

ارتباط بین نوع اسپرم و مورفولوژی زیگوت‌های پیش‌هسته‌ای در چرخه‌های تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم

مهناز آذرینیا^۱، فاطمه قاسمیان^{۱،*}، محمدهادی بهادری^۳

^۱ تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه بیولوژی

^۲ رشت، مرکز آموزشی درمانی الزهرا، مرکز درمان ناباروری

^۳ رشت، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۱۲

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۱۶

چکیده

انتخاب جنین‌ها براساس ارزیابی معیارهای مورفولوژیکی در مرحله پیش‌هسته‌ای می‌تواند خطر حاملگی چندقلویی را کاهش دهد. این مطالعه اثر نوع اسپرم انسان استفاده شده برای تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) بر مورفولوژی زیگوت‌های پیش‌هسته‌ای را بررسی می‌کند. اسپرم‌ها بعد از آماده‌سازی به روش گرادینت آماده‌سازی شد و ارزیابی و به الیگواسپرمی، نرئوزواسپرمی، آستنوزواسپرمی و الیگواسپرمی تقسیم شدند. الگوی دو پیش‌هسته‌های حاصل ثبت و مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که در گروه تخمک‌های تزریق شده با اسپرم‌های طبیعی (نرئوزواسپرمی) افزایش معنی‌داری در میزان دو پیش‌هسته‌ها با درجات Z1 و Z2 مشاهده شد ($P \leq 0.01$). تزریق‌های انجام شده با اسپرم‌های از نوع الیگوزواسپرمی، آستنوزواسپرمی و الیگواسپرمی نیز افزایش معنی‌داری را در شکل‌گیری دو پیش‌هسته‌های حاصل به ترتیب با درجه Z1، Z2، درجه Z2 و درجه Z3 نشان دادند ($P \leq 0.05$). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نوع اسپرم استفاده شده در ICSI می‌تواند بر مورفولوژی و درجه زیگوت‌های دو پیش‌هسته‌ای تاثیر داشته باشد. نوع دو پیش‌هسته تشکیل شده می‌تواند با کیفیت جنین‌های حاصله مرتبط باشد. بنابراین در مواردی که کیفیت اسپرم پایین باشد باید در انتخاب اسپرم با مورفولوژی بهتر دقت بیشتری اعمال شود.

واژه‌های کلیدی: مورفولوژی اسپرم، دو پیش‌هسته، ICSI، باروری

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۳۳۳۳۲۸۷۲۴، پست الکترونیکی: ghasemian.21@gmail.com

مقدمه

توسعه چندین روش ارزیابی در جهت افزایش انتخاب بهترین جنین‌ها و بهبود میزان حاملگی و لانه‌گزینی شده است. معمولاً انتخاب جنین‌ها براساس معیارهای مورفولوژیکی است که بعد از لقاح ارزیابی می‌شود و شامل ارزیابی جنین در هر دو مرحله پیش‌هسته‌ای و کلیواژ است. از این رو مطالعات زیادی در رابطه با حوادث مرتبط با میزان تکوین، من جمله رفتار پیش‌هسته‌ای و هسته‌ای،

میزان لانه‌گزینی به دنبال استفاده از روش‌های کمک باروری (ART) (Assisted Reproductive Technique) در طی سال‌های گذشته افزایش یافته است. علی‌رغم این موفقیت، هنوز بیش از یک جنین به طور همزمان انتقال داده می‌شود که این امر خطر حاملگی چندقلویی را افزایش می‌دهد. اگرچه هنوز در بسیاری از کشورها قوانینی در راستای انتقال یک جنین اجرا می‌شود، و بدین منظور تمایل به انتخاب بهترین جنین دارند که این امر منجر به

فراگمنتاسیون بلاستومر، و چند هسته‌ای بودن بلاستومرها صورت گرفته است.

تصاویر مرتبط با حرکات پیش هسته‌ای و هسته‌ای اولین بار توسط Wright و همکاران و Van Blerkom توصیف شده است. مورفولوژی پیش هسته‌ای به عنوان یک سیستم نمره‌بندی برتر پیش هسته‌ای در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند در جهت انتخاب جنین‌های مناسب استفاده شود. نمرات موجود در این سیستم با تکوین مطلوب جنین‌ها همانند میزان بالای حاملگی و لانه‌گزینی مرتبط می‌شود.

چندین سیستم مختلف نمره‌بندی پیش هسته‌ای توسط آزمایشگاه‌های ART مختلف پیشنهاد شده است، و به منظور انتخاب جنین‌هایی با کیفیت بسیار بالا استفاده می‌شود. با این وجود هیچگونه سیستم درجه‌بندی استاندارد برای درجه‌بندی زیگوت‌ها به طور رایج وجود ندارد. میزان موفقیت قابل ملاحظه‌ای ما بین آزمایشگاه‌ها وجود دارد در حالیکه کنترل کردن کیفیت جنین‌ها با چالش مواجه است. یک سیستم نمره‌بندی ثابت، مانند سیستم نمره‌بندی پیش هسته‌ای در ترکیب با دیگر مارکرهای تکوینی جنین و وضعیت بیمار می‌تواند در تعیین تعداد مطلوب جنین برای انتقال مفید باشد. این موضوع می‌تواند منجر به افزایش در میزان حاملگی و لانه‌گزینی شود، و در عین حال میزان بالای حاملگی‌های چندقلویی را کاهش می‌دهد (۵ و ۶).

در سال‌های اخیر، تحقیقات زیادی در جهت ارزیابی مورفولوژی پیش هسته‌ای به منظور انتخاب جنین‌های تقریباً زنده و مناسب گرایش یافته است. چرا که ارزیابی مورفولوژی پیش هسته‌ای با میزان لانه‌گزینی و حاملگی مرتبط است. به طوریکه سیاست‌های عمومی انتقال جنین‌های حاصل از IVF (In-vitro Fertilization) به رحم در روز بعد از برداشت تخمک (مرحله دو پیش هسته‌ای)، در بسیاری از مراکز پذیرفته شده است و میزان حاملگی قابل مقایسه‌ای را اثبات نموده‌اند (۱). مطالعات نشان داده است که تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم‌های انتخاب شده با

مورفولوژی طبیعی منجر به افزایش کیفیت زیگوت و جنین می‌شود (۱۰). در مطالعه‌ای که توسط Demirel و همکارانش صورت گرفت اثر منبع اسپرم استفاده شده برای تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (اسپرم‌های انزال شده و بیضه‌ای) بر تصاویر مورفولوژیکی زیگوت‌های پیش‌هسته‌ای، که اساس سیستم نمره‌بندی پیش هسته‌ای برای انتخاب جنین‌های بهتر جهت انتقال است، مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه مشاهده شد که منبع اسپرم تأثیری بر تصاویر مورفولوژیکی زیگوت‌های پیش هسته‌ای ندارد، اما نمره‌بندی پیش هسته‌ای در هر دو گروه با نمره کیفیت جنین در روز ۲ مرتبط است (۱). همچنین اطلاعات جهت نشان دادن ارتباط بین مورفولوژی جنین‌های پیش هسته‌ای و میزان حاملگی و زایمان تلفیق یافته است. با توجه به این، زیگوت‌های پیش هسته‌ای انسان حاصل از IVF براساس آرایش پیش هسته‌ها، قطبیت هستک‌ها، هتروژنسیته سیتوپلاسمی و حفره‌های مرکزی و حول پیش هسته‌ای، در امتداد با وجود اولین تقسیم کلیوآزی نمره بندی شده است (۷). این سیستم نمره‌بندی با میزان لانه‌گزینی و زایمان در انتقالات مرحله پیش هسته‌ای ارتباط مستقیمی دارد. بنابراین به نظر می‌رسد که انتخاب جنین‌های زنده و شایسته در مرحله‌ای چون تکوین پیش هسته‌ای، زمانیکه ژنوم‌های پدری و مادری هنوز به طور فیزیکی مجزا هستند امکانپذیر باشد (۱).

در این مطالعه سعی شده است که بررسی شود آیا نوع اسپرم استفاده شده برای تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) (Intracytoplasmic Sperm Injection) بر مورفولوژی زیگوت‌های پیش هسته‌ای در جهت انتخاب جنین‌های بهتر برای انتقال تأثیر می‌گذارد؟

مواد و روشها

این مطالعه شامل ۱۰۲۱ تخمک متافاز II (MII)، تخمک بالغ (بالغ) بدست آمده از ۱۳۰ چرخه ICSI (بیمار) است. تعداد تخمک‌ها در گروه‌های نرموزواسپرمی، ۲۰۰ تخمک (۲۶)

یک سلول اسپرم از نظر مورفولوژیکی طبیعی در نظر گرفته می‌شد. چنانچه سرطبیعی باشد (شکل طبیعی، اندازه طبیعی، دارا بودن یک آکروزوم، و فقدان نقایص دم یا قطعه میانی).

سایر ارزیابی‌های اسپرم شامل ارزیابی تحرک یا پیچش کم دم، نقایص عمده‌ای که در اسپرم غیرطبیعی از نظر مورفولوژی ثبت شده بود مانند (سر طویل یا باریک در مقایسه با حالت طبیعی حداقل دو برابر در عرض کوچکتر هستند)، سر بی شکل (انحراف مورفولوژی سر از حالت طبیعی)، گردن شکسته (محور طولی سر حداقل ۳۰ درجه از محور قطعه میانی با یک نقطه شکسته بین سر و قطعه میانی منحرف شده است) و وجود قطرات سیتوپلاسمی (بدون توجه به اندازه قطره نسبت به اندازه سر) اجرا شد. سپس لوله حاوی نمونه اسپرم در CO_2 ۵٪، رطوبت بالای ۹۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تا زمان ICSI انکوبه شد.

تحریک تخمدان و جمع‌آوری تخمک

تنها چرخه‌های تحریک شده با رژیم طولانی آنالوگ هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) همراه با هورمون تحریک‌کننده فولیکول (FSH) و با گنادوتروپین منوپوزال انسانی (HMG) در این مطالعه ارزیابی شد. هورمون گنادوتروپین جفتی انسان (hCG) به صورت یک دوز منفرد ۱۰۰۰ IU زمانیکه قطر متوسط فولیکول‌ها به ۲۰ میلی‌متر می‌رسد و در حضور حداقل دو فولیکول با قطر بزرگتر از ۱۸ میلی‌متر تزریق شد. ۳۶ ساعت بعد از تزریق hCG برداشت تخمک با استفاده از برداشت تخمک هدایت شده با اولتراسونوگرافی واژنی صورت گرفت. برداشت سلول‌های تاجی شعاعی و کومولوس احاطه‌کننده تخمک با استفاده از یک مرحله آنزیمی هیالورونیداز و به دنبال برهنه کردن مکانیکی از طریق پیتاژ کردن انجام شد.

بیمار)، الیگوزواسپرمی، ۲۷۴ تخمک (۳۲ بیمار)، آستنوزواسپرمی، ۲۴۱ تخمک (۳۱ بیمار) و الگواستنوزواسپرمی، ۳۰۶ تخمک (۴۱ بیمار) بوده است. دوره جمع‌آوری اطلاعات از آذر ۱۳۹۰ تا خرداد ۱۳۹۱ می‌باشد. این تحقیق براساس قوانین کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی گیلان و در بخش درمان ناباروری مرکز آموزش درمانی الزهرا (س) رشت انجام شد و فرم رضایت نامه توسط بیماران تکمیل شد. میانگین سن مردان 36 ± 3 سال و سن زنان 33 ± 2 سال بود.

آماده‌سازی اسپرم: منی انزال شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به منظور مایع شدن انکوبه شد. برای جداسازی اسپرم از سیمین و سلول‌های مرده، مایع سمینال به روش گرادینت دو لایه‌ای شستشو داده می‌شود. به این ترتیب که: ۱،۵ میلی‌لیتر از اسپرم گرید ۹۰٪ در پایین لوله و ۱،۵ میلی‌لیتر از اسپرم گرید ۴۵٪ رقیق شده در محیط $GIVF^{PLUS}$ حاوی ۱۰٪ سرم آلبومین انسانی (Vitrolife، سوئد) در بالای لوله به آرامی قرار داده می‌شود. سپس حدود یک میلی‌لیتر از سیمین به آرامی روی دو لایه قرار داده شده و در $600g - 300g$ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ می‌شود. پلیت و بخشی از محیط لایه پایینی به آرامی برداشته شده و در لوله‌ای دیگر ریخته می‌شود و دوبار با محیط $GIVF^{PLUS}$ (۳۰۰ g، ۵ دقیقه) شستشو داده شد، و پلیت نهایی در محیط به وسیله پیتاژ کردن به صورت سوسپانسیون آماده می‌شود.

پنج میکرولیتر از این سوسپانسیون برداشته شد و غلظت، مورفولوژی و تحرک مطابق معیارهای سازمان جهانی سلامت (World Health Organization:WHO) مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۶). نمونه‌ها به الیگواسپرمی ($10^6 \text{ sperms/ml} < 20$)، نرموزواسپرمی (10^6 sperms/ml) و الگواستنوتراوتوزواسپرمی ($10^6 \times 20 >$) (با تحرک کم) و الگواستنوتراوتوزواسپرمی (با تعداد و تحرک کم و مورفولوژی ضعیف) تقسیم شدند.

زمان شکل می‌گیرند). وجود دو پیش هسته (2PN) نشان دهنده لقاح تخمک‌ها بود. مورفولوژی دو پیش هسته بر اساس سیستم نمره‌بندی توسعه یافته توسط اسکات و همکاران درجه بندی شد (۸) (جدول ۱). چنانچه جنین‌هایی با کیفیت رضایت بخش از نظر مورفولوژیکی در دسترس بود، ۲ یا ۳ جنین حدود ۴۸ ساعت بعد از تزریق درون حفره رحمی جایگزین شد. تامین فاز لوتئال با تزریق پروژسترون ایجاد شد. جنین‌های اضافی با کیفیت خوب مورفولوژیکی در مرحله کلیواژ در روز ۲ یا ۳ منجمد شد.

آنالیز آماری: در تمام موارد از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ آزمون کای دو به عنوان آزمون آماری استفاده شد و سطح معنی‌دار بودن، $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

همه تخمک‌هایی که برای ICSI استفاده شدند در لحظه تزریق بالغ بودند و مورفولوژی طبیعی داشتند و ICSI مطابق روش توصیف شده انجام شد (۱۵).

در این روش مقدار کمی از اسپرم در قطره PVP ریخته شده تا حرکت اسپرم کند شود. سپس با استفاده از سوزن تزریق اسپرم غیرمتحرک و به داخل سوزن منتقل می‌شود. با استفاده از سوزن نگهدارنده تخمک نگه داشته می‌شود. به طوریکه جسم قطبی در موقعیت ساعت ۱۲ یا ۶ قرارگیرد. بدنبال آن اسپرم با استفاده از سوزن تزریق به آرامی به داخل تخمک تزریق می‌شود.

تخمک‌های تزریق شده در محیط $G1^{PLUS}$ کشت داده شدند. تلقیح تخمک‌های تزریق شده حدود ۱۶ تا ۱۸ ساعت بعد از ICSI مورد بررسی قرار گرفت (دو پیش هسته‌ها در این

جدول ۱- سیستم نمره‌بندی پیش هسته‌ای توسعه یافته توسط Scott و همکاران.

درجه Z	شرح مورفولوژیکی
Z1	PN یکسان تعداد و اندازه هستک‌های برابر (طیفی بین ۳ و ۷) همه‌ی هستک‌ها در ناحیه اتصال پیش هسته‌ها در هر دو پیش هسته آرایش یافته‌اند
Z2	PN یکسان تعداد و اندازه برابر هستک‌ها (طیفی بین ۳ و ۷) هستک‌ها در هر دو PN آرایش نیافته‌اند.
Z3	PN یکسان تعداد برابر و اندازه یکسان و/یا غیر یکسان هستک‌ها (طیفی از ۳ و ۷) هستک‌ها در ناحیه اتصال پیش هسته‌ای در یک PN آرایش یافته و در PN دیگر آرایش نیافته است.
Z4	تعداد نابرابر هستک‌ها یا هستک‌های پراکنده شده یا PN قرار گرفته به طور غیر مرکزی

هسته در هر گروه مشاهده و ثبت شد (جدول ۲). نتایج نشان داد که در گروه تخمک‌های تزریق شده با اسپرم‌های طبیعی، تشکیل دو پیش هسته با گریدهای Z1، Z2، Z3 و Z4 به ترتیب ۳۳،۳۳٪، ۳۶،۸۴٪، ۲۱،۰۵٪ و ۸،۷۷٪ بود که تفاوت معنی‌داری بین دو پیش هسته‌ها با درجات Z1 و Z2 مشاهده نشد ($P > 0.05$). اما نسبت به درجات Z3 و Z4

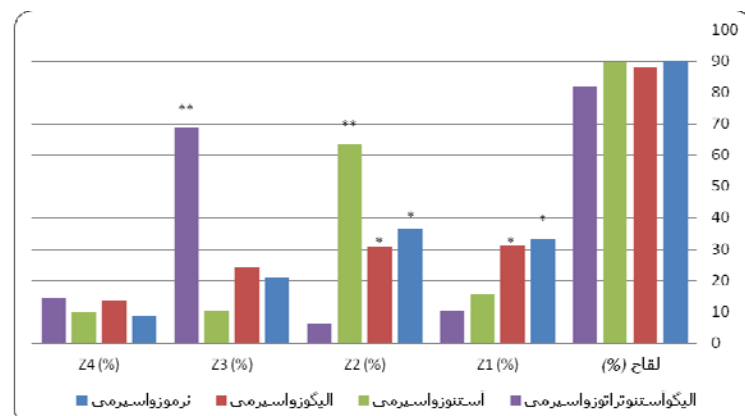
نتایج

در این مطالعه تخمک‌های بالغ با استفاده از انواع اسپرم‌ها (نرموزواسپرمی، الیگوزواسپرمی، آستوزواسپرمی، الیگواستونوتراتوزواسپرمی) مورد تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم قرار گرفتند. ۱۶-۱۸ ساعت بعد، الگوی دو پیش

آستنواسپرمی افزایش معنی‌داری نسبت به سایر درجات Z1، Z3 و Z4 داشت (۶۳٫۶۸٪، $P \leq 0.05$). همچنین در گروه تخمک‌های تزریق شده با اسپرم‌هایی از نوع الیگواستنوتراتوزواسپرمی درجه دو پیش‌هسته‌ای با گرید Z3 افزایش معنی‌داری نسبت به سایر درجات دو پیش‌هسته‌ای داشت (۶۸٫۷۵٪، $P \leq 0.01$).

افزایش معنی‌داری داشتند ($P \leq 0.01$). در گروه تزریق شده با اسپرم‌های از نوع الیگواسپرمی نیز افزایش معنی‌داری در دو پیش‌هسته‌های حاصل با درجه Z1 و Z2 (به ترتیب ۳۱٫۴۶٪ و ۳۰٫۷۶٪) نسبت به درجات Z3 و Z4 (به ترتیب ۲۴٫۰۷٪ و ۱۳٫۷۶٪) مشاهده شد ($P \leq 0.05$).

همانطور که در نمودار ۱ نیز مشاهده می‌شود دو پیش‌هسته‌های با درجه Z2 در گروه تخمک‌های تزریق شده با



نمودار ۱- ارتباط بین نوع اسپرم و میزان لقاح و کیفیت زیگوت‌های حاصل. $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$.

جدول ۲- تاثیر نوع اسپرم استفاده شده در ICSI بر میزان لقاح و کیفیت زیگوت‌های حاصل

نوع اسپرم	درصد لقاح	Z1%	Z2%	Z3%	Z4%
نرموزواسپرمی	۹۰٫۱۲	*۳۳٫۳۳	*۳۶٫۸۴	۲۱٫۰۵	۸٫۷۷
الیگوزواسپرمی	۸۷٫۹	*۳۱٫۴۶	*۳۰٫۷۶	۲۴٫۰۷	۱۳٫۷۶
آستنوزواسپرمی	۸۹٫۴	۱۵٫۷۸	**۶۳٫۶	۱۰٫۵۲	۱۰٫۰۸
الیگواستنوتراتوزواسپرمی	۸۱٫۸۷	۱۰٫۵	۶٫۲۵	**۶۸٫۷۵	۱۴٫۵

* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$

باشد. به طوریکه اسپرم‌های طبیعی درجات بالایی از زیگوت‌های Z1 و Z2 را نشان می‌دادند. این در حالی بود که درجات زیگوت حاصل از الیگواستنوتراتوزواسپرمی بسیار ضعیف بود.

تلاش‌هایی جهت مشخص نمودن فاکتورهای بالقوه‌ای که ممکن است سیستم نمره‌بندی پیش‌هسته‌ای را تحت تاثیر قرار دهد، صورت گرفته است. مشخص شده که مادرهای جوانتر درجه پیش‌هسته‌ای بالاتری در مقایسه با والدین مسن‌تر دارند (۷).

در بین گروه‌ها تفاوتی در سن متوسط زنان و مردان، تعداد تخمک‌های برداشت شده، مدت ناباروری، تعداد آمپول‌های گنادوتروپین تزریق شده و مدت تحریک تخمدانی وجود نداشت.

بحث

در سال ۱۹۹۸، ارتباط بین مورفولوژی زیگوت پیش‌هسته‌ای و میزان لانه‌گزینی ارزیابی شد (۷). در این مطالعه دیده شد که نوع اسپرم استفاده شده در ICSI می‌تواند بر مورفولوژی و درجه زیگوت‌های مرحله 2PN تاثیر داشته

عملکردی بر توانایی سلول‌ها جهت رشد و عملکرد نیز اثر دارد (۲ و ۴).

جنین‌هایی با تعداد برابر NPB، Z1 و Z2، تکوین و مورفولوژی طبیعی دارند. فقدان قطبیت در NPB در جنین‌های Z3 و Z4 یک معیار مورفولوژیکی از فقدان قطبیت کروماتین است که منجر به تکوین غیرطبیعی، آهسته‌تر و بسیار ضعیف می‌شود.

در سال ۱۹۹۸ ارتباط بین مورفولوژی جنین پیش‌هسته‌ای و میزان لانه‌گزینی برای ۱۱۴ سیکل مرسوم IVF که از سیاست انتقال جنین یک روزه برخوردار بودند ارزیابی شد (۷). در این مطالعه تصاویر قابل توجه مورفولوژی پیش‌هسته برای لانه‌گزینی، در ۱۸-۱۶ ساعت بعد از لقاح، که پیش‌هسته‌ها به طور نزدیکی قرار گرفته بودند، هستک‌ها در سطح داخلی پیش‌هسته‌ها و تراکم سیتوپلاسم حول هسته‌ای وجود داشت مورد ارزیابی قرار گرفت. در گذشته نشان داده شد که این تصاویر پیش‌هسته‌ای با میزان بهبود یافته‌ای از حاملگی مرتبط می‌باشد (۱۷ و ۱۳). یک سیستم نمره‌بندی بر اساس ارزیابی این تصاویر مورفولوژیکی پیش‌هسته‌ای در ارتباط با احتمال دستیابی به حاملگی پیدا شده بود (۷).

بعد از لقاح، پیش‌هسته‌ها یک حالت دینامیک درون سیتوپلاسم را نشان می‌دهد. در مطالعه‌ای بر توالی حوادث در جریان لقاح بعد از ICSI، دیده شد که بعد از تشکیل پیش‌هسته مذکر در مرکز اووپلاسم، پیش‌هسته مونث به تدریج از نقطه تشکیلش نزدیک دومین جسم قطبی به سمت پیش‌هسته مذکر حرکت می‌کند تا اینکه هر دو به هم برسند.

در فازهای اولیه از تکوین پیش‌هسته‌ای، هستک‌ها کوچک، فراوان هستند و به طور تصادفی درون پیش‌هسته‌ها توزیع شده‌اند. با گذشت زمان تعدادشان کاهش می‌یابد، و هستک‌ها بزرگ‌تر شده و در امتداد سطح آرایش می‌یابند و تحت عنوان حالت قطبی شده نامیده می‌شود

در این مطالعه اثر نوع اسپرم (نرموزواسپرمی، الیگوزواسپرمی، آستنوزواسپرمی و الیگواستنوزواسپرمی) بر مورفولوژی پیش‌هسته‌ای بررسی شد. چرا که مطالعات نشان داده است، تفاوت در نوع اسپرم در بسته‌بندی DNA هسته‌ای ممکن است زمانبندی فرایند لقاح را تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین، تفاوت فرضی در غلظت فاکتورهای اسپرم فعال‌کننده‌ی تخمک می‌تواند منتج به تفاوت در زمانبندی فعال‌سازی تخمک شود (۱۱).

همچنین حرکت پیش‌هسته‌ای به وسیله میکروتوبول‌های آستر اسپرم تنظیم می‌شود. عدم فرارگیری پیش‌هسته‌ها در مجاورت هم ممکن است به واسطه سانتروزوم ناقص اسپرم، نقص کیفی یا کمی، باشد که اثر مستقیمی بر فرایند لقاح دارد. گزارش شده است که زیگوت‌های پیش‌هسته‌ای با نمره پایین با توقف تکوینی در ۲۴-۲۶ ساعت بعد از تزریق اسپرم مواجه می‌شوند (۱۳).

ارزیابی پتانسیل تکوین و لانه‌گزینی جنین‌ها از اهمیت بالایی برای انتخاب جنین‌ها جهت انتقال برخوردار است، به طوری که میزان حاملگی بالایی در ارتباط با تعداد کم حاملگی‌های چندقلویی حاصل می‌شود. از این رو درجه-بندی زیگوت‌ها و جنین‌های مرحله کلیواژ جهت شناسایی و انتخاب جنین‌ها برای انتقال پیشنهاد شده است (۳). یکی از مهمترین پارامترهای ارزیابی شده در مورفولوژی زیگوت وجود اجسام پیش‌ساز هستکی (NPB) (Nucleolar Precursor Bodies) در جریان تشکیل پیش‌هسته است. مطالعات قبلی اثر این پارامترها را بر جنین در حال تکوین نشان داده است (۹). یکی از جنبه‌ها: تعداد برابر NPB ما بین هسته‌ها یک حادثه ضروری در هر سلول میتوزی است. تعداد نامساوی NPB منتج به چرخه‌های غیرطبیعی سلول می‌شود که ممکن است اساس سلول‌های سرطانی شود (۵). عدم هماهنگی در تعداد و الگوی NPB ما بین هسته‌ها نیز منجر به فقدان قطبیت می‌شود (۱۴). پیوستگی و بازسازی هستک‌های

مطالعه‌ای که توسط Demirel و همکارانش (۲۰۰۱) صورت گرفت تفاوتی در درجه پیش هسته‌های زیگوت از هر دو نوع اسپرم استفاده شده برای ICSI (اسپرم انزال شده و بیضه‌ای) مشاهده نشد. تصاویر پیش هسته‌ای هر کدام یک توزیع مشابهی را در هر گروه از اسپرم‌ها نشان دادند (۱).

در مجموع، در این مطالعه تصاویر مورفولوژی جنین‌های دو پیش هسته‌ای حاصل به دنبال استفاده از انواع مختلف اسپرم متفاوت بوده که می‌تواند پتانسیل تکوینی متفاوتی داشته باشد که متعاقباً بر پتانسیل لانه‌گزینی نیز تاثیر داشته باشد. اسپرم‌هایی با پارامترهای متفاوت مورفولوژیکی و حرکتی ممکن است دارای نقایص کیفی و کمی متفاوتی باشد که متعاقباً بر کیفیت زیگوت و جنین تاثیر می‌گذارد.

تشکر و قدردانی

از زحمات تمامی همکاران محترم بخش IVF مرکز آموزشی درمانی الزهرا (س) رشت، دانشگاه علوم پزشکی گیلان کمال تشکر و قدردانی می‌گردد.

(۱۲). در جریان رشد پیش هسته‌ای اندامک‌ها از قسمت قشری به سمت مرکز تخمک متراکم می‌شود و ناحیه قشری شفاف را به وجود می‌آورد.

ثبات کروماتین اسپرم به وسیله دفسفریله شدن پروتامین در انتهای اسپرماتوزن و با تشکیل پل‌های دی سولفید داخل و بین مولکولی ما بین پروتامین‌ها در جریان عبور اپی دیدیمی فراهم می‌شود.

هم‌طور که در بالا ذکر شد حرکت پیش هسته‌ای به وسیله میکروتوبول‌های آستر اسپرم تنظیم می‌شود. مهاجرت و آرایش مجاور هم پیش هسته‌ها تحت کنترل سانتروزوم تازه تشکیل شده زیگوت، ناحیه سازمان دهنده میکروتوبول تخمک است. بنابراین فقدان آرایش پیش هسته‌ای ممکن است به واسطه سانتروزوم ناقص اسپرم، هر نقص کمی یا کیفی باشد که اثر مستقیمی بر فرایند لقاح دارد. عدم موفقیت در رشد پیش هسته‌ای نیز یک پدیده عمومی در جریان لقاح با اسپرم‌های نابالغ است. عدم موفقیت در رشد و مهاجرت پیش هسته‌ای مانع از تکوین طبیعی می‌شود. یک اختلاف مشهود اندازه ما بین دو پیش هسته یک عدم هماهنگی ما بین مراحل تکوینی این دو را پیشنهاد می‌کند (۱).

منابع

- Demirel, L. C., Evirgen, O., Aydos, K., and Unlu, C., 2001. The impact of the source of spermatozoa used for ICSI on pronuclear morphology. Hum. Reprod. 16, PP: 2327-2332.
- Depa-Martynow, M., Jdrzejczak, P., and Pawelczyk, L., 2007. Pronuclear scoring as a predictor of embryo quality in *in vitro* fertilization program. Folia. Histochem. Cytobiol. 45, PP: 85-89.
- Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., Gaiswinkler, U., Wiesinger, R., Puchner, M., and Tews, G., 2003. Presence, but not type or degree of extension, of a cytoplasmic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behavior. Hum. Reprod. 11, PP: 1406-1412.
- Gamiz, P., Rubio, C., de los Santos, M. J., Mercader, A., Simon, C., Remohi, J., and Pellicer, A., 2003. The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos. Hum. Reprod. 18, PP: 2413-2419.
- Scott, L., 2003. Pronuclear score as a predictor of embryo development. Reprod. BioMed. Online. 6, PP: 201-14.
- Scott, L., 2003. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. Hum. Reprod. Update. 9: 237-49.
- Scott, L. A., and Smith, S., 1998. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. Hum. Reprod. 13, PP: 1003-1013.
- Scott, L., Alvero, R., Leondires, M., and Miller, B., 2000. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. Hum. Reprod. 15, PP: 2394-403.
- Senn, A., Urner, F., Chanson, A., Primi, M. P., Wirthner, D., and Germond, M., 2006.

- Morphological scoring of human pronuclear zygotes for prediction of pregnancy outcome. *Hum. Reprod.* 21, PP: 234-239.
10. Setti, A. S., Braga, D. P., Figueira, R. C., Iaconelli, A. Jr., and Borges, E. Jr., 2012. The predictive value of high-magnification sperm morphology examination on ICSI outcomes in the presence of oocyte dysmorphisms. *J Assist. Reprod. Genet.* 29(11), PP: 1241-1247.
 11. Stice, S. L., and Roble, J. M., 1990. Activation of mammalian oocytes by a factor obtained from rabbit sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 25, PP: 272-280.
 12. Tesarik, J., and Kopečný, V., 1989. Development of human male pronucleus: ultrastructure and timing. *Gamete. Res.* 24, PP: 135-149.
 13. Van Blerkom, J., 1990. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J. Electron. Microsc. Techn.* 16, PP: 324-46.
 14. Van Blerkom, J., Davis, P., and Alexander, S., 2000. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Hum. Reprod.* 15, PP: 2621-33.
 15. Van Steirteghem, A. C., Nagy, Z., Joris, H., Liu, J., Staessen, C., and Smitz, J., 1993. High fertilization and implantation rate after ICSI. *Hum. Reprod.* 8, PP: 1061-1066.
 16. World Health Organization. 2010. Department of Reproductive Health and research. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth edition. ISBN: 978 92 4 154778 9.
 17. Wright, G., Wiker, S., Elsner, C., Kort, H., Massey, J., Mitchell, D., Toledo, A., and Cohen, J., 1990. Observations on the morphology of pronuclei and nucleoli in human zygotes and implications for cryopreservation. *Hum. Reprod.* 5, PP: 109-15.

The correlation between sperm type and pronucleate zygote morphology in intracytoplasmic sperm injection cycles

Azarnia M.¹, Ghasemian F.^{1,2} and Bahadori M.H.³

Biology Dept., Biology Faculty, Kharazmi University, Tehran, I.R. of Iran

Infertility Therapy Center, Alzahra Educational and Remedial Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, I.R. of Iran

Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, I.R. of Iran

Abstract

Embryo selection based on morphological criteria assay in pronucleus stage can decrease multiple pregnancy risk. This study evaluates the effect of human sperm type used for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) on pronucleate zygote morphology. Sperms were processed via gradient method and evaluated and divided as oligozoospermia, normozoospermia, asthenozoospermia and oligoasthenoteratozoospermia. The pattern of resulted pronucleus were recorded and studied. The results indicated that oocytes injected with normal sperms (normozoospermia) showed significantly increase in rate of Z1 and Z2 two pronuclear grades ($P \leq 0.01$). In the injections with oligospermia, asthenospermia, and oligoasthenoteratospermia were shown significantly increase in pronuclear grades of Z1 and Z2, Z2, and Z3 respectively ($P \leq 0.05$). This study's results indicate that the sperm type used for ICSI can influence morphology and grade of pronucleate zygote. The formed two pronucleus type may correlate resulted embryo quality. Therefore, if the quality of sperm be low, the selection of better morphology sperms should care more.

Key words: Sperm morphology, Two pronucleus, ICSI, Fertility.