

Abstract

Project Code: MRG4980207

Project Title: The relationship between the packaging of chromatin and reproductive capacity in human spermatozoa

Investigator: Sirikul Manochantr
Division of Cell Biology, Department of Preclinical Science, Faculty of
Medicine, Thammasat University

E-mail Address: bsirikul@yahoo.com

Project Period: July 1st 2006 – June 30th 2008

The various spermatozoa types present in an ejaculate differ in their motility and morphology. However, little is known about nuclear maturity of these spermatozoa and their relationship with morphological and motile characteristics. Histone-to-protamine exchange is a late spermiogenesis event, along with acrosome formation, membrane remodeling and other significant morphological and biochemical events those are necessary for normal sperm function. Therefore, protamines are considered as a good marker of sperm nuclear maturity. The aim of the present study is to investigate the relationship between DNA/chromatin integrity and sperm quality as measured by conventional semen parameters. The study group consisted of 49 patients attending the Center for Assisted Reproduction and Embryology, Thammasat University Hospital, Thailand for diagnostic semen analysis. Semen analysis was carried out to assess sperm concentration, motility, and morphology. The remaining aliquot of each semen sample was processed for the study of chromatin condensation and DNA integrity using transmission electron microscopy, chromomycin A3 (CMA3) assay and TUNNEL assay. Following the semen analysis, 49 patients were divided into 4 groups according to the percentage of morphologically normal spermatozoa, >30%; 14-30%; 4-14% and <4% normal morphology. The ultrastructural analysis showed heterogeneity in sperm nuclear morphology with some spermatozoa showing the round nucleus and other spermatozoa showing a more elongated nucleus. The disruption in chromatin condensation, identified by a coarse granular pattern and contains numerous vacuoles, in the spermatozoa from infertile couples is observed. Immunoreactivity with anti-TP was increased in spermatozoa of patients with morphologically normal spermatozoa <4%, while staining with anti-protamine antibodies was increased in spermatozoa of patients with

morphologically normal spermatozoa >4%. This finding indicating the maturation defect as TP are retained in the spermatozoa of infertile couples. The relationship of the incidence of spermatozoa with abnormal chromatin condensation and parameters of basic semen analysis was investigated. The sperm concentrations were gradually reduced in patients with lower percentage of morphologically normal spermatozoa 14-30% (149.84 ± 16.58 M/ml), 4-14% (125.54 ± 11.59 M/ml), <4% (78.81 ± 16.09 M/ml), versus patients with morphologically normal spermatozoa >30% (179.88 ± 29.30 M/ml; $P < 0.05$). Significantly lower percentages of sperm motility were recorded between the 4 different morphological groups, namely $57.8\% \pm 6.12$, $48.5\% \pm 4.78$, $43.24\% \pm 3.49$ and $25.78\% \pm 6.76$, respectively ($P < 0.05$). Spearman's correlation analysis indicated that the percentage of morphologically normal spermatozoa as recorded by strict criteria was significantly correlated with the concentration ($r = 0.45$, $P = 0.001$) and motility ($r = 0.36$, $P = 0.01$). The inversely correlations were found between the percentage of protamine deficiency spermatozoa (CMA3 positive) and concentration ($r = -0.33$, $P = 0.009$), motility ($r = -0.53$, $P = 0.00$) and normal morphology ($r = -0.41$, $P = 0.002$) while the other seminal parameters were less well correlated. Linear regression analysis revealed that the percentage of DNA damage spermatozoa were negatively correlated with concentration ($r = -0.31$, $P = 0.01$), motility ($r = -0.46$, $P = 0.00$) and normal morphology ($r = -0.29$, $P = 0.02$). In addition, patients with morphologically normal spermatozoa <4% have the significantly higher percentages of CMA3 and TUNNEL positive spermatozoa whereas the significantly lower percentage of sperm motility. The relationship between the percentages of CMA3 and TUNNEL positive spermatozoa also showed a significantly positive correlation with each other ($r = 0.68$, $P = 0.00$). These finding indicated that patients with abnormal semen parameters (decreased concentration, low motility, abnormal morphology) carrying higher loads of DNA-damaged spermatozoa, therefore seeking ART is of concern. The classical semen parameters do not give directly information about chromatin condensation and DNA integrity therefore additional strategies might be required to further improve the characterization of the semen quality.

Key words: male infertility, chromatin condensation, protamine deficiency, DNA integrity

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG4980207

ชื่อโครงการ: ความสัมพันธ์ระหว่างการจัดเรียงตัวของไฮโครมาตินและความสามารถในการ
เจริญพันธุ์ ในเซลล์อสุจิของมนุษย์

ชื่อนักวิจัย: ศิริกุล มะโนจันทร์

สาขาเซลล์วิทยา สถาบันวิทยาศาสตร์ฟิสิกส์ คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

E-mail Address: bsirikul@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ: 1 กรกฎาคม 2549 – 30 มิถุนายน 2551

น้ำอสุจิประกอบด้วยอสุจิที่มีความแตกต่างกันทั้งทางด้านรูปร่างและการเคลื่อนที่ อย่างไรก็ตาม ข้อมูลเกี่ยวกับความสมบูรณ์ของนิวเคลียสของอสุจิเหล่านี้และความสัมพันธ์กับรูปร่างและการเคลื่อนที่ ยังไม่เป็นที่ทราบอย่างแน่ชัด ในระยะท้ายของการสร้างอสุจิจะมีการแทนที่โปรตีน histone ด้วย protamine พร้อมกับการสร้างอะโครโซม และการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและชีวเคมี ซึ่งส่งผลต่อการทำหน้าที่ของอสุจิ ดังนั้น protamine จึงเป็นตัวบ่งชี้ความสมบูรณ์ของนิวเคลียสที่ดี เนื่องจาก protamine เป็นโปรตีนที่เข้าไปแทนที่ histone ในช่วงท้ายของการสร้างอสุจิ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสมบูรณ์ของโครมาติน/ดีเอ็นเอกับคุณภาพของอสุจิตามตัวบ่งชี้พื้นฐาน กลุ่มตัวอย่างประกอบด้วยผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา ณ หน่วยผู้มีบุตรยาก รพ. ธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จำนวน 49 ราย น้ำอสุจิที่ได้ถูกนำไปตรวจสอบตามวิธีมาตรฐานทางด้านจำนวนอสุจิ, การเคลื่อนที่ของอสุจิ, และรูปร่างของอสุจิ น้ำอสุจิส่วนที่เหลือถูกนำไปศึกษาการขดของไฮโครมาตินและความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน, การทดสอบด้วย CMA3 และ การทดสอบ TUNNEL ภายหลังการตรวจวิเคราะห์น้ำอสุจิ ผู้ป่วยทั้ง 49 ราย ถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ตามร้อยละของอสุจิที่มีรูปร่างสมบูรณ์ ได้แก่ กลุ่มที่มีอสุจิที่มีรูปร่างสมบูรณ์ > 30%; 14-30%; 4-14% และ < 4% ตามลำดับ จากการศึกษาโครงสร้างแบบละเอียดพบว่า อสุจิจากคู่สมรสที่มีบุตรยากมีรูปร่างหลายแบบทั้งที่มีนิวเคลียสกลมและนิวเคลียสยาวเรียว ภายในนิวเคลียสมีการขดตัวของโครมาตินแบบกระจัดกระจายและมีช่องว่างภายในนิวเคลียสจำนวนมาก ผลการศึกษาการกระจายตัวของโปรตีนในนิวเคลียส พบว่า อสุจิของคู่สมรสที่มีบุตรยาก มีการกระจายของ transition protein เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่มีอสุจิที่มีรูปร่างสมบูรณ์น้อยกว่า 4% ในขณะที่การกระจายของ protamine จะเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่มีอสุจิที่มีรูปร่างสมบูรณ์มากกว่า 4% ข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ถึงความผิดปกติในด้านความสมบูรณ์ของการสร้างอสุจิ เมื่อศึกษาความสัมพันธ์

ระหว่างอุบัติการณ์ของอสุจิที่มีการขดตัวของโครมาตินที่ผิดปกติและตัวบ่งชี้พื้นฐานทางด้านคุณภาพของอสุจิ พบว่า จำนวนอสุจิจะลดลงเป็นลำดับตามร้อยละของอสุจิที่มีรูปร่างสมบูรณ์, 14-30% (149.84 ± 16.58 M/ml), 4-14% (125.54 ± 11.59 M/ml), <4% (78.81 ± 16.09 M/ml), เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีอสุจิที่มีรูปร่างสมบูรณ์มากกว่า 30% (179.88 ± 29.30 M/ml; $P < 0.05$). นอกจากนี้ ยังพบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ของร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่ได้แก่ $57.8\% \pm 6.12$, $48.5\% \pm 4.78$, $43.24\% \pm 3.49$ และ $25.78\% \pm 6.76$ ตามลำดับ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย Spearman พบว่า ร้อยละของอสุจิที่มีรูปร่างสมบูรณ์ มีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนอสุจิ ($r = 0.45$, $P = 0.001$) และการเคลื่อนที่ของอสุจิ ($r = 0.36$, $P = 0.01$). อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่า ร้อยละของอสุจิที่มีภาวะขาด protamine มีความสัมพันธ์ในเชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับจำนวนอสุจิ ($r = -0.33$, $P = 0.009$), การเคลื่อนที่ของอสุจิ ($r = -0.53$, $P = 0.00$) และจำนวนอสุจิที่มีรูปร่างสมบูรณ์ ($r = -0.41$, $P = 0.002$) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้ linear regression พบว่า ร้อยละของอสุจิที่มีดีเอ็นเอผิดปกติ มีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับจำนวนอสุจิ ($r = -0.31$, $P = 0.01$), การเคลื่อนที่ของอสุจิ ($r = -0.46$, $P = 0.00$) และจำนวนอสุจิที่มีรูปร่างสมบูรณ์ ($r = -0.29$, $P = 0.02$). นอกจากนี้ยังพบว่า ผู้ป่วยที่มีอสุจิที่มีรูปร่างสมบูรณ์น้อยกว่า 4% จะมีอสุจิที่มีภาวะขาด protamine และมีอสุจิที่มีดีเอ็นเอผิดปกติสูงขึ้น ในขณะที่มีร้อยละอสุจิที่มีการเคลื่อนที่ปกติลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าร้อยละของอสุจิที่มีภาวะขาด protamine มีความสัมพันธ์กับร้อยละของอสุจิที่มีดีเอ็นเอผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.68$, $P = 0.00$) การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ผู้ป่วยที่มีอสุจิผิดปกติ (จำนวนอสุจิลดลง, การเคลื่อนที่ลดลง, รูปร่างผิดปกติ) จะมีร้อยละของอสุจิที่มีดีเอ็นเอผิดปกติสูงขึ้น ทำให้เกิดภาวะไม่เจริญพันธุ์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอาศัยเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ นอกจากนี้การศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นว่าการตรวจน้ำอสุจิโดยวิธีพื้นฐานไม่ให้ข้อมูลที่เกี่ยวกับการขดตัวของโครมาตินและความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอซึ่งบ่งชี้ถึงการเจริญพันธุ์ของอสุจิ ดังนั้นอาจจำเป็นต้องเพิ่มยุทธวิธีบางอย่าง เพื่อให้การตรวจน้ำอสุจิมีความแม่นยำมากขึ้น

คำสำคัญ ภาวะไม่เจริญพันธุ์เพศชาย, การขดของโครมาติน, ภาวะขาดโปรทามีน, การฉีกขาดของดีเอ็นเอ