Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

Comparison of apoptotic markers and protamine deficiency in sperm of infertile individuals with varicocele and fertile men

Shaghayegh Foroozan-Boroojeni[1], Marziyeh Tavalaee[1*], Mohammad Hossein Nasr-Esfahani[1,2]

[1]Department of Reproductive Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
[2]Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran
*Corresponding author; E-mail: Tavalaee.m@royaninstitute.org

Received: 26 September 2017 Accepted: 13 January 2018 First Published online: 7 September 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 October- November; 41(4):64-72

Abstract

Background: Heat and oxidative stress are the main pathophysiological elements of varicocele. One of the most important molecular pathways which is triggered by them is apoptosis and can be identified by various markers such as phosphatidylserine externalization and DNA fragmentation. Protamine deficiency is another phenomenon associated with varicocele. Therefore, the aim of this study was to evaluate apoptotic markers in infertile men with varicocele and correlation of these markers with sperm parameters and chromatin maturation.

Methods: In the current study, semen samples of 15 infertile men with varicocele and 15 fertile men who referred to Isfahan fertility and infertility center were used. Firstly, sperm parameters (sperm concentration, motility and morphology) were assessed based on World Health Organization guidelines (2010). Phosphatidylserine translocation, DNA fragmentation and protamine deficiency were evaluated by flow cytometry, TUNEL assay and chromomycin A3 (CMA3) staining, respectively.

Results: The results showed that mean values of sperm parameters have reduced significantly in varicocele group compared to fertile group. Phosphatidylserine externalization showed no difference between two groups but percentage of DNA fragmentation and protamine deficiency was significantly higher in study group compared to control group.

Conclusion: In infertile men with varicocele, increase in levels of DNA fragmentation, protamine deficiency and low quality of sperm parameters may be due to disturbance of testicular thermos-regulation. Further studies are needed to confirm these results. Moreover, no difference was observed in phosphatidylserine externalization which can be due to the small sample size of this study or result of transition of sperm from early to late stages of apoptosis.

Keyword: Varicocele, Apoptosis, Phosphatidylserine, DNA Fragmentation, Protamine Deficiency

How to cite this article: Foroozan-Boroojeni Sh, Tavalaee M, Nasr-Esfahani M H .[Evaluation of sperm apoptotic markers and protamine deficiency in sperm of infertile individuals with varicocele compared to fertile men]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 October- November; 41(4):64-72. Persian.

© 2019 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

مقایسه مارکرهای آپوپتوزی و کمبود پروتامین در اسپرم افراد نابارور دچار واریکوسل با افراد بارور

شقایق فروزان بروجنی[۱]، مرضیه تولائی[۱*]، محمد حسین نصر اصفهانی[۲،۱]

[۱] پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری تولید مثل، اصفهان، ایران
[۲] مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران
[*] نویسنده مسئول؛ ایمیل Tavalaee.m@royaninstitute.org

دریافت: ۱۳۹۶/۷/۴ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۳ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۶/۱۶
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. مهر و آبان ۱۳۹۸؛ ۴۱(۴):۶۴-۷۲

چکیده

زمینه: به نظر می‌رسد که استرس گرمایی و استرس اکسیداتیو فاکتورهای اصلی پاتوفیزیولوژی واریکوسل هستند. یکی از مهم‌ترین مسیرهای مولکولی که در اثر آن‌ها به راه می‌افتد، آپوپتوز است و با نشانگرهای مختلفی مانند خروج فسفاتیدیل سرین و قطعه‌قطعه شدن DNA قابل شناسایی است. کمبود پروتامین از دیگر پدیده های مرتبط با واریکوسل است. لذا هدف از انجام این مطالعه بررسی نشانگرهای آپوپتوز در افراد نابارور با واریکوسل و ارتباط این نشان‌گرها با پارامترهای اسپرمی و بلوغ کروماتین بود.

روش‌کار: در این مطالعه از نمونه مایع منی ۱۵ مرد نابارور با واریکوسل و ۱۵ مرد بارور مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان، استفاده شد. ابتدا پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی اسپرم) بر اساس راهبردهای سازمان جهانی بهداشت (۲۰۱۰) ارزیابی شد. سپس به ترتیب جابه‌جایی فسفاتیدیل سرین با فلوسایتومتری، قطعه‌قطعه‌شدن DNA با روش TUNEL و کمبود پروتامین با رنگ‌آمیزی کروموماسین A3 (CMA3) بررسی شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که پارامترهای اسپرمی به‌طور معنی‌داری در گروه واریکوسل نسبت به گروه بارور کاهش یافته است. خروج فسفاتیدیل سرین تفاوتی بین دو گروه نشان نداد اما درصد قطعه‌قطعه شدن و کمبود پروتامین در گروه مورد نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: در افراد نابارور با واریکوسل، افزایش سطح آسیب DNA، کمبود پروتامین و کیفیت پایین اسپرم می‌تواند به علت اختلال در تنظیم دمایی بیضه‌ای باشد. مطالعات بیشتری برای تایید این نتایج مورد نیاز است. همچنین تفاوتی بین میزان خروج فسفاتیدیل سرین بین گروه‌ها دیده نشد که شاید به خاطر تعداد محدود افراد شرکت‌کننده در این مطالعه و یا عبور اسپرم‌ها از مراحل اولیه آپوپتوز و ورود آن‌ها به مراحل انتهایی مرگ سلولی باشد.

کلید واژه‌ها: واریکوسل، آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین، قطعه‌قطعه شدن DNA، کمبود پروتامین

نحوه استناد به این مقاله: فروزان بروجنی ش، تولائی م، نصر اصفهانی م ح. بررسی مارکرهای آپوپتوزی و کمبود پروتامین در اسپرم افراد نابارور با واریکوسل در مقایسه با افراد بارور. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی‌درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۴):۶۴-۷۲

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

به اتساع و پیچش غیرطبیعی وریدهای طناب اسپرماتیک واریکوسل گفته می‌شود که حدوداً در ۵۰–۳۵ درصد جمعیت مردان با ناباروری اولیه و ۸۰ درصد جمعیت مردان با ناباروری ثانویه دیده می‌شود. ازاین‌رو در میان فاکتورهای ناباروری مربوط به مردان، واریکوسل از شیوع بالاتری برخوردار است (۱). محققان عواملی همچون استرس گرمایی، استرس اکسیداتیو، عدم تعادل هورمونی، هایپوکسی و غیره را عوامل مرتبط با پاتولوژی واریکوسل می‌دانند. البته به نظر می‌رسد که در این زمینه بازیگران اصلی دو عامل استرس گرمایی و استرس اکسیداتیو باشند (۲). در صورت رخداد این شرایط استرس‌زا، یکی از مسیرهای مولکولی که در اسپرم فعال می‌گردد، آپوپتوز است (۳). آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول یک مسیر حفاظت‌شده در طول تکامل به‌منظور حذف سلول‌های ناکارآمد و آسیب‌دیده است. آپوپتوز شامل رویدادهای بیوشیمیایی است که منجر به تغییرات مورفولوژیک و درنهایت حذف سلول توسط فاگوسیت‌ها یا سلول‌های مجاور می‌شود. درنتیجه به‌منظور تمیز دادن سلول‌های سالم از سلول‌های آپوپتوزی به نشان‌گرهایی در سطح سلول نیاز است (۴). غشاهای زیستی از صدها لیپید مختلف تشکیل شده‌اند که با یکدیگر در زنجیره‌های اسید چرب، چیدمان ستون فقرات و گروه‌های سر تفاوت دارند. از میان لیپیدهای متفاوتی که در غشاهای زیستی یافت می‌شوند می‌توان به فسفولیپیدهای فسفاتیدیل کولین (PC)، فسفاتیدیل سرین (PS)، و فسفاتیدیل اتانل آمین (PE)، اسفنگولیپید اسفنگومیلین (SPH) و کلسترول اشاره کرد. مدت‌های طولانی است که توزیع غیرمتقارن فسفولیپیدهای مختلف در دو سوی غشای پلاسمایی سلول‌های پستانداران شناخته شده است، واقعیتی که برای اولین بار در گلبول‌های قرمز کشف شد (۵). از این میان PS و PE بیشتر در نیم لایه درونی، و PC و SPH بر روی سطح بیرونی دیده می‌شوند و شایع‌ترین مورد سنجش، توزیع PS است. این مسئله شاید به این خاطر است که پروتئین‌هایی که به طور اختصاصی به این فسفولیپید متصل می‌گردند، در دسترس هستند (۶). قرار گرفتن PS در سطح سلول در حیوانات چند سلولی علل و پیامدهای مهم فیزیولوژیک دارد. از میان این علل و پیامدها می‌توان به نقش خروج PS در لخته شدن خون، فیوژن میوبلاست‌ها، لقاح اسپرم با تخمک، حذف اریتروسیت‌ها و حذف آپوپتوزی سلول‌ها اشاره کرد (۶). خروج فسفاتیدیل سرین و رفتن آن به سطح خارجی غشای پلاسمایی از مهم‌ترین نشان‌گرهای مراحل اولیه آپوپتوز و سیگنالی برای فاگوسیتوز سلول آپوپتوزی می‌باشد. همچنین قطعه قطعه شدن DNA یکی از شناخت‌شده‌ترین نشانگرهای مرتبط با مراحل انتهایی آپوپتوز است (۷، ۸). امکان قطعه قطعه شدن DNA در تمامی مراحل اسپرماتوژنز وجود دارد و می‌تواند در اثر فاکتورهایی مانند به راه افتادن آبشار آپوپتوزی، فرار از آپوپتوز، شکست‌های ترمیم نشده DNA در زمان بازآرایی کروماتین حین اسپرماتوژنز، بسته‌بندی ناقص کروماتین یا استرس اکسیداتیو باشد (۹). محققان نشان داده‌اند که در افراد نابارور میزان اسپرم‌های آپوپتوتیک بیشتر از افراد بارور می‌باشد. همچنین مشاهده شده است که اسپرم افراد مبتلا به واریکوسل نیز سطوح بالایی از آپوپتوز را نشان می‌دهد. بااین‌حال گزارش‌ها در این رابطه ضد و نقیض هستند (۱۰، ۱۱). ازاین‌رو، هدف از انجام این مطالعه آن بود که نشانگرهای آپوپتوز در افراد نابارور با واریکوسل بررسی شوند و ارتباط این نشان‌گرها با پارامترهای اسپرمی و بلوغ کروماتین مورد ارزیابی قرار گیرد.

روش‌کار

در این مطالعه که از نوع مورد– شاهدی بود با توجه به مطالعات پیشین از ۱۵ مرد نابارور با واریکوسل گرید II و III و ۱۵ مرد بارور کاندیدای PGS (Preimplantation Genetic Screening) مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان بین پائیز ۹۴ تا بهار ۹۵، نمونه مایع منی گرفته شد. لازم به ذکر است که از تمام افراد پیش از ورود به مطالعه رضایت‌نامه اخذ گردید و تمامی آن‌ها پرسش‌نامه‌ای مربوط به وضعیت سلامت، بهداشت، سبک زندگی و غیره پر کردند. جمع‌آوری نمونه مایع منی از طریق استمنا و پس از ۵–۳ روز پس از پرهیز جنسی در ظروف مخصوص استریل انجام گرفت و به کارکنان آزمایشگاه آندرولوژی مرکز باروروی و ناباروری اصفهان تحویل داده شد. باقی مراحل کار توسط پژوهشگر در آزمایشگاه آندرولوژی پژوهشکده زیست‌فناوری رویان اصفهان صورت گرفته است. نمونه به مدت ۳۰–۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت تا مایع‌شدگی رخ دهد. پس از آن ابتدا حجم نمونه توسط ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد و سپس قسمتی از نمونه به‌منظور بررسی پارامترهای اسپرمی (تعداد، تحرک و مورفولوژی اسپرم) بر اساس راهبردهای سازمان جهانی بهداشت (WHO, 2010) برداشته شد (۱۲). باقی‌مانده نمونه جهت بررسی جابه‌جایی فسفاتیدیل سرین با فلوسایتومتری، قطعه قطعه شدن DNA با روش TUNEL و کمبود پروتامین با رنگ‌آمیزی کروموماسین A3 (CMA3) استفاده گشت (۱۳). معیارهای خروج از مطالعه عبارت بودند از: سن بالای ۵۰ سال، استعمال دخانیات، مشروبات الکلی و مواد مخدر، ناباروری ثانویه، لوکوسیتواسپرمی، آزواسپرمی، تب بالا تا ۹۰ روز قبل از نمونه گیری، مشکلات هورمونی، مشکلات آناتومیک، اختلاف سایز بیضه‌ها، سندروم کلاین– فلتر، سرطان، واریکوسل گرید I، بازگشت واریکوسل، عفونت مجاری ادراری– تناسلی، سابقه‌ی آسیب یا جراحی کیسه بیضه و مواجهات شغلی. به منظور بررسی

میزان جابه‌جایی فسفاتیدیل‌سرین از کیت annexinV (IQ products، هلند) استفاده شد. AnnexinV یک پروتئین سلولی وابسته به کلسیم است که به طور اختصاصی به فسفاتیدیل‌سرین متصل می‌شود و در نتیجه می‌توان از آن برای شناسایی و اندازه‌گیری فسفاتیدیل‌سرینی که از نیمه داخلی غشا به نیمه خارجی غشا آمده است، استفاده نمود. به‌طور خلاصه و بر اساس پروتکل، حدود ۱-۲ میلیون اسپرم از مایع منی با ۱ میلی‌لیتر از بافر کلسیم ۱X و در دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی ریخته شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از AnnexinV متصل به FITC اضافه گردید و سوسپانسیون سلولی به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ در تاریکی قرار گرفت. پس از گذشت این زمان به سوسپانسیون ۱ میلی‌لیتر بافر کلسیم ۱X اضافه و در دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از دور ریختن مایع رویی، ۹۰ میکرولیتر بافر کلسیم ۱X و ۱۰ میکرولیتر رنگ PI (Propidium Iodide) اضافه گردید و سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی بر روی یخ قرار گرفت. پس از گذشت این زمان، سلول‌ها سریعاً توسط فلوسایتومتری شمارش شدند (۱۳). AnnexinV متصل به FITC از خود فلورسانس سبز نشان می‌دهد. میزان رنگ سبز با فلوسایتومتری با لیزر آرگونی با طول موج ۴۸۸ نانومتر خوانده شد. برای هر نمونه ۱۰۰۰۰ سلول شمارش شد. جمعیت اسپرمی محصور، انتخاب و فلورسنس سبز و قرمز (PI) شناسایی و اندازه‌گیری شد. سپس درصد اسپرم‌های زنده و AnnexinV مثبت (PI-AnnexinV+) یا همان اسپرم‌های آپوپتوزی گزارش شد (۱۳). TUNEL روشی مناسب و با دقت بالا برای اندازه‌گیری میزان آسیب DNA اسپرم است. در این روش به انتهای OH^{-3} آزاد DNA شکسته‌شده در سلول‌ها، به کمک آنزیم دئوکسی‌نوکلئوتیدیل ترانسفراز انتهایی، یک dUTP متصل به فلوئوروسین اضافه می‌شود. سپس DNAای که توسط آنزیم با dUTP متصل به فلوئوروسین نشانه‌گذاری شده است را می‌توان به‌طور مستقیم زیر میکروسکوپ فلورسنت مشاهده کرد. در این مطالعه بر اساس دستورالعمل کیت مربوطه (پرومگا، آلمان) به‌طور خلاصه به صورت زیر عمل شد. ابتدا نمونه مایع منی باPBS (phosphate buffered saline) با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه دو بار شستشو داده شد و سپس از آن اسمیری بر روی لام تهیه گشت. اسمیرها با محلول پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه فیکس شدند و پارافرمالدئید اضافی از روی لام با PBS شسته شد. سپس به منظور نفوذپذیر کردن غشا اسپرم‌ها محلول Triton X-100 ۰/۲ درصد به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق به اسمیرها اضافه گردید. پس از شستشو لام با PBS بافر equilibration به مدت ۵ دقیقه به اسمیرها اضافه شد. سپس مخلوطی از نوکلئوتیدهای نشاندار و آنزیم rTdT بر روی لام‌ها ریخته شد و لام‌ها به مدت ۹۰ دقیقه بر روی حمام آبی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت این زمان ادامه فرآیند آنزیمی با اضافه‌کردن محلول SSC به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق مهار گشت. پس از شستشوی لام‌ها با PBS، لام‌ها با استفاده از عدسی X ۱۰۰ میکروسکوپ فلورسنت (الیمپوس، ژاپن) مورد بررسی قرار گرفتند. در هر لام حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های قرمز (TUNEL منفی بدون DNA قطعه‌قطعه) و اسپرم‌های سبز (TUNEL مثبت با DNA قطعه‌قطعه) محاسبه و نتایج به صورت درصد قطعه‌قطعه شدن DNA گزارش شد (۱۳). CMA3 یک آنتی‌بیوتیک گلیکوزیدی با خاصیت ضد قارچی و ضد توموری است که به صورت برگشت‌پذیر به شیار کوچک DNA متصل می‌شود. می‌توان از این ماده به عنوان یک رنگ فلورسنت رنگ کننده‌ی کروموزوم، برای شناسایی غیرمستقیم کمبود پروتامین اسپرم استفاده کرد. در این رنگ‌آمیزی اسپرم‌هایی که کمبود پروتامین داشته باشند به رنگ زرد براق و اسپرم‌های محتوی پروتامین طبیعی به رنگ زرد کدر و یا قهوه‌ای دیده می‌شوند. به منظور انجام این رنگ‌آمیزی ابتدا نمونه مایع منی با PBS با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه دو بار شستشو داده شد. سپس نمونه و فیکساتیو کارنوی (نسبت ۳:۱ از متانول و اسید استیک) به نسبت ۱: ۱ حجمی مخلوط شدند و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. از این مخلوط بر روی لام اسمیر تهیه گشت و پس از خشک‌شدن اسمیر، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگ CMA3 (سیگما، آمریکا) (۰/۲۵ mg/ml) در بافر مک الوین (میلی‌لیتر اسید سیتریک ۰/۱ مولار، ۳۲/۹ میلی‌لیتر $Na_2HPO_4.7H_2O$ ۰/۲ مولار، ۱۰ میلی‌مولار $MgCl_2$، pH=7) بر روی اسمیرها ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی زمان داده شد. پس از گذشت این زمان لام‌ها با PBS دو بار شستشو داده شدند و با استفاده از عدسی X ۱۰۰ میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند. در هر لام حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های CMA3 مثبت گزارش شد (۱۳). اطلاعات حاصل در نرم‌افزار SPSS 22/0 وارد شد و پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها به وسیله‌ی تست Shapiro–Wilk، با استفاده از آنالیزهای آماری Independent T-test برای مقایسه میانگین بین دو گروه و Two-tailed Pearson correlation برای بررسی همبستگی بین پارامترها مورد ارزیابی قرار گرفت. نمودارها در Microsoft Excel 2013 ترسیم گردید. در صورتی‌که P-Value<۰/۰۵ بود، تفاوت داده‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار محسوب شد.

یافته‌ها

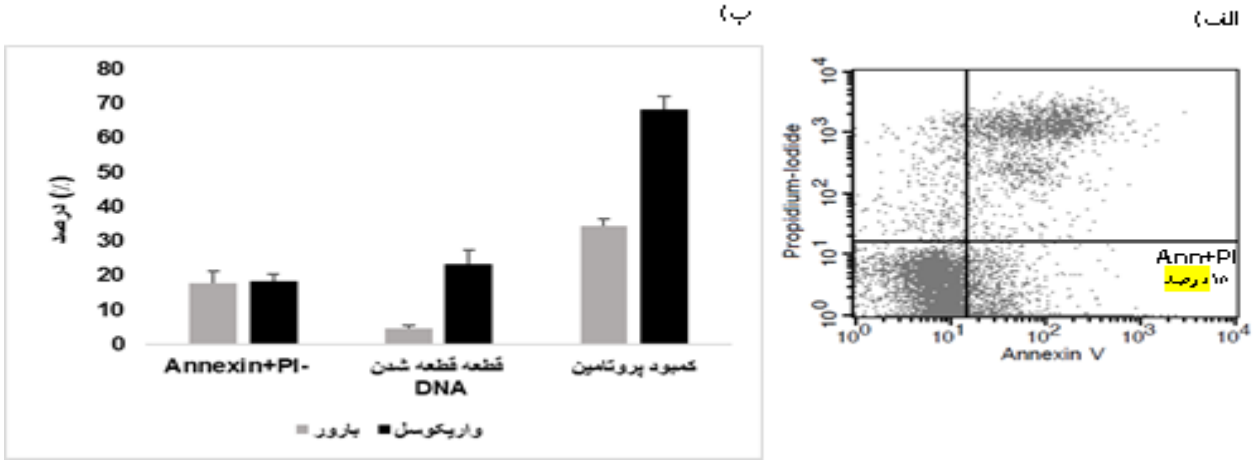
مقایسه پارامترهای اسپرمی میان افراد نابارور با واریکوسل و بارور نشان داد که میانگین غلظت اسپرم در افراد نابارور با واریکوسل به‌طور معنی‌داری کمتر از افراد بارور بود (P<۰/۰۰۱). همچنین میانگین تحرک کل اسپرم نیز در این افراد به‌صورت معنی‌داری

کمتر از افراد بارور مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). میانگین درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم در افراد نابارور با واریکوسل به‌صورت معنی‌داری بیشتر از افراد بارور بود (P=۰/۰۱) (جدول ۱). خروج فسفاتیدیل‌سرین به وسیله پروتئین AnnexinV و با استفاده از روش فلوسایتومتری ارزیابی و درصد اسپرم‌های زنده با خروج فسفاتیدیل‌سرین (AnnexinV+PI–) گزارش شد. در شکل ۱–الف، نمودار فلوسایتومتری برای خروج فسفاتیدیل‌سرین نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل ۱–ب نیز مشخص است، ارزیابی خروج فسفاتیدیل‌سرین با استفاده از فلوسایتومتری حاکی از آن است که تفاوت معنی‌داری در میانگین درصد خروج فسفاتیدیل‌سرین بین افراد نابارور با واریکوسل (۱۸/۳±۲) و افراد بارور (۱۷/۷ ± ۳/۶) وجود نداشت (P=۰/۸).

نتایج حاصل از تست TUNEL نشان داد که میانگین درصد قطعه قطعه‌شدن DNA در افراد نابارور با واریکوسل (۲۳/۳ ± ۴/۲) به‌طور معنی‌داری نسبت به افراد بارور (۴/۶ ± ۰/۹) بالاتر بود (P=۰/۰۰۱) (شکل ۱–ب). نتایج به‌دست آمده از رنگ‌آمیزی CMA3 نشان داد که میانگین درصد کمبود پروتامین در افراد نابارور با واریکوسل (۶۸/۳ ± ۳/۷) به‌صورت معنی‌داری بیشتر از افراد بارور (۳۴/۳ ± ۲/۲) بود (شکل ۱–ب) (P<۰/۰۰۱). ارتباط بین پارامترهای اسپرمی، مارکرهای آپوپتوز و کمبود پروتامین بررسی شد. همان‌گونه که در جدول ۲ مشخص است، بین پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک، مورفولوژی غیرطبیعی) و درصد اسپرم‌های زنده با خروج فسفاتیدیل‌سرین رابطه‌ی معنی‌داری دیده نشد (به ترتیب: P = ۰/۱۹، P = ۰/۵۴، P = ۰/۳۱). بین غلظت اسپرم با درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم، درصد قطعه قطعه شدن DNA و کمبود پروتامین، روابط منفی معنی‌داری (به ترتیب: P = ۰/۰۰۱، P = ۰/۰۱، P = ۰/۰۰۱) دیده شد ولی با درصد تحرک کل اسپرم رابطه‌ی مثبت و معنی‌داری مشاهده شد (P=۰/۰۱). بین درصد تحرک کل اسپرم نیز با درصد قطعه قطعه شدن DNA و همچنین کمبود پروتامین، روابط منفی معنی‌داری دیده شد (به ترتیب: P=۰/۰۰۱، P = ۰/۰۴). علاوه بر این بین درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم با کمبود پروتامین، رابطه مثبت و معنی‌داری وجود داشت (P = ۰/۰۰۷). درصد اسپرم‌های زنده با خروج فسفاتیدیل‌سرین تنها با کمبود پروتامین رابطه مثبت و معنی‌داری نشان داد (P = ۰/۰۰۹) (جدول ۲). علاوه بر روابط ذکرشده در بالا، درصد قطعه قطعه شدن DNA با کمبود پروتامین نیز رابطه مثبت و معنی‌داری داشت (P = ۰/۰۰۷، r = ۰/۶).

جدول ۱: مقایسه پارامترهای اسپرمی بین افراد نابارور با واریکوسل و بارور

پارامترها	بارور (میانگین + خطای استاندارد) N=۱۵	واریکوسل (میانگین + خطای استاندارد) N=۱۵	P-value
غلظت اسپرم (10^6 در هر میلی‌لیتر)	۱۲۹/۲ ± ۱۷/۴	۳۵/۵ ± ۸/۴	P<۰/۰۰۱
تحرک کل اسپرم (درصد)	۶۵/۴ ± ۴/۴	۳۶/۹ ± ۵/۵	P<۰/۰۰۱
مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم (درصد)	۹۴/۸ ± ۰/۹	۹۷/۹ ± ۰/۳	P =۰/۰۱



شکل ۱: نتایج حاصل از بررسی خروج فسفاتیدیل سرین (Annexin+PI–)، قطعه‌قطعه شدن DNA و کمبود پروتامین بین مردان بارور و افراد نابارور با واریکوسل. الف) نمودار فلوسایتومتری برای خروج فسفاتیدیل‌سرین ب) مقایسه میانگین اسپرم‌های زنده با خروج فسفاتیدیل سرین (Annexin+PI–)، اسپرم‌های با DNA قطعه‌قطعه و اسپرم‌های با کمبود پروتامین بین مردان بارور و افراد نابارور با واریکوسل (* نشان‌دهنده P<۰/۰۵، ** نشان‌دهنده P<۰/۰۰۱).

جدول ۲: رابطه بین پارامترهای اسپرمی، مارکرهای آپوپتوز و کمبود پروتامین

	غلظت اسپرم (10^6 در یک میلی‌لیتر)	تحرک کل اسپرم (درصد)	مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم (درصد)	Annexin+PI- (درصد)	قطعه‌قطعه‌شدن DNA (درصد)	کمبود پروتامین (درصد)
غلظت اسپرم (10^6 در یک میلی‌لیتر)	۱	۰/۴۷*	-۰/۸۱**	-۰/۲۵	-۰/۴۷*	-۰/۶۷**
تحرک کل اسپرم (درصد)	۰/۴۷*	۱	-۰/۲۸	-۰/۱۲	-۰/۶۵**	-۰/۴۷*
مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم (درصد)	-۰/۸۱**	-۰/۲۸	۱	۰/۱۹	۰/۳۶	۰/۵۹**
Annexin+PI- (درصد)	-۰/۲۵	-۰/۱۲	۰/۱۹	۱	-۰/۰۷	۰/۵۶**

* ارتباط در سطح P-Value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

** ارتباط در سطح P-Value کمتر از ۰/۰۱ معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

بحث

با درک بهتر پاتوفیزیولوژی ناباروری مردان به‌واسطه‌ی واریکوسل می‌توان فهم بهتری از اثرات زیان‌بار واریکوسل بر اسپرماتوژنز، چگونگی تبیین استراتژی‌های مؤثر درمانی و همچنین انتخاب مناسب بیمارانی که می‌توانند از این درمان‌ها بهره برند، به دست آورد. شواهد موجود از هایپرترمی اسکروتومی و استرس اکسیداتیو به عنوان عناصر کلیدی در پاتوفیزیولوژی ناباروری به‌موجب واریکوسل حمایت می‌کنند (۲). ROSها محصولات جانبی متابولیسم اسپرم هستند که نقش‌های مهمی در عملکردهای فیزیولوژیک اسپرم دارند. بااین‌حال تولید بیش از حد ROS منجر به پیری اسپرم و ورود آن به مسیرهای آپوپتوزی می‌شود (۱۴). در مطالعات مختلف رابطه‌ی مستقیم بین درجه حرارت و میزان ROS نشان داده است. در صورت وجود استرس گرمایی تولید ROS از میتوکندری و متعاقب آن غشای پلاسمایی، سیتوپلاسم و پراکسی زوم افزایش پیدا می‌کند. در این رابطه افزایش تولید ROS میتوکندریایی ممکن است به واسطه مهار کمپلکس‌های زنجیره انتقال الکترون میتوکندری در اثر حرارت باشد که منجر به انتقال الکترون به اکسیژن مولکولی، شکل‌گیری ROS و مهار سنتز آدنوزین تری فسفات می‌گردد (۱۵). همچنین شواهدی مبنی بر افزایش تولید نیتریک اکسید سنتاز القاء شونده به واسطه گرما، افزایش تولید نیتریک اکسید درنتیجه آن و امکان ارتباط این افزایش با تخریب بیضه در واریکوسل وجود دارد. در این رابطه نشان داده شده است که میزان نیتریک اکسید و نیتریک اکسید سنتاز در مایع منی مردان نابارور مبتلا به واریکوسل افزایش می یابد. میزان بیش از حد نیتریک اکسید می‌تواند سبب عدم تحرک اسپرم و آپوپتوز اسپرم بیضه‌ای شود (۱۶). از دیگر مکانیسم‌های احتمالی مرتبط با هایپرترمی اسکروتومی و ROS می‌توان به افزایش تولید فعالیت آنزیم گزانتین اکسیداز، مهار هم اکسیژناز و کمبود پروتئین‌های شوک حرارتی اشاره کرد (۲). در مطالعه حاضر هم راستا با سایر مطالعات مشخص شد که واریکوسل باعث کاهش کیفیت مایع منی ازجمله غلظت، تحرک و مورفولوژی اسپرم می‌شود. در این راستا، Pasqualotto و همکاران و Bahreinian و همکاران نشان داده‌اند که در افراد مبتلا به واریکوسل کیفیت پارامترهای اسپرمی کاهش می‌یابند (۱۷، ۱۸). همچنین Moretti و همکاران کاهش معنی‌دار تحرک اسپرم را در مبتلایان به واریکوسل در مقایسه با افرادی که به این وضعیت دچار نبودند، گزارش کردند (۱۰). اسپرماتوژنز یک فرآیند بسیار منظم و پیچیده از تقسیم، تمایز و بلوغ سلول‌های جنسی نر است. به‌علاوه طی این فرآیند به‌منظور دست‌یابی به جمعیتی از اسپرم‌های سالم و با DNA آسیب ندیده، مرگ طبیعی سلول زایا یا آپوپتوز در اسپرماتوگونی‌ها رخ می‌دهد که نقش مهمی در تولید و بلوغ اسپرم در بیضه دارد (۱۹). در سال ۱۹۹۹ Sakkas و همکاران تئوری‌ای تحت عنوان «فرار از آپوپتوز» ارائه کردند. طبق این نظریه اسپرم‌هایی که باید در روند مرگ سلولی حذف شوند از این روند خارج و به صورت ناقص دستخوش فرآیند آپوپتوز می‌شوند و درنهایت همراه دیگر اسپرم‌ها در مایع منی حضور پیدا می‌کنند. در بیضه افراد بالغ، طی یک اسپرماتوژنز طبیعی سلول‌های زایا دچار تجزیه خود به خودی می‌شوند. تخمین زده‌شده است که طی این تجزیه، ۷۵–۲۵ درصد این سلول‌ها از دست می‌روند (۲۰). ممکن است تغییر در این پروسه طبیعی، برای ناباروری حاصل از واریکوسل در انسان مهم باشد. تحقیقات پیشین نشان داده‌اند که شرایط استرس‌زا مانند استرس حرارتی، باعث آسیب به سلول‌های زایا در بیضه و به راه افتادن مسیرهای مرگ سلولی درون سلول‌های زایا در بیضه می‌شوند (۳). عدم حذف کامل این سلول‌های آسیب‌دیده در بیضه و فرار آن‌ها از آپوپتوز، می‌تواند توجیه‌گر میزان بالاتر اسپرم‌هایی با DNA آسیب‌دیده در انزال مردان نابارور با واریکوسل به نسبت افراد بارور در این مطالعه باشد. این مشاهده با سایر مطالعات انجام شده در این زمینه هم‌خوانی دارد. Ni و همکاران گزارش کردند که در افراد مبتلا به واریکوسل بالینی، هم در مبتلایان با پارامترهای اسپرمی طبیعی و هم در مبتلایان الیگوآستنوزواسپرمی، میزان قطعه قطعه شدن DNA، بالاتر است (۲۱). سایر محققان نیز درصد قطعه قطعه شدن DNA را در افراد نابارور با واریکوسل بالاتر از افراد بارور گزارش کردند (۱۱، ۲۲، ۲۳). در رابطه با دیگر مارکر آپوپتوز یعنی خروج فسفاتیدیل‌سرین، برخلاف Wu و همکاران و La Vignera و همکاران در مطالعه حاضر تفاوتی بین میانگین خروج فسفاتیدیل‌سرین بین دو گروه دیده نشد (۲۲، ۲۳). البته باید خاطر نشان کرد که نمی‌توان به تمامی سلول‌هایی که خروج

فسفاتیدیل‌سرین دارند، "سلول آپوپتوزی" اطلاق کرد، چرا که خروج فسفاتیدیل‌سرین می‌تواند نشانگر اتفاقات فیزیولوژیک مانند ظرفیت‌یابی و واکنش آکروزومی نیز باشد (۶). در این رابطه Kotwicka و همکاران گزارش کردند که خروج فسفاتیدیل‌سرین، در اسپرم‌ها با مورفولوژی طبیعی و اسپرم‌های پاتولوژیک قابل مشاهده است (۲۴). همچنین Moretti و همکاران تفاوت معنی‌داری در خروج فسفاتیدیل‌سرین بین گروه مبتلا به واریکوسل و گروهی که مبتلا به واریکوسل نبودند، مشاهده نکردند (۱۰). از آنجایی که در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری در قطعه‌قطعه شدن DNA بین دو گروه دیده شد، شاید بتوان این نتیجه‌گیری را نمود که عدم مشاهده تفاوت در خروج فسفاتیدیل سرین بین گروه‌ها در اثر عبور اسپرم‌ها از مراحل اولیه و ورود آن‌ها به مراحل انتهایی آپوپتوز است. مطالعات پیشین افزایش میزان قطعه قطعه شدن DNA را در افرادی که پارامترهای غیرطبیعی اسپرمی‌دارند، بیان کرده‌اند که این مسئله با روابط دیده شده بین پارامترهای اسپرمی و قطعه قطعه شدن DNA در مطالعه حاضر هم راستا است (۲۱). در رابطه با ارتباط خروج فسفاتیدیل سرین و کاهش پارامترهای اسپرمی نتایج مطالعات ضد و نقیض وجود دارند (۲۵). در مطالعه حاضر هم‌راستا با مطالعاتی همچون Lachaud و همکاران و Martin و همکاران ارتباطی بین پارامترهای اسپرمی و خروج فسفاتیدیل سرین یافت نشد (۲۶، ۲۷). طی اسپرمیوژنز به منظور حفاظت از کروماتین اسپرم در برابر نوکلئازها و امکان جای‌گیری آنها در فضای بسیار اندک سر اسپرم ۸۵ درصد هیستون‌ها با پروتامین‌ها جایگزین می‌شوند (۲۸). مشاهدات Navaeian- Kalat و همکاران و سایر محققان حاکی از آن است که در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل بسته‌بندی کروماتین با نقص روبه‌رو است (۱۸، ۲۹). دراین‌باره نتایج ما نیز همسو با سایر مطالعات بود. نتایج این مطالعه نشان داد که بین آسیب DNA و کمبود پروتامین رابطه مستقیم معنی‌داری وجود دارد. از آنجایی که در صورت وجود نقص در بسته‌بندی کروماتین اسپرم، DNA مستعد آسیب می‌گردد، می‌توان استنباط کرد که نتایج به دست آمده با واقعیت‌های موجود هم‌خوانی دارند (۳۰). بین کمبود پروتامین و خروج فسفاتیدیل سرین نیز رابطه مثبت معنی‌داری مشاهده گشت. جالب‌توجه است که Kotwicka و همکاران گزارش کردند که در اکثر موارد خروج فسفاتیدیل سرین در قسمت‌هایی از سلول دیده می‌شوند که بلوغ درستی نداشته‌اند (۲۴). از آنجایی که رنگ‌آمیزی CMA3 می‌تواند به‌طور غیرمستقیم نشان‌دهنده‌ی بلوغ اسپرم باشد، شاید بتوان نتیجه گرفت که رابطه‌ی ذکرشده بین کمبود پروتامین و خروج فسفاتیدیل سرین در مطالعه حاضر حاکی از این عدم بلوغ است.

نتیجه‌گیری

در کل نتایج این مطالعه حاکی از آن است که در افراد نابارور با واریکوسل، افزایش سطح آسیب DNA و کمبود پروتامین دیده می‌شود که می‌تواند به علت عدم حذف اسپرم‌های غیرطبیعی در بیضه و راه یافتن آن‌ها به مایع منی باشد. همچنین تفاوتی بین میزان خروج فسفاتیدیل سرین بین گروه‌ها دیده نشد که شاید به خاطر عبور سلول‌ها از مراحل اولیه آپوپتوز و ورود آن‌ها به مراحل انتهایی مرگ سلولی (شکستگی DNA) باشد و احتمالاً این میزان از خروج فسفاتیدیل سرین که در دو گروه دیده شد، سطحی پایه با عملکرد فیزیولوژیک می‌باشد که البته تایید این موضوع نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

قدردانی

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از کارکنان و مسؤولین پژوهشکده زیست فناوری رویان اصفهان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان ابراز می‌دارند.

منابع مالی

نتایج این مقاله استخراج‌شده از طرح تحقیقاتی به شماره ۹۴۰۰۰۱۶۵ تصویب شده در پژوهشگاه رویان می‌باشد. هزینه‌های این طرح توسط این موسسه تأمین شده است.

ملاحظات اخلاقی

ملاحظات اخلاقی شامل نمی‌شود.

منافع متقابل

مؤلفان اظهار می‌دارند که منافع متقابلی از تألیف یا انتشار این مقاله ندارند.

مشارکت مؤلفان

ش ف ب، اجرای طرح، جمع‌آوری داده‌ها و تألیف مقاله را بر عهده داشت. م ح ن الف و م ت استادان راهنما و مشاور طرح بوده، آنالیز داده‌ها، تألیف مقاله را بر عهده داشته و نسخه نهایی را تائید کرده‌اند.

References

1. Alsaikhan B, Alrabeeah K, Delouya G, Zini A. Epidemiology of varicocele. *Asian J Androl* 2016; **18**(2): 179-181. doi: 10.4103/1008-682X.172640
2. Cho C L, Esteves S C, Agarwal A. Novel insights into the pathophysiology of varicocele and its association with reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. *Asian J Androl* 2016; **18**(2): 186-193. doi: 10.4103/1008-682X.170441
3. Durairajanayagam D, Agarwal A, Ong C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reprod Biomed Online* 2015; **30**(1): 14-27. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.09.018

4. Fulda S, Gorman A M, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol* 2010; **2010**: doi: 10.1155/2010/214074
5. Verkleij A J, Zwaal R F, Roelofsen B, Comfurius P, Kastelijn D, van Deenen L L. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1973; **323**(2): 178-193. doi: 10.1016/0005-2736(73)90143-0
6. Bevers E M, Williamson P L. Getting to the Outer Leaflet: Physiology of phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. *Physiol Rev* 2016; **96**(2): 605-645. doi: 10.1152/physrev.00020.2015
7. Klöditz K, Chen Y Z, Xue D, Fadeel B. Programmed cell clearance: From nematodes to humans. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; **482**(3): 491-497. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.005
8. Collins J A, Schandi C A, Young K K, Vesely J, Willingham M C. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1997; **45**(7): 923-934. doi: 10.1177/002215549704500702
9. Sakkas D, Alvarez J G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010; **93**(4): 1027-1036. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.046
10. Moretti E, Collodel G, Mazzi L, Campagna M, Iacoponi F, Figura N. Resistin, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and human semen parameters in the presence of leukocytospermia, smoking habit, and varicocele. *Fertil Steril* 2014; **102**(2): 354-360. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.04.017
11. Cortés-Gutiérrez E I, Dávila-Rodríguez M I, Fernández J L, López-Fernández C, Aragón-Tovar AR, Urbina-Bernal LC, Gosálvez J. DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele evaluated by sperm chromatin dispersion and DBD-FISH. *Arch Gynecol Obstet* 2016; **293**(1): 189-196. doi: 10.1007/s00404-015-3822-y
12. WHO. *World Health Organization Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 2010.
13. Tavalaee M, Deemeh MR, Arbabian M, Nasr-Esfahani MH. Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection? *J Assist Reprod Genet* 2012; **29**(1): 31-38. doi: 10.1007/s10815-011-9686-6
14. Moazamian R, Polhemus A, Connaughton H, Fraser B, Whiting S, Gharagozloo P, Aitken R J. Oxidative stress and human spermatozoa: diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation. *Mol Hum Reprod* 2015; **21**(6): 502-515. doi: 10.1093/molehr/gav014
15. Slimen I B, Najar T, Ghram A, Dabbebi H, Ben Mrad M, Abdrabbah M. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *Int J Hyperthermia* 2014; **30**(7): 513-523. doi: 10.3109/02656736.2014.971446
16. Rosselli M, Dubey R K, Imthurn B, Macas E, Keller P J. Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. *Hum Reprod* 1995; **10**(7): 1786-1790. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a136174
17. Pasqualotto F F, Lucon A M, de Góes P M, Sobreiro B P, Hallak J, Pasqualotto E B, Arap S. Semen profile, testicular volume, and hormonal levels in infertile patients with varicoceles compared with fertile men with and without varicoceles. *Fertil Steril* 2005; **83**(1): 74-77. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.06.047
18. Bahreinian M, Tavalaee M, Abbasi H, Kiani-Esfahani A, Shiravi A H, Nasr-Esfahani M H. DNA hypomethylation predisposes sperm to DNA damage in individuals with varicocele. *Syst Biol Reprod Med* 2015; **61**(4):179-186. doi: 10.3109/19396368.2015.1020116
19. Shaha C, Tripathi R, Mishra D P. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; **365**(1546): 1501-1515. doi: 10.1098/rstb.2009.0124
20. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi P G, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999; **4**(1): 31-37. doi: 10.1095/biolreprod66.4.1061
21. Ni K, Steger K, Yang H, Wang H, Hu K, Zhang T, Chen B. A comprehensive investigation of sperm DNA damage and oxidative stress injury in infertile patients with subclinical, normozoospermic, and astheno/oligozoospermic clinical varicocoele. *Andrology* 2016; **4**(5): 816-824. doi: 10.1111/andr.12210
22. Wu G J, Chang F W, Lee S S, Cheng Y Y, Chen CH, Chen I C. Apoptosis-related phenotype of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *Fertil Steril* 2009; **91**(3): 831-837. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.12.058
23. La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, D'Agata R, Calogero A E. Effects of varicocelectomy on sperm DNA fragmentation, mitochondrial function, chromatin condensation, and apoptosis. *J Androl* 2012; **33**(3): 389-296. doi: 10.2164/jandrol.111.013433
24. Kotwicka M, Jendraszak M, Jedrzejczak P. Phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: topography in membrane domains and relation to cell vitality. *J Membr Biol* 2011; **240**(3): 165-170. doi: 10.1007/s00232-011-9357-7.
25. Almeida C, Sousa M, Barros A. Phosphatidylserine translocation in human spermatozoa from impaired

spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2009; **19**(6): 770-777. doi: 10.1016/j.rbmo.2009.10.002

26. Lachaud C, Tesarik J, Cañadas M L, Mendoza C. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 2004; **19**(3): 607-610. doi: 10.1093/humrep/deh130.
27. Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 2005; **20**(12): 3459-3468. doi: 10.1093/humrep/dei245
28. Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006; **12**(4): 417-435. doi: 10.1093/humupd /dml009
29. Navaeian-Kalat E, Deemeh MR, Tavalaee M, Abasi H, Modaresi M, Nasr-Esfahani MH. High total acrosin activity in varicocele individuals. *Andrologia* 2012; **44**: 634-641. doi: 10.1111/j.1439-0272.2011.01242.x
30. Aitken R J, Smith T B, Jobling M S, Baker M A, De Iuliis GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl* 2014; **16**(1): 31-38. doi: 10.4103/1008-682X.122203