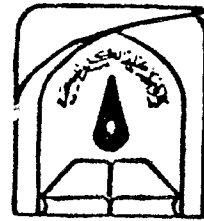
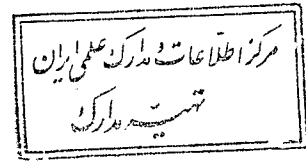


۱۳۷۴ / ۱۲ / ۷



دانشگاه تربیت مدرس

دانشگاه تربیت مدرس  
دانشکده پزشکی

کارشناسی ارشد رشته بافت شناسی و جنین شناسی

موضوع:

آنالیز منی و تأثیر کافئین بر حرکت اسپرم در افراد استنواسپرمی

استاد راهنما:

جناب آقای دکتر رجبعلی صدر خانلو

استاد مشاور:

جناب آقای دکتر مجتبی رضازاده

تحقیق و نگارش:

فرح فرخی

سال تحصیلی بهار ۱۳۷۴

تقدیم به:

لاله‌های سرخ شهادت ، آنان که در سیاهی  
شب به پیشواز صبح رفتند و نوید قربت صبح  
را عاشقانه سرودند و تفسیر حیات را با خود  
نگاشتند تا عبرت آیندگان گردد.

وتقدیم به همهٔ آنانی که به من آموختند.

### با تشکر و قدردانی از:

- جناب آقای دکتر صدر خانلو که راهنمایی این پایان نامه را بعهده داشته‌اند.
- جناب آقای دکتر رضازاده که باراهنمائیهای ارزنده خود در تمام مراحل انجام تحقیق مرا یاری نمودند.
- آزمایشگاه پاتولوژی دکتر قوام - دکتر انصاری در ارومیه که در امر آزمایشات صمیمانه یاریم کردند.
- آقای ولی زاده ، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه در تهیه محیط - و با تشکر از همه دوستان که هر یک به نحوی در این پروژه مرا یاری نمودند.

چکیده

۱ فصل اول : مروری بر مطالعات گذشته

۲ مقدمه

۳ بررسی خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی منی

۹ بررسی خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی اسپرم

۱۲ رابطه تعداد اسپرم و میزان باروری آن

۱۳ رابطه مورفولوژی اسپرم و میزان باروری

۱۴ رابطه حرکت اسپرم و میزان باروری

۱۵ مکانیسم حرکت اسپرم

۱۷ منبع انرژی حرکتی اسپرم

۱۸ عوامل مؤثر بر حرکت اسپرم

۲۳ اثر متیل گزانتین ها بر حرکت اسپرم

۲۴ مکانیسم عمل کافئین

۳۰ هدف از تحقیق

۳۱ فصل دوم : مواد و روشها

۳۲ آزمایشات مقدماتی و مشاهدات ماکروسکوپی

۳۳ آزمایشات میکروسکوپی

۳۳ مطالعه حرکت اسپرم

۳۴ مطالعه تعداد اسپرم

صفحه	عنوان
۳۵	مطالعه مورفولوژیکی اسپرم
۳۶	مواد لازم برای رنگ آمیزی
۳۶	روش رنگ آمیزی گرم
۳۷	روش رنگ آمیزی H.E
۳۹	روش رنگ آمیزی گیمسا
۴۰	روش تهیه محیط کشت اسپرم
۴۳	<b>فصل سوم: مشاهدات و نتایج</b>
۴۵	اثر کافتین بر تعداد اسپرم مرده
۴۷	اثر کافتین بر تعداد اسپرم زنده
۴۹	اثر کافتین بر حرکت پیش رونده اسپرم
۵۰	اثر کافتین بر حرکت آرام اسپرم
۵۲	<b>فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری</b>
۵۷	نتیجه بحث
۵۸	پیشنهادات
۵۹	خلاصه به زبان انگلیسی
۶۰	منابع و مأخذ

### چکیده:

آنالیز منی مطالعه و تشخیص علل ناباروری را در مردان امکان پذیر می سازد. در پروژه حاضر با مطالعه ۱۴۸ بیمار، ۲۰ مورد استنواسپرمی مشاهده گردید. محققین برای معالجه افراد استنواسپرمی مشتقات متیل گزانتین‌ها را در محیط آزمایشگاه توصیه نموده‌اند. از جمله Gabery و همکارانش در سال ۱۹۷۱ با افزودن کافئین بر روی منی تأثیر مثبت آن را بر حرکت و ظرفیت باروری اسپرم در محیط آزمایشگاه مشاهده کردند. به تبع آن محققین دیگری از کافئین بصورت محلول با دزهای مختلف در منی منجمد و تازه، استفاده کرده و بهبود چشمگیری را در حرکت اسپرم مشاهده نمودند.

در پروژه حاضر با افزودن کافئین با دوز ۲mmol بر روی اسپرم شسته شده و فاقد مایع منی، تأثیر کافئین در فواصل زمانی ۰/۵-۲-۱۲ و ۲۴ ساعت مطالعه شد. انکوباسیون اسپرم با کافئین بهبود چشمگیری در حرکت اسپرم داشته است. مقایسه گروه کنترل و شاهد نشان می دهد که حرکت اسپرم در محیط آزمایش بخوبی اصلاح شده است زیرا هم درصد اسپرم متحرک و هم سرعت حرکت اسپرم افزایش یافته است و این اختلاف در مقایسه با گروه کنترل معنی دار است ( $P < 0.001$ ) با وجود نتایج مثبت اثر کافئین بر حرکت اسپرم، استفاده درمانی و کلینیکی و بالینی آن به علت تأثیر احتمالی کافئین بر ساختمان فوق ریزینی اسپرم جای بحث و مطالعه بیشتری دارد.

## فصل اول

مروری بر مطالعات گذشته



## مقدمه

یکی از مشکلات موجود در جامعه بشری ناباروری است. سابقاً تصور بر این بود که عامل ناباروری زنان هستند، در حالیکه مطالعات عمیق تر و آزمایشات کلینیکی و بالینی نشان داده اند ۴۰-۵۰٪ نقص فوق مربوط به مردان است، از این رو برای متخصصین زنان و زایمان مهم است که از بابت ناباروری مرد اطلاع داشته باشند علل ناباروری مردان بطور خلاصه بشرح زیر است (Speroff, et.al, 1989).

آنومالیهای کروموزومی (Chromosomal Abnormalities)، بیضه مخفی (Cryptorchidism)، کاهش حجم مایع منی به کمتر از ۱ ml (Decreased semen volume)، داروهای ضد سرطانی (Drugs, anti cancer)، انسداد مجاری (Ductal Obstruction)، بیماریهای اندوکرینی (Endocrine disorders)، نارسایی در انزال (Ejaculatory Disorders)، نارسایی در بلوغ اسپرم (failure of sperm maturation)، واکنشهای ایمنولوژیکی (Immunologic reaction)، افزایش گرما (Increased heat)، افزایش ویسکوزیته منی (Increased viscosity of semen)، عفونت (Infection)، مسائل جنسی (sexual problems) ناهنجاریهای فوق ریزینی (ultrastructural Defects) از جمله فقدان بازوهای دای نئین (Absence of dynein arms)، فقدان آکروزوم (Absence of acrosome)، کاهش میکروتوبولهای محیطی (Decreased microtubules) و اتساع وریدهای طناب اسپرماتیک (Varicocele). با توجه به موارد فوق مشاهده می شود درصد قابل توجهی از ناباروری بعلت تغییر کیفیت منی است بنابراین آنالیز آن برای آندرولوژیست ها که مراحل تولید مثل افراد مذکر را مطالعه می کنند ضروری و حائز اهمیت است. اگر چه امروزه محور بیشتر

تحقیقات به کنترل هورمونی بر روی اسپرما توژنزواستروئیدوز متوجه است؛ ولی بررسی پارامترهای ظاهری منی مثل تعداد، حرکت و مورفولوژی اسپرم در تقسیم بندی علل باروری مرد از اهمیت خاصی برخوردار است. از آنجا که قابلیت باروری اسپرم ایزوله شده انسان در همان موقع مشاهده میکروسکوپی قابل پیش بینی نیست، لذا تکیه بر احتمالات آنالیزی در تأیید هدف فوق ضروری است.

آنالیز منی نه تنها اطلاعات با ارزشی در مورد کمیت و کیفیت اسپرم میدهد بلکه نقش مرموز غدد جنسی را هم مشخص می کند. درک عمیق تر فیزیولوژی و پاتوفیزیولوژی سیستم ژنیتال مرد امکان تشخیص بهتر نارسایی و درمان آنرا فراهم می کند. اطلاعات مادر مورد فاکتورهای تنظیم کننده باروری مرد محدود به حوادث پیچیده ای است که منتهی به اسپرم بارور می شود (Eliasson, 1981).

### بررسی خصوصیات بیوشیمیائی و مورفولوژیکی منی

Semen انسان ترکیب بیولوژیکی مایعی است که شامل مایع منی، اسپرم و دیگر ذرات ریز است. مایع منی در حین خروج اسپرم از اپیدیدیم و مجرای دفران، با ترشحات غدد ضمیمه جنسی به ترتیب مشخص مخلوط می شود. ابتدا ترشحات غدد لیتروکوپر بیرون می ریزند. سپس مایعات از آمپول و اپیدیدیم که غلظت بالایی از اسپرم دارند ترشح می گردند. سرانجام قسمت اعظم مایع منی که از وزیکول سمینال منشاء می گیرد و ۶۵-۶۰٪ مایع را تشکیل می دهد؛ با دیگر ترکیبات مخلوط می شود و در نهایت ترشحات پروستات که ۳۰٪ مایع منی را تشکیل میدهد به مخلوط فوق اضافه می گردد. اگر چه قسمت اعظم منی را مایع تشکیل می دهد ولی نقش فیزیولوژیکی آن هنوز کاملاً واضح نیست و تنها بخشی از مایع منی اپیدیدیم، محرک حرکتی اسپرم موجود در اپیدیدیم بوده که معمولاً حرکت پیش رونده ای نیست (Lindholmer, 1974). از آنجا که اسپرم شسته شده قابلیت لقاح و باروری را در *invivo* و *invitro* دارد، پس مایع منی نقش مهمی در لقاح ندارد و تنها نقش آن در انتقال اسپرم در طول سیستم تناسلی مذکر بوده و

ضمناً محیط بافری و اسمولاریته مناسبی را برای اسپرم فراهم می‌کنند (Siegel et al, 1984). منی بلافاصله بعد از انزال بشکل ژله‌ای و منعقد شده در می‌آید که در مطالعه میکروسکوپی بصورت شبکه‌ای از رشته‌های باریک (به ضخامت  $0.15 \mu\text{m}$ ) است که حرکت اسپرم را محدود می‌کند (Zaneveld et al, 1991).

عامل انعقاد، ترکیبات موجود در ترشحات کیسه منی (سمینال وزیکول) است. بعد از ۳۰-۲۰ دقیقه لخته منعقد شده مایع می‌شود. مایع شدن در *invivo* و *in vitro* انجام می‌گیرد ولی سرعت انجام آن در بدن بیشتر از محیط آزمایشگاه است. عامل مایع شدن از ترکیبات مترشحه پروستات است (Amelar, 1962).

pH مایع منی هم از پارامترهای قابل مطالعه است که در آنالیز Semen اهمیت دارد. مقدار نرمال آن  $7.2-7.8$  است که یک pH آلكالینی است. اگر چه ترشحات پروستات اسیدی و ترشحات کیسه منی قلیائی است؛ ولی در مجموع ترکیب مایع منی قلیائی است. مواد موجود در ترشحات پروستات عبارتند از: اسید فسفاتاز، مورامیداز، اسید سیتریک، امینوترانسفراز، دهیدروکسیداز، روی و منیزیم. آنزیمهای پروتئولیتیک، منی منعقد شده را به مایع تبدیل می‌کنند. علاوه بر ترکیبات فوق آنزیمهای دیگری هم در منی گزارش نموده‌اند از جمله آلفا آمیلاز (آنزیم هیدرولیز کننده کربوهیدرات) Alevaire (عامل موکولیتیک)، Sputolysin (عامل کاهنده دی سولفید) (Siegel et al, 1984).

عامل منعقد شدن منی ترکیبات موجود در کیسه منی است. فروکتوز و پروستاگلاندین‌ها عمده ترشحات کیسه منی را تشکیل می‌دهند. مقایسه لخته خونی و منی نشان داده است که بعضی از ترکیبات موجود در لخته خونی، در منی هم مشاهده شده است؛ از جمله ترومبولاستین و ماده‌ای شبیه فیبرین. ولی فاکتورهای دیگر انعقاد خون مثل فاکتور XII، پروترومبین و فیبرینوژن در منی وجود ندارد (Siegel et al, 1984).

اگر چه مکانیسم انعقاد کاملاً واضح نیست ولی پروتئین‌های بازی ویژه از طریق پلهای دی سولفید کمپکس‌هایی را تشکیل می‌دهند. پروتئین‌های مشابه و یا حتی متفاوت در حضور یونهای

فلزی و فروکتوز کمپلکس‌هایی را ایجاد می‌کنند که ظاهراً با پروتئین‌های دیگر واکنش نشان می‌دهند. از نظر تئوری، لخته در حقیقت ماتریکسی از پروتئین‌های جدا از هم است که توسط پیوندهای یونی، هیدروفوبیک یا کووالانت بهم دیگر مرتبط شده و لخته متراکمی را تولید می‌کنند. سه ماده اصلی انعقاد که در منی منعقد شده وجود دارد عبارتند از: ۱- گلیکوپروتئین بازی با وزن مولکولی ۵۲/۰۰۰، ۸۰/۰۰۰، ۸۲/۰۰۰ دالتون ۲- گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۷۲/۰۰۰، ۵۵/۰۰۰ دالتون که دارای اسید سیالیک بوده و ترکیبات یون دار فلزی را پلیمریزه می‌کند. ایندوپروتئین با بازوهای دی سولفید بهم‌دیگر ارتباط دارند (Siegel et al, 1984).

۳- فروکتوز که در طول انعقاد ممکن است با پروتئین‌های وزیکولر کمپلکس‌هایی ایجاد کند و ضمن مایع شدن، پیوند شکسته شود.

عامل مایع شدن هضم پروتئین‌های ساختمانی ماتریکس توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک است و مایع شدن در سه مرحله صورت می‌گیرد:

۱- اولین فاز شامل هضم ماتریکس ژلاتینی است که توسط آنزیم پروتئیناز شبیه کلاژناز صورت می‌گیرد.

۲- در دومین فاز، آنزیم *seminin* پروتئیناز، پروتئین‌ها را به پپتید تبدیل می‌کند که در pH کمتر از ۴ اثر می‌کند.

۳- در مرحله آخر پپتیدها به اسیدهای آمینه تجزیه می‌شوند (Siegel et al, 1984). منی نرمال در مدت ۳۰-۲۰ دقیقه بعد از انزال مجدداً مایع می‌شود بعضی نمونه‌ها در مدت ۱-۲ ساعت بعد از انزال مایع می‌شوند. در آنالیز منی این موارد ثبت می‌شود. چون در منی منعقد شده، حرکت اسپرم کمتر بوده و در نتیجه ظرفیت (Capacity) باروری و لقاح هم کمتر خواهد بود (Amelar, 1962).

یکی دیگر از فاکتورهای تعیین‌کننده در باروری مرد، حجم منی است. حجم نرمال ۱-۶ ml است، اگر حجم کمتر از ۱ ml باشد این حالت را *hypospermic* و اگر بیش از ۶ ml باشد *hyperspermic* و اگر فاقد منی باشد و یا منی تولید نشود *Aspermic* می‌گویند.

(Zaneveld et al, 1973).

در حجم کمتر معمولاً" تعداد اسپرم کمتر است و عامل آن ممکن است انسداد مجاری انزالی یا عفونت در غدد ضمیمه باشد. حجم زیاد هم معمولاً اسپرم کمتر دارد. عوامل مختلف موجب تغییر کیفیت منی و در نتیجه ناباروری می شوند از جمله :

(۱) زخم یا عمل جراحی در بیضه ها و یا بیماریهای مقاربتی

(۲) گرما، با افزایش درجه حرارت اسکروتال ، اسپرماتوژنز کاهش خواهد یافت. مثلاً بعضی از بیماریها که موجب افزایش درجه حرارت بدن می شود که اثرات بیماری ۳-۲ ماه بعد دیده می شود در اینصورت تعداد و سرعت حرکت اسپرم تغییر خواهد کرد و بر عکس خنک کردن Testis یکی از راههای درمان ناباروری است.

۳- واکنشهای آلرژیک شدید با اثرات سیستمیک

۴- تشعشعات

۵- استفاده از داروهای مخصوص از جمله داروهای ضد سرطان

۶- الکل، سیگار و کار سخت همگی بر ماهیت منی تأثیر می گذارند. نیکوتین کمیت و کیفیت اسپرماتوژنز را مهار و حرکت اسپرم را کاهش می دهد.

۷- دی اتیل استیل بسترول

این عوامل موجب تغییر در کیفیت منی از قبیل افزایش ویسکوزیته آن ، افزایش تعداد گلبولهای سفید (W.B.C) بعلت وجود عفونت، آگلوتینه شده اسپرمها در بیماری اتوایمیون و یا مایع نشدن منی می شوند (Speroff et al, 1989).

بطور طبیعی در مایع منی موادی با وزن مولکولی کم وجود دارند، مثل یونها، کربوهیدراتها، امینواسیدها، نوکلئوتیدهای حلقوی، اسیدهای آلی و ترکیباتی مثل ویتامینها. اسمولاریته مایع منی بمقدار زیادی به وجود ترکیبات آلی و کمی هم به ترکیبات معدنی بستگی دارد (Polakoski, 1976). پروتئینهای مایع منی حدود ۳۵-۵۵mg/ml است که از بیش از ۲۰۰ پروتئین تشکیل شده است. تعداد زیادی از این پروتئین ها که غیر آنزیمی اند، از کیسه منی ترشح می شوند.

تعدادی از پروتئین‌های موجود در سرم خون هم معمولاً در مایع منی هستند از جمله: آلبومین، پری آلبومین - آلفا - بتا و گاما گلوبولین، بتامیکروگلوبولین IGM، IGA، IGE، IGg و  $\alpha_1$  آنتی پروتئیناز،  $\alpha_1$  آنتی کموترپسین،  $\alpha_1$  گلیکوپروتئین و مقداری هورمونهای پروتئینی متصل به استروئیدها، Lewis و آنتی ژنهای خونی ABO (Polakoski, 1976). قابل توجه است که تراکم پروتئین‌های مایع منی خیلی کمتر از پروتئین‌های خونی است، علاوه همه پروتئین‌های موجود در خون در منی وجود ندارد. از جمله آنتی ترومبین III، کمپلمان C<sub>3</sub>، غیر فعال کننده CIs، فاکتور VIII، پلاسمینوژن و فیبرینوژن. تعدادی از هورمونهای پروتئینی فعال کننده سیستم ایمنی در منی انسان کشف شده‌اند از جمله FSH، گلوکاکن، هورمون رشد (GH)، HCG، انسولین، LH، پلی پپتید پانکراتیک، پرولاکتین، ریلکسین، سوماتومدین، TRH، لاکتوژن جفتی،  $\beta$  گلیکوپروتئین حاملگی، پروتئین جفتی 5 و 12 (Siegel et al, 1984). در منی هم چنین پروتئین‌های خاصی است که در سرم خون نیست از جمله آنتی آگلوتین، هماگلوتین، شبه لکتین فاکتور دکا پاسیته شدن، پروتئینی بنام  $\beta$  که از اپیدیدیم منشاء دارد، و حداقل سه مهار کننده آکروزین با وزن مولکولی پائین که در منی و یا غدد مختلف سیستم تولید مثلی ایجاد شده‌اند (Hardy and Garbers, 1993). این پروتئین‌ها نقش‌های فیزیولوژیکی متفاوتی دارند. تعدادی از آنها آنتی ژنهای اسپرم را می پوشانند (Coating) از جمله لاکتوفرین (Herman et al, 1969). و یا مثل ریلکسین، حرکت اسپرم را تحریک و نفوذ آنرا به موکوس سرویکس تسریع می کند. تعدادی دیگر از پروتئین‌ها نقش آنزیمی دارند؛ مثل اسید فسفاتاز، کراتین فسفو کیناز، گاما گلو تامیل ترانسفراز، دی پپتیداز، آمینو پپتیداز، پپسینوژن، گلیکوزیداز، لیپاز، نوکلئاز، فسفولیپاز و پروتئیناز که در مایع شدن مجدد لخته منی اولین نقش را ایفا می کند (Siegel et al, 1984).

در مایع منی هم چنین لیپیدهای ساختمانی و فونکسیونری وجود دارد که تعدادی از آنها از غدد ضمیمه و دستگاه تولید مثلی مشتق می شوند و تعدادی دیگر از متابولیسم غشاهای اسپرم تولید می شوند؛ و بقیه منبع اندوکرینی داشته که به دستگاه تولید مثل منتقل شده‌اند از جمله فسفولیپیدها، پروستاگلاندین‌ها، استروئیدها، تری گلیسریدها و اسیدهای چرب اشباع

(White et al, 1976). عمده‌ترین لیپیدهای منی، فسفولیپیدها هستند که تعدادی از آنها عبارتند از: اسفنگومیلین ۴۴٪، فسفاتید اتانل آمین ۱۲/۳٪، فسفاتیدیل سرین ۱۱/۲٪، فسفاتیدیل کولین، کولین پلاسماالوزن، فسفاتیدیل اینوزیتول و کاردیولیپین (Poulos et al, 1961). تعدادی از فسفولیپیدها که از اسپرم جدا شده و در اثر تخریب بیولوژیکی غشاهای فعال ایجاد شده‌اند، احتمالاً منبع تأمین انرژی اسپرم هستند (Aziz et al, 1983). هم چنین به حفظ یکپارچگی غشا اسپرم کمک می‌کنند. پروستاگلاندین‌های مایع منی عمدتاً از کیسه منی مشتق می‌شوند. حداقل ۱۵ پروستاگلاندین (از PGA تا PGH و مشتقات هیدروکسیله آنها) تاکنون شناسایی شده‌اند. پروستاگلاندین‌ها، محرک غضله صاف و تقویت کننده حرکت اسپرم در سیستم تولید مثلی مؤنث به طرف سلول تخم و لقاح هستند که تعداد آنها با باروری مرد ارتباط دارد (Bygdeman et al, 1970). مواد معدنی موجود در مایع منی با غشاء اسپرم واکنش نشان داده و ضمن حفظ اسمولاریته اسپرم، بعنوان پیامبران ثانویه عمل می‌کنند. این مواد با آنزیمهای مختلف داخل سلول در ارتباط هستند. از تراکم و غلظت یونهای مختلف تک ظرفیتی و دو ظرفیتی (مثل Na، K، Mg، Ca، Zn) و مولکولهای آلی (مثل اوره، اسیداوریک و فروکتوز) در مایع منی بعنوان اندیکاتورهای تعداد و حرکت اسپرم استفاده می‌شود (Arver and Sjobery, 1982). تراکم یونها در مایع منی کمتر از غلظت آنها در خون است ولی غلظت سدیم و کلر بیشتر از خون می‌باشد. سالم بودن فونکلسیونی غدد ضمیمه را می‌توان با تعیین مقدار الکترولیت‌های موجود در منی ارزیابی کرد (Arver and Sjobery, 1982). اسمولاریته مایع منی خیلی بیشتر از مایع پلاسمایی است.

ترکیبات معدنی مایع منی ظاهراً در ابقاء میزان باروری اهمیت دارند. Ca فاکتور کنترل کننده در ظرفیت یافتن (Capacitation) و واکنش آکروزومی هامستر و خوک است، پس بر باروری و لقاح تأثیر می‌گذارد (yanagimachi et al, 1976).

مس، روی و سلنیم در حرکت اسپرم نقش قطعی دارند (Shannon, 1978). این یونها از بافت‌های غدد ضمیمه‌ای مختلف مشتق می‌شوند ولی منبع اصلی آنها خون است. بنظر می‌رسد که