بیان ژن Testis Specific Gene 10 در بافت بیضه بیماران دچار آزواسپرمی غیرانسدادی

محمود اعرابی (M.D.)[1]، هاله سلطان قرایی (M.D.)[2,1]، ناصر امیرجنتی (M.D.)[1,2]، معرفت غفاری نوین (M.D., Ph.D.)[1,2]، محمدرضا صادقی (Ph.D.)[1,3]، محمدمهدی آخوندی (Ph.D.)[1,2]، محمدحسین مدرسی (M.D., Ph.D.)[5,4,1]

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

۲- مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری و سقط مکرر ابن‌سینا، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران.

۳ـ مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران.

٤ـ مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی زیستی، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران.

۵ـ گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: اختلال در بیان هر یک از ژن‌های مؤثر در مسیر اسپرماتوژنز به عنوان یکی از عوامل احتمالی ایجاد آزواسپرمی غیرانسدادی و ناباروری مردان مطرح می‌باشد. در این میان نحوه بیان ژن‌های مؤثر در توانایی حرکت اسپرم نیز می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر باروری مردان داشته باشد. مطالعات اخیر نشان می‌دهد ژن TSGA10 در انجام روند طبیعی اسپرماتوژنز مؤثر می‌باشد، به طوری که پروتئین حاصل از این ژن در موش منجر به تشکیل ساختار اصلی دم اسپرم می‌شود. تاکنون مطالعه گسترده‌ای درباره نحوه بیان ژن در بافت بیضه مردان نابارور انجام نشده است.

روش بررسی: در این مطالعه، بیان mRNA ژن TSGA10 در بافت بیضه ۸٤ مرد مبتلا به آزواسپرمی مراجعه‌کننده به مرکز درمان ناباروری ابن‌سینا در سال‌های ۸٤-۱۳۸۳ به روش Semi-quantitative Nested RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. همچنین با هدف تعیین اثر بیان ژن فوق در پیشرفت اسپرماتوژنز، بررسی و امتیازدهی هیستوپاتولوژی براساس روش Johnsen در نمونه‌ها صورت گرفت. برای آنالیز آماری از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۱/۲ استفاده شد. تفاوت بین بیان ژن براساس متغیرهای کمی با استفاده از آزمون‌های t و آنالیز کوواریانس بررسی و $\alpha<0/05$ به عنوان سطح معنی‌دار آماری در نظر گرفته شد.

نتایج: بیان mRNA ژن TSGA10 در بافت بیضه ۳۱ بیمار دارای آزواسپرمی غیرانسدادی (۳٦/۹٪) مشاهده شد و رابطه معنی‌داری با میزان پیشرفت اسپرماتوژنز داشت ($p<0/001$). از نظر هیستوپاتولوژی، ژن در بیماران دارای امتیاز بالای Johnsen بیان شده بود، در حالی که در نمونه‌های بیماران با امتیاز کمتر از ٤/۵، عدم بیان وجود داشت.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که ژن TSGA10 در بیضه بیان شده و مختص سلول‌های جنسی می‌باشد. به نظر می‌رسد عدم بیان ژن در بیضه بتواند تأثیر منفی در اسپرماتوژنز و باروری مردان داشته باشد. از سوی دیگر، تعیین زمان شروع یا خاتمه بیان ژن در مرحله خاصی از اسپرماتوژنز، امکان استفاده از آن به منظور تعیین پیشرفت اسپرماتوژنز در کنار یافته‌های پاتولوژی را میسر می‌سازد.

کلید واژگان: ناباروری مردان، اسپرماتوژنز، Testis Specific Gene 10 (TSGA10)، بیوپسی بیضه، آزواسپرمی.

مسئول مکاتبه: دکتر محمدحسین مدرسی، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران، ایران

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

Archive of SID

www.SID.ir

زمینه و هدف

حدود ۱۵-۱۰٪ زوجها در سراسر دنیا از مشکل ناباروری رنج می‌برند که نیمی از آنها را مردان نابارور تشکیل می‌دهند (۱). اگرچه برخی از موارد ناباروری مردان با علل شناخته شده‌ای مثل مشکلات مجاری تناسلی یا اختلالات هورمونی قابل توجیه هستند، ولی موارد بسیاری نیز همچنان ناشناخته می‌باشند. از علل اصلی ناباروری در مردان کاهش تعداد اسپرم، کاهش اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی یا اسپرم‌های فاقد حرکت پیشرونده می‌باشد. علل اولیگواسپرمی یا آزواسپرمی می‌تواند متنوع باشد؛ اما گروه مهمی از عوامل آن شامل اختلالات ژنتیکی است که باعث اشکال در روند باروری مردان می‌شود. تعداد زیادی از ژن‌های مختلف مربوط به تقسیم و تمایز سلولی، در سلول‌های ژرمینال بیضه بیان می‌شوند و اختلال در آنها در گزارش‌های مختلف به عنوان عامل ناباروری مردان ذکر شده است (۲).

بیضه به عنوان یک غده با دو کارکرد در نظر گرفته می‌شود: اول ترشحات اندوکرین و اگزوکرین توسط سلول‌های سوماتیک آن است که منجر به تشکیل اجزای مایع منی و تستوسترون می‌گردد. کارکرد دوم شامل بلوغ سلول‌های جنسی و تولید اسپرم می‌باشد که به عنوان اسپرماتوژنز نامیده می‌شود. این عملکرد نیازمند ارتباط صحیح سلول‌های ژرمینال با سلول‌های سوماتیک هم می‌باشد (۳). به نظر می‌رسد اختلال و موتاسیون هریک از ژن‌های مؤثر در اسپرماتوژنز یا اسپرمیوژنز، بتواند باعث ناباروری مردان شود.

یکی از مشکلات اصلی در مردان نابارور، کاهش تعداد اسپرم طبیعی و یا توانایی حرکت اسپرمها می‌باشد. درحال حاضر علی‌رغم اهمیت حرکت اسپرم در فرآیند تولیدمثل، اطلاعات محدودی درباره مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با ساختار و کارکرد حرکتی اسپرم دردست می‌باشد. روش‌های جدید درمان ناباروری همچون ICSI[1]، امروزه نقش مشکلات حرکتی اسپرم را بسیار کم کرده و گاهی به راحتی از آن عبور می‌کند. با این حال باید توجه داشت، استفاده از این روشها می‌تواند باعث حل مشکل باروری شود؛ ولی از سوی دیگر خطر انتقال مشکلات ژنتیکی مرتبط به نسل آینده همچنان وجود خواهد داشت (٤)، به ویژه آن که برخی از اختلالات حرکتی اسپرم، قابل درمان و حتی ریشه کنی با استفاده از روش‌های ژن درمانی می‌باشد (٤). از سوی دیگر اطلاع از نحوه کارکرد دم اسپرم به عنوان بخش حرکتی سلول‌های جنسی مردانه، می‌تواند به استفاده از پروتئینها یا عوامل مولکولی دیگر به عنوان روش‌های پیشگیری از بارداری در مردان نیز منجر شود.

تاکنون عوامل ژنتیکی مختلفی به عنوان عامل مؤثر در اختلال حرکتی اسپرم مطرح شده‌اند. یکی از این بیماریها، سندرم کارتاژنر[2] است که به عنوان بیماری اتوزومال مغلوب با اختلال عمومی[3] در سلول‌های مژکدار بدن از جمله اسپرم و مسیرهای تنفسی شناخته می‌شود. تاکنون سه ژن مؤثر در ساختمان آکسونم به عنوان عوامل مولکولی این بیماری شناخته شده‌اند و به نظر می‌رسد همچنان ژن‌های دیگری در این بیماری مؤثر باشند (٥).

در بیماران دچار دیسپلازی غلاف فیبری اسپرم (DFS)[4] نیز ناباروری به صورت آستنوزواسپرمی شدید یا کامل مشاهده می‌شود. در مطالعات انجام شده، اختلال برخی از اعضای خانواده ژن‌های AKAP به عنوان عامل مولکولی احتمالی در این بیماری مطرح شده‌اند؛ ولی هنوز پروتئین یا ژن مشخصی در این‌باره شناسایی نشده است (٦).

مطالعات انجام شده درباره علل مولکولی اختلال حرکت

1- Intra Cytoplasmic Sperm Injection
2- Kartagener
3- Generalized
4- Dysplasia of the Fibrous Sheath

Archive of SID
www.SID.ir

اسپرم در سال‌های اخیر، اجازه بررسی ژنها و پروتئینها مؤثر در تولید اسپرم سالم را به محققان داده است. ژنها و پروتئین‌های مربوط به ساختار اسپرم، سیگنال‌های کلسیمی، فسفوریلاسیون پروتئینی، متابولیسم و ... هر یک می‌توانند در کارکرد طبیعی اسپرم مؤثر باشند. در قطعه میانی دم اسپرم، آکسونم توسط ۹ فیبر فشرده خارجی (ODF)[1] احاطه شده و با غلاف میتوکندریال در برگرفته می‌شود. در قطعه انتهایی که پس از قطعه میانی قرار گرفته است، این غلاف میتوکندریال به وسیلهٔ غلاف فیبری (FS)[2] جایگزین می‌گردد. در FS، دو عدد از ODF بوسیلهٔ قطعات طولی جایگزین می‌شود که این قطعات توسط طناب‌های عرضی به هم وصل می‌شوند (۷). مطالعات انجام شده، احتمال نقش مهم FS در ساختار، متابولیسم و توانایی حرکت اسپرم را مطرح ساخته است. پروتئین‌های زیادی در FS شناخته شده‌اند که هنوز کارکرد آنها مشخص نشده است.

ژن TSGA10 اخیراً به عنوان یک ژن جدید در فرآیند اسپرماتوژنز توسط این گروه معرفی شده است. این ژن بر روی ناحیه q11.2 کروموزوم شماره ۲ قرار گرفته و شامل ۱۹ اگزون با اندازه RNA تقریبی ۳Kb می‌باشد (۸). ژن TSGA10 در انسان، در بیضه طبیعی بیان می‌شود؛ اما در سایر بافتها و نیز بیضه جنین و بیماران دچار آزواسپرمی غیرانسدادی بیان نمی‌گردد (۹). مطالعات انجام شده در موش نشان داده است که mRNA این ژن در فاز بعد از میوز[3] بیان شده و منجر به تشکیل پروتئین اصلی به کار رفته در FS به اندازه ۶۵kD می‌شود. قبلاً نشان داده شده است که این پروتئین در سلول‌های ژرمینال شکسته می‌شود و قطعه کوچکتر ۲۷kD در ساختمان FS به کار می‌رود (۱۰)؛ اما تاکنون مطالعه گسترده‌ای درباره نحوه بیان ژن انسانی در بیضه انجام نشده است.

به منظور مطالعه میزان بیان ژن TSGA10 در تعداد مناسبی از جمعیت بیماران نابارور، این مطالعه برای اولین بار ۸۴ مرد مبتلا به آزواسپرمی را به روش Semi-quantitative Nested RT-PCR مورد بررسی قرار داد. همچنین با هدف تعیین اثر بیان ژن فوق در پیشرفت اسپرماتوژنز، بررسی و امتیازدهی هیستوپاتولوژیک در کلیه نمونه‌ها صورت گرفت.

روش بررسی

بیماران: نمونه بیوپسی از ۸۴ مرد نابارور که در مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری و سقط مکرر ابن‌سینا در سال‌های ۸۴-۱۳۸۳ تحت بیوپسی بیضه (TESE)[4] به منظور ارزیابی وجود اسپرماتوژنز در بافت بیضه قرار گرفته بودند، اخذ شد. معیار ورود به مطالعه، تشخیص آزواسپرمی براساس آنالیز مایع منی و عدم استحصال اسپرم از اپی‌دیدیم (PESA) بود. اندازه تقریبی نمونه‌ها *mm* ۲×۲×۲ بود و در دمای ℃ ۷۰- ذخیره شد. اطلاعات بیماران شامل سن، سابقه خانوادگی ناباروری، سابقه هرگونه اختلال تکاملی یا پاتولوژیک بیضه‌ها، نتایج معاینه بالینی بیضه‌ها (محل، قوام، اندازه بیضه و وجود واریکوسل)، سطح سرمی هورمون‌های FSH، LH و تستوسترون و نیز شاخص‌های آنالیز مایع منی هم براساس اطلاعات پرونده‌های بیماران جمع‌آوری شد. برای مطالعه بافتها و انجام آزمایشات، موافقت کمیته اخلاق پزشکی پژوهشکده ابن‌سینا اخذ شد و کلیه بیماران قبل از نمونه‌گیری، رضایتنامه کتبی طرح را آگاهانه امضا کردند.

استخراج RNA و انجام RT-PCR: RNA نمونه‌های بیضه با استفاده از Trizol (Invitrogen Inc USA) و براساس

1- Outer Dense Fibers
2- Fibrous Sheath
3- Postmeiotic
4- Testicular Sperm Extraction

Archive of SID
www.SID.ir

دستورالعمل سازنده، استخراج و برای اقدامات بعدی در ۷۰ ℃- ذخیره شد. ارزیابی کمی RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر (Eppendorf, Germany) و جذب تابش‌های UV با طول موج *nm* 260/280 صورت گرفت. میزان متوسط جذب نوری (OD) در طول موج *nm* 260/280 در نمونه‌ها ۱/۷۸ (۱/۸۴- ۱/۷۳ CI:۹۵٪) بود. معادل *mg*۳ از RNA به دست آمده به همراه *µl*۲ از dNTP و *µl*۱ از پرایمر Random Hexamer به مدت ۸ دقیقه در دمای ۷۰ ℃ دناتوره شده[1] و واکنش تهیه cDNA از mRNA در حضور آنزیم M-MLV و RNAse Inhibitor (Roche, Germa-ny) صورت گرفت. کیفیت cDNA حاصل با استفاده از پرایمرهای (5′TCC GACTGAGCGGCACTGGGAGTGC3′) از اگزون ۱۰ و(5′GCC CGC AGG TCC TCT TTC CCT CAC A3′) از اگزون 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 ۲۰ ℃- ذخیره شدند.

TSGA10 PCR: PCR نیمه کمی به روش nested با استفاده از *µl*۱ از cDNA و آنزیم DNA پلی‌مراز در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) انجام شد. تکثیر cDNA در مرحله اول در ۳۵ سیکل (۳۰ ثانیه در ۹۴ ℃، ۳۰ ثانیه در ۵۹ ℃ و ۸۰ ثانیه در ۷۲ ℃) صورت گرفت. در مرحله دوم PCR در ۳۰ سیکل (۳۰ ثانیه در ۹۴ ℃، ۳۰ ثانیه در ۵۶ ℃ و ۳۰ ثانیه در ۷۲ ℃) صورت گرفت. شکل ۱، توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تعیین بیان ژن TSGA10 را نشان می‌دهد. محصولات PCR در ژل آگاروز ۱/۵٪ مورد بررسی قرار گرفت و پس از رنگ‌آمیزی با بروماید اتیدیوم، تحت اشعه UV مشاهده شد. نتایج به صورت منفی و مثبت در نظر گرفته شده و موارد مثبت به دسته‌های +۱ تا +۳ براساس شدت باند PCR و +۴ در صورت بیان قوی و

شکل ۱- توالی پرایمرهای طراحی شده در *TSGA10* nested PCR (شماره ها نشان دهنده اولین یا دومین PCR می باشند، F: Forward, R: Reverse)

***TSGA10*(F1)**	5'-ATGATGCGAAGTAGGTC-3'
***TSGA10* (R1)**	5'-CAGAAATCTCTGTAGCAAAG-3'
***TSGA10* (F2)**	5'-CAAGACGCCCATCACCAACTGCC-3'
***TSGA10* (R2)**	5'-GAGAATAGCSTGTGCCGTTG-3'

وجود باند در هر دومرحله nested PCR تقسیم شدند.

بررسی هیستوپاتولوژی: نمونه‌های تمام بیماران در داخل محلول ثابت کننده Bouin قرار داده شده و به آزمایشگاه پاتولوژی مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری و سقط مکرر ابن‌سینا منتقل شد. پس از انجام فرآیندهای آماده‌سازی، لام‌های تهیه شده با هماتوکسیلین و ائوزین (H & E) رنگ‌آمیزی شد. به منظور تعیین مرحله‌ای از اسپرماتوژنز که در آن ژن TSGA10 بیان می‌شود، تمامی لامها توسط متخصص پاتولوژی مجرب بررسی و براساس تقسیم‌بندی Johnsen امتیازدهی شد (۱۱).

آنالیز آماری: از نرم افزار SPSS نسخهٔ ۱۱/۲ و Microsoft Excel برای ثبت داده‌ها و آنالیز آماری استفاده شد. تفاوت بین بیان ژن براساس متغیرهای کمی با استفاده از آزمون‌های t و آنالیز کوواریانس بررسی و $\alpha<0/05$ به عنوان سطح معنی‌دار آماری در نظر گرفته شد.

نتایج

نمونه‌های بیضه حاصل از ۸۴ بیمار نابارور دارای آزواسپرمی غیرانسدادی با استفاده از RT-PCR نیمه کمی به منظور مشاهده میزان بیان ژن TSGA10 بررسی شد (جدول ۱).

هیستوپاتولوژی نمونه‌های بیضه: در بررسی هیستوپاتولوژی بیضه در ۴۰ بیمار (۴۷/۶٪)، هیچ یک از سلول‌های ژرمینال مشاهده نشد (JohnsenScore:۱-۲). توقف در یکی از مراحل تقسیم میوز در ۲۷ بیمار (۳۲/۲٪) دیده شد؛ که عمدتاً شامل توقف در هریک از سطوح اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه و

1- Denaturated

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- شاخصهای دموگرافیک بیماران دچار آزواسپرمی غیرانسدادی مراجعه‌کننده به مرکز درمان ناباروری و سقط مکرر ابن‌سینا، ۸۴-۱۳۸۳ (CI: Confidence Interval).

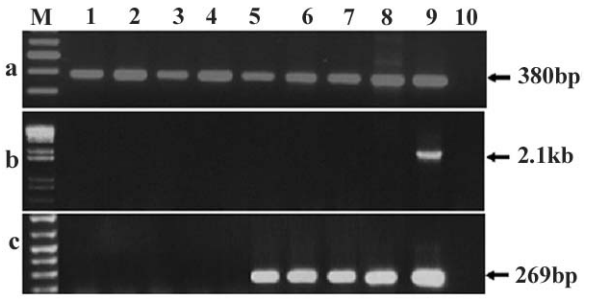
سن *(سال)*، میانگین (95% CI)			۳۵/٤ (۳۳/۹ -۳٦/۹)
مدت ناباروری *(سال)*، میانگین (95% CI)			۷/۹ (٦/۷-۹/۱)
سابقه فامیلی ناباروری مردان			۱٤(٪۱٦/۷)
سابقه مشکلات تکاملی بیضه	کریپتورکیدیسم		۹(٪۱۰/۷)
	ژنیکوماستی		۱(٪۱/۲)
معاینه بیضه	اندازه *(cm)*، میانگین (95% CI)		۱۱/۰(۹/۵-۱۲/۵)
	قوام	نرمال	۵۲(٪٦۱/۹)
		نیمه نرم	۱٦(٪۱۹/۰)
		کاملاً نرم	۱۵(٪۱۷/۹)
سطح سرمی FSH *(IU/L)*، میانگین(95% CI)			۲۱/۸ (۱۷/۱-۲٦/۵)
سطح سرمی LH*(IU/L)*، میانگین (95% CI)			۱۰/۳(۷/۸-۱۲/۸)
سطح سرمی تستوسترون *(ng/ml)*، میانگین(95% CI)			٦/۳(٤/۷-۷/۹)
آنالیز مایع منی	حجم، میانگین (95% CI)		۲/۷(۲/۳-۳/۰)
	PH، میانگین (95% CI)		۷/٤۰(۷/۳۱-۷/٤۹)
	فروکتوز (ng/dl)، میانگین (95% CI)		۲۷۷/٦ (۲٤٦/۷-۳۰۸/٤)

اسپرماتید بود (Johnsen Score:۳-۷). از سوی دیگر، ۱۷ بیمار (٪۲۰/۲) در بررسی هیستوپاتولوژی دارای مقداری اسپرم (هیپواسپرماتوژنز) در بافت بیضه بودند (Johnsen Score:۸-۹)؛ ولی همان طور که انتظار می‌رفت، اسپرماتوژنز کامل و بدون نقص در هیچ یک از بیماران مشاهده نشد.

بیان ژن TSGA10 در نمونه‌های بیضه: بیان ژن TSGA10 در نمونه بیضه ۳۱ بیمار (٪۳٦/۹) قابل تشخیص بود که از این تعداد ۱۳ بیمار (٪۱۵/۵) حداکثر بیان را با پاسخ مثبت در هر دو PCR داشتند. ۲ و ٤ بیمار هم به ترتیب بیان خفیف و متوسط و ۱۲ بیمار بیان قوی در PCR دوم داشتند.

از نظر هیستوپاتولوژی، در تمامی ۱۷ بیماری که در بیوپسی بیضه، اسپرم داشتند (Johnsen Score:۸-۹)، ژن TSGA10 بیان شده بود. در ۲۷ بیمار که دارای امتیاز Johnsen متوسط بودند (Johnsen Score:۳-۷)، ژن در ۱۵ بیمار بیان شده و در ۱۲ بیمار بیان نشده بود. پایین‌ترین سطح بیان ژن در امتیاز Johnsen، برابر ٤/۵ بود و در نمونه‌های حایز امتیاز کمتر از آن، بیان ژن مشاهده نشد. بیان ژن در هیچ کدام از نمونه‌های دارای امتیاز Johnsen پایین (Johnsen Score:۱-۲) قابل مشاهده نبود (شکل ۲). در مجموع بیان ژن TSGA10 در بیماران مورد مطالعه، رابطه معنی‌داری با امتیاز Johnsen داشت؛ به طوری که با افزایش عدد Johnsen احتمال بیان ژن نیز افزایش می‌یافت (t-Test: p<۰/۰۰۰۱) (شکل ۲).

سطح سرمی FSH و LH در بیماران منفی از نظر



شکل ۲- نتایج PCR ژن TSGA10 برروی ژل آگاروز ۱/۵٪ با رنگ‌آمیزی بروماید اتیدیوم. ۱و۲: بیماران دچار سندرم سلول‌های سرتولی و بیماران بدون سلول؛ ۳: بیماران دچار توقف در مرحله اسپرماتوگونی، ۷-٤: بیماران دچار توقف اسپرماتوژنزیس؛۸ و۹: بیماران دارای هیپواسپرماتوژنزیس؛۱۰: کنترل منفی (آب). PGM1 به عنوان کنترل مثبت به‌کاررفته است. a:PGM1، b:TSGA10 first PCR، c:TSGA10 second PCR

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲- رابطه بیان TSGA10 با اندازه بیضه و سطح سرمی FSH و LH در بیماران دچار آزواسپرمی غیرانسدادی مراجعه‌کننده به مرکز درمان ناباروری و سقط مکرر ابن‌سینا، ۸۴-۱۳۸۳

بیان TGSA10 / پارامترها	TSGA10		P-value		
	مثبت	منفی	t-test	ANCOVA1[a]	ANCOVA2[b]
میانگین سطح سرمی FSH *(IU/L)* (95% CI)	۹/۷ (۴/۸-۱۴/۷)	۲۸/۱ (۲۲/۱-۳۴/۱)	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۴۵	۰/۳۳
میانگین سطح سرمی LH *(IU/L)* (95% CI)	۵/۷ (۴-۷/۳)	۱۲/۵ (۹/۰-۱۶/۱)	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۵	۰/۴۰
میانگین اندازه بیضه *(cm)* (95% CI)	۱۶/۱ (۱۳/۶-۱۸/۶)	۸/۲ (۶/۸-۹/۶)	<۰/۰۰۰۱	۰/۳۲	۰/۵۵

a: آنالیز کوواریانس پس از همسان‌سازی سن، مدت ناباروری، سابقه خانوادگی ناباروری مردان، سابقه هرگونه اختلال تکاملی یا پاتولوژیک بیضه‌ها، نتایج معاینه بالینی بیضه‌ها، سطح سرمی هورمون‌های LH, FSH و تستوسترون. **b:** آنالیز کوواریانس پس از همسان‌سازی فاکتورهای بالا به همراه امتیاز Johnsen

TSGA10 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 ۲). در مجموع ۱۴ بیمار سابقه خانوادگی ناباروری در مردان داشتند که نیمی از آنها از نظر بیان ژن منفی بودند. با این حال، رابطه معنی‌داری بین سابقه خانوادگی و بیان ژن مشاهده نشد.

بحث

ناباروری مردان با علت ناشناخته[1] بیشتر از نظر وجود سندرم‌های ژنتیکی و نقایص کروموزومی بررسی می‌شود. با این حال، تعدادی از مطالعات نشان داده‌اند که بروز اختلال در ژنها نیز می‌تواند باعث مشکل در روند اسپرماتوژنز و به دنبال آن ناباروری شود (۱۲). ژن TSGA10 که بر روی کروموزوم شماره ۲ قرار دارد، در موش منجر به تولید پروتئینی می‌شود که به عنوان ساختار اصلی غلاف فیبری[2] در دم اسپرم عمل می‌کند و باعث حرکت رو به جلوی اسپرم می‌گردد (۱۰). به نظر می‌رسد که ژن TSGA10 به عنوان یک ژن مخصوص سلول‌های ژرمینال در روند باروری مردان مؤثر باشد. در سال ۲۰۰۱، مدرسی و همکاران نشان دادند که این ژن تنها در بافت بیضه بیان شده و بیان آن در سایر بافت‌های طبیعی مشاهده نمی‌شود. این مطالعه پیشنهاد داد که TSGA10 می‌تواند به عنوان یک لوکوس مورد نیاز در اسپرماتوژنز مطرح باشد (۸). مطالعات بعدی نشان‌دهنده بیان ژن در برخی سرطانها از جمله ALL نیز بوده است (۹).

مطالعه حاضر، اولین مطالعه‌ای است که برای بررسی بیان mRNA ژن TSGA10 در بافت بیضه ۸۴ بیمار مرد دچار آزواسپرمی غیرانسدادی با علت ناشناخته انجام شده است. در این مطالعه، 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 TSGA10 بیان می‌شود، تعیین گشت. بر این اساس، TSGA10 در تمامی ۱۷ بیمار با اسپرماتوژنز طبیعی بیان شد. بیان این ژن در مردان دچار آزواسپرمی با میزان اختلال در اسپرماتوژنز و امتیاز Johnsen ارتباط داشت. TSGA10 در نمونه‌های بیضه با امتیاز بیشتر از ۴/۵ بیان شد؛ ولی در بیماران حایز امتیازات پایینتر بیان نمی‌شد. با این حال، ماهیت امتیازدهی به روش Johnsen به گونه‌ای است که امکان تعیین سطحی از اسپرماتوژنز که ژن در آن بیان نمی‌شود را مشکل می‌سازد. پیش از این نیز در برخی

1- Unexplained
2- Fibrous Sheath

Archive of SID
www.SID.ir

مطالعات، استفاده از سایر روش‌های امتیازدهی پاتولوژیک و شاخص‌های[1] مولکولی دیگر نیز پیشنهاد شده است (۱۳).

در مطالعه حاضر ژن TSGA10 در ۷ بیمار از ۱٤ بیماری که سابقه ناباروری مردان در بستگان درجه اول داشتند، بیان نشده بود. اگرچه رابطه بیان ژن و سابقه فامیلی معنی‌دار نبود، با این حال در این بیماران ژن فوق می‌تواند عامل ناباروری باشد.

در این مطالعه در بیمارانی که بیان TSGA10 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 مساله احتمالاً در اثر عوامل دیگری به جز TSGA10، مثل نبود سلول‌های ژرمینال و آزواسپرمی می‌باشد، اگرچه یافته‌های این تست آماری در تعداد نمونه مورد مطالعه در این طرح به صورت کامل قابل اعتماد نمی‌باشد. در لوله‌های سمینیفر، تنها سلول‌های سرتولی برای تستوسترون و FSH، گیرنده دارند (۱٤). FSH کنترل تکثیر سلول‌های سرتولی در دوران جنینی و بلوغ را بر عهده دارد و لذا می‌تواند به عنوان شاخص توانایی اسپرماتوژنز در بزرگسالان به کار رود (۱۵). ترشح FSH از هیپوفیز، توسط Inhibin B آزاد شده از بیضه‌ها کنترل می‌گردد. بنابراین، افزایش سطح سرمی FSH در بیماران با سطح پائین‌تر از سلول‌های اسپرماتوگونی، می‌تواند به علت مقدار ناکافی inhibin B و یا نقص سلول‌های سرتولی باشد (۱٦). از سوی دیگر، اثرات هورمون LH از طریق تولید تستوسترون توسط سلول‌های لیدیگ در بیضه ایجاد شده که تستوسترون خود باعث تنظیم ترشح LH از هیپوفیز هم می‌شوند (۱۷). افزایش همزمان سطح سرمی FSH و LH هم معمولاً در مواردی دیده می‌شود که تخریب و اختلال در بافت بیضه هم روی توبول‌های حاوی سلول‌های ژرمینال و سرتولی و هم روی کارکرد آندروژنی بیضه صورت گرفته باشد (۱۸).

نتیجه‌گیری

استفاده از روش‌های مولکولی در سال‌های اخیر به عنوان ابزار مفیدی در ارزیابی اختلالات اسپرماتوژنز در بیضه مردان دچار آزواسپرمی غیرانسدادی پیشنهاد شده است (۱۹). در این میان بررسی بیان ژن‌های مرتبط با حرکت اسپرم، اهمیت بیشتری به دلیل نقش مهم آن در توانایی باروری اسپرم دارد (٤). نتایج این مطالعه، TSGA10 را به عنوان یک شاخص مولکولی بالقوه برای اسپرماتوژنز معرفی می‌کند؛ 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 تأیید تشخیص هیستوپاتولوژی در نمونه‌های بافت بیضه که دچار سندرم سلول‌های سرتولی می‌باشند، مفید است.

نتایج این مطالعه، دانش کنونی درباره مبانی مولکولی اختلال حرکتی اسپرم را به عنوان یکی از علت‌های ناباروری مردان گسترش می‌دهد. به هر صورت، انجام مطالعات کاملتر برای یافتن پروتئین‌های حاصل از ژن TSGA10 در بافت بیضه و تاثیر آن در حرکت اسپرم در انسان و بیان ژن در موارد ناباروری خانوادگی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از زحمات فراوان سرکار خانم بلورزاده و جناب آقای دکتر مدبری صابر از مرکز درمان ناباروری و سقط مکرر ابن‌سینا به دلیل همکاری فراوان در فرایند نمونه‌گیری از بیماران قدردانی می‌کنند. این مطالعه تحت حمایت‌های مالی پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا انجام گرفت.

1- Marker

Archive of SID
www.SID.ir

References

1- Shefi S, Turek PJ. Definition and current evaluation of subfertile men. Int Braz J Urol. 2006;32(4):385-97.

2- Matzuk MM, Lamb DJ. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. Nat Cell Biol. 2002;(4 Suppl): 41-9.

3- Hecht NB. The making of a spermatozoon: a molecular perspective. Dev Genet. 1995;16(2):95-103.

4- Turner RM. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? J Androl. 2003;24(6):790-803.

5- Blouin JL, Meeks M, Radhakrishna U, Sainsbury A, Gehring C, Sail GD, et al. Primary ciliary dyskinesia: a genome-wide linkage analysis reveals extensive locus heterogeneity. Eur J Hum Genet. 2000;8(2):109-18.

6- Turner RM, Musse MP, Mandal A, Klotz K, Jayes FC, Herr JC, et al. Molecular genetic analysis of two human sperm fibrous sheath proteins, AKAP4 and AKAP3, in men with dysplasia of the fibrous sheath. J Androl. 2001;22(2): 302-15.

7- Gadella BM, Van Gestel RA. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. Anim Reprod Sci. 2004;82-83: 307-19.

8- Modarressi MH, Cameron J, Taylor KE and Wolfe J. Identification and characterisation of a novel gene, TSGA10, expressed in testis. Gene. 2001;262(1-2):249 -55.

9- Mobasheri MB, Modarressi MH, Shabani M, Asgarian H, Sharifian RA, Vossough P, et al. Expression of the testis-specific gene, TSGA10, in Iranian patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). Leuk Res. 2006; 30(7):883-9.

10- Modarressi MH, Behnam B, Cheng M, Taylor KE, Wolfe J, van der Hoorn FA. Tsga10 encodes a 65-kilodalton protein that is processed to the 27-kilodalton fibrous sheath protein. Biol Reprod. 2004;70(3):608-15.

11- Johnsen S. Testicular biopsy score count- A method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. Hormones. 1970;1:2-25.

12- Huynh T, Mollard R, Trounson A. Selected genetic factors associated with male infertility. Hum Reprod Update. 2002;8(2):183-98.

13- 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.

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

15- De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, 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):132-7.

16- Steger K, Rey R, Louis F, Kliesch S, Behre HM, 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.

17- Handelsman DJ, Spaliviero JA, Simpson JM, Allan CM, Singh J. Spermatogenesis without gonadotropins: maintenance has a lower testosterone threshold than initiation. Endocrinology. 1999;140(9):3938-46.

18- Anawalt BD, Bebb RA, Matsumoto AM, Groome NP, Illingworth PJ, McNeilly AS, et al., Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. J Clin Endocrinol Metab. 1996;81(9): 3341-5.

19- Weikert S, Schrader M, Muller M, Schulze W, Krause H and 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.

Archive of SID

www.SID.ir