



Scan online to view this article

Association of rs737008 in *PRM1* and rs4780356 in *PRM2* Polymorphisms with Idiopathic Infertility in Iranian men

Elham Siasi ^{1*}, Ahmad Aleyasin²

1- Department of Microbiology, faculty of science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2-, Medical genetic department, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

Abstract

Aim and Background: Histones are replaced by protamines to package sperm head DNA during mammalian spermatogenesis. Protamine genes variation cause sperm DNA damage and is affect infertility in men. Therefore, this study aim was investigation on association of two rs737008 in *PRM1* gene and rs4780356 in *PRM2* gene polymorphisms with azoospermia and oligospermia in Iranian idiopathic infertile men.

Materials and Methods: DNA extraction from blood samples of 96 idiopathic infertile men with azoospermia and oligospermia and 100 normal control men. Prevalance of two studied polymorphisms was identified by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Then results were confirmed with sequencing.

Results: A mutant allele frequency of rs737008 in *PRM1* gene polymorphism was difference in patient and control groups but statistical analysis showed no significant association between this polymorphism prevalance among case and control groups ($P>0.05$). By genotyping shown no existent rs4780356 in *PRM2* gene polymorphism in anyone of case and control groups.

Conclusion: This study finding indicated there was not association with prevalance of two rs737008 in *PRM1* gene and rs4780356 in *PRM2* gene polymorphisms with oligospermia and azospermia and idiopathic male infertility in Iranian population. More studies need to demonstrate the role of these two polymorphisms with idiopathic infertility in Iranian men.

Key words: Male infertility, SNP, *PRM1* and *PRM2* genes, PCR-RFLP.

Corresponding author:

Department of Microbiology, faculty of science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
Email: emi_biotech2006@yahoo.ca



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

ارتباط پلی مورفیسم های rs737008 در ژن *PRM1* و rs4780356 در ژن *PRM2* با ناباروری ادیوپاتیک مردان ایرانی

الهام سیاسی^{۱*}، احمد ال یاسین^۲

۱- گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.
۲- گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: در روند اسپرماتوژنز پستانداران، پروتئین های پروتامین با اتصال به DNA سر اسپرم، جایگزین هیستون شده و سبب بلوغ اسپرم می شوند. تغییر در ژن های کدکننده پروتامین ها منجر به آسیب DNA اسپرم و در نتیجه ایجاد نابارور مردان می گردد. بنابراین هدف این تحقیق بررسی ارتباط دو پلی مورفیسم rs737008 در ژن *PRM1* و rs4780356 در *PRM2* با ایجاد ازواسپرمی و اولیگواسپرمی در مردان نابارور ادیوپاتیک ایرانی بود.

مواد و روش ها: از نمونه خون ۹۶ مرد نابارور ادیوپاتیک که ازواسپرم و اولیگو اسپرم بودند و ۱۰۰ نفر گروه کنترل، استخراج DNA انجام گرفت. حضور دو پلی مورفیسم مورد مطالعه با روش PCR-RFLP بررسی شد. سپس نتایج با روش quencing تأیید شدند.

یافته ها: فراوانی آلل موتان A از پلی مورفیسم rs737008 در ژن *PRM1* در مقایسه بین گروه بیمار با گروه کنترل متفاوت بود ولی با آنالیز آماری اختلاف معنی دار بین حضور این پلی مورفیسم بین گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد ($P > 0/05$). ژنوتایپینگ حضور پلی مورفیسم rs4780356 در ژن *PRM2*، در هیچ یک از گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد.

نتیجه گیری: یافته های این تحقیق مشخص نمود که ارتباطی بین حضور دو پلی مورفیسم rs737008 در ژن *PRM1* و rs4780356 در ژن *PRM2* با ایجاد ازواسپرمی و اولیگواسپرمی و در نتیجه ناباروری ادیوپاتیک جمعیت مردان ایرانی، وجود ندارد. مطالعه های بیشتر نیاز است تا نقش این دو پلی مورفیسم با ایجاد ناباروری ادیوپاتیک در مردان ایرانی مشخص گردد.

واژه های کلیدی: ناباروری مردان، پلی مورفیسم، ژن های *PRM1* و *PRM2*، PCR-RFLP.

مقدمه

ناباروری در میان ۱۵ درصد زوجین در دنیا وجود دارد و در ایران این میزان از آمار جهانی بالاتر است و در حدود درصد از موارد به دلیل ناباروری در مردان^۱ است. نابارور مردان به عنوان یک بیماری کمپلکس مطرح بوده که بیش از نیمی از موارد به علل ناشناخته است و در ۱۵ درصد موارد به علت ناهنجاری های کروموزومی و تغییرهای ژنتیکی

نویسنده مسئول:

گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

پست الکترونیکی: emi_biotech2006@yahoo.ca

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۷

Male infertility

اثرهای آن تغییرهای ژنتیکی بر روی روند اسپرماتوژنز و دخالت در تغییرها پس از ترجمه پروتئین‌هایی که در تشکیل اسپرم بالغ مؤثر هستند، همراه باشد. در نتیجه باعث ناباروری و پیامدهایی هم‌چون تغییر در هورمون‌های مردانه، ایجاد الیگواسپرمی یا ازواسپرمی، عدم توانایی ورود اسپرم به تخمک، انجام نپذیرفتن لقاح موفق و هم‌چنین عدم رشد جنین (حتی در لقاح آزمایشگاهی) می‌گردد (۸،۹،۱۰). مطالعه‌ها روی انواع پروتامین‌ها و نقشی که در روند اسپرماتوژنز دارند مشخص نموده است که تنظیم‌های اپی-ژنتیک هم‌چون تغییرها و بازارایی‌های پروتئین‌های هیستونی و نقش آن‌ها بر عوامل رمدلینگ‌کننده کروماتین-ها می‌تواند در جایگزینی پروتامین‌ها به‌جای هیستون‌ها در پروسه تجمیع هسته اسپرم و تشکیل سلول‌های جنسی بالغ در روند اسپرماتوژنز تأثیرگذار باشد. هم‌چنین وجود پروتامین‌ها در بسته‌بندی صحیح کروماتین که بر عملکرد و حرکت اسپرم بالغ تأثیر دارد و نقش هیدرودینامیکی سر اسپرم که در حفظ اطلاعات ژنتیکی اسپرم مؤثر است ضروری هستند (۳،۸،۱۰).

بنابراین بررسی مکانیسم‌های مولکولی در خصوص جایگزینی پروتئین‌های پروتامینی در هسته اسپرم می‌تواند مشخص‌کننده بیومارکرهای اپی‌ژنتیکی برای شناسایی مردان نابارور بوده و با پتانسیل بالا در درمان این بیماران مطرح باشند. از این رو در این مطالعه به بررسی ارتباط بین حضور دو پلی-مورفیسیم rs737008 در ژن *PRM1* و rs4780356 در ژن *PRM2* و ناباروری ادیوپاتیک مردان ایرانی با روش PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) پرداخته شد و نتایج ژنوتایپینگ، با روش تعیین توالی (Sequencing) تأیید شدند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری - در این تحقیق، ۹۶ مرد نابارور که به‌دلایل علل ناشناخته ژنتیکی، نابارور ادیوپاتیک تشخیص داده شده بودند و با کسب رضایت‌نامه و آگاهی افراد از مطالعه، برای نمونه‌گیری انتخاب شدند. این مردان دو زیر گروه، ازواسپرم که فاقد اسپرم و ۷۷ نفر بودند و اولیگو اسپرم که دارای کم-

است (۲،۱). از سایر عوامل ناباروری می‌توان به اختلال در تعداد، حرکت و مورفولوژی اسپرم و اختلال‌های ساختمانی، عدم تعادل هورمونی و عوامل ژنتیکی که در روند اسپرماتوژنز دخالت دارند، اشاره نمود (۱،۲،۳). عوامل ژنتیکی که تا به امروز مشخص شده‌اند و در ناباروری مردان مؤثر هستند، عبارتند از: اختلال‌های کروموزومی، بیماری‌های تک زنی، اختلال در میوز و اندوکراین (۲،۴). علی‌رغم تمام عوامل ذکر شده، ۲۵٪ از مردان نابارور دارای آنالیز اسپرم غیرطبیعی هستند که هیچ اتیولوژی برای آن‌ها شناسایی نشده است. این حالت را ناباروری ادیوپاتیک مردان می‌نامند، که با دلایل ژنتیکی متعددی مشخص می‌شود (۴،۵،۶). از عوامل ایجاد‌کننده ناباروری ادیوپاتیک، که با بررسی کیفیت اسپرم مشخص شده‌اند، می‌توان به فاکتورهای ژنتیکی هم-چون ژن‌های کروموزوم Y، ژن رسپتور اندروژن و ژن‌های تنظیم‌کننده هورمون‌های جنسی، تغییرهای اپی‌ژنتیک و اشکال غیرمعمول *IncRNA*, *miRNA*, *piRNA*, *RNA*‌ها که روی پروسه اسپرماتوژنز تأثیر می‌گذارند، اشاره نمود (۱،۲،۵).

اسپرماتوژنز روند حیاتی برای تکامل اسپرم است که با تراکم هیستون‌های هسته اسپرم کامل می‌شود. پروتئین‌های پروتامین با جایگزین شدن به‌جای هیستون‌ها در مرحله‌های تمایز هسته اسپرم در بلوغ سلول‌های اسپرم نقش دارند. این پروتئین‌ها غنی از اسید آمینه‌های آرژینین و سیستئین هستند، که برای تشکیل باندهای DNA و پل‌های دی-سولفیدی در هسته اسپرم و تجمیع در قسمت سر اسپرم مورد نیاز هستند (۲،۷،۸). دسته اول پروتئین‌های پروتامینی با ژن‌های *PRM* کد می‌شوند. تمامی پستانداران دارای ژن *PRM1* برای پروتامین‌ها هستند اما انسان و موش علاوه بر آن، ژن *PRM2* را نیز دارند. این ژن‌ها در لوکوس مولتی ژنی در ناحیه‌ای به‌طول ۲۸ کیلو باز روی کروموزوم ۱۶ که در روند اسپرماتوژنز دخالت دارند قرار دارند و تغییر در آن‌ها سبب ایجاد ازواسپرمی و اولیگواسپرمی در مردان می‌گردد. در تحقیقات گذشته مشخص شده است که بین حضور برخی پلی‌مورفیسیم‌ها و جهش‌ها در ژن‌های پروتامین‌ها، با ناباروری مردان ارتباط وجود دارد. این ارتباط می‌تواند با

انجام PCR و الکتروفورز محصول PCR - واکنش
 PCR برای تکثیر هر یک از پلی مورفیسیم‌های مورد مطالعه، با مواد مورد نیاز و پرایمرها و برنامه دستگاه PCR که به ترتیب در جداول ۱ و ۲ و ۳ آورده شده است، انجام گرفت. سپس صحت محصولات PCR با الکتروفورز روی ژل آگاروز و عکس برداری با دستگاه ژل داک کنترل شد.

جدول ۱- مواد مورد نیاز برای واکنش PCR

حجم (میکرولیتر)	مواد مورد نیاز
۱۹	آب مقطر دونیزه
۲/۵	بافر PCR
۱	Mgcl2
۰/۵	dNTP
۰/۵	هر یک از پرایمرهای راست و چپ
۱-۱/۲	DNA ژنومی نمونه مورد نظر
۰/۲	آنزیم Taq پلی‌مراز
۲۵	حجم نهایی

جدول ۲- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در انجام PCR

نام ژن	توالی پرایمرها	رفرنس
<i>PRM1</i>	F- cccctggcatctataacaggccgc R- caagaacaaggagaagagtg	۱۱
<i>PRM2</i>	F- ctccagggcccactgcagcctcag R- gaattgctatggcctcacttggtg	۱۱

جدول ۳- برنامه PCR برای تکثیر پلی مورفیسیم‌های مورد مطالعه.

نام ژن	مرحله دناتوره شدن دما - زمان	مرحله اتصال آغازگر دما - زمان	مرحله طولیل شدن دما - زمان	تعداد سیکل PCR	طول قطعه تکثیر شده bp
<i>PRM1</i>	۹۴°C - ۱ دقیقه	۶۶°C - ۱ دقیقه	۷۲°C - ۱ دقیقه	۳۲	۵۵۷
<i>PRM2</i>	۹۴°C - ۴۵ ثانیه	۷۰°C - ۴۵ ثانیه	۷۲°C - ۴۵ ثانیه	۳۲	۵۹۹

- زمان و دمای دناتوره شدن اولیه برای دو پلی مورفیسیم تکثیر داده شده به ترتیب ۹۴°C و ۵ دقیقه بود.
- زمان و دمای طولیل شدن نهایی برای دو پلی مورفیسیم تکثیر داده شده به ترتیب ۷۲°C و ۵ دقیقه بود.

و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم ۱۰ یونیت بر میکرولیتر که هر ۰/۱ آن معادل ۱ میکرولیتر است، مخلوط شد و حجم کلی را با کمک آب دیونیزه به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس نمونه‌ها را به مدت ۱۶-۲ ساعت در دماهای ۳۷°C و ۶۵°C که دماهای بهینه به ترتیب برای آنزیم‌های *Bsu I* و *Bsr I* (تهیه شده از شرکت تکاپوزیست) هستند، قرار داده شد.

تر از پنج میلیون سلول اسپرم در میلی‌لیتر و ۱۹ نفر بودند، را شامل می‌شدند که گروه بیمار بودند. آنان در گروه سنی ۳۰ تا ۴۵ سال قرار داشتند. گروه کنترل شامل ۱۰۰ نفر از مردان بارور سالم بود، که در گروه سنی مشابه قرار داشتند و از نظر پارامترهای فیزیولوژی و ساختمانی و نتایج کاریو تایپینگ دارای حالت نرمال بودند و دارای حداقل یک فرزند بودند. برای نمونه‌گیری، از کلیه افراد ۵ میلی‌لیتر خون محیطی در فالكون‌های حاوی ۵۰۰ میکرولیتر محلول آنتی-کوالانت EDTA (با غلظت ۱۰-۱ μM و pH برابر با ۶-۴) و میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ازاء هر یک میلی‌لیتر خون محیطی گرفته شد. نمونه‌های خون تا زمان استخراج DNA از هسته گلبول‌های سفید خون در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند.

انجام روش‌های مولکولی برای بررسی حضور پلی- مورفیسیم‌های rs737008 در ژن *PRM1* و rs4780356 در ژن *PRM2*

استخراج DNA و کنترل کیفیت ژنوم استخراج شده-
 استخراج DNA ژنومیک از خون، با روش استخراج نمکی DNA انجام گرفت. به منظور ارزیابی کمیت و کیفیت DNAهای استخراج شده و آگاهی از غلظت و درجه خلوص آن، از دستگاه نانو دراپ و الکتروفورز روی ژل آگاروز استفاده شد.

انجام روش RFLP برای تشخیص پلی مورفیسیم‌ها-
 پس از انجام PCR، برای بررسی حضور دو پلی مورفیسیم مورد مطالعه از روش RFLP و هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم‌های محدودالتر استفاده شد. روش کار و مواد و محلول‌های مورد استفاده برای انجام RFLP عبارت بود از: یک میکرولیتر از محصول PCR با یک میکرولیتر بافر ۱۰ X

گردید. مشخصات آنزیم‌های برش دهنده در این تحقیق در جدول ۴ آورده شده است.

پس از هضم آنزیمی، ژنوتایپینگ نمونه‌ها با الکتروفورز نمودن محصول PCR-RFLP روی ژل آگاروز ۱/۵٪ انجام

جدول ۴- قطعه‌های ناشی از هضم آنزیمی محصول‌های PCR به‌دنبال استفاده از روش RFLP

ژن	پلی‌مورفیسم	آنزیم	سایت برش	برش آلی	طول PCR	طول قطعات حاصل بعد از برش bp
<i>PRM1</i>	Rs737008	<i>Bst</i> I	CG/CG	آلل وحشی	۵۵۷	۵۵۷ و ۳۶۱ و ۱۹۶
<i>PRM2</i>	rs4780356	<i>Bsr</i> I	C/CAGT	آلل وحشی	۵۹۹	۵۹۹ و ۴۰۰ و ۱۹۹

بیماران و در برخی موارد بیوپسی بیضه، مردان ناباروری که ایدیوپاتیک تشخیص داده شدند، انتخاب شدند. نتایج دموگرافی افراد مورد مطالعه در جدول ۵ آورده شده است.

نتایج ژنوتایپینگ برای تشخیص پلی‌مورفیسم‌های *PRM1* در ژن rs737008 و *PRM2* در ژن rs4780356

برای بررسی دو پلی‌مورفیسم مورد مطالعه از تکنیک PCR RFLP - (هضم آنزیمی با آنزیم‌های برش دهنده محصول PCR) استفاده گردید. نتایج ژنوتایپینگ، حضور پلی‌مورفیسم rs4780356 در ژن *PRM2*، را در هیچ‌یک از گروه بیمار و کنترل نشان نداد و برای پلی‌مورفیسم rs737008 در ژن *PRM1* در مقایسه بین گروه بیمار با گروه کنترل آلل موتان A فراوانی متفاوت داشت و به‌عنوان ریسک فاکتور مرتبط با ناباروری مطرح است. در شکل ۱ نمونه‌هایی از ژنوتایپ‌های هموزیگوت‌های غالب CC و مغلوب AA و نمونه‌های هتروزیگوت CA در کنار مارکر مولکولی ۱۰۰ bp آورده شده است که حاصل هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم *Bst* I بوده‌اند.

تأیید صحت نتایج ژنوتایپینگ - برای تعیین سکانس و تأیید محصولات PCR-RFLP نمونه‌هایی از هموزیگوت غالب و هموزیگوت مغلوب و هتروزیگوت‌ها انتخاب شده و پس از خالص‌سازی با کیت سیناکلون، از طرف شرکت تکاپوزیست به کشور کره جنوبی (به شرکت بایونیر) برای تعیین توالی فرستاده شدند. تعیین توالی انجام شد و در نهایت بلاست انجام گرفت.

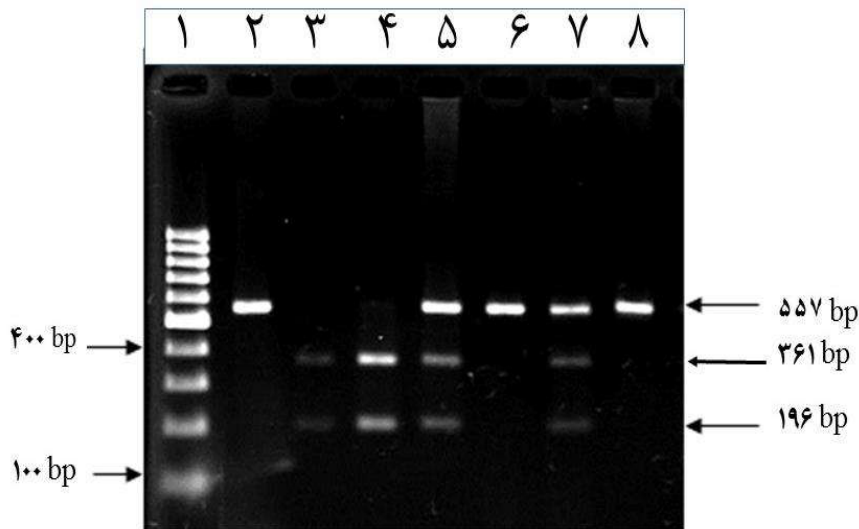
آنالیزهای آماری - برای آنالیز نتایج تحقیق از برنامه آماری SPSS و آزمون X^2 (Chi-square) در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ برای بررسی تفاوت‌های فراوانی آلل‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج نمونه‌ها - گروه بیمار مردان نابارور ازواسپرم و اولیگواسپرم را شامل می‌شدند. این افراد توسط پزشک متخصص اورولوژی مورد بررسی قرار گرفتند. با انجام یک سری آزمایش‌های اندرولوژی روی بیماران شامل بررسی تاریخچه پزشکی، معاینه‌های فیزیکی، آنالیز مایع سیمن، آنالیز هورمونی برای میزان LH, FSH, بررسی کاریوتایپ

جدول ۵- دموگرافی گروه بیمار و کنترل در این مطالعه

افراد مورد مطالعه	گروه بیمار ازواسپرم	گروه بیمار اولیگواسپرم	گروه کنترل سالم
تعداد	۷۷ نفر	۱۹ نفر	۱۰۰ نفر
گروه سنی	$37-45$ ($37/04 \pm 4/57$)	$37-45$ ($37/04 \pm 4/57$)	$26-45$ ($37/92 \pm 5/31$)
تعداد اسپرم	صفر	کم‌تر از 5×10^6	بیش‌تر از 20×10^6
حرکت اسپرم	فاقد حرکت	فاقد حرکت	بیش‌تر از ۵۰٪ متحرک
مورفولوژی اسپرم	نامعمول و غیر طبیعی	نامعمول و غیر طبیعی	بیش‌تر از ۳۰٪ طبیعی



شکل ۱- محصول های هضم آنزیمی برای پلی مورفیسم rs737008 در ژن *PRM1*، خانه شماره ۱: مارکر ژنتیکی ۱۰۰ bp، خانه شماره ۲: نمونه uncut (محصول PCR فاقد برش آنزیمی) (۵۵۷ bp)، خانه های شماره ۳ و ۴: نمونه های هموزیگوت غالب برش یافته (CC) (۳۶۱ bp و ۱۹۶ bp)، خانه های شماره ۵ و ۷: نمونه های هتروزیگوت برش یافته (CA) (۵۵۷ bp و ۳۶۱ bp و ۱۹۶ bp) و خانه های شماره ۶ و ۸: نمونه های هموزیگوت موتان فاقد برش (AA) (۵۵۷ bp).

هم چنین فراوانی از حضور پلی مورفیسم rs4780356 از ژن *PRM2*، در گروه بیمار و کنترل یافت نشد ($P > 0.05$). بنابراین می توان چنین نتیجه گرفت که بین حضور پلی مورفیسم های rs737008 در ژن *PRM1* و rs4780356 در ژن *PRM2* با ایجاد ازواسپرمی و اولیگواسپرمی در ناباروری ادیوپاتیک مردان ایرانی از نظر آماری ارتباط معنی داری وجود ندارد ($P > 0.05$). نتایج فراوانی حضور این دو پلی مورفیسم و آنالیز آماری آن بین گروه بیمار و کنترل در جدول ۶ آورده شده است.

نتایج آنالیز پلی مورفیسم های rs737008 در ژن *PRM1* و rs4780356 در ژن *PRM2* - با آنالیز آماری
نتایج ژنوتایپینگ دو پلی مورفیسم مورد مطالعه و مقایسه بین داده های دو گروه بیمار و کنترل مشخص شد با این که فراوانی آلل موتان A از پلی مورفیسم rs737008 در ژن *PRM1* در مقایسه بین گروه بیمار با گروه کنترل متفاوت بود ولی از نظر آماری اختلاف معنی دار بین حضور این پلی-مورفیسم بین گروه بیمار و کنترل وجود نداشت ($P > 0.05$).

جدول ۶- نتایج فراوانی ژنوتایپ های پلی مورفیسم rs737008 در ژن *PRM1* و rs4780356 در ژن *PRM2* و نتایج آنالیز آماری برای این دو پلی مورفیسم بین گروه بیمار و کنترل.

P.value	فراوانی آلل ها در گروه بیمار	فراوانی آلل ها در گروه سالم	آلل های پلی مورفیسم	فراوانی گروه بیمار	فراوانی گروه سالم	ژنوتایپ پلی مورفیسم rs737008
	۳۸ (۳۹/۶٪)	۳۸ (۳۸٪)	C	۲۲ (۲۲/۹٪)	۲۴ (۲۴٪)	هموزیگوت غالب (CC)
۰/۸۲				۳۲ (۳۲/۳٪)	۲۹ (۲۹٪)	هتروزیگوت (CA)
	۵۸ (۶۰/۴٪)	۶۲ (۶۲٪)	A	۴۲ (۴۳/۸٪)	۴۷ (۴۷٪)	هموزیگوت مغلوب (AA)
	۹۶ (۱۰۰٪)	۱۰۰ (۱۰۰٪)		۹۶ (۱۰۰٪)	۱۰۰	فراوانی کل

					(/۱۰۰)	
P.value	فراوانی آلل‌ها در گروه بیمار	فراوانی آلل‌ها در گروه سالم	آلل‌های پلی‌مورفیسم	فراوانی گروه بیمار	فراوانی گروه سالم	ژنوتایپ پلی‌مورفیسم rs4780356
	۹۶ (/۱۰۰)	۱۰۰ (/۱۰۰)	C	۹۶ (/۱۰۰)	۱۰۰ (/۱۰۰)	هموزیگوت غالب (CC)
NS*				(/۰)۰	(/۰)۰	هتروزیگوت (CT)
	(/۰)۰	(/۰)۰	T	(/۰)۰	(/۰)۰	هموزیگوت مغلوب (CC)
	(/۱۰۰)۹۶	(/۱۰۰)۱۰۰		(/۱۰۰)۹۶	(/۱۰۰)۱۰۰	فراوانی کل

NS* = به دلیل فراوانی صفر برای آلل مغلوب T مقدار Pvalue به صورت بدون معنی no significant محاسبه شده است.

ندارد و برای پلی‌مورفیسم rs4780356 در ژن *PRM2*، فراوانی آلل وحشی C در گروه بیمار و کنترل ۱۰۰٪ به دست آمد و فراوانی آلل موتانت صفر بود. بنابراین آنالیز نتایج چنین نشان داد که بین فراوانی حضور پلی‌مورفیسم‌های مطالعه شده در گروه بیمار و گروه کنترل تفاوت معنی‌دار وجود نداشته است و در نتیجه حضور این پلی‌مورفیسم‌ها در جمعیت مردان نابارور ایرانی با ایجاد ناباروری ادیوپاتیک در اثر اولیگواسپرمی و آزواسپرمی، مرتبط نیستند (زیرا مقدار Pvalue برای دو پلی‌مورفیسم مورد مطالعه، بیش‌تر از ۰/۰۵ و بدون ارتباط معنی‌دار به دست آمده است).

در ادامه برای نتیجه‌گیری کلی به مقایسه نتایج تحقیق‌های گذشته و پژوهش حاضر پرداخته شده است. بررسی مطالعه‌های گذشته نشان می‌دهد در سال‌های اخیر تحقیق‌های زیادی در مورد پلی‌مورفیسم و جهش‌ها در ژن‌های پروتامین در جمعیت‌های مختلف انجام گرفته است و نتایج متفاوتی از این تحقیق‌ها به دست آمده است (۹،۱۰،۱۲،۱۳،۱۴،۱۵،۱۶،۱۷،۱۸). تعدادی از این مطالعه‌ها ارتباط معنی‌داری را بین پلی‌مورفیسم یا جهش‌های مورد مطالعه در ژن پروتامین‌ها گزارش نموده‌اند (۱۵،۱۶،۱۷،۱۹،۲۰). از این تحقیقات می‌توان به ارتباط پلی‌مورفیسم rs4780356 در ژن *PRM2* با جمعیت مردان نابارور ژاپنی که معنی‌دار گزارش شده است و سبب ایجاد آزواسپرمی در آنان شده است اشاره نمود (۱۱). هم‌چنین تحقیق Al Zeyadi و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان داده است که در جمعیت مردان شهر نجف پلی‌مورفیسم rs4780356 در ژن *PRM2* با ایجاد تتراتواسپرمی و

نتایج تعیین توالی محصول‌های PCR - نمونه‌های محصول واکنش PCR برای دو ژن *PRM1* و *PRM2* تعیین توالی گردید و نتایج تعیین توالی در سایت بلاست NCBI برای نمونه‌های هموزیگوت غالب و مغلوب و هتروزیگوت کنترل شدند و با همولوژی که در سایت بلاست مشاهده شد نتایج ژنوتایپینگ با روش PCR-RFLP تأیید گردید.

بحث

براساس مطالعه‌های انجام شده کم‌تر از یک سوم دلایل ژنتیکی برای ناباروری هنوز ناشناخته هستند که به نام دلایل ژنتیکی ادیوپاتیک نامیده شده‌اند. با وجود این که فاکتورهای محیطی می‌توانند نقش مهمی در ناباروری مردان داشته باشند، مطالعه‌های امروزه تغییرهای ژنتیکی را عامل مؤثری در این امر می‌داند و به خصوص توجه زیادی به علل ژنتیکی در ناباروری ادیوپاتیک شده است (۸،۵،۲،۱). بر این اساس تحقیق حاضر به بررسی ارتباط حضور دو پلی‌مورفیسم rs737008 در ژن *PRM1* و rs4780356 در ژن *PRM2* و ایجاد ناباروری ادیوپاتیک در جمعیت مردان ایرانی پرداخته است. برای پلی‌مورفیسم rs737008 در ژن *PRM1*، فراوانی آلل تغییر یافته A در گروه بیمار ۶۰/۴٪ در مقایسه با گروه کنترل ۶۲٪ بود که با توجه به آنالیز ریسک فاکتوری در این خصوص، این آلل می‌تواند به عنوان یک فاکتور مرتبط با ناباروری محسوب شود ولی محاسبه مقدار Pvalue برای آلل‌های این پلی‌مورفیسم نشان داد که در جمعیت مردان نابارور ایرانی اختلاف معنی‌دار بین فراوانی حضور دو آلل غالب و موتانت در گروه بیمار و کنترل وجود

نورواسپریمیا و ناباروری ادیوپاتیک در مردان نابارور عراقی ارتباط معنی‌دار داشته است (۲۱). در تحقیق حاضر که به بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم rs4780356 در ژن *PRM2* با ناباروری مردان ایرانی پرداخته شده است، نتایج نشان داد که آن پلی‌مورفیسم در هیچ‌یک از نمونه‌های گروه بیمار و کنترل یافت نشده و ارتباط معنی‌داری بین این پلی‌مورفیسم با ناباروری مردان ایرانی وجود ندارد. البته تکرار آزمایش‌ها با تعداد نمونه بیشتر برای اثبات نتایج توصیه می‌گردد.

در خصوص پلی‌مورفیسم rs737008 در ژن *PRM1* گزارش‌هایی وجود دارد که بیان می‌دارند بین این پلی‌مورفیسم با ناباروری مردان ارتباط معنی‌داری وجود دارد (۱۵،۱۶،۱۷،۱۹). ولی در تعداد دیگری از مطالعه‌ها، نتایجی مبنی بر عدم ارتباط بین پلی‌مورفیسم مذکور با ناباروری جمعیتی از مردان ژاپنی و ایرانی به‌دست آمده است (۱۱،۲۲). در مطالعه حاضر نیز فراوانی پلی‌مورفیسم rs737008 در ژن *PRM1* بین جمعیت گروه مردان نابارور ایرانی و گروه کنترل تفاوت معنی‌دار نشان نداده است ($P > 0.05$) که در نتیجه نشان داده شده است که با ایجاد ناباروری در مردان ایرانی مرتبط نیست. علاوه بر این موارد، در تعدادی دیگر از مطالعه‌هایی که در خصوص پلی‌مورفیسم‌های معمول در ژن‌های کدکننده پروتامین‌ها انجام گرفته است ارتباطی بین پلی‌مورفیسم‌های مورد مطالعه و ناباروری مردان مشاهده نشده است (۱۰،۱۶،۱۸،۲۲). در این رابطه می‌توان به مطالعه Dehghanpour و همکاران در سال ۲۰۱۹ اشاره نمود که به بررسی ۸ پلی‌مورفیسم مختلف در ژن‌های *PRM1* و *PRM2* در مردان نابارور ادیوپاتیک ایرانی پرداخته بودند. نتایج تحقیق آنان نشان داد فراوانی پلی‌مورفیسم‌های مختلف در این دو ژن بین گروه بیمار و کنترل تفاوت معنی‌داری نداشتند ولی بیان نمودند فراوانی هتروزیگوتی برخی پلی‌مورفیسم‌ها بر کیفیت و مورفولوژی اسپرم و در نتیجه ایجاد اپوپتوز اسپرم می‌تواند تأثیرگذار باشد (۵). هم‌چنین در تحقیق He و همکاران در سال ۲۰۱۹ که با روش متانالیز برای بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های معمول در ژن‌های پروتامین‌ها و ناباروری

مردان انجام گرفته بود، چنین گزارش شد که اکثر این پلی‌مورفیسم‌ها با ناباروری جمعیت مردان آسیایی ارتباط معنی‌دار ندارند ولی می‌توانند با ناباروری جمعیت مردان افریقایی-اروپایی مرتبط باشند (۹). بر اساس این تحقیق‌ها مشخص می‌شود که فراوانی حضور پلی‌مورفیسم‌ها در ژن‌های *PRM1* و *PRM2* در جمعیت ایرانی و مقایسه آن‌ها با سایر جمعیت‌ها، نتایج متفاوتی را نشان می‌دهد که ممکن است به دلایل تفاوت مناطق جغرافیایی و آب و هوایی باشد که با شرایط محیط زیست و عادات زندگی این افراد ارتباط مستقیم دارد و یا به دلیل تفاوت نژاد و قومیت‌های مختلف که حاصل تفاوت ژنتیکی افراد است، باشد و یا به دلیل تفاوت تعداد افراد مورد بررسی و تفاوت سنی آن‌ها باشد که در هر حالت این موارد همگی می‌توانند در نتایج تحقیق‌ها اثرگذار باشند. هم‌چنین ممکن است نوع تغذیه یا ابتلا به بیماری‌های خاص و داروهایی که به‌طور زمینه‌ای در بیماران مصرف شده، عاملی برای تفاوت نتایج در جمعیت‌های مختلف مردان گردند. در هر صورت ناباروری یک بیماری کمپلکس به‌شمار می‌آید که می‌تواند تفاوت فاکتورهای محیطی و تفاوت جغرافیایی و قومیتی (ژنتیکی) در جمعیت‌های مختلف از نمونه‌های مورد بررسی، اثرهای متفاوت پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های پروتامین را که در بیان ژن‌های مرتبط با اسپرماتوژنز مؤثر هستند و نقش مهمی در ناباروری مردان دارند، را توجیه نماید. ذکر این نکته در انتها اهمیت دارد که با گستردگی مباحث در زمینه‌های ناباروری و تخصصی شدن هر یک از شاخه‌های مربوط به این دانش، ابداع روش‌های جدید و شیوه‌های نوین در بررسی جهش‌ها و پلی‌مورفیسم‌ها را قابل تأمل نموده است زیرا به‌کارگیری این متدها می‌تواند راهگشایی برای مطالعه‌های جامع‌تر در حوزه‌های پیش‌آگهی، پیشگیری و درمان این بیماری عاطفی - اجتماعی باشد و گامی مؤثر در جهت کاربرد روش‌های فارماکوژنتیکی برای این بیماری محسوب گردد.

نتیجه‌گیری

ژن‌های پروتامین، ژن‌هایی اختصاصی و با ساختمان ویژه هستند که برای صحت روند اسپرماتوژنز ضروری‌اند و حضور پلی‌مورفیسم و جهش‌ها، وجود هاپلوتایپ‌ها و لینک بودن

برخی ژن‌ها با این ژن‌ها، می‌تواند در آسیب به اسپرماتوژنز و عدم تشکیل اسپرم سالم و بالغ مؤثر باشد و در نتیجه سبب ناباروری در جمعیت مردان گردد. گرچه با توجه به نتایج این تحقیق این اثرها به ندرت با ایجاد ناباروری مرتبط است ولی حضور این پلی‌مورفیس‌ها و اثرهایی که آن‌ها بر وقایع اپی-ژنتیک در روند تغییرها پس از ترجمه این ژن‌ها اعمال می‌نمایند، می‌تواند به عنوان عاملی در تخریب روند اسپرماتوژنز مطرح باشد. لذا مطالعه‌های گسترده و با تعداد نمونه بیشتر در جمعیت‌های مختلف توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

از کلیه پرسنل و بیماران مرکز ناباروری نوید و مسئولان محترم پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک که در انجام کارهای آزمایشگاهی این تحقیق کمال همکاری را مبذول فرموده‌اند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.



1. Azizi F, Omrani M.D, Sadighi Gilani M.A, Hosseini J. The Genetic Causes of Male Infertility in Iranian Population; A systematic Review. *Men's Health Journal*, 2018; 2 (1); e1.
2. Venkatesh S, Kumar R, Deka D, Deccaraman M, Dada R. Analysis of sperm nuclear protein gene polymorphisms and DNA integrity in infertile men. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 2011; 57: 124-132.
3. Wang T, Gao H, Li W, Liu C. Essential Role of Histone Replacement and Modifications in Male Fertility. *Frontiers in Genetics*, 2019; 10(962): 1-15.
4. Park Sh. Genetic Factors and Environmental Factors Affecting Male Infertility. *International Research J. Advanced Engineering and Science*, 2016; 1(3): 115-118.
5. Dehghanpour F, Farzaneh Fesahat F, Miresmaeili S.M, Zare Mehrjardi E, Honarju A, Talebi A.L. Analysis of PRM1 and PRM2 Polymorphisms in Iranian Infertile Men with Idiopathic Teratozoospermia. *International J. Fertility and Sterility*, 2019; 13(1): 77-82.
6. Raheem A.A, Ralph D. Male infertility: causes and investigations. *Trends in urology and mens health*, 2011; 2(5): 8-11.
7. Bisht S, Mathur P, Dada R. Protamines and their role in pathogenesis of male infertility. *Transl Cancer Res*, 2016; 5(3):324-326.
8. Tavalae M, Ghorbani R, Nasr-Esfahani MH. The Role of Sperm Protamine in Pathogenesis of Male Infertility. *J. Fasa University of Medical Sciences*, 2019; 9 (2): 1357-1367.
9. He Q, Deng L, Deng S, Jin T. Association of protamine1 gene c.-190C>A polymorphism with male infertility risk: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*, 2019; 12(4):3047-3055.
10. Nabil A, Khalili M.A, Moshrefi M, Sheikhha M.H, Zare Mehrjardi E, Ashrafzadeh H.R. Polymorphisms in protamine 1 and 2 genes in asthenozoospermic men: A case-control study. *Int J Reprod BioMed*, 2018; 16(6): 379-386.
11. Tanaka H, Miyagawa Y, Tsujimura A, Matsumiya K, Okuyama A.Y.N. Single-nucleotide polymorphisms in the protamine-1 and -2 genes of fertile and infertile human male populations. *Molecular Human Reproduction*, 2003; 9: 69-73.
12. Gazouez C, Oriola J, De Mateo S, Vidal-Taboada J.M, Ballesca J.I. A common protamine 1 promoter polymorphism (C190A) correlates with abnormal sperm morphology and increased protamine P1/P2 ratio in infertile patients. *J. Andrology*, 2008; 29: 540-548.
13. Iguchi N, Yang S, Lamb D.J. An SNP in protamine 1: a possible genetic cause of male infertility? *J Med Genet*, 2006; 43: 382-384.
14. Imken L, Rouba H, EI Houate B, Louanjli N, Barakat A, Chafik A. Mutations in the protamine locus: association with spermatogenic failure? *Molecular Human Reproduction*, 2009; 7: 1-22.
15. Jiang W, Shi L, Liu H, Cao J, Zhu P, Yu M, Guo Y, Cui Y, Xia X. Systematic review and meta-analysis of the genetic association between protamine polymorphism and male infertility.

Andrologia, 2018; 50(5): e12990.

16. Jiang W, Sun H, Zhang J, Zhou Q, Wu Q, Li T, Zhang C, Li W, Zhang M, Xia X. Polymorphisms in Protamine 1 and Protamine 2 predict the risk of male infertility: a meta-analysis. *Scientific Reports*, 2015; 5(15300): 1-11.

17. Jiang W, Zhu P, Zhang J, Wu Q, Li W, Liu S, Ni M, Yu M, Cao J, Li Y, Cui Y, Xia X. Polymorphisms of protamine genes contribute to male infertility susceptibility in the Chinese Han population. *Oncotarget*, 2017; 8(37): 61637-61645.

18. Jodar M, Oriola J, Mestre G, Castillo J, Giwercman A, Vidal-Taboada J. Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes. *Int J Androl*, 2011; 34: 470-485.

19. Aydos O.S.E, Hekmatshoar Y, Altınok B, Özkan T, Şakirağaoğlu O, Karadağ A, Kaplan F, Ilgaz S, Taşpınar M, Yükselen I, Sunguroğlu A, Aydos K. Genetic Polymorphisms in PRM1, PRM2, and YBX2 Genes are Associated with Male Factor Infertility. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2018; 22(1):55-61.

20. Tüttelmann F, Křenková P, Römer S, Nestorovic A.R, Ljujic M, Štambergová A. A common haplotype of protamine 1 and 2 genes is associated with higher sperm counts. *Int J Androl*, 2010; 33: e240-e280.

21. Al Zeyadi M, AL-Salimi A.S.M, Albaldawy M.T. Single Nucleotide Polymorphism in Protamine 1 and Protamine 2 genes in fertile and infertile for men of Al-Najaf City. *J. Phys.: Conf. Ser*, 2019; 1234 (012081): 1-10.

22. Salamian A, Ghaedi K, Razavi S, Tavalae M, Tanhael S, Tavalae M, Salahshouri I, Gourabi H.M.H. Single nucleotide polymorphism analysis of protamine genes in infertile men. *Royan Institute International Journal of Fertility and Sterility*, 2008; 2(1): 13-18 .

23. Aston K.I, Krausz C, Laface I, Ruiz-Castane E, Carrell D.T. Evaluation of 172 candidate polymorphisms for association with oligozoospermia or azoospermia in a large cohort of men of European descent. *Hum Reprod*, 2010; 25: 1383-1397.