

افزایش شکستگی DNA اسپرم انسان بعد از دو ساعت انکوباسیون

علی نبی M.Sc.، محمد علی خلیلی Ph.D.*، ایمان حلوایی M.Sc.، فاطمه انباری M.Sc.

مرکز تحقیقاتی درمانی و ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: khalili59@hotmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۱۹

چکیده

هدف: در این مطالعه میزان شکستگی DNA اسپرم انسانی بعد از آماده سازی به روش Direct swim-up در زمان‌های مختلف انکوباسیون به وسیله تکنیک TUNEL مورد ارزیابی قرار گرفت تا بهترین زمان برای انکوباسیون اسپرم‌های نرمال شسته شده برای استفاده در تکنیک‌های کمک باروری (ART) به دست آید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آینده نگر، ۲۱ نمونه‌ی اسپرم نرمال مورد مطالعه قرار گرفت. از لام Makler chamber برای مطالعه تعداد و قابلیت تحرک اسپرم استفاده شد. برای بررسی مورفولوژی اسپرم از رنگ آمیزی پاپانیکولا و قابلیت حیات اسپرم از رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. نمونه‌ها بعد از آماده سازی به روش Direct swim-up در زمان‌های مختلف در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. میزان شکستگی DNA اسپرم در فواصل زمانی مختلف (۰، ۲۰، ۱، ۰، ۳ ساعت) با استفاده از تکنیک TUNEL مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: میانگین درصد مورفولوژی طبیعی و حرکت سریع پیشرونده اسپرم بعد از آماده سازی نسبت به قبل از آماده سازی افزایش معنی‌داری $P < 0/001$ داشتند. درصد میانگین قابلیت حیات اسپرم بعد از آماده سازی اسپرم نسبت به قبل از آماده سازی به‌طور معنی‌دار افزایش یافته بود ($P < 0/001$). درصد شکستگی DNA اسپرم در زمان دو ساعت انکوباسیون نسبت به زمان صفر ($P < 0/01$) و نیز زمان سه ساعت نسبت به زمان صفر و یک ساعت انکوباسیون ($P < 0/001$) به‌طور معنی‌داری افزایش داشت.

نتیجه گیری: انکوباسیون اسپرم نرمال در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد که به روش Direct swim-up آماده شده برای استفاده در تکنیک‌های کمک باروری باید زمان کمتر از دو ساعت باشد.

واژگان کلیدی: اسپرم نرمال، شکستگی DNA، تکنیک TUNEL

مقدمه

در بسیاری از کلینیک‌ها، پارامترهای معمول نظیر تعداد، تحرک، مورفولوژی، برای بیان کیفیت اسپرم بررسی می‌شود. تحقیقات نشان داده است که پارامترهای معمولی (تعداد، مورفولوژی، تحرک) در مردان نابارور نمی‌تواند گویای سلامت DNA اسپرم باشد (۱). به‌تازگی لوئیس و سیمون (۲) اظهار داشتند که هیچ همبستگی بین پارامترهای معمولی اسپرم و آسیب DNA وجود ندارد. اختلال در یکپارچگی DNA اسپرم می‌تواند میزان لقاح را کاهش داده و میزان لانه‌گزینی جنین را تحت تاثیر قرار دهد. اگر چه احتمال اینکه اسپرم با DNA آسیب دیده بتواند با تخمک لقاح پیدا کرده و تشکیل جنین بدهد وجود دارد (۳) ولی احتمال از بین رفتن جنین و سقط افزایش پیدا می‌کند (۴).

یکی از عواملی که می‌تواند بر میزان موفقیت درمان زوج‌های نابارور و همچنین کیفیت جنین‌ها مهم باشد، کیفیت اسپرم است. در روش‌های کمک باروری (Assisted Reproductive Techniques) بعد از جداسازی اسپرم از مایع منی و آماده سازی اسپرم، می‌تواند به‌خاطر انکوباسیون طولانی مدت، قطعه قطعه شدن DNA اسپرم افزایش پیدا کند (۵). پس از آماده سازی اسپرم، به‌طور معمول اسپرم قبل از استفاده در (ART) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شود (۶) ولی هنوز زمان بهینه برای انکوباسیون اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قبل از استفاده در ART وجود ندارد. بعضی از محققین سعی برای پیدا کردن اثر گذشت زمان بر پارامترهای اسپرم بعد از انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد را دارند. نشان داده شده است که انکوباسیون اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بعد از گذشت ۲۴ ساعت می‌تواند بر روی تحرک اسپرم تاثیر گذار باشد ولی بر روی قابلیت حیات تاثیری ندارد (۷).

بعد از آماده سازی اسپرم برای استفاده در تکنیک‌های ART انکوباسیون کوتاه مدت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد می‌تواند باعث ظرفیت یابی اسپرم شود اما انکوباسیون طولانی مدت می‌تواند بر روی DNA اسپرم تاثیر داشته باشد (۸). در آزمایشگاه‌های آندروولوژی، بعد از عمل شستشو و جداسازی، معمولاً به بررسی پارامترهای اسپرم شامل تعداد، میزان تحرک و وضعیت مورفولوژیکی اسپرم و درصد زنده بودن، می‌پردازند اما به بررسی پارامترهای درون سلولی (شامل شکستگی DNA اسپرم) پرداخته نمی‌شود. همچنین در آزمایشگاه‌های ART معمولاً نمونه‌های اسپرم از ۰/۵ تا حداکثر ۳ ساعت و بعضی از مراکز

درمان ناباروری بدون توجه به‌زمان بعد از عمل جداسازی و شستشو اسپرم مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به نقش اسپرم در فرایند لقاح در روش‌های ART، لازم است که علاوه بر توجه به ساختار سلولی اسپرم به بهترین زمان ممکن جهت انجام تزریق اسپرم آماده شده به‌داخل حفره رحمی توجه شود. لذا با مطالعه ساختار سلولی اسپرم و نیز تعیین زمان دقیق عمل تزریق اسپرم به‌داخل حفره رحمی می‌توان میزان لقاح و در نتیجه میزان حاملگی را افزایش داد. هدف از این مطالعه به‌دست آوردن بهترین زمان برای انکوباسیون اسپرم‌های نرمال شسته شده به‌روش Direct swim-up برای استفاده در تکنیک‌های کمک باروری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

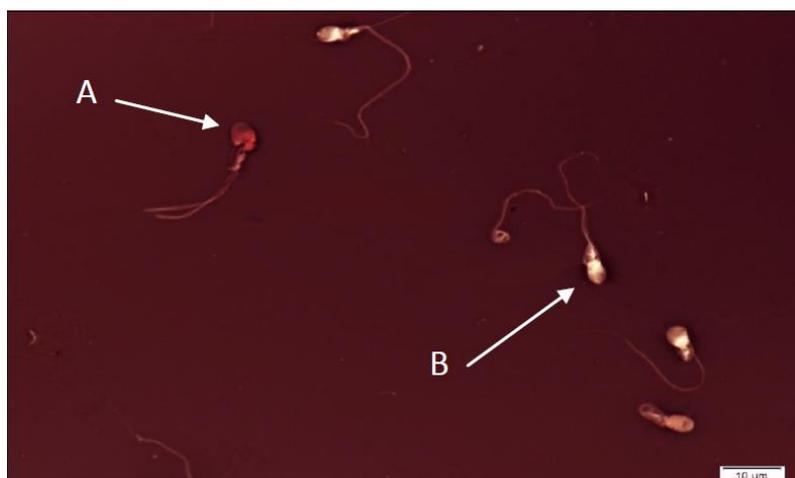
جمع آوری و آنالیز سمن: در این مطالعه آینده نگر، ۲۱ نمونه نرمال از مردهای نابارور مراجعه کننده به پژوهشکده علوم تولید مثل یزد با رعایت اصول اخلاقی جمع آوری شد. نمونه مایع منی افراد پس از ۲ تا ۷ روز خودداری از مقاربت به‌وسیله‌ی خود انزالی در ظروف دهان گشاد جمع آوری شد. سپس برای مایع شدن، نمونه سمن به‌مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. آنالیز مایع منی طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (WHO2010) انجام شد (۹).

آماده سازی اسپرم: پس از آنالیز، نمونه‌ها به‌وسیله‌ی روش Direct swim-up آماده شدند. به این صورت که میزان ۱/۵ میلی‌لیتر محیط کشت ۱۰ Ham's F + ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلبومین سرم انسانی (HSA) درون لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد و سپس ۱ میلی‌لیتر از نمونه به‌وسیله پیپت پاستور به ته لوله اضافه شد. لوله فالکون با زاویه ۴۵ درجه به‌مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۲/۳ مایع رویی جدا شده و داخل یک لوله ریخته شد. ۱/۵ تا ۲ میلی‌لیتر محیط کشت اسپرم به تست تیوپ اضافه شد و به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰-۳۰۰ سانتریفوژ شد. بعد از سانتریفیوژ، ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت اسپرم ته لوله روی رسوب تشکیل شده باقی گذاشته و سپس رسوب درون محیط کشت اسپرم باقی مانده حل شد (۹).

شمارش و ارزیابی تحرک: برای شمارش تعداد و ارزیابی تحرک اسپرم از لام Makler chamber استفاده شد. برای

ارزیابی قابلیت حیات: برای ارزیابی قابلیت حیات از رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. برای ساخت رنگ ابتدا ۰/۶۷ گرم پودر ائوزین Y با ۰/۹ گرم سدیم کلرید در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل و سپس به آن ۱۰ گرم پودر ائوزین-نیگروزین (MERCK, Germany) اضافه کردیم (۹). ۱۰ میکرولیتر از رنگ ائوزین-نیگروزین به درون یک میکروتیوپ ریخته شد و سپس ۱۰ میکرولیتر نمونه درون میکروتیوپ حاوی رنگ اضافه شد و با عمل پیپتینگ با ائوزین-نیگروزین مخلوط شد. پس از ۳۰ ثانیه ۱۰ میکرولیتر از آن برداشته و از آن گسترش تهیه شد. گسترشها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی X ۱۰۰۰ بررسی شد (شکل ۱). اسپرمهایی که رنگ را به خود گرفته و قرمز یا صورتی شده اند مرده، و آنهایی که رنگ را به خود نگرفته اند زنده در نظر گرفته شد (۹). تعداد ۲۰۰ اسپرم شمرده شد و نتایج قبل و بعد از شستشو به روش Direct swim up، ثبت گردید.

شمارش، ۱۰ میکرولیتر از نمونه، توسط سمپلر روی قسمت وسط لام MAKLER CHAMBER قرار داده شد و سپس لامل روی نمونه قرار گرفت. این لامل از ۱۰۰×۱۰ خانه تشکیل شده و با بزرگنمایی ۲۰X، تعداد اسپرمهای موجود در ۱۰ مربع عمودی و ۱۰ مربع افقی پشت سر هم شمارش شد و میانگین این دو گرفته شد. سپس عدد به دست آمده در ۱۰^۶ ضرب شد تا تعداد اسپرم در یک میلی لیتر برحسب میلیون به دست آید. برای ارزیابی تحرک اسپرم، ۱۰ میکرولیتر از نمونه بر روی لام MAKLER CHAMBER قرار گرفت، با لامل پوشانده شد و با بزرگنمایی ۲۰X، انواع حرکت اسپرمها بررسی شد. تعداد اسپرمهای دارای حرکت سریع پیشرونده (a)، آهسته پیشرونده (b)، حرکت درجا (c)، و اسپرمهای بی حرکت (d) را در مربعهای مختلف مشاهده و با کانتیر شمارش شد تا به صورت درصد بیان شود (۹). نتایج برای هر نمونه قبل و بعد از شستشو به روش Direct Swin-up، ثبت شد.



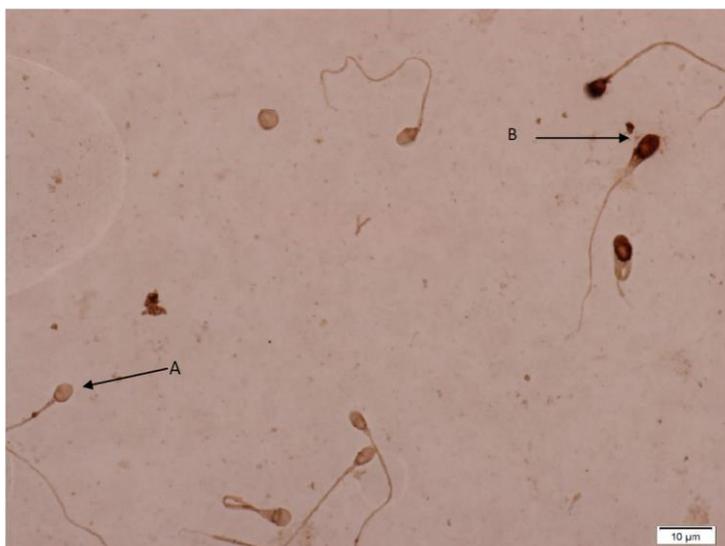
شکل ۱: ارزیابی قابلیت حیات اسپرم انسان توسط رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین. A اسپرمهای با سر سفید، اسپرمهای زنده و B اسپرمهای سر صورتی یا قرمز، اسپرمهای مرده تلقی می شوند. بزرگنمایی ۱۰۰۰x

تست TUNEL بعد از آماده سازی و آنالیز اسپرم در لوله حاوی اسپرم آماده شده به روش Direct Swim-up محکم بسته شد و درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا میزان شکستگی DNA اسپرمها در زمانهای مختلف (۰، ۱، ۲، ۳ ساعت) انکوباسیون توسط تست TUNEL بررسی شود. برای انجام تکنیک TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) کیت سنجشی تانل (Roche, Germany) استفاده شد. ابتدا غلظت نمونه شسته شده به ۲۰ میلیون رسانده و گسترش تهیه شد. پس از خشک شدن گسترشها در دمای اتاق، گسترشها در

ارزیابی مورفولوژی: برای بررسی مورفولوژی از رنگ آمیزی پاپانیکولا طبق دستورالعمل WHO 2010 (۹) سر به رنگ آبی و قطعه میانی به رنگ قرمز یا صورتی در می آید استفاده شد. جهت بررسی مورفولوژی اسپرم، ابتدا از هر نمونه گسترش تهیه شد تا بعداً به طور یک جا رنگ آمیزی پاپانیکولا (MERCK, Germany) روی آنها انجام شود (۹). برای هر نمونه یک لام قبل از عمل Direct Swim-up و یک لام بلافاصله بعد از عمل Direct Swim-up به صورت فیکس شده از اسپرم تهیه شد. پس از رنگ آمیزی، تعداد ۲۰۰ اسپرم با بزرگنمایی ۱۰۰۰X بررسی شد.

درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس گسترش‌ها با محلول (DAB) ۴/۵، DAB، ۵۰۰ میکرولیتر + (substrate(H₂O₂))، ۴/۵ میکرولیتر) به مدت ۲۰ دقیقه در محیط تاریک، مرطوب و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. دوباره عمل شستشو با PBS انجام شد. آگیری از نمونه‌ها توسط الکل‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد (هر کدام ۵ دقیقه) صورت گرفت. شفاف‌سازی نمونه‌ها به وسیله‌ی زایلن و چسباندن توسط چسب انتلان انجام شد (۱۰). سپس، با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $\times 1000$ مشاهده و تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. سلول‌های با رنگ قهوه‌ای تیره دارای شکستگی DNA و TUNEL مثبت در نظر گرفته شد و سلول‌های بدون رنگ و قهوه‌ای کم رنگ بدون شکستگی DNA و TUNEL منفی در نظر گرفته شد (شکل ۲).

متانول ۱۰۰ درصد به مدت ۴ دقیقه فیکس و سپس به منظور شستشو شده به مدت ۳۰ دقیقه در محلول (۱×) PBS قرار گرفت. سپس گسترش‌ها در محلول blocking (H₂O₂) ۳ درصد در متانول) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۵ تا ۲۵ سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از شستشو با PBS به مدت ۵ دقیقه گسترش‌ها با محلول تریتون ۰/۱ درصد در سدیم سیترات ۰/۱ درصد به مدت ۲ دقیقه در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس گسترش‌ها با PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو شد. برای هر لام، ۵ میکرولیتر محلول آنزیم و ۴۵ میکرولیتر محلول لیبیل درون یک میکروتیوپ با هم مخلوط شد و به تمام قسمت‌های لام اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در محیط تاریک، مرطوب و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از شستشو با PBS، (سه بار و هر بار ۵ دقیقه) گسترش‌ها با converter – probe به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷



شکل ۲: بررسی میزان شکستگی DNA اسپرم انسانی توسط تکنیک TUNEL. A اسپرم‌های بدون رنگ و قهوه‌ای کم رنگ بدون شکستگی DNA و TUNEL منفی و B اسپرم‌های با رنگ قهوه‌ای تیره دارای شکستگی DNA و TUNEL مثبت در نظر گرفته شد.

نتایج

جدول ۱ مقایسه‌ای بین طرح‌های مختلف حرکتی، مورفولوژی طبیعی و قابلیت حیات اسپرم انسان قبل و بعد از آماده‌سازی به روش Direct swim-up را نشان می‌دهد. نتایج بیانگر آن است که درصد حرکت پیشرونده و حرکت سریع پیشرونده بعد از آماده‌سازی در مقایسه با قبل از آماده‌سازی به‌طور معنی‌داری ($P < 0/001$) افزایش، در حالی‌که حرکات آهسته و درجا بعد از آماده‌سازی نسبت به قبل از آماده‌سازی به‌طور معنی‌داری ($P < 0/001$) کاهش یافت. با این وجود تغییر قابل ملاحظه‌ای در

آنالیز آماری: برای آنالیز داده‌ها، از نرم افزار SPSS 15 استفاده شد. از pair-T test برای مقایسه پارامترهای اسپرم قبل و بعد از شستشو و از تست ANOVA یک طرفه با تست تکمیلی Tukey برای مقایسه شکستگی DNA اسپرم در زمان‌های مختلف استفاده شد. همچنین جهت بررسی بین زمان انکوباسیون و شکست DNA اسپرم، آزمون Pearson خطی مورد استفاده قرار گرفت. $P < 0/05$ به‌عنوان مرز معنی‌داری داده‌ها در نظر گرفته شد.

نمود. با این حال، افزایش معنی داری در درصد شکستگی DNA اسپرم پس از دو ساعت انکوباسیون نسبت به زمان صفر ($P < 0.01$) و همچنین سه ساعت انکوباسیون نسبت به زمان صفر و یک ساعت ($P < 0.01$) مشاهده شد (نمودار ۱).

همچنین، یک رابطه معکوس بین میزان شکستگی DNA نمونه ها، با حرکت سریع، حرکت کند، مورفولوژی و یک رابطه مستقیم بین درصد شکستگی DNA نمونه ها، با حرکت درجا و بی حرکت دیده شد (جدول ۲).

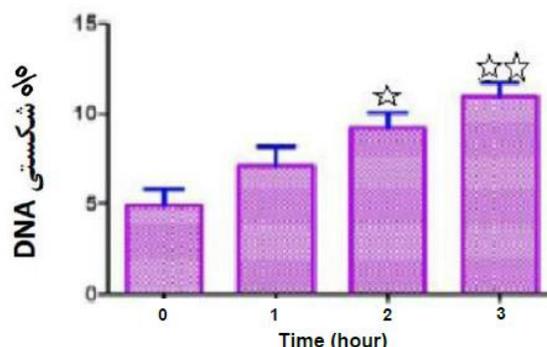
حرکات آهسته اسپرم بین این دو گروه مشاهده نشد. علاوه بر این، مورفولوژی طبیعی اسپرم و همچنین قابلیت حیات اسپرم ها افزایش معنی داری ($P < 0.01$) را بعد از آماده سازی در مقایسه با قبل از آماده سازی نشان داد.

افزایش معنی داری در درصد شکستگی DNA اسپرم بعد از انکوباسیون مشاهده شد. درصد شکستگی DNA اسپرم بعد از یک ساعت انکوباسیون نسبت به زمان صفر، همچنین دو ساعت نسبت به یک ساعت و سه ساعت نسبت به دو ساعت معنی دار

جدول ۱: مقایسه پارامترهای اسپرمی قبل و بعد از آماده سازی اسپرم به روش Direct Swim-up

پارامترهای اسپرم	قبل از آماده سازی اسپرم	بعد از آماده سازی اسپرم
حرکت سریع پیشرونده (/.)	۲۰/۴۸±۲/۵۷	۴۲/۵۲±۳/۳۷*
حرکت آهسته پیشرونده (/.)	۴۳/۲۴±۲/۳۰	۴۷/۷۱±۳/۸۰*
حرکت درجا (/.)	۵/۳۶±۰/۷۰	۴/۲۴±۰/۷۵*
بی حرکت (/.)	۲۹/۸۱±۱/۶۳	۵/۵۲±۰/۵۷*
حرکت پیشرونده (/.)	۶۳/۷۱±۱/۸۳	۹۰/۱۰±۱/۰۲*
مورفولوژی طبیعی (/.)	۴۹/۰۰±۳/۱۰	۷۲/۳۳±۲/۵۳*
قابلیت حیات (/.)	۸۲/۲۹±۱/۶۵	۱۰۰±۰/۰۰*

داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده. $p < 0.0001$ ، حرکت پیشرونده شامل حرکت سریع پیشرونده + حرکت آهسته می باشد.



نمودار: مقایسه میانگین شکستگی DNA اسپرم انسان در زمان های مختلف انکوباسیون بعد از آماده سازی به روش Direct Swim-up با استفاده از تکنیک TUNEL. *میزان شکستگی DNA بعد از دو ساعت نسبت به زمان صفر با در نظر گرفتن سطح معنی داری ۰/۰۵ به طور معنی داری افزایش یافت. ** شکستگی DNA بعد از سه ساعت نسبت به زمان صفر و یک ساعت با در نظر گرفتن سطح معنی داری ۰/۰۵ به طور معنی داری افزایش یافت. داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است.

جدول ۲: رابطه میزان شکستگی DNA اسپرم انسان با سایر پارامترهای اسپرم

مورفولوژی طبیعی	حرکت پیشرونده	متغیرها		حرکت آهسته	حرکت سریع
		بی حرکت	حرکت درجا		
$r = -0.106$	$r = -0.334$	$r = 0.402$	$r = 0.178$	$r = -0.090$	$r = -0.006$
$* < 0.0001$	$* / 0.01$	$* < 0.0001$	۰/۲۲۲	۰/۳۳۰	$* < 0.0001$

value -P, r: ضریب همبستگی

بحث

در این تحقیق همانطور که انتظار می‌رفت میزان تحرک اسپرم و اسپرم‌های با مورفولوژی سالم و همچنین اسپرم‌های زنده نسبت به قبل از شستشوی اسپرم به روش Direct swim up افزایش چشمگیری داشتند و نیز میزان قطعه قطعه شدن DNA اسپرم و آپوپتوزیس به‌طور معنی‌داری نسبت به قبل از آماده سازی اسپرم به روش Direct swim up افزایش نشان داد.

محققین دیگری نیز به نتایج مشابهی در مورد بهبود پارامترهای اسپرم در روش Swim up دست یافتند، به‌طوری‌که اسپرم‌های جمع آوری شده، هم از نظر تعداد و هم از نظر مورفولوژی طبیعی از میزان بیشتری نسبت به روش‌های دیگر برخوردار بودند (۱۱). بعضی از محققین با مقایسه دو روش Swim up و Percoll Gradient به این نتیجه رسیدند که اگرچه تعداد اسپرم در روش Percoll به‌صورت معنی‌داری بیشتر از روش Swim up است ولی درصد حرکت پیش‌رونده در روش Swim up بیشتر است. همچنین این روش برای افزایش قابلیت باروری در سیکل‌های درمانی و حذف اسپرم‌هایی که از بلوغ کمتری برخوردار بوده و یا در مرحله آنپلوئیدی به سر می‌برند، مناسب می‌باشد (۱۲). علی‌رغم این که روش‌های مختلفی برای جداسازی اسپرم وجود دارد، اما بسیاری همچنان بر روش شستشو و Swim up مایع سیمن تاکید داشته و آن را برای دستیابی به اسپرم‌های با حرکت بیشتر و پیش‌رونده، مناسب می‌دانند (۱۳). یکی دیگر از پارامترهای اصلی اسپرم، میزان مورفولوژی طبیعی آن است که نقش تعیین‌کننده‌ای در باروری افراد دارد. لذا اگر طی انجام روشی بتوان میزان بیشتری از اسپرم‌های طبیعی را جمع آوری نمود، مسلماً میزان باروری نیز افزایش خواهد یافت. Younlgai به مقایسه تاثیر یک بار و دوبار شستشو در روش Swim up بر مورفولوژی سر اسپرم پرداخت و به این نتیجه دست یافت که دو بار شستشو در روش Swim up باعث می‌شود تا اسپرم‌هایی که دارای شکل طبیعی و داری واکنش آکروزومی بهتری هستند جدا شوند و یا اسپرم‌هایی جدا شوند که از توانایی بیشتری در مقابل محیط هیپواسماتیک برخوردارند. عده‌ای نیز بر این باورند که در روش Swim up میزان قطعه قطعه شدن DNA نیز به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد (۱۴). نتیجه این تحقیق موید آن است که کاهش میزان قطعه قطعه شدن DNA اسپرم می‌تواند باعث افزایش لقاح و تشکیل جنین در روش‌های کمک باروری (ART) و

همچنین افزایش میزان حاملگی و تولد نوزاد زنده شود. بعضی از مطالعات نشان می‌دهد که اگر چه روش Swim up شاید کمک چندانی به نمونه‌های طبیعی ننماید و حتی ممکن است در این خصوص روش‌هایی مثل Percoll Gradient بهتر از آن عمل نماید ولی این روش در نمونه‌های اولیگواسپرمی، آستنواسپرمی و تراواسپرمی کاملاً تاثیر خود را نشان داده و باعث می‌گردد تا اسپرم‌های طبیعی بیشتری جدا شوند و درمان ناباروری از نتایج بهتری برخوردار باشد (۱۵). به همین دلیل، بعضی از محققین انجام Swim up double washing را پیشنهاد داده و معتقدند که این روش مخصوصاً برای انجام IVF که اسپرم‌ها باید در اطراف اووسیت قرار گرفته و در محیط انکوباتور لقاح انجام پذیرد؛ بسیار مناسب بوده و نتایج بهتری را به‌دنبال خواهد داشت (۱۶). همین ایده در روش آماده سازی اسپرم برای انجام IUI نیز وجود داشته و بسیار موثر بوده، منتها روش Swim up تک مرحله‌ای آسان‌تر و کم هزینه‌تر بوده است (۱۷).

انکوباسیون اسپرم آماده شده و شسته شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای استفاده در تکنیک‌های کمک باروری (ART) امری معمول است که در مراکز ناباروری صورت می‌گیرد. بررسی تاثیر انکوباسیون آزمایشگاهی اسپرم از پژوهش‌هایی است که مورد توجه محققین در دهه‌ی اخیر قرار گرفته است. تحقیقات اولیه در مورد اثر انکوباسیون اسپرم بر روی پارامترهای اسپرم نظیر تحرک، قابلیت حیات و مورفولوژی بوده است. با مشخص شدن نقش مهم سلامت و کیفیت DNA اسپرم در باروری و موفقیت تکنیک‌های کمک باروری، بسیاری از گروه‌های تحقیقاتی تلاش‌های زیادی برای پیدا کردن ارتباط بین انکوباسیون کوتاه مدت و طولانی مدت سلول‌های اسپرم با یکپارچگی DNA اسپرم انجام داده‌اند (۷، ۱۸-۲۰). در این مطالعه آینده نگر سعی بر پیدا کردن اثر زمان‌های مختلف بر روی میزان قطعه قطعه شدن DNA و شکستگی DNA سلول‌های اسپرم نرمال آماده شده به روش Direct swim-up در اثر انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد داشتیم، که بررسی میزان شکستگی DNA اسپرم به‌وسیله تکنیک TUNEL صورت گرفت. نتیجه این مطالعه نشان داد که بعد از گذشت دو ساعت انکوباسیون اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد میزان شکستگی DNA اسپرم به‌میزان قابل توجهی افزایش پیدا می‌کند. به‌تازگی Matsuura و همکاران (۱۸) اثر انکوباسیون اسپرم در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد بدون CO₂ و با CO₂ را بر روی میزان قطعه قطعه شدن DNA اسپرم بررسی کردند.

آن‌ها دریافتند که پس از گذشت ۳ ساعت و ۲۴ ساعت میزان قطعه قطعه شدن DNA اسپرم در انکوباتور CO₂ دار نسبت به بدون CO₂ به صورت معنی داری بالا بود. همچنین میزان شکستگی DNA اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای اتاق به صورت معنی داری افزایش یافت. آن‌ها از روش Sperm chromatin structure assay برای بررسی میزان قطعه قطعه شدن DNA استفاده کردند. Dalzell و همکاران (۲۱) نشان دادند که DNA اسپرم حاصل از عمل TESE بعد از گذشت ۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد دچار آسیب می‌شود.

Hammadeh و همکاران (۲۲) نشان دادند که انکوباسیون اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بازشدگی و خارج شدن از حالت فشرده هسته اسپرم هنگام لقاح با تخمک را کاهش می‌دهد. آن‌ها مشاهده کردند که بعد از دو ساعت انکوباسیون، میزان عدم خروج هسته‌ی اسپرم از حالت فشرده از ۲۵ درصد به ۸۸ درصد افزایش پیدا می‌کند. در یک مطالعه که توسط Fernandez و همکاران (۲۳) در مورد پویایی قطعه قطعه شدن DNA اسپرم اسب نر انجام شده نشان دادند که بیشترین میزان آسیب که به DNA اسپرم وارد شده زمان‌های بیش از ۶ ساعت انکوباسیون اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. در این تحقیق از تست Sperm Chromatin Dispersion برای بررسی میزان قطعه قطعه شدن DNA اسپرم استفاده شده بود. همچنین اثر مضر دیگری که انکوباسیون اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی اسپرم می‌گذارد تغییرات مورفولوژیکی سر اسپرم است که میزان باروری اسپرم را تحت تاثیر قرار می‌دهد و باعث کاهش میزان باروری اسپرم می‌شود. Peer و همکاران (۲۴) نشان دادند که میزان DNA اسپرم‌های دارای واکوئل بعد از دو ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد به میزان معنی داری افزایش پیدا می‌کند.

یافته‌هایی که ما در این مطالعه به دست آوردیم با یافته‌های دیگر محققان در مورد قطعه قطعه شدن DNA اسپرم پس از آماده شدن به روش Direct swim-up مشابه است (۱۸-۱۹). Zhang و همکاران (۲۰) نشان دادند که قطعه قطعه شدن DNA اسپرم انسانی پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد، در حالی که آن‌ها هیچ تفاوت معنی داری را پس از دو ساعت انکوباسیون اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مشاهده نکردند. ممکن است علل احتمالی این

نتایج به خاطر روش آماده سازی اسپرم باشد. Zhang و همکاران اسپرم را به روش Indirect swim-up آماده کردند در حالی که ما به روش Direct swim-up آماده سازی و شستشوی اسپرم را انجام دادیم و همچنین محیط کشتی که برای آماده سازی و نگهداری اسپرم که Zhang و همکاران استفاده کردند با مطالعه‌ی ما متفاوت است به طوری که آن‌ها از محیط Ham's F10 همراه با G-IVF استفاده کردند در حالی که ما از Ham's F10 به همراه آلبومن ۵ درصد استفاده کردیم. یکی دیگر از تفاوت‌هایی که وجود داشته نحوه‌ی انکوباسیون اسپرم بوده است که Zhang و همکاران، اسپرم را در انکوباسیون CO₂ دار ۵ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کردند در حالی که ما اسپرم را در انکوباسیون بدون CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کردیم.

نتایج ما بر خلاف نتایج Calamera و همکاران (۷) است. آن‌ها ارزیابی اثر گذشت زمان (بلافاصله پس از شستشوی اسپرم به روش Swim-up تا ۴۷ ساعت) بر روی پارامترهای اسپرم و یکپارچگی DNA انجام دادند و دریافتند که تفاوت معنی داری بین زمان‌های مختلف انکوباسیون بر روی قطعه قطعه شدن DNA اسپرم وجود ندارد. یکی از علت‌های احتمالی مربوط به روش مورد استفاده برای ارزیابی قطعه قطعه شدن DNA است که مورد استفاده قرار گرفته است. آن‌ها از روش آکریدین اورنژ (AO) برای بررسی یکپارچگی DNA اسپرم مورد استفاده قرار دادند. در حالی که ما در این تحقیق از روش TUNEL برای بررسی قطعه قطعه شدن DNA اسپرم استفاده کردیم. روش‌های آکریدین اورنژ و TUNEL و دیگر روش‌های بررسی آسیب DNA روش‌های متغیر وابسته به فرد هستند یعنی ممکن است نتایج از فردی به فرد دیگر تا حدودی متغیر باشد.

Yavas و همکاران (۲۵) اثر زمان انکوباسیون اسپرم را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در تلقیح خارج رحمی اسپرم (IUI) و نتایج حاملگی بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند که اگر اسپرم آماده شده برای IUI بیش از ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شود باعث کاهش میزان حاملگی به روش IUI می‌شود. نتایج ما هم نشان می‌دهد که یکی از علل کاهش میزان حاملگی و تولد فرزند زنده می‌تواند در اثر زمان طولانی انکوباسیون اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باشد که بر روی DNA اسپرم اثر می‌گذارد.

Lachaud و همکاران (۲۶) به این نتیجه رسیدند که انکوباسیون

نتیجه گیری

بهترین زمان برای انکوباسیون اسپرم طبیعی انسان در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد که به روش Direct swim-up آماده شده برای استفاده در تکنیک‌های کمک باروری در محدوده زمانی دو ساعت می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از مدیریت پژوهشکده علوم تولید مثل یزد به‌خاطر حمایتشان و راهنمایی‌های سرکار خانم ساره عاشورزاده در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. El C-G, MI D-R, López-Fernández C, Fernández J, et al. Evaluation of sperm DNA damage. *Actas Urol Esp.* 2007; 31(2): 120-31.
2. Lewis SE, Simon L. Clinical implications of sperm DNA damage. *Human Fertility.* 2010; 13(4): 201-7.
3. Yamauchi Y, Riel JM, Ward MA. Paternal DNA Damage Resulting From Various Sperm Treatments Persists After Fertilization and Is Similar Before and After DNA Replication. *Journal of Andrology.* 2012; 33(2): 229-38.
4. Mohammad HN-E, Mohammad S, Shahnaz R, Maryam A, et al. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reproductive BioMedicine Online.* 2005; 11(2): 198-205.
5. Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, et al. Spontaneous DNA fragmentation in swim up selected human spermatozoa during long term incubation. *Journal of Andrology.* 2003; 24(2): 253-62.
6. Van der Westerlaken L, Naaktgeboren N, Verburg H, Dieben S, et al. Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in patients with borderline semen: a randomised study using sibling oocytes. *Technology assessment of assisted reproduction.* 2006; 85(2):395-400.
7. Calamera J, Fernandez P, Buffone M, Acosta A, et al. Effects of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. *Andrologia.* 2001; 33(2): 79-86.
8. Marín-Briggiler CI, Tezón JG, Miranda PV, Vazquez-Levin MH. Effect of incubating human sperm at room temperature on capacitation-related events. *Fertility and sterility.* 2002; 77(2): 252-9.

اسپرم پس از چهار ساعت هیچ تاثیری بر روی پارامترهای اسپرم و شکستگی DNA ندارد. آن‌ها بیان کردند انکوباسیون طولانی مدت اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باعث نکروز سلول‌های اسپرم می‌شود و باعث شکستگی DNA نمی‌شود. آن‌ها معتقدند که اسپرم نرمالی که به‌صورت طبیعی از فرد گرفته شده باشد مسیر شکستگی DNA را طی نمی‌کند. یکی از علل آسیب DNA اسپرم ممکن است به خاطر استرس اکسیداتیو باشد. نشان داده شده است که استرس اکسیداتیو، رادیکال‌های فعال اکسیژن را طی انکوباسیون آزمایشگاهی اسپرم افزایش می‌دهد (۷). سلول‌های اسپرم نسبت به رادیکال‌های فعال اکسیژن حساس و آسیب پذیر هستند. که حساسیت و آسیب پذیری به دلایل مختلفی از قبیل حضور اسید چرب غیر اشباع بالا در غشای اسپرم و عدم وجود آنتی‌اکسیدانت کافی در سیتوپلاسم اسپرم است. همچنین سلول‌های اسپرم خود تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌کنند. بیشترین میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون اسپرم تولید می‌شود (۷). پس در انکوباسیون‌های طولانی مدت نقش رادیکال‌های فعال اکسیژن در آسیب DNA یک علت غیر قابل انکار به‌نظر می‌رسد. محققین دیگر قطعه قطعه شدن DNA اسپرم را پس از انکوباسیون آزمایشگاهی اسپرم بعد از ۴ ساعت مورد بررسی قرار دادند (۵). آن‌ها برای مهار کردن فعالیت اندونوکلاز از مهارکننده‌ای اندونوکلاز (ATA) استفاده کردند و اسپرم را برای مدت ۴ و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کردند. آن‌ها نشان دادند که مهار کننده اندونوکلاز (ATA) هیچ تاثیری بر روی قطعه قطعه شدن DNA اسپرم در زمان‌های مختلف انکوباسیون نداشت. می‌توان گفت که استرس اکسیداتیو و تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن توسط اسپرم به‌عنوان یک علت احتمالی برای آسیب به DNA مطرح است. نگهداری طولانی مدت اسپرم در محیط کشت نیز یکی از علت‌های محتمل آسیب به DNA می‌باشد. انکوباسیون طولانی مدت اسپرمی که در محیط کشت ساده که فاقد مواد مغذی است نیز باعث آسیب به DNA اسپرم می‌شود. از سوی دیگر نتایج به‌دست آمده مشابه با کاری است که Bungum و همکاران (۲۷) انجام دادند. آن‌ها گزارش دادند که پس از گذشت دو ساعت انکوباسیون اسپرم آماده شده به‌روش شیب غلظت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد میزان قطعه قطعه شدن DNA اسپرم به‌میزان معنی‌داری نسبت به انکوبه کردن اسپرم در دمای اتاق (۲۴-۲۳ درجه سانتی‌گراد) افزایش می‌یابد.

9. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen: 5ed., Cambridge University Press; 2010. p. 4-165.
10. Ramezani M, Khalili MA, Adib M. Effect of vitrification on apoptosis and some of parameter of sperm in infertile men. *Feyz Journals of Kashan University of Medical Sciences*. 2010; 14(1): 18-25.
11. Michaeli M, Peer S, Anderman S, Ballas S, et al. Post swim-up versus original sperm quality, and strict criteria morphology, it's influence on fertilization rate in in vitro fertilization program: a pilot study. *International Congress Series*; 2004; 1271(01): 181-18
12. Jakab A, Kovacs T, Zavaczki Z, Borsos A, et al. Efficacy of the swim-up method in eliminating sperm with diminished maturity and aneuploidy*. *Human Reproduction*. 2003; 18(7): 1481-8.
13. Paasch U, Grunewald S, Glander H. Sperm selection in assisted reproductive techniques. *Society of Reproduction and Fertility supplement*. 2007; 65:515.
14. Younglai E, Holt D, Brown P, Jurisicova A, et al. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Human Reproduction*. 2001; 16(9): 1950-3.
15. Adiga SK, Kumar P. ANDROLOGY: Influence of Swim-Up Method on the Recovery of Spermatozoa From Different Types of Semen Samples. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2001; 18(3): 160-4.
16. Chen S-U, Ho H-N, Chen H-F, Chao K-H, et al. Comparison between a two-layer discontinuous Percoll gradient and swim-up for sperm preparation on normal and abnormal semen samples. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 1995; 12(10): 698-703.
17. Inaudi P, Petrilli S, Joghtapour A, Trusso P, et al. Reduction of steps in the preparation of motile sperm for intrauterine insemination does not reduce efficacy of the procedure: simplified one-step swim-up method versus classic swim-up. *Human Reproduction*. 2002; 17(5): 1288-91.
18. Matsuura R, Takeuchi T, Yoshida A. Preparation and incubation conditions affect the DNA integrity of ejaculated human spermatozoa. *Asian journal of andrology*. 2010; 12(5): 753-9.
19. Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, et al. Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *Journal of andrology*. 2003; 24(2): 253.
20. Zhang XD, Chen MY, Gao Y, Han W, et al. The effects of different sperm preparation methods and incubation time on the sperm DNA fragmentation. *Human Fertility*. 2011; 14(3): 187-91.
21. Dalzell LH, McVicar CM, McClure N, Lutton D, et al. Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. *Fertility and sterility*. 2004; 82(5): 1443-5.
22. Hammadeh M, Strehler E, Zeginiadou T, Rosenbaum P, et al. Chromatin decondensation of human sperm in vitro and its relation to fertilization rate after ICSI. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2001; 47(2): 83-7.
23. López-Fernández C, Crespo F, Arroyo F, Fernández J, et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: II. The stallion. *Theriogenology*. 2007; 68(9): 1240-50.
24. Peer S, Eltes F, Berkovitz A, Yehuda R, et al. Is fine morphology of the human sperm nuclei affected by in vitro incubation at 37° C? *Fertility and sterility*. 2007; 88(6): 1589-94.
25. Yavas Y, Selub MR. Intrauterine insemination (IUI) pregnancy outcome is enhanced by shorter intervals from semen collection to sperm wash, from sperm wash to IUI time, and from semen collection to IUI time. *Fertility and sterility*. 2004; 82(6): 1638-47.
26. Lachaud C, Tesarik J, Cañadas ML, Mendoza C. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Human Reproduction*. 2004; 19(3): 607-10.
27. Bungum M, Forsell N, Giwercman A. Evaluation of the effects of different in vitro incubation conditions on sperm DNA integrity. *Hum Reprod*. 2010; (25): I132 - I132.

Apoptosis Will be Increased after 2h Incubation of Human Sperm at 37°C

Nabi A, M.Sc., Khalili MA, Ph.D.* , Halvaei I, M.Sc., Anbari F, M.Sc.

Research and Clinical Center for Infertility, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

* Email corresponding author: khalili59@hotmail.com

Received: 9 Mar. 2013

Accepted: 23 Jul. 2013

Abstract

Aim: The main goal was to evaluate the impact of different incubation time intervals on human sperm DNA status using terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) test.

Material and methods: This prospective study involved 21 normozoospermic specimens. After direct swim-up, sperm cells were incubated at 37°C and DNA damage was evaluated at different time intervals (0, 1, 2 and 3 h). After slide fixation with methanol 100% for 4 minutes and rinse in phosphate-buffered solution (PBS), TUNEL was added to each slide and incubated for 60 minute in dark. Eosin-Nigrosin and Papanicolaou staining protocols were applied in order to assess sperm viability and morphology, respectively.

Results: Sperm viability and normal morphology was improved after sperm processing (100%, 72.3% respectively, $p < 0.0001$). The rate of DNA damage was significantly higher after 2h compared to 0h ($9.19 \pm 0.8\%$ Vs $4.9 \pm 0.9\%$, respectively, $p = 0.008$). Also there was significant difference in abnormal sperm DNA between 3h and 1h ($10.95 \pm 0.7\%$ Vs $7.1 \pm 1\%$, respectively, $p = 0.020$).

Conclusion: Incubation of prepared normozoospermic samples at 37°C more than 2 h may be associated with sperm DNA fragmentation. Therefore, it seems that incubation of human spermatozoa at 37°C should be limited up to 2h prior to use in ART clinics.

Keywords: Spermatozoa, DNA fragmentation, TUNEL