۹۵۹۹

شماره پایان‌نامه ۲۰۴۳

دانشگاه تهران

دانشکده داروسازی

پایان‌نامه

برای دریافت درجه دکتری از دانشگاه تهران

موضوع

اندازه‌گیری مقدار فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز

(LDH) در اسپرم انسانی

براهنمائی

استاد ارجمند جناب آقای دکتر پرویز ریاضی

نگارش

مرکز مدارک علمی
بانک اطلاعاتی
۱۳۳۷

شهرزاد احمدزاده

سال تحصیلی ۳۶-۲۵۳۵

اکنون که بانگارش این رساله علمی زحمـــات چندین سالـــهٔ

والدین واستادان خویش را به ثمر می رسانم باابراز امتنا ن

اززحمات بیدریغ وقدردانی ازکوششی کهدرراه ارشاد مـــن

ابراز داشتهاند این ودیعه رابه حضورعزیز ایشان و تما مـــی

پژوهشگـــران کهدرراه جستجوی دانش اند ،تقدیم میدارم .

۹۵۲۹

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
مقدمه	۱
قسمت اول : بررسی برخی ازکارهای پژوهشی جدید درمتون علمی	
۱ــ بحث درساختمان ملکولی آنزیم LDH وایزوآنزیم های آن	٦
۲ــ ویژگی بیوشیمیائی آنزیم LDH	۸
۳ــ روش های اندازه‌گیری آنزیم LDH	۱۳
٤ــ آنزیم LDH در بیولوژی انسانی وکاربرد اندازه‌گیری آن در پزشکی	۱٦
٥ــ منی یا اسپرم انسانی	۱۹
٦ــ آنزیم LDH در اسپرم انسانی	۲٥
قسمت دوم : کارهای پژوهشی شخصی :	
۱ وسایل آزمایشگاهی مورد نیاز	۳۳
۲ــ نمونه برداری اسپرم انسانی	۳۷
۳ــ آزمایش های فیزیکی	
ــ خواص ظاهری	٤۲

عنوان	صفحه
ـ تعیین حجم اسپرم	٤٣
ـ تعیین PH اسپرم	٤٥
ـ شمارش تعداد اسپرماتوزوئید ها	٤٦
٤ ـ آزمایشهای شیمیائی وبیوشیمیائی	
ـ اندازه‌گیری پروتئین تام پلاسما سمینال انسانی	٥١
ـ اندازه‌گیری مقدار فعالیت آنزیم LDH پلاسما سیمنال انسانی	٥٦
ـ جدول خلاصه مشخصات نمونه های اسپرم انسانی آزمایش شده ویافته های آزمایشگاهی مربوط به آنها	٦٨
تفسیر ونتایج	٧٣
خلاصه	٧٦
خلاصه انگلیسی	٨٠
منابع وماخذ	٨٤

مقـــد مـــــه :

شناخت علمی ویژگیهای اسپرم انسان از نظر بیولوژی انسانی حائز اهمیت است. در اسپرم پلاسما سمینال محیط زندگی اسپرماتوزوئید ها بوده واسپرماتوزوئید ها هستند که حامل صفات ارثی برای انتقال از پدر بفرزند می باشند. در متون علمی کارهای تحقیقاتی متعددی همه ساله در بررسی علمی اسپرم انسان به چاپ رسیده ومی رسد.

برآورد خصوصیات بیوشیمیائی اسپرم وشناخت ماکرومولکول های موجود در پلاسما سمینال ونیز بیولوژی اسپرماتوزوئید ها وبررسی چگونگی حرکت این سلول ها از نظر مکانیزم تولید مثل انسانی ، وشناخت علل عقیمی مردان ضرورت کامل را دارد شیوه های فیزیکی ، شیمیائی وبیوشیمیائی که امروزه در جلوگیری از تولید مثل وآبستنی در انسان متداول است براین دانسته های علمی استوار می باشد . بلحاظ مشکلاتی که در نمونه برداری اسپرم انسانی وجود دارد اغلب کارهای پژوهشی انجام شده در این زمینه که نتایج آنها در انتشارات علمی چاپ شده است روی اسپرم حیوانات می باشد . ویاد راغلب کارهای علمی روی تعداد کمی از نمونه های اسپرم انسانی نتایج آزمایشگاهی ارائه شده است

وهم‌چنین در اغلب موارد اسپرم‌های آزمایش‌شده از افراد مریض نمونه‌برداری گردیده و کمتر نمونه‌های اسپرم انسانی سالم مورد بررسی قرار گرفته است.

از این نظر انجام هر نوع پژوهش علمی در روی نمونه‌های سالم اسپرم انسانی مخصوصاً روی تعداد زیادی نمونه از نظر علمی حائز اهمیت می‌تواند باشد با مطالعه کلیه کارهای پژوهشی که امروزه روی اسپرم انجام می‌گیرد به این نتیجه می رسیم که هنوز خیلی از ویژگیهای سیتوبیوشیمیائی اسپرم انسانی نا ـ شناخته است. چون اسپرماتوزوئید ها سلول هائی هستند زنده، متحرک و هاپلوئید (n کروموزومی) لذا شناخت خصوصیات سیتو بیوشیمیائی این سلولها از لحاظ علم ژنتیک بویژه ژنتیک انسانی بسیار جالب است، چون تغذیه، تحرک و پدیده‌های حیاتی اسپرماتوزوئید ها و نیز قدرت باروری آنها بر اساس واکنش های آنزیمی متعددی است که در درون سلول اسپرماتو ـ زوئید و نیز در خود پلاسما سمینال انجام می‌گیرند لذا بررسی و اندازه‌گیری فعالیت‌های آنزیمی پلاسما سمینال از نظر علمی بسیار مهم می باشد.

بویژه اگر روی تعداد زیادی از اسپرم سالم انسانی کلیه خصوصیات سیتوبیو ـ شیمیائی شناسائی شود و دگرگونی این خصوصیات در نمونه‌های پاتولوژیک

اسپرم انسانی بررسی گردد . این دانسته ها و یافته های آزمایشگاهی — می توانند اساس معیارهای تشخیصی در علوم آزمایشگاهی بوده و در موارد تشخیص بیماری های دستگاه تناسلی مردان ، شناخت علل عقیمی و در برخی موارد در پزشکی قانونی در موارد تجاوز های جنسی و غیره مورد استفاده قرار گیرند .

چون اکنون در کشور ما ایران سیاست عمومی اقتصادی و اجتماعی بر این استوار است که افزایش جمعیت سریع نباشد و برنامه های تنظیم خانواده اجرا میگردد . بدون شك این برنامه ها به پنیاد هائی از پژوهش های علمی — نیاز دارد که شناخت علمی اسپرم انسانی نیز یکی از این زمینه ها می تواند باشد . و از آنجائی که ما اطلاع داریم هنوز در ایران مطالعات علمی مرتبی روی ویژگیهای سیتوبیوشیمیائی اسپرم مردان ایرانی تاکنون انجام نگرفته است .

به اعتبار این مطالب از سال ۲۵۳۰ شاهنشاهی اجرای یك طرح علمی پژوهشی تحت عنوان " شناخت ویژگیهای سیتوبیوشیمیائی اسپرم انسانی در ایران " توسط آقای دکتر پرویز لرزبی دانشیار بیوشیمی در دپارتمان بیوشیمی دانشکده علوم پایه پزشکی دانشگاه تهران شروع شده و ادامه دارد .

پایان نامه دکتری داروسازی اینجانب درمورد اندازه‌گیری فعالیت آنزیم

لاکتات دهید روژناز Lactate Dehydrogenase (LDH)

دراسپرم انسانی جزء کوچکی ازطرح فوق است که‌زیر نظر وبه‌راهنمائی

آقای دکتر اربابی درآزمایشگاه بیوشیمی دانشکده علوم‌پایه پزشکی تعیین

وانجام گرفت . ازآنجائی که فعالیتهای حیاتی (تغذیه وحرکـــــت)

وقدرت باروری اسپرماتوزوئید ها براساس واکنش های بیوشیمیائی اکسیداسیون

غیرهوازی می‌باشد وچون آنزیم LDH باکوآنزیم NAD^+ یکی از آنزیم

های مهم واکنش‌های اکسیداسیون غیرهوازی است ازاین‌نظر شناخت —

فعالیت این آنزیم دراسپرم سالم و دگرگونی فعالیت آن درنمونه های اسپرم

پاتولوژیک ارزش کاربردی درآزمایش های تشخیصی می‌تواند داشته باشد .

ازاینرو بین سیستم‌های آنزیمی متعددکه دراسپرم وجود دارد اندازه گیری

فعالیت آنزیم LDH مورد توجه ما قرارگرفت .

کارهای پژوهشی این موضوع ازمهرماه ۲۵۳٤ شاهنشاهی شروع ودرمدت

۲۲ ماه ادامه ودرمرداد ماه ۲۵۳٦ پایان پذیرفت دراین مدت روی ٦۰

نمونه اسپرم انسانی که همگی ازافراد ایرانی بوده‌اند بررسی به‌عمل آمد . روی

هرنمونه اسپرم ۷ نوع آزمایش فیزیکوبیوشیمیائی یعنی بالغ بر ۴۲۰ مورد آزمایش انجام گرفت که در صفحات بعدی این پایان نامه مطالبی در دو قسمت ارائه میشود . در قسمت اول بعضی از کارهای پژوهشی جدید چاپ شده در منابع علمی مربوط به آنزیم LDH و اسپرم به اختصار اشاره رفته است . در قسمت دوم کارهای شخصی خود را که در آزمایشگاه انجام داده ایم و نتایج وتفسیر مربوط به آنها را ارائه می دهیم .

قسمت اول

بررسی برخی از کارهای پژوهشی جدید

در متون علمی

۱ــ بحث در ساختمان ملکولی آنزیم Lactate Dehydrogenase (LDH) و ایزوآنزیم های آن :

آنزیم لاکتات دهید روژناز دارای وزن ملکولی برابر ۱۳۰۰۰۰ تا ۱۴۵۰۰۰ میباشد ودرآنزیمولوژی این آنزیم بشماره E.C.I.I.I.27 شناخته میشود . این آنزیم شامل دوجزء پلی پپتیدی کوچك تری می باشد که دارای ساختمان و سینیتیك مشابهبوده امایکسان نیستند واین دوشکل به M و H نامگذاری شده اند کهنوع اول دریافت قلب ونوع دوم درماهیچه هافراوان می باشد .

این اجزاءباهم ترکیب شده وه نوع ایزوآنزیم چهارتائی بوجود می آورند کهاین ایزوآنزیمها ملکولها ی فعال آنزیم بوده وایجاد هرکدام تحت کنترل ژن بخصوصی می باشد ، این ایزوآنزیمهاعبارتنداز :

M_4 HM_3 H_2M_2 H_3M H_4

کهM و H منومرها ی این ایزو آنزیم هاهستند واختلاف آنهادربار ــ الکتریکی آنهااست کهاحتمالا " به علت اختلاف درآخرین اسیدآمینه زنجیره منومرهااست .(۱) بنابراین ایزوآنزیم های LDH رامی توان

بوسیله روش الکترو فورز در PH ۷—۹ جدا کرد . در جریان الکتروفورز این ایزوآنزیم ها با سرعت های مختلف به طرف قطب مثبت حرکت کرده و ایجاد باند های منفرد در الکترو فوروگرام می نمایند ، هم چنین می توان بوسیله گرم کردن محلول آنزیمی این ایزوآنزیم ها را از همدیگر جدا نمود . (۲)

اتحادیه بین المللی بیوشیمی (I.U.B)* برای نامگذاری این ایزوآنزیم ها پیشنهاد کرد که ایزوآنزیمی را که در الکتروفورز سریعتر حرکت می کند LDH_1 و ایزوآنزیمی که کندترین حرکت را دارد LDH_5 نامگذاری کنند . البته این نوع نامگذاری بطور وسیعی مورد استفاده قرار می گیرد ، با وجود این در برخی از متون چاپ قدیم تر نامگذاری بدین صورت است که ایزوآنزیمی را که در الکتروفورز سریع حرکت می کند LDH_5 و ایزوآنزیمی را که کند حرکت می کند LDH_1 می نامند . بطور کلی این آنزیم را می توان بر پایه ویژگی ژنیتیکی و یا براساس تعاریف I.U.B نامگذاری نمود .

---

* International Union of Biochemistry (I.U.B)

—*

فهرست ایزوآنزیم های LDH جداشده بوسیله الکترو فورز :

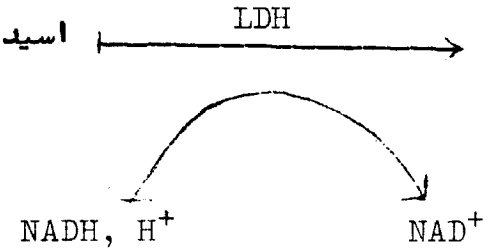
نامگذاری قدیمی U.S.A	نامگذاری ژنتیکی	نامگذاری I.U.B
سریعترین حرکت در الکتروفورز LDH_5	HHHH	LDH_1
4	HHHM	2
3	HHMM	3
2	HMMM	4
کندترین حرکت 1	MMMM	5

تناسب مقدار ایزوآنزیم های مختلف در بافت های مختلف متفاوت است ، بطور یکه در عضله قلب سریعتر از همه بافت ها ایزوآنزیم ایجاد می گردد و فقط دو نوع ایزوآنزیم وجود دارد . اما در عضله چگر و بافت استخوانی از همه نقاط بدن کندتر ایزوآنزیم ایجاد شده و معمولا " ۴ تا ۵ نوع ایزو آنزیم در این بافت ها وجود دارد .

۲ – ویژگی بیوشیمیائی آنزیم LDH :

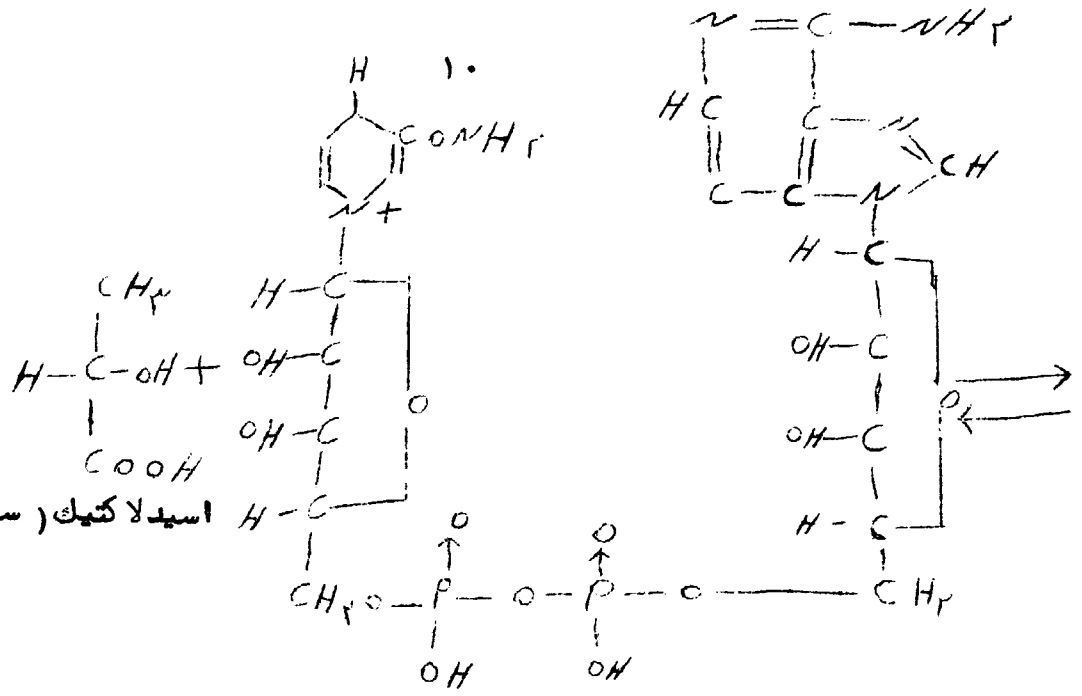
هنگام فقدان یا کمبود اکسیژن از جمله در مرحله غیر هوازی (Anaerobie)

انقباض عضلانی ، اسید پیرویک بکمک آنزیم LDH به اسید لاکتیک مبدل میشود کوآنزیم واکنش $NADH,H^+$ است که از واکنش تبدیل آلدئید گلیسریک ۳ـ فسفات به اسید گلیسریک ۱ـ۳ دی فسفات در راه امبدن میرهوف بدست آمده است. (۱۶)



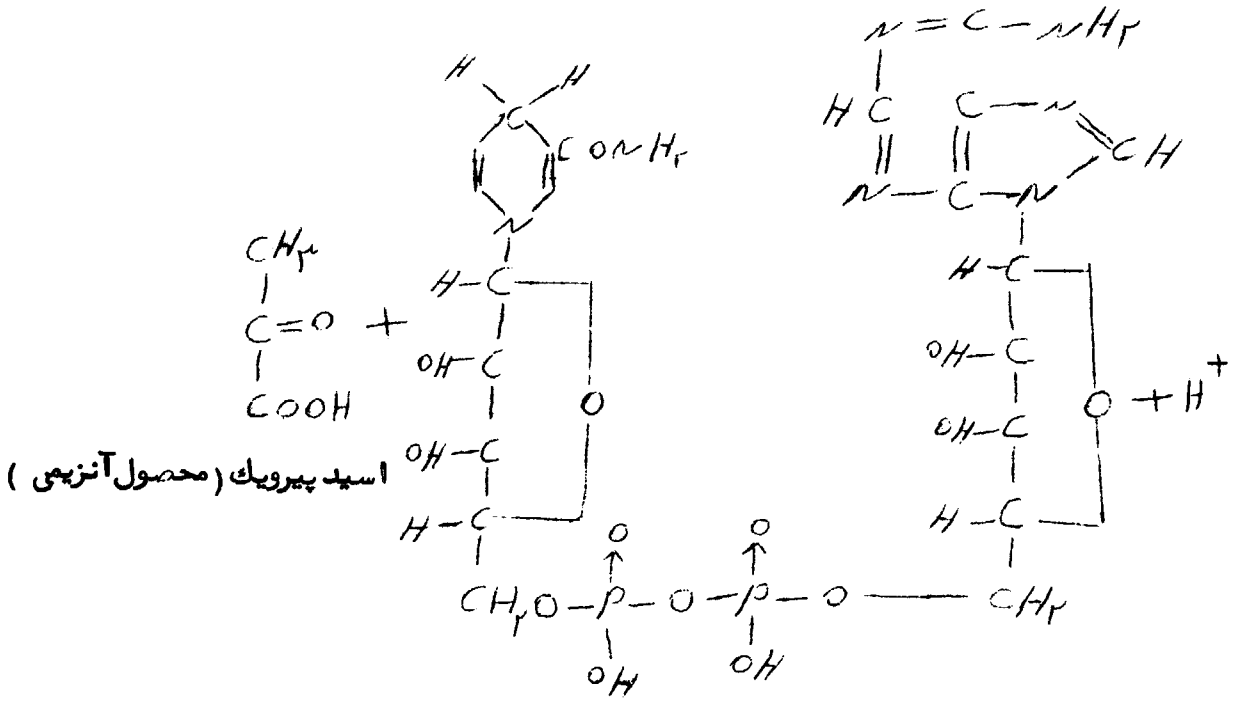
بطورکلی آنزیم لاکتات دهیدروژناز عمل اختصاصی روی لاکتات و پیروات ندارد بلکه واکنش‌های آلفا کتواسید ها و آلفا گامادی کتواسید ها رانیز بطورعمومی کاتالیز می نماید . (۳)

LDH در واکنش صفحه بعد تبدیل اسید لاکتیک را با عمل دهیدروژناسیون به اسید پیرویک وبالعکس کاتالیز می نماید .



اسید لاکتیک (سوپسترا)

(کوآنزیم) نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید اکسیده (NAD^+)



اسید پیرویک (محصول آنزیمی)

(کوآنزیم) نیکوتین‌آمید دی نوکلئوتید احیاشده ($NADH$)