مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۲۰، شماره ۲/ خرداد و تیر ۱۳۹۷/ ۱۲-۱

مقاله پژوهشی

مقایسه پروتئین متصل شونده به دامنه WW صفحات خلف آکروزومی و وضعیت کروماتین اسپرم بین مردان نرموزواسپرمی و ابنرموزواسپرمی

مرضیه تولائی[1*]، لیلا آزادی[1]، محمدحسین نصر اصفهانی[1،2]

[1]پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه زیست فناوری تولیدمثل، اصفهان، ایران؛ [2]مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۱٤ تاریخ پذیرش: ۹٦/۲/۲

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 8:00 +0430 on Wednesday August 15th 2018

چکیده:

زمینه و هدف: **پروتئین متصل شونده به دامنه WW صفحات خلف آکروزومی (PAWP) اسپرم در طی اسپرمیوژنز بیان می‌شود و اخیراً به عنوان یکی از فاکتورهای اسپرمی دخیل در فعال شدن تخمک معرفی شده است. هدف این مطالعه، مقایسه PAWP و وضعیت کروماتین اسپرم بین مردان با پارامترهای اسپرمی طبیعی و غیرطبیعی بوده است.**

روش بررسی: **نمونه مایع منی بر اساس پروتکل سازمان بهداشت جهانی (۲۰۱۰) ارزیابی شد و افراد به دو گروه نرموزواسپرمی (N=۳۱) و ابنرموزواسپرمی (N=۲۳) تقسیم شدند. PAWP اسپرم با استفاده از فلوسایتومتری، آسیب DNA (آزمون TUNEL) و کمبود پروتامین (کروموماییسین A_3) اسپرم توسط میکروسکوپ فلورسنت در این افراد ارزیابی شد. تجزیه و تحلیل آماری به‌وسیله نرم‌افزار SPSS, Chicago IL, USA با استفاده از آنالیز Descriptive، Independent- Sample T Test مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون ضریب همبستگی پیرسون جهت ارتباط بین پارامترها استفاده شد.**

یافته‌ها: **در این مطالعه، اختلاف معنی‌داری در پارامترهای اسپرم (غلظت، تحرک و مورفولوژی) بین مردان نرموزواسپرمی و ابنرموزواسپرمی مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). میانگین درصد PAWP اسپرم به‌طور معنی‌داری در افراد ابنرموزواسپرمی کمتر از افراد نرموزواسپرمی بود (P<۰/۰۰۱). به‌علاوه میانگین درصد آسیب DNA اسپرم و کمبود پروتامین به‌طور معنی‌داری در افراد ابنرموزواسپرمی بیشتر از افراد نرموزواسپرمی بود (P<۰/۰۵). به‌علاوه، همبستگی‌های معنی‌داری بین درصد PAWP اسپرم با پارامترهای اسپرمی مشاهده شد (P<۰/۰۵).**

نتیجه‌گیری: **نتایج نشان می‌دهند که در مردان ابنرموزواسپرمی، تست‌های عملکردی اسپرم مانند آسیب DNA، کمبود پروتامین و همچنین درصد فاکتور اسپرمی (PAWP) دخیل در فعال شدن تخمک در محدوده غیرطبیعی بوده است؛ بنابراین ارزیابی این تست‌ها می‌تواند در تصمیم‌گیری و درمان این مردان نابارور موثر باشد.**

واژه‌های کلیدی: **PAWP، آسیب DNA، کمبود پروتامین، پارامترهای اسپرمی، ناباروری مردان.**

مقدمه:

در طی فرآیند اسپرماتوژنز، از اسپرماتوگونی‌های دیپلوئیدی، اسپرم بالغ هاپلوئیدی تمایز می‌یابد که این فرآیند شامل سه مرحله اصلی اسپرماتوسیتوژنز، میوز و اسپرمیوژنز می‌باشد. در طی مرحله اسپرماتوسیتوژنز، اسپرماتوگونی‌ها از طریق تقسیمات میتوزی منجر به ازدیاد منبع اصلی خود و همچنین تمایز به اسپرماتوسیست‌های اولیه می‌گردند. پس از دو تقسیم متوالی میوزی، اسپرماتوسیست‌های اولیه به اسپرماتوسیست‌های ثانویه و سپس به اسپرماتیدها تمایز می‌یابند. در مرحله اسپرمیوژنز، اسپرماتیدها پس از یکسری تغییرات مورفولوژیکی و

*نویسنده مسئول: اصفهان- دانشگاه اصفهان- پژوهشگاه رویان- پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی- مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل- گروه زیست تولیدمثل- تلفن: ۰۹۱۳۳۱٤۳٤۳۱، E-mail: tavalaee.royan@gmail.com

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 8:00 +0430 on Wednesday August 15th 2018

ساختاری از جمله سازماندهی مجدد کروماتین اسپرم، تشکیل ساختار آکروزوم و حذف زائده‌های سیتوپلاسمی، اسپرم بالغ و کارا را تولید می‌نمایند (۱). سازماندهی مجدد کروماتین اسپرم با جایگزینی پروتامین‌ها به‌جای هیستون‌ها صورت می‌گیرد که موجب تراکم ساختار کروماتین اسپرم می‌شود. لذا هسته اسپرم فشردگی خود را با این جابه‌جایی کسب می‌کند که پیامد آن تسهیل درحرکت اسپرم تا رسیدن به ناحیه لقاح، محافظت از آسیب‌های فیزیکی و مکانیکی در طی عبور در اپیدیدیم، دستگاه تناسلی مونث و غیره می‌باشد (۳،۲).

از به هم پیوستن وزیکول‌های آکروزومی نشأت گرفته از دستگاه گلژی، ساختار آکروزوم که ۷۰٪ سر اسپرم را تشکیل می‌دهد، به وجود می‌آید. بین آکروزوم و هسته، یک ساختاری به نام "پوشش دور هسته‌ای" قرارگرفته که یک لایه پروتئینی متراکم و مقاوم به دترجنت‌های غیر یونی می‌باشد. این ساختار دارای سه منطقه "زیر آکروزومی"، "استوایی" و "خلف آکروزومی" می‌باشد. لایه زیر آکروزومی و خلف آکروزومی در طی فرآیند اسپرمیوژنز به‌طور مستقل تشکیل می‌شوند، به‌گونه‌ای که پروتئین‌های لایه زیر آکروزومی در تشکیل ساختار آکروزوم نقش دارند، درصورتی‌که ناحیه خلف آکروزومی حاوی پروتئین‌هایی است که در طی کشیده شدن سر اسپرم توسط ساختار میکروتوبولی مانشت، به این ناحیه انتقال داده می‌شوند و در فیوژن اسپرم با تخمک و لقاح نقش بسزایی دارند. از جمله پروتئین‌های این ناحیه می‌توان به PAWP (Post-acrosomal sheath WWdomain-binding protein)، subH2BV (Histone H2B subacrosomal variant) و هیستون‌های هسته سوماتیک اشاره نمود (۴).

در طی فرآیند لقاح، پس از برهمکنش ناحیه استوایی سر اسپرم با تخمک، یکسری از فاکتورها از ناحیه خلف آکروزومی اسپرم به داخل تخمک رهایش می‌یابند. PAWP، Phospholipase C zeta= PLCζ و Truncated form of the KIT receptor= tr-KIT از جمله فاکتورهای پیشنهادی هستند که با ورود به داخل تخمک، منجر به افزایش کلسیم داخل سلولی، خروج اووسیت از متافاز Π، تشکیل پیش هسته‌ها و تکوین اولیه جنین می‌گردد (۵).

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که پروتئین PAWP مانند سایر پروتئین‌های ناحیه خلف آکروزومی در طی طویل شدن اسپرماتیدها در لوب سیتوپلاسمی سنتز و به‌وسیله مانشت انتقال می‌یابد و در جایگاه اصلی خود، ناحیه خلف آکروزومی قرار می‌گیرد (۷،۶). به‌علاوه، نشان داده‌شده که در صورت تزریق پروتئین نوترکیب PAWP به داخل تخمک موش و زنوپوس می‌توان نوسانات کلسیم و تکوین اولیه جنین را مشاهده کرد (۸-۶). بااین‌حال، Satouh و همکاران اذعان داشته‌اند که PAWP نقشی در ایجاد نوسانات کلسیم در موش نداشته است (۹). در یک مطالعه‌ای که توسط Kennedy و همکاران بر روی اسپرم گاو انجام شد مشخص گردید که یک ارتباط معنی‌داری بین مورفولوژی طبیعی اسپرم با بیان PAWP وجود دارد بدین معنا که اسپرم‌ها با شکل ظاهری طبیعی، دارای سطح طبیعی پروتئین PAWP می‌باشند (۱۰). اخیراً نیز مشخص‌شده است که افراد نابارور گلوبوزواسپرمی که اسپرم آن‌ها فاقد آکروزوم و سر اسپرم‌ها کروی شکل است، بیان PAWP به‌طور معنی‌داری نسبت به اسپرم افراد بارور کاهش داشته است (۱۱).

با توجه به اهمیت پروتئین PAWP در طی فرآیند اسپرمیوژنز و نقش آن به‌عنوان یک فاکتور اسپرمی که با ورود به تخمک منجر به فعال شدن تخمک می‌گردد، در این مطالعه سعی بر آن شد که این

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 8:00 +0430 on Wednesday August 15th 2018

پروتئین در نمونه اسپرمی مردان با پارامترهای اسپرمی طبیعی که به نظر می‌رسد سیر فرآیند اسپرماتوژنز در آن‌ها طبیعی است و مردان با پارامترهای اسپرمی غیرطبیعی که احتمالاً نقص در فرآیند اسپرماتوژنز دارند، مورد ارزیابی و مقایسه قرار گیرد. به‌علاوه با توجه به رخداد مهم جابه‌جایی هیستون ها با پروتامین ها در طی فرآیند اسپرمیوژنز و سلامت DNA اسپرم، ایندو پارامتر نیز به‌طور هم‌زمان بررسی می‌شود. این سؤال پژوهشی مطرح است که آیا با آنالیز اولیه نمونه اسپرمی می‌توان متوجه شد که در افراد با نقص اسپرمیوژنزی که ابنرموزواسپرمی هستند، بیان پروتئین PAWP، جابه‌جایی صحیح هیستون ها با پروتامین ها و سلامت DNA نیز غیرطبیعی است؟

روش بررسی:

در این مطالعه، نمونه مایع منی از مردان مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری با کسب رضایت و پر کردن فرم رضایت نامه مبنی بر اینکه از نمونه اسپرمی فقط برای انجام فعالیت تحقیقاتی استفاده می‌شود، جمع‌آوری شد. نمونه مایع منی ۴-۳ روز پس از مقاربت جنسی به آزمایشگاه آندرولوژی مرکز باروری و ناباروری تحویل داده شد. پس از ۳۰ دقیقه از دادن نمونه و مایع‌شدگی آن، پارامترهای اسپرمی از جمله غلظت، تحرک و مورفولوژی در این افراد مورد بررسی قرار گرفت و باقیمانده نمونه جهت بررسی پروتئین PAWP با استفاده از روش فلوسایتومتری، ارزیابی کمبود پروتامین و آسیب DNA اسپرم با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت در نظر گرفته شد.

در این مطالعه پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی) بر اساس سازمان بهداشت جهانی (WHO) (۲۰۱۰) مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت اسپرم با استفاده از لام شمارشگر اسپرم و با قرار دادن ۱۰ میکرولیتر از نمونه مایع منی بر روی لام انجام شد و در زیر میکروسکوپ نوری با عدسی چشمی 20x اسپرم‌ها شمارش و به‌صورت میلیون در میلی‌لیتر گزارش شد. درصد تحرک اسپرم با استفاده از نرم‌افزار CASA (Computer- Aided Sperm Analysis) به‌صورت درصد بیان و مورفولوژی اسپرم برای هر نمونه پس از رنگ‌آمیزی با پاپانیکولائو، در حدود ۲۰۰ اسپرم شمارش و به‌صورت درصد مورفولوژی غیرطبیعی گزارش شد (۱۲).

پس از ارزیابی پارامترهای اسپرمی، مراجعین بر سازمان بهداشت جهانی (WHO) (۲۰۱۰) به دو گروه افراد با پارامترهای اسپرمی طبیعی (N=۳۱) و افراد با پارامترهای اسپرمی غیرطبیعی (N=۲۳) دسته‌بندی شدند. درصورتی‌که غلظت اسپرم بیشتر از ۱۵ میلیون در سی‌سی، درصد تحرک بیشتر از ۴۰٪ و درصد مورفولوژی غیرطبیعی پایین‌تر از ۹۶٪ بود، به افراد واژه "نرموزواسپرمی" و در غیر این صورت "ابنرموزواسپرمی" اطلاق گردید. افراد ابنرموزواسپرمی حداقل دارای دو پارامتر اسپرمی غیرطبیعی بودند.

از نمونه اسپرمی شستشو شده با بافر فسفات سالین (PBS= Phosphate Buffer Saline)، ۴ میلیون اسپرم (کنترل و تست) جداسازی گردید و با پارافرمالدهید ۴٪ به مدت ۲۰ دقیقه فیکس شد؛ سپس نمونه‌ها با بافر PBS به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ شستشو و با تریتون x-100 (۰/۵٪) به مدت ۳۰ دقیقه نفوذپذیر گردید. پس از شستشو نمونه‌ها با بافر PBS، جهت بلوک کردن جایگاه‌های غیراختصاصی، نمونه‌ها در BSA (Bovine Serum Albumin) (۳٪) در PBS به مدت یک ساعت انکوبه شدند؛ سپس اسپرم‌ها با آنتی‌بادی اولیه برعلیه PAWP (Abcam, Cambridge)

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 8:00 +0430 on Wednesday August 15th 2018

در BSA به مدت یک شب در دمای ۴ درجه انکوبه شدند. روز بعد، پس از شستشوی نمونه‌های اسپرمی با PBS ازآنتی بادی ثانویه کانجوگه شده به FITC (goat anti rabbit IgG secondary antibody FITC conjugated) به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد استفاده گردید. مجدداً نمونه‌ها با PBS شستشو داده شد و با رنگ هسته‌ای PI (Propidium iodide) جهت شمارش اسپرم با استفاده از فلوسایتومتری FACSCalibur flow cytometer= Becton Dickinson,) San Jose, CA, USA) رنگ‌آمیزی گردید. در هر نمونه ۱۰۰۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های PLCζ مثبت در جمعیت PI مثبت با استفاده از نرم‌افزار BD CellQuest گزارش گردید (۱۴،۱۳).

بطورخلاصه، پس از شستشوی مایع منی با PBS، سلول‌ها با محلول کارنوی (متانول و اسید استیک گلاسیال به نسبت ۳:۱) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد فیکس شدند. گسترشی از سلول‌ها بر روی اسلاید تهیه و پس از خشک شدن در معرض هوا، هر اسلاید توسط ۱۰۰ میکرولیتر محلول کرومایسین A_3 (CMA_3, Sigma, USA)، (۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بافر مک الوین (Mcllvain Buffer) که حاوی ۱۰ میلی مولار کلرید منیزیم با PH=۷) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی گردید. سپس لام‌ها با PBS شستشو داده شده و توسط میکروسکوپ فلئورسنت با بزرگنمایی ۱۰۰ بررسی می شود. در هر نمونه حداقل ۵۰۰ اسپرم شمارش و اسپرم‌ها با رنگ زرد فلئورسنت درخشان در ناحیه خلفی سر اسپرم نشانگر اسپرم‌ها با کمبود پروتامین (CMA_3 مثبت) و اسپرم‌ها با رنگ زرد کمرنگ (CMA_3 منفی) نشانگر اسپرم‌ها با پروتامین طبیعی هستند (۱۵).

در این مطالعه، میزان آسیب DNA با استفاده از کیت TUNEL (Apoptosis Detection System Fluorescein, Promega, Mannheim, Germany) بررسی گردید. بطور خلاصه، پس از شستشوی مایع منی با PBS و تهیه اسمیر بر روی اسلاید، سلول‌ها با پارافرمالدهید ۴٪ به مدت ۲۰ دقیقه فیکس شدند. طبق دستورالعمل کیت TUNEL، اسلایدها رنگ‌آمیزی شدند. در این روش، رنگ فلئورسنت توسط آنزیم rTdT به انتهای قطعات شکسته DNA اتصال می یابد و fluorescein-12-dUTP، DNA را نشاندار می‌کند. مشاهده رنگ سبز فلئورسنت در ناحیه خلفی سر اسپرم نشانگر اسپرم‌ها با آسیب DNA و رنگ قرمز نشانگر اسپرم‌ها با DNA سالم است. در هر نمونه حداقل ۵۰۰ اسپرم با استفاده از میکروسکپ فلئورسنت با بزرگنمایی ۱۰۰ (BX51; Olympus; Japan) بررسی گردید (۱۶).

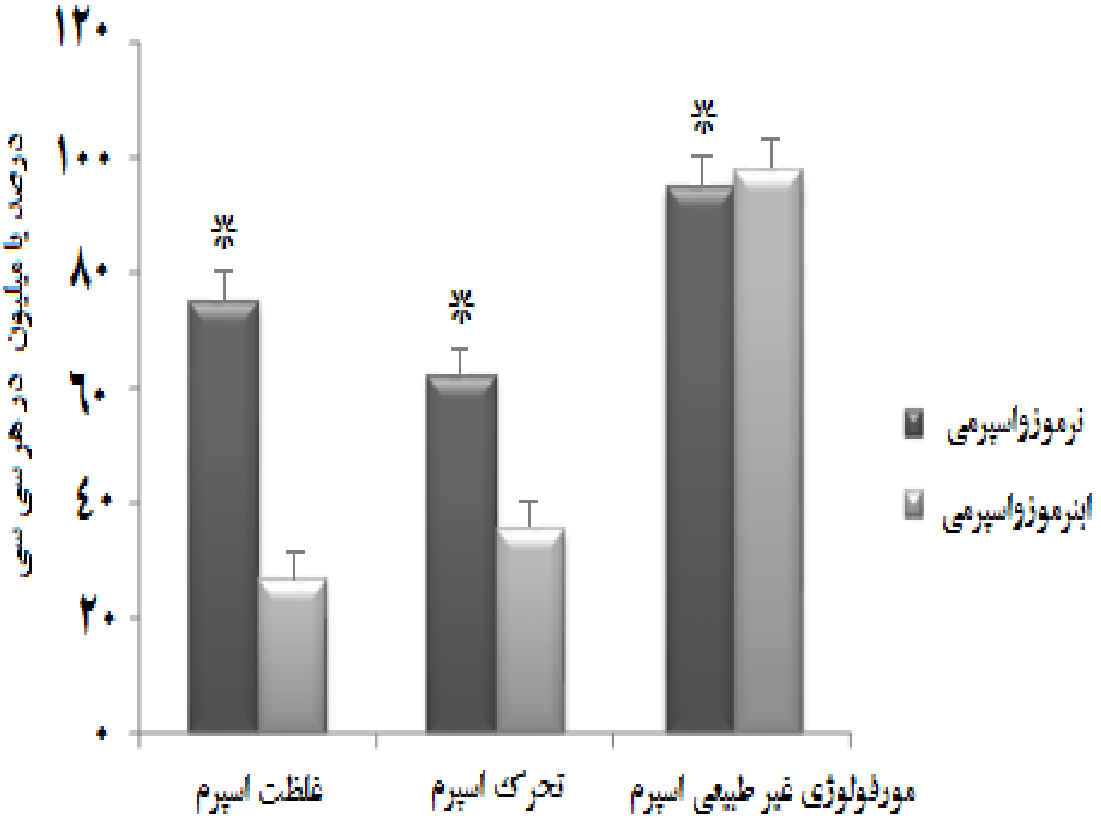
تجزیه و تحلیل آماری به‌وسیله نرم‌افزار SPSS, Chicago IL, USA با استفاده از آنالیز Descriptive، Independent- Sample T-Test مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون ضریب همبستگی پیرسون جهت ارتباط بین پارامترها استفاده شد. P کمتر از ۰/۰۵ در این مطالعه از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها:

در این مطالعه از نمونه مایع منی ۵۴ مرد مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان استفاده شد و پارامترهای اسپرمی، درصد پروتئین PAWP، کمبود پروتامین و آسیب DNA اسپرم مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه گروه‌های مورد مطالعه بر اساس پارامترهای اسپرمی تعیین شدند، گزارش میانگین پارامترهای اصلی اسپرمی از جمله غلظت، تحرک و موروفولوژی بین دو گروه در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. میانگین غلظت

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 8:00 +0430 on Wednesday August 15th 2018

اسپرم (۲۶/۸۲±۴/۶۲ در مقابل ۷۵/۱۶±۵/۳۷) و درصد تحرک اسپرم (۳۵/۵۶±۳/۴۶ در مقابل ۶۲/۴۱±۲/۱۳) به‌طور معنی‌داری در افراد ابنرموزواسپرمی کمتر از افراد نرموزواسپرمی بود (P<۰/۰۰۱). درصورتی‌که درصد مورفولوژی غیرطبیعی در افراد ابنرموزواسپرمی (۹۸/۲۶±۰/۲۰) به‌طور معنی‌داری بالاتر از افراد نرموزواسپرمی (۹۵/۴۸±۰/۲۲) می‌باشد (P<۰/۰۰۱).

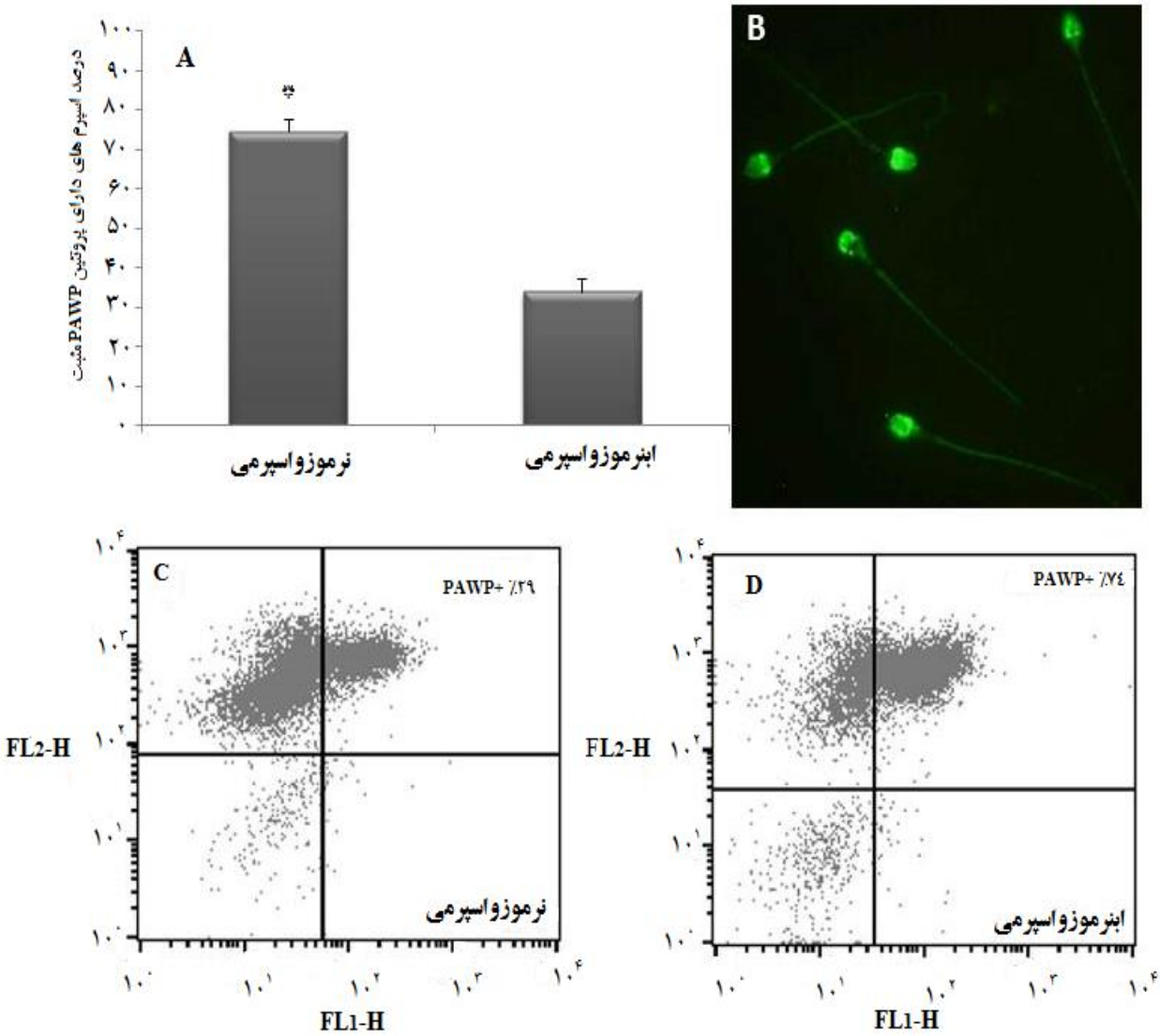


نمودار شماره ۱: مقایسه پارامترهای اسپرمی بین افراد نرموزواسپرمی و ابنرموزواسپرمی

*میانگین غلظت اسپرم و درصد تحرک اسپرم به‌طور معنی‌داری در افراد ابنرموزواسپرمی پایین‌تر از افراد نرموزواسپرمی است؛ درصد مورفولوژی اسپرم به‌طور معنی‌داری در افراد ابنرموزواسپرمی بیشتر از افراد نرموزواسپرمی است. *: نشانگر اختلاف معنی‌دار بین دو گروه در سطح P<۰/۰۰۱ می‌باشد.*

در این مطالعه، درصد پروتئین PAWP اسپرم با استفاده از روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. همانگونه که در نمودار شماره ۲ نشان داده که درصد اسپرم‌های دارای پروتئین PAWP مثبت به‌طور معنی‌داری در افراد ابنرموزواسپرمی (۳۳/۸۸±۳/۳۸) نسبت به نرموزواسپرمی (۷۴/۳۸±۳/۱۰) پایین‌تر است (P<۰/۰۵). جایگاه PAWP در ناحیه سر اسپرم و نتایج فلوسایتومتری یک نمونه نرموزواسپرمی و یک نمونه ابنرموزواسپرمی در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 8:00 +0430 on Wednesday August 15th 2018



نمودار شماره ۲: مقایسه درصد اسپرم‌های دارای PAWP مثبت بین افراد نرموزواسپرمی و ابنرموزواسپرمی

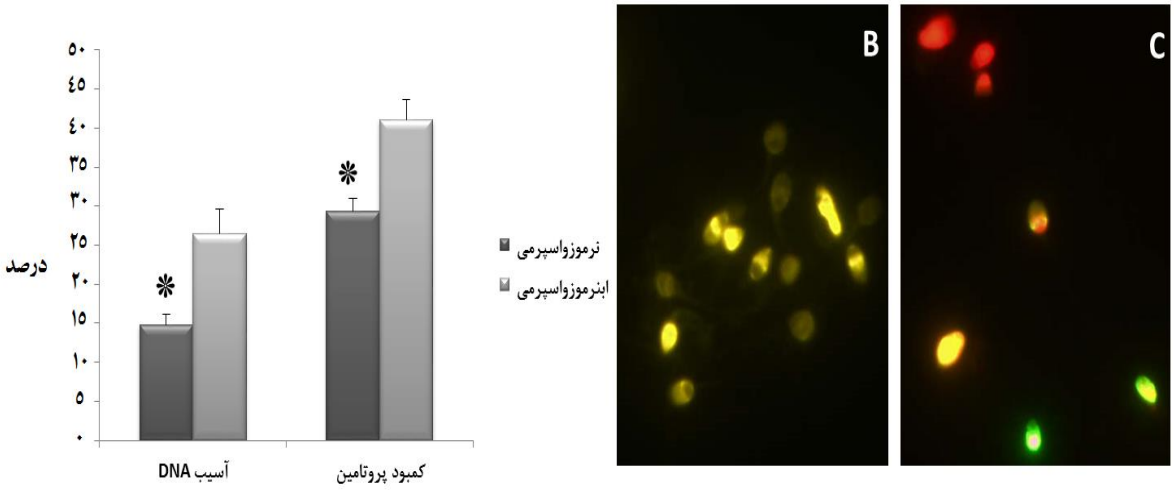
*A: درصد اسپرم‌های دارای PAWP در افراد ابنرموزواسپرمی به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از افراد نرموزواسپرمی است؛ B: جایگاه PAWP در ناحیه سر اسپرم؛ C: ارزیابی PAWP در یک نمونه نرموزواسپرمی و D: یک نمونه ابنرموزواسپرمی با استفاده از روش فلوسایتومتری؛ *: نشانگر اختلاف معنی‌دار بین دو گروه در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد.*

درصد کمبود پروتامین و آسیب DNA اسپرم نیز با استفاده از روش رنگ‌آمیزی کروموماییسین A_3 و TUNEL مورد بررسی قرار گرفت. در نمودار شماره ۳ نمونه‌ای از رنگ‌آمیزی این دو روش نشان داده‌شده و نتایج بیانگر آن است که میانگین درصد کمبود پروتامین در افراد ابنرموزواسپرمی (۲/۵۶±۴۱/۱۳) به‌طور معنی‌داری بالاتر از افراد نرموزواسپرمی (۱/۵۷±۲۹/۳۷) می‌باشد (P<۰/۰۰۱). به‌طور مشابه نیز درصد آسیب DNA اسپرم در افراد ابنرموزواسپرمی (۳/۲۰±۲۶/۴۷) به‌طور معنی‌داری بیشتر از افراد نرموزواسپرمی (۱/۲۵±۱۴/۸۴) است (P<۰/۰۰۱).

به‌علاوه ارتباط بین پارامترهای اسپرمی با درصد پروتئین PAWP، کمبود پروتامین و آسیب DNA اسپرم مورد آنالیز قرار گرفت. همانگونه که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است، ارتباط معنی‌داری بین درصد پروتئین PAWP و کمبود پروتامین اسپرم با پارامترهای

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 8:00 +0430 on Wednesday August 15th 2018

اسپرمی از جمله غلظت، تحرک و مورفولوژی اسپرم وجود دارد. به‌علاوه درصد آسیب DNA اسپرم نیز ارتباط معنی‌داری را با درصد تحرک و مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم نشان داده است (P<۰/۰۵).



نمودار شماره ۳: مقایسه درصد آسیب DNA و کمبود پروتامین اسپرم بین افراد نرموزواسپرمی و ابنرموزواسپرمی

*A: درصد آسیب DNA و کمبود پروتامین اسپرم در افراد ابنرموزواسپرمی به‌طور معنی‌داری بیشتر از افراد نرموزواسپرمی است؛ B: رنگ‌آمیزی کمبود پروتامین در اسپرم با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت. اسپرم‌ها با رنگ زرد تیره نشانگر محتوای پروتامین طبیعی و اسپرم‌ها با رنگ زرد درخشان بیانگر اسپرم‌ها با کمبود پروتامین هستند؛ C: رنگ‌آمیزی آسیب DNA اسپرم در یک نمونه اسپرمی با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت. اسپرم‌ها با رنگ قرمز نشانگر DNA سالم و اسپرم‌ها با رنگ سبز بیانگر اسپرم‌ها با آسیب DNA هستند؛ *: نشانگر اختلاف معنی‌دار بین دو گروه در سطح P<۰/۰۱ می‌باشد.*

جدول شماره ۱: ارتباط بین پارامترهای اسپرمی با درصد پروتئین PAWP، کمبود پروتامین و آسیب DNA اسپرم (N=۵۴)

پارامترها	وضعیت آماری	غلظت اسپرم (میلیون در هر سی‌سی)	درصد تحرک اسپرم	درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم
درصد پروتئین PAWP	ضریب همبستگی	۰/۶۸۱**	۰/۷۷۴**	-۰/۷۱۶**
	P	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
درصد آسیب DNA	ضریب همبستگی	-۰/۱۷۱	-۰/۶۲۸**	۰/۴۳۲**
	P	۰/۲۱۶	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱
درصد کمبود پروتامین	ضریب همبستگی	-۰/۳۴۱*	-۰/۳۳۴*	۰/۴۶۷*
	P	۰/۰۱۲	۰/۰۱۴	۰/۰۰۰

*: بیانگر معنی‌دار بودن ضریب همبستگی بین دو پارامتر با P<۰/۰۵ است؛ **: بیانگر معنی‌دار بودن ضریب همبستگی بین دو پارامتر با P<۰/۰۱ است.*

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 8:00 +0430 on Wednesday August 15th 2018

درصد پروتئین PAWP اسپرم ارتباط معنی‌داری را با درصد آسیب DNA اسپرم (P=۰/۰۰۲، r=-۰/۴۱۸) و درصد کمبود پروتامین اسپرم (P=۰/۰۲۶، r=-۰/۳۰۲) داشته و همچنین یک رابطه معنی‌داری بین اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین و آسیب DNA اسپرم (P=۰/۰۲۷، r=-۰/۳۰۱) مشاهده گردید.

بحث:

پوشش دور هسته‌ای یکی از اجزاء اصلی اسکلت سلولی است که مقاوم به دترجنت های غیریونی است و محتوی پروتئین‌های سیتوزولی متراکم در اطراف هسته اسپرم می‌باشد. پوشش پری نوکلئار از سه لایه زیر آکروزومی، استوایی و صفحه خلف آکروزومی تشکیل شده و به‌عنوان لنگرگاهی از پروتئین‌های دخیل در فرآیندهای اسپرمیوژنز و لقاح معرفی شده است (۸،۱۷،۱۸).

PAWP از جمله پروتئین‌هایی است که خاص بیضه می‌باشد و در طی فرآیند طویل شدن اسپرماتیدها این پروتئین از طریق ساختار موقت مانشت به ناحیه غلاف آکروزومی انتقال می‌یابد و نقش آن تابه‌حال در فرآیند اسپرمیوژنز و لقاح گزارش‌شده است (۸،۱۱،۱۰). با توجه به اهمیت پروتئین PAWP در طی فرآیند اسپرمیوژنز و نقش احتمالی آن به‌عنوان یک فاکتور اسپرمی که با ورود به تخمک منجر به فعال شدن تخمک می‌گردد، در این مطالعه سعی بر آن شد که این پروتئین در نمونه اسپرمی مردان با پارامترهای اسپرمی طبیعی که به نظر می‌رسد سیر فرآیند اسپرماتوژنز در آن‌ها طبیعی است و مردان با پارامترهای اسپرمی غیرطبیعی که احتمالاً نقص در فرآیند اسپرماتوژنز دارند، مورد ارزیابی و مقایسه قرار گیرد. نتایج حاکی از آن است که درصد اسپرم‌های دارای پروتئین PAWP در افراد با پارامترهای اسپرمی غیرطبیعی نسبت به افرادی که پارامترهای اسپرمی آن‌ها طبیعی بوده است، به‌طور معنی‌داری کاهش‌یافته است. این نتیجه می‌تواند بیانگر آن باشد که مردانی که نقص در فرآیند اسپرماتوژنز دارند و آنالیز اسپرم آن‌ها غیرطبیعی است، درصد اسپرم‌ها با PAWP مثبت در آن‌ها کمتر می‌باشد. لذا احتمال موفقیت لقاح در این افراد پس از تکنیک کمک درمانی مخصوصاً پس از ICSI کاهش می‌یابد. این مطلب می‌تواند مطابق با نظریه Wu و همکاران و اعرابی و همکاران باشد که تأکید بر روی نقش PAWP در تشکیل پرونوکلئوس ها نر و ماده نموده اند (۸،۱۳). به‌علاوه در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین اسپرم‌های دارای PAWP با غلظت اسپرم، تحرک و مورفولوژی غیرطبیعی مشاهده شد. ضریب همبستگی بین این پارامترها تقریباً در محدوده نزدیک به شیب خط یک می‌باشد و با مشاهده این ارتباط می‌توان به این نتیجه دست یافت که هرچه تعداد اسپرم تولیدشده در طی فرآیند اسپرماتوژنز بیشتر باشد، درصد اسپرم‌های دارای PAWP بیشتر می‌باشد و آن اسپرم‌ها از لحاظ مورفولوژی و تحرک، طبیعی‌تر هستند.

در طی فرآیند اسپرمیوژنز تغییراتی از لحاظ ساختاری و مورفولوژی جهت تمایز اسپرم از اسپرماتید رخ می‌دهد که از آن جمله می‌توان به تشکیل ساختار آکروزوم، جابه‌جایی هیستون ها با پروتامین ها و همچنین حذف زائده‌های سیتوپلاسمی اشاره نمود (۱۹) ولی باید مدنظر داشت که یکسری از پروتئین‌ها در این زمان بیان می‌شوند که ارزش بسزایی جهت لقاح و تکوین اولیه جنین دارد (۲۲-۲۰) و بررسی هرکدام از آن‌ها می‌تواند علاوه بر آنالیز اسپرم، کمک شایانی به تشخیص و درمان افراد نابارور جهت پیشگویی میزان موفقیت لقاح کند. در این راستا، جانقربان لاریچه و همکاران بیان پروتئین PLCζ (از دیگر پروتئین‌های دخیل در فعال شدن تخمک) و آسیب DNA اسپرم را در افراد نابارور با واریکوسل مورد ارزیابی قراردادند. واریکوسل یک نوع

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 8:00 +0430 on Wednesday August 15th 2018

ناباروری شایع در بین مردان می‌باشد که دمای بیضه بالا است و فرآیند اسپرماتوژنز و کیفیت مایع منی تحت تأثیر است. نتایج آن‌ها اذعان کننده این مطلب بود که دمای بالای بیضه بر روی کیفیت پارامترهای اسپرمی، آسیب DNA و بیان برخی پروتئین‌ها از جمله PLCζ تأثیر گذاشته است. لذا درصورتی‌که مردان تمایل به جراحی (واریکوسلکتومی) نداشته باشند، استفاده از روش‌های مصنوعی فعال شدن تخمک به همراه ICSI (Intra- Cytoplasmic Sperm Injection) برای درمان این افراد پیشنهاد می‌شود (۲۳).

به‌علاوه در افراد نابارور با ۱۰۰٪ اسپرم سرگرد که سندروم گلوبوزواسپرمی هم نامیده می‌شوند، مشخص‌شده است که روند اسپرمیوژنز این افراد با نقص مواجه است و تمامی اسپرم‌ها فاقد آکروزوم می‌باشد؛ لذا بیان یکسری از پروتئین‌ها که در بیوژنز آکروزوم نقش دارند و همچنین بیان برخی از آن‌ها جهت تمایز اسپرم و لقاح ضروری است، با کاهش یا عدم بیان مواجه می‌باشد از آن جمله می‌توان به پروتئین‌های PAWP، PLCζ، DPY19L2 و SUN5 اشاره نمود (۱۱،۲۷-۲۴). لذا با مروری بر مطالعات می‌توان این‌گونه استنباط نمود که در افراد نابارور علاوه بر کاهش پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک، مورفولوژی) یکسری از عوامل یا فاکتورهای دخیل در تشکیل و تمایز اسپرم، تشکیل پرونوکلئوس ها و همچنین تکوین اولیه جنین نیز تحت تأثیر است. لذا شناسایی آن‌ها می‌تواند کمک شایانی در تصمیم‌گیری صحیح درمان داشته باشد.

در طی فرآیند اسپرمیوژنز، علاوه بر آنکه ساختار آکروزوم سر اسپرم تشکیل می‌شود، کروماتین اسپرم مورد بازسازی مجدد قرار می‌گیرد و پروتامین ها جایگزین هیستون ها می‌شوند. لذا کروماتین اسپرم متراکم شده و این فرآیند می‌تواند علاوه بر آنکه کمک به محافظت ژنوم از آسیب‌های فیزیکی و مکانیکی شود، اسپرم را هیدرودینامیک تر کند و تسهیل درحرکت اسپرم را سبب گردد (۳۰-۲۸). لذا با توجه به اینکه ژنوم اسپرم نیمی از ژنوم آینده جنین را تشکیل می‌دهد و جایگزینی صحیح هیستون ها با پروتامین ها و به دنبال آن سلامت DNA ارزش بسزایی در لقاح و باروری دارد (۳۲،۳۱)، در این مطالعه به‌طور هم‌زمان علاوه بر ارزیابی پروتئین PAWP، کمبود پروتامین و آسیب DNA اسپرم بین افراد با پارامترهای اسپرمی طبیعی و غیرطبیعی مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج بیانگر آن است که کمبود پروتامین و آسیب DNA اسپرم افراد پارامترهای اسپرمی غیرطبیعی به‌طور معنی‌داری بیشتر از افراد با پارامترهای اسپرمی طبیعی است. به‌علاوه ارتباط معنی‌داری بین پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک، مورفولوژی) با آسیب DNA اسپرم و کمبود پروتامین مشاهده شد (ارتباط بین غلظت اسپرم با آسیب DNA اسپرم معنی‌دار نبود). لذا با مشاهده کاهش پارامترهای اسپرمی می‌توان پیش‌بینی نمود که در افراد با کاهش کیفیت اسپرم، احتمال بالا بودن درصد آسیب DNA اسپرم، کمبود پروتامین و درصد کمتری از اسپرم‌های دارای PAWP وجود دارد؛ بنابراین در طی فرآیند ICSI می‌توان این احتمال را داد که با انتخاب اسپرم با مورفولوژی و تحرک طبیعی، احتمال سلامت کروماتین اسپرم و اینکه دارای پروتئین PAWP است، وجود دارد. به‌علاوه وجود ارتباط بین اسپرم‌های دارای کمبود پروتامین با آسیب DNA می‌تواند نشانگر آن باشد که اسپرم‌هایی که در طی فرآیند اسپرمیوژنز نقص در بسته‌بندی کروماتین دارند، بیشتر مستعد آسیب DNA هستند که صحت این مطلب قبلاً اثبات‌شده است (۲۸،۱۶).

نتیجه‌گیری:

نتایج این مطالعه بیانگر آن است که در افراد با پارامترهای اسپرمی غیرطبیعی، درصد اسپرم‌های فاقد پروتئین PAWP، آسیب DNA اسپرم و کمبود پروتامین

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 8:00 +0430 on Wednesday August 15th 2018

بیشتر از افراد با پارامترهای اسپرمی طبیعی است و از مشاهده اسپرم با مورفولوژی و تحرک طبیعی احتمالاً می‌توان به حضور پروتئین PAWP و سلامت کروماتین اسپرم مطمئن گردید.

تشکر و قدردانی:

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از پرسنل محترم پژوهشکده زیست فناوری و مسئولان گرامی پژوهشگاه رویان ابراز می‌دارند.

منابع:

1. Griswold MD. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. Physiol Rev. 2016; 96(1): 1-17.
2. Sabeti P, Pourmasumi S, Rahiminia T, Akyash F, Talebi AR. Etiologies of sperm oxidative stress. Int J Reprod Biomed. 2016; 14(4): 231-40.
2. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. World J Mens Health. 2014; 32(1): 1-17.
4. Oko R, Sutovsky P. Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. J Reprod Immunol. 2009; 83(1-2): 2-7.
5. Yeste M, Jones C, Amdani SN, Patel S, Coward K. Oocyte activation deficiency: a role for an oocyte contribution? Hum Reprod Update. 2016; 22(1): 23-47.
6. Aarabi M, Balakier H, Bashar S, Moskovtsev SI, Sutovsky P, Librach CL, et al. Sperm-derived WW domain-binding protein, PAWP, elicits calcium oscillations and oocyte activation in humans and mice. FASEB J. 2014; 28(10): 4434-40.
7. Aarabi M, Sutovsky P, Oko R. Re: Is PAWP the 'real' sperm factor? Asian J Androl. 2015; 17(3): 446-9.
8. Wu AT, Sutovsky P, Manandhar G, Xu W, Katayama M, Day BN, et al. PAWP, a sperm-specific WW domain-binding protein, promotes meiotic resumption and pronuclear development during fertilization. J Biol Chem. 2007; 282(16): 12164-75.
9. Satouh Y, Nozawa K, Ikawa M. Sperm postacrosomal WW domain-binding protein is not required for mouse egg activation. Biol Reprod. 2015; 93(4): 94.
10. Kennedy CE, Krieger KB, Sutovsky M, Xu W, Vargovic P, Didion BA, et al. Protein expression pattern of PAWP in bull spermatozoa is associated with sperm quality and fertility following artificial insemination. Mol Reprod Dev. 2014; 81(5): 436-49.
11. Tavalaee M, Nasr-Esfahani MH. Expression profile of PLCzeta, 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; 4(5): 850-6.
12. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.
13. Aarabi M, Balakier H, Bashar S, Moskovtsev SI, Sutovsky P, Librach CL, et al. Sperm content of postacrosomal WW binding protein is related to fertilization outcomes in patients undergoing assisted reproductive technology. Fertil Steril. 2014; 102(2): 440-7.
14. Tavalaee M, Kiani-Esfahani A, Nasr-Esfahani MH. Relationship between Potential Sperm Factors Involved in Oocyte Activation and Sperm DNA Fragmentation with Intra-Cytoplasmic Sperm Injection Clinical Outcomes. Cell J 2017; 18(4): 588-96.
15. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mozdarani H, Mardani M, Azvagi H. Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. Andrologia. 2004; 36(3): 95-100.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 8:00 +0430 on Wednesday August 15th 2018

16. 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. Syst Biol Reprod Med. 2015; 61(4): 179-86.
17. Oko RJ. Developmental expression and possible role of perinuclear theca proteins in mammalian spermatozoa. Reprod Fertil Dev. 1995; 7(4): 777-97.
18. Oko R, Maravei D. Protein composition of the perinuclear theca of bull spermatozoa. Biol Reprod. 1994; 50(5): 1000-14.
19. Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. Semin Cell Dev Biol. 2016; 59: 10-26.
20. Scieglinska D, Krawczyk Z. Expression, function, and regulation of the testis-enriched heat shock HSPA2 gene in rodents and humans. Cell Stress Chaperones. 2015; 20(2): 221-35.
21. Francis S, Yelumalai S, Jones C, Coward K. Aberrant protamine content in sperm and consequential implications for infertility treatment. Hum Fertil. 2014; 17(2): 80-9.
22. Chalmel F, Rolland AD. Linking transcriptomics and proteomics in spermatogenesis. Reproduction. 2015; 150(5): R149-57.
23. Janghorban-Laricheh E, Ghazavi-Khorasgani N, Tavalaee M, Zohrabi D, Abbasi H, Nasr-Esfahani MH. An association between sperm PLC? levels and varicocele? J Assist Reprod Genet. 2016; 33(12): 1649-55.
24. Kamali-Dolat Abadi M, Tavalaee M, Shahverdi A, Nasr-Esfahani MH. Evaluation of PLC? and PAWP Expression in Globozoospermic Individuals. Cell J. 2016; 18(3): 438-45.
25. Modarres P, Tanhaei S, Tavalaee M, Ghaedi K, Deemeh MR, Nasr-Esfahani MH. Assessment of DPY19L2 deletion in familial and non-familial individuals with globozoospermia and DPY19L2 genotyping. Int J Fertil Steril. 2016; 10(2): 196-207.
26. Yassine S, Escoffier J, Abi Nahed R, Pierre V, Karaouzene T, Ray PF, et al. Dynamics of Sun5 localization during spermatogenesis in wild type and Dpy19l2 knock-out mice indicates that Sun5 is not involved in acrosome attachment to the nuclear envelope. PloS one. 2015; 10(3): e0118698.
27. Kuentz P, Vanden Meerschaut F, Elinati E, Nasr-Esfahani MH, Gurgan T, Iqbal N, et al. Assisted oocyte activation overcomes fertilization failure in globozoospermic patients regardless of the DPY19L2 status. Hum Reprod. 2013; 28(4): 1054-61.
28. Tavalaee M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. Fertil Steril. 2009; 91(4): 1119-26.
29. Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, et al. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. Reprod Biomed Online. 2005; 11(2): 198-205.
30. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mozdarani H, Mardani M, Azvagi H. Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. Andrologia. 2004; 36(3): 95-100.
31. Cissen M, Wely MV, Scholten I, Mansell S, Bruin JP, Mol BW, et al. Measuring sperm DNA fragmentation and clinical outcomes of medically assisted reproduction: A systematic review and meta-analysis. PloS One. 2016; 11(11): e0165125.
32. Simon L, Liu L, Murphy K, Ge S, Hotaling J, Aston KI, et al. Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment. Hum Reprod. 2014; 29(5): 904-17.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2018; 20(2): 1-12.

Original article

Comparison of post-acrosomal sheath WWdomain-binding protein and chromatin status of sperm between normozospermic and ab-normozoospermic men

Tavalaee M[1*], Azadi L[1], Nasr-Esfahani MH[1,2]
[1]Reproductive Biomedicine Research Center, Reproductive Biotechnology Dept., Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, I.R. Iran; [2]Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, I.R. Iran.

Received: 3/Jan/2017 Accepted: 22/Apr/2017

Background and aims: Sperm post-acrosomal sheath WWdomain-binding protein (PAWP) was expressed during spermiogenesis and recently introduced as one of sperm factors involved in oocyte activation. So, the aim of this study was to compare sperm PAWP and chromatin status between men with normal (normozoospermia) and abnormal (ab-normozoospermia) sperm parameters.
Methods: Semen samples were assessed according to World Health Organization (2010) protocol and individuals were divided into normozospermia (N=31) and ab-normozoospermia (N=23). Sperm PAWP were assessed by flow cytometry. Sperm DNA damage (TUNEL assay) and protamine deficiency (chromomycin A_3 staining) were assessed by fluorescent microscope in these individuals. Data were analyzed using independent t-test and Pearson coefficient test and by SPSS software.
Results: In this study, significant differences were observed in sperm parameters (concentration, motility, morphology) between men with normozoospermia and ab-normozoospermia ($P<0.001$). Mean percentage of sperm PAWP was significantly lower in ab-normozoospermic men compared to normozoospermic men ($P<0.001$). In addition, mean percentage of spermatozoa with DNA damage and protamine deficiency were significantly higher in ab-normozoospermic men compared to normozoospermic men ($P<0.05$). Furthermore, significant associations were observed between percentage of sperm PAWP with sperm parameters ($P<0.05$).
Conclusion: The results of the current study show that in men with ab-normozoospermia, sperm functional tests such as DNA damage, protamine deficiency, and also percentage of sperm factor (PAWP) related to oocyte activation were in range of abnormality. Therefore, assessment of these tests can be efficient in the decision of treatment in infertile men.

Keywords: **PAWP, DNA damage, Protamine deficiency, Sperm parameters, Male infertility.**

Cite this article as: Tavalaee M, Azadi L, Nasr-Esfahani MH. Comparison of post-acrosomal sheath WWdomain-binding protein and chromatin status of sperm between normozospermic and ab-normozoospermic men. J Shahrekord Univ Med Sci. 2018; 20(2): 1-12.

[*]**Corresponding author:**
Reproductive Biomedicine Research Center, Reproductive Biotechnology Dept., Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, I.R. Iran. Tel: 00989133143431, E-mail: tavalaee.royan@gmail.com

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 8:00 +0430 on Wednesday August 15th 2018