TUMJ مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، شهریور ۱۳۹۶، دوره ۷۵، شماره ۶، صفحه‌های ۴۱۷ تا ۴۲۳ مقاله اصیل

ارزیابی بیان پروتیین متصل به دُمین WW غلاف خلف آکروزومی در اسپرماتوزوآی مردان نابارور با واریکوسل

نسیم قضاوی خوراسگانی[۱و۲]
الهام جانقربان لاریچه[۱و۲]
مرضیه تولائی[۱*]، دینا ظهرابی[۲]
همایون عباسی[۳]، محمد حسین نصراصفهانی[۱و۳]

۱- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه زیست فناوری تولیدمثل، اصفهان، ایران.
۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، موسسه آموزش عالی نور دانش، میمه، اصفهان، ایران.
۳- مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران.

*نویسنده مسئول: اصفهان، خوراسگان، خیابان سلمان، خیابان رویان، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه زیست فناوری تولیدمثل.
تلفن: ۹۵۰۱۵۶۸۲ -۰۳۱
E-mail: Tavalaee.m@royaninstitute.org

چکیده

دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۱ ویرایش: ۱۳۹۶/۰۶/۲۱ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۳۰ آنلاین: ۱۳۹۶/۰۶/۳۱

زمینه و هدف: پروتیین متصل به دُمین WW غلاف خلف آکروزومی (PAWP) به‌عنوان یکی از فاکتورهای اسپرمی مرتبط با فعال‌سازی تخمک معرفی شده که در اسپرماتیدهای طویل شده، بیان می‌گردد. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که افزایش دمای بیضه در مردان نابارور با واریکوسل می‌تواند روی کیفیت مایع منی، بیان ژن‌ها و پروتیین‌ها تاثیر گذارد. در این مطالعه، بیان PAWP در هر دو سطح RNA و پروتیین و همچنین آسیب DNA اسپرم بین مردان بارور و مردان نابارور با واریکوسل مقایسه شد.

روش بررسی: در این مطالعه مورد-شاهدی، نمونه‌های مایع منی از ۲۰ فرد بارور و ۳۵ نابارور با واریکوسل مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان از دی ۱۳۹۴ تا شهریور ۱۳۹۵ جمع‌آوری شده بود. پارامترهای اسپرمی، آسیب DNA، بیان PAWP در هر دو سطح RNA و پروتیین به‌ترتیب بر اساس دستور کار سازمان بهداشت جهانی، تست کروماتین، واکنش زنجیره پلی‌مراز همزمان و تکنیک وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت و داده‌ها مقایسه گردید.

یافته‌ها: میانگین غلظت اسپرم، درصد تحرک و بیان PAWP در هر دو سطح RNA ($P<۰/۰۰۱$) و پروتیین ($P=۰/۰۳$) در افراد نابارور با واریکوسل در مقایسه با افراد بارور به‌طور معناداری پایین‌تر بود. همچنین میانگین درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم و آسیب DNA افراد نابارور با واریکوسل در مقایسه با افراد بارور به‌طور معناداری بیشتر بود ($P=۰/۰۳$).

نتیجه‌گیری: بیان PAWP به‌عنوان پروتیینی که در فرآیند اسپرماتوژنز و لقاح نقش دارد، در افراد نابارور با واریکوسل کاهش یافت. همچنین سلامت DNA اسپرم در این افراد مختل شده که می‌توان به‌عنوان اتیولوژی‌های مهم ناباروری در نظر گرفت.

کلمات کلیدی: مطالعه مورد-شاهد، واریکوسل، PAWP، آسیب DNA، آنالیز مایع منی.

مقدمه

یکی از علل ناباروری در مردان، واریکوسل می‌باشد که به‌صورت اتساع غیرطبیعی ورید اسپرماتیک و پیچ و خم شبکه‌ی پامپینی فرم در اسکروتوم نمایان می‌شود.[۱] در افراد نابارور با واریکوسل، افزایش درجه حرارت بیضه، اختلال در روند اسپرماتوژنز، کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی و ناباروری گزارش شده است.[۲] تاکنون عواملی همچون هایپوکسی وریدی، استرس گرمایی بیضه، افزایش سطح استرس اکسیداتیو، عدم تعادل هورمونی و افزایش سطح سموم شیمیایی و فلزاتی مانند روی و آهن در پاتولوژی واریکوسل شناخته شده است.[۳و۴] به‌احتمال افزایش دمای بیضه، یکی از مهمترین عوامل موثر در مختل شدن اسپرماتوژنز در بیماران نابارور با واریکوسل

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]

می‌باشد. مشخص شده است که بالا رفتن دما باعث اختلال در فرآیند اسپرماتوژنز و به‌دنبال آن کاهش کیفیت مایع منی می‌شود که می‌توان به کاهش تعداد اسپرم، درصد تحرک، و مورفولوژی اسپرم و همچنین افزایش آسیب DNA اشاره نمود.[۵و۶]

در طی لقاح و فعال‌سازی تخمک، یک سری وقایع سلولی و مولکولی رخ می‌دهد که در بیشتر تخمک‌های جانوران، با آزادسازی کلسیم درون سلولی همراه می‌شود.[۷و۸] اسپرم پستانداران پس از اتصال با تخمک، برخی فاکتور (فاکتورهای) پروتیینی اختصاصی را به درون سیتوپلاسم تخمک رها می‌کند که این فاکتور (فاکتورها) نوسانات کلسیم را راه‌اندازی می‌کند. هنوز مشخص نیست که کدام فاکتور (فاکتورهای) اسپرمی بالا دست آزادسازی کلسیم درون سلولی جهت آغاز فرآیند فعال‌سازی عمل می‌کند. از بین فاکتورهای فعال کننده‌ی تخمک بررسی شده در پستانداران، فسفولیپاز C زتا (PLCζ: Phospholipase C ζ) و دمین WW غلاف خلف آکروزومی Post-acrosomal WW-domain binding protein, PAWP بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند.[۹و۱۰]

به‌دنبال اتصال غشای اسپرم با تخمک و رهایی PLCζ به داخل تخمک، PLCζ به داخل تخمک، و اتصال غشای اسپرم با تخمک، PLCζ می‌تواند فسفواینوزیتید ٤، ٥ بیس فسفات (PIP2) را در درون سلول مورد هدف قرار دهد و از طریق ناحیه‌ی اتصال دهنده‌ی X-Y خود با PIP2 واکنش دهد. سپس PIP2 به اینوزیتول تری فسفات (IP3) و دی آسیل گلیسرول (DAG) شکسته شده و به دنبال آن IP3 با رسپتور خود درون سلول واکنش دهد و نوسانات کلسیم القا گردد.[۱۱] بر خلاف PLCζ، مکانیسم مولکولی دقیق مسیر سیگنالی PAWP هنوز مشخص نشده است.

PAWP هیچ فعالیت آنزیمی ندارد ولی فعالیت هیدرولیتیکی PLC و توانایی برای عمل کردن به‌عنوان فعال کننده‌ی ژنتیکی را دارا می‌باشد. فرض شده که PAWP توسط بر همکنش با دیگر پروتیین‌ها اثرات خود را در تخمک اعمال کند. PLCγ برای فعال‌سازی موفق تخمک الزامی می‌باشد، اما هنوز روشن نیست که PLCγ چگونه توسط فاکتور فعال‌سازی تخمک برگرفته از اسپرم فعال می‌شود.[۱۱] پیشنهاد شده که به دنبال آزادسازی PAWP به‌داخل تخمک در مراحل نهایی لقاح، به‌احتمال PAWP با بر همکنش با پروتیین‌های مرتبط با YAP عمل می‌کند که از طریق Src-like kinase، فعال شدن PLCγ را به همراه دارد.[۱۱] پس از فعال شدن PLCγ، PIP2 توسط PLCγ به IP3 و دی آسیل گلیسرول شکسته می‌شود. سپس IP3 آزادسازی کلسیم را از شبکه‌ی آندوپلاسمی از طریق القا به رسپتورهای IP3 بر روی این شبکه راه‌اندازی می‌کند.[۱۲و۱۳] با توجه به اینکه برخی پروتیین‌های دمین WW1 مثل YAP به‌عنوان یک پروتیین واکنش دهنده با PAWP، به‌طور زیادی در تخمک بیان می‌شوند و یک موتیف متصل شونده به SH3 را دارا می‌باشند، ممکن است PLCγ به‌طور غیرمتعارفی از طریق دُمین SH3 خودش برای شکستن PIP2 در طول لقاح مهره داران فعال شود.[۱۲و۱٤]

جایگاه PAWP در پستانداران، در غلاف خلف آکروزومی پوشش دور هسته‌ای سر اسپرم در طی اسپرمیوژنز شناسایی شده است.[۱۷-۱۵] مشخص شد که ریزتزریق پروتیین نوترکیب PAWP در تخمک‌های متافاز ۲ زنوپوس و پستانداران منجر به شروع دوباره‌ی میوز و تشکیل پیش هسته می‌شود. همچنین تزریق اسپرم به‌همراه آنتی‌بادی ضد PAWP منجر به توقف لقاح می‌گردد. بنابراین نقش PAWP به‌عنوان فاکتور فعال کننده‌ی تخمک مورد توجه بیشتر قرار گرفت.[۱۵] افزون بر این، تزریق پروتیین نوترکیب PAWP در تخمک‌های زنوپوس، موش و انسان، نوسانات کلسیم را به‌دنبال دارد. همچنین ارتباطی بین سطح PAWP در اسپرم با نتایج لقاح در انسان یا با لقاح مصنوعی در دام گزارش شده است.[۱۰و۱۸-۱۵] مطالعات پیشین نشان داده‌اند که استرس دمایی مانند وضعیت واریکوسل و همچنین شوک حرارتی که در طی فریز به اسپرم وارد می‌شود، می‌تواند منجر به کاهش بیان PLCζ شود.[۱۹و۲۰] هدف از مطالعه حاضر، مقایسه بیان PAWP (در هر دو سطح رونویسی و ترجمه) و آسیب DNA اسپرم بین مردان نابارور با واریکوسل و مردان بارور بود.

روش بررسی

این مطالعه مورد-شاهدی در آزمایشگاه آندرولوژی پژوهشکده زیست فناوری پژوهشگاه رویان انجام شد. نمونه مایع منی از افراد مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان از دی ۱۳۹٤ تا شهریور ۱۳۹۵ جمع‌آوری گردید. افراد مورد بررسی در این مطالعه شامل دو گروه هستند، گروه اول (شاهد)، ۳۵ فرد نابارور با واریکوسل درجه ۲ و ۳ که جهت انجام عمل واریکوسلکتومی به این

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]

مرکز مراجعه کرده بودند و گروه دوم (کنترل)، ۲۰ فرد بارور، بدون سابقه واریکوسل، که کاندید تشخیص ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی (Preimplantation genetic diagnosis, PGD) جهت تعیین جنسیت برای حفظ تعادل جنسیت در خانواده بودند. از همه‌ی زوج‌های شرکت‌کننده در این طرح، رضایت‌نامه‌ی کتبی گرفته و نمونه‌ی بیماران با آگاهی آن‌ها در طرح استفاده شد.

نمونه مایع منی افراد پس از ۵-۳ روز پرهیز از مقاربت در ظروف استریل و در مدت ۳۰-۱۵ دقیقه پس از انزال به آزمایشگاه تحویل داده شد. سپس بخشی از نمونه مایع منی هر دو گروه از لحاظ پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی) بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی بررسی گردید.[۲۱] با بررسی بخش باقیمانده نمونه‌ی اسپرم، آسیب DNA اسپرم توسط روش آزمون ساختار کروماتین اسپرم (SCSA)[۲۲] و بیان نسبی سطوح mRNAی PAWP توسط تکنیک Real-time PCR و پروتیین PAWP توسط تکنیک وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت.[۲۳و۲۴]

غلظت نمونه‌ی اسپرمی با استفاده از لام شمارنده‌ی مکلر بر حسب میلیون بر لیتر، میزان تحرک اسپرم با استفاده از سیستم آنالیز اتوماتیک اسپرم (Computer aided sperm analysis, CASA) بر حسب درصد و مورفولوژی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو بر اساس دستورکار سازمان بهداشت جهانی مورد ارزیابی قرار گرفت.[۲۱]

نتایج حاصل از این مطالعه با استفاده از SPSS statistical software, version 11.5 (IBM, Armonk, NY, USA) و از طریق آنالیز آماری Independent samples t-test مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه، P≤۰/۰۵ از لحاظ آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

آنالیزهای معمول مایع منی بر روی ۲۰ فرد بارور و ۳۵ فرد نابارور با واریکوسل بر اساس دستورکار سازمان بهداشت جهانی انجام شد.[۲۱] جدول ۱ توصیف پارامترهای مایع منی بین افراد با واریکوسل و افراد بارور را نشان می‌دهد. میانگین غلظت اسپرم (۷/۰۸±۳۹/۰۹ در مقابل ۹/۱۰±۸۶/۱۶)، تعداد کل اسپرم (۱۴/۷۵±۱۰۵/۵۸ در مقابل ۷۴/۱۶±۴۹۸/۹۹)، درصد تحرک اسپرم (۳/۴۱±۴۶/۰۱ در مقابل ۴/۲۷±۵۸/۶۱) و حجم مایع منی ۰/۳۲±۳/۱۵ در مقابل ۰/۵۳±۵/۷۱) به‌طور معناداری در افراد نابارور با واریکوسل در مقایسه با افراد بارور کمتر بود (P<۰/۰۵).

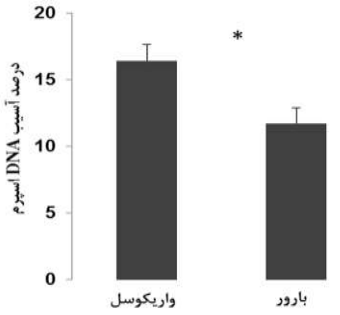
همچنین، درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم (۰/۳۰±۹۶/۶۴ در مقابل ۰/۲۹±۹۵/۶۵) به‌طور معناداری در افراد نابارور با واریکوسل در مقایسه با افراد بارور بیشتر بود. آسیب DNA اسپرم به‌وسیله‌ی تکنیک آزمون ساختار کروماتین اسپرم (Sperm chromatin structure assay, SCSA) ارزیابی شد و بین دو گروه مورد مطالعه مقایسه گردید. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، درصد آسیب DNA اسپرم به‌طور معناداری در افراد نابارور با واریکوسل (۱/۵۲±۱۶/۴۵) در مقایسه با افراد بارور (۱/۱۸±۱۱/۷۵) بیشتر بوده است (P=۰/۰۳).

جدول ۱: آنالیز توصیفی پارامترهای اسپرمی بین افراد بارور و افراد نابارور با واریکوسل

پارامترها	افراد نابارور با واریکوسل (میانگین± خطای استاندارد) N=۳۵	افراد بارور (میانگین± خطای استاندارد) N=۲۰	P*
غلظت اسپرم (10^6 در هر میلی‌لیتر)	۷/۰۸±۳۹/۰۹	۹/۱۰±۸۶/۱۶	<۰/۰۰۱
درصد تحرک اسپرم	۳/۴۱±۴۶/۰۱	۴/۲۷±۵۸/۶۱	۰/۰۳
درصد ناهنجاری مورفولوژی اسپرم	۰/۳۰±۹۶/۶۴	۰/۲۹±۹۵/۶۵	۰/۰۳
حجم (ml)	۰/۳۲±۳/۱۵	۰/۵۳±۵/۷۱	<۰/۰۰۱
تعداد کل اسپرم (انزال/10^6)	۱۴/۷۵±۱۰۵/۵۸	۷۴/۱۶±۴۹۸/۹۹	<۰/۰۰۱

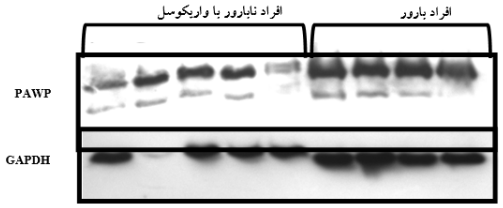
* آنالیز آماری: Independent t-test، گروه‌ها مقایسه شدند و P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]



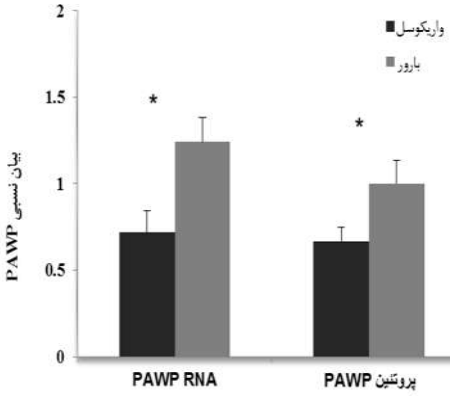
شکل ۱: مقایسه درصد آسیب DNA اسپرم بین افراد بارور و افراد نابارور با واریکوسل.

از طریق آنالیز آماری Independent t-test، گروه‌ها مقایسه شدند و ستاره نشانگر اختلاف معناداری بین دو گروه در سطح P<۰/۰۵ است.



شکل۳: وسترن بلات پروتیین‌های PAWP (باند ۳۸ کیلودالتون) و GAPDH (باند ۳۲ کیلودالتون) در چهار فرد بارور و پنج فرد نابارور با واریکوسل

از طریق آنالیز آماری Independent t-test، گروه‌ها مقایسه شدند و ستاره نشانگر اختلاف معناداری بین دو گروه در سطح P<۰/۰۵ است.



شکل ۲: مقایسه بیان نسبی PAWP در هر دو سطح RNA و پروتیین بین افراد بارور و افراد نابارور با واریکوسل.

از طریق آنالیز آماری Independent t-test، گروه‌ها مقایسه شدند و ستاره نشانگر اختلاف معناداری بین دو گروه در سطح P<۰/۰۵ است.

PAWP در سطح RNA به‌وسیله‌ی تکنیک Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) و در سطح پروتیین به‌وسیله‌ی تکنیک وسترن بلات تشخیص داده شد. در شکل ۲ نشان داده شده است که میانگین بیان نسبی PAWP در سطح RNA به‌طور معناداری در افراد نابارور با واریکوسل (۰/۷۲±۰/۱۲) در مقایسه با افـراد بارور (۱/۲٤±۰/۱٤) پایین‌تر بوده است (P<۰/۰۰۱). وسترن بلات PAWP اسپرم در چهار فرد بارور و پنج فرد نابارور در شکل ۳ نشان داده شده است. میانگین بیان نسبی PAWP در سطح پروتیین به‌طور معناداری در افراد نابارور با واریکوسل (۰/٦۷±۰/۸) در مقایسه با افراد بارور (۱/۰۰±۰/۱۳) به‌طور معناداری (P=۰/۰۳) پایین‌تر بود (شکل ۲).

بحث

با توجه به تاثیر دما بر روی بیان پروتیین‌ها، در این مطالعه پروتیین PAWP بین افراد نابارور با واریکوسل و افراد بارور مورد ارزیابی قرار گرفت. مطالعات نشان دادند که نوسانات کلسیم و لقاح توسط اسپرم که از آنتی‌بادی ضد PAWP یا پپتیدهای رقابتی برگرفته شده از توالی آن‌ها استفاده شده بود، مهار گردید. از این‌رو PAWP به‌عنوان یکی از فاکتورهای اسپرمی احتمالی دخیل در فعال‌سازی تخمک پیشنهاد شد.[۱۲و۱۵و۱۸و۲۵] افزون بر این، Aarabi و Kennedy در مطالعات خود به منظور اثبات نقش PAWP در فرآیند اسپرمیوژنز، گزارشی در رابطه با ارتباط بین مورفولوژی غیرطبیعی سر اسپرم با محتوای کم PAWP در اسپرم انسان و دام گزارش کردند.[۱۷و۲۶] در افراد نابارور گلوبوزواسپرمی (Globozoospermia: افرادی که دارای اسپرم‌های سرگرد و فاقد آکروزوم و یا آکروزوم جزیی در سر هستند)

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]

بیان PAWP در سطح RNA و پروتیین نسبت به افراد بارور به‌طور معناداری کاهش داشته و نشانگر این است که اسپرم‌هایی که دارای شکل غیرطبیعی سر هستند با کاهش بیان پروتیین PAWP مواجهند.[۲۷] در مطالعه‌ی دیگر، PAWP به‌عنوان یک بیومارکر جهت پیشگویی لقاح ICSI و تکوین پیش از لانه‌گزینی معرفی شده است.[۱۷] از این‌رو PAWP نقش بسزایی در فرآیند لقاح و فعال شدن تخمک دارد.

در این مطالعه برای اولین بار بیان نسبی PAWP، بین افراد نابارور با واریکوسل و افراد بارور در هر دو سطح mRNA و پروتیین مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان بیان PAWP در سطح mRNA و پروتیین در افراد نابارور با واریکوسل نسبت به افراد بارور کاهش معناداری داشته است.

بنابراین یکی از اتیولوژی‌های ناباروری مردان نابارور با واریکوسل می‌تواند مربوط به کاهش سطح PAWP و عدم فعال شدن تخمک در این افراد به‌علت تاثیر افزایش دمای بیضه بر روی بیان ژن‌ها در طی اسپرماتوژنز باشد. به‌تازگی در افراد نابارور گلوبوزواسپرمی مشخص شده که بیان PAWP در سطح RNA و پروتیین به‌طور معناداری نسبت به افراد بارور کاهش داشته و با انجام فعال‌سازی مصنوعی تخمک پس از روش تزریق اسپرم به‌داخل سیتوپلاسم تخمک (ICSI)، میزان لقاح (٥٦/٠٦٪) و حاملگی (٤١/٧٪) به‌طور رضایت‌بخشی افزایش می‌یابد[۲٤] در پژوهش Tavalaee و همکاران ارتباط معناداری بین درصد اسپرم‌های دارای PAWP مثبت با پارامترهای اسپرمی و میزان لقاح پس از ICSI مشاهده شده است.[۲۸] در پژوهش دیگر، گزارش شده که بیان ζPLC به‌عنوان فاکتور اسپرمی دیگر دخیل در فعال شدن تخمک در افراد نابارور با واریکوسل کاهش معناداری را نسبت به افراد بارور داشته است.[۲۹]

با توجه به نزدیکی ناحیه پری‌نوکلئارتکا (Perinuclear theca) به هسته، DNA اسپرم نیز در این افراد می تواند تحت تاثیر باشد. در مطالعه پیشین افزایش آسیب DNA در افراد نابارور با واریکوسل گزارش شده که این افزایش با سطح بالای استرس اکسیداتیو مایع منی مرتبط است.[۳۰]

از این‌رو استرس گرمایی یا شرایط واریکوسل، می‌تواند با افزایش آسیب DNA و کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی همراه باشد.[۳۱و۳۲] در این مطالعه، همانند سایر مطالعات، میانگین درصد آسیب DNA اسپرم در افراد نابارور با واریکوسل در مقایسه با افراد بارور به‌طور معناداری بیشتر و کیفیت پارامترهای اسپرمی نیز کاهش یافته بود که می‌تواند به‌علت نقص فرآیند اسپرماتوژنز به سبب استرس دمایی بیضه در این افراد باشد.[۳۳و۳٤]

کاهش بیان PAWP و افزایش آسیب DNA در اسپرم افراد نابارور با واریکوسل می‌تواند از اتیولوژی‌های مهم ناباروری در این افراد باشد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از طرح پژوهشکده زیست‌فناوری پژوهشگاه رویان، تحت عنوان "مقایسه بیان PAWP در اسپرم افراد نابارور با واریکوسل و افراد بارور" با کد ٩٤٠٠٠٠٧٤ بین سال‌های ١٣٩٤ تا ١٣٩٥ اجرا شده است.

References

1. Agarwal A, Deepinder F, Cocuzza M, Agarwal R, Short RA, Sabanegh E, et al. Efficacy of varicocelectomy in improving semen parameters: new meta-analytical approach. *Urology* 2007;70(3):532-8.
2. Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update* 2001;7(5):473-81.
3. Eisenberg ML, Lipshultz LI. Varicocele-induced infertility: newer insights into its pathophysiology. *Indian J Urol* 2011;27(1):58-64.
4. Sheehan MM, Ramasamy R, Lamb DJ. Molecular mechanisms involved in varicocele-associated infertility. *J Assist Reprod Genet* 2014;31(5):521-6.
5. Fujisawa M, Yoshida S, Kojima K, Kamidono S. Biochemical changes in testicular varicocele. *Arch Androl* 1989;22(2):149-59.
6. Navaeian-Kalat E, Deemeh MR, Tavalaee M, Abasi H, Modaresi M, Nasr-Esfahani MH. High total acrosin activity in varicocele individuals. *Andrologia* 2012;44 Suppl 1:634-41.
7. Amdani SN, Yeste M2, Jones C, Coward K. Sperm Factors and Oocyte Activation: Current Controversies and Considerations. *Biol Reprod* 2015;93(2):50.
8. Machaca K. Ca2+ signaling differentiation during oocyte maturation. *J Cell Physiol* 2007;213(2):331-40.
9. Nomikos M, Swann K, Lai FA. Is PAWP the "real" sperm factor? *Asian J Androl* 2015;17(3):444-6.
10. Aarabi M, Sutovsky P, Oko R1. Re: Is PAWP the 'real' sperm factor? *Asian J Androl* 2015;17(3):446-9.
11. Kashir J, Nomikos M, Swann K, Lai FA. PLCζ or PAWP: revisiting the putative mammalian sperm factor that triggers egg activation and embryogenesis. *Mol Hum Reprod* 2015;21(5):383-8.
12. Aarabi M, Balakier H, Bashar S, Moskovtsev SI, Sutovsky P, Librach CL, et al. Sperm-derived WW domain-binding protein, PAWP, elicits calcium oscillations and oocyte activation in humans and mice. *FASEB J* 2014;28(10):4434-40.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]

13. Xu Z, Kopf GS, Schultz RM. Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca2+ release in early and late events of mouse egg activation. *Development* 1994;120(7):1851-9.
14. Chen HI, Sudol M. The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92(17):7819–23.
15. Wu AT, Sutovsky P, Manandhar G, Xu W, Katayama M, Day BN, et al. PAWP, a sperm-specific WW domain-binding protein, promotes meiotic resumption and pronuclear development during fertilization. *J Biol Chem* 2007;282(16):12164-75.
16. Wu ATH, Sutovsky P, Xu W, van der Spoel AC, Platt FM, Oko R. The postacrosomal assembly of sperm head protein, PAWP, is independent of acrosome formation and dependent on microtubular manchette transport. *Dev Biol* 2007;312(2):471-83.
17. Aarabi M, Balakier H, Bashar S, Moskovtsev SI, Sutovsky P, Librach CL, et al. Sperm content of postacrosomal WW binding protein is related to fertilization outcomes in patients undergoing assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2014; 102(2):440-7.
18. Aarabi M, Qin Z, Xu W, Mewburn J, Oko R. Sperm-borne protein, PAWP, initiates zygotic development in Xenopus laevis by eliciting intracellular calcium release. *Mol Reprod Dev* 2010;77(3):249-56.
19. Kashir J, Heynen A, Jones C, Durrans C, Craig J, Gadea J, et al. Effects of cryopreservation and density-gradient washing on phospholipase C zeta concentrations in human spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2011;23(2):263-7.
20. Sanusi R, Yu Y, Nomikos M, Lai FA, Swann K. Rescue of failed oocyte activation after ICSI in a mouse model of male factor infertility by recombinant phospholipase Cζ. *Mol Hum Reprod* 2015;21(10):783-91.
21. World Health Organization (WHO). Examination and processing human semen. 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.
22. Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA). *Methods Mol Biol* 2013;927:147-64.
23. Aghajanpour S, Ghaedi K, Salamian A, Deemeh MR, Tavalaee M, Moshtaghian J, et al. Quantitative expression of phospholipase C zeta, as an index to assess fertilization potential of a semen sample. *Hum Reprod* 2011;26(11):2950-6.
24. Tavalaee M, Nasr-Esfahani MH. Expression profile of PLCζ, PAWP, and TR-KIT in association with fertilization potential, embryo development, and pregnancy outcomes in globozoospermic candidates for intra-cytoplasmic sperm injection and artificial oocyte activation. *Andrology* 2016;4(5):850-6.
25. Satouh Y, Nozawa K, Ikawa M. Sperm postacrosomal WW domain-binding protein is not required for mouse egg activation. *Biol Reprod* 2015;93(4):94.
26. Kennedy CE, Krieger KB, Sutovsky M, Xu W, Vargovič P, Didion BA, et al. Protein expression pattern of PAWP in bull spermatozoa is associated with sperm quality and fertility following artificial insemination. *Mol Reprod Dev* 2014;81(5):436-49.
27. Kamali-Dolat Abadi M, Tavalaee M, Shahverdi A, Nasr-Esfahani MH. Evaluation of PLCζ and PAWP expression in globozoospermic individuals. *Cell J* 2016;18(3):438-45.
28. Tavalaee M, Nasr-Esfahani MH. Relationship between potential sperm factors involved in oocyte activation and sperm DNA fragmentation with intra-cytoplasmic sperm injection clinical outcomes citation. *Cell J* 2016;18(184):588-96.
29. Janghorban-Laricheh E, Ghazavi-Khorasgani N, Tavalaee M, Zohrabi D, Abbasi H, Nasr-Esfahani MH. An association between sperm PLCζ levels and varicocele? *J Assist Reprod Genet* 2016;33(12):1649-55.
30. Bahreinian M, Tavalaee M, Abbasi H, Kiani-Esfahani A, Shiravi AH, Nasr-Esfahani MH. DNA hypomethylation predisposes sperm to DNA damage in individuals with varicocele. *Syst Biol Reprod Med* 2015;61(4):179-86.
31. Tunc O, Tremellen K. Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. J Assist Reprod Genet 2009;26(9-10):537-44.
32. Azadi L, Abbasi H, Deemeh MR, Tavalaee M, Arbabian M, Pilevarian AA, et al. Zaditen (Ketotifen), as mast cell blocker, improves sperm quality, chromatin integrity and pregnancy rate after varicocelectomy. *Int J Androl* 2011;34(5 Pt 1):446-52.
33. Li F, Yamaguchi K, Okada K, Matsushita K, Ando M, Chiba K, et al. Significant improvement of sperm DNA quality after microsurgical repair of varicocele. *Syst Biol Reprod Med* 2012;58(5):274-7.
34. Tavalaee M, Bahreinian M, Barekat F, Abbasi H, Nasr-Esfahani MH. Effect of varicocelectomy on sperm functional characteristics and DNA methylation. *Andrologia* 2015;47(8):904-9.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]

TUMJ Tehran University Medical Journal, September 2017; Vol. 75, No. 6: 417-423 Original Article

Evaluation of post-acrosomal sheath WW domain binding protein expression in spermatozoa from infertile men with varicocele

Nasim Ghazavi-Khorasgani M.Sc.[1,2]
Elham Janghorban-Laricheh M.Sc.[1,2]
Marziyeh Tavalaee Ph.D.[1*]
Dina Zohrabi Ph.D.[2]
Homayon Abbasi M.D.[3]
Mohammad Hossein Nasr-Esfahani Ph.D.[1,3]

1- Royan Institute, Institute for Biotechnology of Academic Center for Education, Culture and Research, Reproductive Biomedicine Research Center, Department of Reproductive Biotechnology, Isfahan, Iran.
2- Department of Biology, Faculty of Sciences, Nour Danesh Institute of Higher Education, Meymeh, Isfahan, Iran.
3- Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran.

[*]Corresponding author: Royan Institute, Institute for Biotechnology of Academic Center for Education, Culture and Research, Reproductive Biomedicine Research Center, Department of Reproductive Biotechnology, Royan St., Salman Ave., Khorasgan, Isfahan, Iran.
Tel: +98- 31- 95015682
E-mail: Tavalaee.m@royaninstitute.org

Abstract

Received: 01 May 2017 Revised: 12 Sep. 2017 Accepted: 21 Sep. 2017 Available online: 22 Sep. 2017

Background: Post-acrosomal sheath WW domain binding protein (PAWP) is one of sperm factors related to oocyte activation and is expressed in elongating spermatid. Previously, the effect of high of testicular temperature in infertile men with varicocele on semen quality, sperm DNA damage, expression of genes and proteins were reported. In this study, expression of PAWP at RNA and protein levels, and also sperm DNA damage were compared between fertile and infertile men with varicocele.

Methods: In this case-control study, semen samples were collected from 35 infertile men with varicocele (grade II & III) and 20 fertile men referring to Isfahan Fertility and Infertility Center from January 2016 to September 2016. Ejaculated semen was obtained by masturbation into a sterile plastic container after 3-5 days of abstinence and was allowed to liquefy at room temperature. Briefly, sperm concentration, motility and morphology were evaluated using a sperm chamber (Sperm meter; Sperm Processor, Aurangabad, India), Computer Assisted Semen Analysis (CASA, Video Test, ltd: version Sperm 2.1, Russia) and Papanicolaou staining, respectively. In addition, DNA fragmentation, expression of PAWP at RNA and protein levels were assessed by real-time PCR, and Western blot technique, respectively. Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) and Package for the Social Studies were used to analyze data. We used independent-samples t-test to compare the mean value between different groups. Differences with values of $P<0.05$ were considered as statistically significant.

Results: Mean of semen volume, sperm concentration, percentage of sperm motility, and expression of PAWP at both RNA ($P=0.0001$) and protein ($P=0.03$) levels were significantly lower in infertile men with varicocele in comparison with fertile men. In addition, mean percentage of sperm abnormal morphology and sperm DNA fragmentation were significantly higher in infertile men with varicocele in comparison with fertile men ($P<0.05$).

Conclusion: Expression of PAWP as a protein involved in spermatogenesis and fertilization process, has decreased in infertile men with varicocele. In addition, sperm DNA integrity was disrupted in these individuals that can be considered as a main etiology of infertility.

Keywords: case-control studies, DNA fragmentation, PAWP, semen analysis, varicocele.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]