۱۰۱۷۶۰
۸۴۸۸۰۱۶۶۶

دانشگاه پیام نور

گروه زیست شناسی

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته زیست شناسی-گرایش بیوشیمی

عنوان:

بررسی کارایی دو روش Zeta و HA binding assay در جداسازی اسپرم های بالغ با میزان پروتامین و کروماتین طبیعی

مولف:

محمدرضا دیمه

۱۳۸۸ /۲/ ۲۰

استاد راهنما:

دکتر محمدحسین نصر اصفهانی

دکتر شهناز رضوی

استاد مشاور:

دکتر حبیب الله ناظم

اردیبهشت ۱۳۸۷

۱۱۲۲۰۸

جمهوری اسلامی ایران
وزارت علوم تحقیقات و فناوری

تاریخ .....
شماره .....
پیوست .....

دانشگاه پیام نور

دانشگاه جامع پیام نور استان تهران

((تصویب نامه))

پایان نامه تحت عنوان :

"بررسی کارآیی دو روش HA binding assy, zeta در جداسازی اسپرمهای بالغ با میزان پروتامین و کروماتین طبیعی "

تاریخ دفاع : ۸۷/۲/۲۸ نمره : ۱۹/٤ درجه : عالی

اعضای هیات داوران :

نام و نام خانوادگی	هیات داوران	مرتبه علمی	امضاء
۱- جناب آقای دکتر محمدحسین نصر اصفهانی	استاد راهنمای اول		
۲- سرکار خانم دکتر شهناز رضوی	استاد همکار دوم		
۳- جناب آقای دکتر حبیب اله ناظم	استاد مشاور		
٤- جناب آقای دکتر حاجی حسینی	استاد داور داخلی		
۵- جناب آقای دکتر لامع راد	استاد داور خارجی		
۶- سرکار خانم شامحمدی	نماینده گروه		

...خیابان انقلاب،
... استاد نجات اللهی،
... خیابان سپند،
...لاک ۲۳۳
۸۸۸۰۱۰۹۰
۸۸۹۰۳۱۵۸
...ت الکترونیکی:
info@Tehran.pnu

همچنین از کلیه پرسنل مرکز باروری و ناباروری اصفهان و پرسنل آزمایشگاه آندرولوژی این مرکز

به خصوص خانمها:

افسانه صالحی **فرحناز مولوی**
فرزانه شریف بیان الحق **مهرناز جعفری**
مریم جمدی **گیلدا فرهادیان**

که در تمامی مراحل تحقیق همکاری صمیمانه ای را با من نمودند، کمال تشکر و سپاس را دارم.

همچنین از کلیه پرسنل پژوهشکده رویان که در این تحقیق مرا یاری نمودند صمیمانه تشکر می کنم.

۱۳۸۰/۲/۲۰

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه ۱

روشهای کمک باروری ۴

آماده سازی اسپرم در مراکز کمک باروری ۵

Swim-up یا مهاجرت اسپرم ۵

سانتریفوژ در شیب غلظت ۷

جداسازی اسپرم جهت تزریق به درون سیتوپلاسم تخمک ۹

روش HA-binding ۱۰

متد Zeta ۱۰

جداسازی اسپرم ها با استفاده از دستگاه الکتروفورز ۱۱

روش جداسازی اسپرم ها بر اساس Magnetic sperm separation ۱۱

تکوین اسپرماتوزوئید ۱۵

ساختار کروماتین در هسته اسپرم ۱۶

ارزیابی بلوغ اسپرم ۲۱

شکل‌گیری گیرنده‌ها بر سطح غشاء پلاسمائی اسپرم ۲۳

بار سطحی غشاء اسپرم ۲۵

پتانسیلZeta ۲۷

تست های ارزیابی بلوغ اسپرم ۳۱

رنگ آمیزی کروموماپسین A3 و مطالعات قبلی درباره آن ۳۱

بررسی آسیب DNA اسپرم..... ۳۲

فصل دوم: اهداف و فرضیات..... ۳۸

ضرورت اجرا..... ۳۸

هدف کلی..... ۳۹

اهداف جزئی..... ۳۹

هدف کاربردی..... ۴۰

سؤالات پژوهشی..... ۴۰

فصل سوم: مواد و روشها..... ۴۲

مواد و وسایل آزمایشگاهی مورد استفاده..... ۴۲

روش اجرا..... ۴۵

رنگ آمیزی کروموماپسین A3..... ۵۰

تست Sperm Chromatin Dispersion (SCD)..... ۵۲

روش های بررسی آماری..... ۵۴

فصل چهارم: نتایج..... ۵۶

فصل پنجم: بحث و پیشنهادات..... ۷۳

منابع..... ۸۳

خلاصه انگلیسی..... ۹۴

فهرست تصاویر

عنوان **صفحه**

تصویر (۱-۱): مراحل پی در پی در جداسازی اسپرم با استفاده از روش مهاجرت اسپرم..... ۶

تصویر (۱-۲): وقایع گرادیانت پیور اسپرم..... ۸

تصویر (۱-۳): جداسازی اسپرم ها بر اساس دستگاه الکتروفورز..... ۱۲

تصویر (۱-۴): روش جداسازی اسپرم بر اساسMACS..... ۱۴

تصویر (۱-۵): مراحل تشکیل و بلوغ اسپرم در بیضه و اپیدیدیم..... ۱۵

تصویر (۱-۶): شکل شماتیک از تغییرات کروماتین هسته اسپرم طی روند بلوغ اسپرم..... ۱۹

تصویر (۱-۷): نمایی شماتیک از Zeta potential..... ۳۰

تصویر (۴-۱): نمای میکروسکوپی اختلالات کروماتین به روش CMA3..... ۶۸

تصویر (۴-۲): نمای میکروسکوپی اسپرم های بدون فراگمنتاسیون DNA..... ۶۹

تصویر (۴-۳): نمای میکروسکوپی اسپرم های دارای فراگمنتاسیون DNA..... ۷۰

تصویر (۴-۴): نمای میکروسکوپی اسپرم های متصل به اسید هیالورونیک..... ۷۱

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول (۴-۱): اطلاعات توصیفی مربوط به ، پارامترهای اسپرمی، کمبود پروتامین و فراگمنتاسیون DNA.....۶۲

جدول(۴-۲): مقایسه میانگین اسپرم های دارای کمبود پروتامین و در سه گروه کنترل، اسپرم های جداسازی شده به روش Zeta و اسپرم های متصل به اسید هیالورونیک.....۶۳

فهرست نمودارها

عنوان صفحه

نمودار(۴-۱): مقایسه میانگین درصد اسپرم های دارای کمبود پروتامین در سه گروه کنترل، اسپرم های جدا شده توسط روش Zeta و اسپرم های متصل به اسید هیالورونیک در ۷۰بیمار ۶۴

نمودار(۴-۲): مقایسه میانگین درصد اسپرم های دارای فراگمنتاسیون DNA در سه گروه کنترل، اسپرم های جدا شده توسط روش Zeta و اسپرم های متصل به اسید هیالورونیک در ۷۰ بیمار)..... ۶۵

نمودار(۴-۳): بررسی رابطه موجود بین میزان کمبود پروتامین(+CMA3) و میزان آسیب DNA در هسته اسپرم در گروه کنترل در ۷۰ بیمار)..... ۶۶

نمودار(۴-۴): بررسی رابطه موجود بین غلظت نمونه اسپرمی با میزان کمبود پروتامین (+CMA3) در گروههای کنترل، اسپرم های جدا شده از طریق Zeta method اسپرم های متصل به اسید هیالورونیک..... ۶۷

فصل اول

کلیات و مروری بر منابع

۱-۱ مقدمه

ازدواج و تولد فرزندان هم‌چون حلقه ای نسل ها را بهم مرتبط می سازد و داشتن فرصت انتقال تجارب زندگی به نسل آینده، پدیده ای است که به زندگی معنی می بخشد. ناباروری یک زوج می تواند به عنوان یک اختلال مهم اساس زندگی را بهم ریخته و موجب ضربه روحی با ابعاد بسیار گسترده باشد. بنابراین اگرچه ناباروری به خودی خود تهدیدی برای سلامت فیزیکی نمی باشد اما اثرات وسیعی بر وضعیت روانی و اجتماعی افراد نابارور دارد. برای غلبه بر این بحران لازم است تدابیر اساسی جهت تشخیص و درمان آن بکار گرفته شود. میزان پراکندگی علل ناباروری در مردان و زنان بخوبی مشخص نشده است. طی سال های ۱۹۸۵-۱۹۸۲ سازمان بهداشت جهانی[۱] (WHO) ۲۰ درصد از علل ناباروری را عوامل مربوط به مردان، ۳۸ درصد را عوامل مربوط به زنان، ۲۷ درصد را فاکتورهای مشترک و ۱۵ درصد را بدون علت، گزارش نموده است (۱). غالباً به علت سهولت بررسی مایع منی، ناباروری در مردان زودتر تشخیص داده می شود. علل ناباروری مردان به ٤ گروه کلی زیر تقسیم می شوند(۲) :

الف . بیماری های هیپوتالاموس - هیپوفیز (هیپوگنادیسم ثانویه) به میزان ۲-۱ درصد

ب . بیماری های بیضه (هیپوگنادیسم اولیه) به میزان ٤۰-۳۰ درصد

---

۱. World Health Organization (WHO)

ج . نقایص مجاری انتقال اسپرم به میزان ۲۰-۱۰ درصد

د . ناباروری با علت نامشخص به میزان ٦۰-٤۰ درصد

یکی از مراحل اصلی و شاید قدم اول در تشخیص زوج های نابارور، بررسی خصوصیات مایع منی از لحاظ قدرت باروری می باشد. جهت انجام این بررسی روش های استانداردی از سوی WHO ارائه شده است که مورد قبول اکثر مراکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری می باشند. در بررسی مایع منی، ارزیابی ویژگی های اسپرم از اهمیت خاصی برخوردار است. ویژگی های مهم اسپرم عبارتند از تعداد، تحرک و ریخت‌شناسی. طبق معیار WHO یک نمونه طبیعی منی دارای حداقل بیست میلیون اسپرم در هر میلی لیتر، ۵۰٪ تحرک پیشرونده و حداقل ۳۰٪ از اسپرم ها دارای شکل طبیعی می باشند. در نمونه های غیرطبیعی یک و یا چند ویژگی اسپرم دچار اختلال می باشد که می توان با توجه به معیارهای ارائه شده WHO آنها را به گروه های زیر تقسیم کرد(۳):

۱- Oligozoospermia : نمونه هایی که تعداد اسپرم در هر میلی لیتر مایع منی کمتر از ۲۰×۱۰^{٦} باشد.

۲- Teratozoospermia : نمونه هایی که در هر میلی لیتر آنها کمتر از ۳۰٪ اسپرم ها دارای شکل طبیعی هستند.

۳- Asthenozoospermia : نمونه هایی که در هر میلی لیتر آن کمتر از ۵۰٪ اسپرم ها، دارای حرکت پیشرونده و یا کمتر از ۲۵٪ اسپرم ها دارای حرکت سریع در خط مستقیم باشند.

٤ - Oligoasthenozoospermia : نمونه هایی که تعداد و حرکت اسپرم در آنها غیرطبیعی باشد.

۵- Oligoteratozoospermia : نمونه هایی که تعداد و شکل اسپرم در آنها غیرطبیعی باشد.

٦- Asthenoteratozoospermia : نمونه هایی که شکل و حرکت اسپرم در آنها غیرطبیعی باشد.

۷- Oligoasthenoteratozoospermia : نمونه هایی که هرسه ویژگی تعداد، حرکت و ریخت‌شناسی اسپرم در آنها غیرطبیعی باشد.

۸- Azoospermia : نمونه های فاقد اسپرم.

۱-۲ روش های کمک باروری[۲]

امروزه یک روش درمان برای زوج‌های نابارور استفاده از روش‌های کمک‌باروری است. عمده‌ترین روش‌های درمانی مورد استفاده در این زمینه تزریق درون‌سیتوپلاسمی اسپرم[۳] و لقاح آزمایشگاهی[٤] می‌باشد (٤).

اولین بار IVF در سال ۱۹۷۸ توسط Stepton و Edward انجام گرفت(٥). در این روش که بیشتر در مواردی استفاده می‌شود که عامل ناباروری عوامل مربوط به زنان است، اسپرم و تخمک در محیط آزمایشگاه در مجاورت هم قرار می‌گیرند. بنابراین انجام لقاح به کیفیت اسپرم بستگی دارد. با وجودی که طی لقاح طبیعی در بدن احتمال رسیدن اسپرم غیرطبیعی به محل لقاح به حداقل ممکن می‌رسد اما در IVF همراه اسپرم طبیعی، اسپرم‌های غیرطبیعی نیز درکنار تخمک قرار می‌گیرند، درنتیجه ممکن است چنین اسپرم‌هایی توانایی بارور کردن تخمک را پیدا نمایند. میزان موفقیت این روش در ایجاد حاملگی حدود۳۰-۲۰٪ می‌باشد(٦). از آنجایی که این روش جهت درمان بیمارانی که در آنها عامل ناباروری فاکتورهای مردانه است چندان مؤثر نمی‌باشد، روش جدیدی به نام ICSI در سال ۱۹۹۲ توسط palermo مورد استفاده قرارگرفت(۷). در این روش درمانی، پس از جمع‌آوری تخمک‌ها، با استفاده ازآنزیم هیالورونیداز و روش‌های

---

۲. Assisted Reproduction Techniques (ART)
۳. Intra-Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI)
٤. In Vitro Fertilization (IVF)

مکانیکی سلول‌های کومولوس اطراف تخمک برداشته می‌شوند. سپس در زیر میکروسکوپ معکوس از میان اسپرم‌ها، بهترین اسپرم از لحاظ شکل و تحرک انتخاب شده و به‌وسیله سوزن میکرواینجکشن به داخل تخمک تزریق می‌شود. میزان موفقیت این روش نیز در ایجاد حاملگی حدود ۴۰-۲۰٪ می‌باشد (۸).

۱-۳ آماده‌سازی اسپرم در مراکز کمک‌باروری:

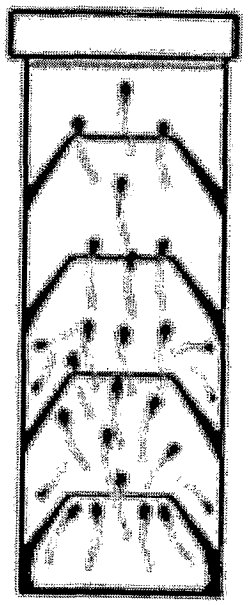
یکی از علل مهم ناباروری زوجین، عوامل مربوط به مردان است. با توجه به این که کیفیت مایع منی در افراد مختلف ناهمگن می‌باشد و همچنین در انزال‌های یک فرد نیز این ناهمگنی وجود دارد، لازم است مایع منی جهت جداسازی اسپرم‌های سالم (با تحرک بیشتر و شکل طبیعی) شستشو داده شود. در واقع آماده‌سازی اسپرم یکی از مهمترین مراحل در روش‌های کمک‌باروری می‌باشد (۹). بیشتر کلینک‌های باروری برای جداسازی اسپرم‌هایی با عملکرد طبیعی، از یکی از روش‌های زیر استفاده می‌کنند(۱۰) :

۱-۳-۱ مهاجرت اسپرم[۵]

اساس این روش بر پایه حرکت اسپرم می‌باشد که پس از رقیق کردن نمونه منی با یک محیط مناسب و سانتریفوژ آن رسوبی ته ظرف تشکیل می‌شود. اسپرم‌های متحرک از این رسوب به سمت بالا و به داخل محیط تازه اضافه شده شنا می‌کنند. سپس محیط که حاوی اسپرم‌های متحرک می‌باشد مورد استفاده قرار می‌گیرد(۹).

---

۵. Swim-up

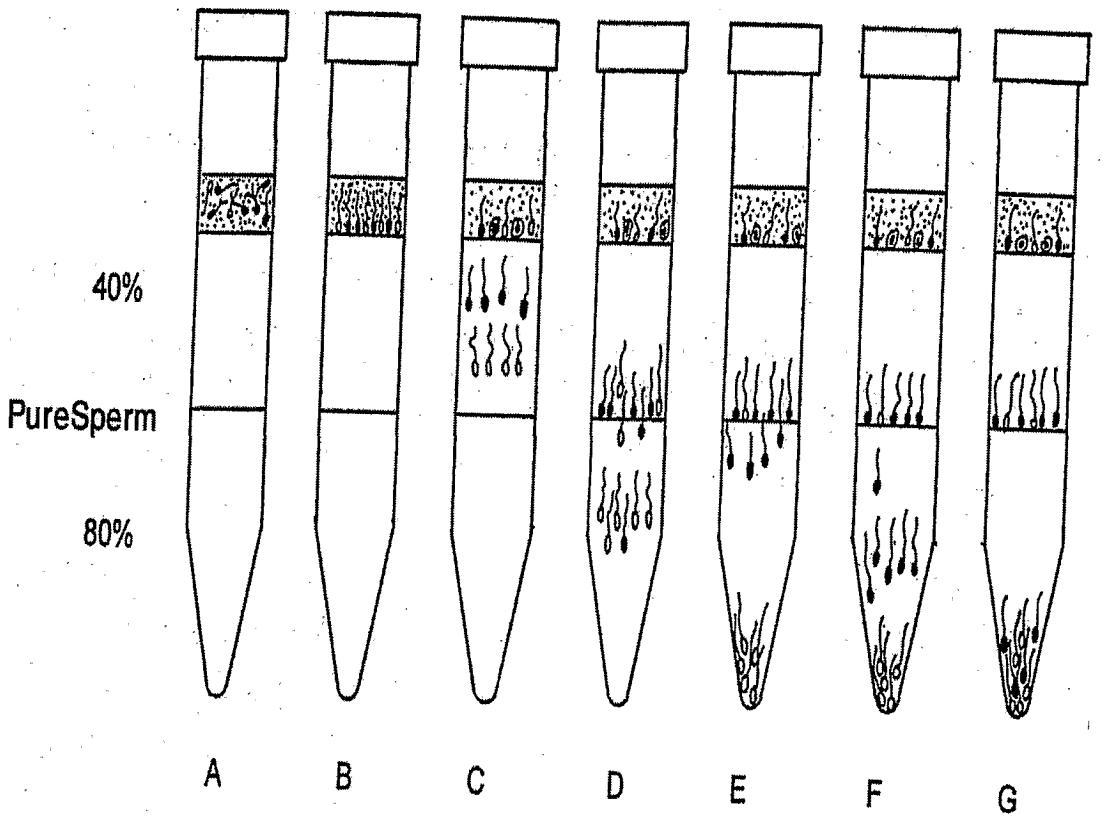


شکل ۱-۱: مراحل پی در پی در جداسازی اسپرم با استفاده از روش مهاجرت اسپرم

۱-۳-۲ سانتریفوژ در شیب غلظت[۶]

روش سانتریفوژ در شیب غلظت یک روش مناسب جهت جداسازی اسپرم از مایع منی می‌باشد (شکل ۱-۳). در این روش مایع منی بر روی لایه‌هایی با غلظت‌های مختلف قرار گرفته و پس از سانتریفوژ بر اساس چگالی (حجم/وزن)، جداسازی انجام می‌گیرد. با توجه به چگالی باکتری‌ها، سلول‌ها، اسپرم‌های مرده و زنده هر کدام به ترتیب در لایه‌ها از بالا به پایین قرار می‌گیرند و اسپرم زنده که احتمالاً با حرکت نیز می‌باشد، براساس چگالی بیشتر به انتهای لوله رسیده و ته نشین می‌گردد. در این روش زمان سانتریفوژ با توجه به کیفیت نمونه اسپرمی متغیر است به‌طوری که وقتی جداسازی بخشی از یک نمونه اسپرمی با تحرک کامل وکیفیت بالا مورد نظر است، یک سانتریفوژ کوتاه مدت (کمتر از ۱۰ دقیقه) ممکن است کافی باشد در حالی که وقتی هدف، جداسازی بیشترین تعداد اسپرم از یک نمونه ضعیف باشد با افزایش زمان سانتریفوژ میزان جداسازی بالا بوده اما به دلیل طولانی شدن زمان سانتریفوژ، اسپرم‌های غیرمتحرک نیز به ته لوله می‌رسند(۱۱). مواد مورد استفاده در روش سانتریفوژ در شیب غلظت با عناوین مختلف تجاری شناخته می‌شوند که عبارتند از: Percoll، Sil-Select، Ixaprep و Pure Sperm که امروزه Pure Sperm به‌طور معمول در روش‌های کمک‌باروری و آزمایشگاه‌های آندرولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۲).

۶. Density gradient centrifugation



شکل ۱-۲: مراحل پی در پی در جداسازی اسپرم با استفاده از شیب غلظت پیور اسپرم (Makler 1998).

۱-٤ جداسازی اسپرم جهت تزریق به درون سیتوپلاسم تخمک:

امروزه روش ICSI به‌عنوان یک روش مناسب جهت درمان ناباروری مورد استفاده قرار می‌گیرد(۷) و میزان موفقیت آن به‌طور عمده وابسته به انتخاب نوع اسپرمی است که طی این روش جهت تزریق استفاده می‌شود(۱۳). در حال حاضر جنین شناسان با انتخاب بهترین اسپرم از لحاظ ظاهر سالم و تحرک اسپرم و سپس تزریق آن به داخل سیتوپلاسم تخمک شانس فرزند دار شدن را برای زوج‌های نابارور فراهم می‌سازند(۷) و از طرف دیگر Bartoov و همکارانش نیز اعلام کردند در موارد ICSI با انتخاب اسپرم‌هایی که هسته‌ای با شکل طبیعی دارند، می‌توان شانس حاملگی را افزایش داد(١٤-١٦) ولی مطالعات اخیر نشان می‌دهد در نوزادانی که از طریق ICSI به دنیا می‌آیند، شانس بروز اختلالات کروموزومی مانند آنوپلوئیدی‌کروزومی و حذف در کروموزوم Y نسبت به نوزادان طبیعی بیشتر است(۱۷، ۱۸). بنابراین ویژگی‌های شکل و تحرک به تنهایی قادر به پیشگویی وجود یا عدم وجود اختلالات کروموزومی در اسپرم نمی‌باشند(۱۹). به علاوه امروزه ارزیابی اولیه مایع منی، جزء اولین اقدامات انجام گرفته در بررسی زوج‌های نابارور می‌باشد ولی با این وجود، بررسی معمول مایع منی فقط می‌تواند وضعیت غلظت، ریخت‌شناسی و تحرک اسپرم را تعیین کند و بیان‌کننده سایر خصوصیات عملکردی اسپرم مانند بلوغ هسته، سلامت DNA (عدم تخریب DNA) و توانایی اسپرم در واکنش با تخمک نمی‌باشد(۲۰- ۲۲). مطالعات اخیر، علاوه بر روش‌های مختلف آماده‌سازی اسپرم، روش‌های دیگری را پیشنهاد می‌کنند که اساس آنها بر ساختار مولکولی و عملکردی اسپرم می‌باشد، از جمله: روش جداسازی الکتروفورتیک اسپرم(۲۳)، روش Zeta(۲٤) و روش توانایی اتصال اسپرم به HA (۲۵) و روش Magnetic sperm separation(٥٤).

۱-٤-۱- روش HA-binding :

اساس این روش جدید جداسازی اسپرم بر مبنای قابلیت اتصال آن به اسید هیالورونیک می باشد.. تحقیقات نشان داده است که اسپرم نابالغ همراه با زائده سیتوپلاسمی قابلیت اتصال به منطقه شفاف را ندارد، بنابراین گفته می شود که ایجاد گیرنده برای اتصال به منطقه شفاف قسمتی از فرایند تغییر در غشاء پلاسمایی اسپرم است. یکی از پروتئینهایی که در طی این تغییرات در سطح غشاء پلاسمایی اسپرم ایجاد می شود پروتئین PH-20 بوده که یک گیرنده برای اسیدهیالورونیک(HA) است. اتصال اسپرم به اسیدهیالورونیک از طریق این گیرنده بر روی سر اسپرم ایجاد می شود.

اسپرم های متصل به اسید هیالورونیک در محیط آزمایشگاه دارای ویژگی های زیر است:

(۱) اتصال به اسید هیالورونیک، انتخاب اسپرم بالغ را جهت تزریق بداخل اووسیت تسهیل می کند.

(۲) اسپرم نابالغ، ناهنجاری های کروموزمی بیشتری داشته و آنهائی که طی فرآیند اسپرماتوژنز در تغییر وضعیت غشاء پلاسمائی موفق نبوده اند، قادر به پیوند با اسید هیالورونیک نمی باشند.

(۳) اسپرم های متصل به اسید هیالورونیک دارای آکروزوم سالم می باشد.

(٤) اسپرم های دارای زائده های سیتوپلاسمیک قادر به پیوند با اسید هیالورونیک نمی باشند (۲۵).

۱-٤-۲-متد Zeta:

اخیرا روش Zeta به عنوان یک روش جدید جهت انتخاب اسپرم بالغ پیشنهاد شده است . انتخاب یک اسپرم بالغ و سالم از لحاظ مورفولوژی و پروتامین طبیعی و هسته سالم یک مرحله مهمی برای انجام روشهای کمک باروری(ART) می باشد. در این روش اسپرم ها بر اساس بار الکتریکی سطح غشاء جدا می

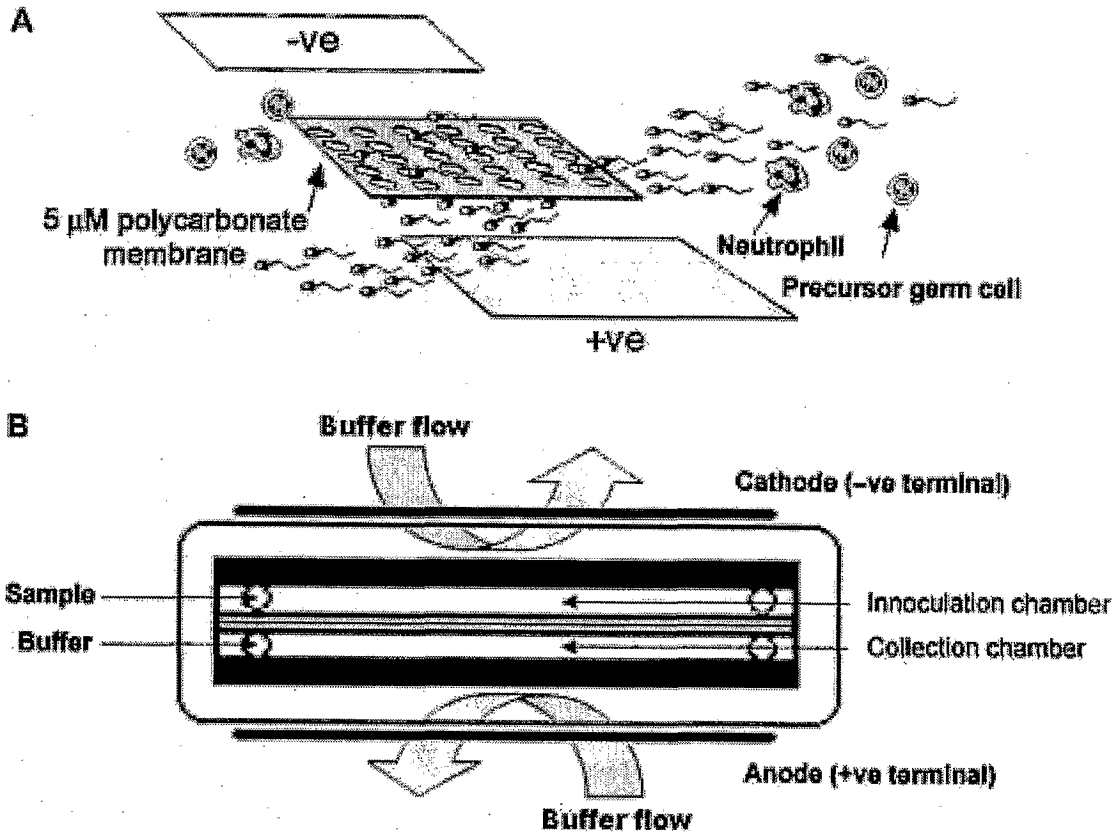
شوند. مزیت مهم روش Zeta این است که سلولهای اسپرم با ولتاژ بالای الکتریسیته مواجه نمی شوند. بعلاوه در این روش نیاز به دستگاههای گران قیمت الکتروفورز نیست (۲٤). روش Zeta یک روش کم هزینه می باشد که می تواند باعث بهبود پارامترهای اسپرمی مخصوصا مورفولوژی شود.

۱-٤-۳- جداسازی اسپرم ها با استفاده از دستگاه الکتروفورز:

در این روش اسپرم ها هم بر اساس بار الکتریکی موجود در سطح غشاء و هم بر اساس اندازه اسپرم جهت عبور از منافذ موجود در دستگاه جداسازی می شوند. در این روش نمونه اسپرمی در میدان الکتریکی قرار می گیرد که اسپرم های با بار منفی سریعتر به سمت قطب مثبت حرکت می کنند. همزمان این اسپرم ها از یک فیلتر از ترکیبات کربن که دارای منافذی به اندازه اسپرم می باشد نیز می گذرند. اسپرم های غیر متحرک و همچنین سلولهای دیگر از این منافذ عبور نمی کنند. از مزایای این روش حساس بودن آن و جداسازی اسپرم های با آسیب DNA کمتر را می توان نام برد. از سوی دیگر هزینه بالای استفاده از دستگاه، ساده نبودن کار با آن، و همچنین صرف زمان زیاد جهت جداسازی از جمله معایب این روش می باشد(شکل۱-۳)(۵۳).

۱-٤-٤ - روش جداسازی اسپرم ها بر اساس Magnetic sperm separation:

آپوپتوز به عنوان یک پدیده فیزیولوژیک مهم جهت حذف سلولهای آسیب دیده می باشد. در سلولهای سوماتیک و زاینده و همچنین در مایع سمن مارکرهایی وجود دارد که نشان دهنده وجود آپوپتوز در سلولهای مذکور می باشد. ازجمله این مارکرها می توان به فعال شدن آنزیم کاسپاز(آنزیم کلیدی در فرآیند آپوپتوز)، بیان گیرنده FAS، اختلال در پتانسیل غشایی میتوکندریها، افزایش میزان فراگمنتاسیون DNA و...



شکل ۱-۳ : جداسازی اسپرم ها بر اساس دستگاه الکتروفورز

اشاره کرد. وجود مارکرهای آپوپتوز در مایع سمن انسان نمی تواند به طور کامل گویای وجود پدیده آپوپتوز در اسپرم ها باشد. به همین دلیل وجود این مارکرها و میزان پدیده آپوپتوز هنوز مورد بحث و تحقیق می باشد(٥٦). با این حال وجود مار کرهای آپوپتوز با ناهنجاریهای اسپرم مانند ناهنجاریهای مورفولوژیکی،کروموزومی و ناهنجاریهای کروماتین اسپرم ارتباط دارد.

اخیرا متدی برای جداسازی اسپرمهای فاقد پدیده آپوپتوز از اسپرم های در معرض آپوپتوز شناسایی شده که تحت عنوان MACS شناخته می شود. روش MACS بر اساس خاصیت اتصال آنکسینV به فسفاتیدیل سرین سطح غشا است. فسفاتیدیل سرین در حالت طبیعی در سطح داخلی غشای اسپرم وجود داشته و همزمان با شروع آپوپتوز به سمت سطح خارجی غشای اسپرم منتقل می شود. جابجایی فسفاتیدیل سرین از سطح داخلی به سمت خارج غشا موید وجود آپوپتوز در اسپرم می باشد. آنکسینV یک پروتئین اتصالی به فسفولیپید می باشد که توانایی زیادی جهت اتصال به فسفاتیدیل سرین دارد. همچنین این پروتئین توانایی عبور از غشای اسپرم را نداشته و به همین دلیل تنها به فسفاتیدیل سرین سطح غشا اتصال می یابد.

در روشMACS ابتدا ذرات بسیار ریز پارامغناطیسی با پروتئین آنکسینV به صورت کونژوگه در می آید. سپس جداسازی اسپرم ها با روش گرادیان دانسیته صورت گرفته واسپرمهای جدا شده در معرض آنکسینV کونژوگه شده با ذرات پارا مغناطیسی قرار می گیرد. اسپرم ها در طی زمان مشخصی در معرض ستونهای حاوی میدان مغناطیسی قرار گرفته و اسپرم هایی که از طریق فسفاتیدیل سرین سطح غشا به پروتئین کونژوگه شده با ذرات مغناطیسی اتصال پیدا کرده اند در میدان الکتریکی گیرافتاده و اسپرم های بدون مارکر آپوپتوز فسفاتیدیل سرین در طول ستون عبور می کنند. سپس دو گروه از یکدیگر تفکیک شده و جهت پروسه های بعدی و یا تحقیقات مورد استفاده قرار می گیرند(٢٤).