

مقایسه پروتئین متصل شونده به دامنه WW صفحات خلف آکروزومی و وضعیت کروماتین اسپرم بین مردان نر موزواسپرمی و ابرموزواسپرمی

مرضیه تولائی^{۱*}، لیلا آزادی^۱، محمدحسین نصر اصفهانی^{۲،۱}

^۱پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه زیست فناوری تولیدمثل، اصفهان، ایران؛ ^۲مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۲

چکیده:

زمینه و هدف: پروتئین متصل شونده به دامنه WW صفحات خلف آکروزومی (PAWP) اسپرم در طی اسپرمیوزن بیان می‌شود و اخیراً به عنوان یکی از فاکتورهای اسپرمی دخیل در فعال شدن تخمک معرفی شده است. هدف این مطالعه، مقایسه PAWP و وضعیت کروماتین اسپرم بین مردان با پارامترهای اسپرمی طبیعی و غیرطبیعی بوده است.

روش بررسی: نمونه مایع منی بر اساس پروتکل سازمان بهداشت جهانی (۲۰۱۰) ارزیابی شد و افراد به دو گروه نر موزواسپرمی (N=۳۱) و ابرموزواسپرمی (N=۲۳) تقسیم شدند. PAWP اسپرم با استفاده از فلوسایتومتری، آسیب DNA (آزمون TUNEL) و کمبود پروتامین (کرومومایسین A₃) اسپرم توسط میکروسکوپ فلورسنت در این افراد ارزیابی شد. تجزیه و تحلیل آماری به وسیله نرم افزار SPSS, Chicago IL, USA با استفاده از آنالیز Independent- Sample T Test, Descriptive مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون ضریب همبستگی پیرسون جهت ارتباط بین پارامترها استفاده شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، اختلاف معنی‌داری در پارامترهای اسپرم (غلظت، تحرک و مورفولوژی) بین مردان نر موزواسپرمی و ابرموزواسپرمی مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). میانگین درصد PAWP اسپرم به طور معنی‌داری در افراد ابرموزواسپرمی کمتر از افراد نر موزواسپرمی بود (P<۰/۰۰۱). به علاوه میانگین درصد آسیب DNA اسپرم و کمبود پروتامین به طور معنی‌داری در افراد ابرموزواسپرمی بیشتر از افراد نر موزواسپرمی بود (P<۰/۰۰۵). به علاوه، همبستگی‌های معنی‌داری بین درصد PAWP اسپرم با پارامترهای اسپرمی مشاهده شد (P<۰/۰۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهند که در مردان ابرموزواسپرمی، تست‌های عملکردی اسپرم مانند آسیب DNA، کمبود پروتامین و همچنین درصد فاکتور اسپرمی (PAWP) دخیل در فعال شدن تخمک در محدوده غیرطبیعی بوده است؛ بنابراین ارزیابی این تست‌ها می‌تواند در تصمیم‌گیری و درمان این مردان نابارور موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: PAWP، آسیب DNA، کمبود پروتامین، پارامترهای اسپرمی، ناباروری مردان.

مقدمه:

منبع اصلی خود و همچنین تمایز به اسپرماتوسیت‌های اولیه می‌گردند. پس از دو تقسیم متوالی میوزی، اسپرماتوسیت‌های اولیه به اسپرماتوسیت‌های ثانویه و سپس به اسپرماتیدها تمایز می‌یابند. در مرحله اسپرمیوزن، اسپرماتیدها پس از یکسری تغییرات مورفولوژیکی و

در طی فرآیند اسپرماتوزن، از اسپرماتوگونی‌های دیپلوئیدی، اسپرم بالغ هاپلوئیدی تمایز می‌یابد که این فرآیند شامل سه مرحله اصلی اسپرماتوسیتوزن، میوز و اسپرمیوزن می‌باشد. در طی مرحله اسپرماتوسیتوزن، اسپرماتوگونی‌ها از طریق تقسیمات میتوزی منجر به ازدیاد

^۱نویسنده مسئول: اصفهان- دانشگاه اصفهان- پژوهشگاه رویان- پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی- مرکز تحقیقات پزشکی

تولیدمثل- گروه زیست تولیدمثل- تلفن: ۰۹۱۳۳۱۴۳۴۳۱، E-mail: tavalae.royan@gmail.com

ناحیه خلف آکروزومی اسپرم به داخل تخمک رهایش می‌یابند. PAWP، PLC ζ ، Phospholipase C zeta= و Truncated form of the KIT receptor= tr-KIT از جمله فاکتورهای پیشنهادی هستند که با ورود به داخل تخمک، منجر به افزایش کلسیم داخل سلولی، خروج اووسیت از متافاز II، تشکیل پیش هسته‌ها و تکوین اولیه جنین می‌گردد (۵).

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که پروتئین PAWP مانند سایر پروتئین‌های ناحیه خلف آکروزومی در طی طویل شدن اسپرماتیدها در لوب سیتوپلاسمی ستر و به وسیله مانشت انتقال می‌یابد و در جایگاه اصلی خود، ناحیه خلف آکروزومی قرار می‌گیرد (۶،۷). به علاوه، نشان داده شده که در صورت تزریق پروتئین نوترکیب PAWP به داخل تخمک موش و زنبوس می‌توان نوسانات کلسیم و تکوین اولیه جنین را مشاهده کرد (۸-۶). باین‌حال، Satouh و همکاران اذعان داشته‌اند که PAWP نقشی در ایجاد نوسانات کلسیم در موش نداشته است (۹). در یک مطالعه‌ای که توسط Kennedy و همکاران بر روی اسپرم گاو انجام شد مشخص گردید که یک ارتباط معنی‌داری بین مورفولوژی طبیعی اسپرم با بیان PAWP وجود دارد بدین معنا که اسپرم‌ها با شکل ظاهری طبیعی، دارای سطح طبیعی پروتئین PAWP می‌باشند (۱۰). اخیراً نیز مشخص شده است که افراد نابارور گلوبوزواسپرمی که اسپرم آن‌ها فاقد آکروزوم و سر اسپرم‌ها کروی شکل است، بیان PAWP به‌طور معنی‌داری نسبت به اسپرم افراد بارور کاهش داشته است (۱۱).

با توجه به اهمیت پروتئین PAWP در طی فرآیند اسپرمیوزن و نقش آن به‌عنوان یک فاکتور اسپرمی که با ورود به تخمک منجر به فعال شدن تخمک می‌گردد، در این مطالعه سعی بر آن شد که این

ساختاری از جمله سازماندهی مجدد کروماتین اسپرم، تشکیل ساختار آکروزوم و حذف زائده‌های سیتوپلاسمی، اسپرم بالغ و کارا را تولید می‌نمایند (۱). سازماندهی مجدد کروماتین اسپرم با جایگزینی پروتئین‌ها به جای هیستون‌ها صورت می‌گیرد که موجب تراکم ساختار کروماتین اسپرم می‌شود. لذا هسته اسپرم فشرده‌گی خود را با این جابه‌جایی کسب می‌کند که پیامد آن تسهیل در حرکت اسپرم تا رسیدن به ناحیه لقاح، محافظت از آسیب‌های فیزیکی و مکانیکی در طی عبور در اپیدیم، دستگاه تناسلی مونث و غیره می‌باشد (۲،۳).

از به هم پیوستن وزیکول‌های آکروزومی نشأت گرفته از دستگاه گلژی، ساختار آکروزوم که ۷۰٪ سر اسپرم را تشکیل می‌دهد، به وجود می‌آید. بین آکروزوم و هسته، یک ساختاری به نام "پوشش دور هسته‌ای" قرار گرفته که یک لایه پروتئینی متراکم و مقاوم به دترجنت‌های غیر یونی می‌باشد. این ساختار دارای سه منطقه "زیر آکروزومی"، "استوایی" و "خلف آکروزومی" می‌باشد. لایه زیر آکروزومی و خلف آکروزومی در طی فرآیند اسپرمیوزن به‌طور مستقل تشکیل می‌شوند، به‌گونه‌ای که پروتئین‌های لایه زیر آکروزومی در تشکیل ساختار آکروزوم نقش دارند، در صورتی که ناحیه خلف آکروزومی حاوی پروتئین‌هایی است که در طی کشیده شدن سر اسپرم توسط ساختار میکروتوبولی مانشت، به این ناحیه انتقال داده می‌شوند و در فیوزن اسپرم با تخمک و لقاح نقش بسزایی دارند. از جمله پروتئین‌های این ناحیه می‌توان به PAWP (Post-acrosomal sheath WW domain-binding protein)، subH2BV (Histone H2B subacrosomal variant) و هیستون‌های هسته سوماتیک اشاره نمود (۴).

در طی فرآیند لقاح، پس از برهمکنش ناحیه استوایی سر اسپرم با تخمک، یکسری از فاکتورها از

اسپرم با استفاده از لام شمارشگر اسپرم و با قرار دادن ۱۰ میکرولیتر از نمونه مایع منی بر روی لام انجام شد و در زیر میکروسکوپ نوری با عدسی چشمی 20x اسپرمها شمارش و به صورت میلیون در میلی لیتر گزارش شد. درصد تحرک اسپرم با استفاده از نرم افزار CASA (Computer- Aided Sperm Analysis) به صورت درصد بیان و مورفولوژی اسپرم برای هر نمونه پس از رنگ آمیزی با پاپانیکولانو، در حدود ۲۰۰ اسپرم شمارش و به صورت درصد مورفولوژی غیرطبیعی گزارش شد (۱۲).

پس از ارزیابی پارامترهای اسپرمی، مراجعین بر سازمان بهداشت جهانی (WHO) (۲۰۱۰) به دو گروه افراد با پارامترهای اسپرمی طبیعی (N=۳۱) و افراد با پارامترهای اسپرمی غیرطبیعی (N=۲۳) دسته بندی شدند. در صورتی که غلظت اسپرم بیشتر از ۱۵ میلیون در سی سی، درصد تحرک بیشتر از ۴۰٪ و درصد مورفولوژی غیرطبیعی پایین تر از ۹۶٪ بود، به افراد واژه "نرموزواسپرمی" و در غیر این صورت "ابنرموزواسپرمی" اطلاق گردید. افراد ابنرموزواسپرمی حداقل دارای دو پارامتر اسپرمی غیرطبیعی بودند.

از نمونه اسپرمی شستشو شده با بافر فسفات سالین (PBS= Phosphate Buffer Saline)، ۴ میلیون اسپرم (کنترل و تست) جداسازی گردید و با پارافمالدهید ۴٪ به مدت ۲۰ دقیقه فیکس شد؛ سپس نمونه ها با بافر PBS به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ شستشو و با تریتون x-100 (۰/۵٪) به مدت ۳۰ دقیقه نفوذپذیر گردید. پس از شستشو نمونه ها با بافر PBS، جهت بلوک کردن جایگاه های غیراختصاصی، نمونه ها در BSA (Bovine Serum Albumin) (۳٪) در PBS به مدت یک ساعت انکوبه شدند؛ سپس اسپرم ها با آنتی بادی اولیه بر علیه (Abcam, Cambridge) PAWP

پروتئین در نمونه اسپرمی مردان با پارامترهای اسپرمی طبیعی که به نظر می رسد سیر فرآیند اسپرماتوژنز در آن ها طبیعی است و مردان با پارامترهای اسپرمی غیرطبیعی که احتمالاً نقص در فرآیند اسپرماتوژنز دارند، مورد ارزیابی و مقایسه قرار گیرد. به علاوه با توجه به رخداد مهم جابه جایی هیستون ها با پروتامین ها در طی فرآیند اسپرمیوژنز و سلامت DNA اسپرم، ایندو پارامتر نیز به طور هم زمان بررسی می شود. این سؤال پژوهشی مطرح است که آیا با آنالیز اولیه نمونه اسپرمی می توان متوجه شد که در افراد با نقص اسپرمیوژنری که ابنرموزواسپرمی هستند، بیان پروتئین PAWP، جابه جایی صحیح هیستون ها با پروتامین ها و سلامت DNA نیز غیرطبیعی است؟

روش بررسی:

در این مطالعه، نمونه مایع منی از مردان مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری با کسب رضایت و پر کردن فرم رضایت نامه منی بر اینکه از نمونه اسپرمی فقط برای انجام فعالیت تحقیقاتی استفاده می شود، جمع آوری شد. نمونه مایع منی ۴-۳ روز پس از مقاربت جنسی به آزمایشگاه آندروولوژی مرکز باروری و ناباروری تحویل داده شد. پس از ۳۰ دقیقه از دادن نمونه و مایع شدگی آن، پارامترهای اسپرمی از جمله غلظت، تحرک و مورفولوژی در این افراد مورد بررسی قرار گرفت و باقیمانده نمونه جهت بررسی پروتئین PAWP با استفاده از روش فلوسایتمتری، ارزیابی کمبود پروتامین و آسیب DNA اسپرم با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت در نظر گرفته شد.

در این مطالعه پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی) بر اساس سازمان بهداشت جهانی (WHO) (۲۰۱۰) مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت

در BSA به مدت یک شب در دمای ۴ درجه انکوبه شدند. روز بعد، پس از شستشوی نمونه‌های اسپرمی با PBS از آنتی بادی ثانویه کانجوگه شده به FITC (goat anti rabbit IgG secondary antibody FITC conjugated) به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد استفاده گردید. مجدداً نمونه‌ها با PBS شستشو داده شد و با رنگ هسته‌ای (Propidium iodide) PI جهت شمارش اسپرم با استفاده از فلوسایتمتری (FACSCalibur flow cytometer= Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) رنگ‌آمیزی گردید. در هر نمونه ۱۰۰۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های PLC مثبت در جمعیت PI مثبت با استفاده از نرم‌افزار BD CellQuest گزارش گردید (۱۳، ۱۴).

بطور خلاصه، پس از شستشوی مایع منی با PBS، سلول‌ها با محلول کارنوی (متانول و اسید استیک گلاسیال به نسبت ۳:۱) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد فیکس شدند. گسترشی از سلول‌ها بر روی اسلاید تهیه و پس از خشک شدن در معرض هوا، هر اسلاید توسط ۱۰۰ میکرولیتر محلول کروماتین A₃ (CMA₃, Sigma, USA)، (۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر بافر مک الوین (McIlvain Buffer) که حاوی ۱۰ میلی مولار کلرید منیزیم با PH=۷) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی گردید. سپس لام‌ها با PBS شستشو داده شده و توسط میکروسکوپ فلئورسنت با بزرگنمایی ۱۰۰ بررسی می‌شود. در هر نمونه حداقل ۵۰۰ اسپرم شمارش و اسپرم‌ها با رنگ زرد فلئورسنت درخشان در ناحیه خلفی سر اسپرم نشانگر اسپرم‌ها با کمبود پروتئین (CMA₃ مثبت) و اسپرم‌ها با رنگ زرد کم‌رنگ (CMA₃ منفی) نشانگر اسپرم‌ها با پروتئین طبیعی هستند (۱۵).

تجزیه و تحلیل آماری به وسیله نرم‌افزار SPSS, Chicago IL, USA با استفاده از آنالیز Descriptive، Independent-Sample T-Test، مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون ضریب همبستگی پیرسون جهت ارتباط بین پارامترها استفاده شد. P کمتر از ۰/۰۵ در این مطالعه از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شده است.

بطور خلاصه، پس از شستشوی مایع منی با PBS، سلول‌ها با محلول کارنوی (متانول و اسید استیک گلاسیال به نسبت ۳:۱) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد فیکس شدند. گسترشی از سلول‌ها بر روی اسلاید تهیه و پس از خشک شدن در معرض هوا، هر اسلاید توسط ۱۰۰ میکرولیتر محلول کروماتین A₃ (CMA₃, Sigma, USA)، (۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر بافر مک الوین (McIlvain Buffer) که حاوی ۱۰ میلی مولار کلرید منیزیم با PH=۷) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی گردید. سپس لام‌ها با PBS شستشو داده شده و توسط میکروسکوپ فلئورسنت با بزرگنمایی ۱۰۰ بررسی می‌شود. در هر نمونه حداقل ۵۰۰ اسپرم شمارش و اسپرم‌ها با رنگ زرد فلئورسنت درخشان در ناحیه خلفی سر اسپرم نشانگر اسپرم‌ها با کمبود پروتئین (CMA₃ مثبت) و اسپرم‌ها با رنگ زرد کم‌رنگ (CMA₃ منفی) نشانگر اسپرم‌ها با پروتئین طبیعی هستند (۱۵).

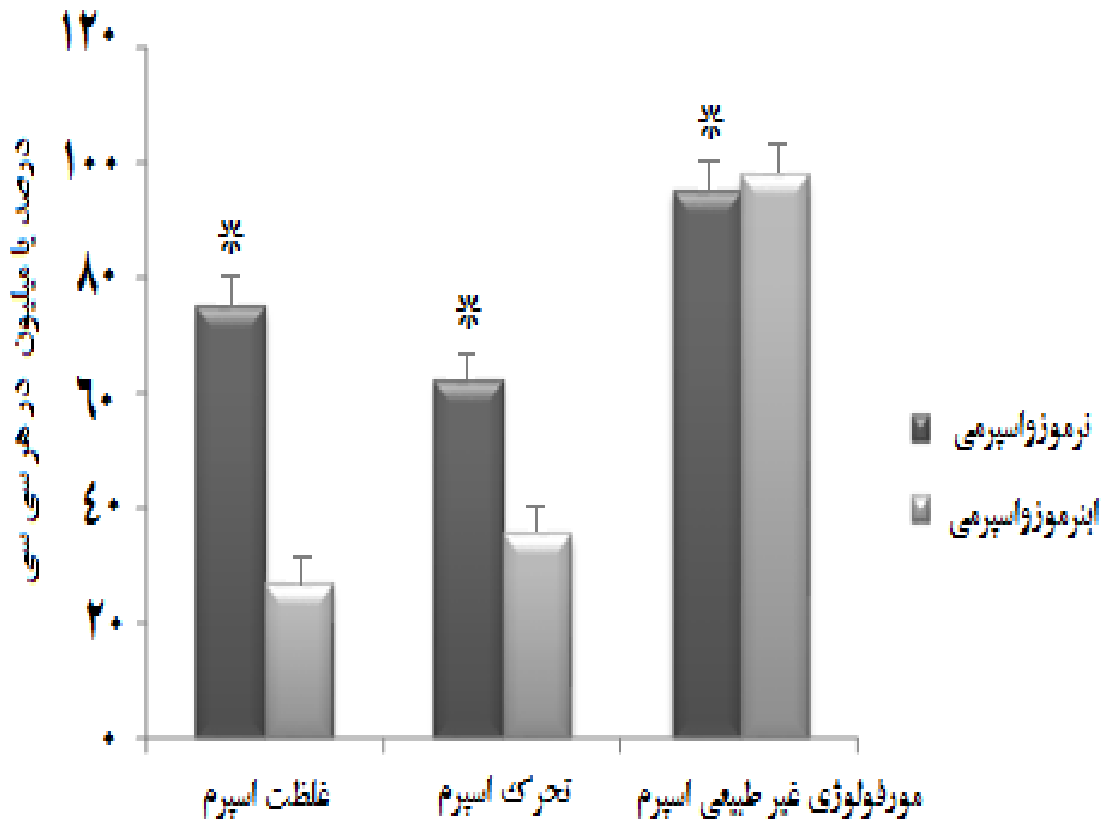
یافته‌ها:

در این مطالعه از نمونه مایع منی ۵۴ مرد مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان استفاده شد و پارامترهای اسپرمی، درصد پروتئین PAWP، کمبود پروتئین و آسیب DNA اسپرم مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه گروه‌های مورد مطالعه بر اساس پارامترهای اسپرمی تعیین شدند، گزارش میانگین پارامترهای اصلی اسپرمی از جمله غلظت، تحرک و مورفولوژی بین دو گروه در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. میانگین غلظت

در این مطالعه، میزان آسیب DNA با استفاده از کیت TUNEL (Apoptosis Detection System Fluorescein,

در صورتی که درصد مورفولوژی غیرطبیعی در افراد اینرموزواسپرمی (۹۸/۲۶±۰/۲۰) به طور معنی داری بالاتر از افراد نرموزواسپرمی (۹۵/۴۸±۰/۲۲) می باشد (P<۰/۰۰۱).

اسپرم (۲۶/۸۲±۴/۶۲ در مقابل ۷۵/۱۶±۵/۳۷) و درصد تحرک اسپرم (۳۵/۵۶±۳/۴۶) در مقابل (۶۲/۴۱±۲/۱۳) به طور معنی داری در افراد اینرموزواسپرمی کمتر از افراد نرموزواسپرمی بود (P<۰/۰۰۱).

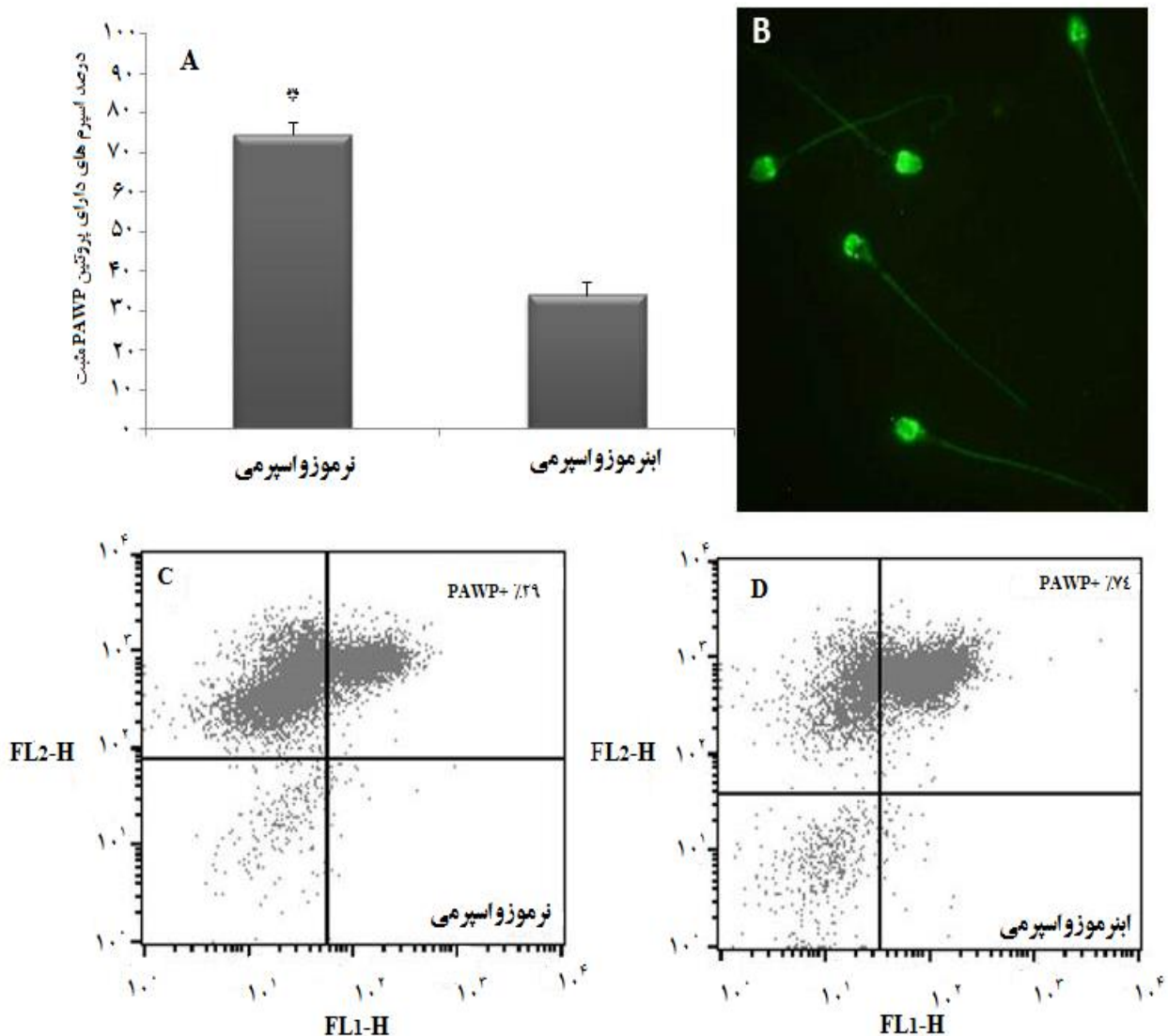


نمودار شماره ۱: مقایسه پارامترهای اسپرمی بین افراد نرموزواسپرمی و اینرموزواسپرمی

میانگین غلظت اسپرم و درصد تحرک اسپرم به طور معنی داری در افراد اینرموزواسپرمی پایین تر از افراد نرموزواسپرمی است؛ درصد مورفولوژی اسپرم به طور معنی داری در افراد اینرموزواسپرمی بیشتر از افراد نرموزواسپرمی است. *: نشانگر اختلاف معنی دار بین دو گروه در سطح P<۰/۰۰۱ می باشد.

نسبت به نرموزواسپرمی (۷۴/۳۸±۳/۱۰) پایین تر است (P<۰/۰۰۵). جایگاه PAWP در ناحیه سر اسپرم و نتایج فلوسایتمتری یک نمونه نرموزواسپرمی و یک نمونه اینرموزواسپرمی در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است.

در این مطالعه، درصد پروتئین PAWP اسپرم با استفاده از روش فلوسایتمتری مورد بررسی قرار گرفت. همانگونه که در نمودار شماره ۲ نشان داده که درصد اسپرم های دارای پروتئین PAWP مثبت به طور معنی داری در افراد اینرموزواسپرمی (۳۳/۸۸±۳/۳۸)



نمودار شماره ۲: مقایسه درصد اسپرم های دارای PAWP مثبت بین افراد نرموزواسپرمی و اینرموزواسپرمی

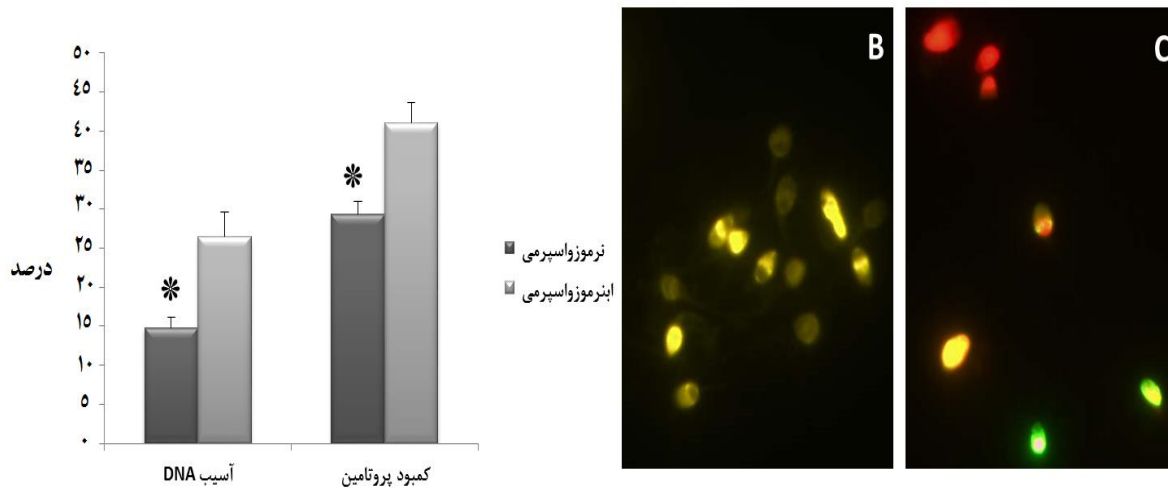
A درصد اسپرم های دارای PAWP در افراد اینرموزواسپرمی به طور معنی داری پایین تر از افراد نرموزواسپرمی است؛ B جایگاه PAWP در ناحیه سر اسپرم؛ C. ارزیابی PAWP در یک نمونه نرموزواسپرمی و D یک نمونه اینرموزواسپرمی با استفاده از روش فلوسایتومتری؛ *: نشانگر اختلاف معنی دار بین دو گروه در سطح $P < 0/05$ می باشد.

در افراد اینرموزواسپرمی ($26/47 \pm 3/20$) به طور معنی داری بیشتر از افراد نرموزواسپرمی ($14/84 \pm 1/25$) است ($P < 0/001$).

به علاوه ارتباط بین پارامترهای اسپرمی با درصد پروتئین PAWP، کمبود پروتئین و آسیب DNA اسپرم مورد آنالیز قرار گرفت. همانگونه که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است، ارتباط معنی داری بین درصد پروتئین PAWP و کمبود پروتئین اسپرم با پارامترهای

درصد کمبود پروتئین و آسیب DNA اسپرم نیز با استفاده از روش رنگ آمیزی کروموماسین A₃ و TUNEL مورد بررسی قرار گرفت. در نمودار شماره ۳ نمونه ای از رنگ آمیزی این دو روش نشان داده شده و نتایج بیانگر آن است که میانگین درصد کمبود پروتئین در افراد اینرموزواسپرمی ($41/13 \pm 2/56$) به طور معنی داری بالاتر از افراد نرموزواسپرمی ($29/37 \pm 1/57$) می باشد ($P < 0/001$). به طور مشابه نیز درصد آسیب DNA اسپرم

اسپرمی از جمله غلظت، تحرک و مورفولوژی اسپرم وجود دارد. به علاوه درصد آسیب DNA اسپرم نیز ارتباط معنی داری را با درصد تحرک و مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم نشان داده است ($P < 0/05$).



نمودار شماره ۳: مقایسه درصد آسیب DNA و کمبود پروتامین اسپرم بین افراد نرموزواسپرمی و ابرموزواسپرمی
 A: درصد آسیب DNA و کمبود پروتامین اسپرم در افراد ابرموزواسپرمی به طور معنی داری بیشتر از افراد نرموزواسپرمی است؛
 B: رنگ آمیزی کمبود پروتامین در اسپرم با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت. اسپرمها با رنگ زرد تیره نشانگر محتوای پروتامین طبیعی و اسپرمها با رنگ زرد درخشان بیانگر اسپرمها با کمبود پروتامین هستند؛
 C: رنگ آمیزی آسیب DNA اسپرم در یک نمونه اسپرمی با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت. اسپرمها با رنگ قرمز نشانگر DNA سالم و اسپرمها با رنگ سبز بیانگر اسپرمها با آسیب DNA هستند؛ * نشانگر اختلاف معنی دار بین دو گروه در سطح $P < 0/001$ می باشد.

جدول شماره ۱: ارتباط بین پارامترهای اسپرمی با درصد پروتئین PAWP، کمبود پروتامین و آسیب DNA اسپرم (N=54)

پارامترها	وضعیت آماری	غلظت اسپرم (میلیون در هر سی سی)	درصد تحرک اسپرم	درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم
درصد پروتئین PAWP	ضریب همبستگی	۰/۶۸۱**	۰/۷۷۴**	-۰/۷۱۶**
	P	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
درصد آسیب DNA	ضریب همبستگی	-۰/۱۷۱	-۰/۶۲۸**	۰/۴۳۲**
	P	۰/۲۱۶	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱
درصد کمبود پروتامین	ضریب همبستگی	-۰/۳۴۱*	-۰/۳۳۴*	۰/۴۶۷*
	P	۰/۰۱۲	۰/۰۱۴	۰/۰۰۰

*: بیانگر معنی دار بودن ضریب همبستگی بین دو پارامتر با $P < 0/05$ است؛ **: بیانگر معنی دار بودن ضریب همبستگی بین دو پارامتر با $P < 0/01$ است.

درصد پروتئین PAWP اسپرم ارتباط معنی داری را با درصد آسیب DNA اسپرم ($r=-0/418, P=0/002$) و درصد کمبود پروتئین اسپرم ($r=-0/302, P=0/026$) داشته و همچنین یک رابطه معنی داری بین اسپرم های دارای کمبود پروتئین و آسیب DNA اسپرم ($r=-0/301, P=0/027$) مشاهده گردید.

بحث:

پوشش دور هسته ای یکی از اجزاء اصلی اسکلت سلولی است که مقاوم به دترجنت های غیر یونی است و محتوی پروتئین های سیتوزولی متراکم در اطراف هسته اسپرم می باشد. پوشش پری نوکلئار از سه لایه زیر آکروزومی، استوایی و صفحه خلف آکروزومی تشکیل شده و به عنوان لنگرگاهی از پروتئین های دخیل در فرآیندهای اسپرمیوژن و لقاح معرفی شده است (۱۸، ۱۷، ۸).

PAWP از جمله پروتئین هایی است که خاص بیضه می باشد و در طی فرآیند طویل شدن اسپرماتیدها این پروتئین از طریق ساختار موقت مانشت به ناحیه غلاف آکروزومی انتقال می یابد و نقش آن تا به حال در فرآیند اسپرمیوژن و لقاح گزارش شده است (۱۰، ۱۱، ۸). با توجه به اهمیت پروتئین PAWP در طی فرآیند اسپرمیوژن و نقش احتمالی آن به عنوان یک فاکتور اسپرمی که با ورود به تخمک منجر به فعال شدن تخمک می گردد، در این مطالعه سعی بر آن شد که این پروتئین در نمونه اسپرمی مردان با پارامترهای اسپرمی طبیعی که به نظر می رسد سیر فرآیند اسپرماتوژن در آن ها طبیعی است و مردان با پارامترهای اسپرمی غیر طبیعی که احتمالاً نقص در فرآیند اسپرماتوژن دارند، مورد ارزیابی و مقایسه قرار گیرد. نتایج حاکی از آن است که درصد اسپرم های دارای پروتئین PAWP در افراد با پارامترهای اسپرمی غیر طبیعی نسبت به افرادی که پارامترهای اسپرمی آن ها طبیعی بوده

است، به طور معنی داری کاهش یافته است. این نتیجه می تواند بیانگر آن باشد که مردانی که نقص در فرآیند اسپرماتوژن دارند و آنالیز اسپرم آن ها غیر طبیعی است، درصد اسپرم ها با PAWP مثبت در آن ها کمتر می باشد. لذا احتمال موفقیت لقاح در این افراد پس از تکنیک کمک درمانی مخصوصاً پس از ICSI کاهش می یابد. این مطلب می تواند مطابق با نظریه Wu و همکاران و اعرابی و همکاران باشد که تأکید بر روی نقش PAWP در تشکیل پرونوکلئوس ها نر و ماده نموده اند (۱۳، ۸). به علاوه در این مطالعه ارتباط معنی داری بین اسپرم های دارای PAWP با غلظت اسپرم، تحرک و مورفولوژی غیر طبیعی مشاهده شد. ضریب همبستگی بین این پارامترها تقریباً در محدوده نزدیک به شیب خط یک می باشد و با مشاهده این ارتباط می توان به این نتیجه دست یافت که هرچه تعداد اسپرم تولید شده در طی فرآیند اسپرماتوژن بیشتر باشد، درصد اسپرم های دارای PAWP بیشتر می باشد و آن اسپرم ها از لحاظ مورفولوژی و تحرک، طبیعی تر هستند.

در طی فرآیند اسپرمیوژن تغییراتی از لحاظ ساختاری و مورفولوژی جهت تمایز اسپرم از اسپرماتید رخ می دهد که از آن جمله می توان به تشکیل ساختار آکروزوم، جابه جایی هیستون ها با پروتئین ها و همچنین حذف زائده های سیتوپلاسمی اشاره نمود (۱۹) ولی باید مدنظر داشت که یکسری از پروتئین ها در این زمان بیان می شوند که ارزش بسزایی جهت لقاح و تکوین اولیه جنین دارد (۲۰-۲۲) و بررسی هر کدام از آن ها می تواند علاوه بر آنالیز اسپرم، کمک شایانی به تشخیص و درمان افراد نابارور جهت پیشگویی میزان موفقیت لقاح کند. در این راستا، جانقربان لاریچه و همکاران بیان پروتئین PLC (از دیگر پروتئین های دخیل در فعال شدن تخمک) و آسیب DNA اسپرم را در افراد نابارور با واریکوسل مورد ارزیابی قراردادند. واریکوسل یک نوع

ناباروری شایع در بین مردان می‌باشد که دمای بیضه بالا است و فرآیند اسپرماتوژنز و کیفیت مایع منی تحت تأثیر است. نتایج آن‌ها اذعان کننده این مطلب بود که دمای بالای بیضه بر روی کیفیت پارامترهای اسپرمی، آسیب DNA و بیان برخی پروتئین‌ها از جمله PLC γ تأثیر گذاشته است. لذا در صورتی که مردان تمایل به جراحی (واریکوسلکتومی) نداشته باشند، استفاده از روش‌های مصنوعی فعال شدن تخمک به همراه ICSI (Intra- Cytoplasmic Sperm Injection) برای درمان این افراد پیشنهاد می‌شود (۲۳).

به‌علاوه در افراد نابارور با ۱۰۰٪ اسپرم سرگرد که سندروم گلوبوزواسپرمی هم نامیده می‌شوند، مشخص شده است که روند اسپرمیوژنز این افراد با نقص مواجه است و تمامی اسپرم‌ها فاقد آکروزوم می‌باشد؛ لذا بیان یکسری از پروتئین‌ها که در بیوژنز آکروزوم نقش دارند و همچنین بیان برخی از آن‌ها جهت تمایز اسپرم و لقاح ضروری است، با کاهش یا عدم بیان مواجه می‌باشد از آن جمله می‌توان به پروتئین‌های PAWP، PLC γ ، DPY19L2 و SUN5 اشاره نمود (۲۷، ۲۴-۲۶). لذا با مروری بر مطالعات می‌توان این‌گونه استنباط نمود که در افراد نابارور علاوه بر کاهش پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک، مورفولوژی) یکسری از عوامل یا فاکتورهای دخیل در تشکیل و تمایز اسپرم، تشکیل پرونوکلئوس‌ها و همچنین تکوین اولیه جنین نیز تحت تأثیر است. لذا شناسایی آن‌ها می‌تواند کمک شایانی در تصمیم‌گیری صحیح درمان داشته باشد.

در طی فرآیند اسپرمیوژنز، علاوه بر آنکه ساختار آکروزوم سر اسپرم تشکیل می‌شود، کروماتین اسپرم مورد بازسازی مجدد قرار می‌گیرد و پروتامین‌ها جایگزین هیستون‌ها می‌شوند. لذا کروماتین اسپرم متراکم شده و این فرآیند می‌تواند علاوه بر آنکه کمک به محافظت ژنوم از آسیب‌های فیزیکی و مکانیکی شود، اسپرم را هیدرودینامیک تر کند و تسهیل در حرکت

اسپرم را سبب گردد (۳۰-۲۸). لذا با توجه به اینکه ژنوم اسپرم نیمی از ژنوم آینده جنین را تشکیل می‌دهد و جایگزینی صحیح هیستون‌ها با پروتامین‌ها و به دنبال آن سلامت DNA ارزش بسزایی در لقاح و باروری دارد (۳۱، ۳۲)، در این مطالعه به‌طور هم‌زمان علاوه بر ارزیابی پروتئین PAWP، کمبود پروتامین و آسیب DNA اسپرم بین افراد با پارامترهای اسپرمی طبیعی و غیرطبیعی مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج بیانگر آن است که کمبود پروتامین و آسیب DNA اسپرم افراد پارامترهای اسپرمی غیرطبیعی به‌طور معنی‌داری بیشتر از افراد با پارامترهای اسپرمی طبیعی است. به‌علاوه ارتباط معنی‌داری بین پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک، مورفولوژی) با آسیب DNA اسپرم و کمبود پروتامین مشاهده شد (ارتباط بین غلظت اسپرم با آسیب DNA اسپرم معنی‌دار نبود). لذا با مشاهده کاهش پارامترهای اسپرمی می‌توان پیش‌بینی نمود که در افراد با کاهش کیفیت اسپرم، احتمال بالا بودن درصد آسیب DNA اسپرم، کمبود پروتامین و درصد کمتری از اسپرم‌های دارای PAWP وجود دارد؛ بنابراین در طی فرآیند ICSI می‌توان این احتمال را داد که با انتخاب اسپرم با مورفولوژی و تحرک طبیعی، احتمال سلامت کروماتین اسپرم و اینکه دارای پروتئین PAWP است، وجود دارد. به‌علاوه وجود ارتباط بین اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین با آسیب DNA می‌تواند نشانگر آن باشد که اسپرم‌هایی که در طی فرآیند اسپرمیوژنز نقص در بسته‌بندی کروماتین دارند، بیشتر مستعد آسیب DNA هستند که صحت این مطلب قبلاً اثبات شده است (۱۶، ۲۸).

نتیجه‌گیری:

نتایج این مطالعه بیانگر آن است که در افراد با پارامترهای اسپرمی غیرطبیعی، درصد اسپرم‌های فاقد پروتئین PAWP، آسیب DNA اسپرم و کمبود پروتامین

تشکر و قدردانی:

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از پرسنل محترم پژوهشکده زیست فناوری و مسئولان گرامی پژوهشگاه رویان ابراز می‌دارند.

بیشتر از افراد با پارامترهای اسپرمی طبیعی است و از مشاهده اسپرم با مورفولوژی و تحرک طبیعی احتمالاً می‌توان به حضور پروتئین PAWP و سلامت کروماتین اسپرم مطمئن گردید.

منابع:

1. Griswold MD. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev.* 2016; 96(1): 1-17.
2. Sabeti P, Pourmasumi S, Rahiminia T, Akyash F, Talebi AR. Etiologies of sperm oxidative stress. *Int J Reprod Biomed.* 2016; 14(4): 231-40.
2. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health.* 2014; 32(1): 1-17.
4. Oko R, Sutovsky P. Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *J Reprod Immunol.* 2009; 83(1-2): 2-7.
5. Yeste M, Jones C, Amdani SN, Patel S, Coward K. Oocyte activation deficiency: a role for an oocyte contribution? *Hum Reprod Update.* 2016; 22(1): 23-47.
6. Aarabi M, Balakier H, Bashar S, Moskovtsev SI, Sutovsky P, Librach CL, et al. Sperm-derived WW domain-binding protein, PAWP, elicits calcium oscillations and oocyte activation in humans and mice. *FASEB J.* 2014; 28(10): 4434-40.
7. Aarabi M, Sutovsky P, Oko R. Re: Is PAWP the 'real' sperm factor? *Asian J Androl.* 2015; 17(3): 446-9.
8. Wu AT, Sutovsky P, Manandhar G, Xu W, Katayama M, Day BN, et al. PAWP, a sperm-specific WW domain-binding protein, promotes meiotic resumption and pronuclear development during fertilization. *J Biol Chem.* 2007; 282(16): 12164-75.
9. Satouh Y, Nozawa K, Ikawa M. Sperm postacrosomal WW domain-binding protein is not required for mouse egg activation. *Biol Reprod.* 2015; 93(4): 94.
10. Kennedy CE, Krieger KB, Sutovsky M, Xu W, Vargovic P, Didion BA, et al. Protein expression pattern of PAWP in bull spermatozoa is associated with sperm quality and fertility following artificial insemination. *Mol Reprod Dev.* 2014; 81(5): 436-49.
11. Tavalae M, Nasr-Esfahani MH. Expression profile of PLCzeta, PAWP, and TR-KIT in association with fertilization potential, embryo development, and pregnancy outcomes in globozoospermic candidates for intra-cytoplasmic sperm injection and artificial oocyte activation. *Andrology.* 2016; 4(5): 850-6.
12. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.
13. Aarabi M, Balakier H, Bashar S, Moskovtsev SI, Sutovsky P, Librach CL, et al. Sperm content of postacrosomal WW binding protein is related to fertilization outcomes in patients undergoing assisted reproductive technology. *Fertil Steril.* 2014; 102(2): 440-7.
14. Tavalae M, Kiani-Esfahani A, Nasr-Esfahani MH. Relationship between Potential Sperm Factors Involved in Oocyte Activation and Sperm DNA Fragmentation with Intra-Cytoplasmic Sperm Injection Clinical Outcomes. *Cell J* 2017; 18(4): 588-96.
15. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mozdarani H, Mardani M, Azvagi H. Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. *Andrologia.* 2004; 36(3): 95-100.

16. Bahreinian M, Tavalae M, Abbasi H, Kiani-Esfahani A, Shiravi AH, Nasr-Esfahani MH. DNA hypomethylation predisposes sperm to DNA damage in individuals with varicocele. *Syst Biol Reprod Med*. 2015; 61(4): 179-86.
17. Oko RJ. Developmental expression and possible role of perinuclear theca proteins in mammalian spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*. 1995; 7(4): 777-97.
18. Oko R, Maravei D. Protein composition of the perinuclear theca of bull spermatozoa. *Biol Reprod*. 1994; 50(5): 1000-14.
19. Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol*. 2016; 59: 10-26.
20. Scieglinska D, Krawczyk Z. Expression, function, and regulation of the testis-enriched heat shock HSPA2 gene in rodents and humans. *Cell Stress Chaperones*. 2015; 20(2): 221-35.
21. Francis S, Yelumalai S, Jones C, Coward K. Aberrant protamine content in sperm and consequential implications for infertility treatment. *Hum Fertil*. 2014; 17(2): 80-9.
22. Chalmel F, Rolland AD. Linking transcriptomics and proteomics in spermatogenesis. *Reproduction*. 2015; 150(5): R149-57.
23. Janghorban-Laricheh E, Ghazavi-Khorasgani N, Tavalae M, Zohrabi D, Abbasi H, Nasr-Esfahani MH. An association between sperm PLC γ levels and varicocele? *J Assist Reprod Genet*. 2016; 33(12): 1649-55.
24. Kamali-Dolat Abadi M, Tavalae M, Shahverdi A, Nasr-Esfahani MH. Evaluation of PLC γ and PAWP Expression in Globozoospermic Individuals. *Cell J*. 2016; 18(3): 438-45.
25. Modarres P, Tanhaei S, Tavalae M, Ghaedi K, Deemeh MR, Nasr-Esfahani MH. Assessment of DPY19L2 deletion in familial and non-familial individuals with globozoospermia and DPY19L2 genotyping. *Int J Fertil Steril*. 2016; 10(2): 196-207.
26. Yassine S, Escoffier J, Abi Nahed R, Pierre V, Karaouzene T, Ray PF, et al. Dynamics of Sun5 localization during spermatogenesis in wild type and Dpy19l2 knock-out mice indicates that Sun5 is not involved in acrosome attachment to the nuclear envelope. *PloS one*. 2015; 10(3): e0118698.
27. Kuentz P, Vanden Meerschaut F, Elinati E, Nasr-Esfahani MH, Gurgan T, Iqbal N, et al. Assisted oocyte activation overcomes fertilization failure in globozoospermic patients regardless of the DPY19L2 status. *Hum Reprod*. 2013; 28(4): 1054-61.
28. Tavalae M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril*. 2009; 91(4): 1119-26.
29. Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, et al. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2005; 11(2): 198-205.
30. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mozdarani H, Mardani M, Azvagi H. Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. *Andrologia*. 2004; 36(3): 95-100.
31. Cissen M, Wely MV, Scholten I, Mansell S, Bruin JP, Mol BW, et al. Measuring sperm DNA fragmentation and clinical outcomes of medically assisted reproduction: A systematic review and meta-analysis. *PloS One*. 2016; 11(11): e0165125.
32. Simon L, Liu L, Murphy K, Ge S, Hotaling J, Aston KI, et al. Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment. *Hum Reprod*. 2014; 29(5): 904-17.

Comparison of post-acrosomal sheath WWdomain-binding protein and chromatin status of sperm between normozoospermic and ab-normozoospermic men

Tavalaee M^{1*}, Azadi L¹, Nasr-Esfahani MH^{1,2}

¹Reproductive Biomedicine Research Center, Reproductive Biotechnology Dept., Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, I.R. Iran; ²Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, I.R. Iran.

Received: 3/Jan/2017

Accepted: 22/Apr/2017

Background and aims: Sperm post-acrosomal sheath WWdomain-binding protein (PAWP) was expressed during spermiogenesis and recently introduced as one of sperm factors involved in oocyte activation. So, the aim of this study was to compare sperm PAWP and chromatin status between men with normal (normozoospermia) and abnormal (ab-normozoospermia) sperm parameters.

Methods: Semen samples were assessed according to World Health Organization (2010) protocol and individuals were divided into normozoospermia (N=31) and ab-normozoospermia (N=23). Sperm PAWP were assessed by flow cytometry. Sperm DNA damage (TUNEL assay) and protamine deficiency (chromomycin A₃ staining) were assessed by fluorescent microscope in these individuals. Data were analyzed using independent t-test and Pearson coefficient test and by SPSS software.

Results: In this study, significant differences were observed in sperm parameters (concentration, motility, morphology) between men with normozoospermia and ab-normozoospermia (P<0.001). Mean percentage of sperm PAWP was significantly lower in ab-normozoospermic men compared to normozoospermic men (P<0.001). In addition, mean percentage of spermatozoa with DNA damage and protamine deficiency were significantly higher in ab-normozoospermic men compared to normozoospermic men (P<0.05). Furthermore, significant associations were observed between percentage of sperm PAWP with sperm parameters (P<0.05).

Conclusion: The results of the current study show that in men with ab-normozoospermia, sperm functional tests such as DNA damage, protamine deficiency, and also percentage of sperm factor (PAWP) related to oocyte activation were in range of abnormality. Therefore, assessment of these tests can be efficient in the decision of treatment in infertile men.

Keywords: PAWP, DNA damage, Protamine deficiency, Sperm parameters, Male infertility.

Cite this article as: Tavalaee M, Azadi L, Nasr-Esfahani MH. Comparison of post-acrosomal sheath WWdomain-binding protein and chromatin status of sperm between normozoospermic and ab-normozoospermic men. J Shahrekord Univ Med Sci. 2018; 20(2): 1-12.

***Corresponding author:**

Reproductive Biomedicine Research Center, Reproductive Biotechnology Dept., Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, I.R. Iran. Tel: 00989133143431, E-mail: tavalaee.royan@gmail.com