

بررسی ارتباط تغییرات پروتئین اسپرم با نسبت پروتئین P1/P2

محمد صالحی **M.Sc.**، محمدحسین نصرافهانی **Ph.D.**، شهناز رضوی **Ph.D.***

محمد مردانی **Ph.D.**، حمید بهرامیان **Ph.D.**، فرزاد عریضی **M.Sc.***

* دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

* دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

* پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

پست الکترونیک: [Email: mh_nasr@med.mui.ac.ir](mailto:mh_nasr@med.mui.ac.ir)

چکیده

دریافت مقاله: ۸۳/۴/۲۰، پذیرش مقاله: ۸۳/۱۱/۲۱

* **هدف:** بررسی رابطه بین میزان رنگ پذیری اسپرم با CMA3 و نسبت P1/P2

* **مواد و روشها:** در این مطالعه ۷۱ بیمار مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا آنالیز مایع سیمن طبق معیار WHO انجام شد. جهت مشخص کردن کمبود پروتئین از رنگ آمیزی CMA3 استفاده گردید و به وسیله استخراج پروتئینهای هسته اسپرم و سپس تفکیک این پروتئینها توسط ژل الکتروفورز اسید استیک اوره و آنالیز باندهای حاصله نسبت P1/P2 در هر نمونه محاسبه گردید. جهت تایید حضور پروتئینهای P1 و P2 از آنتی بادیهای اولیه Anti-P1 و Anti-P2 وسترن بلات استفاده شد. ۴۵ بیمار تحت عمل میکرو اینجکشن (ICSI) قرار گرفتند.

* **یافته‌ها:** نتایج حاصل نشان می‌دهد که بین رنگ آمیزی CMA3 و نسبت P1/P2 با میزان لقاح رابطه معنی دار و معکوسی وجود دارد ولی بین نسبت P1/P2 و CMA3 رابطه‌ای مشاهده نشد.

* **نتیجه گیری:** نتایج حاصل پیشنهاد می‌کنند اگر چه کمبود پروتئین به وسیله رنگ آمیزی CMA3 مشخص می‌شود با وجود این، رنگ آمیزی شاخصی جهت تشخیص نوع کمبود پروتئین نیست.

کل واژگان: کرومومایسین (CMA3)A3، پروتئین P1، پروتئین P2، میکرواینجکشن (ICSI)

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، زمستان ۸۳، شماره ۲۴، صفحات ۲۱۷-۲۱۲

مقدمه

طی اسپرمیوژن تراکم کروماتین اسپرم افزوده می‌شود. این عمل به واسطه جایگزینی ۸۵ درصد هیستونها توسط پروتئینها صورت می‌گیرد که منجر به قالب گیری مجدد هسته شده و ژنوم اسپرم را به شکل متراکمی بسته بندی می‌نماید. بنابراین در اسپرم DNA به دو صورت نوکلئو هیستونی و نوکلئو پروتئینی سازمان بندی شده است (۱، ۲).

پروتئینهای پروتئینهای دارای وزن مولکولی کم و بار مثبت زیادی هستند که تراکم و بسته بندی کروماتین اسپرم را به وسیله تشکیل باندهای دی سولفید در بین ریشه های سیستمین خود افزایش می دهند (۲، ۳). سطوح سازمان بندی دیگر در اسپرم شامل loop domainهای متصل به ماتریکس هسته و کروموزمهای شبیه hair pin است. این سازماندهی پیچیده DNA در اسپرم نه تنها باعث انتقال ژنوم به نسل آینده می گردد، بلکه DNA را از آسیبهای فیزیکی و شیمیایی محافظت می نماید (۴). دو خانواده پروتئین در اسپرم انسان با مقادیر تقریباً مساوی (P1/P2=۰/۱۶/۱/۱) وجود دارد (۵). P1 که در همه پستانداران موجود است و غنی از آرژنین، سیستمین و تیروزین است و خانواده P2 که در انسان، موش و هامستر وجود دارد و شامل سه پروتئین (P2، P3، P4) است که همه از یک ژن منفرد بر روی کروموزوم ۱۶ ساخته می شوند اما به دلیل تفاوت در محل بریدگی انتهای آمینی طول آنها متفاوت است و غنی از هیستیدین هستند (۲، ۶). خانواده P2 تنها ۵۰ درصد با پروتئین P1 شباهت ساختمانی دارند. P2 عضو اصلی این خانواده است. خانواده

P2 پروتئینهای Zinc finger است که باعث مهار نسخه برداری در انتهای اسپرمیوژنر به وسیله اتصال Zinc finger پروتئینهای P2 به محل‌های اشغال شده توسط فاکتورهای رونویسی می گردند (۷).

کمپلکس DNA-پروتئین به عنوان نوکلئو پروتئین شناخته می‌شود که DNA در آن به صورت فرم β بوده و دارای شیارهای کوچک و بزرگ است. بیشتر مطالعات بر روی جاندارانی که یک نوع پروتئین دارند انجام گرفته است. به طور مثال پروتئین سالمین (۸) و پروتئین گاو (۹) درون شیار بزرگ DNA قرار می‌گیرند. ترکیب و وزن مولکولی پروتئینهای انسان با پروتئین گاو و ماهی متفاوت است (۱۰). در مورد انسان و حیواناتی که دارای چند نوع پروتئین هستند نظرات متفاوتی موجود است که بر اساس این نظریات پروتئینهای درون شیار بزرگ (۱۱) و یا درون هر دو شیار (۱۲) و یا از طریق پیوندهای الکتروستاتیک با ریشه های فسفات DNA بدون محل مخصوصی به سطح خارجی زنجیره DNA باند می‌شوند (۱۰). وجود پروتئینهای P2 در اسپرم انسان منجر به طرح این سوال می‌شود که نقش این خانواده در تراکم DNA به چه صورت است؟ به طوری که مطرح شده است در بیماران نابارور، تمایل خانواده P2 برای اتصال به DNA کاهش می‌یابد و میزان این پروتئینها نیز در این بیماران کاهش یافته و در نهایت منجر به ناباروری می‌گردد (۱۳). از بین فلوروکرومهای فراوان و رنگهای مصرفی در ارزیابی پروتئین هسته اسپرم رنگ کرومومایسین A3 (CMA3) بیشترین مورد استفاده را دارد. این رنگ فلورسنت در غیاب پروتئین به صورت یک

با حرکت و مورفولوژی مناسب انتخاب و پس از شکست دم توسط پیست مخصوص به داخل اووسیت تزریق شد. اووسیت‌های تزریق شده در محیط G1.III شستشو و کشت داده شدند. ۱۶ ساعت پس از تزریق، تخمکها جهت وجود یا عدم پیش هسته بررسی شدند. لازم به ذکر است که در تمام مراحل، کشت در زیر روغن مخصوص محیط کشت انجام شد و به جز G.MOPS که در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد، محیطهای دیگر در شرایط ۵ درصد CO₂ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و بیش از ۹۰ درصد رطوبت انجام گرفت. برای تعیین میزان لقاح نسبت تعداد تخمکهای لقاح یافته به کل تخمکها در ۱۰۰ ضرب شد.

رنگ‌آمیزی CMA3 (ارزیابی کمبود پروتامین)

پس از ۳ بار شستشوی سیمن با PBS (۳۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه) از اسپرمهای شسته شده جهت رنگ‌آمیزی CMA3 استفاده شد. به اسپرمهای شسته شده حجم مساوی از محلول فیکساتیو کارنوی (متانول و اسیداستیک به نسبت ۳ به ۱) اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از تهیه اسمیر از نمونه هر اسلاید با ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۲۵ درصد CMA3 (Sigma) در بافر مک الوین با pH ۷ به مدت ۲۰ دقیقه در محیط تاریک رنگ‌آمیزی شد. سپس اسلایدها با PBS شستشو داده شده و با لامل مونت گردید. با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس (Nikon Eclipse 600 Tokyo, Japan) با فیلتر ۴۷۰-۴۶۰ نانومتر و بزرگنمایی ۱۰۰× تعداد ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید بررسی گردید و درصد اسپرمهای درخشان (CMA3 مثبت) و اسپرمهای فاقد درخشندگی (CMA3 منفی) محاسبه گردید. نمونه‌های اسپرمی در دو گروه بیش از ۳۰ درصد CMA3 مثبت (دارای کمبود پروتامین) و کمتر از ۳۰ درصد CMA3 مثبت (دارای پروتامین نرمال) تقسیم‌بندی شدند (۱۸).

انجماد اسپرم

حدود ۵۰۰ میکرولیتر مایع سیمن از هر نمونه با استفاده از روش استاندارد انجماد در نیتروژن مایع منجمد گردید (۱۹). بعد از جمع‌آوری نمونه‌های مورد نظر، سیمن منجمد شده در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد ذوب شد و با استفاده از محیط Ham's F10 سه بار شستشو داده شد و جهت استخراج پروتامین از نمونه ذوب شده استفاده گردید.

استخراج پروتامینها

جهت تخلیص پروتئینهای هسته اسپرم از روش De Yebra با اندکی تغییر استفاده شد (۲۰). به طور خلاصه رسوب حاصل از شستشوی نمونه با یک میلی‌مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) در آب مقطر به منظور لیز غشا سلولی اسپرم از طریق شوک اسمزی به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۶۰۰ شستشو داده شد. مایع رویی را تخلیه کرده و رسوب حاصله در ۱۰۰ میکرولیتر بافرتریس ۱۰۰ میلی‌مولار حاوی ۲۰ میلی‌مولار EDTA و یک میلی‌مولار PMSF با pH ۸ مخلوط شد. سپس به سوسپانسیون حاصل ۱۰۰ میکرولیتر گوانیدین ۶ مولار و دی‌تیوتریتول ۵۷۵ میلی‌مولار به ترتیب جهت شکستن پیوندهای هیدروژنی و دی‌سولفید اضافه گردید. سوسپانسیون حاصل در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد و دور از نور به مدت ۳۰ دقیقه جهت گسترش کروماتین قرار داده شد. یک میلی‌لیتر اتانول سرد ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه به سوسپانسیون اضافه گردید این سوسپانسیون در

دایمر در شیار کوچک به توالیهای GC باند می‌شود و موجب عریض و کم عمق شدن شیار کوچک و کوچک شدن شیار بزرگ می‌شود (۱۴). در طی اسپرمیورژن میزان رنگ‌پذیری سلولها نسبت به CMA3 متفاوت است به طوری که اسپرم نابالغ به میزان زیادی CMA3 مثبت بوده در حالی که اسپرم بالغ منفی است، که بیانگر دوره‌های مختلف رسوب پروتامین در طی این فرآیند است. طبق تحقیقات گذشته CMA3 وسیله‌ای ارزان و مفیدی برای غربالگری سریع مردان نابارور با کمبود پروتامین است. گزارشات حاکی از آن است که در این گونه اسپرمها میزان nick و دنچوراسیون DNA افزایش می‌یابد (۱۵). همچنین ارتباط معکوسی بین کمبود پروتامین (CMA3) و میزان لقاح گزارش شده است (۱۶، ۱۷). با توجه به اهمیت پروتامینها به خصوص پروتامین P2 در باروری، هدف این مطالعه بررسی رابطه بین میزان رنگ‌پذیری اسپرم با CMA3 و نسبت P1/P2 است.

مواد و روشها

این مطالعه به صورت تجربی و آینده‌نگر بر روی ۷۱ بیمار مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان انجام گرفت. از بین این بیماران ۴۵ بیمار تحت عمل ICSI قرار گرفته و جهت بررسی میزان لقاح از این نمونه‌ها استفاده گردید. در این گروه متوسط سن مردان ۳۶±۵ سال و زنان ۳۱±۵ سال بود.

معیارهای انتخاب نمونه

جهت انجام مطالعه از مقادیر اضافه سیمن افراد مراجعه کننده (با کسب اجازه) استفاده شد. به علت انجام فرآیند تخلیص پروتئین، نمونه‌های با غلظت حداقل ۱۰ میلیون در هر میلی‌لیتر انتخاب و مطالعه بر روی آنها انجام شد. برای بررسی میزان لقاح، نمونه‌هایی که حداقل ۴ تخمک با کیفیت مناسب داشتند مورد مطالعه قرار گرفتند و نمونه‌های دارای تخمک با کیفیت نامناسب از مطالعه حذف شدند. از بین ۴۵ نمونه ۲۷ نمونه دارای شرایط فوق‌الذکر بودند.

روش انجام کار

در ابتدا آنالیز مایع سیمن (غلظت، مورفولوژی و حرکت اسپرم) طبق معیار WHO انجام شد. از باقیمانده نمونه سیمن جهت انجام ICSI، رنگ‌آمیزی CMA3 و انجماد استفاده گردید.

روش انجام ICSI

پس از تحریک و القا تخمک‌گذاری توسط داروهای حاوی FSH (Menopure, Ferring) و hCG (Organon, Holland)، فولیکولها با سونوگرافی واژینال تخلیه گردیدند و تخمکهای به دست آمده در محیط G.MOPS (Vitrolife, Gothenburg, Sweden) شستشو شد. به تخمکها آنزیم هیالورونیداز (Vitrolife, Gothenburg, Sweden, Hyase) اضافه شد تا سلولهای اطراف تخمک جدا گردند و پس از چندین شستشو به داخل دیش میکرواینجکشن حاوی قطرات G.MOPS منتقل گردیدند. اسپرم شستشو شده نیز به داخل قطره ICSI.100 (Vitrolife, Gothenburg, Sweden) در همین دیش انتقال داده شد. سپس با استفاده از دستگاه میکرومانیپولاتور اسپرم

استاندارد انجام گرفت (۲۲). برای انتقال پروتئینها به کاغذ نیترو سلولز از محلول ایمونوبات اسید استیک ۰/۹ میلی مولار با اختلاف پتانسیل ۸۵ ولت به مدت ۳۵ دقیقه استفاده شد. آنتی بادی P1 و P2 توسط دکتر کلاوس استیگر هدیه شد و بقیه مواد جهت این مرحله از شرکت داکو دانمارک تهیه شد.

استاندارد نمودن نتایج

برای تهیه سیمن گروه کنترل یک نمونه سیمن با حجم ۵ میلی لیتر و غلظت ۶۰ میلیون تهیه و سپس به ۱۰ قسمت که هر کدام حاوی ۳۰ میلیون اسپرم، تقسیم و در نی های انجماد منجمد شدند. در هر بار ۷ نمونه از نمونه های مورد مطالعه و یک نمونه از گروه کنترل تخلیص و در یک ژل، الکتروفورز شدند سپس نسبت P1/P2 محاسبه شد. در گروه کنترل نسبت P1/P2 بین ۰/۵۵-۰/۳۳ بود. ضریب تغییرات (Coefficient of variation) یا به دست آوردن نسبت انحراف معیار به میانگین ضرب در ۱۰۰ محاسبه شد. ضریب تغییرات کمتر از ۱۵ درصد بود، که موید عدم تاثیر خطاهای آزمایشگاهی و بین آزمایشی بر نتایج است.

آزمونهای آماری

ارتباط بین پارامترها با استفاده از آنالیزهای آماری ضریب همبستگی، student t test و chi square بررسی گردید. تمام آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت.

یافته‌ها

نتایج حاصل از ژل که توسط نرم افزار lab work محاسبه گردیده بود، به صورت نسبت P1/P2 گزارش شد. جهت تشخیص کمبود پروتامین از رنگ کرومومایسین A3 استفاده شد. در شکل ۱ اسپرمهای کرومومایسین A3 مثبت (دارای کمبود پروتامین) به صورت درخشان و اسپرمهای کرومومایسین A3 منفی به صورت غیر درخشان مشخص شده است. میانگین درصد CMA3 در بیمارانی ۱۴/۴۹±۲۲/۶۸ بود. اسیداستیک اوره است. در ۱ lane سلولهای Vero که فاقد پروتامین هستند به عنوان کنترل و ۲ lane نشان دهنده هیستونها، پروتئینهای حد واسط و پروتامینها در اسپرم است. ۳ lane مشخص کننده حضور پروتامینهای P1 و P2 با روش وسترن بلات در ۲ lane است. ضریب تغییرات در این تحقیق برای نمونه ای که با هر بار تخلیص همراه نمونه های تحت مطالعه بررسی گردید، کمتر از ۱۵ درصد بود که بیانگر پایین بودن خطاهای ناشی از تخلیص، الکتروفورز و آنالیز نسبت P1/P2 می باشد. میانگین نسبت P1/P2 در بیمارانی ۰/۸±۰/۴ بود. شکل ۲ بیانگر آنالیز پروتئینهای هسته اسپرم به وسیله ژل الکتروفورز نتایج حاصل با استفاده از آزمون ضریب همبستگی حاکی از عدم رابطه بین CMA3 و نسبت P1/P2 است (نمودار ۱).

در بیمارانی که کمبود پروتامین ندارند (CMA3⁺<30%) میانگین نسبت P1/P2 برابر ۰/۷۹±۰/۴ است و در بیمارانی که دارای کمبود پروتامین هستند (CMA3⁺>30%) میانگین نسبت P1/P2 برابر ۰/۷۷±۰/۳ است که آزمون t-student این اختلاف را معنی دار نشان نمی دهد (P-value= ۰/۸۳). طبق نظر Balhorn (۵) طیف طبیعی نسبت P1/P2 برابر ۰/۹۸±۰/۱۲ است. لذا براین اساس نسبت P1/P2

حرارت ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۴ دقیقه و با دور ۱۱۰۰۰ سانترفوژ گردید. مایع رویی را تخلیه کرده و شستشو با اتانول تکرار شد. ۸۰۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۰/۵ مولار به رسوب حاصله اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانترفوژ گردید. مایع رویی که حاوی پروتئین است را نگه داشته و به آن ۲۰۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱۰۰ درصد اضافه شد. این محلول را به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۴ درجه سانتی گراد قرار داده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه و در حرارت ۴ درجه سانتی گراد با دور ۱۱۰۰۰ سانترفوژ گردید. رسوب حاصل ۲ بار در ۵۰۰ میکرولیتر ۲- مرکاپتواتانل- استن یک درصد شستشو شد (هر بار به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد و با دور ۱۱۰۰۰). رسوب نهایی خشک و در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. به منظور تهیه کنترل جهت ژل الکتروفورز از سلولهای Vero کشت داده شده و سپس تخلیص هیستونها طبق روش فوق استفاده گردید. لازم به ذکر است تمام مواد مصرفی در فرآیند تخلیص از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

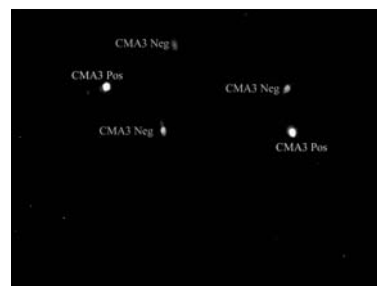
تفکیک و آنالیز پروتامینها

از ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید اسیداستیک اوره به ارتفاع ۲۰ سانتی متر و محتوی Running gel و Stacking gel با تغییراتی در روش جهت تفکیک پروتئینها استفاده شد (۲۱). Running gel از مخلوط اکریل آمید ۲۰ درصد، بیس اکریل آمید ۰/۲۹ درصد، اوره ۲/۵ مولار، اسید استیک ۰/۹ مولار، تترامیتل اتیلن دی آمین (TEMED) ۰/۳۳ درصد و آمونیوم پرسولفات ۰/۱۸ درصد با pH ۳-۳/۱ تهیه شد. Stacking gel از مخلوط اکریل آمید ۷/۵ درصد، بیس اکریل آمید ۰/۱۱ درصد، اوره ۲/۵ مولار، اسیداستیک ۰/۲۷ مولار، تترامیتل اتیلن دی آمین (TEMED) ۰/۵ درصد و آمونیوم پرسولفات ۰/۴۸ درصد با pH ۳/۱-۲/۹ تهیه شد. رسوب حاصل از تخلیص در بافر نمونه محتوی اسیداستیک ۰/۹ مولار، سوکروز ۳۰ درصد و متیل گرین ۰/۴ درصد مخلوط شد. الکتروفورز ژل به مدت ۵-۴ ساعت با اختلاف پتانسیل ۱۸۰ ولت در حالت معکوس و بافر تانک اسید استیک ۰/۹ مولار انجام شد. سپس ژل در محلول فیکساتیو حاوی متانول ۵۰ درصد و اسیداستیک ۱۰ درصد به مدت ۲ ساعت فیکس شد. سپس توسط محلول رنگ کوماسی بلو (۱/۱ گرم کوماسی بلو G-۲۵۰، ۲۵۰ میلی لیتر متانول، ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر و ۵۰ میلی لیتر اسیداستیک) به مدت یک شب رنگ آمیزی شد. پس از آن به مدت ۵ دقیقه در محلول فیکساتیو قرار داده شد. رنگ زدایی ژل با محلول رنگ زدای حاوی متانول ۱۰ درصد و اسیداستیک ۱۰ درصد به مدت یک شب انجام گرفت (۲۲). ژل حاصل با استفاده از دستگاه اسکنر و برنامه فتوشاپ اسکن شد. تصویر حاصل توسط نرم افزار Lab work UVP 3.0.02.00 آنالیز و نسبت P1/P2 در هر نمونه محاسبه شد. مواد مصرفی فوق از شرکت بیوژن مشهد تهیه شد.

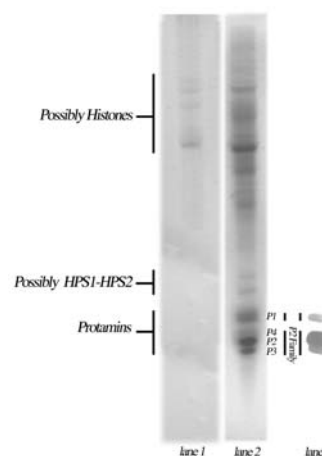
وسترن بلات

برای تایید حضور پروتامینهای P1 و P2 با استفاده از آنتی بادیهای اولیه Anti-P1 و Anti-P2، آنتی بادی ثانویه کونژوگه به بیوتین، استرپتو آویدین پراکسیداز و دی آمینوبندین وسترن بلات به روش

در بیماران به ۳ گروه پایین تر از حد طبیعی ($<0/86$)، طبیعی ($0/87-1/11$) و بیش از حد طبیعی ($>1/11$) تقسیم شد.



شکل ۱: نمای میکروسکوپی رنگ آمیزی کرومومایسین A3 اسپرمهای درخشان CMA3⁺



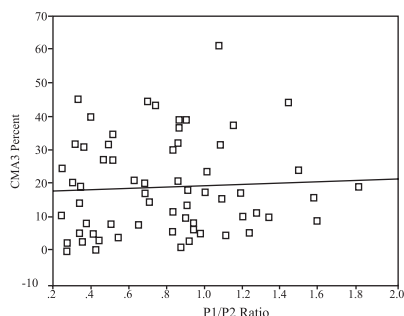
شکل ۲: آنالیز پروتئینهای هسته به وسیله ژل الکتروفورز. Lane ۱: سلولهای vero حاوی هیستون (کنترل). Lane ۲: اسپرم حاوی هیستون، پروتئینهای حد واسط (HPS1 و HPS2) و پروتامینها. Lane ۳: وسترن بلات مشابه ۲ جهت تایید حضور پروتامینهای خانواده P1 و P2

در بین بیمارانی که کمبود پروتامین داشتند ($CMA3^+ > 30\%$)، ۵۸/۸ درصد کاهش نسبت P1/P2 (احتمالاً کمبود P1)، ۲۹/۴ درصد در طیف طبیعی و ۱۱/۸ درصد افزایش نسبت P1/P2 (احتمالاً کمبود P2) را نشان دادند. در بیمارانی که کمبود پروتامین نداشتند ($CMA3^+ < 30\%$)، ۵۳/۱ درصد کاهش نسبت P1/P2 (احتمالاً کمبود P1)، ۲۶/۵ درصد در طیف طبیعی و ۲۰/۴ درصد افزایش نسبت P1/P2 (احتمالاً کمبود P2) را نشان دادند. با استفاده از آزمون chi square تفاوت معنی داری بین نسبتهای P1/P2 در دو گروه CMA3 بالای ۳۰ درصد و زیر ۳۰ درصد به دست نیامد (جدول ۱).

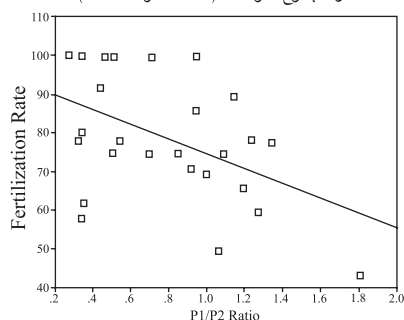
نتیجه دیگر مطالعه حاضر حاکی از وجود رابطه معنی دار بین CMA3 و میزان لقاح است ($r = -0/412$ و $P \leq 0/002$) (نمودار ۲). بین نسبت P1/P2 و میزان لقاح نیز رابطه معنی دار و معکوسی مشاهده گردید ($r = -0/464$ و $P \leq 0/017$) (نمودار ۳).

جدول ۱: فراوانی نسبت P1/P2 در نمونه‌های با مقادیر طبیعی و دارای کمبود پروتامین

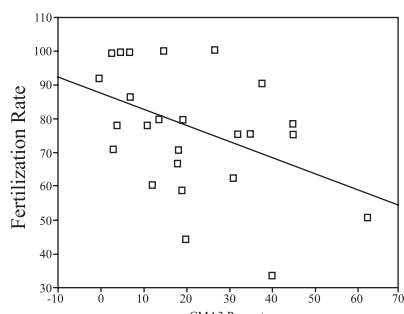
P1/P2 CMA3	<0/86	0/87-1/11	>1/11
CAM3>۳۰درصد	۱۰ (۵۸درصد)	۵ (۲۹درصد)	۲ (۱۱درصد)
CAM3<۳۰درصد	۲۶ (۵۳درصد)	۱۲ (۲۶درصد)	۱۰ (۲۰درصد)



نمودار ۱: رابطه بین رنگ آمیزی کرومومایسین A3 (کمبود پروتامین) و نسبت P1/P2 در مجموع نمونه ها ($r = 0/07$ و $P = 0/58$)



نمودار ۲: رابطه بین رنگ آمیزی کرومومایسین A3 (کمبود پروتامین) و میزان لقاح در بیماران ICSI ($r = -0/412$ و $P \leq 0/002$)



نمودار ۳: رابطه بین نسبت P1/P2 و میزان لقاح در بیماران ICSI ($r = -0/464$ و $P \leq 0/017$)

بحث

طی اسپرمیوزن پروتئینهای ویژه بیضه (پروتامینها و پروتئینهای حدواسط) باعث تراکم کروماتین اسپرماتید می گردند. در مرحله اول این فرآیند که در اسپرماتید گرد به وقوع می پیوندد هیستونهای سوماتیک توسط هیستونهای ویژه بیضه جایگزین می شوند، سپس این هیستونها توسط پروتئینهای حدواسط جایگزین شده و در نهایت در Elongating spermatid پروتامینها (P1 و P2) جایگزین پروتئینهای حدواسط می شوند. در نتیجه این فرآیند، کروماتین متراکم تر و از لحاظ رونویسی خنثی می شود.

این تغییر شکل کروماتین اهمیت حیاتی جهت عملکرد اسپرم دارد، به طوری که تغییر در بیان پروتامینها یا ساختمان آنها موجب ناباروری مرد می گردد (۲۵). برای ارزیابی کروماتین روشهای متعددی استفاده می شود، که یکی از معمول ترین روشها استفاده از رنگهای فلورسنت است. رنگ فلورسنت کرومومایسین A3 در شیار کوچک DNA به

خارجی DNA بدون قرارگیری در محل خاصی به DNA متصل می شوند (۱۰). مطالعات بر روی پروتئینهای zinc finger که به DNA متصل می شوند، مانند فاکتور رونویسی TFIIIA، رسپتورهای هورمونهای استروئیدی و دیگر فاکتورهای رونویسی مشخص کرده است که این پروتئینها دارای قسمت α هلیکسی بوده و به سه نوکلئوتید در شیار بزرگ DNA اتصال می یابند (۲۸). با توجه به اینکه پروتامینهای P2 نیز جزء پروتئینهای zinc finger هستند (۷)، بنابراین احتمال می رود که پروتامینهای P2 نیز مثل دیگر پروتئینهای zinc finger که به DNA متصل می شوند در شیار بزرگ قرار گرفته باشند.

طبق نظر Bizzaro و همکاران (۲۹) در صورتی که پروتئینهای بازی هسته اسپرم را توسط غلظت بالای نمک خارج نموده و سپس اسپرم را توسط CMA3 رنگ آمیزی کنیم میزان فلورسنت حاصله به دلیل خارج شدن پروتامینها افزایش می یابد. ولی اگر به این مجموعه پروتامین ماهی اضافه نماییم میزان فلورسنت کاهش خواهد یافت. محققان مذکور پیشنهاد کردند که با اضافه کردن پروتامین ماهی به کمپلکس DNA-CMA3، پروتامین با CMA3 رقابت کرده و به دلیل میل ترکیبی زیاد با DNA در شیار کوچک قرار گرفته و CMA3 از شیار کوچک خارج می شود.

به علاوه در تحقیق Bizzaro از پروتامین ماهی استفاده شده است که وزن مولکولی (۴ کیلو دالتون) و ساختمان شیمیایی آن (فاقد سیستمین و هیستیدین) با پروتامینهای انسانی متفاوت است (۱۰). با وجود این دو مولکول CMA3 که توسط یک یون منیزیم به هم متصل شده اند (دایمر) در شیار کوچک DNA به توالیهای GC متصل می شود و به علت قرارگیری آن بین جفت بازها باعث شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی شده و منجر به تغییراتی در شیار کوچک می شود که در طی آن شیار کوچک کم عمق تر و عریض تر و شیار بزرگ فشرده می شود (۱۴). ولی در مطالعه حاضر بین میزان CMA3 و نسبت P1/P2 رابطه معنی داری حاصل نشد. به علاوه فراوانی بیماران با مقادیر پایین، طبیعی و بالای نسبت P1/P2 در هر دو گروه CMA3 بالا و زیر ۳۰ درصد مشابه است (جدول ۱). عدم ارتباط بین این نسبت و نتایج حاصل از رنگ آمیزی CMA3 می تواند به این علت باشد که احتمالاً هر دو خانواده پروتامین در شیار بزرگ DNA و یا در سطح خارجی DNA هستند. محققین عدم ارتباط بین CMA3 و کمبود پروتامین را این چنین توجیه می نمایند که در صورتی که پروتامین در شیار بزرگ یا سطح خارجی DNA نباشد دایمر CMA3 به توالیهای GC در شیار کوچک متصل شده و باعث عریض تر شدن این شیار و در نهایت کوچکتر شدن شیار بزرگ می شود ولی در صورتی که پروتامین در شیار بزرگ یا سطح خارجی DNA حضور داشته باشد رنگ CMA3 که باید به صورت دایمر باشد به شیار کوچک باند نمی شود و به این ترتیب ارتباط بین رنگ CMA3 و کمبود پروتامین توجیه می شود که لازمه این بحث استفاده از پروتامین انسانی، CMA3، DAPI و DNA فاقد پروتامین است. بنابراین مهم نیست که P1 و یا P2 کم باشد، در هر صورت CMA3 مشخص کننده کمبود پروتامین است و نوع کمبود را مشخص نمی کند. به طوری که با استفاده از آزمونهای آماری t-student و chi-square اختلاف معنی داری بین میانگین اسپرمهای با درصد بالای CMA3 مثبت و نوع کمبود پروتامین مشخص نشد.

توالیهای GC باند می شود و لذا یکی از روشهای ارزیابی وضعیت کروماتین محسوب می گردد (۱۴). Bianchi و همکاران این رنگ آمیزی را به عنوان روش مفیدی جهت تشخیص کمبود پروتامین و وجود بریدگی (nick) در DNA معرفی کردند (۱۵). تحقیقات متعددی در زمینه استفاده از رنگ آمیزی CMA3 جهت پیشگویی قدرت باروری مرد در لقاح آزمایشگاهی صورت گرفته است.

نتایج مطالعه حاضر بیانگر وجود رابطه بین میزان لقاح و CMA3 در بیماران ICSI است که مطابق تحقیقات (۲۳) Sakkas، Nasr-Esfahani (۲۴) و Razavi (۱۸) است. تحقیقات اخیر این محققین بیانگر آن است که بر خلاف روش IVF که مورفولوژی طبیعی اسپرم نقش مهم تری را نسبت به کمبود پروتامین در لقاح ایفا می نماید در روش ICSI کمبود پروتامین نقش مهم تری دارد و این امر می تواند از کاهش تاثیر پارامترهای اسپرمی به دلیل تزریق مستقیم اسپرم به درون اووسیت باشد. در صورتی که در IVF علاوه بر کمبود پروتامین، مورفولوژی و تحرک اسپرم نیز اهمیت ویژه ای دارند. تحقیقات نشان داده که میزان کل پروتامینها و نسبت پروتامین P1 به پروتامین P2 (P1/P2) عامل مهمی در عملکرد اسپرم هستند (۱۸، ۵، ۶) ولی تاثیر نسبت P1/P2 در باروری مردان مؤثرتر از مقدار پروتامینها گزارش شده است (۲۵).

از آنجایی که جایگزینی هیستون توسط پروتامین در مراحل آخر اسپرمیوزن همراه با تشکیل اکروزوم، تغییرات غشاء اسپرم و دیگر تغییرات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی رخ می دهد، احتمالاً تغییر در نسبت P1/P2 همراه با طیف وسیعی از نقایص اسپرمیوزن است که می تواند عملکرد اسپرم را تحت تاثیر قرار دهد.

بر اساس مطالعات گذشته و مطالعه حاضر کمبود P2 منجر به کاهش میزان لقاح می گردد. اگر چه اهمیت کمبود P2 کاملاً مشخص نشده است، ولی تحقیقات اخیر Cho (۲۶) و همکارانش بیانگر آن است که ارتباط مستقیمی بین اسپرمهای دارای کمبود P2 و آسیب DNA وجود دارد و این آسیب می تواند باعث عدم رشد جنین شود. به طور طبیعی حدود ۱۵ درصد هیستونها در اسپرم بالغ باقی می ماند که این مناطق دارای ساختار نوکلئو هیستونی هستند و احتمالاً ژنهای imprint شده را مشخص می کنند (۲۷). طبق تحقیقات جدید، اسپرمی که کمبود P2 داشته باشد کمبود P1 نیز دارد (۲۶). پس می توان نتیجه گرفت که با کمبود P2 مناطق بیشتری از DNA فاقد پروتامین بوده و در نتیجه آسیب DNA و افزایش مناطق نوکلئو هیستونی (اسپرمهای با درصد بالای CMA3 مثبت) را در بر خواهد داشت. افزایش مناطق نوکلئو هیستونی (کمبود پروتامین) باعث می شود که کروماتین اسپرم در اووسیت دیرتر از تراکم خارج شده و منجر به نقص لقاح گردد همچنین آسیب DNA احتمالاً می تواند منجر به نقص لقاح گردد.

مطالعات متعددی درباره نحوه اتصال پروتامینها به DNA انجام شده است. به طوری که مشخص گردیده پروتامین P1 در ماهی (۸) و گاو (۹) به شیار بزرگ DNA متصل می شوند ولی در انسان و موجوداتی که چند نوع پروتامین دارند نظرات متفاوتی وجود دارد. به طوری که Pogany در سال ۱۹۸۱ پیشنهاد کرد که پروتامینهای موش درون شیار بزرگ DNA قرار می گیرند (۱۱) و D'auria و همکاران گزارش نمودند که پروتامینها به هر دو شیار DNA متصل می گردند (۱۲) و Bianchi و همکاران گزارش نمودند که پروتامینها بر روی سطح

تقدیر و تشکر

داریم. همچنین از دکتر استیگر جهت اهداء آنتی‌بادیها تشکر می‌نماییم. بودجه این تحقیق توسط پژوهشکده رویان طرح شماره ۲-۲۳۶ پرداخت گردید.



References

1. Barone JG, De Lara J, Cummings KB, Ward WS: DNA organization in human spermatozoa. *J Androl* 1994; 15(2): 139-44
2. Carrell DT, Liu L: Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl* 2001; 22(4): 604-10
3. McKay DJ, Renaux BS, Dixon GH: Human sperm protamines. Amino-acid sequences of two forms of protamine P2. *Eur J Biochem* 1986; 156(1): 5-8
4. Braun RE: Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet* 2001; 28(1): 10-2
5. Balhorn R, Reed S, Tanphaichitr N: Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia* 1988; 44(1): 52-5
6. De Yebra L, Balleca JL, Vanrell JA, Bassas L, Oliva R: Complete selective absence of protamine P2 in humans. *J Biol Chem* 1993; 268(14): 10553-7
7. Bianchi F, Rousseaux-Prevost R, Sautiere P, Rousseaux J: P2 protamines from human sperm are zinc-finger proteins with one CYS2/HIS2 motif. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 182(2): 540-7
8. Hud NV, Milanovich FP, Balhorn R: Evidence of novel secondary structure in DNA-bound protamine is revealed by Raman spectroscopy. *Biochemistry* 1994; 33(24): 7528-35
9. Brewer L, Corzett M, Lau EY, Balhorn R: Dynamics of protamine 1 binding to single DNA molecules. *J Biol Chem* 2003; 278(43): 42403-8
10. Bianchi F, Rousseaux-Prevost R, Bailly C, Rousseaux J: Interaction of human P1 and P2 protamines with DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 201(3): 1197-204
11. Pogany GC, Corzett M, Weston S, Balhorn R: DNA and protein content of mouse sperm. Implications regarding sperm chromatin structure. *Exp Cell Res* 1981; 136(1): 127-36
12. D'Auria G, Paolillo L, Sartorio R, Wurzbürger S: Structure and function of protamines: an 1H nuclear magnetic resonance investigation of the interaction of clupeines with mononucleotides. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1162(1-2): 209-16
13. Belokopytova IA, Kostyleva EI, Tomilin AN, Vorob'ev VI: Human male infertility may be due to a decrease of the protamine P2 content in sperm chromatin. *Mol Reprod Dev* 1993; 34(1): 53-7
14. Gao XL, Patel DJ: Chromomycin dimer-DNA oligomer complexes. Sequence selectivity and divalent cation specificity. *Biochemistry* 1990; 29(49): 10940-56
15. Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D: Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod* 1993; 49(5): 1083-8
16. Lolis D, Georgiou I, Syrrou M, Zikopoulos K, Konstantelli M, Messinis I: Chromomycin A3-staining as an indicator of protamine deficiency and fertilization. *Int J Androl* 1996; 19(1): 23-7
17. Iranpour FG, Nasr-Esfahani MH, Valojerdi MR, al-Taraihi TM: Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17(1): 60-6
18. Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghadam A: Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. *Andrologia* 2003; 35(4): 238-43
19. Elder KT, Avery S, Mills C: IVF laboratory procedures. Welwyn Garden City Hertfordshire, Broadwater Press, 1990, pp 39-40.
20. De Yebra L, Oliva R: Rapid analysis of mammalian sperm nuclear proteins. *Anal Biochem* 1993; 209(1): 201-3
21. Spiker S: A modification of the acetic acid-urea system for use in microslab polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 1980; 108(2): 263-5
22. De Yebra L, Balleca JL, Vanrell JA, Corzett M, Balhorn R, Oliva R: Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fertil Steril* 1998; 69(4): 755-9
23. Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi U, Shoukir Y, Campana A: Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 1998; 13: 11-19
24. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M: Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18: 199-205
25. Aoki VW, Carrell DT: Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian J Androl* 2003; 5: 315-324
26. Cho C, Jung-Ha H, Willis WD, Goulding EH, Stein P, Xu Z, Schultz RM, Hecht NB, Eddy EM: Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod* 2003; 69(1): 211-7
27. Reik W, Walter J: Genomic imprinting: paternal influence on the genome. *Natur Gene Rew* 2001; 2: 21-32
28. Leon O, Roth M: Zinc fingers: DNA binding and protein-protein interaction. *Biol Res* 2000; 33: 21-30
29. Bizzaro D, Manicardi GC, Bianchi PG, Bianchi U, Mariethoz E, Sakkas D: In-situ competition between protamine and fluorochromes for sperm DNA. *Mol Hum Reprod* 1998; 4(2): 127-32

