Association of single nucleotide polymorphisms T824C and T132903C in *OR2W3* and *INSR* genes, respectively with idiopathic infertility in Iranian men

Elham Siasi [1]*, Ahmad Aleyasin[2], Javad Mowla[3]

1. Associate Professor, Department of Genetic, School of science, NT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Associate Professor, Department of Medical Genetic, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

3. Associate Professor, PhD of Genetic, Department of Molecular Genetics, faculty of science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Abstract

Aim and Background: The Frequency of male infertility is 10-15% and there is no definite reason in 50% of infertility in men. This form of infertility is named idiopathic infertility, and genetic factors are one of the causes of male infertility. Therefore, this study aimed to investigate on association between the T824C polymorphism in the *OR2W3* gene and the T132903C polymorphism in the *INSR* gene in Iranian idiopathic infertile males.

Materials and Methods: For this study, DNA was extracted from 200 blood samples, consisting of 100 men with oligospermia and azoospermia (idiopathic infertile) and 100 fertile men as a control group. Genotyping of the two studied polymorphisms was performed by using molecular methods, HRM-PCR, PCR-RFLP, and sequencing, and finally, the results were statistically analyzed.

Results: For the T824C polymorphism in the *OR2W3* gene, statistical analysis showed no significant difference between the patient and control groups ($p = 0.2$), and the results showed no association between this polymorphism and idiopathic male infertility in the Iranian population. In addition, the frequency of T132903C polymorphism in the *INSR* gene was different in infertile patients and control groups ($p = 0.02$) and indicates a significant relationship with idiopathic male infertility in the studied Iranian men population.

Conclusion: According to these research results, the T132903C polymorphism in the *INSR* gene is affected by idiopathic infertility in the Iranian male population and could cause oligospermia and azoospermia in Iranian infertile males. To confirm these results, it is recommended to study more samples.

Keywords: Idiopathic male infertility, Gene polymorphism, oligospermia, azoospermia, *OR2W3* ،*INSR*.

***Corresponding author:**
Elham Siasi - Associate Professor-Department of Genetics, School of science, NT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
Email:emi_biotech2006@yahoo.ca

ارتباط پلی‌مورفیسم‌های T824C و T132903C به‌ترتیب در ژن‌های *OR2W3* و *INSR* با ناباروری آیدیوپاتیک مردان ایرانی

الهام سیاسی *[۱]، احمد ال یاسین[۲]، جواد مولا[۳]

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

چکیده

سابقه و هدف: میزان شیوع ناباروری در مردان ۱۰-۱۵ درصد است و برای حدود ۵۰ درصد موارد ناباروری مردان نمی‌توان علت خاصی یافت. این نوع ناباروری به‌عنوان ناباروری آیدیوپاتیک نامیده می‌شود و یکی از علل ناباروری آیدیوپاتیک در مردان عوامل ژنتیکی است. هدف این مطالعه بررسی ارتباط حضور دو پلی‌مورفیسمِ ژنی مرتبط با روند اسپرماتوژنز شامل T824C در ژن *OR2W3* و T132903C در ژن *INSR*، با ناباروری آیدیوپاتیکِ مردان در جمعیتی از مردان نابارور ایرانی بود.

مواد و روش‌ها: استخراج DNA، از ۲۰۰ نمونهٔ خون شامل گروه بیمار، ۱۰۰ مرد دارای اُلیگواسپرمی و آزواسپرمی (نابارورِ آیدیوپاتیک) و ۱۰۰ نفر گروه کنترل انجام گرفت. ژنوتایپینگ دو پلی‌مورفیسم موردمطالعه با استفاده از روش‌های مولکولی HRM-PCR، PCR-RFLP و Sequencing انجام گرفت و در نهایت نتایج آنالیز آماری شد.

یافته ها: برای حضور پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* تفاوت معنی‌دار بین گروه بیماران و گروه کنترل مشاهده نشد. (p =۰/۲) و نتایج نشان دادند که بین این پلی‌مورفیسم با ناباروری در مردان ایرانی ارتباطی وجود ندارد. به‌علاوه فراوانی پلی‌مورفیسم T132903C در ژن *INSR* دارای تفاوت معنی‌دار بین گروه بیمار و کنترل بود (p = ۰/۰۲) و با ناباروریِ آیدیوپاتیک در جمعیت مردان ایرانیِ موردمطالعه ارتباط معنی‌دار نشان داد.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج، حضور پلی‌مورفیسم T132903C در ژن *INSR* در ایجاد ناباروریِ آیدیوپاتیک در جمعیت مردان ایرانی می‌تواند در اُولیگواسپرمی و آزواسپرمی مردان نابارور ایرانی نقش مؤثر داشته باشد. برای تأیید این نتایج، مطالعات در نمونه‌های بیشتر توصیه می‌گردد.

واژگان کلیدی: ناباروری آیدیوپاتیک مردان، پلی‌مورفیسم ژنی، اُولیگواسپرمی، آزواسپرمی.

نویسنده مسئول: 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- مقدمه

اسپرماتوژنز یک فرایند پیچیده می‌باشد که تحت‌تأثیر ژن‌های زیادی قرار دارد و با مکانیسم‌های مولکولی متعددی ارتباط دارد.

بنابر مطالعه‌های انجام‌شده بیش از هزاران ژن، این فرایند را کنترل می‌نمایند که بیشتر آن‌ها بر روی کروموزوم‌های اتوزوم قرار دارند و در حدود ۳۰ ژن نیز روی کرموزوم Y واقع شده‌اند (۱ و ۲). از مهم‌ترین عوامل ناباروری که در ایجاد ناباروری مردان دخالت دارند، می‌توان به اختلال در تعداد، حرکت و مورفولوژیِ اسپرم و اختلالات ساختمانی و فیزیولوژیکی در اسپرماتوژنز، عدم‌تعادل هورمونی و عوامل ژنتیکی، عوامل پاتوژنز، عوامل محیطی، استرس اکسیداتیو و عوامل عفونیِ ویروسی نظیر کووید ۱۹ اشاره نمود (۳ و ۶-۱۲). عوامل ژنتیکی مؤثر در ناباروریِ مردان که تا به امروز مشخص شده‌اند عبارتند از: اختلالات کرموزومی، بیماری‌های تک‌ژنی، اختلال در میوز و اِندوکرین. براساس مطالعه‌ها، ناباروری با علل ناشناختهٔ ژنتیکی در مردان، به نام ناباروری آیدیوپاتیک مردان شناخته شده است و در تحقیق‌های اخیر تشخیص این علل آیدیوپاتیک، موردبررسی قرار گرفته‌اند (۳، ۴، ۶، ۱۱ و ۱۳). از شایع‌ترین عوامل آیدیوپاتیک، اختلالات در هستهٔ سلولِ اسپرم و تغییر ساختمان DNA آن، همچنین تغییر در پارامترهای اسپرم مانند کاهش تعداد اسپرم، کاهش حرکت و ناهنجاری‌های شکلی، تکامل و بلوغ اسپرم وجود دارد (۳، ۴، ۶، ۱۱، ۱۳ و ۱۴). براساس مطالعه‌های انجام‌شده، یکی از علل ناباروری آیدیوپاتیک حضور پلی‌مورفیسم‌ها و جهش‌ها در ژن‌های مؤثر در روند اسپرماتوژنز است که از میان این پلی‌مورفیسم‌ها می‌توان به دو پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3*[1] و T132903C در ژن *INSR*[2] اشاره نمود که با ایجاد آزواسپرمی و اُولیگواسپرمی با ناباروری آیدیوپاتیک مردان به‌طور معنی‌داری ارتباط دارند (۱۵-۱۸). ژن *OR2W3* پروتئینی کد می‌نماید که رسپتور (گیرنده) اولفاکتوری است و با مولکول‌های بوییِ بینی در ارتباط می‌باشد. این رسپتورها توانایی حس بوییِ بالایی دارند و از رسپتورهایی هستند که با G-پروتئین‌ها جفت می‌شوند. این ژن روی کروموزوم ۱ قرار دارد و براساس مطالعه‌های گذشته وجود پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* سبب تغییر اسیدآمینهٔ متیونین به والین می‌شود که در نتیجه می‌تواند آزواسپرمی و اُولیگواسپرمی شدید ایجاد نماید و باعث ناباروری آیدیوپاتیک در مردان گردد (۱۶ و ۱۷). ژن دیگر، ژن *INSR* است که روی کروموزوم ۱۹ قرار دارد. هنگامی‌که رسپتور انسولین برای جذب ایزوفرم‌های آلفا و بتای گلوکز تحریک می‌شود، پروتئینی که از این ژن کد می‌شود دخالت نموده و با دو حالت متفاوتِ ترجمهٔ ژن سبب عملکرد متفاوت رسپتورهای انسولین می‌گردد. براساس تحقیق‌های انجام‌شده مشخص گردیده است که در صورت وجود پلی‌مورفیسم T132903C در ژن *INSR*، فنوتیپ اُولیگواسپرمی شدید یا آزواسپرمی ایجادشده و سبب ناباروری مردان می‌گردد (۱۶ و ۱۸).

بنابراین، هدف از انجام این پژوهش بررسی ارتباط حضور دو پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* و T132903C در ژن *INSR* با ناباروریِ مردان در جمعیتی از مردانِ نابارور ایرانی است. این پژوهش در دو گروه ۱۰۰ نفری شامل یک گروه از بیماران با ناباروری آیدیوپاتیک (دارای آزواسپرمی و اُولیگواسپرمی) و گروه دیگر افراد کنترل (مردان بارور و دارای فرزند) صورت گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌های موردمطالعه

در این پژوهش از دو گروه بیمار و کنترل که هریک شامل ۱۰۰ مرد نابارور و سالم بودند با کسب رضایت نامه و مجوز اخلاق نمونه گیری انجام گرفت. این مردان جهت درمان ناباروری به مرکز ناباروری مراجعه نموده بودند که دارای نقص در روند اسپرماتوژنزیز و شامل دو زیر گروه آزواسپرم (فاقد اسپرم) به تعداد ۸۰ نفر و اولیگواسپرم (دارای کمتر از پنج میلیون سلول اسپرم در میلی‌لیتر) به تعداد ۲۰ نفر بودند. این افراد توسط پزشک متخصص اورولوژی موردبررسی قرار گرفتند. همچنین انجام یک سری آزمایش‌های اندرولوژی روی بیماران که شامل بررسی تاریخچهٔ پزشکی، معاینات فیزیکی، آنالیز مایع سِمن و آنالیز هورمونی برای میزان LH و FSH بودند و نیز بررسی کاریوتایپ بیماران و در برخی موارد بیوپسیِ

[1]Olfactory receptor, family 2, subfamily W, member 3 gene
[2] Insulin receptor gene

بیضه نیز صورت گرفت و در پروندهٔ بیماران ثبت گردید. در ادامه با تشخیص بیماران با ناباروری آیدیوپاتیک (ناباروری به‌دلایل علل ناشناختهٔ ژنتیکی) از بین مردان نابارور انتخاب شدند. این افراد در گروه سنی ۳۰-۴۵ سال قرار داشتند. از این جهت که پزشکان در مورد این گروهِ نابارور گاهی با IVF ناموفق، بی‌دلیل روبه‌رو می‌شوند؛ لزوم بررسی عللِ ژنتیکی نامعمول در این افراد مطرح می‌گردد. معیار اصلی انتخاب بیماران برای نمونه‌گیری، بیماران نابارورِ آیدیوپاتیک است. پس از بررسی‌های انجام‌شده توسط متخصصان مرکز ناباروری و تأیید بیماری در این افراد، نمونه گیری انجام شد. گروه کنترل شامل ۱۰۰ نفر از مردان بارور سالم و دارای فرزند بودند که در گروه سنی مشابه قرار داشتند و از نظر پارامترهای فیزیولوژی، ساختمانی و نتایج کاریوتایپینگ دارای حالت نرمال بودند.

۲-۲- استخراج DNA و کنترل کمّی و کیفی آن

به این منظور از کلیهٔ افراد موردنظر ۵ میلی‌لیتر خون محیطی در فالکون‌های حاوی ۵۰۰ میکرولیتر محلول آنتی‌کوالانت EDTA (۲۰ میلی‌مولار با pH = ۸ و میزان ۱۰۰میکرولیتر به ازای هر یک میلی‌لیتر خون محیطی) اخذ گردید. نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA از هستهٔ گلبول‌های سفید خون در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند. برای بررسی‌های ژنتیکیِ مورد مطالعه در این پژوهش روش معمول یعنی استخراج نمکیِ DNA استفاده گردید (۱۹). همچنین برای اطمینان از صحت DNA استخراج‌شده، الکتروفورز روی ژل ۱ درصد و بررسی با نانودراپ (مدل Analytic Jena و کشور سازنده آلمان) و نسبت بین میزان جذب نوری ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر موردارزیابی قرار گرفت.

۲-۳- بررسی حضور دو پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* و T132903C در ژن *INSR*

با دو روش PCR-RFLP وHRM-PCR Corbett انجام گرفت.

۲-۳-۱- انجام روش RFLP-PCR

برای بررسی حضور دو پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* و T132903C در ژن *INSR* با استفاده از روش RFLP-PCR ابتدا تکثیر پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که در این پژوهش با برنام، DNAsisMax طراحی شده‌اند (به‌طول ۱۹۹ bp) انجام گرفت. برای تکثیر پلی‌مورفیسم T132903C در ژن *INSR* از پرایمرهایی که آغازگر چپ با انتهای ناهمگون در ابتدای نوکلئوتید ۱۳۲۹۰۳ (برای تکثیر قطعه‌ای به‌طول ۱۳۴ bp) بود و در این پژوهش با برنامهٔ SNPCutter طراحی شده‌اند استفاده شد (برای ژن *OR2W3* با شمارهٔ ثبت NG_053132.1 و برای ژن *INSR* با شمارهٔ ثبت NG_008852.2). سپس حضور پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* با تأثیر آنزیم محدودالاثر HindIII بر محصولات PCR این پلی‌مورفیسم و مشاهدهٔ هضم آنزیمیِ قطعهٔ تکثیرشده موردبررسی قرار گرفت و برای بررسی حضور پلی‌مورفیسم T132903C در ژن *INSR* از آنزیم محدودالاثر *VspI* و اثر هضم آنزیمی آن بر محصولات PCR آن پلی‌مورفیسم استفاده شد (نرم‌افزار SNPCutter براساس نوع پلی‌مورفیسم ژنی و شمارهٔ شناساگر آن پلی‌مورفیسم، آنزیم محدودالاثر مناسب برای هضم آنزیمی را ارائه نمود). مشخصات پرایمرها، مواد مورد استفاده، برنامهٔ دستگاه PCR (مدل BioRad و کشور سازنده آمریکا) و همچنین مشخصات قطعه‌های حاصل از برش آنزیمی با آنزیم‌های محدودالاثر به‌ترتیب در جداول ۱ تا ۴ ارائه شده است.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورداستفاده برای دو پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* و T132903C در ژن *INSR*

نام ژن	*OR2W3*
نام پرایمر و توالی نوکلئوتیدی آن ´۳ - ´۵	F- Primer *OR2W3*: CCCATCTCACTGTGGTCTCC
	R- Primer *OR2W3*: CTCTTCCCCAGAAGCAACCT
طول قطعهٔ تکثیرشده	199Bp
مشخصات پلی‌مورفیسم موردمطالعه	T824C Ch 1 rs 11204546

نام ژن	*INSR*
نام پرایمر و توالی نوکلئوتیدی آن´۳ - ´۵	F-Primer *INSR*: GTCACCTTTTCGGATGAACG F-Primer *INSR*: TGAATCAGACCTCTTGCTATTAA (With mismatch a-3´)
	R-Primer *INSR*: CACTGCATTGCACTCTAGCC
طول قطعهٔ تکثیرشده	HRM-PCR Corbett برای ۲۳۹ bp PCR برای ۱۳۴ bp
مشخصات پلی‌مورفیسم موردمطالعه	T132903C Ch 19 rs 2059807

جدول ۲- مواد موردنیاز برای واکنش PCR برای تکثیر دو پلی‌مورفیسم **T824C در ژن *OR2W3* و T132903C در ژن *INSR***

مواد لازم برای واکنش PCR	حجم مواد برحسب میکرولیتر	غلظت	شرکت سازنده
پرایمر چپ	۱	۱۰ پیکومول	ماکروژن
پرایمر راست	۱	۱۰ پیکومول	ماکروژن
بافر مستر میکس 1X	۱۰	۱/۵ میلی‌مول	امپلیکون
نمونهٔ DNA	۴	۲۰۰ نانوگرم	-
آب دو بار تقطیر شده	۴	-	-
حجم نهایی	۲۰	-	-

جدول ۳- شرایط برنامهٔ PCR برای تکثیر دو پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* و T132903C در ژن *INSR*

مراحل برای تکثیر پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3*	زمان	دما (سلسیوس)	تعداد سیکل
واسرشته شدن اولیه	۵ دقیقه	۹۵	۱
واسرشته شدن	۳۰ ثانیه	۹۵	۳۲
اتصال	۳۰ ثانیه	۶۰	
طویل شدن	۳۰ ثانیه	۷۲	
طویل شدن نهایی	۵ دقیقه	۷۲	۱
مراحل برای تکثیر پلی مورفیسم و T132903C در ژن *INSR*	**زمان**	**دما (سلسیوس)**	**تعداد سیکل**
واسرشته شدن اولیه	۵ دقیقه	۹۵	۱
واسرشته شدن	۳۰ ثانیه	۹۵	۳۲
اتصال	۳۰ ثانیه	۶۲	
طویل شدن	۲۰ ثانیه	۷۲	
طویل شدن نهایی	۵ دقیقه	۷۲	۱

جدول ۴- مشخصات آنزیم محدودالاثر و قطعه‌های هضم آنزیمی در واکنش PCR-RFLP برای دو پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* و T132903C در ژن *INSR*

نام ژن	نام پلی‌مورفیسم	طول محصول PCR (bp)	نام آنزیم	نوع ژنوتیپ	طول قطعه‌های ایجادشده با آنزیم
OR2W3	T824C	۱۹۹	HindIII	TT TC CC	**100bp,47bp,45bp** **146bp,101bp47bp,45bp,92bp** **146bp,47bp**
INSR	T132903C	۱۳۴	VspI	TT TC CC	**112bp,22bp** **134 bp, 112bp, 22bp** **123bp**

۲-۳-۲- انجام روش HRM-PCR Corbett

برای بررسی حضور پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* و پلی‌مورفیسم T132903C در ژن *INSR* با استفاده از روش HRM-PCR Corbett، تکثیر پلی‌مورفیسم موردنظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، که در این پژوهش با برنامهٔ DNAsisMax که باید دارای توالی با طول بین ۱۰۰-۳۰۰ باشد طراحی شده‌اند (جدول ۱) و با استفاده از دستگاه HRM-PCR Corbett (مدل Mic QPCR و کشور سازنده استرالیا) انجام گرفت. سپس حضور دو پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* و T132903C در ژن *INSR* از آنالیز محصولات PCR و مقایسهٔ نمونه‌های کنترل با هریک از نمونه‌های ژنوتایپ هموزیگوت غالب و مغلوب و هتروزیگوت برای این پلی‌مورفیسم‌ها در گروه افراد بیمار و سالم بررسی شد. مشخصات مواد مورداستفاده و برنامهٔ دستگاه HRM-PCR Corbett به‌ترتیب در جداول ۵ و ۶ ارائه شده است.

جدول ۵- مقدار و غلظت مواد مورداستفاده در واکنش HRM-PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر

مواد لازم برای واکنش PCR	حجم مواد برحسب میکرولیتر	غلظت	شرکت سازنده
پرایمر چپ	۱	۱۰ پیکومول	ماکروژن
پرایمر راست	۱	۱۰ پیکومول	ماکروژن
بافر مستر میکس 2X	۱۰	۵۰ نانومول	امپلیکون
نمونهٔ DNA	۴	۲۰۰ نانوگرم	-
Eva Green	۰/۸	-	امپلیکون
آب دو بار تقطیر شده	۳/۲	-	-
حجم نهایی	۲۰	-	-

جدول ۶- شرایط برنامهٔ HRM-PCR برای تکثیر دو پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* و T132903C در ژن *INSR*

مراحل برای تکثیر پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3*	زمان	دما (سلسیوس)	تعداد سیکل
واسرشته شدن اولیه	۱۰ دقیقه	۹۵	**۱**
واسرشته شدن	۱۵ ثانیه	۹۵	**۴۰**

اتصال	۳۰ ثانیه	۶۰	
طویل شدن	۳۰ ثانیه	۷۲	
طویل شدن نهایی	**۵ دقیقه**	**۷۲**	**۱**
مراحل برای تکثیر پلی‌مورفیسم و T132903C در ژن *INSR*	**زمان**	**دما (سلسیوس)**	**تعداد سیکل**
واسرشته شدن اولیه	۱۰ دقیقه	۹۵	**۱**
واسرشته شدن	۱۵ ثانیه	۹۵	**۴۰**
اتصال	۳۰ ثانیه	۶۲	
طویل شدن	۲۰ ثانیه	۷۲	
طویل شدن نهایی	**۵ دقیقه**	**۷۲**	**۱**

۲-۴- آنالیز آماری

برای آزمون معنادار بودنِ ارتباط این دو پلی مورفیسم با ناباروریِ نمونه‌های مردانِ نابارور از نرم‌افزار SPSS و آزمون T و محاسبهٔ رگرسیون لُجستیک و بررسی ریسک فاکتور بودن پلی‌مورفیسم موردمطالعه استفاده شد و سطح معنادار بودن داده‌ها به‌صورت $p < ۰/۰۵$ درنظر گرفته شد.

۳- نتایج

۳-۱- نتایج نمونه‌ها و نمونه‌گیریِ DNA

گروه مردانِ آزواسپرم افرادی بودند که فاقد اسپرم بوده و در گروه اُولیگواسپرم مردان نابارور دارای اسپرم به‌میزان کمتر از ۵۰۰۰۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر بودند. میانگین سنی این بیماران بین ۳۰-۴۵ سال بود. این افراد توسط پزشک متخصص از نظر سایر فاکتورهای ناباروری موردبررسی قرار گرفته بودند و نابارور بودن آن‌ها تنها از نظر علل ژنتیکی ناشناخته تشخیص داده شده بود. در مواردی این افراد به‌دلیل مشخص نبودن علت ناباروری دارای IVF ناموفق نیز بودند. گروه مردان نابارور به‌عنوان گروه بیمار درنظر گرفته شدند و به تعداد ۱۰۰ نفر بوده که ۲۰ نفر از آن‌ها اولیگواسپرم و۸۰ نفر آزواسپرم بودند. برای بررسی علل آیدیوپاتیک ژنتیکی در این بیماران از نمونهٔ خون آن‌ها استخراج DNA به عمل آمد. به‌منظور مقایسهٔ بیماران با گروه کنترل و به تعداد ۱۰۰ نفر مرد بارور که دارای فرزند بودند و در گروه‌های سنی مشابه قرار داشتند به‌عنوان گروه مردان سالم درنظر گرفته شدند. از گروه کنترل نیز خون‌گیری و استخراج DNA انجام گرفت و صحت DNA استخراج‌شده ارزیابی شد و از نمونه‌های با کیفیت مناسب برای ژنوتایپینگ استفاده گردید.

۳-۲- نتایج ژنوتایپینگ دو پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* و T132903C در ژن *INSR*

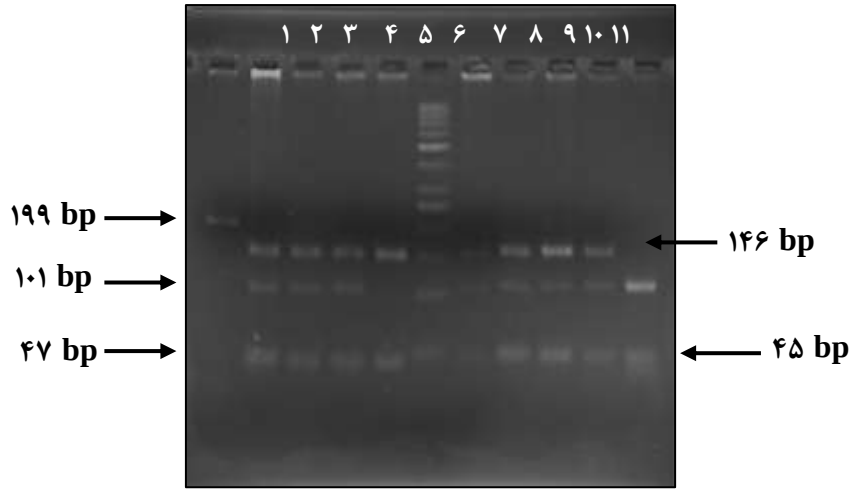
نتایج با دو روش PCR-RFLP و HRM-PCR Corbett به‌دست آمد.

۳-۲-۱- نتایج ژنوتایپینگ با روش PCR–RFLP

برای بررسی دو پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* و T132903C در ژن *INSR* از تکنیک PCR–RFLP (هضم آنزیمی با آنزیم‌های برش‌دهندهٔ محصول PCR) استفاده گردید.

۳-۲-۱-۱- نتایج هضم آنزیمی برای پلی‌مورفیسم T824C ژن *OR2W3* با آنزیم *Hin1II*

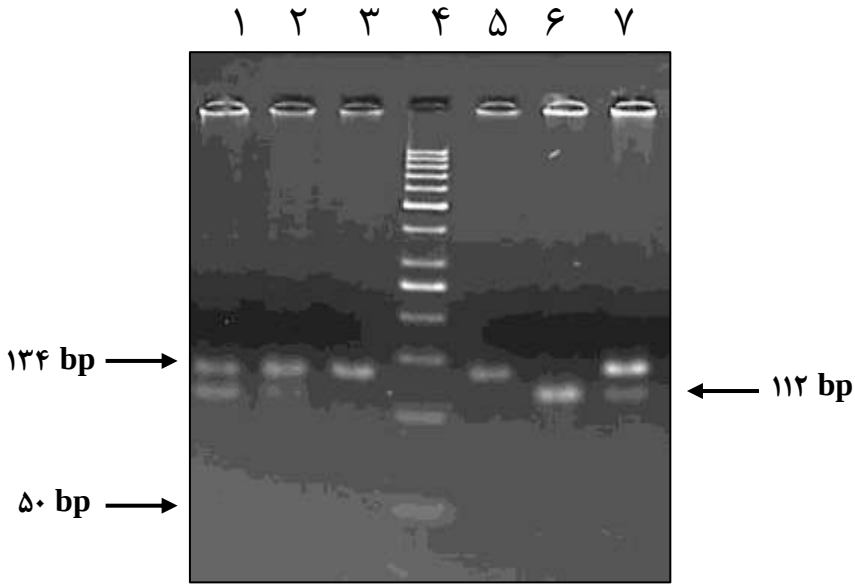
در این روش ابتدا با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده برای ژن *OR2W3*، قطعهٔ bp ۱۹۹ از این ژن در دو گروه بیمار و کنترل تکثیر شد. از هر نمونهٔ PCRشده ۳-۵ میکرولیتر بر روی ژل آگاروز الکتروفورز شد و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و با دستگاه ژل‌داک عکس‌برداری شد. پس از کنترل صحت واکنش PCR، این محصولات PCR تحت هضم آنزیمی با آنزیم *HindIII* قرار گرفتند و ژنوتایپینگ نمونه‌های گروه بیمار و کنترل با الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی بر روی ژل آگاروز انجام گرفت. نتایج ژنوتایپ نمونه‌ها با هضم آنزیمی برای پلی‌مورفیسم T824C ژن *OR2W3* در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- محصولات هضم آنزیمی برای پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3*. خانهٔ ۶ مارکر ژنتیکی bp ۵۰، خانهٔ ۱ محصول PCR (فاقد برش) (bp ۱۹۹)، خانهٔ ۱۱ نمونهٔ هموزیگوت وحشی برش‌یافته (TT) (bp ۱۰۱، bp ۴۷ و bp۴۵)، خانه‌های ۲ تا ۴ و ۷ تا ۱۰ نمونهٔ هتروزیگوت برش‌یافته (TC) (bp ۱۴۶، bp ۱۰۱، bp ۴۷ و bp ۴۵) و خانهٔ ۵ نمونهٔ هموزیگوت موتان برش‌یافته (AA) (bp ۱۴۶ و bp ۴۷).

۲-۱-۲-۳- نتایج هضم آنزیمی برای پلی‌مورفیسم T132903C ژن *INSR* با آنزیم VspI

در این روش با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده برای ژن *INSR* (دو پرایمر چپ و یک پرایمر راست)، دو قطعهٔ bp ۲۳۹ و bp ۱۳۴ از این ژن در دو گروه بیمار و کنترل تکثیر شد. از هر نمونهٔ محصول ۳-۵PCR میکرولیتر بر روی ژل آگاروز الکتروفورز شد و سپس در اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و با دستگاه ژل‌داک نیز عکس‌برداری شد. پس از کنترل صحت واکنش PCR، این محصولات PCR تحت هضم آنزیمی با آنزیم *VspI* قرار گرفتند و ژنوتایپینگ نمونه‌های گروه بیمار و کنترل با الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی بر روی ژل آگاروز انجام گرفت. نتایج ژنوتایپ نمونه‌ها با هضم آنزیمی برای پلی‌مورفیسم T132903C ژن *INSR* در شکل ۲ ارائه شده است.



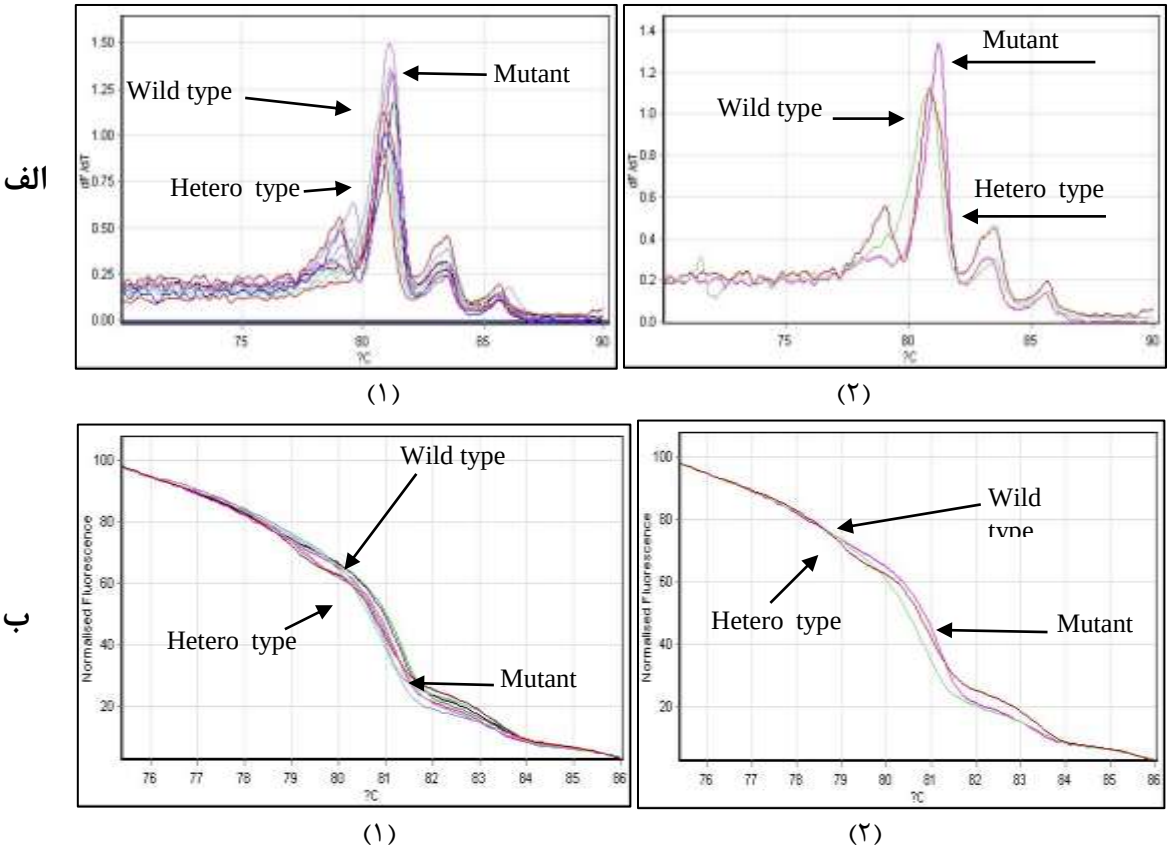
شکل ۲- محصولات هضم آنزیمی برای پلی‌مورفیسم T132903C در ژن *INSR*. خانهٔ ۴ مارکر ژنتیکی bp ۵۰، خانهٔ ۳ محصول PCR (فاقد برش) (bp ۱۳۴)، خانهٔ ۶ نمونهٔ هموزیگوت وحشی برش‌یافته (TT) (bp ۱۱۲ و bp ۲۲)، خانه‌های ۱، ۲ و ۷ نمونهٔ هتروزیگوت برش‌یافته (TC) (bp ۱۳۴، bp ۱۱۲ و bp ۲۲) و خانهٔ ۵ نمونهٔ هموزیگوت موتان فاقد برش(CC) (bp ۱۳۴).

۲-۲-۳- نتـایج ژنوتایپینـگ بـا روش HRM-PCR Corbett

برای ژنوتایپینگ دو پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* و T132903C در ژن *INSR* از تکنیک Real-Time PCR HRM که روشی با قدرت رزولوشن بالا می‌باشد استفاده گردید.

۱-۲-۲-۳- نتایج بررسی پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3*

نتایج ژنوتایپینگ پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* با محصولات HRM-PCR Corbett در این مطالعه، تأییدکنندهٔ نتایج ژنوتایپینگ با هضم آنزیمی با روش PCR-RFLP می‌باشد که در شکل ۳ (الف و ب) نمایش داده شده است.



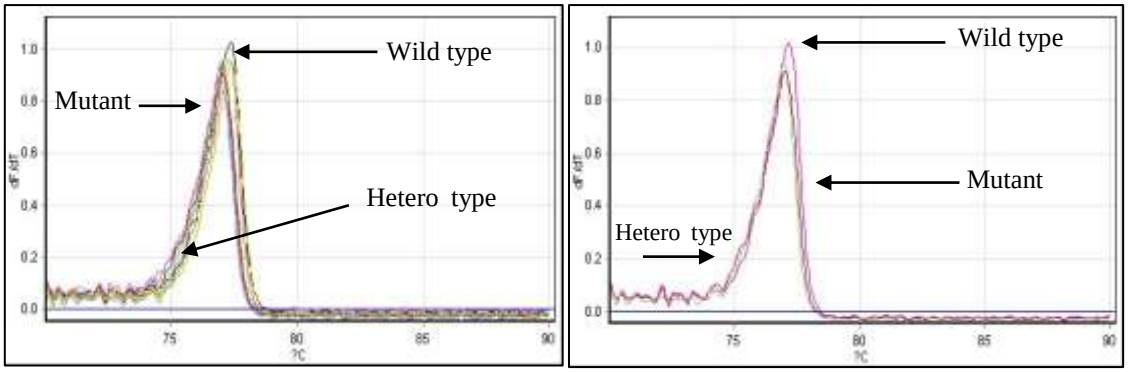
شکل ۳- الف) نمودارهای منحنیِ ذوب برای نمونه‌های DNA بیمار و کنترل برای تکثیر ژن *OR2W3* (نمودار ۱ حالت استاندارد و نمودار ۲ حالت نمونه‌های موردآزمون به‌ترتیب: wild type = TT, Hetero type = TC, Mutant = CC).

ب) نمودارهای منحنی استاندارد نمونه‌های DNA بیمار و کنترل برای تکثیر ژن *OR2W3* (نمودار ۱ حالت استاندارد و نمودار ۲ حالت نمونه‌های موردآزمون به‌ترتیب: wild type = TT, Hetero type = TC, Mutant = CC).

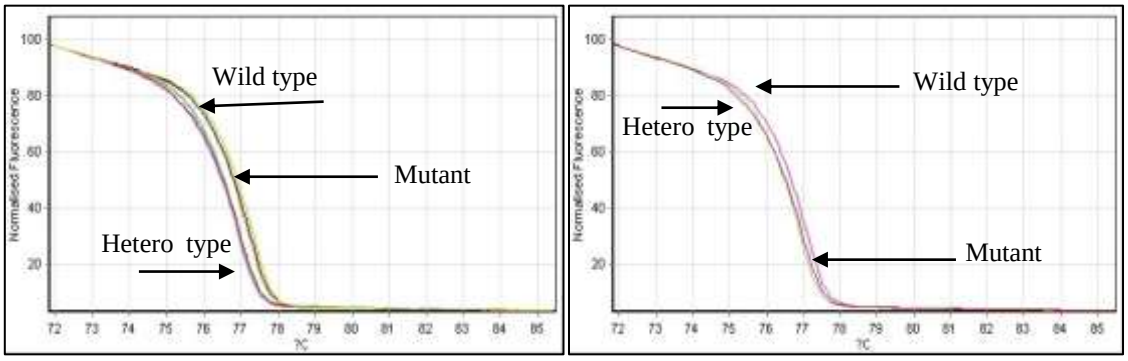
۲-۲-۲-۳- نتایج بررسی پلی‌مورفیسم T132903C در ژن *INSR*

نتایج ژنوتایپینگ پلی‌مورفیسم T132903C در ژن *INSR* با محصولات HRM-Corbett PCR در این مطالعه، تأییدکنندهٔ نتایج ژنوتایپینگ با هضم آنزیمی با روش PCR-RFLP می‌باشد که در شکل ۴ (الف و ب) نمایش داده شده است.

الف



ب



شکل ۴ – الف) نمودارهای منحنی ذوب برای نمونه‌های DNA بیمار و کنترل برای تکثیر ژن *INSR* (نمودار ۱ حالت استاندارد و نمودار ۲ حالت نمونه‌های موردآزمون به‌ترتیب: wild type = TT, Hetero type = TC, Mutant = CC).

ب) نمودارهای منحنی استاندارد برای نمونه‌های DNA بیمار و کنترل برای تکثیر ژن *INSR* (نمودار ۱ حالت استاندارد و نمودار ۲ حالت نمونه‌های موردآزمون به‌ترتیب: wild type = TT, Hetero type = TC, Mutant = CC).

۳-۲-۳- نتایج ژنوتایپینگ با روش Sequencing

برای تأیید نهایی نتایج ژنوتایپینگ با روش‌های مولکولی بیان‌شده، نمونه‌هایی از هموزیگوت غالب، هموزیگوت مغلوب و هتروزیگوت تعیین‌توالی شدند و نتایج تعیین‌توالی با سایت BLAST پایگاه NCBI موردتأیید قرار گرفت. نتایج تعیین‌توالی با نتایج ژنوتایپینگ با دو روش بیان‌شده هم‌سو بودند.

۳-۳- آنالیز نتایج دو پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* و T132903C در ژن *INSR*

نتایج آنالیز آماری پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* با مقایسهٔ بین داده‌های دو گروه بیمار و کنترل نشان دادند که بین این دو گروه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که بین حضور پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* و ایجاد ناباروری در جمعیتی از مردان ایرانیِ موردمطالعه از نظر آماری ارتباط معنی‌دار وجود ندارد (p = ۰/۲). همچنین نتایج آنالیز آماری پلی‌مورفیسم T132903C در ژن *INSR* نشان داد که بین داده‌های دو گروه بیمار و کنترل اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بنابراین چنین نتیجه‌گیری می‌شود که بین حضور پلی‌مورفیسم T132903C در ژن *INSR* و ایجاد ناباروری در مردان موردمطالعه از نظر آماری ارتباط معنی‌داری وجود دارد (p = ۰/۰۲). نتایج فراوانی ژنوتایپینگ و آنالیز آماری این دو پلی‌مورفیسم در جدول ۷ گزارش شده است. بررسی آماری در پلی‌مورفیسم برای محاسبهٔ ضریب رِگرسیون لُجستیک بین گروه‌های موردمطالعه (گروه بیمار و گروه کنترل) و ژنوتایپ‌های به‌دست آمده در این پلی‌مورفیسم نشان داد که میزان significant برای دو پلی‌مورفیسم بیان‌شده بزرگتر از ۰/۰۵ به‌دست آمد و مشخص نمود که آلل C را در این دو پلی‌مورفیسم نمی‌توان برای بروز ناباروری در جمعیت موردمطالعه، ریسک فاکتوری مرتبط با بروز بیماری درنظر گرفت.

جدول ۷- نتایج فراوانی ژنوتیپ‌ها و آنالیز آماری دو پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* و T132903C در ژن *INSR* در مقایسه بین گروه بیمار و گروه کنترل

پلی‌مورفیسم	مقادیر آماری	ژنوتایپ	گروه کنترل	گروه بیمار	Odds Ratio	P-value
پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3*	Allele	C	۵۶٪	٪۵۷	۱/۰۰	
		T	٪۴۴	٪۴۳	(۰/۱-۷۱/۴۲) ۰/۰۱	۰/۲
	Codominant	CC	۳۶٪	٪۳۵	۱/۰۰	
		TC	٪۳۹	٪۴۴	(۰/۴۶-۱/۶۲) ۰/۶۸	۰/۷۲
		TT	٪۲۵	٪۲۱	(۰/۵۵ -۲/۴۳) ۱/۱۶	
	Dominant	CC	٪۳۶	٪۳۵	۱/۰۰	
		TC + TT	٪۶۴	٪۶۵	(۰/۵۴ -۱/۷۱) ۰/۹۶	۰/۸۸
	Recessive	CC + TC	٪۷۵	٪۷۹	۱/۰۰	
		TT	٪۲۵	٪۲۱	(۰/۶۵ -۲/۴۳) ۱/۲۵	۰/۵
	Over dominant	CC + TT	٪۶۱	٪۵۶	۱/۰۰	
		TC	٪۳۹	٪۴۴	(۰/۴۶ -۱/۴۳) ۰/۸۱	۰/۴۷
	Log-Additive				(۰/۷۳ -۱/۵۲) ۱/۰۵	۰/۷۸

پلی‌مورفیسم	مقادیر آماری	ژنوتایپ	گروه کنترل	گروه بیمار	Odds Ratio	P-value
پلی‌مورفیسم T132903Cدر ژن *INSR*	Allele	C	٪۶۸	٪۷۷	۱/۰۰	
		T	٪۳۲	٪۲۳	۰/۱ (۰/۰۷ -۱/۴۲)	۰/۰۲
	Codominant	CC	٪۵۹	٪۷۱	۱/۰۰	
		TC	٪۱۸	٪۱۲	(۰/۸۰ -۴/۰۵) ۱/۸۱	۰/۲
		TT	٪۲۳	٪۱۷	(۰/۸۰ -۳/۳۳) ۱/۶۳	
	Dominant	CC	٪۵۹	٪۷۱	۱/۰۰	
		TC + TT	٪۴۱	٪۲۹	۱/۷۰ (۰/۹۵-۳/۰۶)	۰/۰۸
	Recessive	CC + TC	٪۷۷	٪۸۳	۱/۰۰	
		TT	٪۲۳	٪۱۷	(۰/۷۲ -۲/۹۴) ۱/۴۶	۰/۲۹
	Over dominant	CC + TT	٪۸۲	٪۸۸	۱/۰۰	
		TC	٪۱۸	٪۱۲	(۰/۷۳ -۳/۵۵) ۱/۶۱	۰/۲۳
	Log-Additive				(۰/۹۳ -۱/۸۵) ۱/۳۲	۰/۱۱

۴- بحث

براساس مطالعه‌های انجام‌شده، کمتر از یک‌سوم دلایل ژنتیکی برای ناباروریِ مردان هنوز ناشناخته هستند که به دلایل ژنتیکی آیدیوپاتیک نامیده شده‌اند (۱، ۳، ۴ و ۱۳). اگرچه فاکتورهای محیطی می‌توانند نقش مهمی در ناباروریِ مردان داشته باشند، اما مطالعه‌های امروزه تغییرهای ژنتیکی را در کنار فاکتورهای محیطی عامل مؤثری در این امر دانسته، خصوصاً موجب توجه زیاد به علل ناباروریِ آیدیوپاتیک شده است (۲، ۱۰، ۱۱، ۱۳ و ۱۴). براین‌اساس پژوهش پیش‌رو به بررسی ارتباط دو پلی‌مورفیسم در ژن‌هایی پرداخته که به‌صورت آیدیوپاتیک در ناباروریِ مردان نقش دارند و این پلی‌مورفیسم‌ها عبارتند از:

T824C در ژن *OR2W3* و T132903C در ژن *INSR* که با روش‌های مولکولی HRM-PCR Corbett، PCR-RFLP و طراحی پرایمرهای اختصاصی با نرم‌افزار DNAsisMan، با توانایی تکثیر طول قطعهٔ کوتاه‌تر از ۲۰۰ bp و یک پرایمر چپ با دارا بودن انتهای ناهمگون، به بررسی دو پلی‌مورفیسم موردمطالعه در این پژوهش پرداخت. نتایج نشان دادند که برای پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* فراوانی آلل C در گروه بیمار با میزان ۵۷/۱ درصد در مقایسه با گروه کنترل که ۵۵/۴ درصد به‌دست آمده است، تفاوت معنی‌دار بین گروه بیمار و کنترل نشان نداده بنابراین چنین نتیجه‌گیری می‌شود که بین این پلی‌مورفیسم و ایجاد اولیگواسپرمی و آزواسپرمی در جمعیت مردانِ نابارور ایرانی ارتباط معنی‌داری وجود ندارد. نتایج برای پلی‌مورفیسم T132903C در ژن *INSR* نشان داد که آلل C با فراوانی ۷۷ درصد در گروه بیمار در مقایسه با گروه کنترل که ۶۸ درصد به‌دست آمد، دارای تفاوت معنی‌داری بین گروه بیمار و کنترل می‌باشد و در نتیجه با ناباروریِ آیدیوپاتیک در جمعیت مردانِ ایرانی موردمطالعه ارتباط معنی‌داری دارد و یا به عبارتی با ایجاد اولیگواسپرمی و آزواسپرمی در مردان می‌تواند موجب ناباروری شود. در ادامه نیز به بررسی و مقایسهٔ نتایج این دو پلی‌مورفیسم درجمعیت ایرانی با سایر جمعیت‌ها پرداخته شده است.

در بررسی پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* که در مطالعه‌های گذشته با روش‌های دارای قدرت تشخیص بالا همچون Genomic Wide SNP Association Study (GWAS) و microarray انجام‌شده مشخص شده است که این پلی‌مورفیسم با ایجاد

آزواسپرمی و اولیگواسپرمی در ناباروریِ آیدیوپاتیک مردان ارتباط دارد. در یکی از این مطالعه‌ها که در سال ۲۰۱۰ توسط استون و همکارانش انجام گرفته است ۱۷۲ پلی‌مورفیسم در جمعیت مردان آزواسپرم و اولیگواسپرمِ اروپایی موردبررسی قرار گرفت که در آن مطالعه چندین پلی‌مورفیسم جدید گزارش گردید که یکی از این پلی‌مورفیسم‌ها که با جمعیت معنی‌دار گزارش‌شده، پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* می‌باشد (۱۵). در پژوهش حاضر نیز برای بار اول این پلی‌مورفیسم در جمعیت مردان نابارور ایرانی که ناباروریِ آیدیوپاتیک داشتند با روش Real-Time PCR-HRM Corbett بررسی انجام شد و سپس با روش PCR-RFLP نتایج ژنوتایپینگ تأیید گردید. در بررسی انجام‌گرفته مشخص شد که این پلی‌مورفیسم در بین گروه مردانِ نابارور و بارورِ ایرانی تفاوت معنی‌داری نداشته است و در نتیجه در ایجاد آزواسپرمی، اولیگواسپرمی و ایجاد ناباروری در مردان ایرانی مؤثر نمی‌باشد. در مطالعهٔ استون و همکاران نشان داده شده است که حضور این پلی‌مورفیسم سبب بروز آزواسپرمی و اولیگواسپرمی شدید می‌گردد و این اثر را با تغییر اسیدآمینهٔ متیونین به والین و در نتیجه ایفای تغییر نقشِ تنظیمیِ رسپتور اولفاکتوری که در حس بویایی دخالت داشته و روی این ژن قرار دارد می‌پردازد. در مطالعهٔ آنان تفاوت معنی‌داری بین گروه بیمار و کنترل از نظر حضور پلی‌مورفیسم بیان‌شده گزارش گردیده است (p =۰/۰۰۰۲) (۱۵).

در مطالعهٔ پلاسیسکی و همکارانش در سال ۲۰۱۲ گزارش گردید که حضور پلی‌مورفیسم rs11204596 در ژن *OR2W3* با ناباروریِ آیدیوپاتیک مردان ارتباط معنی‌داری وجود دارد. تحقیقات آنان نشان داد که حضور این پلی‌مورفیسم در ژن بیان‌شده می‌تواند با تأثیر در روند اسپرماتوژنز سبب آزواسپرمی در مردان شود و در نتیجه با ناباروریِ مردان در ارتباط باشد (۱۷) که با توجه به پژوهش حاضر و عدم‌ارتباط معنی‌دار، می‌توان به تفاوت نژادی، جمعیتی و جغرافیایی که در بروز این فنوتیپ مؤثر است اشاره نمود. همچنین در تحقیقه‌های دیگری که روی نقش این پلی‌مورفیسم مشخص شده است، رسپتورهای کدشونده با این ژن با رسپتورهای عصبی و هورمونی و همچنین با سایر رسپتورهای بویایی ارتباط دارند و تمامی آن‌ها روی ژن *OR2W3* قرار دارند که از این دیدگاه نیز جای بحث و بررسی بیشتری برای نقش این ژن و پلی‌مورفیسم‌های آن در سایر بیماری‌ها نیز وجود دارد (۲۰ - ۲۲).

همچنین بررسی پلی‌مورفیسم T132903C در ژن *INSR* که در مطالعه‌های انجام‌شده در سال‌های گذشته و با روش‌های با قدرت تشخیص بالا همچون GWAS و microarray صورت گرفته است که به نقش این پلی مورفیسم که می‌تواند با ایجاد آزواسپرمی و اولیگواسپرمی در ناباروریِ آیدیوپاتیک مردان مؤثر باشد پرداخته شده است. در مطالعهٔ دیگری استون و همکارانش در سال ۲۰۱۰ توسط ۱۷۲ پلی‌مورفیسم در جمعیت مردان آزواسپرم و اولیگواسپرم اروپایی موردبررسی قرار گرفته که آنان چندین پلی‌مورفیسم جدید را در ارتباط با ناباروری مردان گزارش نموده که یکی از این پلی‌مورفیسم‌ها که در جمعیت موردمطالعه معنی‌دار گزارش شده، پلی‌مورفیسم T132903C در ژن *INSR* می باشد (۱۶). در این مطالعه استون نشان داده که حضور این پلی‌مورفیسم سبب بروز آزواسپرمی و اولیگواسپرمی شدید می‌گردد و این اثر را با تغییر رسپتورهای پروتئینی برای انسولین ایجاد می‌نماید و این رسپتورها با ژن *INSR* کُد می شوند. در این مطالعه همچنین تفاوت معنی‌داری بین گروه بیمار و کنترل از نظر حضور پلی‌مورفیسم بیان‌شده گزارش شده است (p = ۰/۰۰۱) (۱۶). در پژوهش حاضر نیز برای بار اول، این پلی‌مورفیسم در جمعیت مردان نابارور ایرانی که ناباروری آیدیوپاتیک داشتند با روش Real-Time PCR-HRM Corbett بررسی شده سپس با روش PCR-RFLP نتایج ژنوتایپینگ کنترل و تأیید گردیده است. در بررسی انجام‌گرفته، مشخص شده است که بین فراوانی حضور این پلی‌مورفیسم در گروه مردان نابارور و بارور ایرانی تفاوت معنی‌داری وجود دارد (p = ۰/۰۲) و در نتیجه می‌تواند در ایجاد آزواسپرمی و اولیگواسپرمی در مردان نابارور نقش داشته باشد و به‌عنوان عاملی برای ناباروری در جمعیت موردمطالعه از مردان ایرانی مطرح باشد؛ به‌علاوه این نتایج نشان دادند که پژوهش حاضر با مطالعهٔ استون هم‌خوانی دارد.

همچنین در سال ۲۰۱۹ در تحقیقی که توسط نیریگنک و همکارانش انجام گرفت مشخص گردید که ژن *INSR* با تأثیر در فاکتورهای رشد و رسپتورهای انسولین در مسیرهای سیگنالینگی که در دستگاه تناسلی برای اسپرماتوژنز و عملکرد طبیعی باروری مؤثر هستند تأثیرگذار است و بیان نمودند که مطالعه‌هایی در خصوص حضور پلی‌مورفیسم‌ها در این ژن و اثرهایی که در تغییرات بیان‌ژن می‌گذارد می‌تواند راهگشایی برای مطالعه‌های آینده در زمینه‌های ناباروری باشد (۱۸). با درنظر گرفتن نتایج پژوهش حاضر می‌توان چنین عنوان نمود که نتایج این دو تحقیق در راستای یکدیگر می‌باشند و حضور

پلی‌مورفیسم بیان‌شده می‌تواند در ایجاد ناباروری در مردان نقش مؤثری داشته باشد. همچنین در تحقیق‌های دیگری که در ارتباط با این پلی‌مورفیسم انجام شده است مشخص گردید که رسپتورهایی که با ژن *INSR* کُد می‌شوند با رسپتورهای عصبی و هورمونی در ارتباط بوده و نیز با فعالیت تیروزین پروتئین کینازی که دارند به‌طور غیرمستقیم (با فرایندهای هورمونی) روی اسپرماتوژنز تأثیر می‌گذارند و سبب ایجاد کاهش اسپرم می‌گردند و می‌توانند سبب ناباروری مردان شوند. همچنین سایر تحقیق‌ها در خصوص پلی‌مورفیسم بیان‌شده نشان داده است که این پلی‌مورفیسم می‌تواند نقش مؤثری در سایر بیماری‌ها نیز دارا باشد (۲۳ – ۲۶).

در این پژوهش در مورد حضور پلی‌مورفیسم‌های مرتبط با ناباروریِ مردان در جمعیت مردانِ نابارور ایرانی از روش HRM Corbett استفاده شده است که این روش با توانایی بالا در تشخیص پلی‌مورفیسم‌های موردمطالعه و با قدرت رزولیشن بالا می‌تواند راهگشایی برای تشخیص تغییرهای ژنتیکی در مطالعه‌های ژنتیکی به‌خصوص با تعداد زیاد نمونه‌ها مطرح باشد و روش دقیقی برای آنالیز نتایج و رسم نمودارها با داشتن نرم‌افزارهای مربوطه می‌باشد. بنابراین در کنار استفاده از روش‌های دارای قدرت تفکیک بالا، تعداد نمونه‌های بیشتر و نمونه‌هایی از قومیت‌ها و جمعیت‌های مختلف برای تأیید نتایج این پژوهش و سایر تحقیقه‌های مشابه توصیه می‌گردد.

۵- نتیجه‌گیری

در این مطالعه به بررسی نقش دو پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* و T132903C در ژن *INSR* در تنظیم اسپرماتوژنز و در نتیجه بروز ناباروریِ مردان پرداخته شد. نتایج نشان دادند که بین حضور پلی‌مورفیسم T824C در ژن *OR2W3* و ناباروریِ آیدیوپاتیک مردان ایرانی در جمعیت موردمطالعه ارتباط معنی‌داری وجود ندارد اما این ارتباط بین حضور پلی‌مورفیسم T132903C در ژن *INSR* و ایجاد الیگواسپرمی و آزواسپرمی و در نتیجه ناباروریِ آیدیوپاتیک مردان می‌تواند معنی‌دار باشد و نیز این نتایج می‌توانند آغازی برای مطالعه‌های آتی در این زمینه باشند و با تعداد بیشتری از نمونه‌های مردان نابارور و در جمعیت‌های مختلف مردانِ نابارور ایرانی و سایر کشورهای جهان این نوع مطالعه‌ها انجام گیرد و راهگشایی برای پژوهش‌های آینده در درمان، کنترل و پیش‌آگهی این معضل اجتماعی-عاطفی در خانواده‌ها گردد.

۶- ملاحظات اخلاقی

کلیه کارهای پژوهشی مقاله با کسب رضایت نامه و انتخاب اگاهانه از بیماران مرکز ناباروری نوید و با کسب مجوز اخلاقی از آزمایشگاه ژنتیک پزشکی پژوهشکده ملی مهندسی ژنتیک صورت پذیرفت.

۷- تشکر و قدردانی

از کلیهٔ پرسنل و بیماران مرکز ناباروری نوید و مسئولان محترم آزمایشگاه ژنتیک پزشکی پژوهشگاه ملّی مهندسی ژنتیک و گروه ژنتیک دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس که در انجام کارهای آزمایشگاهی این پژوهش کمال همکاری و مساعدت را مبذول داشتند تشکر و قدردانی می‌گردد.

۸- تعارض منافع

مقاله فاقد هر گونه تعارض منافع است.

۹- سهم نویسندگان

اجرای مراحل کارهای تحقیقاتی و انالیز داده ها و نگارش و تنظیم مقاله توسط خانم دکتر الهام سیاسی صورت پذیرفت. طراحی تحقیق و نظارت بر روند انجام کار توسط اقای دکتر ال یاسین انجام گرفت. مشاوره‌های روندپژوهش و ویرایش فرم نهایی مقاله توسط اقای دکترجواد مولاانجام شد.

۱۰- منابع

1. Witherspoon L, Flanniga R. Male factor infertility Initial workup and diagnosis in primary care. Canadian Family Physician. 2021; 67: 248-54.
2. Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, Cho ChL, Henkel R, Vij S , Arafa M, Panner Selvam MK, Shah R. Male infertility. Lancet. 2021; 397(10271): 319-33.
3. Oud MS, Smits RM, Smith HE, Mastrorosa FK, Holt GS, Houston BJ, et al. A de novo paradigm for male infertility. Nature Communications. 2022; 13: 154.
4. Ayad B, Omolaoye TS, Louw N, Ramsunder Y, Skosana BT, Oyeipo PI, Du Plessis SS. Oxidative Stress and Male Infertility: Evidence from a Research Perspective. Front. Reprod. Health. 2022; 4(82257): 1-15.
5. Andrade DL, Viana MC, Esteves SC. Differential Diagnosis of Azoospermia in Men with Infertility. J. Clin. Med. 2021; 10: 3144.
6. Arafa M, Agarwal A, Majzoub A, Panner Selvam MK, Baskaran S, Henkel R, Elbardis H. Efficacy of Antioxidant Supplementation on Conventional and Advanced Sperm Function Tests in Patients with Idiopathic Male Infertility. Antioxidants. 2020; 9(219): 1-15.
7. De Luca MN, Marisa Colone M, Gambioli R, Stringaro A, Unfer V. Oxidative Stress and Male Fertility: Role of Antioxidants and Inositols. Antioxidants. 2021; 10(1283): 1-20.
8. Dutta S, Sengupta P. SARS-CoV-2 and male infertility: Possible multifaced pathology. Reprod. Sci. 2021; 28: 23-6.
9. Fave RFD, Polisini G, Giglioni G, Parlavecchio A, Dell Atti L, Galosi AB. COVID-19 and male fertility: Taking stock of one year after the outbreak began. Arch. Ital. Urol. Androl. 2021; 93: 115-9.
10. Babakhanzadeh E, Nazari M, Ghasemifar S, Khodadadia A. Some of the Factors Involved in Male Infertility: A Prospective Review. International Journal of General Medicine. 2020; 12: 29-41.
11. Karavolos S, Panagiotopoulou N, Alahwany H, Martins da Silva S. An update on the management of male infertility. The Obstetrician Gynaecologist. 2020.; 22: 267-74.
12. Chaudhuri GR, Das A, Bandhu Kesh S, Bhattacharya K, Dutta S, Sengupta P, Syama AK. Obesity and male infertility: multifaceted reproductive disruption. Middle East Fertility Society Journal. 2022; 27(8): 1-12.
13. Ring JD, Lwin AA, Köhler TS. Current medical management of endocrine-related male infertility. Asian Journal of Andrology. 2016; 18: 357-63.
14. Alahmar AT, Calogero AE, Singh R, Cannarella R, Sengupta P, Dutt S. Coenzyme Q10, oxidative stress, and male infertility: A review. Clin Exp Reprod Med. 2021; 48(2): 97-104.
15. Yin Y, Zhu P, Luo T, Xia X. Association of single‐nucleotide polymorphisms in antioxidant genes and their gene‐gene interactions with risk of male infertility in a Chinese population. BIO MED REP. 2020; 13: 49-54.
16. Aston KI , Krausz C, Laface I, Ruiz-Castané 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(6):1383-97.
17. Plaseski T, Noveski P, Popeska Z, Efremov GD, Plaseska-Karanfilska D. Association study of single-nucleotide polymorphisms in FASLG, JMJDIA, LOC203413, TEX15, BRDT, OR2W3, INSR, and TAS2R38 genes with male infertility. J Androl. 2012; 33(4): 675-83.
18. Neirijnck Y, Papaioannou MD, Nef S. The Insulin/IGF System in Mammalian Sexual Development and Reproductio. Int. J. Mol. Sci. 2019; 20(4440): 1-18.
19. Shokrzadeh M, Mohammadpour A. Evaluation of a modified salt-out method for DNA extraction from whole blood lymphocytes: A simple and economical method for gene polymorphism. Pharm Biomed Res. 2018; 4(2): 28-32.
20. Ma X, Guan L, Wu W, Zhang Y, Zheng W, Ga YT. Whole-exome sequencing identifies OR2W3 mutation as a cause of autosomal dominant retinitis pigmentosa. Sci Rep. 2015; 5(9236): 1-6.
21. Trimmera C, Kellerb A, Murphya NR, Snydera LL, Willerc JR, Nagaid MH. Genetic variation across the human olfactory receptor repertoire alters odor perception. PNAS. 2019; 116 (19): 9475–80.
22. Sharon D, Kimchi A, Rivolta C. OR2W3 sequence variants are unlikely to cause inherited retinal diseases. Ophthalmic Genet. 2016; 37(4): 366-8.
23. Bedair RN, Magour GM, Ooda SA, Amar EM, Awad AM. Could insulin receptor H1085H C > T single nucleotide polymorphism predicts insulin resistance in type 2 diabetic and chronic hepatitis C virus patients in Egypt? Egyptian Liver Journal. 2021; 11(4): 1-11.
24. Nobakht H, Mahmoudi T, Sabzikarian M, Tabaeian SP, Rezamand G, Asadi A, Farahani H, Dabiri R, Mansour-Ghanaei F, Maleki I, Zali MR. Insulin and insulin receptor gene polymorphisms and susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. Arq Gastroenterol. 2020; 57(2): 203-8.
25. Liu N, Feng X, Feng Y, Zhang Sh, Wu Y, Jia T, Yang X, On Lee LT, Sun L. An association study between MiR-146a and INSR gene polymorphisms and hypertensive disorders of pregnancy in Northeastern Han Chinese population. Placenta. 2021; 104: 94-101.

26. Thangavelu M, Godla UR, F.D.Paul S, Maddaly R. Single-nucleotide polymorphism of INS, INSR, IRS1, IRS2, PPAR-G and CAPN10 genes in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. J of Genet. 2017; 96: 1-10.