University of Mosul
College of Education for
Pure Science

Molecular Indentification of Hayluronidase and the Effects of Fatty Acids and Oxidative Stress in Seminal Fluid of Infertile Men

Reem Nawaf Hamdoon Al-Sawaf

Ph.D. Thesis
Chemistry

Supervised by

Assist. Prof.
Dr. Mohammed Abd Al-Hadi Al-Obeady

Assist. Prof.
Dr. Sarab Dawod sleman Al-Shamaa

2021 A.D **1443 A.H**

Summary

This study was conducted on a group of men with unexplained infertility.The study included a sample of (150) fertile males and a sample of (50) control males , Semen samples were collected from the two groups after a period of abstention from sexual relationships for three days and during the period between (15/11/2019) and (20/5/2020).

The semen samples were divided into several parts in order to conduct many tests for various tests parameters , total cholestrol , manganese , zinc and antioxidant parameters albumin, thiol group , total anti oxidants capacity , malondialdehyde and creatine kinase. Significant changes were observed for most of the measured parameters with the exception of albumin when comparing the group of fertile males with the control group .The results for the fertile group were as: (33.58 mg/dl), (42.05µg/ml), (75.44 µg/ml), (1.06 g/dl) ,(6.78 µmol/L), (1.85%),(1.04 µmol/L), and (302 U/L) respectively whilst the results for the control group were (21.63 mg/dl), (70.62 µg/ml), (186.6 µg/ml), (0.889 g/dl), (14.43 µmol/L), (12.16%), (1.40 µmol/L),and (538 U/L) respectively.

The study also dealt with the analysis and measurement of the percentage of fatty acids of various saturated and unsaturated types (mono and poly) in the semen fractions cholesterol ester and phospholipids using capillary gas chromatography . The results showed significant differences in the percentage of a large number of fatty acids in general and unsaturated fatty acids in particular where the percentage of saturated (0.279), monounsaturated (0.211) and polyunsaturated (0.126) were determind .As fatty acids in the phospholipids fraction of semen for infertile males, the results were for the same fatty acids (0.355) (0.248) and (0.234) for control group for the same fraction of semen. while for the cholesterol ester fraction for saturated fatty acids were

(0.369), monounsaturated were (0.209) and polyunsaturated were (0.123) for fertile males, whereas for control group they were (0.310) (0.221) and (0.136) and for the same part of semen respectively.The results represent the total percentage of each type of fatty acid.

The study also included the isolation and purification of hyaluronidase from the semen of the control group using chromatography techniques, ion exchange and gel filtration, and calculation of the approximate molecular weight using the electro-migration technique (SDS).The approximate molecular weight was (57), and the study also included stabilization of the optimum conditions for the enzyme, where the results were for the acidity function , temperature , the incubation period , the concentration of the substrate and the concentration of the enzyme. were all calculated and analysed.

The study also included agenetic study of the enzyme and two gen, namely (Hyal 2) and (PH20) in terms of enzyme primers, their design and gene expression for both types using the quantitative poly chain reaction(qPCR) and (nanodrop) techniques to analyse (DNA).Moreover, detection of two genes coding for two hyaluronidases isomers were accomplished in this study utilizing the qRTPCR technique for amplicon copy number that reflects quantitative gene expression of these two genes in the seminal fluid of both the control and infertiled men. The results of this thesis proved the existence of two coding genes of hyaluronidase isomers, hyal 2 and SPAM1/PH20. A comparison of Hyal 2 and PH20 amplicon copy numbers between control group and infertile males revealed that there were significant differences in the amplicon copy numbers of these two genes of around 50 percent, which reflects the difference in these two genes expression between these two groups which is considered one of the unexplained reasons for infertility

The study also included conducting a correlational relationship to find the correlation coefficient between a number of biochemical parameters related to the process of oxidative stress and a number of fatty acids on the one hand, and the gene expression of the enzyme on the other. The results showed that there is a significant positive correlation on the zinc ,malondialdehyde and fatty acids(C18:2) and (C22:1) ,and a significant negative correlation on the thiol-group ,total antioxidant capacity and fatty acids (C18:0),(C22:2) and (C20:4).This indicates that there is a clear effect of these parameters and fatty acids on the gene expression of the enzyme which contributes to a significant extent to the reasons behind unexplained infertility.

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة على مجموعة من الرجال الذين يعانون من عقم مجهول السبب ، حيث اشتملت الدراسة على عينة من (150) رجل عقيم وعينة من (50) رجلاً غير عقيم كمجموعة ضابطة ، حيث تم جمع السائل المنوي من المجموعتين. بعد فترة انقطاع عن الجماع الجنسي أو العلاقات الجنسية لمدة (3) أيام وللمدة ما بين (2019/11/15) (2020/5/20).

تم تقسيم عينات السائل المنوي إلى عدة أجزاء من أجل إجراء العديد من الاختبارات ، حيث تم قياس المتغيرات البيوكيميائية التالية: الكوليسترول الكلي ، المنغنيز ، الزنك , معاملات الإجهاد التأكسدي الالبومين ، مجموعة الثايول ، السعة الكلية لمضادات الأكسدة ، مالونديالديهايد وكرياتين كاينيز , حيث لوحظت تغيرات معنوية لمعظم المتغيرات المقاسة باستثناء الألبومين عند مقارنة مجموعة المرضى مع مجموعة السيطرة وكانت النتائج لمجموعة المرضى كالتالي: (33.58 ملغم / ديسيلتر) ، (42.05 مايكروغرام / مل) ، (75.44 مايكروغرام / مل) ، (1.06 غم / ديسيلتر) ، (6.78 مايكرومول / غم) ، (1.85٪) ، (1.04 مايكروغرام / لتر) ، (302 وحدة / لتر) على التوالي: (21.63 ملغم / ديسيلتر) ، (70.62 مايكروكرام / مل) ، (186.6 مايكروكرام / مل) ، (0.889 غم / ديسيلتر) ، (14.43 مايكروكرام / غم) ، (12.16٪) ، (1.40 مايكروغرام / لتر) ، (538 وحدة/لتر) على التوالي .

تناولت الدراسة أيضًا تحليل وقياس النسبة المئوية للأحماض الدهنية من مختلف الأنواع المشبعة وغير المشبعة (أحادية ومتعددة) في أجزاء السائل المنوي الكوليسترول استر والدهون الفوسفاتية, باستخدام كروماتوكرافيا الغاز الشعري.وأظهرت النتائج وجود فروق معنوية في النسبة المئوية لعدد كبير من الأحماض الدهنية بشكل عام والأحماض الدهنية غير المشبعة بشكل خاص حيث كانت النسبة المئوية للأحماض الدهنية المشبعة (0.279) وللاحادية غير المشبعة (0.211) وللمتعددة غير المشبعة (0.126).اما بالنسبة النسبة المئوية لذات الاحماض الدهنية لكن للسائل المنوي لمرضى العقم ، كانت النتائج لنفس الأحماض الدهنية (0.355) (0.248) (0.234) للأشخاص الأصحاء.في حين كانت النتائج بالنسبة لجزء كوليستيرول إستر للأحماض الدهنية المشبعة (0.369) ، الأحادية غير المشبعة (0.209) والمتعددة (0.123) للأشخاص العقيمين ، بينما كانت للأشخاص الأصحاء كانت (0.310) (0.221) (0.136) ولنفس الجزء من السائل المنوي.

كما تضمنت الدراسة عزل وتنقية إنزيم الهيالورونيداز من السائل المنوي للأشخاص الأصحاء باستخدام تقنيات الكروماتوغرافيا والتبادل الأيوني والترشيح الهلامي وحساب الوزن الجزيئي التقريبي باستخدام تقنية الهجرة الكهربائية (SDS). حيث كان الوزن الجزيئي التقريبي

(57كيلو دلتون) ، كما اشتملت الدراسة على دراسة الظروف المثلى لعمل الانزيم ، فيما يتعلق بالدالةالحامضية ودرجة الحرارة وفترة الحضانة وتركيز المادة الاساس وتركيز الإنزيم. .

تناولت الدراسة ايضا إجراء دراسة وراثية للإنزيم واثنين من أيزومرين هما (HTAL2, PH20) من حيث البادئات الإنزيمية وتصميمها والتعبير الجيني لكلا النوعين باستخدام تقنية (qPCR) و (nanodrop) للتحليل ,علاوة على ذلك ، تم الكشف عن اثنين من الجينات المشفرة لاثنين من أيزومرات الهيالورونيداز في هذه الدراسة باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل الحقيقي لرقم نسخ الأمبليكون الذي يعكس التعبير الجيني الكمي لهذين الجينين في السائل المنوي لكل من الرجال الأصحاء والعقم.وقد أثبتت النتائج وجود جينين مشفرين لأيزومرات الهيالورونيداز ، الهيال 2و PH20 / SPAM1و كشفت مقارنة أرقام نسخ تطبيق Hyal2 و PH20 بين الرجال الأصحاء والعقم عن وجود اختلافات كبيرة في أعداد نسخ الأمبليكون لهذين الجينين في 50 بالمائة ، مما يعكس الاختلاف في تعبير هذين الجينين بين هاتين المجموعتين وهذا قد يكون من أسباب العقم غير المبررة.

كما تضمنت الدراسة إجراء علاقة ارتباطية لإيجاد معامل الارتباط بين عدد من المتغيرات الكيموحيوية المتعلقة بعملية الإجهاد التأكسدي ونسبة عدد من الأحماض الدهنية من جهة ، والتعبير الجيني للإنزيم من جهة أخرى. أظهرت النتائج أن هناك علاقة ارتباط موجبة معنوية بين كل من الخارصين و المالونداياالديهايد والأحماض الدهنية (C18: 2) و (C22: 1) ، ووجود ارتباط سلبي معنوي على مجموعة الثايول ومضادات الاكسدة الكلية والأحماض الدهنية (C16: 0)، (C18: 0)، (C22: 2)، (C20: 4) ، وهذا يشير إلى وجود تأثير واضح لهذه المتغيرات والأحماض الدهنية على التعبير الجيني للإنزيم مما يساهم إلى حد كبير في أسباب العقم غير المبرر.

جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

التشخيص الجيني للهيالورنديز وتاثير الاحماض الدهنية والكرب التاكسدي في السائل المنوي للرجال المصابين بالعقم

ريم نواف حمدون الصواف

اطروحة دكتوراه

الكيمياء

بإشراف

الاستاذ المساعد
الدكتور محمد عبدالهادي جاسم محمد العبيدي

الاستاذ المساعد
الدكتورة سراب داود سليمان الشماع

1443هـ

2021م