View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۸، شماره ۴/ مهر و آبان ۱۳۹۵/ ۱۹-۹

مقاله پژوهشی

مقایسه ساختار کروماتین و PLCζ اسپرم بین مردان نابارور الیگوآستنوتراتوزواسپرمی (OAT) و بارور

مرضیه تولایی[۱*]، کاظم پریور[۱]، محمد حسین نصر اصفهانی[۳،۲]، عبدالحسین شاهوردی[۴]، کامران قائدی[۶،۵]

[۱]دانشجو، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران؛ [۲]گروه زیست فناوری تولید مثل، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، اصفهان، ایران؛ [۳]مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران؛ [۴]گروه جنین شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران؛ [۵]گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران؛ [۶]گروه زیست فناوری مولکولی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۶

چکیده:

زمینه و هدف: **مهم ترین علل عدم فعال شدن تخمک پس از تکنیک های کمک باروری، عدم رهایش فاکتورهای اسپرمی فعال کننده تخمک و آسیب به DNA اسپرم است. PLCζ یکی از فاکتورهای اسپرمی است که در فعال شدن تخمک نقش دارد. هدف از این مطالعه مقایسه PLCζ، کمبود پروتامین (مارکر بلوغ کروماتین اسپرم) و آسیب DNA اسپرم در ۲ گروه افراد بارور و نابارور الیگوآستنوتراتوزواسپرمی است.**

روش بررسی: **در این مطالعه شاهد کنترل، نمونه مایع منی از ۱۰ فرد نابارور الیگوآستنوتراتوزواسپرمی و ۱۰ فرد بارور جمع آوری گردید. پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی)، بیان پروتئین PLCζ، آسیب DNA و کمبود پروتامین به ترتیب بر اساس پروتکل سازمان بهداشت جهانی، فلوسایتومتری، رنگ آمیزی TUNEL و کرومایسین A_3 مورد بررسی قرار گرفت.**

یافته ها: **درصد اسپرم های PLCζ مثبت، سلامت DNA و محتوی پروتامین در افراد نابارور الیگوآستنوتراتوزواسپرمی نسبت به افراد بارور، به طور معنی داری کمتر بود؛ همچنین ارتباط معنی داری بین درصد اسپرم های PLCζ مثبت با پارامترهای اسپرمی و درصد کمبود پروتامین مشاهده گردید. ارتباط معنی داری نیز بین درصد آسیب DNA اسپرم و کمبود پروتامین مشاهده شد.**

نتیجه گیری: **در این افراد نابارور، سلامت کروماتین اسپرم و درصد اسپرم ها با PLCζ مثبت به شدت کاهش یافته است که می تواند یکی از دلایل عدم لقاح در این افراد باشد؛ لذا روش فعال سازی مصنوعی تخمک برای این نوع ناباروران پیشنهاد می شود.**

واژه های کلیدی: **PLCζ، کمبود پروتامین، آسیب DNA، الیگوآستنوتراتوزواسپرمی.**

مقدمه:

روش تزریق اسپرم به درون سیتوپلاسم تخمک (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection= ICSI) یکی از تکنیک های کمک باروری می باشد که به طور گسترده جهت درمان افراد نابارور با فاکتورهای مردانه مورد استفاده قرار می گیرد (۱). میزان لقاح پس از ICSI برابر و یا حتی بالاتر از دیگر روش های کمک باروری گزارش شده است؛ اما در برخی از موارد منجر به عدم موفقیت لقاح می گردد (۲). عدم دستیابی به لقاح می تواند وابسته به عوامل متعددی از جمله، فاکتورهای وابسته به تخمک (مانند ناهنجاری کروموزومی و کیفیت نامناسب آن)، فاکتورهای وابسته به اسپرم (مانند ناهنجاری کروموزومی، نقص در ساختار

نویسنده مسئول: تهران- دانشگاه آزاد اسلامی- واحد علوم و تحقیقات- گروه زیست شناسی- تلفن: ۰۹۱۳۳۱۴۳۴۳۱، E-mail: tavalaee.royan@gmail.com

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:49 +0430 on Tuesday July 18th 2017

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:49 +0430 on Tuesday July 18th 2017

کروماتین) و یا نقص در پروسه انجام تکنیک ICSI باشد (۱). در حدود ۳-۱٪ موارد، عدم موفقیت لقاح به دلیل عدم حضور فاکتورهای اسپرمی فعال کننده تخمک SAOAFs= Sperm associated oocyte-activating factors است که در ناحیه غلاف خلف آکروزومی سر اسپرم قرار گرفته است (۴،۳). در طی لقاح طبیعی، با وارد شدن اسپرم به داخل تخمک، تخمک فعال می شود که با افزایش غلظت کلسیم داخل سیتوپلاسمی همراه می باشد. مطالعات نشان داده اند که افزایش غلظت کلسیم داخل سیتوپلاسمی تخمک در اثر ورود فاکتورهای SAOAFs از اسپرم است (۳-۱). از مهم ترین و اصلی ترین این فاکتورها می توان به پروتئین های PLCζ، PAWP و tr-KIT اشاره نمود که آغازگر آبشار سیگنالی فعال شدن تخمک می باشند و فعال شدن تخمک و به دنبال آن تقسیم و رشد جنینی را منجر می شود (۶،۵). اگرچه در رابطه با معرفی بهترین کاندید SAOAFs در جهان اختلاف نظر وجود دارد؛ اما در حال حاضر محققان بیشتر فاکتور PLCζ را به عنوان محتمل ترین کاندید SAOAFs معرفی می کنند (۸،۷). ژن کد کننده PLCζ در انسان بر روی کروموزوم ۱۲ (12p12.3) قرار دارد و از خانواده آنزیم های فسفولیپاز C می باشد (۲). پروتئین PLCζ یک پروتئین ویژه اسپرمی است که دارای ۲ دومین کاتالیتیکی X و Y است و بین آن ها یک بخش به نام ناحیه اتصال دهنده X-Y وجود دارد. در ناحیه انتهای آمینی این پروتئین، ۴ دومین به نام handsEF (1,2,3,4) (۴،۳،۲،۱) و در ناحیه انتهای کربوکسیلی آن دومین C_2 واقع شده است (۲). تزریق cRNA یا پروتئین نوترکیب PLCζ موش، انسان، میمون، خوک و سایر پستانداران به درون تخمک موش سبب ایجاد نوسانات کلسیم می گردد (۹). Heytens و همکاران اذعان داشته اند که بیان PLCζ در افراد نابارور با کاهش میزان لقاح، پایین است و علت کاهش و یا عدم لقاح پس از ICSI در برخی از افراد نابارور می تواند به دلیل کاهش و یا عدم پروتئین PLCζ باشد؛ بنابراین آن ها این پروتئین را به عنوان یک بیومارکر جهت افراد با کاهش و یا عدم لقاح معرفی کردند که با بررسی این بیومارکر، می توان برای درمان آن ها در مراکز ناباروری از روش فعال سازی مصنوعی تخمک (AOA= Artificial oocyte activation) استفاده نمود تا شانس افزایش میزان لقاح را در این افراد افزایش داد (۱۰). از طرفی دیگر مشخص شده است عدم تراکم اسپرم در طی فرآیند اسپرمیوژنز در حالت معمول باید پروتامین ها جایگزین هیستون های های بیضه ای شوند و تراکم کروماتین در اسپرم ها رخ دهد. یک دلیل دیگر برای افراد نابارور با کاهش و یا عدم لقاح پس از ICSI می باشد. عدم تراکم صحیح کروماتین می تواند منجر به قطعه قطعه شدن DNA گردد و فرآیند شکست در لقاح را تشدید نماید (۱۱). با توجه به اهمیت سلامت ساختار کروماتین اسپرم و PLCζ در طی فرآیند لقاح، در این مطالعه سعی بر آن است که برای اولین بار PLCζ، کمبود پروتامین (مارکر بلوغ کروماتین اسپرم) و آسیب DNA اسپرم در ۲ گروه افراد بارور و نابارور با پارامترهای اسپرمی شدیداً غیر طبیعی که روند اسپرماتوژنز در آن ها بیشتر تحت تأثیر قرار گرفته، مورد مقایسه قرار گیرد. افراد نابارور در این مطالعه، مردان الیگوآستنوتراتوزواسپرمی و افراد بارور کسانی هستند که دارای پارامترهای اسپرمی طبیعی اند و صاحب فرزند می باشند که جهت تعیین جنسیت به هدف حفظ تعادل جنسیت در خانواده، به مرکز باروری و ناباروری مراجعه کرده اند. در صورت کاهش مارکر اسپرمی فعال کننده تخمک (PLCζ) می توان برای این افراد در آینده از روش فعال سازی مصنوعی تخمک استفاده نمود.

روش بررسی:

نمونه مایع منی از افراد نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان جمع آوری شد. این افراد به ۲ گروه تقسیم شدندکه گروه اول شامل ۱۰ مرد نابارور الیگوآستنوتراتوزواسپرمی شدید و گروه دوم شامل ۱۰ فرد بارور که کاندید تعیین جنسیت بودند، می باشد. جهت گرفتن مایع منی این افراد برای استفاده

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:49 +0430 on Tuesday July 18th 2017

در کارهای تحقیقاتی، از آن ها رضایت کتبی گرفته شد. با توجه به اینکه افراد نابارور مورد مطالعه در این طرح، مردان نابارور با پارامترهای اسپرمی شدید بودند، جمع آوری این نمونه ها در حدود یک سال به طول انجامید تا شاخص پارامترهای اسپرمی غیرطبیعی بر اساس سازمان بهداشت جهانی ۲۰۱۰ را داشته باشند (۱۲). ناباروری آن ها فقط با فاکتورهای مردانه بوده و خانم های آن ها باید از سلامت کامل از لحاظ تولید مثلی برخوردار باشند.

نمونه مایع منی افراد بعد از ۴-۳ روز پرهیز از مقاربت جمع آوری شد. نمونه مایع منی افراد از لحاظ پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی) بر اساس معیار سازمان بهداشت جهانی (۲۰۱۰)، بیان پروتئین PLCζ با استفاده از روش فلوسایتومتری، آسیب DNA با استفاده از روش TUNEL و کمبود پروتامین با استفاده از رنگ آمیزی کرومایسین A_3 مورد بررسی قرار گرفت. غلظت نمونه اسپرمی با استفاده از دستگاه شمارش اسپرم (Makler) بر حسب میلیون بر لیتر و میزان تحرک اسپرم به وسیله نرم افزار CASA= Computer Aided Sperm Analysis به صورت درصد، و مورفولوژی اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی پاپانیکولائو بر اساس سازمان بهداشت جهانی (۲۰۱۰) مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۲).

میزان آسیب DNA با استفاده از کیت TUNEL (Apoptosis Detection System (Fluorescein, Promega, Mannheim, Germany بررسی گردید. ابتدا مایع منی دوبار با بافر فسفات سالین (PBS= Phosphate Buffer Saline) شستشو داده شده و پس از تهیه اسمیر بر روی لام و فیکس با پارافرمالدهید ۴٪، در معرض هوا خشک می شود. کیت TUNEL از شرکت پرومگا (آلمان) خریداری شد و طبق دستور العمل آن، اسلایدها رنگ آمیزی شدند. در این روش، رنگ فلئورسنت توسط آنزیم rTdT به انتهای قطعات شکسته DNA اتصال می یابد و fluorescein-12-dUTP، DNA را نشان دار می کند. رنگ سبز فلئورسنت مشاهده شده در ناحیه خلفی سر اسپرم نشانگر اسپرم ها با آسیب DNA و رنگ قرمز نشانگر اسپرم ها با DNA سالم هستند. در هر نمونه در حدود ۲۰۰ اسپرم با استفاده از میکروسکپ فلئورسنت با بزرگنمایی ۱۰۰ (BX51, Olympus, Japan) بررسی گردید (۱۳).

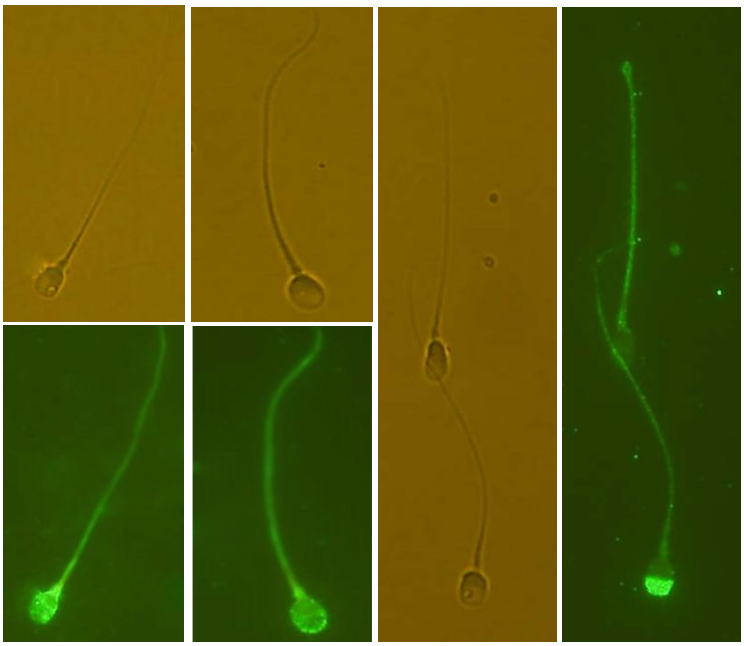
میزان کمبود پروتامین اسپرم با استفاده از رنگ کرومایسین A_3 مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور خلاصه، ابتدا مایع منی دوبار با بافر PBS شستشو داده شده و با محلول کارنوی (متانول و اسید استیک گلاسیال به نسبت ۳:۱) به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد فیکس گردید. پس از تهیه اسمیر و خشک شدن در معرض هوا، هر اسلاید توسط ۱۰۰ میکرولیتر محلول کرومایسین A_3 (CMA_3, Sigma, USA)، ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر بافر مک الوین (Mcllvain Buffer) که حاوی ۱۰ میلی مولار کلرید منیزیم با PH=۷) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی شد؛ سپس لام ها را در محلول بافر PBS دوبار شستشو داده شد و توسط میکروسکوپ فلئورسنت با بزرگنمایی ۱۰۰ بررسی شد. اسپرم ها با رنگ زرد فلئورسنت درخشان در ناحیه خلفی سر اسپرم شانگر اسپرم ها با کمبود پروتامین (CMA_3 مثبت) و رنگ زرد کمرنگ (CMA_3 منفی) نشانگر اسپرم ها با پروتامین طبیعی هستند. در هر نمونه در حدود ۲۰۰ اسپرم شمارش گردید (۱۳).

PLCζ براساس پروتکل تغییر یافته Grasa و همکاران در این مطالعه انجام شد (۱۴). مایع منی دوبار با بافر PBS شستشو داده شد و پس از جداسازی ۴ میلیون اسپرم (کنترل و تست)، با پارافرمالدهید ۴٪ فیکس گردید؛ سپس با بافر PBS به مدت ۵ دقیقه با دوز ۳۰۰۰rpm شستشو داده شد و با تریتون x-100 (۰/۵٪) به مدت ۳۰ دقیقه نفوذپذیر گردید. مجدداً با بافر PBS شستشو داده شد و جهت بلوک کردن جایگاه های غیر اختصاصی BSA (۳٪) در PBS به مدت یک ساعت انکوبه گردید؛ سپس اسپرم ها با آنتی بادی اولیه بر علیه PLCζ (Covalab/ France) در BSA به مدت یک شب در

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:49 +0430 on Tuesday July 18th 2017

دمای ۴ درجه انکوبه شدند. روز بعد، اسپرم ها پس از دوبار شستشو، با آنتی بادی کانجوگه شده به FITC به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند. در نهایت، اسپرم ها پس از دوبار شستشو با بافر PBS، با رنگ PI (Propidium iodide) جهت شمارش اسپرم، رنگ آمیزی شدند. درصد اسپرم های PLCζ مثبت در جمعیت PI مثبت با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (FACSCalibur flow cytometer= Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) از طریق یک لیزر آرگون با طول موج ۴۸۸ نانومتر گزارش گردید. حداقل در هر نمونه ۱۰۰۰۰ اسپرم شمارش و با استفاده از نرم افزار BD CellQuest آنالیز گردید. لازم به ذکر است که جایگاه PLCζ در اسپرم با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت مشاهده گردید که در نواحی مختلف سر اسپرم قابل مشاهده بود (تصویر شماره ۱).

جهت تعیین نرمال بودن توزیع، از آزمون One-sample Kolmogorov-Smirnov استفاده شد و نرمالیتی در سطح ۰/۰۱ بررسی گردید. توزیع نرمال برای متغیرها مشاهده گردید (P=۰/۰۲۲۳۸). آنالیز آماری به وسیله نرم افزار SPSS (SPSS, Chicago, IL, USA) با استفاده از آنالیز Descriptive، Independent-Sample T-Test مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون ضریب همبستگی اسپیرمن جهت ارتباط بین پارامترها استفاده شد. P≤۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته می شود.



تصویر شماره ۱: جایگاه PLCζ در نواحی مختلف سر اسپرم (ناحیه آکروزومی، ناحیه استوایی، ناحیه خلفی) با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت

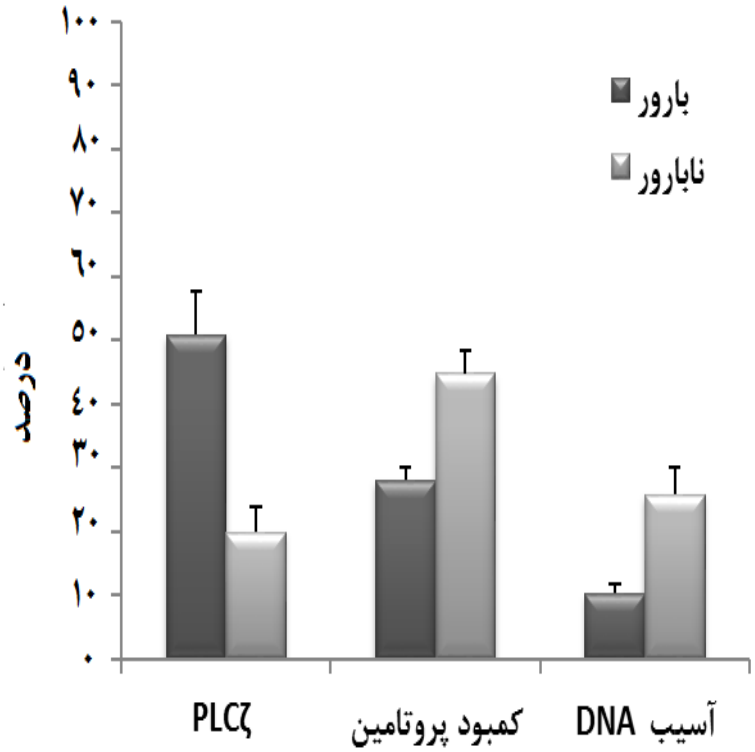
یافته ها:

جمعیت مورد بررسی در این مطالعه شامل ۱۰ فرد نابارور الیگوآستنوتراتوزواسپرمی و ۱۰ فرد بارور می باشد. در این مطالعه، میانگین غلظت اسپرم (میلیون در هر سی سی) در افراد نابارور (۷/۶±۱/۲) به طور معنی داری (P<۰/۰۵) کمتر از افراد بارور (۹۰/۱±۱۳/۰۰) بود. میانگین درصد تحرک اسپرم در افراد نابارور (۲۸/۵±۵/۰۵) به طور معنی داری (P<۰/۰۵) کمتر از افراد بارور (۶۴/۰۰±۲/۷۶) و درصد مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم در افراد نابارور (۹۸/۶±۰/۲۲) به طور معنی داری بیشتر از افراد بارور (۹۵/۶±۰/۴۲) گزارش شد (P<۰/۰۵). اختلاف معنی داری

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:49 +0430 on Tuesday July 18th 2017

در میانگین حجم مایع منی در افراد نابارور (۰/۵۱±۳/۶۲) و افراد بارور (۰/۶۶±۴/۵) مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

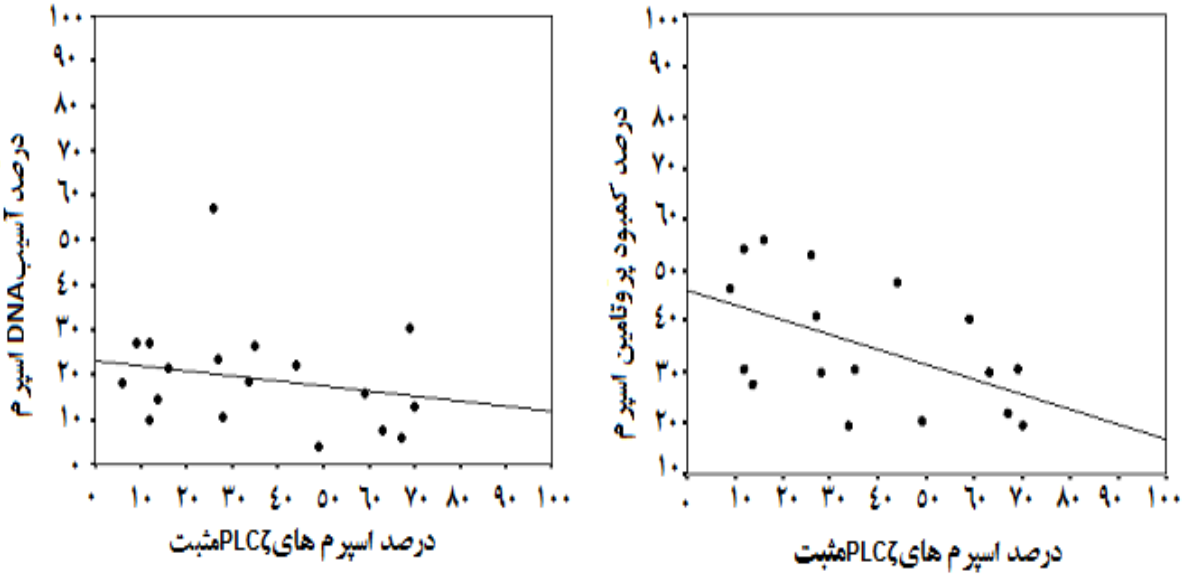
در این مطالعه PLCζ با استفاده از روش فلوسایتومتری، کمبود پروتامین و آسیب DNA با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت مورد ارزیابی قرار گرفت. همان گونه که در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است، اختلاف معنی داری در درصد اسپرم های PLCζ مثبت بین گروه بارور (۶/۷۴±۵۰/۸۷) و الیگوآستنوتراتوزواسپرمی (۳/۹۶±۱۹/۹) وجود دارد. درصد کمبود پروتامین اسپرم در افراد الیگوآستنوتراتوزواسپرمی (۳/۵۶±۴۴/۸۷) که احتمالاً روند اسپرماتوژنز آن ها با نقص مواجه است، به طور معنی داری بیشتر از افراد بارور (۲/۰۹±۲۸/۰۰) می باشد. به طور مشابه، درصد آسیب DNA اسپرم در افراد الیگوآستنوتراتوزواسپرمی (۴/۲۹±۲۵/۸۳) به طور معنی داری بیشتر از افراد بارور (۱/۶۶±۱۰/۲۷) است.



نمودار شماره ۱: مقایسه درصد اسپرم های PLCζ مثبت، کمبود پروتامین و آسیب DNA بین افراد نابارور الیگوآستنوتراتوزواسپرمی و بارور

در این مطالعه ارتباط معنی داری بین اسپرم های PLCζ مثبت با درصد کمبود پروتامین مشاهده شد (r=-۰/۵۲۶، P=۰/۰۳). در صورتی که با آسیب DNA اسپرم ارتباط معنی داری مشاهده نشد (r=-۰/۲۱۳، P=۰/۲۸۳)، شاید به دلیل تعداد کم افراد مورد مطالعه در این طرح باشد (نمودار شماره ۲). به علاوه ارتباط معنی داری بین درصد اسپرم های PLCζ مثبت با غلظت اسپرم (r=۰/۵۶۹، P=۰/۰۱۱)، درصد تحرک اسپرم (r=۰/۴۷۳، P=۰/۰۴) و درصد مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم (r=-۰/۵۲۶، P=۰/۰۳) مشاهده شد. ارتباط معنی دار و مستقیمی بین درصد آسیب DNA اسپرم و کمبود پروتامین وجود دارد (r=۰/۶۸۶، P=۰/۰۰۲).

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:49 +0430 on Tuesday July 18th 2017



نمودار شماره ۲: ارتباط بین اسپرم های PLCζ مثبت با آسیب DNA اسپرم (r=-۰/۲۱۳، P=۰/۲۸۳) و کمبود پروتامین (r=-۰/۵۲۶، P=۰/۰۳)

بحث:

در حدود ۲۵٪ زوج ها در جهان تحت تأثیر مشکلات باروری می باشند. شیوع فزآینده ناباروری منجر به پیشرفت سریع تکنیک های کمک باروری گردیده است. عمده این تکنیک ها، شامل IVF و یا ICSI می باشد که تقریباً ۲٪ تولدهای زنده در هر سال در کشور انگلستان ناشی از این تکنیک ها می باشد (۱۶،۱۵). اگرچه IVF درمان مناسبی برای زوجین نابارور می باشد؛ اما در حدود ۷-۴٪ موارد با عدم موفقیت در لقاح مواجه هستند که مهم ترین علت آن عدم فعال شدن تخمک می باشد. در صورتی که میانگین میزان لقاح در روش ICSI حدود ۸۰٪ می باشد. ۵۳/۱٪ سیکل های تکنیک های کمک باروری در کشور انگلیس در حال حاضر ICSI می باشد؛ ولی میزان حاملگی بر اساس گزارش کنگره Eshre در سال ۲۰۱۴ بیشتر از ۳۳٪ گزارش نشده است (۱۸،۱۷). عدم یا کاهش میزان لقاح پس از ICSI را می توان از طریق استفاده از روش های فعال سازی مصنوعی تخمک، به گونه ای درمان کرد. این روش ها شامل فعال سازی الکتریکی، شیمیایی و مکانیکی می باشد. در بیشتر مراکز درمانی از روش فعال سازی شیمیایی مخصوصا آیونوفورها استفاده می کنند. آینوفورها قابلیت حل شدن در چربی را داشته و کار اصلی آن ها انتقال یون ها از غشاء سلولی می باشد. کلسیم آینوفور A23187 و یونوماسین دو آینوفوری هستند که به طور گسترده در مراکز کلینیکی جهت افزایش میزان کلسیم درون سلولی مورد استفاده قرار می گیرند (۲۰،۱۹). یونومایسین به عنوان یک عامل فعال کننده برای تخمک افراد نابارور استفاده شده و هیچ اثر سوء بر تکوین جنینی اعمال نمی کند (۲۱). یونومایسین و یا کلسیم آینوفور باعث ایجاد یک نوسان کلسیم با طول موج بلند در تخمک شده و موجب فعال کردن آن می گردند (۲۲). Montag و همکاران گزارش کردند که در افراد با عدم موفقیت در لقاح پس از ICSI یا کمتر از ۳۰٪ میزان لقاح، فعال سازی مصنوعی تخمک برای درمان آن ها موفقیت آمیز می باشد؛ اما آنچه باید در نظر گرفت آن است که همه افراد با این روش های مصنوعی فعال سازی تخمک نمی توانند میزان موفقیت لقاح و حاملگی رضایت بخشی را داشته باشند؛ همچنین معیاری که قبل از استفاده از این تکنیک ها بتوان

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:49 +0430 on Tuesday July 18th 2017

پیشگویی کرد که آیا امکان دستیابی به لقاح و باروری موفق امکان پذیر است یا نه، هنوز ارائه نشده است. مطالعات قبلی گزارش کرده اند که مهم ترین علت عدم موفقیت در لقاح، عدم فعال شدن تخمک است (۲۳). در حالت طبیعی فعال شدن تخمک با ورود اسپرم به داخل تخمک و رهایش فاکتورهای فعال کننده تخمک از اسپرم تحت عنوان SAOAF صورت می گیرد. این فاکتورها باعث افزایش کلسیم داخل سلولی از طریق اتصال به رسپتورهای اینوزیتول تری فسفات (IP3) بر روی شبکه آندوپلاسمی و رهایش کلسیم به داخل سیتوپلاسم می گردند؛ لذا در شرایط آزمایشگاه از طریق فعال سازی مصنوعی تخمک می توان منجر به افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی، پیشبرد تخمک از متافاز میوز II به آنافاز و شروع تقسیمات کلیواژی شد (۲۲). آقاجان پور و همکاران PLCζ را که به عنوان یک کاندید SAOAF است را در افراد نابارور با عدم موفقیت در لقاح و افرادی که با موفقیت در لقاح مواجه شده بودند را بررسی نمودند و نشان دادند که بیان PLCζ در سطح RNA در افراد با عدم موفقیت در لقاح نسبت به آن هایی که با موفقیت در لقاح ICSI مواجه هستند، به طور معنی داری کاهش یافته است. آن ها این گونه استنباط کردند که می توان از بیومارکر PLCζ به عنوان یک مارکر پیشگویی کننده میزان لقاح در افراد نابارور استفاده نمود (۲۴). به دنبال این مطالعه، مطالعات متعددی در افراد گلوبوزواسپرمی، انجام شد و مشخص گردید که در این افراد که با عدم یا کاهش موفقیت در لقاح پس از ICSI مواجه هستند، سطح PLCζ در سطح پروتئین کاهش یافته است (۲۵،۱۰). در مطالعه کنونی، برای اولین بار میزان بیان PLCζ در افراد نابارور با پارامترهای اسپرمی شدیداً غیر طبیعی، مورد بررسی قرار گرفت. این افراد بر اساس استاندارد WHO-2010 با تعداد پایین اسپرم، تحرک پایین و افزایش مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم مواجه بودند (۱۲). تکنیک ICSI راهکار مناسبی جهت درمان این افراد بوده است؛ اما موفقیت یا عدم موفقیت آن مشخص نمی باشد و در بررسی این مسئله که آیا آن ها نقص در مارکرهای فعال سازی تخمک دارند یا نه، هنوز مطالعه ای انجام نشده است. علاوه بر این از علت های دیگر عدم فعال سازی تخمک می توان به نقایص ساختار کروماتین اسپرم اشاره نمود. همان گونه که در مقالات متعددی گزارش شده است، در طی اسپرمیوژنز کروماتین اسپرم تحت بازسازی گسترده قرار می گیرد. به طوری که هیستون های کروماتین با پروتامین جایگزین و کروماتین متراکم می گردد. عدم تراکم کروماتین می تواند منجر به قطعه قطعه شدن DNA اسپرم گردد و عدم موفقیت در لقاح و تکوین اولیه جنینی را به دنبال داشته باشد (۲۶)؛ لذا در این مطالعه علاوه بر مارکر PLCζ، وضعیت پروتامین اسپرم و سلامت DNA نیز بین افراد نابارور الیگوآستنوتراتوزواسپرمی و بارور مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج مطالعه کنونی حاکی از آن است که افراد نابارور با پارامترهای اسپرمی شدیداً غیر طبیعی از درصد پایینی از PLCζ نسبت به افراد بارور برخوردار هستند؛ بنابراین امکان دارد یکی از علل ناباروری آن ها عدم رهایش این فاکتور به داخل تخمک به دلیل فقدان یا کمبود آن در اسپرم باشد؛ بنابراین جهت درمان این افراد می توان در آینده از تکنیک ICSI همراه با فعال سازی مصنوعی تخمک استفاده نمود تا از این طریق تخمک فعال گردد و احتمال تشکیل پیش هسته ها و تکوین اولیه جنینی افزایش یابد؛ اما جهت تأیید این نتایج نیاز به مطالعه گسترده در افراد الیگوآستنوتراتوزواسپرمی با استفاده از تکنیک ICSI همراه با فعال سازی مصنوعی تخمک می باشد.

به علاوه درصد کمبود پروتامین و آسیب DNA در افراد نابارور الیگوآستنوتراتوزواسپرمی به طور معنی داری بیشتر از افراد بارور است. اسپرم های دارای آسیب کروماتین، دارای پیامدهای ناخوشایندی بر روی نتایج کلینیکی و باروری می باشند؛ به طوری که اخیراً در یک متاآنالیز مشخص شده است که ارتباط معنی داری بین افزایش آسیب DNA اسپرم و کاهش

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:49 +0430 on Tuesday July 18th 2017

میزان تولد زنده نوزادان پس از استفاده از تکنیک های کمک باروری وجود دارد. بدین معنا که افزایش سطح آسیب DNA در اسپرم، احتمالاً همراه با افزایش در سقط جنین و کاهش نوزادان سالم است (۲۷). به عبارتی دیگر، بین آسیب DNA اسپرم با فقدان یا کاهش لقاح، کیفیت پایین جنین، میزان پایین حاملگی و افزایش سقط خود به خودی پس از IVF رابطه معنی داری وجود دارد (۲۸). در رابطه با تأثیر اسپرم با آسیب DNA بر روی ارجعیت نتایج کلینیکی ICSI بر IVF نظرات متناقضی وجود دارد؛ به طوری که برخی اذعان دارند که ICSI باعث بهبود میزان حاملگی افراد با آسیب DNA اسپرم می گردد (۳۰،۲۹). در صورتی که برخی دیگر از محققان عقیده دارند که انتخاب اسپرم بر اساس مورفولوژی طبیعی جهت ICSI نمی تواند تضمین کننده سلامت DNA باشد. اسپرم هایی با مورفولوژی طبیعی وجود دارد که دارای آسیب DNA هستند (۳۲،۳۱). اخیراً Park و همکاران نشان داده اند که بیان پایین PLCζ در اسپرم انسانی با وضعیت اکسیداسیون DNA اسپرم ارتباط دارد (۳۳). نتایج مطالعه ما نیز نشان می دهد که افراد دارای پارامترهای اسپرمی شدیداً غیر طبیعی نسبت به افراد بارور، دارای سطح PLCζ پایین تر و آسیب کروماتین (در سطح پروتامین و DNA) بالاتری هستند (نمودار شماره ۱).

در این مطالعه ارتباط معنی داری بین اسپرم های PLCζ مثبت و کمبود پروتامین مشاهده شد. با توجه به اینکه بیان PLCζ در مرحله اسپرمیوژنز صورت می گیرد و جا به جایی هیستون ها با پروتامین ها نیز دقیقاً در این مرحله است. چنین می توان نتیجه گیری کرد که در افرادی که کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی به دلیل نقص در فرآیند اسپرماتوژنز می باشد، بیان PLCζ نیز تحت تأثیر این فرآیند قرار و نقص در جایگزینی پروتامین منجر به آسیب DNA اسپرم آن ها شده است؛ لذا احتمال عدم موفقیت در لقاح و باروری در این افراد بیشتر می باشد. مشاهده ارتباط معنی دار بین درصد اسپرم های PLCζ مثبت با پارامترهای اسپرمی (تعداد، تحرک و مورفولوژی) این استنباط را تأیید می نماید. در این مطالعه ارتباط معنی داری بین درصد اسپرم های PLCζ مثبت با آسیب DNA مشاهده نشد که احتمال دارد، با بیشتر شدن تعداد نمونه، ارتباط معنی دار بین این ۲ پارامتر مشاهده شود. از مهم ترین محدودیت های این مطالعه، انتخاب نوع ناباروران با پارامترهای اسپرمی شدیداً غیر طبیعی که همسران آن ها از سلامت کامل برخوردار باشند، بوده و علت ناباروری زوجین فقط باید به دلیل فاکتور مردانه باشد. لذا جمع آوری نمونه در این مطالعه را سخت و دشوار کرده بود. به علاوه محدودیت در انتخاب مردان نابارور که فاقد واریکوسل یا موقعیت های شغلی تأثیرگذار بر روی نتایج مطالعه باشد نیز منجر به کاهش تعداد نمونه ها شده است.

نتیجه گیری:

در افراد نابارور الیگوآستنوتراتوزواسپرمی، سلامت کروماتین اسپرم و درصد اسپرم ها باPLCζ مثبت به شدت کاهش یافته است که می تواند یکی از علل شکست در لقاح و باروری این افراد باشد؛ لذا می توان برای این افراد، روش فعال سازی مصنوعی تخمک را پیشنهاد نمود.

تشکر و قدردانی:

نویسنده گان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولان پژوهشکده رویان اصفهان ابراز می دارند.

منابع:

1. Bhattacharya S, Hamilton MP, Shaaban M, Khalaf Y, Seddler M, Ghobara T, et al. Conventional in-vitro fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomised controlled trial. Lancet. 2001; 357(9274): 2075-9.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:49 +0430 on Tuesday July 18th 2017

2. Swann K, Saunders CM, Rogers NT, Lai FA. PLCzeta(zeta): a sperm protein that triggers Ca2+ oscillations and egg activation in mammals. Semin Cell Dev Biol. 2006; 17(2): 264-73.
3. Swain JE, Pool TB. ART failure: Oocyte contributions to unsuccessful fertilization. Hum Reprod Update. 2008; 14(5): 431-46.
4. Amdani SN, Yeste M, Jones C, Coward K. Sperm Factors and Oocyte Activation: Current Controversies and Considerations. Biol Reprod. 2015; 93(2): 50.
5. Kashir J, Nomikos M, Swann K, Lai FA. PLCzeta or PAWP: Revisiting the putative mammalian sperm factor that triggers egg activation and embryogenesis. Mol Hum Reprod. 2015; 21(5): 383-8.
6. Sette C, Paronetto MP, Barchi M, Bevilacqua A, Geremia R, Rossi P. Tr-kit-induced resumption of the cell cycle in mouse eggs requires activation of a Src-like kinase. EMBO J. 2002; 21(20): 5386-95.
7. Nomikos M, Swann K, Lai FA. Is PAWP the "real" sperm factor? Asian J Androl. 2015; 17(3): 444-6.
8. Aarabi M, Sutovsky P, Oko R. Re: Is PAWP the 'real' sperm factor? Asian J Androl. 2015; 17(3): 446-9.
9. Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, et al. PLC zeta: A sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. Development. 2002; 129(15): 3533-44.
10. Heytens E, Parrington J, Coward K, Young C, Lambrecht S, Yoon SY, et al. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCzeta) in spermatozoa from infertile men. Hum Reprod. 2009; 24(10): 2417-28.
11. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Tavalaee M. Failed fertilization after ICSI and spermiogenic defects. Fertil Steril. 2008; 89(4): 892-8.
12. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.
13. Kheirollahi-Kouhestani M, Razavi S, Tavalaee M, Deemeh MR, Mardani M, Moshtaghian J, et al. Selection of sperm based on combined density gradient and Zeta method may improve ICSI outcome. Hum Reprod. 2009; 24(10): 2409-16.
14. Grasa P, Coward K, Young C, Parrington J. The pattern of localization of the putative oocyte activation factor, phospholipase Czeta, in uncapacitated, capacitated, and ionophore-treated human spermatozoa. Hum Reprod. 2008; 23(11): 2513-22.
15. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. PLoS Med. 2012; 9(12): e1001356.
16. www.hfea.gov.uk/ October 11, 2014.
17. Vanden Meerschaut F, Leybaert L, Nikiforaki D, Qian C, Heindryckx B, De Sutter P. Diagnostic and prognostic value of calcium oscillatory pattern analysis for patients with ICSI fertilization failure. Hum Reprod. 2013; 28(1): 87-98.
18. Kupka MS, Ferraretti AP, De Mouzon J, Erb K, D'Hooghe T, Castilla JA, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2010: Results generated from European registers by ESHREdagger. Hum Reprod. 2014; 29(10): 2099-113.
19. Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR, Tavalaee M. Artificial oocyte activation and intra-cytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 2010; 94(2): 520-6.
20. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Javdan Z, Tavalaee M. Artificial oocyte activation in severe teratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 2008; 90(6): 2231-7.
21. Deemeh MR, Tavalaee M, Nasr-Esfahani MH. Health of children born through artificial oocyte activation: a pilot study. Reprod Sci. 2015; 22(3): 322-8.
22. Vanden Meerschaut F, Nikiforaki D, Heindryckx B, De Sutter P. Assisted oocyte activation following ICSI fertilization failure. Reprod Biomed Online. 2014; 28(5): 560-71.
23. Montag M, Koster M, Van der Ven K, Bohlen U, Van der Ven H. The benefit of artificial oocyte activation is dependent on the fertilization rate in a previous treatment cycle. Reprod Biomed Online. 2012; 24(5): 521-6.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:49 +0430 on Tuesday July 18th 2017

24. Aghajanpour S, Ghaedi K, Salamian A, Deemeh MR, Tavalaee M, Moshtaghian J, et al. Quantitative expression of phospholipase C zeta, as an index to assess fertilization potential of a semen sample. Hum Reprod. 2011; 26(11): 2950-6.
25. Taylor SL, Yoon SY, Morshedi MS, Lacey DR, Jellerette T, Fissore RA, et al. Complete globozoospermia associated with PLCzeta deficiency treated with calcium ionophore and ICSI results in pregnancy. Reprod Biomed Online. 2010; 20(4): 559-64.
26. Tavalaee M, Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR. Etiology and evaluation of sperm chromatin anomalies. Int J FertilSteril. 2008; 2(1): 1-8.
27. Osman A, Alsomait H, Seshadri S, El-Toukhy T, Khalaf Y. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: A systematic review and meta-analysis. Reprod Biomed Online. 2015; 30(2): 120-7.
28. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: A systematic review and meta-analysis. Hum Reprod. 2012; 27(10): 2908-17.
29. Lewis SE, John Aitken R, Conner SJ, Iuliis GD, Evenson DP, Henkel R, et al. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. Reprod Biomed Online. 2013; 27(4): 325-37.
30. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. Hum Reprod. 2007; 22(1): 174-9.
31. Avendano C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. Fertil Steril. 2009; 91(4): 1077-84.
32. 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.
33. Park JH, Kim SK, Kim J, Kim JH, Chang JH, Jee BC, et al. Relationship between phospholipase C zeta immunoreactivity and DNA fragmentation and oxidation in human sperm. Obstet Gynecol Sci. 2015; 58(3): 232-8.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2016; 18(4): 9-19.

Original article

Comparison of sperm chromatin structure and PLCζ between infertile oligoasthenoteratozoospermic and fertile men

Tavalaee M[1*], Parivar K[1], Nasr-Esfahani MH[2,3], Shahverdi A[4], Ghaedi K[5,6]
[1]Student, Biology Dept., Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran; [2]Reproductive Biotechnology Dept., Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, I.R. Iran; [3]Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, I.R. Iran; [4]Embryology Dept., Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, I.R. Iran; [5]Biology Dept., University of Isfahan, Isfahan, Iran; [6]Cellular Biotechnology Dept., Cell Science research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, I.R. Iran.
Received: 13/Sep/2015 Accepted: 16/Jan/2016

Background and aims: The most important cause of fertilization failure after assisted-reproduction techniques are lack of releasing sperm-associated oocyte activating factors (SAOAFs) and sperm DNA damage. PLCζ is one of the sperm factors that plays important role in oocyte activation. The aim of this study was to compare expression of PLCζ, protamine deficiency (maturity marker of sperm chromatin) and sperm DNA damage between fertile men and oligoasthenoteratozoospermic subfertile men.
Methods: In this case-control study, semen samples were collected from 10 subfertile oligoasthenoteratozoospermic and 10 fertile men. Sperm parameters (concentration, motility, morphology), expression of PLCζ, DNA damage, and protamine deficiency were assessed by World Health Organization protocol, flow cytometery, TUNEL and chromomycin A3 staining, respectively.
Results: Percentage of PLCζ- positive sperm, DNA integrity and protamine content significantly was lower in oligoasthenoteratozoospermic men compared to fertile men. In addition, significant correlations were observed between percentage of PLCζ- positive sperm with sperm parameters and percentage of protamine deficiency. A significant correlation was also observed between percentage of DNA fragmentation and protamine deficiency.
Conclusion: In these infertile men, sperm chromatin integrity and percentage of PLCζ-positive sperm decreased extremely. This could be one cause of fertilization failure in these individuals. Therefore, the artificial oocyte activation is recommended for these type of infertile men.

Keywords: **PLCζ, Protamine deficiency, DNA damage, Oligoasthenoteratozoospermic.**

Cite this article as: Tavalaee M, Parivar K, Nasr-Esfahani MH, Shahverdi A, Ghaedi K. Comparison of sperm chromatin structure and PLCζ between infertile oligoasthenoteratozoospermic and fertile men. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(4): 9-19.

[*]**Corresponding author:**
Student, Biology Dept., Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran. Tel:00989133143431, E-mail: tavalaee.royan@gmail.com

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:49 +0430 on Tuesday July 18th 2017