بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای حمید علیزاده نیلی رشته ژنتیک پزشکی رساله دکتری خود را با عنوان " بررسی ارتباط بین آنیوپلوئیدی کروموزومی در اسپرم مردان کم بارور با آسیب DNA و کمبود پروتامین " در تاریخ ۹/۴/۸۸ ارائه کردند. اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پشنهاد می کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر حسین مزدارانی	
۲- استاد مشاور	دکتر اشرف آل یاسین	
۳- استاد ناظر	دکتر فرخنده بهجتی	
۴- استاد ناظر	دکتر مجید صادقی زاده	
۵- استاد ناظر	دکتر منصوره موحدین	
۶- استاد ناظر	دکتر مهرداد نوروزی‌نیا	
۷- استاد ناظر نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر محمد تقی اکبری	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد . ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پا یان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب ، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرح های تحقیقاتی دانشگاه می باشد، باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی- پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه،دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به « دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:
«کتاب حاضر، حاصل رساله دکتری نگارنده در رشته ژنتیک پزشکی است که در سال ۱۳۸۸ در دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر حسین مزداری ، مشاوره سرکار خانم دکتر اشرف آل عباس و جناب آقای دکتر فرانک پلستور از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب حمید علیزاده رضایی دانشجوی رشته ژنتیک پزشکی مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

حمید علیزاده رضایی

۱۳۸۸

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پزشکی

رساله دوره دکتری تخصصی (Ph.D) در رشته ژنتیک پزشکی

عنوان

بررسی ارتباط بین آنیوپلوئیدی کروموزومی در اسپرم مردان کم بارور با آسیب DNA و کمبود پروتامین

نگارش

حمید علیزاده رادی

استاد راهنما

آقای دکتر حسین مزداران

استاد مشاور

Dr. Franck Pellestor

خانم دکتر اشرف آل یاسین

تیر ۱۳۸۸

چکیده

ناباروری با منشأ مردانه، حدود ۵۰ درصد از موارد را به خود اختصاص داده است. انتظار براین است که مردان نابارور با آسیب DNA و ناهنجاری های کروموزومی بیشتر، واجد اسپرمها و متعاقب آن زاده های ناهنجار کروموزومی بیشتر باشند. درجات متفاوتی از فراوانی آسیب DNA و آنیوپلوئیدی، توسط روشهای مختلف مطالعاتی در افراد نابارور در مقایسه با افراد نرمال گزارش شده است. اما تا کنون هیچ گزارشی مبنی بر استفاده از تکنیک PRINS وجود ندارد. جهت مقایسه میزان آسیب DNA اسپرم با میزان کمبود پروتامین، در اسپرم مردان بارور و نابارور، تعداد ۳۰ نمونه از مایع منی از سه گروه الیگوزواسپرم، استنوزواسپرم و الیگواستنوزواسپرم (طبق معیار WHO)، به همراه ۱۴ نمونه از افراد نرمال مراجعه کننده به بیمارستان شریعتی، اخذ و مورد بررسی قرار گرفت. آسیب DNA، توسط تکنیک کامت قلیایی و کمبود پروتامین، با روش رنگ آمیزی کروموماسین A3 (CMA3) سنجیده شد. با استفاده از تکنیک PRINS و پراب‌های اختصاصی کروموزومهای X،Y،۱۸و۲۱، میزان دیزومی کروموزومی را به عنوان شاخص آنیوپلوئیدی، در چهار گروه اندازه گیری شد.

نتایج حاکی از تفاوت معنی دار در میزان آسیب DNA اسپرم در سه گروه نابارور در مقایسه با گروه نرمال است($P<۰/۰۱$).شدت این آسیب ها در افراد الیگواستنوزواسپرم سطح بالاتری نسبت به دو گروه الیگوزواسپرم و استنوزواسپرم نشان می دهد. اسپرمهای +CMA3 (کمبود پروتامین) نیز در سه گروه نابارور میزان بالاتری نسبت به افراد نرمال نشان داده است.شدت این کمبود پروتامین در گروه الیگواستنوزواسپرم‌بالاترین میزان را نشان میدهد($P<۰/۰۱$). میانگین فراوانی های دیزومی در چهار گروه نرمال، الیگوزواسپرم، استنوزواسپرم والیگواستنوزواسپرم در مورد دیزومی کروموزم۱۸، به ترتیب ۰/۰۶۷، ۰/۱۱۷، ۰/۰۶۸و۰/۲۵۱ درصد، در مورد دیزومی کروموزم۲۱، به ترتیب۰/۲۳۱، ۰/۳۳۱، ۰/۲۶۱و ۰/۴۴۵ درصد، در مورد دیزومی کروموزمX، به ترتیب ۰/۰۶۶، ۰/۱۲۶، ۰/۰۷۳و۰/۱۵۲ درصد، در مورد دیزومی کروموزمY، به ترتیب ۰/۰۵۸، ۰/۰۷۶، ۰/۰۵۹و ۰/۱۲۷ درصد، در مورد دیزومی کروموزمXY، به ترتیب ۰/۱۸۴، ۰/۳۲، ۰/۲۰۴ و۰/۶۳۸ درصد بوده است . این نتایج نشان می دهد که مردان الیگوزواسپرم و الیگواستنوزواسپرم در مقایسه با گروه نرمال و استنوزواسپرم میزان بالاتری از خطر ناهنجاری های کروموزمی در اسپرمشان (مخصوصاً کروموزم های جنسی) وجود دارد. یافته ها نشان داده است که روش PRINS علاوه بر قابل اعتماد بودن آن همانند روش FISH، سریعتر و ارزان تر می باشد.

لغات کلیدی: PRINS، اسپرم، دیزومی کروموزمی، الیگوزواسپرم، استنوزواسپرم، الیگواستنوزواسپرم،CMA3، کامت، پروتامین و آسیب DNA

فهرست مطالب:

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده

۱-۱. ناباروری و تعریف آن ۱
۱-۲. اپیدمیولوژی ۱
۱-۳. فاکتورهای تشخیصی ۳
۱-۴. مسائلی که بایستی جهت تشخیص مد نظر قرار داد ۳
۱-۵. بررسی و آنالیز مایع منی ۴
۱-۶. آسیب DNA در اسپرم ۵
۱-۶-۱. DNA اسپرم انسان و ساختار کروماتینی آن ۵
۱-۶-۲. یکپارچگی و آسیب DNA در اسپرم ۷
۱-۶-۳. اتیولوژی آسیب DNA در اسپرم ۸
۱-۶-۳-۱. کمبود پروتامین ۹
۱-۶-۳-۲. آپوپتوز ۹
۱-۶-۳-۳. دارو، شیمی درمانی و رادیوتراپی ۱۰
۱-۶-۳-۴. عوامل فعال اکسیژن (ROS) ۱۱
۱-۶-۳-۵. استعمال دخانیات و سموم محیطی ۱۲
۱-۶-۳-۶. عوامل بعد از تولید اسپرم ۱۳
۱-۶-۳-۷. واریکوسل ۱۳
۱-۶-۳-۸. سن ۱۳
۱-۶-۴. روشهای بررسی میزان یکپارچگی DNA اسپرم ۱۴
۱-۶-۴-۱. روشهای غیر مستقیم ۱۴
۱-۶-۴-۲. روشهای مستقیم ۱۵
۱-۶-۴-۲-۱. تاریخچه کامت ۱۷
۱-۶-۴-۲-۲. متدولوژی آزمون کامت ۱۹
۱-۶-۴-۲-۳. ارزیابی نتایج در آزمون کامت ۱۹
۱-۶-۴-۲-۴. آسیبهای قابل تشخیص توسط آزمون کامت ۲۰
۱-۶-۴-۲-۵. کاربردهای آزمون کامت ۲۱
۱-۶-۴-۲-۶. مطالعات انجام شده بر روی اسپرم با روش کامت ۲۱
۱-۷. بلوغ هسته اسپرم ۲۵
۱-۷-۱. پروتامین ۲۵
۱-۷-۲. ساختار پروتامین و عملکرد آن ۲۶
۱-۷-۳. سازماندهی ژنومی و نسخه برداری اززنهای پروتامین ۲۶
۱-۷-۴. سنتز پروتامین ها ۲۷
۱-۷-۵. مرحله گذار از نوکلوهیستون به نوکلوپروتامین ۲۸
۱-۷-۶. نقش اپی دیدیم در پایداری کروماتین اسپرم ۳۱
۱-۷-۷. روش های بررسی بلوغ هسته اسپرم و مطالعات بر پایه آن ۳۲
۱-۷-۷-۱. روش مستقیم ۳۲
۱-۷-۷-۲. روش های غیر مستقیم ۳۴

۱-۸. کمبود پروتامین و آسیب DNA اسپرم ۳۶
۱-۹. آنیوپلو ئیدی کروموزومی در اسپرم ۳۷
۱-۹-۱. مردان نابارور با پارامترهای غیرطبیعی مایع منی ۳۷
۱-۹-۱-۱. ارتباط آنیوپلوئیدی و مورفولوژی اسپرم ۳۸
۱-۹-۱-۲. ارتباط آنیوپلوئیدی و تحرک اسپرم ۳۹
۱-۹-۱-۳. ارتباط آنیوپلوئیدی و غلظت اسپرم ۳۹
۱-۹-۲. مردان نابارور با پارامترهای طبیعی مایع منی ۴۰
۱-۹-۳. روشهای بررسی ناهنجاری کروموزومی اسپرم ۴۱
۱-۹-۴. PRINS ۴۲
۱-۹-۴-۱. کاربردهای تکنیک PRINS ۴۴
۱-۹-۴-۲. مطالعات انجام شده بر روی اسپرم توسط تکنیک PRINS ۴۵
۱-۱۰. اهداف و فرضیات ۴۶

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱. نمونه گیری ۴۷
۲-۱-۱. مواد و وسایل مورد نیاز ۴۷
۲-۱-۲. تهیه وآماده سازی محیط کشت ۴۸
۲-۱-۳. دسته بندی نمونه ها ۴۸
۲-۱-۴. آماده سازی و شستشوی نمونه ها ۴۹
۲-۲. آزمون کامت قلیایی ۴۹
۲-۲-۱. مواد و وسایل مورد نیاز ۴۹
۲-۲-۲. ساختن محلولها ۵۰
۲-۲-۲-۱. Phosphate Buffered Saline (PBS) ۵۰
۲-۲-۲-۲. ژل های آگاروز ۵۰
۲-۲-۲-۳. محلول لیز (Lysing Solution) ۵۰
۲-۲-۲-۴. بافر الکتروفورز ۵۱
۲-۲-۲-۵. بافر خنثی کننده ۵۱
۲-۲-۲-۶. محلول رنگ آمیزی ۵۱
۲-۲-۳. تهیه ژل ۵۱
۲-۲-۴. آماده سازی اسلایدها ۵۱
۲-۲-۵. تهیه اسلاید ۵۲
۲-۲-۶. لیز کردن سلولها ۵۲
۲-۲-۷. تیمار قلیایی ۵۲
۲-۲-۸. الکتروفورز ۵۳
۲-۲-۹. خنثی سازی و تثبیت ۵۳
۲-۲-۱۰. رنگ آمیزی ۵۳
۲-۲-۱۱. بررسی میکروسکوپی و ارزیابی نتایج ۵۴
۲-۲-۱۲. رنگ شویی، نگهداری و بررسی مجدد اسلایدها ۵۴
۲-۳. آزمون رنگ آمیزی کروموماپسین A3 (CMA3 Staining) ۵۵

۲-۳-۱. مواد و وسایل مورد نیاز ۵۵
۲-۳-۲. ساخت محلولها ۵۵
۲-۳-۳. رنگ آمیزی کروموماپسین A3 ۵۵
۲-۳-۴. بررسی میکروسکوپی و ارزیابی نتایج ۵۶
۲-۴. آزمون بررسی آنیوپلوئیدی توسط FISH دو رنگ ۵۶
۲-۴-۱. مواد و وسایل مورد نیاز ۵۶
۲-۴-۲. تهیه اسلاید ۵۶
۲-۴-۳. Pre-denaturation ۵۷
۲-۴-۴. Denaturation ۵۷
۲-۴-۵. هیبریداسیون ۵۷
۲-۴-۶. شستشوی بعد از هیبریداسیون ۵۸
۲-۴-۷. بررسی میکروسکوپی و ارزیابی نتایج ۵۸
۲-۵. آزمون بررسی آنیوپلوئیدی توسط PRINS دو رنگ ۵۸
۲-۵-۱. مواد و وسایل مورد نیاز ۵۸
۲-۵-۲. آماده سازی اسلاید ۵۹
۲-۵-۳. تهیه پرایمر ۶۰
۲-۵-۳. واکنش PRINS دو رنگ ۶۰
۲-۵-۴. بررسی میکروسکوپی و ارزیابی نتایج ۶۱
۲-۶. آنالیز آماری ۶۱

فصل سوم: نتایج
۳-۱. نتایج آزمون های بررسی آسیب DNA وکمبود پروتامین ۶۲
۳-۲. نتایج بررسی آزمون های بررسی آنیوپلوئیدی اسپرم ۶۷

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری ۷۶
فصل پنجم: فهرست منابع ۸۵
چکیده انگلیسی ۹۷

فهرست تصاویر:

شکل۱-۱: تفاوت فشرده سازی DNA در سلولهای سوماتیک و اسپرم ۶
شکل۱-۲: ساختار کلی یک اسپرم و نواحی غنی از پروتامین و هیستون ۷
شکل۱-۳: آپوپتوز و آسیب DNA در اسپرم ۱۰
شکل۱-۴: عوامل ایجاد کننده آسیب به اسپرم با واسطه استرسهای اکسیداتیو ۱۲
شکل۱-۵: نگاه اجمالی به روش کامت ۱۷
شکل۱-۶: ساختمان ژنی خانواده پروتامین و مراحل نسخه برداری و بعد از آن (A) و ساختار پروتینی ژنی گروه های پروتامین (B) ۲۸

شکل۱-۷: طرح شماتیک از تغییرات اساسی کروماتین در طی مرحله گذار از نکلوهیستون ها به نکلوپروتامین ها در اسپرماتوژنز و ناپدید شدن نکلوپروتامین ها و قرارگیری مجدد نکلوهیستون ها متعاقب لقاح.....۳۰
شکل۱-۸: اساس واکنش multicolor –PRINS.....۴۳
شکل ۳-۱: فراوانی کامتها (۴،۳،۲،۱،۰)در اسپرم مردان Subfertile. میزان فراوانی کامت صفر با افزایش آسیب DNA کاهش می یابد و بالعکس میزان فراوانی کامت های ۴،۳،۲،۱ افزایش نشان می دهد.....۶۳
شکل ۳-۲. درصد فراوانی آسیب DNA در چهارگروه.....۶۴
شکل ۳-۳: درصد فراوانی اسپرمهای +CMA3 در چهارگروه.....۶۴
شکل ۳-۴: نمودار ارتباط معنی دار کمبود پروتامین با آسیب DNA و غلظت اسپرم درکل افراد.....۶۵
شکل ۳-۵: نمودار ارتباط بین کمبود پروتامین با سن و دوره ناباروری در کل افراد.....۶۶
شکل۳-۶: درصد فراوانی دیزومی های کروموزمهای Y،X و XY در چهار گروه مورد مطالعه.....۶۸
شکل۳-۷: درصد فراوانی دیزومی های کروموزمهای ۱۸و ۲۱ در چهار گروه مورد مطالعه.....۶۹
شکل۳-۸: نمودار ارتباط بین آسیب DNA و فراوانی دیزومی کروموزوم ۱۸ در کل افراد.....۶۹
شکل۳-۹: نمودار ارتباط بین آسیب DNA و فراوانی دیزومی کروموزوم ۲۱ در کل افراد.....۶۹
شکل۳-۱۰: نمودار ارتباط بین آسیب DNA و فراوانی دیزومی کروموزوم X در کل افراد.....۷۰
شکل۳-۱۱: نمودار ارتباط بین آسیب DNA و فراوانی دیزومی کروموزوم Y در کل افراد.....۷۰
شکل۳-۱۲: نمودار ارتباط بین آسیب DNA و فراوانی دیزومی کروموزوم های X-Y در کل افراد.....۷۰
شکل۳-۱۳: انواع مختلف کامت های اسپرم(comet 0-4) مشاهده شده با میکروسکپ اپی فلورسنت.....۷۲
شکل۳-۱۴:رنگ آمیزی کروماتین A3. اسپرم های با رنگ روشن CMA3+ واسپرم های بی رنگ CMA3- می باشند.....۷۳
شکل۳-۱۵: رنگ آمیزی FISH دو رنگ. رنگ سبز کروموزوم Y و رنگ قرمز کروموزوم X می باشد.(بزرگنمایی ۴۰۰).....۷۴
شکل۳-۱۶: رنگ آمیزی PRINS دو رنگ. رنگ سبز کروموزوم Y و رنگ قرمز کروموزوم X می باشد.(بزرگنمایی ۴۰۰).....۷۵

فهرست جداول:

جدول۱-۱: اتیولوژی و درصد توزیع علل ناباروری مردان(بررسی شده در ۷۰۵۷ مرد نابارور)..... ۲
جدول۱-۲: شاخص های استاندارد سازمان بهداشت جهانی(WHO,1999) در مورد مایع منی در فرد نرمال..... ۴
جدول۱-۳: اصطلاحات بکار رفته در آنالیز مایع منی(WHO)..... ۴
جدول۱-۴: تعدادی از داروها که در روند باروری مردان اختلال ایجاد می‌کنند..... ۱۱
جدول۱-۵: تکنیکهای بررسی آسیب های DNA (DNA Integrity) و بلوغ کروماتین اسپرم..... ۱۴
جدول۱-۶: نکلوپروتئین های موجود در هسته اسپرم پستانداران در طی مراحل مختلف اسپرماتوژنز..... ۲۹
جدول۲-۱: توالی و دمای Annealing پرایمرهای کروموزومی ۱۸، ۲۱، Xو Y..... ۶۰
جدول۳-۱. خصوصیات نمونه های اخذ شده از افراد مراجعه کننده به مرکز ناباروری بیمارستان شریعتی..... ۶۲
جدول ۳-۲: فراوانی کامتها (۴،۳،۲،۱،۰) در اسپرم مردان نابارور و میزان آسیب DNA نسبت به گروه نرمال..... ۶۳
جدول ۳-۳. ارتباط کمبود پروتامین با دیگر فاکتورها..... ۶۶
جدول ۳-۴: عدم وجود اختلاف معنی دار بین نتایج بدست آمده از دو نوع پروتوکل..... ۶۷
جدول۳-۵: درصد اسپرم های واجد کروموزم X و Y (نسبت جنسی)..... ۷۱

۱-۱. ناباروری و تعریف آن

ناباروری[۱] عبارتست از عدم بارداری در یک زوج حداقل به مدت یک سال علارغم وجود مقاربت صحیح و عدم استفاده از روشهای متداول جلوگیری[۱].

۱-۲. اپیدمیولوژی

در حدود ۲۵ درصد از زوجها علائم ناباروری را نشان می دهند که حدوداً بیش از ۱۵ درصد این افراد با مراجعه به مراکز کمک باروری مورد مراقبت های پزشکی جهت باروری قرار خواهند گرفت و مابقی این افراد تمایلی به باروری نداشته و به مراکز باروری مراجعه نمی کنند . ناباروری در هر دو جنس دیده شده و حدود نیمی از این مسأله مربوط به مسائل مردان می باشد . چنانچه ناباروری مربوط به یکی از زوجین باشد، زوج دیگر نیز بایستی تاوان ناباروری او را پرداخت نماید. حال آنکه بسیاری از عوامل ناباروری مشترکاً و همزمان در هر دو جنس دیده می شود . در این حالت، ناباروری زمانی بروز پیدا خواهد کرد که هر دو زوج پتانسیل باروری پائینی[۲] داشته و یا به عبارت دیگر در گروه افراد کم بارور[۳] قرار گیرند. عوامل بسیار متعددی باعث کاهش قدرت باروری در مردان کم بارور می گردد که به صورت خلاصه عبارتند از [۱]:

- ناهنجاری های مادرزادی و اکتسابی لوله های تناسلی[۴]
- عفونت و التهاب لوله های تناسلی[۵]

---

۱ Infertility
۲ Reduced Fertility
۳ Subfertile
۴ Congenital and acquired urogenital abnormalities
۵ Infection of genital tract

- افزایش دمای اسکروتوم یا واریکوسل[۱]
- آشفتگی هورمونی در غدد درونریز[۲]
- عوامل ژنتیکی
- عوامل ایمونولوژیکی
- عوامل ناشناخته و عوامل دیگر

این عوامل و میزان شیوع آن در جدول ۱-۱ قابل مشاهده است. در بین این عوامل حدود ۷۵-۶۰ درصد از مردان کم بارور عامل ناشناخته از ناباروری[۳] را نشان می دهند.

این افراد در گذشته هیچ گونه سابقه ای از ناباروری در خود نشان نداده و آزمایشات فیزیکی، پاتولوژیکی و هورمونی این افراد نرمال می باشد . اما آزمایش بررسی مایع منی [۴] در این افراد غیر نرمال م ی باشد. در این افراد میزان کاهش یافته ای از تعداد اسپرم ها (اولیگوزواسپرم[۵])، کاهش تحرک کافی در اسپرم (استنوزواسپرم[۶])، هر دو عامل توأمان (اولیگواستنوزواسپرم[۷]) و یا تعداد بسیار زیاد اسپرمهای با مورفولوژی نامناسب (تراتوزواسپرم[۸]) ممکن است دیده شود . گاهی در مواردی ممکن است تمام مشکلات بالا در یک فرد وجود داشته باشد و ایجاد یک سندرم به نام OAT[۹]بنماید.

جدول۱-۱: اتیولوژی و درصد توزیع علل ناباروری مردان(بررسی شده در ۷۰۵۷ مرد نابارور)[1].

•	Sexual factors	1.7
•	Urogenital infection	6.6
•	Congenital anomalies	2.1
•	Acquired factors	2.6
•	Varicocele	12.3
•	Endocrine disturbances	0.6
•	Immunological factors	3.1
•	Other abnormalities	3.0
•	Idiopathic abnormal semen (OAT syndrome) or no demonstrable cause	75.1

[۱] Increased scrotal temperature-Varicocele
[۲] Endocrine disturbalances
[۳] Idiopathic male infertility
[۴] Semen
[۵] Oligozoospermia
[۶] Asthenozoospermia
[۷] Oligoasthenozoospermia
[۸] Teratozoospermia
[۹] Oligoasthenotratozoospermia syndrome

۱-۳. فاکتورهای تشخیصی[۱]

عوامل مؤثر در پیش آگهی ناباروری و تعیین خط و مشی درمانی عبارتند از:

۱ - مدت زمان ناباروری؛ افرادی که بیش از چهار سال مدت زمان ناباروری بدون جلوگیری را تجربه نمایند، میزان موفقیت باروری در آنها به کمتر از ۱/۵٪ در ماه خواهد رسید.

۲ - نوع ناباروری ؛ ناباروری اولیه و ثانویه

۳ - نتایج آنالیز مایع منی

۴ - سن و شرایط باروری زوجه: در حال حاضر در بسیاری از کشورهای غربی و حتی کشورهای در حال توسعه زنان زمان اولین حاملگی خود را تا پایان تحصیلات آکادمیک و شروع یک کار تخصصی مناسب به تعویق می اندازند. در کل باروری زنان در سن ۳۵ سالگی حدود نصف باروری یک زن ۲۵ ساله می‌باشد. در سن ۳۸ سالگی این میزان به ۲۵ درصد و در سن بالای ۴۰ سالگی به کمتر از ۵ درصد خواهد رسید. سن زوجه به تنهایی یکی از عوامل مهم و مؤثر در روش های کمک باروری یا ART [۲] می باشد[۲].

۱-۴. مسائلی که بایستی جهت تشخیص مد نظر قرار داد

- ✓ جهت طبقه بندی ناباروری هر دو فرد بایستی همزمان با یکدیگر مورد بررسی قرار گیرند
- ✓ جهت برآورد مسائل ناباروری یک زوج، جمع آوری اطلاعات مربوط به طول دورهٔ ناباروری، وجود یا عدم وجود حاملگی های قبلی و سن زوجه از نکات کلیدی است.
- ✓ جهت تشخیص و مدیریت ناباروری مردانه، توجه به شانس باروری همسر ضروری است ، چرا که این مسأله در شناسایی نتایج نهایی کمک شایانی خواهد نمود[۲،۳].
- ✓ اورولوژیست یا آندرولوژیست بایستی هر فرد را ابتداً از نظر ناهنجاری های لوله ه ای تناسلی بررسی نماید. این عمل برای هر فردی که کیفیت مایع منی پایینی دارد الزامی بوده و این تشخیص باعث تصمیم گیری درست جهت انتخاب درمان اولیه است (دارو، جراحی و یا ART).

---

[۱] Prognosis Factors
[۲] Assisted Reproduction Techniques

۱-۵. بررسی و آنالیز مایع منی[۱]

چنانچه آزمونهای بررسی مایع منی ناهنجار باشد، آنگاه تست ه ای آندرولوژیک مطرح خواهد شد . از آنجایی که این بررسی اساس تصمیم گیری در مورد درمان ناباروری مردانه است، وجود یک استاندارد و مأخذ آزمایشگاهی لازم و ضروری به نظر می رسد . سازمان بهداشت جهانی[۲] این آزمون را به صورت استاندارد تعریف نموده و به صورت یک راهنمای کلی جهت آنالیز مایع منی در دسترس مراکز بهداشتی قرار داده است[۴]. این استاندارد حداقل شاخص های مورد نیاز برای یک فرد بارور بوده و در جدول شماره ۱-۲ نشان داده شده است.

جدول۱-۲: شاخص های استاندارد سازمان بهداشت جهانی در مورد مایع منی در فرد نرمال[۴].

•	Volume	≥ 2.0 ml
•	pH	7.0-8.0
•	Sperm concentration	≥ 20 million/ml
•	Total no. of spermatozoa	≥ 40 million/ejaculate
•	Motility	≥ 50% with progressive motility or 25% with rapid motility within 60 min after ejaculation
•	Morphology	≥ 14% of normal shape and form*
•	Viability	> 50% of spermatozoa
•	Leukocytes	< 1 million/ml

چنانچه نتایج بر مطابق با استاندارد هایWHO باشد انجام یک آزمون بررسی مایع منی کافی است. تنها زمانی آزمونهای آندرولوژیک مطرح می گردد که نتایج آنالیز مایع منی در یک فرد در دو بار آزمون غیر نرمال باشد. باتوجه به معیارهای تعیین شده در جدول۱-۲، ناهنجاری های مرتبط و عمده در مایع منی، به صورت خلاصه در جدول ۱-۳ تنظیم شده است.

جدول ۱-۳: اصطلاحات بکار رفته در آنالیز مایع منی(WHO)

Semen analysis terminology

- Normozoospermia—All semen parameters normal
- Oligozoospermia—Reduced sperm numbers
  Mild to moderate: 5-20 million/ml of semen
  Severe: < 5 million/ml of semen
- Asthenozoospermia—Reduced sperm motility
- Teratozoospermia—Increased abnormal forms of sperm
- Oligoasthenoteratozoospermia—Sperm variables all subnormal
- Azoospermia—No sperm in semen
- Aspermia (anejaculation)—No ejaculate (ejaculation failure)
- Leucocytospermia—Increased white cells in semen
- Necrozoospermia—All sperm are non-viable or non-motile

[۱] Semen analysis
[۲] World Health Organization (WHO)

از آنجایی که این افراد ، کاندیداهای روشهای کمک باروری مانندIUI[1]،IVF[2]و ICSI[3] می باشند، شناخت کافی از میزان کیفیت اسپرم این افراد دارای اهمیت است.

ما در این تحقیق بر آن شدیم تا مسائل مربوط به ناباروری سه گروه از این افراد را که در زمرهٔ ناباروری های ناشناخته (حدود ۶۷ ٪) قرار دارند، بررسی نما یم. عوامل مورد هدف در این تحقیق بررسی کیفیت DNA و نیز شیوع ناهنجاری های کروموزومی در اسپرم این افراد می باشد.

۱-۶. آسیب DNA[4] در اسپرم

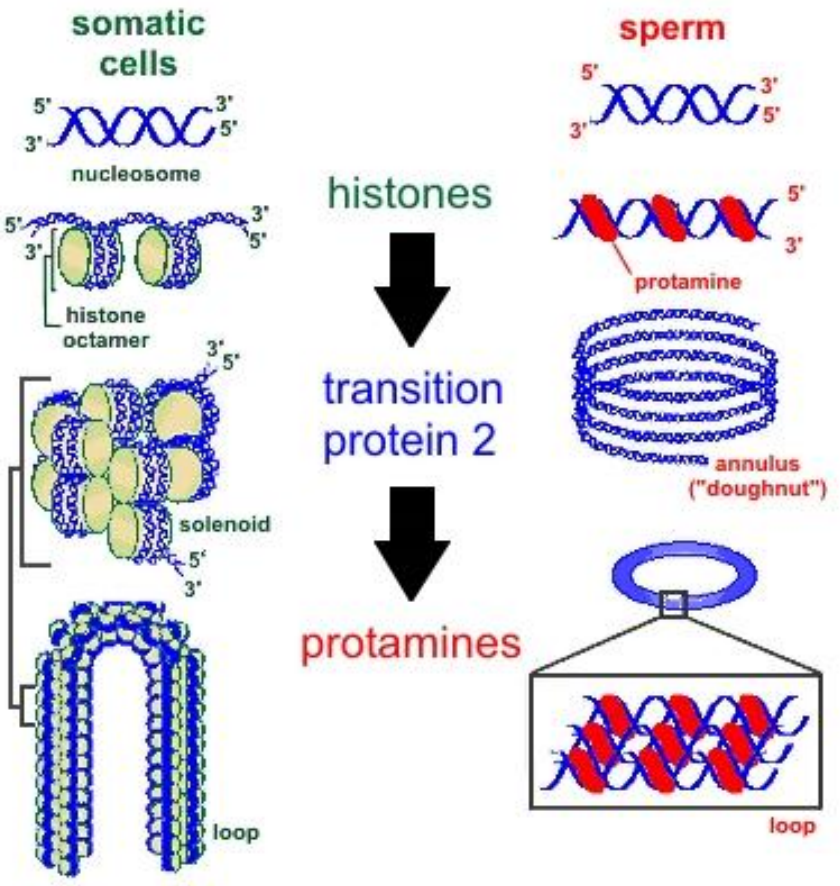
۱-۶-۱. DNA اسپرم انسان و ساختار کروماتینی آن

بر خلاف ساختار کروماتینی سلولهای سوماتیکی، کروماتین اسپرم شدیداً تحت تأثیر پیوندهای منحصر به فرد میان DNA ، ماتریکس هسته ای و نکلو پروتئین های هسته اسپرم (پروتامین ها)[5] فشرده گردیده است[۵]. در خلال آخرین مراحل اسپرماتوژنز، هستهٔ اسپرماتید دوباره شکل گرفته و عمل متراکم سازی آن با واسطه جایگزین شدن پروتئین های هسته ای واسط [6] به جای هیستون‌ها و نهایتاً قرار گرفتن پروتامین ها به جای این پروتئین های واسط تکمیل می گردد. زنجیرهٔ DNA اسپرم به صورت کام لاً محکم به دور ملکولهای پروتامین پیچیده شده و یک ساختار حلقه مانند [7] ایجاد می نماید که در هر حلقه از آن حدود ۵۰ کیلوباز از DNA دیده می شود [۵]. تفاوت در ساختار کروماتینی اسپرم با سلولها ی سوماتیک در شکل ۱-۱ قابل مشاهده می باشد.

پیوندهای دی‌سولفیدی درون و بین ملکولی که باعث اتصال متقاطع بین پروتامین های غنی از سیستئین می شوند، علت اصلی این فشرده سازی و پایداری هسته اسپرم بوده و به نظر می رسد که چنین هستهٔ فشرده ای نقش بسیار مهمی در حفاظت ژنوم اسپرم از استرس های خارجی (از قبیل اکسیداسیون و یا دمای بالای لوله های سمینیفرس زنانه در حین عبور اسپرم) ایفا می کند[۶].

---

[1] Inter-Uterus Injection
[2] In Vivo Fertilization
[3] Inter Cytoplasmic Sperm Injection
[4] DNA damage
[5] Protamines
[6] Transition Nucleoproteins: TNPs
[7] Toroidal Structure



شکل۱-۱: تفاوت فشرده سازی DNA [۱] در سلولهای سوماتیک و اسپرم

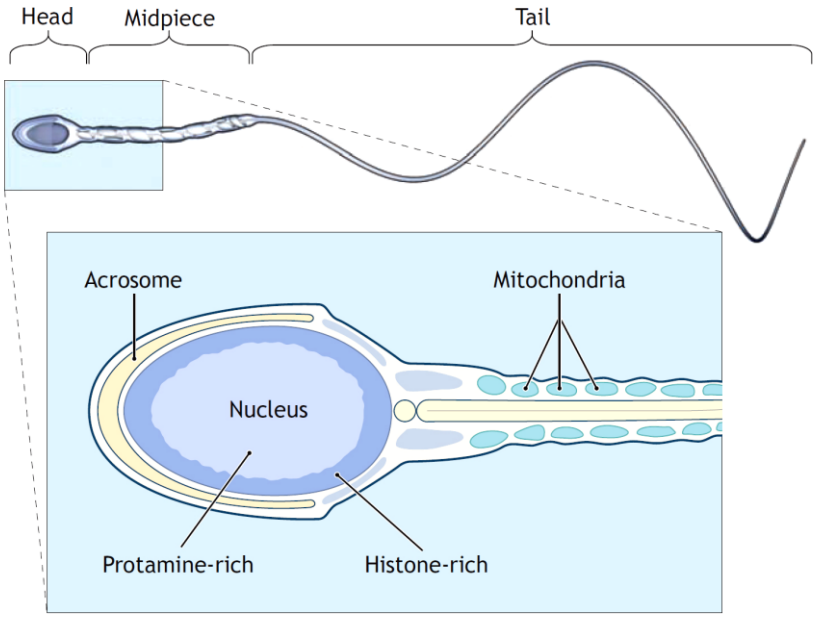
به صورت متناقضی ، پروتامین ها و گروههای سولفیدریل ممکن است در فرایند از هم باز شدن DNA [۲] اسپرم در حین لقاح نیز نقش مهمی داشته باشند[۶].

جالب این است که درصد کمی از DNA در اسپرم هنوز با ساختار قبلی خود با هیستونها باقی مانده اند(حدود ۱۵٪). این نواحی از نظر توالی محافظت شده [۳] بوده و کمتر متراکم می باشند و انتظار بر این است که در هنگام لقاح اولین گروهی باشند که تراکم خود را از دست می دهند[۷].

احتمال بر این است که چنین قسمت هایی از توالی DNA در لقاح و تکامل اولیه جنین نقش ایفا می نمایند.هیستونها همراه با نواحی تلومری ممکن است اولین نواحی بوده باشند که به علایم اوو سیت برای تشکیل پیش هستک [۴] پاسخ دهند [۵،۷]. شکل۱-۲ نمای کلی یک اسپرم و نواحی غنی از پروتامین و هیستون را نشان می دهد.

---

[۱] DNA Packaging
[۲] Decondensation
[۳] Sequence-Specific-Areas
[۴] Pronucleus



شکل۱-۲: ساختار کلی یک اسپرم و نواحی غنی از پروتامین و هیستون

۱-۶-۲. یکپارچگی[۱] و آسیب DNA در اسپرم

به ارث رسانیدن سالم و صحیح خاصیت فشردهٔ کروماتین اسپرم و بالطبع DNA همراه با آن ، به عنوان یکپارچگیDNA تعریف می گردد. هم اکنون شواهد نشان می دهند که یکپارچگی DNA اسپرم می تواند یک شاخص بسیار مناسبی از عملکرد درست اسپرماتوژنز و نهایتاً باروری فرد باشد[۱۱-۸].

تقریباً بیش از ۱۰ درصد از اسپرم افراد بارور و به صورت معنی داری میزان بیشتری از آن در افراد نابارور (۲۰-۲۵٪) دارای میزان قابل اندازه گیری از نقص یکپارچگی DNA می باشند[۱۱].

بررسی یکپارچگی DNA اسپرم به احتمال زیادی می تواند در آینده نشانگر بهتری از شناسایی ناباروری مردانه نسبت به روشهای متداول امروزه (به عنوان مثال، بررسی پارامترهای مایع منی) باشد، اما اثبات این مسأله نیاز به بررسی های بیشتری دارد[۱۲،۸،۱۰،۱۱].

مواد ژنتیکی که میزان قابل اندازه گیر ی از آسیب را با خود داشته باشند (به عنوان مثال آسیب DNA اسپرم به علت استرسهای اکسیداتیو[۲]) ممکن است خطاهایی در طول همانند ساز ی داشته و نهایتاً تولید موتاسیون های de novo در نسل بعدی را موجب شوند[۱۳]. هر چند که هنوز این مسأله در پستانداران مورد

---

[۱] DNA Integrity
[۲] Oxidation Stress

بررسی قرار نگرفته است، اما احتمال وجود موتاسیون های de novo در زاده های حاصل از لقاح اسپرم حاوی آسیب DNA با تخمک سالم را نمی‌توان رد نمود[۱۳].

اووسیتها و جنین، در طی تکامل توانایی ترمیم DNA اسپرم را دارا می باشند، اما میزان ترمیم در آنها محدود بوده و آسیب های شدید قابل ترمیم نم ی باشند. مطالعات بر رو ی حیوانات نشان داده است که ظرفیت ترمیم اووسیت آنقدر کافی نیست که اسپرم با آسیب DNA زیاد را به صورت نرمال ترمیم و متکامل کند[۱۴].

اگر چه قسمت قابل ملاحظه‌ای از DNA اسپرم در درون هسته قرار دارد، اما قسمت بسیار کوچکی از آن درون میتوکندری های گردن اسپرم می باشد که مقدار آن حدود ۱۶/۵کیلوباز و نوع آن حلقو ی می باشد. این DNA غیر متراکم بوده و به هیچ گونه ای از پروتئین متصل نمی باشد[۱۵].

این DNA، ۳۷ ژن را کد می کند؛ ۲۲ عدد tRNA ، ۲ عدد rRNA و ۱۳ عدد پلی‌پپتید که همگی زیر مجموعه های کمپکس آنزیمی متیوکندریایی مسوؤل فسفریلاسیون اکسیداتیو می باشند.

یکی از خواص ذاتی این DNA استعداد فراوان آن به موتاسیون م ی باشد (۱۰ تا ۱۰۰ برابر نسبت به DNA هسته) که شاید به علت عدم وج ود پروتئین ها ی محافظ و برهنه بودن DNA باشد و یا بر اثر تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن ی ROS [۱] به عنوان محصول جانبی در واکنش ها ی فسفریلاسیون اکسیداتیو این آسیب ها ایجاد گردند . همانگونه که مشخص است حرکت اسپرمها وابسته به عملکرد میتوکندر ی های آن می باشد و میزان حرکت اسپرم با تعداد آنها ارتباط مستقیم دارد [۱۶]. موتاسیون و یا حذف در mtDNA با کاهش حرکت اسپرمها همراه خواهد بود . اگر چه mtDNA از طرف مادر ی به ارث خواهد رسید اما برخ ی شواهد نشان داده است که ممکن است کمتر از یک درصد آن نیز توسط پدر منتقل گردد[۱۷].

۱-۶-۳. اتیولوژی آسیب DNA در اسپرم

اتیولوژی آسیب DNA اسپرم همانند ناباورو ی چندی علت داشته و ممکن است من تج از عوامل درون زاد، برون زاد و یا عوامل خارجی باشد. به وضوح می توان گفت که آسیب DNA با ناباروری مردان همراه است. اما میزان کمی از آسیب نیز در اسپرم افراد بارور وجود دارد. هنوز مشخص نشده است که آیا یک یا

[۱] Reactive Oxygen Species: ROS

چند عامل باعث آسیب DNA اسپرم می شوند[۹،۱۱]. اما مهمترین عوامل شناخته شده در آسیب DNA عبارتند از:

- کمبود پروتامین
- آپوپتوز
- دارو، شیمی درمانی و رادیوتراپی
- سن
- عوامل فعال اکسیژن
- استعمال دخانیات و سموم محیطی
- عوامل بعد از تولید اسپرم
- واریکوسل

۱-۶-۳-۱. کمبود پروتامین

ناهنجاری غالب در کروماتین اسپرم کمبود نسبی و یا کامل پروتامین می باشد. یک زیر مجموعه بزرگ از مردان نابارور (۱۵٪-۵) (اما نه مردان بارور) فاقد پروتامین می باشند و برخی از افراد دارای موتاسیون ژنتیکی در زنجیره ژنی پروتامین خود می باشند. [۱۸].

۱-۶-۳-۲. آپوپتوز

آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده در حین اسپرماتوژنز به صورت طبیعی باعث انهدام ۷۵٪ از اسپرمها می گردد. چنین روند برنامه ریزی شده باعث می گردد تا از ازدیاد غیر قابل مهار سلولهای زایا[۱] جلوگیری شده و نهایتاً با این عمل مانع تولید اسپرمهای ناهنجار خواهد شد[۱۹].

این عمل باعث می شود که تعداد ثابت سلولهای سرتولی، میزان مشخص و مناسبی از سلولهای زایا را که در طی تقسیمات مکرر میتوز به شدت در حال توسعه هستند تغذیه کرده و تعداد آنها را محدود کند . مشخص شده است که این پروتئین های سطح سلولی به نام Fas هستند که تولیدشان ، مانع توسعه و گسترش تکثیر سلولهای اولیه می شود. اتصال Fas به لیگاند[۲] خود موجب القاء مرگ سلولی خواهد شد[۲۰].

برخی از شواهد نشان می دهد که تعدادی از اسپرمها که دارای آسیب DNA می باشند وارد روند آپوپتوز شده اما در میان راه از آن فرار خواهد کرد.(آپوپتوز ناقص[۳])[۲۱].

---

[۱] Germ cell
[۲] Fas-Ligand
[۳] Aborted Apoptosis