Effect of protamine and Its abnormalities on male fertility potential

Tahereh Rahiminia[1], Javad Amini Mahabadi[2], Ehsan Farashahi Yazd[3], Alireza Talebi[4]

1. Assistant Professor, Gametogenesis Research Center, Shahid Beheshti Hospital, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran., (Corresponding Author), Tel: +98-31-55621158, Email: tahereh.rahiminia@gmail.com. ORCID ID: 0000-0002-4320-0892
2. Ph.D. of Reproductive Biology, Gametogenesis Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran. ORCID ID: 0000-0003-2930-1213
3. Assistant Professor, Stem Cell Biology Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran. ORCID ID: 0000-0003-1122-0626
4. Assistant Professor, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran. ORCID ID: 0000-0001-7753-0710

ABSTRACT

Background and Aim: All studies on mammals and rodents have revealed the presence of protamine 1 (P1) and protamine 2 (P2) in the sperm which is indicative of the expression of these two genes at different molecular levels. The aim of this study was to investigate the effect of protamine and its disorders on male fertility potential.

Materials and Methods: Using keywords of sperm, protamine, male infertility, and chromatin we searched PubMed and Google Scholar databases between 1980 and 2020.

Results: Sperm concentration, motility, and morphology in the patients with variable P1/P2 ratios were significantly reduced compared to those in the individuals with normal P1/P2 ratios which were directly associated with reduced fertility rate. The most common protamine abnormality in the infertile men was increased P1/P2 ratio which was frequently associated with a decreased level of P2 and increased level of P2 precursors. Increased levels of histone B2 (H2B) in sperm and lower levels of protamine have been reported. Any disturbances in the histone expression process cause inconvenient early chromatin condensation, transcription arrest, as well as spermatogenesis failures.

Conclusion: The results of this study showed that the protamine transcripts ratio can be used as a marker for male fertility. Histones/protamines mRNAs ratios are important for sperm quality and therefore can be used as predictors for male infertility. Altered levels of protamines may result in an increased susceptibility to injury in the sperm DNA causing infertility or poor outcome in assisted reproduction.

Keywords: Male infertility, Sperm, Protamine, Chromatin

Received: July 6, 2019 **Accepted:** Aug 8, 2020

How to cite the article: Tahereh Rahiminia, Javad Amini Mahabadi, Ehsan Farashahi Yazd, Alireza Talebi. Effect of protamine and Its abnormalities on male fertility potential. SJKU 2020;25(5):52-66.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و پنجم / آذر و دی ۱۳۹۹/۶۶-۵۲

اثر پروتامین و اختلالات آن در پتانسیل باروری مردان

طاهره رحیمی نیا[۱]، جواد امینی مهابادی[۲]، احسان فرا شاهی یزد[۳]، علیرضا طالبی[۴]

۱. استادیار، مرکز تحقیقات گامتوژنزیس، مرکز باروری و ناباروری بیمارستان شهید بهشتی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، ایران. پست الکترونیک: tahereh.rahiminia@gmail.com، تلفن:۸ ۰۳۱۵۵۶۲۱۱۵، کد ارکید: ۰۸۹۲-۴۳۲۰-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۲. دکتری بیولوژی تولیدمثل، مرکز تحقیقات گامتوژنزیس، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، ایران. کد ارکید: ۱۲۱۳-۲۹۳۰-۰۰۰۳-۰۰۰۰

۳. استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلول های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ایران. کد ارکید: ۰۶۲۶-۱۱۲۲-۰۰۰۳-۰۰۰۰

۴. استادیار، پژوهشکده علوم تولیدمثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ایران. کد ارکید: ۰۷۱۰-۷۷۵۳-۰۰۰۱-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: در همه پستانداران و جوندگان مورد مطالعه، اسپرم دارای هر دو پروتامین ۱ (P1) و پروتامین ۲ (P2) بوده است که نشان دهنده بیان این دو ژن در سطوح مختلف مولکولی است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر پروتامین و اختلالات آن در پتانسیل باروری مردان است.

مواد و روش ها: جستجو از پایگاه های PubMed و Google Scholar با کلید واژه های اسپرم، پروتامین، ناباروری مردان و کروماتین در بازه زمانی ۱۹۸۰ تا ۲۰۲۰ انجام گرفت.

یافته ها: غلظت، تحرک و مورفولوژی اسپرم در بیماران با نسبت های متغیری از P1 به P2 در مقایسه با افراد با نسبت طبیعی P1 به P2 کاهش قابل توجهی یافته است که ارتباط مستقیمی با کاهش توانایی باروری دارد. رایج‌ترین اختلال پروتامین در مردان نابارور افزایش نسبت P1 به P2 است که اغلب در نتیجه کاهش سطح پروتئین P2 همزمان با افزایش سطح پیش سازهای P2 است. افزایش سطح هیستون B2 (H2B) با سطوح کمتر پروتامین گزارش شده است. هر گونه اختلال در فرآیند بیان هیستون سبب تراکم ناهمسان اولیه ی کروماتین، توقف رونویسی و همچنین نقص در اسپرماتوژنز می شود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که نسبت رونویسی پروتامین به عنوان یک نشانگر برای باروری مردان عمل می کند. نسبت mRNA های هیستون/پروتامین برای کیفیت اسپرم مهم هستند و بنابراین می توانند به عنوان پیش بینی کننده های ناباروری مردان استفاده شوند. تغییر سطح پروتامین ها منجر به افزایش حساسیت به آسیب در DNA اسپرم می شوند که سبب ناباروری یا نتایج ضعیف در تولید مثل می گردند.

کلید واژه ها: ناباروری مردانه، اسپرم، پروتامین، کروماتین

وصول مقاله: ۹۸/۴/۱۵ اصلاحیه نهایی:۹۹/۵/۱ پذیرش:۹۹/۵/۱۸

مقدمه

اسپرماتوژنز فرآیندی پیچیده و بسیار هماهنگ از تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به اسپرم بالغ در بزرگسالان است. یکی از ویژگی‌های اصلی تمایز سلول‌های زایای مردانه روند ترتیبی، ساختاری و سازمان‌دهی مجدد فضایی کروموزوم است که در رویدادهای متفاوتی به عنوان بازآرایی کروماتین، نوترکیبی DNA، حرکات دینامیک کروموزوم و دومین‌های آن (سانترومرها و تلومرها) در هسته تظاهر می‌یابد (۱).

هیستون‌ها در مراحل نهایی بلوغ اسپرماتید به ترتیب توسط سه نوع پروتئین جایگزین می‌شوند: هیستون ویژه اسپرم، پروتئین شبه پروتامین یا پروتئین انتقالی و پروتامین (۲). در پستانداران، پروتامین به طور مستقیم جایگزین هیستون های سوماتیک نمی‌شود؛ به جای آن اسپرماتید در حال تمایز یک گروه پروتئین به اصطلاح انتقالی را می سازد که پیش از پروتامین به DNA اسپرماتید متصل می شود. جایگزینی غیر طبیعی هیستون ها توسط پروتامین ها می تواند سبب قطعه قطعه شدن DNA اسپرم شود و به همین علت، بین کیفیت کروماتین اسپرم و آسیب DNA رابطه وجود دارد (۳). بررسی مقایسه‌ای سه خانواده پروتئین ذکر شده نشان می‌دهد که فرآیند آماده‌سازی ژنوم اسپرم برای لقاح احتمالاً تکامل تخصصی اسپرم از هیستون‌ها به پروتئین شبه پروتامین و به پروتامین است. با این حال، پروتامین همه حیوانات ساختاری مشابه دارد (۴, ۵).

پروتامین یک پروتئین اصلی شناخته شده ی اسپرم است که به DNA اسپرم متصل می شود و به عنوان مارکرهای مولکولی باروری در نظر گرفته می شود. در طی فرآیند بلوغ، اکثر پروتئین های هیستون مرتبط با DNA توسط پروتامین ها جایگزین می شوند (۶). بائو و همکاران در سال ۲۰۱۶ در یک مطالعه متوجه شدند که در اسپرم انسانی تقریباً ۲۰-۱۵ درصد هیستون‌های بیضه‌ای باقی می مانند و ۸۰ تا ۸۵ درصد هیلتون‌ها توسط پروتامین جایگزین می‌شوند و مشخص گردید که عوامل اپی ژنتیکی می تواند با اثر بر روی مراحل تکامل اسپرم در روند باروری نقش داشته باشند (۷).

اسپرم زایی پستانداران یک فرآیند منحصربه فرد پیچیده‌ای است که در طی آن اسپرماتوگونیای گرد دیپلوئید با تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و مورفولوژیکی به اسپرماتوزوآی هاپلویید تمایز یافته با یک هسته فشرده وآکروزوم و دم تبدیل می شود (۸). الیاس و همکاران در سال ۲۰۱۲ نتیجه‌گیری نمودند که کمبود پروتامین منجر به کاهش باندهای دی سولفیدی شده و این امر منجر به عدم حفاظت از DNA اسپرم می شود (۹). از سویی دیگر، علل ۵۰ درصد موارد ناباروری مربوط به فاکتورهای مردانه است که در این بین ۳۰ درصد مربوط به فاکتورهای اختصاصی مردانه و ۲۰ درصد مربوط به فاکتورهای اختصاصی در هر دو جنس است (۱۰). در وهله‌ی اول، ناباروری مردان با آنالیز مایع سمینال بررسی می‌شود که این آنالیز شامل ارزیابی تعداد اسپرم، تحرک، مورفولوژی و ناهنجاری‌های آن است که اطلاعات ارزنده‌ای از وضعیت باروری فرد در اختیار قرار می‌دهد. این ارزیابی‌ها بسیاری از ناهنجاری‌ها از قبیل آزوسپرمی، اولیگوسپرمی، تراتوزوسپرمی و غیره را آشکار می‌کند (۱۱-۱۳). این در حالی است که بسیاری از مطالعات سال های اخیر به این نتیجه رسیدند که درصد قابل توجهی از ناباروری در زوج های نابارور با اتیولوژی ناشناخته ۵ علل مردانه دارد که اغلب آن ها در ارزیابی‌های متداول پارامترهای اسپرمی طبق معیارهای سازمان جهانی بهداشت ۲۰۱۰ طبیعی بوده‌اند (۱۴). با توجه به اهمیت حیاتی پروتامین به عنوان یکی از عوامل محتمل در افزایش بروز ناباروری مردانه، این مطالعه مروری با هدف بررسی پروتامین و نقش اختلالات آن در کاهش پتانسیل باروری در مردان انجام شده است.

مواد و روش ها

این مطالعه مروری حاصل بخشی از پایان نامه دکتری و در راستای جستجو از پایگاه های PubMed و Google Scholar با کلمات کلیدی اسپرم، پروتامین، ناباروری

مردان و کروماتین بر اساس MESH در بازه زمانی ۱۹۸۰ تا ۲۰۲۰ انجام گرفت. کلید واژه های انگلیسی مورد استفاده شامل " Male infertility, Sperm, Protamine, Chromatin" بود. برای انتخاب مطالعات و استخراج داده ها ابتدا عناوین تمام مقالات به دست آمده بررسی و موارد تکراری حذف گردید. در نهایت متن کل مقالات باقی مانده بررسی و مطالب مرتبط به ژن پروتامین؛ ساختار و جایگاه کروموزومی، تغییرات پس از ترجمه در پروتامین، پروتامین P1، پروتامین P2، اختلالات پروتامین و کاهش پتانسیل باروری، تجزیه و تحلیل پلی مورفیسم در پروتامین و ژن های مرتبط با آن، نوکلئوهیستون در ساختار کروماتین اسپرم، بیان ژن در اسپرم و پردازش RNA در سلول های زایا و تأثیر این عوامل بر پتانسیل باروری مردان از مطالعات به طور اولیه جمع آوری گردید. سپس مطالب توسط نویسندگان به صورت مجزا دسته بندی، بازخوانی و هدف بندی شد. به عنوان معیار خروج مقالات از این مطالعه، مقالات در قالب مورد نگاری، نامه به سر دبیر و کوتاه و همچنین مقالات انگلیسی یا فارسی قدیمی تر از سال های ۱۹۸۰ میلادی از لیست مطالعات مورد بررسی خارج شدند.

یافته ها

ژن پروتامین؛ ساختار و جایگاه کروموزومی: ژن‌های P1 و P2 انسان بر روی کروموزوم ۱۶ واقع در یک خوشه‌ی فشرده در p16 قرار دارد؛ این خوشه شامل ژن پروتئین انتقالی ۲ نیز است که آن هم در تراکم کروماتین دخالت دارد. خوشه پروتامین مشابهی نیز بر روی کروموزوم ۱۶ در موش یافت شده است (۵, ۱۵). در انسان، موش و موش صحرایی نر خوشه پروتامین دارای قاب خوانش باز است که به عنوان «ژن ۴» یا «پروتامین ۳» اشاره شده است (۱۴). توالی آمینواسید پیش بینی شده برای این پروتئین، تقریباً به اندازه همان P2 خواهد بود که شامل توالی تکراری گلوتامیک و اسید اسپارتیک و نیز خوشه آرژنین و لیزین در دومین متصل به DNA است. این تفاوت در ترکیب محتوای بالای آمینواسیدهای بار منفی در مقایسه با محتوای بالای اسیدهای آمینه با بار مثبت در پروتامین (۱۶)، نشان می دهد که نقش پروتئین ژن ۴ به احتمال زیاد جهت اتصال به DNA و تراکم نیست و ممکن است در اتصال و تعامل با پروتامین‌ها و انجام برخی عملکردهای دیگر مربوط به بسته بندی کروماتین باشد (۱۷). در حالی که ژن P1 به نظر می رسد در اسپرماتید تمامی پستانداران رونویسی و ترجمه شود (۱۸)، ژن P2 به شیوه‌ای مختص به گونه ترجمه می‌شود. تکنیک‌های PCR حضور P1 را در طیف گسترده‌ای از پستانداران تکامل یافته تایید کرده اند؛ اما تلاش برای تکثیر توالی P2 نشان داد که ژن P2 تنوع قابل توجهی دارد (۱۹).

بحث

تغییرات پس از ترجمه در پروتامین:

در پروتامین P1 پستانداران، دومین اتصال به DNA به طور معمول شامل یک یا چند جایگاه فسفوریلاسیون است. این سایت‌ها در انسان، اسب و گاو شناسایی شده است و به نظر می رسد بلافاصله پس از سنتز پروتئین و نیز پس از ورود اسپرم به تخمک فسفوریله شوند. در P2، فرم پیش ساز و همچنین اشکال مختلف پردازش شده فسفریله می باشند (۱۹). جایگاه های فسفوریلاسیون اغلب شامل سرین و ترئونین است، اگر چه در موش تیروزین هم فسفوریله می‌شود. افزودن فسفات به دنباله سرین می تواند از واکنش با DNA جلوگیری کند (۲۰).

پروتامین P1:

این پروتامین در پستانداران معمولاً دارای ۴۹ یا ۵۰ اسید آمینه و شامل سه دومین است. دومین مرکزی که در اتصال به DNA نقش دارد، غنی از آرژنین و در هر دو طرف حاوی سیستئین است. در اغلب گونه ها، دومین مرکزی به طور معمول از یک سری توالی حاوی ۳ تا ۱۱ آرژنین که پروتئین را به DNA متصل می‌کند، تشکیل شده است. مقایسه توالی پروتامین ماهی با پروتامین P1 پستانداران نشان می دهد که مناطق غنی از آرژنین حاوی دومین لنگر انداز

حفاظت شده اند (حدود ۶۰ تا ۸۰ درصد شباهت توالی)؛ اما باقی مانده توالی پروتئین تنوع قابل توجهی دارد (۲۱).

پروتامین P2:

در حالی که به نظر می رسد پروتامین P1 و P2 از یک ماده پیش اجدادی مشترک مشتق شده اند؛ اما پروتامین P2 دارای ویژگی‌های متعددی است که از P1 متمایز است. در سطح توالی، پروتامین P2 در گونه‌های مختلف دارای همان تنوع مشاهده شده در پروتامین P1 است (بیش از ۶۰ درصد شباهت توالی در P2؛ ۵۰ تا ۷۰ درصد شباهت توالی بین P2 و P1). با این حال ژن P2 پروتئین پیشرو را کد می‌کند که به DNA اتصال می‌یابد و سپس مراحل پروتئولیتیک را طی می‌کند (۲۲). این رویداد پردازش در طی یک دوره چند روزه در اواخر اسپرماتید رخ می دهد و نتیجه آن تولید شش نوع فرآوری شده از پروتئین پیشرو است (۲۳). هنگامی پردازش کامل می شود که حدود ۴۰ درصد از پایانه آمینی مولکول حذف گردد. در فرم کامل پردازش شده از پیش ساز P2، پروتامین P2 کمی بزرگ‌تر از P1 (۶۳ آمینه اسید در موش) است و فرم غالب در سر اسپرم بالغ است. برخلاف جوندگان و اکثر گونه های دیگر پستانداران، دو شکل متفاوت پردازش P2 از پروتامین به صورت P2 و P3 به DNA انسان و میمون تکامل یافته ی قدیمی متصل است (۲۴) و تنها یک شکل پردازش شده در میمون تکامل یافته ی جدید مشاهده شد. این دو شکل پروتئین P2 تنها در سه اسید آمینه ترمینالی خود تفاوت دارد. پروتامین P3 سه اسیدهای آمینه از P2 کوتاه تر است و به نظر می رسد یکی از محصولات ژن P2 باشد. توالی این پروتامین در اسپرم انسان (۲۴) و نوعی میمون دنیای قدیم (۲۵) شناسایی شده است. پروتامین P2 و P1 از این جهت تفاوت دارند که P2 به Zn متصل می‌شود. بررسی‌ها روی اسپرم سالم در گونه‌های مختلف نشان می‌دهد که پروتامین P2 انسان، موش و همستر با یک اتم Zn به مولکول متصل می باشند. نسبت قابل توجهی از Zn کروماتین اسپرم زمانی که گروه‌های تیول سیستئین در پروتامین اکسید می شوند و باند دی سولفید شکل می دهند، از بین می رود (۲۶).

اختلالات پروتامین و کاهش پتانسیل باروری:

هر مولکول P1 پروتامین به ۱۰ الی۱۱ جفت باز DNA متصل می‌شود. پروتامین P2 به بخشی کمی بزرگ‌تر از DNA (حدود ۱۵ جفت باز) متصل است. این اتصال، بار منفی امتداد ستون فسفو دی استر DNA را خنثی و مولکول را قادر می سازد تا فشرده شود. کمپلکس DNA و پروتامین در اسپرم پستانداران تکامل یافته، تشکیل شبکه‌ای از پیوندهای دی سولفید می دهد که اکثریت ژن های اسپرماتید را غیر فعال و راه را برای برنامه ریزی مجدد ژنوم پدری و آغاز ژنوم جنینی هموار می کند. پروتامین متصل به DNA، منجر به تولید کمپلکس کروماتین ۲۰ برابر کوچکتر از هسته سوماتیک می‌شود. این کمپلکس به هیدرودینامیک بیشتر سر و البته به طور غیر مستقیم به شکل سر کمک می کند. مشاهده شده است که اسپرم حاوی بسته بندی نادرست کروماتین اغلب بزرگ شده و یا سر با اشکال غیر طبیعی دارند (۲۷, ۲۸). اسپرم‌های حاوی نسبت بالاتری از P2 (انسان و همستر) نسبت به اسپرم‌های حاوی نسبت بسیار کم P2 (موش) و یا بدون P2 (گاو) به سرعت در تخمک از تراکم خارج می شوند. این امر نشان می دهد که پیشرفت تکامل از رویداد لقاح اولیه در پستانداران نیازمند سلول اسپرم برای تکمیل فرآیند تراکم زدایی در یک دوره خاص زمانی پس از ورود به تخمک است و این زمان در میان گونه‌های مختلف متفاوت می باشد. تفاوت در محتوای P2 کروماتین اسپرم ممکن است یک مکانیسم برای بارکدینگ ژنوم دریافتی ارائه کند و آن را به عنوان بسته قابل قبول یا غیر قابل قبول مورد شناسایی قرار دهد (۵). به نظر می رسد که محتوای P2 و نسبت P1 به P2 اسپرم در یک گونه به شدت تنظیم شده باشد؛ اما به طور چشمگیری بین گونه‌ها متفاوت است. این موضوع ممکن است توضیح دهد که چرا مردانی که اسپرم حاوی نسبت‌های غیر طبیعی از P1 و P2 دارند، نابارور هستند (۲۹).

عوامل متعددی در ارتباط با بسته بندی هسته اسپرم از جمله جایگزینی هیستون‌های هسته ای با نسبت مناسبی از P1 به P2 و نسبت هیستون به پروتامین شناسایی شده اند از جمله تغییرات اپی ژنتیک و سطوح مناسب پروتامین (۳۰)(۲۰). این بررسی‌ها نشان می دهد که نسبت غیرطبیعی P1 به P2 نشان دهنده ناباروری مردان است. مطالعات با هدف درک اتیولوژی نسبت غیر طبیعیP1 به P2 و ظهور اپی ژنتیک اسپرم و نقش احتمالی اختلالات پروتامین در اپی ژنوم اسپرم نشان داده‌اند که نسبت P1 به P2 در اهداکنندگان بارور نزدیک به ۱ شناخته شده (۲۹, ۳۱) و در افراد نورمواسپرمی طیف ۰/۸ تا ۱/۲ برآورد شده است (۸, ۳۲). به طور کلی اختلال این نسبت در هر دو حالت، با کیفیت ضعیف سیمن، افزایش آسیب DNA و کاهش باروری مشخص شده است (۳, ۳۳-۳۵). مطالعه ایی نشان داد پارامترهایی از قبیل غلظت اسپرم، تحرک و مورفولوژی در بیمارانی با نسبت پایین و یا نسبت بالایP1 به P2 در مقایسه با افرادی که نسبت طبیعی P1 به P2 دارند، کاهش یافت (۳۴). علاوه بر این، تغییر نسبتP1 به P2 با کاهش توانایی باروری همراه است، اگر چه با استفاده از تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) به عنوان لقاح آزمایشگاهی استاندارد می‌توان بر این موضوع غلبه کرد (۳۵, ۳۶). استفاده از ICSI حتی در بیماران IVF با فقدان کامل P2، سبب لقاح و مورفولوژی طبیعی جنین شد. با این حال، میزان لانه گزینی و حاملگی کاهش یافت (۲۹).

رایج ترین اختلال پروتامین در مردان نابارور، افزایش نسبت P1 به P2 است (۳۷). افزایش نسبت P1 به P2 اغلب در نتیجه کاهش سطح پروتئین P2 هم‌زمان با افزایش سطح پیش سازهای P2 است (۳۸-۴۰). بیان کم P2 دلیل اکثر موارد افزایش نسبت P1 به P2 است؛ اما عدم تنظیم بیانP1 نیز سبب برخی از اختلالات می شود (۳۸).

در یک تحقیق نشان داده شد که نسبت P1 به P2یکپارچگی DNA (DNA integrity) تأثیر دارد؛ بنابراین، مشخص شد که می تواند نقش مهمی در کیفیت و عملکرد اسپرم انسان داشته باشد و می تواند به عنوان پیش بینی کننده باروری در درمان های ART کمک شود (۳۷). مطالعه‌ی دیگر نشان داد که تغییرات PRM1 و PRM2 در بیماران واریکوسل سبب تولید اسپرم با کمبود پروتامین بیشتر همراه است و این یکی از دلایل احتمالی ناباروری ناشی از واریکوسل است (۴۱). همچنین مشاهده شد که P1در نسبت کم P1/P2 به میزان قابل توجهی کاهش یافته و مقدار P2 در P1/P2 بالا به طور قابل توجهی کاهش نشان داد. مقدار میانگین P1 mRNA در بیماران مبتلا به کاهش بیان پروتئین P1 به طور قابل توجهی بالا بود (۳۶). به طوری که در بیماران با بیان بیش از حد P1 mRNA به طور قابل توجهی P1 کاهش یافت. گرایش به افزایش سطح P2 mRNAدر بیماران با کاهش بیان پروتئین P2 نیز دیده شد. اکثر بیماران، غلظت نرمال پروتئین P2 و P1 سطوح نرمال نسبت mRNA داشتند. انباشت غیرطبیعی mRNAپروتامین به نظر می رسد با بیان نابجای پروتامین در مردان نابارور مرتبط باشد. یافته‌ها نشان می‌دهد که نقص در تنظیمات ترجمه پروتامین ممکن است به کمبود پروتامین در مردان نابارور بیانجامد (۴۲).

در اتیولوژی اختلالات پروتامین، بین ارتباط بیان ناهنجاری پروتامین با شمارش پایین اسپرم، کاهش تحرک و مورفولوژی، کاهش توانایی لقاح و افزایش آسیب کروماتین اسپرم رابطه علت و معلولی وجود ندارد (۱۱). از آنجا که جایگزینی پروتامین در مرحله اسپرماتید دراز رخ می‌دهد، مدتی پس از اتمام میوز، اسپرماتید دراز به طور هم‌زمان تحت دیگر رویدادهای بلوغ قرار می‌گیرد که تحرک و باروری اسپرم را تحت تأثیر قرار می دهد؛ اما این رویدادها به طور مستقیم با تعداد اسپرم مرتبط نیست. این امر منجر به این فرضیه شد که ارتباط بین جایگزینی غیر طبیعی پروتامین و به طور کلی کاهش کیفیت سیمن ممکن است به دلیل نقصی از وجود ناهماهنگی رونویسی و ترجمه در سیستمی منحصر به فرد در طول اسپرماتوژنز باشد (۴۳). برخی بیان پروتامین را به عنوان عملکرد کل انزال بررسی کرده‌اند. با

این حال، مشخص شد که انزال ناهمگن می باشد و بیماران با نسبت غیرطبیعی P1 به P2 هم دارای اسپرم با وضعیت جایگزینی طبیعی پروتامین هستند و ممکن است که با انتخاب اسپرم با مورفولوژی طبیعی برای ICSI شانس انتخاب اسپرم با پروتامین طبیعی افزایش یابد و در نتیجه اثرات بالقوه پروتامین غیرطبیعی در جنین به حداقل رسانده شود (جدول ۱) (۳۲).

جدول ۱: مطالعات در بیماران ناباروری که پروتامین ها پس از استخراج اسپرم در آن ها مورد ارزیابی قرار می گیرند.

یافته های مهم	نتایج	نام نویسندگان
گزارش کاهش محتوی پروتامین (نسبت افزایش یافته ی P1/P2) در بسیاری از بیماران نابارور می تواند نتیجه ی P2فرآیند ناقص پیش سازهای پروتامین شود.	با تجزیه و P2 تعیین پیش سازهای افزایش یافته ی پروتامین P1/P2 تحلیل وسترن در بیماران با افزایش نسبت	de Yebra et al. (1998) (55)
نابالغ و همچنین، بسته بندی ژنوم در P2وجود پروتامین اسپرم های تولید شده ی بیماران خاص نابارورگزارش شد.	در نمونه های بیمار به دست آمده در زمان P1/P2 نسبت های مختلف	Bench et al. (1998) (56)
برای مشخص کردن و بروز سطوح پروتامین، تراکم کروماتین، نرخ های آنوپلوئیدی کروموزوم و توانایی عملکردی اسپرم با سر گرد از دو برادر با سندرم گلوبوزواسپرمیا ضروری می باشد.	تفاوت در محتوای پروتامین و فراساختار اسپرم مشخص شده ICSI در دو خواهر و برادر مرتبط با نتایج مختلف	Carrell et al. (1999) (57)
تب و یا آنفلوانزا می تواند اثرات نهفته ای بر ساختار کروماتین اسپرم داشته باشد و ممکن است منجر به آزادسازی .اسپرم غیرطبیعی شود	که توسط الکتروفورز بین P2 ظهور پیش سازهای پروتامین ۳۳ تا ۳۹ روز پس از گرمای شدید در یک بیمار تشخیص داده شد.	Evenson et al. (2000) (58)
تعیین سطوح غیرطبیعی پروتامین در اسپرم بیماران نابارور. در بیماران نابارور در مقایسه با P2 به P1نسبت پروتامین گروه شاهد. P2ظرفیت نفوذ اسپرم و ارتباط با بیان تغییر یافته ی پروتامین	نفر از ۱۳ بیمار بدون کاهش میزان نفوذ اسپرم تعداد ۱۲ در مقایسه با بیمارانی که حاوی پیش P2تشخیص پروتامین و با کاهش ظرفیت نفوذ بودند، مشاهده این پروتامین ساز گردید.	Carrell and Liu. (2001) (59)
از مورفولوژی و P1/P2نسبت و مقدار نسبتاً متفاوت .مشاهده شد Percoll تحرک اسپرم در بخش های مختلف اگر تغییراتی در بلوغ هسته ای وجود داشته باشند باید به عنوان یک تغییر در کل نمونه در نظر گرفته شود، نه اینکه فقط در سلول های اسپرم غیر متحرک یا مورفولوژیکی غیر .طبیعی ارزیابی گردند	برابر با ۰.۱۵±۱.۰۱در مردان بارور شاهد (۱۰ P1/P2نسبت نفر) برابر با ۰.۴۸±۱.۵۱ در بیماران P1/P2 نسبت اولیگوزواسپرمی (۱۲ نفر) برابر با ۰.۶۵±۱.۲۳ در بیماران آستنوزواسپرمی P1/P2نسبت (۱۳ نفر) از نمونه های فردی و Percoll ناهمگنی کم بین کسرهای تفاوت های مشخص بین بیماران و گروه های کنترل	Mengual et al. (2003a) (60)
همبستگی معنی داری بین نقص پروتامین اسپرم با میزان لقاح از این رو نقص پروتامین اسپرم بر میزان لقاح مشاهده شد. تأثیر می گذارد و احتمالاً اسپرم را به تراکم زودرس	همبستگی منفی به طورمعنی داری بین میزان لقاح با کمبود وجود داشت. P1/P2پروتامین و نسبت سطوح تغییر یافته ی پروتامین موجود در بیماران نابارور با	Nasr-Esfahani et al. (2004b) (35)

.مستعد می کند ICSI کروماتین پس از	درمان بیمار بهبود پیدا کرد.	
طبقه بندی جدیدی از بیماران نابارور با نسبت کاهش یافته ی شناسایی شد.P1/P2 . با کیفیت اسپرم در ارتباط بودP1/P2نسبت ، به شدت کیفیت P1/P2بیمارانی با نسبت کاهش یافته ی را کاهش IVF اسپرم را تحت تأثیر قرار داده و باروری با داده اند.	در اهدا کنندگان بارور (۸۷ برابر با ۰.۰۱±۱.۰۶P1/P2نسبت نفر) کمتر از ۰.۸ در ۱۳/۶ درصد از بیماران (۳۷ P1/P2نسبت نفر) بین ۰.۸ تا ۱.۲ در ۴۶.۷ درصد بیماران (۱۲۷ P1/P2نسبت نفر) کمتر از ۱.۲ در در ۳۹.۷ درصد از بیماران P1/P2نسبت (۱۰۸ نفر) با میزان نفوذ اسپرم و میزان لقاحP1/P2ارتباط نسبت	Aoki et al. (2005a) (36)
محتوای پروتامین اسپرم انسان به طور معنی دار با قطعه قطعه .ارتباط داشت DNA شدن رابطه DNA اسپرم با قطعه قطعه شدن P2 و P1 غلظت معکوس دارد و این نشان دهنده نقش محافظتی پروتامین ها .اسپرم است DNA در برابر آسیب	در نمونه هایی با نسبت کاهش یافته DNA قطعه قطعه شدن ، P1/P2 در برابر نمونه هایی با نسبت نرمال/بالای P1/P2ی افزایش یافت.	Aoki et al. (2005) (34)
در پروتامین غیرطبیعی با بیان ناقص آن در mRNA ابقای .مردان نابارور همراه بود نقص هایی در تنظیم، ترجمه و همچنین کمبود پروتامین در .مردان نابارور نقش داشتند	توسط mRNA و P2 و P1 همبستگی بین پروتامین های شناسایی شد.real-time PCR تکنیک	Aoki et al. (2006) (42)
مردان نابارور نسبت بالاتری از اسپرماتوزوئیدها با نسبت به پروتامین نسبت به مردان بارور H2B بالای هیستون .دارند	به پروتامین در مردان نابارور افزایش یافت.2Bنسبت هیستون	Zhang et al. (2006) (61)
، باعث ایجاد مکانیسم های بیماری زایی در pre-P2سطح .ناباروری خواهدشد در برخی از بیماران با افزایش نسبت pre-P2افزایش و کاهش pre-P2، دخالت در پردازش P1/P2 . مرتبط می باشد DNA یکپارچگی	مربوط به محتوای پروتامین و یکپارچگی P2 پیش سازهای DNA	Torregrosa et al. (2006) (40)
در گروه بزرگی از مردان، ارتباطی از هاپلوتیپ رایج بوسیله با خروجی و پارامترهای اسپرم P2 و P1 ی پروتامین های .وجود دارد که می تواند در باروری نقش داشته باشد	و P1یک ارتباط هاپلوتایپ شکل گرفته توسط پروتامین های با بازدهی اسپرم در گروه بزرگی از مردان تشکیل شد. P2	Tuttelmann et al. (2010) (62)
به همراه نسبت rSDF وSDFارتباط معناداری بین در اسپرم انسان و مقایسه ی سه گروه مختلف بیمار P1/P2 با گروه کنترل ملاحظه گردید.	قطعه قطعه شدن اسپرم و نرخ)SDFقطعه قطعه شدن اسپرم (در اسپرم انسان ارتباط دارد و P1/P2 با نسبت)rSDF(تفاوت های معناداری بین گروه کنترل با سه گروه مختلف از .بیماران وجود داشت	Garcia-Peiro et al. (2011) (38)
و P1 پروتامین در rs2301365 و Rs737008 ، به طور قابل توجهی با P2 در پروتامین rs1646022 ناباروری مردان ارتباط داشتند و ناباروری را تحت تاثیر قرار .می دهند	و P1 در پروتامین rs2301365 و Rs737008 ، به طور قابل توجهی با P2در پروتامین rs1646022 ناباروری مردان در ارتباط بودند و این برهم کنش های ژن و .ژن در ناباروری مردان نقش داشت	Jiang et al. (2017) (63)
را تحت تأثیر قرار داده و DNA یکپارچگی P1/P2 نسبت	ارتباط DNAبا شاخص قطعه قطعه شدن P1/P2 نسبت	Amor et al. (2018)

نقشی اساسی در کیفیت و عملکرد اسپرم انسان دارد و به عنوان پیش بینی کننده باروری در درمان های کمک باروری استفاده می شود (ART).	با تحرک پیشرونده ی اسپرم P2 مثبت داشت. پروتامین همبستگی منفی بین پروتامین ارتباط مثبت داشت. همچنین، دیده شد DNAشاخص قطعه قطعه شدن و P1 .	
های پروتامین اسپرم به طور منفی mRNA کیفیت اسپرم و تحت تأثیر سیگار قرار گرفتند و این به عنوان شواهدی جدید در مورد اثر خطرناک سیگار بر باروری مردان است.	در افراد سیگاری به P2 و P1 ی پروتامین mRNAسطوح نسبت های طور معنی داری کمتر از افراد غیر سیگاری بود. در نمونه های غیر سیگاری تفاوت معنی mRNA P1/P2 داری را در مقایسه با افراد سیگاری نشان داد.	Hamad et al. (2019) (49)
به صورت خوراکی ممکن است با C تجویز روزانه ویتامین افزایش سطح بیان ژن پروتامین در مردانی با باروری کم، را بهبود بخشد DNA پارامترهای اسپرم و یکپارچگی.	و P2،P1ی پروتامین mRNAتغییر قابل توجهی در سطح پس از درمان مشاهده شد P1/P2 نسبت .	Hamidian et al. (2020) (15)

تجزیه و تحلیل Single Nucleotide (SNP) Polymorphism در پروتامین و ژن‌های مرتبط با آن:

بسیاری از مطالعات به بررسی علل اختلالات پروتامین و ارزیابی تنوع ژنتیکی از طریق توالی یابی مستقیم ژن مربوطه در بیماران و گروه کنترل پرداخته اند. مطالعات نشان داده اند که نواحی کد کننده پروتامین و پروتئین انتقالی در هرگونه سبب اختلالات در بیماران نمی‌شوند (۳۶, ۴۴). محققان مشخص کردند توالی نواحی غیر ترجمه شونده پروتامین ۱ و ۲ ممکن است رونویسی پروتامین، ترجمه و پایداری mRNA را تحت تأثیر قرار دهد (۴۳). در بررسی مقایسه‌ی طولی VLR (Variable Length Repeat) به عنوان یک ارزیابی احتمالی اختلالات پروتامین در گروه بیماران و شاهد نشان داد، اگر چه تنوع گسترده‌ای در VLR پروتامین ۲ بین مردان وجود داشت؛ اما در طول VLR یا درصد هتروزیگوسیتی بین مردان بارور و مردان نابارور با اختلالات پروتامین تفاوتی مشاهده نشد (۹).

فرکانس پایین SNP ها (very low frequency of SNPs) در مناطق غیر کدکننده ی ۵' و ۳' مناطق ترجمه نشده (UTRs) ژن پروتامین گزارش شده است؛ اما به احتمال زیاد مسئول بخش عمده‌ای از ناباروری به دلیل اختلالات کروماتین نیست و پیشنهاد شده که حضور یک SNP، ۱۵ جفت باز بالادست کدون شروع‌کننده‌ی ژن پروتامین۱ ممکن است باعث اتصال غیرطبیعی یک عامل رونویسی مثل فاکتور هسته‌ای هپاتوسیت ۳ شود و به طور بالقوه بر سطوح رونویسی مؤثر باشد (۴۵). از طرفی جهش ژن‌های پروتئین انتقالی ممکن است روند بازسازی کروماتین را تحت تأثیر قرار دهد، با این حال، هیچ افزایشی در تغییرات ژن مردان نابارور و یا مردانی با ناهنجاری پروتامینی شناخته شده نسبت به گروه کنترل یافت نشد (۴۶).

فرآیند بازآرایی اتصال پروتامین به کروماتین نیازمند زمان رونویسی DNA و ترجمه mRNA در اسپرماتید در حال تکامل است (۴۷). یک مکانیسم برای انجام تنظیمات، حفظ mRNA های است که از لحاظ فیزیکی از مکانیسم ترجمه سلولی جدا می‌شوند. عامل مکانیسم سرکوب‌کننده‌ی ترجمه شناخته نشده است، با این حال، روشن است که ترجمه توسط ریبونوکلئوپروتئین‌ها به تأخیر می‌افتد. mRNA ها به پروتئین های اتصالی به RNA (RBPs) متصل می شوند و این کمپلکس mRNA تا زمان ایجاد تغییرات بیشتر و آزاد شدن فرآیند رونویسی، از ترجمه جلوگیری می کند (۴۸).

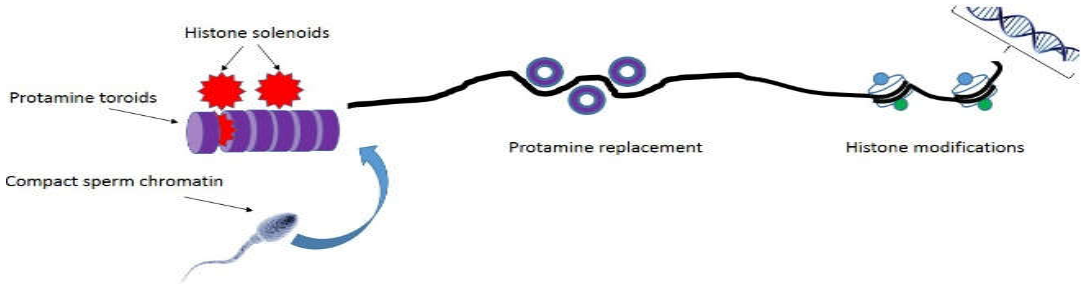
حضور ۱۳ عدد SNP در مسیر Contrin گزارش شده است (۹). همچنین، در یک مطالعه، ۱۵ سایت پلی مورفیسم نشان داده شد که هفت پلی مورفیسم در یک یا دو جمعیت بیمار

نسبت به گروه کنترل فرکانس بالاتری داشته‌اند. از این هفت پلی مورفیسم، دو تای آن ها منجر به تعویض اسید آمینه در دومین به شدت حفاظت شده cold shock (مورد نیاز برای فعالیت رونویسی) بود و یکی منجر به تغییر بسیار مهم در اگزون ۸ بیمار نابارور و بقیه در UTRs و مرزهای اینترون/ اگزون باقی ماندند. در بیان غیر طبیعی پروتامین ممکن است که تنوع ژنتیکی مانند آنچه که در بالا و یا در مطالعات دیگر شرح داده شد به تنهایی مسئول آسیب‌شناسی نباشد، بلکه عوامل خطر و اثرات پلی مورفیسم‌های متعدد و یا تعامل با عوامل محیطی مسئول بیان نابهنجار پروتامین باشد. برای مثال مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۹ انجام شد و مشاهده کردند که اسپرم و mRNA های پروتئین آن و با بررسی SNP، با سیگار کشیدن تحت تأثیر قرار می‌گیرند و این داده‌ها به عنوان شواهد جدید برای اثر خطرناک سیگار کشیدن بر باروری مردان در نظر گرفته می شوند. علاوه بر این، نسبت رونوشت پروتامین ممکن است به عنوان یک نشانگر برای باروری مردان باشد (۴۹).

مطالعات جدیدتر معتقدند که اختلالات شدید پروتامین، آزواسپرمی و یا الیگواسپرمی شدید ممکن است با افزایش SNP ها در چندین ژن اسپرماتوژنز و یا به طور کلی با افزایش SNP ها در کل ژنوم در ارتباط باشد (۱۲).

نوکلئوهیستون در ساختار کروماتین اسپرم:

در طی بلوغ و پس از میوز، کروماتین اسپرم تحت سازمان‌دهی مجدد قرار می‌گیرد. هیپراستیلاسیون هیستون خاص بیضه، برای پیشرفت طبیعی روند اسپرماتوژنز مهم است و توسط فعل‌وانفعالات هیستون استیل ترانسفرازها و هیستون داستیلاز اعمال می‌شود. هیپراستیلاسیون هیستون، تمایل اتصال نوکلئوزوم به DNA را کاهش می‌دهد و منجر به آرامش کروماتین، اتصال پروتئین انتقالی و سپس جایگزینی با پروتامین می‌گردد (۱۳). در گونه‌های پستانداران از جمله انسان، برخی هیستون ها در کروماتین اسپرم در طی جایگزینی پروتامین حفظ می شوند. در واقع هسته اسپرم انسان ۱۰-۱۵ درصد از محتوای هیستون اصلی را حفظ و آن را در یک توزیع ناهمگن در ژنوم قرار می دهد (۵۰). نسبت مناسب هیستون 2B (H_2B) به پروتامین به عنوان عامل مهمی در بسته‌بندی کروماتین اسپرم در نظر گرفته می شود. همچنین افزایش سطح H_2B در اسپرم با سطوح پایین‌تر پروتامین مرتبط است این در حالی است که سطح بالایی از ذخیره‌ی هیستون در اسپرم برخی از بیماران نابارور نشان داده شد (شکل ۱) (۵۱).



شکل ۱: نمایش شماتیک از سازمان‌دهی و فشرده سازی کروماتین اسپرم. با بررسی اجمالی اپی ژنتیک اسپرم، تقریباً ۸۵ درصد از هیستون های متصل به DNA در طی اسپرم سازی توسط پروتامین ها جایگزین می شوند. بنابراین، کروماتین اسپرم از نوکلئوپروتامین های جمع شده در توروئیدها و متصل به مناطق اتصال ماتریکس و نوکلئوهیستون های پیچیده شده در سلونوئیدها تشکیل شده است. اگرچه اسپرم به عنوان یک سلول غیر فعال از نظر رونویسی شناخته شده است، اما هیستون های باقیمانده بسیار استیله شده و همچنین دارای تغییرات دیگری مانند متیلاسیون هستند.

بیان ژن در اسپرم:

در پستانداران در فرآیند اسپرمیوژنز، بیان ژن‌های هسته‌ای به منظور تسهیل در جایگزینی نوکلئوهیستون سوماتیک به نوکلئوپروتامین خاص گامت صورت می پذیرد. در طول این جایگزینی و پس از آن، بیان ژن به طور انحصاری تحت کنترل عوامل ترجمه‌ای و mRNA های ذخیره شده در اسپرماتوژنز قرار می‌گیرد (۵۲). بدین مفهوم که مجموعه‌ی هسته‌ای می‌تواند به عنوان پایه ای با هدف کشف مسیرهای بیان ژن در اسپرم مردان نابارور استفاده شود.

پردازش RNA در سلول‌های زایا:

فرآیند رونویسی در اسپرماتوسیت ها، در سطح بالایی فعال و رونوشت‌ها در این سلول ها تجمع می‌یابند. در نتیجه mRNA ذخیره شده و عوامل فعال‌سازی ترجمه، نقش کلیدی در کنترل سنتز پروتئین اسپرماتید و اسپرمی دارند که در مراحل آخر بلوغ سلول های ژرمینال تولید می شوند (۵۳).

طول دم پلی (A) در mRNA ژن‌های بیان شده در بیضه در طول فرآیند اسپرمیوژنز تغییر می‌کند که نشان می دهد طول این توالی ممکن است ترجمه mRNA را تحت تأثیر قرار دهد. با این مفهوم، حذف پلیمراز ویژه بیضه در موش باعث اختلال در بیان ژن هاپلوئید خاص و نیز کوتاه شدن طول دم پلی (A) mRNA می‌شود. بسیاری از mRNA ها مانند پروتامین و رونوشت پروتئین انتقالی، در اسپرماتید اولیه به دلیل دم بلند پلی (A) سرکوب و در ذرات سیتوپلاسمی ریبونوکلئوپروتئین تا یک هفته ایزوله می شوند. ترجمه در اواخر مرحله اسپرماتید وقتی دم پلی (A) در mRNA توسط دآدنیلاسیون کوتاه می شود، شروع می‌گردد (۴۷).

نتیجه‌گیری

تنظیم پروتامین از دیگر تنظیم گرهای ترجمه ای رونوشت‌ها مستقل نیست. از سویی، کنش غیرطبیعی پروتامین با کروماتین ممکن است رونویسی ژن‌های دیگر را تحت تأثیر قرار دهد. در واقع الگوی رونوشت اسپرم بالغ در مردان با نقص پروتامین از گروه کنترل تفاوت دارد. جالب است که فرضیه اختلال عمومی تنظیم رونویسی نیز توسط یافته‌های اولیه پشتیبانی شده است، در حالی که افزایش در تنوع رونوشت پروتامین دیده شد و کاهش یا افزایش مطلق در رونوشت خاصی وجود نداشت. همچنین تغییر در رونوشت‌ها می تواند با تغییر نسبت P1 به P2 و دور شدن از وضعیت طبیعی همراه باشد (۵۴).

نسبت پروتامین ها، یک بیومارکر مناسبی برای ارزیابی کیفیت اسپرم هستند و هر گونه نقص در پروتامین سبب آسیب DNA اسپرم می‌شود و در نهایت ناباروری را به دنبال خواهد داشت. هر دو پروتامین P1 و P2 برای متراکم کردن کروماتین اسپرم ضروری هستند و کمبود هر کدام از این دو سبب آسیب DNA ی اسپرم و مرگ جنین می شود. همچنین، جایگزینی غیرطبیعی پروتامین سبب کاهش کیفیت اسپرم، از جمله کاهش تعداد، کاهش باروری و افزایش آسیب DNA می‌شود. زوج‌هایی با ناباروری ناشناخته، نقص مشخصی در نسبت غیرطبیعی P1/P2 دارند. همچنین، هیچ ارتباطی بین DNA ی اسپرم آسیب دیده و کیفیت جنین بعد از ICSI وجود ندارد؛ بنابراین شناسایی آسیب DNA اسپرم جهت درمان این بیماران می‌تواند کمک زیادی در رفع این مشکل کند. تحقیقات در زمینه‌ی ارتباط بین پروتامین ها و ناباروری هنوز به عنوان یک نقطه ی جالب توجه در نظر گرفته می شود؛ اما سؤالات زیادی هنوز باقی مانده است تا این مسائل به طور کامل حل شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان نامه دوره دکترای تخصصی مصوب و دفاع شده در دانشگاه علوم پزشکی یزد استخراج شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از کارکنان بیمارستان شهید بهشتی و مسئولان پژوهشی مرکز تحقیقات گامتوژنزیس کاشان که ما را در انجام و ارتقاء کیفی این پژوهش یاری دادند، اعلام نمایند

منابع

1.Griswold MD. Spermatogenesis: the commitment to meiosis. Physiol Rev. 2015; 96(1):1-17.
2.Khalili MA, Aghaie-Maybodi F, Anvari M, Talebi AR. Sperm nuclear DNA in ejaculates of fertile and infertile men: correlation with semen parameters. Urol J. 2009; 3(3):154-9.
3.Rahiminia T, Yazd EF, Fesahat F, Moein MR, Mirjalili AM, Talebi AR. Sperm chromatin and DNA integrity, methyltransferase mRNA levels, and global DNA methylation in oligoasthenoteratozoospermia. Clin Exp Reprod Med. 2018; 45(1):17-24.
4.Wykes SM, Krawetz SA. Conservation of the PRM1→ PRM2→ TNP2 domain. DNA Sequence. 2003; 14(5):359-67.
5.Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. Genome Biol. 2007; 8(9):227.
6.Pardede BP, Agil M, Supriatna I. Protamine and other proteins in sperm and seminal plasma as molecular markers of bull fertility. Vet World. 2020; 13(3):556-62.
7.Bao J, Bedford MT. Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. Reproduction. 2016; 151(5):55-70.
8.Aoki VW, Liu L, Jones KP, Hatasaka HH, Gibson M, Peterson CM, et al. Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. Fertil Steril. 2006; 86(5):1408-15.
9.Hammoud S, Emery BR, Aoki VW, Carrell DT. Identification of genetic variation in the 5′ and 3′ non-coding regions of the protamine genes in patients with protamine deregulation. Arch Androl. 2007; 53(5):267-74.
10.Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. Reprod Biol Endocrinol. 2015; 13(1):37.
11.Castillo J, Simon L, de Mateo S, Lewis S, Oliva R. Protamine/DNA ratios and DNA damage in native and density gradient centrifuged sperm from infertile patients. J Androl. 2011; 32(3):324-32.
12.Carrell DT. The genetics of male infertility in the era of genomics. The genetics of male infertility: Springer; 2007. p. 3-27.
13.Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. Reproduction. 2010; 139(2):287-301.
14.Grzmil P, Boinska D, Kleene KC, Adham I, Schlüter G, Kämper M, et al. Prm3, the fourth gene in the mouse protamine gene cluster, encodes a conserved acidic protein that affects sperm motility. Biol Reprod. 2008; 78(6):958-67.
15.Hamidian S, Talebi AR, Fesahat F, Bayat M, Mirjalili AM, Ashrafzadeh HR, et al. The effect of vitamin C on the gene expression profile of sperm protamines in the male partners of couples with recurrent pregnancy loss: A randomized clinical trial. Clin Exp Reprod Med. 2020; 47(1):68-76.
16.Rahimipour M, Talebi AR, Anvari M, Sarcheshmeh AA, Omidi M. Effects of different doses of ethanol on sperm parameters, chromatin structure and apoptosis in adult mice. Eur J Obstet Gynecol. 2013; 170(2):423-8.
17.Schluter G, Engel W. The rat Prm3 gene is an intronless member of the protamine gene cluster and is expressed in haploid male germ cells. Cytogenet Genome Res. 1995; 71(4):352-5.
18.Corzett M, Mazrimas J, Balhorn R. Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. Mol Reprod. Dev. 2002; 61(4):519-27.

19.Schrider DR, Navarro FC, Galante PA, Parmigiani RB, Camargo AA, Hahn MW, et al. Gene copy-number polymorphism caused by retrotransposition in humans. PLoS Genet. 2013; 9(1):e1003242.
20.Seligman J, Zipser Y, Kosower NS. Tyrosine phosphorylation, thiol status, and protein tyrosine phosphatase in rat epididymal spermatozoa. Biol Reprod. 2004; 71(3):1009-15.
21.Luke L, Tourmente M, Roldan ER. Sexual selection of protamine 1 in mammals. Mol Biol Evol. 2015; 33(1):174-84.
22.Akmal M, Widodo MA, Sumitro SB, Purnomo BB. The important role of protamine in spermatogenesis and quality of sperm: A mini review. Asian Pac J Reprod. 2016; 5(5):357-60.
23.Oliva R. Protamines and male infertility. Hum Reprod Update. 2006; 12(4):417-35.
24.Liu L, Aston KI, Carrell DT. Protamine extraction and analysis of human sperm protamine 1/protamine 2 ratio using Acid gel electrophoresis. Spermatogenesis: Springer; 2013. p. 445-50.
25.Balhorn R. Mammalian protamines: structure and molecular interactions. Molecular biology of chromosome function: Springer; 1989. p. 366-95.
26.Bjorndahl L, Kvist U. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. Mol Hum Reprod. 2009; 16(1):23-9.
27.Cho C, Jung-Ha H, Willis WD, Goulding EH, Stein P, Xu Z, et al. Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. Biol Reprod. 2003; 69(1):211-7.
28.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(4):472-6.
29.Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? Hum Reprod Update. 2007; 13(3):313-27.
30.Gunes S, Kulac T. The role of epigenetics in spermatogenesis. Turk J Urol. 2013; 39(3):181-7.
31.Aleem M, Padwal V, Choudhari J, Balasinor N, Gill□Sharma M. Sperm protamine levels as indicators of fertilising potential in sexually mature male rats. Andrologia. 2008; 40(1):29-37.
32.Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. J Androl. 2006; 27(6):890-8.
33.Mohammad HN-E, Mohammad S, Shahnaz R, Maryam A, Shahla R, Fariba M, et al. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. Reprod Biomed Online. 2005; 11(2):198-205.
34.Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JBM, Carrell DT. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. J Androl. 2005; 26(6):741-8.
35.Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mozdarani H, Mardani M, Azvagi H. Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. Andrologia. 2004; 36(3):95-100.
36.Aoki VW, Liu L, Carrell DT. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. Hum Reprod. 2005; 20(5):1298-306.
37.Amor H, Zeyad A, Sobhy Bakry M, Bosilah AMH, Ben Ali H, Eid Hammadeh M. Protamine Ratio as Predictor of the Fertility Potential of Sperm by Couple Undergoing ICSI. Int J Women's Health Reprod Sci. 2018; 6(4):400-9.

38.Garcia-Peiro A, Martinez-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(1):105-9.
39.Evgeni E, Charalabopoulos K, Asimakopoulos B. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. J Reprod Infertil. 2014; 15(1):2.
40.Torregrosa N, Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Shirley CR, Meistrich ML, Ballescà JL, et al. Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. Hum Reprod. 2006; 21(8):2084-9.
41.Nayeri M, Talebi AR, Heidari MM, Seifati SM, Tabibnejad N. Polymorphisms of sperm protamine genes and CMA3 staining in infertile men with varicocele. Rev Int Androl. 2020; 18(1):7-13.
42.Aoki VW, Liu L, Carrell DT. A novel mechanism of protamine expression deregulation highlighted by abnormal protamine transcript retention in infertile human males with sperm protamine deficiency. Mol Hum Reprod. 2006; 12(1):41-50.
43.Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. The aetiology of sperm protamine abnormalities and their potential impact on the sperm epigenome. Int J Androl. 2008; 31(6):537-45.
44.Aoki VW, Christensen GL, Atkins JF, Carrell DT. Identification of novel polymorphisms in the nuclear protein genes and their relationship with human sperm protamine deficiency and severe male infertility. Fertil Steril. 2006; 86(5):1416-22.
45.Ravel C, Chantot-Bastaraud S, El Houate B, Berthaut I, Verstraete L, De Larouziere V, et al. Mutations in the protamine 1 gene associated with male infertility. Mol Hum Reprod. 2007; 13(7):461-4.
46.O'Brien KLF, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. Fertil Steril. 2010; 93(1):1-12.
47.Champroux A, Torres-Carreira J, Gharagozloo P, Drevet J, Kocer A. Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. Basic Clin Androl. 2016; 26(1):17.
48.Gendelman M, Roth Z. Seasonal effect on germinal vesicle-stage bovine oocytes is further expressed by alterations in transcript levels in the developing embryos associated with reduced developmental competence. Biol Reprod. 2012; 86(1):1-9.
49.Hamad M, Shelko N, Montenarh M, Hammadeh ME. The impact of cigarette smoking on protamines 1 and 2 transcripts in human spermatozoa. Hum Fertil. 2019; 22(2):104-10.
50.La Spina FA, Romanato M, Brugo-Olmedo S, De Vincentiis S, Julianelli V, Rivera RM, et al. Heterogeneous distribution of histone methylation in mature human sperm. J Assist Reprod Genet. 2014; 31(1):45-9.
51.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(1):51-7.
52.Sharma R, Agarwal A. Spermatogenesis: an overview. Sperm Chromatin: Springer; 2011. p. 19-44.
53.Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. Nature. 2009; 460(7254):473-8.
54.Qujeq D. Evaluation of protamine level in human sperm samples using chromomycin a3 and aniline blue staining. Res Mol Med. 2016; 4(1):50-5.
55.de Yebra Ls, Ballesca J-L, 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 5. Fertil Steril. 1998; 69(4):755-9.
56.Bench G, Corzett M, De Yebra L, Oliva R, Balhorn R. Protein and DNA contents in sperm from an infertile human male possessing protamine defects that vary over time. Mol Reprod Dev. 1998; 50(3):345-53.

57.Carrell DT, Emery BR, Liu L. Characterization of aneuploidy rates, protamine levels, ultrastructure, and functional ability of round-headed sperm from two siblings and implications for intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 1999; 71(3):511-6.
58.Evenson DP, Jost LK, Corzett M, Balhorn R. Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. J Androl. 2000; 21(5):739-46.
59.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.
60.Mengual L, Ballescá JL, Ascaso C, Oliva R. Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from percoll fractions between patients and controls. J Androl. 2003; 24(3):438-47.
61.Zhang X, Gabriel MS, Zini A. Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate. J Androl. 2006; 27(3):414-20.
62.Tuttelmann F, Krenkova P, Romer S, Nestorovic A, Ljujic M, Stambergova A, et al. A common haplotype of protamine 1 and 2 genes is associated with higher sperm counts. Int J Androl. 2010; 33(1):240-8.
63.Jiang W, Zhu P, Zhang J, Wu Q, Li W, Liu S, et al. Polymorphisms of protamine genes contribute to male infertility susceptibility in the Chinese Han population. Oncotarget. 2017; 8(37):61637-45.