مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۵، شماره ۷، مهر ۱۳۹۶
صفحه: ۵۹۴-۵۸۵

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 25, No.7, Oct 2017
Pages: 585-594

مقایسه بیان پروتئین PLCζ و آسیب DNA اسپرم بین مردان بارور و نابارور

مرضیه تولائی*[۱]، مریم اربابیان[۲]، محمدحسین نصر اصفهانی[۳]

چکیده

مقدمه: پروتئین فسفولیپاز C زتای اسپرم (PLCζ) در طی اسپرماتوژنز بیان می‌شود و نقش مهمی را در طی فرآیند فعال شدن تخمک ایفا می‌کند. در این مطالعه بیان پروتئین PLCζ و آسیب DNA اسپرم در مردان بارور و نابارور ارزیابی شده است.

روش بررسی: در این مطالعه مورد- شاهدی نمونه مایع منی ۱۵ مرد بارور و ۱۰ مرد نابارور کاندید برای تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) جمع‌آوری شد. پارامترهای اسپرمی، بیان پروتئین PLCζ و آسیب DNA به ترتیب بر اساس پروتکل سازمان بهداشت جهانی (۲۰۱۰)، وسترن بلات و آزمون TUNEL ارزیابی شد.

نتایج: کیفیت پارامترهای اسپرمی به‌طور معنی‌داری در مردان نابارور کمتر از افراد بارور بود. به علاوه، در افراد نابارور، بیان پروتئین PLCζ به‌طور معنی‌دار کمتر و درصد آسیب اسپرم به‌طور معنی‌داری بیشتر از افراد بارور بود.

نتیجه‌گیری: نتایج ما به وضوح نشان می‌دهد که کاهش یا عدم بیان PLCζ و آسیب DNA اسپرم می‌تواند به عنوان فاکتورهای دخیل در شکست لقاح در این افراد نابارور در نظر گرفته شود؛ بنابراین ارزیابی برخی تست‌ها مانند پروتئین PLCζ و آزمون‌های کروماتین جهت بررسی قدرت لقاح یک مایع منی برای مردان نابارور پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: PLCζ، ICSI، آسیب DNA، پارامترهای اسپرمی

۱- استادیار، زیست شناسی علوم جانوری، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری تولید مثل، اصفهان
۲- کارشناس زیست شناسی سلولی و مولکولی، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری تولید مثل، اصفهان
۳- استاد جنین شناسی، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری تولید مثل، اصفهان
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۳۱-۹۵۰۱۵۶۸۲ ، پست الکترونیکی: Tavalaee.m@royaninstitute.org
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۲/۲۸

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

ناباروری به ناتوانایی یک زوج جهت کسب بارداری پس از یک سال زناشویی بدون استفاده از روش‌های جلوگیری اطلاق می‌گردد (۱). امروزه روند رشد و شیوع ناباروری در تمام جهان رو به افزایش است و از مهم‌ترین دلایل علت این امر، می‌توان به عوامل محیطی و ژنتیکی اشاره نمود. ۳۰-۲۰ درصد موارد ناباروری به علت فاکتورهای مردانه، ۳۵-۲۰ درصد به علت فاکتورهای زنانه و ۴۰-۲۵ درصد به علت هردو فاکتورهای زنانه و مردانه برآورد شده است. جهت درمان افراد نابارور، تکنیک‌های مختلفی ارائه شده است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به تکنیک لقاح آزمایشگاهی In vitro fertilization (IVF) و تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم Intra- sytoplasmic sperm injection (ICSI) اشاره نمود که جزء تکنیک‌های درمانی موفق بشمار می‌آیند. با این حال میزان عدم موفقیت این دو تکنیک اخیراً توسط HFEA (Human Fertilization and Embryology Authority) آمریکا به‌صورت آماری گزارش شده است به گونه‌ای که ۱۰ درصد عدم موفقیت در بیماران IVF و ۵۰/۴ درصد بیماران ICSI، به علت فاکتور مردانه است. تفاوت‌ها و تشابهات بین تکنیکIVF و ICSI می‌تواند تا حدی توجیه‌کننده این تفاوت آماری در نابارورانِ با فاکتور مردانه باشد (۴-۲). در روش IVF، اسپرم ظرفیت‌یابی شده با لایه منطقه شفاف (Zona pellucida) در اطراف تخمک برهمکنش می‌کند و پس از انجام واکنش آکروزومی و نفوذ به داخل لایه‌های اطراف تخمک، بین غشاء اسپرم و تخمک تماسی حاصل می‌گردد و درنهایت محتوای اسپرمی به داخل تخمک ریزش می‌کند. در حالی که در روش ICSI، برهمکنشی بین غشای گامت‌ها رخ نمی‌دهد و اسپرم‌ها از طریق سوزن میکرواینجکشن به داخل تخمک تزریق می‌گردد. لذا برخی از این سدهای بیولوژیکی در روش ICSI وجود ندارد؛ بنابراین شکست IVF می‌تواند با کاهش تحرک اسپرم، ناتوانی ظرفیت‌یابی و واکنش آکروزومی اسپرم، مشکلات در طی فیوژن گامت‌ها، عدم صحیح تعامل بینJuno-Izumo1 و نقش رفت‌های لیپیدی (Lipid raft) در غشاء تخمک مرتبط باشد (۵،۶). در مقابل، شکست ICSI به چندین فاکتور از جمله فاکتورهای تکنیکی (تزریق نامناسب یا بیرون‌شدگی اسپرم در طی تزریق)، نقایص اسپرمی یا فاکتورهای بیوشیمیایی (تراکم غیرطبیعی کروماتین هسته اسپرم، نقایص دوک‌های تخمکی) نسبت داده شده است (۷،۸). عدم فعال شدن تخمک (OAD) Oocyte activation deficiency به عنوان محتمل‌ترین علت اصلی شکست لقاح به دنبال ICSI در ۴۰ درصد کیس‌ها با شکست مواجه شده، گزارش شده است. علت OAD فقط به نقایص اسپرمی محدود نمی‌شود بلکه می‌تواند تخمک هم درگیر باشد از آنجایی که کیفیت تخمک نیز نقش بسزایی در موفقیت لقاح دارد (۹،۱۰).

مکانیسم فعال شدن تخمک با اتصال غشاء سر اسپرم از ناحیه استوایی به غشاء تخمک شروع می‌گردد و با رهایش یک‌سری از فاکتورهای اسپرمی که تحت عنوان فعال‌کننده تخمکی Sperm-borne oocyte activating factor (SOAF) است مسیر سیگنالی ادامه می‌یابد. تاکنون تعدادی از این فاکتورهای اسپرمی از جمله PLCζ(Phospholipase C zeta)، PAWP (Post-acrosomal sheath WWdomain-binding protein) و tr-kit (Truncated form of the KIT receptor) در پستانداران شناسایی شده است. محتمل‌ترین فاکتور اصلی PLCζ معرفی شده است که با ورود آن به داخل سیتوپلاسم تخمک، PLCζ با فاکتورهای تخمکی برهمکنش می‌دهد و به دنبال آن فسفاتیدیل اینوزیتول دی فسفات (PIP_2) را که بر روی وزیکول‌های سیتوپلاسمی است به دی آسیل گلیسرول (DAG) و اینوزیتول تری فسفات (IP_3) هیدرولیز می‌کند. متعاقباً IP_3 با اتصال به گیرنده‌هایش بر روی ذخایر داخل سلولی از جمله شبکه آندوپلاسمی، سبب رهایش کلسیم از این ذخایر به داخل سیتوپلاسم تخمک می‌گردد و افزایش کلسیم سیتوپلاسمی تخمک را سبب می‌گردد که به دنبال آن تخمک از متافازII به سمت آنافاز پیشروی می‌کند، جلوگیری از پلی‌اسپرمی رخ می‌دهد و سپس پرونوکلئوس‌ها و تکوین اولیه جنین صورت می‌گیرد (۱۲،۱۱)؛ بنابراین نقش فاکتور اسپرمی در فعال شدن تخمک کاملاً بارز است و ارزش تحقیقاتی آن بر

Archive of SID
www.SID.ir

روی افرادی که با عدم موفقیت در لقاح پس از ICSI مواجه هستند، آشکار است. در صورتی که زوجین با عدم موفقیت لقاح به دنبال ICSI مواجه باشند برخی از مراکز درمان ناباروری، تکنیک فعال‌سازی مصنوعی تخمک یا (AOA) Assisted oocyte activation را برای آن‌ها پیشنهاد می‌کنند که به دنبال ICSI جهت افزایش میزان لقاح کاربرد دارد. روش‌های مکانیکی، شیمیایی و الکتریکی جهت فعال‌سازی مصنوعی تخمک انجام می‌شود که متداول‌ترین آن‌ها استفاده از روش شیمیایی از جمله آیونوفورها است که می‌توان به یونومایسین اشاره نمود. این آیونوفورها خاصیت انحلال در چربی را دارند لذا با عبور از دو لایه لیپیدی غشاء باعث افزایش کلسیم داخل سیتوپلاسمی می‌گردد (۱۳،۱۴)؛ بنابراین به گونه‌ای می‌توانند فعال شدن تخمک را بهبود بخشند ولی برخی مراکز به علت اینکه استفاده از AOA شاید سلامت جنین و تولد و رشد فرزند را به مخاطره بیندازد، نگران بودند. در این راستا، گزارش شد که جنین و فرزند متولد شده حاصل از این تکنیک از سلامت روحی- روانی و جسمی برخوردار می‌باشند (۱۵). سؤالی که هنوز به‌طور کامل پاسخ داده نشده آن است که چه افرادی می‌توانند استفاده بهینه و سودمندی را از AOA ببرند. در صورتی که بتوان یک بیومارکری را ارائه نمود که پیشگوکننده پتانسیل میزان لقاح یک نمونه مایع منی باشد، شاید کمک شایانی به درمان این افراد نابارور شده باشد. با توجه به مطالب بالا، در این مطالعه سعی بر آن است که بیان PLCζ در سطح پروتئین با استفاده از تکنیک Western blot در افراد نابارور کاندید ICSI که با کاهش یا عدم موفقیت در لقاح ICSI مواجه بودند ارزیابی و مورد قیاس با افراد بارور گردد.

روش بررسی

در این مطالعه مورد-شاهدی نمونه مایع منی از مردان بارور و نابارور مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری با کسب رضایت و پرکردن پرسشنامه تحقیقاتی مبنی بر اینکه از نمونه اسپرمی فقط برای انجام فعالیت تحقیقاتی استفاده می‌شود، جمع‌آوری شد. مردان بارور کسانی بودند که قبلاً فرزند داشته‌اند و جهت تعادل جنسیت در خانواده از طریق روش PGD (Preimplantation genetic diagnosis) برای فرزند بعدی مراجعه کرده بودند و تعداد آن‌ها ۱۵ نفر بود. مردان نابارور کاندید روش کمک باروری ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) بودند. این افراد پس از استفاده از این روش با کاهش یا عدم موفقیت در لقاح مواجه بودند و میزان لقاح آن‌ها کمتر از ۲۵ درصد گزارش شده بود. با تماس تلفنی از این افراد، ۱۰ نمونه مایع منی جمع‌آوری گردید. با توجه به اینکه هدف اصلی این مطالعه بررسی فاکتور اسپرمی PLCζ بود، لذا گروه ناباروران این مطالعه از افرادی انتخاب شدند که با شکست فعال شدن تخمک و کاهش لقاح پس از ICSI روبه‌رو بودند (۱۶). پس از جمع‌آوری نمونه، پارامترهای اسپرمی بر اساس سازمان بهداشت جهانی،[1] میزان بیان پروتئین PLCζ با استفاده از روش وسترن بلات (۱۷) و میزان آسیب DNA اسپرم با استفاده از روش TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase) مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز پارامترهای اسپرمی: نمونه مایع منی پس از ۴-۳ روز پرهیز از مقاربت جنسی جمع‌آوری و در مدت ۳۰ دقیقه جهت مایع‌شدگی در شرایط آزمایشگاه نگهداری شد. پارامترهای اسپرمی از جمله غلظت اسپرم (دستگاه شمارش اسپرم)، تحرک اسپرم (با استفاده از نرم‌افزار CASA (Computer Aided Sperm Analysis)) و مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم (با استفاده از رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو) مورد ارزیابی قرار گرفت (۱).

بررسی فراگمنتاسیون DNA اسپرم با استفاده از تست TUNEL: آسیب DNA اسپرم با استفاده از کیت TUNEL از شرکت Promega بررسی شد. به‌طور خلاصه ابتدا مایع منی را با بافر فسفات سالین Buffer Phosphate Saline (PBS) شستشو داده و سپس گسترشی از نمونه بر روی اسلاید فراهم گردید. پس از خشک‌شدن، لام‌ها توسط پارافرمالدئید ۴ درصد فیکس شدند و رنگ‌آمیزی توسط کیت TUNEL صورت گرفت. پس از رنگ‌آمیزی، از رنگ PI (Propidium Idedio) که هسته را رنگ می‌کند جهت شمارش اسپرم‌ها استفاده گردید. اسپرم‌هایی که شکستگی تک‌رشته یا دو رشته داشته باشند به رنگ سبز فلورسنت و اسپرم‌هایی که به رنگ قرمز

Archive of SID
www.SID.ir

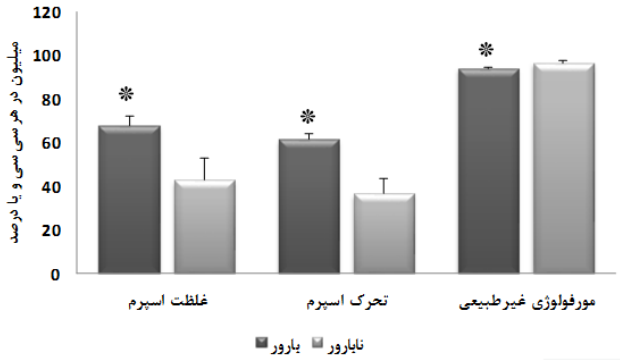
دیده شوند، بیانگر سلامت DNA می‌باشد. در هر لام حداقل ۵۰۰ اسپرم با استفاده از میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰(BX51,OLYMPUS,JAPON) شمارش و درصد آسیب DNA برای شخص گزارش شد (۱۸).

بررسی پروتئین PLCζ با استفاده از روش وسترن بلات: به‌طور خلاصه، مایع منی با استفاده از PBS شستشو داده شد و استخراج پروتئین در بافر لیزکننده صورت گرفت. غلظت پروتئین با استفاده از روش Bradford (Bio-Rad, Foster city, MI,USA) ارزیابی گردید. ۳۵ ماکروگرم از هر نمونه بر روی ژل پلی اکریل آمیدسدیم دودسیل سولفات ۱۲ درصد بارگذاری و سپس به غشاهای پلی‌وینیلدن در فلوراید انتقال داده شد. در مرحله بعد، غشاها به مدت یک شبانه‌روز جهت بررسی پروتئین خانه‌گردان GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) و برای پروتئین PLCζ به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه در شیر خشک به هدف پوشاندن مناطق غیراختصاصی قرار داده شد. سپس غشاها در معرض آنتی‌بادی اولیه GAPDH (Millipore, USA) به مدت یک ساعت و نیم در دمای اتاق و برای آنتی‌بادی اولیه PLCζ (Covalab/France) به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۴ درجه و پس از سه بار شستشو، در معرض آنتی‌بادی ثانویه به مدت یک ساعت جهت مشخص شدن باندهای پروتئین قرار گرفت. آنتی‌بادی ثانویه دارای شناسه‌گر پراکسیدازی (Horse Radish) است که از طریق سوبسترای خود در محلولی تحت عنوان ECL (Enhanced Chemoluminescence) که دارای خاصیت لومینانس است، عمل می‌کند. محصول این واکنش با ساطع کردن نور در محل اتصال آنتی‌بادی موجب تشخیص نمونه از طریق تصویر ایجادی بر روی فیلم رادیولوژی می‌شود. سپس فیلم مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرد (۱۷).

آنالیز آماری به‌وسیله نرم‌افزار SPSS۱۸ (SPSS, Chicago, IL, USA) انجام گرفت. از آزمون Kolmogoro v-Smirnov جهت تعیین نرمال بودن توزیع استفاده گردید. جهت مقایسه بین گروه‌ها از روش Independent sample T test استفاده شد و نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف خطا گزارش گردید. در صورتی که P-values کمتر ۰/۰۵ بود، اختلاف از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته می‌شود. این مطالعه در کمیته اخلاق پژوهشگاه رویان مورد تایید قرار گرفته و تصویب شده است (94000127).

نتایج

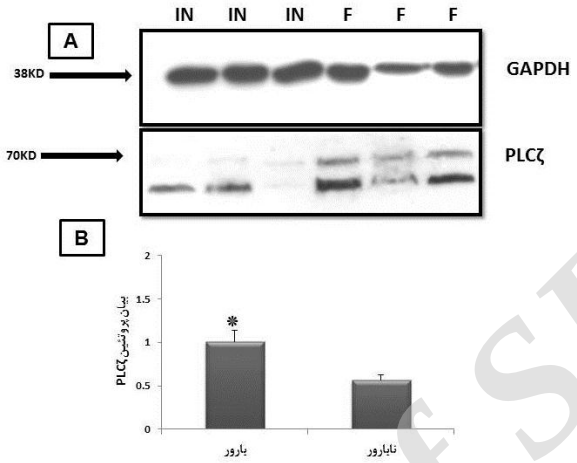
در این مطالعه پارامترهای اسپرمی ۱۵ مرد بارور و ۱۰ مرد نابارور مورد بررسی قرار گرفت (نمودار ۱). میانگین غلظت اسپرم در افراد بارور و نابارور به ترتیب ۴/۷ ± ۶۷/۷۱ و ۹/۸ ± ۴۲/۸۹ بود که به‌طور معنی‌داری در افراد نابارور کاهش یافته است (P=۰/۰۴). درصد تحرک اسپرم با استفاده از نرم‌افزار CASA مورد آنالیز قرار گرفت و مشخص شد که میانگین درصد تحرک اسپرم نیز به‌طور معنی‌داری در مردان نابارور (۶/۸ ± ۳۶/۶۷) پایین‌تر از مردان بارور (۲/۵ ± ۶۱/۴۲) است (P=۰/۰۳). به‌علاوه، درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم در نمونه اسپرمی مردان مراجعه‌کننده شمارش شد و بیانگر افزایش معنی‌داری در مورفولوژی غیرطبیعی در افراد نابارور (۰/۸ ± ۹۶/۷۸) در مقایسه با افراد بارور (۰/۷ ± ۹۴/۲۱) می‌باشد (P<۰/۰۰۱).



نمودار ۱: مقایسه پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی غیرطبیعی) بین افراد بارور (N=۱۵) و نابارور (N=۱۰)
*نشانگر اختلاف معنی‌دار بین دو گروه در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

در این مطالعه بیان پروتئین PLCζ به عنوان یک فاکتور اسپرمی دخیل در فعال شدن تخمک در لقاح با استفاده از تکنیک وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. همان‌گونه که در نمودار ۲A نشان داده شده است شدت باند پروتئین PLCζ با وزن مولکولی ۷۰ کیلودالتون در افراد بارور نسبت به افراد نابارور بیشتر می‌باشد. داده‌ها به‌صورت کمی آنالیز شد و در نمودار ۲B به‌صورت نمودار مشخص شد که میانگین بیان پروتئین PLCζ به‌طور معنی‌داری در افراد نابارور (۰/۵۶ ±۰/۰۶) پایین‌تر از افراد نابارور (۱/۰۰±۰/۱۳) می‌باشد (P=۰/۰۰۸).

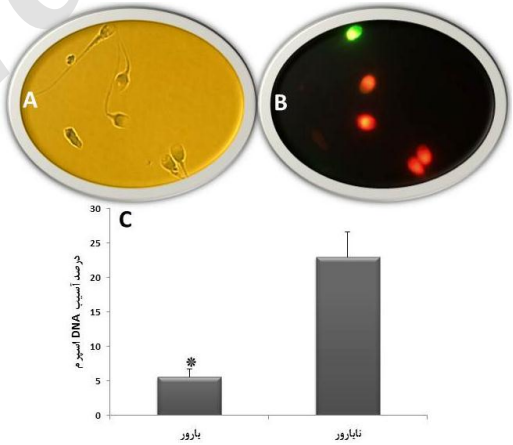


نمودار ۲: بررسی بیان پروتئین PLCζ با استفاده از روش وسترن بلات.

A) شدت باند پروتئین PLCζ در افراد نابارور (IN) کمتر از افراد بارور (F) می‌باشد.

B) مقایسه کمی پروتئین PLCζ بین افراد بارور و نابارور. *نشانگر اختلاف معنی‌دار بین دو گروه در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد.

در این مطالعه، آسیب DNA اسپرم با استفاده از روش TUNEL در افراد بارور و نابارور بررسی گردید. نمودار ۳A-C بررسی آسیب DNA اسپرم را با استفاده از کیت TUNEL نشان می‌دهد. اسپرم‌هایی که دارای شکستگی تک‌رشته یا دو رشته هستند به رنگ سبز و اسپرم‌ها با DNA سالم به رنگ قرمز مشاهده می‌شوند. در هر نمونه اسپرمی حداقل ۵۰۰ اسپرم شمارش و میانگین درصد آسیب DNA اسپرم بین دو گروه بارور (۵/۵۶±۱/۲) و نابارور (۲۳/۰۰±۳/۷) مشخص‌کننده افزایش معنی‌دار آسیب DNA اسپرم در افراد نابارور می‌باشد (P=۰/۰۴).



نمودار ۳: بررسی آسیب DNA اسپرم با استفاده از روش TUNEL.

(A&B) نمایی از اسپرم‌ها با میکروسکوپ نوری و فلورسنت. رنگ سبز نشانگر آسیب DNA در اسپرم و رنگ قرمز نشانگر DNA سالم می‌باشد.

C) مقایسه درصد آسیب DNA اسپرم بین افراد بارور و نابارور. *نشانگر اختلاف معنی‌دار بین دو گروه در سطح P<۰/۰۱ می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

دو ویژگی مهم اسپرم پستانداران می‌تواند نقش تعیین‌کننده‌ای در باروری داشته باشد. یکی توانمند بودن اسپرم در رسیدن به جایگاه لقاح و نفوذ به داخل لایه‌های اطراف تخمک و دیگری کسب لقاح و مراحل اولیه تکوین که نه تنها توسط ژنوم پدری تعیین می‌شود، بلکه فاکتورهای تعیین‌کننده‌ای از اسپرم به داخل تخمک رهایش می‌یابد که در فعال شدن تخمک و تشکیل پیش هسته‌های نر و ماده نقش بسزایی دارد (۱۹). تاکنون فاکتورهای مختلفی پیشنهادشده است که در بین این فاکتورها، PLCζ به‌عنوان محتمل‌ترین فاکتور اسپرمی دخیل در فعال شدن تخمک شناخته شده است (۱۲). mRNA این فاکتور اسپرمی در ابتدا در اسپرماتیدهای کروی بیان می‌شود و احتمالاً در طی طویل‌شدن اسپرماتیدها، ترجمه و در طی تمایز اسپرم، در ناحیه خلف آکروزومی قرار می‌گیرد (۲۰،۲۱). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که با تزریق پروتئین نوترکیب PLCζ به داخل تخمک موش و انسان، نوسانات کلسیم آغاز و تشکیل پیش هسته‌ها و تکوین اولین جنین شروع می‌شود (۱۱،۱۳). با توجه به اهمیت این فاکتور اسپرمی در طی فرایند لقاح، در این مطالعه سعی بر آن شد که بیان PLCζ با استفاده از روش وسترن بلات در افراد نابارور که با عدم موفقیت در لقاح پس از ICSI مواجه بودند، بررسی شود. در مطالعات قبلی، PLCζ در گروه‌های مختلف ناباروران مورد بررسی قرار گرفته است. از جمله این مطالعات می‌توان به بررسی این فاکتور اسپرمی در سطح RNA و پروتئین در افراد نابارور گلبوزواسپرمی که سر اسپرم فاقد آکروزوم است، اشاره نمود. مشخص گردیده که یک علتی که افراد نابارور گلوبوزواسپرمی نمی‌توانند لقاح موفق را دنبال کنند، عدم یا کمبود این فاکتور اسپرمی می‌باشد لذا برای این افراد نیاز است که علاوه بر استفاده تکنیک درمانی ICSI، از طریق مصنوعی، تخمک‌ها فعال شوند (۲۵-۲۱). در مطالعه‌ای که آقاجان پور و همکاران (۲۰۱۱) در این راستا انجام دادند نشان دادند که mRNA فاکتور اسپرمی PLCζ در افراد نابارور کاندید ICSI که با کاهش یا عدم موفقیت لقاح مواجه بودند، کاهش یافته است (۲۴). RNA فاکتور اسپرمی PLCζ از جمله mRNAها ضروری است که در اسپرم باقی می‌ماند و با ورود به داخل تخمک ترجمه و عملکردی می‌شود (۲۶). اخیراً هم مطالعه‌ای توسط سانوسی و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد که با قرار دادن اسپرم‌ها در معرض دمای ۵۶ درجه، PLCζ غیرفعال گردید. سپس با اضافه شدن PLCζ نوترکیب، فعال شدن تخمک و تکوین بلاستوسیتی مجدداً آغاز شد. لذا دما می‌تواند بر روی فعالیت این فاکتور اسپرمی تأثیر داشته باشد (۲۲). در این راستا، اخیراً PLCζ در سطح RNA و پروتئین در افراد نابارور با واریکوسل بررسی شده است. در افراد نابارور واریکوسل، سطح دمای بیضه از دمای بدن بالا می‌باشد لذا فرایند اسپرماتوژنز تحت تأثیر قرار می‌گیرد و کیفیت پارامترهای اسپرمی کاهش می‌یابد. با توجه به اینکه بیان PLCζ در بیضه در طی فرایند اسپرمیوژنز رخ می‌دهد، مشخص گردید که سطح بیان RNA و پروتئین نسبت به افراد بارور به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است لذا پیشنهاد شده که شاید در برخی از افراد واریکوسل که سطح بیان PLCζ کاهش یافته است، عمل واریکوسکتومی به همراه استفاده از تکنیک‌های کمک باروری بیشتر مؤثر باشد (۲۷). در این مطالعه برای اولین بار بیان پروتئین PLCζ در ۱۰ فرد نابارور که پس از ICSI با کاهش یا عدم لقاح مواجه بودند، بررسی گردید. نتایج حاکی از آن است که در این افراد به‌طور معنی‌داری سطح بیان پروتئین PLCζ نسبت به گروه بارور کاهش داشته است. به‌علاوه پارامترهای اسپرمی نیز از جمله غلظت، تحرک، مورفولوژی اسپرم نیز در این افراد نابارور به‌طور معنی‌داری نسبت به افراد بارور کاهش یافته است. لذا در این گروه از افراد نابارور، احتمالاً روند اسپرماتوژنز یک سیر طبیعی خود را نداشته و علاوه بر آنکه کیفیت پارامترهای اسپرمی تحت تأثیر بوده است، بر روی بیان برخی پروتئین‌ها از جمله بیان PLCζ که نقش تعیین‌کننده در لقاح دارد، تأثیر گذاشته است. این نتایج با برخی از گروه‌های نابارور از جمله افراد نابارور با واریکوسل و افراد گلوبوزواسپرمی که تاکنون بررسی شده‌اند، تطابق دارد. لذا نتایج این مطالعه پیشنهادکننده این است که

Archive of SID
www.SID.ir

فقط نباید AOA برای افرادی که تراتوزواسپرمی، یا افرادی که قبلاً چندین بار شکست در لقاح پس از ICSI را داشته‌اند، انجام گردد. بلکه بهتر است برای گروه‌های مختلف ناباروران، تست ارزیابی PLCζ در ابتدا به‌عنوان یک بیومارکر پیشگوکننده کیفیت مایع منی در راستای توانایی فعال شدن تخمک انجام شود و سپس در رابطه با استفاده از کدام تکنیک درمان کمک باروری، تصمیم گرفته شود. تعداد افرادی که پروتئین PLCζ آن‌ها در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است، کم بوده و جهت کاربردی شده این نتایج لازم است که در آینده از تعداد افراد نابارور بیشتری که قبلاً با شکست در لقاح در طی فرآیند ICSI مواجه بوده‌اند، استفاده گردد.

با توجه به اهمیت سلامت ژنوم پدری در سرنوشت جنینی، میزان آسیب DNA اسپرم نیز در این مطالعه بررسی گردید که نتایج بیانگر افزایش میزان آسیب DNA اسپرم در این گروه از افراد نابارور نسبت به افراد بارور می‌باشد. لذا این امکان وجود دارد که عدم لقاح در برخی از گروه‌های ناباروران چندفاکتوره باشد که با توجه به اهمیت ژنوم پدری، در صورتی که آسیب DNA بسیار زیاد باشد، بهتر است جهت استفاده از تکنیک ICSI، از روش‌های نوین آماده‌سازی اسپرم از جمله روش زتا که اسپرم‌ها بر اساس بار سطحی جدا می‌شوند و تائید شده (۱۸) که نسبت به روش‌های معمولی از جمله روش سانتریفیوژ در شیب غلظت Density gradient centrifugation (DGC) می‌تواند اسپرم‌ها با DNA سالم‌تری را جداسازی نماید، استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

از نتایج این مطالعه این‌گونه می‌توان استنباط کرد که افرادی که با کاهش یا عدم موفقیت در لقاح پس از ICSI مواجه هستند احتمالاً نقص در بیان فاکتور اسپرمی PLCζ دارند. لذا با ارزیابی اولیه PLCζ در مایع منی به عنوان یک بیومارکر پیشگوکننده قدرت فعال‌سازی تخمک، می‌توان در صورت کمبود و یا عدم آن، از روش فعال‌سازی مصنوعی تخمک جهت کسب لقاح و حاملگی رضایت‌بخش برای این ناباروران استفاده نمود. با توجه به اینکه سطح آسیب DNA اسپرم در این افراد نیز بالا بوده، می‌توان از روش‌های نوین آماده‌سازی اسپرم از جمله زتا استفاده نمود.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از کارکنان محترم پژوهشکده زیست‌فناوری و مسئولان گرامی پژوهشگاه رویان ابراز می‌دارند.

References:

1- World Health Organization. ***WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.*** Cambridge: Cambridge University Press, 2010.

2- ESHRE, ART fact sheet. [Internet] http://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/ ART-fact-sheet.aspx 2014, date last accessed.

3- Chandra A, Copen CE, Stephen EH. ***Infertility service use in the United States: data from the National Survey of Family Growth, 1982-2010***. Natl Health Stat Report 2014; 22 (73): 1-21.

4- Allen C, Reardon W. ***Assisted reproduction technology and defects of genomic imprinting.*** BJOG 2005; 112(12): 1589-94.

5- Barroso G, Valdespin C, Vega E, Kershenovich R, Avila R, Avendaño C, et al. ***Developmental sperm contributions: fertilization and beyond.*** Fertil Steril 2009; 92(3): 835-48.

Archive of SID
www.SID.ir

6- Beck-Fruchter R, Lavee M, Weiss A, Geslevich Y, Shalev E. ***Rescue intracytoplasmic sperm injection: a systematic review.*** Fertil Steril 2014; 101(3): 690-8.

7- Swain JE, Pool TB. ***ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization.*** Hum Reprod Update 2008; 14(5): 431-46.

8- Yanagida K, Fujikura Y, Katayose H. ***The present status of artificial oocyte activation in assisted reproductive technology.*** Reprod Med Biol 2008; 7(3): 133–142.

9- Vanden Meerschaut F, Nikiforaki D, Heindryckx B, De Sutter P. ***Assisted oocyte activation following ICSI fertilization failure.*** Reprod Biomed Online 2014; 28(5): 560-71.

10- Kashir J, Heindryckx B, Jones C, De Sutter P, Parrington J, Coward K. ***Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility.*** Hum Reprod Update 2010; 16(6): 690-703.

11- Amdani SN, Yeste M, Jones C, Coward K. ***Sperm Factors and Oocyte Activation: Current Controversies and Considerations.*** Biol Reprod 2015; 93(2): 50.

12- Amdani SN, Yeste M, Jones C, Coward K. ***Phospholipase C zeta (PLCζ) and male infertility: Clinical update and topical developments.*** Adv Biol Regul 2016; 61 :58-67.

13- Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR, Tavalaee M. ***Artificial oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection.*** Fertil Steril 2010; 94(2): 520-6.

14- Aydinuraz B, Dirican EK, Olgan S, Aksunger O, Erturk OK. ***Artificial oocyte activation after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: A prospective randomized sibling oocyte study.*** Hum Fertil (Camb) 2016; 19(4): 282-288.

15- Deemeh MR, Tavalaee M, Nasr-Esfahani MH. ***Health of children born through artificial oocyte activation: a pilot study.*** Reprod Sci 2015; 22(3): 322-8.

16- Montag M, Köster M, van der Ven K, Bohlen U, van der Ven H. ***The benefit of artificial oocyte activation is dependent on the fertilization rate in a previous treatment cycle.*** Reprod Biomed Online 2012; 24(5): 521-6.

17- Tavalaee M, Nasr-Esfahani MH. ***Expression profile of PLCζ, PAWP, and TR-KIT in association with fertilization potential, embryo development, and pregnancy outcomes in globozoospermic candidates for intra-cytoplasmic sperm injection and artificial oocyte activation.*** Andrology 2016; 4(5):850-6.

18- Kheirollahi-Kouhestani M, Razavi S, Tavalaee M, Deemeh MR, Mardani M, Moshtaghian J, et al. ***Selection of sperm based on combined density gradient and Zeta method may improve ICSI outcome.*** Hum Reprod 2009; 24(10): 2409-16.

19- Li S, Winuthayanon W. ***Oviduct: roles in fertilization and early embryo development.*** J Endocrinol 2017; 232(1): R1-R26.

Archive of SID
www.SID.ir

20- Aarabi M, Yu Y, Xu W, Tse MY, Pang SC, Yi YJ, et al. ***The testicular and epididymal expression profile of PLCζ in mouse and human does not support its role as a sperm-borne oocyte activating factor.*** PLoS One 2012; 7(3):e33496.

21- Heytens E, Schmitt-John T, Moser JM, Jensen NM, Soleimani R, Young C, et al. ***Reduced fertilization after ICSI and abnormal phospholipase C zeta presence in spermatozoa from the wobbler mouse.*** Reprod Biomed Online 2010; 21(6):742-9.

22- Sanusi R, Yu Y, Nomikos M, Lai FA, Swann K. ***Rescue of failed oocyte activation after ICSI in a mouse model of male factor infertility by recombinant phospholipase Cζ.*** Mol Hum Reprod 2015; 21(10): 783-91.

23- Kamali-Dolat Abadi M, Tavalaee M, Shahverdi A, Nasr-Esfahani MH. **Evaluation of PLCζ and PAWP Expression in Globozoospermic Individuals.** Cell J 2016; 18(3):438-45.

24- Aghajanpour S, Ghaedi K, Salamian A, Deemeh MR, Tavalaee M, Moshtaghian J, et al. ***Quantitative expression of phospholipase C zeta, as an index to assess fertilization potential of a semen sample.*** Hum Reprod 2011; 26(11): 2950-6.

25- Escoffier J, Yassine S, Lee HC, Martinez G, Delaroche J, Coutton C, et al. ***Subcellular localization of phospholipase Cζ in human sperm and its absence in DPY19L2-deficient sperm are consistent with its role in oocyte activation.*** Mol Hum Reprod 2015; 21(2): 157-68.

26- Lambard S, Galeraud-Denis I, Martin G, Levy R, Chocat A, Carreau S. ***Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation.*** Mol Hum Reprod 2004; 10(7): 535-41.

27- Janghorban-Laricheh E, Ghazavi-Khorasgani N, Tavalaee M, Zohrabi D, Abbasi H, Nasr-Esfahani MH. ***An association between sperm PLCζ levels and varicocele?*** J Assist Reprod Genet 2016; 33(12): 1649-55.

Archive of SID

www.SID.ir

Comparison of sperm PLCζ protein and DNA damage between fertile and infertile men

Marziyeh Tavalaee [1*], Maryam Arbabian [2], Mohammad Hossein Nasr- Esfahani [3]

[1,2,3] Department of Reproductive Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran

Tavalaee.m@royaninstitute.org

Received: 4 Feb 2017 **Accepted:** 18 May 2017

Abstract

Introduction: Sperm-specific phospholipase C zeta (PLCζ) protein is expressed during spermatogenesis and plays a main role during oocyte activation. In this study, the expression of sperm PLCζ protein and DNA damage in fertile and infertile men was assessed.

Methods: In this case-control study, semen samples were collected from 15 fertile and 10 infertile men candidated for intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI). Sperm parameters, the expression of PLCζ protein, and DNA damage were assessed by the World Health Organization (2010) protocol, Western Blot, and TUNEL assay, respectively.

Results: The quality of sperm parameters were significantly lower in the infertile men compared with the fertile men. In addition, the expression of PLCζ protein was significantly lower, and percentage of sperm DNA damage were significantly higher in infertile men than fertile men.

Conclusion: Our results clearly showed that low or absence expression of PLCζ and sperm DNA damage could be considered as factors involved in failed fertilization in these infertile men. Therefore, the evaluation of some tests such as PLCζ protein and chromatin tests to assess fertilization potential of a semen sample for infertile men are recommended.

Keywords: PLCζ; ICSI; DNA damage; Sperm parameters

Archive of SID

This paper should be cited as:

Tavalaee M, Arbabian M, Nasr- Esfahani MH. **Comparison of sperm PLCζ protein and DNA damage between fertile and infertile men.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(7): 572-584.

***Corresponding author: Tel: +98 31 95015682, email: Tavalaee.m@royaninstitute.org**

www.SID.ir