Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.43; No.3; 2019

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 23:04 +0330 on Wednesday October 16th 2019

Investigation of the Relationship between HIWI2 Gene and Male Idiopathic Infertility

Sara Salimi[1], Saeid Ghorbian[1*], Reza Alibakhshi[2]

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

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ۴۳، شماره ۳، ۱۳۹۸، صفحات ۱۶۴ تا ۱۶۹

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 23:04 +0330 on Wednesday October 16th 2019

بررسی رابطه چند شکلی ژن HIWI2 با ناباروری ایدیوپاتیک مردان

سارا سلیمی [۱]، سعید قربیان* [۱]، رضا علی بخشی [۲]

۱- گروه ژنتیك مولكولي، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامي، اهر، ایران
۲- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقاتی دارورسانی نانو، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت مقاله:۱۳۹۷/۰۷/۱۴ تاریخ پذیرش مقاله:۱۳۹۷/۱۲/۰۶

چکیده:

سابقه و هدف: الیگواسپرمی و آزواسپرمی نقش مهمی در ناباروری مردان دارند. ژن‌های خانواده *HIWI* در تولید اسپرم از سلول‌های اسپرماتوگونی از طریق حفاظت و شکل گیری تقسیم میوزی نقش مهمی دارند. از عوامل ژنتیکی موثر در ناباروری مردان، تغییرهای تک نوکلئوتیدی در ژن *HIWI2* گزارش‌شده است. هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط بین چندشکلی ژن *HIWI2 (rs508485 C>T)* با خطر آزواسپرمی / الیگواسپرمی ایدیوپاتیک در مردان نابارور بود.

موادوروش‌ها: 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 معتضدی کرمانشاه در سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۳ انجام شد. فراوانی چندشکلی ژن *HIWI2 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) *OR = 1/000 p >۰/۰۵* نشان نداد. از نظر فراوانی آللی، 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 *HIWI2* به عنوان عامل مستعدکننده خطر برای مردان آزواسپرم /الیگواسپرم ایدیوپاتیک نشان نداد.

واژگان کلیدی: ژن *HIWI۲*، ناباروری ایدیوپاتیک، آزواسپرمی، الیگواسپرمی

مقدمه:

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 نهایتً عقیمی مواجه شده اند(۱).

پروتئین Argonaut (Ago)با خانواده مجزایی از RNA، یک هسته تحریک‌کننده خاموش‌شدگی RNA (RISC) و فعال‌کننده تخریب RNA را تشکیل می‌دهد(۲). بنابر شواهد متعدد، این پروتئین‌ها نقش بسیار حیاتی در مسیرهای خاموش‌کنندگی به واسطه RNA ایفا می‌کنند(۳). ژن HIWI یک پروتئین ۸۶۱ آمینواسیدی را رمز می‌کند که وزن مولکولی آن ۹۸ کیلو دالتون است. پروتئین HIWI متشکل از موتیف PAZ، جایگاه اثر RNAهای کوچک و موتیف PIWI، برش‌دهنده هیبرید RNA-DNAاست(۴).

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 گامتوژنز ضروری بود، شناسایی شده بودند(۶). جهش در پروتئین PIWI در موش با نقص در گامتوژنز 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 بیوژنز piRNAها ضروری هستند(۷). حضور نداشتن piRNA ها سبب نقص در تکوین رده سلول‌های زایا و در نتیجه به ناباروری منجر شده است(۹، ۸). 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

نویسنده مسئول: سعید قربیان
پست الکترونیک: *yahoo.com; s_ghorbian@iau-ahar.ac.ir@ghorbian20*

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 23:04 +0330 on Wednesday October 16th 2019

ترانسپوزون‌ها همراه داشته است(۱۱، ۱۰). خانواده ژنی آرگونات در ژنوم انسان شامل ژن‌های HIWI3 ، HIWI2 ،HIWI و HILI است. مطالعه‌ها نشان داده است که در نتیجه خاموش شدن بیان ژن‌های ارتولوگ HIWI در موش، توقف تقسیم میوزی و ناباروری 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 (HIWI2) و rs11703684 (HIWI3) با افزایش خطر الیگواسپرمی همراه شده بود(۱۵). چندشکلی rs508485 در ژن HIWI2 بدلیل قرارگیری در جایگاه انتهای غیرقابل ترجمه (3´-UTR)، ممکن است بر پایداری mRNA یا تمایل اتصال به miRNAsهای 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، ۹، ۸، ۱). به دلیل اینکه نتایج مطالعه‌های انجام شده متناقض هستند و از طرفی با توجه به اهمیت ناباروری 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.

با توجه به اینکه فراوانی آللی 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 براین، 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 ژن HIWI2 C>T به‌عنوان عامل مستعدکننده ناباروری در مردان آزواسپرم/ الیگواسپرم با دلیل نامعلوم در جمعیت مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری 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 آزواسپرم/الیگواسپرم ایدیوپاتیک و ۱۰۰ نمونه خون محیطی مردان بارور سالم که واجد یک فرزند و فاقد سابقه خانوادگی ناباروری بودند و در سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۳ برای درمان و ارزیابی به مرکز ناباروری و نازایی بیمارستان معتضدی شهر کرمانشاه مراجعه کرده بودند، انجام شد. گروه بیمار، مربوط به بیماران نابارور مبتلابه 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 ناباروری که مراجعه‌کننده به آزمایشگاه مرکزی شهر کرمانشاه بودند، انتخاب شدند. چنانچه در پرونده بیماران دلیل ناباروری 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 HIWI2 C>T، در ابتدا DNA ژنومی به روش Salting out (۱۷) استخراج شد، سپس با روش Tetra ARMS-PCR آزمایش شد. توالی ژن هدف (Accession number: NC_000011.10) در نرم‌افزار Oligo Analyzer 7 برای طراحی آغازگرها وارد و پس از BLAST کردن در سایت NCBI اختصاصت آن‌ها بررسی شد. برای بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific، آمریکا) و ژل الکتروفورز آگارز یک درصد استفاده شد. برای تکثیر ناحیه اختصاصی rs508485، از ۱۲ میکرولیتر از Master Mix Red 2x (Ampliqon، دانمارک)، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام یک از آغازگرهای اختصاصی (10pmol/µl)، یک میکرولیتر DNA استخراج شده (100 ng) و ۱۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر PCR grade استفاده شد. برنامه PCR شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و در ۳۵ سیکل با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال با دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در مرحله آخر، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد(۸).

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

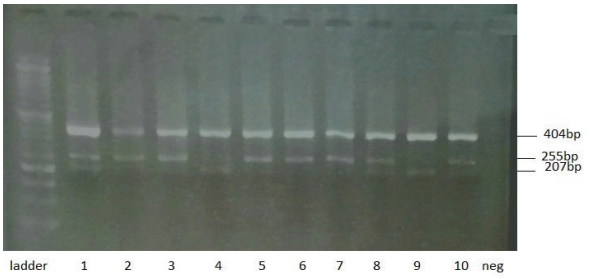
آلل	اندازه محصول‌ها	توالی آغازگرها	نام آغازگرها
کنترل داخلی	۴۰۴ جفت باز	5›-GAGAAAGATTGAGCTTAGTTTTCATGTC-3´	PIWIL4-FO
		5'-GCTGCAAATACTTCAATTATGAGGTTCA-3'	PIWIL4-RO
آلل C	۲۵۵ جفت باز	5›-AACTAAGTGTTTGCGTGATATTTTGATTAC-3›	PIWIL4-FI
آلل T	۲۰۷ جفت باز	5›-GGGGTGGGAATTAGACTCTGTTTATATA-3›	PIWIL4-RI

بعد از انجام واکنش PCR محصول‌های حاصل روی ژل آگارز ۳درصد الکتروفورز و سپس رنگ‌آمیزی و عکس‌برداری شدند. نتایج با کمک نرم‌افزار آماری SPSS، نسخه ۲۵، بررسی شدند. فراوانی چند شکلی به‌طور جداگانه بین گروه‌های بیمار و کنترل محاسبه و با استفاده از آزمون آماری مجذور کای آنالیز شدند. مقدار ۵ درصد>p معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

میانگین سن افراد گروه بیمار ۲±۴۱/۲۷ سال (در محدوده سنی ۷۸-۲۳ سال) و گروه سالم ۲±۴۴/۲۵ سال (در محدوده سنی ۷۱-۲۱ سال) بود که اختلاف معناداری بین دو گروه مشاهده نشد (۵درصد <p).

در مطالعه حاضر، ارتباط بین چندشکلی HIWI2 (rs508485)با خطر آزواسپرمی/ الیگواسپرمی ایدیوپاتیک در ۱۰۰ مرد بارور سالم و ۱۰۰ مرد نابارور آزواسپرم/ الیگواسپرم 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 محصول‌ها 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.

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 23:04 +0330 on Wednesday October 16th 2019

ستون های ۱، ۸ و ۱۰: افرادی با ژنوتیپ هتروزیگوت، ستون های ۲، ۳، ۷-۵: افرادی با ژنوتیپ هموزیگوت جهش یافته، ستون‌های ۴ و ۹: افرادی با ژنوتیپ هموزیگوت سالم، چاهک ابتدایی، Ladder ۵۰ جفت بازی.

فراوانی درصد ژنوتیپی چند شکلی rs508485 مربوط به ژن HIWI2 در گروه بیمار و سالم و فراوانی آلل‌های وحشی و جهش یافته ژن HIWI2 در دو گروه بیمار و سالم نیز در جداول شماره یک و دو نشان داده شده است. فراوانی ژنوتیپ‌های چندشکلی ژن HIWI2 (rs508485 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 HIWI2 (rs508485 C>T) در بین گروه‌های سالم و بیمار

چندشکلی (rs508485 C>T) HIWI2	گروه: تعداد (درصد) بیمار	گروه: تعداد (درصد) سالم	جمع	P
هموزیگوت سالم (CC)	۲۵ (۵۷درصد)	۱۹ (۴۳درصد)	۴۴	۰/۵۴۸
هتروزیگوت (CT)	۳۱ (۵۰درصد)	۳۱ (۵۰درصد)	۶۲	
هموزیگوت جهش‌یافته (TT)	۴۴ (۴۷درصد)	۵۰ (۵۳درصد)	۹۴	

در این مطالعه، به منظور احتمال اختلاف معناداری ژنوتیپ‌ها در الگوهای توارثی غالب، مغلوب و هم بارزی، 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 0/306 =P،CI;0/359-1/381، OR=0/704 و هم بارزی 1/000 =P،CI;0/594-1/821، OR=1/000اختلاف معناداری را 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 اختلاف آماری معناداری از نظر فراوانی ژنوتیپی بین دو گروه مطالعه شده مشاهده نشد 0/359 =P،CI;0/450-1/371، OR=0/786 در نتیجه مقایسه میزان فراوانی آلل جهش یافته T بین گروه‌های مورد مطالعه، اختلاف معناداری به دست نیامد 0/215 =P،CI;0/516-1/161، OR=0/774که این شاید نشان‌دهنده این است که 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 HIWI2 (rs508485) با خطر ابتلا به آزواسپرمی/الیگواسپرمی ایدیوپاتیک در مردان نژاد کردی نابارور در شهر کرمانشاه مورد بررسی قرار گرفت. یافته های این مطالعه برخلاف پیشین، ارتباط معنی داری بین چندشکلی ژن HIWI2 (rs508485) با افزایش خطر مردان به ناباروری ناشی از آزواسپرمی/الیگواسپرمی ایدیوپاتیک نشان نداد.

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

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 نداده بود. بر اساس نتایج گزارش شده، تغییرات تک نوکلئوتیدی در ژن PIWI تنها ممکن است تأثیر نسبتا 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 نمونه های بیضه ۴۰ مرد مبتلا به سندروم سلول سرتولی تنها (Sertoli cell only syndrome)، ۲۲ مورد مربوط به مبتلایان

جدول ۲- مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های چندشکلی ژنHIWI2 (rs508485 C>T) در بین افراد سالم و بیمار

چندشکلی (rs508485 C>T) HIWI2	گروه: تعداد (درصد) بیمار	گروه: تعداد (درصد) سالم	جمع	نسبت شانس	فاصله اطمینان ۹۵درصد: بالا	فاصله اطمینان ۹۵درصد: پایین	P
الگوی هم‌بارزی							
CT	۳۱ (۵۰درصد)	۳۱ (۵۰درصد)	۶۲	۱/۰۰۰	۱/۸۲۱	۰/۵۴۹	۱/۰۰۰
CC+TT	۶۹ (۵۰درصد)	۶۹ (۵۰درصد)	۱۳۸				
الگوی غالب							
CC	۲۵ (۵۷%)	۱۹ (۴۳%)	۴۴	۰/۷۰۴	۱/۳۸۱	۰/۳۵۹	۰/۳۰۶
CT+TT	۷۵ (۴۸درصد)	۸۱ (۵۲درصد)	۱۵۶				
الگوی مغلوب							
TT	۴۴ (۴۷درصد)	۵۰ (۵۳درصد)	۹۴	۰/۷۸۶	۱/۳۷۱	۰/۴۵۰	۰/۳۵۹
CC+CT	۵۶ (۵۳درصد)	۵۰ (۴۷درصد)	۱۰۶				
فراوانی آلل جهش یافته T	۱۱۹ (۴۸درصد)	۱۳۱ (۵۲درصد)	۲۵۰	۰/۷۷۴	۱/۱۶۱	۰/۵۱۶	۰/۲۱۵
فراوانی آلل وحشی C	۸۱ (۵۴درصد)	۶۹ (۴۶درصد)	۱۵۰				

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 23:04 +0330 on Wednesday October 16th 2019

به توقف در بلوغ سلول های زاینده (Germ cell maturation arrest) و ۱۷ نفر از مبتلایان به اختلالات Hypo spermatogenesis بیوپسی 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 گرووه نشان داده نشد.

در بررسی دیگری که Kamaliyan و همکاران که روی مردان آزواسپرم 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 آزواسپرمی 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 ناحیه3´-UTR در ژن HIWI2 نقشی در ناباروری مردان ندارد. در مقایسه گروه های 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 نمی تواند 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 آزواسپرمی 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 بیوژنز 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 ناحیه3-UTR ژن HIWI2 خطر آزواسپرمی 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 پردازش‌شده piRNAها در بافت بیضه‌ای انسان اهمیت ویژه‌ای داده شود. مطالعه‌ها نشان داده است که چندین ژن، مسئول رمزکنندگی پروتئین‌هایی هستند که در فرآیند اسپرماتوژنز نقش اساسی دارند. با این‌حال مطالعه‌های دیگر نیز نشان داده‌اند که RNAهای غیر رمزکننده نیز در این فرآیند دخیل هستند. piRNAها در میان RNAهای غیررمزکننده در باروری مردان نقش زیادی دارند(۱۹، ۱۲). پروتئین PIWI و TDRD به تکامل و عملکرد piRNA ها کمک و برای بهبود فرآیند اسپرماتوژنز نیاز هستند. ازاین‌رو، جهش و چندشکلی در این ژن‌های غیررمزکننده می‌تواند نقش مهمی در اسپرماتوژنز 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 متعدد در یک ژن به مراتب تاثیر بیشتری را خواهد گذاشت. علاوه براین، بر اساس یافته‌های پیشین، اسپرماتوژنز یک فرآیند چند ژنی (پلی‌ژنیک) 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 آزواسپرمی داشته است. به نظر می‌رسد این تغییرها تنها یک تاثیر جزیی روی اسپرماتوژنز داشته و به‌تنهایی نمی‌توانند به آزواسپرمی 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 آزواسپرمی 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 براین، 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 هم‌بارزی بررسی شد که در مطالعه های 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 آزواسپرم/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.

به‌طورکلی 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 اپی‌ژنتیکی 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 آزواسپرم/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 معتضدی کرمانشاه انجام شده است. از تمامی افرادی که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع:

1. 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.

2. Tolia NH, Joshua-Tor L. Slicer and the argonautes. Nature chemical biology. 2007;3(1):36.

3. Peters L, Meister G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. Molecular cell. 2007;26(5):611-23.

4. De Fazio S, Bartonicek N, Di Giacomo M, Abreu-Goodger

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 23:04 +0330 on Wednesday October 16th 2019

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.