مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره هشتم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۸۸، ۳۲۶-۳۱۷

مقایسه تعداد اسپرم‌های زنده در نمونه‌های انسانی با استفاده از سه روش؛ تورم هیپواسموتیک، V/C Assay و ائوزین- نیگروزین: یک مطالعه آزمایشگاهی

حمید حکیمی[۱]

دریافت مقاله: ۸۷/۷/۲۳ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۸/۲/۲۶ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۸/۷/۲۳ پذیرش مقاله: ۸۸/۸/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: تعداد اسپرم‌های زنده در نمونه سمن (Semen) یکی از شاخص‌هایی است که در بررسی علل ناباروری بایستی مورد توجه قرار گیرد. بسته به شرایط و امکانات هر آزمایشگاه، به ویژه اهداف تشخیصی یا درمانی، یک یا چند روش به کار گرفته می‌شود. در این مطالعه سه روش HOST، VCA و ENT از لحاظ هزینه و امکانات مورد نیاز، دقت تشخیص و زمان لازم جهت انجام این آزمایشات به منظور تعیین ارجحیت نسبت به یکدیگر مقایسه شده‌اند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، ۶ نمونه سمن از داوطلبین سالم مراجعه‌کننده به آزمایشگاه آندرولوژی بیمارستان هلم‌شایر انگلستان در سال ۱۳۸۳ مورد بررسی قرار گرفت. از هر نمونه سمن با استفاده از روش Percoll gradien ، ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون از اسپرم با غلظت ۵×۱۰^{۶} اسپرم بر میلی‌گرم تهیه شد. در ۴ اپندورف ،۱۸۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ریخته شد. به ۳ اپندورف حاوی سوسپانسیون فوق، ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکارید کلامیدیا به حجم ۲۰ میکرلیتر بر میلی‌لیتر اضافه شد. به اپندورف آخر نیز ۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر از EBSS ×۱ به عنوان کنترل اضافه گردید. اپندورف‌ها به مدت ۶ ساعت درانکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسیدکربن ۵٪ نگهداری شدند. میزان حیات و مرگ اسپرم‌ها با سه روش پیش گفت، با استفاده از آزمون‌های آماری One-way ANOVA ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان مرگ اسپرم در مجاورت ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکاریدکلامیدیا به طور قابل توجهی افزایش یافت [(Host، ۴/۱±۳۵/۵٪) و (ENT ۳/۹±۳۴/۴٪) و (VCA، ۳/۳±۳۳/۸٪)، (p<۰/۰۵)] اما این افزایش در گروه آزمون نسبت به یکدیگر معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: چنانچه ارزیابی قابلیت حیات اسپرم فقط جنبه تشخیصی داشته باشد، تکنیک ائوزین – نیگروزین به عنوان روش برتر پیشنهاد می‌شود. زیرا روشی ارزان، ساده، سریع، سهل‌الصول و بدون نیاز به امکانات خاص می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، قابلیت حیات، سمیت سلولی، تورم هیپواسموتیک، ائوزین- نیگروزین

۱- (نویسنده مسئول) استادیار، گروه آموزشی میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
تلفن۰۳۹۱-۵۲۳٤۰۰۳، دورنگار: ۰۳۹۱- ۵۲۲۵۲۰۹، پست الکترونیکی: hamid.hakimi@gmail.com

مقدمه

تعداد کل اسپرم، تعداد اسپرم‌های زنده، متحرک و با شکل ظاهری طبیعی از جمله شاخص‌های مهمی هستند که در ارزیابی مایع سمن مردان نابارور مورد توجه قرار می‌گیرند. برای هر یک از این شاخص‌ها محدوده طبیعی از سوی سازمان جهانی بهداشت تعریف شده است. به عنوان مثال تعداد اسپرم‌های زنده در یک نمونه سالم سمن بایستی بیش از ۷۵٪ کل اسپرم‌ها باشد [۱]. اگر چه تحرک اسپرم دلیل کافی برای اثبات حیات آن است اما بی‌تحرکی اسپرم، مساوی با مرگ آن نیست. لذا ارزیابی حیات اسپرم در شرایطی که میزان اسپرم‌های متحرک کمتر از ۵۰٪ است حائز اهمیت می‌باشد [۱]. هم اکنون در آزمایشگاه‌های آندرولوژی به منظور تعیین تعداد اسپرم‌های زنده در نمونه سمن، از روش‌های مختلفی نظیر Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST)؛ Viability/Cytotoxicity Assay (VCA)، Eosin- Nigrosin Technique (ENT)، Mechanical Touch، فلوسیتومتری و لیزر استفاده می‌شود. شرایط و امکانات هر آزمایشگاه، لحاظ کردن معایب و مزایای هر یک از این روش‌ها و به ویژه اهداف تشخیصی یا درمانی از جمله عوامل تعیین‌کننده انتخاب نوع روش می‌باشند. ENT برای اولین بار در دهه ۱۹۵۰ جهت ارزیابی حیات اسپرم حیوانی مورد استفاده قرار گرفت [۲] و سال ۱۹۹۰، Mortimer این روش را برای اسپرم انسانی به کار گرفت [۳]. Wang و همکارانش در سال ۱۹۹۳تکنیک VCA را برای بررسی مرگ سلولی مورد استفاده قرار دادند [۴]. HOST نیز در سال۱۹۸۴ توسط Jeyendran معرفی شد [۵]. در مواردی که ارزیابی پارامترهای سمن از جمله قابلیت حیات اسپرم، اقدام اولیه تشخیصی باشد در صورت و امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی موجود باشد، محدودیتی در انتخاب نوع روش وجود ندارد. اما چنانچه ارزیابی حیات اسپرم به منظور اهداف درمانی انجام گیرد باید روش‌هایی استفاده گردد که ضمن تشخیص اسپرم زنده، اثر سمی و کشنده بر اسپرم نیز نداشته باشد. به عنوان مثال، جهت افزایش شانس موفقیت در انجام تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم در مواردی که به تفکیک و جداسازی اسپرم زنده از اسپرم‌های غیرمتحرکی که از بیوپسی بیضه استحصال شده‌اند نیاز می‌باشد بایستی از روش‌هایی که به تکنیک‌های رنگ‌آمیزی هم‌چون VCA، ENT و فلوسیتومتری متکی است، به دلیل تأثیرات سمی بر اسپرم پرهیز نمود [۶-۷] و در عوض از روش‌هایی هم‌چون HOST [۸]، Mechanical Touch [۹] و لیزر [۱۰] استفاده کرد. در این مطالعه مزایا و معایب سه روش HOST، VCA و ENT در ارزیابی قابلیت حیات اسپرم‌هایی که به مدت ۶ ساعت در مجاورت ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر لیپوپلی‌ساکارید کلامیدیا تراکوماتیس به عنوان عامل توکسیک اسپرم قرار گرفته‌اند، بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام این مطالعه آزمایشگاهی، ابتدا ۶ نمونه سمن از داوطلبین سالم مراجعه‌کننده به بیمارستان Hallamshire (Sheffield, UK) که بر اساس استانداردهای سازمان جهانی بهداشت [۱] طبیعی تشخیص داده شدند جمع‌آوری شد (با در نظر گرفتن ملاحظات اخلاقی مصوب South Research (Ethics Committee, project number 02/337).

روش تهیه و آماده‌سازی نمونه‌ها: از هر ۱ میلی‌لیتر نمونه سمن مایع شده با استفاده از روش Percoll

gradient [۱۱] سوسپانسیونی از اسپرم‌های با تحرک بالا و کمترین آلودگی از نظر وجود لکوسیت تهیه شد. بدین منظور ابتدا از Percoll ۱۰۰٪ با استفاده از محلول 1 x Earl's balanced salt solution (EBSS) (Invitrogen Ltd, Paisley, UK) containing 0.3% (w/v) Bovine serum albumin (BSA) دو غلظت ۴۰٪ و ۸۰٪ تهیه شد. ۱ میلی‌لیتر از محلول ۸۰٪ در یک لوله استریل ۱۵ میلی‌لیتری مخروطی شکل ریخته شد و ۱ میلی‌لیتر از محلول۴۰٪ به صورت قطره قطره به آن اضافه شد. سرانجام ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپرم به آرامی روی محلول ۴۰٪ ریخته شد به گونه‌ای که در نهایت این دو محلول و سوسپانسیون، بدون ادغام در یکدیگر با مرز مشخصی در لوله از یکدیگر مجزا شدند. لوله به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ ۵۰۰ دور در دقیقه گذاشته شد. پس از طی این مدت، لایه روی سوسپانسیون بیرون ریخته شد و مابقی در ۱ میلی‌لیتر از EBSS حاوی BSA ۰/۳٪ رقیق شد به گونه‌ای که غلظت اسپرم در سوسپانسیون ۵×۱۰^{۶} اسپرم بر میلی‌گرم تنظیم شد.

از آن جا که لیپوپلی‌ساکارید تجاری کلامیدیا موجود نبود، فرم عفونی اما غیرفعال (از لحاظ متابولیک) کلامیدیا تراکوماتیس (EBs Serovar LGV) در محیط آزمایشگاهی و با کشت مکرر و انبوه در بیش از ۲۰۰ فلاسک کشت اختصاصی ۷۵ میلی‌لیتر حاوی سلول‌های McCoy کشت داده شد [۱۲]. محیط کشت اختصاصی جهت رشد EBs حاوی Minimum Essential Medium Eagle ([EMEM], در foetal calf serum ۱۰٪ و ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محلول cycloheximide (Sigma,UK) مورد استفاده قرار گرفت. EBs سپس با روش Caldwell از سلول‌های McCoy جدا شدند [۱۳]. پس ازجمع‌آوری، شستشو و تغلیظ EBs در محلول PBS، با استفاده از روش Nurminen لیپوپلی‌ساکارید جدا شد [۱۴]. در این روش ابتدا سوسپانسیون EBs به کمک ۸ میلی‌لیتر محلول اوروگرافین و سانتریفیوژ (۱۵۰۰۰ دور در دقیقه) به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد از سلول‌های McCoy جدا شد. EBs تصفیه شده در ۲/۵ میلی‌لیتر محول فنل ۹۰٪ به مدت نیم ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد با همزن مغناطیسی مخلوط گردیدند. در مرحله بعد ۴ میلی‌لیتر اتر و ۲/۵ میلی‌لیتر کلروفرم به مخلوط اضافه شده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق با همزن مغناطیسی مخلوط شدند. سپس به مدت نیم ساعت سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه) گردیدند. محلول حاصله در استون ۲۰- درجه سانتی‌گراد رسوب شد. رسوب نهایی در استون سرد شستشو داده شد، در دستگاه واکیوم خشک گردید و سپس در ۲۰۰ میکرولیتر محلول triethylamine 2SP+٪۰/۱ حل شد. جهت اثبات جداسازی موفقیت‌آمیز لیپوپلی‌ساکارید، ۲۰ میکرولیتر از محلول حاصله را بر روی ژل پولی‌آکریل‌آمید ۱۴٪ با ولتاژ ۱۵۰-۱۰۰ ولت عبور داده و پس از اتمام کار ژل در متانول و اسید استیک خشک شده و رنگ‌آمیزی نقره به عمل آمد. به کمک Limulus Amebocyte Lysate (LAL) (Cambrex Biosciences, UK) میزان کمی لیپوپلی‌ساکارید حاصله محاسبه گردید.

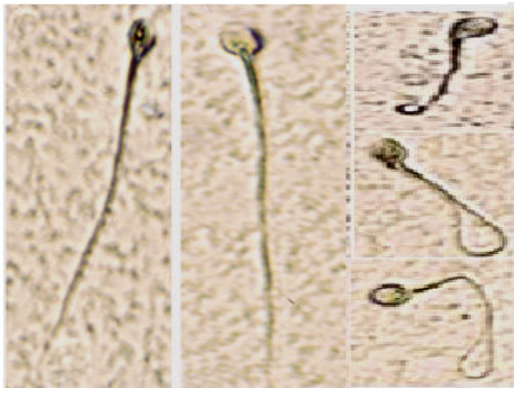
در ۴ اپندورف،۱۸۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپرم با غلظت ۵×۱۰^{۶} اسپرم بر میلی‌گرم ریخته شد. به ۳ اپندورف حاوی سوسپانسیون فوق، ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر (بر اساس مطالعات قبلی) از لیپوپلی ساکارید کلامیدیای تولید شده به شرح فوق و به حجم ۲۰ میکرولیتر اضافه شد. به اپندورف آخر نیز ۲۰ میکرولیتر از EBSS ×۱ به عنوان کنترل اضافه شد. اپندورف‌ها به مدت

۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسیدکربن نگهداری شدند.

میزان حیات اسپرم‌ها پس از ۶ ساعت انکوباسیون با روش‌های HOST، VCA و ENT به شرح ذیل ارزیابی شد.

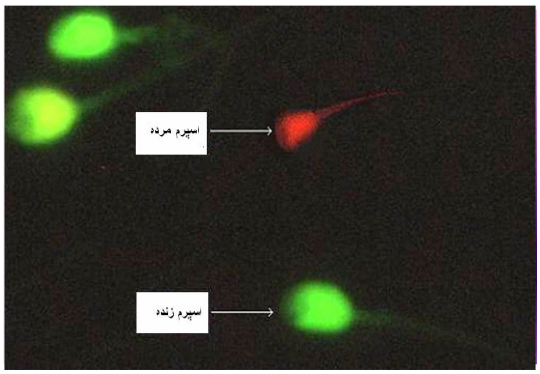
HOST: ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اپندورف اول و کنترل با ۲۰۰ میکرولیتر محلول Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST) حاوی دی‌هیدرات‌سیترات سدیم و فروکتوز مخلوط و به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد تا میزان حیات و مرگ اسپرم‌ها بررسی شود [۱]. اساس این روش بر نفوذپذیری نسبی غشاء پلاسمایی اسپرم زنده در برابر محلول هیپواسمولار می‌باشد. به گونه‌ای که غشاء پلاسمایی اسپرم زنده در مجاورت این محلول متورم شده و از ناحیه دم پیچ می‌خورد، در حالی که اسپرم مرده دمی صاف و کشیده دارد.

پس از مجاورت با محلول هیپواسمولار، از اسپرم‌ها اسلاید تهیه شد و پس از ثابت شدن در متانول به مدت ۴۵ دقیقه، با استفاده میکروسکوپ نوری، ۲۰۰ اسپرم از هر اپندورف شمارش و بر اساس شکل دم، درصد اسپرم‌های زنده (دم پیچ خورده) و مرده (دم صاف) (شکل ۱) تفکیک شدند.



شکل ۱- اسپرم‌های زنده (دم پیچ خورده) و مرده (دم صاف) در مجاورت محلول هیپواسمولار.

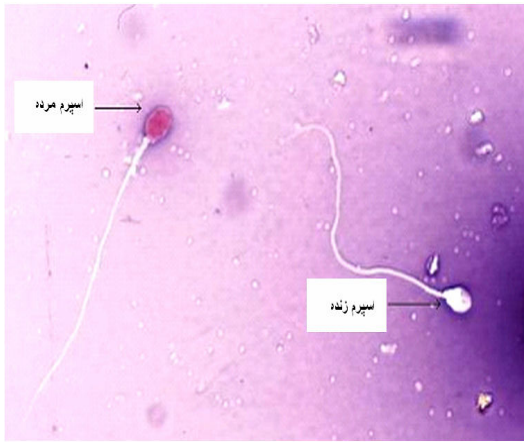
VCA: با استفاده از کیت تجاری **VCA** (Molecular Probes, Invitrogen Technologies, Paisley, UK) حاوی Component A (Calcein AM) و Component B (Ethidium homodimer-1) تعداد اسپرم‌های زنده و مرده در اپندورف دوم کنترل و شمارش شد. این روش بر پایه تکنیک فلورسانس است به گونه‌ای که اسپرم‌های زنده را به رنگ سبز و اسپرم‌های مرده را به رنگ قرمز نشان می‌دهد [۲]. طبق دستور شرکت سازنده، ۲ میکرولیتر از Component B به ۱ میلی‌لیتر PBS افزوده شد و پس از مخلوط شدن، ۱ میلی‌لیتر از Component A به آن اضافه گردید. ۱۰ میکرولیتر از هر اپندورف با ۱۰ میکرولیتر از ترکیب ساخته شده Component A و Component B مخلوط و به مدت یک ساعت در انکوباسیون با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. از هر اپندورف اسمیر تهیه شد و با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت (Leica Microsystems Ltd, Milton Keynes, UK) ۲۰۰ اسپرم با فیلد ۱۰۰۰× شمارش و بر اساس رنگ سبز (زنده) و قرمز (مرده) تفکیک شدند (شکل ۲).



شکل ۲- تصویر اسپرم زنده و مرده در تکنیک VCA.

ENT: در این تکنیک از دو رنگ ائوزین (که توسط اسپرم‌های مرده جذب می‌شود) و نیگروزین (به عنوان رنگ زمینه جهت سهولت در افتراق اسپرم‌های رنگ گرفته) استفاده می‌شود [۱]. ۱۰ میکرولیتر از اپندورف

سوم و کنترل با ۲۰ میکرولیتر از ائوزین ۱٪ مخلوط شد. بعد از ۳۰ ثانیه، ۳۰ میکرولیتر از محلول نیگروزین ۱۰٪ به مخلوط قبلی اضافه و به آرامی مخلوط گردید. ۳۰ ثانیه بعد، از مخلوط نهایی لام تهیه شد و با استفاده از میکروسکوپ نوری با فیلد ۱۰۰۰× ۲۰۰ اسپرم از هر اپندورف شمارش و بر اساس جذب یا عدم جذب رنگ ائوزین تفکیک شدند (شکل ۳).

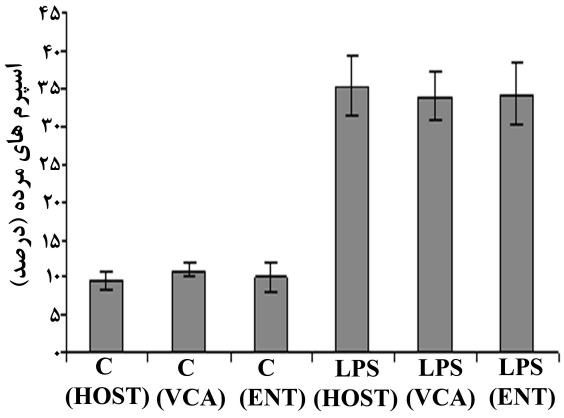


شکل۳- تصویر اسپرم زنده (فاقد رنگ) و مرده (رنگ قرمز) در تکنیک ENT.

آزمایش برای هر روش شش بار تکرار گردید و نتایج حاصل از این مطالعه با نرم‌افزار آماری GraphPad InStat software. مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

میانگین مرگ اسپرم‌های مورد استفاده جهت گروه کنترل و آزمون در زمان صفر و قبل از مجاورت با لیپو پلی‌ساکارید کلامیدیا ۰/۶ ± ۹/۳٪ بود. ۶ ساعت پس از انکوباسیون (در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسیدکربن)، میزان مرگ اسپرم در گروه کنترل نسبت به لحظه صفر و نسبت به تکنیک‌های به کار گرفته شده در گروه آزمون تغییر قابل ملاحظه‌ای نداشت. به طوری که میزان مرگ اسپرم در تکنیک HOST، ۱/۴±۹/۵٪، در تکنیک ENT، ۱/۹±۱۰٪ و در تکنیک VCA، ۱±۱۰/۸٪ بود ($p>0/05$). میزان مرگ اسپرم در مجاورت ۰/۱میکروگرم در میلی‌لیتر از لیپوپلی‌ساکارید کلامیدیا، ۶ ساعت پس از انکوباسیون (در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسیدکربن ۵٪)، به طور معنی‌داری به شرح ذیل افزایش یافت: در تکنیک VCA، میزان مرگ اسپرم ۳/۳±۳۳/۸٪، در تکنیک ENT ۹/۳±۳۴/۴٪ و در تکنیک HOST، ۴/۱±۳۵/۵٪ بود ($p<0/05$). اگر چه این افزایش نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود اما تجزیه و تحلیل یافته‌ها به کمک آزمون ANOVA یک طرفه نشان داد که میزان مرگ اسپرم در مقایسه دو به دو در گروه آزمون معنی‌دار نبود (نمودار ۱).



نمودار ۱- مقایسه سه روش ارزیابی حیات اسپرم ٦ ساعت پس از انکوباسیون با لیپوپولی‌ساکارید کلامیدیا با استفاده از تکنیک‌های HOST، VCA و ENT. نتایج میانگین ٦ بار آزمایش Mean±SEM می‌باشد. کنترل= C

بحث

آنالیز مایع سمن یکی از تست‌های اولیه، کم هزینه و در عین حال اساسی در بررسی علل ناباروری مردان می‌باشد. در این آنالیز علاوه بر رنگ، حجم و pH، فاکتورهای میکروسکوپی نظیر تعداد کل اسپرم، تعداد اسپرم‌های متحرک، تعداد اسپرم‌های با شکل طبیعی و تعداد اسپرم‌های زنده نیز مورد ملاحظه قرار می‌گیرند. از

نظر معیارهای سازمان جهانی بهداشت یک نمونه سالم سمن بایستی بیش از ۷۵٪ اسپرم زنده داشته باشد. البته عواملی نظیر نوع تکنیک آماده‌سازی اسپرم از جمله Swim-up, Glass Wool Filteration, Discontinous Percoll Density Gradient و Albunin Gradients [۱۵] و هم‌چنین نوع تکنیک به کار گرفته شده جهت افتراق حیات و مرگ اسپرم توسط هر آزمایشگاه از قبیل VCA, ENT, Trypan Blue, Mechanical Touch, Flow Cytometry, Laser و HOST ممکن است استانداردهای طبیعی سمن از قبیل شمارش، شکل و میزان حرکت اسپرم را تحت تأثیر قرار دهد.

هر اسپرم متحرک، زنده نیز هست اما هر اسپرم زنده، متحرک نمی‌باشد. توجه به این مسئله به ویژه در مردان نابارور مراجعه‌کننده به مراکز درمان‌های کمک باروری (Assisted Reproductive Techniques) با شمارش اسپرم صفر (آزووسپرمی) یا با شمارش کمتر از استاندارد (اولیگوسپرمی) حائز اهمیت می‌باشد. در این بیماران ممکن است مقدار اندکی اسپرم زنده (عمدتاً غیر متحرک) با دشواری و از طریق تکنینک‌های مختلف از جمله بیوپسی بیضه حاصل شود. در چنین شرایطی انتخاب اسپرم زنده جهت انجام عمل تزریق اسپرم به داخل سیتوپلاسم تخمک همراه با حداکثر شانس موفقیت، مستلزم استفاده از تکنیک‌هایی است که بتوانند با حداقل آسیب به اسپرم، قابلیت افتراق اسپرم زنده غیر متحرک از اسپرم مرده را نیز داشته باشند. از میان آزمایش‌های با قابلیت فوق می‌توان به Mechanical Touch, Laser و HOST اشاره کرد. در تکنیک Laser با استفاده از Single Laser Shot به انتهای دم اسپرم، چنانچه اسپرم زنده باشد از ناحیه دم پیچ می‌خورد و از اسپرم مرده قابل افتراق است [۱۰]. در روش Mechanical Touch، تحریک دم اسپرم به وسیله ضربه ملایم میکروپیپت در ظرف مخصوص تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم انجام می‌شود که در صورت حیات اسپرم، دم تا شده و سریع به حال اول بر می‌گردد [۹].

نفوذپذیری نسبی غشاء پلاسمایی اسپرم زنده در برابر محلول هیپواسمولار اساس تکنیک HOST می‌باشد. غشاء پلاسمایی اسپرم زنده در مجاورت این محلول متورم شده و از نا حیه دم پیچ می‌خورد در حالی که اسپرم مرده دمی صاف و کشیده دارد. اگر چه کاربرد تشخیصی و درمانی این آزمون در بعضی مطالعات زیر سوال رفته است اما هنوز به طور مؤثری در بیماران آزوسپرمی شدید کاربرد دارد [۱۶]. سایر تکنیک‌های اشاره شده به دلیل استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی با اثر توکسیک بر اسپرم، فقط ارزش تشخیصی دارند. بنابراین قبل از استفاده از این روش‌ها علاوه بر در نظر گرفتن امکانات آزمایشگاهی، به کاربرد تشخیصی و یا درمانی روش نیز بایستی توجه نمود. روش HOST علاوه بر کاربرد درمانی در تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم به عنوان روش تشخیصی نیز کاربرد دارد [۸]. این تکنیک به تجهیزات خاص آزمایشگاهی نیازمند است. اما حداقل به نیم ساعت زمان نیاز دارد. در VCA، اسپرم‌ها در مجاورت Calcein AM و Ethidium Homo-Dimer 1 (EthD-1) قرار می‌گیرند. Calcein AM پیش ماده‌ای برای آنزیم استراز داخل سلولی است و در اسپرم زنده رنگ سبز فلورسانس ایجاد می‌کند، EthD-1 هم وارد سلول‌های مرده با غشای آسیب دیده شده و به DNA متصل شده و رنگ قرمز روشن فلورسانس ایجاد می‌کند. روش VCA بر خلاف HOST، فقط یک روش تشخیصی است و گر چه به سهولت اسپرم مرده را از زنده افتراق می‌دهد اما به دلیل قیمت نسبتاً

زیاد کیت، نیاز به حداقل یک ساعت زمان و وابستگی آن به میکروسکوپ فلورسنت، کاربرد متداول ندارد. در روش ENT، از دو رنگ ائوزین و نیگروزین استفاده می‌شود. در این تکنیک اسپرم مرده رنگ ائوزین را جذب کرده به رنگ قرمز در می‌آید و در رنگ زمینه‌ای که توسط نیگروزین ایجاد می‌شود به راحتی از اسپرم زنده به رنگ سفید قابل تشخیص می‌باشد. ENT به تجهیزات خاصی نیاز نداشته و رنگ‌های به کار رفته، ارزان و در دسترس می‌باشند علاوه بر این، نتایج طی ۳۰ ثانیه قابل ارزیابی می‌باشند. با توجه به یافته‌های این مطالعه که با مطالعات مشابه منطبق است [۲،۱۷] هیچ یک از سه روش ذکر شده از نظر دقت تشخیص اسپرم زنده از مرده، ارجحیتی نسبت به یکدیگر ندارند اما از نظر هزینه، زمان، عدم نیاز به امکانات خاص آزمایشگاهی و سهولت انجام، تکنیک ENT به HOST و VCA برتری دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه در شرایطی که بررسی مایع سمن فقط به عنوان بررسی مقدماتی در ارزیابی علل ناباروری مردان انجام می‌شود پیشنهاد می‌گردد که از روش ENT جهت تعیین میزان حیات اسپرم استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان و همکاری آزمایشگاه آندرولوژی بیمارستان هلم‌شایر شفیلد انگلیس و مرکز تحقیقات کلامیدیای دانشگاه شفیلد انجام شده است که بدین‌وسیله از ایشان تقدیر و تشکر می‌شود.

References

[1] WHO. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, 2000; Cambridge University Press, Cambridge, UK.

[2] Björndahl L, Söderlund I, Kvist U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment *Hum Reprod* 2003; 18(4): 813-6.

[3] Mortimer D. *Practical Laboratory Andrology,* New York, USA: Oxford University Press. 1994; pp: 66-9.

[4] Wang XM, Terasaki PI, Rankin GW Jr, Chia D, Zhong HP, Hardy S. A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release. *Hum Immunol* 1993; 37(4): 264-70.

[5] Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fert* 1984; 70(1): 219-28.

[6] Goyeneche A, Harmon JM, Telleria CM. Cell death induced by serum deprivation in luteal cells involves the intrinsic pathway of apoptosis. *Reproduction* 2006; 131(1): 103-11.

[7] Fierro R, Bene MC, Foliguet B, Faure GC, Grignon G. Evaluation of human sperm acrosome reaction and viability by flow cytometry. *Ital J Anat Embryol* 1998; 103(4 Suppl 1): 75-84.

[8] Buckett WM. Predictive value of hypo-osmotic swelling test to identify viable non-motile sperm. *Asian J Androl* 2003; 5(3): 209-12.

[9] de Oliveira NM, Vaca Sanchez R, Rodriguez Fiesta S, Lopez Salgado T, Rodriguez R, et al. Pregnancy with frozen-thawed and fresh testicular biopsy after motile and immotile sperm microinjection, using the mechanical touch technique to assess viability. *Hum Reprod* 2004; 19(2): 262-5.

[10] Aktan TM, Montag M, Duman S, Gorkemli H, Rink K, Yurdakul T. Use of a laser to detect viable but immotile spermatozoa. *Andrologia* 2004; 36(6): 366-9.

[11] Hosseinzadeh S, Brewis IA, Pacey AA, Moore HD, Eley A. Coincubation of human spermatozoa with Chlamydia trachomatis in vitro causes increased tyrosine phosphorylation of sperm proteins. *Infect Immun* 2000; 68(9): 4872-6.

[12] Tjiam KH, van Heijst BY, de Roo JC, de Beer A, van Joost T,Michel MF, et al. Survival of Chlamydia trachomatis in different transport media and at different temperatures: diagnostic implications. *Br J Vener Dis* 1984; 60(2): 92–4.

[13] Caldwell HD, Kromhout J. Schachter J. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis. *Infect Immun* 1981; 31(3): 1161-76

[14] Nurminen M, Rietschel ET, Brade H. Chemical characterization of Chlamydia trachomatis lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1985; 48(2): 573-5.

[15] Soderlund B, Lundin K. The use of silane-coated silica particles for density gradient

centrifugation in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 2000; 15(4): 857-60.

[16] Munuce MJ, Caille AM, Berta CL, Perfumo P, Morisoli L. Does the hypoosmotic swelling test predict human sperm viability? *Arch Androl* 2000; 44(3): 207-12.

[17] Andrade-Rocha FT. Significance of sperm characteristics in the evaluation of adolescents, adults and older men with varicocele. *J Postgrad Med* 2007; 53(1): 8-13.

Comparison of Viable Human Sperm Count Using Three Different Methods; Hypo-Osmotic Swelling Test, Viability/Cytotoxicity Assay, and Eosin-Nigrosin Technique: A Laboratory Study

H. Hakimi [1]

Received: 14/10/08 **Sent for Revision: 16/05/09** **Received Revised Manuscript: 15/10/09** **Accepted: 21/11/09**

Background and Objectives: Sperm viability is one of the semen parameters that should be noted in male infertility approaches. Depending on the laboratory's facilities and especially the purpose of the experiment, i.e. diagnostic or therapeutic, one or more of the diagnostic techniques are employed. In the present study, three methods; Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST), Viability/Cytotoxicity Assay (VCA), and Eosin-Nigrosin Technique (ENT) have been compared in terms of cost, required equipments, diagnostic value, and rapidity.

Materials and Methods: In this laboratory study semen samples from six healthy volunteers referred to the Andrology laboratory, Hallamshire hospital, Sheffield, UK were investigated in 2002. In 4 ependorfs, 180µl of 5 $x10^6$ sperm/ml of prepared sperm using percoll gradient method were decanted. Three of the ependorfs were treated with 20µl of *Chlamydia* LPS at final concentration of 0.1µg/ml for 6 h at 37ºC in 5% CO_2 for 6 h and the last ependorf was treated with 20µl of 1 x EBSS as control. After 6h incubation the sperm viability was measured using HOST, VCA, and ENT methods. The data was then analysed using t-test and One-way ANOVA.

Results: The findings of HOST, VCA, and ENT indicated that sperm mortality rate enhanced markedly in the presence of lipopolysaccharide from *Chlamydia trachomatis* at 0.1µg/ml; [35.5±4.1% (HOST), 33.8±3.3% (VCA), 34.4±3.9% (ENT), $p<0.05$). However, the differences between the test groups were not statistically significant in the inter-group comparison.

Conclusion: If sperm viability assessment is required only for diagnostic purposes, ENT is suggested as a preferred method, because it is cheap, easy, fast, handy, and needs no specific facilities.

Key words: Sperm, Viability, Cytotoxicity, Hypo-Osmotic Swelling, Eosin-Nigrosin

Funding: This research was funded by Rafsanjan University of Medical Sciences and conducted at the University of Sheffield, UK.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethical Committee of Rafsanjan University of Medical Sciences and Sheffield University jointly approved the study.

1- Assistant Prof., Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
(Corresponding Author) Tel: (0391)5234003, Fax: (0391) 5225209, E-mail: hamid.hakimi@gmail.com