مقاله پژوهشی

بررسی آسیب DNA اسپرم در مردان مبتلا به آستنوزواسپرمی

علی نصراصفهانی*[1]، کوثر پاشایی[2]، پریا بهداروندیان[3]، مرضیه تولائی*[4]، گلناز شیرازی[5]، محمدحسین نصراصفهانی[6]

تاریخ دریافت ۱۴۰۲/۰۵/۲۳ تاریخ پذیرش ۱۴۰۲/۱۱/۲۹

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: استنوزواسپرمی یک بیماری ناباروری است که در آن تحرک اسپرم فرد کاهش می‌یابد و بنابراین، شانس بارور شدن تخمک توسط اسپرم در دستگاه تناسلی زن کاهش می‌یابد. مطالعه حاضر باهدف بررسی آسیب DNA اسپرم با استفاده از تست‌های SCSA و TUNEL در جمعیت بزرگی از مردان نابارور آستنوزواسپرمی و مقایسه آن با جمعیت دیگری از افراد نرموزواسپرمی (دارای نمونه اسپرم کاملاً سالم) طراحی شده است.

مواد و روش کار: در این مطالعه مورد شاهدی، پارامترهای مایع منی بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (۲۰۱۰) در جمعیت بزرگی از مردان نابارور آستنوزواسپرمی (۱۳۸۳ مرد) و نرموزواسپرمی (۲۲۳۵ مرد) که به مرکز باروری و ناباروری اصفهان مراجعه کرده بودند، ارزیابی شد. علاوه بر این، آسیب DNA اسپرم توسط تست‌های TUNEL و SCSA مورد ارزیابی قرار گرفت. برای مقایسه متغیرهای مطالعه بین دو گروه از آزمون t نمونه‌های مستقل و برای همبستگی بین پارامترها از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. $P<0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: علی‌رغم عدم تفاوت معنی‌داری در حجم منی و شاخص توده بدنی، میانگین غلظت اسپرم، تعداد، تحرک کل اسپرم و تحرک پیش‌رونده در مردان آستنوزواسپرمی به‌طور معنی‌داری کمتر از مردان نرموزواسپرم بود (P< ۰/۰۰۱). علاوه بر این، میانگین رنگ‌پذیری بالای DNA و آسیب DNA اسپرم توسط تست‌های SCSA و TUNEL در مردان آستنوزواسپرمی به‌طور معنی‌داری بیشتر از مردان نرموزواسپرمی بود (P< ۰/۰۰۱).

بحث و نتیجه‌گیری: در مردان آستنوزواسپرمی، سلامت DNA اسپرم به‌شدت تحت تأثیر است، بنابراین در این افراد، قبل از استفاده از روش‌های کمک باروری، بهتر است از درمان آنتی‌اکسیدانی و یا روش‌های نوین جداسازی اسپرم برای درمان استفاده شود.

کلیدواژه‌ها: آستنوزواسپرمی، نورموزواسپرمی، آسیب DNA اسپرم، تحرک اسپرم، پارامترهای اسپرم

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و چهارم، شماره یازدهم، ص ۶۹۹-۶۹۱، بهمن ۱۴۰۲

آدرس مکاتبه: اصفهان، خوراسگان، خیابان سلمان، خیابان رویان، پژوهشکده زیست‌فناوری، تلفن: ۰۳۱۹۵۰۱۵۶۸۰

Email: m.tavalaee@royan-rc.ac.ir, nasresfahani.ali97@gmail.com

مقدمه

آستنوزواسپرمی یکی از علل شایع ناباروری در مردان است که با کاهش تحرک یا عدم تحرک اسپرم در انزال مردان مشخص می‌گردد. بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (WHO[7])(۱)، آستنوزواسپرمی به‌عنوان درصد تحرک کلی اسپرم کمتر از ۴۲درصد و درصد تحرک پیش‌رونده اسپرم کمتر از ۳۰درصد در نمونه مایع منی تعریف شد (۲). آستنوزواسپرمی کامل، بدین معناست که ۱۰۰ درصد اسپرم‌ها بی‌حرکت، است که دارای فراوانی

[1] دکترای حرفه‌ای، گروه زنان و زایمان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران (نویسنده مسئول)

[2] دکترای حرفه‌ای، گروه زنان و زایمان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران

[3] کارشناسی ارشد زیست سلولی ملکولی، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران

[4] دانشیار زیست شناسی علوم جانوری-تکوین، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران (نویسنده مسئول)

[5] کارشناسی زیست سلولی ملکولی، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران

[6] استاد جنین‌شناسی، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران

[7] World Health Organization

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-19]

[DOI: 10.61186/umj.34.11.4]

یک به ۵۰۰۰ در جمعیت مردان است و حاکی از پیش‌آگهی کاهش پتانسیل باروری است (۳). از مهم‌ترین علل شایع آستنوزواسپرمی می‌توان به عفونت‌های دستگاه تناسلی، واریکوسل، آنتی‌بادی ضد اسپرم، بیماری‌های متابولیک و ناهنجاری‌های آناتومیک دم اسپرم اشاره نمود (۴). پس از تولید و تمایز اسپرم در بیضه، بلوغ اسپرم در اپیدیدیم رخ می‌دهد که اسپرم‌ها تحرک را در طی عبور از سر اپیدیدیم به سمت انتهای اپیدیدیم کسب می‌کنند. این رخداد با یکسری تغییراتی در محتوای پروتئین، لیپید و قند بر روی غشاء اسپرم همراه است (۵) در این راستا، مطالعه‌ای اخیراً ۶۰۰۰ پروتئین را در اسپرم شناسایی کرده، که در طی عبور اسپرم از اپیدیدیم، این پروتئین‌ها دچار تغییراتی می‌شوند. تغییرات عمده با از دست دادن پروتئین‌های اسپرم مرتبط است و بیشترین مسیر سیگنالینگی که فعال است با واسطه RHOA[1] است که به بلوغ عملکردی اسپرم کمک می‌کند (۵). تحرک اسپرم برای بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی در دستگاه تناسلی زنان، ازجمله مهاجرت از واژن به سمت لوله‌های فالوپ، نفوذ به لایه‌های کومولوس اوفوروس و فرآیندهای درگیر در لقاح مهم است. بنابراین، ارتباط واضحی بین تحرک اسپرم و شانس لقاح طبیعی وجود دارد. از طرفی، با توجه به سدهای طبیعی که در طی عبور اسپرم برای نفوذ به داخل تخمک در سیستم تناسلی زنان وجود دارد، از عبور اسپرم‌های غیرطبیعی و یا با آسیب DNA جلوگیری می‌شود (۶). در این راستا، نشان داده‌شده که در بیماران مبتلا به آستنوزواسپرمی با علت ناشناخته، آسیب DNA اسپرم وجود دارد که با استرس اکسیداتیو مرتبط است. تولید بیش‌ازحد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS[2]) ممکن است علت تحرک کم اسپرم در بیماران مبتلا به آستنوزواسپرمی با علت ناشناخته باشد (۷). بعلاوه، تیراباسی و همکاران (۸) اثرات کوآنزیم Q10 و اسید آسپارتیک در برابر استرس اکسیداتیو، و محافظت اسپرم از آسیب DNA در افراد مبتلا به آستنوزواسپرمی با علت ناشناخته نشان دادند. بنابراین، درمان با آنتی‌اکسیدانت‌ها می‌تواند منجر به بهبود سلامت DNA اسپرم در افراد آستنوزواسپرمی گردد (۹). برای زوج‌هایی با ناباروری شدید با عامل مردانه، ازجمله آستنوزواسپرمی شدید، بیشتر روش میکرواینجکشن یا تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI[3]) پیشنهاد می‌شود. در صورت حضور اسپرم زنده و یا متحرک، می‌توان به موفقیت در لقاح و حاملگی امیدوار بود. ولی در موارد آستنوزواسپرمی کامل، میزان لقاح پس از ICSI با اسپرم‌های بی‌تحرک به‌ویژه هنگام استفاده از اسپرم‌های انزالی معمولاً بسیار پایین است (۳). در این راستا، مطالعه‌ای توسط Nagy و همکاران انجام شد (۱۰) که آن‌ها نشان دادند که تنها یک وضعیت آن هم اینکه ۱۰۰ درصد اسپرم‌های مرد، بی‌حرکت و مرده باشد، می‌تواند تأثیر منفی شدیدی بر نتایج کلینیکی ICSI ازجمله لقاح و حاملگی داشته باشد، بنابراین تنها معیار نهایی برای ICSI موفق، وجود حداقل یک اسپرم زنده برای تزریق به داخل هر تخمک است. با توجه به مطالعات اخیر که بیانگر پیامدهای ناخوشایند آسیب DNA اسپرم بر نتایج ICSI ازجمله رشد جنین، افزایش سقط و حتی انتقال بیماری به نسل آینده است که با افزایش سن مردان این موارد، بیشتر تشدید می‌گردد (۱۱-۱۳). لذا در این مطالعه سعی شده است که برای اولین بار آسیب DNA اسپرم با استفاده از دو تست SCSA و TUNEL در جمعیت بزرگی از افراد آستنوزواسپرمی (۱۳۸۳ مرد) و مردان نرموزواسپرمی که پارامترهای اسپرمی آن‌ها طبیعی است، (۲۲۳۵ مرد) موردبررسی و مقایسه قرار گیرد. مزیت اصلی این مطالعه، بررسی سلامت DNA اسپرم با دو تست معتبر است که با فلوسایتومتری ارزیابی شده است. از محدودیت‌های مطالعه می‌توان به عدم دسترسی کامل به پرونده‌های درمانی آن‌ها اشاره کرد که همه این افراد به یک مرکز درمانی خاص برای استفاده از فن‌های کمک باروری مراجعه نکرده‌اند و فقط برای ارزیابی پارامترهای اسپرمی و سلامت DNA به مرکز درمان باروری و ناباروری اصفهان مراجعه کرده‌اند. جمعیت کمی از این افراد دارای پرونده پزشکی در این مرکز می‌باشند.

مواد و روش کار

تمام مواد استفاده‌شده برای این مطالعه از شرکت مرک (Merck, Darmstadt, Germany) خریداری شد. مواردی که از این شرکت خریداری نشد، مشخصات آن در متن، ارائه شد.

در این مطالعه، داده‌های مربوط به پارامترهای اسپرمی و آسیب DNA اسپرم از ۱۰۰۰۰ نمونه منی مردان نابارور مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان در فاصله زمانی اسفندماه ۱۳۹۶ تا مردادماه ۱۴۰۱ جمع‌آوری شد. در این مرکز درمانی، در بدو ورود بیماران، فرم رضایت مبنی بر اینکه "آیا می‌توان از داده‌های شما بدون قید نام و آدرس، برای تحقیقات استفاده نمود"، در اختیار قرار داده می‌شود. لذا داده‌های افرادی برای این مطالعه در نظر گرفته شد که این فرم را تأیید کرده بودند.

معیارهای ورود و خروج مطالعه:

از بین این ۱۰۰۰۰ نمونه اسپرمی مردان آستنوزواسپرمی وارد این مطالعه شدند که بر اساس آخرین ورژن WHO (۱)، دارای تحرک اسپرم کمتر از ۴۲ درصد (درصد تحرک کمتر یا برابر ۴۱) و درصد حرکت پیش‌رونده کمتر از ۳۰ درصد (درصد تحرک

[1] Ras homolog family member A
[2] Reactive oxygen species
[3] Intra-cytoplasmic sperm injection

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-19]
[DOI: 10.61186/umj.34.11.4]

پیش‌رونده کمتر یا برابر ۲۹) باشند. ولی درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم و تعداد کل اسپرم آن‌ها بر اساس WHO (۱)، در حد طبیعی بود (مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم کمتر یا برابر ۹۶ و تعداد کل اسپرم بیشتر یا برابر ۳۹ میلیون در هر انزال). بنابراین ۱۳۸۳ نمونه اسپرمی دارای این ویژگی‌ها بود که به‌عنوان "گروه آستنوزواسپرمی" در نظر گرفته شد. در رابطه با گروه کنترل یا نرموزواسپرمی، ۲۲۳۵ نمونه اسپرمی دارای حد آستانه طبیعی بر اساس WHO (۱) بودند (تحرک اسپرم بیشتر یا برابر ۴۲ درصد، درصد تحرک پیش‌رونده بیشتر یا برابر ۳۰، مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم کمتر یا برابر، و تعداد کل اسپرم بیشتر یا برابر ۳۹ میلیون در هر انزال) (۲).

نمونه‌های منی که حجم آن‌ها کمتر از ۰/۵ سی‌سی بود، یا غلظت اسپرم کمتر از ۵ میلیون در هر سی‌سی بود، به دلیل اینکه هم‌زمان دو تست آسیب DNA باید انجام می‌شد، در طی آنالیز، این افراد از مطالعه حذف شدند. بنابراین، همه افراد این مطالعه دارای تمام نتایج پارامترهای اسپرمی و تست‌های آسیب DNA اسپرم هستند.

آنالیز نمونه اسپرمی:

نمونه‌های منی پس از ۲ تا ۷ روز پرهیز از مقاربت جنسی در ظروف استریل از طریق خودارضایی جمع‌آوری شد. پس از مایع‌شدگی مایع منی، پارامترهای اسپرمی بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (۱۴)، و آسیب DNA با استفاده از دو تست SCSA و TUNEL موردبررسی و تحلیل قرار گرفت (۱).

ارزیابی آسیب DNA اسپرم به روش TUNEL:

برای بررسی آسیب DNA اسپرم از پروتکل شرکت سازنده کیت تانل (Promega، Mannheim، آلمان) استفاده گردید. به‌طور خلاصه، نمونه‌های مایع منی دو بار با بافر فسفات سالین (PBS) شسته، و سپس با پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه تثبیت شدند. جهت نفوذپذیری، نمونه‌های اسپرمی به مدت ۵ دقیقه در ۰/۲ درصد تریتون Triton X-100 قرار داده شد (Merck, Darmstadt, Germany). روند رنگ‌آمیزی طبق پروتکل شرکت سازنده کیت تانل انجام شد. سپس از رنگ پروپیدیوم یدید با غلظت نهائی 1 µg/mL برای رنگ هسته به هدف شمارش سلول استفاده شد. بررسی آسیب DNA اسپرم از طریق دستگاه فلوسایتومتری (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) انجام شد. برای هر نمونه اسپرمی، حداقل ۱۰۰۰۰ اسپرم شمارش، و نتایج به‌صورت درصد آسیب DNA اسپرم گزارش شد (۱).

ارزیابی آسیب DNA اسپرم به روش SCSA:

برای بررسی آسیب DNA اسپرم از پروتکل ایونسون (۱۵) استفاده شد. به‌طور خلاصه، دو میلیون سلول اسپرم در حجم نهایی ۱ میلی‌لیتری بافر TNE که شامل (50 mM Tris HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) بود، قرار داده شد. سپس، محلول اسید دترژنت اضافه، و به دنبال آن محلول رنگ‌آمیزی آکریدین نارنجی (Sigma, St. Louis, USA) اضافه گردید. بررسی آسیب DNA اسپرم از طریق دستگاه فلوسایتومتری (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) انجام شد. برای هر نمونه حداقل ۱۰۰۰۰ اسپرم شمارش شد و نتیجه به‌عنوان درصد شاخص قطعه‌قطعه شدن DNA (DFI) و رنگ‌پذیری بالای DNA (%HDS) ارائه شد (۱۵).

در این مطالعه مورد-شاهدی، روش‌های ارزیابی پارامترهای اسپرمی بر اساس سازمان بهداشت جهانی ورژن ۲۰۱۰ بود (۱۴). برای آنالیز داده‌ها و گروه‌بندی افراد آستنوزواسپرمی و نرموزواسپرمی، از حد آستانه‌های تعریف‌شده بر اساس آخرین ورژن سازمان بهداشت جهانی (۱) استفاده گردید. تجزیه‌وتحلیل‌های آماری با استفاده از SPSS نسخه ۲۰ (IBM Corp., Armonk, NY, USA) انجام شد. از آمار توصیفی برای توصیف پارامترهای اصلی مطالعه در مورد حداقل، حداکثر و انحراف معیار میانگین استفاده شد. با توجه به توزیع نرمال متغیرها، از آزمون t نمونه مستقل برای مقایسه میانگین پارامترهای اسپرم و آسیب DNA اسپرم بین دو گروه آستنوزواسپرمی و نرموزواسپرمی، استفاده شد. بعلاوه، برای بررسی ارتباط بین متغیرهای مطالعه، از آزمون همبستگی پیرسون استفاده شد. سطح معنی‌داری آماری $P < ۰/۰۵$ تعیین شد.

یافته‌ها

در این مطالعه از نتایج آنالیز پارامترهای اسپرمی و تست‌های آسیب DNA ۱۳۸۳ مرد مبتلا به آستنوزواسپرمی و ۲۲۳۸ مرد نرموزواسپرمی استفاده شد. پارامترهای مطالعه بین مردان نرموزواسپرمی و آستنوزواسپرمی مورد مقایسه قرار گرفت. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، برخلاف میانگین BMI که بین دو گروه مشابه بود، میانگین سن مردان در افراد آستنوزواسپرمی به‌طور معنی‌داری بیشتر از افراد نرموزواسپرمی بود. در رابطه با حجم نمونه، غلظت اسپرم، و تعداد کل اسپرم، این پارامترها به‌طور معنی‌داری در گروه آستنوزواسپرمی کمتر از گروه نرموزواسپرمی بود. درصورتی‌که میانگین درصد اسپرم‌ها با مورفولوژی غیرطبیعی به‌طور معنی‌داری در افراد آستنوزواسپرمی بیشتر از افراد نرموزواسپرمی بود. در رابطه با پارامترهای تحرک، همان‌طور که انتظار می‌رفت به دلیل انتخاب گروه‌های مطالعه بر اساس حرکت اسپرم، میانگین درصد کل تحرک اسپرم، و درصد کل حرکت پیش‌رونده به‌طور معنی‌داری در گروه آستنوزواسپرمی کمتر از گروه نرموزواسپرمی بود (جدول ۱).

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-19]

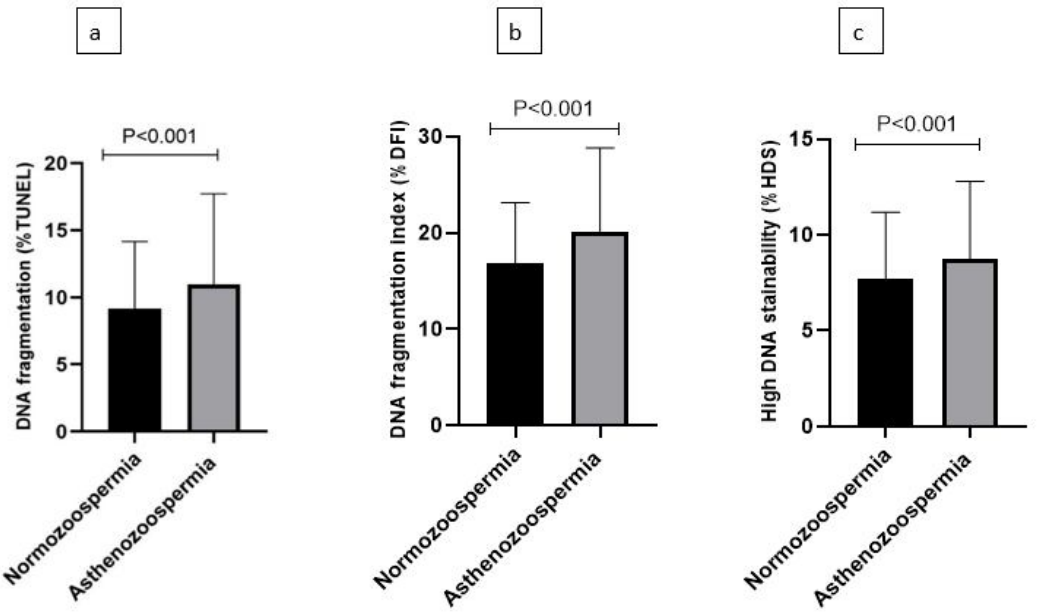
[DOI: 10.61186/umj.34.11.4]

جدول (۱): مقایسه پارامترهای اسپرمی، سن مردان و شاخص توده بدن بین افراد آستنوزواسپرمی و افراد نرموزواسپرمی.

پارامترهای مطالعه	انحراف معیار± میانگین		سطح معنی‌داری
	نرموزواسپرمی	آستنوزواسپرمی	
سن مرد (سال)	۵/۹۲±۳۷/۲۹	۶/۳۳±۳۷/۸۳	۰/۰۱۲
حجم مایع منی (میلی‌لیتر)	۱/۷±۴/۰۷	۱/۷±۳/۹۸	۰/۱۰۶
غلظت اسپرم (10^6 در هر میلی‌لیتر)	۴۲/۲۷±۷۹/۹۹	۳۴/۷±۵۱/۲۱	P<۰/۰۰۱
تعداد کل اسپرم (10^6/انزال)	۲۰۰/۴±۳۱۳/۲۳	۱۵۰/۸۵±۱۹۳/۹۳	P<۰/۰۰۱
درصد کل حرکت اسپرم	۱۲/۹۸±۶۶/۱۷	۱۰/۹۲±۲۴/۷۰	P<۰/۰۰۱
درصد کل حرکت پیش‌رونده	۸/۹۸±۴۲/۳۵	۷/۸۳±۱۳/۰۶	P<۰/۰۰۱
مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم (٪)	۴/۸۳±۹۲/۷۹	۵/۴±۹۱/۵۸	P<۰/۰۰۱
شاخص توده بدنی (BMI)	۴/۴۹±۲۶/۷۸	۴/۱±۲۶/۵۵	۰/۱۸۷

BMI: Body mass index

در این مطالعه، آسیب DNA اسپرم به دو روش SCSA و TUNEL در افراد نرموزواسپرمی و آستنوزواسپرمی موردبررسی قرار گرفت. نتایج در شکل ۱ نشان می‌دهد که میانگین آسیب DNA اسپرم بررسی‌شده با روش TUNEL به‌طور معنی‌داری (p< ۰/۰۰۱) در گروه آستنوزواسپرمی (۱۰/۹۸±۶/۷۵) بیشتر از گروه نرموزواسپرمی (۹/۱۵±۵/۰۰) است. همچنین، با استفاده از روش SCSA نتایج مشابهی مشاهده‌شده که میانگین آسیب DNA اسپرم به‌طور معنی‌داری (p< ۰/۰۰۱) در گروه آستنوزواسپرمی (۲۰/۸±۱۷/۷) بیشتر از گروه نرموزواسپرمی (۱۶/۶±۸۱/۳۵) است. در رابطه با نتایج رنگ‌پذیری بالای DNA (%HDS)، میانگین این پارامتر نیز به‌طور معنی‌داری (p< ۰/۰۰۱) در گروه آستنوزواسپرمی (۸/۴±۷۸/۰۲) بیشتر از گروه نرموزواسپرمی (۷/۶۸±۳/۵) است (تصویر ۱).



شکل (۱): مقایسه میانگین درصد آسیب DNA اسپرم ارزیابی شده با استفاده تست TUNEL (a)، درصد آسیب DNA اسپرم ارزیابی شده با استفاده تست SCSA (DFI) (b) و شدت رنگ‌پذیری DNA (%HDS) (c) بین افراد آستنوزواسپرمی و نرموزواسپرمی.

SCSA: Sperm chromatin structure assay; DFI: DNA fragmentation index; HDS: High DNA stainability; TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-19]

[DOI: 10.61186/umj.34.11.4]

با توجه به اینکه هدف اصلی این مطالعه بررسی آسیب DNA اسپرم در افراد آستنوزواسپرمی بود، آنالیز ارتباطی بین نتایج تست‌های SCSA و TUNEL با پارامترهای مطالعه در این گروه موردبررسی قرار گرفت. نتایج این آنالیز در جدول ۲ گزارش شده است. بعلاوه، ارتباط معکوس و معنی‌داری بین درصد تحرک اسپرم و تحرک پیش‌رونده اسپرم با آسیب DNA اسپرم در هر دو روش SCSA و TUNEL مشاهده گردید. برخلاف BMI، ارتباط مستقیم و معنی‌داری بین سن افراد آستنوزواسپرمی با آسیب DNA اسپرم در هر دو روش SCSA و TUNEL به دست آمد. دو نتیجه غیرمنتظره دیگری نیز از این آنالیز در افراد آستنوزواسپرمی مشاهده شد: یکی ارتباط مستقیم و معنی‌داری بین آسیب DNA اسپرم در هر دو روش SCSA و TUNEL با تعداد اسپرم، و دیگری ارتباط معکوس و معنی‌داری بین درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم با آسیب DNA اسپرم ارزیابی شده با روش SCSA بود (جدول ۲).

جدول (۲): ارتباط بین درصد آسیب **DNA** اسپرم با پارامترهای اسپرمی، سن مردان و شاخص توده بدن در افراد آستنوزواسپرمی

پارامترهای مطالعه		شاخص فرگمنتاسیون DNA (%DFI)	درصد فرگمنتاسیون DNA (%TUNEL)	رنگ‌پذیری بالاDNA (%HDS)
r (p-value)				
حجم مایع منی (ml)	r	۰/۰۰۹	۰/۰۲	-۰/۰۳
	p	۰/۷۴	۰/۳۹	۰/۱۵
غلظت اسپرم ($ml/10^6$)	r	۰/۲۱**	۰/۲۲**	-۰/۰۲
	p	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۰/۲۸
تعداد کل اسپرم (10^6/انزال)	r	۰/۱۸**	۰/۲۱**	- ۰/۰۷**
	p	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۰/۰۰۹
تعداد کل حرکت اسپرم (٪)	r	- ۰/۱۱**	- ۰/۰۹**	- ۰/۰۷**
	p	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۰/۰۰۸
تعداد کل حرکت پیش‌رونده (٪)	r	-۰/۱۳**	- ۰/۰۹**	-۰/۱۷**
	p	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱
مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم (٪)	r	- ۰/۰۷**	-۰/۰۲	-۰/۰۴
	p	۰/۰۰۴	۰/۴۵	۰/۰۸
سن مرد (سال)	r	۰/۲۴**	۰/۲۳**	-۰/۰۰۸
	p	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۰/۷۶
شاخص توده بدنی (BMI)	r	-۰/۰۳	-۰/۰۴	-۰/۰۱
	p	۰/۲۶	۰/۱۹	۰/۶۱

SCSA: Sperm chromatin structure assay; DFI: DNA fragmentation index; HDS: High DNA stainability; TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; BMI: Body mass index

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه کنونی، از بین ۱۰۰۰۰ مرد ناباور مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان در محدوده زمانی اسفندماه ۱۳۹۶ تا مردادماه ۱۴۰۱، در حدود ۱۳۸۳ کیس آستنوزواسپرمی که ازنظر تعداد و مورفولوژی اسپرم بر اساس حد آستانه تعریف‌شده توسط آخرین ورژن WHO-2021 (۱) طبیعی بودند، وارد مطالعه شدند. بعلاوه، ۲۲۳۵ کیس نرموزواسپرمی هم برای این مطالعه در نظر گرفته شد. جالب‌توجه است، باوجودی که افراد آستنوزواسپرمی در این مطالعه، ازنظر مورفولوژی و تعداد اسپرم در محدوده طبیعی بودند، ولی با توجه به نتایج جدول یک، تعداد اسپرم در گروه آستنوزواسپرمی به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از افراد نرموزواسپرمی بود. نتایج مشابهی در رابطه با حجم نمونه و غلظت اسپرم هم مشاهده شد. از این آنالیز می‌توان این‌گونه استنباط کرد که روند تولید و تمایز اسپرم در افراد آستنوزواسپرمی این مطالعه به‌احتمال‌زیاد به‌طور طبیعی انجام شده است و تعداد اسپرم در محدوده حد آستانه WHO بوده است، ولی با عبور اسپرم طی اپیدیدیم که قرار است تحرک اسپرم کسب شود، به‌احتمال‌زیاد عواملی ازجمله افزایش سطح استرس اکسیداتیو منجر به کاهش تحرک اسپرم شده است. یک دیدگاه دیگر به نتایج آن است که

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-19]

[DOI: 10.61186/umj.34.11.4]

کاهش درصد تحرک همه اسپرم‌ها در یک نمونه می‌تواند دلالت بر اختلال ژنتیکی باشد (۹). بر اساس مطالعات پیشین، بیش از ۴۰ درصد از مردان نابارور با کاهش یا عدم اسپرم متحرک در انزال مواجه هستند. آستنوزواسپرمی ممکن است به دلایل متعددی ازجمله عوامل ژنتیکی، سبک زندگی، عفونت‌ها و عدم فعالیت بدنی نسبت داده شود (۱۶). بنابراین بسته به‌شدت آستنوزواسپرمی که می‌تواند از صفر درصد تا کمتر از ۴۲ درصد باشد، می‌تواند پیشنهاد دارودرمانی مانند استفاده آنتی‌اکسیدانتی‌ها و یا استفاده از روش میکرواینجکشن برای درمان ناباروری را داد. گزارش اخیر از چین نشان داده که آستنوزواسپرمی در ۵۰/۵ درصد از ۳۸۹۰۵ مرد نابارور در فاصله زمانی سال ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۶ وجود داشته است (۱۷). در این راستا، در یک مقاله مروری سیستماتیک، مطالعاتی را اشاره کردند که استفاده از هرکدام آنتی‌اکسیدانت‌ها مانند Fertilovit، Mplus، CoQ10، Clomiphene citrate، vitamin E، Lycopene، L-Carnitine، و curcumin در افراد نابارور منجر به بهبود وضعیت تحرک اسپرم شده است (۹). بنابراین، در برخی افراد می‌توان از طریق دارودرمانی، نتایج تحرک اسپرم را بهبود بخشید.

در رابطه با نتایج مورفولوژی در مطالعه کنونی، میانگین درصد مورفولوژی طبیعی اسپرم در افراد آستنوزواسپرمی بطورمعنی‌داری کمتر از افراد نرموزواسپرمی بود. بعلاوه، ارتباط معکوس و معنی‌داری هم بین مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم با آسیب DNA اسپرم مشاهده شد. این نتیجه غیرمنتظره بود ولی با نگاهی به میانگین دو گروه می‌توان متوجه شد که اختلاف در حدود یک درصد است. بااین‌حال انتخاب افراد آستنوزواسپرمی بر پایه تعداد و مورفولوژی طبیعی بوده است و شاید این دلیلی بر این نتیجه عکس باشد.

نتایج مطالعه کنونی نشان می‌دهد که برخلاف شاخص توده بدن (BMI) که در هر دو گروه یکسان است ولی سن افراد آستنوزواسپرمی اگرچه به‌طور معنی‌داری بیشتر از افراد نرموزواسپرمی است ولی میانگین سن مردان در هر دو گروه ۳۷ سال است. نکته قابل‌توجه در رابطه با سن مردان این است که در این مطالعه یک رابطه مستقیم و معنی‌داری بین سن مردان آستنوزواسپرمی با آسیب DNA اسپرم در هر دو روش ارزیابی (TUNEL و SCSA) مشاهده شد. بنابراین با افزایش سن در مردان آستنوزواسپرمی، درصد آسیب DNA اسپرم بیشتر است که مطالعات دیگر هم این رابطه را گزارش کرده‌اند (۱۸). افزایش آسیب DNA اسپرم می‌تواند منجر به کاهش نتایج کلینیکی درمان ناباروری ازجمله لقاح، کیفیت جنین، حاملگی، تولد زنده و حتی سلامت نسل بعد شود. به‌گونه‌ای که امکان درصد بیماری‌هایی مانند اوتیسم، دوقطبی و غیره در نسل بعد بیشتر می‌شود که علت اصلی آن سن بالای پدر است (۱۳، ۱۹، ۲۰).

بعلاوه، در این مطالعه، نتایج نشان داد که میانگین آسیب DNA اسپرم با استفاده از هر دو روش (TUNEL و SCSA) به‌طور معنی‌داری در افراد آستنوزواسپرمی بیشتر از افراد نرموزواسپرمی است. بعلاوه، ارتباط معکوس و معنی‌داری بین آسیب DNA اسپرم با استفاده از هر دو روش (TUNEL و SCSA) با تحرک اسپرم و تحرک پیش‌رونده اسپرم وجود دارد. بنابراین در نمونه‌هایی که درصد تحرک اسپرم بسیار پایین است، به‌احتمال‌زیاد میزان آسیب DNA هم بالا است. در این راستا، نشان داده شده که دو بار انزال با فاصله نزدیک در موارد آستنوزواسپرمی یا الیگوآستنوزواسپرمی، می‌تواند منجر به افزایش کل اسپرم متحرک در انزال دوم شود. لذا ادغام دو انزال متوالی از مردان نابارور مبتلا به آستنوزواسپرمی یا الیگوآستنوزواسپرمی روشی ساده برای افزایش کیفیت اسپرم برای فن‌های کمک باروری است (۲۱). بعلاوه، در مطالعات پیشین گفته‌شده که افزایش سطح استرس اکسیداتیو می‌تواند منجر به آسیب غشاء اسپرم و آسیب DNA شود. لذا در این افراد با استفاده از درمان آنتی‌اکسیدانتی می‌توان سطح استرس اکسیداتیو و پیامد نهایی آن‌که قطعه‌قطعه شدن DNA اسپرم است را، تقلیل داد (۹). در این راستا، نتایج مطالعه Barash و همکاران (۲۲) بهبود قابل‌توجهی را در تحرک و تعداد اسپرم پس از روش جداسازی Swim up در انزال دوم نشان داد. آن‌ها همچنین بهبود قابل‌توجهی را در میزان لقاح و کلیواژ جنینی نشان دادند زمانی که تخمک‌ها در معرض اسپرم از انزال دوم قرار گرفتند. در مطالعه حاضر، برخلاف درصد HDS، ما ارتباط مستقیم و معنی‌داری بین آسیب DNA اسپرم با استفاده از هر دو روش (TUNEL و SCSA) با تعداد و غلظت اسپرم مشاهده کردیم. ما توجیه خاصی را برای این ارتباط نداریم، به‌هرحال این ارتباط فقط در بین افراد آستنوزواسپرمی گرفته‌شده که تحرک پایین، ولی تعداد، غلظت و مورفولوژی طبیعی دارند. بنابراین در این افراد روند تولید اسپرم به‌احتمال طبیعی بوده ولی این اسپرم‌ها عملکرد خوبی نداشته و از تحرک پایین و آسیب DNA بالا برخوردار هستند. نکته‌ای که برای آنالیز کل داده‌های این مقاله باید متذکر شد این است که اگرچه اختلاف در پارامترهای مطالعه، و ارتباط بین پارامترها از p-value بسیار خوبی برقرار است ولی با نگاهی به شیب‌خط (r) در آنالیزهای ارتباطی می‌توان متوجه شد که از شیب ضعیفی برخوردار است. p-value های کمتر از ۰/۰۰۱ در آنالیزهای ارتباطی که به دست آمده است می‌تواند به دلیل کیس بالا در این مطالعه باشد. اگرچه که یکی از نقاط قوت این مطالعه، جمع‌آوری جمعیت بزرگی از افراد آستنوزواسپرمی و نرموزواسپرمی، و همچنین بررسی آسیب DNA اسپرم به دو روش معتبر TUNEL و SCSA بوده است، ولی مطالعه‌ای که تأثیر یک نوع آنتی‌اکسیدانت یا مکمل را برای درمان این افراد در جمعیت

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-19]
[DOI: 10.61186/umj.34.11.4]

بزرگی از افراد آستنوزواسپرمی پوشش دهد، نیاز است. از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم دسترسی کامل به پرونده‌های درمانی همه افراد آستنوزواسپرمی و نرموزواسپرمی اشاره کرد. همه این افراد به یک مرکز درمانی خاص برای استفاده از فن‌های کمک باروری مراجعه نکرده‌اند و فقط برای ارزیابی پارامترهای اسپرمی و سلامت DNA به مرکز درمان باروری و ناباروری اصفهان مراجعه کرده‌اند. جمعیت کمی از این افراد دارای پرونده پزشکی در این مرکز می‌باشند. لذا اگر با این تعداد بالا می تونستیم نتایج درمانی پس از میکرواینجکشن را موردبررسی و مقایسه قرار می‌دادیم، به ارزش این مطالعه بیشتر اضافه می‌شد.

نتیجه‌گیری

در مردان آستنوزواسپرمی، سلامت DNA اسپرم به‌شدت تحت تأثیر است، بنابراین در این افراد، قبل از استفاده از روش‌های کمک باروری، بهتر است از درمان آنتی‌اکسیدانی و یا روش‌های نوین جداسازی اسپرم برای درمان استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مسئولین و کارکنان پژوهشکده زیست‌فناوری جانوری رویان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان سپاسگزار هستند

ملاحظات اخلاقی

این پروژه تحقیقاتی در کمیته اخلاق پژوهشگاه رویان با کد اخلاقIR.ACECR.ROYAN.REC.1401.031 به تصویب رسیده است.

تعارض منافع

بدین‌وسیله پدیدآوران اعلام می‌کنند که این اثر حاصل یک پژوهش مستقل بوده و هیچ‌گونه تضاد منافعی با سازمان‌ها و اشخاص دیگر ندارد.

حمایت مالی تحقیق:

منابع مالی این مطالعه از سازمان خاصی حمایت نشده است. تمام ارزیابی پارامترهای اسپرمی و تست‌های DNA اسپرم از پرونده افراد مطالعه با کسب اجازه استخراج شده است.

References:

1. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 6th ed. WHO Press; Geneva, Switzerland: 2021. ((accessed on 3 December 2021)). Available online: https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787
2. Boitrelle F, Shah R, Saleh R, Henkel R, Kandil H, Chung E, Vogiatzi P, Zini A, Arafa M, Agarwal A. The Sixth Edition of the WHO Manual for Human Semen Analysis: A Critical Review and SWOT Analysis. Life (Basel) 2021;11(12):1368. https://doi.org/10.3390/life11121368
3. Ortega C, Verheyen G, Raick D, Camus M, Devroey P, Tournaye H. Absolute asthenozoospermia and ICSI: what are the options? Hum Reprod Update 2011;17(5):684-92. https://doi.org/10.1093/humupd/dmr018
4. Bonanno O, Romeo G, Asero P, Pezzino FM, Castiglione R, Burrello N, et al. Vicari E, D'Agata R. Sperm of patients with severe asthenozoospermia show biochemical, molecular and genomic alterations. Reprod 2016;152(6):695-704. https://doi.org/10.1530/REP-16-0342
5. Skerrett-Byrne DA, Anderson AL, Bromfield EG, Bernstein IR, Mulhall JE, Schjenken JE, et al. Global profiling of the proteomic changes associated with the post-testicular maturation of mouse spermatozoa. Cell Reports 2022;41(7):111655. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111655
6. Pérez-Cerezales S, Ramos-Ibeas P, Acuña OS, Avilés M, Coy P, Rizos D, et al. The oviduct: from sperm selection to the epigenetic landscape of the embryo. Biol Reprod 2018;98(3):262-76. https://doi.org/10.1093/biolre/iox173
7. Wang X, Liu N. Sperm DNA oxidative damage in patients with idiopathic asthenozoospermia. Zhong Nan Da Xue Xue Bao 2012;37(1):100-5.
8. Tirabassi G, Vignini A, Tiano L, Buldreghini E, Bruge F, Silvestri S, et al. Protective effects of coenzyme Q 10 and aspartic acid on oxidative stress and DNA damage in subjects affected by idiopathic asthenozoospermia. Endocrine 2015;49:549-52. https://doi.org/10.1007/s12020-014-0432-6

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-19]

[DOI: 10.61186/umj.34.11.4]

9. Shahrokhi SZ, Salehi P, Alyasin A, Taghiyar S, Deemeh MR. Asthenozoospermia: Cellular and molecular contributing factors and treatment strategies. Andrologia 2020;52(2): e13463. https://doi.org/10.1111/and.13463
10. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, et al. Andrology: The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. Hum Reprod 1995;10(5):1123-9. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136104
11. Borges Jr E, Zanetti BF, Setti AS, Braga DP, Provenza RR, Iaconelli Jr A. Sperm DNA fragmentation is correlated with poor embryo development, lower implantation rate, and higher miscarriage rate in reproductive cycles of non-male factor infertility. Fertil Steril 2019;112(3):483-90. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.04.029
12. Aitken RJ, De Iuliis GN, Nixon B. The sins of our forefathers: paternal impacts on de novo mutation rate and development. Annu Rev Genet 2020;54:1-24. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112618-043617
13. Aitken RJ. Role of sperm DNA damage in creating de novo mutations in human offspring: the 'post-meiotic oocyte collusion'hypothesis. Reprod Biomed Online 2022;45(1):109-24. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2022.03.012
14. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. World Health Organization. 2010; P.271 ttps://apps.who.int/iris/handle/10665/44261.
15. Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA®). Spermatogenesis: methods and protocols. 2013:147-64. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0_14
16. Wang XB, Wu QJ, Liu FH, Zhang S, Wang HY, Guo RH, et al. The association between dairy product consumption and asthenozoospermia risk: a hospital-based case-control study. Front Nutr 2021;8:714291. https://doi.org/10.3389/fnut.2021.714291 https://doi.org/10.3389/fnut.2021.742375
17. Wu ZG, Chen WK, Fei QJ, Liu YL, Liu XD, Huang H, et al. Analysis of semen quality of 38 905 infertile male patients during 2008-2016 in Wenzhou, China. Asian J Androl 2021;23(3):314-8. https://doi.org/10.4103/aja.aja_83_20
18. Dong S, Chen C, Zhang J, Gao Y, Zeng X, Zhang X. Testicular aging, male fertility and beyond. Front Endocrinol (Lausanne) 2022;13:1012119. https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1012119
19. Booze M, Brannian J, Von Wald T, Hansen K, Kasperson K, Evenson D. High DNA stainability in the SCSA® is associated with poor embryo development and lower implantation rate. Reprode BioMed Online 2019;39:e3-4. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.07.011
20. Sharma R, Agarwal A, Rohra VK, Assidi M, Abu-Elmagd M, Turki RF. Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. Reprod Biol Endocrinol 2015;13:35. https://doi.org/10.1186/s12958-015-0028-x
21. Hussein TM, Elariny AF, Elabd MM, Elgarem YF, Elsawy MM. Effect of repeated sequential ejaculation on sperm DNA integrity in subfertile males with asthenozoospermia. Andrologia 2008;40(5):312-7. https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2008.00861.x
22. Barash A, Lurie S, Weissman A, Insler V. Comparison of sperm parameters, in vitro fertilization results, and subsequent pregnancy rates using sequential ejaculates, collected two hours apart, from oligoasthenozoospermic men. Fertil Steril 1995;64(5):1008-11. https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)57920-5

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-19]

[DOI: 10.61186/umj.34.11.4]

Original Article

ASSESSMENT OF SPERM DNA DAMAGE IN MEN WITH ASTHENOZOOSPERMIA

Ali Nasresfahan[1], Kosar Pashaei[2], Paria Behdarvandiyan[3], Marziyeh Tavalaee[4*], Golnaz Shirazi[5], Mohammad Hossein Nasr-Esfahani[6]*

Received: 14 August, 2023; Accepted: 18 February, 2024

Abstract

Background & Aims: Asthenozoospermia is an infertility condition in which a person has reduced sperm motility and so, the chance of the sperm fertilizing the egg in the female reproductive tract is reduced. This study aimed to investigate sperm DNA damage using SCSA and TUNEL tests in a large population of infertile men with asthenozoospermia, comparing them with a population of normozoospermic individuals with healthy sperm samples.

Materials & Methods: In this observational case-control study, semen parameters were assessed according to the World Health Organization guidelines (2010) guideline in a large population of asthenozoospermic (1383) and normozoospermic (2235) men referring to Isfahan Fertility and Sterility Center. In addition, sperm DNA fragmentation were assessed by TUNEL, and SCSA tests. For comparison of study variations between two groups, independent samples t-test was used, and for correlation between parameters, Pearson's correlation coefficient was carried out. $P<0.05$ was considered significant.

Results: Despite no significant differences in sperm volume and body mass index, the means of sperm concentration, count, total sperm motility and total progressive were significantly lower in the asthenozoospermic men compared to normozoospermic men ($P<0.001$). In addition, the means of high DNA stainability as well as sperm DNA fragmentation assessed by SCSA and TUNEL tests were significantly higher in asthenozoospermic men compared to normozoospermic men ($P<0.001$).

Conclusion: In asthenozoospermic men, sperm DNA is severely damaged, so before using assisted reproductive techniques in these individuals, it is better to use antioxidant treatment and/or novel sperm preparation methods for treatment of them.

Keywords: Asthenozoospermia, Normozoospermia, Sperm DNA Fragmentation, Sperm Motility, Sperm Parameters

Address: Salman St., Royan St., Biotechnology Research Institute, Khorasgan, Isfahan, Iran
Tel: +983195015680
Email: m.tavalaee@royan-rc.ac.ir, nasresfahani.ali97@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2024: 34(11): 699 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

[1] MD, Department of Obstetrics and Gynecology, Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences Branch, Tehran, Iran. Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran (Corresponding Author)
[2] MD, Department of Obstetrics and Gynecology, Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences Branch, Tehran, Iran. Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran
[3] MSC of Department of Animal Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
[4] Associate Professor of Department of Animal Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran (Corresponding Author)
[5] Bsc of Department of Animal Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
[6] Professor of Department of Animal Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-19]

[DOI: 10.61186/umj.34.11.4]