بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی جانوری

مقایسه کارآیی دو روش جداسازی اسپرم DGC و DGC-Zeta جهت انتخاب اسپرم با میزان پایین آپوپتوز

استادان راهنما:

دکتر مهران عربی

دکتر محمد حسین نصر اصفهانی

استاد مشاور:

مرضیه تولایی

پژوهشگر:

معصومه زارعی خیرآبادی

دی ماه 1389

هزینه‌های مصرفی این پایان نامه بر مبنای قرارداد شماره
88/43492 پ.ر مورخ88/08/25 از بودجه تحقیقاتی
پژوهشگاه رویان تأمین‌گردیده است.

با توجه به قرارداد شمارهٔ 88/43492 پ.ر مورخ 88/08/25 فی مابین پژوهشگاه رویان و دانشگاه شهرکرد و مفاد تبصره شماره 1 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 فناوری و ثبت اختراع منجر گردد، حقوق مادی و معنوی آن متعلق به پژوهشگاه رویان و دانشگاه شهرکرد با توجه به میزان سرمایه گذاری تعلق دارد.

تشکر و قدردانی

حمد بادخداوندی را که سخنوران در ثنای او درمانند و شمارندگان از شمارش عاجزآیند و کوشندگان حق نعمتش را آن سان که شایسته اوست ادا کردن نتوانند. خداوندگاری که تیزهوش به عمق جلال و جبروت او نرسد خداوندی که فرازهای صفاتش را نه حدی است و نه نهایتی و وصف جلالش را سخنوری در خور نتوان یافت که در زمان نگنجد و مدت نپذیرد.

در آغاز لازم می دانم از زحمات پدر و مادر همسر گرامیم که با سعه صدر و ایثار و شوق و پشتیبانی همیشگی خود همواره راهنمای من بوده اند کمال تشکر را بنمایم.

نگارنده بر خود می داند که از زحمات بی دریغ، تلاش های بی وقفه و راهنمایی های ارزشمند اساتید گرامی:

§ آقای دکتر [illegible] و جناب آقای دکتر محمد حسین نصر اصفهانی که در اجرای این تحقیق همواره پشتیبان و راهنمای اینجانب بودند.

§ کارخانم مرضیه تولاکی که مشاوره پایان نامه را عهده دار بودند.

§ جناب آقای [illegible] رضا دیه، عباس کیانی و سرکارخانم مریم اربابیان که در اجرای این پایان نامه اینجانب را یاری رساندند تشکر و قدردانی نماید.

معصومه زارعی

تا جهان بود از سر آدم فراز — کس نبود از راز دانش بی نیاز

هر زمان بخرد اندر هر زمان — راز دانش را به هر گونه زبان

گرد کردند و گرامی داشتند — تا به رنگ اندر همی بنگاشتند

دانش اندر دل چراغ روشن است — و نهیبر بر تن تو جوشن است

تقدیم به همسر مرحوم دختر عزیزم

چکیده:

یکی از روشهای معمول درمان ناباروری روش تزریق اسپرم به درون تخمک (ICSI) می باشد. در طی این تکنیک، اسپرمی که دارای مورفولوژی و تحرک طبیعی است به داخل سیتوپلاسم تخمک تزریق می شود. با این وجود، نگرانی هایی برای تزریق اسپرم های دارای انوپلوئیدی و فراگمنتاسیون DNA به داخل تخمک درروش تزریق اسپرم به درون تخمک وجود دارد. چنین به نظر می رسدکه شکل ظاهری اسپرم به تنهایی یک پارامتر مناسب برای انتخاب اسپرم نرمال نیست و روش های دیگری برای انتخاب یک اسپرم نرمال بایستی به کارگرفته شود. در حال حاضر در مراکز باروری و ناباروری از روش جدا سازی اسپرم تحت نام سانتریفوژ بر اساس گرادیان غلظت (DGC) استفاده می شود. در این مطالعه میزان سلامت DNA، کمبود پروتامین، مورفولوژی و جابه جایی فسفاتیدیل سرین به عنوان مارکر آپوپتوز در اسپرم های به دست آمده از روش ترکیبی DGC-Zeta با روش سانتریفوژ بر اساس گرادیان غلظت مقایسه گردیده است.

در این مطالعه از نمونه مایع منی 30 فرد نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان جهت انجام این طرح استفاده شد. قبل از نمونه گیری فرم رضایتی توسط افراد نابارور پر شده است (فرم رضایت پیوست می باشد). پس از گرفتن نمونه از مرکز، غلظت آن تعیین شده و سپس قسمتی از نمونه جهت رنگ آمیزی پاپانیکولائو(بررسی مورفولوژی اسپرم)، تست تانل(بررسی فراگمنتاسیون DNA) و CMA3 (بررسی کمبود پروتامین) و باقیمانده وارد روش جداسازی بر اساس گرادیان غلظت شد. پس از انجام این روش، بر روی قسمت بیشتر نمونه روش جدا سازی زتا و بر روی باقیمانده آن علاوه بر تست های فوق، آپوپتوز نیز به وسیله آنکسین وی بررسی شد. پس از روش جدا سازی زتا، مجددا بر روی نمونه تست های فوق انجام گرفت. در 22 نمونه رنگ آمیزی کلروتتراسایکلین(رنگ آمیزی CTC) جهت بررسی میزان ظرفیت یابی در سه گروه فوق به همراه زمان 30، 60 و 90 دقیقه پس از جداسازی بر اساس گرادیان غلظت انجام شد. در همین نمونه ها تست آنکسین وی نیز انجام شد. پس از مقایسه نتایج به دست آمده در سه گروه قبل از جداسازی(مایع منی، کنترل)، پس از جداسازی بر اساس گرادیان غلظت و پس از DGC-Zeta، مشخص شد که روش DGC-Zeta قادر به جداسازی اسپرم با محتوای کروماتین و مورفولوژی سالم می باشد. از طرفی این روش سبب افزایش روند ظرفیت یابی شده که با افزایش میزان جابجایی PS همراه است و خود یک مزیت دیگری برای این روش جداسازی می باشد.

واژه های کلیدی: روش جداسازی اسپرم بر اساس گرادیان غلظت ، روش جدا سازی اسپرم زتا، آنکسین وی، فراگمنتاسیون DNA، کمبود پروتامین در اسپرم انسان، ظرفیت یابی در اسپرم انسان، رنگ آمیزی CTC

فهرست مطالب

فصل اول – مقدمه 8

1-اسپرماتوژنز 9

1-1-اسپرماتوسیتوژنز 10

1-2-تقسیم میوز 10

1-3-اسپرمیوژنز 11

2- بلوغ اسپرم در اپیدیدیم ..... 13.

3- ظرفیت یابی 15

3-1-حذف پلاسمای سمینال 15

3-2-عبور از دستگاه تناسلی ماده 16

4-واکنش آکروزومی 19

5- آنالیز مایع منی 21

5-1- ارزیابی ماکروسکوپی مایع منی 21

5-2- ارزیابی میکروسکوپی مایع منی 22

6-روشهای متداول جداسازی اسپرم 26

6-1-روش جداسازی اسپرم بر اساس گرادیان غلظت 26

6-2-روش جداسازی اسپرم بر اساس فیلتراسیون پشم شیشه 27

6-3-روش جداسازی اسپرم بر اساس مهاجرت 28

7-روشهای نوین جداسازی اسپرم 29

7-1-روش الکتروفورز 29

7-2-جداسازی اسپرم با واسطه اسید هیالورونیک 29

7-3- روش جداسازی اسپرم به وسیله خاصیت مغناطیسی 30

7-4- روش زتا 31

فهرست مطالب

8- آسیب کروماتین اسپرم 33

8-1- گونه های اکسیژن فعال 33

8-2- آپوپتوز 34

8-2-1--عوامل مهم در آپوپتوز 35

8-2-2-مسیر های آپوپتوز 37

8-2-3-تغییرات غشاء پلاسمایی در طول آپوپتوز 41

8-2-4-شناسایی جابجایی فسفاتیدیل سرین در سلولهای آپوپتوتیک 42

8-3--بسته بندی ناقص کروماتین 45

فصل دوم - مواد و روش ها 48

1- تجهیزات 49

2- مواد 50

3-روش اجرای طرح 52

3-1-جمعیت مورد مطالعه 52

3-2-جمع آوری مایع منی 52

3-3- بررسی میکروسکوپیک 52

3-4- روش جداسازی اسپرم بر اساس گرادیان غلظت 55

3-5- روش جداسازی زتا 55

3-6-تکنیک تانل 56

3-7-بررسی کمبود پروتامین با رنگ آمیزی کروموماسینA3 57

3-7-1-محلول ها و بافرهای مورد نیاز جهت تست کروموماسین A3 57

3-7-2-روش انجام رنگ آمیزی کروموماسین A3 57

فهرست مطالب

3-8-بررسی آپوپتوز به وسیله آنکسین وی 58

3-9-ارزیابی ظرفیت یابی 59

3-9-1-محلول های شیمیایی لازم جهت تست ظرفیت یابی 59

3-9-2- روش رنگ آمیزی کلروتتراسایکلین 59

3-10-روش های بررسی آماری 59

فصل سوم- نتایج 61

1- مقایسه درصد اسپرم های دارای مورفولوژی غیر طبیعی در سه گروه کنترل،

DGC و DGC-Zeta 63

2-مقایسه درصد اسپرم های دارای کمبود پروتامین در سه گروه کنترل،

DGC و DGC-Zeta 65

3-مقایسه درصد اسپرم های دارای آسیب DNA در سه گروه کنترل،

DGC و DGC-Zeta 67

4-مقایسه درصد اسپرم های دارای جابجایی فسفاتیدیل سرین در دو گروه

DGC و DGC-Zeta 69

فصل چهارم- بحث و نتیجه گیری 75

فصل پنجم- پیشنهادات 84

پیوست 86

منابع 87

فهرست شکل ها

شکل 1-1-بیضه و جایگاه لوله های منی ساز 10

شکل 2-1-سه مرحله اسپرماتوژنز:اسپرماتوسیتوژنز(a)، تقسیم میوز(b)، اسپرمیوژنز(c) 11

شکل 3-1-اسپرمیوژنز: مرحله گلژی، مرحله کلاهک، مرحله آکروزومی،مرحله بلوغ 12

شکل 4-1-اسپرماتوژنز و در نهایت تولید اسپرم بالغ 13

شکل 5-1-جایگاه کیسه های منی 14

شکل 6-1-جایگاه غده پروستات 14

شکل 7-1-مراحل ظرفیت یابی: در ناحیه واژن (1)، سرویکس (2)، در محیط رحم (3)

و اویداکت (4) 17

شکل 8-1-مسیرهای سیگنال رسانی در ظرفیت یابی 18

شکل 9-1-ظرفیت یابی و افزایش تحرک 19

شکل 10-1-مراحل انجام واکنش آکروزومی در اسپرم پستانداران 20

شکل 11-1-واکنش آکروزومی 20

شکل 12-1-انواع مورفولوژی غیرطبیعی در اسپرم 25

شکل 13-1- تزریق درون‌سیتوپلاسمی اسپرم(ICSI) 26

شکل 14-1- روش جداسازی اسپرم بر اساس گرادیان غلظت (DGC) 27

شکل 15-1- فیلتراسیون پشم شیشه 28

شکل 16-1- روش جداسازی اسپرم بر اساس مهاجرت 28

شکل 17-1-روش الکتروفورز 29

شکل 18-1-جداسازی اسپرم با واسطه اسید هیالورونیک 30

شکل 19-1- روش جداسازی اسپرم به وسیله خاصیت مغناطیسی 30

فهرست شکل ها

شکل 1-20-روش جداسازی اسپرم به وسیله خاصیت مغناطیسی 31

شکل 1-21-روش زتا 32

شکل 1-22- انواع گونه های اکسیژن فعال 33

شکل 1-23-استرس اکسیداتیو 34

شکل 1-24-مقایسه آپوپتوز و نکروز 35

شکل 1-25-فعال شدن پروکاسپاز 36

شکل 1-26-مسیر آبشاری فعال شدن کاسپازها 36

شکل 1-27-خانواده Bcl-2 37

شکل 1-28-مسیر خارجی یا آپوپتوز القاء شده توسط گیرنده های مرگ 39

شکل 1-29-مسیرهای داخلی یا مسیر میتوکندریایی آپوپتوز 40

شکل1-30- فرایند آپوپتوز منجر به تغییر در ساختار غشاء سلول، میتوکندری و فراگمنتاسیون
DNA می گردد. 41

شکل 1-31-شناسایی جابجایی فسفاتیدیل سرین با آنکسین وی و حیات سلول با پروپودیم یدید 42

شکل 1-32- نحوه اتصال آنکسین وی و پروپودیم یدید 43

شکل 1-33-تانل 44

شکل 1-34-روش تانل 44

شکل 1-35- نحوه فشرده شدن کروماتین در اسپرم 46

شکل 1-36- رنگ آمیزی کروموماپسین A3 جهت شناسایی کمبود پروتامین 47

شکل 2-1- نحوه تهیه اسمیر 54

شکل2-2-چهار جمعیت سلولی در نمودار فلوسیتومتری 58

شکل 2-3-روش اجرای طرح 60

شکل 3-1-رنگ آمیزی پاپانیکولائو 64

فهرست شکل ها

شکل 2-3-رنگ آمیزی کروموماپسین A3 66

شکل 3-3-بررسی فراگمنتاسیون شدن DNA..... 68

شکل 4-3-چهار جمعیت سلولی در تصویر میکروسکوپ فلورسنت 69

شکل 5-3-مقایسه درصد سلول های $An^- PI^-/PI^-$ و $An^+ PI^-/PI^-$ پس از

DGC و DGC-Zeta 70

شکل 6-3-آنکسین وی: A) نمودار فلوسیتومتری B) نمودار فلوسیتومتری C) هیستوگرام..... 71

شکل 7-3-ظرفیت یابی 72

شکل 8-3-درصد اسپرم های ظرفیت یاب شده و ظرفیت یاب نشده..... 73

شکل9-3-درصد سلول های آنکسین مثبت 73

شکل10-3-درصد سلول های PI مثبت 74

فهرست جداول

جدول1-2-وسایل آزمایشگاهی 49

جدول 2-2-مواد 50

جدول 3-2-وسایل 51

جدول 1-3-میانگین پارامترها در نمونه مایع منی 62

جدول 2-3-درصد اسپرم های دارای مورفولوژی غیر طبیعی در سه گروه کنترل،
DGC و DGC-Zeta 63

جدول 3-3-درصد اسپرم های دارای کمبود پروتامین در سه گروه کنترل، DGC
و DGC-Zeta 65

جدول 4-3-درصد اسپرم های دارای آسیب DNA در سه گروه کنترل،
DGC و DGC-Zeta 67

فصل اول

مقدمه

باروری در اکثر فرهنگها از ارزش بالایی برخوردار است و آرزوی داشتن فرزند یکی ازاساسی ترین محرک های انسانی در تداوم زندگی محسوب می شود. اگر تلاش در جهت باردار شدن با موفقیت همراه نشود می تواند منجر به یک تجربه احساسی مخرب شود. ناباروری [1] بر اساس سازمان بهداشت جهانی[2] (WHO) به صورت عدم توانایی در بارداری بعد از یک سال مقاربت طبیعی، مداوم و بدون پیشگیری تعریف شده است (1). بطورکلی، 10 تا 15 درصد از زوج‌های جوان معمولا با مشکل نازایی مواجه‌اند.

علل ناباروری به چهار گروه دسته بندی می شود :

1. ناباروری به علت فاکتور مردانه[3]
2. ناباروری به علت فاکتور زنانه[4]
3. ناباروری با علت فاکتورهای مردانه و زنانه به‌طور هم‌زمان
4. ناباروری به دلایل ناشناخته

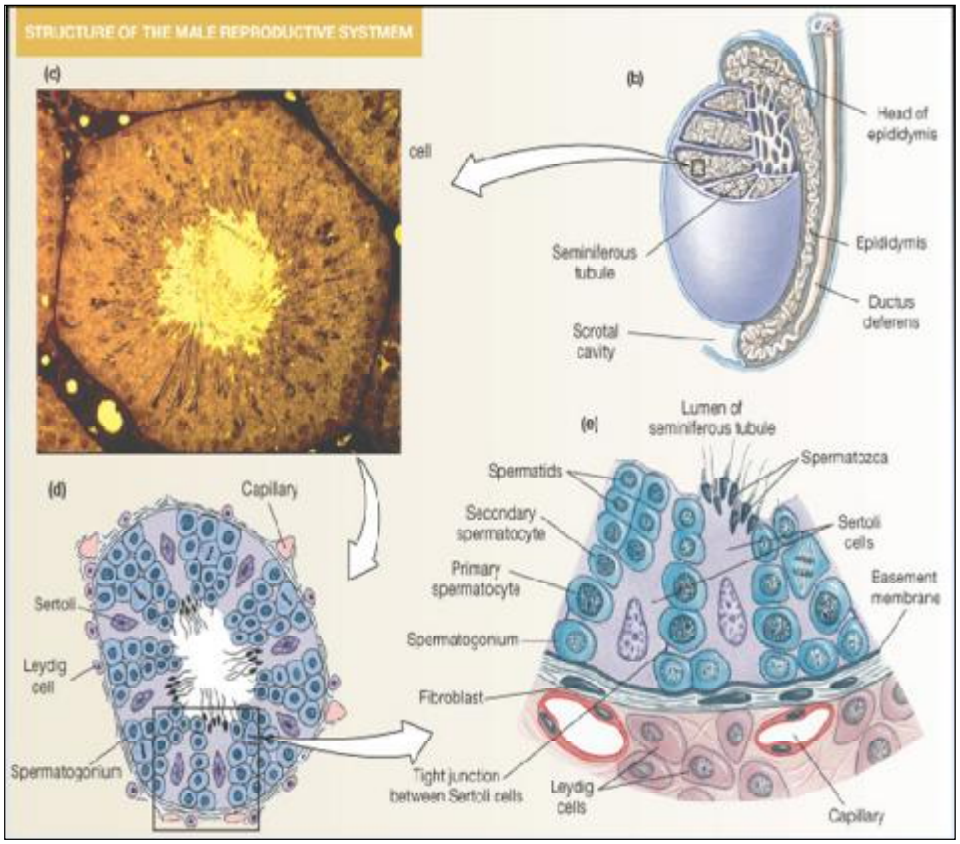
ارزیابی ناباروری به صورت یک عامل نسبی است که هر دو زوج را گرفتار می کند و نباید فقط به یکی از آن دو نسبت داده شود. میزان پراکندگی علل ناباروری در مردان و زنان به خوبی مشخص نشده است. سازمان بهداشت جهانی 20 درصد از علل ناباروری را عوامل مربوط به مردان، 38 درصد را عوامل مربوط به زنان، 27 درصد را فاکتورهای مشترک و 15 درصد را بدون علت، گزارش نموده است. غالباً به علت سهولت بررسی مایع منی، ناباروری در مردان زودتر تشخیص داده می شود (1).

لقاح[5] در پستانداران، یک رویداد خاص گونه است که نتیجه مجموعه ای ازوقایع سلولی و مولکولی می باشد. به منظور بارور کردن تخمک، اسپرم متحمل تغییرات زیادی در طول مراحل زیر می گردد: (1) تشکیل وتکثیر در بافت بیضه (اسپرماتوژنز)[6]، (2) بلوغ در اپیدیدیم[7] و (3) ظرفیت یابی[8] در دستگاه تناسلی ماده(2).

1-اسپرماتوژنز

اسپرماتوژنز در لوله های منی ساز[9] موجود در بیضه صورت می گیرد(شکل 1-1) و شامل سه مرحله می باشد: اسپرماتوسیتوژنز[10]، میوز، اسپرمیوژنز[11](3، 4)

[1] - Infertility
[2] - World Health Organization
[3] - Male factor
[4] - Female factor
[5] - Fertilization
[6] - Spermatogenesis
[7] - Epididymis
[8] - Capacitation
[9] - Seminiferous tubules
[10] -Spermatocytogenesis
[11] -Spermiogenesis



شکل 1-1- بیضه و جایگاه لوله های منی ساز در انسان

1-1-اسپرماتوسیتوژنز

سلول اسپرماتوگونی[1] اولین رده سلولی واقع در لوله های منی ساز است که در طی تقسیم های متوالی میتوز، اسپرماتوسیت اولیه[2] را ایجاد می کند(شکل 2-1-a). سلول های اسپرماتوگونی خود شامل سه گروهند:A کم رنگ (Ap)[3] ، A تیره (Ad)[4] و نوع B

سلول های A کم رنگ و A تیره صرفاً در رنگ پذیری هسته با هم اختلاف دارند، به این معنی که پس از رنگ آمیزی هسته سلول Ad تیره تر از Ap خواهد بود. هر سلول Ad با تقسیم میتوزی یک سلول Ad مشابه خودش و یک سلول Ap را ایجاد می کند که به این ترتیب همواره تعداد سلولهای ذخیره ای Ad حفظ خواهد شد. با تقسیم سلول های Ap نیز سلول های نوع B حاصل می شود. طی تقسیمات متوالی سلولهای نوع B، اسپرماتوسیت اولیه ایجاد می گردد (5).

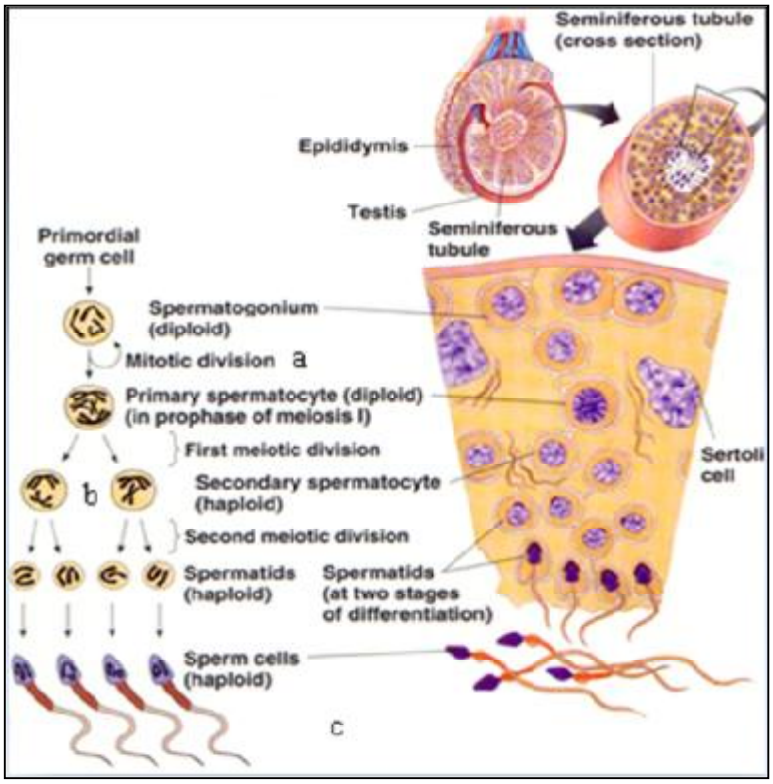
2-1-تقسیم میوز

تقسیم میوز شامل دو تقسیم متوالی است که در تقسیم اول، کاهش کروموزومی اتفاق می افتد و اسپرماتوسیت های ثانویه[1] حاصل می شود. این سلولها 23 کروموزوم دارند در حالیکه محتوای DNA آنها 2n

---

[1] - Spermatogonia
2 - Primary spermatocyte
3 - A pale
4 - A dark

می باشد. درتقسیم دوم میوز از هر اسپرماتوسیت ثانویه، دو اسپرماتید[2] به وجود می آید که آنها نیز هاپلوئید بوده و محتوای DNA آنها n می باشد.این مرحله حدود 24 روز طول می کشد (6) (شکل 2-1-b).



شکل 2-1- سه مرحله اسپرماتوژنز:اسپرماتوسیتوژنز(a)، تقسیم میوز(b)، اسپرمیوژنز(c)

3-1-اسپرمیوژنز

در مرحله اسپرمیوژنز، اسپرماتید گرد به اسپرماتوزوآی طویل با سری کشیده تغییر شکل می دهد(شکل 2-1-c). اسپرمیوژنز شامل چهار مرحله می باشد که به شرح زیر است (7):

1- **مرحله گلژی**[3]: در ابتدا گرانول های کوچک پیش آکروزومی[4] پدیدار می شوند. با ادغام این گرانول ها، گرانول های آکروزومی ایجاد شده که منشأ گلژی دارند. با ادغام گرانول های آکروزومی، وزیکول آکروزومی[5] در ناحیه جلویی سر ایجاد می گردد که حاوی ترکیباتی چون گلیکوپروتئین، آنزیمهای هیدرولیتیک مثل هیالورونیداز، آکروزین[6] و غیره می باشد. سانتریول ها به قطب مخالف مهاجرت کرده و یکی از آنها آکسونم را می سازد (4، 8)(شکل 3-1 قسمت 1 و 2).

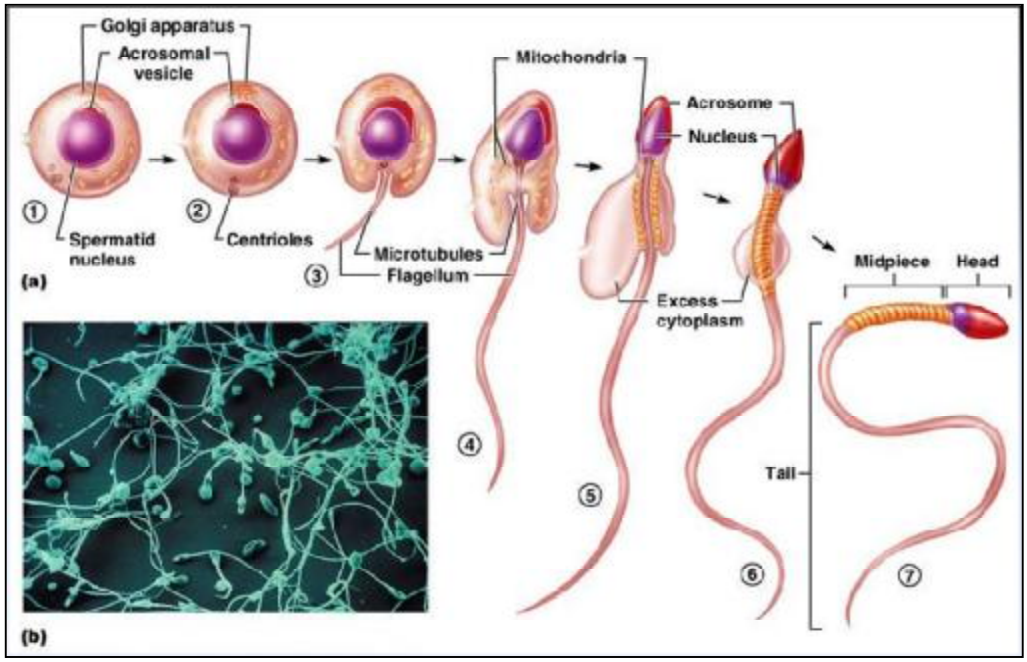
---

1 - Secondary spermatocyte
2 - Spermatid
3 - Golgi phase
4 - Proacrosomal granules
5 - Acrosomal vesicle
6 - Acrosin

2- **مرحله کلاهک**[1]: در این مرحله آکروزوم بیش از نیمی از سر را پوشانده و وزیکول آکروزومی دو لایه شده به طوری که لایه داخلی مجاورغشای هسته و لایه خارجی دورتر از آن (مجاور غشاء پلاسمایی) قرار می گیرد (8)(شکل 3-1 قسمت 3).

3- **مرحله آکروزومی**[2]: در این مرحله هسته سلول بیضی شکل و متراکم شده، آکروزوم نزدیک 70 درصد سر را می پوشاند. دم به طویل شدن ادامه داده و ساختارش کامل می شود (8)(شکل 3-1 قسمت 4 و 5).

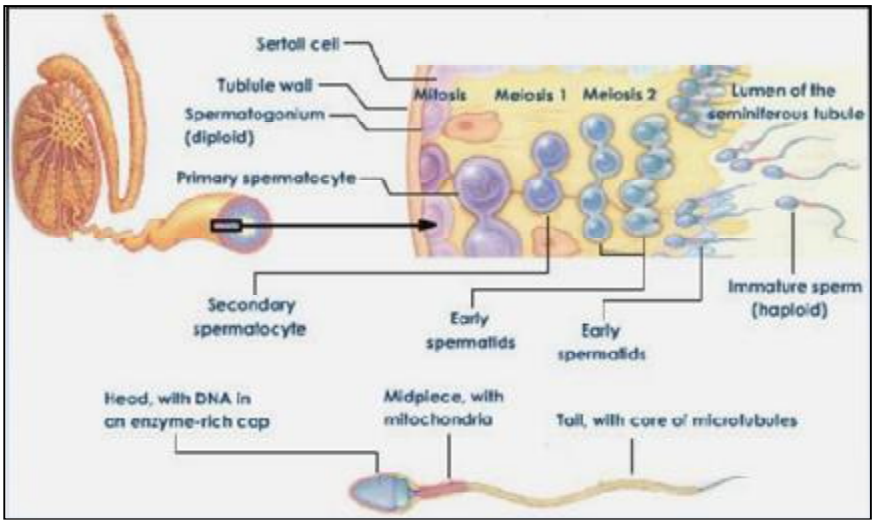
4- **مرحله بلوغ**[3]: در این مرحله جدا شدن و فاگوسیتوز شدن سیتوپلاسم اضافی اسپرماتیدها توسط سلول های سرتولی صورت می گیرد و سرانجام سلول های سرتولی[4] اسپرماتوزوئید را به داخل لوله منی ساز رها می کنند (8)(شکل 3-1 قسمت 6 و 7).



شکل 3-1-اسپرمیوژنز: مرحله گلژی(1 و 2)، مرحله کلاهک(3)، مرحله آکروزومی(4 و 5)، مرحله بلوغ(6 و 7)

یک اسپرم بالغ شامل ناحیه سر، گردن و دم می باشد. دم شامل ناحیه میانی، ناحیه اصلی و ناحیه انتهایی است (9)(شکل 4-1).

[1] - Cap phase
[2] - Acrosomal phase
[3] - Maturation phase
[4] - Sertoli cells



شکل 4-1- مراحل اسپرماتوژنز در لوله های منی ساز و در نهایت تولید اسپرم بالغ

2- بلوغ اسپرم در اپیدیدیم

پس از تولید اسپرم در بیضه، اسپرم وارد اپیدیدیم می شود. اپیدیدیم شامل سه قسمت سر، تنه و دم می باشد و مخزن اسپرم ها می باشد. مدت توقف در این ناحیه، 1 تا 3 هفته می باشد. در این مدت اسپرم ها دچارتغییراتی از لحاظ شکل، اندازه و حرکت می شوند و سرانجام متحرک شده، در واقع به بلوغ نهایی خود می رسد.

اپیدیدیم به مجرای دفران[1] به طول 45 سانتیمتر و پهنای 2 تا 3 میلیمتر منتهی می گردد. این مجرا در انتها ناحیه وسیعی با نام آمپول[2] را ایجاد می کند و سپس دو قسمت می شود. یک انشعاب به کیسه منی[3] منتهی خواهد شد و انشعاب دیگر مجرای انزالی[4] را تشکیل می دهد. کیسه های منی (وزیکول های سمینال) دو غده کوچک هستند که در پشت مثانه[5] و در دو طرف پروستات [6] قرار گرفته اند(شکل 5-1). وظیفه کیسه منی تولید مایع مغذی (قند، پروتئین، غیره) جهت تغذیه اسپرم ها می باشد (10).

[1] - Vas deferens
[2] - Ampulla
[3] - Seminal veshcle
[4] - Ejaculatory duct
[5] - Urinary bladder
[6] - Prostate gland