به نام خدا

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

(گرایش سلولی تکوینی)

ارتباط پلی مورفیسم ژن ***GST-T1*** (گلوتاتیون **S** – ترانسفراز **T1**) با ناباروری ایدیوپاتیک مردان

از:

لیدا قلی زاده میشامندانی

اساتید راهنما:

دکتر زیور صالحی

دکترحمید رضا وزیری

استاد مشاور:

دکتر علی حمیدی مدنی

شهریور ۱۳۸۹

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

خداوند بزرگ را سپاس می گویم که با الطاف نامتناهی اش اسباب اجرای این پروژه را فراهم ساخت.
در ابتدا از خانواده ی عزیزم که در تمامی مراحل زندگی و تحصیل مرا همراهی و پشتیبانی کرده اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.
از اساتید راهنمای بزرگوار و فرزانه ام، سرکار خانم دکتر زیور صالحی و جناب آقای دکتر حمید رضا وزیری که در تمامی مراحل اجرای این پروژه از رهنمود ها و تجارب ارزشمند شان بهره مند شدم، کمال تشکر را دارم و برایشان از درگاه حق آرزوی سلامت و سعادت دارم. از استاد مشاور بزرگوارم جناب آقای دکتر علی حمیدی مدنی به خاطر راهنمایی ها و حمایت های بی دریغشان کمال تشکر را دارم و برای ایشان آرزوی توفیق روز افزون دارم. از اساتید گرامی جناب آقای دکتر فرهاد مشایخی و جناب آقای دکتر علی نیک پی که قبول زحمت فرموده و داوری پایان نامه ی اینجانب را پذیرفته اند، بی نهایت سپاسگزارم و سر بلندی و سعادت ایشان را از درگاه حق خواستارم. از سرکار خانم دکتر جنت سرمد نماینده ی محترم کمیته ی تحصیلات تکمیلی به خاطر حضور ارزشمند شان در جلسه ی دفاع کمال تشکر را دارم و سعادت و بهروزی ایشان را آرزومندم.
لازم می دانم از کارشناسان محترم آزمایشگاه های گروه زیست شناسی، سرکار خانم ها شایگان، هادوی و امیدی و دوستان عزیزم در آزمایشگاه های تکوین و بیوشیمی که در انجام این پروژه مرا یاری نموده اند، صمیمانه سپاسگزاری نمایم.
از دوستان عزیز و مهربانم، خانم ها پریچهر زمانی و لاله میرزا نژاد که طی انجام این پروژه مرا همراهی نموده اند، بسیار متشکرم.
در پایان از همه ی کسانی که به طریقی مرا در اجرای این پروژه همراهی کرده اند، تشکر می نمایم.

لیدا قلی زاده
شهریور ۱۳۸۹

ارتباط پلی مورفیسم ژن *GST-T1* (گلوتاتیون S- ترانسفراز T1) با ناباروری ایدیوپاتیک مردان

چکیده

ناباروری مردان یک اختلال چند عاملی (Multifactorial) است و فاکتورهای ژنتیکی و محیطی مختلفی در بروز آن نقش دارند. بخش اعظم موارد ناباروری مردان با نواقص سیستمیک مانند دیابت، چاقی، واریکوسل، سیستیک فیبروزیز و یا با عدم تعادل مقادیر استروئید های گنادی و هورمون های تروفیک، موتاسیون های ژنی و عفونت های دستگاه تناسلی در ارتباط است. اما تقریباً در ۲۵ درصد موارد ناباروری مردان، علت دقیق ناباروری مشخص نیست که این ها به عنوان موارد ناباروری ایدیوپاتیک معرفی می شوند. پلی مورفیسم های ژنتیکی آنزیم های سم زدا، مانند گلوتاتیون S- ترانسفراز ها (GSTs) ممکن است نقش مهمی را در آمادگی برای ابتلا به ناباروری ایدیوپاتیک مردان ایفا کنند. ژن های گلوتاتیون S-ترانسفرازها (GSTs) خانواده ی بزرگی از آنزیم ها را کد می کنند که این آنزیم ها توسط واکنش های کاتالیز شده بین گلوتاتیون و ترکیبات الکتروفیل، در متابولیسم کارسینوژن های محیطی، گونه های واکنش پذیراکسیژن و عوامل شیمی درمانی شرکت می کنند. GSTT1 در واکنش های فعالسازی و سم زدایی نقش دارد و اتصال مواد شیمیایی صنعتی مانند اتیلن اکسیدها را به گلوتاتیون کاتالیز می کند. ژن *GSTT1* روی کروموزوم 22q11.2 قرار گرفته است و دارای پلی مورفیسم عملکردی به فرم حذف هموزیگوت ژن است که منجر به از بین رفتن فعالیت فنوتیپی آنزیم اش می شود. اختلافات (تنوعات) نژادی و قومی در فراوانی حذف این ژن در جمعیت های مختلف وجود دارد. هدف تحقیق حاضر، بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن *GSTT1* با ناباروری ایدیوپاتیک مردان در جمعیتی از شهرستان رشت بود. بدین منظور، از ۵۰ مرد مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک و ۳۰ داوطلب سالم نمونه ی خون جمع آوری شد. DNA ژنومی از لوکوسیت های خون محیطی استخراج گردید. فراوانی ژنوتیپ ها با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) در بیماران و کنترل های سالم تعیین شد. اختلاف معنی داری در فراوانی ژنوتیپ نول *GSTT1* بین بیماران و کنترل ها مشاهده نشد (χ^2=0.577, P=0.447). فراوانی ژنوتیپ نول *GSTT1* در گروه بیمار 6% بود، در مقایسه با گروه کنترل که درآن ها ٪ 0 بود. بررسی حاضر پیشنهاد می کند که ژنوتیپ نول *GSTT1* با خطر بالای ناباروری ایدیوپاتیک مردان در جمعیت مورد مطالعه در ارتباط نیست، اما این مشاهدات به تأیید بیشتر، در یک تحقیق بزرگ چند قومیتی (چند نژادی) نیاز دارد.

کلمات کلیدی: گلوتاتیون S- ترانسفراز T1، پلی مورفیسم ژنی، ناباروری ایدیوپاتیک مردان، حذف ژن

ر

Association of *GST-T1* gene polymorphism (Glutathione S-Transferase T1) with idiopathic male infertility

Abstract

Male infertility is a multifactorial disorder, with various genetic and environmental factors. A large proportion of male infertility cases are associated either with systemic defects such as diabetes, obesity, varicocele, cystic fibrosis or else with imbalance in levels of gonadal steroids and trophic hormones, gene mutations and genital tract genital tract infections. However, in nearly 25% cases of male infertility, the exact cause of infertility is not clear. These are identified as cases of idiopathic infertility. Genetic polymorphisms of detoxicating enzymes, such as Glutathione S-transferases (GSTs), may play an important role in susceptibility to idiopathic male infertility. Glutathione S-transferases (GSTs) genes code for a superfamily of enzymes that are involved in the metabolism of environmental carcinogenes, reactive oxygens and chemotherapeutic agents by catalyzing reactions between glutathione and electrophilic compounds. GSTT1 is involved in activation and detoxification reactions and catalyzes the conjugation of industrial chemicals, e.g. ethylene oxides, with glutathione. *GSTT1* gene located on chromosome 22q11.2, has functional polymorphism in the form of homozygous deletion of gene leading to absence of its phenotypic enzyme activity. There are racial and ethnic variations in the frequency of gene deletion in different population. The aim of the present study was to examine the association of the *GSTT1* gene polymorphism with idiopathic male infertility in a population of Rasht. For this study, blood samples were collected from 50 male with idiopathic infertility and 30 healthy volunteers. Genomic DNA was prepared from peripheral blood leukocytes. Genotypes frequencies were determined in patients and healthy controls using polymerase chain reaction (PCR). No significant difference of the frequency of *GSTT1* null was observed between patients and controls (χ^2=0.577, P=0.447). The prevalence of *GSTT1*-null genotype in the patient group was 6%, compared to 0% in the control group. The present study suggests that *GSTT1* null genotype is not associated with higher risk of idiopathic male infertility; these observations, however, requiring further confirmation in a larger multi-ethnic study.

Key words: GSTT1, gene polymorphism, idiopathic male infertility, gene deletion

فهرست مطالب

عنوان ..... صفحه

چکیده فارسی .....ذ

چکیده انگلیسی .....ر

فصل اول: مقدمه

۱- مقدمه ۱

۱-۱- شیوع ناباروری ۱

۱-۲- ناباروری با فاکتور مردانه ۲

۱-۲-۱- بررسی ناباروری در مردان ۲

۱-۲-۱-۱- آنالیز مایع منی ۳

۱-۳- علت شناسی ناباروری مردان ۵

۱-۳-۱- وقوع فرآیند اسپرماتوژنز.....۵

۱-۳-۱-۱- تنظیم هورمونی اسپرماتوژنز.....۷

۱-۳-۱-۱-۱- مکانیسم تنظیم هورمونی اسپرماتوژنز ۷

۱-۳-۲- طبقه بندی علل ناباروری در مردان ۸

۱-۳-۲-۱- اختلالات اسپرماتوژنیک ۹

۱-۳-۲-۱-۱- عوامل ژنتیکی ۹

۱-۳-۲-۱-۲- عوامل اکتسابی ۱۰

الف) عوامل محیطی ۱۰

۱- الف- شیوه ی زندگی و عادات فردی ۱۰

۱- الف-۱- چاقی ۱۰

عنوان .....صفحه

۱- الف-۲- استعمال سیگار.....۱۱

۱- الف-۳- مصرف الکل ۱۱

۱- الف-٤- استرس ۱۱

۱- الف-۵- گرمای زیاد ۱۲

ب) بیماری های سیستمیک و عفونت ها ۱۲

۱-۳-۲-۱-۳- اختلالات تکاملی ۱۲

الف) ناهنجاری های عروقی در بیضه ها.....۱۲

ب) کریپتورکیدیسم ۱۲

۱-۳-۲-۲- اختلالات انتقال اسپرم ۱۳

الف) عوامل مادرزادی ۱۳

ب) عوامل اکتسابی ۱۳

۱-۳-۳- ارتباط بین سن مردان و ناباروری ۱٤

۱-۳-٤- ناباروری ایدیوپاتیک مردان ۱٤

۱-۳-٤-۱- عوامل محیطی ۱۵

۱-۳-٤-۲- عوامل ژنتیکی ۱٦

۱-۳-٤-۲-۱-گلوتاتیون S- ترانسفرازها (GSTs) ۱۷

۱-۳-٤-۲-۲-گلوتاتیون (GSH) ۱۷

۱-۳-٤-۲-۳- اعمال گلوتاتیون S – ترانسفرازها ۱۹

۱-۳-٤-۲-٤- مکانیسم عمل گلوتاتیون S – ترانسفرازها ۲۰

۱-۳-٤-۲-۵- طبقه بندی گلوتاتیون S – ترانسفرازها ۲۰

۱-۳-٤-۲-۵-۱- خانواده ی گلوتاتیون S - ترانسفرازهای سیتوزولی ۲۱

عنوان ..... صفحه

۱-۳-٤-۲-٥-۱-۱- ساختار گلوتاتیون S- ترانسفرازهای سیتوزولی ۲۱

۱-۳-٤-۲-٥-۱-۲- خانواده ی ژنی گلوتاتیون S- ترانسفرازهای Theta انسان ۲٤

۱-۳-٤-۲-٥-۱-۲-۱- ژن گلوتاتیون S- ترانسفراز T1 (*GSTT1*) ۲٤

۱-۳-٤-۲-٥-۱-۲-۲- محصول ژن *GSTT1* ۲٥

۱-۳-٤-۲-۱-۱- پلی مورفیسم یا چند شکلی ژنتیکی ۲٥

۱-۳-٤-۲-۱-۱-۱- پلی مورفیسم ژن های گلوتاتیون S- ترانسفرازها ۲۷

۱-۳-٤-۲-۱-۱-۱-۱-پلی مورفیسم ژن *GSTT1* ۲۷

۱-۳-٤-۲ -۱-۱-۱-۱-۱- پلی مورفیسم حذف گلوتاتیون S- ترانسفراز T1 و بیماری زایی ۲۹

- هدف از تحقیق ۳۰

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱- مواد و لوازم مورد نیاز.....۳۲

۲-۱-۱- مواد و لوازم مورد نیاز جهت نمونه گیری ۳۲

۲-۱-۲- مواد و لوازم مورد نیاز جهت استخراج DNA از لوکوسیت های خون محیطی ۳۲

۲-۱-۳- مواد و لوازم مورد نیاز در الکتروفورز ژل آگارز جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده ۳۲

۲-۱-٤- مواد و لوازم مورد نیاز جهت انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) ۳۳

۲-۱-٥- مواد و لوازم مورد نیاز در الکتروفورز محصولات PCR به کمک ژل آگارز ۳٤

۲-۱-٦- مواد و لوازم مورد نیاز در الکتروفورز محصولات PCR به کمک ژل پلی آکریل آمید ۳٤

۲-۱-۷- آماده سازی بافرها و محلول ها ۳٥

الف) بافر TBE با غلظت 10X (TBE -10X) ۳٥

ب) بافر TBE با غلظت 1X (TBE -1X) ۳٥

عنوان ..... صفحه

پ) محلول استوک آکریل آمید ۳۰ درصد ۳۵

ت)محلول آمونیوم پرسولفات (APS) ۱۰ درصد ۳۶

ث) بافر A (بافر تثبیت کننده) ۳۶

ج) بافر B (بافررنگ آمیزی) ۳۶

چ) بافر C (بافر ظاهرسازی) ۳۶

۲-۲- لیست اسامی دستگاه ها و تجهیزاتی که به وفور در آزمایشگاه مورد استفاده قرار می گیرند ۳۷

۲-۳- روش کار ۳۸

۲-۳-۱- نمونه گیری ۳۸

۲-۳-۲- استخراج DNA ژنومی از خون ۳۸

۲-۳-۳- ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده به کمک ژل آگارز (الکتروفورز افقی) ۳۹

۲-۳-٤- واکنش زنجیره ای پلی مراز (Polymerase Chain Reaction= PCR) ٤۰

۲-۳-٤-۱- انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) ٤۱

۲-۳-٤-۲- آغازگرهای (Primers) مورد استفاده برای تکثیر ژن *GSTT1* ٤۲

۲-۳-٤-۳- چرخه ی حرارتی PCR ٤۳

۲-۳-٤-٤- پروفایل حرارتی PCR ٤٤

۲-۳-۵- الکتروفورز محصولات PCR ٤۵

۲-۳-۵-۱- ارزیابی محصولات PCR به روش الکتروفورز عمودی ٤۵

۲-۳-۵-۱-۱- آماده سازی ژل پلی آکریل آمید ۷ درصد ٤۵

۲-۳-۵-۱-۲- رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید با نیترات نقره ٤٦

۲-۳-۵-۲- ارزیابی محصولات PCR به روش الکتروفورز افقی ٤٦

عنوان ..... صفحه

۲-۳-۵-۲-۱- آماده سازی ژل آگارز ۲ درصد ۴۷

- آنالیز آماری ۴۷

فصل سوم: نتایج

۳- نتایج ۴۹

۳-۱- خصوصیات نمونه ها ۴۹

۳-۲- نتایج بررسی های مولکولی.....۵۰

۳-۲-۱- نتایج بررسی کیفیت DNA استخراج شده توسط ژل آگارز ۰/۸ درصد (الکتروفورز افقی) ۵۰

۳-۲-۲- نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) ۵۱

۳-۲-۲-۱- بررسی کیفیت قطعات DNA تکثیر شده توسط ژل پلی آکریل آمید ۷ درصد (الکتروفورز عمودی) ۵۲

۳-۲-۲-۲- بررسی کیفیت قطعات DNA تکثیر شده توسط ژل آگارز ۲ درصد (الکتروفورز افقی).....۵۳

۳-۳- نتایج حاصل از بررسی فراوانی حذف ژن *GSTT1* در مردان مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک و مردان سالم ۵۵

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴- بحث و نتیجه گیری ۵۸

منابع ۶۴

پیوست ۷۸

فهرست اشکال

عنوان ..... صفحه

شکل (۱-۱): دستگاه تولید مثلی مرد ٦

شکل (۱-۲): دیاگرام شماتیکی از تنظیم هورمونی اسپرماتوژنز ۸

شکل (۱-۳): ساختار گلوتاتیون تری پپتید ۱۸

شکل (۱-٤): واکنش آنزیمی اتصال دی کلرومتان به گلوتاتیون که توسط گلوتاتیون S- ترانسفرازها کاتالیز می شود.....۲۰

شکل (۱-۵):ساختار دایمری گلوتاتیون S- ترانسفرازهای سیتوزولی ۲۳

شکل (۱-٦): جایگاه ژنومی خانواده ی ژنی گلوتاتیون S- ترانسفراز Theta روی کروموزوم ۲۲ .....۲٤

شکل (۱-۷): ساختار ژن *GSTT1* ۲۵

شکل (۱-۸): نحوه ی ایجاد آلل نول ژن *GSTT1* ۲۹

شکل (۲-۱): Alignment آغازگرهای مورد استفاده در تحقیق با توالی ژن *GSTT1* انسان ٤۲

شکل (۲-۲): پروفایل حرارتی PCR ٤٤

شکل (۳-۱): DNA ژنومی استخراج شده ازلوکوسیت های خون محیطی روی ژل آگارز ۰/۸ درصد ۵۱

شکل (۳-۲): ژل پلی آکریل آمید ۷ درصد مربوط به الکتروفورز محصولات PCR.....۵۲

شکل (۳-۳): ژل آگارز ۲ درصد مربوط به الکتروفورز محصولات PCR ۵٤

شکل (۳-٤): مقایسه ی فراوانی ژنوتیپ *GSTT1* در دو گروه بیمار و کنترل ۵۷

فهرست جداول

عنوان ..... صفحه

جدول (۱-۱): مقادیر استاندارد آنالیز مایع منی ۳

جدول (۱-۲): اصطلاحات تشخیصی در ارتباط با ناهنجاری های مایع منی ٤

جدول (۱-۳): رده های مختلف گلوتاتیون S- ترانسفرازهای سیتوزولی انسان ۲۲

جدول (۲-۱): مواد مصرفی در Internal Standard-Controlled PCR ٤۱

جدول (۲-۲): مشخصات آغازگرهای ژن *GSTT1* ٤۳

جدول (۲-۳): چرخه ی حرارتی PCR ٤۳

جدول (۳-۱): نتایج آنالیز مایع منی بر اساس پارامترهای اسپرم در مردان مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک ٤۹

جدول (۳-۲): فراوانی ژنوتیپ *GSTT1* در دو گروه بیمار و کنترل ٥٦

۱- مقدمه

یکی از مسائل مهم علم پزشکی در تمام جوامع بشری، مشکل کاهش باروری و ناباروری است. کاهش باروری که با افزایش تقاضا برای درمان همراه است، یکی از نگرانی های جدی سال های اخیر به شمار می رود (Leridon & Slama, 2008). در تعریف، ناباروری به عدم موفقیت در بارداری پس ازگذشت یکسال مقاربت های متوالی و موفق زوجین، آن هم بدون بهره‌گیری از روش های جلوگیری از بارداری اطلاق می شود (Rowe *et al.*, 2000). از آنجایی که ناباروری توانایی بچه دار شدن یک فرد را تحت تأثیرقرارمی‌دهد، در نگاه اول ممکن است به عنوان یک مشکل فردی در نظر گرفته شود، اما ناباروری پیامد های روانی- اجتماعی، فیزیولوژیکی، اقتصادی و خانوادگی را نیز به همراه دارد (Sharlip *et al.*, 2002).

۱-۱- شیوع ناباروری[1]

با توجه به پدیده های اجتماعی مانند تمایل برای ازدواج و بچه دار شدن در سنین بالاتر و همچنین افزایش استفاده از روش های جلوگیری از بارداری، میزان ناباروری در۳۰ سال اخیر افزایش یافته است (Bentley *et al.*, 2000). ناباروری بیش از ۱۵ درصد زوج های در سن تولید مثل را در سرتاسر جهان تحت تاثیر قرار می دهد (Pasqualotto *et al.*, 2004). با توجه به رشد و توسعه ی جوامع بشری و استفاده ی روز افزون از مواد شیمیایی مضر و همچنین با در نظر گرفتن تغییر الگوی زندگی و عادات فردی، این احتمال وجود دارد که در سال های آینده میزان ناباروری رو به افزایش رود. اما درعین حال، با پیشرفت علم پزشکی و دسترسی به ابزارهای تشخیصی و روش های درمانی جدید، امید به بهبود این معضل و شانس بچه دار شدن افراد نسبت به گذشته افزایش یافته است. به طور کلی، ناباروری می تواند ناشی از فاکتورهای مردانه، زنانه، فاکتورهای مرکب[2] از هر دو و یا دلایل ناشناخته باشد (Jaffe & Jewelewicz, 1991; Collins *et al.*, 1995).

1- Prevalence of infertility

2- Combined factors

۱-۲- ناباروری با فاکتور مردانه[1]

تقریباً ۲۰ درصد موارد ناباروری، منحصراً در نتیجه ی فاکتور مرد است و در ۴۰-۳۰ درصد از موارد، فاکتور زن و مرد هر دو در این زمینه نقش دارند (Mosher & Pratt, 1991; Thonneau *et al.*, 1991). بنابراین فاکتور مرد در نیمی از موارد ناباروری دخالت دارد. هم اکنون حدود ۷-۵ درصد کل جمعیت مردان در دنیا ازناباروری رنج می برند (Carlsen *et al.*, 1992; Auger *et al.*, 1995)و شاخص های آماری نشان می دهند که وقوع سالانه ی ناباروری مردان، حداقل ۲ میلیون مورد است. اصطلاح ناباروری مردان نشان دهنده ی یک سندروم کلینیکی تعریف شده نیست، بلکه مجموعه ای از موقعیت ها و علل مختلف را شامل می شود (Peterson, 2006).

۱-۲-۱- بررسی ناباروری در مردان

بررسی برای ناباروری معمولاً بعد از یکسال مقاربت منظم (بدون بهره گیری از روش های جلوگیری از بارداری) زوجین و عدم کسب نتیجه مورد نظر آغاز می شود. بررسی ناباروری مردان نیازمند کسب اطلاعاتی از تاریخچه، آزمایش فیزیکی، اندازه گیری سطح سرمی هورمونهای تولید مثلی، آنالیزمایع منی، بعضاً آنالیز ژنتیکی و ارزیابی موفقیت قبلی فرد در بچه دار شدن است، که این اطلاعات هم با کمک روش های غیرتهاجمی به دست می آیند (Guigan *et al.*, 1999). به منظور سنجش ناباروری در مردان، پزشکان معمولاً با یک تاریخچه ی پزشکی از رشد دوران طفولیت وبزرگسالی، عفونت های گذشته، جراحی ها، بیماری های منتقل شونده از طریق جنسی، آسیب به بیضه ها، عادات اجتماعی و شغلی و تماس محیطی با داروها یا مواد شیمیایی مضر آغاز می کنند. در ادامه، یک معاینه ی فیزیکی جهت جستجوی علائمی مبنی بر وجود هر گونه ناهنجاری های آناتومیکی در اندام تناسلی مرد مانند واریکوسل[2]، بیضه های کوچک یا نزول نکرده و یا شرایط دیگری که باروری را تحت تأثیرقرار می دهند و همچنین آزمایشات خون به منظور جستجوی نقص های هورمونی و دلایل ژنتیکی ناباروری انجام می شوند. اما ضروری ترین مرحله در سنجش ناباروری مردان، آنالیز مایع منی است، زیرا با کمک این آنالیز می توان فعالیت تولید مثلی مرد را ارزیابی و شدت ناباروری را تشخیص داد (Bradley *et al.*, 2005).

1- Male Factor Infertility

2- Varicocele

۱- ۲-۱-۱- آنالیز مایع منی

آنالیز متعارف مایع منی، مفیدترین و اساسی ترین بررسی در سنجش مردان است، بطوری که همه ی سرنخ ها برای هرنوع مشکل ناباروری (هورمونی یا ساختاری) در این مایع یافت می شود (Gyllenborg *et al*., 1999; Dohle, 2003). این آنالیز همچنین به عنوان اساس سنجش آزمایشگاهی مردان نابارور در نظر گرفته می شود. این تست ارزان و انجام آن آسان است و اطلاعات با ارزشی را فراهم می کند (Bigelow *et al*., 1998). اما از معایب این تست این است که درخصوص سلامت ماده ی ژنتیکی اسپرم اطلاعاتی را فراهم نمی کند. آنالیزاستاندارد مایع منی شامل اندازه گیری پارامترهای خاصی از اسپرم مانند تعداد، تحرک و مورفولوژی آن است. تعداد اسپرم متحرک و یا کیفیت تحرک اسپرم مهمترین پارامترهای اسپرم در ارتباط با حاملگی است (Mortimer, 1994; Sherins, 1995). معمولاً در یک آنالیز منی، علاوه بر پارامترهای اسپرم، برخی ازخصوصیات این مایع مانند ظاهر، حجم، pH و قابلیت دوام (Viability) آن که می توانند تعیین کننده های مهم صلاحیت عملکردی اسپرم باشند، نیز اندازه گیری می شوند (Gyllenborg *et al*., 1999; Dohle, 2003). جدول (۱-۱) مقادیر استاندارد آنالیز مایع منی را که در سال ۱۹۹۹ مطابق معیار های سازمان سلامت جهانی (WHO) گزارش شد را نشان می دهد.

جدول (۱-۱): مقادیر استاندارد آنالیز مایع منی. بر گرفته از؛ (World Health Organization Laboratory, 1999)

standard values for semen analysis according to the World Health Organization (WHO) criteria	
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

هنگامی که نتایج آنالیز مایع منی مطابق با معیارهای سازمان سلامت جهان (WHO) غیر طبیعی باشد، ناباروری با فاکتور مرد (MFI) تشخیص داده می شود (World Health Organization, 1999). برخی از اصطلاحاتی که برای توصیف ناهنجاری های مایع منی به کار می رود، در جدول (۱-۲) آورده شده است.

جدول (۱-۲): اصطلاحات تشخیصی در ارتباط با ناهنجاری های مایع منی.

Diagnostic Terms Related to Semen Abnormalites
Aspermia: Complete lack of semen **Oligospermia:** Very few sperm in semen <20 x 10^6/ml (WHO) **Azoospermia:** No sperm in semen **Severe oligospermia** <5 x 10^6/ml **Asthenospermia:** Poor motility of sperm **Teratospermia:** Abnormal sperm forms <30% (WHO), <14% **Oligoasthenospermia:** Oligospermia with decreased sperm motility **Oligoasthenoteratozoospermia:** Disturbance of all three variables

برگرفته از؛ (Hadziselimovic & Herzog, 2001; Immarrone *et al*., 2003)

از بین ناهنجاری های مایع منی، الیگواسپرمی به عنوان شایع ترین علت منفرد مسئول ناباروری مردان محسوب می شود. الیگواسپرمی به موقعیتی اطلاق می شود که در آن تعداد کم اسپرم در مایع منی وجود داشته باشد و این تعداد کم به صورت کمتر از۲۰ میلیون اسپرم در هر میلی لیتر مایع منی تعریف می شود. الیگواسپرمی ممکن است حاصل برخی از اختلالات ژنتیکی، مشکلات هورمونی، انزال روبه عقب[1]، واریکوسل یا مشکلات بیضوی درخصوص تولید اسپرم باشد. حدود ۵۰ درصد موارد الیگواسپرمی، با ناهنجاری های کروموزومی اسپرم در ارتباط است (Grimes & Lopez, 2007).

1- Retrograde ejaculation

۱-۳- علت شناسی ناباروری مردان

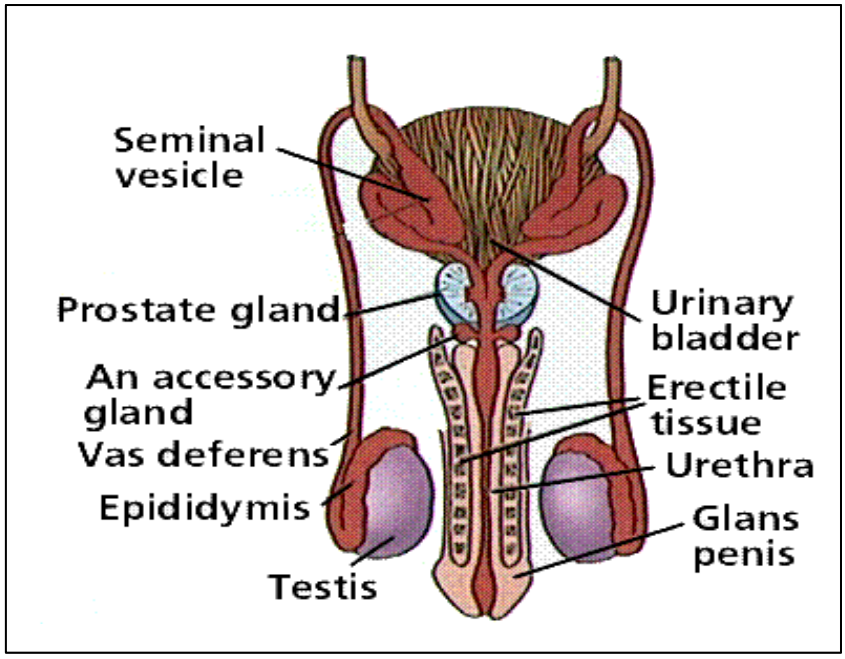
ناباروری مردان به صورت یک سندروم چند عاملی[1] تعریف می شود که می تواند طیف وسیعی از اختلالات را شامل شود، به عبارتی علل بروز ناباروری در مردان متعدد می باشد (Peterson, 2006). از آنجایی که باروری حاصل عملکرد تشکیلات ژنتیکی فرد و میانکنش آن با محیط است (Shah *et al*., 2003)، بنابر این دور از انتظار نخواهد بود که عوامل مختلفی از قبیل اختلالات ژنتیکی و عوامل محیطی (اکتسابی) روی قدرت باروری در هر دو جنس تاثیرگذار باشند و بتوانند منجر به ناباروری در آن ها شوند (Leke *et al*., 1993). علیرغم پیشرفت های روز افزون علم پزشکی، در حال حاضر علت دقیق ناباروری دراغلب مردان نابارور قابل تشخیص نمی باشد (Baker *et al*., 1986; Comhaire *et al*.,1987). ازنظر کلینیکی ناباروری مردان به صورت نواقصی در یک یا چند پارامتر از پارامترهای مایع منی و اسپرم های موجود در آن شناخته می شود. این ناهنجاری ها که شامل اختلالاتی در تعداد، تحرک، مورفولوژی و عملکرد اسپرم و یا تغییراتی در حجم و پارامترهای دیگر مایع منی می باشند، حاصل تغییراتی در فرآیند پیچیده ی اسپرماتوژنز در مردان اند و به علت پیچیدگی این فرآیند، تاکنون اطلاعات کمی درخصوص عواملی که منجر به بروز اختلال در آن می شوند در دسترس است (Cooper *et al*., 2010).

۱-۳-۱- وقوع فرآیند اسپرماتوژنز

دستگاه تولید مثلی مرد شامل گنادهای نر(بیضه ها) و مجموعه ای از مجاری و غدد ضمیمه است. دو عملکرد اصلی این دستگاه، تولید سلول های جنسی مرد (اسپرم) و سنتز هورمون های مردانه (آندروژن ها) است. اسپرم پس از تولید درون بیضه ها از میان مجاری تولید مثلی که شامل اپی دیدیم، مجاری دفران، مجاری انزال و پیشابراه می باشند، عبور می کند و در این مسیر ترشحات حاصل از غدد ضمیمه ی دستگاه تناسلی مانند پروستات و وزیکول سمینال به اسپرم اضافه شده و در نهایت اسپرم ازطریق انزال[2]، همراه با مایع منی که ترکیبی از ترشحات بیضه ها و غدد ضمیمه تناسلی است از دستگاه تولید

1- Multifactorial syndrome
2- Ejaculation

مثلی مرد خارج می شود (Valerie *et al.*,2000). در شکل (١- ١) ساختار دستگاه تولید مثلی مرد نشان داده شده است.



شـکل (١- ١): دستگاه تولید مثلی مرد. برگرفته از؛ (http://www.sinauer.com)

تولید سلول های جنسی مرد که رابطه ی مستقیمی با قدرت تولید مثـل و بـاروری در مـردان دارد، طـی فرآینـد پیچیـده ای، معروف به اسپرماتوژنز، اتفاق می افتد. اسپرماتوژنز فرآیندی است که طی آن اسپرم (اسپرماتوزوآ) بالغ ایجاد مـی شـود. ایـن فرآیند در پستانداران طی چرخه هایی درون لوله های پیچ خورده بیضه ای معروف به لوله های سـمینیفر[1]رخ مـی دهـد و در مورد انسان تقریباً ۶۴ روز به طول می انجامد (Heller *et al.*, 1963). سرانجام، تکامل اسپرم توسط سیستم انـدوکرین از طریق محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گناد[2] کنترل می شود.

1- Seminiferous tubules

2- Hypothalamus - Pituitary - Gonadal axis

۱-۳-۱-۱- تنظیم هورمونی اسپرماتوژنز

اسپرماتوژنز فرآیندی است که سیستم اندوکرین کنترل ویژه ای را روی آن اعمال می کند، آن چنان کـه آغـاز اسـپرماتوژنز در زمان بلوغ در نتیجه ی میانکنش های بین سیستم اندوکرین و بیضه ها رخ مـی دهـد. ایـن تنظـیم هورمـونی در گونـه هـای مختلف، مکانیسم های متفاوتی دارد که در مورد انسان این مکانیسم ها به طور کامل درک نشده است. مهمترین هورمون های تنظیم کننده ی اسپرماتوژنز در انسان شامل هورمون آزاد کننده ی گنـادوتروپین[1](GnRH)، گنـادوتروپین هـا، پـرولاکتین و هورمون های استروئیدی (مانند تستوسترون) می باشند(Pareek *et al.*, 2007).

۱-۳-۱-۱-۱- مکانیسم تنظیم هورمونی اسپرماتوژنز

اسپرماتوژنز تحت کنترل هورمون آزاد کننده ی گنادوتروپین[1](GnRH) ترشح شده از هیپوتالاموس است. این هورمون باعث آزاد شدن گنادوتروپین ها – هورمون محرک فولیکـول[2](FSH) و هورمـون لوتئـال[3](LH)- از غـده ی هیپـوفیز مـی شـود (Evers & Collins, 2004)و این گلیکوپروتئین های هیپوفیزی در عوض اعمالی را درون بیضـه هـا تنظـیم مـی کننـد، آنچنان که بیضه ها در پاسخ به هورمون LH، هورمون های استروئیدی (عمدتاً تستوسترون) تولید می کنند و تستوسترون در غلظت های موضعی بالا برای آغاز و حفظ فرآیند اسپرماتوژنز مورد نیاز است (Colie, 1993). از طـرف دیگـر، هورمـون FSH با حفظ غلظت تستوسترون به تولید طبیعی اسپرم کمک مـی کنـد. همچنـین مطالعـات اخیـر پیشـنهاد مـی کننـد کـه گنادوتروپین ها از طریق سرکوب سیگنال های پیش آپوپتوزیز[4]هم می توانند اسپرماتوژنز را حمایت کنند (Pareek *et al.*, 2007).

هورمون دیگری که نقش تنظیمی در این فرآیند ایفا می کند، پرولاکتین است که از غده ی هیپوفیز ترشح مـی شـود. این هورمون از طریق کنترل میزان گنادوتروپین ها، اثر خود را اعمال می کند، به عنوان مثال درغلظت های بالا می تواند تولید گنادوتروپین ها را مهار کند، که البته این حالت در زنان معمول تر است (Evers & Collins, 2004). در شـکل (۱- ۲) مسیر تنظیم هورمونی اسپرماتوژنز به صورت شماتیک نشان داده شده است.

1- Gonadotropin - releasing hormone
2- Follicle Stimulating Hormone
3- Lutenising Hormone
4- Proapoptosis signals