

تأثیر فعالیت و مورفولوژی آکروزوم بر لقاح پس از انجام ICSI

محمد حسین نصر اصفهانی (Ph.D.)^۱، شهناز رضوی (Ph.D.)^۲، غلامحسن واعظی (Ph.D.)^۳، عبدالحسین شیروی (Ph.D.)^۴،
مرضیه تولائی (M.Sc.)^۱

۱- گروه جنین‌شناسی، پژوهشکده رویان، اصفهان، ایران.

۲- مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران.

۳- گروه علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی اصفهان، اصفهان، ایران.

۴- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: عدم موفقیت در لقاح پس از انجام ICSI می‌تواند ناشی از عوامل اسپرمی، تخمکی و یا هر دو باشد. با توجه به اهمیت مورفولوژی و عملکرد آکروزوم در فعال نمودن تخمک و میزان موفقیت در لقاح، در این مطالعه رابطه بین یکسری وقایع که در طول اسپرمیوژنز رخ می‌دهد، از جمله مورفولوژی اسپرم و فعالیت آکروزوم به‌عنوان شاخص سلامت آکروزوم و توانایی اسپرم در فعال نمودن تخمک با میزان لقاح پس از انجام ICSI ارزیابی گردید.

روش بررسی: نمونه‌های سیمن از ۶۸ زوج نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان جهت انجام ICSI جمع‌آوری شد. بخشی از نمونه‌ها جهت آنالیز پارامترهای اسپرمی براساس معیار WHO و بخش اعظم آنها جهت انجام ICSI آماده گردید. باقیمانده نمونه‌ها جهت رنگ‌آمیزی پاپانیکولا و تست ژلاتینولیز به ترتیب برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم براساس Strict criteria و فعالیت آکروزوم مورد استفاده قرار گرفت. نتایج با تعیین ضریب همبستگی و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۱/۵، مورد بررسی و تحلیل قرار گرفت و در صورتی که عدد P کمتر از ۰/۰۵ بود از لحاظ آماری معنی‌دار به حساب آمد.

نتایج: نتایج حاصل از تست ژلاتینولیز نشان داد که میانگین قطر هاله از لحاظ آماری رابطه معنی‌داری با غلظت اسپرم ($r=0/343, p=0/004$)، تحرک ($r=0/282, p=0/020$)، مورفولوژی اسپرم براساس معیار

WHO ($r=-0/314, p=0/009$)، میزان لقاح ($r=0/270, p=0/026$) و درصد تشکیل هاله ($r=0/853, p=0/001$) داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه بیانگر آن است که در طی انجام ICSI، انتخاب اسپرم با آکروزوم کوچک، که احتمالاً پارامترهای تست ژلاتینولیز (میانگین قطر هاله- درصد تشکیل هاله) آن کاهش یافته، شانس موفقیت باروری را در اینگونه اسپرمها کاهش می‌دهد. از آنجایی که تست ژلاتینولیز به‌عنوان آزمون برای سلامت آکروزوم و غلاف خلف آکروزومی در نظر گرفته می‌شود، کاهش لقاح می‌تواند به علت کاهش عوامل اسپرمی فعال کننده تخمک (SAOAFs) در اینگونه اسپرمها باشد. در پایان پیشنهاد می‌شود که روش‌هایی جهت شناسایی اندازه‌گیری SAOAFs در نمونه‌های اسپرمی افراد کاندید روش‌های لقاح خارج رحمی ارائه گردد.

کلید واژگان: فعالیت آکروزوم، ICSI، لقاح، فعال شدن تخمک، مورفولوژی اسپرم.

مسئول مکاتبه: دکتر محمد حسین نصر اصفهانی، گروه جنین‌شناسی، پژوهشکده رویان، صندوق پستی: ۴۶۴-۱۹۳۹۵، تهران، ایران.

پست الکترونیک: mh_nasr@med.mui.ac.ir

زمینه و هدف

لقاح، فرایندی چند عاملی^۱ است که با ورود اسپرم به تخمک شروع می‌شود. ورود اسپرم به داخل تخمک سه نقش مهم به ترتیب شامل: انتقال ژنوم پدری، تعیین جنسیت جنین و فعال‌سازی تخمک را ایفا می‌کند. فعال‌سازی تخمک تحت تأثیر فاکتورهای اسپرمی فعال‌کننده تخمک (SAOAFs)^۲ صورت می‌گیرد. تحقیقات نشان داده است که این فاکتور در ارتباط با آکروزوم و غلاف خلف آکروزومی (تکای پری نوکلئار) اسپرم می‌باشد (۱). با ورود اسپرم به داخل تخمک و آزادسازی این فاکتور، کلسیم از ریتیکولوم اندوپلاسمی به صورت زنجیره‌ای از نوسانات مکرر^۳ آزاد می‌شود. این نوسانات ۴-۳ ساعت و گاهی تا ۲۰ ساعت با فرکانس‌های خاصی ادامه یافته و هنگام تشکیل پیش‌هسته‌ها متوقف می‌شود (۲،۲). علی‌رغم تزریق اسپرم به داخل تخمک در روش تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)^۴ میانگین درصد لقاح در این بیماران بین ۷۰-۶۰٪ گزارش شده است (۴). تصاویر میکروسکوپی الکترونی در اسپرم‌های دارای سرگرد^۵ نشان می‌دهد که احتمالاً کاهش لقاح در اینگونه نمونه‌ها به علت عدم وجود آکروزوم و مخصوصاً غلاف خلف آکروزومی در ارتباط می‌باشد که در نهایت منجر به فعال نشدن تخمک می‌گردد (۵،۶). به علاوه، عدم موفقیت در لقاح را می‌توان به نقایص آکروزومی و محتویات آکروزین نسبت داد (۷). بنابراین اینگونه اسپرم‌ها نه تنها قابلیت نفوذ به تخمک را ندارند، بلکه فاکتورهای فعال‌کننده تخمک در ارتباط با آکروزوم و غلاف خلف آکروزومی (تکای پری نوکلئار) در آنها ناقص است (۹،۸). با توجه به اهمیت این موضوع، به جز چند گزارش تزریق اسپرم به تخمک موش جهت بررسی قدرت فعال‌سازی تخمک،

آزمونی برای اندازه‌گیری SAOAFs در این مطالعات یافت نشد و از آنجایی که SAOAFs در غلاف خلف آکروزومی قرار دارد و این غلاف در ارتباط مستقیم با آکروزوم است، لذا این مطالعه با بررسی سلامت آکروزوم به روش آزمون ژلاتینولیز به‌طور غیرمستقیم، تأثیر آن را بر لقاح بررسی نموده است (۱۰).

در طی روند ICSI، انتخاب اسپرم براساس مورفولوژی و تحرک آنها صورت می‌گیرد. همچنین شایان ذکر است که در طی سال‌های گذشته، مطالعات متعددی در زمینه فعالیت آکروزین و مورفولوژی اسپرم گزارش شده و مشخص گردیده است که بین مورفولوژی آکروزوم طبیعی (درصد اشکال طبیعی) با فعالیت آکروزین رابطه وجود دارد (۱۱). برخی معتقدند مورفولوژی آکروزوم حساسیت بیشتری نسبت به مورفولوژی سر اسپرم در پیشگویی لقاح آزمایشگاهی دارد (۱۲،۱۳)؛ در حالیکه عده‌ای معتقدند، ارزیابی شاخص‌های آکروزومی نمی‌تواند به‌طور صحیح میزان لقاح را مشخص نماید (۱۴). بنابراین اندازه آکروزوم می‌تواند نقش مهمی در تعیین مورفولوژی طبیعی در لقاح آزمایشگاهی (IVF)^۶ داشته باشد (۱۵). لذا هدف از این مطالعه بررسی تأثیر فعالیت آکروزین براساس آزمون ژلاتینولیز به‌عنوان شاخص سلامت آکروزوم و توانایی اسپرم در فعال ساختن تخمک و مورفولوژی اسپرم براساس Strict criteria بر روی میزان لقاح در بیماران کاندید ICSI می‌باشد.

روش بررسی

۱. آماده‌سازی اسپرم: نمونه‌های مایع منی از ۶۸ زوج نابارور مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان از مهرماه سال ۱۳۸۴ تا اردیبهشت ماه ۱۳۸۵ جهت انجام ICSI جمع‌آوری شد. مایع منی در روز تخمک‌گذاری، پس از ۴-۳ روز پرهیز از مقاربت آماده

- 1- Multifactorial
- 2- Sperm Associated Oocyte Activating Factors
- 3- Oscillation
- 4- Intracytoplasmic Sperm Injection
- 5- Globozoospermic

6- In Vitro Fertilization

تعداد تخمک‌های لقاح یافته نسبت به کل تخمک‌های تزریق شده محاسبه شد. تمامی بیماران انتخابی برای این مطالعه حداقل دارای چهار تخمک بالغ بودند که فرآیند ICSI را به سلامت گذراندند. شایان ذکر است تمامی محیط‌های مورد استفاده در میکرواینجکشن محصول شرکت Vitrolife سوئد بود.

۳. *تست ژلاتینولیز: فعالیت آکروزوم به‌عنوان شاخص سلامت آکروزوم توسط تست ژلاتینولیز ارزیابی شد (۱۷).* براساس این تست $20 \mu\text{l}$ از ژلاتین ۰.۵٪ بر روی اسلایدها کشیده شده، سپس در هوای خشک و در دمای 4°C به مدت یک شب نگهداری گردید. بعد از آن اسلایدها با گلو تار آلدیید ۰.۰۵٪ (Merck, Germany) فیکس و دو بار با PBS شستشو داده شدند. $20 \mu\text{l}$ مایع منی شستشو شده با نسبت ۱:۱۰ در PBS حاوی $150 \mu\text{M}$ گلوکز، رفیق گردید و اسمیری از این اسپرم بر روی اسلایدهای پوشیده شده توسط ژلاتین، تهیه و در محیط مرطوب در دمای 37°C به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. برای هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های دارای هاله و قطر آنها (بر حسب میکرومتر) با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست و توسط نرم‌افزار Olysia (Olympus, Japan) محاسبه گردید. بدین ترتیب که پس از تصویر برداری، قطر هاله‌ها براساس میکرومتر مشخص و در جدول Olysia ثبت شد. سپس میانگین آنها توسط این نرم‌افزار محاسبه گردید (شکل ۱).

۴. *بررسی مورفولوژی اسپرم: مورفولوژی اسپرم براساس Strict criteria مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۸).* بر این اساس، نمونه‌های سیمن شستشو داده شده، با استفاده از تکنیک پاپانیکولا رنگ‌آمیزی گردید.

آنالیز مورفولوژی اسپرم شامل ارزیابی اندازه سر اسپرم، شکل و محیط در برگیرنده آکروزومی می‌باشد. در این مطالعه اسپرم‌هایی طبیعی در نظر گرفته شد که دارای سربیزی با محیطی صاف، طولی معادل

بخشی از نمونه‌های منی جهت آنالیز پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی) با استفاده از میکروسکوپ نوری و براساس معیار WHO بررسی شد (۱۵) و بخش اعظم آن با استفاده از دوگردیان غلظتی Pure Sperm (۴۰:۸۰) (Nidacone, Gothenburg, Sweden) جهت انجام ICSI آماده گردید (۱۶). لازم به‌ذکر است تمامی مواد مصرفی در این مطالعه بجز موارد اشاره شده در متن از شرکت سیگما (USA) تهیه گردید.

۲. *تزریق اسپرم به درون سیتوپلاسم تخمک: بعد از تخمک‌گیری، تخمکها در محیط G-MOPS که حاوی هیالورونیداز است، قرار داده شد. سپس تخمکها در G-MOPS تازه شسته شده و به زیر روغن در داخل یک پتری‌دیش (Falcon, BD) برای میکرواینجکشن منتقل گردیدند. به‌علاوه اسپرم شسته شده به محیط ICSI 100 (محیطی غلیظ جهت تسهیل کار برای اسپرم) منتقل گردید.*

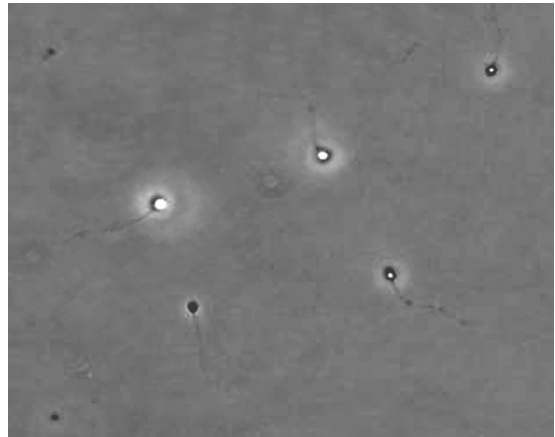
از میکرومانیپلاتور اپندروف نصب شده روی میکروسکوپ اینورت (Nikon) برای تزریق اسپرم استفاده شد. بدین ترتیب اسپرم با بهترین مورفولوژی و تحرک از جمعیت اسپرمی انتخاب شده و پس از بی‌حرکت شدن، اسپرم به‌داخل یک پیپت تزریق، کشیده شد و سپس به‌داخل تخمک تزریق گردید. تزریق معمولاً ۲-۳ ساعت پس از جمع‌آوری تخمکها صورت می‌گرفت. تخمک‌های تزریق شده در محیط G1 انکوبه شدند. پس از ۱۸-۱۶ ساعت، میزان لقاح براساس وجود یا عدم وجود تشکیل پرونوکلئوسها در هر گروه تعیین گردید. در ضمن زیگوت‌هایی که دارای ۱ PN و ۲ PN یا بیشتر بودند، از این مطالعه حذف شدند. به‌علاوه در این مطالعه بیماران که دارای تخمک‌های وزیکول ژرمینال، دژنره، گرانولار، بدون جسم قطبی و واکوئله یا دفرمه بودند، حذف شدند تا تأثیر فاکتورهای تخمکی در مطالعه به حداقل ممکن برسد. درصد لقاح براساس

آن بین ۷۰-۴۰٪ سر اسپرم باشد. اگر آکروزوم کمتر از ۳۰٪ و یا بیشتر از ۷۰٪ باشد، به ترتیب به عنوان موارد غیرطبیعی شامل: آکروزوم کوچک^۱ و آکروزوم بزرگ^۲ در نظر گرفته می‌شود (۱۱). برای هر نمونه حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد.

آنالیز آماری: آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون آماری ضریب همبستگی و محاسبه شاخص‌های توصیفی توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱/۵ انجام گرفت و در صورتی که $p\text{-value} < 0/05$ بود، از لحاظ آماری معنی‌دار محسوب شد.

نتایج

نمونه‌های مایع منی از ۶۸ زوج نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان کاندیدای انجام ICSI دریافت شد. میانگین سن مردان مورد مطالعه $34 \pm 4/5$ سال و همسران آنها $30 \pm 4/7$ سال بود. نتایج حاصل از ارزیابی پارامترهای اسپرم، تست ژلاتینولیز و میزان لقاح در جدول ۱ نشان داده شده است. میزان لقاح در این مطالعه بین ۱۰۰-۰ و میانگین آن $69/58 \pm 26/05$



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

$4-5 \mu m$ ، قطری برابر با $2/5-3/5 \mu m$ آکروزوم ۷۰-۴۰٪ اندازه سر اسپرم و فاقد آنومالی در ناحیه گردن و دم بود. اگر قطرات سیتوپلاسمی بیشتر از ۳۰٪ اندازه سر اسپرم باشد، اسپرم غیرطبیعی محسوب می‌شود.

مورفولوژی آکروزوم اسپرم براساس ویژگی‌های اندازه و شکل بوسیله میکروسکوپ نوری ارزیابی گردید. آکروزومی نرمال محسوب می‌گردد که شکلی بیضی با محیطی صاف داشته باشد و اندازه آکروزوم

جدول ۱- مشخصات پارامترهای مایع منی، تست ژلاتینولیز، مورفولوژی اسپرم و میزان لقاح در بیماران کاندیدای ICSI مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان

میانگین و انحراف معیار M±SD	حداکثر	حداقل	تعداد نمونه	تعداد- میانگین پارامترها
$54/71 \pm 25/04$	۱۱۰	۵	۶۸	غلظت اسپرم ($1 \times 10^6/ml$)
$46/57 \pm 14/61$	۷۰	۵	۶۸	درصد تحرک اسپرم
$36/41 \pm 12/97$	۶۲	۰	۶۸	درصد مورفولوژی غیر طبیعی (WHO)
$21/16 \pm 11/46$	۶۶	۲	۵۶	درصد مورفولوژی غیر طبیعی (Strict Criteria)
$24/73 \pm 11/63$	۶۹	۴	۵۶	درصد سر طبیعی (Strict Criteria)
$76/80 \pm 8/99$	۱۰۰	۴۵	۵۶	درصد آکروزوم نرمال
$19/95 \pm 9/11$	۵۳	۴	۵۵	درصد آکروزوم کوچک
$3/25 \pm 3/40$	۱۷	۱	۳۶	درصد آکروزوم بزرگ
$76/53 \pm 15/49$	۱۰۰	۳۵	۶۸	درصد هاله
$12/00 \pm 3/11$	۱۷/۲۰	۵/۰۱	۶۸	میانگین قطر هاله (μm)
$69/58 \pm 26/05$	۱۰۰	۰	۶۴	درصد لقاح بعد از ICSI

- 1- Small acrosome
2- Large acrosome

جدول ۲- رابطه بین پارامترهای مختلف اسپرم با درصد تشکیل هاله، میانگین قطر هاله و میزان لقاح

میزان لقاح		میانگین قطر هاله		درصد تشکیل هاله		درصد تشکیل پارامترها
P-value	r	P-value	r	P-value	r	
۰/۲۷۷	۰/۱۲۸	۰/۰۰۴*	۰/۳۴۳	۰/۰۹۱	۰/۲۰۶	غلظت اسپرم ($10^6/ml$)
۰/۱۴۷	۰/۱۸۳	۰/۰۲۰*	۰/۲۸۲	۰/۱۱۸	۰/۱۹۱	درصد تحرک اسپرم
۰/۰۲۴*	۰/۲۸۲	۰/۰۰۹*	۰/۳۱۴	۰/۰۳۲*	۰/۲۶۰	درصد مرفولوژی غیرطبیعی (WHO)
۰/۷۱۴	۰/۰۵۲	۰/۴۰۹	۰/۱۱۲	۰/۵۱۰	۰/۰۹۰	درصد مرفولوژی غیرطبیعی (Strict criteria)
۰/۶۳۷	۰/۰۶۶	۰/۱۳۱	۰/۲۰۵	۰/۱۰۴	۰/۲۱۹	درصد آکروزوم نرمال
۰/۷۲۵	۰/۰۵۰	۰/۰۷۳	۰/۲۴۴	۰/۰۹۰	۰/۲۳۱	درصد آکروزوم کوچک
۰/۶۴۸	۰/۰۸۲	۰/۳۵۵	۰/۱۵۹	۰/۴۲۳	۰/۱۳۸	درصد آکروزوم بزرگ
۰/۱۲۷	۰/۱۹۳	۰/۰۰۱*	۰/۸۵۳	-----	-----	درصد تشکیل هاله
۰/۰۲۶*	۰/۲۷۰	-----	-----	۰/۰۰۱*	۰/۸۵۳	میانگین قطر هاله (μm)
-----	-----	۰/۰۲۶*	۰/۲۷۰	۰/۱۲۷	۰/۱۹۳	درصد لقاح پس از ICSI

* $p < 0.05$, $r =$ Correlation coefficient

مورفولوژی اسپرم براساس Strict criteria با درصد تشکیل هاله، میانگین قطر هاله و میزان لقاح رابطه‌ای وجود نداشت (جدول ۲).

بحث

تحقیقات نشان داده است که تزریق اسپرم به داخل تخمکی که در متافاز II است به تنهایی جهت لقاح و تکامل جنین کافی نیست و فاکتورهای دیگری از جمله سلامت غشاء اسپرم، کیفیت کروماتین، مورفولوژی اسپرم تزریق شده و قدرت فعال‌سازی تخمک در این امر تأثیر دارند (۱۹). اگرچه بیشتر از ۸۰٪ تخمک‌های لقاح نیافته بعد از ICSI حاوی اسپرماتوزو می‌باشند، ولی عدم لقاح در این تخمکها را می‌توان به عدم توانایی تخمک در انجام یکسری وقایع بیوشیمیایی متوالی که جهت فعال شدن تخمک لازم است، نسبت داد (۲۰). عدم توانایی فعال شدن تخمک در ارتباط با فاکتورهای اسپرمی، تخمکی و یا هر دو می‌تواند باشد. در مطالعه حاضر فاکتورهای تخمکی که ممکن است بر فعال شدن تخمک تأثیر داشته باشند، با استفاده از به کارگیری پروتکلی یکسان جهت تحریک تخمک‌گذاری به حداقل رسانیده شد. همچنین در مواردی که کیفیت تخمک

است. در این مطالعه حداقل غلظت اسپرم ۵ میلیون در هر میلی‌لیتر بود.

مورفولوژی اسپرم بر طبق Strict criteria و معیارهای WHO سنجیده شد. درصد مورفولوژی طبیعی اسپرم بین ۶۶-۲٪ بود. وضعیت آکروزوم برای هر اسپرم به صورت طبیعی، کوچک و بزرگ گروه‌بندی گردید. در این مطالعه متوسط درصد آکروزوم طبیعی $76/8 \pm 8/99$ ، آکروزوم کوچک $19/95 \pm 9/11$ و آکروزوم بزرگ $3/25 \pm 3/40$ بود.

فعالیت آکروزین براساس تست ژلاتینولیز ارزیابی شد و براساس آن میانگین قطر هاله و درصد تشکیل هاله مورد بررسی قرار گرفت. از لحاظ آماری بین میانگین قطر هاله با غلظت اسپرم، مورفولوژی غیرطبیعی (WHO)، تحرک، میزان لقاح و درصد تشکیل هاله رابطه معنی‌داری بدست آمد ($p < 0.02$). همچنین از لحاظ آماری رابطه معنی‌داری بین درصد تشکیل هاله با مورفولوژی طبیعی (WHO) وجود داشت ($p < 0.022$)، اما با سایر پارامترها رابطه معنی‌داری یافت نشد. به علاوه در این مطالعه رابطه معنی‌داری بین مورفولوژی غیر طبیعی (WHO) با میزان لقاح پس از ICSI مشاهده شد ($p < 0.024$) در صورتی که بین

نامناسب و یا درصد تخمک‌های نارس بالا بود، آنها از مطالعه حذف گردیدند.

عدم موفقیت در لقاح را می‌توان به فاکتورهای اسپرمی که شامل مورفولوژی اسپرم و نقایص آکروزومی اسپرم است، نسبت داد (۲۴-۲۱). آکروزوم و غلاف خلف آکروزومی یا تکای پری نوکلئار، به‌طور همزمان در اواخر اسپرمیورژن تشکیل می‌شود (۲۵). به‌علاوه فقدان Ca^{2+} ، Oscilin و یا عدم حضور آکروزین در اسپرم‌هایی با سر گرد گزارش شده است (۲۶). فعالیت آکروزین به‌عنوان شاخص سلامت آکروزوم مطرح می‌باشد. این تست بر پایه توانایی آنزیم‌های آکروزومی برای هیدرولیز کردن پروتئین‌های با وزن مولکولی بالا شبیه ژلاتین است (۲۷).

Henkel و همکارانش در سال ۱۹۹۵ نشان دادند که میزان فعالیت آکروزین با استفاده از آزمون ژلاتینولیز (میانگین قطر هاله) با میزان لقاح در روش IVF ارتباط دارد (۱۷). همچنین در این مطالعه رابطه معنی‌داری بین میانگین قطر هاله و میزان لقاح ($r=0/27$, $p=0/02$) به دست آمد. اما رابطه‌ای بین درصد تشکیل هاله و میزان لقاح نشان داده نشد. این نتایج بیانگر این موضوع است که نمونه‌های اسپرمی با فعالیت آکروزین بالا، شانس بیشتری را در القای فعال شدن تخمک و در نهایت افزایش میزان لقاح دارند. از طرف دیگر، اسپرم با فعالیت آکروزین بالا می‌تواند با مقدار مناسبی از فعالیت SAOAFs باعث القای طبیعی فعال شدن تخمک و در نهایت لقاح گردد (۲۷، ۲۴، ۸، ۷). در واقع عدم مشاهده رابطه معنی‌دار بین درصد تشکیل هاله و میزان لقاح در این مطالعه می‌تواند ناشی از این مطلب باشد که در طی انجام ICSI، معمولاً اسپرم با آکروزوم طبیعی انتخاب می‌شود و اسپرم‌هایی که دارای آکروزوم کوچک هستند، شانس لقاح کمتری دارند. در این بررسی از بین پارامترهای مورد مطالعه، رابطه‌ای بین درصد آکروزوم طبیعی، آکروزوم کوچک و آکروزوم بزرگ با میزان

لقاح بعد از ICSI مشاهده نشد. این موضوع احتمالاً به دلیل انتخاب معیار مورفولوژی در ICSI است.

Kruger و همکاران گزارش نمودند که مورفولوژی اسپرم خصوصاً مورفولوژی آکروزوم و توانایی آن در اتصال به زونا معیار خوبی جهت پیشگویی میزان موفقیت در لقاح می‌باشد (۱۸). همچنین در این مطالعه رابطه‌ای بین درصد اندازه آکروزوم کوچک با میانگین قطر هاله و درصد تشکیل هاله مشاهده شد؛ اما از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p=0/09$, $p=0/073$). در این مطالعه، بین مورفولوژی طبیعی اسپرم که مطابق معیار WHO سنجیده شد، با درصد تشکیل هاله و میانگین قطر هاله از لحاظ آماری ارتباط معنی‌داری مشاهده شد، ولی بر طبق ارزیابی با Strict criteria و بین مورفولوژی اسپرم و درصد تشکیل هاله و میانگین قطر هاله رابطه‌ای بدست نیامد. که می‌تواند ناشی از این مطلب باشد که در طی ارزیابی مورفولوژی براساس Strict criteria، اسپرم با ناهنجاری‌های جزئی مانند عدم قرارگیری دم در امتداد محور سر به‌عنوان غیرطبیعی در نظر گرفته شده است و در طی مراحل ICSI، به‌علت عدم توانایی تشخیص نقایص جزئی مورفولوژی اسپرم، یک تخمک می‌تواند با اسپرمی که از لحاظ آکروزوم، طبیعی ولی دارای سر آمورف جزئی است، لقاح یابد. El-Ghobashy و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که ارزیابی همزمان مورفولوژی سر اسپرم، اندازه آکروزوم، وجود واکوئل‌های آکروزومی و توانایی انجام واکنش آکروزومی در پیشگویی میزان موفقیت در نتایج لقاح به‌طریق IVF اهمیت دارد (۱۲).

اگرچه در فرآیند لقاح طی انجام ICSI، از دست دادن محتویات آکروزوم به‌عنوان یک امتیاز محسوب می‌شود؛ ولیکن وجود غلاف خلف آکروزومی که در مجاورت آکروزوم سالم و حاوی SAOAFs است، لازمه لقاح می‌باشد (۱۰). بر این اساس در مطالعات اخیر Bartoov و همکاران مشاهده شد که با استفاده از

امر منجر به کاهش میزان لقاح می‌گردد. حتی در اینگونه نمونه‌ها اگر اسپرم دارای آکروزوم با اندازه طبیعی جهت تزریق استفاده شود به علت پایین بودن سطح SAOAFs در آن، همچنان شانس موفقیت در لقاح پایین خواهد بود.

تشکر و قدردانی

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

سیستم تصویربرداری مخصوص، در طی ICSI بین مورفولوژی اسپرم‌های تزریق شده با میزان موفقیت در لقاح رابطه معنی‌داری وجود دارد. همچنین مشخص شد که طبیعی بودن مورفولوژی هسته اسپرم (سر) نه تنها با افزایش میزان موفقیت در لقاح بلکه در افزایش میزان حاملگی هم موثر است (۲۹).

از آنجایی که ساختار غلاف آکروزومی در ارتباط با ساختار آکروزومی است، نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که کاهش فعالیت آکروزین و اندازه آکروزوم با عدم موفقیت در لقاح ارتباط دارد. اگرچه انتخاب اسپرم جهت تزریق براساس تحرک و مورفولوژی است ولی در مجموع چنین می‌توان استنباط نمود که نمونه‌هایی که دارای درصد بالایی از آکروزوم کوچک و یا فعالیت آکروزین (میانگین قطر هاله و درصد تشکیل هاله) آنها پایین است، میزان SAOAFs یا قدرت فعال‌سازی تخمک در آنها پایین می‌باشد که این

References

- 1- Dozortsev D, De Sutter P, Rybouchkin A, Dhont M. Timing of sperm and oocyte nuclear progression after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1995; 10:3012-7.
- 2- Ozil JP, Huneau D. Activation of rabbit oocyte: The impact of the ca²⁺ signal regime on development. *Development.* 2001;128:917-928.
- 3- Williams CJ. Signaling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Hum Reprod Update.* 2002;8(4):313-321.
- 4- Zhang J, Wang CW, Blaszczyk A, James A. Electrical activation and in vitro development of human oocytes that fail to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1999;72 (3):509-512.
- 5- Yamano S, Koji N, Toshihoro A. Fertilization failure and oocyte activation. *J Med Inves.* 2000;47:1-8.
- 6- Rybouchkin AV, Sutter PD, Straeten FV, Dhont M. Fertilization and pregnancy after assisted oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection in a case of round headed sperm associated with deficient oocyte activation capacity. *Fertil Steril.* 1997;68(6):1144-7.
- 7- Escalier D. Failure of differentiation of the nuclear-perinuclear skeletal complex in the round-headed human spermatozoa. *Int J Dev Biol.* 1990;34:287-97.
- 8- Courtot AM. Presence and localization of the 60 KD calicin in human spermatozoa presenting postacrosomal sheath defects: preliminary results. *Mol Reprod Dev.* 1991;28:272-9.
- 9- Tesarik J, Sousa M, Testart J. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1994;9:511-8.
- 10- Takeuchi T, Colombero LT, Neri QV, Rosenwaks Z, Palermo GD. Does ICSI Require acrosomal disruption? An ultrastructural study. *Hum Reprod.* 2004;19(1): 114-7.
- 11- Menkveld R, Rhemrev JP, Franken DR, Vermeiden JP. Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis: relation with acrosin activity, morphology (strict criteria), and fertilization in vitro. *Fertil Steril.* 1996;65:637-44.
- 12- El-Ghobashy AA, Christopher R. The human sperm head: A key for successful fertilization. *J Androl.* 2003; 24:232-38.
- 13- Menkveld R, Stander FSH, Kruger TF. Comparison between acrosome index and Teratozoospermia index as additional criteria to sperm morphology in the prediction of expected in vitro fertilization outcome. *Hum Reprod.* 1998;13:52.

- 14- Soderlund B, Lundin K. Acrosome index is not an absolute predictor of the outcome following conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet.* 2001;18:483-89.
- 15- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press. 1999.
- 16- Szczygiel M, Kurpisz M. Teratozoospermia and its effect on male fertility potential. *Andrologia.* 1999;31: 63-75.
- 17- Henkel R, Muller C, Miska W, Schill WB, Kleinstein J, Gips H. Acrosin activity of human spermatozoa by means of a simple gelatinolytic technique: a method useful for IVF. *J Androl.* 1995; 16(3):272-7.
- 18- Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1986;46:1118-23.
- 19- De Vos A, De Velde HV, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2003;79 (1):42-48.
- 20- Tesarik J, Testart J. Treatment of sperm-injected human oocytes with Ca²⁺ ionophore supports the development of Ca²⁺ oscillations. *Biol Reprod.* 1994; 51:385-91.
- 21- Liu DY, Baker HW. Relationships between human sperm acrosin, acrosome, morphology and fertilization in vitro. *Hum Reprod.* 1990;5:298-303.
- 22- Menkveld R, El-Garem Y, Schill WB, Henkel R. Relationship between human sperm morphology and acrosomal function. *J Assist Reprod Genet.* 2003;20: 432-8.
- 23- Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A., Moghdam A. Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. *Andrologia.* 2003;35:238-43.
- 24- Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Mardani M, Bahramian H, Steger K, Oreizi F. Effect of protamine-2 deficiency on ICSI outcome. *Reprod Biomed Online.* 2004b;9:652-8.
- 25- Longo FJ, Krohne G, Franke WW. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *J Cell Biol.* 1987;105:1105-20.
- 26- Tesarik J. Molecular mechanisms of fertilization: the re-opening of the search for oscilin. *Contracept Fertil.* 1998;6(26):693-5.
- 27- Welker B, Bernstein GS, Diedrich K, Nakamura RM, Krebs D. Acrosomal proteinase activity of human spermatozoa and relation of results to semen quality. *Hum Reprod.* 1988;2:75-80.
- 28- Lalonde L, Langlais J, Antaki P, Chapdelaine A, Roberts KD, Bleau G. Male infertility associated with round-headed acrosomeless spermatozoa. *Fertil Steril.* 1988;49:316-21.
- 29- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cell is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl.* 2002;23:1-8.