چکیده

هدف: این مطالعه ارزیابی رابطه بین یکسری وقایع که در طول اسپرمیوژنز رخ می دهد، از جمله میزان پروتامین و سلامت آکروزوم با میزان لقاح پس از انجام ICSI

مواد و روشها: نمونه های مایع منی از ۶۸ زوج نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان که کاندید انجام ICSI بودند، جمع آوری شد. بخشی از نمونه های مایع منی برای آنالیز پارامترهای اسپرمی بر اساس معیار WHO و بخش اعظم آن برای انجام ICSI آماده شد. باقیمانده نمونه برای ارزیابی رنگ آمیزی کرومومایسین و آزمون ژلاتینولیز استفاده شد.

یافته ها: از لحاظ آماری بین درصد اسپرمهای CMA_3 مثبت با میزان لقاح، درصد تشکیل هاله و میانگین قطر هاله رابطه معنی دار معکوسی وجود داشت. همچنین میانگین قطر هاله از لحاظ آماری رابطه معنی داری را با غلظت اسپرم، تحرک، میزان لقاح و درصد تشکیل هاله نشان داد، در صورتی که این پارامترها با درصد CMA_3 مثبت رابطه معنی دار معکوسی را نشان داده است. با استفاده از آزمون t-test مشخص شد، میزان لقاح در دو گروه CMA_3 مثبت کمتر و بیشتر از ۴۰ درصد اختلاف معنی داری را نشان داد. به علاوه در این مطالعه میانگین قطر هاله و درصد اسپرمهای CMA_3 مثبت در دو گروه با میزان لقاح کمتر و بیشتر از ۲۵ اختلاف معنی داری را نشان داده است.

نتیجه گیری: می توان دریافت اگر چه دو پارامتر کمبود پروتامین و فعالیت آکروزین با میزان لقاح رابطه دارد، با این حال برای تعیین فاکتورهایی که به طور مستقیم در لقاح تاثیر دارند نیاز به مطالعات بیشتری است.

کلید واژه ها: کمبود پروتامین، فعالیت آکروزین، ICSI، لقاح، فعال شدن اووسیت

مقدمه

درمان زوجهای نابارور به کار می رود. با توجه به اینکه در تزریق اسپرم به داخل سیتوپلاسم تخمک، سدهایی که برای نفوذ و دسترسی اسپرم به داخل اووسیت در طی لقاح طبیعی وجود دارد، مطرح نمی شود، با این حال میزان موفقیت در

تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم به عنوان یک روش متداول در

آدرس مکاتبه: تهران، پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی، صندوق پستی

E-mail: mh_nasr@med.mui.ac.ir

۱۹۳۹۵-۴۶۴۴

مواد و روشها

آماده سازی اسپرم

نمونه‌های مایع منی از ۶۸ زوج نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان که کاندید انجام ICSI بودند جمع‌آوری شد. مایع منی در روز تخمک‌گذاری، پس از ۳-۴ روز پرهیز از مقاربت آماده شد. بخشی از نمونه‌های مایع منی برای آنالیز پارامترهای اسپرمی با استفاده از میکروسکوپ نوری بر اساس معیار WHO بررسی شد و بخش اعظم آن با استفاده از Pure Sperm Gradients (۸۰:۴۰) (Nidacone, Gothenburg, Sweden) برای انجام ICSI آماده شد [۲۴].

تزریق اسپرم به درون سیتوپلاسم تخمک

بعد از تخمک‌گیری، اووسیتها در محیط G-MOPS که حاوی هیالورونیداز است، قرار داده شد. سپس اووسیتها را در G-MOPS تازه شسته و به زیر روغن در داخل یک پتری دیش فالكون ۱۰۰۶ برای میکرواینجکشن منتقل شد. به‌علاوه اسپرم شسته شده به محیط ICSI ۱۰۰ (محیطی غلیظ برای تسهیل کار برای اسپرم که همانند محیط^۱ pvp است) منتقل شد.

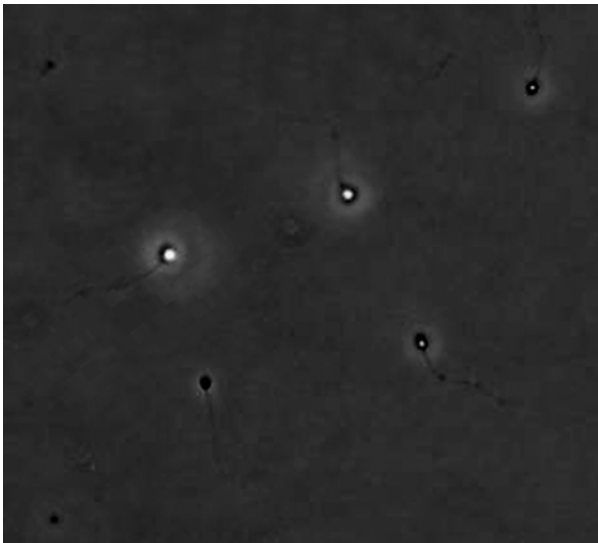
از میکرومانیپلاتور اپندروف نصب شده روی میکروسکوپ اینورت (Nikon) برای تزریق اسپرم استفاده شد. بدین ترتیب اسپرم با بهترین مرفولوژی و تحرک از جمعیت اسپرمی انتخاب شده و پس از بی حرکت شدن، اسپرم به‌داخل یک پیپت تزریق، کشیده شده و سپس به‌داخل اووسیت تزریق شد. اووسیتهای تزریق شده در محیط G1 انکوبه شدند. پس از ۱۶-۱۸ ساعت، میزان لقاح بر اساس وجود یا عدم وجود تشکیل پرونوکلئوسها در هر گروه تعیین شد. تمامی بیماران انتخاب شده برای این مطالعه حداقل دارای چهار اووسیت بالغ بودند که پروسه ICSI را به سلامت گذراندند.

سنجش کمبود پروتامین (رنگ آمیزی کروماتین A3)

اسمیرهای آماده شده از مایع اسپرمی در محلول کارنوی (متانول

طی لقاح بین ۷۰-۶۰ درصد است [۱ و ۲]. به‌طور کلی عامل عدم موفقیت در لقاح را پس از انجام ICSI می‌تواند ناشی از فاکتورهای مختلفی که به ویژگیهای اسپرم، اووسیت و یا هردو، مربوط است، نسبت داد. از جمله این فاکتورها تعداد اووسیت، کیفیت اووسیت، حیات اسپرم، تحرک، مرفولوژی و وضعیت کروماتین اسپرم است [۳، ۴، ۵ و ۶]. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که بیشتر از ۸۰ درصد اووسیتهای لقاح نیافته بعد از ICSI حاوی اسپرماتوزوا است [۱]. در این اووسیتها اسپرم می‌تواند در وضعیتهای گوناگون که شامل سر متراکم دست نخورده، سرمختصر از تراکم خارج شده و یا تراکم زودرس کروموزوم (PCC: Premature chromosome condensation) باشد [۷]. عدم توانایی هسته اسپرم در خروج از تراکم می‌تواند با کیفیت اسپرم، میزان بالای فراگمتاسیون DNA، همچنین ممکن است در ارتباط با کمبود نوسانات کلسیم باشد [۸ و ۹]. به‌علاوه عدم موفقیت لقاح در روش IVF را به کاهش فعالیت آکروزین در آکروزوم سر اسپرم نسبت داده‌اند [۱۰، ۱۱ و ۱۲]. لازم به ذکر است که اسپرماتوزوا با سر گرد (globozoospermic) فاقد غشای آکروزومی و محتویات آکروزین است [۱۳]. بنابراین این‌گونه اسپرمها نه تنها قابلیت نفوذ به اووسیت را ندارند بلکه فاکتورهای فعال کننده تخمک مربوط به غلاف خلف آکروزومی (تکای پری نوکلئار) در آنها ناقص است [۱۴، ۱۵ و ۱۶]. قابل توجه است که تشکیل ساختار درون سلولی و غلاف خلف آکروزومی طی اسپرمیوزن شروع شده و همراه با بازسازی هسته کامل می‌شود [۱۷]. طی بازسازی ساختار هسته، پروتامین به جای هیستون قرار می‌گیرد [۱۸ و ۱۹]. مطالعات قبلی نشان داده است که کمبود پروتامین اسپرم با عدم موفقیت در لقاح ارتباط دارد [۲۰-۲۳]. عدم موفقیت در لقاح می‌تواند به‌طور مستقیم با کمبود پروتامین یا با سایر وقایع اسپرمیوزن که شامل تشکیل آکروزوم و ساختار مرتبط با آن که غلاف خلف آکروزومی است، رابطه داشته باشد. بنابراین هدف از این مطالعه ارزیابی ارتباط بین کمبود پروتامین و فعالیت آکروزین به‌عنوان شاخص سلامت آکروزوم با میزان لقاح در نمونه‌های مایع منی در بیمارانی که کاندید ICSI بودند، است.

1. poly vinyl pyrrolidone



شکل ۱. تصویری از تشکیل هاله در اطراف سر اسپرم با اندازه‌های متفاوت، که بیانگر فعالیت آنزیم آکروزین است. بزرگنمایی: $\times 400$

یافته‌ها

نمونه‌های مایع منی از ۶۸ زوج نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان که کاندید ICSI بودند، به دست آمد. میانگین سن افراد مورد مطالعه $34 \pm 4/5$ و همسران آنها $30 \pm 4/7$ بود. نتایج حاصل از ارزیابی پارامترهای مایع منی، آزمون ژلاتینولیز (درصد هاله - میانگین قطر هاله)، کمبود پروتئین و میزان لقاح در جدول ۱ نشان داده شده است. میزان لقاح در این مطالعه بین ۰-۱۰۰ و میانگین آن $26/05 \pm 69/58$ است. حداقل غلظت اسپرم در این مطالعه ۵ میلیون در هر میلی لیتر است. درصد کمبود پروتئین به وسیله کرومومایسین A3 ارزیابی شد که در این مطالعه طیف اسپرمهای CMA3 مثبت در محدوده ۰-۳ درصد و میانگین آن $18/75 \pm 40/85$ بود. رابطه بین پارامترهای مایع منی، درصد تشکیل هاله، میانگین قطر هاله، درصد اسپرمهای CMA3 مثبت و میزان لقاح در جدول ۲ مشخص شده است. از لحاظ آماری بین درصد اسپرمهای CMA3 مثبت با میزان لقاح (نمودار ۱)، درصد تحرک اسپرم، درصد تشکیل هاله و میانگین قطر هاله رابطه معنی دار معکوسی وجود داشت. همچنین میانگین قطر هاله از لحاظ آماری رابطه معنی داری را با غلظت اسپرم، تحرک، میزان لقاح و درصد تشکیل هاله نشان داد.

و اسید استیک با نسبت ۳:۱) به مدت ۵ دقیقه در دمای 4° سانتی‌گراد تثبیت شد. به منظور انجام رنگ آمیزی CMA3، هراسلاید به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول CMA3 رنگ آمیزی شد ($0/25$ گرم بر میلی لیتر در بافر مک الوین: ۷ میلی لیتر اسید استیک ۰/۱ مولار و $32/9$ میلی لیتر از Na_2HPO_4 و $7H_2O$ و با غلظت $0/2$ مولار $pH=7$ شامل ۱۰ میلی مولار از $MgCl_2$). سپس اسلایدها توسط بافر گلیسرول شستشو و با همین بافر (۱:۱) مونت شدند. با استفاده از میکروسکوپ فلئورسانت (Tokyo, Japan) Olympus (BX51، با فیلتر $470-660$ در همان روز ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. درصد اسپرمهای با رنگ زرد درخشان (CMA3+) و اسپرمهای با رنگ زرد تیره (CMA3-) با استفاده از نرم افزار Olysia محاسبه شد [۲۵].

آزمون ژلاتینولیز

سلامت آکروزوم توسط آزمون ژلاتینولیز بررسی شد، فعالیت آکروزین بعنوان شاخص سلامت آکروزوم ارزیابی شد [۲۶]. بر اساس این آزمون ۲۰ میکرولیتر از ژلاتین ۵ درصد که با آب مقطر رقیق شده است را روی اسلایدها کشیده، سپس در هوا خشک و در دمای 4° سانتی‌گراد به مدت یک شب نگهداری شد بعد از آن اسلایدها با گلو تار آلدهید ۰/۰۵ درصد (Merck) تثبیت شده و دوبار با PBS (Phosphate Buffer Saline) شستشو داده می‌شود. این اسلایدها را می‌توان در دمای 4° سانتی‌گراد به مدت سه هفته نگهداری کرد. ۲۰ میکرولیتر محلول مایع منی شستشو شده را با نسبت ۱:۱۰ در PBS که حاوی $15/7$ میلی مول در لیتر گلوکز است، رقیق کرده و اسمیری از این محلول روی اسلایدهای آماده شده ژلاتین تهیه و در محیط مرطوب در دمای 37° به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. برای هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرمهای دارای هاله و قطر آنها با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست و توسط نرم افزار Olysia بررسی شد (شکل ۱).

جدول ۱. مشخصات پارامترهای مایع منی، آزمون ژلاتینولیز، کمبود پروتامین و میزان لقاح در بیماران کاندید ICSI

پارامترها	تعداد نمونه	حداقل	حداکثر	انحراف معیار ± میانگین
غلظت اسپرم (×۱۰ ^۶ /ml)	۶۸	۵	۱۱۰	۵۴/۷۱±۲۵/۰۴
درصد مرفولوژی غیر طبیعی	۶۸	۳۸	۱۰۰	۶۳/۸۸±۱۳/۲۵
درصد تحرک	۶۸	۵	۷۰	۴۶/۵۷±۱۴/۶۱
درصد تشکیل هاله	۶۸	۳۵	۱۰۰	۷۶/۵۳±۱۵/۴۹
میانگین قطر هاله	۶۸	۵/۰۱	۱۷/۲۰	۱۲/۰۰±۳/۱۱
درصد CMA ₃ ⁺	۵۷	۳	۱۰۰	۴۰/۸۵±۱۸/۷۵
درصد لقاح بعد از ICSI	۶۴	۰	۱۰۰	۶۹/۵۸±۲۶/۰۵

جدول ۲. رابطه بین پارامترهای مختلف با درصد اسپرمهای CMA₃⁺، درصد تشکیل هاله و میانگین قطر هاله

پارامترها	درصد CMA ₃ ⁺	P-Value	درصد تشکیل هاله	P-Value	میانگین قطر هاله	P-Value
غلظت اسپرم	۰/۰۶۷	۰/۶۲۱	۰/۲۰۶	۰/۰۹۱	۰/۳۴۳	۰/۰۰۴**
درصد مرفولوژی غیر طبیعی اسپرم	۰/۲۳۶	۰/۰۷۷	۰/۲۶۰	۰/۰۳۲*	۰/۳۱۴	۰/۰۰۹**
درصد تحرک	۰/۲۷۵	۰/۰۳۹*	۰/۱۹۱	۰/۱۱۸	۰/۲۸۲	۰/۰۲۰
درصد تشکیل هاله	۰/۲۹۵	۰/۰۲۶*	-	-	۰/۸۵۳	۰/۰۰۱**
میانگین قطر هاله	۰/۳۶۲	۰/۰۰۶**	۰/۸۵۳	۰/۰۰۱**	-	-
درصد اسپرمهای CMA ₃ ⁺	-	-	۰/۲۹۵	۰/۰۲۶*	۰/۳۶۲	۰/۰۰۶**
درصد لقاح بعد از ICSI	۰/۵۱۹	۰/۰۰۱**	۰/۱۹۳	۰/۱۲۷	۰/۲۷۹	۰/۰۲۶*

*: اختلاف معنی دار در سطح P<0.05

** : اختلاف معنی دار در سطح P< 0.01

جدول ۳. مقایسه میانگین پارامترهای مختلف در دو گروه CMA₃ مثبت کمتر و بیشتر از ۴۰ درصد و میزان لقاح کمتر و بیشتر از ۲۵ درصد

پارامترها	%CMA ₃ <۴۰	P-Value	لقاح >۲۵%	P-Value	لقاح <۲۵%	P-Value
درصد تشکیل هاله	۷۹/۱۶±۱۴/۶۵	۰/۲۶۸	۶۴/۵۰±۱۷/۷۰	۰/۱۲۴	۱۱/۷۷±۱۵/۵۸	۰/۱۲۴
میانگین قطر هاله	۱۲/۶۳±۲/۶۷	۰/۱۵۹	۷/۶۳±۲/۹۸	۰/۰۰۰*	۱۲/۲۱±۲/۹۵	۰/۰۰۰*
درصد لقاح	۷۶/۹۹±۱۷/۶۸	۰/۰۴۰*	-	-	-	-
درصد CMA ₃ ⁺	-	-	۸۶/۵۰±۱۹/۰۹	۰/۰۰۱**	۳۸/۸۰±۱۷/۰۴	۰/۰۰۱**

* : اختلاف معنی دار در سطح P<0.05

** : اختلاف معنی دار در سطح P< 0.01

نظر نشان داده شده است. نتایج این جدول نشان می‌دهد که درصد لقاح از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین دو گروه CMA₃ کمتر و بیشتر از ۴۰ درصد نشان می‌دهد.

در این مطالعه بیماران بر اساس درصد اسپرمهای CMA₃ مثبت به دو گروه کمتر و بیشتر از ۴۰ درصد تقسیم بندی شدند. در جدول ۳ مقایسه میانگین قطر هاله و لقاح در گروههای مورد

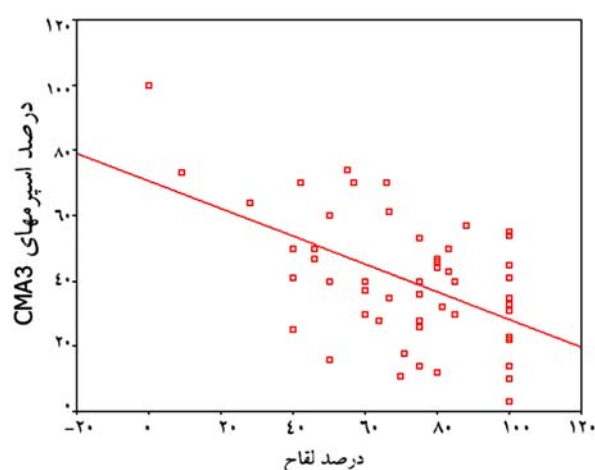
پس از ورود اسپرم، تقسیم میوز تکمیل می‌شود و با جایگزینی پروتامین توسط هیستون، سراسپرم از تراکم خارج می‌شود [۲۷]. به‌طور معمول تقریباً ۳۰ درصد اووسیتها پس از انجام ICSI لقاح نمی‌یابند. اگرچه بیش از ۸۰ درصد این اووسیتها دارای اسپرماتوزوا هستند، علت عدم لقاح در اووسیت را می‌توان ناشی از عدم توانایی اووسیت در انجام یک فرایند بیوشیمیایی دانست که برای فعال شدن اووسیت مورد نیاز است [۱۶]. همچنین علت عدم موفقیت در لقاح را می‌توان مربوط به فاکتورهای اسپرمی که شامل نقص در بسته بندی و تراکم ساختار کروماتین اسپرم و نقایص مربوط به آکروزوم و ساختار اطراف آن باشد، نسبت داد [۲۱، ۲۲، ۲۹ و ۳۰].

در این مطالعه همانند مطالعات قبلی رابطه معنی داری بین مرفولوژی اسپرم بر اساس معیار WHO و میزان لقاح وجود دارد که بیانگر این موضوع است که نمونه اسپرمی با مرفولوژی طبیعی از نظر شکل و سلامت آکروزوم می‌تواند نقش مهمی را در فعال شدن اووسیت طی روند ICSI و در نهایت لقاح داشته باشد [۳۱].

به‌علاوه نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر آن است که از لحاظ آماری رابطه معنی دار معکوسی بین کمبود پروتامین و میزان لقاح پس از انجام ICSI وجود دارد که همانند مطالعات قبلی می‌توان دریافت که کمبود پروتامین با عدم موفقیت در لقاح پس از انجام ICSI رابطه دارد [۱۹-۱۷]. گرچه عدم موفقیت لقاح در این اووسیتها را می‌توان، به‌طور مستقیم با کمبود پروتامین یا بطور غیر مستقیم با سایر وقایعی که طی اسپرمیوژن از قبیل تشکیل آکروزوم و تکای پری نوکلنار رخ می‌دهد، نسبت داد [۳۲-۳۵].

فعالیت آکروزین به‌عنوان شاخص سلامتی آکروزوم، توسط آزمون ژلاتینولیز ارزیابی می‌شود. این آزمون براساس توانایی آنزیمهای موجود در آکروزوم برای هیدرولیز یک پروتئین با وزن مولکولی بالا شبیه ژلاتین به‌کار می‌رود [۳۶]. نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر آن است که نمونه‌های اسپرمی با فعالیت آکروزین بالا، شانس بیشتری را در القای فعال شدن اووسیت و همچنین لقاح دارند که می‌تواند تأیید کننده این مطلب باشد که

به‌علاوه؛ بیماران بر اساس درصد لقاح، بدو گروه کمتر و بیشتر از ۲۵ درصد تقسیم شدند. در جدول ۳ مقایسه میانگین درصد هاله، میانگین قطر هاله و درصد CMA3 مثبت در گروههای مورد نظر نشان داده شده است. نتایج این جدول موید این مطلب است که میانگین قطر هاله و درصد اسپرمهای CMA3 مثبت از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری در دو گروه نشان می‌دهد.



نمودار ۱. رابطه بین درصد اسپرمهای CMA3 مثبت با میزان لقاح پس از انجام ICSI ($r=-0.519$, $p=0.001$)

بحث

دستیابی به لقاح و تکامل جنین نیاز به تعامل متقابل اسپرم و تخمک و به‌دنبال آن وقوع یک‌سری وقایع متوالی است. بخشی از این وقایع مربوط به ادغام اسپرم و تخمک است که منجر به آمیختن کروموزومهای موجود در اسپرم و تخمک شده که لازمه آن فعال شدن اووسیت توسط فاکتورهای موجود در اسپرم است. به‌طور کلی با ورود اسپرم به‌داخل سیتوپلاسم تخمک طی انجام ICSI، فاکتورهای اووسیت که باعث خروج تراکم هسته اسپرم (SNDNFs: perm) nuclear decondensation factors می‌شود، به‌داخل اسپرم راه یافته و بدین ترتیب فعال شدن اووسیت آغاز می‌شود. به‌دنبال ورود SNDNFs، سراسپرم متورم شده و با رها شدن فاکتور فعال کننده اووسیت از ناحیه تکای پری نوکلنار (Sperm Associated Oocyte Activating Factors: SAOAFS) MPF (Maturation Promoting Factor) غیر فعال می‌شود [۲۷ و ۲۸].

لازم به ذکر است در این مطالعه، آزمونهای انجام شده روی باقیمانده نمونه‌های شستشو شده، صورت گرفته و چون برای انجام هر آزمون نیاز به تعداد معین اسپرم بود، بنابراین نمونه‌هایی که غلظت آنها از ۵ میلیون در هر میلی لیتر کمتر بود، از این مطالعه حذف شدند. از آنجایی که از لحاظ آماری غلظت اسپرم با تعدادی از این آزمونها رابطه معنی داری دارد. بنابراین، این احتمال وجود دارد که ارتباطات مشاهده شده، ممکن است در نمونه‌هایی که غلظت پایین دارند، تشدید شود.

نتایج این مطالعه بیانگر آن است که هر دو پارامتر کمبود پروتامین و سلامت آکروزوم با میزان لقاح در ICSI ارتباط دارد؛ اگرچه کمبود پروتامین تاثیر بارزتری را روی توانایی لقاح یک اسپرماتوزوا دارد. با این حال از این مطالعه، نمی‌توان نتیجه گرفت که کدامیک از این فاکتورها ممکن است به‌طور مستقیم باعث عدم موفقیت در لقاح شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری متخصصین زنان و زایمان و پرسنل آزمایشگاه نازایی مرکز باروری و ناباروری اصفهان، همچنین از همکاری مسئولین پژوهشکده رویان اصفهان و دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان که زمینه اجرای این تحقیق را فراهم آوردند تقدیر و تشکر می‌نمایند. کلیه هزینه‌های مصرفی و غیر مصرفی این تحقیق از بودجه تحقیقاتی پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی تامین گردیده است.

References

1. Flaherty SP, Payne D, Matthews CD. Fertilization failures and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1998; 1:155-64.
2. Lopes S, Jurisicova A, Casper RF. Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1998; 13(3):703-8.
3. Menkveld R, El-Garem Y, Schill WB, Henkel R.

نمونه‌های اسپرمی که دارای SAOAFS برای فعال نمودن اووسیت هستند، نسبت به آنهایی که با کمبود این فاکتور مواجهه اند، لقاح بالاتری را نشان دادند. [۱۴، ۱۵، ۳۲ و ۳۷].

کمبود پروتامین در اسپرم که توسط شاخص CMA3 مثبت و سلامت آکروزوم که با اندازه گیری درصد تشکیل هاله و میانگین قطر هاله ارزیابی شد، از لحاظ آماری رابطه معنی دار معکوسی را با یکدیگر نشان دادند. نتایج بیانگر آن است که اسپرمهای دارای کمبود پروتامین معمولاً با کاهش سلامت آکروزوم مواجهه هستند بنابراین انتظار می‌رود که فعالیت آکروزوم در آنها کم و احتمالاً پتانسیل آنها در فعال نمودن اووسیت بعد از ICSI پایین باشد و می‌تواند بیانگر این مطلب باشد که بازسازی کروماتین اسپرم همزمان با تشکیل آکروزوم طی مراحل آخر اسپرمیوژن رخ می‌دهد. در این مطالعه بیماران بر اساس درصد اسپرمهای CMA3 مثبت به دو گروه کمتر و بیشتر از ۴۰ درصد تقسیم شدند و میانگین لقاح در این دو گروه اختلاف معنی داری نشان داد. بدین ترتیب در نمونه‌هایی که درصد اسپرمهای CMA3 مثبت بیش از ۴۰ درصد است، شانس موفقیت در لقاح کاهش می‌یابد.

آنالیز رگرسیون خطی چندگانه نشان می‌دهد که بین درصد CMA3 مثبت و میزان لقاح ($r = -0.519$; $p=0.000$) رابطه قویتری در مقایسه با میانگین قطر هاله ($r = 0.279$; $p=0.026$) با میزان لقاح وجود دارد، و ممکن است بیانگر این موضوع باشد که کمبود پروتامین در یک اسپرم نسبت به سلامت آکروزوم تاثیر بیشتری بر روند لقاح دارد.

Relationship between human sperm morphology and acrosomal function. J Assist Reprod Genet 2003; 20: 432-8.

4. Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. Reprod Biol Endocrinol 2003; 14:108.
5. Emery BR, Wilcox AL, Aoki VW, Peterson CM, Carrell DT. In vitro oocyte maturation and subsequent delayed fertilization is associated with increased embryo aneuploidy. Fertil Steril 2005; 8:

- 1027-9.
6. **Greco E, Ubaldi F, Rienzi L, Iacobelli M, Ferrero S, Minasi G, Romano S, Litwicka C, Tesarik J.** Limiting the number of injected oocytes to three impairs ICSI outcomes in patients with nonobstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2006; in press.
 7. **Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mozdarani H, Mardani M, Azvagi H.** Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. *Andrologia* 2004; 36(3):95-100.
 8. **Rawe VY, Olmedo SB, Nodar FN, Doncel GD, Acosta AA, Vitullo AD.** Cytoskeletal organization defects and abortive activation in human oocytes after IVF and ICSI failure. *Mol Hum Reprod* 2000; 6(6):510-6
 9. **Collas P, Fissore R, Robl JM, Sullivan EJ, Barnes FL.** Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 1993; 34(2):212-23.
 10. **Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich GI, Hartmann PE.** A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge: relationship to fertility and other seminal parameters. *J Androl* 1991; 12:98-103.
 11. **Fenichel P, Donzeau M, Farahifar D, Basteris B, Ayraud N, Hsi BL.** Dynamics of human sperm acrosome reaction: relation with in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1991;55(5):994-9.
 12. **Mahutte NG, Arici A.** Failed fertilization: is it predictable? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2003;15(3):211-8.
 13. **Florke-Gerloff S, Topfer-Petersen E, Muller-Esterl W, Mansouri A, Schatz R, Schirren C, Schill W, Engel W.** Biochemical and genetic investigation of round-headed spermatozoa in infertile men including two brothers and their father. *Andrologia* 1984;16(3):187-202.
 14. **Escalier D.** Failure of differentiation of the nuclear-perinuclear skeletal complex in the round-headed human spermatozoa. *Int J Dev Biol* 1990; 34:287-97.
 15. **Courtot AM.** Presence and localization of the 60 KD calicin in human spermatozoa presenting postacrosomal sheath defects: preliminary results. *Mol Reprod Dev* 1991;28(3):272-9.
 16. **Tesarik J, Testart J.** Treatment of sperm-injected human oocytes with Ca²⁺ ionophore supports the development of Ca²⁺ oscillations. *Biol Reprod* 1994;51(3):385-91.
 17. **Clermont Y, Leblond CP.** Renewal of spermatogonia in the rat. *Am J Anat* 1953;93(3):475-501.
 18. **Balhorn R.** A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 1982;93:298-305.
 19. **Balhorn R.** A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 1983; 93: 298-305.
 20. **Poccia D.** Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *Int Rev Cytol* 1986;105:1-65.
 21. **Iranpour FG, Nasr-Esfahani MH, Valojerdi MR, al-Taraihi TM.** Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility. *J Assist Reprod Gene* 2000; 17:60-66.
 22. **Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghdam A.** Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. *Andrologia* 2003; 35: 238-43.
 23. **Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Mardani M, Bahramian H, Steger K, Oreizi F.** Effect of protamine-2 deficiency on ICSI outcome. *Reprod Biomed Online* 2004;9(6):652-8.
 24. **Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S,**

- Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, Mardani M.** Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online*, 2005;11(2):198-205.
25. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press 1999.
26. **Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M.** Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18: 219-25.
27. **Henkel R, Muller C, Miska W, Schill WB, Kleinstein J, Gips H.** Acrosin activity of human spermatozoa by means of a simple gelatinolytic technique: a method useful for IVF. *J Androl* 1995; 16(3):272-7.
28. **Dozortsev D, De Sutter P, Rybouchkin A, Dhont M.** Timing of sperm and oocyte nuclear progression after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995;10: 3012-7.
29. **Dozortsev D, Qian C, Ermilov A, Rybouchkin A, De Sutter P, Dhont M.** Sperm-associated oocyte-activating factor is released from the spermatozoon within 30 minutes after injection as a result of the sperm-oocyte interaction. *Hum Reprod* 1997;12: 2792-6
30. **Liu DY, Baker HW.** Relationships between human sperm acrosin, acrosomes, morphology and fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1990;5(3):298-303.
31. **Menkveld R, Rhemrev JP, Franken DR, Vermeiden JP, Kruger TF.** Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis: relation with acrosin activity, morphology (strict criteria), and fertilization in vitro. *Fertil Steril* 1996;65(3):637-44.
32. **Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezes Y, Barak Y.** Real-time fine morphology of motile human sperm cell is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 2002; 23:1-8.
33. **Longo FJ, Krohne G, Franke WW.** Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *J Cell Biol* 1987;105(3):1105-20.
34. **Schill WB.** Some disturbances of acrosomal development and function in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1991; 6(7):969-78. Review.
35. **Dale B, Iaccarino M, Fortunato A, Gragnaniello G, Kyojuka K, Tosti E.** A morphological and functional study of fusibility in round-headed spermatozoa in the human. *Fertil Steril* 1994;61(2):336-40.
36. **Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai FA.** Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 1996; 25: 364-8.
37. **Welker B, Bernstein GS, Diedrich K, Nakamura RM, Krebs D.** Acrosomal proteinase activity of human spermatozoa and relation of results to semen quality. *Hum Reprod* 1988; 2:75-80.
38. **Lalonde L, Langlais J, Antaki P, Chapdelaine A, Roberts KD, Bleau G.** Male infertility associated with round-headed acrosomeless spermatozoa. *Fertil Steril* 1988;49(2):316-21.