مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۳۱۳/هفته دوم بهمن ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۲

ارزیابی شکست DNA اسپرم در بیماران با گلبوزوسپرمیای نسبی

فرشته رسولی[۱]، دکتر مرجان صباغیان[۲]، دکتر محمد علی صدیقی گیلانی[۳]، دکتر رامش منجمی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ناباروری یکی از مشکلاتی است که حدود ۱۵ درصد از زوج‌ها با آن مواجه می‌باشند. مطالعات نشان داده است که اسپرم مردان نابارور دارای نقص‌های عملکردی و ساختاری متفاوتی می‌باشد. گلبوزوسپرمیا یک نوع نادر ولی شدید از اختلالات اسپرم با شیوع کمتر از ۰/۱ درصد است که باعث ناباروری مردان می‌گردد و اسپرم‌هایی با سر گرد و فاقد آکروزوم از جمله ویژگی‌های مورفولوژیک آن محسوب می‌گردد. در گلبوزوسپرمیای کامل، تمام اسپرم‌ها ودر گلبوزوسپرمیای نسبی، درصدی از اسپرم‌ها فاقد آکروزوم بوده، دارای سر گرد هستند. در مطالعات قبلی مشخص شده است که میزان شکست DNAاسپرم با اختلالات مورفولوژی اسپرم در ارتباط می‌باشد. در نتیجه، ممکن است که اسپرم‌های سرگرد، دارای اختلال در ساختار کروماتین و یا شکست DNA باشند. هدف از این مطالعه، ارزیابی شکست DNA اسپرم در بیماران مبتلا به گلبوزوسپرمیای نسبی بود.

روش‌ها: این مطالعه بر روی ۳۳ فرد مبتلا به بیماری گلبوزوسپرمای نسبی و ۴۴ مرد با اسپرموگرام طبیعی بر طبق معیارهای سازمان جهانی بهداشت، مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری پژوهشگاه رویان صورت گرفت. شکست DNA اسپرم با استفاده از دو روش TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) و SCSA (Sperm chromatin structure assay) برای هر فرد مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: شکست DNA در گروه بیمار و شاهد با روش TUNEL به ترتیب ۱۸/۶۸ ± ۲۴/۸۱ و ۴/۲۲ ± ۱۱/۵۰ درصد و با روش SCSA به ترتیب ۱۶/۶۹ ± ۲۶/۵۷ و ۹/۲۴ ± ۱۴/۷۵ درصد بود. میزان درصد شکست DNA در بیماران گلبوزوسپرمیای نسبی تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد در هر دو روش TUNEL و SCSA نشان داد. در گروه شاهد و بیمار بین نتایج روش TUNEL و SCSA رابطه‌ی معنی‌دار مثبت وجود داشت ($P < ۰/۰۰۱$؛ $r = ۰/۴۸۴$). همچنین، با هر دو روش، رابطه‌ی معنی‌داری بین شکست DNA و پارامترهای اسپرمی نظیر سر گرد مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: تا زمان انجام این پژوهش، چندین مطالعه در زمینه‌ی یافتن ارتباط بین میزان شکست DNA و ویژگی‌های اسپرم انجام شده بود و این مطالعه بزرگ‌ترین مطالعه‌ای بود که درباره‌ی رابطه‌ی بین DFI (DNA Fragmentation Index) و اسپرم‌های با سر گرد با استفاده از روش‌های TUNEL و SCSA در بیماران گلبوزوسپرم نسبی انجام شد. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که در اسپرم‌هایی که شکل سر آن‌ها غیرطبیعی است، ساختار DNA نیز دچار نقص بوده، در برابر آسیب حساس‌تر می‌باشد.

واژگان کلیدی: گلبوزوسپرمیای نسبی، شکست DNA، روش Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)، روش Sperm chromatin structure assay (SCSA)، ناباروری مردان

ارجاع: رسولی فرشته، صباغیان مرجان، صدیقی گیلانی محمد علی، منجمی رامش. **ارزیابی شکست DNA اسپرم در بیماران با گلبوزوسپرمیای نسبی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۱۳): ۲۱۳۳-۲۱۲۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه آندرولوژی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده‌ی زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل، جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه آندرولوژی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده‌ی زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل، جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مرجان صباغیان
Email: marjan.sabbaghian@gmail.com

مقدمه

با توجه به افزایش روزافزون تعداد زوج‌های نابارور، درک بهتر هر نوع ناباروری می‌تواند کمک بزرگی جهت یافتن راه‌های درمانی بهتر و کارآمدتر باشد. در جوامع کنونی، حدود ۱۵ درصد از زوجین با مشکلات ناباروری مواجه‌اند که در نیمی از این موارد، ناباروری زوجین به علت ناتوانی مرد در تولید اسپرم‌های طبیعی می‌باشد (۱).

از میان ناباروری‌ها با علل مردانه، گلبوزوسپرمیا (Globozoospermia) نوع نادری از تراتوزوسپرمیا (Teratozoospermia) با شیوع کمتر از ۰/۱ درصد در میان مردان نابارور) است که در آن اسپرم‌ها دارای سری با شکل غیرطبیعی کروی می‌باشند. برای اولین بار در سال ۱۹۶۵، Meyhofer با استفاده از میکروسکوپ نوری موفق به مشاهده‌ی اسپرم‌هایی با سر کروی در مایع سمن مردان گردید (۲). اما مطالعه‌ی دقیق ساختار آن‌ها توسط Schirren و همکاران در سال ۱۹۷۱ با استفاده از میکروسکوپ الکترونی انجام گرفت. در مایع سمن مردان بارور، درصد کمی از اسپرم‌ها (به طور متوسط، ۶ درصد) به طور طبیعی دارای سری کروی هستند که مقدار اسپرماتوزوآی فاقد آکروزوم در مایع سمن، اثر منفی روی قدرت باروری مردان نخواهد گذاشت. اما در بیماران گلبوزوسپرمیای نسبی، بین ۲۰ تا ۱۰۰ درصد اسپرم‌ها سرگرد می‌باشند (۳).

بیماری گلبوزوسپرمیا به علت نقص در تشکیل آکروزوم در طول فرآیند اسپرمیوژنز ایجاد می گردد. وجود این اندامک ترشحی برای بارور کردن تخمک ضروری است و اسپرماتوزوئیدهای فاقد آکروزوم، قادر به لقاح با تخمک نخواهند بود؛ چرا که به علت فقدان آکروزوم و محتویات آن، نمی‌توانند از ناحیه‌ی شفاف عبور کنند. دو نوع گلبوزوسپرمیا تعریف شده است. در نوع یک یا گلبوزوسپرمیای کامل، ۱۰۰ درصد اسپرم ها فاقد آکروزوم بوده، دارای سری گرد می‌باشند و در نوع دو یا گلبوزوسپرمیای نسبی، ترکیبی از اسپرم‌های طبیعی و اسپرم‌های با سر کروی دیده می‌شود (۴).

در بررسی‌های انجام شده تا کنون، تغییرات چندین ژن در ارتباط با ایجاد بیماری گلبوزوسپرمیا مطرح شده است که از مهم‌ترین آن‌ها، حذف ژن DPYL2 می‌باشد (۵). در مطالعات قبلی مشخص شده است که میزان شکست DNA اسپرم با اختلالات مورفولوژی اسپرم در ارتباط است. طی فرآیند بلوغ، اسپرم دچار یک سری تغییرات مورفولوژیک و بیوشیمیایی می شود که برای کسب قدرت باروری فرد ضروری است. از جمله ی این تغییرات، می‌توان به بسته‌بندی و متراکم شدن کروماتین در هسته ی اسپرم طی مراحل اسپرمیوژنز اشاره نمود (۶). عامل اصلی متراکم شدن کروماتین، جایگزینی پروتامین با هیستون می‌باشد. هر گونه نقص در فرآیند جایگزینی می تواند ژنوم پدر را در برابر عوامل آندوژن و اگزوژن آسیب‌پذیر کند. تحقیقات در این زمینه، نشان‌دهنده‌ی رابطه‌ی مستقیم بین میزان پروتامین و سلامت و یک پارچگی DNA است (۸-۷).

در دهه‌ی گذشته، مطالعات فراوانی درباره‌ی نقش DNA هسته در ناباروری مردان صورت پذیرفت. مطالعات متعدد نشان دادند که اسپرم افراد نابارور، دارای آسیب DNA بیشتری نسبت به افراد بارور می‌باشد. علاوه بر این، سطح بالای آسیب DNA

ممکن است با کیفیت پایین پارامترهای اسپرمی رابطه داشته باشد (۹، ۶).

روش‌های متعددی برای تشخیص میزان آسیب DNA اسپرم وجود دارد که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)، Sperm chromatin dispersion (SCD)، Sperm chromatin structure assay (SCSA)، Single cell gel electrophoresis (SCGE) یا COMET و Acridine orange staining (AOT) اشاره کرد. از میان این روش‌ها، روش TUNEL به عنوان یک روش دقیق جهت بررسی شکستگی های تک رشته‌ای و دو رشته‌ای DNA در بیشتر مقالات گزارش شده است (۱۳-۱۰).

تعیین ارتباط بین ناهنجاری‌های مورفولوژیک و میزان شکست DNA اسپرم اهمیت زیادی در پیش بینی نتایج روش‌های کمک‌باروری دارد. از آن جایی که تا زمان انجام این پژوهش، مطالعات محدودی در زمینه‌ی بررسی ارتباط ساختار کروماتین با مورفولوژی گلوبوزوسپرمیا صورت گرفته بود، در این تحقیق کروماتین اسپرم تعداد قابل توجهی از این بیماران مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه‌ی هم‌گروهی آینده‌نگر (Cohort) بود که بر روی ۳۳ فرد مبتلا به بیماری گلبوزوسپرمیای نسبی و ۴۴ مرد با اسپرموگرام طبیعی بر طبق معیارهای سازمان جهانی بهداشت (WHOیا World Health Organization)، مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری پژوهشگاه رویان صورت گرفت.

نمونه‌ها از طریق Masturbation، بعد از حداقل ۴-۳ روز پرهیز از ارتباط جنسی جمع‌آوری شد. قسمتی از نمونه‌ی مایع سمن جهت بررسی پارامترهای اسپرمی (تعداد و تحرک) با نرم‌افزار CASA (Computer-aided sperm analysis) و مورفولوژی اسپرم با روش رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو بر اساس معیار سازمان جهانی بهداشت انجام شد و باقی‌مانده‌ی نمونه جهت ارزیابی درصد شکستگی DNA با استفاده از دو روش TUNEL و SCSA، تا زمان انجام آزمایش در تانک نیتروژن نگهداری گردید.

از میان مراجعه کنندگان به پژوهشگاه رویان، گروه بیمار را مردانی تشکیل دادند که در بررسی مایع سمن آن‌ها بعد از رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو، ۹۰-۲۰ درصد اسپرم‌ها دارای مورفولوژی سر کروی بودند. گروه شاهد را افرادی تشکیل دادند که دارای اسپرموگرام طبیعی (مورفولوژی بیش از ۷ درصد، مجموع حرکت بیش از ۴۰ درصد و تعداد اسپرم بیش از ۲۰ درصد) بودند.

پس از آنالیز مایع سمن، از باقی‌مانده‌ی آن جهت بررسی شکست DNA اسپرم با دو روش SCSA و TUNEL استفاده شد.

روش SCSA: در این روش، ابتدا نمونه‌های فریز به سرعت ذوب شدند. سپس ۲۰۰ ماکرولیتر PBS (Phosphate-buffered saline) به ۱۰۰ ماکرولیتر از مایع سمن اضافه و به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰ g سانتریوفوژ گردید. محلول رویی دور ریخته شد و به ۲۰۰ ماکرولیتر از نمونه‌ی شسته شده، ۴۰۰ ماکرولیتر محلول اسیدی (تریتون ۱۰۰×، سدیم کلرید، اسید هیدروکلریدریک) اضافه گردید و ۴۰ ثانیه در دمای اتاق قرار داده شد. به محلول تیمار شده با اسید، ۱/۲ میلی‌لیتر محلول رنگی سیتریک اسید، دی‌سدیم

هیدروژن فسفات، اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید، سدیم کلرید، آکریدین اورانژ افزوده و به سرعت توسط دستگاه فلوسایتومتری (شمارش ۱۰۰۰۰ اسپرم) بررسی شد. در نمونه‌ی شاهد نیز به جای اسید از PBS استفاده شد و سپس مرحله‌ی رنگ آمیزی انجام گردید. درصد جمعیت سلولی که رنگ قرمز از خود بروز دادند، نشان دهنده‌ی میزان شکست DNA به شمار رفت (۱۵-۱۴).

روش TUNEL: این روش از جمله‌ی تکنیک‌های بسیار حساس و اختصاصی در شناسایی اسپرم غیر طبیعی از اسپرم‌های سالم است. کیت TUNEL از شرکت پرومگای آمریکا تهیه شد. در این روش، ابتدا اسپرم‌ها با استفاده از محلول PBS بعد از ذوب نمونه شستشو شد، سپس بر روی لام، اسمیر تهیه گردید. بعد از خشک شدن لام، ۲۰۰ ماکرولیتر پارافرمالدئید ۴٪ اضافه و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. سپس با محلول PBS شستشو انجام و به آن، محلول نفوذپذیر (۰/۱ درصد تریتون ۱۰۰× در ۰/۱ درصد سدیم سیترات) اضافه شد. بعد از ۱۰ دقیقه قرار گرفتن در دمای اتاق، دو بار با PBS شستشو انجام شد. سپس، اضافه کردن ۵۰ ماکرولیتر از ترکیب واکنش کننده‌ی فعال به هر لام در تاریکی و انکوباسیون لام‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام گرفت. در آخر، دو بار شستشو با PBS و اضافه کردن PI (Propidium Iodide) انجام شد.

بر اساس این تکنیک، رنگ فلورسنت Fluorescein-12-dUTP با استفاده از آنزیم Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) به انتهای OH- از 3DNA` (قطعات شکسته‌ی DNA) اتصال می‌یابد. Fluorescein-12-d UTP، DNA را نشان‌دار نموده، امکان مشاهده‌ی مستقیم آن را فراهم می‌نماید. رنگ فلورسنت مشاهده شده در هر اسپرم، نشان‌گر شکستگی در رشته یا رشته‌های DNA است. بر اساس حضور یا عدم حضور رنگ فلورسنت در ناحیه‌ی سر اسپرم، اسپرم‌ها به عنوان TUNEL مثبت (اسپرم دارای شکستگی DNA) یا منفی (اسپرم‌های دارای DNA سالم) در نظر گرفته می‌شود. در هر لام، حداقل ۱۰۰ اسپرم شمارش و درصدگیری می‌شود (۱۶).

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری ضریب همبستگی (Pearson Correlation test) و t در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام گرفت و مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار محسوب شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از ارزیابی پارامترهای اسپرمی در افراد دچار گلبوزوسپرمیای نسبی و مقایسه‌ی آن با پارامترهای اسپرمی افراد شاهد در جدول ۱ نشان داده شده است. پارامترهای اسپرمی بین دو گروه شاهد و بیمار به طور معنی‌داری متفاوت بود.

درجات آسیب DNA اسپرم با استفاده از هر دو روش به تفکیک گروه‌های شاهد و بیمار در جدول ۲ نشان داده شده است. ملاحظه می‌شود که میانگین DNA fragmentation index (DFI) با استفاده از هر دو روش در بیماران دچار گلبوزوسپرمیای نسبی افزایش معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۵$).

در جدول ۳، ارتباط نتایج روش‌های TUNEL و SCSA با یکدیگر و همین طور، ارتباط آن با

پارامترهای اسپرم نشان داده شده است. از لحاظ آماری، رابطه‌ی معنی‌داری بین نتایج هر دو روش و همچنین، ارتباط معنی‌داری بین نتایج هر یک از این روش‌ها با درصد اسپرم سرگرد مشاهده شد. به نحوی که، با افزایش درصد سرگرد بودن، میزان آسیب DNA بیشتر شده بود ($P < ۰/۰۰۱$؛ $r = ۰/۴۸۴$).

بحث

استفاده از روش‌های کمک‌باروری (ART یا Assisted reproductive technology) بهترین گزینه برای رفع مشکلات زوج‌های نابارور است. میزان موفقیت این روش‌ها به عوامل متعددی نظیر سلامت کامل تخمک و اسپرم بستگی دارد. مطالعات نشان داده است که اسپرم مردان نابارور دارای نقص‌های عملکردی و ساختاری متفاوتی می‌باشد. امروزه، ارزیابی اولیه‌ی مایع سمن، جزء اولین اقدامات انجام گرفته در بررسی زوجین نابارور است؛ اما آنالیز مایع سمن به تنهایی نمی تواند

جدول ۱. نتایج آنالیز سمن افراد بیمار و شاهد

گروه		غلظت (۱۰^۶ میلیون/میلی‌لیتر)	درصد تحرک اسپرم	درصد مورفولوژی طبیعی	درصد سر گرد
گلبوزوسپرمیای نسبی	میانگین ± انحراف استاندارد	۲۰/۳۸ ± ۱۵/۰۱	۱۴/۵۲ ± ۱۲/۶۸	۰/۶۰ ± ۰/۳۶	۲۰/۸۲ ± ۴۸/۰۰
	حداقل	۰/۳۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۲۰
	حداکثر	۸۴	۴۵	۲	۹۰
شاهد	میانگین ± انحراف استاندارد	۲۹/۲۶ ± ۷۹/۸۶	۱۲/۵۲ ± ۶۶/۰۴	۲/۱۷ ± ۹/۲۰	-
	حداقل	۲۱	۴۸	۷	-
	حداکثر	۱۵۱	۹۱	۱۶	-

جدول ۲. بررسی شکست DNA اسپرم با دو روش TUNEL و SCSA در دو گروه بیمار و شاهد

	گروه	حداقل	حداکثر	میانگین ± انحراف استاندارد
میزان شکست DNA با روش TUNEL	گلبوزوسپرمیای نسبی	۵	۸۰	۱۸/۶۸ ± ۲۴/۸۱
	شاهد	۴	۲۰	۴/۲۳ ± ۱۱/۵۰
میزان شکست DNA با روش SCSA	گلبوزوسپرمیای نسبی	۵	۶۵	۱۶/۶۹ ± ۲۶/۵۷
	شاهد	۴	۴۲	۹/۲۴ ± ۱۴/۷۵

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; SCSA: Sperm chromatin structure assay

جدول ۳. رابطه‌ی بین نتایج روش‌های TUNEL و SCSA

		TUNEL	SCSA	مورفولوژی اسپرم	تحرک اسپرم	غلظت اسپرم	درصد سر گرد
TUNEL	r (P-value)	۱	۰/۴۸۴ (< ۰/۰۰۱)	-۰/۴۳۲ (< ۰/۰۰۱)	-۰/۴۶۸ (< ۰/۰۰۱)	-۰/۳۸۸ (< ۰/۰۰۱)	۰/۶۲۰ (< ۰/۰۰۱)
SCSA	r (P-value)	۰/۴۸۴ (< ۰/۰۰۱)	۱	-۰/۴۱۸ (< ۰/۰۰۱)	-۰/۳۵۵ (۰/۰۰۲)	-۰/۲۵۰ (۰/۰۲۸)	۳۸۳ (۰/۰۲۸)
درصد سر گرد	r (P-value)	۰/۶۲۰ (< ۰/۰۰۱)	۳۸۳ (۰/۰۲۸)	-۰/۳۹۶ (۰/۰۲۳)	-۰/۲۴۳ (۰/۱۷۲)	۰/۱۴۲ (۰/۴۳۰)	۱

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; SCSA: Sperm chromatin structure assay

بیان کننده‌ی تشخیص قطعی در ناباروری مردان باشد؛ چرا که، تنها وضعیت تعداد، مورفولوژی و تحرک اسپرم را تعیین می‌کند و بیان کننده‌ی ویژگی‌های اسپرم مانند سلامت DNA، که از اهمیت خاصی در قدرت باروری برخوردار است، نمی‌باشد (۱۷). بنابراین، برای اطمینان بیشتر از صحت قدرت باروری مرد، انجام تست‌های مربوط به عملکرد اسپرم لازم و ضروری است.

تا کنون، درصد DFI یا شاخص شکست DNA در تعداد کمی از بیماران گلبوزوسپرم مورد بررسی قرار گرفته است. به طور کلی، در یازده مطالعه، شانزده بیمار دچار گلبوزوسپرمیای کامل مورد بررسی قرار گرفته‌اند این شانزده بیمار در مطالعات جداگانه افزایش معنی‌داری در میزان درصد DFI نسبت به گروه شاهد نشان دادند (۲۵-۱۸). در بیشتر این مطالعات، ارزیابی شکست DNA با روش TUNEL صورت گرفته است. تنها در یک مطالعه، Larson و همکاران، جهت ارزیابی میزان شکست DNA از دو روش SCSA و COMET استفاده کردند. در مطالعه آنان، عدم تفاوت در شکست DNA افراد بیمار در مقایسه با مردان گروه شاهد، افزایش شکست DNA اسپرم در افراد دچار گلبوزوسپرمیا را رد کرد (۱۹).

شیوع بسیار کم بیماری گلبوزوسپرمیای نسبی در میان بیماری‌های مربوط به ناباروری مردان و به‌دنبال آن، تعداد کم بیماران شناسایی شده در سراسر دنیا، سبب شده است تا مطالعات محدودی پیرامون جنبه‌های مختلف این بیماری انجام گیرد (۱۹، ۵). در این مطالعه، به بررسی میزان شکست DNA اسپرم، در مردان دچار گلبوزوسپرمیای نسبی مراجعه کننده به پژوهشگاه رویان پرداختیم. از دو روش SCSA و TUNEL جهت سنجش میزان آسیب DNA اسپرم (به دلیل حساسیت بالا و بررسی شکست DNA به طور مستقیم) در هر یک از افراد بیمار و شاهد استفاده کردیم.

همچنین، تمام مطالعات صورت گرفته در مورد ارزیابی میزان شکست DNA تا کنون، مردان دچار گلبوزوسپرمیای کامل را مورد هدف قرار داده و به صورت بررسی موردی انجام شده است؛ تا کنون، بررسی شکست DNA اسپرم در بیماران دچار گلبوزوسپرمیای نسبی به صورت گروهی انجام نشده است. تنها در دو مطالعه‌ی موردی، در کل دو بیمار دچار گلبوزوسپرمیای نسبی مورد بررسی قرار گرفته اند؛ ارزیابی شکست DNA در مطالعه دیمه و همکاران به وسیله‌ی روش SCD و CMA3 (۲۰) و در مطالعه‌ی Brahem و همکاران با استفاده از روش TUNEL انجام شده است. در هر دو مطالعه، افزایش معنی‌داری در میزان شکست DNA در این بیماران مشاهده شده است.

در این مطالعه، پس از انجام آزمایش و آنالیزهای آماری با استفاده از روش TUNEL، درصد شکست DNA اسپرم در بیماران دچار گلبوزوسپرمیای نسبی، نسبت به مردان گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. مطالعه‌ی Brahem و همکاران با استفاده از روش TUNEL نیز نشان داد که میزان شکست DNA در بیماران دچار تراتوزوسپرمیا نسبت به افراد شاهد به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (۲۵). این نتایج مشابه گزارش‌های سال‌های اخیر است که نشان داده‌اند که در مایع سمن مردان نابارور با پارامتر غیرطبیعی، درصد اسپرم با DNA آسیب دیده بیشتر است (۲۵-۱۸). نتایج مطالعه‌ی حاضر، همچنین نشان

دهنده‌ی افزایش شکست DNA اسپرم با استفاده از روش TUNEL در یک گروه از مبتلایان به نادرترین نوع تراتوزوسپرمیا (گلبوزوسپرمیا) است. بنابراین، احتمال می‌رود، تا حدودی شکل طبیعی یک اسپرم بتواند نشانه‌ای از سلامت ژنتیک آن باشد. از طرف دیگر، بررسی DFI با استفاده از روش SCSA، تفاوت معنی‌داری را بین گروه بیمار و شاهد نشان داد که بر خلاف نتایج Larson و همکاران (۱۹)بود. آنان تنها یک بیمار گلبوزوسپرم را مورد بررسی قرار دادند، در صورتی که مطالعه‌ی حاضر روی جمعیت بزرگ‌تری از بیماران صورت گرفت.

Henkel و همکاران در دو مطالعه، با استفاده از دو روش TUNEL و SCSA، شکست DNA را در ۷۹ بیمار با مورفولوژی اسپرم بین ۱۴-۰ درصد مورد بررسی قرار دادند که نتایج حاکی از تفاوت معنی‌دار بین مورفولوژی غیر طبیعی (۴-۰) و شکست DNA با هر دو روش بود (۲۳-۲۲).

مشاهدات ما، به دلیل بیان ارتباط بین مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم با نقص بسته‌بندی کروماتین و افزایش شکست DNA اسپرم، دارای اهمیت ویژه‌ای است و تأیید کننده‌ی بیشتر مطالعات پیشین است. در بررسی ما، مشابه نتایج Henkel و همکاران (۲۳-۲۲)، ارتباط معنی‌داری بین نتایج دو روش SCSA و TUNEL دیده شد. همچنین، آنالیز همبستگی Pearson نشان داد که در گروه بیماران، این دو روش با دیگر پارامترهای اسپرم، از جمله تعداد، حرکت و شکل، رابطه‌ی معنی‌دار معکوس دارد. این ارتباط می‌واند بیان‌گر درجات متفاوت نقص اسپرماتوژنز باشد. افراد با تعداد کم اسپرم با نقص بیشتر در آسیب DNA مواجه هستند. مطالعات متفاوتی درباره‌ی ارتباط DFI با پارامترهای اسپرم وجود دارد و اغلب، رابطه‌ای بین DFI با یک یا هر سه پارامتر اصلی اسپرم (تعداد، تحرک و شکل) در بیشتر آن‌ها دیده شده است (۲۳-۲۲).

در این تحقیق، یک ارتباط مستقیم بین نقص مورفولوژی سر اسپرم و شکست DNA دیده شد که مخالف نتایج Zini و همکاران می‌باشد. آن‌ها با استفاده از روش SCSA، بیماران مختلف را مورد ارزیابی قرار دادند و رابطه‌ی معنی‌داری بین DFI و مورفولوژی سر اسپرم مشاهده نکردند (۲۴). یافته‌های ما مشابه نتایج Brahem و همکاران است که ارتباط معنی‌داری بین مورفولوژی اسپرم افراد دچار تراتوزوسپرمیا و شکست DNA مشاهده کردند (۲۵). این همبستگی نشان می‌دهد که نقص سر اسپرم ممکن است به دلیل کاهش یک‌پارچگی DNA اسپرم باشد. این نتایج موافق دیگر مطالعات صورت گرفته است (۲۶-۲۵). بسیاری از محققان گزارش کرده‌اند که مورفولوژی سر اسپرم یک فاکتور مهم و پیش‌بینی کننده برای باروری است و یک رابطه‌ی مستقیم بین مورفولوژی غیرطبیعی سر اسپرم و میزان شکست DNA وجود دارد. در این مطالعات گزارش شده است که ارتباط بین توانایی رنگ‌پذیری DNA اسپرم و مورفولوژی سر، تا حدی نشان‌دهنده‌ی تراکم هسته است. فشردگی هسته یا تراکم غیرطبیعی می‌تواند به دلیل کمبود پروتامین یا پروتامین ناقص باشد (۲۷).

استفاده از سایر روش‌های بررسی DFI و انجام مطالعه روی جمعیت بزرگ‌تری از بیماران می‌تواند اطلاعات مفیدتری را در این زمینه در اختیار ما قرار دهد (۲۶). نتایج اخیر بیانگر ارتباط مستقیم بین مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم و آسیب DNA و در

نتیجه، کاهش باروری اسپرم است.

نتیجه‌گیری

این مطالعه بزرگ‌ترین مطالعه‌ای است که تا کنون درباره‌ی رابطه‌ی بین DFI و اسپرم‌های سرگرد با استفاده از روش‌های TUNEL و SCSA در بیماران دچار گلبوزوسپرمیای نسبی انجام شده است و بیانگر آن است که در افراد دارای اسپرم های سرگرد نیز مشابه دیگر انواع تراتوزوسپرمیا، درصد شکست DNA نسبت به افراد سالم با اسپرموگرام طبیعی بالاتر می‌باشد. به علاوه، افزایش شکست DNA در بیماران دچار گلبوزوسپرمیای نسبی می‌تواند یکی از عوامل تأثیرگذار در کاهش قدرت باروری طبیعی آن ها و شکست روش‌های کمک باروری در این بیماران باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با همکاری پژوهشگاه رویان صورت گرفت. بدین وسیله از کارکنان آزمایشگاه آندرولوژی، که زمینه‌ی اجرای این تحقیق را فراهم آوردند، تقدیر و تشکر می‌نماییم.

بودجه‌ی این پژوهش توسط پژوهشگاه رویان پرداخت گردید.

References

1. 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.
2. Niederberger C. Re: Molecular cytogenetic and genetic aspects of globozoospermia: a review. J Urol 2012; 188(6): 2320.
3. Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A. Analysis of sperm aneuploidies and DNA fragmentation in patients with globozoospermia or with abnormal acrosomes. Urology 2011; 77(6): 1343-8.
4. Vicari E, Perdichizzi A, de Palma A, Burrello N, D'Agata R, Calogero AE. Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities: case report. Hum Reprod 2002; 17(8): 2128-33.
5. Elinati E, Kuentz P, Redin C, Jaber S, Vanden Meerschaut F, Makarian J, et al. Globozoospermia is mainly due to DPY19L2 deletion via non-allelic homologous recombination involving two recombination hotspots. Hum Mol Genet 2012; 21(16): 3695-702.
6. 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.
7. 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.
8. Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? Hum Reprod Update 2007; 13(3): 313-27.
9. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. Hum Reprod 2003; 18(5): 1023-8.
10. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. J Androl 2002; 23(1): 25-43.
11. Ribas-Maynou J, Garcia-Peiro A, Fernandez-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E, et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. Andrology 2013; 1(5): 715-22.
12. Agarwal A, Tsarev I, Erenpreiss J, Sharma R. Sperm chromatin assessment. In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z, editors. Textbook of assisted reproductive techniques. London, UK: Taylor and Francis; 2004.
13. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, de Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. J Androl 2006; 27(1): 53-9.
14. Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst

development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. Fertil Steril 2004; 81(5): 1289-95.
15. Darzynkiewicz Z, Traganos F, Sharpless T, Melamed MR. Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. Exp Cell Res 1975; 90(2): 411-28.
16. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. Exp Cell Res 1993; 207(1): 202-5.
17. Bigelow PL, Jarrell J, Young MR, Keefe TJ, Love EJ. Association of semen quality and occupational factors: comparison of case-control analysis and analysis of continuous variables. Fertil Steril 1998; 69(1): 11-8.
18. Perrin A, Coat C, Nguyen MH, Talagas M, Morel F, Amice J, et al. Molecular cytogenetic and genetic aspects of globozoospermia: a review. Andrologia 2013; 45(1): 1-9.
19. Larson KL, Brannian JD, Singh NP, Burbach JA, Jost LK, Hansen KP, et al. Chromatin structure in globozoospermia: a case report. J Androl 2001; 22(3): 424-31.
20. Deymeh MR, Tavalaee M, Razavi S, Nasr-Esfahani M. Evaluation of protamine deficiency and DNA fragmentation in two globozoospermia patients undergoing ICSI. Int J Fertil Steril 2007; 1(2):85-8.
21. Perrin A, Louanjli N, Ziane Y, Louanjli T, Le RC, Gueganic N, et al. Study of aneuploidy and DNA fragmentation in gametes of patients with severe teratozoospermia. Reprod Biomed Online 2011; 22(2): 148-54.
22. Henkel R, Hoogendijk CF, Bouic PJ, Kruger TF. TUNEL assay and SCSA determine different aspects of sperm DNA damage. Andrologia 2010; 42(5): 305-13.
23. Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, et al. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. Reprod Biomed Online 2003; 7(4): 477-84.
24. Zini A, Phillips S, Courchesne A, Boman JM, Baazeem A, Bissonnette F, et al. Sperm head morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay. Fertil Steril 2009; 91(6): 2495-500.
25. Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A. Detection of DNA fragmentation and meiotic segregation in human with isolated teratozoospermia. J Assist Reprod Genet 2011; 28(1): 41-8.
26. Mehdi M, Khantouche L, Ajina M, Saad A. Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters. Andrologia 2009; 41(6): 383-6.
27. Cohen-Bacrie P, Belloc S, Menezo YJ, Clement P, Hamidi J, Benkhalifa M. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. Fertil Steril 2009; 91(5): 1801-5.

Journal of Isfahan Medical School Received: 10.10.2014

Vol. 32, No. 313, 2nd Week, February 2015 Accepted: 02.01.2015

Assessment of Sperm DNA Fragmentation in Patients with Partial Globozoospermia

Fereshteh Rasouli[1], Marjan Sabbaghian PhD[2], Mohammad Ali Sadighi-Gilani MD[3], Ramesh Monajemi PhD[4]

Original Article

Abstract

Background: Infertility is estimated to affect up to 15% of couples of reproductive age. Globozoospermia is a rare (incidence < 0.1%) but severe disorder in male infertility. It is characterized by the absence of acrosome in round-headed spermatozoa. Cases with partial globozoospermic are a group of patients whose semen samples show only a fraction with this typical head shape. It is possible that round-headed sperm may have an abnormal chromatin structure and/or DNA strand breaks. Moreover, sperm DNA fragmentation is shown to be associated with teratozoospermia. This study aimed to assess the sperm DNA fragmentation in the patients with partial globozoospermia.

Methods: In this prospective cohort study, 77 subjects including 33 infertile men with round-headed sperm (above 20%) and 44 normozospermic men as control was recruited over a 30-month period. Semen examination was based on World Health Organization guidelines. Sperm chromatin structure assay (SCSA) and terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay were done for evaluation of the chromatin structure.

Findings: The analysis of sperm DNA fragmentation showed statistical differences between patients with partial globozoospermia and control group. Patients with partial globozoospermia had a higher mean level of DNA fragmentation than the men with normal spermogram in SCSA (26.57 ± 16.69 vs. 14.57 ± 9.24) and TUNEL (24.81 ± 18.68 vs. 11.50 ± 4.22) methods, respectively. The results of TUNEL and SCSA showed a strong relationship ($r = 0.484$; $P < 0.001$) in both groups.

Conclusion: Some specific morphological abnormalities were shown to be predictive of chromatin alteration. The present study demonstrated that men with round-head sperm have elevated risk for DNA fragmentation in their sperm compared to control group. There are just some case reports about DNA fragmentation rate in men with globozoosprmia and further confirmation in a larger scale study is needed.

Keywords: Globozoospermia, Sperm DNA fragmentation, Sperm chromatin structure assay (SCSA), Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay

Citation: Rasouli F, Sabbaghian M, Sadighi-Gilani MA, Monajemi R. **Assessment of Sperm DNA Fragmentation in Patients with Partial Globozoospermia.** J Isfahan Med Sch 2015; 32(313): 2124-33

1- MSc Student, Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Andrology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, The Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran
3- Associate Professor, Department of Andrology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, The Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran
4- Assistant Professor, Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Marjan Sabbaghian PhD, Email: marjan.sabbaghian@gmail.com