۱۱۵۰۴۲

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی گرایش فیزیولوژی جانوری

# مقایسه کارایی روش زتا و روش شیب اسپرم خالص در نتایج حاصل از تزریق‌های درون سیتوپلاسمی اسپرم

استادان راهنما:

دکتر سید جمال مشتاقیان

دکتر محمد حسین نصر اصفهانی

دکتر شهناز رضوی

استاد مشاور:

مهندس مرضیه تولایی

پژوهشگر:

مهسا خیراللهی

بهمن ماه ۱۳۸۷

مرکز اطلاعات و مدارک علمی جهاد
تهیه مدارک

۱۳۸۸/۴/۲

۱۱۵۰۴۲

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات،
ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق
موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه
اصفهان است.

کلیه هزینه‌های مصرفی و غیرمصرفی این پایان‌نامه برمبنای طرح شماره ۶-۲۷۰ از بودجه تحقیقات پژوهشکده رویان- جهاد دانشگاهی تامین گردیده است

شیوه نگارش پایان نامه
رعایت شده است
تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان

**دانشگاه اصفهان**

**دانشکده علوم**

**گروه زیست شناسی**

# پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی گرایش فیزیولوژی جانوری، خانم مهساخیراللهی کوهستانی تحت عنوان

# مقایسه کارایی روش زتا و روش شیب اسپرم خالص در نتایج حاصل از تزریق‌های درون سیتوپلاسمی اسپرم

در تاریخ ۸۷/۱۱/۱۶ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه ..عالی.. به تصویب نهایی رسید.

| | | | |
|---|---|---|---|
| ۱- استادان راهنمای پایان نامه | دکتر سید جمال مشتاقیان | با مرتبه‌ی علمی استادیار | امضاء |
| | دکترمحمدحسین نصراصفهانی | با مرتبه‌ی علمی دانشیار | امضاء |
| | دکتر شهناز رضوی | با مرتبه‌ی علمی دانشیار | امضاء |
| ۲- استاد مشاور پایان نامه | مهندس مرضیه تولایی | با مرتبه‌ی علمی مربی | امضاء |
| ۳- استاد داور داخل گروه | دکتر اکبر وحدتی | با مرتبه‌ی علمی استاد | امضاء |
| ۴- استاد داور خارج از گروه | دکتر حسن حسنی | با مرتبه‌ی علمی دانشیار | امضاء |

**امضای مدیر گروه**

گروه زیست شناسی ۱۳۹۵ Department of Biology

## تشکر و قدردانی:

لازم می دانم از زحمات تمامی عزیزانی که طی دوران تحصیل و اجرای این پایان نامه با اینجانب همکاری داشته اند تشکر و قدردانی نمایم:

با سپاس از **جناب آقای دکتر سید جمال مشتاقیان، جناب آقای دکتر محمد حسین نصر اصفهانی و سرکار خانم دکتر شهناز رضوی و سرکار خانم مهندس مرضیه تولایی** به جهت صبر و شکیبایی و نصایح ارزشمندشان در انجام این مطالعه، برای آن بزرگواران آرزوی سلامتی و موفقیت می‌نمایم.

با تقدیر و تشکر از **مدیر محترم گروه زیست شناسی جناب آقای دکتر قادریان** و اساتید گرانقدری که در طول ایام تحصیلم خالصانه دانسته ها و تجربیات خویش را در اختیارم گذاشتند.

با سپاس از کلیه دوستان صادق و مهربانم **سرکار خانم ها حاتمی، خواجوی، میرحسینی، بابازاده، سلیمانی** که لحظه‌های بودن با آن عزیزان از بهترین خاطرات زندگی‌ام هستند.

با تشکر فراوان از کلیه پرسنل پرتلاش پژوهشکده رویان و مرکز تحقیقاتی اصفهان و کارکنان صدیق مرکز باروری و ناباروری اصفهان که نهایت همکاری را داشتند. از درگاه پروردگار متعال برای همه این عزیزان توفیق روزافزون خواستارم.

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم آنان که تکیه گاه پرسخاوت لحظه های بودنم و ترنم زیبای زندگی من هستند

تقدیم به

یگانه خواهر مهربانم ، او که حضور سبزش گرمابخش قلب و جان من است

**چکیده:**

در حال حاضر انتخاب اسپرم توسط جنین‌شناسان جهت ICSI بر اساس شکل و تحرک است، لیکن مطالعات انجام شده ثابت نموده‌اند که این ویژگی‌ها همیشه جهت انتخاب اسپرم بالغ با DNA سالم کارایی ندارند. در مرحله اسپرمیوژنز ۸۵٪ هیستون موجود در ساختار کروماتین توسط پروتامین جایگزین می شود. بنابراین کمبود پروتامین می تواند یکی از علل تخریب DNA باشد. از طرفی مطالعات نشان داده که جداسازی اسپرم بر اساس وجود بار الکتریکی منفی بر روی سطح غشاء آن منجر به جداسازی اسپرم‌هایی بلوغ یافته با سلامت ساختار کروماتین می‌گردد و از این‌رو انتخاب چنین اسپرم‌هایی جهت انجام ICSI می‌تواند مفید واقع گردد. از سوی دیگر روش سانتریفیوژ در شیب غلظت(پیور) به عنوان روشی مناسب جهت جداسازی اسپرم در حال حاضر در بیشتر مراکز کمک باروری جهت جداسازی اسپرم مورد استفاده قرار می‌گیرد. از این‌رو هدف در این مطالعه آن بوده تا بکارگیری همزمان هر دو روش مذکور جهت جداسازی اسپرم ، نتایج حاصل از ICSI مورد ارزیابی قرار گرفته و نتایج حاصله با گروه کنترل مورد مقایسه قرار گیرد. از بین افراد مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان که کاندیدای انجام روش درمانی ICSI بودند، ۶۲ بیمار نابارور انتخاب گردیدند. بیماران به‌طور همزمان به دو گروه A و B تقسیم گردیدند. تخمک‌های بیماران گروه A به دو قسمت تقریبا مساوی تقسیم گردید. نیمی از تخمک‌های بیماران گروه A با اسپرم‌های جداسازی شده به روش پیور( گروه کنترل داخلی) و نیم دیگر تخمک‌ها با اسپرم‌های جداسازی شده توسط روش ترکیبی پیور-زتا (گروه آزمایش) تلقیح شدند. تخمک‌های بیماران گروه B با اسپرم‌های جداسازی شده به روش پیور تلقیح گردیدند. درحقیقت گروهB به عنوان گروه کنترل خارجی در نظر گرفته شد. در هر دو گروهA و B معیار انتخاب اسپرم جهت تزریق درون سیتوپلاسمی،شکل و تحرک مناسب بود..پس از انجام عمل ICSI ،درآزمایشگاه آندرولوژی باقی‌مانده نمونه بیماران گروه A به ۴ بخش تقسیم می‌گردید که عبارت بودند از: بخش اول،نمونه مایع منی دوبار شستشو شده بیماران بود که هیچ نوع عمل جداسازی اسپرم بر روی آن انجام نمی‌پذیرفت و به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته می‌شد.بخش دوم، نمونه مایع منی بیماران بود که توسط روش زتا جداسازی می‌گردید.بخش سوم، نمونه مایع منی که توسط روش پیور جداسازی می‌شد.بخش چهارم ،نمونه مایع منی بیماران بود که توسط روش ترکیبی پیور-زتا جداسازی می‌گردید. نمونه‌های آماده‌سازی شده از هر بخش بطور مجزا از لحاظ ریخت‌شناسی، میزان کمبود پروتامین ومقدار تخریب DNA به ترتیب با استفاده از روش رنگ آمیزی Diff Quick، رنگ آمیزی کروموماپسین A3 (CMA3)وSperm Chromatin Dispersion (SCD) مورد بررسی قرار گرفتند.همچنین نتایج حاصل ازانجام عمل ICSI ،از جمله درصد لقاح ، درصد کلیواژ و کیفیت جنین‌های تشکیل شده در روز دوم و سوم پس از لقاح بین گروه‌های آزمایش، کنترل داخلی و گروه کنترل خارجی(گروهB) مقایسه و ارزیابی گردید.علاوه بر این میانگین درصد حاملگی و لانه‌گزینی جنین در هر دو گروه A و B محاسبه شد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که درصد اسپرم‌ها با شکل غیرطبیعی، کمبود پروتامین و درصد تخریب DNA درسه گروه اسپرم‌های جداسازی شده به روش زتا، روش پیور و روش ترکیبی پیور- زتا نسبت به گروه کنترل(نمونه مایع منی دو بار شستشوشده)، از لحاظ آماری کاهش معنی‌داری یافته‌است

(P< ۰/۰۵ ). به‌علاوه بین روش زتا و روش ترکیبی پیور- زتا تفاوت معنی‌داری از لحاظ جداسازی اسپرم با شکل و محتوای پروتامین طبیعی وجود دارد (P< ۰/۰۵ ) ، در صورتی‌که روش پیور-زتااختلاف معنی‌داری را نسبت به روش پیور در جداسازی اسپرم‌ها با شکل و محتوای پروتامین طبیعی دارا نیست (P > ۰/۰۵ ). افزون بر این، در جداسازی اسپرم‌های دارای تخریب DNA تفاوت معنی‌داری بین سه روش زتا، پیور و روش ترکیبی پیور-زتا وجود ندارد (P > ۰/۰۵ ). از سوی دیگر،درصد لقاح به طور معنی‌داری در گروه A نسبت به گروه کنترل خارجی(گروهB) بالاتر می‌باشد (P<۰/۰۵). از لحاظ درصد کلیواژ ،در روز دوم وسوم پس از لقاح تفاوت معنی‌داری بین سه گروه وجود نداشته است(P > ۰/۰۵ ). همچنین کیفیت جنین‌های تشکیل‌شده در روز دوم پس از لقاح ، تفاوت معنی‌داری بین سه گروه آزمایش ،کنترل داخلی و گروه B را نشان نمی‌دهد (P > ۰/۰۵ ). در روز سوم پس از لقاح ،کیفیت جنین‌های تشکیل‌شده در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل داخلی و گروه B افزایش داشته ، و این تفاوت نزدیک به معنی‌دار شدن بوده است (P = ۰/۰۹۵ )لیکن تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل داخلی و گروه B مشاهده نگردید (P > ۰/۰۵ ). در گروه A میزان تفاوت درصد حاملگی درمقایسه با گروه B معنی‌دار می‌باشد (P < ۰/۱). درصد لانه‌گزینی جنین در گروه A نسبت به گروهB افزایش یافته، لیکن این تفاوت معنی‌دار نیست (P > ۰/۰۵ ). نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آن هستند که بکارگیری هم‌زمان دو روش پیور و زتا (روش ترکیبی پیور-زتا)منجر به جداسازی اسپرم‌هایی با شکل و ساختار کروماتین طبیعی می‌گردد و استفاده از این روش ترکیبی با افزایش دادن درصد لقاح و حاملگی و نیز درصد لانه‌گزینی جنین گزینه مناسبی را جهت جداسازی اسپرم‌ها در درمان ICSI در پیش‌روی محققین قرارمی‌دهد.

واژگان کلیدی- روش زتا، روش پیور، روش ترکیبی پیور-زتا، باروری، حاملگی، لانه‌گزینی

## فهرست مطالب

**عنوان** **صفحه**


**فصل اول: کلیات و مروری بر منابع**

۱-۱مقدمه..... ۱

۱-۲- تعریف ناباروری..... ۲

۱-۳- انواع ناباروری..... ۲

۱-۴- علل ناباروری..... ۲

۱-۵- ساختار کروماتین در هسته اسپرم..... ۵

۱-۶- تخریب DNA اسپرم..... ۹

۱-۶-۱- عوامل درون زاد..... ۹

۱-۶-۲- عوامل برون زاد..... ۱۰

۱-۷روش‌های کمک باروری..... ۱۲

۱-۸- روش‌های معمول جداسازی اسپرم در مراکز کمک‌باروری..... ۱۳

۱-۸-۱- مهاجرت اسپرم..... ۱۳

۱-۸-۲- سانتریفیوژ در شیب غلظت..... ۱۴

۱-۹- جداسازی اسپرم جهت تزریق به‌درون سیتوپلاسم تخمک..... ۱۵

۱-۱۰- روش‌های نوین جداسازی اسپرم جهت تزریق به درون سیتوپلاسم تخمک..... ۱۶

۱-۱۰-۱- روش جداسازی الکتروفورتیک اسپرم..... ۱۶

۱-۱۰-۲- روش جداسازی زتا..... ۱۷

۱-۱۰-۳- روش جداسازی اسپرم بر اساس توانایی اتصال به اسیدهیالورونیک..... ۱۸

۱-۱۰-۴- روش جداسازی اسپرم بر اساس MACS..... ۲۰

۱-۱۰-۵- روش جداسازی اسپرم بر اساس بزرگنمایی میکروسکوپ..... ۲۱

۱-۱۱- اهداف و اهمیت اجرای طرح ..... ۲۳

**فصل دوم: مواد و روش ها**

۲-۱- مواد و وسائلی که در این پروژه مورد استفاده قرار گرفته اند..... ۲۴

عنوان | صفحه


۲-۲- وسایل آزمایشگاهی مورد استفاده در این طرح ..... ۲۶
۲-۳- محلول ها و بافرهای استفاده شده در این پژوهش ..... ۲۷
۲-۳-۱- محلول های شیمیایی مورد نیاز جهت رنگ آمیزی کروموماپسین $A_3$ ..... ۲۷
۲-۳-۲- محلول های شیمیایی مورد نیاز جهت رنگ آمیزی Diff Quick ..... ۲۸
۲-۳-۳- محلول های شیمیایی مورد نیاز جهت رنگ آمیزی SCD ..... ۲۸
۲-۴- روش اجرای پروژه ..... ۲۸
۲-۴-۱- جمعیت مورد مطالعه ..... ۲۸
۲-۴-۲- جمع آوری مایع منی ..... ۲۹
۲-۴-۳- ارزیابی اولیه مایع منی ..... ۳۰
۲-۴-۴- روش‌های جداسازی اسپرم ..... ۳۱
۲-۴-۵- ارزیابی ریخت‌شناسی اسپرم ..... ۳۲
۲-۴-۶- رنگ آمیزی Diff Quick ..... ۳۳
۲-۴-۷- ارزیابی ریخت‌شناسی اسپرم بر اساس معیار جزیی ..... ۳۳
۲-۴-۸- ارزیابی کمبود پروتامین بر اساس رنگ آمیزی کروموماپسین $A_3$ ..... ۳۴
۲-۴-۹- ارزیابی تخریب DNA بر اساس تست SCD ..... ۳۶
۲-۴-۱۰- تحریک تخمک گذاری و تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم ..... ۳۹
۲-۴-۱۱- ارزیابی لقاح ..... ۳۹
۲-۴-۱۲- ارزیابی جنین ..... ۴۰
۲-۴-۱۳- انتقال جنین ..... ۴۰
۲-۵- روش های بررسی آماری ..... ۴۱

**فصل سوم: نتایج**

**فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری**

۴-۱- پیشنهادات ..... ۵۸
منابع و مآخذ ..... ۵۹

## فهرست شکل ها

**عنوان** **صفحه**


شکل ۱-۱- مراحل تشکیل و بلوغ اسپرم در بیضه و اپیدیدیم..... ۴

شکل ۱-۲- شکل شماتیک مقایسه ساختار کروماتین در هسته سلول‌های سوماتیک و اسپرم..... ۶

شکل ۱-۳- ترتیب جایگزینی هیستون توسط پروتامین طی روند بلوغ اسپرم..... ۶

شکل ۱-۴- اتصال پروتامین به کروماتین اسپرم و بسته‌بندی DNA..... ۸

شکل ۱-۵- روش جداسازی مهاجرت اسپرم..... ۱۳

شکل ۱-۶- مراحل جداسازی اسپرم با استفاده از روش سانتریفیوژ شیب غلظت..... ۱۴

شکل ۱-۷- روش تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم به داخل تخمک(ICSI)..... ۱۵

شکل ۱-۸-جداسازی اسپرم‌ها با استفاده از دستگاه الکتروفورز..... ۱۶

شکل ۱-۹- جداسازی اسپرم‌ها براساس روش زتا..... ۱۸

شکل ۱-۱۰-جداسازی اسپرم‌ها بر اساس توانایی اتصال به اسید هیالورونیک..... ۱۹

شکل ۱-۱۱- جداسازی اسپرم‌ها بر اساس روش MACS..... ۲۱

شکل ۲- ۱- ناهنجاری های ریخت شناسی اسپرم..... ۳۴

شکل ۲-۲-- نمای میکروسکوپی اختلالات کروماتین به روش $CMA_3$..... ۳۵

شکل ۲-۳- نمای میکروسکوپی اسپرم های بدون تخریب DNA..... ۳۷

شکل ۲-۴- نمای میکروسکوپی اسپرم های دارای تخریب DNA..... ۳۸

شکل ۳-۱- مقایسه میزان درصد شکل غیرطبیعی بر اساس روش جداسازی اسپرم..... ۴۵

شکل ۳-۲- مقایسه میزان درصد کمبود پروتامین بر اساس روش جداسازی اسپرم..... ۴۶

شکل۳-۳- مقایسه میزان تخریب DNA بر اساس روش جداسازی اسپرم..... ۴۷

شکل ۳-۴- مقایسه میزان لقاح در گروه‌های B ،کنترل داخلی و آزمایش..... ۴۹

شکل ۳-۵- مقایسه درصد حاملگی و لانه‌گزینی در دو گروه A و B..... ۵۱

شکل ۳-۶- مقایسه میزان درصد حاملگی و لانه‌گزینی بر اساس تعدادجنین منتقل شده از گروه A..... ۵۱

## فهرست جدول ها

**عنوان** **صفحه**

جدول ۳-۱- اطلاعات توصیفی مربوط به ویژگی‌های اسپرمی بیماران نابارور گروهA.....۴۳
جدول ۳-۲- اطلاعات توصیفی مربوط به ویژگی‌های اسپرمی بیماران نابارور گروهB.....۴۳
جدول ۳-۳- مقایسه محدوده سنی بیماران و تعداد دفعات درمان قبلی در دو گروه A و B.....۴۸
جدول ۳-۴- درصد زوجین با علل و فاکتورهای ناباروری در دو گروهA و B.....۴۸
جدول ۳-۵-میزان درصد کلیواژ و کیفیت جنین‌های تشکیل‌شده در روز دوم و سوم در گروه‌هایB ،کنترل داخلی و آزمایش.....۵۰

# فصل اول

# کلیات و مروری بر منابع

## ۱-۱ مقدمه

بارور بودن موهبتی الهی است که همچون حلقه‌ای ارزشمند نسل‌ها را به هم پیوند می دهد تا نوع بشر هدیه آسمانی حیات را به آیندگان بسپارد. هر چند در این میان افرادی هستند که در آرزوی داشتن فرزند ناکام می مانند. در حال حاضر، جهت فائق آمدن بر این معضل برای درمان افراد نابارور از روش‌های کمک باروری (ART) استفاده می گردد با این هدف که این روش‌ها بتوانند پنجره‌ای امیدبخش را در جهت درمان زوجین نابارور بگشایند و به چشم‌های منتظربیماران نابارور نوید آمدن هدیه‌ای از سوی پروردگار را مژده دهند. آن هدیه همانا لبخند شیرین کودکی است که پس از سال‌ها انتظار والدین خود، به دل‌های پرامیدشان تقدیم می کند.در حال حاضر بیش از هشتاد میلیون زوج در جهان (۱)و بیش از یک ونیم میلیون زوج در ایران نابارورند این تخمین بر پایه گزارش سازمان بهداشت جهانی[1] (WHO) است. بطورکلی، ۱۵-۱۰ درصد از زوج‌های جوان معمولا با مشکل نازایی مواجه‌اند(۲).

---

1. World Health Organization (WHO)

## ۱-۲ تعریف ناباروری :

ناباروری عبارت است از عدم دستیابی به حاملگی درصورتی‌که یک سال از زمان تصمیم‌گیری یک زوج جهت فرزنددار شدن گذشته باشد(۳،۴).

## ۱ -۳ انواع ناباروری :

به طور کلی ناباروری به دو دسته طبقه‌بندی می‌گردد :

۱- ناباروری اولیه : حالتی است که سابقه باروری در گذشته بیمار وجود نداشته باشد.

۲- ناباروری ثانویه : حالتی است که یک یا چند حاملگی ، قبل از ایجاد ناباروری داشته و در مراجعه به مراکز درمانی ثبت شده است(۳).

## ۱-٤ علل ناباروری :

علل ناباروری به چهار صورت دیده می شود :

۱. ناباروری به علت فاکتور مردانه

۲. ناباروری به علت فاکتور زنانه

۳. ناباروری با علت فاکتورهای مردانه و زنانه به‌طور هم‌زمان

۴. ناباروری به دلایل ناشناخته

۴۰ تا ۵۰ درصد موارد ناباروری مربوط به فاکتورهای مردان است. با این همه ارزیابی ناباروری به صورت یک عامل نسبی است که هر دو زوج را گرفتار می کند و نباید فقط به یکی از آن دو نسبت داده شود(۵). میزان پراکندگی علل ناباروری در مردان و زنان بخوبی مشخص نشده است. طی سال‌های ۱۹۸۵-۱۹۸۲ سازمان بهداشت جهانی 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 (۶).

غالباً به علت سهولت بررسی مایع منی، ناباروری در مردان زودتر تشخیص داده می شود. علل ناباروری مردان به ۴ گروه کلی زیر تقسیم می گردند (۷):

۱- بیماری‌های هیپوتالاموس - هیپوفیز (هیپوگنادیسم ثانویه) به میزان ۲-۱ درصد

۲- بیماری‌های بیضه (هیپوگنادیسم اولیه) به میزان ۴۰-۳۰ درصد

۳- نقایص مجاری انتقال اسپرم به میزان ۲۰-۱۰ درصد

۴- ناباروری با علت نامشخص به میزان ۶۰-۴ درصد

یکی از مراحل اصلی و شاید قدم اول در تشخیص زوج‌های نابارور، بررسی خصوصیات مایع منی از لحاظ قدرت باروری می باشد. جهت انجام این بررسی روش‌های استانداردی از سوی WHO ارائه گردیده است که مورد قبول اکثر مراکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری می باشند. در بررسی مایع منی، ارزیابی ویژگی‌های اسپرم از اهمیت خاصی برخوردار است. ویژگی‌های مهم اسپرم عبارتند از تعداد، تحرک و ریخت‌شناسی. طبق معیار WHO یک نمونه طبیعی منی دارای حداقل بیست میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر، ۵۰٪ تحرک پیشرونده و حداقل ۳۰٪ از اسپرم‌ها دارای شکل طبیعی می باشند. در نمونه‌های غیرطبیعی یک و یا چند ویژگی اسپرم دچار اختلال می باشد که می توان با توجه به معیارهای ارائه شده WHO آن‌ها را به گروه‌های زیر تقسیم نمود (۱):

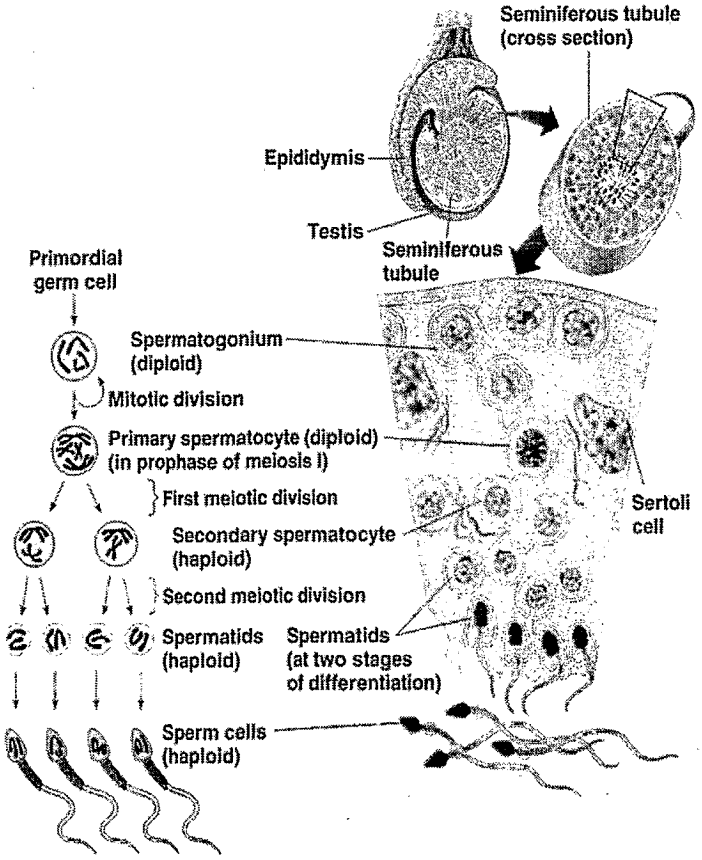
- Oligozoospermia: نمونه‌هایی که تعداد اسپرم در هر میلی لیتر مایع منی کمتر از $۲۰ \times ۱۰^{۶}$ باشد.
- Teratozoospermia: نمونه‌هایی که‌درهرمیلی‌لیترآن‌هاکمتراز ۳٪ اسپرم‌ها دارای شکل طبیعی‌هستند.
- Asthenozoospermia: نمونه‌هایی که در هر میلی لیتر آن کمتر از ۵۰٪ اسپرم ها، دارای حرکت پیشرونده و یا کمتر از ۲۵٪ اسپرم ها دارای حرکت سریع در خط مستقیم باشند.
- Oligoasthenozoospermia: نمونه‌هایی که تعداد و حرکت اسپرم در آن‌ها غیرطبیعی باشد.
- Oligoteratozoospermia: نمونه‌هایی که تعداد و شکل اسپرم در آن‌ها غیرطبیعی باشد.
- Asthenoteratozoospermia: نمونه‌هایی که شکل و حرکت اسپرم در آن‌ها غیرطبیعی باشد.
- Oligoasthenoteratozoospermia: نمونه‌هایی که هرسه ویژگی تعداد، حرکت و ریخت‌شناسی اسپرم در آن‌ها غیرطبیعی باشد.
- Azoospermia: نمونه‌های فاقد اسپرم.

به‌طور طبیعی تشکیل و بلوغ اسپرم در بیضه و اپیدیدیم رخ می‌دهد. این فرآیند شامل سه مرحله اسپرماتوسیتوژنز، میوز و اسپرمیوژنز به شرح زیر است ( شکل ۱-۱).

۱. اسپرماتوسیتوژنز: طی آن اسپرماتوگونی‌ها تقسیم شده و نسل‌های پیاپی سلولی ایجاد می شوند که در نهایت اسپرماتوسیت بوجود می‌آید.

۲. میوز: طی آن اسپرماتوسیت‌ها دستخوش دو تغییر پیاپی شده و تعداد کروموزوم ها و مقدار DNA هر سلول به نصف کاهش می یابد و اسپرماتید ایجاد می‌شود.

۳. اسپرمیوژنز: سلسله تغییراتی که بر اثر تغییر شکل اسپرماتید به اسپرماتوزوئید بوجود می‌آیند، تحت عنوان اسپرمیوژنز نامیده می‌شوند.




**شکل ۱-۱ : مراحل تشکیل و بلوغ اسپرم در بیضه و اپیدیدیم**

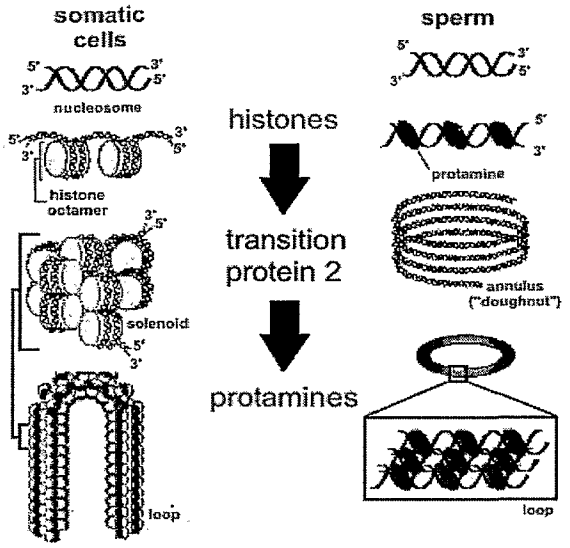
یکی از مهمترین وقایع طی اسپرمیوژنز تغییرات بیوشیمیائی و ریخت‌شناسی اسپرم است. طی این فرآیند ساختمان کروماتین اسپرماتوگونی که مشابه سلول سوماتیک می‌باشد، تغییر یافته و کروماتین اسپرم شکل می‌گیرد. بنابراین، پروتامین‌ها به جای هیستون‌ها در کروماتین هسته جایگزین می‌شوند که باعث تراکم و بسته‌بندی کروماتین در هسته می‌گردند (۸).

## ۱-۵ ساختار کروماتین در هسته اسپرم

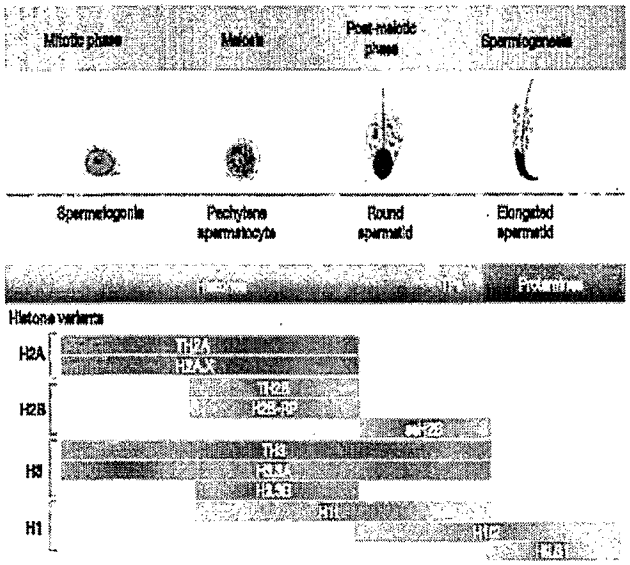
یکی از برجسته‌ترین تغییرات ساختاری کروماتین در طول اسپرم‌زایی(اسپرماتوژنز) پستانداران رخ می‌دهد (۹) در این فرآیند کروماتین اسپرم به میزان زیادی فشرده می‌شود ، اولین گام دراین رویداد در اسپرماتیدهای گرد رخ می دهد، وهیستون‌ها توسط پروتئین‌های انتقالی (Transitional proteins) جایگزین شده ، سپس در مرحله طویل شدن اسپرماتید،پروتامین‌ها جایگزین این پروتئین‌ها می گردند (۸).

فرآیند جایگزینی پروتامین به جای هیستون در انسان در چند مرحله صورت می گیرد. در ابتدای مرحله اسپرمیوژنز، هیستون‌های ویژه بیضه به جای هیستون‌های سوماتیک (شکل ۱-۲) و (۲-۲) قرار می گیرند (۱۰). هیستون‌ها، پروتئین‌های بازی هستند که حاوی ۲۰-۱۰ درصد اسید آمینه لیزین و آرژینین می باشند و دارای پنج نوع H1، H2A ، H2B ، H3 و H4 هستند. در بیضه هیستون H1 وجود ندارد و هیستون H2 به دو شکل کمی متفاوت بنام H2AX و H2AZ دیده می شود و هیستون‌های H3 و H4 به میزان زیادی استیله هستند (۱۱ و ۱۲). این هیستون‌ها در کروماتین اسپرم تشکیل نوکلئوزوم‌هایی را می دهند که بسیار متراکم‌تر از آن چیزی هستند که در سلول‌های سوماتیک دیده می‌شوند ولی به دنبال فسفوریلاسیون H2AX کروماتین حالت گسترده به خود می‌گیرند (۱۱ و ۱۳). فقدان H1 و استیله بودن هیستون‌ها مخصوصاً H3 و H4 و فسفوریلاسیون H2AX نشانگر کروماتین فعال است (۱٤، ۱۵ و ۱٦). در اسپرم انسان تقریباً ۲۰-۱۵ درصد هیستون‌های بیضه‌ای باقی می‌مانند (۱۲ و ۱٤). در بعضی گونه‌ها مانند موش‌صحرایی (۱۷) ، موش (۱۷) و انسان (۱۸ و ۱۹) ۸۵-۸۰ درصد هیستون‌ها در اواسط اسپرمیوژنز بوسیله پروتئین‌هایی با خصوصیات بازی متوسط بنام پروتئین‌های حدواسط[1] (TP) جایگزین می گردند .

1. Transitional Proteins (TP)




شکل ۱-۲ : شکل شماتیک مقایسه ساختار کروماتین در هسته سلول‌های سوماتیک و اسپرم




شکل ۱-۳ : ترتیب جایگزینی هیستون توسط پروتامین در طی روند بلوغ اسپرم.

TP1 یک روز دیرتر از TP2 ظهور می کند و عمل آن خروج DNA از حالت پایدار و تحریک ترمیم DNA می باشد (۲۰ و ۲۱). به طور کلی اطلاعات کمی درباره اعمال اختصاصی پروتئین‌های حدواسط در دست است. این پروتئین‌ها احتمالاً در جایگزینی هیستون‌ها توسط پروتامین‌ها نقش دارند و یا ممکن است در متوقف کردن فعالیت نسخه برداری اسپرماتید دخیل باشند.

در مرحله آخر اسپرمیوژنز پروتئین‌های حدواسط توسط پروتامین‌ها جایگزین می‌شوند. این پروتئین‌ها بار مثبت زیادی دارند (۵۰ درصد خاصیت بازی آن‌ها بیشتر از هیستون‌ها است) و باعث تراکم و بسته‌بندی کروماتین در واحدهای حلقوی[1] می گردند. هر واحد حلقوی حاوی ۵۰ کیلو باز DNA است و اندازه آن حدود ۵۰ نانومتر می‌باشد (۵ و ۲۲). دو خانواده متفاوت از این پروتئین‌ها (P1 و P2) در پستانداران تشخیص داده شده است. در انسان ٤ نوع پروتامین وجود دارد: HP1، HP2، HP3 و HP4. از این ٤ نوع، پروتامین‌های HP2، HP3 و HP4 در خانواده P2 و تنها HP1 در خانواده P1 قرار دارد (۲۳ و ۲٤). P1 در همه پستانداران یافت می‌شود (۲۵). خانواده P2 تنها در بعضی گونه‌ها مانند انسان، هامستر و موش وجود دارد (۲٦ و ۲۷). این خانواده به‌صورت پپتید پیش‌سازی که حدود ٦٦ تا ۱۰۱ اسید آمینه دارد، ساخته می‌شود. به دلیل تفاوت بریدگی انتهای آمینی، طول آن‌ها متفاوت است و تنها در ٤-۱ اسید آمینه باقیمانده در انتهای آمینی خود تفاوت دارند (۲۸، ۲۹ و ۲۷). حدود ۵۰٪ از اسیدهای‌آمینه پروتامین‌های P1 و P2 انسان با هم مشابهند (۲۸). در حالت طبیعی نسبت P1/P2 در انسان تقریباً برابر یک است (۳۰).

پروتامین‌های پستانداران محتوی مقادیر زیادی سیستئین می‌باشند که در تشکیل پیوندهای دی‌سولفید بین مولکولی و درون مولکولی در مراحل آخر بلوغ کروماتین اسپرم نقش دارند. پیوندهای دی‌سولفید بین مولکولی در مراحل آخر اسپرمیوژنز، زمان کوتاهی پس از اتصال پروتامین‌ها به DNA تشکیل شده و همین‌طور که اسپرم‌ها بیضه را ترک کرده و وارد اپیدیدیم می‌شوند پیوندهای دی‌سولفید بین‌مولکولی نیز شکل گرفته و ساختمان پیچیده کروماتین اسپرم که بسیار متراکم و از لحاظ نسخه‌برداری غیرفعال است، شکل می گیرد (۳۱).(شکل ۲-۳)

1. Toroidal