دانشگاه پیام نور

دانشکده علوم پایه و کشاورزی

پایان نامه

برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد

رشته بیوشیمی

گروه بیوشیمی

بررسی و مقایسه پروتئین شوک حرارتی A2 (HSPA2) در مردان بارور و نابارور

مرجان مطیعی

استاد راهنما: دکتر محمد حسین نصر اصفهانی

استاد راهنمای همکار: دکتر رضا حاجی حسینی

استاد مشاور: مهندس مرضیه تولائی

شهریور ۱۳۹۰

بسم الله الرحمن الرحيم
الحمد لله رب العالمين الرحمن الرحيم مالك يوم الدين
اهدنا الصراط المستقيم صراط الذين أنعمت عليهم غير المغضوب عليهم ولا الضالين

تمامی هزینه های مصرفی این پایان نامه بر مبنای قرارداد شماره ۸۹/۱۹/۵۲۷۳۵/ص مورخ ۱۳۸۹/۱۲/۱۶ از بودجه تحقیقاتی پژوهشگاه رویان تأمین گردیده است.

با توجه به قرارداد شماره ۸۹/۱۹/۵۲۷۳۵/ص مورخ ۱۳۸۹/۱۲/۱۶ فی ما بین پژوهشگاه رویان و دانشگاه پیام نور تهران و مفاد تبصره شماره ۱ قرارداد مذکور، از آنجایی که کلیه هزینه های مربوط به انجام این پایان نامه توسط پژوهشگاه رویان پرداخت گردیده است، بنابراین در صورتی که نتایج این پایان نامه به ارائه فن آوری و ثبت اختراع منجر گردد، حقوق مادی و معنوی متعلق به پژوهشگاه رویان می‌باشد.

دانشگاه پیام نور

دانشکده علوم پایه و کشاورزی

مرکز تهران

پایان نامه برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد

رشته بیوشیمی

گروه بیوشیمی

عنوان پایان نامه:

بررسی و مقایسه پروتئین شوک حرارتی A2 (HSPA2) در مردان بارور و نابارور

مرجان مطیعی

استاد راهنما: دکتر محمد حسین نصر اصفهانی

استاد راهنمای همکار: دکتر رضا حاجی حسینی

استاد مشاور: مهندس مرضیه تولائی

شهریور ۱۳۹۰

اینجانب مرجان مطیعی دانشجوی ورودی سال ۱۳۸۸مقطع کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی گواهی می نمایم چنانچه در پایان نامه خود از فکر، ایده و نوشته دیگری بهره گرفته ام با نقل قول مستقیم یا غیر مستقیم منبع و ماخذ آن را نیز در جای مناسب ذکر کرده ام . بدیهی است مسئولیت تمامی مطالبی که نقل قول دیگران نباشد بر عهده خویش می دانم و جوابگوی آن خواهم بود.

دانشجو تأیید می نماید که مطالب مندرج دراین پایان نامه(رساله) نتیجه تحقیقات خودش می باشد و در صورت استفاده از نتایج دیگران مرجع آن را ذکر نموده است.

مرجان مطیعی

تاریخ و امضاء

اینجانب مرجان مطیعی دانشجوی ورودی سال ۱۳۸۸ مقطع کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی گواهی می نمایم چنانچه براساس مطالب پایان نامه خود اقدام به انتشار مقاله، کتاب، و ... نمایم ضمن مطلع نمودن استاد راهنما، با نظر ایشان نسبت به نشر مقاله، کتاب، و ... و به صورت مشترک و با ذکر نام استاد راهنما مبادرت نمایم.

مرجان مطیعی

تاریخ و امضاء

شهریور ۱۳۹۰

به یاد می آورم لحظه های فراز را که صدای آنها اعتبارم بخشید و لحظه های نشیب را که اعتمادم ، به یاد می آورم افراهای افراشته را، به یاد می آورم پدرم، مادرم و خانواده ام را

تقدیم به شما

مرجان

استاد، پرورنده روان است و پدر و مادر، پرورش دهنده جان

دست استاد خویش را می بوسم، چون او هم پدر است هم پرورنده خرد...

بررسی و مقایسه پروتئین شوک حرارتی A2 (HSPA2) در مردان بارور و نابارور

چکیده

مقدمه: HSPA2 پروتئین شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی در سلول های اسپرماتوژنزی و اسپرم است که از نظر ساختمانی و به میزان زیاد در بیضه بیان می شود. HSPA2 روی سطح اسپرم انسان شناسائی شده و در دو فاز بیان می شود: ۱) میوز به عنوان محتوای کمپلکس سیناپتونمال و ۲) اسپرمیوژنز نهائی: در اسپرماتیدهای طویل و همزمان با حذف سیتوپلاسمی، بازسازی غشای پلاسمائی، و تشکیل جایگاه های اتصالی زونا. این پروتئین برای بلوغ گامتوسیت های مرد ضروری است و با ناباروری ارتباط دارد. بنابراین، هدف از این مطالعه ارزیابی HSPA2 با آنتی بادی پلی کلنال در مردان بارور و نابارور است.

روش ها: نمونه مایع منی ۴۷ فردنابارور و ۴۳ فرد بارور (گروه کنترل) که به مرکز باروری و ناباروری اصفهان مراجعه کردند، مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت، تحرک و مورفولوژی مایع منی مطابق دستورالعمل WHO بررسی شد. نمونه های مایع منی با کمک محلول Ham's F-10 شسته شده و پلت حاصل توسط سه تکنیک فلوسایتومتری، میکروسکپ فلورسنت و وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج: در تکنیک فلوسایتومتری، درصد اسپرم با HSPA2 مثبت بعد از فرایند ظرفیت یابی افزایش یافت و اختلاف معنی داری بین افراد بارور و نابارور بعد از فیکس و نفوذپذیرکردن غشا دیده شد. با کمک میکروسکپ فلورسنت این پروتئین در نواحی مختلف اسپرم شناسائی شد و از نظر نحوه جایگیری این پروتئین، بین افراد بارور و نابارور اختلاف معنی داری وجود داشت. در نهایت با کمک تکنیک وسترن بلات، اختلاف معنی داری در بیان این پروتئین در افراد بارور و نابارور دیده نشد. **و بحث و نتیجه گیری:** احتمالا بیان پروتئین HSPA2 در افراد بارور و نابارور تفاوتی نداشته و تفاوت مهم آنها در نحوه جایگیری این پروتئین در اسپرم است.

کلید واژه: پروتئین شوک حرارتی A2 (HSPA2)، نفوذپذیریریال ظرفیت یابی، بارور و نابارور

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: کلیات تحقیق..... ۱

۱-۱مقدمه..... ۲

۱-۲ اهداف و فرضیات پژوهشی..... ۳

۱-۲-۱ هدف کلی طرح..... ۳

۱-۲-۲ اهداف جزئی طرح..... ۳

۱-۲-۳ فرضیات پژوهشی..... ۳

فصل دوم: پیشینه تحقیق و مبانی نظری..... ۵

۲-۱پروتئین شوک حرارتی یاHeat Shock Protein..... ۶

۲-۱-۱ پروتئین شوک حرارتی کوچک و پروتئین های کریستالی..... ۱۱

۲-۱-۲ چاپرونین ها (خانواده HSP60/HSP10)..... ۱۲

۲-۱-۳ خانواده HSP70/HSP40..... ۱۲

۲-۱-۴ پروتئین شوک حرارتی ۹۰ کیلودالتونی و کوچاپرون ها..... ۱۳

۲-۱-۵ پروتئین شوک حرارتی ۱۰۰ کیلودالتونی..... ۱۴

۲-۱-۶ چاپرون های دیگر و پروتئین های استرس..... ۱۴

۲-۲ پروتئین شوک حرارتی HSP70..... ۱۵

۲-۲-۱ ساختمان و نحوه عملکرد پروتئین های خانواده HSP70..... ۱۶

۲-۳ پروتئین شوک حرارتی A2..... ۱۹

۲-۴ پروتئین شوک حرارتی ۷۰ کیودالتونی و مراحل تکاملی اسپرم.....۲۲
۲-۴-۱ پروتئین شوک حرارتی A2 و میوز.....۲۴
۲-۴-۲ پروتئین شوک حرارتی A2 و اسپرمیوژنز.....۲۷
۲-۴-۳ پروتئین شوک حرارتی A2 و ظرفیت یابی.....۳۰
۲-۵ پروتئین شوک حرارتی و فرایند لقاح.....۳۲
۲-۶ پروتئین شوک حرارتی و تکامل جنین.....۳۴
۲-۷ پروتئین های شوک حرارتی و آپوپتوز.....۳۵
۲-۷-۱ پروتئین های شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی و آپوپتوز.....۳۸
۲-۸ پروتئین های شوک حرارتی A2 و نقص های تکاملی.....۳۹
۲-۸-۱ پروتئین شوک حرارتی A2 و مورفولوژی.....۴۰
۲-۸-۲ پروتئین شوک حرارتی A2 و آسیب DNA.....۴۱
۲-۸-۳ پروتئین شوک حرارتی A2 و انوپلوئیدی.....۴۲
۲-۹ جایگیری پروتئین شوک حرارتی A2.....۴۳
فصل سوم:روش تحقیق.....۴۵
۳-۱ مواد و وسایل.....۴۶
۳-۲ محلول ها و بافرهای مورد نیاز.....۴۹
۳-۲-۱ محلول Ham's F10.....۴۹
۳-۲-۲ محلول PBS.....۴۹
۳-۲-۳ ژل ها و بافرهای مورد نیاز جهت وسترن بلات.....۴۹
۳-۲-۴ پارافرمالدئید۴٪.....۵۰

۳-۳ روش اجرای طرح..... ۵۱
۳-۳-۱ جمعیت مورد مطالعه..... ۵۱
۳-۳-۲ جمع آوری مایع منی..... ۵۲
۳-۳-۳ ارزیابی اولیه مایع منی..... ۵۲
۳-۳-۳-۱ بررسی ماکروسکپی (مشخصات فیزیکی)..... ۵۲
۳-۳-۳-۲ بررسی میکروسکوپی..... ۵۳
۳-۳-۴ روش انجام آزمایشات اختصاصی و تقسیم بندی نمونه ها..... ۵۶
۳-۳-۴-۱ آماده سازی و بررسی نمونه توسط فلوسایتومتری و میکروسکپ فلورسنت..... ۵۶
۳-۳-۴-۱-۱ آماده سازی نمونه های فیکس شده با غشای نفوذپذیر..... ۵۶
۳-۳-۴-۱-۲ آماده سازی نمونه های فیکس نشده با غشای نفوذناپذیر (قبل و بعد از ظرفیت یابی)..... ۵۶
۳-۳-۴-۱-۳ فلوسایتومتری..... ۵۸
۳-۳-۴-۲ وسترن بلات..... ۶۰
۳-۳-۴-۲-۱ آماده سازی نمونه و استخراج پروتئین..... ۶۰
۳-۳-۴-۲-۲ تعیین غلظت پروتئین..... ۶۱
۳-۳-۴-۲-۳ آماده سازی ژل پلی آکریل امید..... ۶۲
۳-۳-۴-۲-۴ الکتروفورز..... ۶۲
۳-۳-۴-۲-۵ انتقال نمونه از ژل به غشاPVDF در شرایط مرطوب..... ۶۲
۳-۳-۴-۲-۶ بلوکه کردن غشا..... ۶۳
۳-۳-۴-۲-۷ رنگ آمیزی با آنتی بادیهای اولیه و ثانویه..... ۶۳
۳-۳-۴-۲-۸ ردیابی محل حضور شناساگر متصل به آنتی بادی ثانویه..... ۶۴

۳-۵ روش های بررسی آماری..... ۶۴
فصل چهارم:یافته های تحقیق..... ۶۵
۴-۱بررسی پارامترهای اسپرمی..... ۶۶
۴-۲ بررسی HSPA2 توسط تکنیک فلوسایتومتری..... ۶۶
۴-۳ تعیین جایگیری پروتئین HSPA2 با کمک تکنیک میکروسکپ فلورسنت..... ۶۸
۴-۴ ارزیابی پروتئین HSPA2 با کمک تکنیک وسترن بلات..... ۶۹
فصل پنجم:جمع بندی و نتیجه گیری و ارایه پیشنهادات..... ۷۱
۵-۱ جمع بندی و نتیجه گیری..... ۷۲
۵-۱-۱ ارزیابی پروتئین HSPA2 توسط تکنیک فلوسایتومتری..... ۷۲
۵-۱-۲ ارزیابی پروتئین HSPA2 توسط میکروسکپ فلورسنت..... ۷۴
۵-۱-۳ ارزیابی پروتئین HSPA2 توسط وسترن بلات..... ۷۵
۵-۲ پیشنهادات..... ۷۵
فصل ششم:منابع..... ۷۷
۶-۱ کتاب..... ۷۸
۶-۲ مقاله..... ۷۸
۶-۳ سایت اینترنتی..... ۹۲

فهرست تصاویر

عنوان **صفحه**

شکل۲-۱: تنظیم بالای پروتئین شوک حرارتی..... ۶

شکل ۲-۲: دو عملکرد متفاوت پروتئین شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی..... ۷

شکل ۲-۳: علامت های فیزیولوژیکی که سبب بیان پروتئین شوک حرارتی می شوند..... ۹

شکل ۲-۴: ساختمان عمومی دنباله های HSP70..... ۱۷

شکل ۲- ۵: مراحل تشکیل اسپرماتوزوآ..... ۲۲

شکل ۲-۶: تنظیم چرخه چاپرون HSPA2 توسط هیستون رابط-tNASP..... ۲۵

شکل ۲-۷: تنظیم Hsp70-2 با میانجیگری Bat3..... ۲۶

شکل ۲-۸: بازسازی کروماتین در هنگام اسپرماتوژنز..... ۲۸

شکل ۲-۹: اساس مولکولی رخدادهای آهسته و سریع ظرفیت یابی در اسپرم..... ۳۱

شکل ۲-۱۰: مرحل انجام فرایند لقاح..... ۳۲

شکل ۲-۱۱: مراحل تکامل جنین..... ۳۴

شکل ۲-۱۲: دناتوره شدن پروتئین به عنوان علامتی برای فعال سازی پاسخ استرسی یا آپوپتوز عمل می کند..... ۳۵

شکل ۲-۱۳: جایگاههائی که HSP ها اثرات آنتی آپوپتوزی خود را ایفا می کند..... ۳۶

شکل ۲-۱۴: مدلی از اسپرم با بلوغ کم و نرمال..... ۴۱

شکل ۳-۱:فلوچارت روش های بررسی مایع منی..... ۵۱

شکل ۳-۲: نمودارهای آنالیز فلوسایتومتری..... ۵۹

شکل ۴-۱: مقایسه درصد اسپرم با HSPA2 مثبت قبل و بعد از ظرفیت یابی.....۶۶

شکل ۴-۲: مقایسه درصد اسپرم با HSPA2 مثبت در نمونه های فیکس شده با غشای نفوذپذیر در مقابل نمونه های فیکس نشده با غشای نفوذ ناپذیر در افراد بارور و نابارور.....۶۷

شکل ۴-۳: مقایسه در نمونه های اسپرمی قبل و بعد از ظرفیت یابی در افراد بارور و نابارور.....۶۷

شکل ۴-۴: ارتباط درصد اسپرم با HSPA2 مثبت با (A) غلظت و (B) مورفولوژی ناهنجار.....۶۸

شکل ۴-۵: بررسی جایگیری پروتئین HSPA2 در نواحی مختلف اسپرم.....۶۹

شکل ۴-۶: بیان پروتئین HSPA2/β-Actin در افراد بارور (ردیف های ۵-۶) و نابارور (ردیف های ۱-۴).....۷۰

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱: طبقه بندی پروتئین های شوک حرارتی براساس وزن مولکولی..... ۱۱

جدول ۲-۲: ایزوفرم های گوناگون خانواده HSP70 انسانی..... ۱۶

جدول ۳-۱: مواد و وسایل مورد استفاده..... ۴۶

جدول ۳-۲: دستگاه های مورد استفاده..... ۴۸

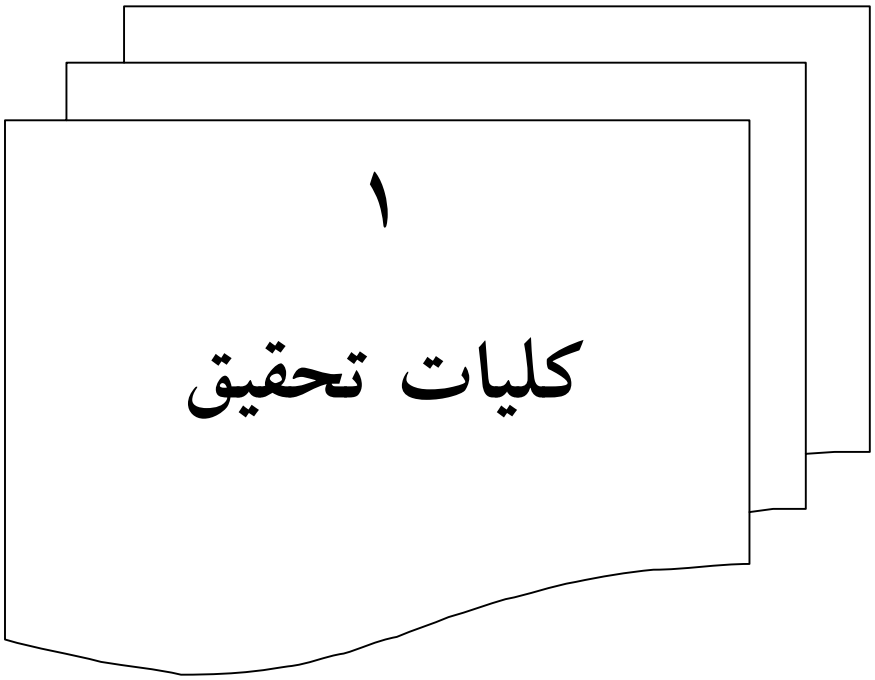
جدول۳-۳: مواد تشکیل دهنده دو ژل resolving و ژل stacking..... ۴۹

جدول ۳-۴: مواد تشکیل دهنده بافرهای مورد نیاز در وسترن بلات..... ۵۰

جدول ۳-۵: غلظت های متفاوت استاندارد جهت رسم نمودار..... ۶۱

جدول ۳-۶: فهرست آنتی بادی های اولیه و ثانویه..... ۶۳

جدول ۴-۱: مقایسه میانگین پارامترهای اسپرمی بین دو گروه بارورو نابارور..... ۶۶



۱

کلیات تحقیق

۱-۱ مقدمه

بارور بودن موهبتی الهی است که همچون حلقه ای ارزشمند نسل ها را بهم پیوند داده و نوع بشر، این هدیه آسمانی را به نسل های آینده می سپارد. بنابراین، باروری و داشتن فرزند در جامعه بشری از اهمیت بسزائی برخوردار است. ناباروری نیز، پدیده ای است که در طول تاریخ بشر با زندگی انسان درهم آمیخته و حتی در کتب آسمانی نیز از این حقیقت سخن به میان آمده، از آن جمله می توان به زندگی حضرت ابراهیم (ع) با همسرش ساره در سوره قصص اشاره نمود. ناباروری به عنوان یک بحران روانی، استرس زیادی را بر زوج های نابارور وارد نموده و به روش های گوناگونی سلامت روانی زوجین را تهدید می نماید. بنابراین برای حل این مشکل لازم است تدابیر اساسی جهت تشخیص و درمان آن به کار گرفته شود.

در ابتدا درمان ناباروری محدود به موارد خاص بود، لیکن با افزایش اطلاعات در مورد سلول های جنسی و ساختار و عملکرد آن و نیز افزوده شدن دانسته ها در رابطه با زیست شناسی تولید مثل، تدریجا گزینه هائی جدید، فراسوی جامعه بشری قرار گرفت. از این رو گروهی از محققان در این زمینه تحقیقات مؤثری انجام داده اند.

اسپرماتوزوآی مردان نابارور اغلب نقص های عملکردی و ساختاری متفاوتی دارند. یکی از عوامل شناخته شده مؤثر بر باروری مردان، پروتئین های شوک حرارتی هستند. حداقل پنج نوع متفاوت HSP70 در بیضه بیان می‌شود که نوع غالب آن HSPA2 است. HSPA2 چاپرونی مولکولی است که در تجمع، پیچش و انتقال ترانسممبر کمپلکس های پروتئینی با وساطت ATP در سیتوپلاسم، میتوکندری و شبکه اندوپلاسمی دخالت دارد. این پروتئین در دو مرحله میوز و اسپرمیوژنز بیان می گردد و نقش مهمی را درتمایز اسپرماتوژنزی به عهده دارد.

HSPA2 در مرحله پاکیتن اسپرماتوسیت اولیه با کمپلکس سیناپتونمال ارتباط داشته و سبب انجام میوز می شود. HSPA2 در اسپرماتیدهای طویل؛ در ترمیم DNA ، جابه جائی نوکلئوپروتئینی، جابه جائی پروتئین در حذف سیتوپلاسمی، تغییر وضعیت غشا پلاسمائی و تسهیل تشکیل جایگاه های اتصال منطقه شفاف دخالت دارد.

کاهش بیان HSPA2 با عدم حذف سیتوپلاسمی، کاهش جابجائی هیستون با پروتامین، افزایش آسیب DNA، میزان بالای انوپلوئیدی کروموزومی، عدم تغییروضعیت غشا پلاسمائی و آپوپتوز همراه است. عدم تغییروضعیت غشا پلاسمائی سبب نقص جایگاه های اتصال اسپرم- منطقه شفاف می گردد. عدم حذف سیتوپلاسمی نیز سبب ایجاد سر بزرگتر، گردتر و بی شکلتر شده که بر

طول دم اسپرم هم اثر گذاشته و آنرا کاهش می دهد. بنابراین، کاهش HSPA2 منجر به تغییر نسبت طول دم به طول محور سر شده و بر پارامترهای مورفومتریک اثر می گذارد .

با توجه به مطالعات انجام شده می توان HSPA2 را بعنوان یک مارکر بیوشیمیائی جهت بررسی بلوغ و عملکرد اسپرم در افراد بارور و نابارور معرفی کرد.

۱-۲ اهداف و فرضیات پژوهشی

۱-۲-۱ هدف کلی طرح

مقایسه و چگونگی میزان بیان پروتئین شوک حرارتی A2 (HSPA2) در نمونه مایع منی مردان بارور و نابارور

۱-۲-۲ اهداف جزئی طرح

۱- بررسی میزان بیان پروتئین HSPA2 در نمونه مایع منی مردان بارور و نابارور به روش وسترن بلات

۲- تعیین جایگیری پروتئین HSPA2 در نمونه مایع منی مردان بارور و نابارور با کمک میکروسکوپ فلورسنت

۳- تعیین درصد اسپرم های بیان کننده پروتئین HSPA2 در مردان بارور و نابارور به روش فلوسایتومتری

۴- مقایسه درصد اسپرم های بیان کننده پروتئین HSPA2 در مردان بارور و نابارور به روش فلوسایتومتری

۱-۲-۳ فرضیات پژوهشی

۱- پروتئین HSPA2 در نمونه مایع منی مردان بارور و نابارور به روش وسترن بلات شناسائی می شود.

۲- جایگیری پروتئین HSPA2 در نمونه مایع منی مردان بارور و نابارور با کمک میکروسکوپ فلورسنت تعیین می شود.

۳- درصد اسپرم های بیان کننده پروتئین HSPA2 در مردان بارور و نابارور به روش فلوسایتومتری تعیین می شود.

۴- درصد اسپرم های بیان کننده پروتئین HSPA2 در مردان بارور و نابارور به روش فلوسایتومتری مقایسه می شود.

۲

پیشینه تحقیق و مبانی نظری