

پروتکل سنجش بلوغ کروماتین اسپرم (SCMA)

آنالیز روتین منی اولین روش در ارزیابی وضعیت باروری مردان می باشد. این ارزیابی اطلاعات مفیدی را راجع به تعداد، حرکت، مورفولوژی، میزان زنده بودن اسپرم ها، عملکرد گناد ها و انزال در اختیار قرار می دهد اما این ارزیابی اطلاعاتی راجع به یکی از مهمترین پارامترها یعنی بلوغ کروماتین اسپرم که برای قدرت باروری اسپرم و رشد جنین ضروری می باشد در اختیار قرار نمی دهد.

نسبت اسپرم های با تراکم کروماتین غیر طبیعی در انزال می تواند به عنوان یک فاکتور پیش گویی کننده در ارزیابی باروری مردان و میزان احتمال حاملگی مد نظر قرار گیرد. در روند اسپرمیوژنز هسته اسپرم به طور کامل سازماندهی مجدد می شود که منجر به ترکیب کروماتین آن می گردد. این تراکم در اثر جایگزین شدن هیستون ها به وسیله پروتئین های انتقالی و سپس به وسیله پروتامین ها ایجاد می گردد. اختلال در بلوغ کروماتین اسپرم می تواند سبب آسیب پذیری DNA و مستعد نمودن آن برای شکست یا دناتورده شدن گردد که اغلب با ناباروری و کاهش قدرت باروری مردان در ارتباط است.

بنابراین **سنجش بلوغ کروماتین اسپرم** در کنار آنالیز روتین مایع منی می تواند سبب بهبود و تکمیل ارزیابی میزان باروری مردان شود. روش های مختلفی جهت این ارزیابی وجود دارد که روش مورد استفاده در کیت حاضر در عین سهولت انجام و عدم نیاز به تجهیزات گران قیمت از دقت و صحت بسیار بالایی برخوردار است.

اصول روش:

تمایل اتصال DNA به مواد فلوروکروم و مواد رنگی در کروماتین اسپرم نرمال، تقریباً ۵ برابر کمتر از کروماتین اسپرماتید های گرد می باشد. این موضوع به دلیل ساختار بسیار متراکم و مستحکم مولکول DNA اسپرم بالغ بوده که موجب عدم دسترسی لیگاندهای رنگی و فلوروسانس به شیار اصلی موجود در DNA کروماتین اسپرم می شود. رنگ آنیلین بلو یکی از رنگ هایی است که باعث تمایز بین هیستون های بازی غنی از لیزین اسپرم های نا بالغ و پروتامین های غنی از سیستئین و آرژنین در اسپرم های بالغ می گردد. پروتئین های هیستون حاوی تعداد زیادی از اسید آمینه لیزین بوده که به رنگ اسیدی آنیلین بلو متصل شده و در نتیجه اسپرم نابالغ به رنگ آبی تیره مشاهده می گردد. جایگزینی هیستون ها با پروتامین ها در اسپرم بالغ منجر به عدم اتصال رنگ آنیلین بلو به اسید آمینه آرژنین و سیستئین موجود در پروتامین گردیده و در نهایت باعث عدم رنگ آمیزی اسپرم های دارای کروماتین بالغ بوسیله این روش می گردد.

مواد و تجهیزات موجود در کیت:

مواد و تجهیزات مورد نیاز که در کیت وجود ندارد:

✓	میکروسکوپ نوری	✓	محلول A، محلول فیکس کننده (100ml)
✓	بافر PBS	✓	محلول B، رنگ آمیزی (100ml)
✓	لام	✓	محلول C، رنگ آمیزی (100ml)

نمونه مورد نیاز:

نمونه منی تازه باید در ظرف استریل جمع آوری گردد. ارزیابی بلوغ کروماتین اسپرم باید بلافاصله بعد از دریافت نمونه و یا بلافاصله بعد از ذوب نمونه منجمد انجام گردد.

دستورالعمل استفاده از کیت:

سه محلول موجود در کیت را در سه ظرف مجزا ریخته و با پارافیلیم درب آن ها را به طور محکم ببندید.

- (۱) اسپرم های نمونه منی را با بافر PBS دو بار شستشو داده (سانتریفیوژ با دور 300g و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه) و در نهایت سوسپانسیونی با تعداد ۱۰-۱۵ میلیون اسپرم تهیه نمایید.
- (۲) لایه نازکی از سوسپانسیون روی لام تهیه نمایید و اجازه دهید تا حداقل مدت زمان ۱۰ دقیقه در دمای اتاق بماند تا خشک شود.
- (۳) لام را در محلول A قرار دهید و اجازه دهید تا مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق بماند، سپس لام را کمی کج کرده تا مایع اضافه روی آن خالی شود.
- (۴) لام را به مدت ۵ دقیقه در محلول B در دمای اتاق قرار دهید.
- (۵) با جریان غیر مستقیم آب مقطر لام را با ملایمت شستشو دهید.
- (۶) لام را به مدت ۳-۲ دقیقه در داخل محلول C در دمای اتاق قرار دهید.
- (۷) با جریان غیر مستقیم آب مقطر لام را با ملایمت شستشو دهید.
- (۸) لام را در دمای اتاق قرار داده تا خشک شود. سپس لام را با عدسی ۱۰۰ مشاهده کنید. حداقل ۱۰۰ اسپرم را شمارش کرده، درصد اسپرم های بالغ و نابالغ گزارش می شود. اسپرم های بالغ به رنگ صورتی و اسپرم های نابالغ به رنگ آبی تیره قابل مشاهده می باشند.

توصیه های ایمنی:

- استفاده از دستکش و ماسک در زمان انجام آزمایش توصیه می گردد.
- چنانچه بعد از گذشت حداکثر ۴ بار استفاده از کیت در طی ۴ روز کاری مشاهده گردید که کیفیت تصاویر از نظر رنگ پذیری اسپرم های نابالغ در حد مطلوبی نمی باشد به جای محلول A به نسبت ۱ به ۱ از اتانول-استون استفاده نمایید.
- با توجه به کار روی نمونه انسانی و خطرات بالقوه آلودگی آن ها، بعد از انجام آزمایش، دفع مواد زاید و زباله ها باید مطابق دستورالعمل دفع مواد بیولوژیک آسیب رسان (Biohazard Safety) انجام شود.

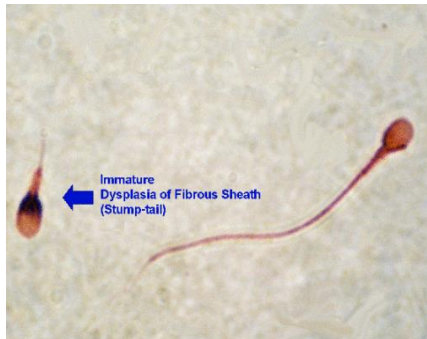
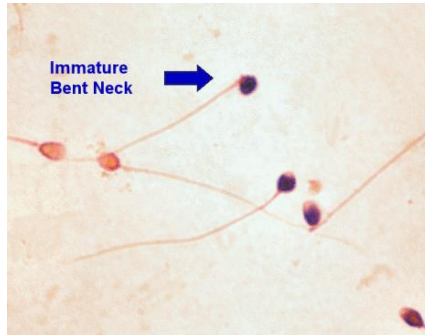
شرایط نگهداری و پایداری کیت

- (۱) محتویات کیت را در دمای یخچال ۲-۸ درجه سانتیگراد نگهداری کنید.
- (۲) محتویات کیت را در معرض تابش مستقیم نور آفتاب یا لامپ UV قرار ندهید و در جعبه اصلی خود نگهداری نمایید.
- (۳) از قرار دادن کیت در کنار دستگاه های حرارت زا خودداری کنید.
- (۴) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای درج شده (یک سال) بر روی هریک از آن ها میباشد.

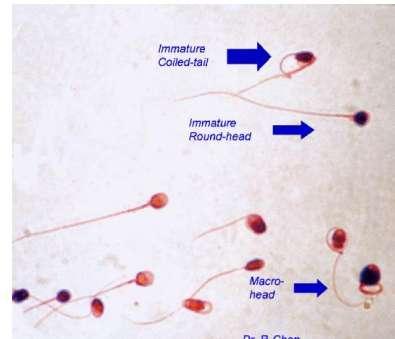
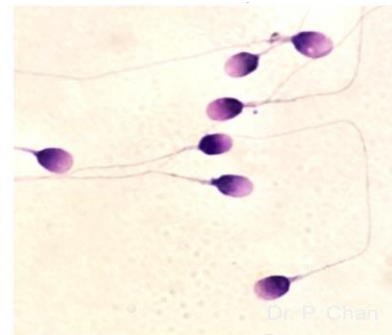
نتایج تست با استفاده از کیت

- ❖ **DFI: Maturation %** درصد اسپرم‌هایی که بالغ هستند.
- ❖ پاسخ به ۴ شکل آماری با میزان احتمال باروری گزارش می‌شود.
- ❖ سلامت و کیفیت عالی تا خوب اسپرم $\text{Maturation} \leq 90\%$
- ❖ سلامت و کیفیت خوب تا نامطلوب اسپرم $70\% \leq \text{Maturation} < 90\%$
- ❖ سلامت و کیفیت نامطلوب تا ضعیف اسپرم $50\% \leq \text{Maturation} < 70\%$
- ❖ سلامت و کیفیت بسیار ضعیف اسپرم $\text{Maturation} \leq 50\%$

تصویر اسپرم های غیر نرمال



تصویر اسپرم های نرمال



اسپرماتوزوئید رنگ آمیزی شده ، نشانگر مورفولوژی بسیار واضح سر اسپرم ها

