نقش آسیب DNA اسپرم در روش‌های کمک باروری

• ژامک پهلوان زاده
کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، گروه آموزشی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، تهران
zhamakpahlevanzadeh@gmail.com

• دکتر طاهره ناجی
دانشیار و مدیرگروه علوم پایه داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، تهران
tnaji2002@gmail.com

Downloaded from labdiagnosis.ir at 10:05 +0430 on Friday June 22nd 2018

چکیده

امروزه استفاده از روش‌های کمک باروری، بهترین گزینه برای رفع مشکلات زوج‌های نابارور است. میزان موفقیت این روش‌ها به عوامل متعددی از جمله سلامت کامل تخمک و اسپرم بستگی دارد. در طی لقاح طبیعی و روش لقاح آزمایشگاهی (IVF)، احتمال نفوذ اسپرماتوزوای غیر بالغ و ناسالم به داخل تخمک به حداقل می‌رسد در صورتی که در روش میکرواینجکشن یا تزریق اسپرم به داخل سیتوپلاسم تخمک (ICSI)، این سد وجود نداشته و بنابراین در روش میکرواینجکشن همیشه موارد نگرانی بوده است. امروزه با وجود فن آوری های کمک باروری و ابزارهای تشخیص و روش‌های متعدد برای اندازه گیری آسیب DNA اسپرم، استفاده از بررسی فاکتور آسیب DNA اسپرم در مردان نابارور افزایش یافته است. شواهد نشان از نقش آسیب DNA اسپرم در IVF و ICSI دارد، اما، اطلاعات از پیامدهای بالینی آسیب DNA اسپرم کامل نمی‌باشد. روش‌های مختلف اندازه گیری آسیب DNA از جمله COMET، بررسی پراکندگی کروماتین اسپرم (SCD, HALLO) و بررسی ساختار کروماتین اسپرم (SCSA,TANEL) که هر کدام جنبه‌های متفاوتی از آسیب DNA را نشان می‌دهند. مطالعات بیشتر برای استاندارد کردن روش‌های برآورد آسیب DNA اسپرم و روشن شدن نقش دقیق آن در IVF و ICSI به نتایج باروری کمک می‌کنند. از آنجا که استفاده از تکنیک‌های جدید کمک باروری می‌تواند علی رغم نقایص عملکردی اسپرم منتج به حاملگی و تولد نوزاد شود، در نتیجه آنالیز منی به عنوان یک آزمایش برای تشخیص باروری و ناباروری کافی نبوده و نیاز به یک نشانگر بالقوه قوی تر وجود دارد.

واژگان کلیدی: IVF، ICSI، میکرواینجکشن، ژنوم، آسیب DNA

آسیب DNA اسپرم

تست‌های عملکردی اسپرم به عنوان یک نوع آزمون غربالگری انجام می‌شود و اولین گام در تشخیص آزمایشگاه آندرولوژی است که با تلاش‌های WHO در سراسر دنیا استاندارد شده است. (حجم ۱,۵ ml، تعداد ۱۵ میلیون در ml، تعداد کل ۳۹ میلیون اسپرم در انزال، حرکت کل ٪۴۰، نرمال مورفولوژی ٪٤، زنده بودن ٪۵۸ معیارهای آنالیز در WHO است.) (۱) در طی تحقیقات انجام شده انتخاب اسپرم توسط پارامترهای معمولی (غلظت، مورفولوژی، تحرک) نمی‌تواند گویای سلامت DNA اسپرم باشد. مطالعات بیانگر این مطلب است که در تخمک‌های لقاح یافته با اسپرم‌های دارای آسیب DNA بالا میزان لانه گزینی و بارداری به طور معنی داری کاهش می‌یابد اگرچه ژنوم آسیب دیده پدری، طی رشد جنینی

می‌تواند دستخوش پردازش قرار گیرد، ولی در صورت وجود آسیب‌های زیاد، احتمال کاهش رشد جنین وجود داشته و اگر میزان نقص‌ها کمتر باشد، می‌تواند نقایص بعد از تولد را به همراه داشته باشد. تجربیات به دست آمده از روش‌های کمک باروری نشان می‌دهد، چنانچه اسپرم با میزان بالایی از آسیب روند ICSI و IVF وارد تخمک شود، سیستم ترمیمی تخمک ممکن است توانایی ترمیم این آسیب‌ها را نداشته و در بسیاری از موارد با وجود موفقیت در لقاح، سلول‌های جنسی توانایی تشکیل جنین یا ادامه تکامل را تا مرحله بعد از ٤ تا ٨ سلولی که مصادف با فعال شدن ژنوم پدری است، ندارند. به علاوه تحقیقات متعدد در زمینه آسیب DNA بیانگر این هستند که ارتباط معنی داری بین آسیب DNA اسپرم و تشکیل جنین بلاستوسیت، رشد جنین و بارداری ارتباط معکوس و معنی داری وجود دارد. ناکافی بودن آنالیز منی منجر به تحقیقات بر روی آسیب DNA اسپرم به عنوان یک نشانگر ناباروری مردان شد. تشخیص مکانیزم‌ها و علل SDF آسان نیست و عوامل مختلفی باعث ایجاد SDF می‌شوند. به طور عمده، استرس اکسیداتیو، فعال شدن اندونوکلئاز اندوژنیک و فعال شدن کاسپاز، تغییرات در بازسازی مجدد کروماتین در طی اسپرمیوژنز و آپوپتوز سلول‌های زاینده ای در آغاز میوز به عنوان عوامل ذاتی شناخته شده‌اند. عوامل خارجی باعث آسیب DNA نیز مانند رادیوتراپی، شیمی درمانی و سموم زیست محیطی توصیف شده‌اند. تمام این مکانیزم ها می‌توانند بر روی یکپارچگی DNA در انواع مختلف تأثیر بگذارند و در نهایت، شکست ssDNA یا dsDNA تولید می‌کنند.(٨) فشردگی DNA در ناحیه سر اسپرم نتیجه یک فرآیند پیچیده است. بر خلاف سلول‌های سماتیک که در آن DNA با هیستون به صورت واحدهای ساختمانی به نام نوکلئوزوم هستند، در اسپرم در طول اسپرمیوژنز رشته DNA توسط پروتئین‌های کوچکی به نام پروتامین فشرده، بسیار پایدار و مقاوم در برابر آسیب می‌شود. نقص در مرحله پروتامینه شدن DNA، شکست‌های دورشته‌ای، نقص در ترمیم DNA و آپوپتوز ناقص سبب می‌شود که DNA بیشتر در معرض آسیب قرار گیرد. شروع مراحل آپوپتوز باعث آزاد شدن گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و القای آسیب DNA می‌شود. در نتیجه اسپرم‌ها سطح بالایی از آسیب DNA را خواهند داشت. (١٠ و ٣)

پراکندگی کروماتین اسپرم (SCD,Halo)

در این آزمایش در یک بستر میکروژلی تحت تأثیر یک تیمار اسیدی، کروماتین و DNA اسپرم دناتوره می‌شود، در مرحله بعد با حذف پروتئین‌های کروماتین، رشته‌های DNA تا حد ممکن در اطراف سر اسپرم پخش می‌گردد که طی رنگ آمیزی به صورت هاله ای در اطراف سر اسپرم قابل مشاهده است. این در حالی است که شکست DNA اسپرم منجر به عدم گسترش رشته‌های DNA و نیز عدم مشاهده هاله یا مشاهده هاله‌های خیلی کوچک در اطراف سر اسپرم می‌گردد آستانه بالینی شاخص SDF ٪٣٠ است، به این معنی که نمونه‌ها می‌توانند تا ٪٣٠، DNA آسیب دیده را داشته باشند و هنوز هم طبیعی می‌باشند. SCD نمی‌تواند تفاوتی بین آسیب DNA تک رشته‌ای و دو رشته ای قائل شود، اما چون وابسته به رنگ فلورسنت نیست می‌توان از آن به عنوان یک روش ساده، سریع و قابل اعتماد استفاده کرد. همچنین نیاز به یک اپراتور با تجربه برای آنالیز نتایج آزمایش ندارد. (٤ و ٨)

بررسی ساختار کروماتین اسپرم (SCSA)

SCSA اندازه گیری حساسیت DNA اسپرم به دناتوره شدن هنگامی که در معرض گرما و یا اسیدها است. این یک آزمایش مبتنی بر فلوسایتومتری است که می‌تواند تعداد زیادی از سلول‌ها را به سرعت ارزیابی کند و بر اساس این اصل که DNA غیر طبیعی در مقابل DNA سالم مستعد تکه تکه شدن است، انجام می‌شود. در SCSA برای نشان دادن اسپرم با DNA سالم از رنگ فلورسنت اکریدین اورنج استفاده می‌شود. اکریدین اورنج وقتی که شکست دو رشته ای باشد رنگ فلورسانس سبز و اگر شکست تک رشته ای باشد به رنگ قرمز تغییر می‌کند. از دستگاه فلوسایتومتری برای شناسایی نسبت اسپرم‌های با رنگ سبز از قرمز و درصد اسپرم‌هایی که شکست DNA دارند استفاده می‌شود (٥). مزیت SCSA این است که

Downloaded from labdiagnosis.ir at 10:05 +0430 on Friday June 22nd 2018

دارای یک پروتکل استاندارد برای همه کاربران به منظور به حداقل رساندن تنوع آزمایشگاهی است. معایب آن این است که نیاز به یک دستگاه فلوسایتومتری دارد و نمونه‌ها باید به یک آزمایشگاه مرکزی فرستاده شوند که طول زمان جواب دهی را افزایش می‌دهد.

آزمون COMET

از روش سنجش ستاره دنباله دار، برای بررسی شکست‌های موجود در رشته‌های DNA استفاده می‌شود. این روش امکان ارزیابی سریع جمعیت بزرگ و تعداد زیاد اسپرم را میسر می‌سازد. در این روش، اسپرم‌ها در لایه‌ای از ژل آگاروز قرار داده می‌شود و تحت شرایط قلیایی، الکتروفورز می‌گردد که در نتیجه DNA آسیب دیده از هسته خارج شده و به سمت آن مهاجرت می‌کند (۱۲). در نهایت محتویات DNA توسط رنگ فلورسانت sybr green رنگ آمیزی شده و در زیر میکروسکوپ فلورسانس به شکل یک ستاره دنباله دار دارای یک دم و یک سر مشاهده می‌شود. این روش قادر به تشخیص شکست DNA تک رشته ای و دو رشته ای است و می‌تواند به خوبی کروماتین وابسته به هیستون را تشخیص دهد و قادر به اندازه گیری مقدار آسیب DNA در اسپرم است. گزارش نتایج آزمون COMET نشان دهنده میانگین آسیب DNA اسپرم است. در مقایسه با سایر آزمون‌ها روشی ساده و ارزان است اما برای تفسیر نیاز به میکروسکوپ فلورسنت و اپراتور با تجربه دارد. (٦)

آزمون (TUNEL)

در این آزمون پایانه‌های DNA تکه تکه شده، تک رشته و دو رشته DNA توسط نوکلئوتیدهایی نشاندار شده، مورد هدف قرار می‌گیرد. واکنش توسط یک پایانه ترانسفرازی کاتالیز می‌شود. نوکلئوتید به طور مستقیم می‌تواند با فلئوکروم نشاندار شود و متکی بر آنزیم TDT و dUTP به عنوان نشانگر در انتهای 3′-OH است که شکست در ssDNA و dsDNA را تشخیص می‌دهد. از فلوسایتومتری و میکروسکوپ فلورسنت برای ارزیابی استفاده می‌شود. رنگ فلورسنت مشاهده شده در هر اسپرم، نشانگر افزایش تعداد شکستگی‌های DNA است و نتایج آزمون نشان دهنده درصد آسیب DNA است. این روش نمی‌تواند تفاوت بین انواع آسیب DNA را تشخیص دهد و روشی گران بوده و نیاز به اپراتور با تجربه برای تفسیر نتایج دارد. (۷)

نقش آسیب DNA در IVF, ICSI

مطالعات متعدد تلاش کرده‌اند تا ارتباط بین آسیب DNA و روش‌های کمک باروری (ART) را بررسی کنند. متاسفانه تفاوت بین روش‌های سنجش آسیب DNA و پروتکل‌ها و حد آستانه و تفاوت در جمعیت مورد مطالعه موجب شده که نتیجه گیری مطمئنی حاصل نشود، اگر چه میزان آسیب DNA به عنوان یک فاکتور مردانه تأثیر نامطلوبی بر نتایج باروری دارد. مطالعات نشان داده‌اند که میزان آسیب DNA می‌تواند موفقیت IVF یا ICSI را پیش بینی کند. (۸ و ۹)

مزایای انجام آزمون SDF

با توجه به اینکه صدها پژوهش بر روی اثرات تکه تکه شدن DNA اسپرم و تأثیر آن روی موفقیت حاملگی انجام شده است، نتیجه کلی این است که آسیب DNA اسپرم بر کیفیت جنین و نتیجه حاملگی تأثیر منفی دارد و باید تصمیم افراد برای این که هزینه انجام آزمایش SDF را بپردازند تحت تأثیر قرار دهد. بدیهی است که در زمان تصمیم گیری برای انجام آزمایش SDF ارزش آن آزمایش را در نظر می‌گیرند. زیرا هزینه آزمون SDF در برابر هزینه‌های IVF,ICSI بسیار ناچیز است. (۷)

نتیجه

در سال‌های اخیر با وجود محدودیت‌هایی که برای پیش‌بینی پیامدهای تولید مثل در IVF و ICSI وجود دارد ارزیابی آسیب DNA می‌تواند به عنوان اندرولوژی پایه و کلینیکی و یک ابزار مفید برای کمک به پیش بینی نتایج IVF, ICSI باشد.

بررسی‌های متعدد ارتباط بین آسیب DNA اسپرم و نتایج تولید مثل در IVF, ICSI را نشان داده‌اند. در حالی

Downloaded from labdiagnosis.ir at 10:05 +0430 on Friday June 22nd 2018

کــه درک ما از اندازه گیری و اثرات آســیب DNA هنوز کامل نیســت، اما این آزمون می‌توانــد اطلاعاتی در مورد نقش حیاتی اسپرم در پیشرفت و نگهداری حاملگی فراهم کند. با این حال هنوز شــواهد قطعی برای استفاده معمول و گسترده از آزمون آسیب DNA در آزمایش‌های معمول باروری وجود ندارد. (۸)

Downloaded from labdiagnosis.ir at 10:05 +0430 on Friday June 22nd 2018

References

1- World health organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update.2010

2- Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. Int J Androl. 2009;32(1):46–56. doi:10.1111/j.1365-2605.2008.00943.x.

3- Aitken RJ, De Iuliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. Mol Hum Reprod. 2010;16(1): 3–13. doi:10.1093/molehr/gap059.

4- Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. Fertil Steril. 2005;84(4):833–42.

5- Evenson DP. Sperm chromatin structure assay. Methods Mol Biol. 2013;927:147–64 doi:10.1007/978-1-62703-038-0_14.

6- Olive PL, Banath JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. Nat Protoc. 2006;1(1):23–9.

7- Sharma R, Masaki J, Agarwal A. Sperm DNA fragmentation analysis using the TUNEL assay. Methods Mol Biol. 2013;927:121–36.

8- Donald P. Evensona, The Sperm Chromatin Structure Assay and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility,2016

9- Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta- analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. Asian J Androl.2016. doi: 10.4103/1008-682X.182822.

10- Efficient isolation of sperm with high DNA integrity and stable chromatin packaging by a combination of density-gradient centrifugation and magnetic-activated cell sorting doi.org/10.5653/cerm.2016.43.4.199

11- " Duty, S.M., Singh, N.P., Ryan, L., Chen, Z., Lewis, C., Hunag, T. and Hauser, R. Hum. "Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm Reprod., 17, 1274-1280, (2002).