

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
دانشکده پزشکی

پایان نامه:

جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد
رشته بیوشیمی بالینی

عنوان:

بررسی پلی مورفیسم ژن آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز نوع IV و
استرس اکسیداتیو در مردان نابارور ایرانی

اساتید راهنما:
دکتر هادی خرازی
دانشیار گروه بیوشیمی بالینی

دکتر محمدرضا صادقی
استادیار پژوهشکده ابن سینا

اساتید مشاور:
دکتر اسد ویسی رایگانی
دکتر محمد حسین مدرسی
دکتر محمد مهدی آخوندی

نگارش:
نیکنام لک پور

بهمن ۱۳۸۵

کتابخانه تخصصی پزشکی کرمانشاه

۱۳۸۷ / ۲ / ۲۰

۹۶۷۰۶

خداوند متعال و بخشنده را شاکرم
که تاکنون در تمام مراحل زندگی من را از لطف و عنایت
خود بهره مند ساخته و با چراغ هدایت خود روشنی
بخش جسم و روح من گردیده است

تقدیم به پدر و مادر مهربان و دلسوزم
که دریای بیکران محبتشان بهترین نوازشگر وجودم و
دعای خیر و نگاه پرمهرشان بدرقه راهم بود

و تقدیم به اساتید راهنمای فرزانه و گرامی ام
جناب آقای دکتر هادی خرازی
جناب آقای دکتر محمدرضا صادقی
که برادرانه و با اشتیاق فراوان در مراحل مختلف این
تحقیق پشتیبانانه محکمی برای من بوده و من را
مرهون راهنمایی های عالمانه خویش قرار دادند

با تشکر و سپاس فراوان از برادر عزیزم

محمدرضا و خواهران

بزرگوارم آن ها که دلشان پاکترین آینه هاست و وجودشان یکپارچه
محبت و همواره حامی و پشتیبان من بوده اند

با تشکر و سپاس فراوان از اساتید مشاور بزرگوارم :

جناب آقای دکتر اسد ویسی رایگانی

جناب آقای دکتر محمد حسین مدرسی

جناب آقای دکتر محمد مهدی آخوندی

با تشکر و قدردانی فراوان از زحمات بی دریغ ریاست محترم

پژوهشکده ابن سینا برادر ارجمند

جناب آقای دکتر محمد مهدی آخوندی

که زمینه را برای انجام این تحقیق فراهم نمودند

با تشکر و سپاس فراوان از کلیه اعضای پژوهشکده ابن سینا و مرکز درمان ناباروی وسقط

مکرر ابن سینای تهران بویژه :

واحد نشریات: جناب آقای دکتر حجت زراعتی

گروه آندرولوژی : سرکار خانم ها مرضیه مبارکی و مهشید حجت

گروه ژنتیک: سرکار خانم ها جمیله قاسمی، تکتیم معماریانی و مهناز حیدری

واحد پژوهشی: سرکار خانم ها شراره محمصی و پروانه احمدی

واحد پژوهشی مرکز درمان ناباروری و سقط مکرر: سرکار خانم الهام سوادی شیرازی

واحد خدمات: جناب آقایان ابوالفضل زارع، محمد خوش قدم و علی لروند

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
I	چکیده فارسی
IV	چکیده انگلیسی
VI	شرح کلمات اختصاری

فصل اول: مقدمه

۱	بیان مسئله
۴	۱-۱- ناباروری
۴	۱-۱-۱- علل ناباروری در مردان
۴	۱-۱-۱-۱- عوامل پیش بیضه ای
۵	۱-۱-۱-۲- عوامل بیضه ای
۵	نهان بیضگی
۶	عوامل کروموزومی
۶	التهاب بیضه (Orchitis)
۷	واریکوسل
۷	جراحی ، داروها ، سموم و فلزات سنگین
۷	علل ایمونولوژیک
۸	۱-۱-۳- عوامل پس بیضه ای (Post- testicular)
۸	نقص در عملکرد اپیدیدیم
۸	عفونت غدد ضمائم جنسی
۹	اختلالات انزالی
۹	ناتوانی جنسی
۱۰	نقایص ژنتیکی
۱۰	واژکتومی
۱۱	استرس اکسیداتیو
۱۱	گونه های واکنش پذیر اکسیژن (ROS)

۱۲	مکانیسم های تولید ROS در مایع منی
۱۲	الف - تولید ROS توسط اسپرم
۱۳	ب - تولید ROS توسط لکوسیت
۱۳	I- تکنیک های تهیه اسپرم
۱۳	الف - سانتریفوژ
۱۴	ب - درجه حرارت
۱۴	ج - جدا کردن پلاسمای منی از اسپرم
۱۴	II - موروفولوژی اسپرم
۱۴	اثرات سمی ROS بر روی اسپرم
۱۷	محصولات پراکسیداسیون لیپیدها
۱۷	واکنش های پراکسیداسیون لیپیدها
۱۹	تخریب پروتئین ها
۱۹	ROS و عملکرد طبیعی اسپرم
۲۰	سیستم های دفاع آنتی اکسیدانی
۲۱	سیستم دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی
۲۲	سوپراکسید دسموتاز (SOD)
۲۳	گلوکوتایون پراکسیداز (GPX)
۲۴	گلوکوتایون پراکسیداز نوع IV (GPX - 4)
۲۷	کاتالاز (Catalase)
۲۸	سیستم آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی
۳۱	بیماریهای سیستمیک و استرس اکسیداتیو در ناباروری
۳۲	عفونت ، استرس اکسیداتیو و ناباروری
۳۲	واریکوسل ، استرس اکسیداتیو و ناباروری
۳۳	کریپتورکیدیسم ، استرس اکسیداتیو و ناباروری
۳۳	الگوی زندگی ، محیط و ناباروری
۳۳	هورمون ها و استرس اکسیداتیو
۳۵	۱-۱-۲- ارزیابی استرس اکسیداتیو
۳۶	۱-۱-۳- کنترل و درمان ناباروری به علت استرس اکسیداتیو
۳۷	۱- درمان اختصاصی بیماری
۳۷	الف - تغییر الگوی زندگی

۳۷	ب - درمان با آنتی بیوتیک
۳۷	ج - واریکوسلکتومی
۳۷	۲- استفاده از آنتی اکسیدان ها در <i>In vitro</i>
۳۸	۳- استفاده از آنتی اکسیدان ها به صورت خوراکی (<i>In vivo</i>)
۴۲	۲-۱- دستگاه تولید مثل مرد
۴۳	۱-۲-۱- مورفولوژی و فیزیولوژی اندام های جنسی مردانه
۴۳	۱-۱-۲-۱- بیولوژی بیضه
۴۶	تولید اسپرم
۴۶	اسپرماتوژنز
۴۷	اسپرماتوگونیوژنز
۴۷	میوز
۴۸	اسپرمیوژنز
۴۹	Spermiation
۵۰	مورفولوژی اسپرم
۵۱	هسته
۵۱	تحرک اسپرم
۵۲	بلوغ و ظرفیت یابی
۵۳	واکنش آکروزومی
۵۳	منی
۵۴	۳-۱- ارزیابی عملکرد در اسپرم
۵۴	۱-۳-۱- عملکرد طبیعی اسپرم
۵۵	۴-۱- آنالیز مایع منی
۵۶	۱-۴-۱- ارزیابی هایروتین اسپرم
۵۶	پارامترهای کمی
۵۶	حجم
۵۷	غلظت
۵۷	اسیدیته (pH)
۵۷	تعداد کل اسپرم
۵۸	پارامترهای کیفی
۵۸	ظاهر مایع منی

۵۸	ویسکوزیته
۵۸	تحرک
۵۹	مورفولوژی
۶۰	۱-۴-۲- تست تورم هیپو اسموتیک (HOS)
۶۰	۱-۴-۳- واکنش متقابل اسپرم - موکوس گردن رحم
۶۰	۱-۴-۴- ارزیابی اتصال به زونا پلوسیدا
۶۱	۱-۴-۵- ارزیابی واکنش آکروزومی
۶۱	۱-۴-۶- ارزیابی فعالیت میتوکندریایی
۶۲	۱-۴-۷- تست های ارزیابی کروماتین اسپرم

فصل دوم: مواد و روش ها

۶۴	۱-۲- افراد مورد مطالعه و جمع آوری نمونه ها
۶۶	۲-۲- استخراج DNA (روش Salting out)
۶۶	مواد و وسایل مورد نیاز
۶۶	تهیه محلول های مورد نیاز
۶۷	روش کار
۶۹	۲-۳- واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)
۷۰	۲-۳-۱- PCR با پرایمر 237-gpx
۷۰	مواد و وسایل مورد نیاز
۷۰	روش کار
۷۲	۲-۳-۲- PCR با پرایمر 148-gpx
۷۲	روش کار
۷۳	۲-۴- الکتروفورز ژل آگاروز
۷۴	مواد و وسایل مورد نیاز
۷۵	روش کار
۷۵	۲-۵- انجام RFLP
۷۶	مواد و وسایل مورد نیاز
۷۶	روش کار
۷۸	۲-۶- الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (PAGE)

۷۸	مواد و وسایل مورد نیاز
۷۹	۷-۲- رنگ آمیزی نیترات نقره (Silver Nitrate Staining)
۸۰	مواد و وسایل مورد نیاز
۸۱	روش کار
۸۱	۸-۲- ارزیابی DNA اسپرم
۸۱	۱-۸-۲- رنگ آمیزی آکریدین ارنج (AO)
۸۲	مواد و وسایل مورد نیاز
۸۳	روش کار
۸۴	۲-۸-۲- رنگ آمیزی تولوئیدین بلو (TB)
۸۴	مواد و وسایل مورد نیاز
۸۵	روش کار
۸۵	۳-۸-۲- رنگ آمیزی کرومومایسین A ₃ (CHA ₃)
۸۶	مواد و وسایل مورد نیاز
۸۶	روش کار
۸۷	۹-۲- اندازه گیری مالون دی آلدئید (MDA)
۸۷	مواد و وسایل مورد نیاز
۸۸	روش کار
۸۹	۱۰-۲- تعیین توان کل آنتی اکسیدان پلاسمای منی
۸۹	روش کار
۹۱	۱۱-۲- اندازه گیری هورمون های LH, FSH و تستوسترون بوسیله روش کمی لومینسانس
۹۱	۱-۱۱-۲- اندازه گیری تستوسترون
۹۲	۲-۱۱-۲- اندازه گیری LH و FSH
۹۳	۱۲-۲- آنالیز آماری داده ها

فصل سوم: نتایج

۹۴	۱-۳- آزمایشات ارزیابی اسپرم (اسپرموگرام)
۹۴	۱-۱-۳- مشخصات مایع منی
۹۶	۲-۳- نتایج حاصل از بررسی پلی مورفیسم های ژن gpx-4
۹۶	۱-۲-۳- بررسی کیفیت DNA های استخراج شده

- ۹۷ ۲-۲-۳- نتیجه اولین PCR با استفاده از پرایمرهای gpx-148 و gpx-237
- ۹۸ ۳-۲-۳- بهینه سازی واکنش PCR برای پرایمر gpx-148
- ۹۸ الف- گرادیان $MgCl_2$
- ۹۸ ب- گرادیان پرایمر gpx-148
- ۱۰۰ ج- گرادیان دمایی برای پرایمر gpx-148
- ۱۰۱ د- باندهای 148bp مربوط به تعدادی از افراد مورد مطالعه
- ۱۰۳ ۴-۲-۳- بهینه سازی واکنش PCR برای پرایمر gpx-237
- ۱۰۳ ۵-۲-۳- باندهای 148 bp و ۲۳۷ bp حاصل از PCR بعد از انجام بهینه سازی شرایط PCR
- ۱۰۵ ۶-۲-۳- هضم آنزیمی قطعات 148 bp و ۲۳۷ bp
- ۱۰۶ ۳-۳- مالون دی آلدئید (MDA)
- ۱۰۶ ۱-۳-۳- مقدار MDA و ارتباط آن با پارامترهای منی
- ۱۰۶ الف - مقایسه میانگین غلظت MDA بین افراد نورمواسپرمی و افراد با پارامترهای اسپرمی معیوب
- ۱۰۷ ب - مقایسه میانگین غلظت MDA بین دو گروه افراد نورمواسپرمی و افراد با پارامترهای اسپرمی معیوب
- ۱۰۸ ج - ارتباط MDA با آسیب دم اسپرم و آسیب گردن - قطعه میانی اسپرم
- ۱۱۰ د- ارتباط MDA با غلظت اسپرم
- ۱۱۰ ذ - ارتباط MDA با حرکت ، شکل طبیعی اسپرم ، TAC و میزان تخریب DNA اسپرم
- ۱۱۰ ر- ارتباط غلظت MDA با میزان هورمون های LH ، FSH و تستوسترون
- ۱۱۰ ۲-۳-۳- ارتباط آسیب گردن - قطعه میانی اسپرم با حرکت اسپرم
- ۱۱۰ ارتباط آسیب گردن - قطعه میانی اسپرم با حرکت اسپرم ، حرکت با درجات a و a+b
- ۱۱۱ ۳-۳-۳- ارتباط آسیب دم اسپرم با حرکت اسپرم
- ۱۱۲ ۴-۳- ظرفیت تام آنتی اکسیدان (TAC)
- ۱۱۲ ۱-۴-۳- مقایسه میانگین غلظت TAC بین افراد نورمواسپرمی و افراد با پارامترهای اسپرمی معیوب
- ۱۱۳ ۲-۴-۳- مقایسه میانگین غلظت TAC بین دو گروه افراد نورمواسپرمی و ۵ گروه با پارامترهای اسپرمی معیوب
- ۱۱۴ ۳-۴-۳- ارتباط TAC با میزان شکست DNA اسپرم ، حرکت اسپرم و شکل طبیعی اسپرم
- ۱۱۴ ۵-۳- هورمون های LH ، FSH و تستوسترون
- ۱۱۴ ۱- ۵-۳- مقایسه میانگین غلظت هورمون های LH ، FSH و تستوسترون
- ۱۱۶ ۲- ۵-۳- مقایسه میانگین غلظت هورمون های LH ، FSH و تستوسترون در دو گروه افراد

نورمواسپرمی و افراد با پارامترهای اسپرمی معیوب

- ۱۱۷ ۳-۵-۳- ارتباط غلظت FSH، LH و تستوسترون با متغیرهای میزان شکست DNA اسپرم، درصد اسپرم های CHA3 مثبت و TAC پلاسمای منی
- ۱۱۹ ۳-۶-۳- مقایسه میانگین میزان شکست DNA اسپرم و میانگین درصد اسپرم های CHA3
- ۱۲۳ ۳-۷-۳- مقایسه میانگین میزان شکست DNA اسپرم و میانگین درصد اسپرم های CHA3 مثبت در بین دو گروه نورمواسپرمی و با پارامترهای اسپرمی معیوب
- ۱۲۴ ۳-۷-۱- ارتباط درصد اسپرم های CHA3 مثبت با میزان شکست DNA اسپرم، اشکال غیر طبیعی سر اسپرم و شکل طبیعی اسپرم

فصل چهارم: بحث

- ۱۲۶ ۴-۱- پلی موفیسم ژن gpx-4
- ۱۲۹ ۴-۲- مالون دی آلدئید (MDA)
- ۱۳۲ ۴-۳- ظرفیت تام آنتی اکسیدان (TAC)
- ۱۳۵ ۴-۴- تخریب DNA اسپرم
- ۱۳۸ ۴-۵- بلوغ کروماتین اسپرم
- ۱۴۰ ۴-۶- هورمون های جنسی FSH، LH و تستوسترون
- ۱۴۱ ۴-۷- ارتباط MDA با سایر پارامترهای مورد بررسی
- ۱۴۴ ۴-۸- ارتباط TAC با تعدادی از پارامترها
- ۱۴۵ ۴-۹- ارتباط میزان پروتامین هسته اسپرم و میزان شکست DNA اسپرم
- ۱۴۶ ۴-۱۰- ارتباط هورمون های FSH، LH و تستوسترون با تخریب DNA اسپرم، میزان پروتامین هسته اسپرم
- ۱۴۸ نتیجه گیری
- ۱۵۰ پیشنهادات
- ۱۵۱ منابع

فهرست جداول

- جدول ۱- آنتی اکسیدان های استفاده شده به صورت *In vitro* و اثرات آنها ۳۹
- جدول ۲- آنتی اکسیدان های استفاده شده به صورت *In vivo* و اثرات آنها ۴۱
- جدول ۳- غلظت و مقدار مواد استفاده شده در PCR ژن *gpx-4* با پرایمر *gpx-237* ۷۱
- جدول ۴- غلظت و مقدار مواد استفاده شده در PCR ژن *gpx-4* با پرایمر *gpx-148* ۷۳
- جدول ۵- پروتوکل اندازه گیری TAC ۹۰
- جدول ۶- مشخصات مایع منی در ۱۳۳ فرد مورد مطالعه ۹۵
- جدول ۷- مشخصات مایع منی ۹۲ بیمار که پلی مورفیسم ژن *gpx-4* در آنها ارزیابی گردید. ۹۶
- جدول ۸- مقایسه میانگین غلظت MDA بین افراد نورمواسپرمی و افراد با پارامترهای اسپرمی معیوب ۱۰۸
- جدول ۹- مقایسه میانگین غلظت MDA بین افراد نورمواسپرمی و افراد با پارامترهای اسپرمی معیوب ۱۰۸
- جدول ۱۰- ارتباط MDA با متغیرهای مختلف ۱۰۹
- جدول ۱۱- ارتباط آسیب گردن - قطعه میانی اسپرم با متغیرهای حرکت ، حرکت درجه a و حرکت درجه a + b ۱۱۱
- جدول ۱۲- ارتباط آسیب دم اسپرم با متغیرهای حرکت ، حرکت درجه a و حرکت درجه d ۱۱۲
- جدول ۱۳- مقایسه میانگین غلظت TAC بین افراد نورمواسپرمی و افراد با پارامترهای اسپرمی معیوب ۱۱۳
- جدول ۱۴- مقایسه میانگین غلظت TAC بین دو گروه افراد نورمواسپرمی و افراد با پارامترهای اسپرمی معیوب ۱۱۴
- جدول ۱۵- ارتباط TCA با میزان شکست DNA اسپرم ، حرکت و شکل طبیعی اسپرم ۱۱۵
- جدول ۱۶- مقایسه میانگین غلظت هورمون های LH ، FSH و تستوسترون ۱۱۶
- جدول ۱۷- مقایسه میانگین هورمون های LH ، FSH و تستوسترون در دو گروه افراد نورمواسپرمی و افراد با پارامترهای اسپرمی معیوب ۱۱۷
- جدول ۱۸- ارتباط غلظت LH ، FSH و تستوسترون با متغیرهای میزان شکست DNA اسپرم ، درصد اسپرم های CHA3 مثبت و TAC پلاسمای منی ۱۱۸
- جدول ۱۹- مقایسه میانگین میزان شکست DNA اسپرم و میانگین درصد اسپرم های CHA3 مثبت ۱۲۰
- جدول ۲۰- مقایسه میانگین میزان شکست DNA اسپرم ، درصد اسپرم های CHA3 مثبت در بین دو گروه نورمواسپرمی و با پارامترهای اسپرمی معیوب ۱۲۴
- جدول ۲۱- ارتباط درصد اسپرم های CHA3 مثبت و تعدادی از متغیرها ۱۲۵

فهرست تصاویر

- شکل ۱- تولید ROS بوسیله اسپرم غیر طبیعی (دارای قطره سیتوپلاسمی) ۱۳
- شکل ۲- مکانیسم های فرض شده درباره نقش استرس اکسیداتیو بر کارایی اسپرم و ایجاد ناباروری ۱۶
- شکل ۳- دیمیرزاسیون پروتئین - پروتئین بوسیله محصولات حاصل از پراکسیداسیون لیپید ۲۰
- شکل ۴- ساختار ژن gpx-4 و پلی مورفیسم های جایگاه های +6 ، +17 و +1725 و نقاط شروع رونویسی از فرم های میتوکندریایی ، سیتوپلاسمی و هسته ای آنزیم های حاصل از این ژن ۲۵
- شکل ۵- واکنش های بین رادیکال های آزاد و آنزیم های آنتی اکسیدان ۲۸
- شکل ۶- مسیرهای پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و تولید مجدد ویتامین E ۳۰
- شکل ۷- سیستم های تولید و تخریب ROS در پلاسمای منی و اثرات آنها در ایجاد ناباروری ۳۱
- شکل ۸- علل و نحوه درمان ناباروری بواسطه استرس اکسیداتیو ۴۲
- شکل ۹- دستگاه تناسلی مرد ۴۴
- شکل ۱۰- سازماندهی سلولهای سرتولی و زایا در داخل لوله سمی نیفروس ۴۵
- شکل ۱۱- بررسی کیفیت DNA های استخراج شده بوسیله ژل آگاروز ۱٪ ۹۷
- شکل ۱۲- اولین PCR از پرایمرهای gpx148 و gpx-237 ۹۷
- شکل ۱۳- گرادیان MgCl₂ برای پرایمر gpx-148 بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ ۹۹
- شکل ۱۴- گرادیان پرایمر برای gpx-148 بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ ۹۹
- شکل ۱۵- گرادیان پرایمر برای gpx-148 بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ ۱۰۰
- شکل ۱۶- گرادیان دمایی برای gpx-148 ۱۰۱
- شکل ۱۷- باندهای ۱۴۸ bp حاصل از PCR مربوط به تعدادی از بیماران مورد مطالعه بعد از انجام شرایط بهینه سازی ۱۰۲
- شکل ۱۸- گرادیان دمایی برای پرایمر gpx-237 ۱۰۲
- شکل ۱۹- باندهای ۲۳۷ bp حاصل از PCR مربوط به تعدادی از افراد مورد مطالعه ۱۰۳
- شکل ۲۰- محصولات PCR ژن gpx-4 بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ ۱۰۴
- شکل ۲۱- محصولات PCR و هضم آنزیمی قطعات تکثیر شده از ژن gpx-4 بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰۷
- شکل ۲۲- بررسی تخریب DNA اسپرم انسان با استفاده از رنگ آمیزی تولوئیدین بلو (TB) ۱۲۱
- شکل ۲۳- بررسی تخریب DNA اسپرم انسان با استفاده از رنگ آمیزی آکریدین ارنج (AO) ۱۲۲
- شکل ۲۴- بررسی میزان پروتامین هسته اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی CHA3 ۱۲۳

براساس نتایج موجود علت ناباروری حدود ۲۵٪ زوجین مراجعه کننده برای درمان ناباروری را اختلال در عملکرد اسپرم تشکیل می دهد. در اکثر موارد شناسایی علل نقایص عملکرد اسپرم مشکل می باشد زیرا برخی از موارد ناباروری در مردان با پارامترهای طبیعی مایع منی نیز مشاهده می گردد. عوامل متعددی سبب ناباروری در مردان می شوند ولی در بعضی از موارد هیچ علت شناخته شده ای برای ناباروری آن پیدا نمی شود و ناباروری این مردان به صورت آیدیوپاتیک طبقه بندی می شود. استرس اکسیداتیو به عنوان یکی از عوامل مهم در ایجاد تخریب بیومولکول های اسپرم بویژه DNA اسپرم در این زمینه مطرح می باشد. با این وجود اثر استرس اکسیداتیو در تخریب DNA اسپرم در مردان نابارور نورمواسپرمی و مردان نابارور با پارامترهای اسپرمی معیوب مشخص نمی باشد. علاوه بر این ممکن است بین استرس اکسیداتیو و تولید هورمون های جنسی LH ، FSH و تستوسترون و نیز بین این هورمون ها و ساختار کروماتین اسپرم ارتباط وجود داشته باشد. از طرف دیگر در برابر استرس اکسیداتیو مکانیسم های دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی در اسپرم و مایع منی وجود دارند. آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نوع ۴ به عنوان سلنو پروتئین اصلی اسپرم یکی از این مکانیسم های آنزیمی است و دارای نقش های متعددی در روند اسپرماتوژنز می باشد. از جمله این نقش ها می توان به تشکیل کپسول میتوکندریایی ، سمیت زدایی هیدروپراکسیدها و متراکم کردن کروماتین اسپرم اشاره کرد. در صورت کاهش فعالیت یا مقدار این آنزیم ممکن است اختلالاتی در روند اسپرماتوژنز و عملکرد اسپرم ایجاد شود. بنابراین با توجه به ابهامات موجود در زمینه ارتباط استرس اکسیداتیو با تخریب DNA اسپرم و تولید هورمون های جنسی LH ، FSH و تستوسترون و نیز ارتباط این هورمون ها با میزان تخریب DNA اسپرم و میزان پروتامین هسته اسپرم و نیز با توجه به اینکه نقص در بیان ژن gpx-4 یا وجود پلی مورفیسم در این ژن ممکن است سبب کاهش فعالیت یا مقدار آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نوع ۴ شود، هدف این مطالعه از یک طرف بررسی ارتباط استرس اکسیداتیو با تخریب DNA اسپرم و تولید هورمون های جنسی LH ، FSH و تستوسترون و نیز بررسی ارتباط این هورمون ها با میزان تخریب DNA اسپرم و میزان پروتامین هسته اسپرم بوده و از طرف دیگر شناسایی تعدادی از پلی مورفیسم های مهم در ژن gpx-4 بوسیله روش PCR-RFLP در مردان نابارور ایرانی می باشد.

مطالعه در زمینه بررسی پلی مورفیسم ژن gpx-4 بر روی ۱۲۸ مرد شامل ۷۴ مرد نابارور دارای اسپرموگرام غیر طبیعی، ۱۸ مرد نورمو اسپرم و ۳۶ مرد کنترل بارور و در زمینه بررسی استرس اکسیداتیو بر روی ۱۳۳ مرد شامل ۸۲ نفر با پارامترهای اسپرمی معیوب و ۵۲ نفر نورمواسپرم انجام شد. DNA ژنومی از گلبول های سفید نمونه خون به روش Salting out استخراج گردید. سپس دو زوج پرایمر برای دو از قطعه ژن gpx-4 در اگزون های 1A و 4 حاوی نوکلئوتیدهای (C→T) + 6، (G→A) + 17 و (G→A) + 1725 طراحی و با استفاده از آنزیم های MWOI, PShAI, SatI با روش PCR-RFLP ارزیابی شدند. MDA به روش TBA و TAC با استفاده از کیت Randox, USA در پلاسما منی بوسیله اسپکتروفتومتر اندازه گیری شدند. علاوه براین تخریب DNA اسپرم بوسیله تستهای AO و با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس و TB با استفاده از میکروسکوپ نوری و میزان پروتامین هسته اسپرم نیز بوسیله تست CHA₃ با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس ارزیابی شدند. از طرف دیگر غلظت هورمون های LH، FSH و تستوسترون در سرم بوسیله روش کمی لومینسانس با استفاده از کیت Diasorin, Italy اندازه گیری شدند. نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۳ آنالیز شد و جهت بررسی آماری از آزمون های آنالیز واریانس یک طرفه Independent - samples T Test، Mann-Whitney Test، One sample T Test و ضرایب همبستگی پیرسون و اسپیرمن، با در نظر گرفتن سطح معنی داری $P < 0.05$ استفاده شد.

بررسی هضم آنزیمی قطعه ۲۳۷ bp حاوی پلی مورفیسم های (C→T) + 6، (G→A) + 17 با استفاده از آنزیم های MWOI و PShAI و قطعه ۱۴۷ bp حاوی پلی مورفیسم (G→A) + 1725 با استفاده از آنزیم Sat I نشان داد که هیچ یک از این سه پلی مورفیسم در ژن gpx-4 در آنها وجود ندارد. از طرف دیگر تفاوت معنی داری بین غلظت MDA ($P = 0.005$)، تخریب DNA اسپرم [TB] ($P = 0$)، درصد اسپرم های CHA₃ مثبت ($P = 0$) و غلظت هورمون های LH و FSH ($P = 0$) بین دو گروه مردان نورمواسپرمی و مردان با پارامترهای اسپرمی معیوب مشاهده شد، اما تفاوت معنی داری بین غلظت TAC ($P = 0.329$)، غلظت تستوسترون ($P = 0.057$) و میزان تخریب DNA اسپرم

[AO] ($P = 0/22$) در دوگروه ذکر شده مشاهده نشد. علاوه بر این ارتباط معنی داری بین غلظت TAC و تخریب DNA اسپرم [TB] ($P = 0/061$ و $r = -0/172$)، غلظت MDA ($P = 0/256$) و $P = 0/107$ ، LH ($r = 0/515$ و $P = 0/067$)، FSH ($r = -0/031$ و $P = 0/762$)، و تستوسترون ($r = -0/115$ و $P = 0/261$) مشاهده نشده است. اما ارتباط معنی داری بین هورمون های LH و FSH با درصد اسپرم های CHA_3 ($P = 0/273$ و $r = 0/004$) و میزان تخریب DNA اسپرم [TB] ($P = 0/102$ و $r = 0/237$) مشاهده شده است البته ارتباط معنی داری بین تستوسترون و درصد اسپرم های CHA_3 مثبت ($P = 0/322$ و $r = 0/095$) و میزان تخریب DNA اسپرم ($P = 0/322$) و $P = 0/119$ مشاهده نشده است. از طرف دیگر ارتباط معنی داری بین درصد اسپرم های CHA_3 مثبت و میزان تخریب DNA اسپرم [TB] مشاهده شده است ($P = 0$ و $r = 0/648$).

براساس نتایج این تحقیق مشخص شد که ممکن است شیوع این پلی مورفیسم ها در مردان نابارور ایرانی پایین بوده و با اتیولوژی اختلال در پارامترهای اسپرمی این افراد ارتباطی نداشته باشد. با این وجود برای تعیین دقیق شیوع این پلی مورفیسم ها و پلی مورفیسم های دیگر در مردان نابارور ایرانی بررسی تعداد بیشتری از مردان نابارور و تعیین توالی ژن این آنزیم در آنها پیشنهاد می شود. علاوه بر این مشخص شد که سطح TAC در دوگروه مردان نابارور نورمواسپرمی و مردان نابارور با پارامترهای اسپرمی معیوب یکسان بوده اما میزان پروتامین هسته اسپرم در مردان با پارامترهای اسپرمی معیوب کمتر می باشد بنابراین به علت عدم حمایت DNA اسپرم در برابر ROS در مردان با پارامترهای اسپرمی معیوب عوامل اکسیدان سبب افزایش تخریب DNA اسپرم می شوند. از طرف دیگر هورمون های LH و FSH ممکن است به طور مستقیم و یا غیر مستقیم با کاهش میزان پروتامین هسته اسپرم سبب افزایش تخریب DNA اسپرم شوند. همچنین استرس اکسیداتیو نمی تواند سبب تغییر در سطح هورمون های LH، FSH و تستوسترون شود.

واژه های کلیدی: استرس اکسیداتیو، گونه های اکسیژنی واکنشگر، گلوکاتایون پراکسیداز نوع 4، LH، FSH، تستوسترون، تخریب DNA اسپرم، میزان پروتامین هسته اسپرم

According to present results, infertility in about 25% of the couples is due to sperms malfunctions. Generally, Identification of causes of sperm function defects is hard because In some cases infertility is seen in men with normal semen parameters. Different reasons cause infertility in men and in some cases infertility is as a result of no known reason. These patients are categorized as idiopathic. Oxidative stress is one of the most important causes in the destruction of sperm biomolecules specially the DNA. yet the effect of oxidative stress in destroying the sperm DNA in men of normozoospermia and defect sperm parameters is not identified. There is a possibility that oxidative stress-production of sexual hormones (LH, FSH and Testosterone) and sperm chromatin structure are related. There are a number of enzymatic and non-enzymatic defensive mechanisms against oxidative stress in the sperm and in semen. the enzyme glutathione peroxidase type 4 (sperm main selenoprotein) is one of this enzymatic mechanisms and has several roles during spermatogenesis. Formation of mitochondrial capsule, Hydroperoxide detoxification and chromatin condensation are among it's roles. In cases of decrease in enzyme activity or content abnormality in spermatogenesis and in sperm function might be seen. Considering the unknowns about the role of oxidative stress in sperm DNA damage and sexual hormones production and also the relation of these hormones with sperm DNA damage and nuclear protamine amount, and according to the fact that decrease in gpx-4 gene expression or presence of polymorphism in the gene might lead to a decrease in the enzyme activity or content, the purpose of this study was analysis the relation between oxidative stress,sperm DNA damage and sexual hormones production. We also studied the relationship of this hormones-sperm DNA damage and the amount of sperm nuclear protamine, on the other hand identifying a number of polymorphism in gpx-4 gene in Iranian infertile men using PCR-RFLP.

The study of gpx-4 gene polymorphism was done on 128 men including 74 infertile men with abnormal spermogram, 18 normospermic men and 36 fertile men as controls. In the field of studying oxidative stress 133 men were included, 82 men which had abnormal sperm parameters and 52 normozoospermia. Genomic DNA was extracted using salting out method. Two pairs of primers designed for exons 1A and 4 in the gpx-4 gene with the nucleotide sequence of +6 (C→ T),+17(G→ A) and +1725(G→ A) were analyzed using SatI, MWOI, PShAI enzymes and PCR-RFLP.MDA and TAC was measured by TBA assay and Randox kit using spectrophotometer in seminal plasma, respectively. DNA damage was examined using AO test with fluorescence microscope and TB test with optical microscope. Applying CHA₃ test we analyzed sperm nuclear protamine with a fluorescence microscope. On the other hand concentration of LH, FSH and Testosterone hormones was measured in the serum using chemiluminescence method and Diasorin kit. The results were analyzed using SPSS 13 and one way ANOVA, Independent – samples T Test, Mann-Whitney Test, One sample T Test and Pearson's and spearman's correlation coefficients with a significance level of P < 0.05.

Analyzing the enzymatic digestion of the 237 bp segment containing +6 (C→ T), +17(G→ A) polymorphisms using MWOI and PShAI enzymes and the 147 bp containing

+1725(G→A) polymorphism using *SatI* enzyme showed that none of the mentioned polymorphisms are present in their *gpx-4* gene. A significance difference was observed in MDA concentration ($P = 0.005$), Sperm DNA damage [TB] ($P = 0$), Percentage of positive CHA₃ sperms and FSH, LH hormone concentration ($P = 0$) between the normozoospermic men and men with abnormal sperm parameters, but no significance difference was detected between the TAC concentration ($P = 0.329$), Testosterone concentration ($P = 0.057$) and sperm DNA damage [AO] ($P = 0.22$) of the two groups. In addition to these no significance relationship was seen between the TAC concentration and sperm DNA damage [TB] ($r = -0.172$, $P = 0.061$), MDA Concentration ($r = 0.107$, $P = 0.256$), LH ($r = 0.067$, $P = 0.515$), FSH ($r = -0.031$, $P = 0.762$) and testosterone ($r = -0.115$, $P = 0.261$). A significance relationship was observed between LH and FSH hormones with percentage of positive CHA₃ sperms ($r = 0.004$, $P = 0.273$) and sperm DNA damage [TB] ($r = 0.237$, $P = 0.012$) although there was no significance relation between testosterone and percentage of positive CHA₃ sperms ($r = 0.095$, $P = 0.322$) and the sperm DNA damage [TB] ($r = 0.119$, $P = 0.322$). Also a significance relation between percentage of positive CHA₃ sperms and the sperm DNA damage [TB] was observed ($r = 0.648$, $P = 0$).

According to the results of this study the prevalence of this polymorphism was low in the Iranian infertile men and was not related to abnormalities in the sperm parameters. To determine the precise prevalence of these polymorphisms and other polymorphisms in Iranian infertile men, analyzing more infertile men and sequencing their *gpx-4* gene is recommended. It was determined that TAC levels was equal in the two groups of infertile men of normozoospermia and with abnormal sperm parameters, but the sperm nuclear protamine was lower in men with abnormal sperm parameters as a result, according to lack of sperm DNA protection against ROS in men with abnormal sperm parameters, the oxidants cause increasing fragmentation of the sperm DNA. LH and FSH hormones can directly or indirectly with the decreased amount of sperm nuclear protamine cause an increase in the sperm DNA damage. Also oxidative stress can not cause a change in the level of LH, FSH and Testosterone hormones.

Key Words: Oxidative Stress, ROS, Glutathione peroxidase – 4, LH, FSH, Testosterone, Sperm DNA damage, The Content of sperm nuclear protamine