

مقایسه مرفولوژی اسپرم در نمونه‌های بدست آمده از TESE و PESA در مردان نابارور مراجعه کننده به بخش نازایی بیمارستان شریعتی و

کلینیک نوید در سال ۱۳۷۸

حجت الله سعیدی سعید آبادی (Ph.D.)^۱، اشرف آل یاسین (M.D.)^۲، مرضیه آقا حسینی (M.D.)^۲
افسانه خادمی (M.D.)^۲، حمید صاحب کشاف (M.D.)^۳، سعید صاحب کشاف (M.D.)^۳
امید پویان (M.D.)^۲

۱- استادیار آزمایشگاه IVF بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- استادیار گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- استادیار کلینیک باروری، ناباروری نوید

چکیده

در این مطالعه مرفولوژی اسپرم بدست آمده با دو روش TESE و PESA مورد بررسی قرار گرفت. این مرفولوژی، با کمک Tygerberg strict criteria بررسی شد. ۴۵ بیمار مبتلا به آواسپرمی انسدادی مورد بررسی قرار گرفتند. روش TESE و PESA با روش معمول و بی حسی موضعی انجام شد. درصد اسپرم طبیعی و اسپرم غیر طبیعی در هر دو گروه بدست آمد. میانگین میزان اسپرم طبیعی در نمونه های TESE ۶/۲ درصد و در نمونه PESA ۱۸/۶ درصد بود که این دو عدد با هم اختلاف آماری معنی دار داشت. درصد اشکال غیر طبیعی سرودم نیز در دو گروه با هم اختلاف معنی داری داشت ولی این اختلاف در مورد اختلالات midpiece صدق نمی کرد. جهت بررسی ارزش روش Tygerberg در تعیین مرفولوژی اسپرم بدست آمده از TESE، نیاز به نمونه کنترل گروه سالم است.

گل واژگان: شکل اسپرم، اسپرم، PESA، TESE

آدرس مکاتبه: تهران، بیمارستان شریعتی، بخش باروری و ناباروری

مقدمه

امروزه تقریباً برای تمام موارد اختلالات شدید اسپرم می‌توان از روش ICSI^۱ استفاده کرد. در حال حاضر PESA^۲ همراه ICSI برای درمان آزواسپرمی انسدادی موفقیت قابل توجهی بدست آورده است (۱). روش دیگر، بدست آوردن اسپرم از بیضه است که با نام TESE^۳ جایگاه خود را در درمان آزواسپرمی انسدادی باز کرده است (۲). آنچه که اساس انتخاب اسپرم مورد استفاده برای ICSI را تعیین می‌کند شکل طبیعی و حرکت فعال اسپرم است (۳). از طرفی احتمال منفی بودن نتیجه PESA زیاد است. نتیجه ۳-۵۵ درصد از اعمال PESA TESE غیر موفق هستند (۴، ۵). در نتیجه نیاز به انجام TESE الزامی می‌شود. مورفولوژی اسپرم در نمونه‌های PESA و TESE نیز با معیار Tygerberg^۴ سنجیده می‌شود (۶). با توجه به اهمیت تشخیص شکل طبیعی اسپرم، برای انجام ICSI ابتدا لازم است مطالعاتی توصیفی از نظر وضعیت اسپرموگرام با کمک معیار Tygerberg از نمونه‌های مختلف PESA و TESE انجام شود و تا دید بازتری نسبت به نمونه‌های PESA و TESE بدست آید.

مواد و روشها

در این مطالعه ۴۵ بیمار مبتلا به آزواسپرمی مورد بررسی قرار گرفتند که اختلال اسپرموگرام آنها با حداقل دو نوبت آزمایش به فاصله ۲ ماه به اثبات رسیده بود. در تمام این بیماران شکل انسدادی آزواسپرمی با بررسی هورمونی (FSH و LH نرمال) و ژنتیکی (کاریوتیپ نرمال) به اثبات رسیده بود. PESA و یا TESE به روش معمول انجام شد (۷). نمونه‌های اسپرم بعد از آماده سازی با روش Kruger^۵ بررسی شد (۶).

معیار طبیعی برای طول سر ۴ تا ۶ میکرون و عرض

آن ۳ تا ۵ میکرون و اندازه اکروزوم بین $\frac{1}{3}$ تا $\frac{2}{3}$ طول سر در نظر گرفته شد. طول گردن بین ۶ تا ۸ میکرون و بدون وجود سیتوپلاسم اضافی و پراکندگی میتوکندریها بطور یکنواخت است. اندازه طول دم ۴۵ میکرون بدون شکستگی یا خمیدگی غیر طبیعی در انتهای دم است (۸، ۶). روش آماده سازی و بررسی اشکال اسپرم با کمک رنگ آمیزی پاپانیکولا و میکروسکوپ معکوس^۴ است. نمونه PESA ابتدا با روش شستشو^۵ معمولی آماده و به روش پاپانیکولا رنگ آمیزی شده است. در TESA بافت جدا شده از بیضه بیماران بوسیله سوزن و پیپت پاستور Dissect گردیده، سپس عصاره آن در محیط کشت قرار داده شده و برای جدا سازی اسپرم از سه لایه Percoll (۵۰٪، ۷۰٪، ۹۰٪) استفاده می‌شود. سپس با استفاده از سانتریفوژ با دور ۵۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه جدا می‌گردد. پس از رنگ آمیزی برای بررسی از میکروسکوپ معکوس استفاده می‌شود. با استفاده از کولیس بر روی مانیتور اندازه گیریهای مورد نظر انجام گرفته و ثبت می‌شود. صد عدد اسپرم در هر نمونه بررسی و اشکال طبیعی و غیر طبیعی درصد بندی می‌گردد.

نتایج

از ۴۵ بیمار آزواسپرمیک تعداد ۲۴ بیمار که تحت PESA قرار گرفته و نمونه اسپرم از آنها بدست آمد. علت آزواسپرمی در این بیماران عفونت (۷ مورد)، وازکتومی قبلی (۴ مورد) و بقیه نامعلوم (۱۳ مورد) بود، از ۲۱ بیمار دیگر که PESA در آنها موفق نبود (۴۷٪) عمل TESE انجام شد. علت انسداد در این بیماران نیز عفونت (۵ مورد)، فقدان ازدفران و یا

4- Inverted Microscopy

5- Swim-up

1- Intracellular Cytoplasmic Sperm Injection

2- Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration

3- Testicular Sperm Extraction

بدست آمده با PESA و TESE از تست Mann-Whitney استفاده شد. نتایج حاصل از انجام ART در بیماران TESE و PESA نیز در جدول شماره (۲) آورده شده است.

میانگین درصد اسپرم نرمال در موارد TESE، ۶/۲٪ و در اسپرمهای بدست آمده از PESA این میزان ۱۸/۶٪ است. اختلالات سر، اکروزوم، تنه و دم در هر گروه ثبت شده است. اشکال اسپرم به تفکیک اختلال در جدول شماره ۳ آورده شده است.

انسداد آن (۸ مورد) و نامعلوم (۸ مورد) بود. در ۱۴ مورد از موارد فوق اسپرم زنده و متحرک جدا شد و در ۷ مورد دیگر اسپرماتید بدست آمد (۳۷٪) ۷ مورد دارای اسپرماتید حذف شدند.

میانگین درصد اسپرم طبیعی و اشکال غیر طبیعی در دو گروه PESA و TESE ثبت شد (جدول ۱).
توضیح: اسپرم برخی از بیماران دارای چندین اختلال متعدد بود ولی اختلال در سر ارجح فرض شد و این نوع اسپرمها در گروه اسپرم دارای اختلال سر دسته بندی شدند. در بررسی آماری یافته های مورفولوژیک اسپرم

جدول ۱- مورفولوژی اسپرم در نمونه TESE و PESA

اسپرم بدست آمده با PESA (۲۴ مورد)	اسپرم بدست آمده با TESE (۱۴ مورد)	روش بدست آوردن اسپرم شکل و اختلال آن
۱۸/۶٪	۶/۲٪*	اسپرم طبیعی
۴۲/۹٪*	۵۴/۶٪	اختلال در سر اسپرم
۱۳/۹٪*	۲۰٪	اختلال در اکروزوم
۲۰/۲٪	۹/۵٪	اختلال در تنه اسپرم (midpiece)
۴/۴٪*	۸/۲٪	اختلال در دم اسپرم
۱۰۰٪	۱۰۰٪	جمع

+ اختلاف معنی دار است ($p < 0.05$)

* اعداد میانگین در صد ها هستند.

جدول ۲- نتایج حاصل بیماران تحت درمان با TESE یا PESA به همراه ICSI

TESE (۱۴ نفر)	PESA (۲۴ نفر)	روش
۳۱/۱ ± ۱/۹ سال	۳۰/۴ ± ۲/۲ سال	میانگین سن خانم *
۷/۶ ± ۲/۳ سال	۸/۲ ± ۱/۷ سال	میانگین مدت نازایی *
۱۰۰٪	۱۰۰٪	نوع نازایی (درصد نوع اولیه) برای مرد *
۸۰٪	۷۶٪	علت نازایی *
۲۰٪	۲۴٪	توأم
۸/۴ ± ۱/۸	۷/۸ ± ۲/۱	میانگین تعداد تخمک *
۴ نفر	۱۱ نفر	تعداد حامله +
۲۸/۶٪	۴۵/۸٪	درصد حاملگی +

+ اختلاف معنی دار است ($p < 0.05$)

* اعداد میانگین در صد ها هستند.

جدول ۳- درصد اشکال مورفولوژی طبیعی و غیرطبیعی موجود در نمونه های اسپرم TESE, PESA

درصد اسپرم بدست آمده با PESA	درصد اسپرم بدست آمده با TESE	شکل اسپرم و اختلال آن
۱۸/۶	۶/۲	طبیعی (Normal)
۲۵/۱	۴۴	بی شکل (Amorphous)
۱/۹	۲/۱	کروی (Globular)
۸/۱	۳/۵	بزرگ (Macro)
۳/۲	۱/۶	سرسوزنی (Pin hair)
۰/۷	۰/۳	سردوتائی (Duplicated head)
۱/۵	۱/۵	نایالغ (Immature)
۰/۵	-	سرواکوتلی (Vacuolated head)
۱/۱	۱/۱	سرتویل (Vacuolated head)
۰/۸	۲	سریاریک (Thin head)
۸/۷	۱۱/۲	سروکوچک (Micro acrosome)
۲/۱	۵/۴	فائد اکروزوم (Free acrosome)
۳/۱	۳/۴	اکروزوم نامنظم (Irregular acrosome)
۱۲/۵	۴/۲	حواوی سیتوپلاسم (Cytoplasmic rest)
۳/۸	۳/۱	سرزاییه دار (Angle)
۳/۹	۲/۲	گردن ضخیم (Thick neck)
۴/۴	۸/۲	اختلالات دم (Tail abnormalities)
۱۰۰	۱۰۰	مجموع (Total)

بحث

سازمان بهداشت جهانی (WHO) و توسط Kruger با نام Tygerberg strict criteria در این مورد کاربرد دارند. لازم به ذکر است که در روش Tygerberg دارای این مزیت است که اشکال غیر طبیعی بطور جداگانه ثبت شده و اشکال حد واسط نیز غیر طبیعی محسوب می شوند. مشاهده می گردد که مرفولوژی حاصل از این روش با نتایج بدست آمده از روش IVF بیشتر ارتباط دارد (۸ و ۶). به همین علت در اینجا نیز از معیار Tygerberg استفاده شده است. اما در هر حال روش اثبات شده ای برای بررسی مرفولوژیک اسپرم PESA و TESE بطور جداگانه وجود ندارد (۱۱).

اسپرم بدست آمده از بافت بیضه نسبت به اسپرم حاصل از انزال دارای بلوغ و تکامل کمتری می باشد. این عدم بلوغ می تواند خود را به اشکال مختلف نشان دهد.

در این مطالعه میزان اسپرم نرمال در گروه PESA برابر با ۱۸/۶٪ و گروه TESE برابر با ۶/۲٪ تقریباً با مطالعاتی از این نوع شبیه است (۱۰). مرفولوژی اسپرم حاصل از بافت بیضه دارای درصد طبیعی کمتری نسبت به PESA است و این اختلاف از نظر آماری معنی دار است. اغلب اشکال اسپرم غیر طبیعی در TESE نیز بیشتر از PESA است. برداشت کلی از این اعداد می تواند مؤید این موضوع باشد که اسپرم بدست آمده از TESE بدتر از PESA است. اما نتیجه گیری کلی به این شکل صحیح نیست. در ابتدا باید به این موضوع اشاره کنیم که روشهایی که در حال حاضر برای بررسی اسپرموگرام وجود دارد، برای اسپرمهای بدست آمده از طریق انزال است. دو روش ارائه شده توسط

دارای cytoplasmic rest نیز در گروه TESE بیشتر باشد، اما چون اغلب، این اختلال با اختلالات سر نیز همراه است و در گروه اختلال سر دسته بندی شده است انحراف مربوطه باعث شده که میزان اختلال تنه اسپرم در گروه TESE کمتر از PESA باشد. میزان حاملگی در گروه TESE کمتر از PESA است و این اختلاف از نظر آماری معنی دار است. علت اختلاف را می توان به دو شکل توجیه کرد. اول اینکه اسپرم TESE اساساً دارای کیفیت بدتری است و این کیفیت بد ممکن است به علت نارس بودن اسپرمها در TESE باشد. جهت تفکیک و اثبات علت اصلی، نیاز به یک گروه کنترل سالم است تا اسپرمهای بدست آمده از TESE این بیماران با بیماران دارای آزواسپرمی انسدادی مقایسه شود.

زیرا در معیار Tygerberg بسیاری از اشکال حد واسط غیر طبیعی محسوب می شوند، به همین دلیل ممکن است تعدادی از این اشکال غیر طبیعی در واقع نارس باشند. بعنوان مثال اشکال نارس با سر بزرگ (Sb₁ Stage) بعنوان غیر طبیعی (globular head) ثبت می شود، در حالیکه براساس تقسیم بندی اسپرماتوژنز یک شکل نارس بوده و غیر طبیعی نمی باشد (۱۲،۱۳). اسپرم موجود در مرحله Sb₂ - Sc اسپرماتوژنز با اسپرم دارای سر بی شکل (Amorphous head) اشتباه می شود و اسپرم مرحله Sd₁ با اسپرم Cytoplasmic rest در تشخیص افتراقی قرار می گیرد (۱۲-۱۳). در مطالعه ما در گروه TESE اختلال به شکل سر بی شکل بیشتر است که ممکن است درصدی از آن در واقع اشکال نارس باشد. انتظار می رفت که اشکال

References

- 1- Nagy Z, Liu J, Cilver S, et al. Using ejaculated fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil steril.* 1995, 63:808-15.
- 2- Schoysman R, Vanderzwalerman P, Nijs M, et al. Pregnancy after fertilization with human spermatozoa. *Lancet.* 1993, 342: 1237.
- 3- Svalander P, Jakobsson AH, Forsberg A, et al. The outcome of intracytoplasmic sperm injection in unrelated to strict criteria sperm morphology. *Hum Reprod.* 1996, 11:1019-22.
- 4- The Sperm Microaspiration Retrieval Techniques Study Group. Results in the United States with sperm microaspiration retrieval techniques and assisted reproductive technologies. *J Urol.* 1994, 151:1255-90.
- 5- Bladou F, Grillo JM, Rossi D, et al. Epididymal sperm aspiration in conjunction with *in vitro* Fertilization and embryo transfer in cases of obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 1991, 9:1284-7.
- 6- Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, et al. Sperm morphologic features as a prognostic *in vitro* fertilization. *Fertil Steril.* 1986, 46:1118-23.
- 7- Graft I, Khalifa Y, Tsirigotis M, et al. Percutaneous epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection in the management of infertility due to obstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 1995, 63:1038-42.
- 8- Kruger TF, Acosta AA, Simmons K, et al. Predictive value of abnormal sperm morphology in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril.* 1988, 49:112-7.
- 9- Hall JA, Fishel SB, Timson J, et al. Human sperm morphology evaluation pre-and post-Percoll gradient centrifugation. *Hum Reprod.* 1995, 10: 342-6.
- 10- Steele EK, Meclure N, Lewis S, et al. A comparison of the morphology of testicular, epididymal and ejaculated sperm from fertile men and men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 2000, 6:1099-1103.
- 11- Abuzaid MI, Sasy MA, Salem, et al. Testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection: a simplified method for treatment of

- obstructive azoospermia. Fertil Steril. 1997, 68:328-33 .
- 12-Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. Am J Anat. 1963, 112:35-51.
- 13-De Kretser DM. Ultrastructural features of spermiogenesis. Zell-forsch Mikrosk Anat. 1969, 98:477-505.