



دانشگاه گیلان

دانشکده علوم پایه
پایان نامه کارشناسی ارشد

بررسی پلی مورفیسزم ژن PON در مردان مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک

از

ستاره بهروزی

استاد راهنما

دکتر فرهاد مشایخی

(تیر ۱۳۹۳)

دانشکده علوم پایه
گروه زیست شناسی (علوم جانوری-سلولی تکوینی)

عنوان

بررسی پلی مورفیسم ژن PON در مردان مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک

از

ستاره بهروزی

استاد راهنما

دکتر فرهاد مشایخی

استاد مشاور

دکتر محمد هادی بهادری

(تیر ۱۳۹۳)

سپاس خدای را که هر چه دارم از اوست
به امید آنکه توفیق یابم جز خدمت به خلق او نکوشم.
و با پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند،
این مجموعه را به پدر و مادر عزیزم تقدیم می کنم.

نخستین سپاس و ستایش از آن خداوندی است که بنده کوچکش را در دریای بیکران اندیشه، قطره ای ساخت تا وسعت آن را از دریچه اندیشه های ناب آموزگاران بزرگ به تماشا نشیند. لذا اکنون که در سایه سار بنده نوازی هایش پایان نامه حاضر به انجام رسیده است، بر خود لازم می دانم تا مراتب سپاس را از بزرگوارانی به جا آورم که اگر دست یاریگرشان نبود، هرگز این پایان نامه به انجام نمی رسید.

- ابتدا از استاد گرامتقدیرم جناب آقای دکتر مشایخی که زحمت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده داشتند، کمال سپاس را دارم.
- از استاد عالی قدردم جناب آقای دکتر بهادری که زحمت مشاوره این پایان نامه را متحمل شدند، صمیمانه تشکر می کنم.
- با سپاس بی دریغ خدمت دوستان گران مایه ام که مرا صمیمانه و مشفقانه یاری داده اند.
- سپاس آخر را به مهربانترین همراهان زندگیم، به پدر، مادرم تقدیم می کنم که حضورشان در فضای زندگیم مصداق بی ریای سخاوت بوده است.
- و در پایان از بیمارستان الزهرا شهر رشت جهت همکاری بیدریغ ایشان جهت پیشبرد این پایان نامه سپاسگذارم.

فصل اول

.....	۱- مقدمه
۲.....	۱-۱- تعریف ناباروری.....
۲.....	۲-۱- اتیولوژی ناباروری در مردان.....
۳.....	۳-۱- ناباروری ایدیوپاتیک.....
۴.....	۴-۱- آنالیز مایع منی.....
۴.....	۵-۱- طبقه بندی علل ناباروری در مردان.....
۴.....	۱-۵-۱- عوامل غیر ژنتیکی.....
۴.....	۲-۵-۱- استروژن ها.....
۴.....	۳-۵-۱- عفونت ها.....
۵.....	۴-۵-۱- فلزات سنگین.....
۵.....	۵-۵-۱- مصرف دخانیات.....
۵.....	۶-۵-۱- تغذیه.....
۶.....	۷-۵-۱- دمای اسکروتال.....
۶.....	۸-۵-۱- آنتی بادی های اسپرم.....
۶.....	۹-۵-۱- دارو های درمانی.....
۷.....	۱۰-۵-۱- هیپوگنادیسم- هیپوگنادوتروپی.....
۷.....	۱۱-۵-۱- گونه های فعال اکسیژن.....
۸.....	۱-۱۱-۵-۱- خواص گونه های اکسیژن فعال.....
۸.....	۲-۱۱-۵-۱- گونه های فعال اکسیژن و فیزیولوژی اسپرم.....
۹.....	۶-۱- استرس اکسیداتیو.....
۹.....	۱-۶-۱- نقش فیزیولوژیکال ROS بر سیستم تولید مثل مرد ۱۰.....
۱۰.....	۲-۶-۱- منشا ROS.....
۱۰.....	۳-۶-۱- مکانیسم محافظت آنتی اکسیدانت در مایع منی.....
۱۱.....	۴-۶-۱- بیماری زایی استرس اکسیداتیو مایع منی.....

۱۱	۷-۱ عوامل ژنتیکی
۱۱	۱-۷-۱ ریز حذف های کروموزوم Y
۱۳	۲-۷-۱ پلی مورفیسم های ژنتیکی
۱۳	۳-۷-۱ ناهنجاری های کروموزومی
۱۴	۴-۷-۱ جهش های میتوکندریایی
۱۴	۵-۷-۱ سندرم کلاین فلتر
۱۵	۶-۷-۱ سندرم نونان
۱۵	۷-۷-۱ سندرم سلول سرتولی
۱۵	۸-۱ ژن های موثر بر ناباروری مردان
۱۶	۹-۱ ژن Paraoxonase(PON)
۱۶	۱-۹-۱ ساختار ژن PON
۱۷	۲-۹-۱ تمرکز سلولی و بافتی PONها
۱۸	۳-۹-۱ فعالیت های فیزیولوژیکی PON
۱۹	۱۰-۱ عناصر تنظیمی GC box
۱۹	۱-۱۰-۱ CCAAT box
۱۹	۱۱-۱ اهمیت پلی مورفیسم های ژنتیکی
۲۰	۱۲-۱ پلی مورفیسم های PON
۲۰	۱-۱۲-۱ پلی مورفیسم PON1
۲۱	۲-۱۲-۱ پلی مورفیسم های PON2
۲۲	۱۳-۱ تنظیم فعالیت PON
۲۳	۱۴-۱ بیماری های دیگر مربوط به PONها
۲۳	۱۵-۱ هدف از تحقیق

فصل دوم

۲- مواد و روش ها

۲۶	۱-۲ مواد و لوازم مورد نیاز
----	----------------------------

۲۶ ۱-۱-۲- لوازم مورد نیاز در نمونه گیری
۲۶ ۲-۱-۲- مواد و لوازم مورد نیاز جهت استخراج DNA از خون
۲۶ ۳-۱-۲- مواد و لوازم مورد نیاز در الکتروفورز ژل آگارز جهت ارزیابی DNA استخراج شده
۲۷ ۴-۱-۲- مواد و لوازم لازم جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)
۲۷ ۵-۱-۲- مواد و لوازم مورد نیاز در الکتروفورز محصولات PCR به کمک ژل آگارز
۲۸ ۲-۲- آماده سازی بافر
۲۸ ۳-۲- لیست دستگاه ها و تجهیزات آزمایشگاه
۲۹ ۴-۲- روش کار
۲۹ ۱-۴-۲- نمونه گیری
۲۹ ۲-۴-۲- استخراج ژنومی DNA ژنومی از خون افراد
۲۹ ۳-۴-۲- رعایت نکاتی قبل از شروع انجام مراحل استخراج
۳۰ ۴-۴-۲- مراحل انجام عمل استخراج
۳۱ ۵-۴-۲- مراحل انجام ژل الکتروفورز
۳۱ ۶-۴-۲- مراحل انجام واکنش PCR
۳۲ ۷-۴-۲- الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۲
۳۳ ۵-۲- واکنش PCR (polymerase chain reaction)
۳۳ ۱-۵-۲- فهرست مواد مصرفی در PCR به ترتیب برای یک نمونه
۳۳ ۲-۵-۲- مراحل واکنش PCR
۳۳ ۱-۲-۵-۲- مشخصات پرایمر آغازگر ژن PON
۳۳ ۲-۲-۵-۲- مشخصات محصول PCR
۳۴ ۳-۲-۵-۲- چرخه ی حرارتی PCR
۳۴ ۶-۲- روش RPC-RFLP
۳۴ ۱-۶-۲- مواد مصرفی جهت انجام PCR-RFLP
۳۵ ۷-۲- آنالیز آماری

فصل سوم

۳- نتایج

- ۳-۱- نتایج بررسی کیفیت DNA استخراج شده ۳۷
- ۳-۱-۱- بررسی کیفیت DNA استخراج شده از طریق روش الکتروفورز افقی با استفاده از ژل آگارز ۳۷
- ۳-۲- نتایج بررسی واکنش های زنجیره پلیمرز (PCR) ۳۷
- ۳-۲-۱- بررسی کیفیت قطعات DNA تکثیر شده توسط ژل الکتروفورز افقی (آگارز ۲۴۶) ۳۷
- ۳-۳- الگوی هضم آنزیمی ۳۸
- ۳-۴- ارزیابی نتیجه هضم آنزیمی ۳۹
- ۳-۴-۱- توسط روش الکتروفورز عمودی با استفاده از ژل آگارز ۲٪ ۳۹
- ۳-۵- بررسی فراوانی ژنوتیپی و الی در جمعیت مردان مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک و مردان سالم ۴۰

فصل چهارم

۴- بحث و نتیجه گیری

- ۴-۱- بحث و نتیجه گیری ۴۴
- ۴-۲- پیشنهادات ۴۸

فصل پنجم

- ۵- منابع ۴۹

فصل ششم

- ۶- پیوست ۵۵

عناوین شکل ها

- ۱-۱- درصد تاثیرگذاری عوامل مختلف بر ناباروری..... ۳
- ۲-۱- عدم تعادل بین تولید گونه های فعال اکسیژن و دفاع طبیعی آنتی اکسیدانی را استرس اکسیداتیو گویند..... ۹
- ۳-۱- مکانیسم افزایش تولید ROS توسط اسپرماتوزوآ غیر طبیعی..... ۱۰
- ۴-۱- مدل معمول الگوی ریز حذف های کروموزوم Y..... ۱۲
- ۵-۱- نقشه ژنتیکی خانواده ژن PON..... ۱۶
- ۶-۱- ساختار پروتئینی PON و اتصال آن به HDL..... ۱۸
- ۷-۱- توزیع بافتی آنزیم های PON..... ۱۸
- ۳-۱- ۸ نمونه از DNA استخراج شده در افراد مورد مطالعه با استفاده از کیت GPP Solution..... ۳۷
- ۲-۳- تصویر ژل آگارز ۲٪ محصولات PCR..... ۳۸
- ۳-۳- تاثیر آنزیم ALW1 بر نمونه های بیمار محصولات حاصل RFLP..... ۳۹
- ۴-۳- تاثیر آنزیم ALW1 بر نمونه های سالم..... ۴۰
- ۵-۳- نمودار فراوانی ژنوتیپی در افراد سالم و بیمار مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک مردان..... ۴۲
- ۶-۳- فراوانی اللی در افراد سالم و بیمار مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک مردان..... ۴۳

عناوین جداول

- ۱-۱- بیشترین گونه های فعال اکسیژن شامل رادیکال های سوپراکسید..... ۸
- ۲-۱- نا هنجاری های کروموزومی در مردان نابارور..... ۱۴
- ۳-۱- پلی مورفیسم های اصلی ژن PON1 ۲۰
- ۴-۱- پلی مورفیسم های اصلی ژن PON2..... ۲۲
- ۱-۳- اطلاعات مربوط به آنزیم ALW1..... ۳۸
- ۲-۳- فراوانی ژنوتیپی در افراد سالم و بیمار مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک مردان..... ۴۱
- ۳-۳- فراوانی اللی در افراد سالم و بیمار مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک مردان..... ۴۱

• چکیده

بررسی پلی مورفیسم ژن PON در مردان مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک
ستاره بهروزی

ناباروری یک بیماری سیستم تولید مثلی است که بصورت عدم بارداری بعد از ۱۲ ماه رابطه جنسی معمول بدون پیشگیری تعریف میشود. ناباروری مردان تقریباً در ۱۵ درصد زوجین دیده میشود که فاکتور های محیطی و ژنتیکی در بروز آن نقش دارند. (Paraoxonase (PON) یک آنزیم آنتی اکسیدانی است که نقش مهمی در بیماری های مختلف داشته و با لانه گزینی جنین، استرس اکسیداتیو و متابولیسم لیپید در ارتباط است. خانواده PON شامل سه ژن PON1، PON2 و PON3 است که بر روی بازوی بلند کروموزوم ۷ قرار گرفته است. در این تحقیق ارتباط پلی مورفیسم ژن PON1 در موقعیت Q/R ۱۹۲ با ناباروری ایدیوپاتیک مردان بررسی گردید. این مطالعه شامل ۱۲۰ مرد نابارور و ۱۲۴ مرد بارور به عنوان گروه کنترل میباشد. نمونه خون تهیه و DNA ژنومی استخراج گردید. سپس تعیین ژنوتیپ با استفاده از روش PCR-RFLP صورت گرفت. در نهایت ارزیابی و آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار MedCalc انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که در فراوانی ژنوتیپی ($P < 0/0001$, $\chi^2 = 33.5$) و فراوانی آلی ($P = 0.0001$, $\chi^2 = 24.7$) بین گروه های نابارور و کنترل ارتباط معنی دار دیده می شود. بطوریکه ژنوتیپ QQ به عنوان یک فاکتور خطر معرفی گردید (OR=4.59, 95% CI=2.67-7.9, $P=0/0001$). بعلاوه حضور آلل Q خطر ابتلا به ناباروری ایدیوپاتیک را به میزان سه برابر افزایش میدهد (OR=3.1, 95% CI=1.98-4.85, $P=0.0001$). این مطالعه نشان داد که پلی مورفیسم 192Q/R ژن PON1 یک فاکتور خطر برای ناباروری ایدیوپاتیک مردان در این جمعیت محسوب می شود. گرچه برای تایید نتایج به دست آمده در این تحقیق، مطالعات بعدی با بهره گیری از تعداد بیماران و افراد سالم بیشتری مورد نیاز می باشد.

واژه های کلیدی: پلی مورفیسم، ناباروری ایدیوپاتیک مردان، PON

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه

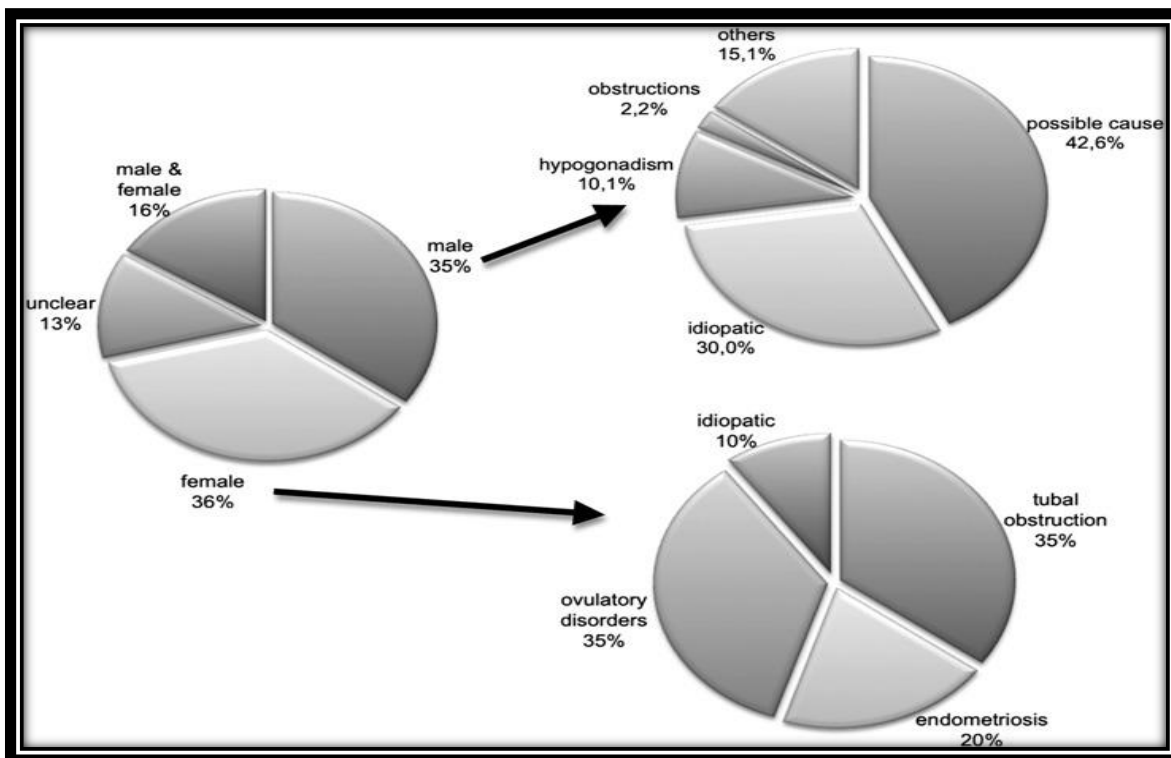
۱-۱- تعریف ناباروری

ناباروری یک بیماری از سیستم تولید مثلی است که بصورت عدم بارداری بعد از ۱۲ ماه یا بیشتر رابطه جنسی معمول بدون پیشگیری تعریف می شود. در همه زوج هایی که بررسی شده اند، ۴۰-۵۰ درصد از موارد شامل ناباروری زنان است. در ۳۰ تا ۴۰ درصد از زوج های نابارور دلیل ناباروری مردان میباشند و در ۱۰ تا ۳۰ درصد دیگر هر دو زوج دخیل هستند (Kara et al., 2010).

ابتلای به ناباروری موجب وارد آمدن صدمات روحی و هزینه های بسیار گزاف درمانی به افراد نابارور، خانواده ها و جامعه می گردد. امروزه ناباروری یکی از مشکلات عمده روحی، اقتصادی واجتماعی در جوامع بشری محسوب می گردد که تقریباً در نیمی از موارد آن به نحوی عامل مرد دخیل است. از این حیث پرداختن به مقوله ناباروری مردان امری جدی و ضروری می نماید (Ferlin et al., 2006).

۱-۲- اتیولوژی ناباروری در مردان

بطور معمول ژنتیک و محیط دلیل ناباروری مردان هستند (Hildebrand et al., 2010). مکانیسم های پایه ای بیماری زایی در مردان نابارور میتواند در اثر سم های محیطی مثل حشره کش ها، گلیکول اتر ها و فلزات سنگین ایجاد شود. بی نظمی های سیستمیک مثل بیماری های هیپوفیزی-هیپوتالاموسی، سرطان بیضه، آپلازی سلول جنسی و فاکتور های ژنتیکی مثل آنوپلوئید ها و جهش های تک ژنی از عوامل مهم در زمینه ناباروری مردان می باشند (Avenariu et al., 2009). با وجود پیشرفت ها در تشخیص های کلینیکی ۵۰٪ از موارد ناباروری مردان ناشناخته می باشد (Hildebrand et al., 2010). بیشتر نمونه های ایدیوپاتیک منشا ژنتیکی مشابه دارند زیرا بیش از هزار ژن در اسپرماتوژنز انسان دخیل هستند (Karanfilska et al., 2012). ناباروری با منشا ناشناخته در مردان ممکن است بر اثر فاکتورهایی چون استرس مزمن، اختلالات هورمونی که بر اثر آلودگی های محیطی ایجاد می شوند، گونه های اکسیژن فعال و یا عوامل ژنتیکی ایجاد شود (Jungwirth et al., 2013). شکل (۱-۱) میزان تاثیرگذاری عوامل مختلف را در ناباروری مردان و زنان نشان میدهد.



شکل ۱-۱: درصد تاثیرگذاری عوامل مختلف بر ناباروری. در ۳۵٪ موارد ناباروری مردان نقش دارند که از این بین

بیشترین سهم مربوط به دلایل شناخته شده می باشد و ناباروری ایدیوپاتیک در رتبه دوم دلایل ایجاد ناباروری در مردان

است (Kara et al., 2010).

۱-۳- ناباروری ایدیوپاتیک

در ناباروری با منشا ناشناخته نقص در ناباروری خود به خودی یا بر اثر دلایل ناشناخته بروز میکند، که به دو گروه تقسیم می شود (Hamada et al., 2011):

- ناباروری غیر قابل توصیف

- ناباروری ایدیوپاتیک

به وسیله آنالیز مایع منی میتوان این دو گروه را از هم جدا کرد. در صورت نرمال بودن پارامترهای آنالیز مایع منی ناباروری غیر قابل توصیف است در صورتی که در ناباروری ایدیوپاتیک پارامترهای مایع منی غیر عادی می باشد. ۶-۲۷٪ از ناباروری در مردان از نوع غیر قابل توصیف می باشد که زیر مجموعه ای از ناباروری با منشا ناشناخته است در حالیکه ناباروری ایدیوپاتیک در مردان، بصورت کاهش در کیفیت منی حداقل در یک یا چند پارامتر (تعداد، حرکت، مورفولوژی) تعریف می شود، که ۳۱٪ از مردان نابارور را به خود اختصاص میدهد (Jungwirth et al., 2013).

۱-۴- آنالیز مایع منی

یک تست ارزان قیمت است که در ارزیابی ناباروری انجام می شود که اطلاعاتی راجع به منی و مایع اسپرم در اختیار قرار میدهد. مواردی که سبب ناباروری می شود شامل آسیب بیضه ای، جراحی، افسردگی، گرما، الکل، مصرف دخانیات می باشد. بعضی از داروها بطور خاص استروئید های آنابولیک میتوانند اثر مخرب بر کیفیت اسپرم داشته باشند. میزان تحرک اسپرم بیش از ۶۰ میلیون بر میلی لیتر مناسب است، وقتی میزان تحرک به کمتر از ۵ میلیون بر میلی لیتر برسد شانس حاملگی طبیعی به کمتر از ۳۷٪ کاهش میابد (Agarwal and Said., 2011).

۱-۵- طبقه بندی علل ناباروری در مردان

۱-۵-۱- عوامل غیر ژنتیکی

عوامل غیر ژنتیکی دخیل در ناباروری مردان شامل استروژن ها، عفونت ها، فلزات سنگین، مصرف دخانیات، تغذیه، دمای اسکروتال، آنتی بادی های اسپرم، داروهای درمانی، هیپوگنادیسم- هیپوگنادوتروپی و گونه های فعال اکسیژن می باشند که در زیر به این موارد پرداخته میشود.

۱-۵-۲- استروژن ها

استروژن و مشتقات آن و ترکیبات مشابه آنها در دامداری ها، مرغ داری ها و صنایع لبنی بطور گسترده استفاده می شوند. افزایش قرار گرفتن در معرض استروژن مسئول بسیاری از آسیب های بیضه ای پیش از تولد و همچنین موجب رکود عملکرد بیضه پس از تولد و اسپرماتوژنز می باشد. ترکیبات شیمیایی مثل دی اکسین و دی کلرو دی فنیل تری کلرواتان (DDT) شناخته شده اند که باعث اختلال در اسپرماتوژنز می شوند. طی آزمایشاتی اثر DDT را بر روی تکوین جنین موش صحرایی بررسی کردند و نشان دادند که سطوح پایین DDT منجر به عدم تولید اسپرم، کاهش در تعداد کل اسپرم و کاهش در تعداد سلول لایدیک می شود (Olayemi et al., 2010).

۱-۵-۳- عفونت ها

عفونت ها در مجاری ادراری تناسلی مرد شامل عفونت اپی دیدیم، وزیکول سمینال، پروستات، مثنه و ناحیه پیشابراه است و تصور میشود نقش مهمی در ناباروری دارد. به دلیل عدم وجود معیار های مناسب و ماهیت بدون علامت عفونت ها، تصور می شود حضور آنتی بادی ها علیه اسپرم شاخص خوبی برای یک عفونت مزمن در غیاب یافته های بالینی دیگر باشد. شمار زیادی

از باکتری ها، ویروس ها و ارگانیزم ها وجود دارند که میتوانند سیستم ادراری تناسلی مرد را آلوده کنند. کلامیدیا بعنوان رایج ترین و بحرانی ترین عفونت مجاری ادراری تناسلی مرد شناخته شده اند که عامل اصلی غیر باکتریایی است که باعث التهاب شدید پروستات و پیش آبراه می شود. ۲۸-۷۱٪ مردان نابارور شواهدی از عفونت های کلامیدیا دارند (Olayemi et al., 2010).

۱-۵-۴- فلزات سنگین

سرب اولین فلز سنگینی بود که تاثیر زیانبار آن بر باروری مردان ثابت شد. بررسی ها یک کاهش در تعداد اسپرم و همچنین کاهش تحرک و طول اسپرم را در افراد مرتبط با سرب نشان میدهد. قرار گرفتن در معرض مقادیر محدود سرب و کادمیوم میتواند بطور قابل توجهی کیفیت اسپرم را کاهش دهد. همچنین غلظت های بالای کروم ۶ ظرفیتی سبب آتروفی بیضه و کاهش در تعداد اسپرم می شود. کمبود روی با کاهش سطح تستسترون و تعداد اسپرم همراه است. بطور خاص در مردان نابارور نشان دادند که کاهش روی میتواند یک عامل موثر در ایجاد ناباروری باشد (Olayemi et al., 2010).

۱-۵-۵- مصرف دخانیات

مصرف سیگار با کاهش اسپرم، تغییرات در تحرک و افزایش در تعداد اسپرم غیر طبیعی در ارتباط است. یک بررسی به منظور سنجش میزان روی اسپرم در افراد سیگاری و غیر سیگاری انجام شد که نشان داد اگرچه سیگاری ها بطور قابل توجهی مقادیر کمتر روی نسبت به غیر سیگاری ها نداشتند، میزان کادمیوم اسپرم به طرز قابل توجهی افزایش نشان داد. شواهد نشان میدهد که نیکوتین میتواند عملکرد محور هیپوفیزی هیپوتالاموسی را تغییر دهد و بر ترشح هورمون رشد، کورتیزول، وازوپرسین و اکسی توسین تاثیر بگذارد که در نتیجه از ترشح هورمون لوتئینه کننده (LH) و پرولاکتین جلوگیری میکند. مصرف کنندگان سیگار همچنین سطوح بالایی از استرادیول و کاهش میزان LH، FSH و پرولاکتین را نشان میدهند که همه اینها میتواند بر اسپرماتوژنز و تحرک اسپرم اثر منفی بگذارد (Olayemi et al., 2010).

۱-۵-۶- تغذیه

زنجیره اسید چرب غیر اشباع مخصوصا اسید چرب امگا۳ باید در رژیم غذایی مردان افزایش یابد زیرا تعیین کننده اصلی سیالیت غشا اسپرم اند. اگرچه چربی های اشباع، روغن های هیدروژنه، اسید های چرب ترانس، روغن دانه کتان، روغن نارگیل و خرما باید اجتناب شوند. مصرف بیش از اندازه چربی های اشباع به همراه مصرف ناکافی اسید های چرب ضروری ترکیب

اسید چرب غشاهای اسپرم را تغییر خواهد داد و بنابراین سیالیت کاهش میابد و تحرک اسپرم مختل می شود. در حالی که مصرف چربی های اشباع و هیدروژنه باید محدود شود، مصرف چربی های غیر اشباع باید افزایش یابد. این چربی ها در تمام جنبه های فعالیت های جنسی شامل شکل گیری اسپرم و فعالیت آن تاثیر گذارند (Olayemi et al., 2010).

۱-۵-۷- دمای اسکروتال

بطور طبیعی کیسه اسکروتوم بیضه را در دمای بین ۳۴-۳۶ درجه نگه میدارد. در دمای بالای ۳۶ درجه تولید اسپرم به مقدار زیادی محدود می شود یا بطور کامل متوقف میگردد. دمای اسکروتال در مردان نابارور بطور قابل توجهی بالاتر از مردان بارور است. فعالیت تولید اسپرم نیازمند دمایی تقریباً ۳-۴ درجه پایین تر از دمای طبیعی بدن است. این واقعیت توسط کاهش تعداد اسپرم مشاهده شده در آسیب شناسی واریکوسل و عدم نزول بیضه ها، و همچنین قرار گرفتن در سوناها طولانی حمایت میگردد (Olayemi et al., 2010).

۱-۵-۸- آنتی بادی های اسپرم

کشف فاکتور ایمنی در مردان نابارور اولین بار توسط ویلسون گزارش شد. به خوبی مشخص شده که مردان و زنان میتوانند آنتی بادی هایی علیه اسپرماتوزوای انسان تولید کنند که این حالت ایمنی ممکن است در توان تولید مثلی تداخل ایجاد کند. وجود آنتی بادی های ضد اسپرم در زوج های نابارور اثبات شده است. تعداد معدودی از آنتی ژن ها وجود دارند که قادر به القای آنتی بادی ها با اثر ضد باروری هستند. این آنتی ژن ها در تمام سطح اسپرم وجود دارند. آنتی بادی های اسپرم ممکن است با عملکرد تولید مثلی از طرق مختلف با سطوح متفاوت تداخل داشته باشد که به محلی که آنتی بادی دریافت می شود و محل مشابهی که آنتی ژن بر سطح اسپرم قرار دارد، بستگی دارد (Olayemi et al., 2010).

۱-۵-۹- دارو های درمانی

ممکن است در اثر استفاده از دارو های مختلف ناباروری اولیه ایجاد شود. درمان با آنتی بیوتیک ها بطور قابل توجهی بر اسپرماتوژنز و اجزای اسپرمی در هر دو مدل انسانی و حیوانی تاثیر می گذارد (Nelson and Bunge, 1957). آنتی بیوتیک هایی که بر باروری مردان تاثیر منفی می گذارند شامل آنتی بیوتیک های گروه Macrolide می باشند که شامل اریترومایسین (Erythromycin)، اسپیرامایسین (Spiramycin)، و نفومایسین (Neomycin) است. آنتی بیوتیک های گروه پنی سیلین (Penicillin) شامل پنی سیلین -G، آمپی سیلین (Ampicillin) و دیکلوزاسیلین (Dicloxacillin) در

ایجاد توقف اسپرما توژنیک موثر تشخیص داده شدند (Timmermans, 1974). جنتامایسین (Gentamycin) و نئومایسین (Neomycin) از گروه آمینوگلیکوزیدها (Aminoglycosides) در تغییر عملکرد بیضه ای نقش دارند (Yundaand Kushniruk, 1973). سولفاسالازین (Sulfasalazine) باعث ایجاد الیگواسپرمی، کم تحرکی و کاهش کیفیت اسپرم می شود (Levi et al., 1979). و همچنین مشتقات تتراسایکلین (Tetracycline)، بطور خاص تتراسایکلین هیدروکلرید (Tetracycline Hydrochloride) باعث کاهش شاخص اسپرما توژنیک می گردد (Kushniruk., 1976). این نتیجه ممکن است بدلیل تاثیر محور گنادی-هیپوفیزی-هیپوتالاموسی باشد یا اثر سمی مستقیم بر گناد ها داشته باشد (Olayemi et al., 2010).

۱-۵-۱۰- هیپوگنادیسم - هیپوگنادوتروپی

هیپوگنادیسم - هیپوگنادوتروپی (HH) یک سندرم بالینی شناخته شده است که با کاهش استروئید جنسی و کاهش سطح گنادوتروپین ها همراه است که در نتیجه یک نقص در الگوی ترشح ضربانی طبیعی GnRH از هیپوتالاموس ایجاد می شود. HH میتواند به همراه یا بدون حس بویایی دیده شود که بعد ها بعنوان سندرم کالمن شناخته شد (Olayemi et al., 2010).

۱-۵-۱۱- گونه های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species= ROS)

ROS بر اجزای اسپرم تاثیر منفی دارد. غشای پلاسمایی اسپرم بدلیل دارا بودن اسید های چرب غیر اشباع نسبت به تاثیر ROS بسیار حساس است. این اسید های چرب غیر اشباع سیالیتی را ایجاد میکنند که برای تحرک اسپرم و ادغام غشاها مثل واکنش آکروزومی و واکنش متقابل اسپرم و تخمک لازم است. ماهیت غیر اشباع این مولکول ها آنها را برای حمله ROS و پراکسیداسیون مداوم لپید تمام غشا پلاسمایی اسپرم مستعد میکند. افزایش در سطح ROS اسپرمی در ۴۰٪ درصد مردان نابارور گزارش شده است. افزایش میزان ROS منجر به آسیب، عدم کارایی اسپرم و مرگ سلول می شود. این رادیکال های آزاد با اکسیداتیو به اسپرم آسیب می رسانند که تصور می شود مسئول برخی از انواع الیگواسپرمی ایدیوپاتیک باشند (Olayemi et al., 2010). جدول (۱-۱) انواع گونه های فعال اکسیژن را نشان میدهد.

جدول-۱: بیشترین گونه های فعال اکسیژن شامل رادیکال های سوپراکسید، هیدروژن پراکسید و هیدروکسیل می باشد (Yoshikawa et al., 2002).

$O_2^{\bullet-}$	Superoxide radical
H_2O_2	Hydrogen peroxide
HO^{\bullet}	Hydroxyl radical
1O_2	Singlet oxygen
HOO^{\bullet}	Hydroperoxyl radical
$LOOH$	Alkylhydroperoxide
LOO^{\bullet}	Alkylperoxyl radical
LO^{\bullet}	Alkoxy radical
ClO^-	Hypochlorite ion
$Fe^{4+}O$	Ferryl ion
$Fe^{5+}O$	Periferryl ion
NO^{\bullet}	Nitric oxide

۱-۵-۱۱-۱- خواص گونه های اکسیژن فعال

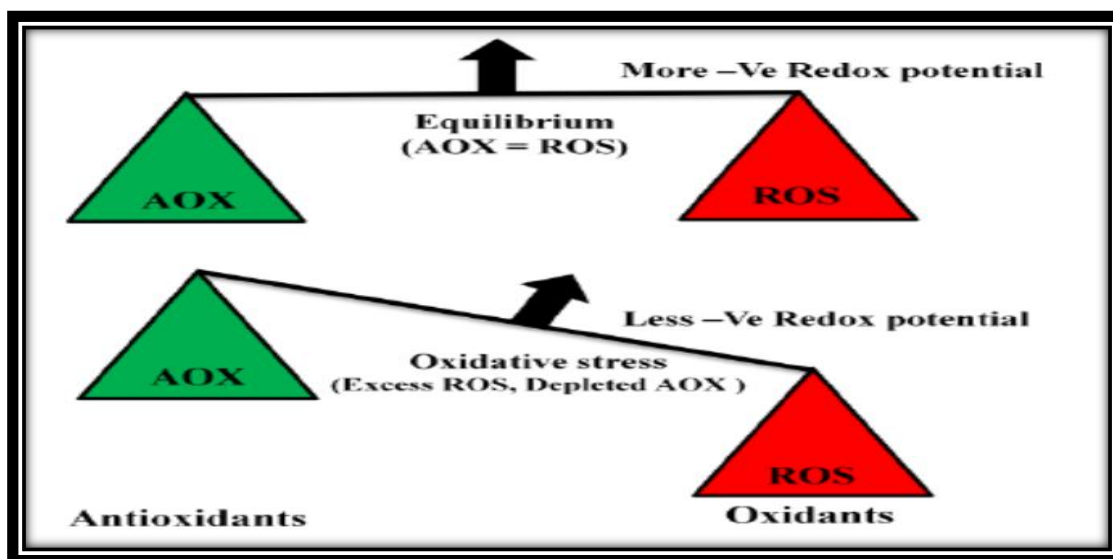
رادیکالهای آزاد به عنوان محصولات جانبی در میتوکندری پستانداران تولید می شوند. اگر مقدار این ترکیبات افزایش یابد میتواند برای سلول سمی باشد، اما مقادیر کم آن در فعالیت های فیزیولوژیکی مهمی مانند انتقال پیام و مرگ سلولی برنامه ریزی شده بسیار مفید است. گونه های اکسیژن فعال نیمه عمر کوتاهی دارند، آنتی اکسیدان ها موجب کاهش مقدار و فعالیت گونه های فعال اکسیژن می شوند ولی فلزاتی چون آهن و مس موجب افزایش میزان آنها می شوند (Oberley et al., 2002). خاصیت مفید تر استرس اکسیداتیو ممکن است مرحله ای باشد که استرس اکسیداتیو آنتی اکسیدان ها را تحت تاثیر قرار میدهد تا بالانس بین گونه های فعال اکسیژن و آنتی اکسیدان ها را کاهش دهد (Yoshikawa et al., 2002).

۱-۵-۱۱-۲- گونه های فعال اکسیژن و فیزیولوژی اسپرم

این ایده که مقدار محدود ROS در تنظیم برخی از عملکرد های اسپرم دخالت میکند اولین بار توسط Aitken و همکاران بررسی شد. یافته های دیگر نشان میدهد که سطوح پایین ROS میتواند توانایی اسپرماتوزوآ انسان برای اتصال به ناحیه شفاف تخمک را افزایش دهد. مطالعات دیگر نشان میدهد که انکوباسیون اسپرماتوزوآ با مقدار پایین هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، ظرفیت یابی اسپرم را تحریک میکند (Aitken et al., 1995).

۱-۶- استرس اکسیداتیو

استرس اکسیداتیو به صورت عدم تعادل بین تولید گونه های فعال اکسیژن و دفاع طبیعی آنتی اکسیدانی تعریف می شود. تنش اکسیداتیو بر روی عملکرد اسپرم تاثیر میگذارد، به این صورت که به DNA در هسته و میتوکندری آسیب میزند، موجب پر اکسیداسیون چربی ها در غشا پلاسمایی اسپرم می شود و ماهیت پروتئین های سلولی را تغییر میدهد (Hamada et al., 2011). وابستگی شدید بین استرس اکسیداتیو و سبک زندگی و بیماری های مربوطه به خوبی شناخته شده است. این تنها دلیل رویداد های خطر ناک مثل پراکسیداسیون لیپید و آسیب اکسیداتیو DNA نمی باشد (Yoshikawa et al., 2002). شکل (۱-۲) تعادل بین اکسیدانت و آنتی اکسیدانت را نشان میدهد.



شکل ۱-۲: عدم تعادل بین تولید گونه های فعال اکسیژن و دفاع طبیعی آنتی اکسیدانی را استرس اکسیداتیو گویند. به عبارت دیگر تعادل بین اکسیدانت و آنتی اکسیدانت استرس اکسیداتیو را تعریف میکند (Kunwar et al., 2011).

۱-۶-۱ نقش فیزیولوژیکال ROS بر سیستم تولید مثل مرد

به طور معمول ROS انحصاراً برای اسپرماتوزوآ انسان سمی شناخته شده، اما مدارک نشان میدهد که مقادیر اندک ROS برای اسپرماتوزوآ لازم است تا توانایی باروری را بدست بیاورد. نشان داده شده که سطوح پایین ROS برای باروری، فعالیت آکروزوم، حرکت و ظرفیت یابی ضروری است. همچنین ROS در واکنش بین اسپرم و تخمک دخالت میکند. پراکسیداسیون لیپید به دلیل سطوح پایین ROS منجر به تغییر غشا پلاسمایی، در نتیجه تسهیل اتصال اسپرم به اووسیت می شود (Ashkok et al., 2010, Makker et al., 2005).