Journal of Gorgan University of Medical Sciences

e-ISSN: 2008-4080 p-ISSN: 1562-4765

2023 / Vol 25 / No 3

OPEN ACCESS

Review Article

Sperm Chromatin Evaluation Methods in Infertility

Bahare Nikoozar (M.Sc)[1], Negin Kazemi (B.Sc)[2], Abbas Kiani-Esfahani (M.Sc)[3], Mohammad Hossein Nasr-Esfahani (Ph.D)[4], Marziyeh Tavalaee (Ph.D)*[5]

1 M.Sc in Microbial Biotechnology, Department of Animal Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran. 2 B.Sc in Genetics, Department of Animal Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran. 3 M.Sc in Medical Immunology, Department of Animal Biotechnology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran. 4 Professor, Department of Animal Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran. 5 Associate Professor, Department of Animal Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran.

Abstract

One of the main spermatogenesis events is the replacement of histones with small proteins called protamines, which leads to chromatin's condensation in the sperm nucleus and protects it against possible damage. Today, tests such as aniline blue (AB), toluidine blue (TB), and chromomycin A3 (CMA3) staining are used based on different characteristics to evaluate sperm chromatin compaction. For the assessment of DNA fragmentation in sperm, several tests such as 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG), TUNEL, Comet, sperm chromatin structure assay (SCSA), sperm chromatic dispersion (SCD), and acridine orange have been introduced that directly and indirectly assay DNA damage. The articles in PubMed and Google Scholar, as well as related books, from 2007 to 2022, were collected and reviewed based on keywords 8-OHdG, TUNEL, Comet, SCD, and acridine orange. So far, many studies have been conducted at the treatment level and on sperm chromatin tests, but the number of cases published so far is limited. Various sperm samples have been used in different studies, with different threshold limits in the tests. The sixth edition of the World Health Organization (WHO) book notes that each laboratory has its threshold limit. Therefore, in this review study, common methods of evaluating chromatin packaging and DNA damage are introduced, and the advantages and disadvantages of each test are discussed based on the latest achievements related to infertility.

Keywords: Male Infertility, Spermatozoa, DNA Fragmentation, Aniline Blue, 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine, Chromomycin A3, TUNEL, Comet Assay

***Corresponding Author:** Marziyeh Tavalaee (Ph.D), E-mail: m.tavalaee@royan-rc.ac.ir and tavalaee.royan@gmail.com

Received 15 Nov 2022
Final Revised 25 Feb 2023
Accepted 1 Mar 2023
Published Online 7 Nov 2023

Cite this article as: Nikoozar B, Kazemi N, Kiani-Esfahani A, Nasr-Esfahani MH, Tavalaee M. [Sperm Chromatin Evaluation Methods in Infertility]. J Gorgan Univ Med Sci. 2023; 25(3): 1-9. [Article in Persian]

© The author(s)
Owned: Golestan University of Medical Sciences **Publisher:** Deputy of Research and Technology

مجله دانشگاه علوم پزشکی گرگان

پاییز ۱۴۰۲ / دوره ۲۵ / شماره ۳ (پی در پی ۸۷)

دارای رتبه علمی -پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

e-ISSN: ۲۰۰۸-۴۰۸۰ p-ISSN: ۱۵۶۲-۴۷۶۵

با دسترسی آزاد

مروری

روش‌های ارزیابی کروماتین اسپرم در ناباروری

بهاره نیکوزر [۱]، نگین کاظمی [۲]، عباس کیانی اصفهانی [۳]

دکتر محمدحسین نصراصفهانی [۴]، دکتر مرضیه تولائی *[۵]

[۱] کارشناس ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران.

[۲] کارشناس ژنتیک، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران. [۳] کارشناس ارشد ایمنی شناسی پزشکی، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران. [۴] استاد، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران. [۵] دانشیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران.

چکیده

یکی از رخدادهای اصلی اسپرمیوژنز جایگزینی هیستون‌ها با پروتئین‌های کوچکی به نام «پروتامین» است. این پدیده منجربه تراکم کروماتین در هسته اسپرم و محافظت از آن در برابر آسیب‌های احتمالی می‌شود. امروزه تست‌هایی مانند رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو (AB)، تولویدین‌بلو (TB) و رنگ‌آمیزی کرومایسین A3 (CMA3) براساس ویژگی‌های مختلف برای ارزیابی تراکم کروماتین اسپرم استفاده می‌شود. برای ارزیابی قطعه قطعه شدن DNA در اسپرم، چندین تست نظیر ۸-هیدروکسی-۲-دئوکسی گوانوزین (8-OHdG)، TUNEL ، Comet ، SCSA ، SCD و Acridine orange معرفی شده است که به‌طور مستقیم و غیرمستقیم آسیب DNA را ارزیابی می‌کنند. مقاله‌های منتشر شده توسط محققان در پایگاه‌های Pubmed و Google scholar و نیز کتب مرتبط از سال ۲۰۰۷ تا ۲۰۲۲ بر اساس کلید واژه‌های ۸-OHdG ، TUNEL، Comet ، SCSA ، SCD و Acridine orange جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفتند. تا به‌حال مقالات متعددی در سطح درمان و تحقیقات بر روی تست‌های کروماتین اسپرم انجام شده است؛ اما تعداد موارد بررسی شده تاکنون کم بوده و همچنین در مطالعات گوناگون از نمونه‌های متفاوت اسپرمی استفاده شده و حد آستانه در تست‌های مختلف، متفاوت بوده است. در ویرایش ششم کتاب WHO به این موضوع پرداخته شده است که هر آزمایشگاه حد آستانه مشخص خود را دارد. لذا در این مقاله مروری، روش‌های رایج ارزیابی بسته‌بندی کروماتین و آسیب DNA معرفی شده و مزایا و معایب هر یک از این تست‌ها بر اساس آخرین دستاوردها در زمینه ناباروری مورد بحث و بررسی قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: *ناباروری مردان ، اسپرم ، تراکم کروماتین ، قطعه قطعه شدن DNA ، آنیلین‌بلو ، ۸- هیدروکسی ۲- دئوکسی گوانین ، کروموما یسین A3 ، TUNEL ، Comet Assay*

* نویسنده مسؤول: دکتر مرضیه تولائی ، پست الکترونیکی m.tavalaee@royan-rc.ac.ir و tavalaee.royan@gmail.com

نشانی: اصفهان، خوراسگان، خیابان سلمان، انتهای خیابان رویان، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، تلفن ۰۳۱-۹۵۰۱۵۶۸۲، نمابر ۹۵۰۱۵۶۸۷

وصول ۱۴۰۱/۸/۲۴ اصلاح نهایی ۱۴۰۱/۱۲/۶ پذیرش ۱۴۰۱/۱۲/۱۰ انتشار ۱۴۰۲/۸/۱۶

مقدمه

در سرتاسر جهان مردان بسیاری تحت تاثیر ناباروری قرار دارند و ناباروری با عامل مردانه در حدود ۲۰ درصد از زوج‌ها دیده می‌شود. دلیل ناباروری مردان می‌تواند چندعاملی باشد و بسیاری از اوقات علت ناشناخته است. اسپرم‌ها، سلول‌های تخصص‌یافته هستند که هدف اصلی آنها انتقال ایمن ژنوم پدری به تخمک است. از نشانه‌های اصلی اسپرمیوژنز جایگزینی هیستون‌ها با پروتئین‌های کوچکی به نام «پروتامین» برای تراکم کروماتین هسته اسپرم است تا DNA را از آسیب محافظت کند.[۱-۶] پروتامین‌ها منحصر به سلول‌های اسپرم هستند و به علت دارا بودن اسیدهای آمینه سیستئین و آرژنین دارای بار مثبت بوده و به همین دلیل موجب اتصال قوی آنها به گروه‌های منفی فسفات DNA می‌شوند.[۱و۲و۴] سیستئین‌ها با ایجاد پل‌های دی سولفیدی بین و درون پروتامین‌ها منجربه تراکم کروماتین می‌شوند. این امر موجب بلوغ اسپرم می‌شود که برای باروری و فرآیند لقاح طبیعی با تخمک امری حیاتی است.[۱و۳و۷]

عوامل آسیب رسان به ساختار کروماتین و DNA اسپرم: هنگامی که بیش از ۲۵ درصد اسپرم‌ها در یک انزال دارای DNA قطعه قطعه شده باشند؛ احتمالاً منجر به ناباروری می‌شود.[۸] میزان قطعه قطعه شدن DNA (Sperm DNA Fragmentation: SDF)، می‌تواند به دلیل عوامل اصلی شامل واریکوسل، استرس اکسیداتیو، آپوپتوز،

عدم ترمیم شکستگی رشته‌های DNA، نقص در بسته‌بندی کروماتین، کمبود پروتامین و نیز به علت عوامل خارجی مانند سن، تغییر در سبک زندگی، عفونت‌ها، قرار گرفتن در معرض زنوبیوتیک‌ها (xenobiotic) و سموم در افراد مختلف متغیر باشد.[۴و۹]

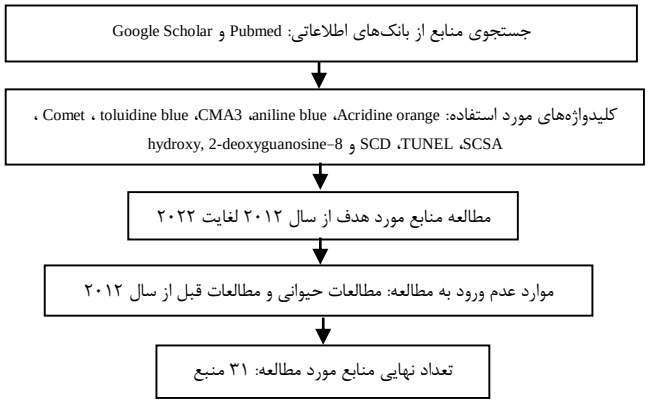
پیامدهای آسیب DNA در اسپرم: مطالعات اخیر نشان می‌دهند که افزایش SDF با ناباروری، اختلال در لقاح، سقط جنین، کاهش رشد و کیفیت جنین، میزان لانه‌گزینی، نقص مادرزادی غیرقابل توضیح فرزندان مثل کارسینومای کودکی مرتبط است.[۵-۱و۹] بین دو گروه اصلی آزمایشات سلامت کروماتین (الف: آزمایش‌های تراکم کروماتین، ب: آزمایش‌های آسیب DNA) تفاوت بسیاری وجود دارد که در ادامه به آنها اشاره خواهد شد. آزمایش‌های مربوط به تراکم کروماتین، از جمله رنگ‌آمیزی آنیلین بلو (AB)، تولوئیدین بلو (TB) و کرومایسین A3 (CMA3)، کیفیت بسته‌بندی و تراکم DNA را به دلیل جایگزینی هیستون‌ها توسط پروتامین‌ها ارزیابی می‌کند. آزمایش‌های آسیب DNA مستقیماً آسیب DNA را اندازه‌گیری می‌کنند و به دو گروه تقسیم می‌شوند.[۱] آزمایش‌های اندازه‌گیری آسیب DNA مانند آزمایش ۸-هیدروکسی-۲-دئوکسی گوانوزین (8-OHdG)، سنجش TUNEL و Comet تحت شرایط pH خنثی (آسیب DNA دو رشته‌ای)[۲] آزمایش‌هایی هستند که پتانسیل آسیب DNA (نشانه‌های ثانویه) را اندازه‌گیری می‌کنند. از جمله آنها می‌توان به SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay)، SCD (Sperm Chromatin Dispersion) و Comet تحت شرایط pH قلیایی (آسیب DNA تک رشته‌ای و دو رشته‌ای) اشاره نمود.[۳] با توجه به اهمیت سلامت کروماتین اسپرم طی لقاح و باروری، شناخت عوامل آسیب‌رسان به این ساختار و نحوه بررسی تراکم کروماتین اسپرم اهمیت به سزایی دارد. لذا در این مقاله روش‌های بررسی آسیب‌های DNA اسپرم را مرور می‌کنیم.

روش بررسی

از پایگاه‌های Pubmed و Google Scholar مقالات اصلی با کلید واژه‌های Acridine orange، aniline blue، CMA3، toluidine blue، Comet، SCSA، TUNEL، SCD و hydroxy, 2-deoxyguanosine-8 در رابطه با بررسی تست‌های عملکردی اسپرم جستجو شدند و مقالات مروری از سال ۲۰۱۲ لغایت ۲۰۲۲ میلادی که به روش‌های بررسی سلامت کروماتین اسپرم و DNA اسپرم پرداخته شده بودند؛ وارد مطالعه شدند. همچنین از اطلاعات بروز کتب بین‌المللی و نسخه ۲۰۲۱ کتاب سازمان بهداشت جهانی در رابطه با آنالیز اسپرم استفاده شد. در نهایت تعداد ۳۱ منبع مرتبط انتخاب و وارد مطالعه شدند (نمودار یک).

الف: آزمایش‌های تراکم کروماتین

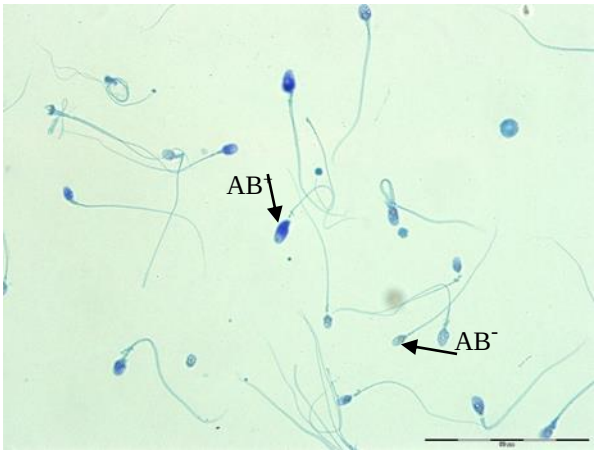
رنگ‌آمیزی آنیلین بلو (Aniline blue): آنیلین بلو بلوغ هسته اسپرم را ارزیابی می‌کند و یک رنگ اسیدی است که میل زیادی به اتصال به هیستون‌های غنی از لیزین در هسته اسپرم نابالغ دارد.[۱۰] رنگ آنیلین‌بلو نمی‌تواند به آرژنین و سیستئین موجود در پروتامین اسپرم بالغ متصل شود؛ پس این آزمایش بین هیستون و پروتامین تفاوت ایجاد می‌کند.[۱۱] در گزارش نتایج این تست AB+ نشان‌دهنده وجود هیستون اضافی در کروماتین و AB- نشان‌دهنده بلوغ طبیعی تراکم کروتامین است (شکل یک).[۱و۳و۶] مقدار حد آستانه در رنگ‌آمیزی AB برای کروماتین اسپرم با کیفیت خوب ۸۷/۲ درصد برای بلوغ کروماتین ارزیابی شده است.[۱] برای تست‌هایی که خوانش آنها به کمک میکروسکوپ است؛ با شمارش تعداد بیشتری سلول برای هر نمونه، دقت و نتیجه ارزیابی دقیق‌تر است.



نمودار ۱: نحوه انتخاب منابع

مزایا: ساده و ارزان قیمت بوده و برای آنالیز این آزمایش به میکروسکوپ ساده میدان روشن نیاز است.

معایب: شمارش نمونه‌های دارای آگلوتیناسیون اسپرمی دشوار بوده، شمارش به متصدی کار وابسته است.[۱۲] امکان ناهمگن بودن رنگ‌آمیزی لام وجود دارد.[۱و۳و۶] در مقایسه با روش فلوسایتومتری تعداد کمی از اسپرم‌ها بررسی می‌شوند.[۳]

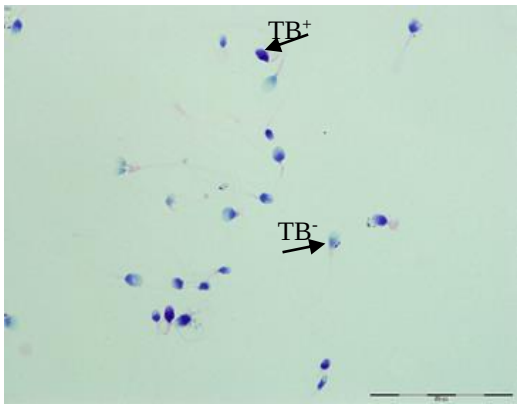


شکل ۱: رنگ‌آمیزی آنیلین بلو
AB+: وجود هیستون اضافی در کروماتین، AB-: بلوغ طبیعی تراکم کروتامین اسپرم
درشت نمایی 100x

رنگ آمیزی تولوئیدین بلو (Toluidine Blue): تولوئیدین بلو برای تشخیص کیفیت و تراکم کروماتین هسته اسپرم استفاده می‌شود و از طریق اتصال به گروه‌های فسفات DNA عمل می‌کند و حتی در صورت آسیب زیاد به DNA می‌تواند به گروه‌های فسفات آزاد DNA متصل شود و تا حدودی سلامت DNA را هم با این روش می‌توان تشخیص داد.[۴] در این شرایط اگر DNA به خوبی بسته‌بندی و متراکم شده باشد؛ تولوئیدین بلو نمی‌تواند به DNA نفوذ یابد و متصل شود و اسپرم آبی روشن دیده می‌شود. این در حالی است که اگر DNA به خوبی بسته‌بندی نشده باشد؛ تولوئیدین بلو به باقیمانده فسفات متصل شده و اسپرم به رنگ آبی تیره تا ارغوانی ظاهر می‌شود (شکل ۲).[۱۳] با کمک میکروسکوپ نوری، می‌توان حدوداً بین ۲۰۰ تا ۵۰۰ اسپرم در مناطق مختلف هر اسلاید را شمارش کرد.[۱۴]

مزایا: ساده، سریع و ارزان قیمت بوده و در رابطه با سلامت کروماتین اسپرم اطلاعات بهتری ارایه می‌دهد.

معایب: شمارش به متصدی کار وابسته است.[۳] تعداد کمی از اسپرم‌ها در مقایسه با روش فلوسایتومتری بررسی می‌گردد.[۳و۴]

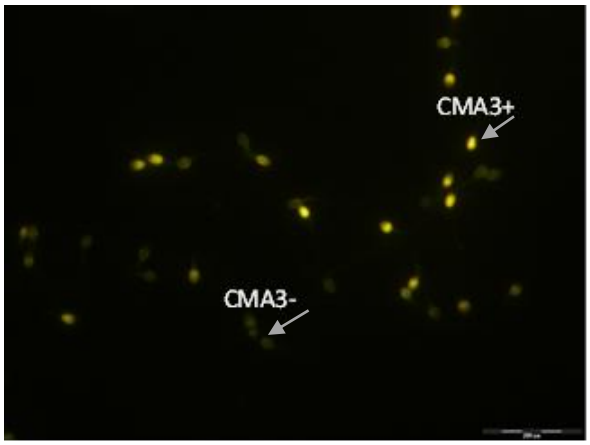


شکل ۲: رنگ آمیزی تولوئیدین بلو
+TB: بسته بندی غیر طبیعی کروماتین، -TB: بسته بندی طبیعی کروماتین
درشت نمایی 100x

رنگ‌آمیزی کرومایسین A3 (Chromomycin A3: CMA3): این روش یک ابزار قوی برای بررسی بسته‌بندی کروماتین اسپرم است که مشاهده غیر مستقیم کمبود پروتامین را امکان‌پذیر می‌کند. تجزیه و تحلیل CMA3 را می‌توان به صورت میکروسکوپی یا فلوسیتومتری ارزیابی کرد.[۱۵] این رنگ فلوئورسنت برای اتصال به شیار کوچک DNA با پروتامین رقابت می‌کند.[۱۶] هنگام اتصال این رنگ به DNA، حداکثر طول موج تحریک و انتشار به ترتیب ۴۴۵ و ۵۷۵ نانومتر است که در نتیجه دو نوع الگوی رنگ با میکروسکوپ فلورسانس مشخص می‌شود. زرد روشن بسته‌بندی غیر طبیعی کروماتین و پروتامیناسیون ناکافی DNA (CMA3+) و زرد ضعیف بسته‌بندی نرمال کروماتین (CMA3-) را نشان می‌دهد (شکل ۳).[۳و۷] مقدار حدآستانه ۱۹/۵ درصد اسپرم CMA3+ قادر به پیش‌بینی دستیابی به کیفیت جنین خوب است.[۷]

مزایا: ساده و آسان است.

معایب: نیاز به میکروسکوپ فلوئورسانس دارد. شمارش سلول در صورت تجمع اسپرم با زمینه فلورسنت دشوار است.[۱۲] شمارش تعداد اسپرم‌ها نسبت به روش فلوسایتومتری محدودیت دارد.[۳] وابسته به اپراتور است و استانداردسازی این روش بین آزمایشگاه‌های مختلف، متفاوت است.[۷]



شکل ۳: رنگ آمیزی کرومایسین A3 (+CMA3: بسته بندی غیر طبیعی کروماتین و پروتامیناسیون ناکافی، -CMA3: بسته‌بندی نرمال کروماتین)

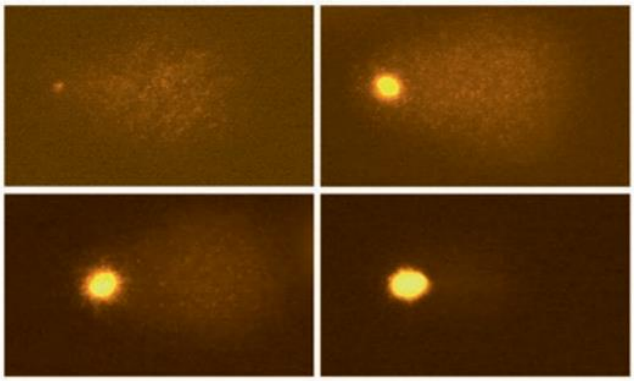
ب: تست‌های ارزیابی سلامت DNA اسپرم

Comet : از این روش برای ارزیابی رشته‌های شکسته DNA اسپرم استفاده می‌شود که به آن الکتروفورز ژل تک‌سلولی هم گفته می‌شود و جداسازی براساس بار و اندازه رشته‌های شکسته شده DNA است.[۱۷] در یک میدان الکتروفورتیک قلیایی، رشته‌های DNA شکسته باردار به سمت کاتد مهاجرت می‌کنند و رشته‌های DNA بدون بار و بدون شکستگی را پشت سر می‌گذارند.[۱۸] اسپرم‌های غیرطبیعی و دارای آسیب DNA، در زیر میکروسکوپ به صورت نقاط سبز کوچک (سر اسپرم) دیده می‌شوند و «دم دنباله‌دار» به‌صورت لکه بزرگ و پراکنده‌تری تابش می‌کند. برعکس، در اسپرم‌ها با سلامت DNA، کروماتین در سر اسپرم به صورت فشرده بوده و هاله دم‌دار به صورت بسیار جزیی دیده می‌شود و یا این که اصلاً مشاهده نمی‌شود (شکل ۴).[۱۲و۱۹] چندین مطالعه آستانه تشخیصی را مقادیر بین ۲۵ تا ۵۰ درصد گزارش کرده‌اند. با استفاده از یک نرم‌افزار مناسب Comet در هر لام پنجاه سلول دنباله‌دار انتخاب شده به صورت تصادفی شمارش می‌شود. با این حال، دنباله‌دارهایی که دم آنها همپوشانی دارند؛ محاسبه نمی‌شوند. دنباله‌دارهای فاقد سر بایستی به عنوان اسپرم با ۱۰۰ درصد آسیب DNA در نظر گرفته شوند.[۱۲]

مزایا: یکی از ساده‌ترین و حساس‌ترین روش‌ها برای اندازه‌گیری

شکستگی و آسیب DNA است.[۱۹] Comet قلیایی را می‌توان در انواع مختلف سلول از جمله اسپرم، برای جلوگیری از برچسب زدن رادیواکتیو، بررسی آسیب در سطح سلول‌های منفرد استفاده کرد.[۱۲] به تعداد کمتری سلول نیاز دارد. برای تجزیه و تحلیل آسیب و آشکارسازی رشته DNA بایستی پروتامین‌ها را حذف کرد که فقط با روش Comet امکان‌پذیر است.

معایب: برای تفسیر نتایج به تخصص بالا نیاز دارد. به‌دلیل تنوع بین آزمایشگاهی برای استفاده بالینی توصیه نمی‌گردد.[۱۲] به یک مشاهده‌گر مجرب با تجهیزات ویژه به‌منظور تفسیر نتایج با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسانس، تجزیه و تحلیل و تفسیر اسلایدها نیاز دارد.[۱۸] این آزمایش فاقد روش استاندارد بوده در نتیجه درک و ارتباط بین آزمایشگاه‌های مختلف دشوار است. دم‌های Comet از DNA مختلف اگر تداخل داشته باشد؛ ممکن است دقت سنجش را کاهش دهد و در بعضی موارد قطعات کوچک دم ممکن است از بین برود و تشخیص قطعات بسیار کوچک سخت باشد.[۲و۳و۲۰]



شکل ۴: Comet درجات مختلفی از آسیب را نشان می‌دهد که با طول و شدت دم مشخص می‌شود.

TUNEL: تشخیص رشته‌های شکسته شده DNA (DSBs) در مکان خود از طریق نشان‌دار کردن رشته‌های شکسته شده با دئوکسی نوکلئوتیدها و معمولاً دئوکسی یوریدین تری فسفات (dUTP) صورت می‌گیرد. گروه هیدروکسیل آزاد انتهای '۳ از شکست‌های رشته DNA به عنوان آغازگر عمل می‌کنند و در این روش با برومو دئوکسی یوریدین (Brd-U) در واکنشی که توسط یک DNA پلیمراز مستقل از الگو تحت عنوان دئوکسی نوکلئوتیدیل ترانسفراز انتهایی (TdT) کاتالیز می‌شود؛ نشانه‌گذاری می‌شود.[۲۱] روش TUNEL درصد سلول‌های آپوپتیک با DNA آسیب‌دیده را نشان می‌دهد. آپوپتوز در اسپرم باعث فعال شدن اندونوکلئازها می‌شود که کروماتین اسپرم را در درجه بالا تجزیه می‌کنند و به قطعات کوچکتر ۵۰ کیلو باز تبدیل می‌کند. سپس این شکستگی‌ها با FITC-dUTP برچسب‌گذاری می‌شوند که با آنزیم TdT انجام می‌شود و دئوکسی ریبونوکلئوتیدها را به انتهای 3′-OH شکست‌های تک رشته و دو رشته منتقل کرده و شدت برچسب فلوئورسنت با میکروسکوپ و فلوسایتومتری متناسب با تعداد نقاط شکست DNA بررسی می‌شوند.[۳و۵] میکروسکوپ فلوئورسانس برای اندازه‌گیری SDF در روش TUNEL استفاده می‌شود؛ اما در ده سال گذشته فلوسایتومتری محبوبیت بیشتری پیدا کرده است. با این حال به‌دلیل عدم توانایی دستگاه فلوسایتومتری در شناخت سلول‌ها و آنالیز آنها از نظر مورفولوژی، کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. از طرف دیگر چون فلوسایتومتری نمی‌تواند غلظت اسپرم پایین مثل افراد الیگوزواسپرمی را اندازه‌گیری کند؛ از میکروسکوپ فلوئورسانس استفاده می‌شود.[۳] از رنگ فلوئورسنت پروپیدیوم یدید (PI) قرمز رنگ به عنوان یک رنگ افتراقی برای شناسایی بهتر اسپرم دو رشته و طبیعی از اسپرم غیرطبیعی می‌توان استفاده نمود. اسپرم با رنگ سبز دارای DNA شکسته شده و غیرطبیعی است (شکل ۵).

مزایا: ساده‌ترین، حساس‌ترین و مطمئن‌ترین روش برای ارزیابی SDF با تنوع کم است. می‌تواند از شمارش سلول‌های غیراسپرم جلوگیری کند و سرهای پیچ خورده و بیضی شکل اسپرم توسط میکروسکوپ فلوئورسانس به وضوح قابل تشخیص است. همچنین در روش فلوسایتومتری که یک روش خودکار است؛ می‌توان ۱۰هزار سلول را در زمان کم ارزیابی کرد.[۳]

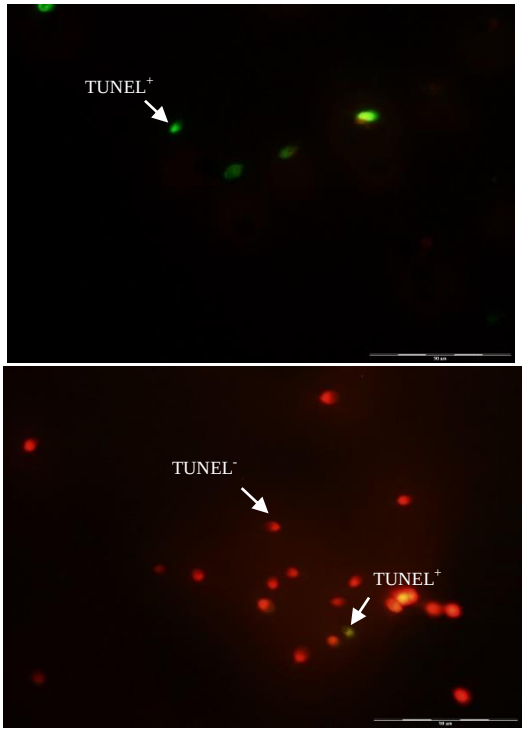
معایب: میکروسکوپ فلوئورسانس به تجربه اپراتور بستگی دارد که توانایی تشخیص رنگ‌ها را از یکدیگر داشته باشد. استفاده از میکروسکوپ برای آنالیز سریع تعداد زیادی نمونه توصیه نمی‌شود و روش غیر خودکار است. در نتیجه هنگام استفاده از میکروسکوپ فلوئورسانس زمان‌بر است و تعداد سلول‌های ارزیابی شده در این حالت بسیار کم است. همچنین روش فلوسایتومتری میتواند هزینه‌بر باشد.[۳]

۸- هیدروکسی ۲- دئوکسی گوانین (8-OHdG) : 8-OHdG یک محصول جانبی از آسیب اکسیداتیو DNA اسپرم است و معیاری برای اندازه‌گیری آسیب استرس اکسیداتیو سلولی است.[۲۲] تشکیل 8-OHdG در نمونه‌های منی باعث افزایش تکه تکه شدن DNA، عدم تراکم کروماتین و کاهش تحرک اسپرم و میزان لقاح می‌شود. به‌منظور اندازه‌گیری 8-OHdG می‌توان از میکروسکوپ نوری، میکروسکوپ فلورسانس و فلوسیتومتری استفاده نمود (شکل ۶).[۲۳و۲۴] به‌دلیل جهش‌زایی قوی، سطح بالای 8-OHdG با سقط جنین، بدشکلی جنینی و یا حتی بدخیمی در دوران کودکی همراه است.[۳]

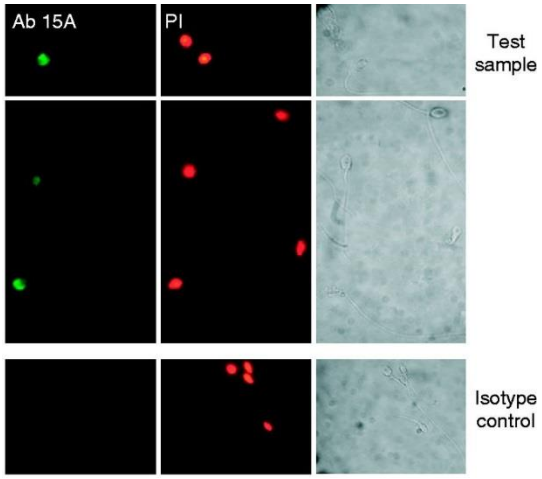
مزایا: ابزاری مطمئن و دقیق برای تعیین کمیت 8-OHdG در مایع منی است.

معایب: کاربرد آنها به عنوان یک تشخیص بالینی به‌شدت محدود و تا حدودی غیرعملی است. روش‌های دشوار و اغلب وقت‌گیر برای تکنیک‌های میکروسکوپی و فلوسیتومتری دارد و به تجهیزات

بزرگ و اغلب گران قیمت نیاز است.[۲۳]



شکل ۵: رنگ‌آمیزی به روش TUNEL (+TUNEL: دارای DNA شکسته شده و غیرطبیعی، -TUNEL: دارای DNA دو رشته و طبیعی)



شکل ۶: رنگ‌آمیزی به روش - هیدروکسی ۲- دئوکسی گوانین (8-OHdG)

سنجش ساختار کروماتین اسپرم (SCSA) (ارزیابی آسیب DNA به روش Acridine Orange با استفاده از فلوسایتومتری: در این روش رنگ AO به DNA دو رشته اضافه شده و رنگ سبز از خود ساطع می‌کند. درحالی که DNA تک رشته رنگ‌آمیزی شده با AO در معرض نور ۴۸۸ نانومتر فلوسایتومتری، از رنگ سبز به رنگ قرمز تغییر رنگ می‌دهد.[۸] آزمایش SCSA مجموع شکستگی رشته DNA اسپرم را ارزیابی می‌کند و علاوه بر شاخص DNA قطعه قطعه شده (DFI) میزان رنگ‌پذیری بالای DNA (High DNA Stainablity) که نشان‌دهنده تراکم هسته اسپرم است را نیز مشخص می‌کند.[۱۴] تجزیه و تحلیل داده‌های جمع‌آوری شده را می‌توان در هر نرم‌افزار فلوسایتومتری از جمله نرم‌افزار تجاری انجام داد.[۱۵] در رنگ‌آمیزی DNA با آکریدین اورانژ، DNA کمپلکس شده با هیستون، نسبت به DNA کمپلکس شده با پروتامین، دو تا سه برابر بیشتر رنگ می‌گیرد.[۲۴] این بخش مناطق HDS است که با افزایش هیستون با آزمایش SCSA به‌راحتی قابل تشخیص است. با توجه به مطالعات بسیاری که بر روی نمونه‌های مایع منی انسان صورت گرفته؛ این نکته حایز اهمیت است که وقتی بیش از ۲۵ درصد اسپرم (درصد DFI) در یک انزال دارای قطعه قطعه شدن DNA گزارش گردد؛ احتمال تولد نوزاد زنده به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد.[۸]

مزایا: بسیار سریع و قابل اعتماد و از نظر آماری قوی است. کل DNA قطعه قطعه شده اسپرم اندازه‌گیری می‌شود. مستقیم‌ترین روش تجزیه DNA که در آن با استفاده از نمونه منی تازه یا منجمد می‌توان داده‌های SCSA مربوط به تقریب ۵۰۰۰ اسپرم را در کمترین زمان به‌دست آورد و می‌توان مطمئن بود که همه سلول‌های مایع منی اندازه‌گیری شده و از نظر بیوشیمیایی تغییر نمی‌کنند.[۸]

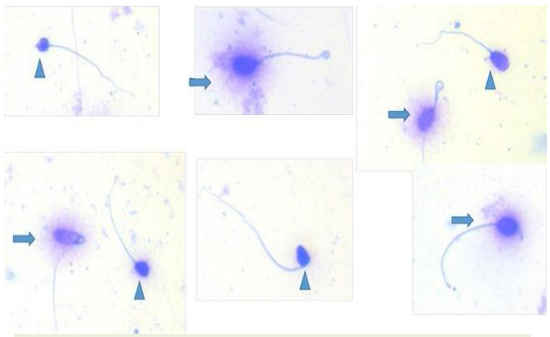
معایب: نیاز به تجهیزات گران قیمت از جمله دستگاه فلوسایتومتری دارد.

روش پراکندگی کروماتین اسپرم یا SCD یا روش HALO : این آزمایش یک روش حساس در تعیین شکستگی DNA است که اساس آن بر پایه آزمون SCSA است که با استفاده از یک محلول اسیدی رشته کروماتین باز می‌شود. وجود آسیب در DNA اسپرم با استفاده از وجود هاله محیطی که ناشی از کروماتین خارج شده از حالت متراکم است؛ در اطراف هسته اسپرم تشخیص داده می‌شود.[۳و۹] روش SCD بر این اصل استوار است که لوپ‌های سالم DNA به دنبال دناتوره شدن و استخراج پروتئین‌های هسته‌ای باز می‌شوند؛ در حالی که وقتی DNA شکسته شود؛ پراکندگی ایجاد نشده یا حداقل است. بنابراین هر چه هاله‌های اطراف سر اسپرم بزرگ یا در حد متوسط باشد؛ نشانگر سلامت DNA است. این روش به ظرفیت کروماتین سالم اسپرم برای تشکیل هاله‌های پراکندگی، پس از قرار گرفتن در معرض اسید و محلول لیز کننده متکی است. هاله‌ها مربوط به لوپ‌های DNA باز شده متصل به ساختار هسته‌ای باقی مانده است که پس از حذف پروتئین‌های هسته آزاد می‌شوند.[۱۲] این روش اجازه می‌دهد تا رنگ‌آمیزی بهتر نوکلئوتید نه تنها توسط فلوئوروکروم‌ها بلکه توسط رنگ‌های استاندارد نیز مانند روش‌های رنگ‌آمیزی Wright یا Diff-Quik ، با استفاده از میکروسکوپ پایه میدان روشن برای مشاهده هاله‌ها امکان‌پذیر شود.[۹] هاله‌های اسپرماتوزوا در نمونه‌ها را می‌توان طبق معیارهای فرناندز و همکاران به بزرگ (عرض هاله مشابه یا بزرگتر از قطر کوچک هسته)، متوسط (اندازه

هاله بین هاله‌های بزرگ و کوچک)، کوچک (عرض هاله مشابه یا کوچکتر از ۱/۳ قطر کوچک هسته)، بدون هاله، بدون هاله – تخریب شده شامل آنهایی که هیچ هاله‌ای نشان نداده و یک هسته نامنظم یا با رنگ‌آمیزی ضعیف نشان داده‌اند؛ طبقه بندی کرد (شکل ۷).[۱۲و۲۵] نتایج هر دسته‌بندی بایستی به صورت درصد گزارش شود. درصد اسپرم‌ها با DNA شکسته، مجموعه‌ای از اسپرم‌ها است که دارای هاله کوچک، بدون هاله و بدون هاله – تخریب شده، هستند.[۱۲]

مزایا: استفاده از میکروسکوپ با میدان روشن سریع، راحت، حساس و مقرون به صرفه است.[۳] شمارش ۵۰۰–۳۰۰ اسپرم، ممکن است در کمتر از یک ساعت انجام شود. از نظر فنی سختگیرانه نیست و برای دستیابی به نتایج قابل اطمینان و سازگار براحتی در هر آزمایشگاهی اجرا می‌شود.[۹] از نظر بالینی این روش پیش‌بینی خوبی برای لقاح و بارداری بعد از IVF و ICSI است.

معایب: با نتایج ART از جمله لقاح و کیفیت جنین ارتباط منفی دارد؛ اما هیچ ارتباطی با میزان حاملگی بالینی و تولد زنده نشان نمی‌دهد. پس در نتیجه می‌توان گفت این آزمایش دارای ارزش پیش‌بینی ضعیف برای کمک به نتایج باروری است.[۳] در این روش تعداد کمی از اسپرم‌ها را در مقایسه با روش فلوسایتومتری می‌توان بررسی کرد. این روش نمی‌تواند آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو را شناسایی کند.[۳و۴]



شکل ۷: روش پراکندگی کروماتین اسپرم یا SCD یا روش HALO

بحث

سلول‌های زایای نر دارای این قابلیت هستند که به طور مداوم در طول عمر باروری مرد تقسیم شوند. به دلیل عوامل مختلفی از جمله مکانیسم‌های مرتبط با سن و ویژگی‌های مختلف اسپرم‌ها مانند تجمع گونه‌های فعال اکسیژن، عدم وجود ظرفیت آنتی اکسیدانی و کمبود مکانیسم‌های ترمیم DNA در نتیجه افزایش سن پدر به احتمال زیاد قادر به افزایش احتمال خطاهای تکراری در ژرم لاین شده و در نتیجه موجب تجمع جهش‌های جدید می‌شود.[۲۶] اثر سن پدر بر سقط جنین ممکن است بیشتر به سطح سلامت DNA اسپرم مرتبط باشد. در مطالعات گوناگون سطح بالایی از DNA قطعه قطعه شده اسپرم در مردان مسن با بیش از دو برابر شاخص DNA قطعه قطعه شده (DFI) نشان داده شده است.[۲۷] شواهد محکمی وجود دارد که نشان می‌دهد افزایش سطح DNA قطعه قطعه شده اسپرم با از دست دادن بارداری (مکرر) مرتبط است.[۲۶] Aktan و همکاران غلظت بیشتری از رادیکال‌های آزاد اکسیژن را در مایع منی مردان نابارور نشان داده‌اند.[۲۸] ROS عمدتاًتوسط لکوسیت‌ها و سیتوپلاسم اسپرم تولید می‌شوند.[۲۶] غلظت بیشتر ROS می‌تواند واسطه مهم آسیب به مولکول‌های زیستی شامل لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA باشد. سه اثر عمده اثر استرس اکسیداتیو بر اسپرم شامل ایجاد DNA قطعه قطعه شده و DNA تک رشته‌ای، اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه غشایی و آسیب پتانسیل غشای میتوکندری است.[۲۹] معمولاً مقدار ROS تولید شده توسط فعالیت آنتی‌اکسیدانی متعادل می‌شود؛ اما اگر این تعادل مختل شود؛ احتمال ایجاد آسیب گسترده به DNA وجود دارد. به نظر می‌رسد مردان نابارور سطح پایین‌تری از فعالیت آنتی اکسیدانی نسبت به مردان بارور دارند.[۲۶] استفاده از استراتژی‌های متفاوت به‌منظور کاهش سطح آسیب DNA اسپرم در انسان دارای اهمیت ویژه‌ای است. آنتی‌اکسیدان‌ها مانند ویتامین‌های C و E، فولات، روی، سلنیوم، کارنتین و کاروتنوئیدها، ROS را از بین برده و به عنوان درمانی برای کاهش اثرات نامطلوب غلظت بالای ROS بر پارامترهای مایع منی است. علاوه بر آنتی‌اکسیدان‌ها، پرهیز از قرار گرفتن در معرض سموم محیطی و کاهش هیپرترمی بیضه ممکن است به بهینه‌سازی یکپارچگی DNA اسپرم کمک کند. همچنین درمان واریکوسل ممکن است آسیب DNA اسپرم را کاهش دهد. به ویژه در مردانی که دارای سطح بالایی از آسیب DNA اولیه اسپرم هستند.[۲۶] اگر آسیب DNA اسپرم تشخیص داده شود؛ چندین مداخله درمانی وجود دارد که می‌توان برای بهبود کیفیت DNA قبل از استفاده از این سلول‌ها در ART معرفی کرد. لذا می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که متخصصان ناباروری بایستی در تشخیص و اصلاح آسیب DNA اسپرم به‌عنوان بهترین روش مشارکت داشته باشند تا خطر پیامدهای نامطلوب سلامتی را در کودکانی که با استفاده از ART متولد می‌شوند را به حداقل برسانند.[۳۰و۳۱]

نتیجه‌گیری

از جمله روش‌ها و آزمایشات ذکر شده در این مقاله می‌توان به رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو (AB)، تولویدین‌بلو (TB) و رنگ‌آمیزی کرومایسین A3 (CMA3) براساس ویژگی‌های مختلف برای ارزیابی تراکم کروماتین اسپرم و به تست های ۸–هیدروکسی–۲–دئوکسی گوانوزین (8-OHdG)، TUNEL، Comet، SCSA، SCD و آکریدین‌اورانژ برای ارزیابی قطعه قطعه شدن DNA در اسپرم اشاره کرد که روش‌های بسیار کاربردی و مهم در این زمینه بوده و با

بهره‌گیری از هر کدام می‌توان تشخیص به موقع و کارایی داشت. همچنین در مقالات متاآنالیز اخیر نشان داده شده است که تست SCSA و TUNEL مورد اهمیت بیشتری قرار دارند.

References

1. Jesse JP, Dhawan V, Dada R. Chromatin Condensation: Aniline Blue Stain. In: Agarwal A, Henkel R, Majzoub A, editors. Manual of Sperm Function Testing in Human Assisted Reproduction. Cambridge: Cambridge University Press. 2021; pp: 142-50. doi: 10.1017/9781108878715.019.
2. Simon L, Emery BR, Carrell DT. DNA Damage: COMET Assay. In: Agarwal A, Henkel R, Majzoub A, editors. Manual of Sperm Function Testing in Human Assisted Reproduction. Cambridge: Cambridge University Press. 2021; pp: 202-12. doi: 10.1017/9781108878715.024.
3. Dutta S, Henkel R, Agarwal A. Comparative analysis of tests used to assess sperm chromatin integrity and DNA fragmentation. Andrologia. 2021 Mar; 53(2): e13718. doi: 10.1111/and.13718.
4. Nasr-Esfahani M, Tavalaee M. Sperm Chromatin Structure: Toluidine Blue Staining. In: Agarwal A, Henkel R, Majzoub A, editors. Manual of Sperm Function Testing in Human Assisted Reproduction. Cambridge: Cambridge University Press. 2021; pp: 156-62. doi: 10.1017/9781108878715.021.
5. Sharma R, Iovine C, Agarwal A. DNA Damage: TdT-Mediated dUTP Nick-End-Labelling Assay. Manual of Sperm Function Testing in Human Assisted Reproduction. Cambridge: Cambridge University Press. 2021; pp: 163-91. doi: 10.1017/9781108878715.022.
6. Irez T, Dayioglu N, Alagöz M, Karatas S, Güralp O. The use of aniline blue chromatin condensation test on prediction of pregnancy in mild male factor and unexplained male infertility. Andrologia. 2018 Dec; 50(10): e13111. doi: 10.1111/and.13111.
7. Marchiani S, Tamburrino L, Benini F, Pellegrini S, Baldi E. Chromatin Condensation: Chromomycin A3 (CMA3) Stain. In: Agarwal A, Henkel R, Majzoub A, editors. Manual of Sperm Function Testing in Human Assisted Reproduction. Cambridge: Cambridge University Press. 2021; pp. 151-55. doi: 10.1017/9781108878715.020.
8. Evenson D. DNA Damage: Sperm Chromatin Structure Assay: Sperm Chromatin Structure Assay Test on its Fortieth Anniversary. In: Agarwal A, Henkel R, Majzoub A, editors. Manual of Sperm Function Testing in Human Assisted Reproduction. Cambridge: Cambridge University Press. 2021; pp: 192-201. doi: 10.1017/9781108878715.023.
9. Gosálvez J, Fernández JL. DNA Damage: Halo Sperm Test. In: Agarwal A, Henkel R, Majzoub A, editors. Manual of Sperm Function Testing in Human Assisted Reproduction. Cambridge: Cambridge University Press. 2021; pp: 213-27. doi: 10.1017/9781108878715.025.
10. Sati L, Huszar G. Methodology of aniline blue staining of chromatin and the assessment of the associated nuclear and cytoplasmic attributes in human sperm. Methods Mol Biol. 2013; 927: 425-36. doi: 10.1007/978-1-62703-038-0_36.
11. Hammadeh ME, al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, Küpker D, Diedrich K, et al. The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. Hum Reprod. 1996 Nov; 11(11): 2468-71. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019139.
12. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed. 2021.
13. Ajina T, Ammar O, Haouas Z, Sallem A, Ezzi L, Grissa I, et al. Assessment of human sperm DNA integrity using two cytochemical tests: Acridine orange test and toluidine blue assay. Andrologia. 2017 Dec; 49(10). doi: 10.1111/and.12765.
14. Kim HS, Kang MJ, Kim SA, Oh SK, Kim H, Ku SY, et al. The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis. Clin Exp Reprod Med. 2013 Mar; 40(1): 23-28. doi: 10.5653/cerm.2013.40.1.23.
15. Hamilton TRDS, Assumpção MEOD. Sperm DNA fragmentation: causes and identification. Zygote. 2020 Feb; 28(1): 1-8. doi: 10.1017/S0967199419000595.
16. Fathi Z, Tavalaee M, Kiani A, Deemeh MR, Modaresi M, Nasr-Esfahani MH. Flow Cytometry: A Novel Approach for Indirect Assessment of Protamine Deficiency by CMA3 Staining, Taking into Account the Presence of M540 or Apoptotic Bodies. Int J Fertil Steril. 2011 Oct; 5(3): 128-33.
17. Gajski G, Ravlić S, Godschalk R, Collins A, Dusinska M, Brunborg G. Application of the comet assay for the evaluation of DNA damage in mature sperm. Mutat Res Rev Mutat Res. 2021 Jul-Dec; 788: 108398. doi: 10.1016/j.mrrev.2021.108398.
18. Bach PV, Schlegel PN. Sperm DNA damage and its role in IVF and ICSI. Basic Clin Androl. 2016 Dec; 26: 15. doi: 10.1186/s12610-016-0043-6.
19. Simon L, Emery B, Carrell DT. Sperm DNA Fragmentation: Consequences for Reproduction. Adv Exp Med Biol. 2019; 1166: 87-105. doi: 10.1007/978-3-030-21664-1_6.
20. Horváthová E, Dusinská M, Shaposhnikov S, Collins AR. DNA damage and repair measured in different genomic regions using the comet assay with fluorescent in situ hybridization. Mutagenesis. 2004 Jul; 19(4): 269-76. doi: 10.1093/mutage/geh030.
21. Sharma R, Iovine C, Agarwal A, Henkel R. TUNEL assay-Standardized method for testing sperm DNA fragmentation. Andrologia. 2021 Mar; 53(2): e13738. doi: 10.1111/and.13738.
22. Mukheef MA, Ali RA, Alheidery HHA. Follicular fluid 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine (8-OHdG) as biomarker for oxidative stress in intracytoplasmic sperm injection. J Med Invest. 2022; 69(1.2): 112-16. doi: 10.2152/jmi.69.112.
23. Castleton PE, Deluao JC, Sharkey DJ, McPherson NO. Measuring Reactive Oxygen Species in Semen for Male Preconception Care: A Scientist Perspective. Antioxidants (Basel). 2022 Jan; 11(2): 264. doi: 10.3390/antiox11020264.
24. Habibi M, Sadeghi N, Tavalaee M, Shahverdi A, Ghorban Z, Nasr-Esfahani MH. Sperm chromatin integrity in a man with macrocephaly syndrome. Andrologia. 2021 Aug; 53(7): e14100. doi: 10.1111/and.14100.
25. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. Fertil Steril. 2005 Oct; 84(4): 833-42. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.11.089.
26. du Fossé NA, van der Hoorn MP, van Lith JMM, le Cessie S, Lashley EELO. Advanced paternal age is associated with an increased risk of spontaneous miscarriage: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update. 2020 Sep; 26(5): 650-69. doi: 10.1093/humupd/dmaa010.
27. Plastira K, Msaouel P, Angelopoulou R, Zanioti K, Plastiras A, Pothos A, et al. The effects of age on DNA fragmentation, chromatin packaging and conventional semen parameters in spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic patients. J Assist Reprod Genet. 2007 Oct; 24(10): 437-43. doi: 10.1007/s10815-

007-9162-5.

28. Aktan G, Doğru-Abbasoğlu S, Küçükgergin C, Kadıoğlu A, Ozdemirler-Erata G, Koçak-Toker N. Mystery of idiopathic male infertility: is oxidative stress an actual risk? Fertil Steril. 2013 Apr; 99(5): 1211-15. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.11.045.

29. Sepidarkish M, Maleki-Hajiagha A, Maroufizadeh S, Rezaeinejad M, Almasi-Hashiani A, Razavi M. The effect of body mass index on sperm DNA fragmentation: a systematic review and meta-analysis. Int J Obes (Lond). 2020 Mar; 44(3): 549-58. doi: 10.1038/s41366-020-0524-8.

30. Aitken RJ, Bakos HW. Should we be measuring DNA damage in human spermatozoa? New light on an old question. Hum Reprod. 2021 Apr; 36(5): 1175-85. doi: 10.1093/humrep/deab004.

31. Tavalaee M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. Fertil Steril. 2009 Apr; 91(4): 1119-26. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.01.063.