ارزیابی آسیب های DNA اسپرم بر نتایج تکنیک های کمک باروری

دکتر شهناز رضوی[1]، دکتر محمد حسین نصر اصفهانی[2*]، مرضیه تولائی[3]، عاطفه عامری[4]

۱- دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
۲- دانشیار گروه جنین شناس و آندرولوژی پژوهشکده رویان - مرکز باروری و ناباروری اصفهان
۳- مربی، کارشناس ارشد زیست شناسی و علوم جانوری گرایش فیزیولوژی، عضو هیئت علمی، گروه آندرولوژی ،پژوهشکده رویان اصفهان
۴ – مربی، کارشناسی ارشد بیوفیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت۸۶/۶/۲۸ ، تاریخ پذیرش ۸۶/۱۰/۵

چکیده

مقدمه: اسپرماتوزوآ مردان نابارور اغلب دارای نقص‌های عملکردی و ساختاری متفاوتی می‌باشد. از جمله این نقایص آسیب DNA اسپرم است که می‌تواند ناشی از فراگمنتاسیون DNA ، بسته‌بندی نا مناسب کروماتین و نقص های اپی ژنتیک باشد. این مطالعه به هدف ارزیابی آسیب های DNA اسپرم بر نتایج تکنیک های کمک باروری صورت گرفته است.

روش کار: این مطالعه از نوع تجربی بوده و نمونه‌های مایع منی از۹۲ زوج نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان جمع‌آوری شد. بخشی از نمونه‌های مایع منی جهت آنالیز پارامترهای اسپرمی براساس معیار WHO و بخش اعظم آن جهت انجام ICSI و IVF آماده گردید. باقیمانده نمونه جهت ارزیابی وضعیت کروماتین از جمله کمبود پروتامین (CMA3)، فراگمنتاسیونDNA (Sperm Chromatin Dispersion) و متیلاسیونDNA توسط رنگ آمیزی ایمنو فلورسنت مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از آمار توصیفی، آزمون های آماری همبستگی و آزمون تی صورت گرفت.

نتایج: ارتباط معنی‌دار بین درصد اسپرم‌های CMA3 مثبت با فراگمنتاسیون DNA، میزان لقاح و درصد مرفولوژی غیر طبیعی ($p<۰/۰۵$) وجود دارد. در حالی که ارتباطی بین درصد مرفولوژی غیر طبیعی و میزان متیلاسیون DNA مشاهده نشد. به علاوه درصد فراگمنتاسیون DNA ارتباط معکوس معنی‌داری را با میزان لقاح ICSI ($P=۰/۰۳$)، درصد مرفولوژی طبیعی و میزان متیلاسیون DNA نشان داده در صورتی که بر میزان باروری در بیماران IVF تأثیر چندانی نداشته است. به علاوه، ارتباط بین فراگمنتاسیون DNA ، کمبود پروتامین و متیلاسیون DNA اسپرم با میزان کلیواژ، کیفیت جنین و حاملگی بررسی شد که از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد.

نتیجه گیری: نمونه‌های منی هتروژن بوده و احتمالا شامل اسپرم با نقایص متفاوت می‌باشد. پارامترهای مورد ارزیابی در این مطالعه، بیان‌گر تاثیر نقایص اسپرمی مانند کمبود پروتامین و میزان فراگمنتاسیون DNA بر روی میزان لقاح است در صورتی که برروی تکامل و میزان حاملگی موثر نبوده است. اگرچه احتمالاً تأثیر این نقایص بر روی نوزادان حاصل از ART در آینده نیاز به تحقیق بیشتری دارد.

واژگان کلیدی: متیلاسیون DNA، پروتامین، کمبود، فراگمنتاسیون DNA، لقاح آزمایشگاهی(IVF)، تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم بداخل تخمک (ICSI)، کروموماپسین A3 (CMA3)

***نویسنده مسئول:** اصفهان، پژوهشکده رویان اصفهان ،گروه جنین شناسی و آندرولوژی ، صندوق پستی:۴۶۴۴-۱۹۳۹۵
Email: mh_nasr@med.mui.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

اولین نوزاد حاصل از روش IVF در سال ۱۹۷۸ و روش ICSI[1] در سال ۱۹۹۲ به دنیا آمد. هر دو این روش‌ها مکرراً در رابطه با زوج‌های نابارور پیشنهاد شده و نتایج مطلوب آنها مشاهده شده است (۱).

اسپرماتوزوآ مردان نابارور اغلب دارای نقص‌های عملکردی و ساختاری متفاوتی می‌باشد(۳،۲). آنالیزاستاندارد مایع منی که شامل غلظت، تحرک و مرفولوژی اسپرم می‌باشد، به عنوان یک مارکر "زیستی حساس" در نظر گرفته می شود. اما این مارکرها نمی‌توانند اطلاعاتی درمورد سلامت ماده ژنتیکی گامت های مذکر به ما بدهند(۴). آسیب DNA اسپرم می‌تواند ناشی از فراگمنتاسیون DNA ، بسته‌بندی نا مناسب کروماتین و نقص‌های اپی ژنتیک باشد(۵، ۶).

فراگمنتاسیون DNA اسپرم می‌تواند ما حصل اختلال در بسته‌بندی کروماتین در طی فرآیند اسپرماتوژنز(۷)، آپوپتوز ناقص قبل از انزال(۸) یا تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) در مایع منی باشد(۹). قرار گرفتن در معرض مواد سمی محیطی یا صنعتی، استرس اکسیداتیو و عوامل ژنتیکی یا مصرف سیگار و... نیز می‌توانند در فراگمنتاسیون DNA اسپرم و ایجاد ناباروری موثر باشند(۱۰).

شواهد و مدارک کلینیکی نشان می‌دهند که آسیب‌های DNA اسپرم بر نتایج باروری اثرات مضر و مخرب داشته و میزان این آسیب‌ها در مردان نابارور نسبت به مردان بارور به مراتب بیشتر می‌باشد. به علاوه مطالعات مختلف بیان‌گر این موضوع است که فراگمنتاسیون DNA می‌تواند بر روی پارامترهای اسپرم و هم‌چنین میزان لقاح و حاملگی تأثیر منفی گذارد(۱۱،۸). درجه فراگمنتاسیون DNA ، نشان دهنده سلامت ماده ژنتیکی گامت هاست. این پارامتر از این جهت مهم می‌باشد که بسیاری از انواع آسیب‌های DNA ایجاد شده توسط جهش‌ها، به طور معمول درانکوژن‌ها و ژن‌های مهار کننده تومور جهش یافته نیز مشاهده می‌شوند(۱۲).

کروماتین اسپرماتوزوآ بالغ در نتیجه جایگزینی پروتئین‌های هیستونی با پروتامین‌ها طی اسپرمیوژنز، به شدت متراکم و فشرده می‌باشد. متراکم شدن کروماتین احتمالاً به برنامه‌ریزی مجدد ژن‌های والدی و بیان شدن ژن‌های مناسب برای مراحل اولیه تکوین و تکامل جنین کمک می کند(۱۴،۱۳). بنابر این سطح متراکم شدن صحیح کروماتین برای توانایی لقاح یافتن اسپرم ضروری به نظر می‌رسد و هر گونه نقص در طی این روند می‌تواند بر روی میزان لقاح و تشکیل جنین تأثیر گذارد(۱۵). نقص‌ها در ساختار کروماتین اسپرم معمولاً با محتوای غیر طبیعی پروتئین‌های هسته‌ای و یا شکست‌های رشته DNA همراه است که این محتوای غیر طبیعی پروتئین‌های هسته‌ای با استفاده از تکنیک‌های متفاوتی مانند TUNEL(۱۶)، SCSA (۱۷)، AO (۱۸)، SCD (۱۹) و CMA3[2] (۲۰) ارزیابی می گردد.

مطالعات اخیر در زمینه نا هنجاری‌های ژنتیکی مانند سندرم‌های آنگلمن و بکویت ویدمن به عنوان نتایج ICSI گزارش شده است(۲۱،۱). این تحقیقات با گزارش‌های اخیردر رابطه با imprinting غیرطبیعی اسپرم و نقص‌های اسپرماتوژنز حمایت می‌شود(۲۱). مدارکی نیز در مورد متیلاسیون DNA با متیلاسیون هیستون وجود دارد که پیشنهاد می‌کنند، متیلاسیون DNA یکی از کدهای اثر گذار بر بازسازی هترو کروماتین می‌باشد. در نتیجه متیلاسیون دیمرهای گوآنین-سیتوزین رشته DNA اثر قابل توجهی بر بیان ژن و ساختار کروماتین خواهد داشت(۲۲). تحقیقات قبلی حاکی از نقش حیاتی ساختار کروماتین اسپرم در رابطه با ایجاد و حفظ الگوهای اپی ژنتیک مناسب طی فرآیند اسپرمیوژنز است و توانایی خود را جهت شناسایی عوامل خطر همراه با ناهنجاری‌های فرآیند اسپرماتوژنز بهبود بخشیده است(۲۳،۶).

1- Intra Cytoplasmic Sperm Injection .

2 Chromomycin A3

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعات بر روی ژن‌های اختصاصی اسپرماتوژنز نشان می‌دهد که دست یابی به الگوی متیلاسیون مناسب DNA به وسیله ژنوم اسپرم نقشی حیاتی دربلوغ اسپرم ایفا می‌کند. متیلاسیون DNA نه تنها در طی فرآیند اسپرماتوژنز، بلکه در مرحله عبور از اپیدیدیم نیز اهمیت دارد(۲۴). سطح متیلاسیون گامت‌های مذکر و مونث برتوانایی تکوین جنین‌ها نیز اثرگذار خواهد بود. در نتیجه سطح متیلاسیون نا مناسب در یک یا هر دو گامت می‌تواند در حالی که ظاهر آنها سالم به نظر می‌رسد، باعث نقص یا شکست در فرآیند تکوین جنین باشد(۲۵).

هدف این مطالعه بررسی اثر وضعیت کروماتین شامل فراگمنتاسیون DNA ، کمبود پروتامین و متیلاسیون DNA برروی نتایج حاصل از ART [1] و ارزیابی ارتباط بین پارامترهای مذکور می‌باشد.

روش کار

آنالیز پارامترها وآماده سازی اسپرم: این مطالعه از نوع تجربی بوده و نمونه‌های مایع منی از ۹۲ زوج نابارور که برای درمان IVF و ICSI به مرکز باروری و ناباروری اصفهان مراجعه کرده بودند، جمع آوری شد. مایع منی در روز تخمک گذاری ، پس از ۴-۳ روز پرهیز از مقاربت آماده گردید و با اخذ فرم رضایت، نمونه‌های منی برای انجام این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. بخشی از نمونه‌های منی جهت آنالیز پارامترهای اسپرمی(غلظت، تحرک و مرفولوژی) با استفاده از میکروسکوپ نوری براساس معیار WHO بررسی شد(۲۶) و بخش اعظم آن با استفاده از گرادیانت پیور اسپرم[2](۸۰:۴۰) جهت انجام IVF و ICSI آماده گردید. از باقیمانده نمونه برای ارزیابی میزان متیلاسیون DNA (5MC)، کمبود پروتامین (CMA3) و فراگمنتاسیون DNA به ترتیب از رنگ آمیزی ایمنوفلورسنت ۵-متیل سیتوزین، رنگ آمیزی کروموماپسین A3 و SCD[3] بهره گرفته شد. لازم به ذکر است تمامی مواد مصرفی در این مطالعه به جز موارد اشاره شده در متن از شرکت سیگما تهیه گردیده است.

تزریق اسپرم به درون سیتوپلاسم اووسیت: بعد از تخمک‌گیری، اووسیت‌ها در محیط G-MOPS[4] حاوی هیالورونیداز، قرار داده شد. سپس اووسیت‌ها در G-MOPS تازه شسته و به زیر روغن در داخل یک پتری دیش فالکون ۱۰۰۶ برای میکرواینجکشن منتقل گردید. به علاوه اسپرم شسته شده به محیط ICSI ۱۰۰ (محیطی غلیظ جهت تسهیل کار برای اسپرم که همانند محیط pvp است) منتقل گردید.

از میکرومانیپلاتور اپندروف نصب شده روی میکروسکوپ واژگون[5] برای تزریق اسپرم استفاده شد. بدین ترتیب اسپرم با بهترین مرفولوژی و تحرک از جمعیت اسپرمی انتخاب شده و پس از بی حرکت شدن، اسپرم به داخل یک پیپت تزریق، کشیده شده و سپس به داخل اووسیت تزریق گردید. تزریق معمولاً ۳-۲ ساعت پس از جمع‌آوری اووسیت‌ها صورت گرفت. اووسیت‌های تزریق شده در محیط G1 انکوبه شدند و پس از۱۸-۱۶ ساعت، میزان لقاح تعیین گردید.

لقاح آزمایشگاهی(IVF) و انتقال جنین: اووسیت‌ها همراه با کومولوس‌های اطراف آن[6] از مایع فولیکولی جدا شده و در محیط G-MOPS شستشو داده شد. سپس هر COC به داخل قطرات ۵۰ میکرولیتری در زیر روغن معدنی[7] منتقل گردد. اسپرم آماده سازی شده توسط گرادیان پیور با محیط G-Rinse شستشو شده و به هر COC، حدود ۱۰۰۰۰۰ -۵۰۰۰۰ اسپرم اضافه گردید و در دمای۳۷ درجه سانتی گراد،۵ درصد Co_2 ، ۵ درصد O_2 و ۹۵ درصد رطوبت به

1 - Assisted Reproductive Technology
2 -Pure Sperm Gradients

3- Sperm Chromatin Dispersion
4 -Vitrolife, Gothenburg, Sweden
5 -Nikon
6- Cumulus oocyte complex COC:
7 - Mineral Oil

Archive of SID
www.SID.ir

مدت ۱۸ ساعت نگهداری شد. در این زمان اووسیت‌ها از توده کومولوسی جدا شده و وجود و یا عدم وجود پیش هسته‌ها در زیر میکروسکوپ اینورت بررسی گردید. اووسیت‌های لقاح یافته به قطرات محیط G1 در زیر روغن منتقل شده و پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت جداسازی توده کومولوسی، مراحل کلیواژ تعیین و ثبت گردید.

ارزیابی میزان لقاح و حاملگی: درصد لقاح براساس نسبت اووسیت‌های دارای PN ۲به اووسیت‌های بالغ (متافاز II) مشخص گردید. میزان حاملگی ابتدا به وسیله ß-hCG ارزیابی و در مراحل بعدی با روش‌های اولترا سوند بر پایه ضربان قلب نوزاد تایید می‌گردد. برای به حداقل رساندن تأثیر فاکتورهای اووسیتی، بیماران دارای زیگوت‌های PN ۱، ۳PN و یا بیشتر، بیماران دارای اووسیت‌های وزیکول ژرمینال، دژنره، گرانولار، بدون جسم قطبی و واکوئله یا دفرم و هم‌چنین بیماران دارای کمتر از ۴ اووسیت، از این مطالعه حذف شدند.

ارزیابی میزان فراگمانتاسیون DNA (تستSCD):
مقدار ۳۰ میکرولیتر از نمونه اسپرمی آماده شده به روش گرادیانت پیور اسپرم (غلظت ۵ تا ۱۰ میلیون) با ۷۰ میکرولیتر از آگاروز با درجه ذوب پایین[1] در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مخلوط گردید. سپس نمونه مخلوط شده بر روی لامی که از قبل با آگاروز ۰/۶۵ درصد پوشیده شده، قرار گرفت و با گذاشتن یک لامل بر روی آن، به مدت ۴ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس لامل از سطح لام جدا شده و هر لام به صورت افقی در محلول اسیدکلریدریک ۰/۰۸ نرمال به مدت ۷ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شد. سپس در درجه حرارت اتاق، به مدت ۱۰ دقیقه در محلول تجزیه کننده ۱[2] و به دنبال آن در محلول تجزیه کننده ۲[3] به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. لام در بافر Trisborate-EDTA[4] مدت ۲ دقیقه شستشو شده و به ترتیب در الکل ۷۰ درصد، ۹۰ درصد، ۱۰۰ درصد هر کدام به مدت ۲ دقیقه آب گیری شد. پس از خشک شدن، با محلول رنگ رایت رنگ آمیزی شده و با حذف رنگ اضافه توسط شستشو با آب به وسیله میکروسکوپ نوری بررسی گردید. با استفاده از این روش می‌توان میزان فراگمانتاسیون DNA را با توجه به وجود و اندازه هاله اطراف هسته بررسی نمود. درصد اسپرم‌های با فراگمانتاسیون DNA (هسته اسپرم با هاله کوچک، بدون هاله و سلول اسپرم تجزیه شده) و بدون فراگمانتاسیون DNA (هسته اسپرم با هاله بزرگ و هاله متوسط) درهرنمونه ارزیابی شد(۱۹).

ارزیابی میزان متیلاسیون DNA (رنگ آمیزی ایمنو فلورسنت): نمونه‌های مایع منی به وسیله محیط Ham's+ FCS(10%) شسته و با دانسیته ۲۰-۱۰ میلیون در میلی لیتر آماده گردید. اسلایدها در محلول کارنوی (متانول و اسید استیک به نسبت ۳:۱) و دمای۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه فیکس شده و در بافر فسفات سالین حاوی Tween ۵ درصد (PBS-T) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق شسته شدند. سپس اسلاید ها در محلول لیز کننده[5] به مدت ۲۰ دقیقه و به مدت ۵ دقیقه در PBS-T شسته شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در 6N HCl ، و به مدت ۱۰ دقیقه با بوراکس شستشو داده شد. برای اطمینان از مرحله شستشو، مجدداً به مدت ۵ دقیقه در PBS-T قرار داده می شد. اسلایدها با آنتی بادی منوکلونال ۵-متیل سیتوزین[6] انکوبه شده و دو بار با محلول PBS-T شستشو شد. اسلایدها در مرحله بعد با فلورسین ایزوتیوسیانات کونژوگه شده علیه IgG موش(FITC) انکوبه و سپس دو بار با محلول PBS-T شسته شد. در نهایت با

1- Low Melting Agaros.
2- 0.4 M Tris, 0.8 M DTT, 1% SDS, and 50 mM EDTA, pH 7.5.
3- 0.4 M Tris, 2 M NaCl, and 1% SDS, pH 7.5.
4 - 0.09 M Tris-borate and 0.002 M EDTA, pH 7.5.
5- 25 mM dithiotreitol and 1 M Tris-Hcl.
6- Eurogentec,Ougree, Belgium.

Archive of SID
www.SID.ir

گلیسرول، مونت گردید. برای درستی پروسه متیلاسیون DNA از اسلایدهای کنترل منفی (بدون رنگ آمیزی آنتی بادی اولیه) استفاده شد. آنالیز میکروسکوپی اسلایدها با استفاده از میکروسکوپ فلئورسنس با فیلتر ۴۷۰-۴۶۰ نانومتر[1] و نرم افزار image J[2] صورت گرفت و بر روی هر لام ۲۰۰ سلول اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت(۲۷).

ارزیابی کمبود پروتامین(رنگ آمیزی کرومایسین A3): اسمیرهای آماده شده از مایع اسپرمی درمحلول کارنوی (متانول و اسید استیک با نسبت ۳:۱) به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد فیکس شد. به منظور انجام رنگ آمیزی CMA_3، هراسلاید به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۰۰ میکرولیتر از محلولCMA_3 رنگ آمیزی گردید (۰/۲۵ گرم بر میلی لیتر در بافر مک الوین: ۷ میلی لیتراسید استیک ۰/۱ مولار و ۳۲/۹ میلی‌لیتر از $7H_2O$ و Na_2HPO_4 و با غلظت ۰/۲ مولار pH=7 شامل ۱۰ میلی مولار از $Mgcl_2$). سپس اسلایدها توسط بافر PBS شستشو و مونت شد. با استفاده ازمیکروسکوپ فلوئورسانت المپوس[3] با فیلتر ۴۷۰-۴۶۰ در همان روز ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. درصد اسپرم‌های با رنگ زرد درخشان (CMA_3^+) و اسپرم‌های با رنگ زرد تیره (CMA_3^-) با استفاده از نرم افزارolysia محاسبه گردید(۲۰).

تجزیه و تحلیل آماری: تحلیل داده‌ها با استفاده از آمار توصیفی، آزمون‌های آماری ضریب همبستگی و آزمون تی، انجام گرفت و در صورتی که$p< ۰/۰۵$ بود از لحاظ آماری معنی‌دار محسوب شد.

نتایج

این مطالعه بر روی ۹۲ زوج نابارور که از تاریخ آبان ماه ۱۳۸۵ تا خرداد ماه ۱۳۸۶ تحت درمان IVF و ICSI قرار گرفته بودند، انجام شد. متوسط سن خانمها۳/۳±۳۴/۴ و میانگین سن آقایان۵/۲± ۳۶/۲ بود. نتایج پارامترهای مایع منی، میزان متیلاسیون DNA ، فراگمنتاسیون DNA، کمبود پروتامین و میزان لقاح در جدول یک نشان داده شده است. حداقل دانسیته غلظت اسپرم مورد استفاده ۷ میلیون در هر میلی لیتر بود. در مطالعه حاضر، مورفولوژی اسپرم با استفاده از روش WHO بررسی و درصد مرفولوژی‌های غیرطبیعی بین ۱۰۰- ۴۸ درصد بود. (میانگین۱۲/۰۵± ۷۴/۸۲). به علاوه میزان لقاح در بیماران ICSI بین ۱۰۰-۰ درصد (میانگین۲۳/۰۵± ۷۶/۱۲) و در بیماران IVF بین ۱۰۰-۵۰ درصد (میانگین ۱۶/۱۸± ۸۳/۴۸) گزارش شد. همان‌طور که در جدول یک نشان داده شده است، پارامترهای مربوط به وضعیت کروماتین اسپرم به شرح زیر می‌باشد:

میزان کمبود پروتامین با تست CMA3 بررسی و بین ۹۶-۱۲ درصد (میانگین۱۶/۴۹± ۴۶/۸۴) ، درصد فراگمنتاسیونDNA با تست SCD بین ۹۴-۱۶ درصد (میانگین۱۹/۲۷ ± ۴۳/۱۰) و میزان متیلاسیون DNA بوسیله رنگ آمیزی ایمنو فلورسانت بین ۱۵۰- ۵۲/۳۸ (میانگین ۲۵/۱۸± ۸۹/۸۱) به دست آمد.

جدول ۲ نشان دهنده ارتباط بین وضعیت‌های کروماتین با پارامترهای مایع منی است. از لحاظ آماری رابطه معنی‌داری بین درصد اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین (CMA3 مثبت) و فراگمنتاسیون DNA با درصد مرفولوژی غیر طبیعی به ترتیب (p =۰/۰۰۱ ، r=۰/۳۶۵) و(p =۰/۰۰۵ ، r=۰/۳۱۹) نشان داده شده است. در حالی که ارتباطی ما بین درصد مرفولوژی غیر طبیعی و میزان متیلاسیون DNA مشاهده نشد(p =۰/۰۹ ، r= -۰/۲۱۸).

افزون بر این، رابطه معنی‌داری بین درصد اسپرم‌های CMA3 مثبت و میزان لقاح وجود دارد که در جدول ۳ نشان داده شده است(IVF: r= -۰/۴۰۹ ، p =۰/۰۲۲ ، p =۰/۰۰۲ ، ICSI : r= -۰/۳۷۷).

به علاوه درصد فراگمنتاسیون DNA ارتباط معکوس معنی‌داری را با میزان لقاح ICSI داشت (p =۰/۰۳۶ ،

1- BX51; Tokyo, Japan.
2 -Version 1.240.
3 -Japan، Tokyo، BX51.

Archive of SID
www.SID.ir

(r= -۰/۲۹۱) (نمودار۱). در حالی که این پارامترها بر میزان باروری در بیماران IVF تأثیر چندانی نداشته است(نمودار۲).

در این مطالعه میزان متیلاسیون DNA توسط رنگ آمیزی ایمنوفلورسنت بررسی شد و نتایج ارتباط معنی‌دار معکوسی را بین متیلاسیون DNA و فراگمنتاسیون DNA نشان داده است(p =۰/۰۱۲ ، r= -۰/۳۴۳). به علاوه در مطالعه حاضر رابطه‌ای بین میزان لقاح و میزان متیلاسیون DNA وجود نداشت. در طی آنالیز دادهای این مطالعه، ارتباط معنی‌داری بین اسپرم‌های +CMA3 و درصد فراگمنتاسیون DNA مشاهده شد(p =۰/۰۱۷ ، r= -۰/۲۹۱).

جدول۱. میانگین پارامترهای مایع منی، درصد کمبود پروتامین، درصد فراگمنتاسیون DNA ، میزان متیلاسیون DNA و میزان لقاح در افراد نابارور

پارامتر ها	تعداد نمونه	حداقل	حداکثر	میانگین ± انحراف معیار
غلظت اسپرم($ml/۱۰^{۶}$×۱)	۹۲	۷	۱۰۰	۵۱/۷۱± ۲۳/۰۶
درصد تحرک	۹۲	۰	۷۰	۴۶/۰۸± ۱۳/۴۲
درصد ناهنجاری های مورفولوژی	۹۲	۴۸	۱۰۰	۷۴/۸۳± ۱۲/۰۵
درصد لقاح پس از ICSI	۶۶	۰	۱۰۰	۷۶/۱۲± ۲۳/۰۵
درصد لقاح پس از IVF	۳۵	۵۰	۱۰۰	۸۳/۴۸± ۱۶/۱۸
درصد فراگمنتاسیون DNA	۷۸	۱۶	۹۴	۴۳/۱۰± ۱۹/۲۷
درصد کمبود پروتامین	۸۴	۱۲	۹۶	۴۶/۸۴± ۱۶/۴۹
میزان متیلاسیون DNA	۶۱	۵۲,۳۸	۱۵۰	۸۹/۸± ۲۵/۱۸

جدول۲. رابطه بین کمبود پروتامین، درصد فراگمنتاسیون DNA و شدت متیلاسیون DNA با پارامترهای مایع منی

پارامترها	غلظت اسپرم($ml/۱۰^{۶}$×۱)	درصد تحرک	درصد ناهنجاری های مورفولوژی
درصد فراگمنتاسیون DNA	- /۱۳۹(۰/۲۳۱)	-۰/۳۴۵(۰/۰۰۲) **	۰/۳۱۹(۰/۰۰۵) **
درصد کمبود پروتامین	-۰/۱۹۸(۰/۰۷)	- ۰/۰۹۸(۰/۴۰۷)	۰/۳۶۵(۰/۰۰۱) **
میزان متیلاسیون DNA	-۰/۱۱۷(۰/۳۷۱)	۰/۱۸۰(۰/۱۶۵)	-۰/۲۱۸(۰/۰۹)

* نشان دهنده رابطه معنی دار در سطح p<۰/۰۵ است.

**نشان دهنده رابطه معنی دار در سطح p<۰/۰۱ است.

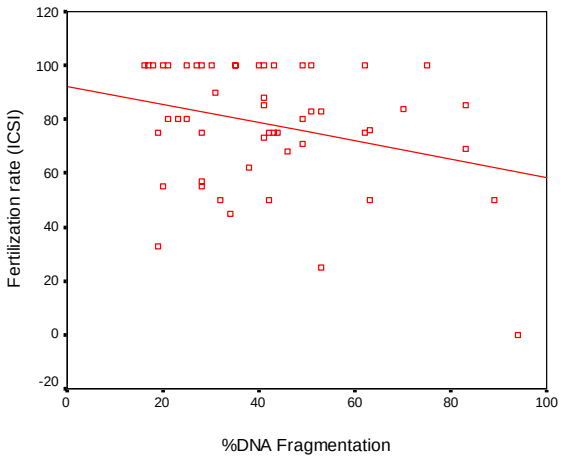
جدول۳. ارتباط بین وضعیت کروماتین اسپرم با میزان لقاح در بیماران نابارور کاندیدای ICSI و IVF

پارامترها	میزان لقاح ICSI	میزان لقاح IVF	درصد فراگمنتاسیون DNA
درصد فراگمنتاسیون DNA	- ۰/۲۹۱(۰/۰۳۶) **	۰/۲۶۹(۰/۱۵۹)	-------
درصد کمبود پروتامین	-۰/۳۷۷(۰/۰۰۲) **	- ۰/۴۰۹(۰/۰۲۲)*	۰/۲۹۱(۰/۰۱۷) *
میزان متیلاسیون DNA	۰/۱۱۵(۰/۴۵۴)	-۰/۰۴۱(۰/۸۴۵)	-۰/۳۴۳(۰/۰۱۲) *

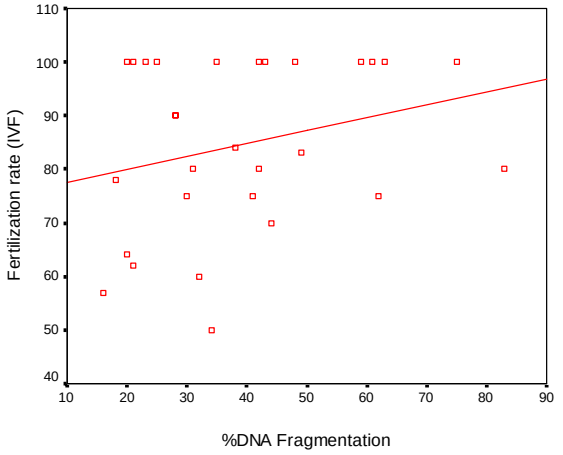
* نشان دهنده رابطه معنی دار در سطح p< ۰/۰۵ است.

**نشان دهنده رابطه معنی دار در سطح P<۰/۰۱ است.

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار۱. رابطه بین درصد فراگمنتاسیون DNA و میزان لقاح ICSI در افراد نابارور(r=-۰/۲۹۱ p=۰/۰۲۶)



نمودار۲. رابطه بین درصد فراگمنتاسیون DNA و میزان لقاح IVF در افراد نابارور(r=۰/۲۶۹ p=۰/۱۵۹)

بحث

درطی لقاح In Vivo ، فرآیند انتخاب طبیعی به گونه‌ای عمل می‌کند که تنها اسپرم با ماده ژنتیکی سالم بتواند با اووسیت عمل لقاح را انجام دهد، اما اسپرمی که در طی عمل ICSI (لقاح مصنوعی درون سیتوپلاسمی اسپرم)به داخل اووسیت تزریق می‌شود، از این مسیر طبیعی عبور نمی‌کند و این احتمال وجود دارد که اسپرم با ماده ژنتیکی ناهنجار و غیر طبیعی با اووسیت لقاح یابد. برای انتخاب اسپرم مناسب پارامترهای مختلفی از جمله غلظت، مورفولوژی و تحرک ارزیابی می‌گردد(۲۸). از آنجا که در نهایت ماده ژنتیکی گامت مذکر نیمی از ماده ژنتیکی زیگوت را تشکیل می‌دهد می‌توان گفت سلامت DNA اسپرم یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های مربوط به اسپرم است که ارزیابی آن می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در رابطه با انتخاب اسپرم طبیعی فراهم آورد(۲۹).

DNA اسپرم به گونه‌ای سازمان دهی شده است که کروماتین هسته به حالت متراکم و پایدار نگه داشته می‌شود (۲۰،۱۵،۲۸). این سازمان دهی DNA ، نه تنها اجازه می‌دهد که اطلاعات ژنتیکی به صورت متراکم به زیگوت منتقل شود بلکه از طرف دیگر تضمین می‌کند که DNA از لحاظ فیزیکی و شیمیایی به گونه‌ای انتقال یابد که جنین بتواند به راحتی به اطلاعات DNA دسترسی داشته باشد(۳۰).

اسپرم‌های بارور دارای DNA پایداری هستند که قادر است در زمان مناسب طی فرایند لقاح از حالت متراکم خارج شده و DNA بدون نقصی را به جنین انتقال دهد(۳۱). آسیب در ماده ژنتیکی اسپرم می‌تواند ناشی از نقص در بلوغ یا متراکم شدن هسته اسپرم و فراگمنتاسیون DNA و هم‌چنین نقص‌های اپی ژنیک یا آناپلوییدهای کروموزوم باشد(۳۲،۱۵).

در مطالعه حاضر ارتباط بین فراگمنتاسیون DNA، بسته بندی غیر طبیعی کروماتین و نقص‌های اپی ژنیک در مردان نابارور مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه حاکی از آن است که بین مرفولوژی غیر طبیعی و کمبود پروتامین که با تست $CMA3^{+}$ مورد ارزیابی قرار گرفت، ارتباط معنی‌داری وجود دارد. همانند مطالعات قبلی، این موضوع بیان کننده این است که کمبود پروتامین، نقش خود رابا تأثیر بر مرفولوژی اسپرم اعمال می‌کند(۳۱،۲۰،۱۵). این نتایج هم‌چنین نشان می‌دهد که اگر چه ارتباط معنی‌داری بین پارامترهای فوق وجود دارد، ولی کمبود پروتامین نیز به طور مستقل بر لقاح

Archive of SID
www.SID.ir

تأثیر می‌گذارد. بنابراین نقص در میزان پروتامین می‌تواند باعث ایجاد اسپرماتوزوآ نابالغ وکاهش توانایی لقاح شود.

دراین مطالعه ارتباط معنی‌داری بین فراگمنتاسیون DNA با تحرک و مرفولوژی غیر طبیعی اسپرم مشاهده شد. این نتایج با مطالعه زینی و همکاران در سال ۲۰۰۱ در مورد این که ارتباط معنی‌دار بین پارامترهای مایع منی و فراگمنتاسیون DNA وجود دارد، مطابقت می‌کند(۳۳). بنابر این می‌توان گفت که اسپرم افراد نابارور با مرفولوژی غیر طبیعی و تحرک پایین احتمالاً دارای فراگمنتاسیون DNA بیشتری درمقایسه با افرا د بارور با پارامترهای مایع منی طبیعی می‌باشند و با توجه به این که این ارتباط از لحاظ آماری معنی‌دار ولی دارای ضریب همبستگی پایین است، نمی‌توان نتیجه گرفت که هر اسپرمی که از لحاظ مرفولوژی و تحرک طبیعی است، از لحاظ ماده ژنتیکی یا آناپلوییدی نیز سالم می‌باشد(۳۴). بنابراین افرادی هستند که دارای پارامترهای مایع منی طبیعی بوده ولی درجات متفاوتی از فراگمنتاسیون DNA را دارند که می‌تواند عامل بسیاری از ناباروری‌های ناشناخته باشد. به علاوه، احتمالاً فراگمنتاسیون DNA اسپرم بیشتر تحت تأثیر بسته‌بندی نا مناسب کروماتین نسبت به ناهنجاری‌های مورفولوژی اسپرم در طی اسپرماتوژنز قرار می‌گیرد(۳۵).

علاوه بر سلامت DNA، تغییرات اپی ژنیک نیز نقش مهمی را بر روی تکامل ایفا می‌کند(۳۲). از جمله تغییرات اپی ژنیک می‌توان به متیلاسیون DNA اشاره کرد که در فرایندهایی از قبیل Imprinting ژن(۲۳،۲۲) ، غیر فعال شدن کروموزوم X(۳۶) و بیان متفاوت ژن‌ها(۳۷) نقش مهمی دارد. در طول متیلاسیون DNA بازهای سیتوزین در دیمرهای سیتوزین-گوآنین تبدیل به ۵- متیل سیتوزین می‌شود(۲۴،۲۳). میزان متیلاسیون DNA[1] با استفاده از روش‌های ایمنوفلورسانس ارزیابی گردید(۱۱). مطالعاتی که در این زمینه توسط آئوکی در سال ۲۰۰۶و بنچیب و همکاران صورت گرفت، نشان دادند که هیچ ارتباطی بین پارامترهای اسپرم و GDM وجود ندارد(۳۸،۳۲) در حالیکه مارکوس و همکاران رابطه‌ای بین Imprinting ژن و الیگوزواسپرم‌های شدید پیدا کرد(۲۱). در مطالعه حاضر مشابه با آنچه آئوکی و همکاران و بنچیب و همکاران مشاهده کردند، هیچ ارتباطی بین پارامترهای اسپرم و GDM مشاهده نشد علیرغم این که ارتباط بین مرفولوژی غیر طبیعی اسپرم و GDM ، نزدیک معنی‌دارشدن بود($p=۰/۰۹$) (۳۸،۳۲).

Aokie و همکاران در سال ۲۰۰۶ ارتباطی بین میزان متیلاسیون DNA و کمبود پروتامین ۱ ، کمبود پروتامین ۲ و نسبت پروتامین ۱ به ۲ در مردان نابارور مشاهده نکردند(۳۸). در این مطالعه نیز ارتباطی بین متیلاسیون DNA و کمبود پروتامین مشاهده نشد. به علاوه در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین میزان لقاح و متیلاسیون DNA مشاهده نشد که با مطالعه بنچیب و همکاران مطابقت دارد(۳۲). با نفوذ اسپرم بداخل اووسیت، دمتیلاسیون گسترده‌ای در سطح ژنوم رخ می‌دهد. پس از مرحله ۸-۶ سلولی، تظاهر متیلاسیون پس از فعال شدن ژنوم صورت گرفته، بنابراین تکامل جنین در انسان در طی ۳-۲ روز اول، تحت m RNA ذخیره شده در اووسیت می‌باشد. در نتیجه عدم ارتباط بین این دو پارامتر احتمالاً به علت تغییرات متیلاسیون قبل و بعد از لقاح می‌باشد(۳۹).

در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین فراگمنتاسیون DNA و کمبود پروتامین مشاهده شد. این یافته‌ها بیان‌گر این است که اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین بیشتر مستعد فراگمنتاسیون DNA هستند(۱۳). تاثیر فراگمنتاسیون DNA بر میزان لقاح در بین مطالعات مختلف ضد و نقیض می‌باشد(۴۱،۴۰،۱۸،۱۱،۸). دلایل زیادی برای این تناقض‌ها وجود دارد که می‌توان به مواردی مثل فرآیند آماده سازی اسپرم، فرآیند لقاح (CSI, IUI, IVF)، نحوه ارزیابی فراگمنتاسیون DNA (TUNEL, SCSA, SCD,AO, COMET) و نحوه انجام آزمایش به صورت دستی یا ماشینی، اشاره نمود.

1- GDM:Global DNA Methylation.

Archive of SID

www.SID.ir

هم‌چنین در مطالعه حاضر ارتباطی معکوس بین فراگمنتاسیون DNA و میزان لقاح پس از ICSI مشاهده شد، بنابراین اسپرم حاوی DNA فراگمنته از توانایی لقاح کمتری برخوردار می‌باشد. با این وجود، هیچ گونه ارتباطی بین فراگمنتاسیون DNA و میزان لقاح IVF مشاهده نشد (نمودار ۱ و ۲) که این موضوع با نتایج دیگر یافته‌ها در این زمینه تطابق دارد(۴۱،۴۰،۱۱،۸). احتمالاً این اختلاف بین بیماران(IVF و ICSI) به این دلیل می‌باشد که اسپرم‌های انتخاب شده برای ICSI اغلب دارای کیفیت پایین‌تری می‌باشند. اگر چه اپراتور ICSI اسپرم با بهترین مرفولوژی و تحرک رابرای ICSI انتخاب می‌کند، اما اسپرم‌هایی وجود دارد که به ظاهر طبیعی ولی دارای آسیب‌های DNA است. با وجود حداکثر تلاش برای انتخاب بهترین اسپرم جهت موفقیت، امکان عدم موفقیت در لقاح وجود خواهد داشت. در حالی که در نمونه‌های IVF، اسپرم بارور توسط زوناپلوسیدا انتخاب و کاندیدهای آنوپلوییید توسط سد زونا پلوسیدا رد می‌شود(۴۱).

درمطالعه حاضر ارتباط معکوس معنی‌داری بین کمبود پروتامین و میزان لقاح پس از IVF و ICSI مشاهده شد. نتایج این مطالعه با مطالعات پیشین دلالت بر این موضوع دارد که کمبود پروتامین با عدم موفقیت در لقاح همراه است(۲۰،۱۵،۱۳). بنابراین عدم موفقیت در لقاح احتمالاً می‌تواند به طور مستقیم به علت کمبود پروتامین و یا به طور غیرمستقیم به دیگر وقایع اسپرمیوژنز مربوط باشد(۳۱).

افزون بر این، ارتباط معنی‌داری بین فراگمنتاسیون DNA و متیلاسیون DNA اسپرم وجود دارد. این یافته ها با نتایج بنچیب و همکاران هم‌خوانی ندارد(۳۲). نتایج این مطالعه حاکی از آن است که افزایش میزان متیلاسیون در طی اسپرمیوژنز رخ می‌دهد بنابراین احتمالاً کاهش میزان متیلاسیون، DNA را مستعدآسیب می‌کند. با توجه به این که ارتباطی بین کمبود پروتامین و متیلاسیون DNA مشاهده نشد ولی ارتباط معنی‌داری بین فراگمنتاسیون DNA و کمبود پروتامین پدیدار گشت. این طور می‌توان احتمال داد که اسپرم دارای کمبود پروتامین، در معرض فراگمنتاسیون DNA قرار گرفته و این فراگمنتاسیون بیشتر در نمونه‌هایی است که با کاهش متیلاسیون همراه هستند. به علاوه عدم هم‌خوانی با دیگر مطالعات می‌تواند ناشی از اختلاف در تعداد نمونه‌ها باشد.

در مطالعه حاضر ارتباط بین فراگمنتاسیون DNA ، کمبود پروتامین و متیلاسیون DNA اسپرم با میزان کلیواژ، کیفیت جنین و حاملگی بررسی شد. بین پارامترهای مذکور از لحاظ آماری ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد.

به علاوه میانگین پارامترهای فوق بین دو گروه دارای حاملگی و فاقد حاملگی مقایسه گردید و تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه مشاهده نشد (داده‌ها نشان داده نشده است). علیرغم نتایج متناقص ارائه شده در این زمینه در مقالات مختلف، یافته‌های ما حاکی از این است که فراگمنتاسیون DNA ، کمبود پروتامین و متیلاسیون DNA اسپرم بر روی نتایج حاملگی اثری نداشته و احتمالاً این فاکتورها می‌توانند بر روی میزان لقاح و تکامل اولیه جنین تأثیر گذارد.

نتیجه گیری

به طور کلی نمونه‌های مایع منی هتروژن بوده و احتمالاً شامل اسپرم با نقایص متفاوت می‌باشد. این نقایص می‌تواند با یکدیگر در ارتباط بوده و احتمالاً بر روی لقاح و تکوین اولیه جنین تأثیر توام ایجاد کند. در رابطه با اسپرم‌هایی که برای روش ICSI انتخاب می‌شود با تکیه بر مورفولوژی، تحرک و بقای آنها، سعی می‌شود اسپرم طبیعی انتخاب شود اما ممکن است اسپرم‌های به ظاهر طبیعی ولی دارای نقایص ماده ژنتیکی انتخاب شود و توجه ما را از فرزندان حاصل از نتایج ART در آینده کاهش دهد. بنابراین روش انتخاب اسپرم، براساس ظرفیت عملکردی آن می‌تواند نقش مهمی در پیشبرد

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج و انتقال جنین و یا فریز کردن آن داشته باشد. از این مطالعه و مطالعات دیگر این طور می توان استنباط کرد که نقایص ساختار کروماتین اسپرم بر روی میزان لقاح تأثیر دارد ولی بر روی تکامل و حاملگی موثر نبوده است. اگرچه تأثیر این نقایص بر روی نوزادان حاصل از تکنیک‌های کمک باروری نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری متخصصین زنان وزایمان و پرسنل آزمایشگاه نازایی مرکز باروری و ناباروری اصفهان، هم‌چنین از همکاری مسئولین پژوهشکده رویان اصفهان که زمینه اجرای این تحقیق را فراهم آوردند تقدیر و تشکر به عمل می آید. کلیه هزینه‌های مصرفی و غیر مصرفی این تحقیق از بودجه تحقیقاتی پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی تامین گردیده است.

منابع

1. Gosden R, Trasler J, Lucifero D, Faddy M. Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. Lancet 2003; 361: 1975-1977.

2. Aitken RJ, Irvine DS, Wu F. Prospective analysis of sperm–oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. Am J Obstet Gynecol 1991; 164:542-551.

3. Liu DY, Baker HW. Disordered acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: a newly discovered sperm defect causing infertility with reduced sperm–zona pellucida penetration and reduced fertilization in vitro. Hum Reprod 1994; 9: 1694–1700.

4. Bigelow PL, Jarrell J, Young MR, Keefe TJ, Love EJ. Association of semen quality and occupational factors: comparison of case–control analysis of continuous variables. Fertil Steril 1998; 69: 11-18.

5. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. Rev Reprod 1999; 4: 31-7.

6. Rousseaux S, Caron C, Govin J, Lestrat C, Faure AK, Khochbin S. Establishment of male-specific epigenetic information. Gene 2005; 345:139-53.

7. Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. Biol Repro 1995; 52: 864-867.

8. Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kruger TF. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. Fertil Steril 2004; 81: 965–972.

9. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ, Agarwal A. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. Hum Reprod 2004; 19: 129–138.

10. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ Jr. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. Fertil Steril 2002; 78: 491-499.

11. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. Hum Reprod 2003;18:1023-28.

12. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis 2000; 21: 361-370.

13. Nasr-Esfahani M.H, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, Mardani M. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. Reprod Biomed Online 2005; 11: 198-205

14. Braun RE. Packaging paternal chromosomes with protamine. Nat Genet 2001; 28: 10-12.

Archive of SID

www.SID.ir

15. Nasr-Esfahani M.H, Razavi S, Tavalaee M. Failed Fertilization post ICSI and Spermiogenic Defects. Fertil Steril 2007 (In Press).
16. Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Schill WB, Kruger TF. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. Reprod Biomed Online 2003; 7: 477-484.
17. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay (SCSA) as a diagnostic and prognostic tool in human fertility clinic. Hum Reprod 1999; 14:1039-1049.
18. Gopalkrishnan K, Hurkadli K, Padwal V, Balaiah D. Use of acridine orange to evaluate chromatin integrity of human spermatozoa in different groups in infertile men. Andrologia 1999; 31: 277–282.
19. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. J Androl 2003; 24: 59–66.
20. 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.
21. Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. Lancet 2004; 363: 1700-2.
22. Richards EJ, Elgin SCR. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. Cell 2002; 108:489-500.
23. Niemitz EL, Feinberg, AP. Epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation. Am J Hum Genet 2004; 74: 599-609.
24. Ariel M, Cedar H, McCarrey J. Developmental changes in methylation of spermatogenesis-specific genes include reprogramming in the epididymis. Nat Genet 1994; 7: 59-63
25. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Embryogenesis:demethylation of the zygotic paternal genome. Nature 2000; 403: 501-502.
26. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen–Cervical Mucus Interaction. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University, Press; 1999.
27. Benchaib M, Ajina M, Lornage J, Niveleau A, Durand P, Guerin JF. Quantitation by image analysis of global DNA methylation in human spermatozoa and its prognostic value in in vitro fertilization: a preliminary study. Fertil Steril 2003; 80: 947-953.
28. Agarwal A, Said T. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Hum Reprod Update 2003; 9:331-45.
25. Perreault SD, Aitken RJ, Baker HW, Evenson DP, Huszar G, Irvine DS. Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. Adv Exp Med Biol 2003; 518: 253-68.
30. Marchesi DE, Feng HL. Sperm DNA integrity from sperm to egg. J Androl 2007; 28: 481-9.
31. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M, Shirazi R, Javanmardi S. Effects of failed oocyte activation and sperm protamine deficiency on fertilization post-ICSI. Reprod Biomed Online 2007; 14: 422-9.
32. Benchaib M, Braun V, Ressnikof D, Lornage J, Durand P, Niveleau A. Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. Hum Reprod 2005; 20:768-73.
33. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. Fertil Steril 2001; 75: 674-7.
34. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, Ravelli A, Huszar G. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. Fertil Steril 2005; 84:1665-73.

Archive of SID

www.SID.ir

35. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboisem M, De Jonge CJ, Carrell D. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. Journal of Andrology 2006; 27(1):53-9.
36. Beard C, Li E, Jaenisch R. Loss of methylation activates exist in somatic but not in embryonic cells. Genes Dev 1995; 9(19): 2325-2334.
37. Eden SH, Cedar H. Role of DNA methylation in the regulation of transcription. Curr Opin Genet Dev 1994; 4(2):255-259.
38. Aoki VW, Emery BR, Carrell DT. Global sperm deoxyribonucleic acid methylation is unaffected in protamine-deficient infertile males. Fertil Steril 2006; 86(5):1541-3.
39. Piyathilake CJ, Henao O, Fros AR, Macaluso M, Bell WC, Johanning GL, Heimburger DC, Niveleau A, Grizzle WE. Race- and age-dependent alterations in global methylation of DNA in squamous cell carcinoma of the lung (United States). Cancer Causes Control 2003; 14(1): 37-42.
40. Muriel L, Garrido N, Fernandez JL, Remohi J, Pellicer A, de los Santos MJ, Meseguer M. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2006; 85(2): 371-83.
41. Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, Guerin FJ. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. Fertility and Sterility 2007; 87(1): 93-100.

Archive of SID

www.SID.ir

Assessing the sperm DNA damages on Assisted Reproductive Technology outcome

Razavi Sh[1], Nasr-Esfahani MH[2]*, **Tavalaee M[3],** Ameri A[4]

Abstract

Introduction: Spermatozoa from infertile men often have multiple structural and functional defects. Sperm DNA damage is one of these defects that may result from DNA fragmentation, abnormal chromatin packaging, and epigenetic defects. In this study the effect of sperm DNA damages on Assisted Reproductive Technology (ART) outcome is investigated.

Materials and Methods: This study is an experimental research. Semen samples were obtained from 92 couples referred to Isfahan Fertility and Infertility Center for Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI) and In Vitro Fertilization (IVF) treatment. Samples were examined for concentration, morphology and motility according to the WHO guidelines. Semen samples were processed for routine ICSI and IVF using discontinuous Pure Sperm Gradients. After insemination of oocytes, the remaining semen samples were used for evaluation of global DNA methylation, protamine deficiency, and DNA fragmentation using immunostaining, Chromomycin A3 (CMA3) and Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test. Data was analyzed using descriptive statistics, t-test and correlation coefficient.

Results: The percentage of CMA3 showed a significant positive correlation with percentage of normal morphology, DNA fragmentation and fertilization rate ($p<0.05$). However, no correlation was found between sperm normal morphology and global DNA methylation. In addition, percentage of DNA fragmentation showed a significant negative correlation with fertilization rate in ICSI patients ($p= 0.03$), percentage of normal morphology and global DNA methylation. However, this parameter did not significantly affect fertilization rate in IVF patients. During this study, analysing the relation between protamine deficiency, global DNA methylation and DNA fragmentation with cleavage, embryo quality score and pregnancy was done. No significant correlations were observed between these parameters.

Conclusion: Semen samples are heterogeneous population, and may contain sperm with different defects. Sperm defects such as protamine deficiency DNA fragmentation, which was assessed during this study, may affect fertilization but does not affect subsequent development and pregnancy. However, effect of these defects on future of ART children awaits further research.

Keywords: DNA methylation, protamine, deficiency, DNA fragmentation, In Vitro Fertilization, Intra Cytoplasmic Sperm Injection, Chromomycin A3

*Corresponding author;
Email: mh_nasr@med.mui.ac.ir
Adress: Department of embryology and andrology, Royan Institute and Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran.

1 - Associate professor, department of Anatomy, school of medicine, Isfahan University of medical science Isfahan, Iran.
2 - Associate professor, department of embryology and andrology, Royan Institute and Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran.
3 - Lecturer, MSc of biology, department of embryology and andrology, Royan Institute of Isfahan, Isfahan, Iran.
4 -MSc student of biophysics, school of basic sciences, Tehran University, Tehran, Iran.

Archive of SID

www.SID.ir