آسیب‌های زمینه DNA در اسپرم‌های افراد سالم و نابارور با استفاده از روش سنجش ستاره دنباله‌دار

دکتر حسین مزدارانی[۱*]، ستاره خشای[۲]

۱- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس ۲- پژوهشکده رویان، تهران

Title: *Study of baseline DNA damage in the sperms of fertile and infertile men using comet assay.*

Authors: *Mozdarani H, (PhD); Khashaee S, (MSc).*

Introduction: *Male infertility constitutes the primary cause of infertility for up to 30% of couples amongst many other reasons. Genetic disorders are too important because DNA integrity in sperm is necessary for having healthy next generation. The aim of this study was to evaluate the baseline DNA damage in sperm samples obtained from normal and infertile individuals.*

Methods: *Baseline DNA damage in spermatozoa from fertile (n=30) and infertile (n=90) individuals was compared using a modified alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay).This technique was used to assess DNA integrity in the cells by measuring damages reflected as strand break under alkaline conditions. The cells were embedded in agarose on glass slides followed by lysis of the cell membranes after which, damaged DNA strands migrate under electrophoresis from nucleus towards the anode and deposited to one side giving the appearance of a tail. DNA damage in each group was calculated following visual observation and grading of comets under a fluorescence microscope. The significance of inter-group differences was statistically evaluated using analysis of variance (ANOVA) and Post hoc tests.*

Results: *Results indicate that the average DNA damage in normal sample is less than any other groups. Samples from oligospermic, oligoasthenospermic and asthenospermic patients showed various degrees of DNA damage significantly different from normal ($p<0.05$). The highest degree of DNA damage was seen in asthenospermic samples.*

Conclusion: *DNA damage in infertile individuals is found to be higher than normal. The reason for this observation may be due to a deficiency in antioxidants which is essential present during spermatogenesis. The presence of antioxidants prevents DNA damages in sperms due to oxidative agents.*

Keywords: *Spermatozoa, male, DNA damage, comet assay, infertility.*

Hakim 2005; 8(2); 17-24.

*- نویسنده مسئول: گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، ص پ ۱۱۱-۱۴۱۱۵، نمابر ۸۸۰۰۶۵۴۴ یا ۸۸۰۱۳۰۳۰ E.mail: mozdarah@modares.ac.ir

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-11-22]

چکیده:

مقدمه: *ناباروری در مردان، عامل ۳۰٪ ناباروری زوجین در بین دلایل دیگر می‌باشد. اختلال در مواد ژنتیکی حایز اهمیت است زیرا موجب انتقال ناقص اطلاعات وراثتی به جنین می‌شود. به همین دلیل، حفظ تمامیت و صحت* DNA *درهسته اسپرم، برای انتقال تمام و کمال ماده وراثتی از نسلی به نسل دیگر بسیار مهم است. هدف از این تحقیق ارزیابی و مقایسه میزان آسیب زمینه در*DNA *اسپرم چهار گروه افراد سالم و نابارور بوده است.*

روش‌کار: *به این منظور نمونه اسپرم ۳۰ نفر ازهر گروه (مردان سالم و سه گروه از مردان نابارور) با روش سنجش ستاره دنباله‌دار* (Comet assay) *قلیایی مورد بررسی قرار گرفت. در این روش، ابتدا سلول‌ها در بستری از ژل‌آگارز روی لام قرار گرفته و پس از لیز در بافردر شرایط قلیایی الکتروفورز شدند.* DNA *آسیب دیده، تحت جریان الکتروفورز به سمت آند مهاجرت کرده و شکلی شبیه به‌یک ستاره دنباله‌دار را در زیر میکروسکوپ فلوئورسانس ایجاد نمود که به طور چشمی و درجه‌بندی استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. میزان آسیب در* DNA *هر یک از گروه‌ها تعیین و تفاوت از نظر آماری با استفاده از آزمون‌های* ANOVA *و* Post hoc test *با یکدیگر مقایسه شد.*

نتایج: *در صد فراوانی آسیب* DNA *در اسپرم افراد سالم، کمتر از دیگر گروه‌های مورد بررسی بوده است. دو گروه اولیگواسپرم و اولیگو استنواسپرم به ترتیب از نظر میزان آسیب موجود در* DNA *بعد از گروه سالم قرار دارند. از مقایسه آماری به عمل آمده بین درصد آسیب* DNA *تعیین شده برای گروه‌ها مشخص شد که گروه‌های اولیگواسپرم و اولیگواستنواسپرم و استنواسپرم در مقایسه با گروه سالم از نظر آسیب زمینه در* DNA *با* $P<0/05$ *تفاوت معنی داری را نشان می‌دهند. در گروه افراد نابارور بیشترین آسیب زمینه در* DNA *مربوط به نمونه‌های استنو اسپرم بوده است.*

نتیجه‌گیری: *نتایج بیانگر آن است که آسیب زمینه در* DNA *اسپرم افراد نابارور، بیشتر از افراد سالم است و در بین افراد نابارور، افراد آستنواسپرم آسیب* DNA *بیشتری را نشان می‌دهند. به نظر می‌رسد آسیب بیشتر مشاهده شده در افراد نابارور ناشی از کمبود سیستم آنتی‌اکسیدانتی در مراحل مختلف اسپرماتوژنز و مایع منی باشد. وجود عوامل آنتی اکسیدان مانع ایجاد آسیب در*DNA *توسط مواد اکسیداتیو می‌شود.*

گل‌واژگان: *اسپرم مردان، آسیب* DNA*، روش سنجش ستاره دنباله‌دار (کامت)، ناباروری.*

مقدمه:

نازایی یا عدم باروری در طی یکسال علیرغم مقاربت صحیح و عدم استفاده از روش‌های جلوگیری از بارداری، یکی از مشکلات جوامع مختلفی است که حدود ۱۴-۱۰ درصد از زوجین درگیر آن هستند. با توجه به‌افزایش سرعت رشد جمعیت و افزایش متوسط عمر و افزایش سن ازدواج از ۱۸ سالگی به ۳۵ سالگی و افزایش عوامل ایجاد ناباروری در محیط زندگی، وجود روش‌های دقیق‌تر ارزیابی ناباروری در مردان بیش‌از پیش نیاز است (۱).

عوامل متعددی در ناباروری مردان مؤثرندکه اهم آنها عوامل هورمونی، التهابی، ایمونولوژیک، محیطی و مکانیکی و آسیب‌رسان ژنتیکی می‌باشند. ازعوامل ژنتیکی ایجاد ناباروری در مردان می‌توان از سندرم کلاین‌فیلتر، سندروم داون، وضعیت‌های غیرطبیعی در کروموزوم‌های جنسی مانند موزاییسم ,XX/XY XX/YY, XXX/XY و XX/XXY و بعضی عوامل اتوزومی و حذف‌های ژنی نام برد.

از روش‌های گوناگونی برای بررسی علل ناباروری در مردان همچون قدرت نفوذ اسپرم انسان‌در اووسیت هامستر (۴ و۵) اندازه واکنش اکروزوم (۶)، ارزیابی‌تحرک اسپرم (۷ و۸)، استفاده از میکروسکوپ الکترونی (۹ و۱۰) و روش فلوسیتومتری برای ارزیابی‌ناهنجاری کروماتینی در اسپرم (۱۱ و ۱۲) استفاده شده است. هیچیک از این روش‌ها، خسارت DNA و ارتباط آن با ناهنجاری‌های کروماتین را مشخص نمی‌سازد. یکی از روش‌های بررسی آسیب DNA روش حلال‌شویی قلیایی است، که آسیب موجود درتک‌رشته DNA را نشان می‌دهد و در آن با

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-11-22]

فیلترهایی با اندازه‌های مختلف، این تک‌رشته‌ها از هم جدا می‌شوند (۱۳ و ۱۴). با روش ELISA نیز کل DNA قابل بررسی است (۱۳). این روش‌ها قادر به تخمین آسیب DNA و میزان ترمیم آن در اسپرم بالغ و در حد یک سلول نمی‌باشند.

از روش سنجش ستاره دنباله‌دار، برای بررسی شکست‌های موجود در رشته‌های DNA استفاده می‌شود. این روش امکان ارزیابی سریع جمعیت بزرگ و تعداد زیاد سلول‌های منفرد یوکاریوتی را میسر می‌سازد. در این روش، سلول مورد نظر درلایه‌ای از ژل آگارز قرار داده می‌شود و تحت شرایط قلیایی، الکتروفورز می‌گردد که در نتیجه DNA آسیب دیده از هسته خارج شده و به سمت آند مهاجرت می‌کند (۱۵ و ۱۶). این روش به ژل الکتروفورز تک سلول (SCGE)[1] نیز معروف است. این روش ابتدا توسط Johanson و Rydberg در سال ۱۹۷۸ ابداع شد، سپس توسطJohanson و Ostling در سال ۱۹۸۴ تحت شرایط خنثی طراحی گردید. Singh و همکاران در سال ۱۹۸۸ نسخه قلیایی این روش را معرفی کردند. در سال ۱۹۹۳ McKelvey-Martin و همکارانش پروتکل نهایی‌سنجش ستاره دنباله‌دار تحت شرایط قلیایی (pH>13) را تدوین نمودند که تا امروز مورد استفاده دارد (۱۴ و۱۸). در این روش محتویات DNA سلول‌ها در نهایت، توسط رنگ‌های فلورسانت مانند اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده و در زیرمیکروسکوپ فلوئورسانس به شکل یک ستاره دنباله‌دار دارای یک دم و یک سر مشاهده می‌شود. هرچه میزان‌آسیب وارده به DNA بیشتر باشد، میزان DNAمهاجرت کرده هم بیشتر خواهد بود و در ضمن درخشان‌تر نیز دیده می‌شود (۲۰– ۱۷).

ارزیابی آسیب DNA در اسپرم با سلول‌های سوماتیک کمی متفاوت است زیرا DNA در سر اسپرم بسیار فشرده تر از بقیه سلول‌ها است، لذا در روش SCGE برای لیز کردن اسپرم تغییراتی باید داده شود (۲۳–۲۱). با روش SCGE به ارزیابی آسیب وارده به DNA اسپرم در اثر مواد اکسیداتیو، دما و سموم مثل مواد شیمیایی، مواد شیمی درمانی و تشعشعات گوناگون پرداخته شده است (۲۴-۲۲). در ابتدا استفاده از روش SCGE در اسپرم برای ارزیابی و تعیین فراوانی مناطقی حساس DNA به مواد قلیایی، متداول بود (۱۵–۱۴ و ۲۵–۲۶). سپس با استفاده از تغییراتی که در این روش داده شد، میزان آسیب وارده به DNA اسپرم پس از پرتو دهی با اشعه X مورد ارزیابی واقع شد (۲۵ و ۲۶). در بعضی از آزمایش‌ها هم از این روش، برای مقایسه میزان آسیب موجود در DNA افراد بارور و نابارور استفاده شده است که علل بیولوژیک آنها مشخص نبوده است و در اکثر موارد میزان آسیب در DNA اسپرم افراد نابارور بیشتربوده است (۲۹–۲۷). در تحقیقی نشان داده شد که اگر مدت و میزان پرتودهی بر سلول‌های در حال تکثیر و سازنده اسپرم زیاد باشد آسیب وارده بسیار زیادتر از مراحل بعدی است (۳۱ و ۳۲). همچنین تاثیر مواد اکسیداتیو به عنوان محرک ایجاد آسیب در DNA اسپرم با این روش مورد بررسی قرار گرفت (۳۰و ۳۳ و ۳۴). این تحقیقات نشان دادند که بین افزایش فعالیت رادیکال آزاد و میزان کاهش سیتوپلاسم در اسپرم ارتباط مستقیمی وجود دارد بطوریکه از این مرحله به بعد آسیب وارده بسیار زیاد است که می‌تواند با کاهش سیستم‌های آنتی اکسیدانت در اسپرم ارتباط داشته باشد (۳۷–۳۵).

در این تحقیق، برای ارزیابی میزان‌آسیب زمینه DNA در چهار گروه افراد سالم، اولیگواسپرم، استنواسپرم و اولیگواستنواسپرم که براساس استانداردهای WHO تقسیم‌بندی شده‌اند (۳۸)، از روش‌سنجش ستاره دنباله‌دار استفاده شد.

روش کار:

نمونه‌گیری:

نمونه‌های اسپرم با اطلاع و رضایت اهدا کنندگان دریافت و براساس شاخصه‌های تعریف شده زیر به سالم و افراد نا بارور تقسیم شد (۳۸).

۱) افراد سالم (۳۰ نمونه): تحرک بیشتر از ۴۰ درصد و تعداد بیشتر از ۲۰ میلیون در میلی‌لیتر

۲) افراد اولیگوسپرم (۳۰ نمونه): تحرک بیشتر از ۴۰ درصد و تعداد کمتر از ۲۰ میلیون در میلی‌لیتر

۳) افراد آستنواسپرم (۳۰ نمونه): تحرک کمتر از ۴۰ درصد و تعداد بیشتر از ۲۰ میلیون در میلی‌لیتر

۴) افراد اولیگواستنواسپرم (۳۰ نمونه): تحرک کمتر از ۴۰ درصد و تعداد کمتر از ۲۰ میلیون در میلی‌لیتر

دو میلی لیتر از نمونه اسپرم تهیه شده به لوله آزمایش ۱۵ میلی‌لیتری (فالکون) مخروطی حاوی دو لایه واضح پرکول ۸۰ درصد در زیر و پرکول ۴۰ درصد در لایه فوقانی افزوده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد (Eppendorf 5810R). رسوبات سلولی به لوله 5cc، منتقل و با محیط هامز (Ham's F-10)(Gibco BRL) محتوی سرم آلبومین انسانی رقیق شده و به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰rpm سانتریفوژ

[1] - Single cell gel electrophoresis

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-11-22]

شد. پس از تکرار شستشو با محیط هامز نمونه‌ها به لوله اپندروف ۵۰۰µl منتقل و غلظت به تعداد ۱۰۵ اسپرم در ۱۰µlرسانده شد.

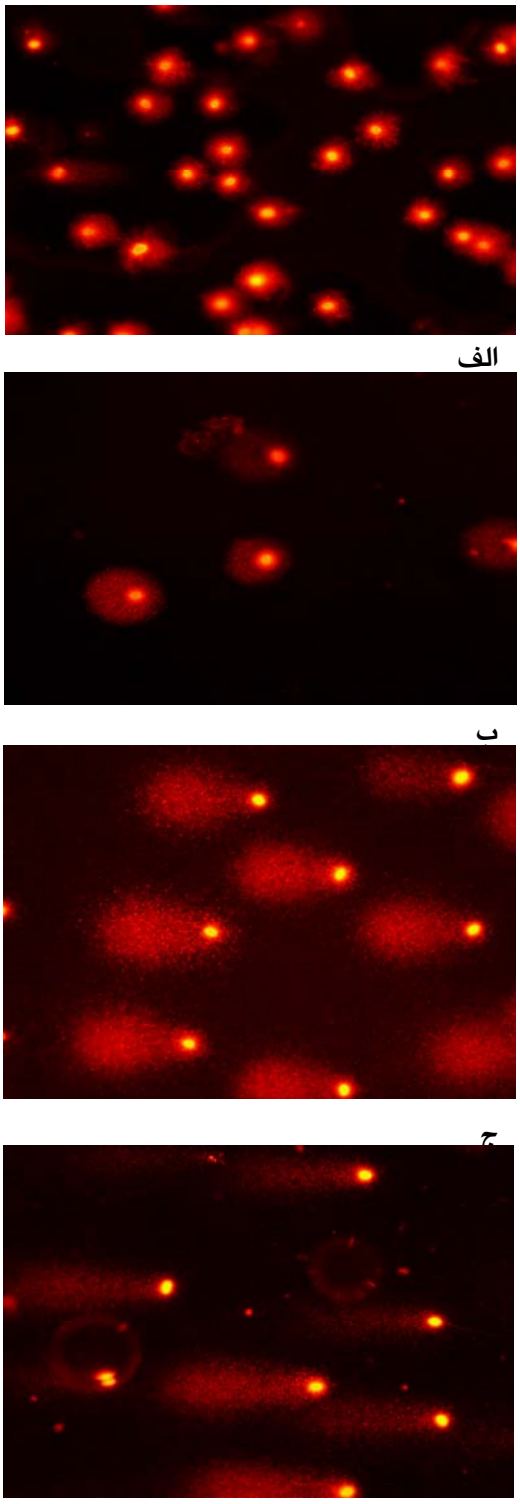
روش کار ژل الکتروفورز تک سلول

اصول و پایه‌های روش و پروتکل کاری، براساس پروتکل (McKelvey-Martin ۱۹۹۳) (۱۸) طراحی و با تغییراتی برای اسپرم بهینه سازی شد و مورد استفاده قرار گرفت. برای هر نمونه ۲ لام تهیه و برای انجام روش از لام‌های کاملاً مات[1] (Richard Supply Company) استفاده شد.

به منظور آماده سازی لام‌ها، ابتدا با استفاده از آگارز معمولی (Merck) با غلظت ۱٪ لامها پیش پوشش داده شدند و پس از قرار دادن یک لامل بزرگ بر روی ژل برای سفت شدن آن به یخچال با دمای ۴°c منتقل گردید. ۱۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم آماده شده با ۷۵µl آگارز با نقطه ذوب پایین ۱٪ (Fermentas) مخلوط و روی لام منتقل شد و بلافاصله روی آن لامل قرار داده شد. پس از سفت شدن آگارز در یخچال لامل برداشته و لام با یک لایه دیگر از آگارز با نقطه ذوب معمولی به مقدار۱۰۰µl پوشش داده شد. پس از سفت شدن لایه سوم ژل، لامل برداشته شده و لام به مدت ۱ ساعت در بافر لیز کننده با pH=10 حاوی 10mM Tris base, 10% DMSO, (Merck),100mM NaEDTA, 2.5 M NaCl 1% Triton X-100 قرار داده شد. برای لیز کامل سیتوپلاسم و غشای اسپرم لام‌ها به مدت یک شب[2] در محلول پروتئیناز K (Sigma) با غلظت ۱mg/ml/. در انکوباتور ۳۷°C نگهداری شد.

به منظور باز شدن پیچش مولکول DNA، لام‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول بافر الکتروفورز با pH=13 حاوی ۳۰۰mM NaOH و ۱mM EDTA (Merck) قرار داده شد و سپس تانک الکتروفورز به منبع تغذیه متصل و با شرایط ۲۵ ولت و ۳۰۰mA به مدت ۲۰ دقیقه الکتروفورز انجام شد. لام‌ها در بافر خنثی‌کننده (0.4M Tris base, Merck) با pH=7 به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شد. با افزودن ۵۰µl اتیدیوم بروماید با غلظت ۲۰mg/ml به روی ژل، ستاره‌های دنباله دار (کامت‌ها) رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ فلوئورسانس (Nikon E800) به طور چشمی و با درشتنمایی ۲۰۰ برابر مورد بررسی قرار گرفت (۲ و ۳). نمونه‌ای از ستاره‌های دنباله‌دار با درجات مختلف آسیب در شکل ۱ نشان داده شده است.

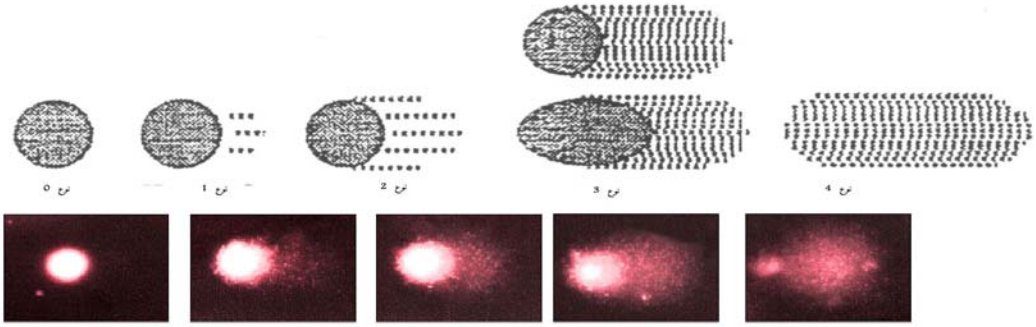
در هر لام در بخش‌های متفاوت به تعداد ۲۰۰ سلول بررسی و بر اساس ظاهر ستاره‌های دنباله‌دار و میزان آسیب DNA درجه‌بندی



شکل ۱- نمونه‌هایی از تصاویر ستاره دنباله‌دار مشاهده شده توسط میکروسکوپ فلورسانت
(الف) ستاره دنباله‌دارنوع صفر و ۱، (ب) ستاره دنباله‌دار نوع ۲، (ج) ستاره دنباله‌دار نوع ۳ و (د) ستاره دنباله‌دار نوع ۴

[1] - Fully frosted
[2] - Over night

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-11-22]



شکل ۲- تصاویر شماتیک و واقعی از انواع ستاره‌های دنباله‌دار (کامت) و معیار درجه‌بندی با روش چشمی

جدول ۱- میانگین درصد فراوانی انواع ستاره‌های دنباله‌دار در چهار گروه مورد آزمون. نتایج از شمارش ۴۰۰ سلول برای هر نمونه و از بررسی دو لام مستقل حاصل شده است

گروه	تعداد نمونه	نوع صفر ±SE	نوع ۱ ± SE	نوع۲ ±SE	نوع۳ ± SE	نوع ٤ ±SE
سالم	۳۰	۹۹/۰±۰/۵	۰/۷±۰/۴	۰/۲۱±۰/۲	۰/۰±۰/۰	۰/۰ ±۰/۰
اولیگواستنواسپرمی	۳۰	۹۷/۹±۰/۷	۱/۴±۰/۵	۰/۶۰±۰/۴	۰/۰۵±۰/۱	۰/۰±۰/۰
اولیگواسپرمی	۳۰	۹۷/۸±۰/۷	۱/۵۷±۰/۵	۰/۴۸±۰/۳	۰/۰۴±۰/۱	۰/۰ ±۰/ ۰
استنواسپرمی	۳۰	۹۷/۶±۰/۸	۱/۴۹±۰/۵	۰/۶۴±۰/۴	۰/۱۶±۰/۳	۰/۰۴±۰/۲

شدند. سلول‌ها با درنظر گرفتن میزان مهاجرت DNA طبق معیارهای پذیرفته شده (۲۰) به ۵ دسته (از صفر تا ۴) دسته‌بندی گردید (شکل۲).

آسیب‌های DNA (DD)، با بررسی هر فرد و انتساب هر یک از اعداد از صفر تا چهار کمی شد و توسط معادله توصیف شده به وسیله Jaloszynski و همکاران (۳۹) محاسبه گردید.

$$DD = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4)/(\Sigma/100)$$

که در این معادله :

DD: آسیب DNA

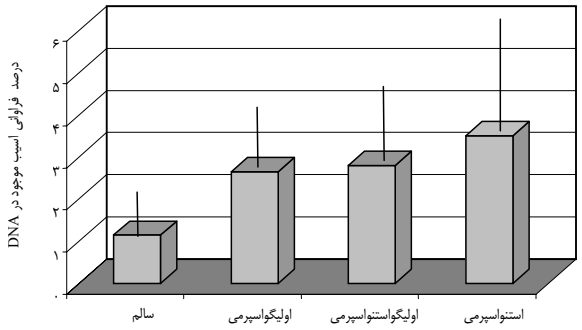
n_0-n_4 : تعداد کامت‌های از نوع ۰ تا ۴

Σ : مجموع گامت‌های شمارش شده، شامل نوع صفر است.

بدین ترتیب آسیب کلی ارایه شده بصورت محدوده‌ای از صفر تا ۴ ارزیابی گردید که به عنوان شاخص کلی میزان آسیب موجود در DNA در شکل ۳ نشان داده شد. اطلاعات و داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS 11.2 و آزمون‌های آنالیز واریانس یکطرفه (one-way ANOVA) و Post hoc test مورد بررسی آماری قرار گرفت و مقایسه بین گروهی انجام شد. تمامی استنتاج‌های آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد صورت گرفته است.

یافته‌ها:

نتایج از شمارش ۴۰۰ سلول برای هر نمونه و از بررسی دو لام مستقل حاصل شده است و در جدول ۱ خلاصه و در شکل ۳ نشان داده شد.



شکل ۳- مقایسه میزان آسیب DNA محاسبه شده برای نمونه‌های اسپرم گروه‌های مختلف مورد مطالعه. نتایج میانگین در صد آسیب حاصل از شمارش ۴۰۰ سلول از دو لام مستقل برای هر نمونه و ۳۰ نمونه از هر گروه می باشد.

همچنانکه در جدول ۱ مشاهده می‌شود در صد فراوانی تعداد هر ۵ نوع ستاره دنباله‌دار، در هر چهار گروه مورد آزمون ذکرگردیده است. فراوانی نسبی ستاره دنباله‌دار نوع‌صفر در گروه سالم از همه بیشتر و بیانگر تعداد سلول‌های با آسیب کمتر در این گروه می‌باشد.

در نمونه‌های نابارور، انواع دیگر ستاره‌های دنباله‌دار مشاهده

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-11-22]

می‌شود که نشان دهنده میزان آسیب بیشتر DNA در اسپرم این افراد است. در مجموع چنین بر می‌آید که میزان آسیب در DNA افراد استنواسپرم از دیگر گروه‌های نابارور بیشتر است.

از مقایسه هر چهار گروه آزمون، از نظر ۵ نوع ستاره دنباله‌دار، این نتایج حاصل می‌شود که در نوع صفر، ۱، ۲ و ۳ ستاره دنباله‌دار بین چهار گروه تفاوت معنی‌داری با P<۰/۰۵ وجود دارد ولی در نوع ۴ ستاره‌دنباله‌دار تفاوت معنی‌داری بین چهار گروه وجود ندارد.

در مقایسه بین گروهی، گروه‌های چهارگانه آزمون، از نظر فراوانی نوع اول ستاره دنباله‌دار، تنها بین گروه سالم و سه گروه دیگر از نظر آماری تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵).

در مقایسه بین گروهی، گروه‌های چهارگانه آزمون، از نظر فراوانی نوع ۱ و ۲، ستاره دنباله‌دار بین گروه سالم و سه گروه دیگر، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵) که در واقع فراوانی نوع ۱ و۲ ستاره دنباله‌دار (سلول‌هایی با آسیب متوسط DNA) در گروه سالم از همه کمتراست.

از نظر فراوانی نوع ۳ ستاره دنباله‌دار بین گروه‌های (سالم و استنواسپرمی) و (اولیگواسپرمی و اولیگواستنواسپرمی) و (اولیگواستنواسپرمی و استنواسپرمی) از نظر آماری با P<۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نوع ۴ ستاره دنباله‌دار هم که تنها در استنواسپرم‌ها و آن هم با فراوانی اندک مشاهده شد، تفاوت‌معنی‌داری با سایر گروه‌ها نشان نمی‌دهد. در شکل ۳، میزان آسیب زمینه در DNA هسته اسپرم نشان‌داده شد که در گروه سالم کمتر از دیگر گروه‌ها و در استنواسپرم‌ها از همه بیشتر است.

بحث:

همواره برای بررسی آسیب موجود در DNA و تغییرات آن در طی اسپرماتوژنز علاقمندانی وجود داشته است (۱۴و۱۵) ولی ارتباط بین DNA اسپرم بالغ و نا باروری در مردان کمتر مورد توجه قرار گرفته است. در طی مراحل اسپرماتوژنز، رشته‌های کروماتین هسته اسپرم فشرده می‌شوند و جای هیستون‌ها درساختار نوکلئوزومی سلول‌های سوماتیک، توسط پروتامین‌ها که غنی از آرژنین هستند، گرفته می‌شود (۴۲-۴۰). DNA در حلقه‌هایی به طول متوسط ۲۷ کیلو باز سازمان‌دهی می‌شود که توسط جفت بازهایشان به ماده زمینه هسته متصل می‌شوند. در عین حال خود این حلقه‌ها به وسیله پل‌های دی سولفیدی که‌میانشان ایجاد می‌شود، پایدار می‌گردند. به همین دلیل پایداری و مقاومت کروماتین‌اسپرم در برابر عوامل لیز کننده معمول بسیار زیاد است. به علت همین ساختمان فوق‌العاده فشرده کروماتین، DNA اسپرم درحین الکتروفورز، قادر به مهاجرت نیست مگر آنکه توسط آنزیم‌های پروتئیناز، پروتامین‌ها تا حد زیادی، تجزیه شده باشند. علت استفاده از پروتئیناز K در این بررسی نیز همین بوده است (۱۷و۱۸).

در تحقیقات Hughes و همکارانش، بین میزان آسیب DNA موجود در هسته اسپرم مردان بارور و نابارور مقایسه‌ای انجام شد. نتایج حاکی از آن بود که میزان آسیب پایه موجود در DNA اسپرم ۲۰ درصد است که ۴ برابر سلول‌های سوماتیک می‌باشد (۲۰-۱۶). این تحقیقات همچنین نشان می‌دهند که آسیب‌هایی که در حین اسپرماتوژنز حاصل می‌گردد، دیگر در اسپرم بالغ قابل تغییر نیست، و علت آن فقدان سیستمهای تعمیر کننده DNA در اسپرم بالغ است. اما مقداری از آسیبها پس از لقاح توسط سیستم‌های ترمیمی بسیار قوی اووسیت جبران می‌شود (۴۳). از دلایل دیگر آسیب‌پذیری بسیار زیاد DNA در اسپرم، فقدان سیستم‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدان شامل‌گلوتامین پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در اسپرم است (۴۴). وجود سیستم‌های آنتی‌اکسیدان قوی دیگری مانند آلفاتوکوفرول، اسید اسکوربیک و اورات در مایع منی وپیرامون اسپرم به حفاظت DNA اسپرم کمک شایانی می‌نماید. عملکرد و مقدار این سیستم‌ها درگروه‌های مختلف اسپرمی تفاوت دارد و حساسیت این گروه‌ها را نسبت به مواد آنتی‌اکسیدان هم متفاوت می‌سازد و در نهایت درجات متفاوت آسیب DNA در آنها دیده می‌شود (۲۹-۲۸ و ۳۴-۳۳). از بین سه سیستم فوق اسید اسکوربیک از همه مهمتر است، غلظت این ماده در مایع منی ۱۰ برابر پلاسمای خون است و نقش مهمی در حفاظت از DNA اسپرم در برابر مواد اکسیداتیو دارد (۴۳ و ۴۴). آلفاتوکوفرول در حفاظت DNA در برابر مواد اکسیداتیو نقش دارد ولی کار اصلی آن ممانعت از پراکسیده شدن لیپیدها در اسپرم است که برای الحاق درست اسپرم به اووسیت مهم است (۲۸و ۳۳ و ۴۳).

Singh و همکارانش معتقدند که در کروماتین اسپرم، مناطق حساس به قلیا، بسیار بیشتر ازDNA سایرسلول‌هاست که این امر در سازمان‌دهی مخصوص کروماتین اسپرم نقش بسزایی دارد و به حفاظت آن‌در مقابل مواد اکسیداتیو کمک زیادی مینماید (۱۵ و ۱۶).

نتایج این تحقیق نشانگر حساسیت و آمادگی بیشتر DNA اسپرم در مردان با مشکل ناباروری برای آسیب‌پذیری از مواد آسیب‌زا در مقایسه با اسپرم افراد سالم و بارور است. نتایج این بررسی حاکی از آن است که در بین گروه‌های نابارور حساسیت استنواسپرم‌ها و میزان آسیب DNA در آنها بیشتر است (شکل ۳).

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-11-22]

این یافته توسـط نتـایج تحقیقـاتی کـه نـشان داده اسـت میـزان سیستم‌های آنتی‌اکسیدان در مایع منی ایـن‌افـراد بـه مقـدار قابـل توجهی کاهش یافته است، که خود باعث حساسیت بـالا و آسـیب فـراوان در DNA ایـن گـروه مـی‌شـود (بـه‌ویـژه کـاهش مقـدار آنتی‌اکسیدان اسید اسکوربیک) (۴۳ و۴۴)، تایید می‌شود. همچنـین در این گروه ناهنجاری‌های کروموزومی و مورفولوژیکی در مقایسه با سه گروه دیگر بیشتر است که باعث می‌گردد به صورت خود بـه خود میزان آسیب پایه DNA در این افراد بیشتر از سه گروه دیگـر باشد. تحقیقات Hughes و همکارانش نیز موید همین نظـر اسـت. حتی آنها معتقدنـد کـه اسـتفاده از گرادیـان غلظتـی پرکـول نیـز می‌تواند باعث دور شـدن سیـستمهای آنتـی‌اکـسیدان حفـاظتی از اسپرم شده و در DNA آسیب ایجادکند (۱۷و ۱۸).

اولیگواستنواسپرمی در مقام دوم میزان آسـیب اسـت. در ایـن افراد هم کمبود سیستم‌های آنتی‌اکسیدان موجود در مایع منـی بـه شدت نوع‌استنواسپرمی است، ولی آسیب بـالقوه موجـود در DNA ایـن گـروه و ناهنجـاری‌هـای مورفولـوژیکی‌کمتـری نـسبت بـه استنواسپرم‌ها دارند. به همین دلیل هم آسیب ارزیابی شـده توسـط روش سنجش ستاره‌دنباله‌دار، کمتر از استنواسـپرم‌هاسـت. نـوع ۴ ستاره دنباله‌دار در این گروه دیده نشد ولـی فراوانـی انـواع ۱و۲و۳ ستاره دنباله‌دار به وضوح در آنها مشاهده مـی‌شـود (جـدول ۱). در اولیگواسپرم‌ها، مورفولوژی و تحرک نرمال بسیار بیـشتراز دوگـروه دیگر نابارور است. اختلالاتی که در اسپرماتوژنز این گروه به وجود می‌آید تنها در تعداد تقسیمات سلول‌های نطفه‌ای اثر دارد و تعـداد کل اسپرم را کمتر از حد سالم می‌سـازد ولـی مـشکلات DNA و ناهنجاری‌های کروموزومی و ریختی در این دسته کمتر اسـت. بـه همین دلیل بعد از گروه سالم، تمامیت DNA بیشتر از بقیـه حفـظ شده است. گروه سـالم کـه بـه‌وضـوح خـسارت جزیـی را نـشان می‌دهند. نمایانگر عملکرد طبیعی سیستم‌هـای آنتـی‌اکـسیدان در مایع منی و صحت کامل DNA در هسته اسپرم آن است.

جمع‌بندی نتایج حاکی از آن است که آسـیب DNA در اسـپرم مردان سالم کمتر از افراد نابارور و در بین اسپرم افراد نابارور گـروه استنواسپرمی بیشترین مقدار آسیب در DNA را نشان می‌دهد. این نتایج مشابه یافته‌های دیگر محققان است با این تفاوت که میـزان آسیب زمینه DNA در اسپرم افـراد سـالم کمـی بیـشتر از مقـادیر گزارش شده است که می‌تواند ناشی از قرار گـرفتن جامعـه مـورد مطالعه در معرض عوامل محیطی و شیمیایی متفاوت و یا بیشتری باشد. همچنین کارآیی مؤثر روش سنجش سـتاره دنبالـه‌دار بـرای ارزیابی آسیب وارده به DNA بـه عنـوان یـک روش سـیتوژنتیکی ساده و در عین حال حساس مشخص گردید.

تشکر و قدردانی:

این تحقیق در قالب طرح تحقیقاتی مـصوب و حمایـت مـالی جهاد دانشگاهی مرکزی و در پژوهشکده رویان انجام شده است.

References:

1- Oehinger S, Acosta A, Veek LC. Recurrent failure of *in vitro* specific sperm oocyte defects. Am J Gynecol 1991; 1: 1210-5.
2- Hughes CM, Lewis SEM, McKelvey-Martin VJ. A comparison of baselines and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. Mol Hum Reprod 1996; 2: 613-9.
3- Hughes CM, Lewis SEM, McKelvey-Martin VJ, et al. Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. Mutation Res 1997; 774: 261-268.
4- Kruger TF, Acosta AA, Swanson R. Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. Fertil Steril 1988; 49:112-117.
5- Liu DY, Baker HW. The proportion of human sperm with poor morphology, but normal intact acrosomes detected with pisum sativum agglutinin correlates with fertilization *in vitro*. Fertil Steril 1988; 50: 288-293.
6- Irvine DA. Assessment of spermatogenesis. Current Gynecol 1992; 2: 20-26.
7- Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, et al. DNA integrity in human spermatozoa relationship with semen quality. J Androl 2000; 21: 33-44.
8- Lipitz S, Bert B, Radian C. Sperm head ultra morphology and chromatin stability of males with unexplained infertility who failed to fertilize normal human ova *in vitro*. Andrologia 1992; 24: 261-9.
9- Zamboni L. Sperm structure and its relevance to infertility. Arch Pathol Lab Med 1992; 116: 325-44.
10- Evenson DP, Jost LK, Baer RK. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. Reprod Toxicol 1991; 5: 115-25.
11- Engh E, Sholbery A, Clausen OPE, et al. DNA flow cytometry of sperm from normozoospermic men in barren couples and men of proven fertility. Int J Fertil 1993; 38: 305-10.
12- Van loon AAWM, Den Boer PJ, Van der Shans GP. Immunochemical detection of DNA damage induction and repair at different cellular stages of spermatogenesis of the hamster after *in vitro* or *in vivo* exposure to ionizing radiation. Cell Res 1991; 193: 303-9.
13- Van loon AAWM, Sonneveld E, Hoogerbrugee J. Induction and repair of single strand breaks and DNA base damage at different cellular stages of spermatogenesis of the hamster upon in vitro exposure to ionizing radiation.

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-11-22]

Mutation Res 1993; 294: 139-48.
14- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. Cell Res (1988); 175: 184-91.
15- Singh NP, Stephens RE. X-ray induced DNA double-strand breaks in human sperm. Mutagenesis 1988; 13: 75-9.
16- Hughes CM, McKelvey-Martin VJ, Lewis SEM. Sperm DNA integrity assessed by comet and ELISA assays. Mutagenesis 1999; 14: 71-5.
17- Hughes CM, Lewis SEM, McKelvey-Martine VJ, et al. The effect of antioxidant supplement during percoll preparation on human sperm DNA integrity. Hum Reprod 1998; 13: 1240-7.
18- McKelvey-Martin VJ, Green MML, Schmer P. The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): A European review. Mutation Res 1993; 288: 47-63.
19- McKelvey Martin VJ, Melia N, Walsh IK. Two potential clinical applications of the alkaline single cell gel electrophoresis assay 1) Human bladder 2) Human sperm and male infertility. Mutation Res 1997; 375: 93-104.
20- Kobayashi H, Sugiyama C, Morikawa Y, et al. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. MMS Communication 1995; 3: 103-15.
21- Tice RR. The single cell gel electrophoresis comet assay: A microgel electrophoresis technique for the detection of DNA damage and repair in individual cell. Environ Mol Mutagen 1995; 1: 315-39.
22- Tice RR, Agurell E, Anderson D, et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen 2000; 35: 206-21.
23- Muller P, Knudsen LE, Loft S, et al. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. Cancer Epidemiol, Biomark Prevent 2000; 9: 1005-15.
24- Kassie F, Parzefall W, Knasmuller S. Single cell gel electrophoresis assay: A new technique for human biomonitoring studies. Mutation Res 2000; 463: 13-31.
25- Hains G, Marples B, Daniel P, Morris I. DNA damage in human and mouse spermatozoa after *in vitro* irradiation assessed by the comet assay. Adv Med Biol 1998; 444: 79-93.
26- Hains GA, Hendry JH, Daniel CP, et al. Increased levels of the comet detected spermatozoa DNA damage following in vitro isotopic or X-irradiation of spermatozoa. Mutation Res 2001; 495: 21-32.
27- Lopes S, Jurisicora A, Sun JG, et al. Reactive oxygen species-potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. Human Reprod 1998; 13: 896-900.
28- Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, et al. Impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biol Reprod 1998; 50: 1037-46.
29- Aitken RJ, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: The balance of benefit and risk. Biol Essay 1994; 16: 259-67.
30- Donnely ET, McClure N, Lewis SEM. Effect of ascorbate supplementation *in vitro* on hydrogen peroxide-induced DNA damage and production of reactive oxygen species in human spermatozoa. Hum Reprod 1998; 13: 2003-10.
31- Shen HM, Ong CN. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. Radiat Med 2000; 28: 529-36.
32- Meistrich N, Hunter N, Suzuki N, et al. Gradual regeneration of mouse testicular stem cell after exposure to ionizing radiation. Rad Res 1978; 74: 349-62.
33- Aitken RJ. Molecular Mechanisms Regulating Human Sperm Function. Mol Hum Reprod 1997; 3: 169-73.
34- Aitken RJ. The Amoroso Lecture: The human spermatozoa; A cell in crisis? J Reprod Fertil; 115: 1-7.
35- Donnelly ET, O'Connell M, McClure N, et al. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. Hum Reproduct 2000; 15: 1552-61.
36- Barroso G, Morshedi M, Oehinger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. Hum Reproduct 2000; 15: 1338-44.
37- Twigg J, Irvine DS, Houston P. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: Lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidant. Hum Reproduct 1998; 13: 1429-36.
38- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm–cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge, UK; Cambridge University Press; 1999.
39- Jaloszynski P, Kujawski M, Czub-Swierczek M, et al. Szyfter K. Bleomycin induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. Mutation Res.1997; 385: 223-33.
40- Sidney R, Grimes JR. Nuclear proteins in spermatogenesis. Compar Biochem Physiol 1986; 83: 495-500.
41- Ward WS, Coffy DS. DNA packaging and organization and mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells. Biol Reprod 1991; 44: 560-74.
42- Ward WS. DNA loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. Biol Reprod 1993; 48: 1193-1201.
43- Lewis SEM, Boyle PM, McKinney KA. Total antioxidant capacity of semen plasma is different in fertile and infertile men. Fertil Steril 1995; 64: 866-70.
44- Lewis SEM, Sterling S, Young I, Thompson W. Comparison of individual antioxidants and total capacity of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. Fertil Steril 1997; 50: 288-93.

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-11-22]