

Origins and Evaluation of DNA Damage in Infertile Individual

Nasr-Esfahani M.H., Ph.D. *, Tavalae M., M.Sc., Deemeh M.R., M.Sc.

** P.O.BOX: 19395-4644, Department of Andrology and Embryology, Center of Reproductive Medicine Research, Royan Institute, (Isfahan campus), ACECR, Tehran, Iran*

Abstract

Assisted reproductive techniques (ART) are considered as the first line of treatment in overcoming infertility. The scope of success of these methods depend on several factors including integrity of sperm and oocyte. Obviously, paternal genomic content has an important effect on fertilization potential in infertile couples. Thus, sperm DNA damage is a genomic disorder that exists in different degree in infertile men. Since the first reports on sperm DNA integrity, this subject has become the focus of numerous studies. It has been reported that individuals with high percentage of sperm DNA damage have lower sperm parameters and, fertilization rate. Therefore, this review is based on our current understanding of mechanisms involved in sperm DNA damage and also will describe different procedures for evaluation of sperm DNA damage.

Key word: DNA damage, Protamine deficiency, Apoptosis, Oxidative stress, Infertility.

بررسی منشاء آسیب DNA اسپرم و شناخت روش‌های بررسی آن در افراد نابارور

محمدحسین نصر اصفهانی Ph.D.* و**، مرضیه تولایی M.Sc.*، محمدرضا دیمه M.Sc.**

*گروه آندروولوژی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی

(پایگاه تحقیقات علوم سلولی اصفهان) تهران، ایران

**مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ وصول: خردادماه ۸۷، تاریخ پذیرش: شهریورماه ۸۷

چکیده

امروزه استفاده از روش‌های کمک باروری (ART) بهترین گزینه برای رفع مشکلات زوج‌های نابارور است. میزان موفقیت این روش‌ها به عوامل متعددی از جمله سلامت کامل تخمک و اسپرم بستگی دارد. در این میان سلامت ژنوم پدری اهمیت زیادی در میزان پتانسیل باروری زوج‌ها دارد. بنابراین آسیب DNA اسپرم یک اختلال ژنومی است که به میزان متفاوت در مردان نابارور وجود دارد. از زمانی که اولین گزارش در مورد آسیب DNA اسپرم منتشر شد مطالعات وسیعی در این زمینه انجام گرفته و مشخص شده که در افراد دارای میزان بالای آسیب DNA، پارامترهای اسپرمی پایین و قدرت باروری نیز کاهش می‌یابد. بنابراین با توجه به اهمیت سلامت DNA، هدف این مقاله مروری، بررسی منشاء و مکانیسم‌های دخیل در ایجاد آسیب DNA و همچنین معرفی روش‌های متداول برای ارزیابی آسیب‌های کروماتین اسپرم است.

کلیدواژه‌ها: آسیب DNA، کمبود پروتامین، آپوپتوز، استرس اکسیداتیو، ناباروری.

مقدمه

تخمک (ICSI) این سد وجود نداشته و بنابراین ایمن بودن روش ICSI همیشه مورد نگرانی بوده است. در ضمن تحقیقات نشان داده است که انتخاب اسپرم توسط پارامترهای معمولی (غلظت، مورفولوژی، تحرک) نمی‌تواند گویای سلامت DNA اسپرم باشد [۴-۱]. مطالعات بیانگر این مطلب است که در تخمک‌های لقاح یافته با اسپرم‌های دارای آسیب بالای DNA، میزان لانه‌گزینی و بارداری به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. اگرچه ژنوم

امروزه از روش‌های کمک باروری برای درمان ناباروری استفاده می‌شود. میزان موفقیت این روش‌ها به سلامت و بلوغ گامت‌های زوجین وابسته است. طی لقاح طبیعی و روش لقاح آزمایشگاهی (IVF: In Vitro Fertilization) احتمال نفوذ اسپرماتوزوای غیربالغ و ناسالم به‌داخل تخمک توسط سد زوناپلوسیدا به حداقل می‌رسد در صورتی که در روش میکرواینجکشن یا تزریق مستقیم اسپرم به‌داخل سیتوپلاسم

آدرس مکاتبه: ایران، تهران، پژوهشکده رویان، گروه آندروولوژی - جنین‌شناسی و

سلول‌های بنیادی، صندوق پستی: ۶۶۴۴-۱۹۳۹۵

E-mail: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

عوامل درون بیضه‌ای یا خارج از بیضه‌ای است. اگرچه آسیب DNA اسپرم در مردان نابارور شناسایی و به نقص در مرحله اسپرماتوزن مربوط است، ولی اسپرم افراد بارور نیز میزان قابل تشخیصی از آسیب DNA را به همراه دارد [۱۰].

اسپرماتوزن شامل تکثیر سلول‌های جنسی مذکر (germ cell)، تقسیم میوز و تمایز اسپرماتید به اسپرماتوزوا است. بنابراین آسیب DNA اسپرم یا ساختار کروماتین آن می‌تواند در هر مرحله از اسپرماتوزن رخ دهد [۹]. آسیب DNA در اسپرماتوزوای بالغ می‌تواند به علت نقایصی در بسته‌بندی کروماتین باشد که از شکستگی‌های آندوژنی در DNA ناشی می‌شود یا ناشی از روند آپوپتوز قبل از انزال اسپرم‌ها باشد. به علاوه میزان بالای تولید ROS نیز می‌تواند منجر به آسیب DNA شود [۱۱-۱۳]. افزون بر این، فاکتورهای محیطی مانند سن، مصرف دارو و سیگار، فاکتورهای هورمونی و افزایش دمای بیضه‌ها و بیماری‌هایی مانند واریکوسل نیز از دیگر دلایل ایجاد آسیب در DNA اسپرم به شمار می‌روند [۱۰ و ۱۷-۱۴] که در این مطالعه فقط به مکانیسم عوامل اصلی ایجاد کننده آسیب DNA و به روش‌های ارزیابی آن پرداخته و به عوامل محیطی آن اشاره نمی‌شود.

بسته‌بندی غیرطبیعی کروماتین

ساختار کروماتین اسپرم برخلاف سلول‌های سوماتیک که ساختار هیستونی دارد از پروتئین‌های بیضه‌ای تشکیل شده است. در پستانداران ۳ نوع از این پروتئین‌ها وجود دارد، پروتامین ۱ که عمده‌ترین پروتئین اتصالی به DNA است، پروتامین ۲ که فقط در برخی از گونه‌ها بیان می‌شود و پروتئین‌های انتقالی که هنگام جابه‌جایی هیستون با پروتامین به عنوان پروتئین‌های واسطه عمل می‌کنند. طی مرحله اسپرمیوزن، در حدود ۸۵ درصد این هیستون‌های بیضه‌ای توسط پروتامین‌ها جایگزین می‌شود و علت باقی ماندن ۱۵

آسیب دیده پدری، طی رشد جنینی می‌تواند دستخوش پردازش قرار گیرد، ولی در صورت وجود آسیب‌های زیاد، احتمال کاهش رشد جنین وجود داشته و اگر میزان نقص‌ها کمتر باشد، می‌تواند نقایص بعد از تولد را به همراه داشته باشد. به همین دلیل، در دسته‌ای از بیماران، نوزادان متولد شده توسط روش ICSI دارای نقص ژنتیکی بیشتری نسبت به نوزادان طبیعی هستند. لازم به ذکر است که تحقیقات متعدد در این زمینه، نتایج ضد و نقیصی را گزارش کرده‌اند [۵-۸].

تجربیات به دست آمده از روش‌های کمک باروری نشان می‌دهد، چنانچه اسپرم با میزان بالایی از آسیب DNA، در روند IVF و ICSI وارد تخمک شود سیستم ترمیمی تخمک ممکن است توانایی ترمیم این آسیب‌ها را نداشته و در بسیاری از موارد با وجود موفقیت در لقاح، سلول‌های جنسی توانایی تشکیل جنین یا ادامه تکامل را تا مرحله بعد از ۴ تا ۸ سلولی که مصادف با فعال شدن ژنوم است، ندارند. براساس تحقیقات مشخص شده که توانایی ترمیم تخمک وابسته به سن مادر بوده و تخمک‌های افراد جوان، از قدرت ترمیم DNA بالایی برخوردارند [۲ و ۹].

به علاوه تحقیقات متعدد در زمینه آسیب DNA بیانگر این هستند که ارتباط معنی‌داری بین آسیب DNA و میزان لقاح وجود ندارد ولی بین آسیب DNA اسپرم و تشکیل جنین، بلاستوسیت، رشد جنین و بارداری ارتباط معکوس و معنی‌داری وجود دارد [۲، ۵ و ۹]. بنابراین با توجه به اهمیت سلامت DNA، هدف این مقاله مروری بررسی عوامل دخیل در ایجاد آسیب DNA و همچنین معرفی روش‌های متداول برای ارزیابی آسیب‌های کروماتین اسپرم است.

منشاء آسیب DNA اسپرم

دلایل ایجاد آسیب در DNA اسپرم مانند دلایل ایجاد ناباروری در مردان پیچیده و وابسته به فاکتورهایی از جمله

نقش آپوپتوز در آسیب DNA اسپرم

طی روند اسپرماتوژنز در پستانداران، مرگ سلول‌های زاینده رخ می‌دهد و به نظر می‌رسد که این مرگ برنامه‌ریزی شده باعث حذف ۲۵ درصد از اسپرم‌ها می‌شود. مرگ انتخابی سلول‌ها به صورت طبیعی نقش مهمی را در روند اسپرماتوژنز ایفاء می‌کند [۲۵ و ۲۶].

مرگ سلول‌ها به طور عمده توسط مکانیزم آپوپتوز که یک پدیده فیزیولوژیک همراه با یکسری وقایع آبخاری است، رخ می‌دهد. مطالعات متعدد روی موش نشان می‌دهد که فاکتورهای پرو و آنتی آپوپتوز نقش مهمی را طی روند اسپرماتوژنز و ایجاد هموستاز در سلول‌های زاینده ایفاء می‌کند. به‌علاوه سلول‌های سرتولی از طریق سیستم FAS (apoptosis stimulating fragment) می‌توانند آپوپتوز را شروع و میزان آن را تنظیم کنند. این سیستم فعالیت خود را از طریق واکنش بین پروتئین FAS با لیگاند خود (FAS) انجام می‌دهد. همچنین فعالیت‌های آبخاری در روند آپوپتوز شامل فعال شدن اندونوکلائازها که شکست در رشته‌های DNA را القاء می‌کند نیز هست [۱۰]. تخریب DNA به قطعات ۱۸۵ kb یکی از نشانه‌های مشخصه آپوپتوز و مرگ سلولی است که از همین خاصیت برای شناسایی سلول‌های آپوپتوز شده، استفاده می‌کنند [۱۰].

روند آپوپتوز دو نقش عمده را طی اسپرماتوژنز طبیعی ایفاء می‌کند که عبارتند از کاهش سلول‌های زاینده به آن تعدادی که توسط سلول‌های سرتولی حمایت شود و همچنین حذف انتخابی اسپرم‌های غیرطبیعی [۲۷]. طی این روند بسیاری از سلول‌های ناکارآمد از جمله سلول‌های مسن، نابالغ یا آسیب دیده حذف می‌شوند. پیامد آپوپتوز رخ دادن یکسری از وقایع از جمله اختلالات غشای سلول، نا منظم شدن اسکلت سلولی، متراکم شدن هسته و قطعه قطعه شدن ساختار DNA است [۱۰، ۱۸ و ۲۷]. به‌علاوه یکسری پروتئین‌های

درصد هیستون‌ها، احتمالاً به دلیل نقش ژن‌های موجود در این قسمت‌ها در لقاح، رشد اولیه جنینی و بیان یکسری از ژن‌ها از جمله ژن‌های اثرگذار (Imprinting) است [۲۱-۱۸]. همراه با جابجایی هیستون‌ها، پروتئین‌های غنی از آرژینین و سیستئین طی عبور از اپیدیدیم، گروه‌های سولفیدریل آزاد سریعاً اکسید شده و باعث تشکیل پیوندهای S-S دی‌سولفیدی می‌شود. وجود این پیوندها دلیل پایداری ساختار کروماتین است. همچنین وجود مولکول‌های Zn باعث به‌وجود آمدن پیوندهای غیرکووالان s...Zn...s می‌شود که این پیوندها نیز در افزایش پایداری ساختار کروماتین مؤثر هستند [۷]. پس از لقاح دوباره هیستون‌های موجود در ژنوم تخمک جایگزین پروتئین‌ها شده و فرایند متراکم شدن کروماتین خاتمه می‌یابد. در حقیقت نقص در محتوای میزان پروتئین در مردان نابارور بیانگر عدم متراکم شدن صحیح کروماتین برای روند لقاح طبیعی، مستعد شدن به آسیب DNA، تراکم زودرس کروماتین (PCC) بعد از انجام ICSI بوده و با عدم فعال شدن تخمک همراه است [۲۲ و ۲۳].

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که در مردان نابارور نسبت هیستون/ پروتئین نسبت به افراد بارور بیشتر است. وجود نقص در نسبت هیستون/ پروتئین باعث نقص در تراکم کروماتین اسپرم شده که همین امر مستعد شدن DNA اسپرم برای آسیب در مقابل شوک‌های خارجی را به‌دنبال دارد. نتایج اخیر بیانگر یک ارتباط مستقیم بین کمبود پروتئین و آسیب DNA و در نتیجه کاهش میزان لقاح در این بیماران است [۹، ۷ و ۱۱]. ساکاس (Sakkas) و همکاران در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که درصد بالایی از اسپرم‌های تزریق شده در ICSI یا نفوذ پیدا کرده طی لقاح IVF یا لقاح طبیعی، توانایی تشکیل پیش هسته‌ها را نداشته‌اند که احتمالاً این تخمک‌ها حاوی اسپرم‌هایی هستند که کروماتین آنها هنوز در مرحله فشردگی باقی مانده یا حاوی تراکم زودرس کروماتین PCC هستند [۲۴].

که آنتی اکسیدان مصرف نموده و آسیب DNA کمتری دارند، شود [۳۵]. همچنین مشخص شده، در افرادی که میزان زواید سیتوپلاسمی در مایع منی زیاد است، مرحله اسپرماتوزن غیرطبیعی بوده و با افزایش میزان تولید ROS همراه هستند [۳۸ و ۳۹].

روش‌های تعیین آسیب DNA اسپرم

سلامت ژنوم اسپرم برای لقاح و تکامل جنین ضروری است. برای بررسی آسیب DNA اسپرم دو روش متفاوت وجود دارد:

روش‌هایی که شکستگی‌های DNA را به هر دو فرم تک رشته و دو رشته تعیین می‌کنند که می‌توان به روش TUNEL (deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) اشاره کرد.

روش‌هایی که سلامت کروماتین اسپرم را با اندازه‌گیری حساسیت کروماتین و مخصوصاً DNA نسبت به دناتوره شدن تحت تیمارهایی خاص ارزیابی می‌کند که می‌توان به روش CMA3، COMET، SCSA و SCD اشاره کرد.

به‌علاوه آزمون‌های دیگری نیز برای ارزیابی کروماتین اسپرم وجود دارد که در ادامه به آن اشاره خواهد شد.

آزمون TUNEL

این آزمون اولین بار توسط گورزیکا (Gorzica) و همکاران در سال ۱۹۹۳ انجام گرفت و برای تشخیص میزان آسیب در دو رشته DNA کاربرد دارد [۴۰]. در این آزمون پایانه‌های DNA فراگمتته شده، تک رشته و دو رشته DNA توسط نوکلئوتیدهایی نشاندار شده، مورد هدف قرار می‌گیرد. واکنش توسط یک پایانه ترانسفرازی کاتالیز می‌شود. این آنزیم دی‌اکسی‌یوریدین تغییر یافته را با بیوتین یا دی‌گوکسی‌ژنین (digoxigenin) در پایانه OH3 از رشته‌ای که شکسته شده

ویژه به نام کاسپاز نیز نقش مهمی را در تنظیم میزان آپوپتوز ایفاء می‌کنند. این پروتئین‌ها ابتدا به‌صورت پروآنزیم در اپیتلیوم لوله‌های منی‌ساز ترشح شده و سپس باعث شروع فعالیت‌های آبشاری دیگری می‌شوند که سیگنال‌های پروآپوپتوز را القاء می‌کند. گیرنده‌های مرگ سلولی در سطح اسپرم مانند FAS و گیرنده TNF α از جمله فاکتورهایی هستند که توسط آنزیم کاسپاز فعال شده و منجر به مرگ سلولی می‌شود [۱۰ و ۱۸].

احتمالاً مکانیسم‌های مختلفی در رابطه با اسپرماتوزوای غیرطبیعی در مایع منی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به نظریه Abortive apoptosis یا فرار از آپوپتوز اشاره کرد به این صورت که وجود مارکرهای آپوپتوز در مایع منی نشان‌دهنده تولید اسپرم غیرطبیعی است که از فرایند آپوپتوز فرار کرده و منجر به بیان نشانگرهای آپوپتوز شده است [۲۸-۳۰].

استرس اکسیداتیو به واسطه ROS

اسپرم به دلیل وجود اسیدهای چرب غیراشباع فراوان در سطح غشای پلاسمایی و همچنین به دلیل کمبود آنزیم‌های محافظتی در سیتوپلاسم در برابر شوک‌های اکسیداتیو بسیار آسیب‌پذیر است. طی دهه گذشته مطالعات نشان داده است که شوک اکسیداتیو باعث ایجاد آسیب غشای پلاسمایی اسپرم شده و احتمالاً بر فعالیت اسپرم تاثیر می‌گذارد و منجر به ناباروری مردان می‌شود. منشاء تولید ROS در مایع منی ابتدا خود اسپرماتوزوآ و سپس لوکوسیت‌های چند هسته‌ای است [۳۱-۳۶].

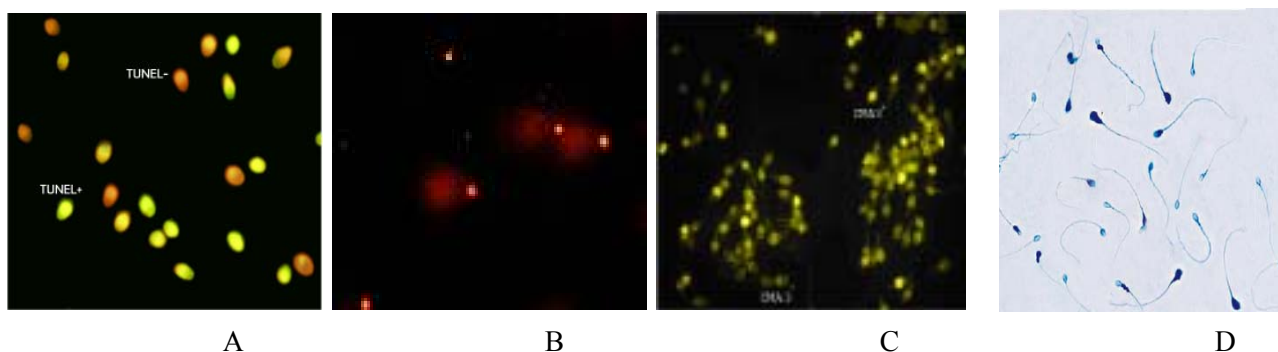
به‌علاوه مطالعات نشان می‌دهد که ارتباط معنی‌داری بین تولید ROS و آپوپتوز وجود دارد که در نهایت منجر به آسیب DNA در اسپرم می‌شود [۳۵ و ۳۷]. لویز (Lopes) و همکاران در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که افزایش تولید ROS می‌تواند منجر به کاهش پارامترهای اسپرمی در مقایسه با افراد طبیعی

می‌دهد، سودمند است. اسپرم‌هایی که دارای DNA فراگمتته شده هستند دارای شکلی شبیه قطره اشک بوده که به دلیل مهاجرت و کشیدگی قطعات کوتاه DNA است و شدت رنگ آمیزی دم بیانگر مقدار شکستگی در DNA است که از قطب منفی به سمت قطب مثبت حرکت می‌کند و این مقدار حرکت نشان‌دهنده درجات متفاوتی از فراگمتتاسیون DNA است [۴۳]. تامسو (Tomsu) و همکاران در سال ۲۰۰۲ اذعان داشتند که آزمون COMET در ناحیه دم و سر برای پیشگویی کیفیت جنین و نتایج IVF مخصوصاً در زوج‌هایی که ناباروری با فاکتورهای نامشخص دارند، سودمند است. افزایش آسیب DNA باعث عدم موفقیت در تکامل جنین پس از ICSI می‌شود [۴۴]. به علاوه، نصر اصفهانی (Nasr-Esfahani) و همکاران در سال ۲۰۰۵ میزان فراگمتتاسیون را به روش COMET ارزیابی و بیان کردند، آسیب DNA بیشتر در اسپرم‌هایی رخ می‌دهد که کاهش در محتوای پروتامین دارند. همچنین برخلاف کمبود پروتامین، آسیب DNA اسپرم مانع از فرآیند لقاح نمی‌شود. با این وجود، جنین‌هایی که دارای اسپرم با بالایی از آسیب DNA هستند، توانایی کمتری برای رسیدن به مرحله بلاستوسیست را دارند [۴۵، ۴۶] (شکل ۱B).

است، ترکیب می‌شود. سپس نوکلئوتیدهای تغییر یافته توسط آنتی‌بادی فلورسنت تعیین می‌شود. نوکلئوتید به‌طور مستقیم می‌تواند با فلئوکروم نشاندار شود. رنگ فلورسنت مشاهده شده در هر اسپرم، نشانگر افزایش تعداد شکستگی‌های DNA است. درصد اسپرم‌های رنگ گرفته بیانگر میزان آسیب DNA اسپرم است. برای تشخیص اسپرم‌های آسیب دیده می‌توان از دو روش مشاهده مستقیم با میکروسکوپ فلورسنت و دستگاه فلوسایتمتری استفاده کرد [۴۰] (شکل ۱A).

روش COMET

روش COMET برای تعیین فراگمتتاسیون DNA در سلول‌های اسپرم در سال ۱۹۸۴ توسط اوستینگ (Ostling) و جانسون (Johanson) با توجه به مقالات الیوا (Oliva) معرفی شد که آن‌ها از شرایط بافاری خنثی برای شکستگی‌های دورشته DNA استفاده می‌کردند. با کمی تغییرات از بافر الکتروفورز، آلکالین برای افزایش حساسیت هم شکستگی‌های تک رشته‌ای و هم شکستگی‌های دو رشته‌ای DNA استفاده شد [۴۱ و ۴۲]. این روش به دلیل این که انواع مختلف فراگمتتاسیون DNA مانند نکروز و آپوپتوز را تشخیص

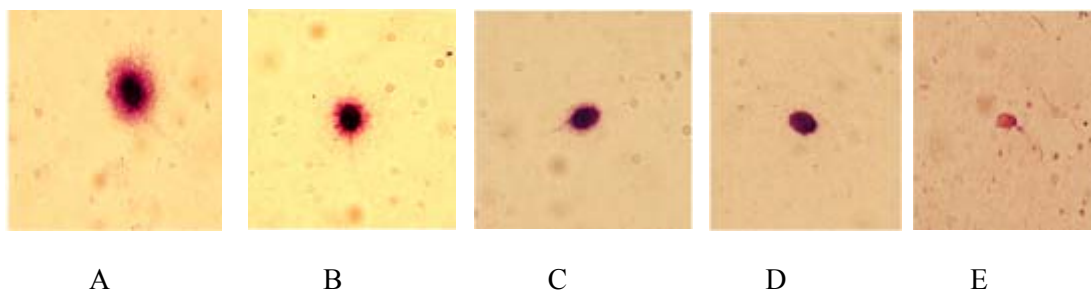


شکل ۱. ارزیابی آسیب DNA توسط A: TUNEL، B: COMET، C: CMA3 و D: Aniline blue

هسته تشکیل می‌شود. پس از تیمار با اسید، اسپرماتوزوایی که داری DNA فراگمتته شده است، پراکندگی لوپ‌های DNA به دام افتاده و بیانگر محدود شدن هاله‌ها یا عدم وجود آن‌هاست [۴۷] که متفاوت از اسپرم‌هایی است که فاقد فراگمتتاسیون DNA است. اندازه هاله‌ها براساس نوع رنگ‌آمیزی، توسط میکروسکوپ نوری یا فلورسنت بررسی می‌شود [۴۸] (شکل ۲).

Sperm chromatine dispersion test

با توجه به مکانیسم متراکم شدن بیشتر DNA در اسپرم نسبت به سلول‌های سوماتیک، با استفاده از این آزمون می‌توان درجات متفاوتی از فراگمتتاسیون DNA را با استفاده از بافر لیز کننده- که منجر به شکسته شده باندهای دی سولفید و خارج شدن پروتئین‌ها می‌شود- ارزیابی کرد. در این حالت لوپ‌های DNA خارج شده و هاله‌ای اطراف ساختار مرکزی



شکل ۲. آزمون Sperm chromatin dispersion.

A&B: اسپرم با اندازه بزرگ و متوسط هاله (بدون فراگمتتاسیون DNA)، C, D, & E: حالت‌های متفاوتی از فراگمتتاسیون DNA

امر می‌تواند با تراکم زودرس کروموزومی یا فاکتورهای دیگر مانند نقایص آکروزومی یا فاکتورهای فعال کننده تخمک وابسته به اسپرم (SAOAF)^۱ در ارتباط باشد [۲۲، ۲۳، ۵۶] (شکل ۱C).

(SCSA) Sperm Chromatin Structure Assay

این روش نیز یک روش مناسب برای بررسی میزان آسیب DNA است که وابسته به رنگ فلورسنت بوده و براساس خاصیت دناتوره شدن ساختار DNA در مقابل حرارت یا القای اسیدی استوار است. در این روش از رنگ‌آمیزی اکریدین

کرومومایسین A3 (CMA3)

کرومومایسین A3 (Chromomycin A3: CMA3) یک فلوروکروم است که با مولکول پروتئین برای اتصال به شیار کوچک DNA دو رشته‌ای رقابت می‌کند. طی روند اسپرماتوژنز قسمت عمده هیستون‌ها با پروتئین جابه‌جا شده تا کروماتین اسپرم متراکم شود [۴۹-۵۱]. بنابراین رنگ‌آمیزی CMA3 یک روش حساس و مفید برای بررسی وضعیت تراکم کروماتین و بررسی محتوای پروتئین به‌طور غیرمستقیم است. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که بین کمبود پروتئین کروماتین اسپرم (CMA3 مثبت) و میزان لقاح بعد از ICSI رابطه معنی‌داری وجود دارد [۵۲-۵۵]. مطالعات قبلی نیز نشان می‌دهد که کمبود پروتئین با عدم لقاح رابطه دارد. دلیل این

1. Sperm associated oocyte activating factors

و [۶۱]. به علاوه، ارویندان و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که بین آزمون‌های SCSSA، COMET و TUNEL برای بررسی میزان آسیب DNA یک رابطه معنی داری وجود دارد [۶۲]. هر چند روش‌های فلورسنت دیگری مانند AO قادر به تشخیص آسیب DNA هستند اما تحقیقات نشان داده است که آزمون SCSSA یک روش مطمئن تر است [۵۰ و ۵۷].

آنیلین بلو

برای بررسی تراکم کروماتین اسپرم می‌توان از رنگ‌های آنیلین بلو و تولوئیدین بلو استفاده کرد [۶۳]. تراکم (Traquem) و دادون (Dadoue) در سال ۱۹۸۳ نشان دادند که رنگ‌آمیزی آنیلین بلو اسیدی به‌طور خاص وجود هیستون‌های اضافی را در ساختار کروماتین اسپرم نشان می‌دهد [۶۴]. طی جابه‌جایی هیستون‌ها با پروتئین‌ها و تراکم کروماتین در مرحله اسپرمیوژنز، اسپرم‌های طبیعی رنگ آنیلین بلو را به خود نمی‌گیرند، ولی اسپرم‌هایی که تراکم ناقص دارند یا بلوغ کافی را طی نکرده‌اند این رنگ را به خود می‌پذیرند [۶۵] و [۶۶]. دادون (Dadoue) در سال ۱۹۸۸ نشان داد که ۲۰ درصد از اسپرم‌های طبیعی در مردان بارور با آنیلین بلو رنگ می‌شوند. همچنین هافمن (Hofmann) در سال ۱۹۹۰ نیز این اطلاعات را تأیید کرد [۶۷ و ۶۸]. به علاوه مطالعات متعددی نشان داده‌اند که میزان رنگ‌پذیری اسپرم‌ها در مردان نابارور بیشتر از مردان بارور است و همچنین یک رابطه معنی دار بین میزان رنگ‌پذیری آنیلین بلو و نتایج IVF وجود دارد [۵۰ و ۲۳] (شکل ۱D).

در حال حاضر مقالات متعددی در ارتباط با تأثیر آسیب DNA اسپرم روی روش‌های کمک باروری منتشر شده است. اگر چه اسپرم با DNA غیرطبیعی می‌تواند با تخمک لقاح یابد، اما ممکن است منجر به ناهنجاری‌هایی طی تکوین و پس از آن شود. در این راستا روش‌های مختلفی برای بررسی

اورانژ استفاده می‌شود [۱۸]. برای تشخیص اسپرم‌های دارای آسیب DNA از دستگاه فلوسایتومتری که توانایی شمارش تعداد زیادی اسپرم را دارند، استفاده می‌شود [۱۸]. اکریدین اورانژ یک رنگ متاکروم است که هنگام اتصال به DNA دناتوره شده به رنگ قرمز در می‌آید ولی در حالت اتصال به DNA با ساختار طبیعی به رنگ سبز خود را نمایان می‌کند. روش SCSSA چند پارامتر را مورد بررسی قرار می‌دهد: شاخص آسیب DNA (DFI) که میزان شکست‌های تشخیص داده شده در ساختار DNA را بیان می‌کند و HDS^۲ که بیانگر شکستگی‌ها در دو رشته DNA بوده و نقایص جابه‌جایی هیستون با پروتئین را نشان می‌دهد. آگاروال (Agarwal) و همکاران در سال ۲۰۰۵ اذعان داشتند، با استفاده از آزمون SCSSA، می‌توان بارداری را پیشگویی کرد؛ هنگامی که میزان DFI بالاتر از ۲۸-۳۰ درصد باشد، میزان درصد بارداری کاهش می‌یابد [۵۷ و ۵۸].

ایونسون (Evenson) و همکاران در سال ۲۰۰۲ براساس اطلاعات به دست آمده از پتانسیل باروری، افراد را از نظر میزان آسیب DNA به ۴ گروه تقسیم بندی کرده‌اند. گروه عالی ۱۵ درصد <DFI، گروه خوب ۲۴-۱۵ DFI، گروه متوسط DF=۲۵-۳۰I و گروه ضعیف DFI >۳۰ و هنگامی که شاخص HDS بیشتر از ۱۵ باشد، پتانسیل باروری در مردان تنها در یک گروه طبقه‌بندی می‌شود [۵۹]. دو مطالعه مستقل از هم در آمریکا و اروپا نشان داده است که اگر میزان آسیب DNA بررسی شده توسط SCSSA بیشتر از ۳۰ درصد باشد، پتانسیل باروری مردان بسیار کاهش می‌یابد و این پارامتر مستقل از دیگر پارامترها مانند غلظت، حرکت و مورفولوژی است [۶۰].

1. DNA fragmentation index

2. High DNA stainability

معرفی شده است. بنابراین شناخت این روش‌ها برای استفاده معمول از آن‌ها در مراکز بالینی برای انجام روش‌های کمک باروری مورد نیاز است.

آسیب‌های DNA اسپرم ارائه شده که در مقاله مروری حاضر منشاء و مکانیسم‌های دخیل در ایجاد آسیب DNA بررسی و همچنین روش‌های متداول ارزیابی آسیب‌های کروماتین اسپرم

References

1. **Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, et al.** Effect of sperm DNA damage and sperm CMA3 staining on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online* 2005; 11(2): 198-205.
2. **Tavalaee M, Razavi R, Nasr-Esfahani MH.** Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2008; in press.
3. **Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez J.** Evaluation of sperm DNA damage. *Actas Urol Esp* 2007; 31(2): 120-31.
4. **Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vaezi GH, Shiravi AH, Tavalaee M.** Effect acrosome activity and morphology on fertilization post ICSI. *Med J Reprod Infertil* 2006; 7: 217-24
5. **Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR.** The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 2002; 17(4): 990-8.
6. **Tavalaee M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH.** Effects of spermiogenesis defecys on Fertilization and pregnancy rate in IVF patients. *Yakhteh* 2007; 9:103-10 (Persian).
7. **Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Tavalaee M, Ameri A.** Assessing the sperm DNA damage on ART outcome. *J Arak University of Medical Sciences.* 2008; 11: 21-33.
8. **Shayesteh M, Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Nazem HA, Deemeh MR, Tavalaee M.** The efficiency of Zeta method in separation of sperm with normal morphology and chromatin structure. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2008; 10: 20-7.
9. **Mardani M, Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Shirazi R, Tavalaee M.** Differentiation between the effect of protamine deficiency and failed oocyte activation on fertilization post ICSI. *J Ir Anat Sci.* 2006;4: 95-103 (Persian).
10. **Ozmen B, Koutlaki N, Youssry M, Diedrich K, Al-Hasani S.** DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. *Reprod Biomed Online* 2007; 14(3): 384-95 (Review).
11. **Zini A, Libman J.** Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction. *Curr Opin Urol* 2006; 16(6):428-34 (Review).
12. **Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ, et al.** Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 2004; 19: 129-38.
13. **Aitken RJ, Krausz C.** Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001; 12: 497-506.
14. **Schmid TE, skenazi BE, Baumgartner A, Marchetti F, Young S, Weldon R, et al.** The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum Reprod* 2007; 22: 180-7.
15. **Stahl O, Eberhard J, Jepson K, Spano M, Cwikiel M, Cavallin-Ståhl E, et al.** Sperm DNA integrity in testicular cancer patients. *Hum Reprod* 2006; 21(12): 3199-205.
16. **Gaur DS, Talekar M, Pathak VP.** Effect of cigarette smoking on semen quality of infertile men. *Singapore Med J* 2007;48(2): 119-23.
17. **Nasr-Esfahani MH, Abasi H, Razavi S, Ashrafi**

- S, Tavalae M. **Varicolectomy**: semen parameters and protamine deficiency. *Int J Androl* 2007 [Epub ahead of print].
18. **Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, Borini A.** Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2007; 14(6): 746-57.
19. **Aoki VW, Carrell DT.** Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian J Androl.* 2003; 5(4): 315-24 (Review).
20. **Carrell DT, Emery BR, Hammoud S.** Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update* 2007; 13 (3): 313-27 (Review).
21. **Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M.** The role of sperm chromatin anomalies on the outcome of assisted reproduction techniques. *Yakhteh* 2006; 28: 206-66 (Persian).
22. **Nasr-Esfahani MH, Razavi SH, Tavalae M.** Failed Fertilization post ICSI and Spermiogenic Defects. *Fertil Steril* 2008; 89(4): 892-8.
23. **Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghdam A.** Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. *Andrologia* 2003; 35(4): 238-43.
24. **Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U.** Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod.* 1999;4(1):31-7 (Review).
25. **Angelopoulou R, Karayiannis V.** Proliferation and apoptosis of germ cells. *Arch Hell Med* 2000; 17: 477-90.
26. **Blanco-Rodriguez J, Martinez-Garcia C.** Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif* 1996; 29: 13-31.
27. **Angelopoulou R, Plastira K, Msaouel P.** Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; 30: 5-36.
28. **Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D.** Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002; 66(4): 1061-7.
29. **Sakkas D, Mariethoz E, St John JC.** Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 1999; 251(2): 350-5
30. **Aitken RJ, Baker MA, Sawyer D.** Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reprod Biomed Online* 2003; 7(1): 65-70.
31. **Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF.** Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 1998; 13(4): 896-900.
32. **Aitken RJ, De Iuliis GN.** Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 2007; 14(6): 727-33 (Review).
33. **Aitken RJ, Baker MA.** Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol.* 2006; 250(1-2): 66-9 (Review).
34. **Aitken RJ, Baker MA.** Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev* 2004; 16(5): 581-8 (Review).
35. **Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF.** Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; 13(4): 896-900.
36. **Hammadeh ME, Radwan M, Al-Hasani S, Micu R, Rosenbaum P, Lorenz M, et al.** Comparison of reactive oxygen species concentration in seminal plasma and semen parameters in partners of pregnant and non-pregnant patients after IVF/ICSI. *Reprod Biomed Online* 2006; 13(5): 696-706.
37. **Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ.** DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J*

- Androl 2000; 21(1): 33-44.
38. **Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD.** Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod* 1997; 56(4): 1020-4.
 39. **Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, et al.** Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol Reprod Dev* 1997;47(4): 468-82.
 40. **Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z.** Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to degeneration in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993; 207: 202-5.
 41. **Ostling O, Johanson KJ.** Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual cells. *Biochem.Biophys. Res.Commun* 1984; 123: 291-8.
 42. **Raman RS, Chan PJ, Corselli JU, Patton WC, Jacobson JD, Chan SR, et al.** Comet assay of cumulus cell DNA status and the relationship to oocyte fertilization via intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2001; 16: 831-5.
 43. **Duty SM, Singh NP, Ryan L, Chen Z, Lewis C, Huang T, et al.** Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. *Hum Reprod* 2002; 17: 1274-80.
 44. **Tomsu M, Sharma V, Miller D.** Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Hum Reprod* 2002; 17(5): 1274-80.
 45. **Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Mardani M, Bahramian H, Steger K, et al.** Effect of protamine-2 deficiency on ICSI outcome. *Reprod Biomed Online* 2004; 9(6): 652-8.
 46. **Salehi M, Nasr-Esfahani MH, Razavi SH, Mardani M, Bahramian H, Oreizi F.** The relation between sperm protamine aberrations with protamine P1/P2 ratio. *Yakhteh* 2005; 24: 212-7 (Persian).
 47. **Fernaández 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.
 48. **Deemeh MR, Tavalae M, Razave S, Nasr-Esfahani MH.** Evaluation of protamine deficiency and DNA fragmentation in two globozoospermia patients undergoing ICSI. *Ir J Fertil Steril* 2007; 1(2): 85-8.
 49. **Iranpour FG, Nasr-Esfahani MH, Valojerdi MR, al-Taraihi TM.** Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17(1): 60-6.
 50. **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(4): 219-25.
 51. **Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, et al.** Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod* 1995; 52: 864-7.
 52. **Tavalae M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH.** Effects of sperm acrosomal integrity and protamine deficiency on In Vitro Fertilization and pregnancy rate. *Ir J Fertil Steril* 2007; 1(1): 27-34.
 53. **Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M, Shirazi R, Javanmardi S.** Effects of failed oocyte activation and sperm CMA3 staining on fertilization post-ICSI. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 422-9.
 54. **Aoki VW, Liu L, Carrell DT.** Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod* 2005; 20:1298-306.
 55. **Nasr-Esfahani MH, Razavi SH, Mardani M, Mafi A, Moghadam A.** Effect of human sperm

- chromatin anomalies on fertilization outcome post ICSI. *Yakhteh* 2004; 21: 5-10 (Persian).
56. **Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vahdati D, Fathi F, Tavalae M.** Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet* 2008; in press.
 57. **Eggert-Kruse W, Rohr G, Kerbel H, Schwabach B, Demirakca T, Klinga K, et al.** The Acridine Orange test: a clinically relevant screening method for sperm quality during infertility investigation. *Hum Reprod* 1996; 11(4): 784-9
 58. **Agarwal A, Said T.** Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int* 2005; 95(4): 503-7 (Review).
 59. **Evenson DP, Larson KL, Jost LK.** Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparison with other techniques. *J Androl* 2002; 23: 25-43.
 60. **Spanò M, Bonde JP, Hjøllund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G.** Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000; 73(1): 43-50.
 61. **Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al.** Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14(4): 1039-49
 62. **Aravindan GR, Bjordhal J, Jost LK, Evenson DP.** Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp Cell Res* 1997; 236(1): 231-7.
 63. **Krzanowska, H.** Toluidine blue staining reveals changes in chromatin stabilisation of mouse spermatozoa during epididymal maturation and penetration of ova. *J Reprod Fertil* 1982; 64(1): 97-101.
 64. **Terquem, A, Dadoune, JP.** Aniline blue staining of human sperm chromatin: evaluation of nuclear maturation. In Andre, J. (ed.) *The sperm cell.* Martinus Nijhoff, London, 1983, pp 249-52.
 65. **Meistrich ML, Brock WA, Grimes SR, Platz RD, Hnilica LS.** Nuclear protein transitions during spermatogenesis. *Fed Proc* 1978;37(11): 2522-5(Review).
 66. **Dadoune, JP, Alfonsi, MF.** Ultrastructural and cytochemical changes of the head components of human spermatids and spermatozoa. *Gamete Res* 1986; 14, 33-46.
 67. **Dadoune JP, Mayaux MY, Guihard-Moscato ML.** Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia* 1988; 20, 211-7.
 68. **Hofmann N, Hilscher.** Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Hum Reprod* 1991; 6(7): 979-82.