Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ٤، شماره ٤، زمستان ١٣٩٢، ٤٢٣-٤١٥

افزایش شکستگی DNA اسپرم انسان بعد از دو ساعت انکوباسیون

علی نبی .MSc ، محمد علی خلیلی .Ph.D *، ایمان حلوایی .M.Sc، فاطمه انباری .M.Sc

مرکز تحقیقاتی درمانی و ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: khalili59@hotmail.com

تاریخ دریافت: ١٣٩١/١٢/١٩ تاریخ پذیرش: ١٣٩٢/٥/١

چکیده

هدف: در این مطالعه میزان شکستگی DNA اسپرم انسانی بعد از آماده سازی به‌روش Direct swim-up در زمان‌های مختلف انکوباسیون به‌وسیله تکنیک TUNEL مورد ارزیابی قرار گرفت تا بهترین زمان برای انکوباسیون اسپرم‌های نرمال شسته شده برای استفاده در تکنیک‌های کمک باروری (ART) به‌دست آید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آینده نگر، ٢١ نمونه‌ی اسپرم نرمال مورد مطالعه قرار گرفت. از لام Makler chamber برای مطالعه تعداد و قابلیت تحرک اسپرم استفاده شد. برای بررسی مورفولوژی اسپرم از رنگ آمیزی پاپانیکولا و قابلیت حیات اسپرم از رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. نمونه‌ها بعد از آماده سازی به‌روش Direct swim-up در زمان های مختلف در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. میزان شکستگی DNA اسپرم در فواصل زمانی مختلف (٣،٢،١،٠ ساعت) با استفاده از تکنیک TUNEL مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: میانگین درصد مورفولوژی طبیعی و حرکت سریع پیشرونده اسپرم بعد از آماده سازی نسبت به قبل از آماده سازی افزایش معنی‌داری P<٠/٠٠١ داشتند. درصد میانگین قابلیت حیات اسپرم بعد از آماده سازی اسپرم نسبت به قبل از آماده‌سازی به‌طور معنی‌دار افزایش یافته بود (P<٠/٠٠١). درصد شکستگی DNA اسپرم در زمان دو ساعت انکوباسیون نسبت به زمان صفر (P<٠/٠١) و نیز زمان سه ساعت نسبت به‌زمان صفر و یک ساعت انکوباسیون (P<٠/٠٠١) به‌طور معنی‌داری افزایش داشت.

نتیجه گیری: انکوباسیون اسپرم نرمال در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد که به روش Direct swim-up آماده شده برای استفاده در تکنیک‌های کمک باروری باید زمان کمتر از دو ساعت باشد.

واژگان کلیدی: اسپرم نرمال، شکستگی DNA، ، تکنیک TUNEL

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در بسیاری از کلینیک‌ها، پارامترهای معمول نظیر تعداد، تحرک، مورفولوژی، برای بیان کیفیت اسپرم بررسی می‌شود. تحقیقات نشان داده است که پارامترهای معمولی (تعداد، مورفولوژی، تحرک) در مردان نابارور نمی‌تواند گویای سلامت DNA اسپرم باشد (۱). به‌تازگی لوئیس و سیمون (۲) اظهار داشتند که هیچ همبستگی بین پارامترهای معمولی اسپرم و آسیب DNA وجود ندارد. اختلال در یکپارچگی DNA اسپرم می‌تواند میزان لقاح را کاهش داده و میزان لانه گزینی جنین را تحت تاثیر قرار دهد. اگر چه احتمال اینکه اسپرم با DNA آسیب دیده بتواند با تخمک لقاح پیدا کرده و تشکیل جنین بدهد وجود دارد (۳) ولی احتمال از بین رفتن جنین و سقط افزایش پیدا می‌کند (۴).

یکی از عواملی که می‌تواند بر میزان موفقیت درمان زوج‌های نابارور و همچنین کیفیت جنین‌ها مهم باشد، کیفیت اسپرم است. در روش‌های کمک باروری (Assisted Reproductive Techniques) بعد از جداسازی اسپرم از مایع منی و آماده سازی اسپرم، می‌تواند به‌خاطر انکوباسیون طولانی مدت، قطعه قطعه شدن DNA اسپرم افزایش پیدا کند (۵). پس از آماده سازی اسپرم، به‌طور معمول اسپرم قبل از استفاده در (ART) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شود (۶) ولی هنوز زمان بهینه برای انکوباسیون اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قبل از استفاده در ART وجود ندارد. بعضی از محققین سعی برای پیدا کردن اثر گذشت زمان بر پارامترهای اسپرم بعد از انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد را دارند. نشان داده شده است که انکوباسیون اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بعد از گذشت ۲۴ ساعت می‌تواند بر روی تحرک اسپرم تاثیر گذار باشد ولی بر روی قابلیت حیات تاثیری ندارد (۷).

بعد از آماده سازی اسپرم برای استفاده در تکنیک‌های ART انکوباسیون کوتاه مدت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد می‌تواند با عث ظرفیت یابی اسپرم شود اما انکوباسیون طولانی مدت می‌تواند بر روی DNA اسپرم تاثیر داشته باشد (۸). در آزمایشگاه‌های آندرولوژی، بعد از عمل شستشو و جداسازی، معمولا به بررسی پارامترهای اسپرم شامل تعداد، میزان تحرک و وضعیت مورفولوژیکی اسپرم و درصد زنده بودن، می‌پردازند اما به بررسی پارامترهای درون سلولی (شامل شکستگی DNA اسپرم) پرداخته نمی‌شود. همچنین در آزمایشگاه‌های ART معمولا نمونه‌های اسپرم از ۰/۵ تا حداکثر ۳ ساعت و بعضی از مراکز درمان ناباروری بدون توجه به‌زمان بعد از عمل جداسازی و شستشو اسپرم مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به نقش اسپرم در فرایند لقاح در روش‌های ART، لازم است که علاوه بر توجه به ساختار سلولی اسپرم به بهترین زمان ممکن جهت انجام تزریق اسپرم آماده شده به‌داخل حفره رحمی توجه شود. لذا با مطالعه ساختار سلولی اسپرم و نیز تعیین زمان دقیق عمل تزریق اسپرم به‌داخل حفره رحمی می‌توان میزان لقاح و در نتیجه میزان حاملگی را افزایش داد. هدف از این مطالعه به‌دست آوردن بهترین زمان برای انکوباسیون اسپرم‌های نرمال شسته شده به‌روش Direct swim-up برای استفاده در تکنیک‌های کمک باروری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری و آنالیز سمن: در این مطالعه آینده نگر، ۲۱ نمونه نرمال از مردهای نابارور مراجعه کننده به پژوهشکده علوم تولید مثل یزد با رعایت اصول اخلاقی جمع آوری شد. نمونه مایع منی افراد پس از ۲ تا ۷ روز خودداری از مقاربت به‌وسیله‌ی خود انزالی در ظروف دهان گشاد جمع آوری شد. سپس برای مایع شدن، نمونه سمن به‌مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. آنالیز مایع منی طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی(WHO2010) انجام شد (۹).

آماده سازی اسپرم: پس از آنالیز، نمونه‌ها به‌وسیله‌ی روش Direct swim-up آماده شدند. به این صورت که میزان ۱/۵ میلی‌لیتر محیط کشت ۱۰ Ham's F+۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلبومین سرم انسانی(HSA) درون لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد و سپس ۱ میلی‌لیتر از نمونه به‌وسیله پیپت پاستور به ته لوله اضافه شد. لوله فالکون با زاویه ۴۵ درجه به‌مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۲/۳ مایع رویی جدا شده و داخل یک لوله ریخته شد. ۱/۵ تا ۲ میلی‌لیتر محیط کشت اسپرم به تست تیوپ اضافه شد و به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰-۵۰۰g سانتریفوژ شد. بعد از سانتیریفیوژ، ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت اسپرم ته لوله روی رسوب تشکیل شده باقی گذاشته و سپس رسوب درون محیط کشت اسپرم باقی مانده حل شد (۹).

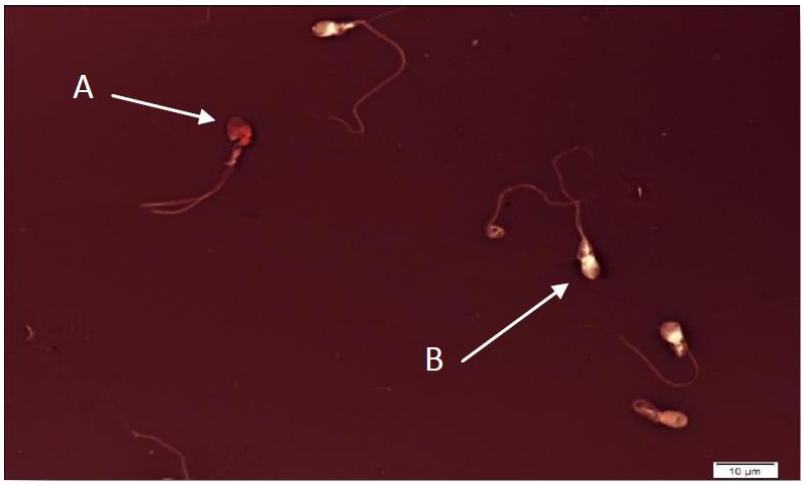
شمارش و ارزیابی تحرک: برای شمارش تعداد و ارزیابی تحرک اسپرم از لام Makler chamber استفاده شد. برای

www.SID.ir

Archive of SID

شمارش، ۱۰ میکرولیتر از نمونه، توسط سمپلر روی قسمت وسط لام MAKLER CHAMBER قرار داده شد و سپس لامل روی نمونه قرار گرفت. این لامل از ۱۰۰ خانه ۱۰×۱۰ تشکیل شده و با بزرگنمایی ۲۰X، تعداد اسپرم‌های موجود در ۱۰ مربع عمودی و ۱۰ مربع افقی پشت سر هم شمارش شد و میانگین این دو گرفته شد. سپس عدد به دست آمده در 10^6 ضرب شد تا تعداد اسپرم در یک میلی‌لیتر برحسب میلیون به‌دست آید. برای ارزیابی تحرک اسپرم، ۱۰ میکرولیتر از نمونه بر روی لام MAKLER CHAMBER قرار گرفت، با لامل پوشانده شد و با بزرگنمایی۲۰X ، انواع حرکت اسپرم‌ها بررسی شد. تعداد اسپرم‌های دارای حرکت سریع پیشرونده (a)، آهسته پیشرونده (b)، حرکت درجا (c)، واسپرم‌های بی‌حرکت (d) را در مربع‌های مختلف مشاهده و با کانتر شمارش شد تا به صورت درصد بیان شود (۹). نتایج برای هر نمونه قبل و بعد از شستشو به‌روش Direct Swin-up، ثبت شد.

ارزیابی قابلیت حیات: برای ارزیابی قابلیت حیات از رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. برای ساخت رنگ ابتدا ۰/۶۷ گرم پودر ائوزینY با ۰/۹ گرم سدیم کلرید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و سپس به آن ۱۰ گرم پودر ائوزین-نیگروزین (MERCK, Germany) اضافه کردیم (۹). ۱۰ میکرولیتر از رنگ ائوزین-نیگروزین به‌درون یک میکروتیوپ ریخته شد و سپس ۱۰ میکرولیتر نمونه درون میکروتیوپ حاوی رنگ اضافه شد و با عمل پیپتینگ با ائوزین-نیگروزین مخلوط شد. پس از ۳۰ ثانیه ۱۰ میکرولیتر از آن برداشته و از آن گسترش تهیه شد. گسترش‌ها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی X ۱۰۰۰ بررسی شد (شکل ۱). اسپرم‌هایی که رنگ را به خود گرفته و قرمز یا صورتی شده اند مرده، و آنهایی که رنگ را به خود نگرفته اند زنده در نظر گرفته شد(۹). تعداد۲۰۰ اسپرم شمرده شد و نتایج قبل و بعد از شستشو به‌روش Direct swim up، ثبت گردید.



شکل۱: ارزیابی قابلیت حیات اسپرم انسان توسط رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین. A: اسپرم‌های با سر سفید، اسپرم‌های زنده و B: اسپرم‌های سر صورتی یا قرمز، اسپرم‌های مرده تلقی می‌شوند. بزرگنمایی ×۱۰۰۰

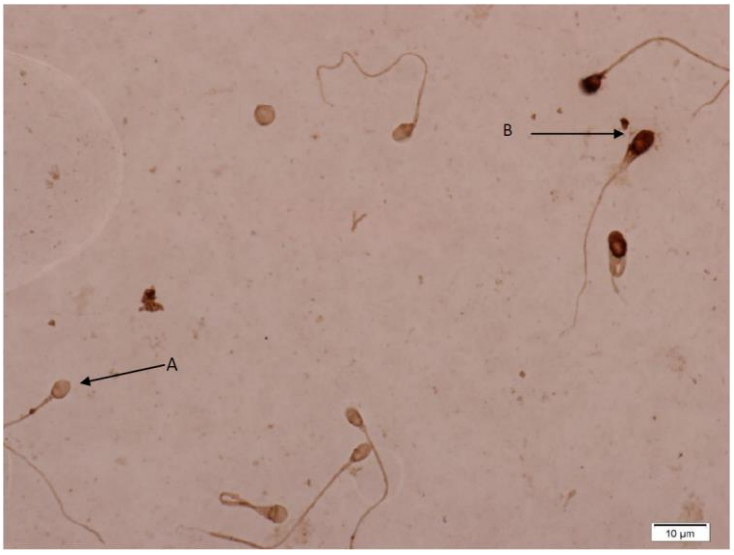
ارزیابی مورفولوژی: برای بررسی مورفولوژی از رنگ آمیزی پاپانیکولا طبق دستورالعمل WHO 2010 (۹) سر به رنگ آبی و قطعه میانی به رنگ قرمز یا صورتی در می‌آید استفاده شد. جهت بررسی مورفولوژی اسپرم، ابتدا از هر نمونه گسترش تهیه شد تا بعدا به‌طور یک‌جا رنگ آمیزی پاپانیکولا (MERCK, Germany) روی آن‌ها انجام شود (۹). برای هر نمونه یک لام قبل از عمل Direct Swim-up و یک لام بلافاصله بعد از عمل Direct Swim- up به‌صورت فیکس شده از اسپرم تهیه شد. پس از رنگ آمیزی، تعداد ۲۰۰ اسپرم با بزرگنمایی X۱۰۰۰ بررسی شد.

تست TUNEL: بعد از آماده سازی و آنالیز اسپرم در لوله حاوی اسپرم آماده شده به روش Direct Swim-up محکم بسته شد و درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا میزان شکستگی DNA اسپرم‌ها در زمان‌های مختلف (۳،۲،۱،۰ ساعت) انکوباسیون توسط تست TUNEL بررسی شود. برای انجام تکنیک TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) از کیت سنجشی تانل(Roche, Germany) استفاده شد. ابتدا غلظت نمونه شسته شده به ۲۰ میلیون رسانده و گسترش تهیه شد. پس از خشک شدن گسترش‌ها در دمای اتاق، گسترش‌ها در

www.SID.ir

Archive of SID

متانول ۱۰۰ درصد به‌مدت ۴ دقیقه فیکس و سپس به‌منظور شستشو شده به‌مدت ۳۰ دقیقه در محلول (×۱) PBS قرار گرفت. سپس گسترش‌ها در محلول blocking (H_2O_2 ۳ درصد در متانول) به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۵ تا ۲۵ سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از شستشو با PBS به مدت ۵ دقیقه گسترش‌ها با محلول تریتون ۰/۱ درصد در سدیم سیترات ۰/۱ درصد به مدت ۲ دقیقه در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس گسترش‌ها با PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو شد. برای هر لام، ۵ میکرولیتر محلول آنزیم و ۴۵ میکرولیتر محلول لیبل درون یک میکروتیوپ با هم مخلوط شد و به تمام قسمت‌های لام اضافه شد و به‌مدت ۱ ساعت در محیط تاریک، مرطوب و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از شستشو با PBS، (سه بار و هر بار ۵ دقیقه) گسترش‌ها با converter – probe به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس گسترش‌ها با محلول(DAB substrate(H2O2) + ۵۰۰ میکرولیتر DAB، ۴/۵ میکرولیتر) به‌مدت۲۰ دقیقه در محیط تاریک، مرطوب و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. دوباره عمل شستشو با PBS انجام شد. آبگیری از نمونه‌ها توسط الکل های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد (هر کدام ۵ دقیقه) صورت گرفت. شفاف سازی نمونه‌ها به وسیله‌ی زایلن و چسباندن توسط چسب انتلان انجام شد (۱۰). سپس، با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ×۱۰۰۰ مشاهده و تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. سلول‌های با رنگ قهوه‌ای تیره دارای شکستگی DNA و TUNEL مثبت در نظر گرفته شد و سلول‌های بدون رنگ و قهوه‌ای کم رنگ بدون شکستگی DNA و TUNEL منفی در نظر گرفته شد (شکل ۲).



شکل ۲: بررسی میزان شکستگی DNA اسپرم انسانی توسط تکنیک TUNEL. A: اسپرم‌های بدون رنگ و قهوه‌ای کم رنگ بدون شکستگی DNA و TUNEL منفی وB: اسپرم‌های با رنگ قهوه‌ای تیره دارای شکستگی DNA و TUNEL مثبت در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری: برای آنالیز داده‌ها، از نرم افزار SPSS 15 استفاده شد. از pair-T test برای مقایسه پارامترهای اسپرم قبل و بعد از شستشو و از تست ANOVA یک طرفه با تست تکمیلی Tukey برای مقایسه شکستگی DNA اسپرم در زمان‌های مختلف استفاده شد. همچنین جهت بررسی بین زمان انکوباسیون و شکست DNA اسپرم، آزمون Pearson خطی مورد استفاده قرارگرفت. P< ۰/۰۵ به‌عنوان مرز معنی‌داری داده‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

جدول ۱ مقایسه‌ای بین طرح‌های مختلف حرکتی، مورفولوژی طبیعی و قابلیت حیات اسپرم انسان قبل و بعد از و آماده سازی به روش Direct swim-up را نشان می‌دهد. نتایج بیانگر آن است که درصد حرکت پیشرونده و حرکت سریع پیشرونده بعد از آماده سازی در مقایسه با قبل از آماده سازی به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) افزایش، در حالی‌که حرکات آهسته و درجا بعد از آماده سازی نسبت به قبل از آماده سازی به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) کاهش یافت. با این وجود تغییر قابل ملاحظه‌ای در

www.SID.ir

Archive of SID

حرکات آهسته اسپرم بین این دو گروه مشاهده نشد. علاوه بر این، مورفولوژی طبیعی اسپرم و همچنین قابلیت حیات اسپرم‌ها افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) را بعد از آماده سازی در مقایسه با قبل از آماده سازی نشان داد.

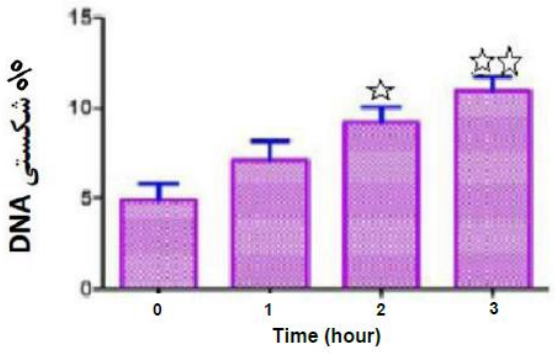
افزایش معنی داری در درصد شکستگی DNA اسپرم بعد از انکوباسیون مشاهده شد. درصد شکستگی DNA اسپرم بعد از یک ساعت انکوباسیون نسبت به زمان صفر، همچنین دو ساعت نسبت به یک ساعت و سه ساعت نسبت به دو ساعت معنی‌دار نبود. با این‌حال، افزایش معنی‌داری در درصد شکستگی DNA اسپرم پس از دو ساعت انکوباسیون نسبت به زمان صفر (P<۰/۰۱) و همچنین سه ساعت انکوباسیون نسبت به زمان صفر و یک ساعت (P<۰/۰۰۱) مشاهده شد (نمودار ۱).

همچنین، یک رابطه معکوس بین میزان شکستگی DNA نمونه ها، با حرکت سریع، حرکت کند، مورفولوژی و یک رابطه مستقیم بین درصد شکستگی DNA نمونه‌ها، با حرکت درجا و بی حرکت دیده شد (جدول ۲).

جدول ۱: مقایسه پارامترهای اسپرمی قبل و بعد از آماده سازی اسپرم به روش Direct Swim-up

پارامترهای اسپرم	قبل از آماده سازی اسپرم	بعد از آماده سازی اسپرم
حرکت سریع پیشرونده (٪)	۲۰/۴۸±۲/۵۷	۴۲ /۵۲±۳/۲۷*
حرکت آهسته پیشرونده (٪)	۴۳/۲۴±۲/۳۰	۴۷ /۷۱±۳/۸۰*
حرکت درجا (٪)	۵/۳۶±۰/۷۰	۴/۲۴±۰/۷۵ *
بی حرکت (٪)	۲۹/۸۱±۱/۶۳	۵/۵۲±۰/۵۷ *
حرکت پیشرونده (٪)	۶۳/۷۱±۱/۸۳	۹۰/۱۰±۱/۰۲ *
مورفولوژی طبیعی (٪)	۴۹/۰۰±۳/۱۰	۷۲/۳۳±۲/۵۳ *
قابلیت حیات (٪)	۸۲/۲۹±۱/۶۵	۱۰۰±۰/۰۰۰ *

داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده. p<۰/۰۰۱، حرکت پیشرونده شامل حرکت سریع پیشرونده + حرکت آهسته می‌باشد.*



*نمودار: مقایسه میانگین شکستگی DNA اسپرم انسان در زمان‌های مختلف انکوباسیون بعد از آماده سازی به‌روش Direct Swim-up با استفاده از تکنیک TUNEL. *میزان شکستگی DNA بعد از دو ساعت نسبت به زمان صفر با در نظر گرفتن سطح معنی داری ۰/۰۵ به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. ** شکستگی DNA بعد از سه ساعت نسبت به‌زمان صفر و یک ساعت با در نظر گرفتن سطح معنی داری ۰/۰۵ به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است.*

جدول ۲:رابطه میزان شکستگی DNA اسپرم انسان با سایر پارامترهای اسپرم

حرکت سریع	حرکت آهسته	متغیر ها		حرکت پیشرونده	مورفولوژی طبیعی
		حرکت درجا	بی حرکت		
r=-۰/۰۰۶	r=-۰/۰۹۰	r=۰/۱۷۸	r=۰/۴۰۲	r=-۰/۳۳۴	r=-۰/۱۰۶
* <۰/۰۰۰۱	۰/۳۳۰	۰/۲۲۲	* <۰/۰۰۰۱	*۰/۰۰۱	* <۰/۰۰۰۱

P –value ،r: ضریب همبستگی

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در این تحقیق همانطور که انتظار می‌رفت میزان تحرک اسپرم و اسپرم‌های با مورفولوژی سالم و همچنین اسپرم‌های زنده نسبت به قبل از شستشوی اسپرم بـه روش Direct swim up افـزایش چشمگیری داشتند و نیز میزان قطعه قطعه شدن DNA اسـپرم و آپوپتوزیس به‌طور معنی‌داری نسبت بـه قبـل از آمـاده سـازی اسپرم به روش Direct swim up افزایش نشان داد.

محققین دیگری نیز به نتایج مشابهی در مورد بهبود پارامترهـای اسپرم در روش Swim up دست یافتند، به‌طوری‌که اسپرم‌هـای جمع آوری شـده، هـم از نظـر تعـداد و هـم از نظـر مورفولـوژی طبیعی از میزان بیشتری نسبت بـه رو ش‌هـای دیگـر برخـوردار بودند (۱۱). بعضی از محققین بـا مقایسـه دو روش Swim up و Percoll Gradient به ایـن نتیجـه رسـیدند کـه اگرچـه تعـداد اسپرم در روش Percoll بـه‌صـورت معنـی‌داری بیشـتر از روش Swim up است ولی درصد حرکـت پیشـرونده در روش Swim up بیشتر است. همچنین این روش برای افزایش قابلیت بـاروری در سیکل‌های درمانی و حذف اسپرم‌هـایی کـه از بلـوغ کمتـری برخوردار بوده و یا در مرحله آناپلوئیدی به سر می‌برنـد، مناسـب مـی‌باشـد (۱۲). علـی‌رغـم ایـن کـه روش‌هـای مختلفـی بـرای جداسـازی اسـپرم وجـود دارد، امـا بسـیاری همچنـان بـر روش شستشو و Swim up مایع سـیمن تاکیـد داشـته و آن را بـرای دستیابی به اسپر مهای با حرکـت بیشـتر و پیشـرونده، مناسـب می‌دانند (۱۳). یکی دیگـر از پارامترهـای اصـلی اسـپرم، میـزان مورفولوژی طبیعی آن است که نقش تعیین کننده‌ای در بـاروری افراد دارد. لذا اگر طـی انجـام روشـی بتـوان میـزان بیشـتری از اسپرم‌های طبیعی را جمع آوری نمود، مسلما میزان باروری نیـز افزایش خواهد یافت. Younglai به مقایسه تاثیر یک بار و دوبـار شستشو در روش Swim up بر مورفولوژی سر اسپرم پرداخت و به این نتیجه دست یافت که دو بار شستشو در روش Swim up باعث می‌شود تـا اسـپرم‌هـایی کـه دارای شـکل طبیعـی و داری واکنش آکروزومی بهتری هستند جدا شوند و یا اسپرم‌هایی جـدا شوند کـه از توانـایی بیشـتری در مقابـل محـیط هیپواسـماتیک برخوردارند. عده‌ای نیز بـر ایـن باورنـد کـه در روش Swim up میزان قطعه قطعه شدن DNA نیز به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد (۱۴). نتیجه این تحقیق موید آن است که کاهش میـزان میزان قطعه قطعه شدن DNA اسپرم مـی‌توانـد باعـث افـزایش لقاح و تشـکیل جنـین در روش‌هـای کمـک بـاروری (ART) و همچنین افزایش میزان حاملگی و تولد نوزاد زنده شود. بعضی از مطالعات نشان می‌دهد که اگر چه روش Swim up شاید کمـک چندانی به نمونه‌های طبیعی ننماید و حتی ممکن اسـت در ایـن خصوص روش‌هایی مثـل Percoll Gradient بهتـر از آن عمـل نماید ولی این روش در نمونه‌های اولیگواسپرمی، آستنواسـپرمی و تراتواسپرمی کاملا تاثیر خود را نشان داده و باعث می‌گـردد تـا اسپرم‌های طبیعی بیشتری جدا شوند و درمان ناباروری از نتـایج بهتری برخوردار باشد (۱۵). به همین دلیل، بعضـی از محققـین انجام Swim up double washing را پیشنهاد داده و معتقدنـد که این روش مخصوصا برای انجام IVF که اسـپرم هـا بایـد در اطراف اووسیت قرار گرفته و در محیط انکوباتور لقاح انجام پذیرد ؛ بسیار مناسب بوده و نتایج بهتـری را بـه‌دنبـال خواهـد داشـت (۱۶). همین ایده در روش آماده سازی اسپرم برای انجام IUI نیز وجود داشته و بسـیار مـوثر بـوده، منتهـا روش Swim up تـک مرحله‌ای آسان‌تر و کم هزینه‌تر بوده است (۱۷) .

انکوباسیون اسپرم آماده شده و شسته شده در دمـای ۳۷ درجـه سانتی‌گراد برای استفاده در تکنیک‌های کمـک بـاروری (ART) امری معمول است که در مراکز ناباروری صورت می گیرد. بررسی تاثیر انکوباسیون آزمایشگاهی اسپرم از پـژوهش‌هـایی اسـت کـه مورد توجه محققین در دهه‌ی اخیر قرار گرفته اسـت. تحقیقـات اولیه در مورد اثر انکوباسیون اسپرم بـر روی پارامترهـای اسـپرم نظیر تحرک، قابلیت حیات و مورفولوژی بوده است. بـا مشـخص شدن نقش مهم سـلامت و کیفیـت DNA اسـپرم در بـاروری و موفقیـت تکنیـک‌هـای کمـک بـاروری، بسـیاری از گـروه‌هـای تحقیقاتی تـلاش هـای زیـادی بـرای پیـدا کـردن ارتبـاط بـین انکوباسیون کوتاه مدت و طـولانی مـدت سـلول‌هـای اسـپرم بـا یکپارچگی DNA اسـپرم انجـام داده انـد (۷, ۱۸-۲۰). در ایـن مطالعه آینده نگر سعی بر پیدا کردن اثر زمـان‌هـای مختلـف بـر روی میزان قطعه قطعه شدن DNA و شکسـتگی DNA سـلول های اسپرم نرمال آماده شده به روش Direct swim-up در اثـر انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد داشتیم، کـه بررسـی میـزان شکسـتگی DNA اسـپرم بـه‌وسـیله تکنیـک TUNEL صورت گرفت. نتیجه این مطالعه نشان داد که بعد از گذشـت دو ساعت انکوباسیون اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گـراد میـزان شکستگی DNA اسپرم بـه‌میـزان قابـل تـوجهی افـزایش پیـدا می‌کند. به‌تـازگی Matsuura و همکـاران (۱۸) اثـر انکوباسـیون اسپرم در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد بدون CO_2 و با CO_2 را بر روی میزان قطعه قطعه شـدن DNA اسـپرم بررسـی کردنـد.

www.SID.ir

Archive of SID

آن‌ها دریافتند که پس از گذشت ۳ ساعت و ۲۴ ساعت میزان قطعه قطعه شدن DNA اسپرم در انکوباتور CO_2 دار نسبت به بدون CO_2 به‌صورت معنی‌داری بالا بود. همچنین میزان شکستگی DNA اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای اتاق به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. آن‌ها از روش Sperm chromatin structure assay برای بررسی میزان قطعه قطعه شدن DNA استفاده کردند. Dalzell و همکاران (۲۱) نشان دادند که DNA اسپرم حاصل از عمل TESE بعد از گذشت ۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد دچار آسیب می شود.

Hammadeh و همکاران (۲۲) نشان دادند که انکوباسیون اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بازشدگی و خارج شدن از حالت فشرده هسته اسپرم هنگام لقاح با تخمک را کاهش می‌دهد. آن‌ها مشاهده کردند که بعد از دو ساعت انکوباسیون، میزان عدم خروج هسته‌ی اسپرم از حالت فشرده از ۲۵ درصد به ۸۸ درصد افزایش پیدا می‌کند. در یک مطالعه که توسط Fernandez و همکاران (۲۳) در مورد پویایی قطعه قطعه شدن DNA اسپرم اسب نر انجام شده نشان دادندکه بیشترین میزان آسیب که به DNA اسپرم وارد شده زمان های بیش از ۶ ساعت انکوباسیون اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. در این تحقیق از تست Sperm Chromatin Dispersion برای بررسی میزان قطعه قطعه شدن DNA اسپرم استفاده شده بود. همچنین اثر مضر دیگری که انکوباسیون اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی اسپرم می‌گذارد تغییرات مورفولوژیکی سر اسپرم است که میزان باروری اسپرم را تحت تاثیر قرار می‌دهد و باعث کاهش میزان باروری اسپرم می‌شود. Peer و همکاران (۲۴) نشان دادند که میزان DNA اسپرم‌های دارای واکوئل بعد از دو ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد به‌میزان معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند.

یافته‌هایی که ما در این مطالعه به‌دست آوردیم با یافته‌های دیگر محققان در مورد قطعه قطعه شدن DNA اسپرم پس از آماده شدن به روش Direct swim-up مشابه است (۱۸-۱۹). Zhang و همکاران (۲۰) نشان دادند که قطعه قطعه شدن DNA اسپرم انسانی پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد، در حالی‌که آن‌ها هیچ تفاوت معنی‌داری را پس از دو ساعت انکوباسیون اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مشاهده نکردند. ممکن است علل احتمالی این نتایج به‌خاطر روش آماده سازی اسپرم باشد. Zhang و همکاران اسپرم را به‌روش Indirect swim-up آماده کردند در حالی‌که ما به‌روش Direct swim-up آماده سازی و شستشوی اسپرم را انجام دادیم و همچنین محیط کشتی که برای آماده سازی و نگهداری اسپرم که Zhang و همکاران استفاده کردند با مطالعه‌ی ما متفاوت است به‌طوری که آن‌ها از محیط Ham's F10 همراه با G-IVF استفاده کردند در حالی‌که ما از Ham's F10 به همراه آلبومن ۵ درصد استفاده کردیم. یکی دیگر از تفاوت‌هایی که وجود داشته نحوه‌ی انکوباسیون اسپرم بوده است که Zhang و همکاران، اسپرم را در انکوباسیون CO_2 دار ۵ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کردند در حالی‌که ما اسپرم را در انکوباسیون بدون CO_2 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کردیم.

نتایج ما بر خلاف نتایج Calamera و همکاران (۷) است. آن‌ها ارزیابی اثر گذشت زمان (بلافاصله پس از شستشوی اسپرم به روش Swim-up تا ۴۷ ساعت) بر روی پارامترهای اسپرم و یکپارچگی DNA انجام دادند و دریافتند که تفاوت معنی‌داری بین زمان‌های مختلف انکوباسیون بر روی قطعه قطعه شدن DNA اسپرم وجود ندارد. یکی از علت‌های احتمالی مربوط به‌روش مورد استفاده برای ارزیابی قطعه قطعه شدن DNA است که مورد استفاده قرار گرفته است. آن‌ها از روش آکریدین اورنژ (AO) برای بررسی یکپارچگی DNA اسپرم مورد استفاده قرار دادند. در حالی‌که ما در این تحقیق از روش TUNEL برای بررسی قطعه قطعه شدن DNA اسپرم استفاده کردیم. روش‌های آکریدین اورنژ و TUNEL و دیگر روش‌های بررسی آسیب DNA روش‌های متغیر وابسته به فرد هستند یعنی ممکن است نتایج از فردی به فرد دیگر تا حدودی متغیر باشد.

Yavas و همکاران (۲۵) اثر زمان انکوباسیون اسپرم را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در تلقیح خارج رحمی اسپرم (IUI) و نتایج حاملگی بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند که اگر اسپرم آماده شده برای IUI بیش از ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شود باعث کاهش میزان حاملگی به روش IUI می شود. نتایج ما هم نشان می‌دهد که یکی از علل کاهش میزان حاملگی و تولد فرزند زنده می‌تواند در اثر زمان طولانی انکوباسیون اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باشد که بر روی DNA اسپرم اثر می‌گذارد.

Lachaud و همکاران (۲۶) به این نتیجه رسیدند که انکوباسیون

www.SID.ir

Archive of SID

اسپرم پس از چهار ساعت هیچ تاثیری برروی پارامترهای اسپرم و شکستگی DNA ندارد. آن ها بیان کردند انکوباسیون طولانی مدت اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باعث نکروز سلول‌های اسپرم می‌شود و باعث شکستگی DNA نمی شود. آن‌ها معتقدند که اسپرم نرمالی که به‌صورت طبیعی از فرد گرفته شده باشد مسیر شکستگی DNA را طی نمی‌کند. یکی از علل آسیب DNA اسپرم ممکن است به خاطر استرس اکسیداتیو باشد. نشان داده شده است که استرس اکسیداتیو، رادیکال‌های فعال اکسیژن را طی انکوباسیون آزمایشگاهی اسپرم افزایش می‌دهد (۷). سلول‌های اسپرم نسبت به رادیکال‌های فعال اکسیژن حساس و آسیب پذیر هستند. که حساسیت و آسیب پذیری به دلایل مختلفی از قبیل حضور اسید چرب غیر اشباع بالا در غشای اسپرم و عدم وجود آنتی اکسیدانت کافی در سیتوپلاسم اسپرم است. همچنین سلول‌های اسپرم خود تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن می کنند. بیشترین میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون اسپرم تولید می‌شود (۷). پس در انکوباسیون‌های طولانی مدت نقش رادیکال‌های فعال اکسیژن در آسیب DNA یک علت غیر قابل انکار به‌نظر می‌رسد. محققین دیگر قطعه قطعه شدن DNA اسپرم را پس از انکوباسیون آزمایشگاهی اسپرم بعد از ۴ ساعت مورد بررسی قرار دادند (۵). آن‌ها برای مهار کردن فعالیت اندونوکلئاز از مهارکننده‌ای اندونوکلئاز (ATA) استفاده کردند و اسپرم را برای مدت ۴ و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کردند. آن‌ها نشان دادند که مهار کننده اندونوکلئاز (ATA) هیچ تاثیری بر روی قطعه قطعه شدن DNA اسپرم در زمان‌های مختلف انکوباسیون نداشت. می‌توان گفت که استرس اکسداتیو و تولید رادیکال فعال اکسیژن توسط اسپرم به‌عنوان یک علت احتمالی برای آسیب به DNA مطرح است. نگهداری طولانی مدت اسپرم در محیط کشت نیز یکی از علت های محتمل آسیب به DNA می‌باشد. انکوباسیون طولانی مدت اسپرمی که در محیط کشت ساده که فاقد مواد مغذی است نیز باعث آسیب به DNA اسپرم می شود. از سوی دیگر نتایج به‌دست آمده مشابه با کاری است که Bungum و همکاران (۲۷) انجام دادند. آن‌ها گزارش دادند که پس از گذشت دو ساعت انکوباسیون اسپرم آماده شده به‌روش شیب غلظت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد میزان قطعه قطعه شدن DNA اسپرم به‌میزان معنی‌داری نسبت به انکوبه کردن اسپرم در دمای اتاق (۲۴-۲۳ درجه سانتی‌گراد) افزایش می‌یابد.

نتیجه گیری

بهترین زمان برای انکوباسیون اسپرم طبیعی انسان در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد که به‌روش Direct swim-up آماده شده برای استفاده در تکنینک‌های کمک باروری در محدوده زمانی دو ساعت می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از مدیریت پژوهشکده علوم تولید مثل یزد به‌خاطر حمایتشان و راهنمایی‌های سرکار خانم ساره عاشورزاده در انجام این پژوهش تشکر و قدرانی می‌شود.

منابع

1. EI C-G, MI D-R, López-Fernández C, Fernández J, et al. Evaluation of sperm DNA damage. Actas Urol Esp. 2007; 31(2): 120-31.

2. Lewis SE, Simon L. Clinical implications of sperm DNA damage. Human Fertility. 2010; 13(4): 201-7.

3. Yamauchi Y, Riel JM, Ward MA. Paternal DNA Damage Resulting From Various Sperm Treatments Persists After Fertilization and Is Similar Before and After DNA Replication. Journal of Andrology. 2012; 33(2): 229-38.

4. Mohammad HN-E, Mohammad S, Shahnaz R, Maryam A, et al. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. Reproductive BioMedicine Online. 2005; 11(2): 198-205.

5. Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, et al. Spontaneous DNA fragmentation in swim up selected human spermatozoa during long term incubation. Journal of Andrology. 2003; 24(2): 253-62.

6. Van der Westerlaken L, Naaktgeboren N, Verburg H, Dieben S, et al. Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in patients with borderline semen: a randomised study using sibling oocytes. Technology assessment of assisted reproduction. 2006; 85(2):395-400.

7. Calamera J, Fernandez P, Buffone M, Acosta A, et al. Effects of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. Andrologia. 2001; 33(2): 79-86.

8. Marín-Briggiler CI, Tezón JG, Miranda PV, Vazquez-Levin MH. Effect of incubating human sperm at room temperature on capacitation-related events. Fertility and sterility. 2002; 77(2): 252-9.

www.SID.ir

Archive of SID

9. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen: 5ed,. Cambridge University Press; 2010. p. 4-165.

10. Ramezani M, Khalili MA, Adib M. Effect of vitrification on apoptosis and some of parameter of sperm in infertile men. Feyz Journals of Kashan University of Medical Sciences. 2010; 14(1): 18-25.

11. Michaeli M, Peer S, Anderman S, Ballas S, et al. Post swim-up versus original sperm quality, and strict criteria morphology, it's influence on fertilization rate in in vitro fertilization program: a pilot study. International Congress Series; 2004; 1271(01): 181–18

12. Jakab A, Kovacs T, Zavaczki Z, Borsos A, et al. Efficacy of the swim-up method in eliminating sperm with diminished maturity and aneuploidy*. Human Reproduction. 2003; 18(7): 1481-8.

13. Paasch U, Grunewald S, Glander H. Sperm selection in assisted reproductive techniques. Society of Reproduction and Fertility supplement. 2007; 65:515.

14. Younglai E, Holt D, Brown P, Jurisicova A, et al. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. Human Reproduction. 2001; 16(9): 1950-3.

15. Adiga SK, Kumar P. ANDROLOGY: Influence of Swim-Up Method on the Recovery of Spermatozoa From Different Types of Semen Samples. Journal of assisted reproduction and genetics. 2001; 18(3): 160-4.

16. Chen S-U, Ho H-N, Chen H-F, Chao K-H, et al. Comparison between a two-layer discontinuous Percoll gradient and swim-up for sperm preparation on normal and abnormal semen samples. Journal of assisted reproduction and genetics. 1995; 12(10): 698-703.

17. Inaudi P, Petrilli S, Joghtapour A, Trusso P, et al. Reduction of steps in the preparation of motile sperm for intrauterine insemination does not reduce efficacy of the procedure: simplified one-step swim-up method versus classic swim-up. Human Reproduction. 2002; 17(5): 1288-91.

18. Matsuura R, Takeuchi T, Yoshida A. Preparation and incubation conditions affect the DNA integrity of ejaculated human spermatozoa. Asian journal of andrology. 2010; 12(5): 753-9.

19. Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, et al. Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. Journal of andrology. 2003; 24(2): 253.

20. Zhang XD, Chen MY, Gao Y, Han W, et al. The effects of different sperm preparation methods and incubation time on the sperm DNA fragmentation. Human Fertility. 2011; 14(3): 187-91.

21. Dalzell LH, McVicar CM, McClure N, Lutton D, et al. Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. Fertility and sterility. 2004; 82(5): 1443-5.

22. Hammadeh M, Strehler E, Zeginiadou T, Rosenbaum P, et al. Chromatin decondensation of human sperm in vitro and its relation to fertilization rate after ICSI. Systems Biology in Reproductive Medicine. 2001; 47(2): 83-7.

23. López-Fernández C, Crespo F, Arroyo F, Fernández J, et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: II. The stallion. Theriogenology. 2007; 68(9): 1240-50.

24. Peer S, Eltes F, Berkovitz A, Yehuda R, et al. Is fine morphology of the human sperm nuclei affected by in vitro incubation at 37° C? Fertility and sterility. 2007; 88(6): 1589-94.

25. Yavas Y, Selub MR. Intrauterine insemination (IUI) pregnancy outcome is enhanced by shorter intervals from semen collection to sperm wash, from sperm wash to IUI time, and from semen collection to IUI time. Fertility and sterility. 2004; 82(6): 1638-47.

26. Lachaud C, Tesarik J, Cañadas ML, Mendoza C. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. Human Reproduction. 2004; 19(3): 607-10.

27. Bungum M, Forsell N, Giwercman A. Evaluation of the effects of different in vitro incubation conditions on sperm DNA integrity. Hum Reprod. 2010; (25): I132 - I132.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Winter 2014; 4(4): 415- 423

Apoptosis Will be Increased after 2h Incubation of Human Sperm at 37°C

Nabi A, M.Sc., Khalili MA, Ph.D.*, Halvaei I, M.Sc., Anbari F, M.Sc.

Research and Clinical Center for Infertility, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

* Email corresponding author: khalili59@hotmail.com

Received: 9 Mar. 2013 Accepted: 23 Jul. 2013

Abstract

Aim: The main goal was to evaluate the impact of different incubation time intervals on human sperm DNA status using terminal deoxyribonucleotidyl transferase–mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) test.

Material and methods: This prospective study involved 21 normozoospermic specimens. After direct swim-up, sperm cells were incubated at 37°C and DNA damage was evaluated at different time intervals (0, 1, 2 and 3 h). After slide fixation with methanol 100% for 4 minutes and rinse in phosphate-buffered solution (PBS), TUNEL was added to each slide and incubated for 60 minute in dark. Eosin-Nigrosin and Papanicolaou staining protocols were applied in order to assess sperm viability and morphology, respectively.

Results: Sperm viability and normal morphology was improved after sperm processing (100%, 72.3% respectively, $p<0.0001$). The rate of DNA damage was significantly higher after 2h compared to 0h (9.19±0.8% Vs 4.9±0.9%, respectively, $p=0.008$). Also there was significant difference in abnormal sperm DNA between 3h and 1h (10.95±0.7% Vs 7.1±1%, respectively, $p=0.020$).

Conclusion: Incubation of prepared normozoospermic samples at 37°C more than 2 h may be associated with sperm DNA fragmentation. Therefore, it seems that incubation of human spermatozoa at 37°C should be limited up to 2h prior to use in ART clinics.

Keywords: Spermatozoa, DNA fragmentation, TUNEL

www.SID.ir