وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد
كلية التربية_ابن الهيثم

دراسة نسق بعض الحركيات الخلوية واليلات مستضدات التطابق النسيجي للجين بيتا 1 في بلازما السائل المنوي للذكور العقيمين

أطروحة مقدمة الى مجلس كلية التربية (ابن الهيثم) / جامعة بغداد وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة في علوم حياة / الوراثة المناعية

من قبل
زهراء حسين محمد قدري

بكالوريوس علوم حياة / كلية التربية (ابن الهيثم) / جامعة بغداد (1999)
ماجستير مناعة / كلية التربية (ابن الهيثم) / جامعة بغداد (2002)

بإشراف

أ.م.د. أنوار ادريس سليمان العساف
مناعة

أ. د. علي حسين أدحية
وراثة-مناعية

ذو الحجة 1432

تشرين الثاني 2011

www.manaraa.com

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية للتحري عن دور مستوى الحركيات الخلوية (IL-2 و IL-4 و IL-10 و IL-13 و IL-17A و TNF-α) وأضداد النطف في السائل المنوي وأليلات HLA-DQB1 في نشوء وإمراضية العقم الذكري في عينة من المرضى العراقيين. شملت الدراسة 116 من الذكور المصابين بالعقم الأولي والمراجعين لمستشفى كمال السامرائي لأمراض العقم وأطفال الأنابيب وعيادة العقم في مستشفى بغداد التعليمي خلال المدة آذار- أب 2010، اذ شملت الدراسة 32 من الذكور الخصبين (سيطرة). وزع المرضى على ثلاث مجاميع استنادا إلى الفحص ألسريري والتحليل العام للسائل المنوي والتي كانت اللانطفيه Azoospermia (32 مريض) وقلة النطف Oligozoospermia (40 مريض) ووهن النطف Asthenozoospermia (44 مريض).

توصلت الدراسة إلى النتائج الآتية:

تقارب معدل حجم السائل المنوي في مرضى اللانطفيه و قلة النطف وكذلك في أفراد السيطرة (2.25 و2.75 و2.50 مل، على التوالي)، ولكنه ارتفع معنويا (الاحتمالية ≤ 0.05) في مرضى وهن النطف (3.58 مل).

كان تركيز الحيوانات المنوية في عينة السيطرة 65.13 مليون حيوان منوي/مل، بينما انخفض هذا التركيز معنويا (الاحتمالية ≤ 0.05) في مرضى وهن النطف (51.42 مليون حيوان منوي/مل) و قلة النطف (5.58 مليون حيوان منوي/مل).

انخفضت معنويا (الاحتمالية ≤ 0.05) النسبة المئوية للحركة التقدمية في مرضى قلة النطف و وهن النطف مقارنة برجال السيطرة (9.6 و16.3 على التوالي مقابل 50.6%)، وعلى العكس من ذلك ارتفعت معنويا الحيوانات اللاتقدمية (45.4 و30.4 على التوالي مقابل 21.9%) أو الغير متحركة في المرضى (45.0 و52.5 على التوالي مقابل 27.5%).

تقارب معدل تكرار الحيوانات المنوية غير الطبيعية في مرضى قلة النطف ووهن النطف (56.7 و58.3%، على التوالي)، إلا أن كلا التكرارين ارتفعت معنويا (الاحتمالية ≤ 0.05) مقارنة بالتكرار المشاهد في السيطرة (23.1%).

لم يظهر فرقا معنويا في معدل أضداد النطف في البلازما المنوية لمرضى اللانطفيه و قلة النطف وكذلك في أفراد السيطرة (38.7 و41.2 و43.8 وحدة/مل، على التوالي)، ولكنه انخفضت هذه المعدلات الثلاث معنويا مقارنة بمعدل هذه الأضداد في مرضى وهن النطف (55.4 وحدة/مل)، وعندما قيم المرضى والسيطرة في ضوء إيجابيتها لأضداد النطف فقد سجل مرضى وهن النطف أعلى نسبة مئوية (41.7%) وتلاها في ذلك أفراد السيطرة (25.0%) ومرضى اللانطفيه (20.8%) وأخيرا مرضى قلة النطف (16.7%)، إلا أن هذه الاختلافات لم تكتسب الدلالة المعنوية عند مقارنة كل مجموعة من مجاميع المرضى مع السيطرة.

لم يظهر معدل مستوى الحركيات الخلوية IL-2 و IL-10 و IL-17A في البلازما المنوية للمجاميع الأربعة المدروسة أية اختلافات معنوية، في حين أظهرت الحركيات الخلوية IL-4 و IL-13 و TNF-α تغايرات معنوية، حيث ارتفع معنويا معدل مستوى IL-4 في البلازما المنوية لمرضى قلة النطف ووهن النطف (24.5 و22.3 بيكوغرام/مل، على التوالي) مقارنة بمرضى اللانطفيه والسيطرة (15.6 و17.1 بيكوغرام/مل، على التوالي). وبالنسبة للحركي الخلوي IL-13، فقد ارتفع مستواه معنويا في مرضى وهن النطف (31.3 بيكوغرام/مل) مقارنة بمعدله في مرضى اللانطفيه (14.0 بيكوغرام/مل)، قلة النطف (10.2 بيكوغرام/مل) أو السيطرة (13.3 بيكوغرام/مل). أظهر TNF-α أعلى معدل في مرضى قلة النطف (106.3 بيكوغرام/مل) مقارنة بمرضى اللانطفيه و وهن النطف (102.0 و100.1 بيكوغرام/مل، على التوالي) أو السيطرة (98.6 بيكوغرام/مل).

من خلال دراسة نسب الحركيات الخلوية فقد كان أكثر التغايرات وضوحا تلك النسب التي شملت IL-13 تحديدا في مرضى وهن النطف وهذا مايؤكد السبب المناعي للعقم في هؤلاء المرضى والتي ربما يؤدي فيها IL-13 دورا مهما.

لم يكن للحركيات الخلوية IL-2 و IL-4 ؛ IL-4 و IL-13 إسهاما معنويا في زيادة معدل تكرار الحيوانات المنوية غير الطبيعية في مرضى قلة النطف ووهن النطف، على التوالي، ولكن عند دراسة تأثير الحركيات الخلوية على الحركة التقدمية للنطف، لم يظهر IL-10 و IL-17A أية تأثيرات معنوية، في حين كان للحركيات الخلوية IL-2 و IL-4 و IL-13 و TNF-α بعض التأثيرات المعنوية. وعند دراسة هذه التأثيرات على أضداد النطف، لم يكن هناك نمطا بسيطا لتوزيع هذه الحركيات الخلوية في الحالات الموجبة والسالبة لأضداد النطف، وكانت هذه التغايرات خاضعة لنوع الحركي الخلوي المدروس وهل الحالات المدروسة مرضية أو تابعة للسيطرة، كما أن نوع العقم هو الأخر كان عاملا مؤثرا (اللانطفيه أو قلة النطف أو وهن النطف).

أظهرت أربع أليلات من HLA-DQB1 (DQB1*0204 و DQB1*0301 و DQB1*0302 و DQB1*0601) اختلافات مابين مرضى اللانطفيه والسيطرة، ولكن لم تكتسب هذه الاختلافات الدلالة المعنوية، في حين أظهر تكرار أليلان (DQB1*0301 و DQB1*0501) زيادة في مرضى قلة النطف بالمقارنة مع السيطرة، إلا أن الأختلاف لم يكن معنويا في الأليل DQB1*0301 ولكن كان معنويا (الاحتمالية = 0.03) في الأليل DQB1*0501 (25.0 مقابل 5.0%). وفي مرضى وهن النطف، أظهر الأليلان DQB1*0301 (22.7 مقابل 6.3%) و DQB1*0501 (27.3 مقابل 6.3%) تكرارات مرتفعة في المرضى مقارنة بالسيطرة، ولكن كان الفرق معنويا (الاحتمالية = 0.05 و0.02 على التوالي) في كلا الأليلين. وأظهر هذان الأليلان تأثيرات مختلفة في مستوى اثنان من الحركيات الخلوية (IL-13 و TNF-α) ولكن في نفس مجاميع العقم (قلة النطف ووهن النطف)، بحيث ساهم الأليل الأول بخفض مستوى IL-13، في حين ساهم DQB1*0501 بزيادة مستوى TNF-α في المرضى. فضلا عن ذلك فقد تصاحب الأليل DQB1*0301 مع الاستعداد

المنارة للاستشارات

www.manaraa.com

لتطور أضداد النطف في مرضى قلة النطف وعلى العكس من ذلك فقد كان الأليل DQB1*0501 عاملا لتقليل إنتاجها في مرضى وهن النطف.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Summary

The presented study aimed to investigate the role of seminal plasma cytokine (IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17A and TNF-α) and anti-sperm antibody (ASA) levels and HLA-DQB1 alleles in the aetiopathogenesis of male infertility in a sample of Iraqi patients. A total of 116 males with primary infertility attending Kamal Al-Samaraie Hospital, Centre of Infertility and *in vitro* Fertilization (Baghdad) and Baghdad Teaching Hospital (Infertility Clinic) during the period March - August 2010 were enrolled in this study, in addition to 32 fertile males (controls). Based on clinical examination and general seminal fluid analysis, the patients were distributed into three clinical groups: 32 azoospermic, 40 oligozoospermic and 44 asthenozoospermic patients.

The study reached the following results:

1. The azoospermia and oligozoospermia patients, as well as, controls shared an approximated mean of seminal fluid volume (2.25, 2.75 and 2.50 ml, respectively), while it was significantly ($P \leq 0.05$) increased (3.58 ml) in asthenozoospermia patients.
2. In control men, the spermatozoa concentration was 65.13 x 10^6 spermatozoa/ml, while it was significantly ($P \leq 0.05$) decreased in asthenozoospermia patients (51.42 x 10^6 spermatozoa/ml), as well as, oligozoospermia patients (5.58 x 10^6 spermatozoa/ml).
3. The percentage frequency of progressive motility was significantly ($P \leq 0.05$) decreased in oligozoospermia and asthenozoospermia patients as compared to control men (9.6 and 16.3, respectively *vs*. 50.6%). In contrast, the non-progressive motile (45.4 and 30.4, respectively *vs*. 21.9%) or immotile (45.0 and 52.5, respectively *vs*. 27.5%) spermatozoa were significantly increased in the patients.
4. Oligozoospermia and asthenozoospermia patients shared an approximated mean of abnormal spermatozoa frequency (56.7 and 58.3%, respectively),

www.manaraa.com

but both frequencies were significantly ($P \leq 0.05$) higher than the observed frequency in controls (23.1%).

5. The means of seminal plasma ASAs in azoospermia and oligozoospermia patients, as well as, controls showed no significant difference (38.7, 41.2 and 43.8 U/ml, respectively), but the three means were significantly lower than the mean (55.4 U/ml) of these antibodies in asthenozoospermia. When patients and controls were evaluated in terms of their positivity for ASAs, the highest frequency of positive cases was observed in asthenozoospermia patients (41.7%), followed by controls (25.0%), azoospermia (20.8%) and finally oligozoospermia (16.7%) groups, but these differences were not significant when each group of infertility was compared with controls.
6. The mean of IL-2, IL-10 and IL-17A levels in seminal plasma showed no significant difference between the four investigated groups, while IL-4, IL-13 and TNF-α demonstrated significant variations. The seminal plasma level means of IL-4 in oligozoospermia and asthenozoospermia patients (24.5 and 22.3 pg/ml, respectively) were significantly higher than the corresponding means in azoospermia patients and controls (15.6 and 17.1 pg/ml, respectively). For IL-13, asthenozoospermia patients showed a significantly higher mean (31.3 pg/ml) than the mean in azoospermia patients (14.0 pg/ml), oligozoospermia patients (10.2 pg/ml) or controls (13.3 pg/ml). TNF-α showed the highest mean in oligozoospermia patients (106.3 pg/ml), as compared to azoospermia and asthenozoospermia patients (102.0 and 100.1 pg/ml, respectively), as well as, controls (98.6 pg/ml).
7. With respect to cytokine ratios, it was obvious that the most observed variations involved ratios that had IL-13 and they were only in asthenozoospermia patients; an observation that confirms the immunological aetiology of infertility in asthenozoospermia patients, in which IL-13 may play a prominent role.

www.manaraa.com

8. There was significant contribution of IL-2 and IL-4 and IL-4 and IL-13 to increased frequencies of abnormal spermatozoa morphology in oligozoospermia and asthenozoospermia patients, respectively. With respect to the effect of cytokines on progressive motility, IL-10 and IL-17A showed no significant effects, while for IL-2, IL-4, IL-13 and TNF-α, some significant variations were observed. When such effect was considered on ASAs, there was no simple manner of cytokine distributions in the positive and negative ASA cases in patients and controls, and the variations were subjected to the type of cytokine investigated, as well as, whether the cases are controls or patients, and further variation can also ascribed to the type of infertility (azoospermia, oligozoospermia or asthenozoospermia).
9. Four HLA-DQB1 alleles (DQB1*0204**,** DQB1*0301**,** DQB1*0302 and DQB1*0601**)** showed differences between azoospermia patients and controls, but none of them attended a significant level. In oligozoospermia patients, two alleles (DQB1*0301, DQB1*0501) showed increased frequencies as compared with controls, but the difference was not significant for DQB1*0301 allele, while it was significant (P=0.03) for DQB1*0501 allele (25.0 *vs*. 5.0%). For asthenozoospermia patients, DQB1*0301 (22.7 *vs*. 6.3%) and DQB1*0501 (27.3 *vs*. 6.3%) alleles showed increased frequencies as compared with controls, but both differences attended a significant level (P = 0.05 and 0.02, respectively). The deviated alleles (DQB1*0301 and DQB1*0501) impacted two cytokines (IL-13 and TNF-α, respectively) levels with different effects, but in the same groups of infertility (oligozoospermia and asthenozoospermia). The first allele contributed to a decreased level of IL-13, while DQB1*0501 was involved in an increased level of TNF-α in the patients. Furthermore, DQB1*0301 allele was probably associated with predisposition to develop ASAs in oligozoospermia patients, while DQB1*0501 was probably associated with a protection in asthenozoospermia patients.

www.manaraa.com

Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Baghdad
College of Education (Ibn Al-Haitham)

Studying the Profile of Some Cytokines and HLA-DQB1 Alleles in Seminal Plasma of Infertile Males

A Thesis
Submitted to the Council of the College of Education Ibn Al-Haitham, University of Baghdad in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Biology/ Immunogenetics

By

Zahraa Hussein Mohammed Kadri
B.Sc. Biology (1999), College of Education (Ibn Al-Haitham), University of Baghdad
M.Sc. Immunology (2002), College of Education (Ibn Al-Haitham), University of Baghdad

Supervised by

Dr. Anwar I. S. Al-Assaf
Assistant Professor
Immunology

Dr. Ali H. Ad'hiah
Professor
Immunogenetics

November 2011 **Dhul-Hijja 1432**

www.manaraa.com