

Investigation of the Relationship between HIWI2 Gene and Male Idiopathic Infertility

Sara Salimi¹, Saeid Ghorbian^{1*}, Reza Alibakhshi²

1. Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

2. Department of Biochemistry, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

(Received:2018/10/6

Accept: 2019/02/25)

Abstract

Background: Oligospermia and azoospermia play important roles in male infertility. HIWI genes family plays an important role in spermatogenesis from spermatogonial through protection and formation of meiosis. The single-nucleotide change in HIWI2 gene has been reported as a genetic factor affecting male infertility. The aim of the present study was to investigate the relationship between HIWI2 (rs508485 C>T) genetic changes and the risk of idiopathic severe oligospermia and azoospermia in infertile men.

Materials and Methods: A case-control investigation was performed on 100 blood samples of men with idiopathic azoospermia/severe oligozoospermia and 100 blood samples of fertile men with one chilled and without historical infertility who were referred to the infertility center of Motazedi Hospital in Kermanshah during 2015-2017. To determine HIWI2 C>T gene polymorphism frequency, we used Tetra ARMS-PCR method and data was analyzed using chi-squat test.

Results: In our findings, the genotype frequencies did not show a statically significant difference in dominant ($P=0.306$, $OR=0.704$), recessive ($P=0.359$, $OR=0.786$), and codominant ($P>0.05$, $OR=1.000$) heredity models. The allele frequencies did not reveal a statically significant difference between the two groups ($P=0.215$, $OR=0.774$; $CI=0.516-1.161$).

Conclusion: Our investigation did not show any evidence to the effect of HIWI2 rs508485 gene polymorphism as a risk factor for idiopathic azoospermia/severe oligozoospermia.

Keywords: HIWI2 Gene; Idiopathic Infertility; Oligozoospermia, Azoospermia

* Corresponding: Saeid Ghorbian
Email: ghorbian20@yahoo.com; s_ghorbian@iaiu-ahar.ac.ir

بررسی رابطه چند شکلی ژن HIW12 با ناباروری ایدیوپاتیک مردان

سارا سلیمی^۱، سعید قربان^{۱*}، رضا علی بخشی^۲

۱- گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
۲- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقاتی دارورسانی نانو، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۱۲/۰۶

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۷/۱۴

چکیده:

سابقه و هدف: الیگواسپرمی و آزواسپرمی نقش مهمی در ناباروری مردان دارند. ژن‌های خانواده HIW12 در تولید اسپرم از سلول‌های اسپرماتوگونی از طریق حفاظت و شکل‌گیری تقسیم میوزی نقش مهمی دارند. از عوامل ژنتیکی موثر در ناباروری مردان، تغییرهای تک نوکلئوتیدی در ژن HIW12 گزارش شده است. هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط بین چندشکلی ژن HIW12 ($rs508485 C>T$) با خطر آزواسپرمی / الیگواسپرمی ایدیوپاتیک در مردان نابارور بود. **مواد و روش‌ها:** مطالعه حاضر در قالب یک بررسی مورد - شاهدی روی ۱۰۰ مرد مبتلا به آزواسپرمی / الیگواسپرمی ایدیوپاتیک و ۱۰۰ مرد سالم دارای حداقل یک فرزند و فاقد سابقه خانوادگی ناباروری، مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری بیمارستان معتمدی کرمانشاه در سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۳ انجام شد. فراوانی چندشکلی ژن HIW12 $C>T$ با روش Tetra ARMS-PCR تعیین و داده‌ها با آزمون آماری مجذور کای آنالیز شدند. **یافته‌ها:** بررسی ما از لحاظ آماری اختلاف معناداری در فراوانی ژنوتیپی بین دو گروه در الگوهای توارثی غالب ($P=0/306$, $OR = 0/704$ ، مغلوب) ($P=0/359$, $OR = 0/786$ و هم بارزی ($p > 0/05$ $OR = 1/000$ نشان نداد. از نظر فراوانی آلی، اختلاف معناداری بین گروه‌های سالم و بیمار مشاهده نشد ($OR=0/744$ □ $CI:0/516-1/161$ □ $P= 0/215$)

نتیجه‌گیری: بررسی ما شواهدی مبنی بر تاثیر چندشکلی $rs508485$ ژن HIW12 به عنوان عامل مستعدکننده خطر برای مردان آزواسپرم / الیگواسپرم ایدیوپاتیک نشان نداد.

واژگان کلیدی: ژن HIW12، ناباروری ایدیوپاتیک، آزواسپرمی، الیگواسپرمی

مقدمه:

در موش MIWI (ارتولوگ HIWI) و MILI فعالیت برشی دارند که در خاموش کردن ترانسپوزون‌ها و فرآیند باروری نقش مهمی دارند (۵). پروتئین PIWI (بیضه‌های ناکارآمد تحت تاثیر P-element در دروزوفیلا) ابتدا طی مطالعه روی جهش‌هایی که بر تقسیم سلول‌های بنیادی در سلول‌های زایا تاثیرگذار و در دروزوفیلا برای گامتوژن ضروری بود، شناسایی شده بودند (۶). جهش در پروتئین PIWI در موش با نقص در گامتوژن همراهی داشته است که بیانگر نقش PIWI در نمو سلول‌های زاینده است. پروتئین‌های PIWI در توسعه رده سلول‌های زایا بسیاری از گونه‌های پر سلولی دخالت دارند و برای بیوژنر piRNAها ضروری هستند (۷). حضور نداشتن piRNAها سبب نقص در تکوین رده سلول‌های زایا و در نتیجه به ناباروری منجر شده است (۸، ۹). اگر چه مولکول‌های piRNA در هر دو بافت بیضه و تخمدان بیان می‌شوند، ولی بررسی‌ها نشان داده است که تنها در موش‌هایی که ژن‌های مرتبط با piRNA حذف شده‌اند عقیمی و در این شکل از ناباروری با افزایش بیان

ژن‌های خانواده HIWI در تولید اسپرم از سلول‌های اسپرماتوگونی از طریق حفاظت و شکل‌گیری تقسیم میوزی نقش مهمی دارند. نتایج بررسی‌ها نشان داده است موش‌هایی که واجد جهش‌های مشخص در ژن HIWI هستند با نقایصی در اسپرم زایی و در نهایت عقیمی مواجه شده اند (۱). پروتئین Argonaut (Ago) با خانواده مجزایی از RNA، یک هسته تحریک کننده خاموش‌شدگی RNA (RISC) و فعال کننده تخریب RNA را تشکیل می‌دهد (۲). بنابر شواهد متعدد، این پروتئین‌ها نقش بسیار حیاتی در مسیرهای خاموش‌کنندگی به واسطه RNA ایفا می‌کنند (۳). ژن HIW12 یک پروتئین ۸۶۱ آمینواسیدی را رمز می‌کند که وزن مولکولی آن ۹۸ کیلو دالتون است. پروتئین HIW12 متشکل از موتیف PAZ، جایگاه اثر RNAهای کوچک و موتیف PIWI، برش‌دهنده هیبرید RNA-DNA است (۴).

نویسنده مسئول: سعید قربان

پست الکترونیک: s_ghorbian@iauh.ac.ir@yahoo.com; s_ghorbian20@ghorbian20

استخراج شد، سپس با روش Tetra ARMS-PCR آزمایش شد. توالی ژن هدف شامل ژن‌های HIWI1، HIWI2، HIWI3 و HILI است. مطالعه‌ها نشان داده است که در نتیجه خاموش شدن بیان ژن‌های ارتولوگ HIWI در موش، توقف تقسیم میوزی و نابروری در نرها را در پی خواهد داشت (۱۴-۱۲، ۶). در سال ۲۰۱۰ Gu و همکارانش در مطالعه‌ای تعداد ۹ چندشکلی مرتبط با ژن HIWI را در جمعیت چینی مطالعه کرده بودند که چندشکلی‌های rs508485 و rs11703684 (HIWI3) با افزایش خطر الیگواسپرمی همراه شده بود (۱۵). چندشکلی rs508485 در ژن HIWI2 بدلیل قرارگیری در جایگاه انتهایی غیرقابل ترجمه (3'-UTR)، ممکن است بر پایداری mRNA یا تمایل اتصال به miRNAs تنظیمی تاثیر داشته باشد. آنالیز با نرم‌افزار HaploRegVer4 نشان داده است که چند شکلی rs508485 ممکن است روی میل اتصال چندین نوع فاکتورهای نسخه‌برداری از جمله Hoxa9، Foxd1، Fox، CEBPG، و GATA تأثیرگذار باشد (۱۶).

تاکنون مطالعه‌های اندکی مبنی بر تغییرهای ژنتیکی در ژن‌های HIWI به‌عنوان عامل مستعدکننده آزواسپرمی یا الیگواسپرمی با دلیل نامعلوم انجام شده است (۱۶، ۸، ۹). به دلیل اینکه نتایج مطالعه‌های انجام شده متناقض هستند و از طرفی با توجه به اهمیت نابروری به‌عنوان یک مشکل اساسی که سلامت تولید مثل را در جوامع مختلف تحت‌الشعاع قرار داده است، بنابراین مطالعاتی که بتواند این فشارها را با آسیب‌شناسی و درمان‌های احتمالی کاهش دهد، اهمیتی فوق‌العاده خواهد داشت.

جدول شماره ۱- توالی آغازگرها، اندازه محصول‌های تکثیر Tetra ARMS-PCR

نام آغازگرها	توالی آغازگرها	اندازه محصول‌ها	آلل
PIWIL4-FO	5'-GAGAAAGATTGAGCTTAGTTTTCATGTC-3'	۴۰۴ جفت باز	کنترل داخلی
PIWIL4-RO	5'-GCTGCAATACTTCAATTATGAGGTTCA-3'		
PIWIL4-FI	5'-AACTAAGTGTGGCGTGATATTTGATTAC-3'	۲۵۵ جفت باز	C
PIWIL4-RI	5'-GGGGTGGGAATTAGACTCTGTTTATATA-3'	۲۰۷ جفت باز	T

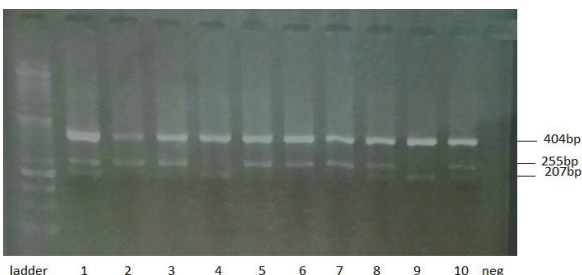
با توجه به اینکه فراوانی آلی به زمینه ژنتیکی افراد مطالعه شده ارتباط دارند و از طرفی ممکن است در قومیت‌ها و نژادهای مختلف متفاوت باشند، بنابراین، این مطالعه برای اولین بار روی نژاد کرد و مردان نابارور در جمعیت استان کرمانشاه انجام شده است. علاوه بر این، با توجه به این که اتکا به نتایج مطالعه‌های محدود قابل تعمیم به کل جامعه نیست و در راستای تایید ارتباط یک چندشکلی با یک بیماری در نظر گرفته شود، مطالعه‌های زیادی نیاز خواهد بود. بنابراین، هدف از این مطالعه، تعیین ارتباط بین چندشکلی $C>T$ HIWI2 به‌عنوان عامل مستعدکننده نابروری در مردان آزواسپرمی/الیگواسپرمی با دلیل نامعلوم در جمعیت مراجعه‌کننده به مرکز نابروری و نازایی بیمارستان معتضدی شهر کرمانشاه بود.

بعد از انجام واکنش PCR محصول‌های حاصل روی ژل آگارز ۳ درصد الکتروفورز و سپس رنگ‌آمیزی و عکس‌برداری شدند. نتایج با کمک نرم‌افزار آماري SPSS، نسخه ۲۵، بررسی شدند. فراوانی چند شکلی به‌طور جداگانه بین گروه‌های بیمار و کنترل محاسبه و با استفاده از آزمون آماري مجذور کای آنالیز شدند. مقدار درصد $p < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

میانگین سن افراد گروه بیمار $27/41 \pm 2$ سال (در محدوده سنی ۲۳-۷۸ سال) و گروه سالم $25/44 \pm 2$ سال (در محدوده سنی ۲۱-۷۱ سال) بود که اختلاف معناداری بین دو گروه مشاهده نشد ($p > 0.05$).

در مطالعه حاضر، ارتباط بین چندشکلی HIWI2 (rs508485) با خطر آزواسپرمی/الیگواسپرمی ایدیوپاتیک در ۱۰۰ مرد بارور سالم و ۱۰۰ مرد نابارور آزواسپرمی/الیگواسپرمی ایدیوپاتیک تعیین شد. پس از استخراج DNA و کیفیت سنجی، با به کارگیری آغازگرهای اختصاصی طراحی شده، فراوانی ژنوتیپ‌های احتمالی ژن مطالعه شده تعیین شد. شکل (۱)، نمونه‌ای از تصویر الکتروفورز محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز سه درصد را نشان می‌دهد که اندازه باندهای مورد انتظار ۴۰۴، ۲۵۵ و ۲۰۷ جفت بازی است.



شکل (۱). نتایج حاصل از واکنش Tetra ARMS-PCR روی ژل آگارز سه درصد اندازه قطعه‌های ۴۰۴، ۲۵۵ و ۲۰۷ جفت بازی برای چند شکلی ژن HIWI2. را نشان می‌دهد.

با توجه به اینکه فراوانی آلی به زمینه ژنتیکی افراد مطالعه شده ارتباط دارند و از طرفی ممکن است در قومیت‌ها و نژادهای مختلف متفاوت باشند، بنابراین، این مطالعه برای اولین بار روی نژاد کرد و مردان نابارور در جمعیت استان کرمانشاه انجام شده است. علاوه بر این، با توجه به این که اتکا به نتایج مطالعه‌های محدود قابل تعمیم به کل جامعه نیست و در راستای تایید ارتباط یک چندشکلی با یک بیماری در نظر گرفته شود، مطالعه‌های زیادی نیاز خواهد بود. بنابراین، هدف از این مطالعه، تعیین ارتباط بین چندشکلی $C>T$ HIWI2 به‌عنوان عامل مستعدکننده نابروری در مردان آزواسپرمی/الیگواسپرمی با دلیل نامعلوم در جمعیت مراجعه‌کننده به مرکز نابروری و نازایی بیمارستان معتضدی شهر کرمانشاه بود.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه در قالب یک بررسی مورد-شاهدی که روی ۲۰۰ نمونه خون محیطی مردانی که شامل ۱۰۰ مرد نابارور آزواسپرمی/الیگواسپرمی ایدیوپاتیک و ۱۰۰ نمونه خون محیطی مردان بارور سالم که واجد یک فرزند و فاقد سابقه خانوادگی نابروری بودند و در سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۳ برای درمان و ارزیابی به مرکز نابروری و نازایی بیمارستان معتضدی شهر کرمانشاه مراجعه کرده بودند، انجام شد. گروه بیمار، مربوط به بیماران نابارور مبتلا به آزواسپرمی و الیگواسپرمی با اسپرم کمتر از پنج میلیون در میلی‌لیتر مایع منی، بدون شناسایی هرگونه ناهنجاری‌های کروموزومی در بررسی‌های روتین سیتوژنتیکی با روش G-Banding، فاقد حذف ژن‌های DAZ و ریز حذف‌های کروموزوم Y (AZF) بودند و توسط متخصصان اورولوژی و ژنتیک پزشکی با عنوان آزواسپرمی/الیگواسپرمی ایدیوپاتیک تشخیص داده شده بود، شامل شد. گروه سالم، از نمونه خون افراد صاحب فرزند با باروری طبیعی و فاقد سوابق خانوادگی نابروری که مراجعه‌کننده به آزمایشگاه مرکزی شهر کرمانشاه بودند، انتخاب شدند. چنانچه در پرونده بیماران دلیل نابروری ذکر شده بود از مطالعه حذف می‌شد. تمامی بیماران پس از مراجعه و تایید ناهنجاری‌های‌شان توسط متخصصان مربوطه و با کسب رضایت‌نامه آگاهانه و با حفظ کامل هویت شخصی افراد و طبق رهنمودهای اخلاقی از تمامی شرکت‌کنندگان، به میزان دو میلی‌لیتر نمونه خون محیطی دریافت شد. در این مطالعه برای تعیین فراوانی چندشکلی ژن $C>T$ HIWI2، در ابتدا DNA ژنومی به روش Salting out (۱۷)

اختلاف آماری معناداری از نظر فراوانی ژنوتیپی بین دو گروه مطالعه شده مشاهده نشد $OR=0/786$ ، $CI:0/450-1/371$ ، $P=0/359$ در نتیجه مقایسه میزان فراوانی آلل جهش یافته T بین گروه‌های مورد مطالعه، اختلاف معناداری به دست نیامد $OR=0/774$ ، $CI:0/516-1/161$ ، $P=0/215$ آلل جهش یافته T نمی‌تواند به عنوان فاکتور خطری برای ناباروری مردان در مطالعه حاضر در نظر گرفته شود.

بحث:

در مطالعه حاضر، ارتباط بین چندشکلی ژن HIW12 (rs508485) با خطر ابتلا به آزواسپرمی/الیگواسپرمی ایدیوپاتیک در مردان نژاد کردی نابارور در شهر کرمانشاه مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های این مطالعه برخلاف پیشین، ارتباط معنی داری بین چندشکلی ژن HIW12 (rs508485) با افزایش خطر مردان به ناباروری ناشی از آزواسپرمی/الیگواسپرمی ایدیوپاتیک نشان نداد.

البته تاکنون، مطالعات محدودی در زمینه اهمیت چندشکلی‌های خانواده ژن HIW12 و ارتباط آنها با ناباروری مردان انجام شده است که بعضاً نتایج متناقضی گزارش شده است (۱، ۸، ۹، ۱۶).

در اولین مطالعه ای که Gu و همکاران بر روی ۴۹۰ مرد مبتلا به آزواسپرمی/الیگواسپرمی شدید و ۴۶۸ مرد بارور سالم در جمعیت چینی انجام داده بودند، نشان داده شد که حضور حداقل یک آلل جهش یافته در چندشکلی rs508485 خطر ناباروری مردان را به طور معناداری افزایش داده است. تغییرات ژنتیکی در خانواده ژن PIWI با الیگواسپرمی همبستگی معنا داری را نشان داده بود در حالیکه با آزواسپرمی ارتباطی نشان نداد. بر اساس نتایج گزارش شده، تغییرات تک نوکلئوتیدی در ژن PIWI تنها ممکن است تأثیر نسبتاً کمی بر روی فرآیند اسپرماتوژنز داشته باشد (۱۵). بنابراین، این برخلاف نتایج مطالعه ما بود که در آن اختلاف معناداری در فراوانی ژنوتیپی در چندشکلی rs508485 بین دو گروه و همبستگی آن با آزواسپرمی مردان نشان داده نشده بود.

ارتباط بین چندشکلی rs508485 با خطر ناباروری مردان توسط Munoz و همکاران بر روی ۷۹ مرد آزواسپرم غیر انسدادی، ۶۱ آزواسپرم، ۱۸ الیگواسپرم شدید، و ۵۶ آزواسپرمی انسدادی در جمعیت اسپانیایی مورد بررسی قرار گرفته شد. علاوه براین، در این مطالعه از نمونه‌های بیضه ۴۰ مرد مبتلا به سندروم سلول سرتولی تنها (Sertoli cell only syndrome)، ۲۲ مورد مربوط به مبتلایان

ستون‌های ۱، ۸ و ۱۰: افرادی با ژنوتیپ هتروزایگوت، ستون‌های ۲، ۳، ۷-۵: افرادی با ژنوتیپ هموزایگوت جهش یافته، ستون‌های ۴ و ۹: افرادی با ژنوتیپ هموزایگوت سالم، چاکر ابتدایی، Ladder ۵۰ جفت باری.

فراوانی درصد ژنوتیپی چند شکلی rs508485 مربوط به ژن HIW12 در گروه بیمار و سالم و فراوانی آلل‌های وحشی و جهش یافته ژن HIW12 در دو گروه بیمار و سالم نیز در جداول شماره یک و دو نشان داده شده است. فراوانی ژنوتیپ‌های چندشکلی ژن HIW12 ($C>T$) در بین گروه‌های سالم و بیمار از نظر آماری اختلاف معناداری را نشان نداد ($P=548/0$)

جدول ۱- مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های چندشکلی ژن HIW12 ($C>T$) در بین گروه‌های سالم و بیمار

P	جمع	گروه		چندشکلی (rs508485 C>T) HIW12
		تعداد (درصد) سالم	تعداد (درصد) بیمار	
	۴۴	۱۹ (۴۳درصد)	۲۵ (۵۷درصد)	هموزایگوت سالم (CC)
۰/۵۴۸	۶۲	۳۱ (۵۰درصد)	۳۱ (۵۰درصد)	هتروزایگوت (CT)
	۹۴	۵۰ (۵۳درصد)	۴۴ (۴۷درصد)	هموزایگوت جهش‌یافته (TT)

در این مطالعه، به منظور احتمال اختلاف معناداری ژنوتیپ‌ها در الگوهای توارثی غالب، مغلوب و هم‌بارزی، هر سه نوع ژنوتیپ به صورت تک تک در دو گروه بیمار و سالم بررسی شدند. فراوانی ژنوتیپی در چندشکلی rs508485 در الگوهای توارثی غالب $OR=0/704$ ، $CI:0/359-1/381$ ، $P=0/306$ و هم‌بارزی $OR=1/000$ ، $CI:0/594-1/821$ ، $P=1/000$ نشان نداد. نتایج این ارزیابی ممکن است بیانگر این باشد که این چندشکلی تأثیری در ناباروری مردان مطالعه شده نداشته است. علاوه براین، در حالت الگوی توارثی مغلوب نیز

جدول ۲- مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های چندشکلی ژن HIW12 ($C>T$) در بین افراد سالم و بیمار

P	فاصله اطمینان ۹۵درصد		نسبت شانس	جمع	گروه		چندشکلی (rs508485 C>T) HIW12
	پایین	بالا			تعداد (درصد) سالم	تعداد (درصد) بیمار	
							الگوی هم‌بارزی
۱/۰۰۰	۰/۵۴۹	۱/۸۲۱	۱/۰۰۰	۶۲	۳۱ (۵۰درصد)	۳۱ (۵۰درصد)	CT
				۱۳۸	۶۹ (۵۰درصد)	۶۹ (۵۰درصد)	CC+TT
							الگوی غالب
۰/۳۰۶	۰/۳۵۹	۱/۳۸۱	۰/۷۰۴	۴۴	۱۹ (۴۳%)	۲۵ (۵۷%)	CC
				۱۵۶	۸۱ (۵۲درصد)	۷۵ (۴۸درصد)	CT+TT
							الگوی مغلوب
۰/۳۵۹	۰/۴۵۰	۱/۳۷۱	۰/۷۸۶	۹۴	۵۰ (۵۳درصد)	۴۴ (۴۷درصد)	TT
				۱۰۶	۵۰ (۴۷درصد)	۵۶ (۵۳درصد)	CC+CT
۰/۲۱۵	۰/۵۱۶	۱/۱۶۱	۰/۷۷۴	۲۵۰	۱۳۱ (۵۲درصد)	۱۱۹ (۴۸درصد)	فراوانی آلل جهش یافته T
				۱۵۰	۶۹ (۴۶درصد)	۸۱ (۵۴درصد)	فراوانی آلل وحشی C

متعدد در یک ژن به مراتب تاثیر بیشتری را خواهد گذاشت. علاوه بر این، بر اساس یافته‌های پیشین، اسپرماتوزن یک فرآیند چند ژنی (پلی ژنیک) است که می‌توان با استفاده از آنالیز و ترکیب کردن متغیرهای متعددی، افراد در معرض خطر بالای ناباروری را شناسایی کرد (۱۵). همچنین بررسی‌ها نشان داد که تغییرهای ژنتیکی در ژن‌های PIWI ارتباط بیشتری با حالت الیگواسپرمی نسبت به آرواسپرمی داشته است. به نظر می‌رسد این تغییرها تنها یک تاثیر جزئی روی اسپرماتوزن داشته و به‌تنهایی نمی‌توانند به آرواسپرمی کامل منجر شوند (۲۱، ۲۰).

بر اساس گزارش یافته‌های پیشین، بی‌نظمی در سطح بیان ژن‌ها یا حضور تغییرهای تک نوکلئوتیدی ژنتیکی در این ژن‌ها، با ناباروری ناشی از آرواسپرمی ارتباط معناداری خواهند داشت. تناقض مطالعه ما نسبت به بررسی‌های پیشین را می‌توان این‌گونه عنوان کرد که ممکن است فراوانی آللی در جمعیت‌های مختلف متفاوت باشد. همچنین ممکن است ناشی از عوامل متعددی از قبیل اندازه جامعه آماری مطالعه شده، نژاد، قومیت و زمینه ژنتیکی متفاوت باشد. علاوه بر این، معیارهای ورود و خروج از مطالعه افراد مورد نظر ممکن است به اختلاف در نتایج گزارش شده منجر شود. البته گاهی این تناقض‌ها ناشی از اشتباه‌های آزمایشگاهی یا تجزیه و تحلیل نادرست اطلاعات هم می‌تواند باشد. ویژگی‌های این ارزیابی نسبت به مطالعه‌های قبلی این است که معیارهای ورود به مطالعه و خروج از آن با بیشترین میزان دقت انجام شد و مهم‌تر از این، فراوانی جهش C>T در 3'-UTR ژن HIWI2 در الگوهای توارثی مختلف غالب، مغلوب و هم‌بازری بررسی شد که در مطالعه‌های پیشین این چنین آنالیزهایی انجام نشده بود. همچنین این مطالعه برای نخستین بار در جمعیت مردان نابارور نژاد کردی در شهر کرمانشاه انجام شد که تاکنون گزارش‌هایی در این زمینه منتشر نشده است، ولی از جمله نقاط ضعف در ارزیابی حاضر، مطالعه تعداد ۱۰۰ مرد آرواسپرم/الیگواسپرم ایدیوپاتیک و ۱۰۰ مرد سالم بود که نسبت به مطالعه‌های پیشین جامعه آماری بزرگ‌تری بررسی شده بود. همچنین این نتایج مربوط به یک نژاد خاص (کردی) است که شاید قابل تعمیم به کل جمعیت ایرانی نباشد.

به‌طور کلی برای درک بهتر رابطه مسیر piRNA و ناباروری مردان، پیشنهاد می‌شود که مطالعه‌های گسترده‌تر و در نژادهای مختلف ایرانی و همچنین نقش دیگر چندشکلی‌ها در ژن‌های دخیل در این مسیر در انواع ناباروری مردان مورد توجه قرار گیرد. همچنین پیشنهاد می‌شود که میزان بیان و تاثیر تغییرهای اپی ژنتیکی در این ژن‌ها را در بافت‌های بیضه مردان نابارور در بررسی‌های آینده مطالعه شوند.

نتیجه‌گیری:

بررسی ما شواهدی مبنی بر تاثیر چندشکلی ژن HIWI2 به عنوان عامل خطر در مردان آرواسپرم/الیگواسپرم ایدیوپاتیک نشان نداد. بنابراین، ارزیابی تغییرات ژنتیکی تک نوکلئوتیدی در ژن‌های مسیر piRNA و ارتباط آن‌ها با ناباروری مردان نیازمند مطالعه‌های گسترده‌ای است.

تشکر و قدردانی:

مقاله حاضر برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد ژنتیک با کد مصوب ۹۳۲۰۱۲ از دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر است. این مطالعه با مشارکت کارکنان بیمارستان شهید معتمدی کرمانشاه انجام شده است. از تمامی افرادی که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع:

- Muñoz X, Navarro M, Mata A, Bassas L, Larriba S. Association of PIWIL4 genetic variants with germ cell maturation arrest in infertile Spanish men. *Asian journal of andrology*. 2014;16(6):931.

به توقف در بلوغ سلول‌های زاینده (Germ cell maturation arrest) و ۷ نفر از مبتلایان به اختلالات Hypo spermatogenesis بی‌بوسی برداشت شده بود. نتایج آنها نشان داده بود که فراوانی آلل جهش یافته T و حاملین آلل T با ژنوتیپ های (CT+TT) در گروه بیماران نسبت به سالم بیشتر بود. این در حالی است که فراوانی ژنوتیپی بین دو گروه اختلاف معناداری را نشان نداده بود (۱). مشابه نتایج مطالعه حاضر نیز اختلاف معناداری در فراوانی ژنوتیپی در چندشکلی rs508485 بین دو گروه نشان داده نشد.

در بررسی دیگری که Kamaliyan و همکاران که روی مردان آرواسپرم غیر انسدادی مراجعه‌کننده به بیمارستان دی تهران انجام شده بود، نتایج با مطالعه حاضر متناقض گزارش شده بود. یافته‌های آن‌ها نشان داد که ارتباط معناداری بین تغییرهای ژنتیکی در ژن HIWI2 که در مسیر piRNA نقش دارند با آرواسپرمی غیر انسدادی مردان ایرانی وجود دارد. براساس این نتایج، تغییرهای چند شکلی در ژن‌های مسیر piRNA می‌توانند به عنوان عامل خطر برای ناباروری مردان نقش داشته باشند (۹).

نتایج بررسی ما نشان داد که جهش C>T در ناحیه 3'-UTR در ژن HIWI2 نقشی در ناباروری مردان ندارد. در مقایسه گروه‌های مورد مطالعه، میزان فراوانی آلل T در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری را نشان نداد که بیانگر آن است که آلل T نمی‌تواند به عنوان فاکتور خطر برای ناباروری در جمعیت نابارور کرمانشاه نقش داشته باشد. این در حالی است که نتایج مطالعه Kamaliyan و همکاران همبستگی معناداری بین چند شکلی در ژن HIWI2 و آرواسپرمی غیر انسدادی ایدیوپاتیک در مردان ایرانی را گزارش کرده بودند (۸).

Bartel و همکاران در بررسی خود که با عنوان مکانیسم و فعالیت ژنومیک و بیوژن micro RNA انجام شده بود روی ۱۰۰ مرد نابارور نشان داد که یک چند شکلی در 3'-UTR ژن HIWI2 به شدت با افزایش خطر احتمالی ناباروری همراهی داشته است (۱۸). این درحالی است که با نتایج مطالعه حاضر به طور کامل در تضاد بود و عامل خطری برای ناباروری به شمار نمی‌رفت.

گزارش‌ها نشان داده اند که در نتیجه تغییرهای تک نوکلئوتیدی در ناحیه 3-UTR ژن HIWI2 خطر آرواسپرمی ایدیوپاتیک افزایش زیادی خواهد یافت (۱۵). با توجه به محل و موقعیت قرارگیری چندشکلی rs508485 در ژن HIWI2، این احتمال وجود دارد که این تغییر نوکلئوتیدی تاثیر چشمگیری روی پایداری مولکول mRNA داشته باشد و به دنبال آن، محل اتصال micRNAها به جایگاه هدف‌شان تغییر کند که در نتیجه میزان بیان ژن هدف از طریق برش مولکول mRNA یا سرکوب فرآیند ترجمه کاهش می‌یابد (۱۸). به دلیل نقش حیاتی که پروتئین‌های PIWI در بیان مولکول‌های piRNA دارند، بنابراین باید به ارتباط بین تغییرهای ژنتیکی و بیان کلی مولکول‌های بالغ و پردازش شده piRNAها در بافت بیضه‌ای انسان اهمیت ویژه‌ای داده شود. مطالعه‌ها نشان داده است که چندین ژن، مسؤل رمزکنندگی پروتئین‌هایی هستند که در فرآیند اسپرماتوزن نقش اساسی دارند. با این حال مطالعه‌های دیگر نیز نشان داده‌اند که RNAهای غیر رمزکننده نیز در این فرآیند دخیل هستند. piRNAها در میان RNAهای غیر رمزکننده در باروری مردان نقش زیادی دارند (۱۹، ۱۲). پروتئین PIWI و TDRD به تکامل و عملکرد piRNAها کمک و برای بهبود فرآیند اسپرماتوزن نیاز هستند. از این رو، جهش و چندشکلی در این ژن‌های غیر رمزکننده می‌تواند نقش مهمی در اسپرماتوزن ناقص و در نتیجه ناباروری مردان داشته باشد (۹). شواهد متعددی نشان داده است که حضور یک چندشکلی تنها تاثیرات اندکی خواهد داشت، درحالی‌که وجود تغییرهای ژنتیکی

- Tolia NH, Joshua-Tor L. Slicer and the argonautes. *Nature chemical biology*. 2007;3(1):36.
- Peters L, Meister G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Molecular cell*. 2007;26(5):611-23.
- De Fazio S, Bartonicek N, Di Giacomo M, Abreu-Goodger

- C, Sankar A, Funaya C, et al. The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature*. 2011;480(7376):259.
5. Cox DN, Chao A, Lin H. Piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development*. 2000;127(3):503-14.
6. Carmell MA, Girard A, van de Kant HJ, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, et al. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Developmental cell*. 2007;12(4):503-14.
7. Poursadegh Zonouzi A, Poursadegh Zonouzi AA, Ghorbian S. PiRNAs interacting proteins, candidate molecular marker for evaluation of idiopathic male infertility. *Andrologia*. 2014;46(8):823.
8. Kamaliyan Z, Pouriamanesh S, Amin-Beidokhti M, Rezagholizadeh A, Mirfakhraie R. HIWI2 rs508485 Polymorphism Is Associated with Non-obstructive Azoospermia in Iranian Patients. *Reports of biochemistry & molecular biology*. 2017;5(2):108.
9. Kamaliyan Z, Pouriamanesh S, Soosanabadi M, Gholami M, Mirfakhraie R. Investigation of piwi-interacting RNA pathway genes role in idiopathic non-obstructive azoospermia. *Scientific reports*. 2018;8(1):142.
10. He Z, Kokkinaki M, Pant D, Gallicano GI, Dym M. Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2009;137(6):901-11.
11. Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science (New York, NY)*. 2007;318(5851):761-4.
12. Thomson T, Lin H. The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect. *Annual review of cell and developmental biology*. 2009;25:355-76.
13. Deng W, Lin H. miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Developmental cell*. 2002;2(6):819-30.
14. Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, Isobe T, Asada N, Fujita Y, et al. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development (Cambridge, England)*. 2004;131(4):839-49.
15. Gu A, Ji G, Shi X, Long Y, Xia Y, Song L, et al. Genetic variants in Piwi-interacting RNA pathway genes confer susceptibility to spermatogenic failure in a Chinese population. *Human Reproduction*. 2010;25(12):2955-61.
- Ward LD, Kellis M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Database issue):D930-4.
16. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988;16(3):1215.
17. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*. 2004;116(2):281-97.
18. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001;68:978-989.
19. Wacholder S, Chanock S, Garcia-Closas M, El Ghormli L, Rothman N. Assessing the probability that a positive report is false: an approach for molecular epidemiology studies. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:434-442.
20. Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* 2006; 442:199-202.