# Effect of chromatin condensation on frozen-thawed sperm DNA integrity in normozoospermic men

**Golshan-Iranpour F [1, 2], Zamani Rarani F[3], Dashti GR [2,4]**

1. Associate Professor, Saint Maryam Fertility and Infertility Center, Shahid Beheshti Hospital, Isfahan, Iran. ORCID ID: 0000-0003-3390-3233
2. Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
3. MSc Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
4. Associate Professor, Saint Maryam Fertility and Infertility Center, Shahid Beheshti Hospital, Isfahan, Iran. (Corresponding Author), Tel: +98-3137929040, Email: dashti@med.mui.ac.ir, ORCID ID: 0000-0002-2725-6423

## ABSTRACT

**Background and Aim:** Sperm cryopreservation is a common technique used for management of male infertility. But this method has detrimental effects on sperm DNA and chromatin quality. Evaluation of different markers associated with the health of genetic material of sperm is beneficial for determination of the fertility of sperm. The aim of this study was to assess the effect of sperm chromatin condensation on frozen-thawed sperm DNA integrity in normozoospermic men.

**Material and Methods:** In this experimental study, 30 semen samples from normozospermia men were cryopreserved for two weeks with a common technique used in most infertility centers, at -196 ° C and then thawed. Samples before and after freezing were evaluated for abnormal chromatin condensation, DNA denaturation and DNA fragmentation by toluidine blue (TB) staining, acridine orange (AO) staining and sperm chromatin dispersion (SCD) test respectively.

**Results:** Before freezing, we found a significant correlation only between abnormal chromatin condensation (evaluated by TB) and DNA denaturation (assessed by AO) ($p < 0.05$). While after cryopreservation correlation was found between abnormal chromatin condensation and DNA denaturation and fragmentation ($p < 0.05$).

**Conclusion:** Abnormal chromatin condensation can make DNA susceptible to denaturation and fragmentation.

**Keywords:** Sperm, Deoxyribonucleic acid, Chromatin, Normozoospermic

**Received:** Dec 24, 2018 **Accepted:** May 12, 2019

**How to cite the article**: Golshan-Iranpour F, Zamani Rarani F, Dashti GR. Effect of chromatin condensation on frozen-thawed sperm DNA integrity in normozoospermic men. SJKU 2019;24(3):34-42.

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13 ]

[ DOI: 10.29252/sjku.24.3.34 ]

# تاثیر تراکم کروماتین بر تمامیت DNA اسپرم فریز و ذوب شده در مردان نورموزواسپرم

**فرهاد گلشن ایران پور[۱،۲]، فهیمه زمانی رارانی[۳]، غلام رضا دشتی[۲،۴]**

۱. دانشیار، مرکز باوری و ناباروری حضرت مریم، بیمارستان شهید بهشتی، اصفهان، ایران. شناسه ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۳۳۹۰-۳۲۳۳

۲. دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۴. دانشیار، مرکز باوری و ناباروری حضرت مریم، بیمارستان شهید بهشتی، اصفهان، ایران (مولف مسئول)، تلفن ثابت: ۰۳۱-۳۷۹۲۹۰۴۰، پست الکترونیک: dashti@med.mui.ac.ir، شناسه ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۲۷۲۵-۶۴۲۳

## چکیده

**زمینه و هدف:** ذخیره ی انجماد سریع (Cryopreservation) اسپرم تکنیکی رایج برای افرادی که در رابطه با مسئله ی ناباروری رنج می‌برند را برطرف نموده است. ولی این روش می تواند اثرات مخرب بر کیفیت دئوکسی ریبونوکلئیک اسید، ( DNA) و کروماتین که معادل مرگ هسته و سلولی اسپرم دارد می‌باشد. ارزیابی مارکرهای مختلف سلامت ماده ی ژنتیکی اسپرم عوامل موثر در جهت تشخیص قدرت باروری اسپرم، در درمان بیماران ناباروری است. در این مطالعه، ارزش تشخیصی و بررسی احتمالی تاثیر تراکم کروماتین بر تمامیت DNA در ارزیابی اسپرم انجماد و ذوب شده در مردان نورموزواسپرم قرار گرفته است.

**روش بررسی:** در این مطالعه ی تجربی، ۳۰ نمونه مایع منی مردان نورموزواسپرم به مدت دو هفته با تکنیک رایج در اکثر مراکز باروری ناباروری در دمای ۱۹۶- درجه ی سانتی گراد انجماد سریع و سپس ذوب شدند. نمونه ها قبل و بعد از انجماد سریع از لحاظ تراکم غیر طبیعی کروماتین، دناتوراسیون DNA و فراگمانتااسیون DNA به ترتیب با رنگ آمیزی Toluidine blue (TB)، رنگ آمیزی Acridine Orange (AO) و تست Sperm Chromatin Dispersion (SCD) ارزیابی شدند.

**یافته ها:** قبل از انجماد سریع تنها بین تراکم غیر طبیعی کروماتین ارزیابی شده توسط TB و دناتوراسیون DNA بررسی شده توسط AO ارتباط وجود داشت ($p <$ ۰/۰۵). در حالی که بعد از انجماد سریع بین تراکم غیر طبیعی کروماتین، دناتوراسیون DNA و فرگمانتاسیون DNA همبستگی دیده شد ($p <$ ۰/۰۵).

**نتیجه گیری:** تراکم غیر طبیعی کروماتین می تواند DNA را مستعد دناتوراسیون و فراگمانتاسیون کند.

**کلید واژه ها:** اسپرم، دئوکسی ریبونوکلئیک اسید، کروماتین، نورموزواسپرم

وصول مقاله:۹۷/۱۰/۳ اصلاحیه نهایی:۹۸/۱/۳۱ پذیرش:۹۸/۲/۲۲

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13 ]

[ DOI: 10.29252/sjku.24.3.34 ]

**مقدمه**

ناباروری زوج های جوان بسیاری را تحت تاثیر قرار داده است. فاکتورهای مردانه در حدود ۶۰ درصد از علل ناباروری دخالت دارند که ۴۰ درصد به تنهایی و ۲۰ درصد در ترکیب با فاکتورهای زنانه می باشد (۱). یکی از روش های رایج در تکنینک های کمک باروری (ART)، ذخیره انجمادی اسپرم می باشد که در مراکز باروری- ناباروری و همچنین بانک اسپرم به طور گسترده کاربرد دارد از جمله قبل از شیمی درمانی، رادیوتراپی و یا اعمال جراحی با احتمال نارسایی بیضه ای نیز در مردان تحت عمل جراحی وازکتومی به منظور حفظ باروری استفاده می شود (۳، ۲). علیرغم مزایای فراوان روش انجماد و ذوب مایع سمن در زمینه ی تولیدمثل، این روش اثرات مخرب بر سلول ها خواهد داشت. محققان یکی از دلایل این اثرات نا مطلوب را تولید بیش از اندازه ی رادیکال های فعال اکسیژن می-دانند. این رادیکال ها اثرات مخربی بر پارامترهای اسپرم از جمله حرکت، بقا و کیفیت DNA و کروماتین اسپرم دارد (۶-۴). در نتیجه بعد از انجماد انجام تست های بررسی کیفیت اسپرم توصیه می‌شود تا اهداف درمانی با موفقیت بیشتری محقق شود. مطالعات نشان داده‌اند که آسیب کروماتین و DNA در ناباروری تاثیرگذار هستند. همچنین در نمونه هایی با پارامترهای اسپرمی طبیعی همچنان احتمال وجود کروماتین و DNA آسیب دیده وجود دارد و این پارامترها نمی‌توانند نشان دهنده ی وضعیت کروماتین و DNA اسپرم باشند.در نتیجه انجام تست های دیگر به ویژه در زوج هایی با ناباروری بدون علت نامشخص توصیه شده است (۸، ۷).

تخمک و رویان قادر به اصلاح برخی از آسیب های موجود در ماده ی ژنتیکی اسپرم می‌باشند اما زمانی که این تخریب ها از حد آستانه بالاتر باشند قدرت اصلاح قادر به پاسخ گویی نیست (۹). مطالعات نشان داده‌اند میزان بالای آسیب DNA در اسپرم می تواند اثرات همچون عدم لقاح یا لانه گزینی (۸) ، سقط (۱۰)، رشد رویان مختل (۱۱)، نقایص جنینی (۱۲) و... داشته باشد. هر چند مطالعاتی نیز وجود دارد که نتایج مخالفی را در خصوص نقش هر یک از این مارکرهای سلامت ماده ی ژنتیکی نشان می‌هند (۱۳،۱۴).

یکی از دلایل عدم استفاده از تست های بررسی وضعیت کروماتین و DNA اسپرم در آنالیز های روتین، قیمت بالا و نیاز به مهارت در انجام این تست ها می باشد. هدف ما از این مطالعه بررسی تاثیر تراکم کروماتین بر تمامیت DNA اسپرم انجماد و ذوب شده در مردان نورموزواسپرم می‌باشد. و به دنبال آن پاسخ به این پرسش که آیا می توان با توجه به تراکم کروماتین از انجام دیگر تست های مرتبط با سلامت DNA صرف نظر کرد.

## روش بررسی

این مطالعه، یک مطالعه ی تجربی بود که به شماره کد طرح: ۳۹۶۳۷۸ بر روی ۳۰ نمونه مایع منی صورت گرفت. نمونه‌ها پس از اخذ رضایت آگاهانه، از بین مردان نورموزواسپرم مراجعه کننده به مرکز فوق تخصصی باروری ناباروری حضرت مریم(س) بیمارستان شهید بهشتی اصفهان که حداقل ۴-۳ روز مقاربت نداشته ، به صورت تصادفی انتخاب و در ظروف استریل جمع آوری شدند. آنالیز اسپرم بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (World WHO Health Organization) انجام شد (۱۵). نمونه های سمن در دمای اتاق به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه قرار گرفته تا به حالت مایع تبدیل شود.سپس قبل از فرآیند فریز و پس از آن تست‌های سلامت کروماتین و DNA در کنار سایر تست های روتین انجام شد. این مطالعه پس از اخذ مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، درآزمایشگاه بافت شناسی گروه آناتومی دانشکده پزشکی این دانشگاه و نیز مرکز فوق تخصصی باروری ناباروری حضرت مریم(س) بیمارستان شهید بهشتی اصفهان انجام شد.

## روش انجماد و ذوب اسپرم



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13 ]

[ DOI: 10.29252/sjku.24.3.34 ]

فریز اسپرم با استفاده از محیط تجاری(Sperm vitrolife Freeze Solution, Vitrolife, Goteborg, Sweden) انجام شد. جهت فریز با محیط تجاری فریز Vitrolife، نمونه سمن با نسبت ۱:۱ در دمای اتاق با این محیط مخلوط و به داخل کرایو ویال کدگذاری شده انتقال داده شدند.کرایوویال ها ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در معرض بخار نیتروژن مایع قرار گرفت و نهایتا در داخل تانک حاوی نیتروژن مایع در دمای ۱۹۶- درجه سانتی گراد ذخیره شد. بعد از دو هفته ویال ها از تانک خارج و بالافاصله داخل ظرف حاوی نیتروژن مایع و نهایتا به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب ۲±۳۵ درجه سانتی گراد غوطه ور شده و سپس از لحاظ کیفیت کروماتین و DNA مورد ارزیابی قرار گرفتند.

### رنگ آمیزی Toluidine Blue (TB)

تولویدین بلو جهت ارزیابی تراکم کروماتین اسپرم استفاده شد. اسمیر های خشک شده در دمای اتاق را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۴ در محلول اتانول و استون که با نسبت ۱:۱ تهیه شد فیکس نموده و سپس به مدت ۵ دقیقه در محلول ۰.۱ نرمال هیدروکلریک اسید در دمای $^{\circ}C$ ۴ د انکوبه نمودیم.سپس هر لام سه مرتبه و هر بار به مدت ۲ دقیقه با آب مقطر شستشو دادیم و نهایتا با محلول تولویدین بلو ۰/۰۵٪ در سترات فسفات ۵۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رنگ کردیم.سپس لام ها را به مدت ۲ دقیقه با آب مقطر شستشو دادیم.با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی عدسی شیئی ۱۰۰ از هر نمونه حداقل ۲۰۰ اسپرماتوزوآ شمارش شد.سلول های دارای کروماتین طبیعی(-TB) دارای سر آبی روشن و اسپرم با کروماتین غیر طبیعی دارای سر با رنگ آبی تیره (+TB)در نظر گرفته شدند (۱۶).

### رنگ آمیزی Acridine Orange (AO)

از تکنیک آکریدین اورنج برای تعیین دناتوریشن DNA استفاده می شود. اسمیر تهیه شده از هر نمونه به مدت حداقل ۲ ساعت در دمای $^{\circ}C$۴ در محلول کارنوی (متانول/گلاسیال استیک اسید به نسبت ۱:۳) فیکس گردید. سپس هر نمونه در محلول رنگ تازه تهیه شده ی آکریدین اورانج (با غلظت ۰.۱۹ mg/dl) در بافر mcllvain phosphate-citrate (pH=4) به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت و پس از شستشو با آب در همان روز با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت با فیلتر ۴۶۰ نانومتر ارزیابی شد. در هر اسلاید ۲۰۰ اسپرماتوزوا بررسی و میزان اسپرم های طبیعی با DNA دو رشته ای سالم (سبز رنگ) نیز اسپرم های دارای DNA دناچور یا تک رشته ای (نارنجی تا قرمز رنگ) به صورت درصد گزارش شد (۱۸، ۱۷).

### بررسی اسپرم ها از لحاظ فراگمانتاسیون DNA (Sperm Chromatin Dispersion (SCD))

ارزیابی نمونه های سمن از نظر فراگمانتاسیون DNA با استفاده از کیت هالواسپرم (شرکت دایان زیست آزما) صورت گرفت. ۵۰ میکرولیتر از نمونه با آگارز با نقطه ی ذوب پایین مخلوط و بر روی لام شیشه ای قرار داده شد. پس از قرار دادن لامل، اسلاید ها به مدت ۵ دقیقه بر روی سطح سرد با دمای $^{\circ}C$ ۴ انکوبه شد.سپس لامل برداشته و اسلاید در محلول دناتوره کننده و پس از آن در محلول لیز کننده غوطه ور شد. پس از شستشو با آب مقطر، با استفاده از محلول های اتانول با غلظت صعودی (۷۰، ۹۰ و ۱۰۰٪) آبگیری و پس از خشک شد در دمای اتاق رنگ آمیزی مجددا با آب مقطر شستشو داده شد. با استفاده از میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۱۰۰۰×) در هر لام حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. در نهایت تعداد اسپرم های دارای هاله بزرگ یا متوسط (نرمال) و دارای هاله کوچک یا بدون هاله (دارای شکست) به صورت درصد گزارش شد (۱۹ ، ۱۷).

### روش آماری

پس از جمع آوری داده ها آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS Version 20 (Inc.,Chicago.IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در این مطالعه از آزمون همبستگی پیرسون ( Pearson's



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13 ]

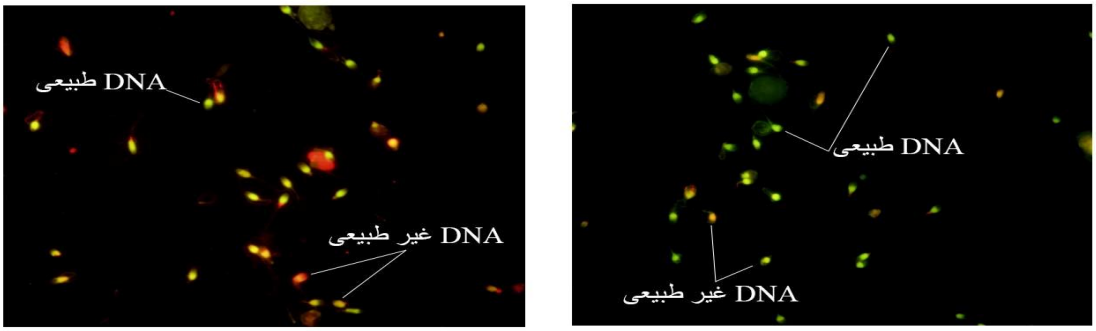
[ DOI: 10.29252/sjku.24.3.34 ]

Correlation Coefficient) استفاده شد. $p < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

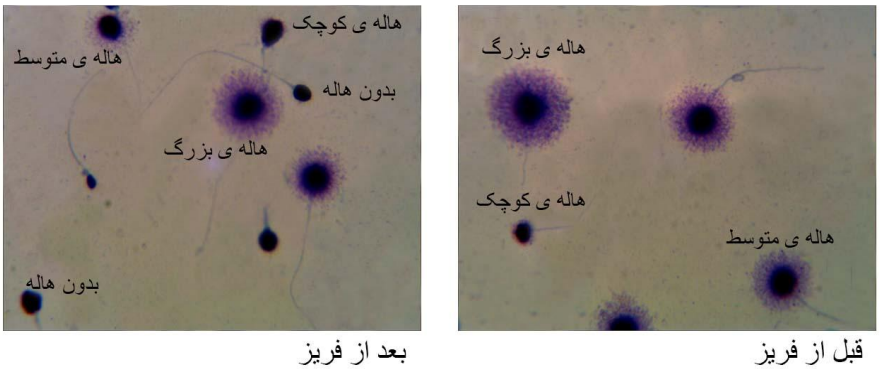
**نتایج**

بر اساس جدول ۱ و شکل های ۲- ۱، در نمونه های تازه و قبل از فرآیند فریز و ذوب، بین تراکم غیر طبیعی کروماتین و میزان دناتوراسیون DNA ارتباط مستقیم قوی وجود داشت ($p <۰/۰۵$) به عبارتی نمونه هایی با میزان بالای اسپرم های غیر طبیعی از لحاظ تراکم کروماتین، درصد بالایی از دناتوراسیون DNA را نیز نشان دادند. همچنین پس از فریز بین میزان اسپرم هایی با تراکم غیر طبیعی کروماتین و اسپرم های دارای دناتوراسیونDNA ارتباط وجود داشت ($p <۰/۰۵$) و نسبت به قبل از فریز این ارتباط معنی دارتر بود.

همچنین قبل از فریز نتایج حاصل از ارزیابی درصد اسپرم هایی با DNA فراگمانته با استفاده از تست SCD با درصد اسپرم هایی با تراکم غیر طبیعی کروماتین ارتباط نداشت ($p >۰/۰۵$) در حالی که پس از فریز ارتباط مثبت قوی بین میزان DNA فراگمانتاسیون و تراکم غیر طبیعی کروماتین اسپرم دیده شد ($p <۰/۰۵$).




شکل ۱: رنگ آمیزی آکریدین اورنج. نمایش اسپرم با DNA سالم دو رشته ای (سبز رنگ) و DNA دناتوره تک رشته ای (نارنجی تا قرمز رنگ) با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت با بزرگ نمایی ۱۰۰۰×




شکل ۲: تست SCD. اسپرم هایی با هاله ی بزرگ، هاله ی متوسط به عنوان سلول با DNA نرمال یا غیرفرگمانته و اسپرم هایی با هاله ی کوچک یابدون هاله به عنوان سلولی با DNA غیر طبیعی یا فراگمانته در نظر گرفته شد (میکروسکوپ نوری،بزرگ نمایی ۱۰۰۰×)



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13 ]

[ DOI: 10.29252/sjku.24.3.34 ]

جدول ۱: نتایج بررسی هم ارتباطی قبل و بعد از فریز و ذوب اسپرم (تعداد نمونه برای هر گروه = ۳۰، p value و r)

| | ٪ تراکم غیر طبیعی کروماتین (TB) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | قبل از فریز | | بعد از فریز | |
| | P value | r | P value | r |
| ٪ دناتوراسیون DNA (AO) | ۰/۰۰۵ | ۰/۵۰۲ | ۰/۰۰۰ | ۰/۶۰۱ |
| ٪ فراگمنتاسیون DNA (SCD) | ۰/۱۶۱ | ۰/۲۶۲ | ۰/۰۰۰ | ۰/۶۹۶ |

## بحث

تراکم بیشترکروماتین اسپرم انسانی در مقایسه با سایر سلول-ها با جایگزینی پروتئین هیستون با پروتامین در طی اسپرمیوژنز امکان پذیر شده است و اسپرم‌های بالغ موجود در دم اپیدیدیم دارای کروماتین با تراکم بالا در مقایسه با سایر سلول‌ها هستند. یکی از راه‌های تعیین میزان تراکم کروماتین سنجش سطوح پروتامین یا هیستون با روش های مختلف می‌باشد. در انسان پروتامین نوع ۱ و نوع ۲ در تراکم ماده ی ژنتیکی اسپرم نقش دارند. کروماتین متراکم ماده ی وراثتی اسپرم را در برابر آسیب‌ها در طی انتقال و رسیدن به اووسیت حفظ می‌کند(۲۰).

نتایج مطالعه ی ما نیز نشان داد که قبل از فرآیند فریز اسپرم انسانی، تراکم غیر طبیعی کروماتین با میزان دناتوراسیون DNA آن ارتباط مستقیم دارد، در حالی بین درصد اسپرم های دارای DNA فرگمانته و درصد اسپرم های دارای تراکم غیر طبیعی کروماتین هم ارتباطی وجود نداشت. بعد از فریز و ذوب نمونه ها، تراکم غیر طبیعی کروماتین علاوه دناتوراسیون DNA با میزان فراگمانتاسیون نیز مرتبط بود. به عبارتی بعد از فریز افزایش میزان اسپرم‌هایی با تراکم غیر طبیعی کروماتین با افزایش میزان دناتوراسیون و فراگمانتاسیون همراه بود.

تراکم غیر طبیعی کروماتین ممکن است با مستعد کردن ماده ی ژنتیکی اسپرم نسبت به عوامل آسیب رسان داخلی و یا خارجی منجر به ناباروری فرد شود. Ajina و همکارانش در سال ۲۰۱۷ نیز در مطالعه ای بر روی ۴۱ مرد آستنوتراتواسپرمیا و ۲۸ مرد بارور مشاهده کردند که بین درصد اسپرم هایی با ساختار غیر طبیعی کروماتین ارزیابی شده توسط رنگ‌آمیزی تولویدین بلو و نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج ارتباط وجود دارد و مردانی با سطوح بالای ساختار کروماتینی غیرطبیعی درصد بالاتری از دناتوراسیون DNA و پارامترهای اسپرمی غیر طبیعی دارند (۲۱).

مطالعات گذشته نشان داده اند که فرآیند فریز علیرغم مزایای فراوان بر پارامتر های اسپرمی نظیر حرکت، بقا و نیز ماده ی ژنتیکی آن اثرات مخربی دارد (۱۷ ،۳). در مطالعه ی نشان داد که غذای پر کلستروال به تنهای یا به همراه آهن ، آسیب معنی داری را درDNA اسپرم ایجاد میکند(۱۸). نتایج پژوهش‌های انجام شده در شرایطی که بر میزان تراکم کروماتین تاثیر گذار است، هم‌راستا با نتایج مطالعه ی ما می‌باشد . همچنین در مطالعه ای دیگر گزارش شده است که در افراد سیگاری کیفیت نمونه ی منی از لحاظ میزان حرکت و بقا اسپرم ها کاهش یافته و میزان فراگمانتاسیون DNA از لحاظ آماری در مقایسه با افراد غیر سیگاری بیشتر است، احتمالا اختلال در فرآیند تراکم کروماتین اسپرم در افراد سیگاری، DNA را نسبت به آسیب مستعد می کند. (۲۳ ،۲۲). در مطالعه ما نیز پیشنهاد می‌شود که در افراد نورموزواسپرم، فرآیند فریز و ذوب با تخریب ساختار



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13 ]

[ DOI: 10.29252/sjku.24.3.34 ]

متراکم کروماتین اسپرم، DNA آن را نسبت به آسیب ها مستعد کرده است.

مطالعات فراوان در خصوص تاثیرات تنش گرمایی بر پارامتر های اسپرم انجام شده است. Zhang و همکارانش در سال ۲۰۱۵ در مطالعه ای بر روی اثرات تنش گرمایی کیسه ی بیضه بر کیفیت نمونه منی، گزارش کردند که بین میزان تراکم کروماتین و میزان فراگمانتاسیون DNA ارتباط مثبت معنی داری وجود دارد. همچنین تنش گرمایی منجر به آسیب رساندن تراکم کروماتین اسپرم و همچنین آسیب DNA آن می‌شود (۲۴).

Fortes و همکارانش در سال ۲۰۱۴ در مطالعه ۱۳۳ گاو نر و با اندازه گیری محتوای پروتامین اسپرم آن ها و مشاهده ی ارتباط آن با میزان تخریب DNA گزارش کردند که احتمالا کمبود پروتامین فاکتور تاثیر گذاری در تخریب و یا آسیب پذیری DNA این سلول ها می‌باشد (۲۵).

همچنین گزارش شده است که میزان هیستون هسته اسپرم مردان سیگاری در مقایسه با افراد غیر سیگاری به طور معنی داری بیشتر می‌باشد و بین این میزان و مارکر های تنش اکسیداتیو ارتباط مثبت قوی وجود دارد. به عبارتی این سلول ها در مردان سیگاری در مقایسه با افراد غیر سیگاری نسبت به آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو مستعد تر هستند (۲۶). همراستا با این نتایج، Simon و همکارانش در سال ۲۰۱۴ ، نشان داده اند که در مردان انتخاب شده از زوج های تحت درمان های کمک باروری، میزان هیستون های باقی مانده در هسته ی اسپرم با تخریب DNA آن ها ارتباط مستقیم دارد (۲۷).

همچنین در مطالعه ی Hosseinifar فر و همکارانش در سال ۲۰۱۵، نشان داده اند که در مردان گلوبوزواسپرمیا سطح آسیب DNA، اندازه گیری شده به وسیله ی chromatin structure assay (SCSA) ، با میزان پروتامین اسپرم ارزیابی شده با CMA3 ارتباط دارد (۲۸).

## نتیجه گیری

با توجه به نتایج بررسی مارکرهای مختلف سلامت کروماتین و DNA اسپرم قبل و بعد از فرآیند فریز ما پیشنهاد می‌کنیم که تراکم غیر طبیعی کروماتین اسپرم می-تواند یکی از دلایل حساسیت بیشتر DNA آن نسبت به آسیب باشد. به نظر می‌رسد در مردان نورموزواسپرم قبل از فریز، ارزیابی وضعیت تراکم کروماتین با TB می تواند نشان دهنده ی تمایل DNA آن ها برای دناتوراسیون (AO) باشد. در حالی که بعد از فریز و ذوب، یا به عبارت بهتر در نمونه‌های در معرض آسیب، با انجام رنگ آمیزی نسبتا ساده و ارزان TB می توان با اطمینان بیشتری به وضعیت سلامت DNA (AO و SCD) پی برد. ما پیشنهاد می‌کنیم که مطالعات آینده با افراد غیر نورمواسپرم نظیر الیگواسپرمیا، تراتواسپرمیا و ... انجام شود.

## تشکر و قدردانی

از معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به دلیل حمایت از این طرح سپاسگزاری می گردد.این مقاله از پایان نامه کارشناسی ارشد علوم تشریحی به شماره کد طرح ۳۹۶۳۷۸ استخراج شده است.



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13 ]

[ DOI: 10.29252/sjku.24.3.34 ]

**References**


1. Jodar M, Soler-Ventura A, Oliva R, of Reproduction MB, Group DR. Semen proteomics and male infertility. J Proteomics 2017;162:125-34.
2. Keshtgar S, Iravanpour F, Gharesi-Fard B, Kazerooni M. Combined effect of Trolox and EDTA on frozen-thawed sperm quality. Iran J Med Sci 2016;41:230-7.
3. Naeini ZK, Bafrani HH, Nikzad H. Evaluation of ebselen supplementation on cryopreservation medium in human semen. Iran J Reprod Med 2014; 12:249–56.
4. Amidi F ,Pazhohan A, Nashtaei MS, Khodarahmian M, Nekoonam S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. Cell Tissue Bank 2016;17:745-56.
5. Toghiani S, Dashti GR, Roudbari NH, Roozbehani S. Effect of ascorbic acid and menthone on the caspase 3 in the sperm cells of acyclovir treated rats. Acta Medica 2016;32:1213-8.
6. Golshan Iranpour F, Fazelian K, Dashti GR. Thymoquinone as a natural spermostatic substance in reproductive medicine: an experimental study. Int J Reprod Biomed (Yazd) 2017;15: 641–8.
7. Bungum M, Bungum L, Giwercman A. Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. Asian J Androl 2011;13:69-75.
8. Sivanarayana T, Ravi Krishna C, Jaya Prakash G, Krishna K, Madan K, Sudhakar G, et al. Sperm DNA fragmentation assay by sperm chromatin dispersion (SCD): correlation between DNA fragmentation and outcome of intracytoplasmic sperm injection. Reprod Med Biol 2014;13:87–94.
9. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. Fertil Steril 2010;93:1027-36.
10. Zidi-Jrah I, Hajlaoui A, Mougou-Zerelli S, Kammoun M, Meniaoui I, Sallem A, Brahem S, Fekih M, Bibi M, Saad A, Ibala-Romdhane S. Relationship between sperm aneuploidy, sperm DNA integrity, chromatin packaging, traditional semen parameters, and recurrent pregnancy loss. Fertil Steril 2016;105:58-64.
11.Simon L, Murphy K, Shamsi MB, Liu L, Emery B, Aston KI, et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. Hum Reprod 2014;29:2402-12.
12. Santos R, Palos-Ladeiro M, Besnard A, Porcher JM, Bony S, Sanchez W, et al. Relationship between DNA damage in sperm after ex vivo exposure and abnormal embryo development in the progeny of the three-spined stickleback. Reproductive Toxicology 2012;36:6-11.
13. González-Marín C, Gosálvez J, Roy R. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. Int J Mol Sci 2012;13:14026-52.
14. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, García-Herrero S, Remohí J, Fernandez JL. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. Fertil Steril 2011;95:124-8.
15. Cooper TG, Noonan E, Von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. world health organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update 2010;16:231-45.
16. Rahiminia T, Hosseini A, Anvari M, Ghasemi-Esmailabad S, Talebi AR. Modern human sperm freezing: effect on DNA, chromatin and acrosome integrity. Taiwan J Obstet Gynecol 2017;56:472-6.
17. Rarani FZ, Golshan-Iranpour F, Dashti GR. Correlation between sperm motility and sperm chromatin/DNA damage before and after cryopreservation and the effect of folic acid and nicotinic acid on post-thaw sperm quality in normozoospermic men. Cell Tissue Bank 2019;28:1-12.




[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13 ]

[ DOI: 10.29252/sjku.24.3.34 ]

18. Ghasemi N, Dashti GhrR, Amoozgar F, Vaez SA . Effect of cholesterol,iron and vitamin e on protamine deficiency and DNA fragmentation of male rabbit sperm. J Isfahan Med Sch 2013;31:1769-78. [In Persian]
19. Tandara M, Bajić A, Tandara L, Bilić-Zulle L, Šunj M, Kozina V, et al. Sperm DNA integrity testing: big halo is a good predictor of embryo quality and pregnancy after conventional IVF. Andrology 2014;2:678-86.
20 .García-Peiró A, Martínez-Heredia J, Oliver-Bonet M, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, et al. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. Fertil Steril 2011;95:105-9.
21. Ajina T, Ammar O, Haouas Z, Sallem A, Ezzi L, Grissa I, et al. Assessment of human sperm DNA integrity using two cytochemical tests: Acridine orange test and toluidine blue assay. Andrologia 2017;49:1-6.
22.Yu B, Qi Y, Liu D, Gao X, Chen H, Bai C, et al.Cigarette smoking is associated with abnormal histone-to-protamine transition in human sperm. Fertil Steril 2014;101:51-7.
23. Taha EA, Ez-Aldin AM, Sayed SK, Ghandour NM, Mostafa T. Effect of smoking on sperm vitality, DNA integrity, seminal oxidative stress, zinc in fertile men. Urology 2012;80:822-5.
24. Zhang MH, Shi ZD, Yu JC, Zhang YP, Wang LG, Qiu Y. Scrotal heat stress causes sperm chromatin damage and cysteinyl aspartate-spicific proteinases 3 changes in fertile men. J Assist Reprod Genet 2015;32:747-55.
25. Fortes MR, Satake N, Corbet DH, Corbet NJ, Burns BM, Moore SS, et al. Sperm protamine deficiency correlates with sperm DNA damage in B os indicus bulls. Andrology 2014;2:370-8.
26. Hamad MF, Shelko N, Kartarius S, Montenarh M, Hammadeh ME. Impact of cigarette smoking on histone (H2B) to protamine ratio in human spermatozoa and its relation to sperm parameters. Andrology 2014;2:666-77.
27. Simon L, Liu L, Murphy K, Ge S, Hotaling J, Aston KI, et al. Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment. Human Reproduction 2014;29:904-17.
28. Hosseinifar H, Yazdanikhah S, Modarresi T, Totonchi M, Sadighi Gilani M, Sabbaghian M. Correlation between sperm DNA fragmentation index and CMA 3 positive spermatozoa in globozoospermic patients. Andrology 2015;3:526-31.

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13 ]

[ DOI: 10.29252/sjku.24.3.34 ]