مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۱، شماره‌ی ۸۵ خرداد و تیر ۱۳۹۲، صفحات ۳۰ تا ۳۹

بررسی ارتباط بین کمبود پروتامین و آزاد شدن قطعات DNA از اسپرم‌های نگهداری شده در محیط مصرفی Ham's F۱۰

دکتر محمد صالحی[۱]، مژده قلی زاده[۲]، صدیقه نعمت الهی[۳]، دکتر مژگان بنده پور[٤]، دکتر بهرام کاظمی دمنه[٥]، دکتر احمد حسینی[٦]

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده‌ی پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی m.salehi@sbmu.ac.ir

دریافت: ۹۱/۵/۱۱ پذیرش: ۹۱/۱۱/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: *کمبود پروتامین و آسیب DNA بر میزان بیان ژن‌ها در دوره‌ی جنینی اثر مهمی دارد. نگهداری اسپرم در محیط کشت موجب تغییرات مورفولوژیک هسته و آزاد شدن DNA می‌گردد. با وجود این، ارتباط بین کمبود پروتامین و میزان آزاد سازی قطعات DNA از اسپرم‌های نگهداری شده در محیط کشت و حضور ژن DNMT۱ در این قطعات مشخص نمی‌باشد.*

روش بررسی: *آنالیز مایع سیمن طبق معیار WHO انجام شد. جهت تعیین کمبود پروتامین از رنگ‌آمیزی CMA۳ استفاده گردید. ۲۰ میلیون اسپرم از هر نمونه در محیط مصرفی Ham's F۱۰ به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از سانتریفوژ کردن، از فاز سوپرناتانت استخراج DNA صورت گرفت. غلظت DNA توسط بیوفوتومتر تعیین گردید. حضور ژن DNMT۱ توسط انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی و الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز تایید شد.*

یافته‌ها: *بین میزان قطعات DNA آزاد شده از اسپرم در محیط کشت و رنگ آمیزی CMA۳ ارتباط مستقیم و معنی‌داری مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$). بین میزان قطعات DNA آزاد شده از اسپرم در محیط کشت و حضور ژن DNMT۱ ارتباط مستقیم و معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۵$). ارتباط معنی‌داری بین کمبود پروتامین و حضور ژن DNMT۱ در قطعات آزاد شده از اسپرم مشاهده نشد.*

نتیجه گیری: *مطالعه‌ی حاضر بیانگر این امر است که انکوباسیون اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین منجر به آزاد شدن قطعات بیشتری از DNA اسپرم می‌گردد که در نهایت سلامت جنین‌های حاصل از این اسپرم‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد.*

واژگان کلیدی: پروتامین، کروماتین اسپرم، قطعات DNA

مقدمه

اسپرماتوژنز پستانداران فرآیند بی‌همتا و پیچیده‌ای است که شامل تغییرات ساختمانی، بیوشیمیایی و مورفولوژیکی می‌شود. اسپرمیوژنز در طول مرحله‌ی پایانی از اسپرماتوژنز اتفاق می‌افتد و در طی آن شکل و اندازه‌ی هسته و ترکیب

۱- دکترای تخصصی جنین شناسی، استادیار مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران
۳- کارشناس ارشد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته، تهران
٤- دکترای تخصصی بیوتکنولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
٥- دکترای تخصصی بیوتکنولوژی، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
٦- دکترای تخصصی جنین شناسی، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

Archive of SID
www.SID.ir

کروماتین تغییر نموده به‌صورتی‌که ۸۵ درصد از هیستون‌های سلول‌های میوتیک توسط نوکلئوپروتئین‌های ویژه‌ی اسپرم با نام پروتامین‌ها جایگزین می‌شوند. پروتامین‌ها غنی از اسیدآمینه‌های آرژنین و سیستئین می‌باشند و از لحاظ اندازه‌ی نصف هیستون‌ها بوده، در انسان دو خانواده‌ی پروتامین P۱ و P۲ وجود دارد (۳-۱). کروماتین اسپرم در طی انتقال از اپیدیدیم به‌واسطه‌ی تشکیل اتصالات دی سولفیدی و پل‌های روی (Zinc) در میان پروتامین‌ها به‌شدت فشرده می‌گردد (۵و ٤). این طبیعت فشرده و سازمان یافته‌ی کروماتین اسپرم سبب حفاظت از سلامت ژنوم در طی انتقال از جنس نر و رسیدن به تخمک می‌گردد (۷و ٦).

سلامت کروماتین اسپرم به‌عنوان فاکتور مهمی در باروری مردان و به‌ویژه نمو اولیه‌ی جنین مورد توجه است (۸و ۷). مجموعه‌ای از شواهد وجود دارد که نقش مهم سلامت کروماتین اسپرم را نه تنها در لقاح بلکه در نمو طبیعی جنین حمایت می‌کنند. تصور بر این است که تغییرات در معماری ویژه‌ی کروماتین اسپرم بر آغاز شدن و تنظیم بیان پدری ژن‌ها در جنین اولیه تاثیر گذار است. در احشام، جوندگان و انسان‌ها آسیب کروماتین اسپرم با ناهنجاری در الگوهای تراکم‌زدایی کروماتین و یا وقفه‌ی طولانی در آغاز تشکیل پیش هسته‌های نر و ماده بعد از لقاح مرتبط می‌باشد (۱۰و ۹، ٦). بر اساس تحقیقات حذف پروتئین‌های اسپرم در عدم موفقیت تشکیل تخم موثر می‌باشد. آسیب DNA اسپرم در سطوح بیضه‌ای، اپی دیدیمال و یا پس از انزال رخ می‌دهد و دارای دو منشا داخلی و خارجی می‌باشد (۱۱). منشا آسیب‌های DNA ی اسپرم پیچیده بوده اما به طور کلی این آسیب‌ها به واسطه‌ی چهار منشا اصلی نقص در فرآیند بسته‌بندی کروماتین، آسیب اکسیداتیو، آپپتوز و سموم و عوامل محیطی ایجاد می‌شود (۱۳). همچنین وجود نقص در نسبت هیستون به پروتامین باعث نقص در تراکم کروماتین اسپرم شده که این امر مستعد شدن DNA ی اسپرم در مقابل آسیب‌های خارجی را به‌دنبال دارد (۱۵-۱۲). کروموماپسین A۳ (CMA۳) فلوروکرومی می‌باشد که در اتصال به CG در شیار کوچک DNA با پروتامین‌ها رقابت می‌کند و پس از اتصال به DNA از خود نور فلورسنس می‌دهد و در نتیجه معرفی از میزان پروتامینه شدن اسپرم می‌باشد و به‌عنوان شاخصی جهت ارزیابی کیفیت اسپرم و تعیین ظرفیت لقاح مورد استفاده قرار گرفته است (۱۷و ۱٦).

استفاده‌ی گسترده از روش‌های کمک باروری شرایط مساعدی را فراهم می‌آورد تا برخی از زوج‌های نابارور صاحب فرزند شوند. نگرانی‌هایی در مورد استفاده از این روش‌ها وجود دارد که برخاسته از گزارشاتی می‌باشد که حاکی از افزایش نقایص مادرزادی، ناهنجاری‌های کروموزومی و مشکلات نموی در کودکان حاصل از این روش‌ها می‌باشد (۲۰-۱۸). چندین گزارش وجود دارد که استفاده از روش‌های کمک باروری می‌تواند سبب افزایش خطر بیماری‌های مرتبط با ناهنجاری‌های فرآیند Genomic Imprinting گردد (۲۰). Imprinting نوعی مکانیسم تنظیم ژن می‌باشد که سبب بیان ژن فقط از یک الل (پدری یا مادری) می‌شود، که این امر به واسطه‌ی فرآیندهای اپی ژنتیکی از جمله متیلاسیون DNA انجام می‌گردد. بسیاری از ژن‌های Imprinted در جفت و جنین فعال بوده و نقش کلیدی را درنمو جنین بر عهده دارند (۲۱). مطالعات نشان داده که غلظت مناسبی از آنزیم DNA متیل ترانسفراز نوع یک (DNMT۱) برای نگهداری الگوهای متیلاسیون ژن‌های Imprinted در طول نمو اولیه‌ی جنین ضروری بوده، فقدان این آنزیم و یا بیان بیش از حد آن برای جنین کشنده می‌باشد (۲۱).

در برخی از روش‌های کمک باروری گاهی آزمایشگاه‌ها مجبور به انکوباسیون سلول‌های اسپرم در دمای فیزیولوژیک ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت طولانی (حداقل ۲٤ ساعت) می‌باشند. مطالعات اخیر بیان می‌دارد که انکوباسیون اسپرم به‌مدت دو ساعت و بیشتر در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد

Archive of SID
www.SID.ir

سبب تغییرات مورفولوژیک در هسته‌ی اسپرم می‌شود. مشخص شده است که قرار گیری اسپرم در محیط‌های مصرفی موجب تغییراتی در یکپارچگی DNA و آزاد شدن قطعات DNA در محیط مصرفی می‌گردد (۲۳و ۳۲).

با توجه به نقش پروتامین‌ها در بسته بندی DNA و تاثیر آسیب‌های DNA بر میزان بیان ژن‌ها در دوره‌ی جنینی، هدف این مطالعه بررسی ارتباط بین کمبود پروتامین و میزان آزاد سازی قطعات DNA از اسپرم‌های نگهداری شده در محیط مصرفی HamsF۱۰ و حضور ژن DNMT۱ در این قطعات بود.

روش بررسی

این مطالعه بر روی ۵۰ بیمار نابارور که دارای ناباروری با علت مردانه بودند و به مرکز باروری و ناباروری بیمارستان عرفان مراجعه کرده بودند، انجام گرفت. متوسط سن افراد ۵/۷۲±۳۶/۶۱ سال بود. جهت انجام مطالعه از مقادیر اضافه منی (سیمن) افراد مراجعه کننده استفاده شد. در ابتدا آنالیز مایع منی (سیمن) (غلظت، مورفولوژی، تحرک و تعداد سلول‌های اسپرم) بر اساس معیار WHO انجام شد. پس از دو بار شستشوی منی (سیمن) با محیط Ham's F۱۰ (Sigma) حاوی سرم آلبومین انسانی (۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه) از اسپرم‌های شسته شده جهت رنگ آمیزی CMA۳ (Sigma) و بررسی میزان آزادسازی قطعات DNA استفاده گردید.

ارزیابی کمبود پروتامین (رنگ آمیزی کروموماپسین A۳): پس از ۳ بار شستشوی منی (سیمن) با PBS (۳۰۰۰ rpm به‌مدت ۵ دقیقه) از اسپرم‌های شسته شده جهت رنگ آمیزی CMA۳ استفاده شد. به اسپرم‌های شسته شده حجم مساوی از محلول فیکساتیو کارنوی (متانول و اسید استیک به نسبت ۳ به ۱) اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در حرارت ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از تهیه‌ی اسمیر از نمونه هر اسلاید با۱۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۲۵ درصد CMA۳ در بافر مک الوین با pH ۷ به‌مدت ۲۰ دقیقه در محیط تاریک رنگ‌آمیزی شد. سپس اسلایدها با PBS شستشو داده شد و با لامل مونت گردید. با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس (Japan- Nikon- Eclipse٦۰۰) با فیلتر مناسب ٤٦۰ تا ٤۷۰ نانومتر و بزرگنمایی۱۰۰تعداد ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید بررسی گردید و درصد اسپرم‌های درخشان (مثبت CMA۳) و اسپرم‌های فاقد درخشندگی (CMA۳ منفی) محاسبه گردید (۷).

روش انکوبه سازی اسپرم: تعداد ۲۰ میلیون اسپرم از هر نمونه با مقدار۱/۵ میلی‌لیتر محیط Ham's F۱۰ حاوی سرم آلبومین انسانی در انکوباتور در شرایط مرطوب با ۵ ٪ Co۲، ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۲٤ ساعت قرارداده شد (۲۳).

روش استخراج DNA از محیط مصرفی: جهت استخراج DNA از روش Lamond استفاده گردید (۲۳) به‌طور خلاصه، پس از ۲٤ ساعت نمونه‌ها از انکوباتور خارج و برای تشکیل دو فاز به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. فاز رویی (S) به میکروتیوب اپندرف جدید منتقل شده و سانتریفوژ مجدد جهت خارج سازی سلول‌های احتمالی انجام گرفت. فاز رسوب یافته از سانتریفوژ اول (P) با ۳۰۰ میکرولیتر از بافر تخلیص اول Tris-HCL ۱۰mM, ۵mM Sucrose, ۵mM MgCl۲, ۱٪ Triton X-۱۰۰, pH۸ مخلوط شده و ورتکس گردید. سپس به‌مدت ۲ دقیقه در ۸۰۰۰ دور سانتریفوژ انجام شد. به رسوب ایجاد شده بافر تخلیص دوم ٤۰۰mM Tris- HCL, ٦۰mM EDTA, ۱۵۰mM NaCl, ۱٪SDS, ۵mM DTT, pH۸ افزوده شد و سپس به‌مدت ۱ تا ۲ ساعت در دمای ۵۵ تا٦۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. استخراج DNA از سلول‌های لیز شده (P) و همچنین از فاز رویی (S) که قبلا به‌دست آمده بود به یک روش و به روش فنل – کلروفرم انجام گرفت. جهت شستشو و تخلیص DNA ی استخراج شده از الکل

Archive of SID

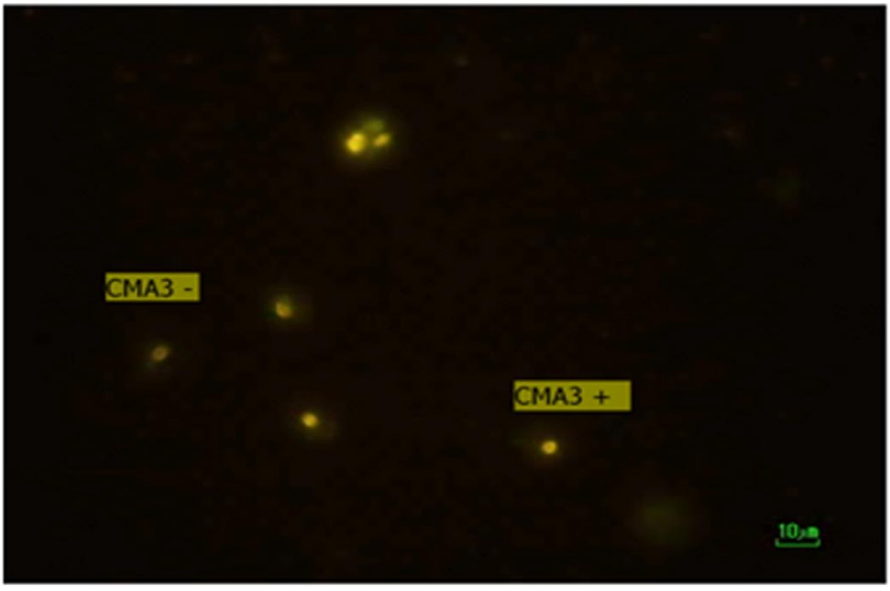
www.SID.ir

۷۰ درصد استفاده گردید. DNA در دمای محیط خشک گردید و سپس در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره شد. به DNA های استخراج شده از فاز P و S به‌طور جداگانه ۱۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و OD آن‌ها توسط دستگاه بیوفوتومتر در ۲۶۰و ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر سنجیده شد.

بررسی حضور ژن DNMT۱ در قطعات DNA استخراج شده از فاز S: جهت تکثیر ژن DNMT۱ موجود در قطعات DNA آزاد شده از روش PCR استفاده گردید. با استفاده از پرایمرهای F:-TTA-CAA-GGA-AAA-GCA-۵´-۳´- CCG و R: -TCT-CTG-GAT-GTA-ACT-۵´-۳´- CTA واکنش، PCR برای هر نمونه در ترموسایکلر ساخت شرکت پریموس انجام گرفت. محصولات PCR انجام شده سبب تکثیر ژن DNMT۱ موجود در قطعات آزاد شده از اسپرم در نمونه‌ها گردید. همچنین جهت اطمینان از صحت طول قطعه‌ی تکثیر شده از مارکر مناسب (۱۰ Kb) استفاده گردید. الکتروفورز ژل با ولتاژ ۵۰ ولت و ۴۰ میلی‌آمپر انجام شد. ژل را از تانک خارج کرده و با استفاده از نور UV و دستگاه Transilluminator، باند مورد نظر ردیابی گردید. ارتباط بین پارامترها با استفاده از آنالیزهای آماری ضریب همبستگی بررسی گردید. P-Value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

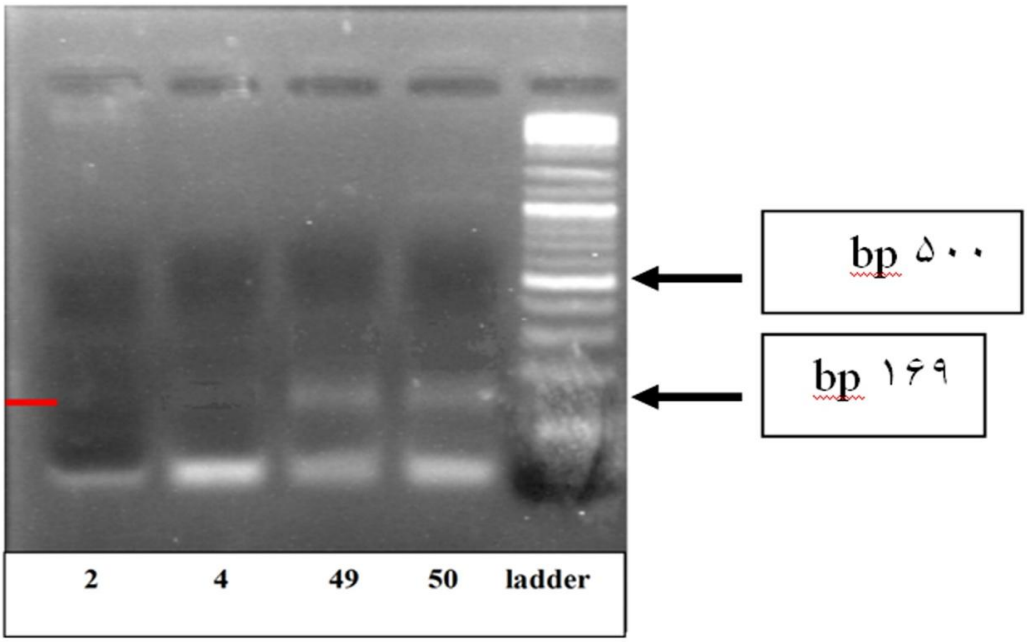
یافته ها

جهت تشخیص کمبود پروتامین از رنگ CMA۳ استفاده گردید. میزان کمبود پروتامین در جمعیت مورد مطالعه ۱۱/۱۱ ±۲۸/۲۶ درصد بود. در شکل ۱ اسپرم‌های کروموما‌یسین A۳ مثبت (دارای کمبود پروتامین) به‌صورت درخشان و اسپرم‌های کروموما‌یسین A۳ منفی به صورت غیردرخشان مشخص شده است. شکل شماره ۲ الکتروفورز محصولات PCR نمونه‌های شماره ۲، ٤، ٤٩ و ۵۰ (به‌ترتیب از چپ به راست) بر روی ژل آگارز می‌باشد، که نشان دهنده‌ی حضور یا عدم حضور ژن DNMT۱ در قطعات DNA آزاد شده از سلول‌های اسپرم در محیط Ham'sF۱۰ می‌باشد. قطعه‌ی تکثیر شده ۱۶۹ bp می‌باشد. نمونه‌های شماره ۲ و ٤ فاقد ژن مورد نظر می‌باشند.

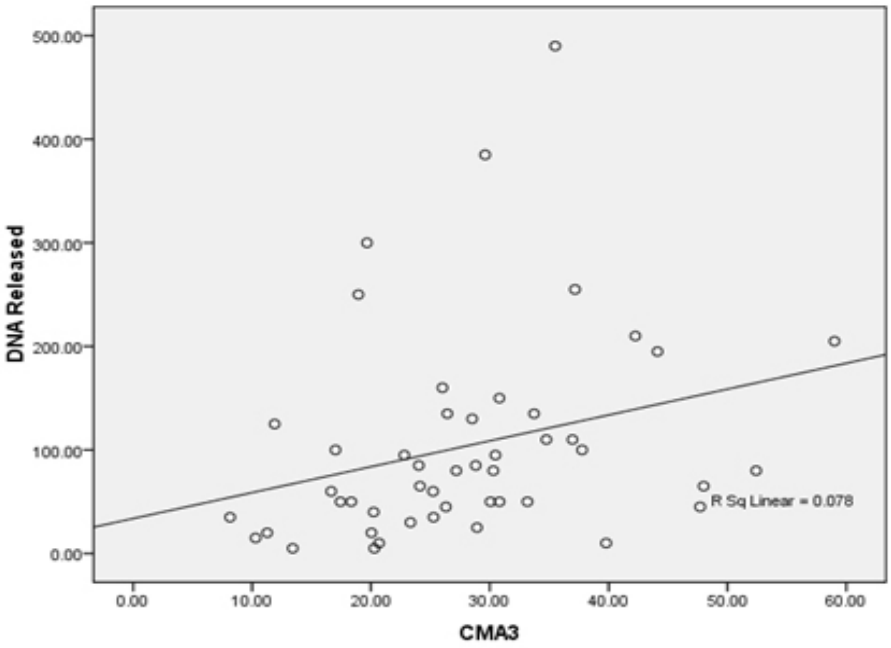


شکل ۱: نمای میکروسکوپی رنگ آمیزی کروموما‌یسین A۳. اسپرم‌های درخشان +CMA۳

www.SID.ir
Archive of SID



شکل۲: بررسی حضور ژن DNMT۱ توسط الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز. قطعه‌ی تولید شده ۱۶۹ bp می‌باشد. نمونه‌های شماره ۲و ٤ به ترتیب از سمت چپ فاقد این ژن و نمونه‌های ٤۹ و ۵۰ دارای این ژن در قطعات DNA آزاد شده از اسپرم می‌باشند.



نمودار ۱: ارتباط بین میزان قطعات DNA آزاد شده از اسپرم در محیط کشت و رنگ آمیزی CMA۳ کمبود پروتامین (P<۰/۰۵ و r=۰/۲۸)

www.SID.ir

با توجه به نمودار ۱ بین کمبود پروتامین و میزان قطعات DNA آزاد شده از اسپرم در محیط کشت (موجود در فاز S) ارتباط مستقیم و معنی داری مشاهده گردید (P<۰/۰۵ و r=۰/۲۸). بین میزان قطعات DNA آزاد شده از سلول‌های اسپرم در محیط کشت و حضور ژن DNMT۱ ارتباط مستقیم و معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۰۲ و r=۰/٤۲٤). ارتباط مستقیمی بین کمبود پروتامین و حضور ژن DNMT۱ وجود دارد که این ارتباط معنی‌دار نمی‌باشد (P<۰/۱۵۲ و r=۰/۲۰۸).

بحث

امروزه استفاده از روش‌های کمک باروری یکی از موثرترین روش‌ها برای رفع مشکلات زوج‌های نابارور است. میزان موفقیت این روش‌ها به عوامل متعددی بستگی دارد که در این میان سلامت ژنوم پدری در میزان باروری زوج‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است (۲۵و ۲٤، ۱۰). در روند چرخه‌های لقاح مصنوعی در طی تحریک تخمک گذاری تا ۳۰ درصد از اووسیت‌های به‌دست آمده به‌صورت نابالغ می‌باشند که در محیط کشت و در شرایط آزمایشگاهی به بلوغ می‌رسند (۲٦). از این‌رو بسیاری از آزمایشگاه‌ها فرآیند لقاح اووسیت‌های نارس را یک روز به تاخیر می‌اندازند تا اووسیت‌ها بالغ شوند و به همین سبب مجبور به استفاده از اسپرم‌هایی می‌گردند که یک روز قبل به‌دست آمده و در محیط کشت و شرایط فیزیولوژیکی ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شده‌اند. گزارشات اخیر بیان می‌دارد که انکوباسیون اسپرم به مدت دو ساعت و بیشتر در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد سبب تغییرات مورفولوژیکی در هسته‌ی اسپرم به‌واسطه‌ی ظهور واکوئل‌های هسته‌ای بزرگ می‌گردد. اگرچه انکوباسیون طولانی اسپرم انسان در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند سبب افزایش فرگمانتاسیون هسته‌ای و تغییر ساختار کروماتین شود (۲۷و ۲۲) اما هنوز گزارشی مبنی بر اثرات کمبود پروتامین بر میزان آزاد شدن قطعات DNA گزارش نشده است. در تحقیق حاضر همبستگی بین پارامترهای میزان کمبود پروتامین و غلظت DNA ی آزاد شده از اسپرم‌ها در طول انکوباسیون ۲٤ ساعته در محیط مورد بررسی قرار گرفت که نتایج بیان‌گر ارتباط مستقیم و معنی‌داری بین کمبود پروتامین و میزان قطعات DNA ی آزاد شده از اسپرم بود. تحقیقات بیان می‌دارد که سلول‌های جنسی نر به دلیل فقدان سیستم‌های ترمیمی و آنتی‌اکسیدانت‌ها در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو حساس‌تر می‌باشند. بنابراین جداسازی سلول‌های اسپرم از مایع سمینال و کشت طولانی مدت سبب شتاب یافتن آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود (۲۲). در برخی از تحقیقات گزارش شده است که قرار گیری اسپرم در محیط‌های مصرفی موجب تغییراتی در یکپارچگی DNA و آزادشدن قطعات DNA در محیط مصرفی می‌شود. اگرچه منابع زیادی از جمله لکوسیت‌ها، اسپرم‌های ناهنجار، فلزات قابل انتقال موجود در محیط کشت آزمایشگاهی و هم چنین تکنیک‌های مورد استفاده در درمان ناباروری برای آسیب رساندن به DNA در این روش‌ها وجود دارد اما به نظر می‌آید که آزاد شدن قطعات DNA به علت فعالیت نوکلئازهای درونی است که DNA را در توالی‌های مخصوصی برش داده، باعث آزاد شدن قطعات بریده شده می‌گردد. از آنجایی که قرارگیری اسپرم در محیط‌های مصرفی فوق باعث فعالیت بیش از اندازه‌ی میتوکندری و تغییراتی در نفوذپذیری غشاهای اسپرم می‌شود، قطعات بریده شده‌ی DNA می‌توانند از این غشاها عبور نموده، وارد محیط مصرفی گردند. آزاد شدن قطعات DNA در طی ۲٤ ساعت اول قرار گیری در محیط مصرفی صورت می‌گیرد که حداکثر میزان آزادسازی قطعات در حدود ۳ تا ۸ ساعت اولیه می‌باشد. پس از گذشت ۲٤ ساعت اول، قطعات بیشتری آزاد

Archive of SID

www.SID.ir

نمی‌گردد بلکه قطعات آزاد شده‌ی قبلی که در محیط مصرفی حضور دارند، دچار شکستگی بیشتر می‌شوند. DNA های استخراج شده از سلول‌های انکوبه شده نیز شکستگی‌های دو رشته‌ای DNA را در طی ۲۴ ساعت اولیه از خود نشان دادند (۲۷و ۲۳). بر اساس گزارش Lamond و همکارانش ارتباط مثبتی بین القای شکستگی رشته‌های DNA و آزادسازی DNA دیده می‌شود، که این امر نشان می‌دهد که علاوه بر آسیب ژنتیکی، پایداری غشای هسته در افزایش زمان انکوباسیون تغییر می‌کند (۲۷و ۲۳). جی‌بی‌سی و همکارانش در سال ۲۰۱۱ با استفاده از رنگ تولوئیدن بلو نشان دادند که آسیب DNA در طول انکوباسیون ۱۸ ساعته در دمای اتاق رخ می‌دهد (۲۲). در مطالعه‌ی حاضر مشخص گردید که در صورتی‌که اسپرم‌ها دچار کمبود پروتامین باشند، میزان این آزاد شدن زیادتر خواهد بود. دلیل این امر می‌تواند به ماهیت پروتامین‌ها در تراکم کروماتین اسپرم باشد، به‌طوری‌که اگر میزان پروتامین کاهش یافته باشد از تراکم کروماتین کاسته شده و نوکلئازهای درونی محل‌های برش بیشتری خواهند داشت و بالطبع میزان آزاد شدن قطعات DNA در محیط مصرفی زیادتر از اسپرم‌های نرمال خواهد بود.

ماهیت رشته‌های DNA آزاد شده تا حدودی مشخص شده است و در تحقیق Lamond آورده شده است (۲۳). یکی از این ژن‌ها، ژن آنزیم DNA متیل ترنسفراز یک است. در تحقیق حاضر بر اساس اطلاعات به دست آمده، ارتباط مستقیم و معنی‌داری بین میزان قطعات DNA آزاد شده از سلول‌های اسپرم در محیط کشت و حضور ژن DNMT۱ در این قطعات مشاهده شد. البته ارتباط مستقیمی نیز بین کمبود پروتامین و حضور ژن DNMT۱ وجود دارد که آزمون آماری این اختلاف را معنی‌دار نشان نمی‌دهد. متیلاسیون DNA به فعالیت خانواده‌ای از آنزیم‌ها به نام DNA متیل ترنسفرازها نیاز دارد که انتقال گروه متیل را از S-Adenosyl-Methionine به موقعیت سیتوزین در DNA کاتالیز می‌نمایند. از جمله این آنزیم‌ها می‌توان به DNMT۱ اشاره کرد (۲۸). فرآیند اپی‌ژنتیکی متیلاسیون DNA نقش مهمی را در طی نمو پستانداران از جمله انسان ایفا می‌کند و در مراحل گوناگون از جمله Genomic Imprinting و بیان متفاوت ژن حضوری موثر دارد. در طول نمو جنین قبل از لانه گزینی، سطح کلی متیلاسیون کاهش می‌یابد و بیش از نیمی از متیلاسیون موجود در DNA کروموزوم‌های با منشا پدری، در مراحل مورولا حذف شده، این حالت در طول بلاستولا باقی می‌ماند و سپس در مراحل بعدی این متیلاسیون می‌تواند دوباره بر اساس منشا پدری باز نشانده شود (۱۸). مطالعات نشان دهنده‌ی این امر است که نقص در DNMT۱ سبب کاهش متیله شدن CpG و افزایش بیان سراسری ژن، افزایش نوترکیبی‌های میتوزی، حذف کروموزومی و بیان ژن‌های خاموش و وارد شدن DNA ی رتروویروسی به درون ژنوم می‌شود (۱۸). در طی چندین تحقیق تاثیر استفاده از روش‌های کمک باروری بر روی متیلاسیون DNA در گامت‌های انسان و کودکان حاصل از این روش‌ها بررسی شده است. گزارشاتی مبنی بر ایجاد ناهنجاری‌های اپی ژنتیکی مانند Beckwith-Wiedemann Syndrom و Prader-Willi and Angelman Syndrom در کودکان حاصل از لقاح مصنوعی در مقایسه با کودکانی که به طور طبیعی حاصل می‌شوند، وجود دارد (۳۰و ۲۹و ۲۰و ۱۹). مطالعه‌ی حاضر می‌تواند بیانگر این باشد که در صورتی‌که از اسپرم‌های انکوبه شده در فرایند درمان‌های کمک ناباروری استفاده گردد، شانس ایجاد ناهنجاری در متیلاسیون DNA در روند تکوین جنین زیاد خواهد بود. مطالعه‌ی حاضر بیانگر این امر است که انکوباسیون اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین منجر به آزاد شدن قطعات بیشتری از DNA اسپرم می‌گردد که در نهایت سلامت جنین‌های حاصل از این اسپرم‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد و مراکز درمان ناباروری باید این امر را تحت نظر بگیرند تا در نسل حاصل از این روش‌های

Archive of SID

www.SID.ir

کمکـی درمـان نابـاروری اخـتلالات کمتـری مـشاهده گـردد.

تقدیر و تشکر

این مقالـه بـر گرفتـه از طـرح تحقیقـاتی و پایـان نامـه‌ی کارشناسی ارشد مصوب مرکـز تحقیقـات سـلولی و ملکـولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بـوده، بـا همکـاری مرکـز IVF بیمارسـتان عرفـان انجـام گرفتـه اسـت، لـذا از کلیـه‌ی مسوولین، متخصصین و پرسـنل مراکـز فـوق کمـال تـشکر و قدردانی را داریم.

References

1- Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 2007; 8: 227.

2- de Yebra L,Oliva R. Rapid analysis of mammalian sperm nuclear proteins. *Anal Biochem.* 1993; 209: 201-3.

3- Wykes SM, Krawetz SA. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem.* 2003; 278: 29471-7.

4- Bjorndahl L, Kvist U. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Mol Hum Reprod.* 2001; 16: 23-9.

5- Aitken R J, Nixon B, Lin M, et al. Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J Androl.* 2007; 9: 554-64.

6- Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, et al. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl.* 2006; 8: 11-29.

7- Nasr-Esfahani M H, Salehi M, Razavi S, et al. Effect of protamine-2 deficiency on ICSI outcome. *Reprod Biomed Online.* 2004; 9: 652-8.

8- Carrell D T, Liu L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl.* 2001; 22: 604-10.

9- Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M. Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet.* 2001; 18: 219-25.

10- Nasr-Esfahani M H, Razavi S, Mardani M, et al. Effects of failed oocyte activation and sperm protamine deficiency on fertilization post-ICSI. *Reprod Biomed Online.* 2007; 14: 422-9.

11- Lewis SE, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res.* 2005; 322: 33-41.

12- Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl.* 2009; 32: 46-56.

13- Marcon L, Boissonneault G. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod.* 2004; 70: 910-8.

14- Ozmen B, Koutlaki N, Youssry M, et al. DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and

Archive of SID

www.SID.ir

safety. *Reprod Biomed Online*. 2007; 14: 384-95.
15- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, et al. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod*. 1999; 4: 31-7.
16- Bianchi P G, Manicardi G C, Bizzaro D, et al. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod*. 1993; 49: 1083-8.
17- Bizzaro D, Manicardi G C, Bianchi P G, et al. In-situ competition between protamine and fluorochromes for sperm DNA. *Mol Hum Reprod.* 1998; 4: 127-32.
18- Benchaib M, Braun V, Ressnikof D, et al. Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Hum Reprod.* 2005; 20: 768-73.
19- Hansen M, Kurinczuk J J, Bower C, et al. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med.* 2002; 346: 725-30.
20- Cox G F, Burger J, Lip V, et al. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet.* 2002; 71: 162-4.
21- Paulsen M, Ferguson-Smith A C. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol*. 2001; 195: 97-110.
22- Jee BC, Suh CS, Shin MS, et al. Sperm nuclear DNA fragmentation and chromatin structure in one-day-old ejaculated sperm. *Clin Exp Reprod Med.* 2011; 38: 82-6.
23- Lamond S, Watkinson M, Rutherford T, et al. Gene-specific chromatin damage in human spermatozoa can be blocked by antioxidants that target mitochondria. *Reprod Biomed Online.* 2003; 7: 407-18.
24- Schulte R T, Ohl D A, Sigman M, et al. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet.* 2010; 27: 3-12.
25- Ward W S. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod*. 2009; 16: 30-6.
26- Jee B C, Han S H, Moon J H, et al. Influence of well defined protein source on in vitro maturation of human oocyte: human follicular fluid versus human serum albumin. *Fertil Steril.* 2008; 89: 348-52.
27- Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, et al. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res.* 1993; 207: 202-5.
28- Dhe-Paganon S, Syeda F, Park L. DNA methyl transferase 1: regulatory mechanisms and implications in health and disease. *Int J Biochem Mol Biol*. 2011; 2: 58-66.
29- Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *J Canadian Med Assoc*. 2006; 175: 495-500.
30- Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet.* 2001; 2: 280-91.

Archive of SID

www.SID.ir

Relationship between Protamine Deficiency and DNA Fragments Release from Sperm Incubated in Ham's F10 Medium

Salehi M[1,2], Gholizadeh M[3], Nematollahi S[4], Bandehpour M[1,5], Kazemi Damaneh B[1,5], Hosseini A[1]

[1]Cellular and Molecular Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[2]Dept. of Biology and Anatomical sciences, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[3]Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University Science and Research Branch, Tehran, Iran.

[4]Dept. of Transgenic Technology, Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran.

[5]Dept. of Biotechnology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Corresponding Author: Salehi M, Cellular and Molecular Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email: m.salehi@sbmu.ac.ir

Received: 1 Aug 2012 **Accepted:** 3 Feb 2013

Background and Objective: Protamine deficiency and DNA fragmentation have a profound effect on embryo gene expression. Incubation of sperm in culture medium leads to morphological changes of the nucleus and DNA release. However, the relationship between protamine deficiency and DNA fragments released from incubated sperm and the presence of the DNMT1 gene is not known.

Materials and Methods: Semen analysis was performed according to the WHO criteria. CMA3 staining was used to determine protamine deficiency. Twenty million sperms per sample were incubated in Ham's F10 medium for 24 hr at 37 °C. After centrifugation, DNA was extracted from the supernatant. DNA concentration was measured by biophotometer. The presence of the DNMT1 gene was confirmed by PCR using specific primers and agarose gel electrophoresis.

Results: A significant correlation was observed between the DNA fragments released from sperm in culture media and CMA3 staining ($P<0.05$). The presence of DNMT1 gene was significantly correlated with DNA fragments released from the sperm ($P<0.05$). Protamine deficiency and the presence of DNMT1 gene were not significantly correlated.

Conclusion: These results demonstrate that incubation of protamines-deficient sperm leads to the release of additional DNA fragments that eventually could have detrimental effectson embryo's health.

Keywords: Protamine, Sperm chromatin, DNA fragments

Archive of SID

www.SID.ir