مقاله پژوهشی

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

Elham Siasi [1]*, Ahmad Aleyasin[2]

1. Associate Professor, PhD of Getetic, Department of Microbiology, faculty of science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Associate Professo, 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.

Material 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 prevalence of two rs737008 in *PRM1* gene and rs4780356 in *PRM2* gene polymorphisms with oligospermia and azospermia and idiopatic 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, Iau Science.

Corresponding author:
Associate Professor, PhD of Getetic, Department of Microbiology, faculty of science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Email: emi_biotech2006@yahoo.ca

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

الهام سیاسی*[۱]، احمدال یاسین[۲]

۱. دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. دانشیار، 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 هیستون‌ها شده و سبب بلوغ اسپرم می شوند. تغییر در ژن های کد کننده پروتامین ها منجر به آسیب DNA اسپرم و در نتیجه ایجاد ناباروری در مردان می‌گردد. بنابراین هدف این تحقیق بررسی ارتباط دو پلی مورفیسم rs737008 و rs4780356 در دو ژن کدکننده پروتئن پروتامین (به‌ترتیب*PRM1* و *PRM2*)، با ایجاد ازواسپرمی و الیگواسپرمی در مردان نابارور ادیوپاتیک ایرانی بود.

مواد و روش‌ها: 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 تعیین توالی تایید شدند.

یافته‌ها: فراوانی الل 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 ($P > ۰/۰۵$). با ژنوتایپینگ حضور پلی مورفیسم rs4780356 در ژن *PRM2* ، در هیچ یک از گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های 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. مطالعات بیشتر نیاز است تا نقش این دو پلی مورفیسم با ایجاد ناباروری ادیوپاتیک در مردان ایرانی مشخص گردد.

واژگان کلیدی: ناباروری مردان، پلی مورفیسم، ژن‌های *PRM1* و *PRM2*، PCR-RFLP، Iau Science.

مقدمه

ناباروری در میان ۱۵ درصد زوجین در دنیا وجود دارد ولی در ایران این میزان از امار جهانی بالاتر است و در حدود ۵۰ درصد از موارد به دلیل ناباروری در مردان[۱] است. ناباروری مردان به عنوان یک بیماری کمپلکس مطرح بوده که در بیش از نیمی از موارد به علل ناشناخته است و در ۱۵ درصد موارد به علت ناهنجاری های کروموزومی و تغییرات ژنتیکی می‌باشد (۱،۲). از سایر عوامل ناباروری می‌توان به اختلال در تعداد، حرکت و مورفولوژی اسپرم و اختلالات ساختمانی، عدم تعادل هورمونی و عوامل ژنتیکی که در

نویسنده مسئول:
دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
پست الکترونیکی: emi_biotech2006@yahoo.ca
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۳۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۱

۱- Male infertility

روند اسپرماتوژنز دخالت دارند، اشاره نمود (۱،۲،۳). عوامل ژنتیکی که تا به امروز مشخص شده‌اند و در ناباروری مردان موثر هستند، عبارتند از: اختلالات کرموزومی، بیماریهای تک ژنی، اختلال در میوز و اندوکرین (۲،۴). علی رغم تمام عوامل ذکر شده، ۲۵٪ از مردان نابارور دارای آنالیز اسپرم غیر طبیعی 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 ایجاد کننده ناباروری ادیو پاتیک، که با بررسی کیفیت اسپرم مشخص شده‌اند، می‌توان به فاکتورهای ژنتیکی همچون ژن های کروموزوم Y، ژن رسپتور اندروژن و ژن‌های تنظیم کننده هورمون‌های جنسی، تغییرات اپی ژنتیک و اشکال غیر معمول IncRNA, miRNA, piRNA, RNA ها که روی پروسه اسپرماتوژنز تاثیر می‌گذارند، اشاره نمود (۱،۲،۵). اسپرماتوژنز روند حیاتی برای تکامل اسپرم می‌باشد که با تراکم هیستون های هسته اسپرم کامل می‌شود. پروتئین-های پروتامین با جایگزین شدن به جای هیستون‌ها در مراحل تمایز هسته اسپرم در بلوغ سلول های اسپرم نقش دارند. این پروتئین‌ها غنی از اسید آمینه‌های آرژنین و سیستئین هستند، که برای تشکیل باندهای DNA و پل-های دی سولفیدی در هسته اسپرم و تجمیع در قسمت سر اسپرم مورد نیاز هستند (۲،۷،۸). دسته اول پروتئین‌های پروتامینی که با ژن کد کننده پروتئین پروتامین (*PRM: Protamin gene*) مرتبط هستند، ژن *PRM1* می‌باشد. تمامی پستانداران دارای ژن *PRM1* برای پروتامین‌ها می‌باشند اما انسان و موش علاوه بر آن، ژن *PRM2* را نیز دارند. این ژن‌ها در لوکوس مولتی ژنی در ناحیه‌ای به طول ۲۸ کیلو باز روی کروموزوم ۱۶ که درروند اسپرماتوژنز دخالت دارند قرار دارند و تغییر در آن‌ها سبب ایجاد آزواسپرمی و اولیگواسپرمی در مردان می‌گردد. در تحقیقات گذشته مشخص شده است که بین حضور برخی پلی‌مورفیسم‌ها و جهش‌ها در ژن‌های پروتامین‌ها، با ناباروری مردان ارتباط وجود دارد. این ارتباط می‌تواند با اثرات آن تغییرات ژنتیکی بر روی روند اسپرماتوژنز و دخالت در تغییرات پس از ترجمه پروتئین‌هایی که در تشکیل اسپرم بالغ موثر 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 ازمایشگاهی) می‌گردد (۸،۹،۱۰). مطالعات روی انواع پروتامین‌ها و نقشی که در روند اسپرماتوژنز دارند مشخص نموده است که تنظیمات اپی ژنتیک همچون تغییرات و بازاریی‌های پروتئین‌های هیستونی و نقش آنها بر عوامل رمدلینگ کننده کروماتین‌ها می‌تواند در جایگزینی پروتامین ها به جای هیستون ها در پروسه تجمیع هسته اسپرم و تشکیل سلول‌های جنسی بالغ در روند اسپرماتوژنز تاثیر گذار باشد. همچنین وجود پروتامین‌ها در بسته بندی صحیح کروماتین که بر عملکرد و حرکت اسپرم بالغ تاثیر دارد و نقش هیدرودینامیکی سر اسپرم که در حفظ اطلاعات ژنتیکی اسپرم موثر است، ضروری می‌باشند (۳،۸،۱۰). بنابراین بررسی مکانیسم‌های مولکولی در خصوص جایگزینی پروتئین های پروتامینی در هسته اسپرم می‌تواند مشخص‌کننده بیومارکرهای اپی ژنتیکی 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 مورفیسم 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) تایید شدند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این تحقیق، ۹۶ مرد نابارور که به دلایل علل ناشناخته ژنتیکی، نابارور ادیوپاتیک تشخیص داده شده بودند و با اگاهی افراد از مطالعه و کسب رضایت نامه برای نمونه گیری انتخاب شدند. این مردان دو زیر گروه، آزواسپرم که فاقد اسپرم و ۷۷ نفر بودند و اولیگو اسپرم که دارای کمتر از پنج میلیون سلول اسپرم در میلی لیتر و ۱۹ نفر بودند، را شامل می‌شدند که گروه بیمار بودند. انان در گروه سنی ۳۰ تا ۴۵ سال قرار داشتند. گروه کنترل شامل ۱۰۰ نفراز مردان بارور سالم بود، که درگروه 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 نمونه گیری، از کلیه افراد ۵ میلی لیتر خون محیطی در فالکون های 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 میلی لیتر خون محیطی گرفته شد. نمونه‌های خون تا زمان استخراج DNA از هسته گلبول‌های سفید خون در دمای ۲۰- سلسیوس نگهداری شدند.

انجام روش‌های مولکولی برای بررسی حضور پلی مورفیسم‌های 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 DNA های استخراج شده و آگاهی از غلظت و درجه خلوص آن، از دستگاه نانو دراپ و الکتروفورز روی ژل اگاروز استفاده شد.

انجام PCR و الکتروفورز محصول PCR

واکنش PCR برای تکثیر هریک از پلی مورفیسم‌های 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 اگاروز و عکسبرداری با دستگاه ژل داک کنترل شد.

جدول ۱- مواد مورد نیاز برای واکنش PCR

مواد مورد نیاز	حجم
آب مقطر دونیزه	۱۹ میکرولیتر
PCRبافر	۲/۵ میکرولیتر
Mgcl2	۱ میکرولیتر
dNTP	۰/۵ میکرولیتر
هر یک از پرایمرهای راست و چپ	۰/۵ میکرولیتر
DNA ژنومی نمونه مورد نظر	۱-۱/۲ میکرولیتر
پلیمرازTaqآنزیم	۰/۲ میکرولیتر
حجم نهایی	۲۵ میکرو لیتر

جدول ۲- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در انجام PCR

رفرنس	توالی پرایمرها	نام ژن
۱۱	F- cccctggcatctataacaggccgc R-tcaagaacaaggagagaagagtgg	*PRM1*
۱۱	F- ctccagggcccactgcagcctcag R- gaattgctatggcctcacttggtg	*PRM2*

جدول ۳- برنامه PCR برای تکثیر پلی‌مورفیسم‌های مورد مطالعه.

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

- دما و زمان دناتوره شدن اولیه برای دو پلی‌مورفیسم تکثیر داده شده به ترتیب ۹۴ درجه سلسیوس و ۵ دقیقه بود.
- دما و زمان طویل شدن نهایی برای دو پلی‌مورفیسم تکثیر داده شده به ترتیب ۷۲ درجه سلسیوس و ۵ دقیقه بود.

انجام روش RFLP برای تشخیص پلی مورفیسم ها- پس از انجام PCR، برای بررسی حضور دو پلی مورفیسم مورد مطالعه از روش RFLP و هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم های محدودالاثر استفاده شد. روش کار و مواد و محلول‌های مورد استفاده برای انجام RFLP عبارت بود از:

یک میکرو لیتر از محصول PCR با یک میکرولیتر بافر X ۱۰ 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 و ۶۵ درجه سلسیوس که دماهای بهینه به ترتیب برای آنزیم های *Bstu I* و *Bsr I* (تهیه شده از شرکت تکاپوزیست) هستند، قرار داده شد. پس از هضم آنزیمی، ژنوتایپینگ نمونه ها با الکتروفورز نمودن محصول PCR-RFLP روی ژل آگاروز ۱/۵ ٪ انجام گردید. مشخصات آنزیم‌های برش دهنده در این تحقیق در جدول ۴ آورده شده است.

جدول ۴- قطعات ناشی از هضم آنزیمی محصولات PCR بدنبال استفاده از روش RFLP

ژن	پلی‌مورفیسم	آنزیم	سایت برش	برش اللی	طول PCR	طول قطعات حاصل بعد از برش bp
PRM1	Rs737008	*Bstu I*	CG/CG	الل وحشی	۵۵۷	۵۵۷ و ۳۶۱ و ۱۹۶
PRM2	rs4780356	*Bsr I*	C/CAGT	الل وحشی	۵۹۹	۵۹۹ و ۴۰۰ و ۱۹۹

تایید صحت نتایج ژنوتایپینگ

برای تعیین سکانس و تأیید محصولات PCR-RFLP نمونه هایی از همو زیگوت غالب و هموزیگوت مغلوب و هتروزیگوت ها انتخاب شده و پس از خالص سازی با کیت سینا کلون، 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 معنی دار ۰,۰۵ برای بررسی تفاوت های فراوانی آلل ها استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج نمونه‌ها

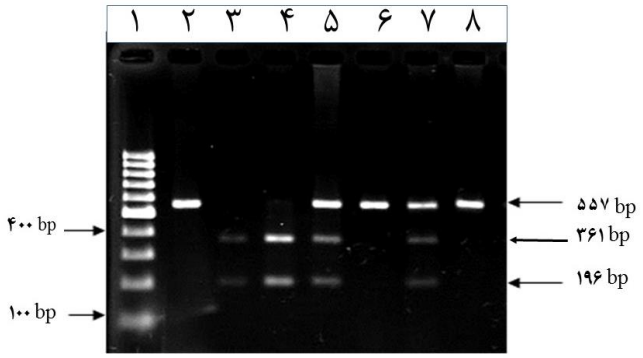
گروه بیمار مردان نابارور ازواسپرم و اولیگواسپرم را شامل می‌شدند. این افراد توسط پزشک متخصص اورولوژی مورد بررسی قرار گرفتند. با انجام یک سری آزمایشات اندرولوژی روی بیماران شامل بررسی تاریخچه پزشکی، معاینات فیزیکی، آنالیز مایع سیمن، آنالیز هورمونی برای میزان LH, FSH، بررسی کاریوتایپ بیماران و در برخی موارد بیوپسی بیضه، مردان ناباروری که ادیوپاتیک تشخیص داده شدند، انتخاب شدند. نتایج دموگرافی افراد مورد مطالعه در جدول ۵ آورده شده است.

جدول ۵- دموگرافی گروه بیمار و کنترل در این مطالعه

افراد مورد مطالعه	گروه بیمار ازو اسپرم	گروه بیمار اولیگواسپرم	گروه کنترل سالم
تعداد	۷۷ نفر	۱۹ نفر	۱۰۰ نفر
گروه سنی	۳۷-۴۵ (۳۷/۰۴ ± ۴/۵۷)	۳۷-۴۵ (۳۷/۰۴ ± ۴/۵۷)	۴۵-۲۶ (۳۷/۹۲ ± ۵/۳۱)
تعداد اسپرم	صفر	کمتر از ۵×۱۰^{۶}	بیشتر از۲۰×۱۰^{۶}
حرکت اسپرم	فاقد حرکت	فاقد حرکت	بیشتر از ۵۰٪ متحرک
مورفولوژی اسپرم	نامعمول و غیر طبیعی	نامعمول و غیر طبیعی	بیشتر از ۳۰٪ طبیعی

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

برای بررسی دو پلی مورفیسم مورد مطالعه از تکنیک PCR – RFLP (هضم آنزیمی با آنزیم های برش دهنده محصول PCR) استفاده گردید. نتایج ژنوتایپینگ، حضور پلی مورفیسم rs4780356 در ژن *PRM2* ، را در هیچ یک از گروه بیمار و کنترل نشان نداد و برای پلی مورفیسم rs737008 در ژن *PRM1* در مقایسه بین گروه بیمار با گروه کنترل الل موتان A فراوانی متفاوت داشت و بعنوان ریسک فاکتور مرتبط با ناباروری مطرح است. در شکل ۱ نمونه هایی از ژنوتایپ های هموزیگوت های 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 انزیم Bstu I بوده اند.



شکل۱- محصولات هضم آنزیمی برای پلی‌مورفیسم 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 و۴ : نمونه های هموزیگوت غالب برش یافته (CC) (۳۶۱ bp و ۱۹۶ bp)، خانه‌های شماره ۵ و ۷ : نمونه های هتروزیگوت برش یافته (CA) (۵۵۷ bp و ۳۶۱bp و ۱۹۶ bp) و خانه های شماره ۶ و ۸ : نمونه‌های هموزیگوت موتان فاقد برش (AA) (۵۵۷ bp).

نتایج آنالیز پلی‌مورفیسم های rs737008 در ژن *PRM1* و rs4780356 در ژن *PRM2*

با آنالیز آماری نتایج ژنوتایپینگ دو پلی‌مورفیسم مورد مطالعه و مقایسه بین داده‌های دو گروه بیمار و کنترل مشخص شد با اینکه فراوانی الل 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 > ۰/۰۵). همچنین فراوانی از حضور پلی مورفیسم rs4780356 از ژن *PRM2* ، در گروه بیمار و کنترل یافت نشد (P > ۰/۰۵). بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که بین حضور پلی‌مورفیسم‌های rs737008 در ژن *PRM1* و rs4780356 در ژن *PRM2* با ایجاد ازواسپرمی و اولیگواسپرمی در ناباروری ادیوپاتیک مردان ایرانی از نظر آماری ارتباط معنی‌داری وجود ندارد (۰/۰۵ > P). نتایج فراوانی حضور این دو پلی مورفیسم و آنالیز آماری ان بین گروه بیمار و کنترل در جدول ۶ آورده شده است.

جدول ۶- نتایج فراوانی ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs737008 در ژن *PRM1* و rs4780356 در ژن *PRM2* و نتایج آنالیز آماری برای این دو پلی‌مورفیسم بین گروه بیمار و کنترل

ژنوتایپ پلی مورفیسم rs737008	فراوانی گروه سالم	فراوانی گروه بیمار	الل‌های پلی مورفیسم	فراوانی الل‌ها در گروه سالم	فراوانی الل‌ها در گروه بیمار	P.value
هموزیگوت غالب (CC)	۲۴ (۲۴٪)	۲۲ (۲۲/۹٪)	C	۳۸ (۳۸٪)	۳۸ (۳۹٪/۶)	
هتروزیگوت (CA)	۲۹ (۲۹٪)	۳۲ (۳۳٪/۳)				۰/۸۲

هموزیگوت مغلوب (AA)	۴۷ (۴۷٪)	۴۲ (٪۴۳/۸)	A	۶۲ (۶۲٪)	۵۸ (٪۶۰/۴)
فراوانی کل	۱۰۰ (۱۰۰٪)	۹۶ (۱۰۰٪)		۱۰۰ (۱۰۰٪)	۹۶ (۱۰۰٪)
ژنوتایپ پلی مورفیسم rs4780356	**فراوانی گروه سالم**	**فراوانی گروه بیمار**	**الل های پلی مورفیسم**	**فراوانی الل ها در گروه سالم**	**فراوانی الل ها در گروه بیمار**
هموزیگوت غالب (CC)	۱۰۰ (۱۰۰٪)	۹۶ (۱۰۰٪)	C	۱۰۰ (۱۰۰٪)	۹۶ (۱۰۰٪)
هتروزیگوت (CT)	(۰٪)۰	(۰٪)۰			
هموزیگوت مغلوب (CC)	(۰٪)۰	(۰٪)۰	T	(۰٪)۰	(۰٪)۰
فراوانی کل	۱۰۰ (۱۰۰٪)	۹۶ (۱۰۰٪)		۱۰۰ (۱۰۰٪)	۹۶ (۱۰۰٪)

P.value

NS* | |

*NS = بدلیل فراوانی صفر برای الل مغلوب T مقدار Pvalue بصورت بدون معنی no significant محاسبه شده است.

نتایج تعیین توالی محصولات PCR

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

بحث

بر اساس مطالعات انجام شده کمتر از یک سوم دلایل ژنتیکی برای ناباروری هنوز ناشناخته هستند که بنام دلایل ژنتیکی ادیوپاتیک نامیده شده‌اند. با وجود این‌که فاکتورهای محیطی می‌توانند نقش مهمی در ناباروری مردان داشته باشند، مطالعات امروزه تغییرات ژنتیکی را عامل موثری در این امر می داند و خصوصا توجه زیادی به علل ژنتیکی در ناباروری ادیوپاتیک شده است (۸و۵و۲و۱). 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 پلی مورفیسم rs737008 در ژن *PRM1* ، فراوانی الل تغییر یافته A در گروه بیمار ۶۰/۴٪ در مقایسه با گروه کنترل ۶۲٪ بود که با توجه به انالیز ریسک فاکتوری در این خصوص، این الل می تواند به‌عنوان یک فاکتور مرتبط با ناباروری محسوب شود ولی محاسبه مقدار Pvalue برای الل‌های این پلی مورفیسم نشان داد که در جمعیت مردان نابارور ایرانی اختلاف معنی دار بین فراوانی حضور دو الل غالب و موتانت در گروه بیمار و کنترل وجود ندارد و برای پلی مورفیسم rs4780356 در ژن *PRM2* ، فراوانی الل وحشی C در گروه بیمار و کنترل ۱۰۰٪ به دست آمد و فراوانی الل موتانت صفر بود. بنابراین آنالیز نتایج چنین نشان داد که بین فراوانی حضور پلی مورفیسم‌های مطالعه شده در گروه بیمار و گروه کنترل تفاوت معنی‌دار وجود نداشته است و در نتیجه حضور این پلی مورفیسم ها درجمعیت مردان نابارور ایرانی با ایجاد ناباروری ادیوپاتیک در اثر اولیگواسپرمی و آزواسپرمی،

مرتبط نمی‌باشند (زیرا مقدار Pvalue برای دو پلی مورفیسم مورد مطالعه، بیشتر از ۰/۰۵ و بدون ارتباط معنی دار بدست آمده است). در ادامه برای نتیجه‌گیری کلی به مقایسه نتایج تحقیقات گذشته و پژوهش حاضر پرداخته شده است. بررسی مطالعات گذشته نشان می‌دهد در سال-های اخیر تحقیقات زیادی در مورد پلی‌مورفیسم و جهش‌ها در ژن های پروتامین در جمعیت‌های مختلف انجام گرفته است و نتایج متفاوتی از این تحقیقات بدست آمده است (۱۸و ۱۷و ۱۶و ۱۵و ۱۴و ۱۳و ۱۲و ۱۰ و۹). تعدادی از این مطالعات ارتباط معنی‌داری را بین پلی‌مورفیسم یا جهش های مورد مطالعه در ژن پروتامین ها گزارش نموده‌اند (۲۰و ۱۹و ۱۷و ۱۶ و ۱۵). از این تحقیقات می-توان به ارتباط پلی‌مورفیسم rs4780356 در ژن *PRM2* با جمعیت مردان نابارور ژاپنی که معنی‌دار گزارش شده است و سبب ایجاد ازواسپرمی در انان شده است اشاره نمود (۱۱). همچنین تحقیق ال زیادی و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان داده است که در جمعیت مردان شهر نجف پلی مورفیسم rs4780356 در ژن *PRM2* با ایجاد تتراتواسپرمیا و نورواسپرمیا و ناباروی ادیوپاتیک در مردان نابارور عراقی ارتباط معنی دار 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 پلی مورفیسم در هیچ یک از نمونه-های گروه بیمار و کنترل یافت نشده و ارتباط معنی‌داری بین این پلی‌مورفیسم با ناباروری مردان ایرانی وجود ندارد. البته تکرار آزمایشات با تعداد نمونه بیشتر برای اثبات نتایج توصیه می‌گردد. در خصوص پلی‌مورفیسم rs737008 در ژن *PRM1* گزارش‌هایی وجود دارد که بیان می‌دارند بین این پلی مورفیسم با ناباروری مردان ارتباط معنی‌داری وجود دارد (۱۹و ۱۷و ۱۶و ۱۵). ولی در تعداد دیگری از مطالعات، نتایجی مبنی بر عدم ارتباط بین پلی مورفیسم مذکور با ناباروری جمعیتی از مردان ژاپنی و ایرانی بدست آمده است (۲۲ و ۱۱). در مطالعه حاضر نیز فراوانی پلی مورفیسم rs737008 در ژن *PRM1* بین جمعیت گروه مردان نابارور ایرانی و گروه کنترل تفاوت معنی دار نشان نداده است ($P > ۰/۰۵$) که در نتیجه نشان داده شده است که با ایجاد ناباوری در مردان ایرانی مرتبط نمی‌باشد. علاوه بر این موارد، در تعدادی دیگر از مطالعات که در خصوص پلی مورفیسم‌های معمول در ژن های کد کننده پروتامین‌ها انجام گرفته است ارتباطی بین پلی‌مورفیسم‌های مورد مطالعه و ناباروری مردان مشاهده نشده است (۲۳و ۱۸و ۱۶ و ۱۰). در این رابطه می توان به مطالعه دهقان پور و همکاران در سال ۲۰۱۹ اشاره نمود که به بررسی ۸ پلی مورفیسم مختلف در ژن‌های *PRM1* و *PRM2* در مردان نابارور ادیوپاتیک ایرانی پرداخته بودند. نتایج تحقیق آنان نشان داد فراوانی پلی مورفیسم های مختلف در این دو ژن بین گروه بیمار و کنترل تفاوت معنی‌داری نداشتند ولی بیان نمودند فراوانی هتروزیگوتی برخی پلی مورفیسم‌ها بر کیفیت و مورفولوژی اسپرم و در نتیجه ایجاد اپوپتوز اسپرم می‌توانند تاثیر گذار باشد (۵). همچنین در تحقیق He و همکاران در سال ۲۰۱۹ که با روش متاانالیز برای بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم‌های معمول در ژن‌های پروتامین ها و ناباروری مردان انجام گرفته بود، چنین گزارش شد که اکثر این پلی مورفیسم ها با ناباروری جمعیت مردان اسیایی ارتباط معنی دار ندارند ولی می‌توانند با ناباروری جمعیت مردان آفریقایی- اروپایی مرتبط باشند (۹). بر اساس این تحقیقات مشخص می‌شود که فراوانی حضور پلی‌مورفیسم ها در ژن‌های *PRM1* و *PRM2* در جمعیت ایرانی و مقایسه آن ها با سایر جمعیت‌ها، نتایج متفاوتی را نشان می‌دهد که ممکن است به دلایل تفاوت مناطق جعرافیایی و آب و هوایی باشد که با شرایط محیط زیست و عادات زندگی این افراد ارتباط مستقیم دارد و یا بدلیل 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 تحقیقات اثر گذار باشند. همچنین ممکن است نوع تغذیه یا ابتلا به بیماری‌های خاص و داروهایی که به طور زمینه ای در بیماران مصرف شده، عاملی برای تفاوت نتایج در جمعیت‌های مختلف مردان گردند. در هر صورت ناباروری یک بیماری کمپلکس به شمار می‌آید که می‌تواند تفاوت فاکتورهای محیطی و تفاوت جغرافیایی و قومیتی (ژنتیکی) در جمعیت‌های مختلف از نمونه‌های مورد بررسی، اثرات متفاوت پلی مورفیسم های ژن‌های پروتامین را که در بیان ژن های مرتبط با اسپرماتوژنز موثر 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 پلی‌مورفیسم ها را قابل تأمل نموده است زیرا به کارگیری این روش‌ها می‌تواند راهگشایی برای

مطالعات جامع‌تر در حوزه های پیش اگهی، پیشگیری و درمان این بیماری عاطفی – اجتماعی باشد و گامی موثر در جهت کاربرد روش های 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 هاپلوتایپ ها و لینک بودن برخی ژن ها با این ژن ها، می‌تواند در آسیب به اسپرماتوژنز و عدم تشکیل اسپرم سالم و بالغ موثر باشد و در نتیجه سبب ناباروری در جمعیت مردان گردد. گرچه با توجه به نتایج این تحقیق این اثرات به ندرت با ایجاد ناباروری مرتبط می‌باشد ولی حضور این پلی‌مورفیسم‌ها و اثراتی که آنها بر وقایع اپی ژنتیک در روند تغییرات پس از ترجمه این ژن‌ها اعمال می نمایند، می‌تواند به عنوان عاملی در تخریب روند اسپرماتوژنز مطرح باشد. لذا مطالعات گسترده و با تعداد نمونه بیشتر در جمعیت های 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 فرموده-اند، تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

منابع

1. Azizi F, Omrani MD, Sadighi Gilani MA, Hosseini J. The Genetic Causes of Male Infertility in Iranian Population; A systematic Review. Men's Healt J, 2018; 2 (1); e1.
2. Venkatesh S, Kumar R, Deka D, Deecaraman M, Dada R. Analysis of sperm nuclear protein gene polymorphisms and DNA integrityin infertile men. Sys Bio Reprod Med, 2011; 57: 124–132.

3. Wang T, Gao H, Li W, Liu C. Essential Role of Histone Replacement and Modifications in Male Fertility. Front Gene, 2019; 10(962): 1-15.
4. Park Sh. Genetic Factors and Environmental Factors Affecting Male Infertility. Inter Res J Advan Enginee Sci, 2016; 1(3): 115-118.

5. Dehghanpour F, Farzaneh Fesahat F, Miresmaeili SM, Zare Mehrjardi E, Honarju A, Talebi AL. Analysis of PRM1 and PRM2 Polymorphisms in Iranian Infertile Men with Idiopathic Teratozoospermia. Inter J Fertil Steril, 2019; 13(1): 77-82.
6. Raheem AA, Ralph D. Male infertility: causes and investigations. Trend uro mens healt, 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. Tavalaee M, Ghorbani R, Nasr-Esfahani MH. The Role of Sperm Protamine in Pathogenesis of Male Infertility. J Fasa Uni Med Sci, 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. Nabi1 A, Khalili MA, Moshrefi M, Sheikhha MH, Zare Mehrjardi E, Ashrafzadeh HR. Polymorphisms in protamine 1 and 2 genes in asthenozoospermic men: A case-control study. Int J Reprod Bio Med, 2018; 16(6): 379-386.

11. Tanaka H, Miyagawa Y, Tsujimura A, Matsumiya K, Okuyama AYN. Single-nucleotide polymorphisms in the protamine-1 and -2 genes of fertile and infertile human male populations. Molecul Hum Reprod, 2003; 9: 69-73.

12. Gazouez C, Oriola J, De Mateo S, Vidal-Taboada JM, Ballesca JI. A comman protamine 1 promoter polymorphism (C190A) correlates with abnormal sperm morphology and increased protamine P1/P2 ratio in infertile patients. J Andro, 2008; 29: 540-548.
13. Iguchi N, Yang S, Lamb DJ. 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? Molecul Hum Reprod, 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. Andro, 2018; 50(5): e12990.

16. Jiang W, Sun H, Zhang J, Zhou Q, Wu Q, Li T, i Zhang C, Li W, Zhang M, Xia X. Polymorphisms in Protamine 1 and Protamine 2 predict the risk of male infertility: a meta-analysis. Sci Report, 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. Onco, 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 Biomark, 2018; 22(1):55-61.

20. Tüttelmann F, Křenková P, Römer S, Nestorovic AR, 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 ASM, Albaldawy MT. 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, Tavalaee M, Tanhael S, Tavalaee M, Salahshouri I, Gourabi HMH. Single nucleotide polymorphism analysis of protamine genes in infertile men. Royan Institute Inter J Fertil Steril, 2008; 2(1): 13-18 .

23. Aston KI, Krausz C, Laface I, Ruiz-Castane E, Carrell DT. 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.