مقاله پژوهشی

بررسی سلامت DNA اسپرم در افراد الیگوزواسپرمی مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان: یک مطالعه مقطعی

علی نصراصفهانی[×۱،۲]، کوثر پاشایی[۱،۲]، مرضیه تولائی[×۳]، پریا بهداروندیان[۴]، زهرا حکمت پژوه[۴]، محمد حسین نصراصفهانی[۵،۶]

تاریخ دریافت ۱۴۰۱/۱۲/۱۷ تاریخ پذیرش ۱۴۰۲/۰۵/۰۷

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: الیگوزواسپرمی یا کاهش غلظت اسپرم اغلب با تحرک و مورفولوژی غیرطبیعی همراه است که نشان‌دهنده عملکرد غیرطبیعی اسپرماتوژنز در بیضه است. سلامت DNA اسپرم نقش مهمی در رشد جنین و باروری دارد. بنابراین، هدف ما ارزیابی سلامت DNA اسپرم در جمعیت بزرگی از مردان اولیگوزواسپرمی و نرموزواسپرمی بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه مقطعی، ۹۶۷ نمونه الیگوزواسپرمی (تعداد اسپرم کمتر از ۳۹ میلیون در هر انزال) و ۹۶۷ نمونه نرموزواسپرمی بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی (WHO-2021) وارد شدند. آسیب DNA اسپرم با روش SCSA و TUNEL ارزیابی شد. تجزیه‌وتحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزارSPSS(نسخه ۲۲) انجام شد و سطح معنی‌داری کمتر از۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: میانگین آسیب DNA اسپرم و همچنین رنگ‌پذیری DNA در افراد الیگوزواسپرمی به‌طور معنی‌داری بیشتر از افراد نرموزواسپرمی بود ($p<0.001$). برخلاف حجم منی و تعداد اسپرم که به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($p<0.001$)، میانگین مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم در مردان اولیگوزواسپرمی نسبت به مردان نرموزواسپرمی به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($p<0.001$).

بحث و نتیجه‌گیری: در افراد الیگوزواسپرمی علاوه بر اینکه تعداد، مورفولوژی و تحرک اسپرم نیز بر اساس آستانه WHO می‌تواند غیرطبیعی باشد. همچنین آسیب DNA اسپرم نیز بطور معنی‌داری بالاست که می‌تواند نشان‌دهنده اسپرماتوژنز غیرطبیعی و عدم بلوغ اپیدیدیمی باشد. بنابراین، بر اساس شدت آسیب، بهتر است راهبردهای مصرف دارویی یا روش‌های کمک درمان را بیشتر مدیریت کرد تا بهترین تصمیم برای درمان گرفته شود.

کلیدواژه‌ها: نرموزواسپرمی، اولیگوزواسپرمی، آسیب DNA اسپرم، پارامترهای اسپرم

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و چهارم، شماره پنجم، ص ۲۶۷-۲۵۹، مرداد ۱۴۰۲

آدرس مکاتبه: اصفهان، پژوهشکده زیست فناوری جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری جانوری، تلفن: ۰۳۱۹۵۰۱۵۶۸۰
Email: tavalaee.m@gmail.com

مقدمه

الیگوزواسپرمی به‌عنوان یکی از شایع‌ترین ناهنجاری‌ها در ناباروری مردان شناخته شده است. علل الیگوزواسپرمی می‌تواند از یک دیدگاه مرتبط با سبک زندگی ازجمله سن، تغذیه، تب بالا، سیگار کشیدن، الکل و/یا استفاده از برخی داروها باشد. از طرفی هم می‌تواند مرتبط با عواملی همچون اختلالات کروموزومی، عدم تعادل هورمونی یا عفونت، ضربه به بیضه، نارسایی ثانویه بیضه، واریکوسل و بیماری‌های مقاربتی باشد. هرکدام از این عوامل می‌تواند به تنهائی و یا با یکدیگر، شدت این ناهنجاری را تغییر دهد. بنابراین، الیگوزواسپرمی ممکن است در بسیاری از اختلالات تولیدمثلی یا سیستمیک رخ دهد، و اغلب با تحرک و مورفولوژی غیرطبیعی می‌تواند همراه باشد، که منعکس‌کننده نقص‌های کمی و کیفی در

[۱] دانشجوی پزشکی، گروه زنان و زایمان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. (نویسنده مسئول)
[۲] دانشجوی پزشکی، مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران (نویسنده مسئول)
[۳] دانشیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران (نویسنده مسئول)
[۴] کارشناس ارشد، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران
[۵] استاد، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران
[۶] استاد، مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران

روند اسپرماتوژنز است. پیش‌بینی باروری طبیعی در افراد مبتلا به الیگوزواسپرمی شدید ("کریپتوزواسپرمی") که در آن اسپرم بسیار کمی دیده می‌شود، یا "آزواسپرمی" که در آن اسپرم به‌طور متناوب دیده می‌شود، احتمالاً به دلیل محدودیت تشخیص آنالیز منی، بسیار پایین است (۱، ۲).

پیشرفت‌های اخیر در طی چند دهه اخیر در درمان زوجین نابارور مانند استفاده از فن لقاح آزمایشگاهی (IVF) و مهم‌تر از آن، روش میکرواینجکشن یا تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) که تنها به تعداد کمی از اسپرم‌های زنده نیاز دارد، باعث شد تحولی عظیم در درمان ناباروری مردان با پارامترهای اسپرمی به شدت غیرطبیعی رخ دهد. با توجه به اینکه به تقریب بیش از ۹۰ درصد ناباروری با عامل مردانه یا به علت تعداد کم اسپرم در مایع منی است و یا اینکه به دلیل تولید اسپرم با کیفیت پایین مشخص می‌شود، بنابراین، برای ناباروری شدید مردان، اغلب یک درمان دارویی در نظر گرفته نمی‌شود و بیشتر درمان به سمت استفاده مستقیم زوجین از روش میکرواینجکشن سوق داده می‌شود(۳). انتخاب یک اسپرم بر اساس شکل ظاهری و حیات، و تزریق آن به داخل سیتوپلاسم تخمک، این احتمال وجود دارد که این اسپرم ازنظر سلامت DNA مشکل داشته باشد، و احتمال کاهش تکوین جنین و یا سقط افزایش یابد. بنابراین، اگرچه استفاده از روش میکرواینجکشن توانسته تاحدی به درمان زوجین نابارور با فاکتور مردانه کمک کند، ولی از طرفی به دلیل نبود سدهای انتخاب طبیعی اسپرم در آزمایشگاه مخصوصاً لایه‌های اطراف تخمک، امکان تزریق اسپرم با شکل ظاهری ولی آسیب DNA وجود دارد (۴، ۵). در این راستا، مطالعات متعددی در جمعیت‌های کم نشان داده‌اند که سطح استرس اکسیداتیو در افراد الیگوزواسپرمی به‌طور معنی‌داری بیشتر از افراد غیرالیگوزواسپرمی است (۶، ۷). بعلاوه، ارتباط معنی‌داری بین افزایش استرس اکسیداتیو و آسیب DNA اسپرم وجود دارد که پیامد نهائی آن می‌تواند افزایش عدم موفقیت فن‌های کمک باروری و حتی اثرات مخرب بر سلامت نسل بعدی داشته باشد(۱۰-۸). با توجه به اهمیت سلامت DNA اسپرم جهت تکوین جنین و باروری، در این مطالعه برای اولین بار سعی شده است که آسیب DNA اسپرم در جمعیت بزرگی از افراد الیگوزواسپرمی و نرموزواسپرمی موردبررسی و مقایسه قرار گیرد.

مواد و روش کار

تمام مواد بافرها و رنگ‌آمیزی‌ها در این مطالعه از شرکت مرک (Merck, Darmstadt, Germany) خریداری شد. فقط کیت تانل از شرکت Promega (Mannheim، آلمان)، رنگ‌آمیزی دیف کوئیک از فن‌آوری نوین قر، و محلول رنگ‌آمیزی آکریدین نارنجی از شرکت سیگما (St. Louis, USA) خریداری شد.

کد تأیید این مطالعه (IR.ACECR.ROYAN.REC.1401.031) از کمیته اخلاق علمی پژوهشگاه رویان دریافت شده است. داده‌های سن مردان، شاخص توده بدن (BMI)، پارامترهای اسپرمی و آسیب DNA اسپرم از پرونده مردان نابارور مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان در فاصله زمانی اسفندماه ۱۳۹۶تا مردادماه ۱۴۰۱جمع‌آوری شد. تعداد ۱۰۰۰۰ پرونده بررسی شد و از بین این افراد، مردان الیگوزواسپرمی و نرموزواسپرمی بر اساس آخرین ورژن WHO (۲۰۲۱) وارد مطالعه شدند. لازم به ذکر است که اطلاعات مربوط به پارامترهای اسپرمی و تست‌های DNA اسپرم این ۱۰۰۰۰ فرد در راستای اهداف متفاوتی مورد تجزیه‌وتحلیل‌های آماری مختلف قرار گرفت، که در این مطالعه تمرکز اصلی بر افراد الیگوزواسپرمی و نرموزواسپرمی است.

معیارهای ورود و خروج مطالعه:

پرونده ۱۰۰۰۰ مرد با نتایج آنالیز اسپرم و تست آسیب DNA به‌طور دقیق بررسی شد. دستورالعمل ارزیابی این پارامترها بر اساس سازمان بهداشت جهانی ۲۰۱۰ (WHO-2010) انجام شد(۱۱). انتخاب افراد الیگوزواسپرمی و نرموزواسپرمی بر اساس حدآستانه تعریف‌شده آخرین ورژن WHO (۲۰۲۱)، صورت گرفت (۱۲، ۱۳). با توجه به اینکه، بر اساس WHO، پارامتر تعداد اسپرم نسبت به غلظت اسپرم نشانگر دقیق‌تری از فعالیت بیضه و اسپرماتوژنز شخص است، بنابراین معیار انتخاب گروه الیگوزواسپرمی در این مطالعه، افرادی بودند که تعداد اسپرم (غلظت اسپرم ضربدر حجم نمونه منی) آن‌ها کمتر از ۳۹ میلیون اسپرم در هر انزال باشد. این افراد می‌توانند از تحرک و مورفولوژی طبیعی برخوردار باشند و یا حتی غیرطبیعی هم باشد. لذا ۹۶۷ فرد داری این خصوصیت بود که به‌عنوان گروه الیگوزواسپرمی در نظر گرفته شد. در رابطه با گروه نرموزواسپرمی، تعداد ۹۶۷ کیس که مشابه تعداد گروه نرموزواسپرمی باشد، به‌صورت رندوم بر اساس حدآستانه تعریف‌شده WHO-2021 انتخاب شدند که دارای تحرک اسپرم≤ ۴۲ درصد، تحرک پیش‌رونده ≤ ۳۰درصد، مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم ≥ ۹۶ درصد و تعداد کل اسپرم ≥ ۳۹ میلیون در هر انزال) باشند (۱۳) . لازم به ذکر است که در این مطالعه دو تست به‌طور هم‌زمان برای بررسی آسیب DNA اسپرم انجام شد (TUNELو SCSA). در افرادی که تعداد اسپرم و حجم نمونه منی بسیار کم بود، یکی از تست‌های DNA انجام شده است.

آنالیز نمونه اسپرمی:

نمونه‌های مایع منی، پس از ۷-۲ روز پرهیز از نزدیکی از طریق خودارضایی جمع‌آوری گردید. پس از مایع شدن مایع منی، پارامترهای کمی و کیفی نمونه منی ارزیابی گردید. غلظت اسپرم با استفاده از لام نئوبار، حجم نمونه با استفاده از وزن کردن نمونه، تحرک اسپرم به‌صورت چشمی و مورفولوژی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی دیف کوئیک (Diff-Quick) ارزیابی شد (۱۱).

ارزیابی فراگمنتاسیون DNA اسپرم به روش TUNEL:

برای بررسی فراگمنتاسیون DNA اسپرم، کیت تانل از شرکت Promega (Mannheim، آلمان) خریداری شد. قسمتی از نمونه منی با بافر فسفات سالین شسته شد. سپس، غلظت اسپرم به‌طور دقیق شمارش گردید و برای هر نمونه بین ۲ تا ۴ میلیون اسپرم جداسازی گردید. نمونه اسپرمی با پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه تثبیت شدند. سپس، نمونه‌ها با بافر فسفات سالین شسته، و به مدت۵ دقیقه در ۰/۲ درصد تریتون Triton X-100 جهت نفوذپذیری غشاء گذاشته شد. در مرحله بعد، رنگ‌آمیزی DNA اسپرم طبق دستورالعمل پروتکل شرکت سازنده کیت انجام شد. درنهایت از غلظت نهائی 1 µg/mL رنگ هسته‌ای پروپیدیوم یدید برای شمارش سلول‌ها استفاده گردید. در این روش، از دستگاه فلوسایتومتری (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) برای بررسی فراگمنتاسیون DNA اسپرم استفاده گردید. برای هر نمونه، حداقل ۱۰۰۰۰ اسپرم شمارش، و درصد فراگمنتاسیون DNA اسپرم در جمعیت سلول‌های پروپیدیوم یدید مثبت گزارش شد.

ارزیابی فراگمنتاسیون DNA اسپرم به روش SCSA:

ارزیابی فراگمنتاسیون DNA اسپرم بر اساس پروتکل ایونسون (۲۰۱۳) انجام 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) قرار داده شد. سپس، محلول اسید دترژنت اضافه، و به دنبال آن محلول رنگ‌آمیزی آکریدین نارنجی (Sigma, St. Louis, USA) اضافه گردید. بررسی فراگمنتاسیون DNA اسپرم از طریق دستگاه فلوسایتومتری (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) انجام شد. برای هر نمونه حداقل ۱۰۰۰۰ اسپرم توسط فلوسایتومتری شمارش شد و نتیجه به‌عنوان درصد شاخص فراگمنتاسیون DNA (DFI) و رنگ‌پذیری بالای DNA (HDS%) ارائه شد (۱۴).

تحلیل آماری:

تجزیه‌وتحلیل‌های آماری با استفاده از SPSS نسخه ۲۰ IBM (Corp., Armonk, NY, USA) انجام شد. از آمار توصیفی برای توصیف پارامترهای اسپرمی و تست‌های DNA اسپرم استفاده شد. از برآورد ضریب همبستگی پیرسون، برای بررسی ارتباط بین متغیرهای مطالعه استفاده گردید. برای مقایسه پارامترهای اسپرم و تست‌های DNA اسپرم بین دو گروه الیگوزواسپرمی و نرموزواسپرمی، آزمون t نمونه مستقل بکار برده شد. سطح معنی‌داری آماری $P < ۰/۰۵$ تعریف شد.

یافته‌ها

در این مطالعه از ۹۶۷ فرد الیگوزواسپرمی که تعداد کل اسپرم آن‌ها از ۳۹ میلیون در هر انزال کمتر بود و ۹۶۷ کیس نروموزواسپرمی که دارای پارامترهای اسپرمی تعداد، تحرک و مورفولوژی طبیعی بودند، استفاده شد. میانگین سن این افراد ۳۷/۶±۵۲/۱ در گروه الیگوزواسپرمی و ۳۷/۶۹±۶/۱ در گروه نروموزواسپرمی بود که در سطح آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (P= ۰ /۵۶).

در رابطه با پارامترهای اسپرمی، مقایسه میانگین حجم نمونه اسپرمی، غلظت، تعداد و مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم بین دو گروه انجام شد که نتایج در شکل ۱ گزارش شده است. میانگین حجم نمونه اسپرمی، غلظت اسپرم و تعداد کل اسپرم به‌طور معنی‌داری در گروه الیگوزواسپرمی نسبت به گروه نروموزواسپرمی کاهش یافت (P<0/001). درحالی‌که، درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم به‌طور معنی‌داری در افراد الیگوزواسپرمی بیشتر از افراد نروموزواسپرمی بود (P<0/001).

در رابطه با پارامترهای تحرک اسپرم بین دو گروه مطالعه، درصد تحرک اسپرم، درصد تحرک پیش‌رونده اسپرم و درصد تحرک غیر پیش‌رونده اسپرم در افراد الیگوزواسپرمی به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از افراد نروموزواسپرمی بود (P<0/001). درحالی‌که درصد اسپرم غیر متحرک در افراد الیگوزواسپرمی به‌طور معنی‌داری بیشتر از افراد نروموزواسپرمی بود (P<0/001) (جدول ۱).

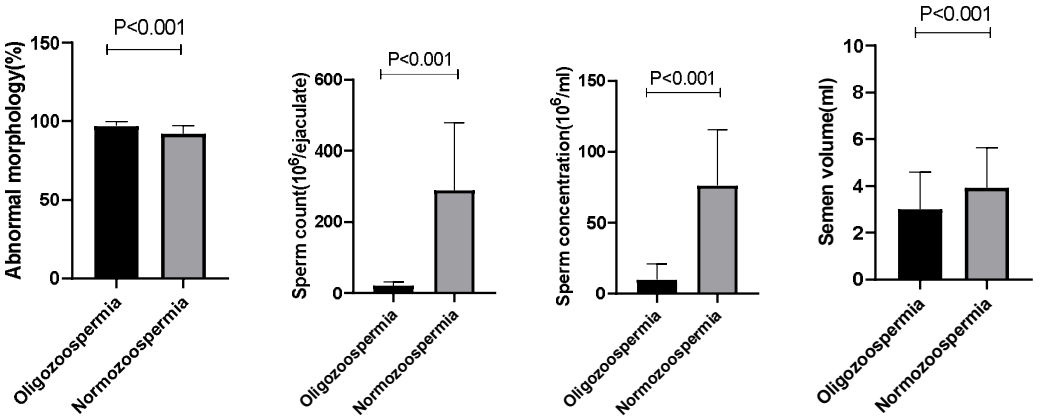
جدول (۱): مقایسه پارامترهای تحرک اسپرم بین افراد الیگوزواسپرمی و افراد نرموزواسپرمی.

پارامترهای مطالعه	میانگین ± انحراف معیار		سطح معنی‌داری
	الیگوزواسپرمیا	نرموزواسپرمیا	
تعداد کل تحرک (٪)	۱۸/۳۶ ±۲۴/۶۶	۱۲/۴۴ ±۶۳/۵۰	P<۰/۰۰۱
تعداد کل حرکت پیش‌رونده (٪)	۱۲/۴۴ ±۱۲/۹۸	۹/۴۶ ±۴۳/۱۹	P<۰/۰۰۱

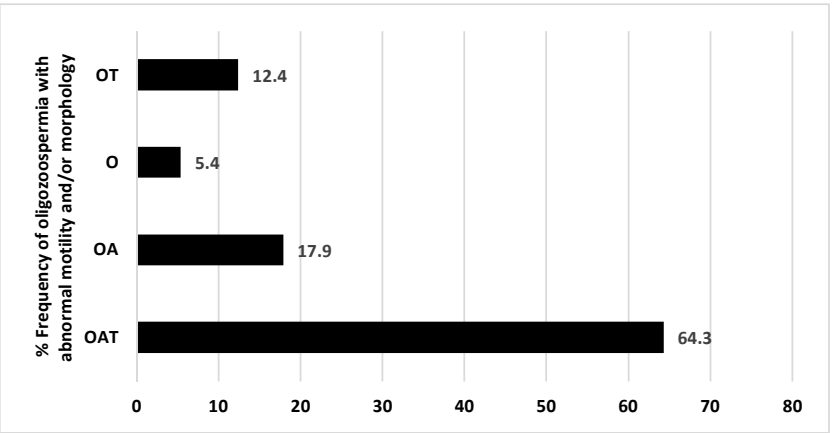
پارامترهای مطالعه	میانگین ± انحراف معیار		سطح معنی‌داری
	الیگوزواسپرمیا	نرموزواسپرمیا	
حرکت غیر پیش‌رونده (٪)	۱۱/۶۷ ±۱۱/۴۳	۹/۶۱±۲۰/۳۱	P<۰/۰۰۱
بدون تحرک (٪)	۱۸/۳۶ ±۷۵/۳۴	۱۲/۴۴ ±۳۶/۴۹	P<۰/۰۰۱

با توجه به اینکه معیار اصلی انتخاب افراد الیگوزواسپرمی، بر اساس تعداد اسپرم کمتر و بیشتر از ۳۹ میلیون در هر انزال بود، نتایج پارامترهای اسپرمی نشان می‌دهد که حجم نمونه اسپرمی، حرکت و مورفولوژی هم در این افراد تحت تأثیر است. لذا درصد فراوانی افراد الیگوزواسپرمی که با تحرک و یا مورفولوژی غیرطبیعی همراه بودند نیز، بررسی گردید. بر اساس سازمان بهداشت جهانی(۲۰۲۱)، واژه تراتوزواسپرمی زمانی اطلاق می‌شود که درصد مورفولوژی طبیعی اسپرم کمتر از ۴ درصد، و واژه آستنوزواسپرمی برای افراد با درصد تحرک کمتر از ۴۲ درصد است. از بین ۹۶۷ فرد الیگوزواسپرمی، ۵/۴ درصد (۵۲ کیس) فقط الیگوزواسپرمی، ۱۷/۹ درصد (۱۷۳کیس) الیگوآستنوزواسپرمی، ۶۴/۳ درصد (۶۲۲کیس) الیگوآستنوتراتوزواسپرمی و ۱۲/۴ درصد (۱۲۰کیس) الیگوتراتوزواسپرمی بودند (شکل ۲).

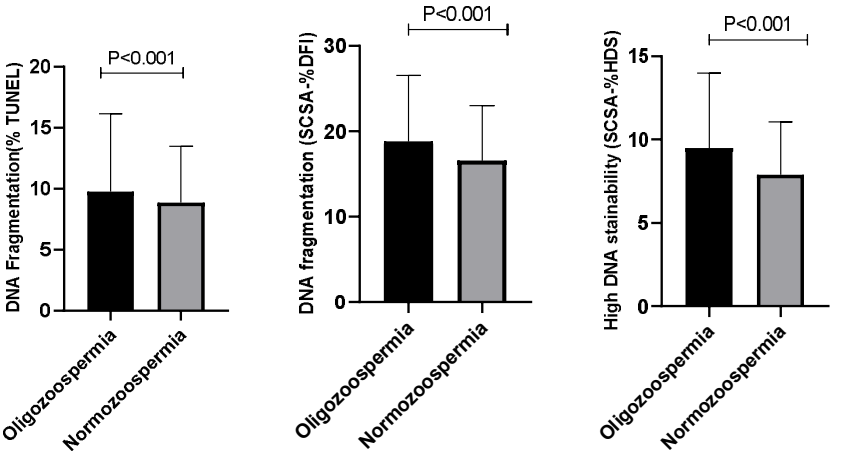
در این مطالعه، وضعیت سلامت DNA اسپرم با استفاده از دو تست SCSA و TUNEL بررسی گردید. نتایج در شکل ۳ نشان داده‌شده میانگین آسیب DNA اسپرم و همچنین شدت رنگ‌پذیری DNA (HDS%) در افراد الیگوزواسپرمی به‌طور معنی‌داری بیشتر از افراد نروموزواسپرمی بود (P<0.001).



شکل (۱): مقایسه میانگین حجم نمونه اسپرمی، غلظت، تعداد و مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم بین افراد الیگوزواسپرمی و نرموزواسپرمی.



شکل (۲): مقایسه درصد فراوانی افراد الیگوزواسپرمی با مورفولوژی و یا تحرک اسپرم غیرطبیعی.



شکل (۳): مقایسه میانگین درصد آسیب DNA اسپرم ارزیابی‌شده با استفاده تست TUNEL، درصد آسیب DNA اسپرم ارزیابی‌شده با استفاده تست SCSA (DFI) و شدت رنگ‌پذیری DNA (HDS%) بین افراد الیگوزواسپرمی و نرموزواسپرمی.

بحث و نتیجه‌گیری

پتانسیل باروری مردان معمولاً بر اساس دستورالعمل‌های WHO(2021) برای حجم مایع منی، غلظت اسپرم، تعداد کل اسپرم، تحرک پیش‌رونده و تحرک کل ارزیابی می‌شود. بااین‌حال، تقریباً ۱۵ درصد از مردان نابارور دارای پارامترهای اسپرمی غیرطبیعی هستند، که این پارامترها ارزش پیش‌بینی نسبتاً پایینی برای پتانسیل باروری اسپرم و نتایج تولیدمثل دارند و تشخیص قطعی ناباروری مردانه را نمی‌توان تنها با تجزیه و ,; معمول منی انجام داد (۱۵، ۱۶). در تأیید این مطلب، گزارش شده است که در مردان نابارور با مورفولوژی ظاهراً طبیعی ممکن است آسیب DNA وجود داشته باشد (۴). لذا عوامل متعددی غیر از پارامترهای معمولی مایع منی می‌تواند بر توانایی لقاح اسپرم تأثیر گذارد (۱۵، ۱۶). سلامت DNA اسپرم یکی از آن عوامل است که برای انتقال دقیق اطلاعات ژنتیکی از پدر به فرزندان ضروری است. در این راستا، مطالعات متعددی نشان داده‌اند که افزایش درصد آسیب DNA اسپرم در نمونه اسپرمی افراد کاندید روش ICSI یا میکرواینجکشن منجر به کاهش نتایج کلینیکی در درمان شده است. به‌گونه‌ای که کاهش درصد لقاح، کاهش تکوین جنین و کاهش میزان حاملگی گزارش شده است (۱۷، ۱۸). بعلاوه، مطالعات متعددی هم گزارش کرده‌اند یکی از علل سقط مکرر جنین در خانم‌ها می‌تواند مرتبط با افزایش سطح آسیب DNA اسپرم باشد (۱۶). در مقابل، کمیته انجمن پزشکی تولیدمثل آمریکا (ASRM) صرف‌نظر از تأیید رابطه بین آسیب DNA اسپرم و سایر پارامترهای مایع منی، بیان می‌کند که شواهد کافی برای توصیه تست سلامت DNA اسپرم به‌عنوان یک آزمایش معمول در ارزیابی و درمان زوج‌های نابارور وجود ندارد و مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است (۱۹). بر این اساس، در این مطالعه برای اولین بار، پارامترهای اسپرمی و آسیب DNA اسپرم با استفاده دو روش معتبر SCSA و TUNEL در افراد الیگوزواسپرمی در یک جمعیت به‌تقریب ۱۰۰۰ نفری و همچنین در مردان نابارور نرموزواسپرمی با تعداد مشابه مردان الیگوزواسپرمی، موردبررسی قرار گرفت. نتایج بیانگر آن است که میانگین پارامترهای منی ازجمله حجم نمونه، غلظت اسپرم، تعداد اسپرم، درصد تحرک اسپرم، و درصد تحرک پیش‌رونده اسپرم به‌طور معنی‌داری در افراد الیگوزواسپرمی پایین‌تر از افراد نرموزواسپرمی بود. بعلاوه، میانگین درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم در افراد الیگوزواسپرمی به‌طور معنی‌داری بیشتر از افراد نرموزواسپرمی بود. این نتایج به‌وضوح نشان می‌دهد که فرایند تولید، تمایز و بلوغ اسپرم در افراد الیگوزواسپرمی به‌شدت تحت تأثیر است. از دیدگاه دیگر، آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد که از جمعیت ۹۶۷ افراد الیگوزواسپرمی، تنها ۵/۴ درصد دارای تحرک و مورفولوژی طبیعی هستند، این در حالی است که ۱۷/۹ درصد دارای تحرک غیرطبیعی، ۶۴/۳ درصد دارای تحرک و مورفولوژی غیرطبیعی و ۱۲/۴ درصد فقط مورفولوژی غیرطبیعی بودند. از این آمار می‌توان به این نتیجه رسید که بر اساس اولویت فراوانی، درصد بی‌شماری از افراد الیگوزواسپرمی دارای مورفولوژی و تحرک غیرطبیعی، سپس افراد الیگوزواسپرمی دارای تحرک غیرطبیعی، بعد افراد الیگوزواسپرمی دارای مورفولوژی غیرطبیعی و درنهایت افراد الیگوزواسپرمی که تحرک و مورفولوژی طبیعی دارند،

قرار گرفتند. بنابراین، در افراد الیگوزواسپرمی علاوه بر آنکه در بیضه، تعداد اسپرم کمی تولید می‌شود و این اسپرم‌ها ازنظر شکل ظاهری طبیعی نیستند، در طی عبور از اپیدیدیم هم که تحرک اسپرم کسب می‌شود، این افراد مشکل دارند. یک علتی که در مقالات گزارش شده است افزایش سطح استرس اکسیداتیو در افراد الیگوزواسپرمی می‌باشد (۶، ۷). افزایش استرس اکسیداتیو علاوه بر آنکه می‌تواند بر سلامت غشاء اسپرم تأثیر گذارد و منجر به کاهش درصد تحرک اسپرم گردد، می‌تواند منجر به آسیب DNA اسپرم گردد. نتایج این مطالعه نشان داد که درصد آسیب DNA اسپرم با استفاده از هر دو روش SCSA و TUNEL در مردان الیگوزواسپرمی به‌طور معنی‌داری بیشتر از مردان نرموزواسپرمی شد. در این راستا، مطالعات کمی وجود دارد که آسیب DNA اسپرم را در افراد الیگوزواسپرمی بررسی کرده باشند ولی Agarwal و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند در همه گروههای الیگوزواسپرمی که مورفولوژی و تحرک غیرطبیعی و یا طبیعی بوده است، سطح استرس اکسیداتیو به‌طور معنی‌داری بیشتر از افراد بارور است. بعلاوه، Verdi و همکاران (۲۰۲۱) هم نشان دادند که ارتباط معنی‌داری بین آسیب DNA اسپرم با بسته بندی غیرطبیعی کروماتین اسپرم در افراد الیگوزواسپرمی وجود دارد (۲۰). بنابراین، علاوه بر افزایش سطح استرس اکسیداتیو، بسته بندی نامناسب کروماتین اسپرم طی فرایند اسپرمیوژنز در بیضه، می‌تواند اسپرم را مستعد آسیب DNA نماید. هم راستا با این توجیه، نتایج مطالعه کنونی نشان می‌دهد که میانگین درصد HDS در افراد الیگوزواسپرمی به‌طور معنی‌داری بالاتر از افراد نرموزواسپرمی است. برخی مطالعات HDS را به‌عنوان یک نشانگری از بلوغ تراکم هسته معرفی کرده‌اند (۲۱، ۲۲). در صورتی که، Mohammadi و همکاران ارتباط ضعیفی را بین درصد HDS و تست‌های تراکم کروماتین اسپرم گزارش نمودند(۲۳). اخیراً یک مطالعه گزارش کرده است که HDS را نمی‌توان به‌عنوان یک مارکر تشخیص آسیب DNA اسپرمی در نظر گرفت (۲۴). با اینحال، Booze و همکاران نشان دادند که HDS بیش از ۲۵ درصد، خطر سقط‌جنین و کاهش تولد زنده را به همراه دارد (۲۵). بنابراین، نتایج مطالعه کنونی مبنی بر افزایش درصد HDS در افراد الیگوزواسپرمی نسبت به افراد نرموزواسپرمی می‌تواند به‌عنوان یک پیامد منفی محسوب گردد که این احتمال وجود دارد که افزایش بیش از حد آن می‌تواند نتایج درمان ناباروری آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. مطالعات متعددی در راستای درمان افراد الیگوزواسپرمی انجام شده که برای افراد الیگوزواسپرمی شدید، از اسپرم بیضه به جای اسپرم انزالی در طی روش ICSI استفاده می‌کنند (۲۶، ۲۷) که به احتمال یکی از فواید آن، در معرض گیری کمتر اسپرم در برابر استرس اکسیداتیو در مسیر عبور اسپرم در دستگاه تناسلی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در افراد الیگوزواسپرمی، علاوه بر تعداد، تحرک اسپرم هم می‌تواند بر اساس حدآستانه WHO در محدوده غیرطبیعی باشد، آسیب DNA اسپرم نیز بالاست که می‌تواند نشانگری از فرآیند اسپرماتوژنز غیرطبیعی و عدم بلوغ اپیدیدیمی باشد. بنابراین، بر اساس شدت آسیب، بهتر است برای راهکارهای استفاده دارویی و یا روش‌های کمک درمانی مدیریت بیشتری کرد که بهترین تصمیم برای درمان گرفته شود. مطالعات بیشتری در آینده نیاز است که تأثیر استفاده آنتی اکسیدانت ها یا مکمل‌ها را بر روند بهبودی فرایند اسپرماتوژنز و نتایج درمان باروری درک نمود. یکی از محدودیت‌های این مطالعه این بود که در برخی از افراد الیگوزواسپرمی به دلیل اینکه تعداد اسپرم و حجم نمونه منی بسیار کم بود، به‌طور هم‌زمان دو تست آسیب DNA اسپرم (TUNELو SCSA) انجام نشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مسئولین و کارکنان پژوهشکده زیست فناوری جانوری رویان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان سپاسگزار هستند.

References:

1. McLachlan RI. Approach to the patient with oligozoospermia. J Clin Endocrinol Metab 2013;98(3): 873-80. doi: 10.1210/jc.2012-3650.
2. Cooper TG, Hellenkemper B, Jonckheere J, Callewaert N, Grootenhuis AJ, Kersemaekers WM, et al. Azoospermia: virtual reality or possible to quantify? J Androl 2006;27(4): 483-90. doi: 10.2164/jandrol.05210.
3. Song SH, Bak CW, Lim JJ, Yoon TK, Lee DR, Kwon SW. Natural course of severe oligozoospermia in infertile male: influence on future fertility potential. J Androl 2010;31(6): 536-9. doi: 10.2164/jandrol.110.010199.
4. Avendaño C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. Fertil Steril 2009;91(4): 1077-84. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.01.015.
5. Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR, Tavalaee M.

Manual for Human Semen Analysis: A Critical Review and SWOT Analysis. Life (Basel). 2021;11(12): 1368. doi: 10.3390/life11121368.

14. Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA®). Methods Mol Biol 2013;927: 147-64. doi: 10.1007/978-1-62703-038-0_14.
15. Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. Fertil Steril 2005;84(4): 850-3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.03.080.
16. Dai Y, Liu J, Yuan E, Li Y, Shi Y, Zhang L. Relationship Among Traditional Semen Parameters, Sperm DNA Fragmentation, and Unexplained Recurrent Miscarriage: A Systematic Review and Meta-Analysis. Front Endocrinol 2022;12: 802632. doi: 10.3389/fendo.2021.802632.
17. Chen Q, Li D, Cheng J, Xue L, Li J. Influence of the sperm DNA fragmentation index on the outcome of rescue ICSI and the clinical value of rescue ICSI. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2022;47(1): 63-71. English, Chinese. doi: 10.11817/j.issn.1672-7347.2022.210021.
18. Ribas-Maynou J, Novo S, Torres M, Salas-Huetos A, Rovira S, Antich M, et al. Sperm DNA integrity does play a crucial role for embryo development after ICSI, notably when good-quality oocytes from young donors are used. Biol Res 2022; 55(1): 41. doi: 10.1186/s40659-022-00409-y.
19. Ribas-Maynou J, Yeste M, Becerra-Tomás N, Aston KI, James ER, Salas-Huetos A. Clinical implications of sperm DNA damage in IVF and ICSI: updated systematic review and meta-analysis. Biol Rev Camb Philos Soc 2021;96(4): 1284-300. doi: 10.1111/brv.12700.
20. Verdi A, Nasr-Esfahani M H, Forozanfar M, Tavalaee M. Correlation of Sperm Parameters With Sperm DNA Damage or Sperm Nucleus Chromatin Status in Oligospermic Individuals Referred to Qom Jihad Daneshgahi Infertility

New era in sperm selection for ICSI. Int J Androl 2012;35(4): 475-84. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01227.x.

6. Kullisaar T, Türk S, Kilk K, Ausmees K, Punab M, Mändar R. Increased levels of hydrogen peroxide and nitric oxide in male partners of infertile couples. Andrology 2013;1(6): 850-8. doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00123.x.
7. Agarwal A, Mulgund A, Sharma R, Sabanegh E. Mechanisms of oligozoospermia: an oxidative stress perspective. Syst Biol Reprod Med 2014;60(4): 206-16. doi: 10.3109/19396368.2014.918675.
8. Borges E Jr, Zanetti BF, Setti AS, Braga DPAF, Provenza RR, Iaconelli A Jr. 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): 483-490. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.04.029.
9. 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. doi: 10.1146/annurev-genet-112618-043617.
10. 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): 109-124. doi: 10.1016/j.rbmo.2022.03.012.
11. World Health Organization (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. World Health. Organization.
12. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 6th ed. WHO Press; Geneva, Switzerland: 2021.
13. Boitrelle F, Shah R, Saleh R, Henkel R, Kandil H, Chung E, et al. The Sixth Edition of the WHO

Treatment Center in 2017 (Iran). Qom Univ Med Sci J 2021;15(3): 222-9.

21. Jerre E, Bungum M, Evenson D, Giwercman A. Sperm chromatin structure assay high DNA stainability sperm as a marker of early miscarriage after intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2019;112(1): 46-53. e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.03.013.
22. Evenson DP, Djira G, Kasperson K, Christianson J. Relationships between the age of 25,445 men attending infertility clinics and sperm chromatin structure assay (SCSA®®) defined sperm DNA and chromatin integrity. Fertil Steril 2020;114(2): 311-20. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.03.028.
23. Mohammadi Z, Tavalaee M, Gharagozloo P, Drevet JR, Nasr-Esfahani MH. Could high DNA stainability (HDS) be a valuable indicator of sperm nuclear integrity? Basic Clin Androl 2020;30: 12. doi: 10.1186/s12610-020-00110-8.
24. Lu JC. High DNA stainability (HDS) should not be recommended as a marker for the detection of sperm DNA damage. Andrologia 2022;54(7): e14442. doi: 10.1111/and.14442.
25. Booze M, Brannian J, Von Wald T, Hansen K, Kasperson K, Evenson DP. High DNA stainability in the SCSA® is associated with poor embryo development and lower implantation rate. BioMed Online 2019;39: e3-4.
26. Thornhill JA, Fanning DM, Davis NF, Ward F, Shamoun O, Brinsden P. Testicular Sperm Extraction and Intracytoplasmic Sperm Injection: Outcomes in a specialist fertility centre. Iran Med J 2015;108(9): 263-5.
27. Alkandari MH, Moryousef J, Phillips S, Zini A. Testicular Sperm Aspiration (TESA) or Microdissection Testicular Sperm Extraction (Micro-tese): Which Approach is better in Men with Cryptozoospermia and Severe Oligozoospermia? Urology 2021;154: 164-9. doi: https: //doi.org/10.1016/j.urology.2021.04.037

Studies in Medical Sciences, Vol. 34(5), August 2023

Original Article

ASSESSMENT OF SPERM DNA INTEGRITY IN OLIGOZOOSPERMIC INDIVIDUALS REFERRED TO ISFAHAN FERTILITY AND INFERTILITY CENTER: A CROSS-SECTIONAL STUDY

Ali Nasresfahani[1,2], kosar Pashae[1,2], Marziyeh Tavalaee[3], Paria Behdarvandiyan[4], Zahra Hekmatpazhooh[4], Mohammad Hossein Nasr-Esfahani[5,6]*

Received: 03 March, 2023; Accepted: 29 July, 2023

Abstract

Background & Aims: Oligozoospermia or reduced sperm concentration is often associated with abnormal motility and morphology, reflecting abnormal spermatogenesis in the testes. The sperm DNA integrity plays an important role in embryo development, and fertility. Therefore, we aimed to assess sperm DNA integrity in a population of oligozoospermic and normozoospermic men.

Materials & Methods: In this cross-sectional study, 967 oligozoospermic samples (sperm count lower than 39 million per ejaculation), and 967 normozoospermic samples according to World Health Organization criteria were included. Sperm DNA damage was assessed by SCSA and TUNEL assays. Statistical analyzes were performed using SPSS version 22 software and a significance level of less than 0.05 was considered.

Results: Mean sperm DNA damage and also DNA stainability were significantly higher in oligozoospermic individuals than them in normozoospermic individuals (Ps<0.001). Unlike semen volume and sperm count which was significantly lower (P<0.001), the mean of sperm abnormal morphology was significantly higher in oligozoospermic men compared to normozoospermic men (P<0.001).

***Conclusion*:** In individuals with oligozoospermia, in addition to the count, morphology and motility of sperm can also be abnormal according to the WHO threshold. Also, sperm DNA damage is significantly high, which can indicate abnormal spermatogenesis and epididymal immaturity. Therefore, depending on the severity of the damage, it is preferable to manage therapeutic interventions, such as drug therapies or assisted reproductive techniques, in order to make the best decisions regarding treatment.

Keywords: Normozoospermia, Oligozoospermia, Sperm DNA damage, Sperm Parameters

Address: Royan Research Institute, Jihad University Biotechnology Research Center, Reproductive Medicine Research Center, Department of Animal Biotechnology, Isfahan, Iran
Tel: +983195015680
Email: tavalaee.m@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2023: 34(5): 267 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] *Medical student, Department of Gynecology and Obstetrics, Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences Unit, Tehran, Iran (Corresponding Author)*
[2] *Medical students, Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran (Corresponding Author)*
[3] *Associate Professor, Royan Research Institute, Jihad University Biotechnology Research Center, Reproductive Medicine Research Center, Department of Animal Biotechnology, Isfahan, Iran (Corresponding Author)*
[4] *Master's degree, Royan Research Institute, Jihad University Biotechnology Research Center, Reproductive Medicine Research Center, Department of Animal Biotechnology, Isfahan, Iran*
[5] *Professor, Royan Research Institute, Jihad University Biotechnology Research Center, Reproductive Medicine Research Center, Department of Animal Biotechnology, Isfahan, Iran*
[6] *Professor, Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran*