پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۶، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱، صفحات ۱۷۶ تا ۱۸۲

مقاله اصلی
(Original Article)

بررسی نقش پارامترهای اسپرمی و اختلالات کروماتین اسپرم با ناباروری توسط CASA و تست تفرق کروماتین

حکیمه اکبری[۱]، دکتر محمد صالحی[۲و۳*]، دکتر محمد حسن حیدری[۴]، دکتر معرفت غفاری نوین[۴]، دکتر اذن اله آذرگشب[۵]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد آناتومی، شعبه بین الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۲] گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۳] مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۴] گروه بیولوژی و علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۵] گروه بهداشت و پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: *اگر چه با انتخاب بهترین اسپرم از لحاظ مورفولوژی و تحرک تا حدی میزان موفقیت در باروری فراهم شده، اما مورفولوژی طبیعی اسپرم نمی‌تواند بیانگر سلامت DNA اسپرم باشد. از آنجایی که سلامت DNA هسته اسپرم بر نتایج روش‌های کمک باروری موثر است، این مطالعه با هدف بررسی پارامترهای اسپرمی اندازه‌گیری شده توسط CASA(Computer Aided Semen Analysis) با اختلالات کروماتین اسپرم در مرکز درمانی طالقانی در سال ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ طراحی شد.*

روش بررسی: *تحقیق به روش مورد- شاهدی انجام گرفت. نمونه مورد کسانی بودند که با تشخیص قطعی ناباروری و گروه شاهد افرادی بودند که در بررسی‌ها مشکلی نداشتند. از هر دو گروه، مایع سیمن گرفته شد و با روش CASA شاخص‌های اسپرمی مثل حرکت و مورفولوژی و فراگمانتاسیون DNA توسط تست تفرق کروماتین مورد بررسی قرار گرفت. بررسی کمبود پروتامین طبق روش کروموماییسین A3انجام شد. در هر دو گروه شاخص‌های بررسی شده مورد قضاوت آماری قرار گرفت.*

یافته‌ها: *رابطه معنی‌داری بین کمبود پروتامین و آسیب DNA و پارامترهای اسپرمی مشاهده شد. در بین ناهنجاری‌های شکلی، ناهنجاری‌های سر و گردن بیشترین ارتباط معنی‌دار را با درصد فراگمانتاسیون DNA اسپرم داشت، اما ناهنجاری‌های دمی در درصد بالاتر سلامت DNA نیز بروز می‌نمود.*

نتیجه‌گیری: *کمبود پروتامین و آسیب زمینه در DNA اسپرم افراد نابارور، بیشتر از افراد سالم بود و در افراد دارای میزان بالای آسیب DNA، پارامتر های اسپرمی ضعیف تر و قدرت باروری نیز کمتر بود. بنابراین روش CASA می‌تواند با دقت بالایی پارامترهای اسپرمی را آنالیز نماید.*

واژگان کلیدی: *کروماتین اسپرم، ناباروری، تست تفرق کروماتین، CASA.*

مقدمه

نازایی یکی از مشکلات جوامع مختلف است که حدود ۱۴-۱۰ درصد از زوجین درگیر آن هستند و با توجه به افزایش متوسط عمر و افزایش سن ازدواج از ۱۸ سالگی به ۳۵ سالگی و افزایش عوامل ایجاد ناباروری در محیط زندگی، وجود روش‌های دقیق‌تر ارزیابی ناباروری بیش از پیش نیاز است. در حال حاضر در اکثر مراکز درمان ناباروری از آزمایش سیمن جهت افتراق افراد بارور و نابارور استفاده می گردد. این آزمایش بیانگر ارزیابی کامل اسپرم نبوده و نیاز به آزمایش های تخصصی مانند تست های ارزیابی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه بیوتکنولوژی، دکتر محمد صالحی (**e-mail:** m.salehi@sbmu.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۳/۲۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۹/۱۳

کروماتین می‌باشد تا دلیل ناباروری مشخص‌تر گردد و متخصصین راهکار درمانی مناسبی انتخاب نمایند. با وجود این تست‌های ارزیابی کروماتین احتیاج به دستگاههای اختصاصی و هزینه بالا داشته و در اکثر مراکز قابلیت اجرا ندارد. مطالعات نشان داده که اسپرم های دارای مورفولوژی و هسته طبیعی انتخاب شده به وسیله میکروسکوپ‌های ویژه منجر به ایجاد درصد بالاتری از لقاح، لانه گزینی و باروری می شود. خصوصا به نظر می‌رسد که مورفولوژی اسپرم پارامتری است که با میزان باروری بیشترین ارتباط را دارد (۱،۲). علی‌رغم اینها نگرانی‌هایی برای تزریق اسپرم‌های دارای اختلالات کروماتین به داخل اووسیت در روش تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) وجود دارد. همچنین تحقیقات نشان داده که شکل ظاهری اسپرم به تنهایی جهت انتخاب اسپرم کافی نیست و جهت تشخیص و درمان احتیاج به ارزیابی بیشتر می‌باشد (۳).

استفاده از روش(CASA (Computer Aided Semen Analysis جهت ارزیابی پارامترهای اسپرمی و شناسایی شاخصه‌های تولید مثلی در مردان توصیه می‌گردد (۷-۴).در این روش کلیه پارامترهای پایه سیمن ازجمله حجم، غلظت، اسپرم‌های متحرک و پیشرونده و اسپرم با شکل نرمال مشخص می‌شود. اختلالات مورفولوژیکی اسپرم مانند میزان نقص سر،گردن ودم مشخص می‌شود. علاوه بر این در بررسی سرعت اسپرم درجات A-B-C-D کاملا مشخص می‌شود و شاخصه منحصر به فرد آن بررسی پارامترهای حرکتی اسپرم ورسم نمودار الگوی حرکت اسپرم می‌باشد که می‌تواند اطلاعات بالینی وسیعی را راجع به اسپرم مشخص نموده و به طور همزمان پارامترهای ظاهری و عملکردی اسپرمی بررسی شود. از آنجایی که پارامترهای اسپرمی بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (WHO) کالیبر شده‌اند تفسیر نتایج نیز بسیار راحت بوده و آموزش‌های پیچیده را نیاز ندارد و چون این روش دستی نبوده کمتر دچار خطای فرد آزمایش کننده می‌شود.

در طی اسپرمیوژنز، پروتامین‌ها جایگزین هیستون‌ها می‌شوند و سپس کروماتین توسط پیوندهای دی‌سولفیدی در بیضه و در طی عبور از اپیدیدیم و نیز در مایع سیمن توسط یون zn استحکام می‌یابد (۸). برخی از مطالعات انجام شده حاکی از آن است که تعداد اسپرم‌های با کروماتین غیر طبیعی، در مردان نابارور بیشتر از مردان بارور است (۹،۸،۱). علاوه بر این مطالعات، صحت و سلامتی DNA در اسپرم نیز یکی از مواردی است که به طور مستقیم بر کیفیت باروری علاوه بر کیفیت و کمیت اسپرم اثرگذار می‌باشد (۹). آنومالی‌های متعددی در اسپرم گزارش شده است که از جمله مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم و آنومالی کروماتین را می‌توان نام برد. آنومالی‌های ذکر شده با میزان لقاح به طور وسیع در IVF و تا حدی در ICSI مطالعه شده است (۸). از میان شاخص‌های اسپرمی و تست عملکرد اسپرم، مورفولوژی اسپرم و آنومالی‌های کروماتین، بالاترین ارتباط مستقل را با میزان باروری نشان می‌دهند (۸). به دلیل تراکمی که توسط پروتامین‌ها به وجود می‌آید، تغییر میزان و یا فقدان آنها می‌تواند سبب ناهنجاری در تراکم هسته اسپرم و سرانجام تاثیر بر کیفیت اسپرم و نیز توانایی آن در بارور نمودن سلول تخم گردد. گروه‌های تحقیقاتی متعددی نشان داده‌اند که اسپرم‌های بیماران نابارور ناهنجاری‌های پنهانی در اجزای هسته خود دارند. این ناهنجاری‌ها به صورت عدم تراکم کروماتین و صدمه به DNA بروز می‌کنند (۱۳-۱۰). در نتیجه، انتخاب اسپرم توسط پارامترهای معمولی (غلظت، مورفولوژی، تحرک) نمی‌تواند گویای سلامت DNA اسپرم باشد (۱).

در بررسی میزان آسیب DNA تاکنون ارتباط پارامترهای اسپرمی با کمبود پروتامین و میزان اختلالات شکلی و حرکتی در اسپرم با روش CASA به طور مستند ارایه نشده است. این تحقیق با هدف ارزیابی کارایی استفاده از روش CASA و بررسی ارتباط بین سلامت DNA هسته اسپرم و کمبود پروتامین با پارامترهای ارزیابی شده توسط این سیستم طراحی شده است تا بدین وسیله بتوان بدون انجام تست‌های اختصاصی ارزیابی سلامت DNA و ساختار کروماتین، توسط سیستم CASA، پارامترهای اسپرمی را سریع‌تر بررسی کرده و اسپرم‌های با کفایت را جهت تکنیک‌های کمک باروری استفاده کرد.

مواد و روشها

تحقیق به روش مورد شاهدی انجام گرفت. نمونه مورد کسانی بودند که با تشخیص قطعی ناباروری و گروه شاهد افرادی بودند که در بررسی‌ها مشکلی نداشتند و دارای فرزند بودند. ۵۲ بیمار نابارور که آنالیز مایع منی آنها با معیارWHO نرمال نبوده و ۱۱ مرد بارور (فرزند دار) مراجعه کننده به بیمارستان طالقانی در سال ۹۱-۱۳۹۰ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

از افراد هر دو گروه، نمونه‌های سیمن بعد از ۴-۳ روز پرهیز از نزدیکی، جمع‌آوری و جهت آنالیز اولیه شاخص‌هایی مانند Density، Agglutination، Motility، Morphology و Viscosity اسپرم و همچنین پارامترهای اختصاصی اسپرم نظیر ویژگی‌های مورفولوژیک و ساختاری، ناهنجاری‌های حرکتی و اختلالات دینامیک اسپرم توسط روشCASA مورد ارزیابی قرار گرفت که در این روش کلیه شاخصه‌هایWHO

قابل اندازه‌گیری است. همچنین آنالیز کلیه اختلالات شکلی در سر، گردن و دم اسپرم مشخص شد. حتی میزان سلول‌های دیگر نظیر اپیتلیال و گلبول قرمز و اسپرماتوژنیک هم اندازه-گیری شد. نمونه زیر میکروسکوپ نوری متصل به مانیتور و برنامه CASA مشاهده شده و خود دستگاه در نهایت جواب را ارایه می‌دهد. مدل دستگاه مورد استفاده در این مطالعه (6.50.,HFTCASA Computer Aided Semen Analysis System) بود.

جهت ارزیابی کمبود پروتامین از رنگ آمیزی کروموماپسین A3 استفاده شد. پس از ۳بارشستشوی سیمن با PBS (۳۰۰۰دور به مدت ۵ دقیقه) از اسپرم‌های شسته شده جهت رنگ آمیزیCMA3 استفاده شد. به اسپرم‌های شسته شده حجم مساوی از محلول فیکساتیو کارنوی (متانول و اسید استیک به نسبت ۳به ۱) اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از تهیه اسمیر از نمونه هر اسلاید با ۱۰۰ میکرو لیتر محلول ۰/۲۵درصد (Sigma) CMA3 در با فرمک الوین با PH ۷ به مدت ۲۰ دقیقه در محیط تاریک رنگ آمیزی شد. سپس اسلایدها با PBS شستشوداده شد و با لامل مونت گردید. با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس (Japan- Nikon- Eclipse600) با فیلتر مناسب ۴۶۰- ۴۷۰ نانومتر و بزرگنمایی۱۰۰تعداد ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید بررسی گردید و درصد اسپرم‌های درخشان (مثبتCMA3) و اسپرم‌های فاقد درخشندگی (CMA3 منفی) محاسبه گردید (۱۱).

ارزیابی فراگمانتاسیون DNA به روش SCD (Sperm Chromatin Dispersion) انجام شد. برطبق روش Fernandez مقدار ۳۰ میکرولیتر از نمونه اسپرمی آماده شده با ۷۰ میکرولیتر از آگاروز با درجه ذوب پایین (Low Melting Agarus) دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد. سپس نمونه مخلوط شده برروی لامی که از قبل با آگاروز ۰/۶۵ درصد پوشیده شده، قرار گرفت و با گذاشتن یک لامل روی آن، به مدت ۴ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. سپس با دقت لامل از سطح لام جدا شده و هرلام به صورت افقی در محلول اسید کلریدریک ۰/۰۸ نرمال به مدت ۷ دقیقه دردمای اتاق و درتاریکی قرارداده شد و در درجه حرارت اتاق، به مدت ۱۰ دقیقه درمحلول تجزیه کننده ۱(0/4 M tris base ,0/8 M DTT , 1% SDS , and 50Mm EDTA، pH7.5) و به دنبال آن در محلول تجزیه کننده ۲(0/4 M tris ,2MNaCL and 1% SDS ,PH=7.5) به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. لام در بافر(PH7/5 –EDTA و 0/09 M tris- borate and 0/002M EDAT Tris borate) به مدت ۲ دقیقه شستشو شده و به ترتیب در الکل ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد هر کدام به مدت ۲ دقیقه آب‌گیری شده و بعد از خشک شدن، با محلول رنگ دیفکوئیک رنگ آمیزی شده و توسط میکروسکوپ نوری بررسی شد. با استفاده از این روش می‌توان میزان فراگمانتاسیون DNA را با توجه به وجود هاله اطراف هسته و اندازه آن بررسی نمود. در اسپرم‌های با فراگمانتاسیون DNA (هسته اسپرم با هاله کوچک و بدون هاله) و بدون فراگمانتاسیون DNA (هسته اسپرم با هاله بزرگ و هاله متوسط) تعیین شد (۱۴). جهت بررسی فراگمانتاسیون DNA تعداد ۲۰۰سلول شمارش گردید.

جهت آنالیز آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶استفاده گردید. شاخص‌های کمی با آزمون t test و در صورت نیاز با آزمون Mann-Whitney U مورد قضاوت آماری قرار گرفتند. ارتباط پارامترها با آزمون ضریب همبستگی بررسی شد.

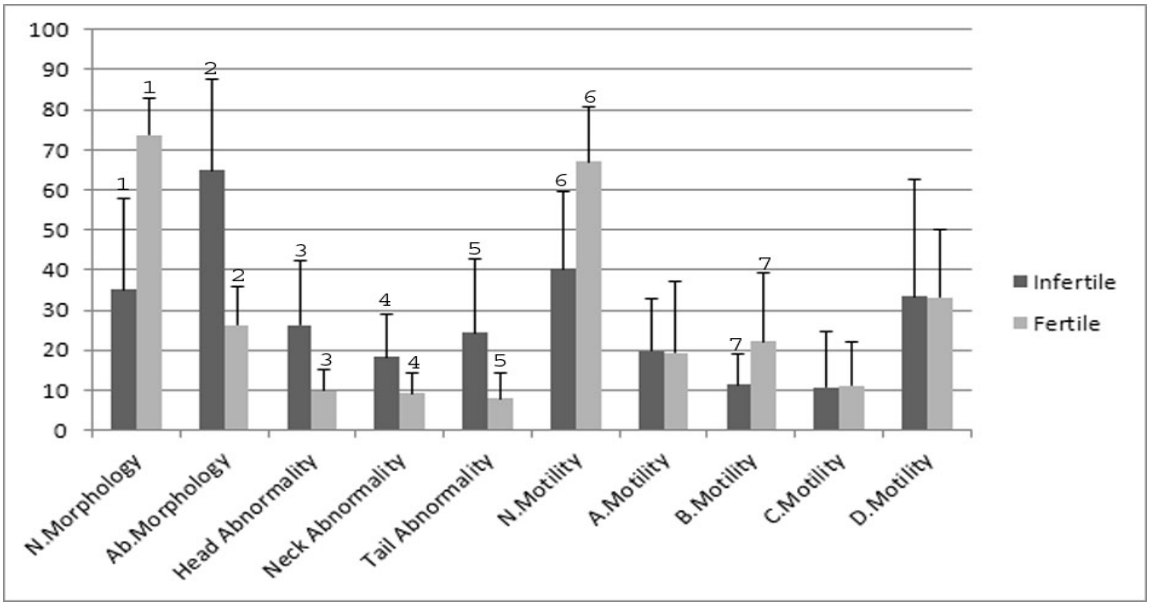
یافته‌ها

از ۶۳ مورد، تعداد ۵۲ نمونه مربوط به افراد نابارور و ۱۱ نمونه (۱۷/۵ درصد) نیز مربوط به افراد بارور (دارای حداقل یک فرزند) بود. متوسط سن شرکت کنندگان ۳۱ سال بود. پارامترهای اسپرمی در دو گروه بارور و نابارور به طور خلاصه در نمودار ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- بررسی درجات آسیب DNA هسته اسپرم در دوگروه بارور و نابارور

نوع SCD	نمونه بارور	نمونه های نابارور	P. value
SCD1	۱۶/۸۱±۶/۴۰	۷/۰۵±۶/۰۴	<۰/۰۰۱
SCD2	۳۷/۳۶±۹/۰۸	۱۹/۲۸±۸/۷۴	<۰/۰۰۱
SCD3	۲۹/۹۰±۸/۱۲	۴۲/۰۵±۱۲/۲۷	۰/۰۰۳
SCD4	۱۵/۹۰±۶/۱۸	۳۱/۳۲±۱۳/۵۶	<۰/۰۰۱

بین گروه‌های بارور و نابارور میزان پارامترهای اسپرمی از جمله مورفولوژی نرمال، مورفولوژی غیرنرمال، حرکات نرمال اسپرم، ناهنجاری‌های مورفولوژیک نظیر ناهنجاری‌های سر، گردن و دم اسپرم به طور معنی‌داری متفاوت بود (P<۰/۰۰۱)، به گونه‌ای که ناهنجاری‌های سر و گردن در این دو گروه تفاوت زیادی داشت و در الگوی حرکت بیشترین اختلاف در فرم B (Slow Progressive) حرکتی بود. شاخصه غلظت اسپرم (ml/ml) نیز در دو گروه تفاوت معنی‌داری داشت (P=۰/۰۰۳).



نمودار ۱– مقایسه پارامترهای اسپرمی در دو گروه بارور و نا بارور. اعداد مشابه نشانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵).

درجات آسیب DNA هسته اسپرم به تفکیک گروه‌های مورد و شاهد در جدول ۱ نشان داده شده است و نشان می‌دهد که شاخص‌های SCD1, 2 در گروه بارور بیشتر بوده (P<۰/۰۰۱)، ولی شاخص‌های SCD3, 4 برعکس در افراد نابارور بیشتر است (P<۰/۰۰۳).

همچنین ارتباط درجات SCD باکمبود پروتامین و مورفولوژی نرمال و ناهنجاری‌های ساختاری اسپرم طبق جدول ۲ بود.

نتایج نشان می‌دهد که ارتباط معنی‌داری بین میزان آسیب DNA و ناهنجاری‌های مورفولوژیکی در اسپرم وجود دارد، به نحوی که با افزایش میزان آسیب DNA، ناهنجاری سر و گردن بیشتر دیده شد. چون آسیب DNA اسپرم یک اختلال ژنومی است، به میزان متفاوت در مردان نابارور وجود دارد. بین SCD1 و SCD2 با کمبود پروتامین همبستگی از نوع منفی بود، به نحوی که هر چه آسیب DNA کمتر، میزان کمبود پروتامین نیز کمتر بود.

بحث

تحقیق نشان داد که در شاخص‌های اسپرمی ارزیابی شده با CASA بعضی از شاخص‌ها در دو گروه مورد مطالعه متفاوت بودند. نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که رابطه پارامترهای مورفولوژی و تحرک با کمبود پروتامین و فراگمانتاسیون DNA معنی‌دار است و هر چه کمبود پروتامین کمتر باشد شاخصه های باروری اسپرم بیشتر شده، حرکات شلاقی و رو به جلو اسپرم نیز بیشتر می‌شود. بسیاری از محققین عنوان نموده‌اند که مورفولوژی یک فاکتور پیش‌بینی کننده برای باروری است (۱۳،۱۰،۲). به نظر می‌رسد مورفولوژی طبیعی بیانگر عملکرد طبیعی نیز می‌باشد. نتایج این مطالعه نیز بیانگر رابطه معنی‌دار بین کمبود پروتامین و مورفولوژی اسپرم باروش CASA است که در توجیه آن می‌توان گفت حضور اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی بیانگر آن است که اسپرماتوزوا نتوانسته فرآیند اسپرمیوژنز را تکمیل کند و هر عاملی که بر فرآیند اسپرمیوژنز تاثیر گذارد نه تنها میزان تراکم کروماتین بلکه مورفولوژی اسپرم را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در نتیجه، افزایش ناهنجاریهای مورفولوژی اسپرم احتمالا با افزایش کمبود پروتامین همراه است. در طی مراحل اسپرماتوژنز، رشته‌های کروماتین هسته اسپرم فشرده می‌شوند و جای هیستون‌ها در ساختار نوکلئوزومی سلول‌های سوماتیک، توسط پروتامین‌ها که غنی از آرژنین هستند گرفته می‌شود (۳). صدمه یا شکست در DNA اسپرم وابسته به مقدار پروتامین متصل به DNA می‌باشد (۹). افزایش میزان هیستون زمینه‌ساز صدمه به DNA توسط فاکتورهای اکسیداتیو است (۸). در نمونه اسپرم‌هایی که درصد ناهنجاری کروموزومی بیشتر است، نسبت هیستون به پروتامین نیز افزایش می‌یابد. عدم موفقیت اکثر مراکز نازایی در به دست آوردن لقاح بیشتر از ۶۵٪ در بیماران ICSI، به علت صدمه و فراگمانتاسیون DNA می‌باشد و این مساله می‌تواند ناشی از غیرطبیعی بودن کروماتین اسپرم باشد (۸، ۱۱، ۱۵، ۱۶). Chemes و همکارانش عنوان کردند که آنومالی‌های فلاژل

جدول ۲- ارتباط درجات SCD باکمبود پروتامین و مورفولوژی نرمال و ناهنجاری‌های ساختاری اسپرم

پارامتراسپرم	SCD1		SCD2		SCD3		SCD4	
	Pvalue	ضریب همبستگی	Pvalue	ضریب همبستگی	Pvalue	ضریب همبستگی	Pvalue	ضریب همبستگی
مورفولوژی نرمال	<۰/۰۰۰۱	۰/۶۲۹*	<۰/۰۰۰۱	۰/۶۱۵*	۰/۰۰۱	۰/۴۱۴*	<۰/۰۰۰۱	-۰/۴۴۷*
مورفولوژی غیرنرمال	<۰/۰۰۰۱	-۰/۶۲۹*	<۰/۰۰۰۱	-۰/۶۱۵*	۰/۰۰۱	۰/۴۱۴*	<۰/۰۰۰۱	۰/۴۴۷*
ناهنجاری سر	۰/۰۰۱	-۰/۴۰۳*	<۰/۰۰۰۱	-۰/۴۳۴*	۰/۰۵۵	۰/۲۴۳	۰/۰۱۱	۰/۳۱۸*
ناهنجاری گردن	<۰/۰۰۰۱	-۰/۴۴۸*	<۰/۰۰۰۱	-۰/۴۵۹*	۰/۱۰۸	۰/۲۰۵	<۰/۰۰۰۱	۰/۴۳۱*
ناهنجاری دم	۰/۰۰۶	-۰/۳۴۲*	۰/۰۱۵	-۰/۳۰۵*	۰/۰۱۶	۰/۳۰۲*	۰/۱۶۶	۰/۱۷۷
کمبود پروتامین	<۰/۰۰۰۱	-۰/۴۸۲*	<۰/۰۰۰۱	-۰/۴۸۸*	۰/۰۱۵	۰/۳۱۰*	۰/۰۰۴	۰/۳۶۷*

* اختلاف معنی دار

پیش‌آگهی خوبی دارند، ولی آنومالی‌هایی که بر روی آکروزوم اسپرم و ناحیه گردن اسپرماتوزئید وجود دارند، موفقیتICSI را کم می‌کنند که نقش اختصاصی قسمت‌های مختلف اسپرم را مطرح می‌کند (۱۷) که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. در صحت DNA نیز درجاتی از آسیب دمی مشهود بود که چندان تاثیری در روند باروری اسپرم نداشت، حال آنکه میزان نارسایی‌های سر و گردن در افراد نابارور بیشتر بود. احتمالا در مرحله اسپرمیوژنز که تشکیل گردن و دم انجام می‌گیرد، اختلالاتی وجود داشته که باعث شده اختلالات کروماتین با ناهنجاری گردن و دم ارتباط داشته باشد.

اسپرماتوژنز شامل تکثیر سلول‌های جنسی مذکر، تقسیم میوز و تمایز اسپرماتید به اسپرماتوزآ است. بنابراین آسیب DNA اسپرم یا ساختار کروماتین آن می‌تواند در هر مرحله از اسپرماتوژنز رخ دهد (۸). آسیب DNA در اسپرماتوزوای بالغ می‌تواند به علت نقایصی در بسته بندی کروماتین باشد که یا از شکستگی‌های آندوژنی در DNA ناشی می‌شود، یا ناشی از روند آپوپتوز قبل از انزال اسپرم‌ها است. به علاوه، میزان بالای تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) نیز می‌تواند منجر به آسیب DNA شود (۱۳). ثابت شده است که اسپرم مردان نابارور میزان بالاتری ناهنجاری کروموزومی دارد؛ به علاوه پایداری کمتری نسبت به دناتوره شدن توسط سدیم دودسیل سولفات (SDS) و افزایش شکست DNA مشاهده می‌شود (۸) که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد، به طوری که میزان تخریب DNA هرچه بیشتر باشد، ناهنجاری‌های ساختاری اسپرم نیز افزایش می‌یابد و پارامترهای اندازه گیری شده توسط CASA نیز طی آنالیز آن را نشان داد.

در سال ۱۹۹۹، Evenson به این نتیجه رسید که وضعیت DNA و کروماتین اسپرم با باروری در محیط خارج از بدن مرتبط است. وی اعتقاد داشت که اگر چه این آزمون با پارامترهای غلظت، تحرک و مورفولوژی گزارش شده بر اساس معیارهایWHO مرتبط نیست؛ ولی می‌تواند به عنوان فاکتوری مستقل در پیشگویی لقاح موثر باشد. مطالعات متعددی نشان داده است که درصد سلول‌های اسپرمی با اختلالات DNA در دو گروه مردان نابارور و مردانی که توانایی باروری طبیعی دارند، به طور معنی‌داری متفاوت است (۱۸). Evenson و همکاران، آستانه ناباروری در سطح ۳۰٪ را در خصوص طبیعی بودن DNA در گروه‌های نابارور گزارش نمودند که با نتایج این تحقیق که پارامترهای اسپرمی در دو گروه بارور و نابارور به طور معنی‌داری متفاوت بود، همخوانی داشت. بین میزان آسیب DNA موجود در هسته اسپرم مردان بارور و نابارور مقایسه‌ای انجام شد. نتایج حاکی از آن بود که میزان آسیب پایه موجود در DNA اسپرم ۲۰ درصد است که ۴ برابر سلول‌های سوماتیک می باشد. این تحقیقات همچنین نشان می‌دهند که آسیب‌هایی که در حین اسپرماتوژنز حاصل می‌گردند، دیگر در اسپرم بالغ قابل تغییر نیست و علت آن فقدان سیستم‌های ترمیم کننده DNA در اسپرم بالغ است. اما مقداری از آسیب‌ها پس از لقاح توسط سیستم‌های ترمیمی بسیار قوی اووسیت جبران می‌شود. مطالعات مختلف نشان

داده‌اند که در مردان نابارور نسبت هیستون / پروتامین نسبت به افراد بارور بیشتر است. وجود نقص در نسبت هسیتون/پروتامین باعث نقص در تراکم کروماتین اسپرم می‌شود که همین امر مستعد شدن DNA اسپرم برای آسیب در مقابل شوک‌های خارجی را دنبال دارد (۱۹،۱۳،۸). نتایج اخیر بیانگر ارتباط مستقیمی بین کمبود پروتامین وآسیب DNA و در نتیجه کاهش پارامترهای باروری اسپرم است که کمبود پروتامین نیز طبق این مطالعه در گروه نابارور نسبت به گروه بارور مشهودتر است. هم‌چنین تخریب DNA نیز در گروه نابارور بیشتر بود. بنابراین صحت و سلامت DNA می‌تواند به نحوی تکامل اسپرم‌ها را به سمت ارتقای شاخص‌های باروری اسپرم هدایت نماید و در صورت آسیب کم DNA، ناهنجاری‌های ساختاری کمتری در مورفولوژی اسپرم در مناطقی که کمتر در امر باروری اسپرم دخیل هستند رخ می‌دهد. ناهنجاری‌های سر با توجه به عملکرد واکنش آکروزومی اسپرم در فراگمانتاسیون بالای DNA دیده می‌شود که با ناباروری اسپرم رابطه دارد و ناهنجاری های گردن اسپرماتوزوئید نیز که بیشتر منجر به ناهنجاری‌های حرکتی در اسپرم می‌گردد تا حد بیشتری نسبت به فلاژل در امر باروری دخیل می‌باشد.

بنابراین می‌توان با تست CASA، هم ساختمان DNA و صحت و سلامت اسپرم را و هم ناهنجاری‌های رخ داده در اسپرم را توجیه نمود و تا حدی در امر پیشگویی باروری مردان و کمبود پروتامین جهت بررسی کاملتر مردان نابارور استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد آناتومی شعبه بین الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و طرح تحقیقاتی مصوب دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می باشد.

REFERENCES

1. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. J Androl 2000; 21: 33-44.
2. Liu DY, Baker HW. Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. Fertil Steril 1992; 58: 1178-84.
3. Guthauser B, Albert M, Ferfouri F, Ray PF, Rabiey G, Selva J, et al. Inverse correlation between chromatin condensation and sperm head size in a case of enlarged sperm heads. Reprod Biomed Online 2011; 23: 711-16.
4. Freour T, Jean M, Mirallie S, Dubourdieu S, Barriere P. Computer-assisted sperm analysis (CASA) parameters and their evolution during preparation as predictors of pregnancy in intrauterine insemination with frozen-thawed donor semen cycles. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2010; 149: 186-89.
5. Kime DE, Van Look KJ, McAllister BG, Huyskens G, Rurangwa E, Ollevier F. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2001;130: 425-33.
6. Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH, et al. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. Hum Reprod 2000; 15: 1562-67.
7. Youn JS, Cha SH, Park CW, Yang KM, Kim JY, Koong MK, et al. Predictive value of sperm motility characteristics assessed by computer-assisted sperm analysis in intrauterine insemination with super ovulation in couples with unexplained infertility. Clin Exp Reprod Med 2011; 38: 47-52.
8. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M. Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. J Assist Reprod Genet 2001; 18: 219-25.
9. Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JB. Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities. Urology 2009; 74: 789-793.
10. 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: 1801-805.
11. Iranpour FG, Nasr-Esfahani MH, Valojerdi MR, al-Taraihi TM. Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility. J Assist Reprod Genet 2000; 17: 60-66.
12. Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, et al. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1996; 11: 837-43.

13. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction. Curr Opin Urol 2006; 16: 428-34.

14. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. J Androl 2003; 24: 59-66.

15. Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyltransferase assay. J Androl 1995; 16: 80-87.

16. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1998; 13: 1864-71.

17. Chemes EH, Rawe YV. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. Hum Reprod Update 2003; 9: 405-28.

18. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. Hum Reprod 1999; 14: 1039-49.

19. Tavalaee M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. Fertil Steril 2009; 91: 1119-26.