Nova Biologica Reperta 6(4): 367-373 (2020)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.6.4.367

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۶، شماره ۴، صفحات ۳۶۷الی ۳۷۳ (۱۳۹۸)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

ارزیابی وضعیت کروماتین اسپرم در مردانی با فاکتورهای مختلف ناباروری و ارتباط با نتایج تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم

فاطمه قاسمیان

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران؛ (ghasemian@guilan.ac.ir)

چکیده. یکی از مهم‌ترین فاکتورهای مرتبط با باروری مردان، وضعیت کروماتین اسپرم است. در جریان تکنیک‌های کمک باروری (ART)، به ویژه تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)، انتخاب طبیعی اسپرم با کیفیت و با کروماتین سالم امکان‌پذیر نیست. بنابراین، کیفیت جنین و میزان حاملگی به دلیل DNA آسیب‌دیده اسپرم‌های درگیر در لقاح تخمک‌ها کاهش می‌یابد. در این مطالعه، فراوانی تراکم غیرطبیعی کروماتین و میزان آسیب کروماتین در مردانی با فاکتورهای مختلف ناباروری (مانند الیگوزواسپرمی، آستنوزواسپرمی، تراتوزواسپرمی، الیگوآستنوتراتوزواسپرمی و نرموزواسپرمی) ارزیابی و نتایج تزریق بررسی می‌شود. ۱۹۵ بیمار در این مطالعه وارد شدند و وضعیت کروماتین اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو و تولوئیدین‌بلو بررسی شد. همچنین میزان لقاح، کیفیت زیگوت و جنین، میزان حاملگی و سقط محاسبه شد. نتایج نشان می‌دهد که در نمونه‌های الیگوآستنوتراتوزواسپرمی، درصد کروماتین آسیب دیده بالاتر از نمونه‌های نرموزواسپرمی است. در این گروه میزان لقاح، کیفیت جنین و میزان حاملگی به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. همچنین میزان سقط بالا در این گروه مشاهده شد. در مجموع، فراوانی کروماتین آسیب دیده در فاکتورهای مختلف ناباروری مردان متفاوت است و می‌تواند نتایج ICSI را تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین، ارزیابی وضعیت کروماتین اسپرم قبل از شروع چرخه می‌تواند نتایج درمان را بهبود بخشد.

واژه‌های کلیدی. جنین، حاملگی، روش‌های‌کمک باروری، لقاح، ناباروری فاکتور مردانه

The evaluation of sperm chromatin status in men with different infertility factors, and its relationship with ICSI outcomes

Fatemeh Ghasemian

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran; (ghasemian@guilan.ac.ir)

Abstract. One of the most important factors related to male fertility is sperm chromatin status. Under Assisted Reproductive Techniques (ART), especially Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI), the natural selection of high quality sperm with intact chromatin is not possible. Therefore, embryo quality and pregnancy rate decreased for damaged DNA of sperms involved in the fertilization of eggs. Thus, this study evaluated the frequency of abnormal sperm chromatin condensation and damaged sperm chromatin in men with different infertility factors (e.g. oligozoospermia, asthenozoospermia, teratozoospermia, oligasthenoteratozoospermia, and normozoospermia) and ICSI outcomes were examined. 195 patients were examined and the sperm chromatin status was evaluated using aniline blue and toluidine blue staining. Fertilization, zygote and embryo quality, chemical pregnancy and abortion rates were calculated, too. The results showed that in the oligoasthenoteratozzoospermia samples, the damaged chromatin percentage was higher than that in normozoospermia ones. The fertilization rate, embryo quality, and pregnancy rate significantly decreased in this group. Also, a higher abortion rate was observed in this group ($P<0.05$). In conclusion, the frequency of damaged chromatin was observed to be different in different male infertility factors, which could influence the ICSI outcomes. Therefore, the evaluation of sperm chromatin status before cycle initiation was found to promote ICSI outcomes.

Keywords. assisted reproductive techniques, embryo, fertilization, pregnancy, male factor infertility

Received 06.07.2017/ Revised 04.02.2018/ Accepted 15.03.2018/ Published 10.01.2020

دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۱۵/ اصلاح: ۱۳۹۷/۱۱/۱۵/ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۵/ انتشار: ۱۳۹۸/۱۰/۲۰

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.4.5]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.367]

مقدمه

با معرفی تکنیک تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (Intracytoplasmic Sperm Injection: ICSI)، بسیاری از مردان با فاکتورهای مختلف ناباروری مانند آزواسپرمی، آستنوزواسپرمی، الیگوزواسپرمی و الیگوآستنوتراتوزواسپرمی از احتمال بچه‌دارشدن بیولوژیکی برخوردار شدند (Sadeghi *et al.*, 2011). بدین‌منظور، تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) می‌تواند بعضی از سدهای بیولوژیکی در طی فرایند لقاح را میانبر بزند و شرایط را به سمت لقاح موفق تغییر دهد. در این تکنیک به تعداد کمی از اسپرم نیاز است (Aboulghar *et al.*, 1997). این‌درحالی است که تحقیقات مختلف اثبات نموده است، نتایج ایکسی مانند میزان لقاح، کیفیت جنین، حاملگی بیوشیمیایی و کلینیکی و در نهایت میزان تولد زنده به شدت با کیفیت اسپرم در ارتباط است (Aboulghar *et al.*, 1997).

ناباروری با فاکتور مردانه تقریبا در ۴۵-۴۰ درصد از موارد ایجادکننده ناباروری در زوج‌ها مشاهده می‌شود (Weng *et al.*, 2014). ارزیابی ناباروری مردان به طور سنتی به آنالیز یک نمونه سیمن براساس معیارهای سازمان جهانی بهداشت (World Health Organization: WHO) وابسته است (WHO, 2010). این آنالیز مبنی بر مشاهدات تعداد اسپرم، تحرک و مورفولوژی آن و ارزیابی از طریق میکروسکوپ نوری انجام می‌شود (Pacey, 2010). بنابراین پیشنهاد می‌شود که بررسی سلامت DNA اسپرم یک بررسی مفید جهت تکمیل آنالیز استاندارد سیمن باشد (Aitken & De Iuliis, 2007). بسیاری از مطالعات اثرات منفی آسیب DNA اسپرم بر باروری را گزارش داده‌اند که با عدم موفقیت در حاملگی (Duran *et al.*, 2002)، طولانی شدن زمان جهت باردارشدن (Spanò *et al.*, 2000)، نتایج ضعیف به دنبال تلقیح داخل رحمی (Duran *et al.*, 2002; Bungum *et al.*, 2007)، تکوین ضعیف جنین (Morris *et al.*, 2002)، میزان بالای سقط (Robinson *et al.*, 2012) و خطر بالای از دست دادن حاملگی بعد از انجام هر دو فرایند لقاح آزمایشگاهی (In-Vitro Fertilization: IVF) و تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (Zini *et al.*, 2008) همراه است.

علی‌رغم اطلاعات بالا، گزارشات پراکنده‌ای از انجمن پزشکی باروری آمریکا (PCASRM, 2008)، انجمن جنین‌شناسی و باروری اروپا (Barratt *et al.*, 2010) و انجمن باروری بریتانیا (Tomlinson *et al.*, 2013) نشان می‌دهد که در حال حاضر شواهد کافی در ارتباط با بررسی DNA اسپرم جهت معرفی به عنوان بخشی از تجارب کلینیکی وجود ندارد و تحقیقات بیش‌تری مورد نیاز است. بنابراین، با توجه به مطالعات صورت گرفته، اطلاعاتی در مورد وضعیت کروماتین (آسیب DNA و وضعیت تراکم کروماتین) در مردان نابارور با فاکتورهای مختلف ناباروی مشاهده نشده است. از این رو، این مطالعه جهت بررسی وضعیت کروماتین در مردان نابارور با فاکتورهای مختلف ناباروری (مانند الیگوزواسپرمی، آستنوزواسپرمی، تراتوزواسپرمی، الیگوآستنو-تراتوزواسپرمی و نرموزواسپرمی) و ارزیابی نتایج تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم دراین گروه‌ها طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

بیماران

از ۲۷۱ زوج مراجعه‌کننده به مرکز درمان باروری (IVF)، ۱۹ زوج به دلیل مصرف داروهای هورمونی توسط مردان و یا وجود بیماری دیابت و/یا بیماری‌های تیروئیدی در مردان از مطالعه خارج شدند. ۵۷ زوج به دلیل ناباروری با عامل زنانه خارج شدند (مانند عدم تخمک‌گذاری، اندومتریوز، بیماری‌های لوله‌ای و درمان تحت دارویی). بنابراین ۱۹۵ مرد نابارور وارد مطالعه شدند و نمونه‌های سیمن جهت ارزیابی پارامترهای سیمن جمع‌آوری گردید. این افراد از میان زوج‌هایی که به مرکز درمان ناباروری بیمارستان الزهرا (گیلان، رشت) در طی سال‌های ۹۴ تا ۹۶ جهت درمان ناباروری مراجعه کرده بودند و تحت درمان کمک باروری قرار گرفتند، انتخاب شدند و رضایت کامل از این زوج‌ها بدست آمد. لازم به ذکر است که این مطالعه فقط بر زوج‌های نابارور با ناباروری فاکتور مردانه صورت گرفت. میانگین سن زنان ۳۰/۸ ± ۵ سال است و هیچگونه تفاوت آماری در سن و ایندکس جرم بدن (Body Mass Index: BMI) این افراد وجود ندارد.

جمع‌آوری نمونه سیمن

نمونه سیمن به روش انزال در یک ظرف استریل جمع‌آوری و در اختیار آزمایشگاه قرار گرفت (در همان روز برداشت تخمک). نمونه‌ها برای مدت ۶۰-۱۵ دقیقه بعد از انزال در دمای اتاق به حالت مایع و روان درآمدند و پارامترهای سیمن مطابق با معیارهای سازمان جهانی بهداشت (WHO, 2010) ارزیابی شدند. این معیارها عبارتند از ارزیابی حجم سیمن، pH، ویسکوزیته، غلظت اسپرم، تعداد کل اسپرم، مورفولوژی اسپرم، تحرک و وجود عفونت. بنابراین براساس ارزیابی‌ها، نمونه‌های سیمن به گروه‌های مختلف نرموزواسپرمی (غلظت اسپرم بالاتر از ۱۵ میلیون در هر میلی لیتر سیمن، مورفولوژی طبیعی بالاتر از ۴ درصد و تحرک بالاتر از ۳۲ درصد)، الیگوزواسپرمی (غلظت اسپرم کم‌تر از ۱۵ میلیون در هر میلی لیتر سیمن)، تراتوزواسپرمی (مورفولوژی طبیعی اسپرم کم‌تر از ۴ درصد)،

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.4.5]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.367]

آستنوزواسپرمی (تحرک اسپرم کم‌تر از ۳۲ درصد) و الیگوآستنوتراتوزواسپرمی (غلظت اسپرم کم‌تر از ۱۵ میلیون در هر میلی‌لیتر سیمن، مورفولوژی طبیعی کم‌تر از ۴ درصد و تحرک کم‌تر از ۳۲ درصد) تقسیم شدند (WHO, 2010) و وضعیت کروماتین اسپرم در هر گروه مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی کروماتین اسپرم

رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو

به منظور بررسی وضعیت کروماتین، اسمیر نازکی بر روی لام تهیه شد. اسمیرها در دمای هوا خشک شدند و با محیط اتانول ۹۶ درصد-استون (۱:۱) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت تثبیت شدند. سپس لام‌ها در 0.1 N HCl در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند و به دنبال آن ۳ بار با آب مقطر و به مدت ۲ دقیقه شستشو داده شدند. در مرحله بعد جهت رنگ‌آمیزی با تولوئیدین بلو ۰/۰۵ درصد (TB, in 50% Mcllvaine's citrate phosphate buffer, pH 3.5, Merck) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. رنگ تولوئیدین‌بلو برای ارزیابی سلامت کروماتین استفاده شد. به طوری که سر اسپرم با کروماتین سالم به رنگ آبی روشن است و آن‌هایی که دارای کروماتین فراگمنته یا غیرطبیعی است به رنگ بنفش تیره است. مجموعه‌ای از ۳۰۰ اسپرم در هر لام با استفاده از میکروسکوپ نوری مشاهده و ارزیابی شدند.

رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو

رنگ آنیلین‌بلو برای ارزیابی تراکم کروماتین نمونه‌های اسپرم استفاده شد. در این روش، اسمیرهای تهیه و خشک شده در دمای هوا با استفاده از فرمالین ٪۴ (Junsei Chemical, Tokoyo, Japan) تثبیت شدند. سپس با آب شستشو داده شدند و در آنیلین‌بلو ٪۵ (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) در محلول اسیداستیک ٪۴ (pH ۳,۵) رنگ‌آمیزی شدند. هر کدام از مراحل فیکساسیون و رنگ‌آمیزی به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق اجرا شد. لام‌ها با آب شسته، در دمای اتاق خشک و با استفاده از میکروسکوپ نوری ارزیابی شدند. حداقل ۳۰۰ اسپرم شمارش و بررسی شدند. اسپرم‌های رنگ شده به صورت تیره به عنوان اسپرم‌های نابالغ با هیستون مازاد و کروماتین غیرطبیعی اسپرم در نظر گرفته شدند.

روش لقاح آزمایشگاهی

با در نظر گرفتن پارامترهای اسپرم (نرموزواسپرمی، الیگوزواسپرمی، آستنوزواسپرمی، الیگوآستنوتراتوزواسپرمی و تراتوزواسپرمی)، تخمک‌های برداشت شده مطابق با روش ایکسی تزریق شدند. تزریق با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Olympus IX70, Tokoyo, Japan) انجام شد. تخمک‌های تزریق شده به محیط $G1^{PLUS}$ (Vitrolife Co., Sweden) منتقل و در یک محیط مرطوب با ٪۵ CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. ارزیابی لقاح در ۱۸-۱۶ ساعت بعد از تزریق با مشاهده دو پیش‌هسته (Two Pronucleus: 2PN) صورت گرفت. ارزیابی زیگوت‌های دو پیش هسته براساس سیستم نمره بندی Scott و همکاران اجرا شد (Scott *et al.*, 2000).

در روز دوم و سوم، جنین‌ها ارزیابی و براساس تعداد بلاستومر، تقارن بلاستومرها، میزان و نوع فراگمنتاسیون سلول طبقه‌بندی شدند. طبقه‌بندی جنین به صورت زیر انجام شد: سلول‌های منظم و بدون فراگمنتاسیون سلولی (درجه A)؛ سلول‌ها با میزان کم‌تر از ٪۲۵ فراگمنتاسیون سلولی (درجه B)؛ سلول‌ها با میزان فراگمنتاسیون ٪۲۵ تا ٪۵۰ (درجه C) و سلول‌ها با فراگمنتاسیون بالاتر از ٪۵۰ (درجه D) (Ebner *et al.*, 2001). انتقال جنین‌های مناسب به صورت داخل رحمی در روز ۳-۲ بعد از ایکسی اجرا شد. حاملگی بیوشیمیایی با افزایش غلظت بتای سرم (beta-human chorionic gonadotropin: B-HCG) در ۱۴ روز بعد از انتقال جنین تعیین شد. مشاهده کیسه آمنیون همراه با ضربان قلب در ۳ هفته بعد از انتقال جنین به عنوان حاملگی کلینیکی درنظر گرفته شد. همچنین باید ذکر شود که از دست دادن خودبخودی حاملگی بعد از مشاهده حاملگی از طریق اولتراسوند سقط محسوب می‌شود.

نتایج

وضعیت کروماتین اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو و تولوئیدین‌بلو ارزیابی شد و درصد تراکم و ساختار غیرطبیعی کروماتین اسپرم در مردانی با فاکتورهای مختلف ناباروری مقایسه شد (جدول ۱). نتایج جدول نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری در تراکم غیرطبیعی کروماتین اسپرم از مردانی با فاکتورهای مختلف ناباروری (الیگوزواسپرمی، تراتوزواسپرمی، آستنوزواسپرمی و الیگوآستنوتراتوزواسپرمی) در مقایسه با نرموزواسپرمی وجود ندارد (P>۰/۰۵). این در حالی است که نتایج نشان می‌دهد، میزان آسیب DNA در نمونه‌های اسپرم از مردان نابارور با فاکتور ناباروری الیگوآستنوتراتوزواسپرمی تقریبا ۲ برابر بیش‌تر از نمونه‌های نرموزواسپرمی است (P<۰/۰۵). نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که میزان لقاح در نمونه‌های الیگوآستنوتراتوزواسپرمی و تراتوزواسپرمی به ترتیب ۰/۳ (P<۰/۰۰۱) و ۰/۴ (P<۰/۰۵) برابر نسبت به گروه نرموزواسپرمی کم‌تر است. همچنین ارزیابی درجه زیگوت نشان می‌دهد که میزان زیگوت‌هایی با درجه Z3 در گروه‌هایی با نمونه‌های الیگوزواسپرمی، الیگوآستنوتراتوزواسپرمی، تراتوزواسپرمی و آستنوزواسپرمی به ترتیب ۲/۶ (P<۰/۰۵)، ۷/۷، ۶

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.4.5]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.367]

جدول ۱- وضعیت کروماتین در نمونه‌های سیمن از مردانی با فاکتورهای مختلف ناباروری.

Table 1. Chromatin status in the semen specimens from men with different infertility factors.

	نرموزواسپرمی N= ۶۵ [OR]	الیگوزواسپرمی N= ۲۵ [OR]	تراتوزواسپرمی N= ۴۲ [OR]	آستنوزواسپرمی N=۲۸ [OR]	الیگوآستنوتراتوزواسپرمی N= ۳۵ [OR]
تراکم غیرطبیعی کروماتین (**AB**)٪	۱۸/۰۸ [۱/۰]	۱۶/۱۸ [۰/۸۷]	۲۲/۲۶ [۱/۲۹]	۲۵/۲۵ [۱/۵۳]	۲۴/۲۵ [۱/۴۵]
کروماتین آسیب دیده (**TB**)٪	۲۳/۷۶ [۱/۰]	۳۰/۶ [۱/۴۱]	۲۸/۵۶ [۱/۲۸]	۳۴/۵۶ [۱/۶۹]	۳۹/۱۴ [۲/۰۶][a]

N: تعداد؛ OR: ضریب احتمال؛ AB: آنیلین‌بلو؛ TB: تولوئیدین‌بلو. P value: [a]<۰/۰۵. گروه رفرنس به صورت [۱/۰] مشخص شده است.

N: Number; OR: Odds Ratio; AB: Aniline Blue; TB: Toluidine Blue; P value: [A]<0.05. The reference category is expressed as [1.0].

جدول ۲- ارتباط بین فاکتورهای مختلف ناباروری در مردان و نتایج لقاح آزمایشگاهی.

Table 2. The relationships among different infertility factors in men and in-vitro fertilization outcomes.

		نرموزواسپرمی N= ۶۵ [OR]	الیگوزواسپرمی N= ۲۵ [OR]	تراتوزواسپرمی N= ۴۲ [OR]	آستنوزواسپرمی N=۲۸ [OR]	الیگوآستنوتراتوزواسپرمی N= ۳۵ [OR]
درصد لقاح		۶۵/۵۹ [۱/۰]	۵۷/۵۸ [۰/۵۹]	۵۱/۸۲ [۰/۴۷][a]	۶۱/۸۷ [۰/۷۰۹]	۴۱/۹ [۰/۳۱۵][c]
درجه زیگوت ٪	Z1	۳۲/۸ [۱/۰]	۲۴/۷۱ [۱/۰]	۱۹/۶ [۱/۰]	۲۳/۲ [۱/۰]	۱۴/۰۳ [۱/۰]
	Z2	۴۹/۱ [۱/۰]	۴۵/۸ [۱/۲۳]	۴۶/۸ [۱/۵۹]	۲۱/۴ [۰/۶۱]	۳۱/۹ [۱/۵۱]
	Z3	۱۰/۳ [۱/۰]	۲۰/۳۹ [۲/۶۲][a]	۳۷/۴ [۶/۰۷][c]	۴۴/۵ [۶/۱][c]	۳۴/۱۷ [۷/۷۵][c]
	Z4	۷/۸ [۱/۰]	۹/۱ [۱/۵۴]	۷/۵ [۱/۶]	۱۰/۹ [۱/۹۷]	۱۹/۹ [۵/۹][c]
درجه جنین ٪	A	۵۹/۹ [۱/۰]	۵۳/۴ [۱/۰]	۴۳/۹ [۱/۰]	۴۴/۸ [۱/۰]	۲۴/۰۷ [۱/۰]
	B	۳۱/۷۶ [۱/۰]	۲۷/۲۱ [۰/۹۶]	۲۰/۲ [۰/۸۶]	۲۳/۶ [۰/۹۹]	۲۴/۲ [۱/۸۹]
	C	۴/۳ [۱/۰]	۱۰/۳ [۲/۶۸]	۱۵/۹ [۵/۰۴][b]	۱۹/۸ [۶/۱۵][c]	۱۳/۰۳ [۷/۵۴][c]
	D	۴/۰۴ [۱/۰]	۹/۰۹ [۲/۵۲]	۲۰ [۶/۷۵][b]	۱۱/۸ [۳/۹][a]	۳۸/۷ [۲۳/۸][c]
میزان حاملگی کمیکال +/TE (٪) [OR]		۲۹/۶۵ (۴۴/۶۱) [۱/۰]	۹/۲۵ (۳۶) [۰/۶۹]	۱۴/۴۲ (۳۳/۳۳) [۰/۶۲]	۱۰/۲۸ (۳۵/۷۱) [۰/۶۹]	۹/۳۵ (۲۵/۷۱) [۰/۴۳][b]
A/+ درصد سقط [OR]		۵/۲۹ ۱۷/۲۴ [۱/۰]	۳/۹ ۳۳/۳۳ [۲/۴][a]	۶/۱۴ ۴۲/۸۵ [۳/۵۹][c]	۴/۱۰ ۴۰ [۳/۲][b]	۴/۹ ۴۴/۴۴ [۳/۸۴][c]

N: تعداد؛ OR: ضریب احتمال؛ +/TE: نسبت تعداد بتای مثبت به جنین‌های انتقال داده شده؛ A/+: نسبت تعداد سقط به تعداد بتای مثبت. [a]<۰/۰۵ و [b]<۰/۰۱؛ [c]<۰/۰۰۱ P value: گروه رفرنس به صورت [۱/۰] مشخص شده است.

N: Number; OR: Odds Ratio; +/TE: Positive Beta test rate/Transferred Embryo; A/+: Abortion rate/ Positive Beta test; P value: [A]<0.05, [B]<0.01, and [C]<0.001. The reference category is expressed as [1.0].

و ۶/۱ (P<۰/۰۰۱) برابر بیش‌تر از نرموزواسپرمی است. همچنین بیش‌ترین میزان زیگوت‌های Z4 در گروه حاصل از الیگوآستنوتراتوزواسپرمی (۵/۹ برابر، P<۰/۰۰۱) در مقایسه با گروه نرموزواسپرمی مشاهده می‌شود. این بدین معنی است که کیفیت زیگوت در این گروه پایین‌تر است. اطلاعات مربوط به کیفیت جنین نیز نشان می‌دهد که میزان تکوین جنین‌هایی با درجه C در نمونه‌های تراتوزواسپرمی، آستنوزواسپرمی و الیگو-آستنوتراتوزواسپرمی به ترتیب ۵ (P<۰/۰۱)، ۶/۱ (P<۰/۰۰۱) و ۷/۵ (P<۰/۰۰۱) برابر نسبت به گروه نرموزواسپرمی بیش‌تر است. همچنین میزان تکوین جنین با درجه D در همین گروه‌ها به ترتیب ۶/۷ (P<۰/۰۱)، ۳/۹ (P<۰/۰۵) و ۲۳/۸ (P<۰/۰۰۱) برابر نسبت به گروه نرموزواسپرمی بیش‌تر است. این بدین معنی

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.4.5]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.367]

است که جنین‌هایی با کیفیت پایین‌تر در این گروه مشاهده می‌شود. همچنین نتایج جدول ۲ تفاوت معنی‌داری را در میزان حاملگی گروه الیگوآستنوتراتوزواسپرمی نشان می‌دهد. این تفاوت بیان‌کننده کاهش میزان حاملگی (۰/۴ برابر کم‌تر، P<۰/۰۱) در این گروه نسبت به نرموزواسپرمی است. همچنین میزان سقط در همه گروه‌ها تفاوت معنی‌داری را نسبت به نرموزواسپرمی نشان می‌دهد (جدول ۲).

بحث

این مطالعه بر ارتباط بین سلامت و تراکم کروماتین اسپرم در مردان نابارور با فاکتورهای مختلف ناباروری (الیگوزواسپرمی، آستنوزواسپرمی، تراتوزواسپرمی، الیگوآستنوتراتوزواسپرمی و نرموزواسپرمی) متمرکز شد و نتایج تکنیک‌های کمک باروری (ICSI) را در گروه‌های مختلف دنبال و مقایسه کرد. در این مطالعه از آنیلین‌بلو برای بررسی تراکم کروماتین استفاده شد که وجود هیستون‌های اضافی را تشخیص می‌دهد و تولوئیدین‌بلو که برای ارزیابی ساختمان و سلامت کروماتین اسپرم است. از آنجائیکه سلامت DNA اسپرم می‌تواند کیفیت جنین و نتایج تکنیک‌های کمک باروری (Brinkworth, 2000; Perreault, 2003; Savitz, 2003) و احتمالا سلامت نوزاد (Campbell & Irvine, 2000; Ramos *et al.*, 2002) را تحت تاثیر قرار دهد، بنابراین ارزیابی سلامت DNA اجتناب‌ناپذیر است. مطابق با نتایج مطالعه حاضر، بررسی وضعیت تراکم کروماتین (نتایج رنگ آمیزی AB) و فراگمنتاسیون DNA (نتایج رنگ آمیزی TB) نشان داد که در مردان نابارور با فاکتور الیگوآستنوتراتوزواسپرمی میزان کروماتین آسیب دیده در مقایسه با گروه نرموزواسپرمی به طور معنی‌داری بیش‌تر است. میزان لقاح و کیفیت زیگوت‌ها و جنین‌ها در این گروه و گروه تراتوزواسپرمی نیز به طور معنی‌داری کم‌تر است. به نظر می‌رسد که کروماتین آسیب‌دیده اسپرم بر روی میزان لقاح و کیفیت جنین تاثیر منفی می‌گذارد. همچنین میزان حاملگی در این گروه به طور معنی‌داری کم‌تر از گروه نرموزواسپرمی بود. بررسی بیش‌تر نشان داد که میزان سقط جنین نیز در این گروه به طور معنی‌داری بالاتر از گروه نرموزواسپرمی است. با توجه به مطالعات صورت گرفته تاکنون مطالعه‌ای بر وضعیت کروماتین و فراوانی آن در فاکتورهای مختلف ناباروری مردان و تاثیر آن بر میزان لقاح، کیفیت زیگوت و جنین، میزان حاملگی و سقط صورت نگرفته است. در مطالعه‌ای (Sadeghi *et al.*, 2011) سلامت و بلوغ DNA اسپرم‌های دریافت شده از اپیدیدیم و اسپرم‌های انزال‌شده بررسی و ارتباطش با نتایج روش‌های کمک باروری در هر دو گروه مطالعه شد. نتایج مطالعه آنها نشان داد که درصد آسیب DNA و تراکم غیرطبیعی کروماتین در اسپرم‌های اپیدیدیم نسبت به اسپرم‌های انزال یافته بیش‌تر بود و به دنبال آن میزان لقاح به طور معنی‌داری پایین‌تر بود. این نتایج تاثیر وضعیت کرماتین اسپرم را بر پتانسیل باروری اسپرم نشان می‌دهد. نتایج مطالعه حاضر نیز در توافق با یافته‌های منتشرشده نشان داد که فراوانی بیش‌تر کروماتین آسیب دیده در نمونه‌های الیگوآستنوتراتوزواسپرمی، میزان لقاح کم‌تر، کیفیت جنین و میزان حاملگی پایین‌تر و سقط بیش‌تری را به همراه دارد. همچنین، بسیاری از مطالعات ارتباط منفی بین فراوانی فراگمنتاسیون DNA اسپرم و میزان لقاح و تکوین جنین را نشان می‌دهند (Avendaño *et al.*, 2010; Benchaib *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2004). سلامت طبیعی کروماتین اسپرم نقش مهمی در پتانسیل لقاح اسپرم دارد. بعضی از مطالعات نشان داده‌اند که آستانه پیش‌بینی‌کننده ۲۷ درصدی از فراگمنتاسیون DNA اسپرم منتج به حاملگی موفق در چرخه‌های IVF/ICSI می‌شود (Larson *et al.*, 2000; Larson-Cook *et al.*, 2003). گزارش شده است که تشخیص کروماتین غیرطبیعی کم‌تر از ۳۰ درصد در اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی AB، تاثیری بر میزان لقاح و کیفیت جنین ندارد (Hammadeh *et al.*, 1996). از طرف دیگر بسیاری از مطالعات بیانگر وجود ارتباط منفی بین فراوانی فراگمنتاسیون DNA اسپرم و میزان لقاح و تکوین جنین است (Avendaño *et al.*, 2010; Benchaib *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2004). بنابراین هنوز اطلاعات ضد و نقیضی از وضعیت کروماتین اسپرم و تاثیرش بر میزان لقاح و نتایج باروری وجود دارد (Collins *et al.*, 2008).

در مجموع با در نظر گرفتن اهمیت ساختار کروماتین اسپرم در حفاظت از ژنوم اسپرم، ساختمان غیرطبیعی کروماتین می‌تواند تاثیرات منفی بر نتایج تکنیک‌های کمک باروری داشته باشد. مطالعه حاضر نشان داد که فراوانی کروماتین آسیب دیده در نمونه‌های الیگوآستوتراتوزواسپرمی بسیار بیش‌تر از سایر گروه‌ها بود و تاثیر این افزایش آسیب کروماتین در میزان لقاح، کیفیت زیگوت و جنین، میزان حاملگی و میزان سقط جنین نمایان شد. همچنین کاهش حاملگی و افزایش سقط جنین در سایر گروه‌های نابارور هم معنی‌دار بود، چرا که در آنها نیز آسیب DNA و ناهنجاری در تراکم کروماتین قابل مشاهده بود. بنابراین پیشنهاد می‌شود در آنالیز سیمن و ارزیابی پارامترهای اسپرم، ارزیابی وضعیت سلامت و تراکم کروماتین اسپرم نیز انجام شود و بدین ترتیب ممکن است نتایج روش‌های کمک باروری بهبود یابد.

سپاسگزاری

نویسندهٔ مقاله از همکاری اعضای مرکز IVF بیمارستان الزهرا(س) رشت سپاسگزاری می‌نماید.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.4.5]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.367]

REFERENCES

Aboulghar, M.A., Mansour, R.T., Serour, G.I., Fahmy, I., Kamal, A., Tawab, N.A. and Amin, Y.M. 1997. Fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection using ejaculate semen and surgically retrieved sperm. – Fertil. Steril. 68: 108-111.

Aitken, R.J. and De Iuliis, G.N. 2007. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. – Reprod. Biomed. Online. 14: 727-733.

Avendaño, C., Franchi, A., Duran, H. and Oehninger, S. 2010. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. – Fertil. Steril. 94: 549-557.

Barratt, C.L., Aitken, R.J., Björndahl, L., Carrell, D.T., de Boer, P., Kvist, U., Lewis, S.E., Perreault, S.D., Perry, M.J., Ramos, L., Robaire, B., Ward, S. and Zini, A. 2010. Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications - A position report. – Hum. Reprod. 25: 824-838.

Benchaib, M., Lornage, J., Mazoyer, C., Lejeune, H., Salle, B. and François Guerin, J. 2007. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. – Fertil. Steril. 87: 93-100.

Brinkworth, M.H. 2000. Paternal transmission of genetic damage: findings in animals and humans. – Int. J. Androl. 23: 123-135.

Bungum, M., Humaidan, P., Axmon, A., Spano, M., Bungum, L., Erenpreiss, J. and Giwercman, A. 2007. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. – Hum. Reprod. 22: 174-179.

Campbell, A.J. and Irvine, D.S. 2000. Male infertility and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). – Br. Med. Bull. 56: 616-629.

Collins, J.A., Barnhart, K.T. and Schlegel, P.N. 2008. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? – Fertil. Steril. 89: 823-831.

Duran, E.H., Morshedi, M., Taylor, S. and Oehninger, S. 2002. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. – Hum. Reprod. 17: 3122-2128.

Ebner, T., Yaman, C., Moser, M., Sommergruber, M., Pölz, W. and Tews, G. 2001. Embryo fragmentation in vitro and its impact on treatment and pregnancy outcome. – Fertil. Steril. 76: 281-285.

Hammadeh, M.E., al-Hasani, S., Stieber, M., Rosenbaum, P., Küpker, D., Diedrich, K. and Schmidt, W. 1996. The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. – Hum. Reprod. 11: 2468-2471.

Larson, K.L., DeJonge, C.J., Barnes, A.M., Jost, L.K. and Evenson, D.P. 2000. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. – Hum. Reprod. 15: 1717-1722.

Larson-Cook, K.L., Brannian, J.D., Hansen, K.A., Kasperson, K.M., Aamold, E.T. and Evenson, D.P. 2003. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. – Fertil. Steril. 80: 895-902.

Morris, I.D., Ilott, S., Dixon, L. and Brison, D.R. 2002 The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. – Hum. Reprod. 17: 990-998.

Pacey, A.A. 2010. Quality assurance and quality control in the laboratory andrology. – Asian J. Androl. 12: 21-25.

Perreault, S.D. 2003. Distinguishing between fertilization failure and early pregnancy loss when identifying male-mediated adverse pregnancy outcomes. – Adv. Exp. Med. Biol. 518:189-198.

Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. 2008. The clinical utility of sperm DNA integrity testing. – Fertil. Steril. 90: 178-180.

Ramos, L., Kleingeld, P., Meuleman, E., van Kooy, R., Kremer, J., Braat, D. and Wetzels, A. 2002. Assessment of DNA fragmentation of spermatozoa that were surgically retrieved from men with obstructive azoospermia. – Fertil. Steril. 77: 233-237.

Robinson, L., Gallos, I.D., Conner, S.J., Rajkhowa, M., Miller, D., Lewis, S., Kirkman-Brown, J. and Coomarasamy, A. 2012. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. – Hum. Reprod. 27: 2908-2917.

Sadeghi, M.R., Lakpour, N., Heidari-Vala, H., Hodjat, M., Amirjannati, N., Hossaini Jadda, H., Binaafar, S. and Akhondi, M.M. 2011. Relationship between sperm chromatin status and ICSI outcome in men with obstructiveazoospermia and unexplained infertile normozoospermia. **–** Rom. J. Morphol. Embryol. 52: 645-651.

Savitz, D.A. 2003. Paternal exposure to known mutagens and health of the offspring: ionizing radiation and tobacco smoke. – Adv. Exp. Med. Biol. 518: 49-57.

Scott, L., Alvero, R., Leondires, M. and Miller, B. 2000. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. – Hum. Reprod. 15: 2394-2403.

Sharma, R.K., Said, T. and Agarwal, A. 2004. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. – Asian. J. Androl. 6: 139-148.

Spanò, M., Bonde, J.P., Hjøllund, H.I., Kolstad, H.A., Cordelli, E. and Leter, G. 2000. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. – Fertil. Steril. 73: 43-50.

Tomlinson, M., Lewis, S. and Morroll, D. 2013. Sperm quality and its relationship to natural and assisted conception: British Fertility Society guidelines for practice. – Hum. Fertil. 16: 175-193.

Weng, S.L., Chiu, C.M., Lin, F.M., Huang, W.C., Liang, C., Yang, T., Yang, T.L., Liu, C.Y., Wu, W.Y., Chang, Y.A., Chang, T.H. and Huang, H.D. 2014.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.4.5]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.367]

Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomics sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. – PLOS ONE 9: e110152.

World Health Organization. 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. – World Health organization, Geneva. 271 pp.

Zini, A., Boman, J.M., Belzile, E. and Ciampi, A. 2008. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. – Hum. Reprod. 23: 2663-2668.

*****

How to cite this article:

Ghasemian, F. 2020. The evaluation of sperm chromatin status in men with different infertility factors, and its relationship with ICSI outcomes. – Nova Biol. Reperta 6: 367-373. (In Persian)

قاسمیان، ف. ۱۳۹۸. ارزیابی وضعیت کروماتین اسپرم در مردانی با فاکتورهای مختلف ناباروری و ارتباطش با نتایج تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۶: ۳۷۳-۳۶۷.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-22]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.4.5]

[DOI: 10.29252/nbr.6.4.367]