Research on Medicine *Original Article*

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.43; No.2; 2019

Relationship between Expression of Sperm PAWP Protein with Fertilization Rate in Infertile Men Candidate for ICSI Technique

Atefeh Rezaeian[1], Nadia Pourmoshir[1], Marziyeh Tavalaee*[1], Mohammad Hossein Nasr-Esfahani[1,2]

1. Department of Reproductive Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
2. Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran

(Received: 2019/02/6 Accept: 2018/07/31)

Abstract

Backgroundm: *Post-acrosomal sheath WW domain binding protein (PAWP) is one of the proteins that is expressed during spermatogenesis process and has several roles in sperm differentiation, fertilization, and early embryonic development. The aim of this study was assessment of the relationship between PAWP expression with fertilization rate in infertile men candidate for intracytoplasmic sperm injection (ICSI). In addition, sperm DNA fragmentation was also assessed in these infertile men.*

Materials and method: *In this descriptive study, semen samples were collected from 54 infertile men, of aged 32.5±4.44 candidate for ICSI referring to Isfahan Fertility and Infertility Center. Sperm parameters, DNA fragmentation, expression of PAWP at RNA, and protein level were assessed by Computer Assisted Semen Analysis, TUNEL assay, real time PCR, and western blot, respectively. Data was analyzed by SPSS (version 16) using Independent t-test and Pearson Correlation. P-values <0.05 were considered statistically significant.*

Resultst: *Significant correlations were observed between expression of PAWP at RNA and protein level with fertilization rate. When infertile men were categorized according to the percentage of fertilization lower and higher than 50%, the expression of PAWP was significantly lower and percentage of DNA fragmentation was significantly higher In the first group,in infertile men with fertilization rate lower than 50% compared to with the other group. ($p<0.05$).*

Conclusion: *Normal expression of sperm PAWP at gene and protein levels, and also low percentage of sperm DNA fragmentation may be considered as normal spermatogenesis processes in men.*

Keywords: *DNA fragmentation, fertilization, PAWP, ICSI, spermSperm*

* *Corresponding author:Marziyeh Tavalaee*
E-mail:Tavalaee.m@royaninstitute.org

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-15]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ۴۳، شماره ۲، ۱۳۹۸، صفحات ۲۳ تا ۲۷

ارتباط بین بیان پروتئین PAWP اسپرم با میزان لقاح در افراد نابارور کاندید ICSI

عاطفه رضاییان ، نادیا پورمشیر، مرضیه تولائی*، محمد حسین نصر اصفهانی

۱- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری تولید مثل، اصفهان، ایران
۲- مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۵/۰۹ تاریخ پذیرش مقاله:۱۳۹۷/۱۱/۰۷

چکیده:

سابقه و هدف: پروتئین متصل به دمین *WW* غلاف خلف آکروزومی *(PAWP)*، از پروتئین‌هایی است که در فرآیند اسپرماتوژنز بیان می‌شود و نقش‌های گوناگونی در تمایز اسپرم، لقاح و تکوین اولیه جنین دارد. هدف این مطالعه تعیین ارتباط بین بیان *PAWP* با میزان لقاح در مردان نابارور کاندید تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم *(ICSI)* بود. به‌علاوه فراگمنتاسیون *DNA* اسپرم نیز در این مردان نابارور ارزیابی شد.

مواد‌وروش‌ها: در این مطالعه توصیفی، نمونه مایع منی از *54* مرد ناباروركاندید *ICSI* که در سن *32/5±4/44* به مرکز باروری و ناباروری اصفهان مراجعه کرده بودند، جمع آوری شد. پارامترهای اسپرمی، فراگمنتاسیون *DNA*، بیان *PAWP* درسطح *RNA* و پروتئین به ترتیب توسط آنالیز کامپیوتری مایع منی، آزمون تانل، واکنش زنجیرهای پلیمراز همزمان و وسترن‌بلات انجام شد. داده‌ها توسط نرم‌افزار*SPSS.16* با استفاده از آنالیز آماري *independent t-test* و *Pearson correlation* بررسی شد و $p-value$ کمتر از ۵ درصد از لحاظ آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: مردان نابارور بر اساس میزان لقاح کمتر و بیشتر از ۵۰ درصد دسته‌بندی شدند. در مردان با لقاح کمتر از ۵۰ درصد، بیان *PAWP* به‌طور معناداری کمتر و درصد فراگمنتاسیون *DNA* اسپرم به‌طور معناداری بیشتر بود *(P<0.05)* . ارتباط معناداری بین بیان *PAWP* در سطح *RNA* و پروتئین با میزان لقاح مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: بیان نرمال ژن و پروتئین *PAWP* اسپرم و درصد پایین فراگمنتاسیون *DNA* اسپرم در مردان نابارور می‌تواند نشانگری از میزان موفقیت لقاح پس از *ICSI* باشد.

واژگان کلیدی: فراگمنتاسیون DNA، میزان لقاح، پروتئین متصل به دمین WW غلاف خلف آکروزومی، ICSI، اسپرم

مقدمه:

اسپرماتوژنز یک فرآیند پیچیده است و شامل سه مرحله اسپرماتوسیتوژنز، میوز و اسپرمیوژنز است. این فرآیند در لوله‌های منی‌ساز رخ می‌دهد و در نهایت به تولید اسپرماتوزوآ ی بالغ منجر می‌شود(۱). پوشش دور هسته‌ای یا پری‌نوکلئار تکا یکی از اجزای اصلی اسکلت سلولی سر اسپرم است که حاوی یک لایه پروتئینی سیتوزولی متراکم است که هسته اسپرم پستانداران را جز در ناحیه دمی هسته احاطه می‌کند. این پوشش مقاوم به دترجنت‌های غیر یونی است و از نظر ترکیبی به سه ناحیه لایه زیر آکروزومی، بخش استوایی و صفحه خلف آکروزومی تقسیم می‌شود. ناحیه پوشش دور هسته‌ای، لنگرگاهی از پروتئین‌هایی است که برای فرآیندهای اسپرمیوژنز و لقاح ضروری است و با توجه به ویژگی‌های این پروتئین‌ها، دو نقش و عملکرد برای این ناحیه پیشنهاد شده است: ۱- تشکیل آکروزوم که توسط لایه زیر آکروزومی انجام می‌شود. ۲- واکنش اسپرم- تخمک هنگام لقاح که توسط صفحه خلف آکروزومی انجام می‌شود(۳-۲).

بیشتر پروتئین‌های یافت شده در صفحه خلف آکروزومی در لوب سیتوپلاسمی اسپرماتیدهای طویل شده سنتز می‌شود و برای جایگیری و تشکیل نهایی در ناحیه خلف آکروزومی از طریق مانشت میکروتوبولی انتقال می‌یابند(۴). روش‌های متفاوت استخراج پروتئین‌های پوشش دور هسته‌ای، به شناسایی و معرفی پروتئین‌های SubH2Bv، هیستون‌های هسته سوماتیک و پروتئین متصل به غلاف خلف آکروزومی (PAWP) منجر شد که نقش و عملکرد این پروتئین‌ها هنوز به خوبی شناخته نشده است(۶-۵). پروتئین PAWP برای اولین بار در سال ۲۰۰۷، در پوشش دور هسته‌ای سر اسپرم شناسایی شد. این پروتئین از جمله پروتئین‌های اختصاصی بیضه است که ژن کدکننده آن WBP2NL در انسان روی کروموزوم ۲۲ جایگاه 13.2q22 قرار دارد. بیان پروتئین PAWP هنگام فرآیند اسپرماتوژنز رخ می‌دهد به گونه‌ای که قبل از طویل شدن اسپرماتیدها، PAWP در لوب سیتوپلاسمی سنتز می‌شود. سپس همزمان با تشکیل ساختار مانشت، PAWP از طریق این ساختارمهاجرت کرده و در ناحیه غلاف خلف آکروزومی، جای می‌گیرد(۶). برخی مطالعه‌ها بیان کرده‌اند که PAWP یک نقش ضروری برای تشکیل سر اسپرم هنگام مراحل انتهایی اسپرمیوژنز در بیضه برخی گونه‌ها مانند موش، گاو و انسان دارد و حتی این پروتئین در فعال شدن تخمک از طریق افزایش نوسانات کلسیم و تشکیل پرونوکلئوس‌ها موثر است(۸-۶). بر خلاف این مطالعه‌ها، برخی مطالعه‌ها بیان کرده‌اند که PAWP نقشی در فعال

نویسنده مسئول: : مرضیه تولائی
پست الکترونیک: *s.h.hosseinimehr@uok.ac.ir* *hosseinimehrhossein@gmail.com*

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-15]

شدن تخمک ندارد(۱۰-۹). بنابراین در این زمینه مطالعه‌های بیشتری نیاز است. در پژوهشی، ارتباط معنادار بین بیان PAWP اسپرم با میزان حاملگی در گاو و همچنین بین مورفولوژی غیر طبیعی سر اسپرم با محتوای کم PAWP در هر دوگونه انسان و دام گزارش شد(۱۱). همچنین در مطالعه‌ای که به تازگی روی اسپرم افراد نابارور گلبوزواسپرمی، افرادی که دارای اسپرم‌های سرگرد و فاقد آکروزوم در سر هستند، انجام شد، مشخص شد که بیان PAWP در این افراد نسبت به افراد بارور، در سطح RNA و پروتئین کاهش معناداری داشته است(۱۳-۱۲). بنابراین اسپرم‌ها با شکل غیرطبیعی سر با کاهش بیان پروتئین PAWP مواجه‌اند. با توجه به اینکه طی فرآیند اسپرمیوژنز، PAWP بیان می‌شود و همچنین تراکم کروماتین اسپرم (جایگزینی پروتامین‌ها به جای هیستون‌ها) نیز رخ می‌دهد و عدم تراکم می‌تواند به آسیب DNA اسپرم منجر شود، در این مطالعه سعی بر آن شد که بیان PAWP در دو سطح RNA و پروتئین و همچنین آسیب DNA اسپرم، در مردان نابارور کاندید روش ICSI (تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم به داخل تخمک) که میزان لقاح آن‌ها کمتر و بیشتر از ۵۰ درصد است، بررسی شد.

روش بررسی:

جمع‌آوری نمونه:

در این مطالعه توصیفی، نمونه مایع منی ۵۴ فرد نابارور با فاکتور مردانه کاندیدای روش ICSI در سن۴/۴۴±۳۲/۵ که از آذر ۱۳۹۶ تا اردیبهشت ۱۳۹۷ به مرکز باروری و ناباروری اصفهان مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری شد. از همه افراد شرکت‌کننده در این طرح رضایتنامه کتبی گرفته و نمونه مایع منی افراد پس از سه تا پنج روز پرهیز از مقاربت جنسی و ۳۰ تا ۱۵ دقیقه پس از انزال به آزمایشگاه آندرولوژی تحویل داده شد. آسیب DNA و بیان PAWP در سطح RNA و پروتئین به ترتیب با استفاده از آزمون تانل (۱۵)، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز همزمان و وسترن بلات انجام شد و همچنین پارامترهای اسپرمی شامل غلظت اسپرم، تحرک و مورفولوژی آن ارزیابی شد. افراد مورد مطالعه کاندید روش ICSI بودند که پس از انجام این روش، این افراد بر اساس میزان لقاح به دو گروه، افراد با درصد لقاح کمتر از ۵۰ درصد (۲۱ نفر) و افراد با درصد لقاح بیش از ۵۰ درصد (۳۳ نفر) تقسیم شدند. افراد نابارور با فاکتور زنانه و افراد نابارور آزواسپرمی و واریکوسل از مطالعه حذف شدند.

ارزیابی پارامترهای اسپرمی:

پارامترهای اسپرمی شامل غلظت، تحرک و مورفولوژی طبق استانداردهای سازمان بهداشت جهانی(WHO, ۲۰۱۰) بررسی شد. برای شمارش اسپرم، با استفاده از لام شمارشگر اسپرم ، 10 µl از مایع منی روی لام قرار داده شد و با مشاهده آن زیر میکروسکوپ نوری (عدسی۲۰)، شمارش اسپرم‌ها به صورت میلیون در میلی‌لیتر مشخص شد. درصد تحرک اسپرم با نرم‌افزار CASA تعیین شد. مورفولوژی اسپرم نیز از طریق رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو بررسی و برای هر نمونه حدود ۱۰۰ اسپرم شمارش شد و نتایج به صورت درصد مورفولوژی غیرطبیعی گزارش شد(۱۴).

بررسی آسیب DNA اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی تانل:

برای ارزیابی آسیب DNA اسپرم با استفاده از تکنیک تانل از کیت مخصوص این روش (Apoptosis Detection system fluorescein, Promega, Manheim, Germany) استفاده شد. در این بخش ابتدا مایع منی با PBS شست‌وشو داده شد و پس از مدت زمان ۲۰ دقیقه در محلول فرمال دهید ۴درصد فیکس شد. سپس اسلایدها طبق پروتکل کیت تانل رنگ‌آمیزی شدند. درصد آسیب DNA از طریق میکروسکوپ فلوئورسنت با بزرگنمایی ۱۰۰ بررسی و گزارش شد(۱۵).

استفاده از تکنیک Real-time PCR برای ارزیابی بیان PAWP:

از این روش می‌توان برای ارزیابی بیان ژن PAWP در سطح RNA بهره برد. به این منظور ابتدا RNA اسپرمی از نمونه‌ها مطابق با مقاله آقاجانپور و همکاران استخراج شد. در این روش پس از شست‌وشوی مایع منی با بافر فسفات سالین به کمک ترایزول RNA (Ambion, Burlington. Canada) استخراج شد. از ژل آگارز و آنالیز تعیین غلظت (در جذب nm ۲۶۰) استفاده شد. پس از تیمار RNA با DNAase I (برای زدودن DNA باقی‌مانده) از آن به عنوان الگویی برای ساخت c DNA طبق دستورالعمل کیت (Reverse Aid first strand cDNA synthesis (Takar, Otsu, Japan) استفاده شد(۱۶).

واکنش Real time PCR توسط دستگاه Applied Biosystems (ABi) انجام شد. در هر واکنش ترکیب مواد به این صورت بود:

5 µl سایبرگرین IIsyber premix Ex Taq(Takara,Ostu, Japan)، 1 µl از c DNA الگو، 0/2 µl ROX، 0/5 µl از هر پرایمر و در نهایت دو تا ۱۰ میکرولیتر از dH_2O برای به حجم رساندن استفاده شد.برای هر نمونه تا سه بار تکرار انجام شد. طراحی پرایمر به کمک نرم‌افزار Beacon Designer صورت پذیرفت.. (جدول ۱)و CT ژن خانه‌گردان GAPDH از ژن PAWP کم شد و نتایج به صورت ΔCT گزارش شد. سطح ΔCT بالا بیانگر کاهش بیان ژن و سطح ΔCT پایین بیانگر افزایش بیان ژن مورد مطالعه است.

مشخصات پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

Genes	Primer sequences	Length (bp)	Tm C (°)
PAWP	R: GCCTTCATTTCCTACGGGTTG	21	61
	F: CAGATGCCTTGTTCAGTTATTGTC	24	
GADPH	R: CCACTCCTCCACCTTTGACG	20	60
	F: CCACCACCCTGTTGCTGTAG	20	

توصیف پارامترهای اسپرمی در افراد مطالعه شده

پارامترها	حداقل	حداکثر	خطای استاندارد ± میانگین
غلظت اسپرم (میلیون/) میلی لیتر	۰/۵	۱۳۰	۶۰/۹۵±۳/۶۴
حجم نمونه (میلی‌لیتر)	۱/۵	۸/۲	۴/۲۱±۰/۲۵
تعداد اسپرم (میلیون/انزال)	۳/۵	۸۲۰	۲۸۳/۰۴±۲۷/۴۸
تحرک اسپرم (درصد)	۵	۹۶	۵۴/۰۹±۲/۲۱
مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم (درصد	۵۰	۱۰۰	۹۴/۱۲±۰/۹۱

استفاده از تکنیک وسترن بلات برای ارزیابی بیان پروتئین PAWP :

بیان پروتئین PAWP با روشی که در ادامه بیان شده است ارزیابی گردید: پس از دو مرتبه شست‌وشوی مایع منی با استفاده از بافرفسفات سالین (PBS)، استخراج پروتئین به کمک ترایزول (SIGMA-Aldrich; USA) انجام شد. سپس غلظت هر نمونه به کمک تکنیک Bradford اندازه‌گیری و در نهایت مقدار 35 µg پروتئین از هرنمونه در هر کدام از چاهک‌های ژل الکتروفورز پلی آکریل‌آمید-سدیم دودسیل سولفات ۱۲درصد بارگذاری شد. سپس پروتئین‌های مجزا به غشای پلی ونیلیدین دی فلوراید (PVDF) منتقل شدند. غشاها به مدت یک شبانه‌روز در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با استفاده از شیرخشک بلوکه شدند. در ادامه به مدت دو ساعت غشاها برای تست با آنتی بادی اولیه PAWP (1:5000, abcam, UK) و آنتی‌بادی GAPDH به عنوان کنترل، در محلول شیرخشک ۲درصد انکوبه شدند. پس از دوساعت دوباره غشا با بافر برای سه بار شست‌وشو داده شد. سپس برای تشخیص PAWP از آنتی بادی ثانویه (horseradish peroxidas(HRP)- conjugated goat anti mouse IgG و برای شناسایی GAPDH نیز anti-Rabbit IgG (Dako, Japan) به غشا اضافه شده و پس از مدت زمان یک ساعت، سه مرتبه با استفاده از بافر شست‌وشو شد. در نهایت باندهای پروتئین مورد نظر به کمک کیت وسترن بلات ردیابی شدند و با کمک نرم‌افزار Fire Reader (Uvitec,Cambridge) و Quantity One v.4.6.9 (Bio-Rad,

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-15]

Munchen, Germany) به ترتیب به حالت دیجیتالی و سپس به حالت کمی تبدیل شدند. نتایج به صورت میانگین نسبی بیان PAWP گزارش شد(۱۷).

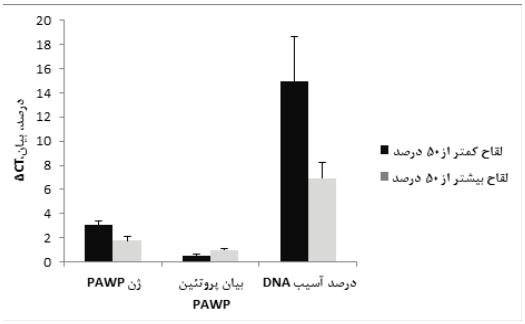
تجزیه و تحلیل آماری:

نتایج حاصل از این مطالعه به وسیله نرم‌افزار SPSS, v.16 و آنالیز آماری independent t-test ارزیابی شد. برای بررسی همبستگی بین پارامترها از Pearson correlation استفاده شد. در تمامی موارد p-value کمتر از پنج درصد به صورت معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

در این مطالعه در مجموع از نمونه مایع منی ۵۴ مرد نابارور کاندید روش ICSI استفاده شد. پارامترهای اسپرمی در این افراد بر اساس دستور کار سازمان بهداشت جهانی (WHO, 2010) بررسی شد (جدول شماره۲). بر این اساس، میانگین غلظت اسپرم (۶۰/۹۵±۳/۶۴)، حجم مایع منی (۴/۲۱±۰/۲۵)، تعداد کل اسپرم (۲۸۳/۰۴±۲۷/۴۸)، درصد تحرک اسپرم (۵۴/۰۹±۲/۲۱) و درصد مورفولوژی غیرطبیعی (۹۴/۱۲±۰/۹۱) بوده است (P).

افراد کاندیدای روش ICSI به دو گروه مجزا تقسیم شدند. گروه اول شامل افراد با درصد لقاح کمتر از ۵۰ درصد و گروه دوم شامل افراد با درصد لقاح بیش از ۵۰ درصد بودند(شکل ۱).



شکل ۱: مقایسه درصد لقاح، بیان پروتئین PAWP ، ژنPAWP و آسیب DNA اسپرم (فراگمنتاسیون) بین افراد با لقاح کمتر و بیشتر ۵۰ درصد (از لحاظ آماری، اختلاف معنادار در هر سه پارامتر بین دو گروه کمتر از ۵درصد بود)

میانگین ΔCT ژن PAWP در افراد نابارور با لقاح کمتر از ۵۰درصد و بیشتر از ۵۰ درصد به ترتیب ۴/۲۳±۰/۳۶ و ۱/۸۶±۰/۳۴ است که این اختلاف از لحاظ آماری بین دو گروه با لقاح کمتر از ۵۰ درصد نسبت به افراد با لقاح بیشتر از ۵۰درصد معنادار است (P = ۰/۰۱۵). همچنین بیان پروتئین PAWP در افراد نابارور با لقاح کمتر از۵۰ درصد (۰/۵۱±۰/۰۹) نسبت به افراد با لقاح بیشتر از ۵۰ درصد (۰/۹۲±۰/۱) اختلاف معناداری را داشت (P = ۳درصد). همچنین درصد آسیب DNA اسپرم نیز بین این دو گروه ارزیابی شد و نتایج بیانگر آن است که میانگین آسیب DNA اسپرم به طور معناداری در افراد با لقاح کمتر از ۵۰ درصد (۱۶/۹±۳/۶۲)، بیشتر از افراد با لقاح بیشتر از ۵۰ درصد (۶/۷۴±۱/۲۳) است (P =۰/۰۰۲).

آنالیز ارتباطات پارامترهای مطالعه نشانگر ارتباط معنادار بین میزان لقاح با بیان پروتئین PAWP بود (چهاردرصد= p ؛ ۰/۳۹= r). همچنین ارتباط معنادار و معکوس بین میزان لقاح و ΔCT ژن PAWP به دست آمد (۲ درصد= P ؛ ۰/۳۱-= r). در افراد با لقاح بالا، سطح ΔCT ژنPAWP پایین بود که نشانگر بیان بالای این ژن در این افراد است و بالعکس. بین آسیب DNA اسپرم و میزان لقاح نیز ارتباط معنادار معکوسی مشاهده شد(۰/۰۱ ؛ ۰/۴۵۱- = r).

بحث:

در این مطالعه، در افراد نابارور با لقاح کمتر از ۵۰ درصد، علاوه بر بیان PAWP، کیفیت پارامترهای اسپرمی(غلظت، تحرک و مورفولوژی) به طور معناداری نسبت به افراد با لقاح بیشتر از ۵۰ درصد کاهش یافته بود. همچنین ارتباط معناداری نیز بین بیان PAWP با میزان لقاح در افراد نابارور کاندیدای ICSI مشاهده شده که نشانگر آن است در افرادی که نتیجه اسپرموگرام آن‌ها غیرطبیعی است، فرآیند اسپرماتوژنز در آن‌ها به صورت طبیعی رخ نداده و عملکرد بیضه‌ها به طور صحیح نیست. همچنین بیان ژن‌ها نیز تحت تاثیر است. با توجه به اهمیت سلامت DNA اسپرم در لقاح و باروری طی روش ICSI، در این مطالعه آسیب DNA اسپرم نیز بررسی و مشخص شد که در افراد با لقاح کمتر از ۵۰ درصد، میزان آسیب DNA اسپرم نیز بیشتر است که این نتایج با مطالعه‌های پیشین مطابقت دارد. لقاح یک فرآیند پیچیده است که عوامل متعددی برای موفقیت در این فرآیند دخیل هستند. در حالت طبیعی، اسپرماتوزوآ پس از ورود به دستگاه ژنیتال مؤنث و عبور از رحم و لوله‌های رحمی، به ناحیه آمپول جایی که تماس اسپرم با تخمک رخ می‌دهد، می‌رسد. اسپرم‌ها باید از لایه‌های اطراف تخمک از جمله لایه گرانولوزا، زوناپلوسیدا عبور کرده و با غشای تخمک ممزوج شوند(۸). مطالعه‌ها نشان داده‌اند که اسپرم‌های طبیعی با کروماتین سالم، شانس بیشتری برای عبور از این لایه‌ها را دارند. بنابراین در حالت طبیعی، شانس ورود اسپرم‌های غیرطبیعی به دلیل وجود این سدهای فیزیولوژیکی کاهش می‌یابد(۱۹). هنگام استفاده از تکنیک‌های کمک باروری از جمله ICSI و IVF، مشخص است که در روش IVF به دلیل قرار گرفتن اسپرم در کنار تخمک، احتمال ورود اسپرم‌های غیرطبیعی به داخل تخمک به دلیل حضور لایه‌های اطراف تخمک به عنوان سد ممانعت‌کننده عبور اسپرم غیرطبیعی، نسبت به روش ICSI کمتر است. در صورتی که در روش ICSI، اسپرم در زیر میکروسکوپ مشاهده و انتخاب آن فقط براساس شکل ظاهری و حیات است، بنابراین احتمال انتخاب اسپرم با آسیب کروماتین یا نقایص دیگر بیشتر است(۲۰). همچنین حضور یک سری پروتئین‌های اسپرمی که برای فرآیند اسپرماتوژنز، لقاح و تکوین اولیه جنین نیاز است، ضروری است. شناخت این پروتئین‌ها ارزش بسزایی برای درمان افراد نابارور دارد(۲۱). در این مطالعه، به بررسی یکی از پروتئین‌هایی که پیش از این نشان داده شده که طی فرآیند اسپرمیوژنز و لقاح عملکردی است، پرداخته شده است. پروتئین PAWP طی فرآیند اسپرمیوژنز بیان می‌شود و از طریق ساختار میکروتوبولی مانشت به ناحیه غلاف خلف اکروزومی انتقال می‌یابد(۴). نتایج مطالعه حاضر بیانگر آن است که در افراد نابارور کاندیدای ICSI که میزان لقاح آن‌ها کمتر از ۵۰ درصد بود، بیان PAWP در سطح پروتئین و RNA به طور معناداری کمتر از افراد با میزان لقاح بالاتر از ۵۰ درصد است. در مطالعه‌های پیشین مشخص شده است که افراد دارای پارامترهای اسپرمی غیرطبیعی(غلظت، تحرک و مورفولوژی) که ناباروری واریکوسل دارند، بیان پروتئین PAWP نیز کاهش یافته است(۲۲). نتایج مطالعه کنونی می‌تواند پیشنهاد کننده این مطالب باشد که نقص در فرآیند اسپرماتوژنز می‌تواند به تولید اسپرم غیرطبیعی منجر شود که علاوه بر آنکه از تحرک و شکل طبیعی برخوردار نیست می‌تواند روی بیان یکسری از پروتئین از جمله PAWP نیز تأثیر گذارد. در این زمینه، مطالعه‌های قبلی نیز نشان داده‌اند که در افرادی که فرآیند اسپرماتوژنز به دلیل دلایل مختلفی از جمله واریکوسل، آثار محیطی، ژنتیکی و ... تحت تاثیر بوده، به دنبال کاهش پارامترهای اسپرمی، بیان یکسری ژن‌ها در سطح RNA و پروتئین نیز تحت تاثیر است. بنابراین کاهش بیان می‌تواند روی عملکرد و توانایی اسپرم برای رسیدن به تخمک و فرآیند موفقیت در لقاح و باروری تاثیرگذار باشد(۲۳،۲۴). در این زمینه مشخص شده که در افراد واریکوسل که دمای بیضه از حالت طبیعی بالاتر است، علاوه بر آنکه کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی مشاهده می‌شود، بیان یکسری از ژن‌ها که در فرآیند اسپرماتوژنز و لقاح نقش دارند مانند PLCζ، HSPA2، Bax، Bcl 2 و Protamine تغییر می‌کند(۲۵-۲۷). همچنین در افراد نابارور که تحت تاثیر سندروم گلوبوزواسپرمی می‌باشند، ژن‌های دخیل در فرایند اسپرماتوژنز مخصوصاً ژن‌هایی که جهت بیوژنز آکروزوم ضروری هستند مانند SPATA، Sirt1، Dpy19L2 و همچنین بیان PLCζ دخیل در فعال شدن تخمک نیز کاهش معناداری داشته است(۲۸). از این مطالعه‌ها این گونه می‌توان استنباط کرد که بسته به شدت و دلیل ناباروری، فرآیند اسپرماتوژنز و بیان برخی ژن‌ها به همان نسبت می‌توانند تحت تاثیر قرار گیرند.

نتیجه‌گیری:

نتایج مطالعه کنونی بیان‌گر آن است که می‌توان علاوه بر ارزیابی پارامترهای اسپرمی، با بررسی آسیب DNA و بیان برخی از ژن‌ها که در فرآیند اسپرماتوژنز و لقاح نقش دارند مانند پروتئین PAWP ، تاحدی آگاهی لازم را نسبت به عملکرد بیضه و کیفیت مایع منی کسب کرده و نتایج موفقیت لقاح را در افراد نابارور پیش بینی کرد.

تشکر و قدردانی:

از همکاری مسئولان پژوهشکده رویان اصفهان که زمینه اجرای این تحقیق را فراهم

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-15]

آوردند و همچنین مسئولان و پرسنل آزمایشگاه آندرولوژی مرکز باروری و ناباروری اصفهان تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع:

1. Griswold MD. Spermatogenesis: the commitment to meiosis. Physiological reviews. 2015 Nov 4;96(1):1-7.
2. Müjica A, Navarro-García F, Hernández-González EO, de Lourdes Juárez-Mosqueda M. Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. Microscopy research and technique. 2003 May 1;61(1):76-87.
3. Oko R, Sutovsky P. Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. Journal of reproductive immunology. 2009 Dec 1;83(1-2):2-7.
4. Lehti MS, Sironen A. Formation and function of manchette and flagellum during spermatogenesis. Reproduction. 2016 Jan 20: REP-15.
5. Wu AT, Sutovsky P, Xu W, van der Spoel AC, Platt FM, Oko R. The postacrosomal assembly of sperm head protein, PAWP, is independent of acrosome formation and dependent on microtubular manchette transport. Developmental biology. 2007 Dec 15;312(2):471-83.
6. Wu AT, Sutovsky P, Manandhar G, Xu W, Katayama M, Day BN, Park KW, Yi YJ, Xi YW, Prather RS, Oko R. PAWP, A sperm specific ww-domain binding protein, promotes meiotic resumption and pronuclear development during fertilization. Journal of Biological Chemistry. 2007 Feb 8.
7. Aarabi M, Sutovsky P, Oko R. Re: Is PAWP the 'real'sperm factor? Asian Journal of Andrology. 2015 May;17(3):446.
8. Sutovsky P, Aarabi M, Miranda-Vizuete A, Oko R. Negative biomarker-based male fertility evaluation: sperm phenotypes associated with molecular-level anomalies. Asian journal of andrology. 2015 Jul;17(4):554.
9. Satouh Y, Nozawa K, Ikawa M. Sperm postacrosomal WW domain-binding protein is not required for mouse egg activation. Biology of reproduction. 2015 Oct 1;93(4):94-1.
10. Nomikos M, Swann K, Lai FA. Is PAWP the "real" sperm factor? Asian Journal of Andrology. 2015 May;17(3):444.
11. Kennedy CE, Krieger KB, Sutovsky M, Xu W, Vargovič P, Didion BA, Ellersieck MR, Hennessy ME, Verstegen J, Oko R, Sutovsky P. Protein expression pattern of PAWP in bull spermatozoa is associated with sperm quality and fertility following artificial insemination. Molecular reproduction and development. 2014 May;81(5):436-49.
12. Abadi MK, Tavalaee M, Shahverdi A, Nasr-Esfahani MH. Evaluation of PLCζ and PAWP expression in globozoospermic individuals. Cell Journal (Yakhteh). 2016;18(3):438.
13. Tavalaee M, Nasr-Esfahani MH. Expression profile of PLCζ, 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 Sep;4(5):850-6. doi: 10.1111/andr.12179.
14. World Health Organization (2010). WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. WHO Press, Geneva, Switzerland.
15. Tavalaee M, Kiani-Esfahani A, Nasr-Esfahani MH. Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status. Systems biology in reproductive medicine. 2017 Jul 4;63(4):259-68.
16. Aghajanpour S, Ghaedi K, Salamian A, Deemeh MR, Tavalaee M, Moshtaghian J, Parrington J, Nasr-Esfahani MH. Quantitative expression of phospholipase C zeta, as an index to assess fertilization potential of a semen sample. Human reproduction. 2011 Sep 6;26(11):2950-6.
17. Tavalaee M, Nasr-Esfahani MH. Expression profile of PLC ζ, 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 Sep;4(5):850-6.
18. Sakkas D, Ramalingam M, Garrido N, Barratt CL. Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? Human reproduction update. 2015 Sep 19;21(6):711-26.
19. Holt WV, Van Look KJ. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. Reproduction. 2004 May 1;127(5):527-35.
20. Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR, Tavalaee M. New era in sperm selection for ICSI. International journal of andrology. 2012 Aug;35(4):475-84.
21. Yeste M, Jones C, Amdani SN, Patel S, Coward K. Oocyte activation deficiency: a role for an oocyte contribution? Human reproduction update. 2015 Sep 7;22(1):23-47.
22. Tavalaee M, Azadi L, Nasr-Esfahani MH. Comparison of sperm PAWP and chromatin status between normozospermic and ab-normozoospermic men. jskums. 2018;20(2).
23. Ghazavi-Khorasgani N, Janghorban-Laricheh E, Tavalaee M, Zohrabi D, Abbasi H, Nasr-Esfahani MH. Evaluation of post-acrosomal sheath WW domain binding protein expression in spermatozoa from infertile men with varicocele. Tehran University Medical Journal TUMS Publications. 2017 Sep 15;75(6):417-23.
24. Tavalaee M, Kiani-Esfahani A, Nasr-Esfahani MH. Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status. Systems biology in reproductive medicine. 2017 Jul 4;63(4):259-68.
24. Miyamoto T, Minase G, Shin T, Ueda H, Okada H, Sengoku K. Human male infertility and its genetic causes. Reproductive medicine and biology. 2017 Apr;16(2):81-8.
25. Janghorban-Laricheh E, Ghazavi-Khorasgani N, Tavalaee M, Zohrabi D, Abbasi H, Nasr-Esfahani MH. An association between sperm PLCζ levels and varicocele?. Journal of assisted reproduction and genetics. 2016 Dec 1;33(12):1649-55.
26. Esfahani MH, Abbasi H, Mirhosseini Z, Ghasemi N, Razavi S, Tavalaee M, Tanhaei S, Deemeh MR, Ghaedi K, Zamansoltani F, Rajaei F. Can altered expression of hspa2 in varicocele patients lead to abnormal spermatogenesis? Int J Fertil Steril. 2010 Sep;4(3).
27. Bahreinian M, Tavalaee M, Abbasi H, Kiani-Esfahani A, Shiravi AH, Nasr-Esfahani MH. DNA hypomethylation predisposes sperm to DNA damage in individuals with varicocele. Systems biology in reproductive medicine. 2015 Jul 4;61(4):179-86.
28. Tavalaee M, Nomikos M, Lai FA, Nasr-Esfahani MH. Expression of sperm PLCζ and clinical outcomes of ICSI-AOA in men affected by globozoospermia due to DPY19L2 deletion. Reproductive biomedicine online. 2018 Mar 1;36(3):348-55.
29. Xue LT, Wang RX, He B, Mo WY, Huang L, Wang SK, Mao XB, Cheng JP, Huang YY, Liu R. Effect of sperm DNA fragmentation on clinical outcomes for Chinese couples undergoing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. Journal of International Medical Research. 2016 Dec;44(6):1283-91.
30. Sedó CA, Bilinski M, Lorenzi D, Uriondo H, Noblía F, Longobucco V, Lagar EV, Nodar F. Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects. JBRA assisted reproduction. 2017 Oct;21(4):343. Altered Expression

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-15]