

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

Golshan-Iranpour F^{1,2}, Zamani Rarani F³, 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 normozoospermia 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.

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^۴

۱. دانشیار، مرکز باوری و ناباروری حضرت مریم، بیمارستان شهید بهشتی، اصفهان، ایران. شناسه ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۳۳۹۰-۲۲۳۳
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 می‌تواند اثرات مخرب بر کیفیت دئوکسی ریبونوکلیک اسید، (DNA) و کروماتین که معادل مرگ هسته و سلولی اسپرم دارد می‌باشد. ارزیابی مارکهای 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، دنا تورا سیون DNA و فراگمانتاسیون DNA به ترتیب با رنگ آمیزی Toluidine blue (TB)، رنگ آمیزی (AO) Acridine Orange 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 دنا تورا سیون DNA بررسی شده توسط AO ارتباط وجود داشت ($p < 0/05$). در حالی که بعد از انجماد سریع بین تراکم غیر طبیعی کروماتین، دنا تورا سیون DNA و فراگمانتاسیون DNA همبستگی دیده شد ($p < 0/05$).

نتیجه گیری: تراکم غیر طبیعی کروماتین می‌تواند DNA را مستعد دنا تورا سیون و فراگمانتاسیون کند.

کلید واژه ها: اسپرم، دئوکسی ریبونوکلیک اسید، کروماتین، نورموزواسپرم

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

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 تکنیک 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 نامطلوب 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 می شود تا اهداف درمانی با موفقیت بیشتری محقق شود. مطالعات نشان داده اند 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 نمی توانند 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 می باشند اما زمانی که این تخریب ها از حد آستانه بالاتر باشند قدرت اصلاح قادر به پاسخ گویی نیست (۹). مطالعات نشان داده اند 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 می دهند (۱۴، ۱۳). یکی از دلایل عدم استفاده از تست های بررسی وضعیت کروماتین و DNA اسپرم در آنالیزهای 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 نوزاد اسپرم می باشد. 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. نمونه ها پس از اخذ رضایت آگاهانه، از بین مردان نوزاد اسپرم 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 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 تست های 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، در آزمایشگاه 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

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 mellvain 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 اسپرمتوزوای 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 (۱۷، ۱۸).

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

ارزیابی نمونه های سمن از نظر فراگماتاسیون 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 4°C انکوبه شد. سپس لامل برداشته و اسلاید در محلول دنا توره 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٪) آبیگری و پس از خشک شدن در دمای اتاق رنگ آمیزی مجدداً با آب مقطر شستشو داده شد. با استفاده از میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی $\times 1000$) 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

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. کرایو ویال ها ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در معرض بخار نیتروژن مایع قرار گرفت و نهایتاً در داخل تانک حاوی نیتروژن مایع در دمای -196°C درجه سانتی گراد ذخیره شد. بعد از دو هفته ویال ها از تانک خارج و با لافاصله داخل ظرف حاوی نیتروژن مایع و نهایتاً به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ درجه سانتی گراد غوطه ور شده و سپس از لحاظ کیفیت کروماتین و DNA مورد ارزیابی قرار گرفتند.

رنگ آمیزی (TB) Toluidine Blue

تولویدین بلو جهت ارزیابی تراکم کروماتین اسپرم استفاده شد. اسپرم های خشک شده در دمای اتاق را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 4°C 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 4°C د انکوبه نمودیم. سپس هر لام سه مرتبه و هر بار به مدت ۲ دقیقه با آب مقطر شستشو دادیم و نهایتاً با محلول تولویدین بلو ۰.۱٪ 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 اسپرمتوزوای 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 (AO) Acridine Orange

از تکنیک آکریدین اورانج برای تعیین دنا توریشن DNA استفاده می شود. اسپرم تهیه شده از هر نمونه به مدت حداقل ۲ ساعت در دمای 4°C در محلول کارنوی (متانول/گلاسیال

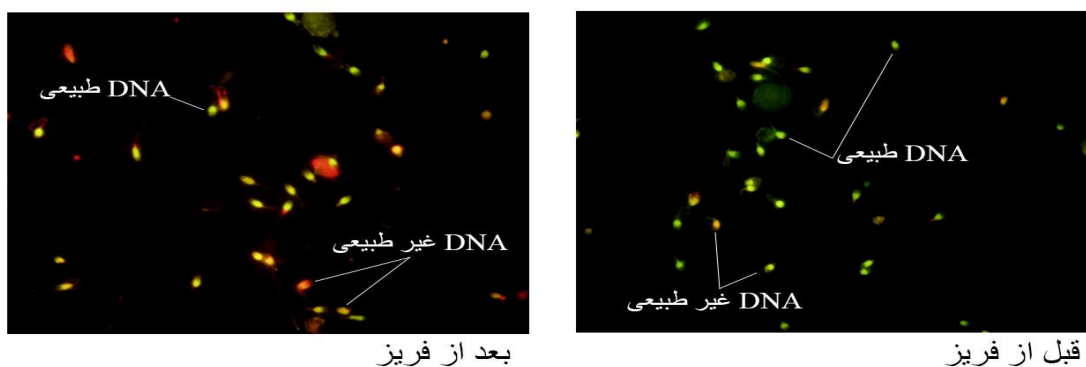
کروماتین و اسپرم های دارای دنا تورا سیون DNA ارتباط وجود داشت ($p < 0/05$) و نسبت به قبل از فریز این ارتباط معنی دار تر بود.

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 ($p > 0/05$) در حالی که پس از فریز ارتباط مثبت قوی بین میزان DNA فراگمانتاسیون و تراکم غیر طبیعی کروماتین اسپرم دیده شد ($p < 0/05$).

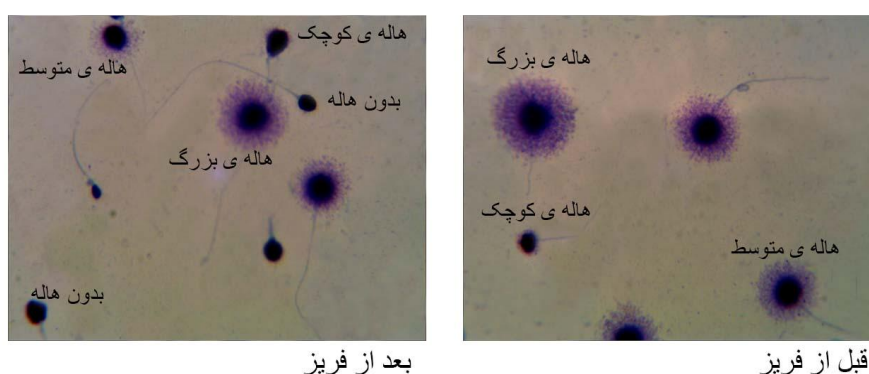
Correlation Coefficient) استفاده شد. $p < 0/05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

نتایج

بر اساس جدول ۱ و شکل های ۱-۲، در نمونه های تازه و قبل از فرآیند فریز و ذوب، بین تراکم غیر طبیعی کروماتین و میزان دنا تورا سیون DNA ارتباط مستقیم قوی وجود داشت ($p < 0/05$) به عبارتی نمونه هایی با میزان بالای اسپرم های غیر طبیعی از لحاظ تراکم کروماتین، درصد بالایی از دنا تورا سیون DNA را نیز نشان دادند. همچنین پس از فریز بین میزان اسپرم هایی با تراکم غیر طبیعی



شکل ۱: رنگ آمیزی آکریدین اورنج. نمایش اسپرم با DNA سالم دو رشته ای (سبز رنگ) و DNA دنا توره تک رشته ای (نارنجی تا قرمز رنگ) با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت با بزرگ نمای $\times 1000$



شکل ۲: تست SCD. اسپرم هایی با هاله ی بزرگ، هاله ی متوسط به عنوان سلول با DNA نرمال یا غیر فرگمانته و اسپرم هایی با هاله ی کوچک یا بدون هاله به عنوان سلولی با DNA غیر طبیعی یا فراگمانته در نظر گرفته شد (میکروسکوپ نوری، بزرگ نمای $\times 1000$)

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

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

بحث

تراکم بیشتر کروماتین اسپرم انسانی در مقایسه با سایر سلول-ها با جایگزینی پروتئین هیستون با پروتامین در طی اسپرمیوژن 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 روش‌های 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 اسپرم‌های دارای DNA فرگمته و درصد اسپرم‌های دارای تراکم غیر طبیعی کروماتین هم ارتباطی وجود نداشت. بعد از فریز و ذوب نمونه‌ها، تراکم غیر طبیعی کروماتین علاوه دناتوراسیون DNA با میزان فراگمتاسیون نیز مرتبط بود. به عبارتی بعد از فریز افزایش میزان اسپرم‌هایی با تراکم غیر طبیعی کروماتین با افزایش میزان دناتوراسیون و فراگمتاسیون 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 اسپرم‌هایی با ساختار غیر طبیعی کروماتین ارزیابی شده توسط رنگ آمیزی تولویدین بلو و نتایج حاصل از رنگ آمیزی آکریدین اورنج ارتباط وجود دارد و مردانی با سطوح بالای ساختار کروماتینی غیر طبیعی درصد بالاتری از دناتوراسیون DNA و پارامترهای اسپرمی غیر طبیعی دارند (۲۱).

مطالعات گذشته نشان داده اند که فرآیند فریز علیرغم مزایای فراوان بر پارامترهای اسپرمی نظیر حرکت، بقا و نیز ماده ی ژنتیکی آن اثرات مخربی دارد (۱۷، ۳). در مطالعه ی نشان داد که غذای پر کلسترول به تنهای یا به همراه آهن، آسیب معنی داری را در DNA 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 اسپرم‌ها کاهش یافته و میزان فراگمتاسیون DNA از لحاظ آماری در مقایسه با افراد غیر سیگاری بیشتر است، احتمالاً اختلال در فرآیند تراکم کروماتین اسپرم در افراد سیگاری، DNA را نسبت به آسیب مستعد می‌کند. (۲۲، ۲۳). در مطالعه ما نیز پیشنهاد می‌شود که در افراد نورموزواسپرم، فرآیند فریز و ذوب با تخریب ساختار

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 می‌تواند 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 می‌تواند نشان دهنده ی تمایل DNA آن‌ها 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 می‌توان 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 می‌گردد. این مقاله از پایان نامه کارشناسی ارشد علوم تشریحی به شماره کد طرح ۳۹۶۳۷۸ استخراج شده است.

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

مطالعات فراوان در خصوص تاثیرات تنش گرمایی بر پارامترهای 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 پروتئین اسپرم آن‌ها و مشاهده ی ارتباط آن با میزان تخریب DNA گزارش کردند که احتمالا کمبود پروتئین فاکتور تاثیر گذاری در تخریب و یا آسیب پذیری DNA این سلول‌ها 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 مارکرهای تنش اکسیداتیو ارتباط مثبت قوی وجود دارد. به عبارتی این سلول‌ها 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 زوج‌های تحت درمان‌های کمک باروری، میزان هیستون‌های باقی مانده در هسته ی اسپرم با تخریب DNA آن‌ها ارتباط مستقیم دارد (۲۷).

همچنین در مطالعه ی Hosseinifar 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 پروتئین اسپرم ارزیابی شده با CMA3 ارتباط دارد (۲۸).

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.

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-specific 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 *Bos 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.