جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله مروری

بررسی روش‌های معمول و نوین جداسازی اسپرم جهت درمان افراد نابارور کاندید ICSI

لیلا آزادی[۱]؛ مرضیه تولایی[۱]*؛ محمدحسین نصر اصفهانی[۱و۲]

چکیده

زمینه: موفقیت در طی تکنیک‌های کمک‌باروری (ART: Assisted Reproductive Technique)، به فاکتورهای دیگر مانند روش‌های آماده‌سازی اسپرم، کیفیت جنین و عوامل دخیل در لانه‌گزینی وابسته است. در طی تکنیک ICSI (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection) (تزریق اسپرم به داخل سیتوپلاسم تخمک) انتخاب اسپرم براساس دو پارامتر تحرک و مورفولوژی می‌باشد، اما مطالعات نشان داده‌اند که این دو پارامتر نمی‌توانند گویای سلامت ژنوم اسپرم انتخاب‌شده باشند. بنابراین پژوهشگران و متخصصان بر روی روش‌های نوین جداسازی اسپرم براساس ساختارهای سلولی و مولکولی، تمرکز کرده‌اند. لذا هدف این مقاله مروری، آشنایی با روش‌های معمول و نوین جداسازی اسپرم، معرفی مزایا و معایب هر روش و بررسی این روش‌ها از نظر کلینیکی است.

روش‌ها: مقالات مرتبط با روش‌های معمول و روتین جداسازی اسپرم از لحاظ تست‌های عملکردی و نتایج کلینیکی در پایگاه‌های اطلاعاتی Pubmed Entrez و پایگاه‌های مرتبط با مقالات ISI جستجو شده است.

یافته‌ها: روش‌های نوین جداسازی اسپرم که براساس انتخاب یک اسپرم باشد (مانند IMSI و توانایی اتصال به زونا پلوسیدا)، وقت‌گیر و هزینه‌بر است. به‌علاوه، بررسی اسپرم انتخاب‌شده از لحاظ آسیب DNA مشکل است. اما روش‌هایی که جمعیتی از اسپرم‌ها را انتخاب می‌کنند (مانند روش زتا) به زمان کم‌تری نیاز داشته و بررسی سلامت کروماتین آن راحت‌تر است.

نتیجه‌گیری: در کاربردهای کلینیکی، استفاده همزمان از روش‌های معمول و نوین احتمالاً باعث بهبود نتایج ICSI می‌شود، اما به‌طورکلی انتخاب یک روش انتخاب اسپرم مناسب، نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

کلیدواژه‌ها: روش‌های جداسازی اسپرم، ناباروری، سلامت DNA اسپرم، مورفولوژی اسپرم، ICSI

«دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۲۸ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۲۰»

۱. پژوهشکده زیست‌فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه زیست فناوری تولید مثل اصفهان

۲. مرکز باروری و ناباروری اصفهان

***عهده‌دار مکاتبات:** اصفهان، خوراسگان، خیابان سلمان، خیابان رویان، پژوهشکده زیست فناوری، تلفن:۰۳۱۱۹۵۱۵۶۸۲

Email: tavalaee.royan@gmail.com

مقدمه

امروزه در کشورهای توسعه‌یافته کشورهای پیشرفته، ۷ درصد از کل تولدها حاصل استفاده از روش‌های کمک‌باروری است (۱). در طی تکنیک کمک‌باروری IVF (In Vitro Fertilization)، اسپرم و تخمک در محیط آزمایشگاه به‌منظور انجام لقاح در مجاورت هم قرار می‌گیرند، اما در تکنیک ICSI، بهترین اسپرم از لحاظ مورفولوژی و تحرک انتخاب شده و به داخل تخمک تزریق می‌شود. در این روش در مقایسه با IVF، میزان لقاح و تقسیمات اولیه جنینی بالاتر است (۲)، اما کیفیت اسپرم انتخاب‌شده، در موفقیت لقاح اهمیت به‌سزایی دارد. در طی روند لقاح طبیعی، وجود سدهایی مانند توده اطراف ناحیه شفاف و غشای تخمک باعث می‌شود که تنها اسپرم بالغ با ماده ژنتیکی سالم بتواند با تخمک لقاح یابد، اما در طی ICSI، اسپرم‌ها بیشتر بر اساس تحرک و شکل آن توسط جنین‌شناس در زیر میکروسکوپ انتخاب

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

می‌شوند (۳). هرچند که مطالعات نشان داده است که اسپرم‌های دارای شکل طبیعی، میزان کم‌تری از آسیب DNA را دارا هستند، ولی داشتن شکل طبیعی نمی‌تواند پیشگویی‌کننده سلامت کروماتین و پتانسیل لقاح اسپرم باشد. بنابراین این احتمال وجود دارد که اسپرم‌های دارای شکل طبیعی که دارای آسیب DNA می‌باشند با تخمک لقاح یابند (۴)، نتیجه این مسأله افزایش میزان سقط و احتمال ایجاد مشکلاتی برای فرزندان است (۵). یکی از پارامترهای اسپرمی که باید از سلامت آن اطمینان حاصل شود، سلامت کروماتین اسپرم است (۶). در نتیجه توسعه و تکوین تکنیک‌های جداسازی اسپرم می‌تواند به انتخاب بهترین اسپرم‌ها از نظر شکل ظاهری، تحرک و عملکرد کمک نموده و در موفقیت روش‌های کمک‌باروری مؤثر باشد.

مواد و روش‌ها

روش‌های جداسازی اسپرم، تحت‌عنوان روش‌های معمول و روش‌های نوین جداسازی اسپرم معرفی می‌گردند. در طی روش‌های معمول جداسازی، از معیارهای ظاهری اسپرم استفاده می‌شود و شامل جداسازی اسپرم بر اساس شیب غلظت(DCG: Density Gradient Centrifugation)، مهاجرت اسپرم (Swim-up) و فیلتراسیون پشم شیشه (GWF: Glass Wool Filtration) است.

روش‌های نوین جداسازی اسپرم بر اساس ساختار مولکولی و عملکردی اسپرم است. روش‌های انتخاب اسپرم بر اساس توانایی آن در پیوند با اسید هیالورونیک، توانایی عبور از کومولوس اطراف تخمک، توانایی اتصال به ناحیه شفاف، مورفولوژی اندامک‌های اسپرم، بار الکتریکی سطح غشا، نشانگرهای سطح سلولی و توانایی پاسخ‌دهی اسپرم به شرایط هایپواسموتیک از جمله این روش‌ها هستند. کاربرد این روش‌ها بیشتر در تکنیک ICSI بوده و در بسیاری از موارد در کاربردهای کلینیکی به‌صورت ترکیبی با روش‌های معمول مورد استفاده قرار می‌گیرد. لذا در طی این مطالعه سعی بر آن است که روش‌های معمول و روش‌های نوین جداسازی اسپرم، مزایا و معایب هر کدام از این روش‌ها و نتایج کلینیکی آن‌ها با استفاده از مقالات سایت‌های معتبر علمی در پایگاه‌های اطلاعاتی Pubmed Entrez و پایگاه‌های مرتبط با مقالات ISI جستجو شده است. کلیدواژه‌های به‌کار برده‌شده جهت این مطالعه، روش‌های جداسازی اسپرم، ناباروری، DNA اسپرم، مورفولوژی اسپرم، و ICSI بوده است.

یافته‌ها

روش‌های معمول جداسازی اسپرم

روش مهاجرت اسپرم(Swim-up):

اساس جداسازی در این روش، حرکت پیش‌رونده اسپرم‌ها می‌باشد. در این روش ابتدا مایع منی به آرامی با میزان کمی محیط کشت مخلوط شده و سانتریفیوژ می‌گردد، سپس مایع فوقانی دور ریخته شده و بر روی رسوب به دست آمده، حدود یک سی‌سی محیط کشت به آرامی به لوله اضافه می‌شود تا دو لایه با هم مخلوط نگردد. با گذشت زمان، اسپرم‌های متحرک به سمت بالا و به داخل محیط تازه اضافه شده، حرکت نموده و به‌طور متوسط بعد از ۴۵ دقیقه محلول رویی به آرامی با پیپت برداشته می‌شود (۹-۷).

در مرحله اسپرمیوژنز، پروتامین به جای هیستون قرار می‌گیرد که نشان‌دهنده بلوغ اسپرم است و مطالعات متعددی بیانگر ارتباط بین کمبود پروتامین و آسیب DNA هستند (۱۰). نتایج یک مطالعه نشان داد که کاربرد روش Swim-up باعث کاهش درصد اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین نمی‌شود (۷)، درحالی‌که در مطالعات دیگر کاربرد این روش باعث کاهش اسپرم‌های دارای آسیب DNA شد (۱۱ و ۱۲). افزایش درصد آسیب DNA با میزان واکوئل‌های درون‌هسته اسپرم، رابطه مستقیم دارد (۱۳) و در یک مطالعه اسپرم‌های جداسازی‌شده به روش Swim-up و DGC را با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمایی بالا بررسی کردند و نشان دادند که استفاده از

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

هر دو روش باعث جداسازی اسپرم‌ها با واکوئل‌های هسته‌ای و آسیب DNA کم‌تر می‌شود (۱۴) (شکل ۱A).

روش سانتریفیوژ در شیب غلظت(DGC):

معیار جداسازی اسپرم‌ها در این روش، بر اساس جرم حجمی آن‌ها در طی سانتریفیوژ می‌باشد. در این روش ابتدا دو لایه مجزا از هم با شیب غلظت متفاوت (گرادیانت) در لوله‌های مخصوص تهیه و نمونه مایع منی در بالای این لایه‌ها قرار داده شده و سانتریفیوژ می‌گردد (۸). مواد مورد استفاده جهت ایجاد شیب غلظت با عناوین مختلف تجاری از جمله پرکل (Percoll)، پیور اسپرم (Pure Sperm) و Sperm Grad، Sil-Select شناخته می‌شوند که امروزه پیور اسپرم به‌طور معمول در روش‌های کمک باروری و آزمایشگاه‌های آندرولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۵ و ۱۶).

در این روش بر اساس چگالی، باکتری‌ها، گلبول‌های سفید، اسپرم‌های مرده و زنده هر کدام به‌ترتیب در لایه‌ها، از بالا به پایین قرار می‌گیرند و اسپرم‌های زنده با بیشترین چگالی که احتمالاً دارای حرکت می‌باشد، به انتهای لوله رسیده و ته‌نشین می‌گردند (۱۷).

ساکاس (Sakkas) در سال ۲۰۰۰ نشان داد که استفاده از تکنیک Swim-up باعث کاهش درصد اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین نمی‌شود، درحالی‌که به کار بردن روش جداسازی DGC، باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در درصد اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین، آسیب DNA و اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی می‌گردد (۷). نتیجه مطالعه دیگری نشان داد که پس از کاربرد روش DGC و Swim-up در کیفیت جنین و میزان لقاح و حاملگی در روش IVF تفاوت معناداری وجود نداشته اما میزان حاملگی در گروهی که روش Swim-up به کار رفته بیشتر است. اما مطالعه دیگری نشان داد که میزان حاملگی حاصل از کاربرد روشDGC نسبت به روش Swim-up در روند IVF بیشتر است (۱۸ و ۱۹). علت تفاوت در نتایج مختلف می‌تواند به‌دلیل نوع نمونه اولیه، نوع روش جداسازی و مهارت شخص انجام‌دهنده باشد (شکل ۱B).

روش فیلتراسیون پشم شیشه(GWF):

اساس جداسازی این روش، تحرک اسپرم و اتصال آن به فیلتر پشم شیشه است. در این روش به‌وسیله اتصال اسپرم به فیبرهای پشم شیشه، اسپرم‌های متحرک از اسپرم‌های غیرمتحرک به کمک نیروهای گرانشی حاصل از سانتریفیوژ و حرکت خود اسپرم جدا می‌شوند. ماهیت شیمیایی شیشه (شیشه بورات، شیشه سیلیکاتی یا کوارتز)، ساختار سطحی، بار الکتریکی و ضخامت الیاف پشم شیشه بر نتایج کیفی اثرگذار است. فیلتراسیون پشم شیشه، اسپرم انسان را با توجه به تحرک و اندازه سر اسپرم جدا می‌کند (۲۲-۲۰).

در یک مطالعه قبل از انجام فریز اسپرم، از دو روش جداسازی GWF و Swim-up استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که اسپرم‌های جداسازی‌شده روش GWF در مقایسه با روش Swim-up دارای قدرت حیات بیشتری هستند (۲۳). در یک مطالعه میزان کارایی سه روش Swim-up، DGC و GWF از لحاظ میزان اسپرم‌های دارای مورفولوژی طبیعی، تراکم کروماتین و میزان لقاح IVF بررسی شد. در هر سه روش میزان تراکم کروماتین و اسپرم‌های دارای مورفولوژی طبیعی در نمونه جداسازی‌شده بهتر از نمونه مایع منی اولیه بود. میزان تراکم کروماتین در روش GWF نسبت به دو روش دیگر و تعداد اسپرم‌های دارای مورفولوژی طبیعی در گروه DGC نسبت به دو روش دیگر به‌طور معناداری بیشتر بود، اما میزان لقاح، لانه‌گزینی و حاملگی در هر سه روش یکسان بود (۲۴). در مطالعه دیگری، از دو روش DGC و GWF برای جداسازی اسپرم‌ها استفاده شد و تخمک‌های آماده‌شده برای ICSI به‌صورت تصادفی با این اسپرم‌ها تزریق شدند، اما در میزان لقاح و کیفیت جنین تفاوت معناداری وجود نداشت (۲۰) (شکل ۱C).

همان‌گونه که گفته شد در حال حاضر روش‌های جدیدی جهت جداسازی اسپرم توسط محققین معرفی گردیده، که هدف تمامی آن‌ها جداسازی اسپرم‌های بالغ و طبیعی از لحاظ شکل ظاهری و سلامت کروماتین می‌باشد

و انتظار می‌رود که در این روش‌ها، به‌کارگیری ویژگی‌های ملکولی و عملکردی اسپرم، باعث افزایش بازده جداسازی شود. اما در بعضی از موارد روش‌های معمول و نوین به‌صورت ترکیبی مورد استفاده قرار می‌گیرد تا یک بازده بهینه به‌دست آید. در ادامه به معرفی تعدادی از این روش‌های نوین پرداخته می‌شود.

روش‌های نوین جداسازی اسپرم

انتخاب اسپرم‌ها بر اساس توانایی اتصال آن به اسید هیالورونیک (HA: Hyaluronic Acid):

اسید هیالورونیک یک پلیمر خطی دی‌ساکاریدی است که به‌طور طبیعی در بسیاری از مایعات و ساختارهای بدن، در سیستم تناسلی ماده و کومولوس احاطه‌کننده تخمک (Cumulus Oophorus) وجود دارد (۲۵). اساس این روش اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک توسط گیرنده اختصاصی آن بر روی سطح غشای اسپرم (پروتئین PH-20) می‌باشد (۲۶). یکی از مراحل اسپرمیوژنز، تغییر در غشاء پلاسمایی اسپرم و بلوغ آن از طریق حذف سیتوپلاسم اضافی است و در این مرحله، تغییر در بعضی از گلیکوپروتئین‌های غشاء پلاسمایی رخ داده که یکی از آن‌ها ایجاد پروتئین PH-20 به‌عنوان یک گیرنده برای اسیدهیالورونیک در سطح غشاء پلاسمایی اسپرم می‌باشد. بنابراین حضور این گیرنده PH-20 در سطح غشاء پلاسمایی اسپرم به‌عنوان یک پارامتر تشخیصی جهت ارزیابی بلوغ غشاء پلاسمایی اسپرم است. اتصال به اسید هیالورونیک، انتخاب اسپرم بالغ را جهت تزریق به داخل تخمک تسهیل می‌کند (۲۷).

در این روش یک قطره اسید هیالورونیک را روی دیش مخصوص قرار می‌دهند و تحت شرایط استریل، آن را خشک می‌کنند. سپس اسپرم شسته‌شده به قطره حاوی HA اضافه می‌شود. به‌علت وجود گیرنده‌های PH-20 روی سطح غشاء پلاسمایی، اسپرم بالغ با آکروزوم سالم، به سمت اسید هیالورونیک حرکت کرده و به HA اتصال می‌یابد تا جهت تزریق به داخل تخمک جدا شود (۲۸). از آن‌جایی که اسپرم‌های نابالغ با ناهنجاری‌های کروموزمی قادر به پیوند با اسید هیالورونیک نمی‌باشند، بنابراین به‌کارگیری این روش برای انتخاب اسپرم‌های بالغ با درصد پائینی از ناهنجاری‌های کروموزومی می‌تواند باعث کاهش مشکلات ژنتیکی به دنبال ICSI در افراد دارای اسپرم غیرطبیعی شود (۲۹). همچنین اسپرم‌هایی اتصال یافته به HA دارای تعداد زیادی از گیرنده‌های HA بوده و روند اسپرماتوژنز را کامل انجام داده و دارای کروماتین سالم هستند (۳۱-۲۹). کاربرد این روش در آزمایشگاه‌های مختلف، نتایج متفاوتی را به دنبال داشته است.

در مطالعه‌ای گزارش شد که درصد اسپرم‌های اتصال‌یافته به HA هیچ رابطه‌ای با لقاح، کلیواژ و جنین‌های کیفیت خوب، سقط و میزان حاملگی در زوج‌هایی که تحت IVF قرار گرفته‌اند، ندارد (۳۲).

مطالعه نصر اصفهانی و همکارانش نشان می‌دهد که به دنبال استفاده از این روش فقط در میزان لقاح، بهبود معناداری مشاهده شده و میزان حاملگی به‌طور غیرمعناداری افزایش یافته است (۳۳).

در یک مطالعه تصادفی، تأثیر اسپرم‌های انتخاب‌شده با HA روی رشد جنین بررسی شد. تخمک‌های بالغ به‌وسیله اسپرم‌های متصل شده به HA و اتصال نیافته به‌صورت تصادفی تزریق شدند و هیچ تفاوت معناداری در میزان لقاح مشاهده نشد (۳۴). اما در مطالعه دیگری، استفاده از این روش باعث افزایش درصد لانه‌گزینی و تولد نوزاد زنده شد (۳۵).

روش آهسته اسپرم (Sperm Slow Method) نیز به‌عنوان یک روش تجاری و جایگزین دیش‌های پوشیده‌شده با HA به‌کار می‌رود. در این روش یک قطره حاوی Sperm Slow بین قطره سوسپانسیون اسپرم و محیط کشت قرار می‌گیرد تا اسپرم‌های بالغ با تعداد کافی از گیرنده‌های HA پیوند برقرار نماید. اسپرم‌های نابالغ آسیب دیده و احتمالاً فاقد گیرنده HA، از مناطق حاوی HA عبور کرده و به مناطقی که فاقد HA است، حرکت می‌کنند. سپس اسپرم‌های منطقه HA جمع‌آوری

شده و مستقیماً به داخل تخمک تزریق می‌شود (بدون استفاده از PVP برای تزریق). نتایج یک مطالعه کلینیکی در تأیید روش Sperm Slow نشان می‌دهد که این روش اسپرم‌های بدون آسیب DNA را جدا کرده و در نتیجه باعث بهبود کیفیت جنین و میزان لانه‌گزینی می‌شود (۳۶) (شکل ۱E).

انتخاب اسپرم بر اساس توانایی عبور از کومولوس اطراف تخمک (COC: Cumulus Oophorus Complex) :

همان‌طور که می‌دانیم اسپرم‌ها باید قبل از لقاح به داخل کومولوس احاطه‌کننده تخمک (کومولوس اووفروس) نفوذ کنند و پس از عبور از ناحیه شفاف وارد سیتوپلاسم تخمک شوند. سلول‌های کومولوس به‌وسیله ماتریکس خارج سلولی محتوی HA احاطه شده‌اند. انتخاب جمعیت اسپرم‌ها در این روش بر اساس توانایی عبور از کومولوس اطراف تخمک می‌باشد. برای این روش، سلول‌های کومولوس اطراف تخمک جدا شده و به داخل لوله‌های باریک کشیده می‌شود، سپس این لوله‌های باریک در داخل قطره سوسپانسون اسپرم آماده شده به روش DGC یا Swim up در مدت‌زمان مشخص قرار می‌گیرد و سرانجام اسپرم‌هایی که از کومولوس اطراف تخمک عبور کرده‌اند جمع‌آوری شده و برای ICSI استفاده می‌شود (۳۷). تفاوت اصلی این روش با روش HA این است که روش HA بر اساس اتصال اسپرم به اسید هیالورونیک حالت جامد می‌باشد، اما در این روش اسپرم‌هایی که به کومولوس اطراف تخمک نفوذ کرده و از آن می‌گذرند مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳۸ و ۳۹). گزارش کلینیکی در مورد نتایج کاربرد این روش ارایه نشده است (شکل ۱G).

انتخاب اسپرم بر اساس توانایی اتصال به ناحیه شفاف:

روش‌های مختلفی جهت تعیین ویژگی‌های اسپرم‌های طبیعی استفاده می‌شود. در این میان، روش اتصال اسپرم با ناحیه شفاف، به‌عنوان بهترین یا معمول‌ترین روش درنظر گرفته شده است. این اسپرم‌ها قادر به واکنش‌های آکروزومی هستند. از آن‌جایی که اسپرم‌های دارای توانایی واکنش آکروزومی و نفوذ به داخل ناحیه شفاف، توانایی لقاح یافتن با تخمک را دارند، بنابراین این روش به‌عنوان تست تشخیصی لقاح به‌کار گرفته می‌شود. در این روش به کمک پیپت ICSI، اسپرم‌ها در نزدیکی تخمک قرار داده می‌شوند. در این شرایط مشابه حالتی که اسپرم‌ها به HA جامد متصل می‌شوند، بعضی از اسپرم‌ها به ناحیه شفاف متصل می‌شوند. سپس اسپرم‌های متصل‌شده به ناحیه شفاف انتخاب شده و برای ICSI مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴۰ و ۴۱).

در یک مطالعه، کاربرد این روش باعث افزایش قابل ملاحظه‌ای در پیشرفت تعداد زیادی از جنین‌های با کیفیت خوب نسبت به گروه کنترل شد (۴۰). همچنین در مطالعه دیگری استفاده از این روش نسبت به روش‌های معمول جداسازی اسپرم منجر به میزان لانه‌گزینی و حاملگی بیشتر شد (۴۲). سرانجام Liu و همکارانش در سال ۲۰۱۱ پیشنهاد کردند که این روش با افزایش کیفیت جنین و میزان لانه‌گزینی به‌طور بالقوه درصد نتایج ICSI را افزایش می‌دهد (۴۳).

انتخاب اسپرم بر اساس بار الکتریکی سطح غشا

الف) انتخاب اسپرم بر اساس روش Zeta

در روش زتا که برای اولین‌بار توسط Chan و همکارانش در سال ۲۰۰۶ پیشنهاد شد، انتخاب اسپرم بالغ بر اساس اختلاف پتانسیل روی سطح غشای اسپرم صورت می‌گیرد (۴۴). در این روش اسپرم‌ها بر اساس اختلاف پتانسیل منفی روی سطح غشاء خود به سطوح دارای بار مثبت اتصال می‌یابند. اسپرم بالغ دارای بار الکتریکی ۱۶- تا ۲۰- میلی‌ولت می‌باشد، که این اختلاف پتانسیل در سطح غشا، پتانسیل زتا نامیده شده است (۴۵). این پتانسیل الکتریکی با ظرفیت‌یابی، قرار گرفتن در معرض مایع داخل رحم و یا مایع فولیکولی کاهش می‌یابد. پتانسیل زتای اسپرم به‌دلیل وجود مقادیر زیادی از سیالوگلیکوپروتئین‌های غشاء اسپرم است که در طی فرایند بلوغ، به سطح آن افزوده می‌شوند. فعالیت ترشحی اپیتلیوم اپیدیدیم یکی از ملزومات اصلی در جریان

تغییرات غشای اسپرم و اضافه شدن این پوشش است. در طی عبور اسپرم از اپیدیدیم، تعدادی گلیکوپروتئین به سطح اسپرم افزوده می‌شود. تحقیقات جدید نشان می‌دهد که برخی از گلیکوپروتئین‌های افزوده شده، برای حفاظت اسپرم در دستگاه تناسلی مؤنث مهم است و به این گلیکوپروتئین‌ها اصطلاحاً آنتی‌ژن بلوغ (Maturation antigen) گفته می‌شود. از جمله پروتئین‌های سراسری اضافه‌شده به سطح اسپرم می‌توان به Gp20 اشاره نمود. Gp20 مسئول بارالکتریکی منفی غشای اسپرم انزال‌شده از دستگاه تناسلی مذکر است (۴۶). در این روش مایع اسپرم شسته شده را در لوله مخصوص سانتریفیوژ ریخته و سپس این لوله باردار می‌شود. لوله باردار حاوی نمونه به‌مدت یک دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار می‌گیرد تا اسپرم‌های بالغ دارای بار منفی به جدار لوله بچسبند. بعد از سانتریفیوژ و تشکیل رسوب، اسپرم‌های ته‌نشین‌شده را به آرامی از ته لوله خارج می‌کنند. سپس با محلول شستشو، جدار لوله را شستشو می‌دهند تا بدون بار شود و اسپرم‌های چسبیده به جدار لوله جدا شده و برای ICSI استفاده می‌شود.

برخی مطالعات نشان داده‌اند که اسپرم دارای کروموزوم X، بار الکتریکی خالص منفی‌تری نسبت به اسپرم دارای کروموزوم Y دارد. بنابراین، احتمالاً از روش زتا در جداسازی اسپرم با کروموزوم X می‌توان استفاده کرد (۴۷).

روش زتا باعث القاء تغییراتی شبیه به ظرفیت‌یابی، مشابه با روند ظرفیت‌یابی طبیعی در سلول اسپرم می‌شود. نتایج یک مطالعه نشان می‌دهد که روش DGC-Zeta با القاء روند ظرفیت‌یابی سبب افزایش میزان فسفاتیدیل سرین و پروتئین یوبیکوئیتین در سطح اسپرم می‌شود (۴۸). پروتئین یوبیکوئیتین نشانه‌ای جهت حذف سلول توسط سیستم پروتئازوم محسوب می‌گردد (۴۹)، همچنین یک ارتباط احتمالی بین ظرفیت‌یابی و درصد اسپرم‌های یوبیکوئیتینه وجود دارد (۴۸).

لازم به ذکر است که در سلول اسپرم، جابه‌جایی فسفاتیدیل سرین از نشانه‌های اولیه آپوپتوز است. این جابه‌جایی طی روند ظرفیت‌یابی و واکنش آکروزومی در شرایط طبیعی در سیستم تناسلی فرد ماده و در شرایط آزمایشگاه در صورت حذف پلاسمای مایع منی و یا القاء هر یک از روندهای فوق ایجاد می‌گردد (۵۰). همچنین در هنگام نفوذ اسپرم به داخل تخمک فسفاتیدیل سرین به گیرنده‌های مربوطه متصل شده و اسپرم به داخل تخمک نفوذ می‌کند (۵۱).

برخی مطالعات نشان داده‌اند که تزریق اسپرم ظرفیت‌یابی‌شده و اسپرمی که واکنش آکروزومی (۴۴ و ۵۲) را انجام داده باعث بهبود نتایج ICSI می‌شود. از سوی دیگر مطالعات نشان داده‌اند که روش جداسازی زتا باید به سرعت و پیش از ظرفیت‌یابی اسپرم انجام شود، زیرا ظرفیت‌یابی اسپرم باعث حذف برخی از گلیکوپروتئین‌ها و سیالوگلیکوپروتئین‌ها از سطح خارجی غشای اسپرم‌ها می‌گردد و این امر منجر به کاهش بار منفی سطح غشا شده که نتیجه آن اتصال تعداد کم‌تر و سست‌تر اسپرم‌ها به جدار شیشه می‌باشد (۵۳). همچنین در این روش نباید از محیط کشت آلبومین‌دار برای شستشو استفاده کرد چرا که اضافه کردن سرم آلبومین سبب خنثی شدن پروتئین‌های سطحی اسپرم و بار آن می‌گردد (۴۸).

مقایسه این روش با روش انتخاب اسپرم بر اساس توانایی اتصال به اسید هیالورونیک نشان می‌دهد که هر دو می‌توانند اسپرم‌های با مورفولوژی سالم‌تر و میزان کمبود پروتامین کم‌تر را جدا کنند. ولی میزان آسیب DNA تنها در روش زتا نسبت به روش HA و گروه کنترل به‌طور معناداری کاهش یافته بود. لذا می‌توان در بیمارانی که دارای آسیب DNA بالا هستند، از این روش جهت جداسازی اسپرم‌ها استفاده کرد (۵۴ و ۵۵).

نتیجه مطالعه روش ترکیبی DGC-Zeta برای انتخاب اسپرم در زوج‌هایی با فاکتور ناباروری مردانه نشان داد که میزان لقاح و حاملگی در این گروه بهتر از گروه کنترل بود اما تفاوتی در کلیواژ و کیفیت جنین مشاهده

نشد. لذا احتمالاً استفاده از این روش ترکیبی منجر به بازدهی بالاتر در روند جداسازی و آماده‌سازی اسپرم‌ها شده و گزینه بهتری در پیش‌روی محققین در انتخاب صحیح‌تر اسپرم‌ها جهت انجام ICSI قرار می‌دهد (۵۶ و ۵۷). به‌علاوه در یک مطالعه موردی، زوجی که پس از ۱۱ بار انتقال جنین، شکست در حاملگی را داشتند با استفاده از روش زتا حامله شدند و نوزاد آن‌ها سالم به دنیا آمد (۵۸) (شکل 1D).

ب) روش الکتروفورز

در این روش از دستگاه الکتروفورتیک با نام CS-10 استفاده می‌گردد. اسپرم‌ها در این دستگاه در معرض جریان الکتریکی با ولتاژی بین ۲۱-۱۸ ولت قرار می‌گیرند. در این روش اسپرم‌ها، هم بر اساس بار الکتریکی موجود در سطح غشاء و هم بر اساس اندازه اسپرم جهت عبور از منافذ موجود در دستگاه جداسازی می‌شوند. روش کار به این ترتیب است که اسپرم‌های با بار منفی، سریع‌تر به سمت قطب مثبت حرکت می‌کنند. همزمان، این اسپرم‌ها از یک فیلتر از ترکیبات کربن که دارای منافذی به اندازه اسپرم می‌باشد نیز می‌گذرند. اسپرم‌های غیرمتحرک و همچنین سلول‌های دیگر از این منافذ عبور نمی‌کنند (۶۱-۵۹).

در یک مطالعه موردی، اولین فرزند زنده متولدشده به‌وسیله انتخاب اسپرم با روش الکتروفورتیک به‌وسیله ICSI برای زوجی گزارش شد که سیکل ICSI/IVF را هفت بار انجام داده بودند (۶۲) (شکل 1H).

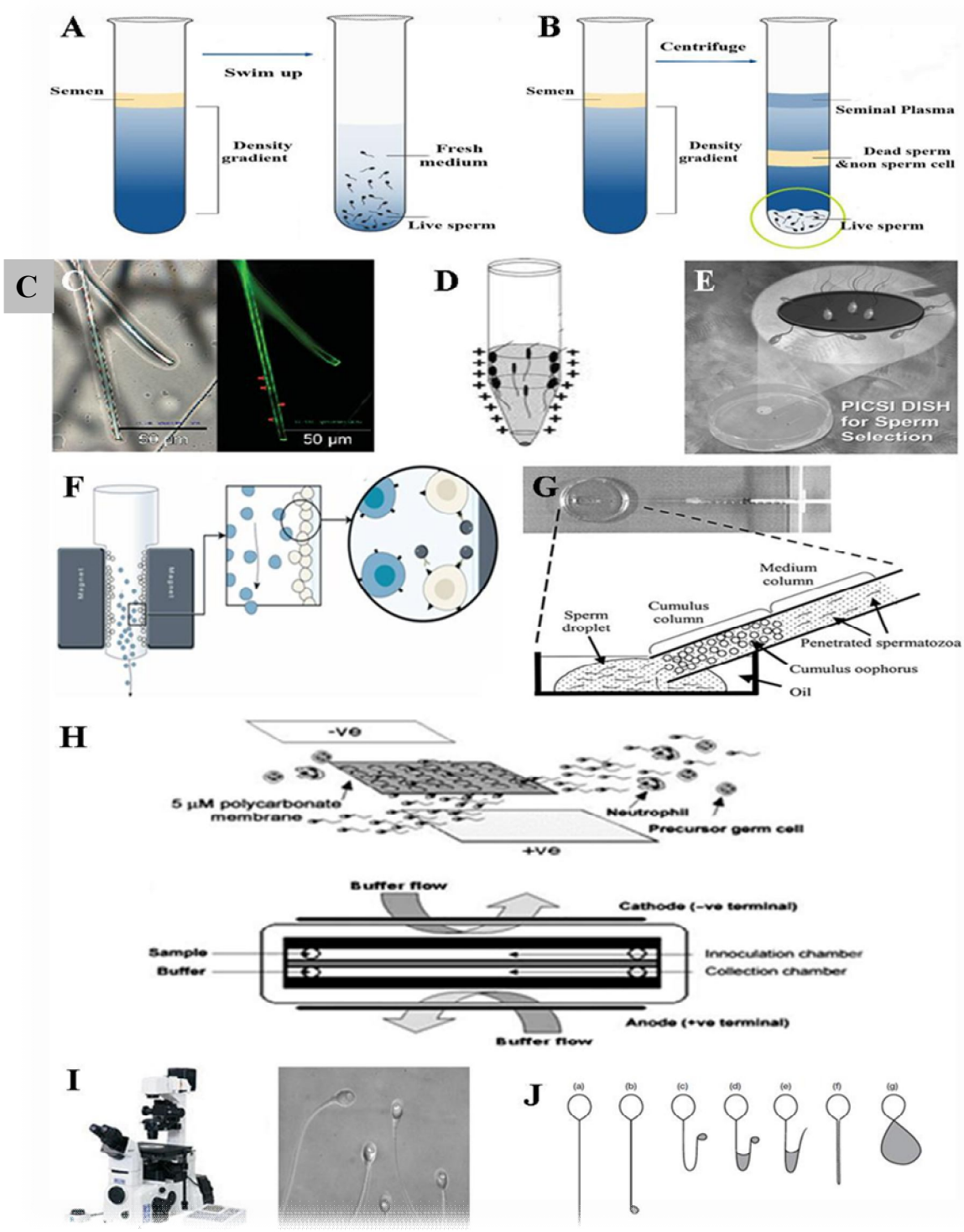
انتخاب اسپرم بر اساس نشانگر های سطح سلولی:

MACS (Magnetic-Activated Cell sorting System) به روشی گفته می‌شود که به‌منظور جدا کردن یک جمعیت خاص سلولی از کل جمعیت سلولی به‌وسیله نشانگرهای نمایان‌شده بر سطح سلول به‌کار می‌رود. در این روش از ذرات آهنربایی (میکروبید) هایی که به آنتی‌بادی‌های خاصی متصل شده‌اند، برای جداسازی سلول‌های موردنظر استفاده می‌شود. بر مبنای آنتی‌بادی‌های استفاده شده، انواع خاصی از سلول‌ها قابل جداسازی هستند. این روش به‌منظور جداسازی اسپرم‌های آپوپتوزی از اسپرم‌های سالم به‌کار می‌رود که بر اساس خاصیت اتصال AnnexinV به فسفاتیدیل سرین سطح غشا می‌باشد (۶۳).

آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی‌شده) یک فرآیند فیزیولوژیکی است که در لوله‌های منی‌ساز رخ داده و برای انجام یک اسپرماتوژنز طبیعی ضروری است. اشکال غیرطبیعی اسپرماتوزوا طی اسپرماتوژنز توسط آپوپتوز به‌طور انتخابی از مایع منی حذف می‌شوند. در مردان با پارامترهای اسپرمی غیرطبیعی، افزایش نشانه‌های آپوپتوزی در اسپرم انزال‌شده مشاهده شده است. احتمال می‌رود در این افراد بعضی از اسپرم‌ها، تحت فرایند فرار آپوپتوز (Abortive apoptosis) قرار گرفته و حذف نشده باشند. در نهایت این اسپرم‌ها، همراه با اسپرم‌های دیگر موجود در مایع منی مشاهده می‌شوند (۶۴).

یکی از مهم‌ترین و زودرس‌ترین تغییراتی که در طی آپوپتوز رخ می‌دهد، جابه‌جایی فسفاتیدیل سرین از لایه داخلی غشاء به سطح خارجی آن می‌باشد که علامتی برای حذف این سلول‌ها است، این جابه‌جایی توسط آنکسین V قابل شناسایی است. آنکسین V، یک پروتئین (۳۵-۳۶ دالتون) است که تمایل بالایی برای اتصال به فسفاتیدیل سرین، در حضور یون کلسیم دارد. استفاده از آنکسین V ابزار بسیار مفیدی جهت بررسی فسفاتیدیل سرین در سلول‌های اسپرم در معرض آپوپتوز می‌باشد (۶۳).

در این روش ابتدا ذرات بسیار ریز آهنربایی (میکروبید) به پروتئین آنکسین V متصل می‌شوند. سپس اسپرم‌ها در معرض این ذرات قرار می‌گیرند و در طی زمان مشخصی از ستون‌های حاوی میدان مغناطیسی عبور می‌کنند. اسپرم‌هایی که از طریق فسفاتیدیل سرین سطح غشا به ذرات پارامغناطیسی متصل به آنکسین V اتصال پیدا کرده‌اند در میدان مغناطیسی باقی می‌مانند و اسپرم‌های سالم و فاقد فسفاتیدیل سرین از ستون عبور کرده و خارج می‌شوند (۶۵).



شکل ۱

A: جداسازی اسپرم با روش Swim up

B: جداسازی اسپرم با روش DGC

C: جداسازی اسپرم با روش GWF

D: جداسازی اسپرم بر اساس روش Zeta

E: جداسازی اسپرم بر اساس توانایی اتصال به اسید هیالورونیک (H-A Binding)

F: جداسازی اسپرم بر اساس روش MACS

G: جداسازی اسپرم بر اساس توانایی عبور از کومولوس اووفروس تخمک

H: جداسازی اسپرم بر اساس روش الکتروفورز

I: جداسازی اسپرم با میکروسکوپ IMSI

J: جداسازی اسپرم بر اساس روش HOST

نکته قابل‌توجه در استفاده از این روش این است که خروج فسفاتیدیل سرین علاوه بر این‌که نشانه شروع آپوپتوز می‌باشد، طی روند ظرفیت‌یابی و واکنش آکروزومی اتفاق می‌افتد (۵۰). بنابراین این روش نیز مانند روش جداسازی زتا باید به‌سرعت و پیش از ظرفیت‌یابی اسپرم انجام شود. از آن‌جایی که MACS توانایی حذف لکوسیت‌ها و سلول‌های جنسی نابالغ را ندارد، این تکنیک به‌منظور حذف پلاسمای مایع منی و کاهش آلودگی معمولاً به‌صورت ترکیبی با DGC استفاده می‌شود (۶۶).

در افراد سالم و مردان با ناباروری ناشناخته، اسپرم‌های جداسازی شده به روش MACS بعد از DGC دارای ۳۰ درصد آسیب DNA کم‌تر نسبت به اسپرم‌های جدا شده به روش DGC تنها بودند (۶۳).

ترکیب DGC و MACS احتمالاً در افزایش میزان حفظ انجمادی اسپرم‌ها مفید است. میزان حفظ انجمادی اسپرم‌های جداشده به‌روش DGC و MACS به‌طور معناداری نسبت به اسپرم‌های جداشده به روش DGC تنها بهتر گزارش شده است (۶۶ و ۶۷).

نتایج یک مطالعه نشان می‌دهد که در گروهی که اول MACS و سپس DGC برای جداسازی اسپرم افراد دارای پارامترهای اسپرمی غیرطبیعی بود میزان کلیواژ و حاملگی بالاتر از روش DGC تنها بود اما در میزان لقاح دو گروه تفاوتی وجود نداشت (۶۸).

نتایج مطالعات نشان می‌دهد که هر دو روش MACS و DGC قادر به جداسازی اسپرم‌های طبیعی با آسیب DNA کم‌تر هستند اما در صورتی که ابتدا از روش DGC و سپس MACS استفاده شود، اسپرم‌ها در طی فرایند DGC احتمالاً مستعد ظرفیت‌یابی و واکنش آکروزومی می‌شوند. این اسپرم‌ها آنکسین مثبت بوده و امکان دارد زمانی که وارد پروسه MACS می‌شوند از ستون‌های MACS جداسازی شده و در نتیجه از جمعیت مورد استفاده جهت اهداف کلینیکی حذف گردند. در صورتی که گزارش شده است که اسپرم‌هایی که ظرفیت‌یابی و واکنش آکروزومی انجام داده‌اند جهت بهبود نتایج کلینیکی بهترند. اما اگر ابتدا از روش جداسازی MACS استفاده شود، اسپرم‌های آپوپتوزشده از کل جمعیت اسپرمی حذف می‌گردند و جمعیت باقیمانده وارد روش جداسازی بر اساس DGC می‌شود، بنابراین کاربرد روش MACS قبل از DGC ارجحیت دارد (۶۹). نتایج مطالعه دیگری نشان داد که هر دو روش MACS و zeta قادر به جداسازی اسپرم‌ها با کروماتین سالم‌تر و مورفولوژی بهتر نسبت به نمونه اولیه می‌باشند، اما روش MACS نسبت به روش Zeta، به‌طور معناداری باعث جداسازی اسپرم‌ها با محتوای آکروزوم و پروتامین سالم‌تر می‌شود (۷۰). به‌علاوه در دو مطالعه موردی، استفاده از روش MACS برای دو زوجی که در درمان‌های قبلی با استفاده از تکنیک ICSI دارای لقاح ناموفق و جنین‌های ضعیف و همچنین همسران آن‌ها دارای سطح بالایی از آسیب DNA بودند، باعث تولد فرزند سالم شده بود (۷۱ و۷۲) (شکل ۱F).

انتخاب اسپرم با استفاده از میکروسکوپ‌هایی با بزرگ‌نمایی بالا (IMSI: Intracytoplasmic Morphologically selected Sperm Injection)

اساس این روش انتخاب اسپرم طبیعی بر اساس مورفولوژی اندامک‌های اسپرم می‌باشد. در این روش از میکروسکوپ‌هایی با بزرگنمایی ۱۶۰۰ برابر استفاده می‌شود و یک قطره کوچک از سوسپانسیون اسپرم متحرک که به‌وسیله یکی از روش‌های جداسازی معمول اسپرم آماده شده است، با میکروسکوپ نوری معکوس با بزرگ‌نمایی بالا بررسی می‌شود. در این روش با کمک سیستم‌های نوری و آنالیز تصاویر دیجیتال، مورفولوژی اسپرم‌ها، شامل طبیعی بودن هسته اسپرم (شکل و محتوای کروماتین)، اندازه آکروزوم و حضور و عدم حضور واکوئل، فضای پشت آکروزوم، گردن، میتوکندری و دم بررسی می‌شود. در بین این اندامک‌ها به‌نظر می‌رسد که هسته اسپرم مهم‌تر بوده و نتایج ICSI را بیشتر تحت تأثیر قرار می‌دهد. مورفولوژی اسپرم به‌عنوان یک عامل

تعیین‌کننده مهم در میزان باروری در لقاح طبیعی و در لقاح آزمایشگاهی می‌باشد (۷۳). در سال ۲۰۰۹ تحقیقات Avendan˜o و همکارانش نشان دادند که تمام اسپرم‌های دارای مورفولوژی طبیعی دارای کروماتین سالم نیستند و درصد اسپرم‌های دارای مورفولوژی طبیعی که ساختار کروماتین آن‌ها آسیب دیده، در افراد نابارور بیشتر از افراد بارور است (۴).

وجود واکوئل درون‌هسته‌ای، منعکس‌کننده نقایص مولکولی درگیر در بازسازی مجدد کروماتین (Chromatin Remodeling) است و افزایش درصد آسیب DNA رابطه مستقیم با میزان واکوئل‌های درون‌هسته‌ای دارد (۱۳)، در نتیجه حذف این اسپرم‌ها به‌روش High–magnification می‌تواند باعث بهبود نتایج باروری شود. نتایج کلینیکی برخی از مطالعات نشان می‌دهد که حاملگی و تولد نوزاد زنده در IMSI به‌طور معناداری بیشتر از ICSI است، اما تفاوتی در میزان لقاح، کلیواژ و مورفولوژی جنین‌ها مشاهده نشد. بنابراین با وجودی که IMSI روی مراحل اولیه لقاح تأثیری ندارد اما تأثیری که روی لانه‌گزینی دارد نباید نادیده گرفته شود (۷۴ و ۷۵). بررسی‌های جدید برای مقایسه نتایج ۳۵۷ سیکل IMSI در مقابل ۳۴۹ سیکل ICSI روتین نشان می‌دهد که در IMSI میزان حاملگی به‌طور معناداری بیشتر و سقط کم‌تر بوده، اما در میزان لقاح تفاوتی مشاهده نشده است (۷۶) (شکل ۱I).

انتخاب اسپرم‌ها بر اساس پاسخ‌دهی اسپرم به شرایط هایپواسموتیک (HOST: Hypo-Osmotic Swelling Test):

در این روش، اسپرم در محلول هایپواسمتیک قرار می‌گیرد. این محیط باعث متورم شدن و کشیدگی غشا پلاسمایی دم اسپرم در اثر درون‌روی آب می‌شود. اسپرم‌های موجود در محیط هایپواسمولار به دو گروه تقسیم می‌شوند:

۱- در صورت عدم تورم دم اسپرم، آن را HOST منفی می‌نامند که نشان‌دهنده فقدان سلامت غشاء اسپرم است (فرم a).

۲- در صورت تورم در ناحیه دم اسپرم، آن را HOST مثبت می‌نامند که نشان‌دهنده سلامت غشاء اسپرم است. این تورم دارای درجات مختلف است که بستگی به سلامت کانال‌های Na^+/K^+ و Na^+/H^+ دارد (فرم b، c، d، e، f و g).

تست متورم‌سازی هایپواسموتیک در ابتدا جهت بررسی سلامت غشاء پلاسمایی اسپرم استفاده می‌شد. در طی این تست برای اسپرم‌های HOST منفی، غشای پلاسمای اسپرم از نظر ساختاری غیرفعال بوده و در فرآیند لقاح نقشی بر عهده نخواهد داشت (۷۷).

مطالعات متعددی با استفاده از تست HOST انجام شده و ارتباط بین سلامت غشاء و پارامترهای اسپرمی از جمله مورفولوژی، تحرک اسپرم و لقاح مورد ارزیابی قرار گرفته است. افراد ناباروری که میزان درصد اسپرم‌های دارای غشاء سالم در آن‌ها بالا است، با میزان موفقیت در لقاح مواجه هستند (۷۸). نتایج مطالعات Stanger و همکارانش نشان می‌دهد می‌توان اسپرم‌هایی با DNA سالم را توسط تست HOST برای ICSI انتخاب نمود (۷۹). در مطالعه دیگری گزارش شد که تمام اسپرم‌های HOST مثبت جهت فرایند ICSI مناسب نیستند و چنین پیشنهاد می‌شود که شکل (d) و سپس (c) با کم‌ترین میزان آسیب DNA، بهترین اسپرم‌ها برای انتخاب توسط جنین‌شناس در طی تکنیک ICSI است و باید از انتخاب شکل (g) که دارای بیشترین میزان آسیب DNA می‌باشد، اجتناب کرد (۸۰). همچنین مطالعه اخیر نشان می‌دهد که انتخاب اسپرم بر اساس الگوی HOST باعث بهبود کیفیت اسپرم انتخاب شده از لحاظ سلامت کروماتین، DNA، مورفولوژی و کاهش میزان آپوپتوز می‌شود (۸۱) (شکل ۱J). لازم به‌ذکر است که مزایا و معایب هر کدام از روش‌های جداسازی اسپرم شرح داده شده در بالا، در جدول ۱ قید شده است.

جدول ۱– مزایا و معایب استفاده از روش‌های معمول و نوین جداسازی اسپرم

روش‌های معمول جداسازی‌اسپرم	مزایای روش‌های جداسازی اسپرم	معایب روش‌های جداسازی اسپرم
روش مهاجرت اسپرم	آسان و مقرون به صرفه انتخاب اسپرم با شکل و تحرک طبیعی(۲۴)	عدم استفاده در افرد الیگوزواسپرمیا*و آستنوزواسپرمیا**(۸) تولید استرس اکسیداتیو در نتیجه تماس اسپرم ها با یکدیگر و لکوسیت ها(۸)
روش سانتریفیوژ در شیب غلظت	انتخاب اسپرم با شکل، تحرک و ساختار کروماتین طبیعی (۷) قابل انجام برای افراد الیگوزواسپرمیا حذف تعداد زیادی از لکوسیت ها کاهش درصد اسپرم های آپوپتوزی (فعالیت کاسپاز، آسیب DNA و جابه جایی فسفاتیدیل سرین) (۱۶)	هزینه بر احتمال تولید اندوتوکسین (۸)
روش فیلتراسیون پشم شیشه	آسان و کارایی بالا انتخاب اسپرم با تحرک بالا (۲۰) و کاهش درصد اسپرم های آپوپتوزی (۱۶) قابل انجام برای افراد الیگوزواسپرمیا* حذف تعداد زیادی از لکوسیت‌ها (تا ۹۰٪) و کاهش میزان تولید استرس اکسیداتیو به دلیل تعداد کم سانتریفیوژ(۲۱)	هزینه بر احتمال باقی ماندن قطعات پشم شیشه (۲۲ و ۸)
روش‌های نوین جداسازی اسپرم	**مزایای روش‌های جداسازی اسپرم**	**معایب روش‌های جداسازی اسپرم**
انتخاب اسپرم ها بر اساس توانایی اتصال به اسید هیالورونیک	انتخاب اسپرم با شکل، تحرک، ساختار کروماتین طبیعی و عملکرد طبیعی(۳۱-۲۹)	غیرقابل انجام برای افراد دارای پارامترهای اسپرمی ضعیف (۶۵) زمان بر برای تزریق تعداد تخمک زیاد(۶۵)
انتخاب اسپرم بر اساس توانایی عبور از کومولوس اطراف تخمک	انتخاب اسپرم با مورفولوژی و محتوای پروتامین طبیعی انتخاب اسپرم با توانایی انجام واکنش آکروزومی و اتصال به ناحیه شفاف(۳۷ و ۳۹)	زمان بر (۶۵) غیر قابل انجام برای افراد دارای پارامتر های اسپرمی ضعیف
انتخاب اسپرم بر اساس توانایی اتصال به ناحیه شفاف	انتخاب اسپرم با تحرک بالا، مورفولوژی طبیعی(۲۲) و توانایی انجام واکنش آکروزومی(۴۰)	زمان بر اتصال اسپرم به ZP وابسته به شدت ناباروری(۴۰ و ۴۱)
انتخاب اسپرم بر اساس روش zeta	انتخاب اسپرم با شکل و ساختار کروماتین طبیعی (۴۸و۵۶) مقرون به صرفه و بدون نیاز به استفاده از تجهیزات گران قیمت الکتروفورز و ولتاژ بالا قابل انجام بر روی اسپرم های فریز و ذوب شده (۵۵)	عدم استفاه در افراد الیگوزواسپرمیا و اسپرم های استخراج شده از بیضه و اپیدیدیم(به دلیل کم بودن بار الکتریکی بر روی سطح غشاء اسپرم نابالغ) (۵۱) عدم استفاده در محیط های مرطوب (۵۴).
انتخاب اسپرم بر اساس بار الکتریکی سطح غشا	انتخاب اسپرم با ساختار کروماتین طبیعی (۶۱) حداقل تولید استرس اکسیداتیو به دلیل عدم استفاده ازسانتریفیوژ (۶۰) قابل استفاده برای افراد الیگوزواسپرمیا، اسپرم استخراج شده از بیضه و اسپرم فریز شده(۶۱ و ۶۲)	هزینه بر و پیچیده بودن کار با دستگاه نیاز به داشتن پرسنل متخصص(۶۱)
انتخاب اسپرم بر اساس نشانگر های سطح سلولی	ساده و سریع انتخاب اسپرم دارای مورفولوژی و کرماتین طبیعی(۶۳) انتخاب اسپرم با فعالیت کاسپاز کم و پتانسیل غشایی میتوکندری بالا (۶۵)	نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی خاص دارای محدودیت در افراد الیگوزواسپرمیا (۶۵)
انتخاب اسپرم با استفاده از میکروسکوپ هایی با بزرگنمایی بالا	انتخاب اسپرم دارای مورفولوژی طبیعی اندامک ها و کروماتین طبیعی(۷۳)	زمان بر نیاز تجهیزات بسیار و سطح بالایی از مهارت مشاهده کننده(۷۵)
انتخاب اسپرم ها بر اساس پاسخ دهی اسپرم به شرایط هایپواسموتیک	ساده و ارزان قابل استفاده در اسپرم های استخراج شده از بیضه و اسپرم های غیر متحرک انزال(۷۷)	زمان بر(۷۹)

* الیگوزواسپرمیا: غلظت اسپرم پائین تر از حد آستانه (۱۵ میلیون اسپرم در هر میلی لیتر) است.

** آستنوزواسپرمیا: درصد تحرک پیش رونده اسپرم (۳۲٪) پائین تر از حد آستانه است.

بحث

در این مقاله علاوه بر بررسی روش‌های معمول جداسازی، چندین روش پیشرفته انتخاب اسپرم بر اساس یافته‌های مختلف از لحاظ عملکردی شرح داده شد. معیار انتخاب اسپرم مناسب، که در روش‌های معمول جداسازی استفاده می‌شود ناکافی بوده و روش‌های دیگری نیاز است که مطمئن شویم اسپرم با کیفیت بهینه قبل از انجام روش‌های کمک‌باروری انتخاب شده است. برای مثال مطالعات جدید نشان می‌دهد که استفاده از اسپرم‌های متصل شده به زونا پلوسیدا برای انجام ICSI در مقایسه با روش‌های معمول باعث افزایش کیفیت جنین، لانه‌گزینی و میزان حاملگی کلینیکی می‌شود بنابراین ترکیب روش‌های معمول و نوین باعث کاهش احتمال باروری اسپرم معیوب شده و راه را برای ICSI موفق هموار کرده و میزان سقط را کاهش می‌دهد.

از میان روش‌های نوین جداسازی اسپرم به‌ترتیب، بیشترین مطالعه بر روی روش‌های انتخاب اسپرم بر اساس مورفولوژی اندامک‌های اسپرم، توانایی آن در پیوند با اسید هیالورونیک، توانایی اتصال به ناحیه شفاف، زتا و MACS انجام شده است. در بعضی از این روش‌ها مانند IMSI و توانایی اتصال به زونا پلوسیدا، اساس انتخاب، یک اسپرم است درحالی‌که در روش‌های دیگر مانند روش زتا و MACS انتخاب جمعیتی از اسپرم‌ها موردنظر است. در بعضی روشها مانند HA انتخاب یک اسپرم در یک جمعیت موردنظر است. اما به‌طورکلی هنگامی که هدف انتخاب یک اسپرم باشد، روش وقت‌گیر و هزینه‌بر است. اما انتخاب جمعیتی از اسپرم‌ها به زمان کم‌تری نیاز دارد. به‌طورکلی اسپرم انتخاب‌شده باید دارای کم‌ترین میزان آسیب DNA باشد.

تحقیقات، سودمندی روش IMSI را در حاملگی بالاتر، تولد نوزاد زنده و درصد پایین‌تر سقط نشان می‌دهد، اما این روش در نتایج اولیه مثل لقاح و میزان کلیواژ تأثیری ندارد. همچنین در یک مطالعه میزان حاملگی در روش IMSI در مقایسه با روش ICSI به دو برابر و میزان سقط به نصف رسیده است اما این روش به‌دلیل نیاز به تجهیزات و صرف زمان زیاد دارای محدودیت است.

گرچه نتایج اولیه به‌دنبال ICSI و IVF بعد از استفاده از روش‌های نوین جداسازی اسپرم در مورد میزان لقاح و حاملگی امیدوارکننده است ولی باید به این نکته توجه کرد که تعداد بیماران مورد بررسی محدودند و همچنین نتایج بیشتر مطالعات انجام‌شده در تولد نوزاد زنده و میزان حاملگی متفاوتند.

نتیجه‌گیری

روش‌های جداسازی اسپرم در افراد نابارور نیاز به تحقیقات بیشتر دارد تا با اطمینان از جنبه‌های ایمنی و اثربخشی روش‌های جداسازی انتخاب اسپرم، در تکنیک‌های کمک‌باروری استفاده شود. همچنین پیگیری‌های طولانی‌مدت برای بررسی فرزندان متولدشده ضروری به‌نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین پژوهشکده رویان اصفهان ابراز می‌دارند.

References

1. Land JA, Evers JL. Risks and complications in assisted reproduction techniques: Report of an ESHRE consensus meeting. Hum Reprod. 2003;18(2):455-7.
2. Pisarska MD, Casson PR, Cisneros PL, Lamb DJ, Lipshultz LI, Buster JE, et al. Fertilization after standard in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in subfertile males using sibling oocytes. Fertil Steril. 1999;71(4):627-32.
3. Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. Hum Reprod Update. 2006;12(1):23-37.
4. Avendaño C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. Fertil Steril. 2009;91(4):1077-84.

5. Kurinczuk JJ, Bower C. Birth defects in infants conceived by intracytoplasmic sperm injection: an alternative interpretation. BMJ. 1997;315(7118):1260-5.
6. Agarwal A, Allamaneni SS. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. Minerva Ginecol. 2004;56(3):235-45.
7. Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG, et al. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. Hum Reprod. 2000;15(5):1112-6.
8. Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. Reprod Biol Endocrinol 2003;1:108.
9. Grunewald S, Miska W, Miska G, Rasch M, Reinhardt M, Glander HJ, et al. Molecular glass wool filtration as a new tool for sperm preparation. Hum Reprod. 2007;22(5):1405-12.
10. Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, et al. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. Reprod Biomed Online. 2005;11(2):198-205.
11. Jayaraman V, Upadhya D, Narayan PK, Adiga SK. Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. J Assist Reprod Genet. 2012;29(6):557-63.
12. Gosálvez J1, Caballero P, López-Fernández C, Ortega L, Guijarro JA, Fernández JL, et al. Can DNA fragmentation of neat or swim-up spermatozoa be used to predict pregnancy following ICSI of fertile oocyte donors? Asian J Androl. 2013;15(6):812-8.
13. Franco JG Jr, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Vagnini L. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. Reprod Biomed Online. 2008;17(1):42-5.
14. Monqaut AL, Zavaleta C, López G, Lafuente R, Brassesco M. Use of high-magnification microscopy for the assessment of sperm recovered after two different sperm processing methods. Fertil Steril. 2011; 95(1):277-80.
15. Chiamchanya C, Kaewnoonual N, Visutakul P, Manochantr S, Chaiya J. Comparative study of the effects of three semen preparation media on semen analysis, DNA damage and protamine deficiency, and the correlation between DNA integrity and sperm parameters. Asian J Androl. 2010;12(2):271-7.
16. Paasch U, Grunewald S, Glander HJ. Sperm selection in assisted reproductive techniques. Soc Reprod Fertil Suppl. 2007;65:515-25.
17. Makler A, Stoller J, Makler-Shiran E. Dynamic aspects concerned with the mechanism of separating motile sperm from nonmotile sperm, leukocytes, and debris with the use of high-density Percoll gradients. Fertil Steril. 1998;70(5):961-6.
18. Söderlund B, Lundin K. The use of silane-coated silica particles for density gradient centrifugation in in-vitro fertilization. Hum Reprod. 2000;15(4):857-60.
19. Van der Zwalmen P, Bertin-Segal G, Geerts L, Debauche C, Schoysman R. Sperm morphology and IVF pregnancy rate: comparison between Percoll gradient centrifugation and swim-up procedures. Hum Reprod. 1991;6(4):581-8.
20. Van den Bergh M, Revelard P, Bertrand E, Biramane J, Vanin AS, Englert Y. Glass wool column filtration, an advantageous way of preparing semen samples for intracytoplasmic sperm injection: an auto-controlled randomized study. Hum Reprod. 1997;12(3):509-13.
21. Sánchez R, Concha M, Ichikawa T, Henkel R, Schill WB. Glass wool filtration reduces reactive oxygen species by elimination of leukocytes in oligozoospermic patients with leukocytospermia. J Assist Reprod Genet. 1996;13(6):489-94.
22. Henkel R. Sperm preparation: state-of-the-art--physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. Asian J Androl. 2012;14(2):260-9.
23. Coetzee K, Erasmus EL, Kruger TF, Menkveld R, Lombard CJ. Glass wool filter preparation of cryopreserved spermatozoa. Andrologia. 1994;26(1):33-4.
24. Hammadeh ME, Kühnen A, Amer AS, Rosenbaum P, Schmidt W. Comparison of sperm preparation methods: effect on chromatin and morphology recovery rates and their consequences on the clinical outcome after in vitro fertilization embryo transfer. Int J Androl. 2001;24(6):360-8.
25. Salustri A, Camaioni A, Di Giacomo M, Fulop C, Hascall VC. Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicles. Hum Reprod Update. 1999;5(4):293-301.
26. Cherr GN, Yudin AI, Overstreet JW. The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. Matrix Biol. 2001;20(8):515-25.
27. 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(3):1616-24.
28. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. Fertil Steril. 2005;84(6):1665-73.
29. Yagci A, Murk W, Stronk J, Huszar G. Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high DNA chain integrity: an acridine orange fluorescence study. J Androl. 2010;31(6):566-72.

30. Razavi SH, Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR, Shayesteh M, Tavalaee M. Evaluation of zeta and HA-binding methods for selection of spermatozoa with normal morphology, protamine content and DNA integrity. Andrologia. 2010;42(1):13-9.
31. Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR, Tavalaee M. New era in sperm selection for ICSI. Int J Androl. 2012;35(4):475-84.
32. Tarozzi N, Nadalini M, Bizzaro D, Serrao L, Fava L, Scaravelli G, et al. Sperm-hyaluronan-binding assay: clinical value in conventional IVF under Italian law. Reprod Biomed Online. 2009;19(3):35-43.
33. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vahdati AA, Fathi F, Tavalaee M. Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. J Assist Reprod Genet. 2008;25(5):197-203.
34. Van Den Bergh MJ, Fahy-Deshe M, Hohl MK. Pronuclear zygote score following intracytoplasmic injection of hyaluronan-bound spermatozoa: a prospective randomized study. Reprod Biomed Online. 2009;19(6):796-801.
35. G, Majumdar A. A prospective randomized study to evaluate the effect of hyaluronic acid sperm selection on the intracytoplasmic sperm injection outcome of patients with unexplained infertility having normal semen parameters. J Assist Reprod Genet. 2013;30(11):1471-5.
36. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Ciampaglia W, Filicori M. "Physiologic ICSI": hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. Fertil Steril. 2010;93(2):598-604.
37. Hong SJ, Chiu PC, Lee KF, Tse JM, Ho PC, Yeung WS. Establishment of a capillary-cumulus model to study the selection of sperm for fertilization by the cumulus oophorus. Hum Reprod. 2004;19(7):1562-9
38. Franken DR, Bastiaan HS. Can a cumulus cell complex be used to select spermatozoa for assisted reproduction? Andrologia. 2009;41(6):369-76.
39. Tesarík J, Mendoza Oltras C, Testart J. Effect of the human cumulus oophorus on movement characteristics of human capacitated spermatozoa. J Reprod Fertil. 1990;88(2):665-75.
40. Paes Almeida Ferreira de Braga D, Iaconelli A Jr, Cássia Sávio de Figueira R, Madaschi C, Semião-Francisco L, Borges E Jr. Outcome of ICSI using zona pellucida-bound spermatozoa and conventionally selected spermatozoa. Reprod Biomed Online. 2009;19(6):802-7.
41. Franken DR, Oehninger S. The clinical significance of sperm zona pellucida binding: 17 years later. Front Biosci. 2006;11:1227-33.
42. Black M, Liu de Y, Bourne H, Baker HW. Comparison of outcomes of conventional intracytoplasmic sperm injection and intracytoplasmic sperm injection using sperm bound to the zona pellucida of immature oocytes. Fertil Steril. 2010;93(2):672-4.
43. Liu F, Qiu Y, Zou Y, Deng ZH, Yang H, Liu de Y. Use of zona pellucida-bound sperm for intracytoplasmic sperm injection produces higher embryo quality and implantation than conventional intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 2011;95(2):815-8.
44. Chan PJ, Jacobson JD, Corselli JU, Patton WC. A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge. Fertil Steril. 2006;85(2):481-6.
45. Simon L, Ge SQ, Carrell DT. Sperm selection based on electrostatic charge. Methods Mol Biol. 2013;27:269-78.
46. Giuliani V, Pandolfi C, Santucci R, Pelliccione F, Macerola B, Focarelli R, et al. Expression of gp20, a human sperm antigen of epididymal origin, is reduced in spermatozoa from subfertile men. Mol Reprod Dev. 2004;69(2):235-40.
47. Kaneko S, Oshio S, Kobayashi T, Iizuka R, Mohri H. Human X- and Y-bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. Biochem Biophys Res Commun. 1984;124(3):950-5.
48. Zarei-Kheirabadi M, Shayegan Nia E, Tavalaee M, Deemeh MR, Arabi M, Forouzanfar M, et al. Evaluation of ubiquitin and annexin V in sperm population selected based on density gradient centrifugation and zeta potential (DGC-Zeta). J Assist Reprod Genet. 2012; 29(4):365-71.
49. Varum S, Bento C, Sousa AP, Gomes-Santos CS, Henriques P, Almeida-Santos T, et al. Characterization of human sperm populations using conventional parameters, surface ubiquitination, and apoptotic markers. Fertil Steril. 2007;87(3):572-83.
50. Grunewald S, Kriegel C, Baumann T, Glander HJ, Paasch U. Interactions between apoptotic signal transduction and capacitation in human spermatozoa. Hum Reprod. 2009;24(9):2071-8.
51. Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. Hum Reprod. 2005;20(12):3459-68.
52. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Crippa A, Lappi M, Capitani S, et al. Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 2010;93(3):807-130.

53. Della Giovampaola C, Flori F, Sabatini L, Incerti L, La Sala GB, Rosati F, et al. Surface of human sperm bears three differently charged CD52 forms, two of which remain stably bound to sperm after capacitation. Mol Reprod Dev. 2001;60(1):89-96.
54. Razavi SH, Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR, Shayesteh M, Tavalaee M. Evaluation of zeta and HA-binding methods for selection of spermatozoa with normal morphology, protamine content and DNA integrity. Andrologia. 2010;42(1):13-9.
55. Kam TL, Jacobson JD, Patton WC, Corselli JU, Chan PJ. Retention of membrane charge attributes by cryopreserved-thawed sperm and zeta selection. J Assist Reprod Genet. 2007;24(9):429-34.
56. Khajavi NA, Razavi Sh, Mardani M, Tavalaee M, Deemeh MR, Nasr- Esfahani MH. Can Zeta sperm selection method, recover sperm with higher DNA integrity compare to density gradient centrifugation? IJRM. 2009;7(2):73-7.
57. Kheirollahi-Kouhestani M, Razavi S, Tavalaee M, Deemeh MR, Mardani M, Moshtaghian J, et al. Selection of sperm based on combined density gradient and Zeta method may improve ICSI outcome. Hum Reprod. 2009;24(10):2409-16.
58. Deemeh MR, Tavalaee M, Ahmadi SM, Kalantari SA, Alavi Nasab SV, Najafi MH, et al. The first report of successfully pregnancy after ICSI with combined DGC / Zeta sperm selection procedure in a couple with eleven repeated fail IVF/ICSI cycles. IJFS. 2010;4(1):41-3.
59. Ainsworth C, Nixon B, Aitken RJ. Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa. Hum Reprod. 2005;20(8):2261-70.
60. Fleming SD, Ilad RS, Griffin AM, Wu Y, Ong KJ, Smith HC, et al. Prospective controlled trial of an electrophoretic method of sperm preparation for assisted reproduction: comparison with density gradient centrifugation. Hum Reprod. 2008;23(12):2646-51.
61. Aitken RJ, Hanson AR, Kuczera L. Electrophoretic sperm isolation: optimization of electrophoresis conditions and impact on oxidative stress. Hum Reprod. 2011;26(8):1955-64.
62. Ainsworth C, Nixon B, Jansen RP, Aitken RJ. First recorded pregnancy and normal birth after ICSI using electrophoretically isolated spermatozoa. Hum Reprod. 2007;22(1):197-200.
63. Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, et al. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. Biol Reprod. 2006;74(3):530-7.
64. Sakkas D, Mariethoz E, St John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. Exp Cell Res. 1999;251(2):350-5.
65. Said TM, Land JA. Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. Hum Reprod Update. 2011;17(6):719-33.
66. Said TM, Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, Baumann T, Kriegel C, et al. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. Reprod Biomed Online. 2005;10(6):740-6.
67. Said TM, Grunewald S, Paasch U, Rasch M, Agarwal A, Glander HJ. Effects of magnetic-activated cell sorting on sperm motility and cryosurvival rates. Fertil Steril. 2005;83(5):1442-6.
68. Dirican EK, Ozgün OD, Akarsu S, Akin KO, Ercan O, Uğurlu M, et al. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. J Assist Reprod Genet. 2008;25(8):375-81.
69. Tavalaee M, Deemeh MR, Arbabian M, Nasr-Esfahani MH. Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection? J Assist Reprod Genet. 2012;29(1):31-8.
70. Zahedi A, Tavalaee M, Deemeh MR, Azadi L, Fazilati M, Nasr-Esfahani MH. Zeta potential vs apoptotic marker: which is more suitable for ICSI sperm selection? J Assist Reprod Genet. 2013;30(9):1181-6.
71. Polak de Fried E, Denaday F. Single and twin ongoing pregnancies in two cases of previous ART failure after ICSI performed with sperm sorted using annexin V microbeads. Fertil Steril. 2010;94(1):351.e15-8.
72. Rawe VY, Boudri HU, Alvarez Sedó C, Carro M, Papier S, Nodar F. Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. Reprod Biomed Online. 2010;20(3):320-3.
73. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. J Androl. 2002;23(1):1-8.
74. Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL, Franco JG Jr. Comparison of day 2 embryo quality after conventional ICSI versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) using sibling oocytes. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2010;150(1):42-6.
75. Lo Monte G, Murisier F, Piva I, Germond M, Marci R. Focus on intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI): a mini-review. Asian J Androl. 2013;15(5):608-15.

76. Souza Setti A, Ferreira RC, Paes de Almeida Ferreira Braga D, de Cássia Sávio Figueira R, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Intracytoplasmic sperm injection outcome versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcome: a meta-analysis. Reprod Biomed Online. 2010;21(4):450-5.
77. Sallam H, Farrag A, Agameya A, Ezzeldin F, Eid A, Sallam A. The use of a modified hypo-osmotic swelling test for the selection of viable ejaculated and testicular immotile spermatozoa in ICSI. Hum Reprod. 2001;16(2):272-6.
78. Ved S, Montag M, Schmutzler A, Prietl G, Haidl G, van der Ven H. Pregnancy following intracytoplasmic sperm injection of immotile spermatozoa selected by the hypo-osmotic swelling-test: a case report. Andrologia. 1997;29(5):241-2.
79. Stanger JD, Vo L, Yovich JL, Almahbobi G. Hypo-osmotic swelling test identifies individual spermatozoa with minimal DNA fragmentation. Reprod Biomed Online. 2010;21(4):474-84.
80. Bassiri F, Tavalaee M, Shiravi AH, Mansouri S, Nasr-Esfahani MH. Is there an association between HOST grades and sperm quality? Hum Reprod. 2012;27(8):2277-84.
81. Charehjooy N, Najafi MH, Tavalaee M, Deemeh MR, Azadi L, Shiravi AH, et al. Selection of sperm based on hypo-osmotic swelling may improve ICSI outcome: a preliminary prospective clinical trial. Int J Fertil Steril. 2014;8(1):21-8.