بیان ژن Synaptonemal Complex Protein 3 (SYCP3) در بافت بیضه مردان آزواسپرم به عنوان مارکر مولکولی اسپرماتوژنز

محمود اعرابی (M.D.)[۱]، هاله سلطان قرایی (M.D.)[۲و۳]، محسن اعرابی (M.D., M.P.H.)[۴]، رضا بهجتی اردکانی (M.D.)[۱]، ناصر امیرجنتی (M.D.)[۲و۳]، معرفت غفاری نوین (M.D., Ph.D.)[۲و۳]، محمدرضا صادقی(Ph.D.)[۲و۳]، محمدحسین مدرسی (M.D., Ph.D.)[۲و۳و۵].

۱- مربی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا ، تهران، ایران.

۲- عضو تیم تخصصی، مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری و سقط مکرر ابن سینا، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا ، تهران، ایران.

۳- استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا ، تهران، ایران.

٤- گروه فارماکولوژی بالینی، دانشگاه شفیلد، شفیلد، انگلستان.

٥- استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: بروز اختلال در بیان هریک از ژن‌های مؤثر در مسیر اسپرماتوژنز به عنوان یکی از عوامل ایجاد آزواسپرمی غیرانسدادی و ناباروری مردان می‌باشد. Synaptonemal Complex Protein 3 (SYCP3) یکی از این ژنها می‌باشد و با تولید پروتئین SYCP3 در مرحله جفت شدن کروموزوم‌های همولوگ و سیناپس فعالیت دارد. عدم بیان این ژن در موش باعث ناباروری جنس نر و کاهش باروری جنس ماده می‌شود. بررسی بیان این ژن در انسان نیز می‌تواند به تعیین علت ناباروری کمک نماید و به عنوان عامل تشخیصی در تعیین پیشرفت اسپرماتوژنز و برنامه درمانی مردان نابارور به کار رود.

روش بررسی: در این مطالعه، بیان ژن SYCP3 از طریق حضور mRNA این ژن در بافت بیضه ۱۱۰ مرد مبتلا به آزواسپرمی مراجعه‌کننده به مرکز درمان ناباروری و سقط مکرر ابن سینا در سال‌های ۸٤-۱۳۸۳ به روش Semi-quantitative Nested Reverse Transcriptase PCR مورد بررسی قرار گرفت. همچنین با هدف تعیین اثر بیان ژن فوق در پیشرفت اسپرماتوژنز، بررسی و امتیازدهی هیستوپاتولوژی نمونه‌ها صورت گرفت.

نتایج: بیان mRNA ژن SYCP3 در بافت بیضه ٦۷ بیمار (٦۰/۹٪) مشاهده شد که رابطه معنی‌داری با میزان پیشرفت اسپرماتوژنز داشت ($p<۰/۰۰۰۱$). در حالی که این ژن در تمام بیماران دارای هیپواسپرماتوژنز و افراد دارای توقف در اسپرماتوژنز بیان شده بود، عدم بیان آن در بیماران دچار توقف در مرحله اسپرماتوگونی، سندرم سلول‌های سرتولی و آتروفی بیضه وجود داشت.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که ژن SYCP3 در بیضه بیان شده و مختص سلول‌های جنسی می‌باشد. یافته‌های این مطالعه به همراه مطالعات انجام شده در حیوانات نشان می‌دهد که عدم بیان ژن در بیضه می‌تواند تأثیر منفی در اسپرماتوژنز و باروری مردان داشته باشد. همچنین، بیان ژن در مرحله خاصی از اسپرماتوژنز، امکان استفاده از آن به منظور تعیین پیشرفت آن در کنار یافته‌های پاتولوژی را میسر می‌سازد.

کلید واژگان: ناباروری مردان، اسپرماتوژنز، پروتئین کمپلکس سیناپتونمال، بیوپسی بیضه، آزواسپرمی.

مسئول مکاتبه: دکتر محمدحسین مدرسی، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی، ابن‌سینا، تهران، ایران.

پست الکترونیک: modaresi@sina.tums.ac.ir

www.SID.ir

زمینه و هدف

اسپرماتوژنز یا فرآیند تولید سلول‌های جنسی مردانه در اثر تقسیمات میتوز و میوز در بیضه‌ها صورت می‌گیرد. با آغاز فرآیند اسپرماتوژنز، سلول‌های اسپرماتوگونی به سمت مرکز توبول‌های سمینیفروس حرکت می‌کنند (۱). این سلولها با انجام تقسیم میتوز به سمت تولید اسپرماتوسیت‌های Pre-Leptotene پیشرفت می‌کنند (۲). اسپرماتوسیت‌های اولیه که حاوی کروموزوم‌های دیپلوئید هستند، تقسیم میوز را انجام داده و به صورت گذرا تبدیل به اسپرماتوسیت ثانویه و به دنبال آن اسپرماتید هاپلوئید می‌شوند و در طی پدیدهٔ اسپرمیوژنز اسپرماتید گرد با تغییراتی در محتوی سیتوپلاسمی و جابجایی ارگانل‌های سلولی، شکل اسپرم با سر حاوی هستهٔ متراکم و ناحیهٔ گردن حاوی میتوکندری و دم طولانی به عنوان وسیلهٔ حرکتی را به خود می‌گیرد. سپس اسپرمها در اپی‌دیدیم به صورت اسپرم بالغ در می‌آیند. در مراحل مختلف اسپرماتوژنز، سلول‌های ژرمینال شرایط متفاوتی از نظر اندازه، مورفولوژی هسته و محل قرارگیری در توبول‌های سمینیفروس دارند که این مسأله امکان بررسی جزئیات بیشتری از فرآیند تقسیم و نمو سلولی را فراهم می‌کند (۳). با این حال، همچنان اختلاف نظر در مورد ارزش یافته‌های هیستوپاتولوژیک در تعیین مرحله پیشرفت اسپرماتوژنز وجود دارد.

تقسیم میوز در انسان توسط ژن‌های فراوانی کنترل می‌شود که برخی از آنها در سراسر میوز و برخی در مراحل خاصی از اسپرماتوژنز بیان می‌شوند. نتیجه فعالیت این ژنها، جفت شدن کروموزوم‌های هومولوگ و کاهش تعداد کروموزومها از دیپلوئید به هاپلوئید می‌باشد. برای انجام صحیح اسپرماتوژنز، روند جفت شدن کروموزوم‌های هومولوگ، سیناپس و نوترکیبی[1] و به دنبال آن جدا شدن کروموزومها ضروری می‌باشد که انجام صحیح این فرآیندها به کمک ساختارهای ویژه پروتئینی به نام پروتئین کمپلکس سیناپتونمال (SC)[2] تنظیم می‌شود (٤). پروتئین‌های کمپلکس سیناپتونمال، ساختار زیپی شکلی هستند که از دو جزء محوری[3] در امتداد هر کروموزوم تشکیل می‌شوند. این اجزای محوری در کمپلکس‌های سیناپتونمال بالغ توسط چندین فیلامان عرضی[4] به هم متصل می‌شوند (٥). اجزای محوری در جریان لپتوتن ایجاد شده و پیش‌ساز اجزاء جانبی[5] هستند که به نوبت خود در زیگوتن و پاکی‌تن مشخص می‌شوند. طی دیپلوتن و دیاکینز نیز همولوگها از هم جدا شده و کمپلکس‌های سیناپتونمال به دلیل جدا شدن اجزاء جانبی و قطع اتصالات عرضی از بین می‌روند (٦). در پستانداران، پروتئین‌های SC شامل سه گروه SCP1, SCP2 و SCP3 (که به نام SYCP3 شناخته می‌شود)، اجزای محوری و جانبی را تشکیل می‌دهند (٦-٩). به نظر می‌رسد SYCP3 تشکیل دهنده بخش اصلی اجزای جانبی باشد و به عنوان بنیان مولکولی اصلی برای اتصال سایر پروتئینها عمل کند. این پروتئین در تنظیم اتصال DNA به کروماتید، انجام فرآیند جفت شدن[6] در کروماتیدهای خواهری و سیناپس مؤثر است (۱۱،۱۰و٤). همچنین اخیراً عنوان شده که SYCP3 تنها در اتصال یک قطبی کینتوکرها در میوز I اثر دارد و به حفظ به هم پیوستگی سانترومرها در میوز II کمکی نمی‌کند (٤).

در موش، ژن مربوط به هر سه پروتئین تنها در بیضه و تخمدان بیان شده و ویژه سلول‌های ژرمینال است (۱۲). در موش‌های موتانت، فقدان ژن SYCP3 از طریق ایجاد اختلال در ساخت اجزای محوری و در نتیجه فشرده شدن کروموزومها و تنظیم فرآیند جفت شدن همولوگها می‌تواند باعث ناباروری شود. عدم وجود

1- Recombination

2- Synaptonemal Complex
3- Axial elements
4- Transverse filaments
5- Lateral elements
6- Cohesion

Archive of SID
www.SID.ir

SYCP3 در موش‌های نر نیز باعث آپوپتوز در اسپرماتوسیت‌های مرحله زیگوتن و فقدان اجزای محوری و جانبی SC در این موشها می‌گردد (۱). در اووسیتها، فقدان SYCP3 باعث کاهش باروری و آنوپلوئیدی و مرگ جنین می‌گردد (۱۳،۱٤).

براساس آمار موجود، حدود ۱۵٪ از زوجین در جوامع مختلف دچار مشکل ناباروری هستند و ۵۰٪ موارد، علت ناباروری ناشی از مردان به تنهایی یا همراه با زنان می‌باشد (۱٤).

عوامل مختلفی در ناباروری مردان مؤثر هستند که نتیجه آنها تولید ناکافی یا عدم تولید اسپرماتوزویید می‌باشد. بیماری‌های مقاربتی، مشکلات آناتومی، آسیب‌های عروقی و انسداد مسیر عبور اسپرم مربوط به مجموعه عواملی هستند که می‌توانند منجر به ناباروری مردان شوند. با این وجود، علت اصلی ناباروری مردان در ۳۰٪ موارد همچنان ناشناخته مانده است (۱۵).

به نظر می‌رسد که اختلالات ژنتیکی نقش مهمی در ناباروری مردان به‌ویژه در موارد آزواسپرمی غیرانسدادی ایفا کنند. طی سال‌های اخیر بررسی ژن‌های مؤثر در فرآیند ناباروری مردان، به دلیل نقش مهم آنها در برنامه‌ریزی درمانی از یکسو و امکان بررسی مشکلات ژنتیکی در فرزندان از طریق روش‌هایی همچون تشخیص‌های ژنتیکی قبل از لانه‌گزینی[1] مورد توجه قرار گرفته‌اند. از سوی دیگر، در صورتی که یک ژن در مرحله خاصی از اسپرماتوژنز بیان شود، امکان پیش‌بینی نحوه پیشرفت اسپرماتوژنز از طریق روش‌های مولکولی و تطبیق آن با یافته‌های هیستوپاتولوژیک فراهم می‌گردد.

تاکنون نقش ژن‌های مختلفی در این مقوله بررسی شده و به تازگی وجود اختلال در تولید پروتئین‌های SC به عنوان عامل مؤثر در بخشی از موارد ناباروری مردان در اثر آزواسپرمی غیرانسدادی مورد توجه قرار گرفته است (۱٦). ژن SYCP3 اندازه‌ای در حدود *kb* ۱۰/۵ دارد و با دارا بودن ۹ اگزون در روی کروموزوم 12q واقع شده است (NM-159634 in GenBank). تاکنون مطالعات محدودی درباره رابطه این ژن با اسپرماتوژنز در انسان انجام شده است. Miyamoto و همکاران در سال ۲۰۰۳، ۱۹ بیمار آزواسپرم را از نظر SYCP3 بررسی کردند (۱۷). بیان ژن تقریباً در نیمی از ۱۷ بیمار مبتلا به ALL در مطالعه دیگری گزارش شده است (۱۸).

به منظور مطالعه میزان بیان ژن SYCP3 در تعداد مناسبی از جمعیت بیماران نابارور، در مطالعهٔ حاضر برای اولین بار مردان آزواسپرم به روش Semi-quantitative Nested Reverse Transcriptase PCR مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین با هدف تعیین اثر بیان ژن فوق در پیشرفت اسپرماتوژنز، بررسی و امتیازدهی هیستوپاتولوژیک در کلیه نمونه‌ها صورت گرفت.

روش بررسی

بیماران: نمونه‌های بیوپسی بیضه ۱۱۰ مرد نابارور که در مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری و سقط مکرر ابن‌سینا در سال‌های ۸٤-۱۳۸۳ تحت بیوپسی بیضه به منظور برداشت اسپرم از بیضه یا TESE[2] برای انجام عمل میکرواینجکشن (ICSI) قرار گرفته بودند، از این مرکز اخذ شد. معیار ورود به مطالعه، تشخیص آزواسپرمی براساس آنالیز مایع منی و تأیید متخصص آندرولوژی بود. اندازه تقریبی نمونه‌ها *mm*۲×۲×۲ بود و کلیه نمونه‌ها پس از دریافت در ازت مایع ($-۱۹۸^{\circ}C$) منتقل و در دمای $-۷۰^{\circ}C$ ذخیره شدند. اطلاعات بیماران شامل سن، سابقه خانوادگی ناباروری، سابقه هرگونه اختلال تکاملی یا وجود پاتولوژی در بیضه‌ها،

1- Preimplantation genetic diagnosis

2- Testicular Sperm Extraction

Archive of SID
www.SID.ir

گزارشات معاینه بالینی بیضه‌ها (محل، قوام، اندازه بیضه و وجود واریکوسل)، سطح سرمی هورمون‌های FSH، LH و تستوسترون و نیز شاخص‌های آنالیز مایع منی هم از پرونده‌های آنها جمع‌آوری شد. برای مطالعه بافتها و انجام آزمایشات متعاقب مجوزی از کمیته اخلاق در زمینهٔ پژوهش‌های علوم پزشکی از پژوهشکده ابن‌سینا اخذ شد. از کلیه بیماران قبل از نمونه‌گیری، رضایتنامه کتبی آگاهانه در مورد انجام آزمایشات روی بیوپسی بیضه اخذ گردید.

استخراج RNA و انجام RT-PCR: RNA نمونه‌های بیضه با استفاده از Trizol (Invitrogen Inc. USA) و براساس دستورالعمل سازنده، استخراج و برای اقدامات بعدی در $-70\ ^{o}C$ ذخیره شد. ارزیابی کمی RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر و نسبت جذب نوری در طول موج‌های $260/280\ nm$ تعیین گردید. میزان متوسط نسبت جذب نوری (۲۶۰/۲۸۰) در نمونه‌ها ۱/۷۸ (۱/۸۴-۱/۷۳:CI ۹۵٪) بود. سپس $3\ mg$ از RNA حاصل به همراه $2\ \mu l$ از dNTP و $1\ \mu l$ از پرایمر Random Hexamer به مدت ۸ دقیقه در دمای $70\ ^{o}C$ قرار داده شد تا اتصالات دو رشته‌ای و پروتئینها جدا شود و واکنش Reverse-Transcription در حضور آنزیم M-MLV و مهارکنندهٔ آنزیم RNAse صورت گرفت. کیفیت cDNA حاصل با استفاده از پرایمرهای (5′TCCGACTGAGCGGCACTGGGAGTGC3′) از اگزون شمارهٔ ۱۰ و (5′GCCCGCAGGTCCTCTT TCCCTCACA3′) از اگزون شماره ۱۱ ژن فسفوگلوکوموتاز ۱ (PGM1) و آنزیم DNA پلی‌مراز (CinnaGen, Iran) کنترل شد. در نهایت نمونه‌های cDNA با کیفیت یکسان و قابل قبول انتخاب و در دمای $-20\ ^{o}C$ ذخیره شدند.

SYCP3 PCR: PCR نیمه کمی به روش nested با استفاده از $1\ \mu l$ از cDNA و $0/2\ \mu l$ آنزیم DNA پلی‌مراز در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. تکثیر cDNA در ۳۰ سیکل (۳۰ ثانیه در $94\ ^{o}C$، ۳۰ ثانیه در $45\ ^{o}C$ و ۴۵ ثانیه در $72\ ^{o}C$) صورت گرفت. محصولات PCR در ژل آگاروز ۱/۵٪ مورد بررسی قرار گرفت و پس از رنگ‌آمیزی با بروماید اتیدیوم، تحت اشعه UV مورد مشاهده قرار گرفت. نتایج به صورت منفی و مثبت در نظر گرفته شد و موارد مثبت به دسته‌های ۱+ تا ۳+ براساس شدت باند PCR و ۴+ در صورت بیان قوی و وجود باند در هر دو PCR تقسیم شدند.

بررسی هیستوپاتولوژیک: نمونه‌های تمام بیماران در داخل محلول ثابت کننده بوئن به آزمایشگاه پاتولوژی پژوهشکده ابن‌سینا منتقل گردید. پس از انجام فرآیندهای آماده‌سازی، لام‌های تهیه شده با هماتوکسیلین و ائوزین (H & E) رنگ‌آمیزی شدند. به منظور تعیین مرحله‌ای از اسپرماتوژنز که در آن ژن SYCP3 بیان می‌شود، تمامی لامها توسط یک پاتولوژیست مجرب بررسی و براساس تقسیم‌بندی Modified Holstein امتیازدهی شد (جدول شماره ۱) (۱۹).

آنالیز آماری: از نرم افزار SPSS نسخه ۱۱/۵ و Microsoft Excel برای ثبت داده‌ها و آنالیز آماری استفاده شد. تفاوت بین بیان ژن براساس متغیرها کمی با استفاده از T-Test و کوواریانس بررسی و $p<0/05$ به عنوان سطح معنی‌دار آماری در نظر گرفته شد.

نتایج

نمونه‌های بیوپسی بیضه ۱۱۰ بیمار نابارور دارای آزواسپرمی غیرانسدادی با استفاده از RT-PCR نیمه کمی به منظور مشاهده میزان بیان ژن SYCP3 بررسی شد.

هیستوپاتولوژی نمونه‌های بیضه: در بررسی هیستوپاتولوژی بیضه ۷ بیمار، هیچ یک از سلول‌های ژرمینال و سرتولی (Score:1) مشاهده نشد و در ۲۷ بیمار (۲۷/۶٪) تنها سلول‌های سرتولی (SCO)[1] مشاهده

1- Sertoli cell-only syndrome

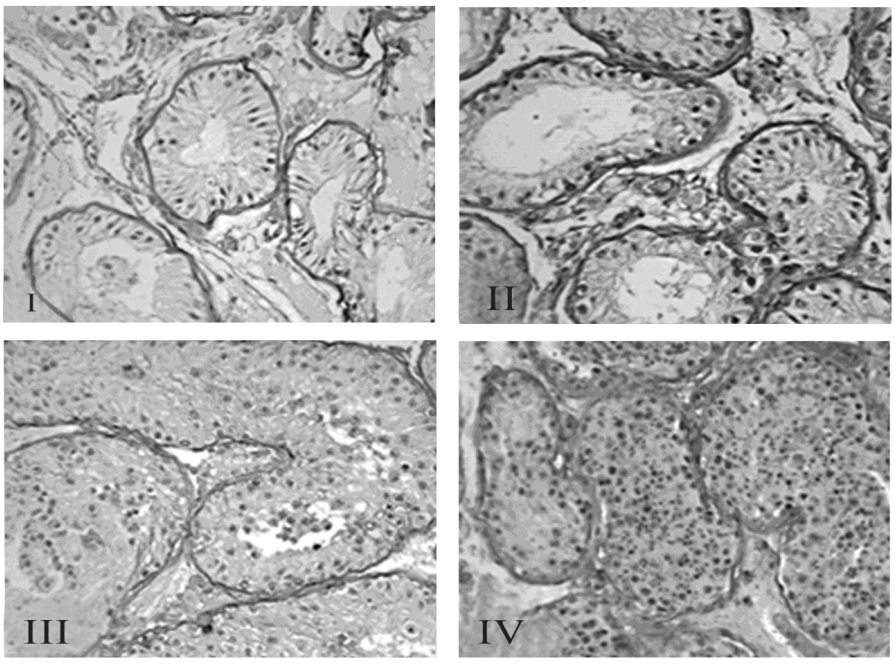
Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- امتیازدهی به یافته‌های هیستوپاتولوژیک بافت بیضه بیماران براساس روش Modified Holstein

Score	Modified Holstein's Scoring System
10	Intact spermatogenesis: many spermatozoa and zones of spermiation
9	Modest reduced spermatogenesis: reduced number of spermatozoa, a few zones of spermiation
8	Distinct reduced spermatogenesis: few spermatozoa, no spermiation
7	Considerably reduced spermatogenesis: no spermatozoa, only spermatids, no spermiation
6	Severely reduced spermatogenesis: only few spermatids, reduced height of germinal epithelium
5	Arrest of spermatogenesis at the stage of primary spermatocytes: many spermatocytes border the lumen of the seminiferous tubule
4	Arrest of spermatogenesis at the stage of primary spermatocytes: a few primary spermatocytes are present
3	Arrest at the stage of spermatogonia: A type spermatogonia multiplicate but do not develop to maturing cells of spermatogenesis
2	No germ cells, only Sertoli cells are present
1	No germ cells, no Sertoli cells. The seminiferous tubule is replaced by connective tissue ground substance

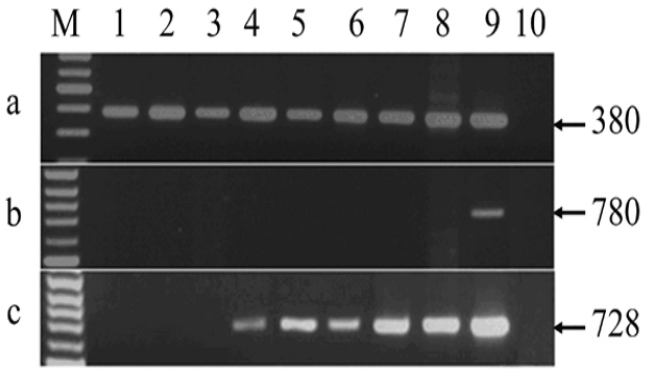
شد. توقف در سطح سلول‌های اسپرماتوگونی (Score:3) تنها در ۲ بیمار دیده شد؛ در حالی که ۲۹ بیمار (۲۹/۵٪) توقف اسپرماتوژنز را در سطح اسپرماتوسیت (Score:4,5) و ۹ بیمار (۹/۲٪) در سطح اسپرماتید داشتند. از سوی دیگر، ۲٤ بیمار (۲٤/٤٪) در بررسی هیستوپاتولوژی دارای مقداری اسپرم در بافت بیضه بودند (Score:8,9)؛ ولی همان طور که انتظار می‌رفت، اسپرماتوژنز کامل و بدون نقص (Score:10) در هیچ یک از بیماران مشاهده نشد (شکل شماره ۱).

بیان ژن SYCP3 در نمونه‌های بیضه: بیان ژن SYCP3 در نمونه بیضه ٦۷ بیمار (٦۰/۹٪) قابل تشخیص بود که از این تعداد ۲۱ بیمار (۱۹/۱٪) حداکثر بیان ژن را با پاسخ مثبت در هر دو PCR انجام شده داشتند. ٦ و ۱۲ بیمار هم بیان ژن را به صورت خفیف و متوسط و ۲۸ بیمار بیان قوی را در PCR دوم نشان می‌دادند. سطح سرمی FSH و LH در بیماران فاقد بیان ژن SYCP3 به طور معنی‌داری بالاتر و اندازه بیضه در این گروه کوچکتر از گروه دیگر بود. آنالیز کوواریانس انجام شده نشان داد که این تفاوت معنی‌دار ناشی از بیان یا عدم بیان ژن نبوده است (جدول شماره ۳). در مجموع



شکل ۱- هیستوپاتولوژی بافت بیضه با رنگ‌آمیزی H&E (200×). I: سندرم سلول‌های سرتولی؛ II: توقف در مرحله اسپرماتوگونی؛ III: توقف اسپرماتوژنز؛ IV: هیپواسپرماتوژنز

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲- نتایج PCR ژن SYCP3 برروی ژل آگاروز ۱/۵٪ با رنگ آمیزی با بروماید اتیدیوم. 1,2: بیماران دچار سندرم سلول‌های سرتولی و بیماران بدون سلول؛ 3: بیماران دچار توقف در مرحله اسپرماتوگونی؛ 4-7: بیماران دچار توقف اسپرماتوژنزیس؛ 8,9: بیماران دارای هیپواسپرماتوژنزیس؛ 10 : کنترل منفی (آب). PGM1 به عنوان کنترل مثبت به کار رفته است. a: *PGM1* ، b: SYCP3 first PCR ، c: second PCR SYCP3.

۱۶ بیمار سابقه خانوادگی ناباروری با علت مردانه داشتند که پنج نفر از آنها از نظر بیان ژن منفی بودند. با این حال، رابطه معنی‌داری بین سابقه خانوادگی و بیان ژن مشاهده نشد.

بیماران دارای هیپواسپرماتوژنز (Score:8-9): از ۲۴ بیماری که در بررسی بیوپسی بیضه اسپرم داشتند، ۷ نفر کاهش مختصر تعداد اسپرم‌ها و ۱۷ نفر کاهش واضح اسپرمها را داشتند. اما در تمامی این بیماران ژن SYCP3 بیان شده بود.

بیماران دچار توقف اسپرماتوژنز (Score:4-7): ۳۸ بیمار دچار آتروفی بیضه‌ها به همراه توقف اسپرماتوژنز در یکی از مراحل اسپرماتوسیت یا اسپرماتید بودند.

جدول ۲- شاخصهای دموگرافیک بیماران آزواسپرم مورد مطالعه در مراجعه‌کنندگان به مرکز درمان ناباروری و سقط مکرر ابن‌سینا، ۸۴-۱۳۸۳

متغیر	میانگین	حدود اعتماد ۹۵٪
سن *(سال)*	۳۵/٤	۳٤/۱ -۳٦/۷
مدت ناباروری *(سال)*	۷/۹	٦/۸-۸/۹
سابقه فامیلی ناباروری با علت مردانه	۱٦	---
اندازه بیضه *(سانتی متر)*	۱۰/۸	۹/٦-۱۲/۱
سطح سرمی FSH *(IU/L)*	۲۱/۲	۱۷/۳-۲۵/۲
سطح سرمی LH*(IU/L)*	۱۰/۲	۸/۱-۱۲/٤
سطح سرمی تستوسترون *(ng/ml)*	۵/۸	٤/۵-۷/۱
حجم مایع منی *(ml)*	۲/٤	۲/۰-۲/۷
PH مایع منی	۷/۳٦	۷/۲۸-۷/٤۵
فروکتوز موجود در مایع منی *(ng/dl)*	۲٤۷	۲٤۷/۱-۳۰۱/۰

SYCP3 در تمامی این بیماران به جز دو مورد که تعداد کمی اسپرماتوسیت داشتند، بیان شده بود.

بیماران دچار توقف در مرحله اسپرماتوگونی (Score:3): در هیچ یک از دو بیمار مورد بررسی در این گروه، ژن SYCP3 بیان نشده بود.

بیماران دچار سندرم سلول‌های سرتولی و بیماران بدون سلول (Score: 1-2): بیان ژن SYCP3 در هیچ کدام از بیماران دچار سندرم سلول‌های سرتولی (SCO) و نیز بیماران فاقد سلول‌های سرتولی و ژرمینال قابل مشاهده نبود. این یافته‌ها نشان دهنده این است که بیان SYCP3 منحصر به سلول‌های ژرمینال است (شکل شماره ۲).

جدول ۳- رابطه بیان SYCP3 با اندازه بیضه و سطح سرمی FSH و LH در مردان مبتلا به آزواسپرمی مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری و سقط مکرر ابن‌سینا، ۸۴-۱۳۸۳

متغیر (میانگین)	SYCP3				P-value		
	مثبت	فاصله اطمینان ۹۵٪	منفی	فاصله اطمینان ۹۵٪	t-test	ANCOVA1[a]	ANCOVA2[b]
سطح سرمی FSH	۱۲/۳	(۸/٤-۱٦/۲)	۳٤/۱	(۲۷/۳-٤۱)	<۰/۰۰۰۱	۰/۰٤۵	۰/۳۳
سطح سرمی LH	٦/٤	(۵-۷/۹)	۱٦/۱	(۱۱/٦-۲۰/۵)	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۵	۰/٤۰
اندازه بیضه	۱۳/٤	(۱۱/۳-۱۵/۵)	۷	(۵/۵-۸/۵)	<۰/۰۰۰۱	۰/۳۲	۰/۵۵

a : آنالیز کوواریانس پس از همسان سازی سن، مدت ناباروری، سابقه خانوادگی ناباروری مردان، سابقه هر گونه اختلال تکاملی یا پاتولوژیک بیضه‌ها، نتایج معاینه بالینی بیضه‌ها، سطح سرمی هورمون‌های FSH , LH و تستوسترون. b: آنالیزکوواریانس پس از همسان سازی فاکتورهای بالا به همراه امتیاز Holstein .

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

پیشرفت تحقیقات و گسترش کاربرد روش‌های مولکولی در تشخیص و درمان علل ناباروری نشان می‌دهد که علت بسیاری از موارد ناباروری با علت ناشناخته[1] ناشی از اختلالات ژنتیکی و کروموزومی می‌باشد که با پیشرفت علم پزشکی این علل شناسایی می‌گردد و همواره از میزان موارد نابارور با علت ناشناخته کاسته می‌شود. تعدادی از مطالعات نشان داده‌اند که بروز مشکل در ژنها می‌تواند باعث اختلال در روند اسپرماتوژنز و به دنبال آن ناباروری شود. علی‌رغم این که کروموزوم Y تعداد زیادی از ژن‌های مورد نیاز در اسپرماتوژنز در خود دارد، ژن‌های اتوزومال نیز در این فرآیند دخیل می‌باشند (۱). ژن SYCP3 که بر روی کروموزوم ۱۲ قرار دارد، منجر به تولید پروتئینی می‌شود که به عنوان ساختار اصلی کمپلکس‌های Synaptonemal عمل می‌کند و باعث جفت شدن کروموزوم‌های همولوگ در جریان میوز می‌گردد (۳). فقدان ژن SYCP3 در موش باعث ناباروری در جنس نر و کاهش باروری در جنس ماده می‌شود (۱و۱۵). به نظر می‌رسد که ژن SYCP3 به عنوان یک ژن اختصاصی سلول‌های ژرمینال در روند باروری مردان مؤثر باشد. Miyamoto و همکاران در سال ۲۰۰۳ نمونه‌های خون ۱۹ بیمار دچار آزواسپرمی را از نظر وجود موتاسیون در ژن SYCP3 بررسی و در یک باز (643delA) حذف شدگی[2] را پیدا کردند. این مطالعه پیشنهاد داد که SYCP3 می‌تواند به عنوان یک لوکوس مورد نیاز برای تکمیل اسپرماتوژنز مطرح باشد (۱۷).

این مطالعه از اولین مطالعاتی است که برای بررسی بیان mRNA ژن SYCP3 در 110 بیمار مرد دچار ناباروری با علت ناشناخته انجام شده است. در این مطالعه، از RT-PCR نیمه کمی به صورت nested به منظور تعیین شدت بیان ژن استفاده شد و بوسیله امتیازدهی هیستوپاتولوژی، مرحله‌ای از اسپرماتوژنز که در آن SYCP3 بیان می‌شود، تعیین گردید. بر این اساس، SYCP3 در تمامی ۲٤ بیمار با اسپرماتوژنز طبیعی بیان شد. بیان این ژن در مردان دچار آزواسپرمی با میزان اختلال در اسپرماتوژنز ارتباط داشت. SYCP3 در نمونه‌های بیضه با تشخیص توقف بلوغ[3] بیان شده ولی در ۳٦ بیمار دچار توقف در سطح اسپرماتوگونی یا سندرم سلول‌های سرتولی بیان نشده بود و لذا به نظر می‌رسد بیان این ژن، به عنوان ژن ویژه فرآیند اسپرماتوژنز در سطح اسپرماتوسیت‌های اولیه آغاز شود.

در مطالعه هیستوپاتولوژی نمونه‌های دو بیمار بدون بیان ژن SYCP3، تعداد بسیار کمی اسپرماتوسیت اولیه مشاهده شد (Score:4) که می‌تواند نشان‌دهنده آن باشد که بیان ژن در مرحله خاصی از میوز و تولید اسپرماتوسیتها آغاز می‌شود. در موش، پروتئین‌های کمپلکس Synaptonemal از پروفاز I قابل مشاهده هستند (۱۳، ٦، ۳). تخریب ژن SYCP3 نیز باعث اختلال در ساخت اجزای محوری و مرگ سلول‌های اسپرماتوسیت موتانت در خلال زیگوتن می‌شود (۳). همچنین گزارش یک مورد انسانی در زمینه اثرات فقدان پروتئین SYCP3 موجود است. Judis و همکاران، بیماری را گزارش کردند که دچار آزواسپرمی با علت ناشناخته بود و در بررسی انجام شده، توقف اسپرماتوژنز در مرحله پاکی‌تن I به همراه اختلال در تولید کمپلکس‌های Synaptonemal داشته است (١٦). بنابراین، در دو بیمار فوق علیرغم فقدان ژن SYCP3 و مشاهدهٔ تعداد محدودی اسپرماتوسیت، توقف اسپرماتوژنز می‌تواند در مراحل زودتر از پاکی‌تن I اتفاق افتاده باشد. به هر حال، مطالعات بعدی از جمله

1- Unexplained
2- Deletion
3- Maturation Arrest

Archive of SID
www.SID.ir

استفاده از ایمنوهیستوشیمی می‌تواند مرحله دقیق میوز که SYCP3 بر آن اثر می‌گذارد را مشخص نماید.
در بیمارانی که بیان ژن SYCP3 نداشتند، به طور معنی‌داری سطح سرمی FSH و LH افزایش و اندازه بیضه کاهش یافته بود. آنالیز کوواریانس در این گروه نشان داد که این یافته احتمالاً در اثر عوامل دیگری به جز SYCP3، مانند فقدان سلول‌های ژرمینال و آزواسپرمی، می‌باشد. در توبول‌های سمینیفروس، تنها سلول‌های سرتولی برای هورمون‌های تستوسترون و FSH، دارای گیرنده می‌باشد (۲۰-۲۳) که FSH مسؤول کنترل تکثیر سلول‌های سرتولی در دوران جنینی و بلوغ بوده و لذا می‌تواند به عنوان شاخص توانایی اسپرماتوژنز در بزرگسالان نیز به کار رود (۲٤). ترشح FSH از هیپوفیز، توسط مهارکننده Inhibin B آزاد شده از بیضه‌ها کنترل می‌گردد. بنابراین، افزایش سطح سرمی FSH در بیماران با سطح پائین‌تری از اسپرماتوگونی، می‌تواند به علت مقدار ناکافی Inhibin B و یا نقص سلول‌های سرتولی باشد (۲۳و۲۵). از سوی دیگر، اثرات هورمون LH از طریق تولید تستوسترون توسط سلول‌های لیدیگ در بیضه ایجاد شده که خود این سلولها باعث تنظیم ترشح LH از هیپوفیز نیز می‌شوند (۲۰). افزایش همزمان سطح سرمی FSH و LH معمولاً در مواردی دیده می‌شود که تخریب و اختلال در بافت بیضه هم روی توبول‌های حاوی سلول‌های ژرمینال و سرتولی و هم روی عملکرد آندروژنی بیضه صورت گرفته باشد (۲٦).
ژن SYCP3 در ٥ بیمار از ١٦ بیماری که سابقه ناباروری با علت مردانه در بستگان درجه اول داشتند، بیان نشده بود. اگرچه در این مطالعه، رابطه بیان ژن و سابقه فامیلی معنادار نبود، با این حال در این بیماران ژن فوق می‌تواند عامل ناباروری باشد. مطالعات تکمیلی در مورد ارتباط بیان ژن SYCP3 در موارد ناباروری خانوادگی توسط این گروه طراحی شده و در حال اجرا می‌باشد.

نتیجه‌گیری

مطالعات متعددی نشان داده است که‌روش‌های مولکولی می‌توانند به عنوان ابزار مفیدی در ارزیابی اختلالات اسپرماتوژنز و پیش‌بینی وجود اسپرم در بیضه مردان دچار آزواسپرمی غیرانسدادی به کار روند (۲۹،۲۷). این بررسی، SYCP3 را به عنوان یک مارکر مولکولی بالقوه برای اسپرماتوژنز معرفی می‌نماید؛ چرا که بیان آن در بیضه با مراحل پیشرفت اسپرماتوژنز ارتباط مشخصی دارد. RT-PCR نیمه کمی به روش nested، روش مناسبی برای بررسی بیان ژن در بیضه می‌باشد. این روش همچنین برای تشخیص نمونه‌های بافت بیضه که حاوی اسپرماتوسیت، اسپرماتید یا اسپرم هستند و افتراق آنها از نمونه‌های حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی و یا سرتولی مفید است.
نتایج این مطالعه، دانش کنونی ما درباره مبانی مولکولی توقف زودهنگام میوز را به عنوان یکی از علت‌های آزواسپرمی غیرانسدادی افزایش می‌دهد. به هر صورت، مطالعات کاملتری برای یافتن موتاسیون‌های ژن SYCP3 در جمعیت مورد مطالعه ما مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از زحمات فراوان سرکار خانم جمیله قاسمی و سرکار خانم معصومه بلورزاده از پژوهشکده ابن‌سینا به دلیل همکاری فراوان در فرایند نمونه‌گیری از بیماران قدردانی می‌کنند. این مطالعه به صورت طرح مشترک پژوهشکدهٔ فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا و شبکه پزشکی مولکولی وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی به شمارهٔ ٥١٢٩پم تأمین اعتبار شد.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1- Yuan L., Liu J.G., Zhao J., Brundell E., Daneholt B. Hoog C. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. Mol Cell.2000;5(1):73-83.

2- Dym M. Spermatogonial stem cells of the testis. Proc Natl Acad Sci USA.1994;91(24):11287-9.

3- Foley G.L., Overview of male reproductive pathology. Toxicol Pathol.2001;29(1):49-63.

4- Parra M.T., Viera A., Gomez R., Page J., Benavente R., Santos J.L., et al., Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I. J Cell Sci.2004;117(Pt7): 1221-34.

5- Eijpe M., Offenberg H., Goedecke W., Heyting C. Localisation of RAD50 and MRE11 in spermatocyte nuclei of mouse and rat. Chromosoma.2000;109(1-2):123-32.

6- Meuwissen R.L., Offenberg H.H., Dietrich A.J., Riesewijk A., Van Iersel M. Heyting C. A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. Embo J.1992;11(13):5091-100.

7- Dobson M.J., Pearlman R.E., Karaiskakis A., Spyropoulos B., Moens P.B.Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. J Cell Sci.1994;107(Pt 10):2749-60.

8- Lammers J.H., Offenberg H.H., Van Aalderen M., Vink A.C., Dietrich A.J., Heyting C. The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. Mol Cell Biol.1994;14 (2):1137-46.

9- Offenberg H.H., Schalk J.A., Meuwissen R.L., Van Aalderen M., Kester H.A., Dietrich A.J., et al., SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. Nucleic Acids Res. 1998;26(11):2572-9.

10- Yuan L., Pelttari J., Brundell E., Bjorkroth B., Zhao J., Liu J.G., et al. The synaptonemal complex protein SCP3 can form multistranded, cross-striated fibers in vivo. J Cell Biol.1998;142(2):331-9.

11- Liebe B., Alsheimer M., Hoog C., Benavente R., Scherthan H. Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing, and bouquet stage duration are modified in spermatocytes lacking axial elements. Mol Biol Cell.2004;15(2):827-37.

12- Wang P., McCarrey J.R., Yang F., Page D.C. An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. Nat Genet.2001;27(4):422-26.

13- Yuan L., Liu J.G., Hoja M.R., Wilbertz J., Nordqvist K., Hoog C. Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. Science.2002;296(5570):1115-8.

14- Matzuk M.M., Lamb D.J. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. Nat Cell Biol.2002;(4Suppl): 41-9.

15- Seshagiri P.B. Molecular insights into the causes of male infertility. J Biosci.2001;26(4 Suppl):429-35.

16- Judis L., Chan E.R., Schwartz S., Seftel A., Hassold T. Meiosis I arrest and azoospermia in an infertile male explained by failure of formation of a component of the synaptonemal complex. Fertil Steril.2004;81(1): 205-9.

17- Miyamoto T., Hasuike S., Yogev L., Maduro M.R., Ishikawa M., Westphal H., et al. Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. Lancet. 2003;362(9397):1714-9.

18- Niemeyer P., Tureci O., Eberle T., Graf N., Pfreundschuh M., Sahin U. Expression of serologically identified tumor antigens in acute leukemias. Leuk Res. 2003;27(7):655-60.

19- Holstein A.F., Schulze W., Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. Reprod Biol Endocrinol.2003;1:107.

20- Handelsman D.J., Spaliviero J.A., Simpson J.M., Allan C.M., Singh J., Spermatogenesis without gonadotropins: maintenance has a lower testosterone threshold than initiation. Endocrinology.1999;140(9): 3938-46.

21- Walker W.H., Cheng J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. Reproduction.2005;130(1): 15-28.

22- Silva F.R., Leite L.D., Wassermann G.F., Rapid signal transduction in Sertoli cells. Eur J Endocrinol.2002; 147(3):425-33.

23- Steger K., Rey R., Louis F., Kliesch S., Behre H.M., Nieschlag E., et al. Reversion of the differentiated phenotype and maturation block in Sertoli cells in pathological human testis. Hum Reprod.1999;14(1): 136-43.

24- De Gendt K., Swinnen J.V., Saunders P.T., Schoonjans L., Dewerchin M., Devos A., et al. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. Proc Natl Acad Sci USA.2004;101(5):1327-32.

25- Anawalt B.D., Bebb R.A., Matsumoto A.M., Groome N.P., Illingworth P.J., McNeilly A.S., et al. Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal

Archive of SID
www.SID.ir

men and men with testicular dysfunction. J Clin Endocrinol Metab.1996;81(9):3341-5.

26- Sokol R.Z., Swerdloff R.S., Endocrine Evaluation, in L. Lipshultz and S. Howards, Editors. Infertility in the Male: Mosby.1997;p:210-218.

27- Schrader M., Muller M., Schulze W., Heicappell R., Krause H., Straub B., et al. Quantification of the expression level of the gene encoding the catalytic subunit of telomerase in testicular tissue specimens predicts successful sperm recovery. Hum Reprod.2002;17(1): 150-6.

28- Weikert S., Schrader M., Muller M., Schulze W., Krause H., Miller K. Expression levels of the inhibitor of apoptosis survivin in testes of patients with normal spermatogenesis and spermatogenic failure. Fertil Steril.2005;83 (Suppl 1):1100-5.

29- Song G.J., Lee H., Park Y., Lee H.J., Lee Y.S., Seo J.T., et al. Expression pattern of germ cell-specific genes in the testis of patients with nonobstructive azoospermia: usefulness as a molecular marker to predict the presence of testicular sperm. Fertil Steril.2000;73 (6):1104-8.

Archive of SID

www.SID.ir