DOI: 10.22122/jims.v39i640.14340 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و نهم/شماره‌ی ۶۴۰/هفته‌ی چهارم آبان ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۷ تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۸/۲۸

ارتباط بین DNA فراگمانتاسیون اسپرم و بیان RNA غیر کد کننده‌ی HOTAIR در مردان نابارور

افسانه جابری اصل[۱]، محمدرضا شریفی[۲]، غلامرضا دشتی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ناباروری، یک اختلال در سیستم تولید مثلی است که درصد قابل توجهی از علل آن مربوط به مردان می‌باشد. آسیب‌های وارده به DNA و عوامل ایجاد کننده‌ی آن، تأثیر منفی بر نتایج باروری در زوجین دارد. هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، ارزیابی حیات، DNA فراگمانتاسیون اسپرم و بیان ژن HOTAIR در مردان بارور و نابارور و بررسی ارتباط بین آن‌ها بود.

روش‌ها: نمونه‌های مایع منی به صورت تصادفی از ۲۵ مرد بارور و ۲۵ مرد نابارور در محدوده‌ی سنی ۵۵-۲۵ سال که به مرکز باروری و ناباروری حضرت مریم (س) بیمارستان شهید بهشتی اصفهان مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری گردید. ارزیابی حیات اسپرم‌ها با رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین انجام شد. DNA فراگمانتاسیون با Sperm chromatin dispersion test (SCDT) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری سطح بیان HOTAIR، از روش Real-time polymerase chain reaction (Real time-PCR) استفاده شد.

یافته‌ها: میانگین بیان HOTAIR در افراد نابارور به طور معنی‌داری نسبت به گروه بارور کاهش یافت. سطح بیان HOTAIR با آسیب‌های DNA همبستگی منفی و با حیات اسپرم همبستگی مثبت معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: کاهش بیان HOTAIR و افزایش آسیب‌های DNA در افراد نابارور و همبستگی بین آن‌ها نشان از اهمیت ارزیابی آسیب DNA و تحقیقات پیرامون عوامل ایجاد کننده‌ی آن‌ها دارد.

واژگان کلیدی: اسپرم؛ DNA؛ RNA غیر کد کننده؛ HOTAIR؛ ناباروری

ارجاع: جابری اصل افسانه، شریفی محمدرضا، دشتی غلامرضا. **ارتباط بین DNA فراگمانتاسیون اسپرم و بیان RNA غیر کد کننده‌ی HOTAIR در مردان نابارور.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۴۰): ۶۵۸-۶۵۳.

مقدمه

ناباروری یک وضعیت پاتولوژیکی چندین علتی است که شیوع رو به افزایشی دارد و حدود ۴۰ درصد از مردان را درگیر کرده است (۱). علت های ناباروری در مردان متنوع هستند و شامل انسداد مجاری انزالی، کریپتورکیدیسم، واریکوسل، اختلالات هورمونی، انزال زودرس، استعمال دخانیات و استرس اکسیداتیو می‌باشند (۲). استرس اکسیداتیو، زمانی به وقوع می‌پیوندد که گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species یا ROS) افزایش می‌یابد و دفاع آنتی اکسیدانی بدن توانایی غیر فعال کردن آن ها را نداشته باشد. در نتیجه، بر هم خوردن تعادل سیستم آنتی اکسیدانی/ سطح ROS همراه با تغییر عملکرد، می‌تواند بقای سلول را به خطر بیندازد (۳).

گونه های فعال اکسیژن مانند هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن و سوپراکسید متابولیت های طبیعی در دستگاه تولید مثلی مردان می باشند (۴). آزاد شدن بیش از حد ROS، سلول اسپرم را به علت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پایین و دارا بودن غشای غنی از اسیدهای چرب غیر

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز باوری و ناباروری حضرت مریم (س)، بیمارستان شهید بهشتی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: غلامرضا دشتی: استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز باوری و ناباروری حضرت مریم (س)، بیمارستان شهید بهشتی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: dashti@med.mui.ac.ir

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

اشباع متحمل آسیب های بیشتری می کند (۵). افزایش سطح ROS با القای پراکسیداسیون لیپیدی غشای اسپرم، حیات، حرکت و غلظت اسپرم را کاهش می‌دهد، بر ریخت‌شناسی (Morphology) آن اثر می گذارد و پتانسیل باروری در مردان را کاهش می دهد (۶). ROS، با تخریب ساختار DNA (تخریب بازها و شکسته شدن DNA دو رشته‌ای) DNA فراگماتاسیون (DNA fragmentation) اسپرم را افزایش می‌دهد. آسیب DNA اسپرم‌ها توسط مکانیسم مختلفی ایجاد می‌شود و استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد، از اهمیت بسیاری برخوردار است. مطالعات متعدد همبستگی مثبت معنی‌داری بین سطح ROS و DNA فراگمانتاسیون را گزارش کرده‌اند (۸-۷).

RNAهای غیر کد کننده‌ی پروتئین با طول بلند (Long non-coding RNA یا lncRNA) رونوشت‌هایی با بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید می‌باشند که در چندین سال اخیر، به علت حضور در فرایندهای متنوع سلولی مورد توجه محققین قرار گرفته اند (۱۰-۹). از طریق تنظیم چرخه ی سلولی و آپوپتوز، نقش مهمی در کنترل رشد سلول ایفا می کنند (۱۱). همچنین، فعالیت های مهمی در پاتوژنز بسیاری از بیماری های انسان نظیر سرطان دارند که می توانند اهداف امیدوار کننده‌ای برای درمان و تشخیص باشند (۱۳-۱۲). گروهی از lncRNA در اسپرم به فراوانی بیان می‌شوند و عملکردهای مختلفی درمراحل اسپرماتوژنز دارند (۱۴). تنظیم فرایند استرس اکسیداتیو از جمله فعالیت های lncRNAها می باشد که در مطالعات اخیر مورد توجه قرار گرفته است. HOTAIR (HOX transcript antisense RNA) یک lncRNA تنظیم کننده‌ی سیستم آنتی‌اکسیدان/سطح ROS می‌باشد (۱۵). موقعیت آن بر روی کروموزم ۱۲q۱۳ قرار دارد. در بیضه، پروستات و پوست بیان بالایی دارد (۱۶). کاهش بیان HOTAIR در اسپرم بیماران آستنوزواسپرمی مشاهده شد و این کاهش، با اختلالات مرتبط با ROS در اسپرم همراه بوده است (۱۷).

پژوهش حاضر، در راستای اهمیت اثر استرس اکسیداتیو و نشانگرهای ژنتیکی در ایجاد آسیب‌های DNA تدوین شد. مطالعه‌ی حاضر، با هدف بررسی درصد آسیب‌های DNA و بیان ژن HOTAIR در اسپرم مردان بارور و نابارور و ارزیابی ارتباط آن‌ها انجام شد.

روش‌ها

در این مطالعه، ۵۰ نمونه‌ی مایع منی از میان مردان بارور و نابارور در محدوده‌ی سنی ۵۵-۲۵ سال که در سال های ۹۹-۱۳۹۸ برای درمان ناباروری به مرکز باروری و ناباروری حضرت مریم (س) بیمارستان شهید بهشتی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مراجعه کرده و واجد معیارهای مورد نظر بودند، با اخذ رضایت آگاهانه گرفته شد. نمونه‌ها در ظروف استریل مخصوص جمع‌آوری و به منظور مایع‌سازی به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد اتاق نگهداری شدند. بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۰ افراد در دو گروه مورد (بارور) و شاهد (نابارور) (n = ۲۵ در هر دو گروه) قرار گرفتند (۱۸).

ارزیابی حیات اسپرم‌ها با رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین (Eosin-Nigrosin staining)، انجام شد. برای این منظور، یک قطره از محلول اسپرماتوزوآی ذوب شده با دو قطره ائوزین ۱ درصد آماده گردید. با گذشت ۳۰ ثانیه، میزان ۳ قطره نیگروزین ۱۰ درصد به هر محلول اضافه شد. سپس، از هر نمونه بر روی لام میکروسکوپ، اسمیر تهیه و لام ها در دمای آزمایشگاه خشک شدند. حدود ۲۰۰ اسپرم در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی ۱۰۰ عدسی شیئی، شمارش شد و درصد اسپرم‌های زنده محاسبه گردید. باید توجه نمود اسپرم‌های زنده با رنگ سفید و اسپرم های فاقد حیات به دلیل پاره شدن غشا، به رنگ قرمز مشاهده شدند (۱۹).

بررسی میزان آسیب مادهی وراثتی (Sperm chromatin dispersion test یا SCDT): بررسی آسیب DNA، در نمونه‌های اسپرم از کیت هالواسپرم (شرکت دایان زیست آزما، ایران) استفاده شد. مقداری از اسپرم از هر نمونه (۵۰ میکرولیتر) با آگارز با نقطه‌ی ذوب پایین، مخلوط و سپس بر روی یک لام تخلیه و توسط لامل پوشیده شد. اسلایدها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸-۲ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس، اسلایدها در محلول Denaturing and Lysis غوطه‌ور شدند. اسلایدها در آب‌مقطر شسته و سپس، در اتانول (۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد) به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق و هوای خشک، جهت دهیدراته شدن قرار گرفتند. آن گاه، به وسیله‌ی محلول‌های موجود در کیت رنگ‌آمیزی شدند. برای هر اسلاید نمونه، حداقل ۲۰۰ اسپرم در زیر میکروسکوپ نوری با روغن ایمرسیون (بزرگ‌نمایی ۱۰۰) به منظور شناسایی هاله‌ی اطراف اسپرم شمارش شد. اسپرم‌های هاله‌دار به عنوان اسپرم‌هایی با DNA سالم و اسپرم‌های بدون هاله، به عنوان اسپرم‌هایی با DNA فراگمنته در نظر گرفته شدند (۲۰).

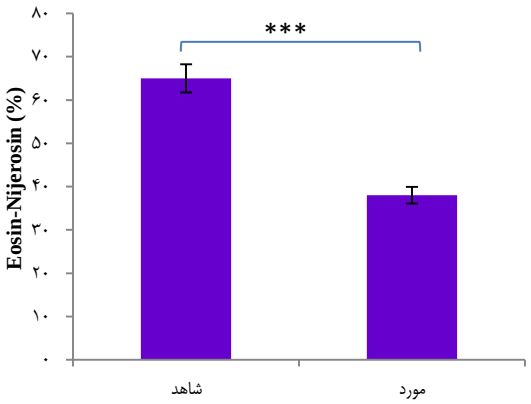
بیان ژن HOTAIR به روش Real-time polymerase chain reaction (PCR): RNA اسپرم طبق شیوه‌نامه‌ی کیت Super RNA extraction (شرکت آناسل، ایران) استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری تعیین گردید و سپس، RNAی استخراج شده، توسط کیت سنتز (cDNA) (شرکت آناسل، ایران) طبق دستورالعمل ارایه شده به cDNA تبدیل شد.توالی پرایمر ژن HOTAIR Forward: 5′TCTGGAGCTTGATCCGAAAG3′ و Reverse: 5′GGTGTTGGTCTGTGGAACT3′ می‌باشد. ژن GAPDH با توالی Forward: AAGCTCATTTCCTGGTATG و Reverse: CTTCCTCTTGTGCTCTTG به عنوان ژن رفرنس انتخاب

و در نهایت، Real-time PCR با استفاده از SYBRGreen Mastermix (Ampliqon, Denmark) انجام شد. سطح بیان نسبی HOTAIR با فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ سنجیده شد.

داده‌ها پس از جمع‌آوری وارد نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, IBM Corporation, Armonk, NY) شد. جهت تجزیه و تحلیل آزمون Independent t در صورت طبیعی بودن توزیع متغیرها (آزمون Mann-Whitney در صورت غیر طبیعی بودن توزیع متغیرها)، ضریب همبستگی Pearson در صورت طبیعی بودن توزیع متغیرها (Spearman در صورت غیر طبیعی بودن توزیع متغیرها) استفاده گردید. $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بین میانگین درصد حیات اسپرم در گروه شاهد و مورد (نابارور) اختلاف معنی داری مشاهده شد ($P < ۰/۰۰۱$). میانگین درصد حیات اسپرم در گروه مورد (۷/۶۳ ± ۳۷/۹۴)، ۲۷/۹۶ واحد کمتر از گروه شاهد (۸/۱۴ ± ۶۵/۹) می‌باشد که این اختلاف معنی‌دار است ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱. درصد حیات اسپرم (میانگین ± انحراف معیار) در گروه شاهد و مورد (n = ۲۵ در هر دو گروه). درصد حیات در دو گروه تفاوت معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۰۱$).

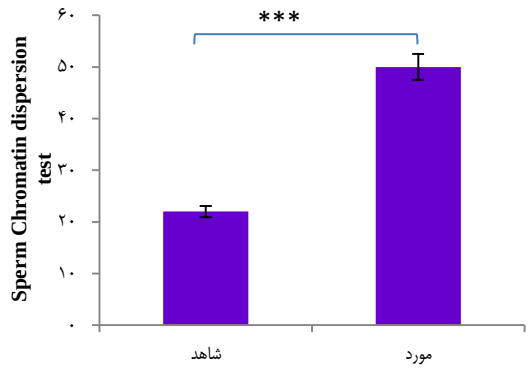
میانگین درصد آسیب‌های DNA اسپرم در گروه مورد (۷/۹۷ ± ۴۱/۴۵)، ۱۹/۶۸ واحد بیشتر از گروه شاهد (۷/۶۴ ± ۲۱/۷۷) می‌باشد. این اختلاف، معنی‌دار است ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل‌های ۳ و ۴). مقادیر مثبت ضریب همبستگی (Correlation coefficient) یا (r) بیانگر ارتباط مستقیم بین متغیرها و مقادیر منفی ارتباط معکوس را نشان داد. بین سطح آسیب DNA و حیات اسپرم (r = −۰/۷۳۲، $P < ۰/۰۰۱$) همبستگی منفی معنی‌داری مشاهده شد.

میانگین بیان نسبی ژن HOTAIR در گروه مورد (۰/۰۷ ± ۰/۲۶) پایین‌تر از گروه شاهد (۱/۷۶ ± ۱/۰۰) بود. بین میانگین بیان ژن در دو گروه اختلاف ۰/۷۴ به دست آمد که این اختلاف معنی دار بود. بین سطح بیان ژن HOTAIR و حیات اسپرم (r = ۰/۵۱۳، $P < ۰/۰۰۱$) همبستگی مثبت و با آسیب DNA (r = −۰/۴۰۳، $P < ۰/۰۰۱$) همبستگی منفی معنی‌داری مشاهده شد.

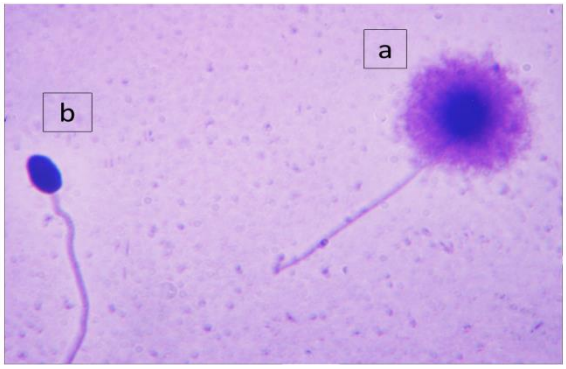
شکل ۲. رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین. اسپرم‌های سفید رنگ (بدون رنگ)، به عنوان سلول زنده (a) و اسپرم‌های قرمز رنگ به عنوان سلول مرده (b) در نظر گرفته شدند (میکروسکوپ نوری بزرگ‌نمایی ×۱۰۰۰)

بحث

ناباروری، یکی از مشکلات شایع در بین زوجین می‌باشد که روز به روز آمار آن در حال افزایش است. حدود نیمی از موارد ناباروری، مربوط به عوامل مردانه می‌باشد. با این وجود، روندهای پاتولوژیک ناباروری هنوز به درستی درک نشده است.



شکل ۳. درصد آسیب‌های DNA اسپرم (میانگین ± انحراف معیار) در دو گروه شاهد و مورد (n = ۲۵ در هر دو گروه). درصد آسیب‌های DNA در گروه مورد بیشتر از گروه شاهد بود و تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P < ۰/۰۰۱$).



شکل ۴. آزمون Sperm chromatin dispersion (SCD). اسپرم‌های هاله‌دار (a) دارای DNA طبیعی بودند و اسپرم‌های بدون هاله (b) دارای DNA غیر طبیعی هستند (میکروسکوپ نوری بزرگ‌نمایی ×۱۰۰۰)

یکپارچگی DNA اسپرم، نقش اساسی در لقاح دارد؛ به طوری که لقاح موفق، لانه‌گزینی صحیح و رشد جنین به یکپارچگی DNA متکی می‌باشد (۲۱).آسیب DNA اسپرم، باعث انتقال معیوب ژنوم پدری به جنین می‌شود و پیامدهای نامطلوبی برای آن به همراه دارد. از این رو، ارزیابی آسیب‌های DNA در روند تشخیص و درمان ناباروری اهمیت بالایی دارد (۲۲). تجزیه و تحلیل داده‌های مطالعه‌ی حاضر نشان داد که بین حیات و آسیب DNA اسپرم، در گروه‌های شاهد و مورد تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P < ۰/۰۰۱$). همچنین، همبستگی معنی‌داری بین حیات و آسیب DNA اسپرم مشاهده شد ($P < ۰/۰۰۱$). با بررسی آسیب‌های DNA اسپرم در افراد بارور و نابارور، مشخص شد که فراگمانتاسیون DNA اسپرم در دو گروه تفاوت معنی‌داری دارد. درصد آسیب‌های DNA اسپرم افراد نابارور بیشتر می‌باشد (۲۵-۲۳). طبق مطالعات، در مردانی که ویژگی‌های مایع منی آن‌ها شامل حرکت، حیات و ریخت‌شناسی غیر طبیعی به دست آمد، درصد آسیب‌های DNA بالاتری مشاهده شد (۲۷-۲۶). آسیب‌های DNA با تأثیر بر اسپرم، باعث کاهش باروری در مردان می‌شود (۲۸). مطالعه‌ی ما در راستای تأیید یافته‌های مطالعات پیش‌گفته می‌باشد.

شناسایی عوامل پاتولوژیکی و ژنتیکی که در روند آسیب به DNA اسپرم شرکت می‌کنند، مورد توجه قرار گرفته است. استرس اکسیداتیو، یکی از عوامل اصلی آسیب DNA در اسپرم می‌باشد؛ به طوری که ROS اضافی با شکستن رشته‌ها و اتصالات عرضی کروموزوم، فراگمانتاسیون DNA را افزایش می‌دهند (۷). طبق مطالعات گذشته، بیان HOTAIR در اسپرم بیماران مبتلا به الیگواستنوزواسپرمی و آستنوزواسپرمی کمتر از گروه شاهد است. کاهش بیان HOTAIR منجر به افزایش بیان ROS و اختلال در متغیرهای اسپرم می‌شود (۱۷). مطالعه‌ی حاضر نشان داد که سطح بیان HOTAIR در مردان نابارور به طور قابل توجهی پایین تر از گروه شاهد می‌باشد. سطح بیان HOTAIR با درصد حیات اسپرم همبستگی مثبت و آسیب‌های DNA اسپرم، همبستگی منفی معنی داری دارد. بیان بیش از حد HOTAIR از طریق بهبود عملکرد قلب، کاهش استرس اکسیداتیو و مرگ میوسیت اثرات مفیدی بر روی میوسیت قلبی در موش‌های مبتلا به دیابت ایجاد کرد (۲۹). HOTAIR یک تنظیم کننده‌ی اصلی منفی استرس اکسیداتیو است (۳۰). با این وجود، در چندین مطالعه، گزارش کردند که بیان بیش از حد HOTAIR قادر به افزایش ROS می‌باشد (۳۲-۳۱).

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که سطح HOTAIR در گروه مورد پایین تر است و بین سطح HOTAIR حیات و فراگمانتاسیون DNA همبستگی معنی داری وجود دارد؛ بدین صورت که با کاهش سطح HOTAIR، افزایش در DNA فراگمانتاسیون اسپرم مشاهده گردید ($P < ۰/۰۰۱$). اگر چه شواهد کافی در این زمینه وجود ندارد، اما می‌تواند یک گام رو به جلو در تحقیقات آینده‌ی ناباروی در مردان باشد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این مطالعه، به نظر می رسد که سطح بیان HOTAIR در مردان نابارور به طور قابل توجهی مهار می‌شود که می‌تواند منجر به اختلال در ناباروری و آسیب DNA اسپرم شود. بنابراین، ارزیابی آسیب DNA و تحقیقات پیرامون عوامل ایجاد کننده‌ی آن‌ها، در بهینه‌سازی اهداف درمانی و تشخیصی ناباروری کمک خواهد کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد علوم تشریحی به کد علمی ۳۹۸۷۹۲ و کد اخلاق IR.MUI.MED.REC.1399.025 می‌باشد که در معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تصویب و با حمایت این معاونت اجرا شده است. از این رو، از معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری این دانشگاه سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Oztekin U, Caniklioglu M, Sari S, Selmi V, Gurel A, Isikay L. Evaluation of male infertility prevalence with clinical outcomes in middle anatolian region. Cureus 2019; 11(7): e5122.
2. Naz M, Kamal M. Classification, causes, diagnosis and treatment of male infertility: A review. Orient Pharm Exp Med 2017; 17(2): 89-109.
3. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative stress: Harms and benefits for human health. Oxid Med Cell Longev 2017; 2017: 8416763.
4. Sadeghi Z, Shahla Ishaqi S, Dashti GR. The effect of folic acid and nicotinic acid on malondialdehyde levels of semen in oligospermia men after

cryopreservation. J Isfahan Med Sch 2021; 38(603): 921-8. [In Persian].
5. Toghiani S, Hayati RN, Dashti GR, Rouzbehani S. The effects of vitamin C and menthone on acyclovir induced DNA damage in rat spermatozoa: An experimental study. Int J Reprod Biomed 2018; 16(11): 703-10.
6. Rui BR, Shibuya FY, Kawaoku AJT, Losano JDA, Angrimani DSR, Dalmazzo A, et al. Impact of induced levels of specific free radicals and malondialdehyde on chicken semen quality and fertility. Theriogenology 2017; 90: 11-9.
7. Dorostghoal M, Kazeminejad SR, Shahbazian N, Pourmehdi M, Jabbari A. Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. Andrologia 2017; 49(10).
8. Zamani Rarani F, Golshan-Iranpour F, Dashti GR. Correlation between sperm motility and sperm chromatin/DNA damage before and after cryopreservation and the effect of folic acid and nicotinic acid on post-thaw sperm quality in normozoospermic men. Cell Tissue Bank 2019; 20(3): 367-78.
9. Bhat SA, Ahmad SM, Mumtaz PT, Malik AA, Dar MA, Urwat U, et al. Long non-coding RNAs: Mechanism of action and functional utility. Noncoding RNA Res 2016; 1(1): 43-50.
10. Marchese FP, Raimondi I, Huarte M. The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function. Genome Biol 2017; 18(1): 206.
11. Li Q, Zhang J, Su DM, Guan LN, Mu WH, Yu M, et al. lncRNA TUG1 modulates proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis via targeting miR-29b in trophoblast cells. Hum Genomics 2019; 13(1): 50.
12. Sabet M, Sharifi M, Heidari M, Kazemi M, Babaei N. Blockage of HOTAIR reduced cell proliferation in human ovarian cancer cells through upregulation of AKT2. Indian J Gynecol Oncol 2019; 17(4): 85.
13. Abbastabar M, Sarfi M, Golestani A, Khalili E. lncRNA involvement in hepatocellular carcinoma metastasis and prognosis. EXCLI J 2018; 17: 900-13.
14. Joshi M, Rajender S. Long non-coding RNAs (lncRNAs) in spermatogenesis and male infertility. Reprod Biol Endocrinol 2020; 18(1): 103.
15. Li L, Zhang M, Chen W, Wang R, Ye Z, Wang Y, et al. LncRNA-HOTAIR inhibition aggravates oxidative stress-induced H9c2 cells injury through suppression of MMP2 by miR-125. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2018; 50(10): 996-1006.
16. Mozdarani H, Ezzatizadeh V, Rahbar PR. The emerging role of the long non-coding RNA HOTAIR in breast cancer development and treatment. J Transl Med 2020; 18(1): 152.
17. Zhang L, Liu Z, Li X, Zhang P, Wang J, Zhu D, et al. Low long non-coding RNA HOTAIR expression is associated with down-regulation of Nrf2 in the spermatozoa of patients with asthenozoospermia or oligoasthenozoospermia. Int J Clin Exp Pathol 2015; 8(11): 14198-205.
18. Cooper TG, Noonan E, von ES, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update 2010; 16(3): 231-45.
19. Nateghian Z, Dashti GR, Baghazadeh S, Golshan-Iranpour F. Effects of keeping semen samples in 4-6 °C on sperm motility, viability and dna denaturation. J Isfahan Med Sch 2016; 34(401): 1181-6. [In Persian].
20. Golshan-Iranpour f, Zamani Rarani F, Dashti GR. Effect of chromatin condensation on frozen-thawed sperm DNA integrity in normozoospermic men. Sci J Kurdistan Univ Med Sci 2019; 24(3): 34-42. [In Persian].
21. Sefidgar Tehrani M, Amirian M, Jalali M, Attaranzadeh A, Fazel A, Ebrahimzadeh Bideskan Al. Comparison of intracytoplasmic sperm injection outcome with sperm selection techniques in oligoasthenozoospermic males: A randomized controlled trial. Iran Red Crescent Med J 2019; 21(1): E70656.
22. O'Neill CL, Parrella A, Keating D, Cheung S, Rosenwaks Z, Palermo GD. A treatment algorithm for couples with unexplained infertility based on sperm chromatin assessment. J Assist Reprod Genet 2018; 35(10): 1911-7.
23. Li MW, Lloyd KCK. DNA fragmentation index (DFI) as a measure of sperm quality and fertility in mice. Sci Rep 2020; 10(1): 3833.
24. Zidi-Jrah I, Hajlaoui A, Mougou-Zerelli S, Kammoun M, Meniaoui I, Sallem A, et al. Relationship between sperm aneuploidy, sperm DNA integrity, chromatin packaging, traditional semen parameters, and recurrent pregnancy loss. Fertil Steril 2016; 105(1): 58-64.
25. Muratori M, Pellegrino G, Mangone G, Azzari C, Lotti F, Tarozzi N, et al. DNA fragmentation in viable and non-viable spermatozoa discriminates fertile and subfertile subjects with similar accuracy. J Clin Med 2020; 9(5).
26. Evgeni E, Lymberopoulos G, Gazouli M, Asimakopoulos B. Conventional semen parameters and DNA fragmentation in relation to fertility status in a Greek population. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2015; 188: 17-23.
27. Ghasemi N, Dashti G, Amoozgar F, Vaez SA. Effect of cholesterol, iron and vitamin E on protamine deficiency and dna fragmentation of male rabbit sperm. J Isfahan Med Sch 2013; 31(259): 1769-78. [In Persian].
28. Ajina T, Ammar O, Haouas Z, Sallem A, Ezzi L, Grissa I, et al. Assessment of human sperm DNA integrity using two cytochemical tests: Acridine orange test and toluidine blue assay. Andrologia 2017; 49(10): 1-6.
29. Gao L, Wang X, Guo S, Xiao L, Liang C, Wang Z, et al. LncRNA HOTAIR functions as a competing endogenous RNA to upregulate SIRT1 by sponging miR-34a in diabetic cardiomyopathy. J Cell Physiol 2019; 234(4): 4944-58.
30. Meng K, Jiao J, Zhu RR, Wang BY, Mao XB, Zhong YC, et al. The long noncoding RNA hotair regulates oxidative stress and cardiac myocyte apoptosis during ischemia-reperfusion injury. Oxid Med Cell Longev 2020; 2020: 1645249.
31. Xu G, Zhang W, Wang Z, Chen M, Shi B. Matrine regulates H2O2-induced oxidative stress through long non-coding RNA HOTAIR/miR-106b-5p axis via AKT and STAT3 pathways. Biosci Rep 2020; 40(5): BSR20192560.
32. Liu J, Huang GQ, Ke ZP. Silence of long intergenic noncoding RNA HOTAIR ameliorates oxidative stress and inflammation response in ox-LDL-treated human macrophages by upregulating miR-330-5p. J Cell Physiol 2019; 234(4): 5134-42.

DOI: 10.22122/jims.v39i640.14340 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School Vol. 39, No. 640, 4th Week, November 2021

Received: 16.03.2021 Accepted: 20.09.2021 Published: 26.11.2021

The Correlation between Sperm DNA Fragmentation and the Expression of Long Non-Coding RNA HOTAIR in Infertile Men

Afsaneh Jaberi-Asl[1], Mohammadreza Sharifi[2], Gholam Reza Dashti[3]

Original Article

Abstract

Background: Infertility is a disorder of the reproductive system that affects a significant percentage of men. DNA damage and its causative agents negatively affect fertility outcomes. The present study aimed to evaluate the sperm viability, DNA fragmentation, and HOTAIR gene expression in infertile and fertile men, and to investigate the correlation between them.

Methods: Specimens of semen were obtained randomly from 25 fertile and 25 infertile men, aged between 25-55 years who were referred to Saint Maryam Fertility and Infertility Center of Shahid Beheshti Hospital, Isfahan, Iran. Sperm viability was assessed using Eosin-Nigrosin staining. DNA fragmentation was assessed by sperm chromatin dispersion test (SCDT). The expression of HOTAIR was detected using real-time polymerase chain reaction (real time-PCR).

Findings: HOTAIR gene expression in infertile people was significantly decreased in comparison to fertile group. HOTAIR expression level was negatively correlated with DNA fragmentation and positively correlated with sperm viability ($P < 0.001$).

Conclusion: Decreased HOTAIR expression and increased DNA damage in infertile people and the correlation between them indicating the importance of assessing DNA damage and research on their causative agents.

Keywords: Sperm; DNA; Long non-coding RNA; HOTAIR; Infertility

Citation: Jaberi-Asl A, Mohammadreza Sharifi M, Dashti GR. **The Correlation between Sperm DNA Fragmentation and the Expression of Long Non-Coding RNA HOTAIR in Infertile Men.** J Isfahan Med Sch 2021; 39(640): 653-8.

1- MSc Student, Department of Anatomy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine AND Saint Maryam Fertility and Infertility Center, Shahid Beheshti Hospital, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Gholam Reza Dashti, Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine AND Saint Maryam Fertility and Infertility Center, Shahid Beheshti Hospital, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: dashti@med.mui.ac.ir