

Original Article

Relation between Sperm Binding Ability to Hyaluronic Acid with Protamine Deficiency and DNA Fragmentation

Razavi. S., ph.D., Fathi.F. M.Sc, Tavalaei. M., M.Sc., Vahdati. A., ph.D., Nasr-Esfahani. M.H., ph.D.*

**P.O.Box: 19395-4644, Royan institute, Embryology Department, Tehran, Iran*

Abstract

Purpose: The best sperm selection by its binding ability to hyaluronic acid for ICSI and assessment of correlation between sperm binding ability to hyaluronic acid with sperm parameters, protamine deficiency and DNA fragmentation.

Materials and Methods: Semen samples collected from 55 infertile couples referring to ?? Fertility and Infertility center were collected during this study. Semen analysis was carried out according to WHO criteria. By incubation sperm to hyaluronic acid within microinjection dishes, can measure percentage of sperm binding to hyaluronic acid. Sperm morphology, protamine deficiency and DNA fragmentation were assessed by Papanicolaou staining, Chromomycin A3 (CMA3) staining, and SCD test, respectively.

RESULTS: Percentage of sperm binding to hyaluronic acid has significant negative correlation with percentage of abnormal morphology ($p=0.001$) whereas a significant positive correlation was obtained with sperm concentration ($p=0.001$) and motility ($p=0.001$). Also, percentage of sperm binding to hyaluronic acid has significant negative correlation with protamine deficiency ($p=0.028$) and DNA fragmentation ($p=0.035$).

Conclusion: The results of present study suggest that sperm binding to hyaluronic acid show normal morphology and intact chromatin structure. Thus, we could select the best sperm for ICSI that binds to hyaluronic acid.

Keywords: Hyaluronic Acid, Sperm Morphology, Protamine Deficiency, Sperm DNA Fragmentation

بررسی ارتباط بین قابلیت اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک با ساختار کروماتین

شهناز رضوی. ph.D.*، فرهاد فتحی. M.Sc.**، مرضیه تولایی. M.Sc.***، اکبر وحدتی. ph.D.**،

محمد حسین نصر اصفهانی. ph.D.****

*گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

**گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان

***گروه آندرولوژی پژوهشکده رویان اصفهان

****گروه جنین شناسی، گروه آندرولوژی و گروه سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان اصفهان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان

تاریخ وصول: دی ماه ۸۵، تاریخ پذیرش: اسفندماه ۸۵

چکیده

هدف: انتخاب بهترین اسپرم بر اساس قابلیت اتصال آن به اسید هیالورونیک (HA) جهت افزایش شانس موفقیت در ICSI و تعیین ارتباط بین قابلیت اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک با کمبود پروتامین و میزان فراگماتاسیون DNA مواد و روشها: مایع منی از ۵۵ بیمار مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان جمع آوری شد، بخشی از آن برای آنالیز معمول مایع منی (مورفولوژی، غلظت و تحرک اسپرم) بر اساس معیار WHO و باقیمانده آن برای آزمون HA-binding استفاده شد. با قرار دادن اسپرم در مجاورت اسید هیالورونیک درون دیشه‌های میکرواینجکشن، می‌توان درصد اتصال اسپرم به HA را محاسبه کرد. برای بررسی مورفولوژی اسپرم، کمبود پروتامین و فراگماتاسیون DNA از رنگ آمیزی پاپانیکولا، رنگ آمیزی کرومومایسین A3 و آزمون SCD استفاده شد.

یافته‌ها: درصد اتصال اسپرم به HA با درصد اسپرمهای دارای مورفولوژی غیر طبیعی ارتباط معکوس معنی دار و با تحرک و غلظت اسپرم ارتباط مستقیم معنی دار را نشان می‌دهد ($p < 0.001$). همچنین بین درصد اتصال اسپرم به HA با کمبود پروتامین ($p = 0.028$) و میزان فراگماتاسیون DNA ($p = 0.035$) ارتباط معکوس معنی داری وجود دارد.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نمایانگر آن است که اسپرمهای متصل به اسید هیالورونیک، دارای مورفولوژی و ساختار کروماتین طبیعی هستند. بنابراین برای انتخاب بهترین اسپرم برای انجام ICSI می‌توان از اسپرمهایی که به اسید هیالورونیک متصل شده‌اند، استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: اسید هیالورونیک، مورفولوژی اسپرم، کمبود پروتامین، فراگماتاسیون DNA.

مقدمه

روش تزریق اسپرم به درون سیتوپلاسم (ICSI)، اسپرم را قادر می‌سازد که با پشت سر گذاشتن سد های طبیعی مستقیماً به درون تخمک وارد شود [۱]. اگرچه این روش یک فرصت منحصر به فرد را برای درمان ناباروری مردان فراهم کرده است ولی ممکن است دل‌نگرانی‌هایی را نیز به همراه داشته باشد. اول اینکه در فرزندان پسری که با استفاده از روش ICSI به دنیا می‌آیند احتمال میزان آنو پلوئیدی و اختلالات مربوط به حذف کروموزوم Y افزایش می‌یابد. دوم اینکه فرآیند انتخاب طبیعی اسپرم که در طی تکامل رخ داده است به وسیله یک انتخاب تصادفی از طرف یک جنین شناس جایگزین می‌شود. بنابراین ممکن است اسپرمی که توانایی باروری طبیعی تخمک را ندارد، بدین ترتیب فرایند لقاح را آغاز کند [۲-۴]. در حال حاضر جنین شناسان با انتخاب بهترین اسپرم از لحاظ مورفولوژی و تحرک، توانسته‌اند شانس میزان موفقیت در باروری را با تزریق آن به داخل تخمک در زوجه‌های نابارور فراهم سازند [۵] اما مورفولوژی طبیعی اسپرم قادر به پیشگویی وجود یا عدم وجود اختلالات کروموزومی و سلامت DNA در اسپرم نیست. بنابراین انتخاب اسپرم بر اساس مورفولوژی و تحرک طبیعی ممکن است شاخص مناسبی برای انتخاب اسپرم بالغ دارای سلامت DNA و فاقد اختلالات کروموزومی که برای ICSI استفاده می‌شود، نباشد [۶].

وجود پروتامین در ساختار کروماتین به عنوان نشانگر بلوغ هسته اسپرم محسوب می‌شود [۷]. طی فرآیند اسپرماتوزن هیستون‌های موجود در ساختار کروماتین به وسیله پروتئین‌های انتقالی جایگزین می‌شوند، بعداً در جریان مرحله اسپرمیوزن، پروتئین‌های پروتامین (p1, p2) جایگزین این پروتئین‌های انتقالی می‌شوند. واکنش بین پروتامین و DNA اجازه می‌دهد که DNA به صورت مجاور هم قرار گیرد و به واسطه پلهای دی سولفید (بین مولکولی و درون مولکولی) بین اسیدهای آمینه

سیستئین پروتامینها، کروماتین اسپرم به هم فشرده می‌شود. در مجموع ۸۵ درصد از هیستون‌ها به وسیله پروتامینها جایگزین می‌شوند. تصور می‌شود که این تراکم و به هم فشرده‌گی هسته اسپرم برای محافظت ژنوم اسپرم از استرس‌های خارجی از قبیل اکسیداسیون یا درجه حرارت بالا مهم باشد همچنین باعث تسهیل انتقال اسپرم در مجرای تناسلی ماده شود [۸] و [۹].

به‌علاوه، فراگمانتاسیون DNA اسپرم انسان ممکن است بر نتایج تولید مثل تاثیر منفی گذارد. به طور تقریبی ۱۰ درصد از اسپرماتوزوای مردان بارور و ۲۰-۲۵ درصد از اسپرماتوزوای مردان نابارور دارای سطوحی از فراگمانتاسیون DNA است [۱۰]. ساکاس و شن (Shen & Sakkas) عوامل متعددی از جمله: کمبود پروتامین، تغییر در میزان بیان آنزیم توپوایزومراز II، آپوپتوز، رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)، داروها، شیمی درمانی، پرتو درمانی، استعمال دخانیات و واریکوسل را به عنوان علل تخریب کروماتین اسپرم گزارش نموده‌اند [۱۱ و ۱۲].

HSPA2 (Heat Shock Protein A2) یکی از مارکرهای بیوشیمیایی است که در مرحله اسپرماتوزن بیان می‌شود [۱۶-۱۳] با بررسی میزان بیان این پروتئین از طریق RT-PCR می‌توان میزان اسپرم‌های بالغ و نابالغ را در افراد نابارور ارزیابی کرد [۱۷, ۱۸]. در جریان اسپرمیوزن همزمان با حذف زوائد سیتوپلاسمی و سنتز HSPA2، غشای پلاسمایی اسپرم نیز دستخوش یک تغییر وضعیت در ارتباط با بلوغ می‌شود. مطالعات متعددی نشان می‌دهند که تغییر در غشای پلاسمایی اسپرم، یک روند مرتبط با بلوغ اسپرم است و یک ارتباط قوی بین حذف زوائد سیتوپلاسمی و مارکرهای بیوشیمیایی غشای پلاسمایی اسپرم وجود دارد [۱۹]. به علاوه ثابت شده است که اسپرم نابالغ همراه با زائده سیتوپلاسمی قابلیت اتصال به منطقه شفاف (Zona pellucida) را ندارد، بنابراین گفته می‌شود که ایجاد رسپتورهایی برای اتصال به منطقه شفاف قسمتی از فرآیند تغییر در غشای پلاسمایی اسپرم است [۱۸ و ۱۹]. یکی

WHO انجام گرفت [۲۶]. لازم به ذکر است تمامی مواد مصرفی در این مطالعه به جز موارد اشاره شده در متن از شرکت سیگما (U.S.A) تهیه شده است.

آماده سازی اسپرم

مایع منی به دو بخش تقسیم شد. بخشی از آن برای انجام آزمایش قابلیت اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک به روش گرادینت پیور اسپرم آماده شد و بخش دیگر آن، با محیط (fetal calf serum) ۱۰٪ FCS + Ham's شستشو داده شد. سپس روی بخش دوم ارزیابی مورفولوژی اسپرم (رنگ آمیزی پاپانیکولاو) بر اساس Strict criteria [۲۷]، کمبود پروتئامین (رنگ آمیزی کرومومایسین A3) [۷] و فراگمانتاسیون DNA (SCD: Sperm Chromatin Dispersion) انجام گرفت [۲۸].

ارزیابی کمبود پروتئامین (رنگ آمیزی کرومومایسین A3)

۲۰ میکرو لیتر از مایع منی شسته شده با محیط + FCS 10% Ham's به نسبت ۱:۱ با محلول تثبیت کننده کارنوی (متانول و اسید استیک به نسبت ۳ به ۱) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه قرار داده شد. سپس از این مخلوط برای تهیه گسترش روی اسلاید استفاده شد. اسلایدها را در مجاورت هوای اتاق قرار داده تا خشک شوند. به منظور انجام رنگ آمیزی CMA3، هر اسلاید به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول CMA3 رنگ آمیزی شد. (۷ میلی لیتر اسید استیک ۰/۱ مولار را به ۳۲/۹ میلی لیتر از محلول دی سدیم فسفات هیدراته ۰/۲ مولار اضافه نموده و pH آن به ۷ رسانیده شد (بافر مک الوین). سپس کلرید منیزیم ۱۰ میلی مولار به آن اضافه گردید). سپس اسلایدها توسط PBS شستشو و بعد لامل گذاری شدند. سپس با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنت Olympus (BX51, Tokyo, Japan) و فیلتر ۴۷۰-۴۶۰ در همان روز ۱۰۰ اسپرم شمارش شد. درصد اسپرمهای

از پروتئینهایی که طی این تغییرات در سطح غشای پلاسمایی اسپرم ایجاد می شود پروتئین PH-20 بوده که یک رسپتور برای اسید هیالورونیک (HA) محسوب می شود. اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک از طریق این گیرنده روی سر اسپرم ایجاد می شود [۲۰ و ۲۱].

اسید هیالورونیک یا هیالورونان یک پلیمر خطی دی ساکارییدی است که در دستگاه تناسلی مؤنث و کمپلکس کومولوس اووفوروس وجود دارد [۲۲ و ۲۳]. اسپرم زنده توسط پروتئین PH-20 که روی غشای پلاسمایی آن وجود دارد، به اسید هیالورونیک متصل می شود [۲۰ و ۲۱]. بنابراین اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک در محیط آزمایشگاه یک شاخص خوبی خواهد بود که بلوغ، قابلیت حیات و سلامت آکروزومی اسپرم را که با باروری مردان مرتبط است، نشان می دهد [۲۴].

امروزه به طور معمول آماده سازی مایع منی برای روش درمانی ICSI توسط روشهای گرادینان انجام می گیرد. با این وجود مطالعات اخیر، روشهای جدید و متفاوتی را برای انتخاب و جداسازی اسپرم معرفی کرده اند که اساس آنها بر ساختار مولکولی و مشخصات عملکردی اسپرم است. یکی از این روشها، آزمایش توانایی اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک (HBA: Sperm-Hyaluronan Acid binding assay) است [۲۵]. بنابراین در این مطالعه تصمیم گرفته شد در هر یک از افراد نابارور میزان درصد اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک ارزیابی و ارتباط آن با کمبود پروتئامین و فراگمانتاسیون DNA اسپرم بررسی شود.

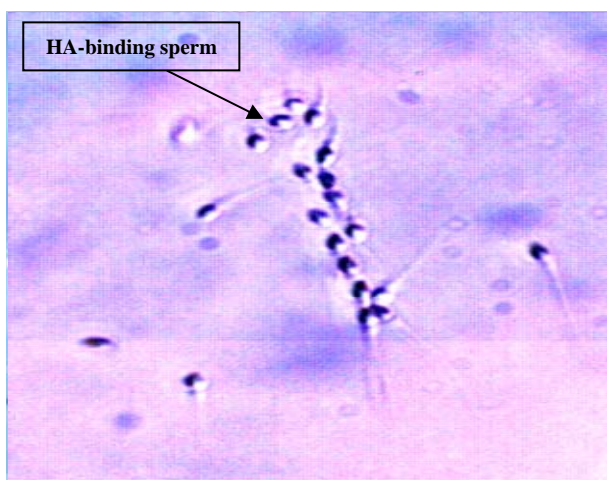
مواد و روشها

این تحقیق یک مطالعه توصیفی و تحلیلی است. در این مطالعه از مایع منی ۵۶ زوج نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان استفاده شد. آنالیز معمول مایع منی که شامل غلظت، تحرک و مورفولوژی است، طبق معیار

آزمایش قابلیت اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک

در هر دیش قطره ای ۵۰ میکرو لیتری از اسید هیالورونیک قرار داده شد، بعد از خشک شدن قطره در زیر هود، قطره توسط محیط کشت G-oocyte و سپس توسط روغن مینرال پوشیده شد. نمونه اسپرمی تهیه شده به روش گرادیان به آن اضافه شد، با گذشت ۱۰ دقیقه اسپرمها به HA متصل می شوند. اسپرمها به طور کلی به سه دسته تقسیم شدند: اسپرمهای متحرک آزاد، اسپرمهای متحرک متصل به HA و اسپرمهای غیر متحرک. برای تعیین درصد اسپرمهای دارای قابلیت اتصال به HA در ۵ میدان دید مختلف ۲۰۰ اسپرم شمارش شد [۲۲، ۲۴]. با استفاده از فرمول زیر درصد اتصال اسپرم به HA محاسبه شد (شکل ۱).

$100 \times (\text{تعداد کل اسپرمها} / \text{تعداد اسپرمهای متحرک متصل به HA}) = \text{درصد اتصال اسپرم به HA}$



شکل ۱. نحوه اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک (در ناحیه پیکان، اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک دیده می شود)

بررسی آماری

آنالیز دادهها با استفاده از نرم افزار SPSS-۱۱/۵ انجام گرفت و برای بررسی ضریب همبستگی از Correlation Coefficient استفاده شد. در صورتی که $p\text{value} < 0.05$ باشد، از لحاظ

با رنگ زرد درخشان (CMA3+) و اسپرمهای با رنگ زرد تیره (CMA3-) با استفاده از نرم افزار Olympus, DP Japan) Olysia (70, محاسبه شد [۷].

ارزیابی فراگمانتاسیون DNA

مقدار ۳۰ میکرو لیتر از نمونه اسپرمی آماده شده به روش گرادیان پیور اسپرم (غلظت ۵ تا ۱۰ میلیون در هر میلی لیتر) با ۷۰ میکرو لیتر از آگاروز با درجه ذوب پایین (Low Agaros) Melting در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مخلوط شد. سپس نمونه مخلوط شده بر روی لامی که از قبل با آگاروز ۰/۶۵ درصد پوشیده شده، قرار گرفت و با گذاشتن یک لامل روی آن، به مدت ۴ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد گذاشته شد. سپس با دقت لامل از سطح لام جدا شده و هر لام به صورت افقی در محلول اسیدکلریدریک ۰/۰۸ نرمال به مدت ۷ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شد و در درجه حرارت اتاق، به مدت ۱۰ دقیقه در محلول تجزیه کننده ۱ (0.4 M Tris base, 0.8 M DTT, 1% SDS, and 50 mM EDTA, pH 7.5) دنبال آن در محلول تجزیه کننده ۲ (0.4 M Tris, 2 M NaCl, 1% SDS, pH 7.5) and ۵ دقیقه قرار گرفت. لام در بافر EDTA (0.09 M Tris-borate and 0.002 M EDTA, pH 7.5) به مدت ۲ دقیقه شستشو شده و به ترتیب در الکل ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد هر کدام به مدت ۲ دقیقه آب گیری شده و بعد از خشک شدن، با محلول رنگ Wright رنگ آمیزی شده و بعد از ۱۰ دقیقه با آب معمولی شستشو داده و توسط میکروسکوپ نوری بررسی شد. با استفاده از این روش می توان میزان فراگمانتاسیون DNA را با توجه به وجودهاله اطراف هسته و اندازه آن بررسی نمود. درصد اسپرمهای با فراگمانتاسیون DNA (هسته اسپرم باهاله کوچک و بدون هاله و سلول اسپرم degrade شده) و بدون فراگمانتاسیون DNA (هسته اسپرم باهاله بزرگ و هاله متوسط) تعیین شد [۲۸].

آماري معنی دار محسوب شد.

یافته‌ها

در جدول ۱ اطلاعات توصیفی مربوط به پارامترهای اسپرمی، درصد اتصال اسپرم به HA، کمبود پروتامین و فراگمانتاسیون DNA بیان شده است. این اطلاعات شامل: تعداد بیماران، حداقل، حداکثر، میانگین و انحراف معیار مربوط به هر یک از

می دهد. درصد اتصال اسپرم به HA با درصد اسپرمهای دارای مورفولوژی غیر طبیعی دارای ارتباط معکوس معنی دار ($r = -0.524$ و $p = 0.001$) و با درصد تحرک ($r = 0.499$ و $p = 0.002$) دارای ارتباط مستقیم معنی دار است. همچنین درصد اتصال اسپرم به HA با میزان کمبود پروتامین ($r = -0.297$ و $p = 0.028$) و فراگمانتاسیون DNA ($r = -0.290$ و $p = 0.035$) ارتباط معکوس

جدول ۱. اطلاعات توصیفی مربوط به پارامترهای اسپرمی، درصد اتصال اسپرم به HA، کمبود پروتامین و فراگمانتاسیون DNA

متغیر	تعداد نمونه	حداقل	حداکثر	میانگین	انحراف معیار
درصد اسپرمهای با مورفولوژی غیر طبیعی	۵۶	۶۰	۱۰۰	۸۶/۳۴	۸/۷۵
غلظت (میلیون در میلی لیتر)	۵۶	۱/۵	۹۰	۴۰/۵۶	۲۱/۹۱
درصد تحرک اسپرم	۵۶	۵	۶۰	۳۵/۴۱	۱۳/۷۳
درصد اسپرمهای متصل به HA	۵۶	۱	۹۵	۴۹/۸۹	۳۱/۵۸
درصد اسپرمهای دارای کمبود پروتامین	۵۵	۲۰	۸۸	۵۲/۱۰	۱۴/۰۴
درصد اسپرمهای دارای فراگمانتاسیون DNA	۵۳	۵	۸۳	۳۸/۵۲	۱۵/۹۲

متغیرها است.

معنی داری را از خود نشان می دهد.

میانگین درصد اسپرمهای دارای مورفولوژی غیر طبیعی (86.34 ± 8.75)، میانگین غلظت اسپرم بر حسب میلیون در میلی لیتر (40.56 ± 21.91)، میانگین درصد تحرک اسپرم (35.41 ± 13.73) و میانگین درصد اتصال اسپرم به HA (49.89 ± 31.58) در ۵۶ بیمار محاسبه شد. با توجه به از دست رفتن نمونه در برخی از بیماران میانگین درصد کمبود پروتامین (52.10 ± 14.04) در ۵۵ بیمار و میانگین درصد فراگمانتاسیون DNA (38.52 ± 15.92) در ۵۳ بیمار بررسی شد.

ارتباط پارامترهای اسپرمی و کمبود پروتامین با فراگمانتاسیون DNA

همچنین در این مطالعه ارتباط بین پارامترهای اسپرمی و کمبود پروتامین با فراگمانتاسیون DNA بررسی شده است. جدول ۲ نشان می دهد که درصد اسپرمهای دارای مورفولوژی غیر طبیعی با میزان فراگمانتاسیون DNA دارای ارتباط مستقیم معنی دار ($r = 0.362$ و $p = 0.008$) است در حالی که درصد تحرک اسپرم با میزان فراگمانتاسیون DNA ارتباط معکوس معنی داری ($r = -0.276$ و $p = 0.045$) دارد. از طرف دیگر دادهها نشان می دهد کمبود پروتامین با فراگمانتاسیون DNA به طور مستقیم ($r = 0.280$ و $p = 0.045$) ارتباط معنی داری دارد.

ارتباط درصد اتصال اسپرم به HA با پارامترهای اسپرمی، کمبود پروتامین و فراگمانتاسیون DNA

جدول ۲ رابطه درصد اتصال اسپرم به HA با پارامترهای اسپرمی، کمبود پروتامین و فراگمانتاسیون DNA را نشان

جدول ۲. رابطه بین درصد اتصال اسپرم به HA با پارامترهای اسپرمی، کمبود پروتامین و فراگمانتاسیون DNA

درصد فراگمانتاسیون DNA		درصد اسپرمهای متصل به HA		متغیر
r	P-Value	r	P-Value	
۰/۳۶۲	۰/۰۰۸**	-۰/۵۲۴	۰/۰۰۱**	درصد اسپرمهای با مورفولوژی غیر طبیعی
۰/۳۶۹	۰/۰۰۷**	-۰/۳۶۵	۰/۰۰۶**	درصد سر اسپرم با مورفولوژی غیر طبیعی
-۰/۲۷۶	۰/۰۴۵*	۰/۴۰۲	۰/۰۰*	درصد تحرک اسپرم
-۰/۱۲۱	۰/۳۸۹	۰/۴۹۹	۰/۰۰۲**	غلظت (میلیون در میلی لیتر)
۰/۲۸۰	۰/۰۴۵*	-۰/۲۹۷	۰/۰۲۸*	درصد اسپرمهای دارای کمبود پروتامین
-----	-----	-۰/۲۹۰	۰/۰۳۵*	درصد اسپرمهای دارای فراگمانتاسیون DNA

* : ارتباط در سطح $p < 0.05$ معنی دار است** : ارتباط در سطح $p < 0.01$ معنی دار است

بحث

امروزه در مراکز باروری و ناباروری پس از آنالیز معمول مایع منی، با توجه به این که کیفیت سیمن در افراد مختلف هتروژن بوده و در انزالهای یک فرد نیز این هتروژنیته وجود دارد، مایع منی را برای جداسازی اسپرمهای سالم (با تحرک بیشتر و مورفولوژی طبیعی) شستشو داده و آماده سازی می کنند [۲۹]. روشهای مختلفی برای این منظور وجود دارد که می توان به Density gradient centrifugation، Swim-up و glass wool filtration اشاره نمود [۲۹]. مطالعات اخیر، علاوه بر روشهای مختلف آماده سازی اسپرم، روشهای دیگری را پیشنهاد می کنند که اساس آنها بر ساختار مولکولی و عملکردی اسپرم است، از جمله: روش جداسازی الکتروفوریتیک اسپرم [۳۰]، روش Zeta [۳۱] و قابلیت اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک [۲۴]. در این مطالعه روش قابلیت اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک برای تعیین کیفیت پارامترهای اسپرمی، کمبود پروتامین و تخریب DNA اسپرم بررسی شده است.

در جریان باروری طبیعی اسپرمهای سالم که روند بلوغ را به طور کامل طی کرده اند به وسیله مکانیسم انتخاب طبیعی جدا

می شوند تا در فرآیند لقاح شرکت کنند. در این مطالعه از اسید هیالورونیک به عنوان ماده ای طبیعی برای جداسازی اسپرمهای بالغ استفاده شده است. در هنگام تزریق اسپرم به درون سیتوپلاسم تخمک این احتمال وجود دارد که اسید هیالورونیک همراه با اسپرم به درون تخمک وارد شود اما از آنجایی که اسید هیالورونیک به طور طبیعی در مجرای تناسلی ماده و توده تخمکی وجود دارد چنین حالتی مشکلی در باروری با اسپرم انتخاب شده از طریق اتصال به اسید هیالورونیک به وجود نخواهد آورد و در واقع این روش منافاتی با فرآیند باروری طبیعی نخواهد داشت [۲۴ و ۲۵].

در این مطالعه مشاهده شد که درصد اسپرمهای متصل به اسید هیالورونیک دارای ارتباط معنی داری با مورفولوژی ($p=0.001$) و تحرک اسپرم ($p=0.001$) است. این نتایج نشان می دهد که در یک نمونه سیمن با افزایش درصد اسپرمهای دارای مورفولوژی و تحرک طبیعی، درصد اسپرمهای متصل به اسید هیالورونیک افزایش پیدا می کند و احتمالاً همان طوری که مطالعات قبلی توسط هازار (Huszar) در سال ۲۰۰۴ نشان داده است، اسپرمهای دارای مورفولوژی طبیعی، زنده و دارای تحرک قادرند به اسید هیالورونیک متصل شوند.

ارتباط معکوس است ($p=0.035$). از طرف دیگر هر چه قدر میزان کمبود پروتامین افزایش یابد، میزان فراگمانتاسیون DNA نیز بالا می‌رود ($p=0.045$). مطالعات نشان می‌دهد که یکی از علل فراگمانتاسیون DNA، نقص در بسته بندی کروماتین است و کاهش پروتامین در این مرحله از اسپرمیوزن می‌تواند باعث عدم تراکم صحیح کروماتین شده و می‌تواند منجر به آسیب DNA در مسیرهای دستگاه تناسلی شود [۳۶]. طی اسپرماتوژنز تغییراتی در گلیکوپروتئینهای سطحی غشای پلاسمایی اسپرم رخ می‌دهد که ایجاد رستورهایی برای اتصال به منطقه شفاف و اسیدهیالورونیک را تسهیل می‌کند که این تغییرات با از دست دادن سیتوپلاسم اضافی و جایگزینی هیستون توسط پروتامین در هسته اسپرم همزمان است. بنابراین در اسپرمهایی که فرآیند اسپرماتوژنز را به طور طبیعی پشت سر گذاشته اند تغییرات در ساختار غشای پلاسمایی با بلوغ هسته اسپرم همراه است. از این رو در اسپرمهای متصل به اسید هیالورونیک، هم درصد اسپرمهای دارای کمبود پروتامین و هم درصد اسپرمهای دارای فراگمانتاسیون DNA کاهش می‌یابد که این یافته با مطالعات قبلی که توسط آقایهازار (Huszer) در سال ۱۹۸۸ و کوانسی (Kovanci) در سال ۲۰۰۱ انجام شده، مطابقت دارد [۳۲ و ۳۵].

نتایج این مطالعه همچنین نشان می‌دهد که پارامترهای اسپرمی با فراگمانتاسیون DNA ارتباط معنی داری دارد. به طوری که با افزایش میزان فراگمانتاسیون DNA، درصد اسپرمهای دارای تحرک و مورفولوژی طبیعی کاهش می‌یابد. این مطلب موید این نکته است که عوامل موثر در فراگمانتاسیون DNA (تغییر در فرآیند بلوغ، آپوپتوز و تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن) می‌توانند بر ساختار و عملکرد اسپرم تاثیر گذارند [۳۷].

در روشهای کمک باروری به ویژه در ICSI کیفیت پارامترهای اسپرمی از اهمیت بالایی برخوردار است [۵]. بنابراین طی این مطالعه مشخص شد، در نمونههایی که درصد اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک افزایش یافته است با سطح پایین

بنابراین در روش جدید انتخاب اسپرم بر مبنای قابلیت اتصال آن به اسید هیالورونیک می‌توان اسپرمهایی را که از نظر شکل و تحرک سالم و طبیعی هستند، انتخاب نمود. از طرف دیگر بلوغ در ساختار غشای پلاسمایی اسپرم که منجر به تشکیل رستورهایی برای اتصال به منطقه شفاف تخمک و اسید هیالورونیک می‌شود با بلوغ در سایر خصوصیات اسپرم از جمله حذف سیتوپلاسم اضافی همراه است [۲۲].

در اسپرمهایی که بلوغ ناقص دارند، زواید سیتوپلاسمی افزایش یافته که این خود عاملی برای کاهش باروری است. به علاوه اسپرمهای نابالغ در فرآیند تغییر وضعیت ساختار غشا ناتوان هستند و نمی‌توانند به اسید هیالورونیک متصل شوند [۳۲]. در مطالعات قبلی مشاهده شد اسید هیالورونیک به طور معنی داری تحرک اسپرم را بهبود می‌بخشد که این امر احتمالاً در نتیجه اثر اسید هیالورونیک روی متابولیسم اسپرم است. از طرف دیگر با افزایش غلظت اسپرم در نمونهها، درصد اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک نیز افزایش می‌یابد [۳۵-۳۳].

یکی دیگر از نتایج این مطالعه که در جدول ۲ نشان داده شده، این است که درصد اتصال اسپرم به HA با میزان کمبود پروتامین ارتباط معکوس ($p=0.028$) دارد. از آنجایی که ایجاد رستور برای اسید هیالورونیک در مرحله اسپرمیوزن رخ می‌دهد و هر گونه نقصی در روند اسپرمیوزن ممکن است باعث عدم تکامل بلوغ غشای پلاسمایی اسپرم شود و همچنین بسته بندی و تراکم کروماتین اسپرم نیز در این مرحله اتفاق می‌افتد و عدم تراکم صحیح کروماتین اسپرم، ممکن است با تکامل پروتئینهای سطحی غشای پلاسمایی اسپرم همزمان باشد، بنابراین نقص کمبود پروتامین در اسپرمهایی که به اسید هیالورونیک متصل می‌شوند، کمتر خواهد بود [۱۹ و ۲۴].

به علاوه در جدول ۲ نشان داده شده است که درصد اتصال اسپرم به HA با فراگمانتاسیون DNA (به روش SCD) دارای

سازی می‌کند که دارای سطح پایین تری از کمبود پروتامین و فراگمانتاسیون DNA است. بنابراین از لحاظ ساختار کروماتین اسپرمهای سالم تری بوده و می‌توان در آینده از این گونه اسپرمها برای تزریق ICSI استفاده کرد و بدین وسیله شانس موفقیت در لقاح و فرزند دار شدن را برای زوجهای نابارور افزایش داد.

تری از کمبود پروتامین و فراگمانتاسیون DNA همراه است. از سوی دیگر مطالعات نشان می‌دهند که باروری، تکوین جنین و به دنبال آن میزان بارداری به سلامت DNA اسپرم بستگی دارند [۳۸-۴۰].

بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان دریافت روش قابلیت اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک، اسپرمهای بالغی را جدا

References

1. **Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC.** Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-8.
2. **Simpson JL, Lamb DJ.** Genetic effects of intracytoplasmic sperm injection. *Semin Reprod Med* 2001; 19: 239-49.
3. **Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I.** Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod* 2002; 17: 2600-14.
4. **Van Steirteghem A, Bonduelle M, Devroey P, Liebaers I.** Follow-up of children born after ICSI. *Hum Reprod* 2002; 8: 111-6.
5. **Bartoov B, Berovitz A, Eltes F.** Selection of sperm with normal nuclei to improve pregnancy rates with ICSI [letter]. *N Engl J Med* 2001; 345: 1067-8.
6. **Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Bray-Ward P.** Sperm selection based on shape properties alone does not preclude the presence of numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod* 2004; 19: 2052-9.
7. **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.
8. **Balhorn R.** A model for the structure of chromatin in human sperm. *J Cell Biol* 1982; 93: 298-305.
9. **Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R.** Thioldisulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl* 1992; 13: 342-8.
10. **Zini A, Bielecki R, Phang D.** Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001; 75: 674-7.
11. **Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U.** Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999; 4: 31-7.
12. **Shen H, Ong C.** Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 529-36.
13. **Huszar G, Vigue L.** Incomplete development of human spermatozoa is associated with increased creatine phosphokinase concentrations and abnormal head morphology. *Mol Reprod Dev* 1993; 34: 292-8.
14. **Dokras A, Giraldo JL, Habana A, Erel T, Kovanci E, Huszar G.** Sperm cellular maturity and the treatment choice of IVF or intracytoplasmic sperm injection: the contributions of sperm creatine kinase M-isoform ratio

- measurements. In: Program of ASRM Annual Meeting. 1999; Toronto, Ontario, Canada. Abstract 199.
15. **Muhlebach SM, Gross M, Wirz T, Wallimann T, Perriard JC, Wyss M.** Sequence homology and structure predictions of the creatine kinase isoenzymes. *Mol Cell Biochem* 1994; 133-134: 245-62.
 16. **Huszar G, Vigue L, Morshedi M.** Sperm creatine phosphokinase Misoform ratios and fertilizing potential of men: a blinded study of 84 couples treated with in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1992; 57: 882-8.
 17. **Gergely A, Kovanci E, Senturk L, Cosmi E, Vigue L, Huszar G.** Morphometric assessment of mature and diminished-maturity human spermatozoa: sperm regions that reflect differences in maturity. *Hum Reprod* 1999; 14: 2007-14.
 18. **Huszar G, Vigue L, Oehninger S.** Creatine kinase (CK) immunocytochemistry of human hemizona-sperm complexes: selective binding of sperm with mature CK-staining pattern. *Fertil Steril* 1994; 61: 136-42.
 19. **Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller D, Shur B.** Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane b-1,4,-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod* 1997; 56: 1020-4.
 20. **Cherr GN, Yudin AI, Li MW, Vines CA, Overstreet JW.** Hyaluronic acid and the cumulus extracellular matrix induce increases in intracellular calcium in macaque sperm via the plasma membrane protein PH-20. *Zygote* 1999; 7: 211-22.
 21. **Vines CA, Li MW, Deng X, Yudin AI, Cherr GN, Overstreet JW.** Identification of a hyaluronic acid (HA) binding domain in the PH-20 protein that may function in cell signaling. *Mol Reprod Dev* 2001; 60: 542-52.
 22. **Huszar G, Celik-Ozenci C, Cayli S, Kovacs T, Vigue L, Kovanci E.** Semen characteristics after overnight shipping: preservation of sperm concentrations, HspA2 ratios, CK activity, cytoplasmic retention, chromatin maturity, DNA integrity, and sperm shape. *J Androl* 2004; 25(4): 593-604.
 23. **Cayli S, Jakab A, Ovari L, Delpiano E, Celik-Ozenci C, Sakkas D, Ward D, Huszar G.** Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reprod Biomed Online* 2003; 7(4): 462-8.
 24. **Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L.** Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 2003; 79: 1616-24.
 25. **Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, Ravelli A, Huszar G.** Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril* 2005; 84(6): 1665-73.
 26. World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 1999.
 27. **Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K.** Sperm morphologic features as a prognostic factor in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986; 46: 1118-1123.
 28. **Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT.** The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003; 24: 59-66.