Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

Comparison of PAWP between separated spermatozoa based on density gradient centrifugation and Zeta potential

Elham Sadeghi-Dormiani[1], Shima Khakpour Esfahani[1], Marziyeh Tavalaee[1], Maryam Arbabian[1], Mehrnoosh Bahadorani[2], Mohammad Hossein Nasr- Esfahani [1,3*]

[1]Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Reproductive Biomedicine Research Center, Department of Reproductive Biotechnology, Isfahan, Iran
[2]Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
[3]Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran
*Corresponding author; E-mail: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

Received: 22 February 2017 Accepted: 18 June 2017 First Published online: 5 March 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 April-May; 41(1):47-55

Abstract

Background: Density gradient centrifugation (DGC) and Zeta procedures are used for separation of normal sperm for treatment of infertility. Previous studies showed that Zeta method was more efficient in separation of normal sperm with intact chromatin compared to DGC. In this study, we aimed to compare postacrosomal sheath WW domain-binding protein (PAWP) protein as one of the factors involved to oocyte activation between two methods.

Methods: Semen samples were collected from 23 men with normal sperm parameters (concentration, motility and morphology) according to World Health Organization criteria. Semen samples were washed with VitaSperm media and each sample were divided into three groups; control, DGC and Zeta. The percentage and intensity of PAWP were assessed by flow cytometry for each group. In addition, localization of PAWP in spermatozoa was detected by immunostaining procedure.

Results: Percentage of PAWP-positive spermatozoa was significantly higher in separated spermatozoa from DGC procedure in comparison with control and Zeta groups ($P<0.001$), while intensity of PAWP was significantly ($P<0.001$) higher in separated spermatozoa from Zeta method in comparison with control and DGC procedures. PAWP appear to be localized mainly in equatorial segment and post acrosome sheath of sperm head in all the groups.

Conclusion: The Zeta method could separate low percentage of PAWP-positive spermatozoa compared to DGC method but such sperm appear higher intensity of PAWP than DGC. Therefore, separated spermatozoa by Zeta method possibly has better chance in activation of oocyte. However, further studies are needed to confirm this result.

Keyword: Zeta, DGC, PAWP, Sperm Parameters.

How to cite this article: Sadeghi-Dormiani E, Khakpour Esfahani Sh, Tavalaee M, Arbabian M, Bahadorani M, Nasr- Esfahani M H. [Comparison of PAWP between separated spermatozoa based on density gradient centrifugation and Zeta potential]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 April-May;41(1):47-55. Persian.

© 2019 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

مقایسه پروتئین PAWP بین اسپرم‌های جدا شده بر اساس سانتریفیوژ شیب غلظت و پتانسیل Zeta

الهام صادقی درمیانی[۱]، شیما خاکپور اصفهانی[۱]، مرضیه تولائی[۱]، مریم اربابیان[۱]، مهرنوش بهادرانی[۲]، محمد حسین نصراصفهانی[۳،۱*]

[۱]پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری تولید مثل، اصفهان، ایران
[۲]گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
[۳]مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران
[*]نویسنده مسئول؛ ایمیل: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۴ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۲۸ انتشار برخط: ۱۳۹۷/۱۲/۱۴
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۸؛ ۴۱(۱):۴۷-۵۵

چکیده

زمینه: روش‌های سانتریفیوژ شیب غلظت (DGC) و Zeta جهت جداسازی اسپرم‌های طبیعی جهت درمان ناباروری استفاده می‌شود. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که روش Zeta بیشتر در جداسازی اسپرم‌های طبیعی با کروماتین سالم نسبت به DGC مؤثر است. در این مطالعه، هدف ما مقایسه پروتئین متصل شونده به دامنه WW صفحات خلف آکروزومی (PAWP) بعنوان یکی از فاکتورهای مرتبط در فعال شدن تخمک، بین دو روش می‌باشد.

روش‌کار: نمونه مایع منی از ۲۳ مرد با پارامترهای اسپرمی طبیعی (غلظت، تحرک و مورفولوژی) بر اساس معیار سازمان بهداشت جهانی جمع‌آوری شد. نمونه مایع منی با محیط VitaSperm شسته و هر نمونه به سه گروه کنترل، DGC و Zeta تقسیم شدند. درصد و شدت PAWP در هر گروه با استفاده از فلوسایتومتری ارزیابی شد. بعلاوه، مکان PAWP در اسپرم‌ها توسط روش ایمنواستینینگ تعیین گردید.

یافته‌ها: درصد اسپرم‌های PAWP مثبت بطور معنی‌داری در اسپرم‌های جدا شده از روش DGC در مقایسه با گروه های کنترل و Zeta بیشتر بود ($P<۰/۰۰۱$)، در صورتی که شدت PAWP بطور معنی‌داری در اسپرم‌های جدا شده از روش Zeta در مقایسه با روش DGC و کنترل بیشتر بود. پروتئین PAWP بطور عمده در قطعه استوایی و صفحات خلف آکروزومی سر اسپرم در همه گروه‌ها قرار دارد.

نتیجه‌گیری: اگرچه روش Zeta درصد پایین‌تری از اسپرم‌های PAWP مثبت را در مقایسه با روش DGC جداسازی می‌کند اما این اسپرم ها شدت بیشتری از PAWP را نسبت به روش DGC آشکار نموده‌اند. لذا اسپرم‌های جدا شده به روش Zeta، احتمالاً شانس بیشتری در فعال شدن تخمک را دارند. با این حال مطالعات بیشتری جهت تأیید این نتایج لازم است.

کلید واژه‌ها: زتا، سانتریفیوژ شیب غلظت، PAWP، پارامترهای اسپرمی.

نحوه استناد به این مقاله: صادقی درمیانی ا، خاکپور اصفهانی ش، تولائی م، اربابیان م، بهادرانی م، نصراصفهانی م ح. مقایسه پروتئین PAWP بین اسپرم‌های جدا شده بر اساس سانتریفیوژ شیب غلظت و پتانسیل Zeta. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۱):۴۷-۵۵

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد

مقدمه

ناباروری یکی از معضلات جامعه کنونی است، که تقریبا یک زوج از هر هفت زوج را درگیر می‌کند. در حدود نیمی از موارد ناباروری مربوط به فاکتورهای مردانه می‌باشد (۱). در حال حاضر تکنیک‌های کمک باروری (ART: Assisted Reproductive Techniques) مانند تلقیح داخل رحمی اسپرم (IUI: Intra Utrian Insemination)، لقاح آزمایشگاهی (IVF: In-Vitro Fertilization)، تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI: Intra-Cytoplasmic Sperm Injection) و دیگر تکنیک‌ها را برای حل مشکل باروری می‌توان استفاده نمود. ICSI به عنوان یک روش مناسب، جهت درمان ناباروری، به خصوص افراد نابارور با فاکتورهای مردانه می‌باشد. در طی این روند، بهترین اسپرم از لحاظ مورفولوژی و تحرک انتخاب و به داخل تخمک تزریق می‌شود. لذا ممکن است شانس بهتری جهت ایجاد لقاح و تشکیل جنین را برای بیماران فراهم کند (۲). اگر چه در طی روش ICSI، انتخاب اسپرم براساس مورفولوژی و حیات می‌باشد، اما امکان دارد اسپرم‌ها با آسیب DNA در فرآیند لقاح شرکت کنند و در نتیجه موجب شکست لقاح و سقط جنین شوند (۳). لذا استفاده از بهترین روش آماده سازی اسپرم، جهت جداسازی اسپرم‌هایی با کیفیت عملکردی مناسب ضروری به نظر می‌رسد. روش‌های معمولی برای جداسازی اسپرم‌های بالغ و طبیعی وجود دارند که شامل سانتریفیوژ شیب غلظت (DGC: Density Gradient Centrifuge) و Swim-up می‌باشد. در روش DGC، اسپرم‌ها بر اساس شیب غلظت جداسازی می‌شوند، که پس از سانتریفیوژ اسپرم‌های سالم و زنده که دارای چگالی بالاتر هستند، سریع‌تر ته‌نشین می‌شوند. اما روش Swim-up زمان‌بر بوده و سانتریفیوژ می‌تواند اثرات مخرب از جمله تولید استرس اکسیداتیو ایجاد کند که فعالیت عملکردی اسپرم را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۴). اخیراً روش‌های نوین جداسازی اسپرم براساس ساختار سلولی و مولکولی پیشنهاد شده، که از بین آن‌ها می‌توان به روش جداسازی اسپرم براساس بار الکتریکی یا پتانسیل Zeta اشاره نمود. Zeta در سال ۲۰۰۶ توسط Chan و همکاران معرفی گردید، در این روش اختلاف پتانسیل موجود در سطح غشاء اسپرم که در حدود ۱۶- تا ۲۰- میلی‌ولت است و پتانسیل Zeta نامیده می‌شود، اساس انتخاب اسپرم بالغ می‌باشد (۵). مطالعات قبلی در این زمینه اذعان داشته‌اند که جداسازی اسپرم براساس پتانسیل Zeta کارا می‌باشد و اسپرم‌هایی با ساختار کروماتین طبیعی‌تری را نسبت به روش معمول DGC می‌تواند جداسازی نماید. بعلاوه نتایج حاملگی این روش که اخیراً بررسی شده رضایت‌بخش می‌باشد (۶،۷). با وجودی که از روش ICSI جهت درمان افراد نابارور با فاکتورهای مردانه استفاده می‌شود، ولی در ۴-۳ درصد سیکل‌های ICSI عدم موفقیت در لقاح مشاهده می‌شود (۸). به طور مثال در آمریکا تقریبا ۶۷ درصد از روش های کمک باروری، شامل ICSI می‌باشد، اما تنها ۳۵/۸ درصد از آن‌ها به حاملگی کلینیکی منجر می‌گردد. مهمترین علل عدم موفقیت لقاح پس از ICSI فعال نشدن تخمک گزارش شده، که جهت درمان در برخی از مراکز درمانی، روش فعال‌سازی مصنوعی تخمک (AOA: Artificial Oocyte Activation) به دنبال روش ICSI به منظور افزایش کلسیم داخل سلولی تخمک استفاده می‌شود (۹). روش‌های متعددی از جمله روش‌های الکتریکی، شیمیایی و مکانیکی برای انجام AOA وجود دارد، که روش شیمیایی به صورت معمول مورد استفاده قرار میگیرد، و در آن از موادی مانند یونومایسین یا A23187 جهت افزایش کلسیم داخل سلولی استفاده می‌گردد (۱۰،۱۱). همانگونه که در بالا اشاره شد مهمترین علت عدم موفقیت در لقاح، فعال نشدن تخمک می‌باشد. برای فعال شدن تخمک، ورود فاکتورهای اسپرمی فعال‌کننده‌ی تخمکی (SOAF: Sperm-born Oocyte-Activating Factor)، پس از ادغام غشا اسپرم و تخمک ضروری می‌باشد. با ورود این فاکتورها به داخل تخمک، افزایش رهایش کلسیم از ذخایر داخل سلولی از جمله شبکه آندوپلاسمی صورت می‌گیرد، که این افزایش کلسیم جهت لقاح و تکوین اولیه‌ی جنین ضروری است و باعث می‌شود که تخمک از مرحله‌ی متافاز ۲ به سمت آنافاز پیشروی کند و تکوین یابد (۱۲). تاکنون چندین فاکتور SOAF پیشنهاد شده، اما از مهمترین و اصلی‌ترین این فاکتورها می‌توان به پروتئین (PLC(Phospholipase C Zeta، PAWP(Post-Acrosomal sheath WW domain-binding Protein) و (TR-KIT(Truncated Kit اشاره نمود (۱۲،۱۳). در حال حاضر، دو فاکتور PLC و PAWP بیشتر مورد توجه محققان قرار گرفته است، هرچند که هنوز قطعیتی راجع به اینکه کدامیک از این فاکتورها در اسپرم مسئول اصلی این افزایش کلسیم درون سلولی هستند، وجود ندارد (۱۷-۱۳). PAWP برای اولین بار در سال ۲۰۰۷ توسط Wu و همکاران معرفی گردید. PAWP از پروتئین‌های اختصاصی اسپرمی می‌باشد که با نام WBP2NL نیز شناخته می‌شود. منشاء آن از قسمت سیتوپلاسمی اسپرماتیدهای طویل شده است و محل قرارگیری آن در ناحیه پری نوکلئار سر اسپرم می‌باشد. ژن کدکننده PAWP در انسان بر روی کروموزوم ۲۲ جایگاه q13.222 قرار دارد. ساختار پروتئین PAWP از یک نیمه‌ی N-terminal مشابه با WBP2 و یک نیمه‌ی C-terminal، که شامل موتیف‌های ppxy و ۹ تکرار YGXPPXG می‌باشد. نقش PAWP در تنظیم انتقال سیگنال در داخل تخمک لقاح یافته می‌باشد که برای شروع مجدد میوز و تکوین پیش هسته ضروری است (۱۸). اخیرا، تحقیقات Aarabi و همکاران بر روی پروتئین PAWP که مسئول نوسانات کلسیم در داخل تخمک پس از ورود اسپرم می‌باشد، متمرکز شده است. آن‌ها با نشان دادن این حقیقت

که PAWP نیز نوسانات کلسیم و تشکیل پیش هسته را در تخمک‌های انسان و موش القا می‌کند، یافته‌های قبلی خود را در گونه‌های زنوپوس و خوک تایید کرده‌اند (۱۴). بعلاوه آن‌ها گزارش کردند که تزریق cRNA یا پروتئین نوترکیب PAWP موجب ایجاد نوسانات کلسیم یا افزایش کلسیم سیتوزولی در تخمکهای انسان، موش و گاو شده و یک ارتباط مثبتی بین سطح PAWP اسپرم با نتایج لقاح در افراد نابارور را گزارش کرده‌اند (۱۴،۱۷). با توجه به اهمیت پروتئین PAWP اسپرم در فعال شدن تخمک، هدف این مطالعه این است که برای اولین بار از دو روش معمول (DGC) و نوین (Zeta) جداسازی اسپرم استفاده شود و پروتئین PAWP بین این دو روش مورد قیاس قرار گیرد، تا مشخص شود که آیا روش نوین جداسازی اسپرم نسبت به روش معمول، توانایی جداسازی اسپرم‌های حاوی PAWP بیشتری را دارد یا خیر؟ در صورتی که مشخص شود روش Zeta کارا می باشد، می‌توان در آینده برای افرادی که با شکست لقاح پس از ICSI مواجه هستند، روش Zeta را پیشنهاد نمود.

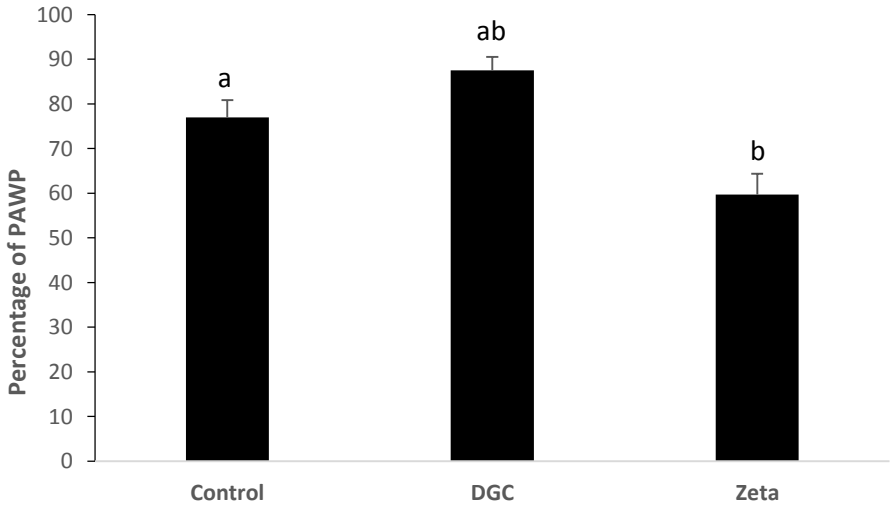
روش‌کار

قبل از ورود افراد به مطالعه، بیماران شرکت کننده در طرح، رضایت کتبی خود را جهت استفاده از اضافه نمونه مایع منی را (که در حالت عادی دور ریخته می‌شود) برای انجام طرح تحقیقاتی اعلام نمودند. این طرح در کمیته علمی پژوهشگاه رویان با کد ۹۴۰۰۰۳۰۰ تصویب شده است. این مطالعه بر روی نمونه مایع منی ۲۳ مرد نرموزواسپرمی مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان که پارامترهای اسپرمی آن‌ها براساس معیار سازمان بهداشت جهانی، ۲۰۱۰ (WHO: World Health Organization) طبیعی بود، انجام شد. اسپرم این افراد داری تحرک بالاتر از ۴۰ درصد، مورفولوژی طبیعی بیشتر از ۴ درصد و غلظت اسپرمی بیشتر از ۱۵ میلیون می‌باشد (۱). مایع منی پس از ۳ الی ۴ روز خودداری زوجین از مقاربت، در ظرف پلاستیکی استریل که از نظر نداشتن اثرات سمی بر روی اسپرم کنترل شده بود، جمع‌آوری گردید و اجازه داده شد در دمای آزمایشگاه به صورت مایعی همگن در آید. سپس آنالیز پارامترهای اسپرمی (تحرک، مورفولوژی و غلظت اسپرم) با استفاده از میکروسکوپ نوری و بر اساس WHO، مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های مایع منی با محیط کشت Vita-Sperm (Inoclon, Tehran, Iran) شستشو داده و هر نمونه به سه قسمت تقسیم شد. قسمت اول روش جداسازی اسپرم براساس سانتریفیوژ شیب غلظت(DGC)، قسمت دوم روش جداسازی اسپرم بر اساس پتانسیل Zeta و قسمت سوم به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. سپس درصد پروتئین PAWP با استفاده از روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، جهت انجام روش DGC از ماده تجاری Pure sperm (Nidacon, Sweden) استفاده گردید. یک گرادیان دو لایه‌ای از محلول Pure sperm ۹۰ و ۴۵ درصد در یک لوله سانتریفیوژ ۱۰ میلی‌لیتر تهیه گردید، به این صورت که ابتدا ۱/۵ میلی‌لیتر لایه‌ی ۹۰ درصد و سپس ۱/۵ میلی‌لیتر لایه ۴۵ درصد و در آخر ۱/۵ میلی‌لیتر از مایع منی شسته شده روی آن قرار داده و به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، مایع‌رویی با پیپت پاستور به صورت دورانی تخلیه شد، پلیت باقی مانده که حاوی اسپرم‌های بالغ می‌باشد به یک لوله دیگر منتقل شد و جهت ارزیابی پروتئین PAWP مورد استفاده قرار گرفت (۶). روش Zeta بر اساس مطالعه Nasr-Esfahani و همکاران در سال (۲۰۱۶) انجام شد (۷). ابتدا نمونه مایع منی شسته شده به لوله مخصوص سانتریفیوژ انتقال داده شد به طوری که در هر لوله حدود ۵ میلیون اسپرم وجود داشته باشد. سپس لوله سه مرتبه درون دستکش لاتکس چرخانده و بیرون کشیده شد تا باردار گردد. لوله باردار حاوی نمونه به مدت یک دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا اسپرم‌های بالغ دارای بار منفی به دیواره لوله بچسبند. محلول درون لوله را با پیپت پاستور به طوری که پیپت به جدار لوله برخورد نکند به آرامی خارج کرده، پس از آن ۴ سی سی Vita+Albumin (۱۰ درصد) در لوله ریخته و جدار لوله را با آن شستشو داده شد تا بدون بار گردد و اسپرم‌های چسبیده به جدار لوله جدا گردد. سپس به مدت ۵ دقیقه ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ و مایعرویی را خارج کرده و پلیت تشکیل شده جهت بررسی پروتئین PAWP استفاده گردید. پس از جداسازی اسپرم ها بر اساس دو روش ذکر شده و همچنین نمونه کنترل، درصد پروتئین PAWP با استفاده از روش فلوسایتومتری، و الگوی مکانی آن با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت ارزیابی گردید. نمونه های آماده شده از روش DGC، Zeta و گروه کنترل را با PBS (Phosphate Buffered Saline) شسته شد و به مدت ۵ دقیقه در۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. پس از آن پلیت باقی مانده در پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه فیکس شد. سپس، دو بار با PBS به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰rpm شسته شده و تریتون X-۱۰۰ (۰/۵ درصد) اضافه می‌گردد و به مدت ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه قرار داده می‌شود. سپس دو بار با PBS شسته شده و به نمونه (BSA, Bovine Serum Albumin) (۳ درصد) جهت بلوک‌کردن مناطق غیر اختصاصی به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه اضافه گردید. پس از آن به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. به پلیت باقی‌مانده آنتی‌بادی اولیه PAWP (Anti-WBP2NL antibody, Abcam, USA) افزوده و ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از طی این مدت دو بار با PBS شسته شده و به نمونه آنتی‌بادی ثانویه (Goat Anti-Rabbit IgG, Sigma, Biotech USA) اضافه کرده و به مدت ۶۰ دقیقه درانکوباتور قرار داده شد، دو بار با PBS شسته شد و نهایتا به

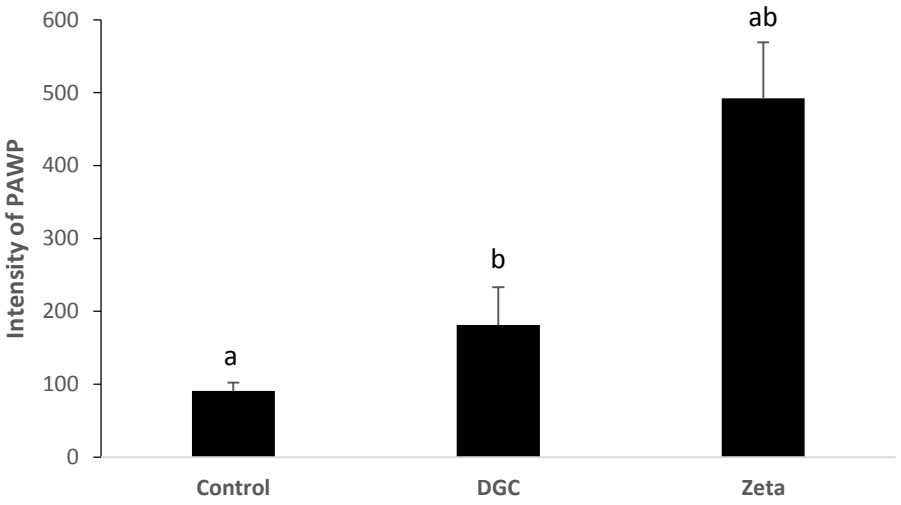
نمونه PI (Propidium Iodide, Sigma, Saint, Louis, USA) اضافه شد، و با استفاده از فلوسایتومتری تجزیه و تحلیل گردید (۱۹). لازم بذکر است که از همین روش، جهت ارزیابی الگوی مکانی PAWP، از طریق میکروسکوپ فلورسنت (BX51, Tokyo, Japan) استفاده گردید، با این تفاوت که کل پروسه بر روی اسلاید انجام شد. پس از جمع‌آوری نتایج، نرمال بودن توزیع داده‌ها بررسی گردید. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون One-Way ANOVA انجام گرفت. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد و P-value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

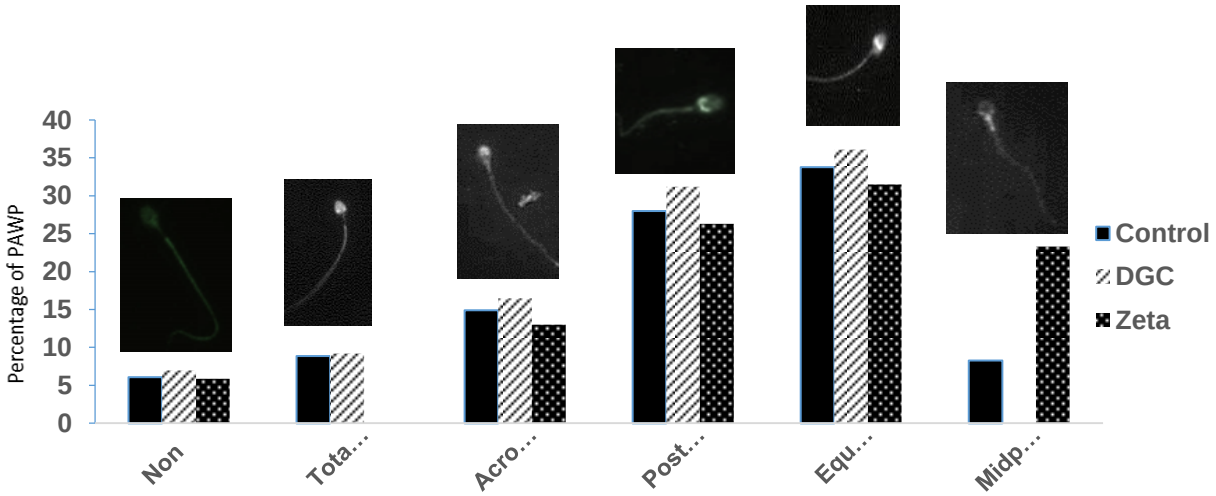
در این مطالعه از مایع منی ۱۳ مرد جهت ارزیابی پروتئین PAWP با روش فلوسایتومتری و ۱۰ مرد جهت ارزیابی پروتئین PAWP به هدف بررسی جایگاه PAWP در اسپرم توسط میکروسکوپ فلورسنت با پارامترهای اسپرمی طبیعی استفاده گردید. اطلاعات توصیفی پارامترهای اسپرمی برای ارزیابی PAWP با روش فلوسایتومتری بین روش‌های جداسازی اسپرمی عبارتند از: میانگین غلظت اسپرم ۷/۱۵±۹۵/۹۲ میلیون در سی سی با حداقل و حداکثر بین ۱۴۰–۴۲، درصد تحرک اسپرم ۲/۱۰±۶۴/۲۳ با حداقل و حداکثر بین ۷۵–۵۰، درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم ۰/۳۹±۹۵/۳۰ با حداقل و حداکثر بین ۹۶– ۹۱ و میانگین حجم نمونه ۰/۴۵± ۵/۰۷ با حداقل و حداکثر بین ۲/۴۰– ۷/۱۰. میانگین پارامترهای اسپرمی جهت ارزیابی جایگاه PAWP با استفاده میکروسکوپ فلورسنت به شرح زیر می‌باشد. میانگین غلظت اسپرم ۲۴/۰۴±۸۴ میلیون در سی سی، درصد تحرک اسپرم ۴/۸۵±۵۸/۸۸، درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم ۰/۷۸±۹۵/۸۸ و میانگین حجم نمونه ۱/۳۰±۴/۳۵ بود. مقایسه شدت و درصد پروتئین PAWP بین گروه کنترل و دو روش DGC و Zeta با استفاده از روش فلوسایتومتری قیاس گردید. شدت و درصد پروتئین PAWP با استفاده از فلوسایتومتری بین سه گروه کنترل، DGC و Zeta مورد قیاس قرار گرفت. میانگین درصد اسپرم‌ها که دارای PAWP مثبت بودند ۳/۸۴±۷۷/۰۰، ۳/۰۰±۸۷/۵۳ و ۴/۶۷±۵۹/۶۹ به ترتیب در گروه کنترل، DGC و Zeta بود. شکل ۱ نشان می‌دهد که درصد اسپرم‌های PAWP مثبت به طور معنی‌داری در روش DGC نسبت به گروه کنترل و Zeta افزایش یافته است (P<۰/۰۰۱). بعلاوه شدت پروتئین PAWP، ۱۱/۴۸±۹۰/۷۳، ۵۱/۹۲±۱۸۱/۱۵و ۷۶/۵۷±۴۹۲/۳۸ به ترتیب در گروه کنترل، DGC و Zeta بود که در شکل ۲ نشان داده شده است که شدت پروتئین PAWP اسپرم در گروه Zeta به طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های کنترل و DGC، می‌باشد (P<۰/۰۰۱).



شکل ۱: مقایسه درصد پروتئین PAWP بین گروه کنترل و دو روش آماده سازی اسپرم (DGC و Zeta). درصد پروتئین PAWP در روش DGC بطور معنی‌داری بیشتر از روش Zeta است. مقایسه گروه ها از طریق آزمون One-Way ANOVA انجام شده است.



شکل ۲: مقایسه شدت پروتئین PAWP بین گروه کنترل و دو روش آماده سازی اسپرم (DGC و Zeta).



شکل ۳: بررسی جایگاه پروتئین PAWP اسپرم انسانی با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت. درصد بیان پروتئین PAWP در هر سه گروه مطالعه بیشتر در نواحی استوایی و خلف آکروزوم اسپرم می‌باشد.

شدت پروتئین PAWP در روش Zeta بطور معنی‌داری بیشتر از DGC روش بود. مقایسه گروه‌ها از طریق آزمون One-Way ANOVA انجام شد، بعلاوه پروتئین PAWP در نواحی مختلف اجزای اسپرمی از جمله آکروزوم، ناحیه استوایی، خلف آکروزوم، کل سر و قطعه میانی قابل مشاهده بود که از بین ۱۰۰۰ اسپرم شمارش شده همانگونه که در شکل ۳ نشان داده شده است بیان پروتئین PAWP در هر سه گروه، بیشتر در نواحی استوایی و خلف آکروزوم اسپرم می‌باشد.

بحث

امروزه در بیشتر مراکز درمان ناباروری، از روش‌های DGC و Swim-up که تنها قادر به جداسازی اسپرم با مورفولوژی و تحرک طبیعی می‌باشد، جهت تکنیک‌های کمک باروری از جمله ICSI استفاده می‌شود (۲۰). با توجه به اینکه جنین شناس در طی فرآیند ICSI، اسپرم را بر اساس شکل ظاهری و حیات انتخاب می‌کند، این اسپرم نمی‌تواند گویای سلامت کروماتین اسپرم که انتقال دهنده‌ی نیمی از ژنوم جنین آینده است، باشد (۲۱). سلامت غشاء اسپرم جهت فرآیندهای فیزیولوژیکی از جمله ظرفیت‌یابی و واکنش آکروزومی ضروری است و وضعیت آپوپتوزی، منجر به فعال شدن مسیر مرگ سلولی شده و اسپرم به سمت مرگ پیش می‌رود (۲۲). لذا ارائه‌ی روش‌های نوین بر پایه‌ی برهم‌کنش‌های سلولی و مولکولی جهت جداسازی اسپرم‌های کارا ضروری به نظر می‌رسد. در این راستا، محققان روش‌های جدیدی را بر اساس رسپتورهای سطحی، بار الکتریکی، سلامت غشاء، مارکرهای

سطحی و غیره پیشنهاد نموده‌اند (۵، ۲۴، ۲۳). از بین این روش‌ها، روش جداسازی اسپرم بر پایه پتانسیل Zeta در سطوح مختلف تحقیقاتی و درمانی مطالعه شده و در حال حاضر نیز در حال تحقیق و بررسی می‌باشد. غشای اسپرم دارای پتانسیل Zeta می‌باشد که مشخص گردیده هر چه بار منفی غشاء اسپرم بیشتر، آن اسپرم بالغ‌تر و کاراتر است (۵). این بار منفی در طی عبور اسپرم از اپیدیدم با اضافه شدن اسیدهای سیالیک به سطح غشاء اسپرم کسب می‌گردد (۲۵). در مطالعات قبلی نشان داده شده است که یک ارتباط مثبت بین سلامت غشاء اسپرم و سلامت کروماتین اسپرم وجود دارد لذا در صورتی که اسپرم با بار منفی بیشتر جداسازی شود نشانگر بالغ بودن آن و سلامت غشاء و کروماتین است (۲۰،۲۶). بنابراین با جداسازی اسپرم بر اساس این ویژگی‌ها در آزمایشگاه، می‌توان اسپرم‌ها را با کروماتین سالم‌تر که جهت لقاح و تکوین جنین ارزش به سزایی دارد، جداسازی نمود. در این راستا، مطالعات قبلی ثابت کردند که جداسازی اسپرم بر اساس بار الکتریکی می‌تواند نسبت به روش‌های معمول جداسازی اسپرم که در مراکز درمانی استفاده می‌شوند، اسپرم‌های سالم تر از لحاظ سلامت DNA، محتوای پروتامین، کروماتین و با مورفولوژی طبیعی‌تر را جداسازی کند (۶،۲۷). بعلاوه جداسازی اسپرم بر اساس پتانسیل Zeta می‌تواند منجر به القاء فرآیند ظرفیت یابی شده و در نتیجه، اسپرم‌های کارآتری را می‌توان از این روش جداسازی نمود (۲۰). در سطح کلینیکی، میزان لقاح و حاملگی بین دو روش DGC و Zeta مورد قیاس قرار گرفت و مشخص شد که اسپرم‌های آماده شده به روش Zeta نسبت به روش DGC منجر به افزایش حاملگی پس از روش ICSI شده است (۷). از آنجایی که هدف اصلی در این مطالعه این است که فاکتور اسپرمی PAWP که در فعال شدن تخمک و تکوین اولیه جنین نقش دارد، بین دو روش DGC و Zeta مورد قیاس قرار گیرد، سوالی که در این مطالعه باید پاسخ داده شود این است که آیا اسپرم‌های جداسازی شده به روش Zeta که تاکنون اثبات شده از لحاظ کروماتین و عملکردی سالم‌تر می‌باشند، آیا قادر به جدا کردن اسپرم‌ها با محتوی PAWP بیشتر نسبت به روش DGC هست یا خیر؟ در صورتی که بتوان از روش Zeta اسپرم‌های حاوی PAWP بیشتری را جداسازی نمود می‌توان در آینده برای افراد نابارور که شکست در لقاح ICSI به طور مکرر داشته اند از این روش آماده سازی اسپرم استفاده نمود و میزان موفقیت لقاح و باروری را در این افراد بالا برد. در مراکز درمانی در افرادی که با شکست در لقاح پس از ICSI مواجه هستند از روش AOA استفاده می‌شود (۹). لذا می‌توان با ارائه راهکار درمانی در خصوص این افراد با بررسی حضور یا عدم حضور فاکتور اسپرمی PAWP که در فعال شدن تخمک نقش دارد، موفقیت این روش را پیش‌بینی کرد. بدین جهت برای بررسی اینکه آیا با جداسازی اسپرم‌های دارای PAWP بیشتر نسبت به روش‌های معمول می‌توان میزان لقاح پس از ICSI را افزایش داد و یا برای آن‌ها باید به دنبال ICSI، روش فعال‌سازی مصنوعی تخمک (AOA) را انجام داد، پروتئین PAWP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه کنونی نشان می‌دهد که درصد اسپرم‌های دارای PAWP به طور معنی‌داری در روش Zeta پایین‌تر از روش DGC می‌باشد. در صورتی که شدت پروتئین PAWP در روش Zeta به طور معنی‌داری بیشتر از DGC می‌باشد. این نتایج بیانگر آن است که، اگر چه روش Zeta تعداد اسپرم دارای PAWP کمتری را نسبت به DGC جداسازی می‌کند ولی شدت پروتئین PAWP در این اسپرم‌های جدا شده بیشتر از روش DGC است، لذا، جهت تکنیک ICSI می‌توان اسپرم‌هایی که بیان‌کننده شدت بیشتری از پروتئین PAWP هستند را جداسازی نموده و به داخل تخمک تزریق نمود. بنابراین احتمالاً می‌توان شانس میزان لقاح و باروری را از این طریق افزایش داد. در این راستا، Kashir و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که روش DGC قادر به جداسازی اسپرم‌ها با پروتئین PLCζ بیشتری نسبت به نمونه اسپرمی شسته شده می‌باشد (۲۸). نتایج مطالعه حاضر نیز موید نتایج قبلی حاکی از تاثیر روش DGC در جداسازی درصد بیشتری از پروتئین اسپرمی PAWP است، با این تفاوت که نوع فاکتور اسپرمی فعال‌کننده تخمک و روش ارزیابی بین دو مطالعه یکسان نبوده‌اند. بعلاوه نتایج این مطالعه بیانگر آن است که در هر سه گروه مطالعه، جایگاه قرارگیری PAWP بیشتر در ناحیه پری نوکلئار سر اسپرم می‌باشد. پری نوکلئار از سه قسمت تشکیل شده که شامل ناحیه زیر آکروزومی، استوایی و خلف آکروزومی می‌باشد. در طی فرآیند اسپرمیوژنز، PAWP از جمله پروتئین‌هایی است که توسط ساختار میکروتوبولی بنام مانشت به ناحیه خلف آکروزومی جایی که فاکتورهای اسپرمی دخیل در فعال شدن تخمک حضور دارند، انتقال می‌یابد. در هر سه گروه کنترل، DGC و Zeta بیشترین درصد اسپرم‌های دارای PAWP در ناحیه خلف آکروزومی و استوایی قرار دارند. لذا جایگاه این پروتئین با عملکرد آن در طی فرآیند لقاح تطابق دارد (۱۷،۱۸). Grasa و همکاران (۲۰۰۸) نیز جایگاه PLCζ را به عنوان دیگر پروتئین منتخب در فعال شدن تخمک در ناحیه غلاف خلف آکروزومی و استوایی سر اسپرم شناسایی کرده بودند (۲۹). بعلاوه Aarabi و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز جایگاه PAWP را در سر اسپرم در ناحیه غلاف خلاف آکروزومی گزارش نموده‌اند که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد (۳۰). این اولین مطالعه‌ای است که جایگاه پروتئین PAWP را پس از دو روش جداسازی اسپرم مورد بررسی قرار داده است.

نتیجه‌گیری

اگرچه روش Zeta قادر به جداسازی درصد کمتری از اسپرمهای حاوی PAWP نسبت به DGC می‌باشد ولی اسپرم‌های

جداسازی شده با این روش دارای شدت PAWP بیشتری نسبت به DGC می‌باشد، لذا احتمال شانس فعال شدن تخمک توسط این اسپرم‌ها بیشتر است. بعلاوه در هر دو روش جداسازی اسپرم، بیشترین درصد اسپرم‌ها در ناحیه خلف آکروزومی و استوایی، دارای پروتئین PAWP هستند، جایگاهی که فیوژن اسپرم–تخمک در طی لقاح صورت می‌گیرد.

قدردانی

این طرح با همکاری پژوهشکده رویان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان انجام گرفته است. لذا نویسندگان از کلیه مسئولین و پرسنل مراکز فوق کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع مالی

نتایج این مقاله استخراج شده از طرح به شماره ۹۴۰۰۰۳۰۰ می باشد که در پژوهشگاه رویان به تصویب رسیده و هزینه های این طرح متعلق به این موسسه است.

منافع متقابل

مؤلف اظهار می دارد که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارد.

مشارکت مؤلفان

صادقی درمیانی الف و خاکپور اصفهانی ش، اجرای طرح و جمع آوری داده ها را بر عهده داشتند. اربابیان م در اجرای طرح کمک نموده است. بهادرانی م استاد راهنمای این طرح بوده است. م تولائی و نصر اصفهانی م ح، آنالیز داده ها و تالیف مقاله را بر عهده داشته و نسخه نهایی آن را تایید کرده اند.

References

1. WHO. World Health Organization Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 2010.
2. Cissen M, Bensdorp A, Cohlen B J, Repping S, de Bruin JP, van Wely M. Assisted reproductive technologies for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2016; **2**: doi: 10.1002/ 14651858.CD000360. pub5
3. 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): 1077-1084. doi: 10.1016 /j.fertnstert.2008.01.015
4. Mehta A, Sigman M. Identification and Preparation of Sperm for ART. *Urol Clin North Am* 2014; **41**(1): 169-180. doi: 10.1016/j.ucl.2013.08.005.
5. Chan P J, Jacobson J D, Corselli J U, Patton W C. A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge. *Fertil Steril* 2006; **85**(2): 481-486. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.07.1302
6. Kheirollahi-Kouhestani M, Razavi S, Tavalaee M, Deemeh M R, 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): 2409-2416. doi: 10.1093/ humrep/dep088
7. Nasr-Esfahani M H, Deemeh M R, Tavalaee M, Sekhavati M H, Gourabi H. Zeta sperm selection improves pregnancy rate and alters sex ratio in male factor infertility patients: A double-blind, randomized clinical trial. *Int J Fertil Steril* 2016; **10**(2): 253-260.
8. Javed M, Esfandiari N, Casper R F. Failed fertilization after clinical intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Biomed Online* 2010; **20**(1): 56-67. doi: 10.1016/j. rbmo.2009.10.010
9. Ebner T, Montag M. Artificial oocyte activation: Evidence for clinical readiness. *Reprod Biomed Online* 2016; **32**(3): 271-273. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.12. 004
10. Nasr-Esfahani M H, Deemeh M R, Tavalaee M. Artificial oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2010; **94**(2): 520-256. doi: 10.1080/14647273.2016.1240374
11. Vanden Meerschaut F, Nikiforaki D, De Roo C, Lierman S, Qian C, Schmitt-John T, et al. Comparison of pre-and post-implantation development following the application of three artificial activating stimuli in a mouse model with round-headed sperm cells deficient for oocyte activation. *Hum Reprod* 2013; **28**(5): 1190-1198. doi: 10.1093/humrep/det038
12. Yeste M, Jones C, Amdani SN, Patel S, Coward K. Oocyte activation deficiency: A role for an oocyte contribution? *Hum Reprod Update* 2016; **22**(1): 23-47. doi: 10.1093/humupd/dmv040
13. Muciaccia B, Sette C, Paronetto M P, Barchi M, Pensini S, D'Agostino A, et al. Expression of a truncated form of KIT tyrosine kinase in human spermatozoa correlates with sperm DNA integrity. *Hum Reprod* 2010; **25**(9): 2188-2202. doi: 10.1093/ humrep/deq168
14. Aarabi M, Balakier H, Bashar S, Moskovtsev S I, Sutovsky P, Librach C L, et al. Sperm-derived WW domain-binding protein, PAWP, elicits calcium oscillations and oocyte activation in humans and mice. *FASEB J* 2014; **28**(10): 4434-4440. doi: 10.1096/fj.14-256495

15. Swann K, Lai FA. PLC and the initiation of Ca2+ oscillations in fertilizing mammalian eggs. *Cell Calcium* 2013; **53**(1): 55-62. doi: 10.1016/j.ceca.2012.11.001
16. Lee H C, Arny M, Grow D, Dumesic D, Fissore R A, Jellerette-Nolan T. Protein phospholipase C Zeta1 expression in patients with failed ICSI but with normal sperm parameters. *J Assist Reprod Genet* 2014; **31**(6): 749-756. doi: 10.1007/s10815-014-0229-9
17. Aarabi M, Balakier H, Bashar S, Moskovtsev S I, Sutovsky P, Librach CL, et al. Sperm content of postacrosomal WW binding protein is related to fertilization outcomes in patients undergoing assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2014; **102**(2): 440-447. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.05.003
18. Wu ATH, Sutovsky P, Manandhar G, Xu W, Katayama M, Day BN, et al. PAWP, a sperm-specific WW domain-binding protein, promotes meiotic resumption and pronuclear development during fertilization. *J Biol Chem* 2007; **282**(16): 12164-12175. doi:10.1074/jbc.M609132200
19. Tavalaee M, Kiani-Esfahani A, Nasr-Esfahani M H. Relationship between Potential Sperm Factors Involved in Oocyte Activation and Sperm DNA Fragmentation with Intra-Cytoplasmic Sperm Injection Clinical Outcomes. *Cell Journal(Yakhteh)* 2016; **18**(4): 588-596.
20. Zarei-Kheirabadi M, Shayegan nia E, Tavalaee M, Deemeh M R, 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): 365-371. doi: 10.1007/s10815-011-9689-3
21. Avendaño C, Oehninger S. DNA fragmentation in morphologically normal spermatozoa: how much should we be concerned in the ICSI era? *J androl* 2011; **32**(4): 356-363. doi:10.2164/jandrol.110.012005
22. Grunewald S, Kriegel C, Baumann T, Glander H J, Paasch U. Interactions between apoptotic signal transduction and capacitation in human spermatozoa. *Human Reproduction* 2009; **24**(9): 2071-2078. doi: 10.1093/humrep/dep178
23. Nasr-Esfahani M H, Razavi S, Vahdati A A, 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. doi: 10.1007/s10815-008-9223-4
24. Said T M, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Glander HJ, Paasch U. Evaluation of sperm recover following annexin V magnetic-activated cell sorting separation. *Reprod Bio Med Online* 2006; **13**(3): 336-339.
25. Della Giovampaola C, Flori F, Sabatini L, Incerti L, La Sala G B, Rosati F, et al. Surface of human sperm bears three differently charged CD52 forms, two of which remain stably bound to sperm after cap citation. *Mol Reprod Dev* 2001; **60**(1): 89-96 doi: 10.1002/mrd.1065
26. Khajavi N A, Razavi S, Mardani M, Tavalaee M, Deemeh MR, Nasr-Esfahani M H. Can Zeta sperm selection method, recover sperm with higher DNA integrity compare to density gradient centrifugation? *IJRM* 2009; **7**(2): 73-77.
27. Kam T L, Jacobson J D, Patton W C, Corselli J U, Chan P J. Retention of membrane charge attributes by cryopreserved-thawed sperm and zeta selection. *J Assist Reprod Genet* 2007; **24**(9): 429-434. doi: 10.1007/s10815-007-9158-1
28. Kashir J, Heynen A, Jones C, Durrans C, Craig J, Gadea J, et al. Effects of cryopreservation and density-gradient washing on phospholipase C zeta concentrations in human spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2011; **23**(2): 263-267. doi: 10.1016/j.rbmo.2011.04.006
29. Grasa P, Coward K, Young C, Parrington J. The pattern of localization of the putative oocyte activation factor, phospholipase Cz, in uncapacitated, capacitated, and ionophore-treated human spermatozoa. *Human Reproduction* 2008; **23**(11): 2513-2522. doi: 10.1093/humrep/den280
30. Aarabi M, Yu Y, Xu W, Tse MY, Pang SC, Yi YJ, et al. The Testicular and Epididymal Expression Profile of PLCf in Mouse and Human Does Not Support Its Role as a Sperm-Borne Oocyte Activating Factor. *PLoS One* 2012; **7**(3): 33496. doi: 10.1371/journal.pone.0033496