

Research Paper:

Association of the -308G/A Polymorphism of TNF- α Gene with Some Semen and Sperm Parameters in Men with Infertility



Reza Najafipour¹, *Sahar Moghbelinejad¹, Shokouh Sadat Aboutorabi², Elnaz Riyazi¹, Leila Mokhber³

1. Cellular and Molecular Research Centre, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.
2. Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kowsar Hospital, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.
3. School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.



Citation Najafipour R, Moghbelinejad S, Sadat Aboutorab Sh, Riyazi E, Mokhber L. Association of the -308G/A Polymorphism of TNF- α Gene with Some Semen and Sperm Parameters in Men with Infertility. The Journal of Qazvin University of Medical Sciences. 2019; 23(5):382-395. <https://doi.org/10.32598/JQUMS.23.5.382>

<https://doi.org/10.32598/JQUMS.23.5.382>



Received: 07 Jul 2019

Accepted: 13 Oct 2019

Available Online: 01 Dec 2019

Keywords:

Male infertility, TNF- α polymorphism, Oxidative stress, Sperm DNA damage

ABSTRACT

Background The tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene is a cytokine involved in systemic inflammation. Results of the association of its polymorphisms with infertility in men are controversial.

Objective The aim of this study was to evaluate the association of -308G/A polymorphism in TNF- α gene with different parameters of semen and sperm in infertile men.

Methods Participants were 210 men with infertility and 120 controls. The polymorphism evaluation was performed by sequencing method. In order to assess oxidative stress and apoptosis in men with -308G/A polymorphism, malondialdehyde and caspase-9 values were measured. The sperm DNA damage and sex chromosomes aneuploidy were also measured in these patients.

Findings A significant higher frequency of A allele of -308G/A polymorphism was observed in men with oligoasthenospermia ($P=0.01$). In semen samples of the men with AA genotype, there was significantly high level of malondialdehyde and caspase-9 ($P<0.0001$). We also observed higher frequency of sperm DNA damage ($P=0.0001$) and sex chromosome disomy type XY ($P=0.0001$) in sperm samples of men with AA genotype of -308G/A polymorphism. Furthermore, there was a significant correlation between sex chromosome aneuploidy and sperm DNA damage in sperms of men with this polymorphism ($R=0.72$, $P=0.048$).

Conclusion -308G/A polymorphism of TNF- α gene has association with decreased sperm parameters, increased oxidative stress, higher sperm DNA damage and sex chromosome aneuploidy which can affect infertility.

Extended Abstract

1. Introduction

Endocrine environment and/or genetic factors are two agents involved in male infertility. Chromosomal abnormality and Yq microdeletion are two main causes of

impaired spermatogenesis [1, 2]. Mutations of autosomal genes are also closely related to male infertility; however, the underlying molecular mechanisms are still unknown [3, 4]. Various studies have shown the association between different genotypes of cytokines encoding genes and infertility [5-8]. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is a cytokine that is normally present in the male genital tract. Studies have shown the lower sperm motility and higher degree

*** Corresponding Author:**

Sahar Moghbelinejad

Address: Cellular and Molecular Research Centre, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.

Tel: +98 (281) 3336001

E-Mail: smoghbelinejad@qums.ac.ir

of sperm DNA damage in seminal plasma of infertile men with high levels of TNF- α [9, 10].

Different factors are involved in seminal plasma TNF- α level, one of which is genetic factor such as single nucleotide polymorphisms. Several polymorphisms in the TNF- α gene cluster, especially in promoter region (-1031T/C, -863C/A, -857C/T, -575G/A, -376G/A, -308G/A, -244G/A, and -238G/A), have been associated with modified TNF- α level [6]. On the other hand, one of the environmental risk factors for infertility is reactive oxygen species (ROS). They are negatively correlated with many sperm function parameters. ROS can damage cellular membranes and cause lipid oxidation. In the clinical studies, elevated ROS levels have been reported in patients with abnormal sperm motility and morphology. Several studies have shown that ROS and cytokines including TNF- α have a complex interaction which ultimately can lead to sperm DNA fragmentation (SDF) and the apoptosis of germ cells [11, 12].

The relationship between TNF- α activity and apoptosis process has already been reported [13]. Most of studies have reported higher level of sperm DNA damage, chromosomes abnormality or both in sperm samples of infertile men [14, 15]. The aim of study was to evaluate the effect of -308G/A polymorphism of TNF- α gene on different semen parameters, stress oxidative, sperm DNA damage and sperm chromosome aneuploidy among the Iranian men with infertility.

2. Materials and Methods

Sperm and blood samples was collected during 2017–2018 years from ACECR Telemedicine Infertility Cen-

ter in Qazvin, Iran. There was 4 study groups: one group with normal spermatogenesis (n=120, control group); and three other groups with abnormal spermatogenesis including: Men with sthenospermia having low sperm motility (A+B<32%; n=70), men with oligospermia having low sperm count (<15 \times 10⁶ /ml; n=70), and men with oligoasthenospermia having low sperm count and motility (n=70) [18]. Groups with infertile men had no other infertility criteria including cystic fibrosis, Klinefelter's syndrome, varicocele, chemotherapy, and azoospermia factor (AZF) microdeletion. The men with smoking and alcohol consumption were excluded from the study.

TNF- α genotyping was done by sequencing method. For measuring SDF index, we used SDF assay kit (Kalazist Co., IRAN). Prolactin (PRL) and testosterone levels was measured by ELISA kit (Diagnostics Biochem Canada Inc., Canada). For the measurement of caspase-9 activity in semen samples, we used a colorimetric assay kit (R&D Systems, USA) and malondialdehyde (MDA) was assessed using the thiobarbituric acid reaction (TBAR) method. Moreover, Disomy of sex chromosomes was evaluated by using fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis according to the method described by [16].

3. Results

Patient characteristics and semen quality parameters are shown in Table 1. Results showed that the frequency of GG and GA genotypes in TNF α -308G/A polymorphism were not significantly different in asthenospermic and oligospermic patients compared to controls (P=0.06) (Table 2), but we observed a significant difference in the frequency of AA genotype and A allele frequency in the oligoasthenospermic

Table 1. Characterization of the participants

Variable	Mean \pm SD			
	Fertile (n=120)	Infertile (n=70)		
		Asthenospermia	Oligospermia	Oligoasthenospermia
Age (year)	32 \pm 2.8	26.1 \pm 3.2	32 \pm 4.5	33 \pm 5.4
BMI (Kg/m ²)	22.2 \pm 2.7	23 \pm 1.2	24.2 \pm 2.1	24.2 \pm 1.8
Abstinence time (days)	3.8 \pm 0.7	4.2 \pm 0.55	4 \pm 0.45	4 \pm 0.8
Serum LH level (IU/L)	7.2 \pm 2.2	7.87 \pm 3.1	7.1 \pm 2.1	7.9 \pm 1.9
Serum FSH level (IU/L)	5.8 \pm 0.95	5.88 \pm 1.3	6.1 \pm 1.9	6.9 \pm 3.2
Testicular volume (mL)	3.2 \pm 1.5	2.8 \pm 1.9	2.3 \pm 1.8	2.9 \pm 1.2
Concentration (10 ⁶ /mL)	120 \pm 6.1	99 \pm 4.54.	12 \pm 2.3	13.2 \pm 1.1
Progressive motility (A+B) (%)	72 \pm 1.5	13 \pm 2.8	42 \pm 3.2	19.1 \pm 3.2
Morphology (%)	17.2 \pm 1.2	12.1 \pm 1.5	13.5 \pm 3.2	10.1 \pm 2.9

SD: Standard deviation; BMI: Body mass index; LH: Luteinizing hormone; FSH: Follicle stimulating hormone

Table 2. Frequency of different genotypes in -308G/A polymorphism of TNF- α

SNPs	Genotypes	No. (%)		OR (95% CI)	Oligoasthe- nospermia	OR (95% CI)	Oligospermia No. (%)	OR (95% CI)
		Control	Asthenospermia					
-308G/A polymorphism	GG	62 (52)	38 (54)	1 (Ref)	26 (37)	1 (Ref)	28 (40)	1 (Ref)
	GA	45 (37)	26 (37)	0.9 (0.53-1.7)	28 (40)	1.3 (0.75-2.3)	31 (44)	0.98 (1.09-3.6)
	AA	13 (11)	6 (9)	1.5 (0.41-5.6)	16 (23)	2.5 (1.02-6.1)*	11 (16)	0.99 (0.87-1.8)
	G allele	169 (70)	102 (73)	1 (Ref)	80 (57)	1 (Ref)	87 (62)	1 (Ref)
	A allele	71 (30)	38 (27)	1.2 (0.68-2.3)	60 (43)	2.7 (0.95-3.9)*	53 (38)	0.97 (0.65-1.7)

SNP: Single-nucleotide polymorphism; OR: Odd ratio; CI: Confidence interval

The Journal of
Qazvin University of Medical Sciences (JQUMS)

Table 3. Descriptive statistics of some variables in patients with GG, GA and AA genotypes of -308G/A polymorphism in TNF- α

Number of patients		Mean \pm SD			P
		GG	GA	AA	
		92	85	33	
Sperms Parameters	Sperm count (106/mL)	55 \pm 3.1	53.8 \pm 12.8	14.1 \pm 11.8	0.0001
	Sperm motility (A+B%)	36.5 \pm 9.4	31.2 \pm 8.8	10.9 \pm 8.2	0.0001
	Sperm morphology	13.3 \pm 5.1	13.2 \pm 3.1	11.5 \pm 2.1	0.0001
	SDF index> 30%	13%	15.5%	29%	0.0001
Hormonal Level	FSH (mIU/mL)	6.31 \pm 1.2	6.52 \pm 1.44	6.11 \pm 1.8	
	LH (mIU/mL)	6.92 \pm 1.11	7.1 \pm 2.33	6.7 \pm 2.12	
	Testosterone (ng/L)	689 \pm 2.1	671 \pm 3.5	668 \pm 3.8	
	Prolactin (ng/mL)	6.9 \pm 1.5	7.3 \pm 1.52	7.3 \pm 1.8	
Apoptosis Facto	Caspase-9 (U/106 sperms)	1.2 \pm 0.99	1.8 \pm 0.78	3.8 \pm 0.98	0.0001
Oxidative Stress Factor	MDA (nmol/mL)	1.55 \pm 0.78	2.1 \pm 0.68	3.93 \pm 0.84	0.0001

SD: Standard deviation; LH: Luteinizing hormone; FSH: Follicle stimulating hormone

The Journal of
Qazvin University of Medical Sciences (JQUMS)

men compared to controls [OR (95% CI): 2.5 (1.02-6.1) for AA genotype and 2.7 (0.95-3.9) for A allele] (P=0.01). In the patients groups, the -308G/A polymorphism had no impact on the hormone level (Follicle- stimulating hormone, luteinizing hormone, testosterone, and prolactin) (Table 3). Evaluating the effect of AA genotype in -308G/A polymorphism of TNF α on different sperm parameters showed that this genotype can significantly decrease the sperm count (P=0.0001), motility (P=0.0001) and morphology (P=0.0001). We measured SDF index between men with different genotypes. The results reported a significant increase in sperm DNA damage (>30%) in subjects with AA genotype (34%) compared to those with GG (16%) and GA (19.5%) genotypes (P=0.0001).

Caspase-9 level as a main factor in apoptosis process was increased significantly in semen samples of the men with AA genotype (Mean \pm SD=3.8 \pm 0.98) compared to the men with

GG (1.2 \pm 0.99) and GA (1.8 \pm 0.78) genotypes (P=0.0001). Moreover, we observed a significant higher level of MDA (one of the stress oxidative factors) in semen samples of the men with AA genotype (Mean \pm SD =3.93 \pm 0.84) versus men with GG (1.15 \pm 0.78) and GA (2.1 \pm 0.68) genotypes (P=0.0001). Because of the importance of sex chromosomes aneuploidy in infertility, we evaluated its rate in sperm samples of the men with G and A alleles of -308G/A polymorphism. As shown in Table 4, three disomy types (XX, XY, YY) were examined. Regarding the frequency of XX and YY types, there was no significant difference between the men with G and A alleles (P=0.32), but there was a significant difference between them in terms of XY disomy frequency (Mean \pm SD= 0.075 \pm 0.045 vs. 0.634 \pm 0.12) (P=0.0001). Results from the analysis of relationship between sex chromosomes aneuploidy and DNA damage, indicated a strong and significant positive correlation between these two parameters (R= 0.72, P=0.028).

4. Conclusion

Consistent with other studies [3-5], the results of the present study suggested that, firstly, the prevalence of -308G/A polymorphism varies among different populations, and more studies are needed in this area. Secondly, in infertile men with this polymorphism, we observed a decrease in sperm parameters, an increase in oxidative stress, sperm DNA damage, and apoptosis in the sperm cells which ultimately reduced the normal parameters of the sperms. On the other hand, in men with A allele of this polymorphism, the aneuploidy levels of sex chromosomes were higher due to the increase in sperm DNA damage.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Research Ethical Committee of Qazvin University of Medical Sciences (Code: IR.QUMS.REC.1395.200) and informed written consent was obtained from the participants.

Funding

This study is the result of the thesis of Elnaz Riyazi and Leila Mokhbar students in Medicine of Qazvin University of Medical Sciences.

Authors' contributions

Conceptualization, writing, data analysis, supervision, project administration: Sahar Moghbelinejad; Editing and funding acquisition: Reza Najafipour; Validation, editing and sampling: Shokouh Sadat Aboutorabi; Methodology and investigation: Elnaz Riyazi and Leila Mokhber.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank and appreciate the Cellular and Molecular Research Center of Qazvin University of Medical Sciences.

همراهی پلی مورفیسم ۳۰۸-ژن TNF- α با استرس اکسیداتیو سمن در مردان ناباروررضا نجفی پور^۱، * سحر مقبلی نژاد^۱، شکوه‌السادات ابوترابی^۲، الناز ریاضی^۱، لیلیا مخبر^۳

۱. مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

۲. گروه زنان و زایمان بیمارستان کوثر، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

۳. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

چکیده

زمینه: ژن TNF- α یک سیتوکین را کد می کند که در التهاب سیستمیک نقش دارد. در زمینه همراهی پلی مورفیسم این ژن با ناباروری مردان، نتیجه قطعی وجود ندارد.

هدف: هدف از این مطالعه، بررسی همراهی پلی مورفیسم ۳۰۸-ژن TNF- α با پارامترهای مختلف سمن و اسپرم در مردان نابارور بود. **مواد و روش ها:** ۲۱۰ مرد نابارور و ۱۲۰ شرکت کننده بارور به عنوان کنترل در این مطالعه مورد شاهد انتخاب شدند. پلی مورفیسم با روش توالی یابی بررسی شد. به منظور بررسی شاخص های استرس اکسیداتیو و آپوپتوزیس به ترتیب از آزمون مالون دی آلدیید و کاسپاز-۹ استفاده شد. همچنین میزان آسیب DNA اسپرم و آنیوپلوئیدی کروموزوم های جنسی اسپرم مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: در این تحقیق فراوانی بالای آلل A در این پلی مورفیسم در مردان اولیگواسپرمیا مشاهده شد ($P=0/01$). افزایش مالون دی آلدیید و کاسپاز-۹ در نمونه سمن مردان با ژنوتیپ AA مشاهده شد ($P\leq 0/0001$). همچنین میزان بالای آسیب DNA اسپرم ($P\leq 0/0001$) و دیزومی کروموزوم های XY ($P\leq 0/0001$) در نمونه اسپرم مردان با ژنوتیپ AA مشاهده شد. یک ارتباط معنی دار بین آنیوپلوئیدی کروموزوم های جنسی و آسیب DNA اسپرم نیز دیده شد ($R=0/77$, $P=0/048$).

نتیجه گیری: در این تحقیق یک همراهی معنی داری بین ژنوتیپ AA پلی مورفیسم ۳۰۸-ژن TNF- α با کاهش پارامترهای اسپرم، افزایش میزان استرس اکسیداتیو، میزان بالای آسیب DNA اسپرم و آنیوپلوئیدی کروموزوم های جنسی مشاهده شد که می تواند بر ناباروری اثر گذار باشد.

تاریخ دریافت: ۱۶ تیر ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: ۲۱ مهر ۱۳۹۸

تاریخ انتشار: ۱۰ آذر ۱۳۹۸

کلیدواژه ها:

ناباروری مردان، پلی مورفیسم ژن TNF- α ، استرس اکسیداتیو

مقدمه

منطقه کمپلکس پلی مورفیک^۲ بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۶ بین ژن های لیمفوتوکسین و لیمفوتوکسین بتا^۳ قرار دارد [۹].

TNF- α به عنوان یک فاکتور تمایزی رشد از لوکوسیت ها ترشح می شود. به منظور عملکرد دقیق پروتئین TNF- α گیرنده های آن بر روی سلول های لیدیگ و سرتولی قرار دارند و عملکرد این سیتوکین را هموار می کنند [۱۰]. مطالعات متعددی ارتباط بین افزایش میزان TNF- α در سمن با کاهش پارامترهای اسپرم و افزایش میزان آسیب DNA اسپرم را نشان داده اند [۱۱، ۱۲]. عوامل متعددی در میزان TNF- α در سمن دخالت دارند که یکی از این موارد پلی مورفیسم های این ژن است. پلی مورفیسم های متعددی در این ژن به خصوص در ناحیه پروموتوری گزارش شده است (1031T/C, -863C/A, -857C/T, -575G/A,)

فاکتورهای اندوکراین و ژنتیکی دو عامل مهمی هستند که در ناباروری مردان دخالت دارند. ریز حذف بازوی بلند کروموزوم Y و ناهنجاری های کروموزومی دو عامل مهم در بروز اسپرماتوژنیزیس ناقص هستند [۲، ۱۰]. به علاوه جهش های ژن های آتوزومال با ناباروری مردان در ارتباط هستند، ولی مکانیسم مولکولی درگیر در این مسیر هنوز به طور کامل شناخته شده نیست [۳، ۴]. مطالعات متعددی همراهی بین ژنوتیپ های مختلف ژن های کدکننده سیتوکین ها و ناباروری را نشان داده اند [۵-۸]. تومور نکروز فاکتور آلفا^۱ یکی از سیتوکین هایی است که به طور طبیعی در مجرای اندام جنسی بیان می شود. خوشه ژن TNF- α در

2. Major histocompatibility complex (MHC)
3. Lymph toxin beta

1. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)

* نویسنده مسئول:

سحر مقبلی نژاد

نشانی: قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی.

تلفن: ۰۰۱ ۳۳۳۶۰۱ (۲۸۱) ۹۸+

رایانامه: smoghbelinejad@qums.ac.ir

دستگاه توالی‌یابی ABI 3730XL توالی‌یابی شدند. توالی طبیعی ژن TNF- α از پایگاه‌های داده‌ای مربوطه گرفته شد و سپس توسط نرم افزار Chroma's (ورژن ۲/۴) توالی‌های به دست آمده بلاست شدند.

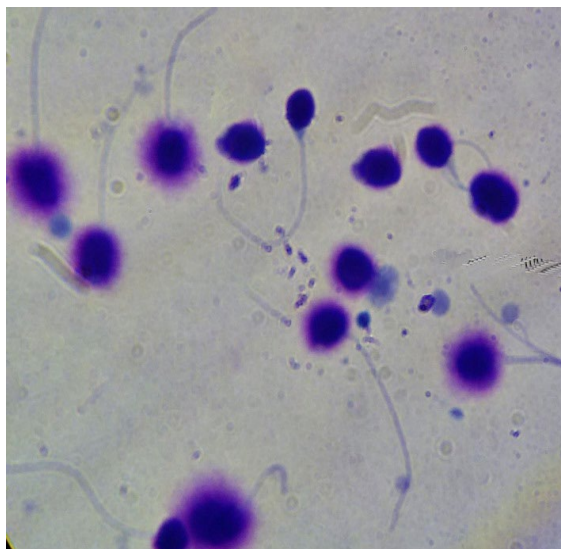
به منظور بررسی قطعه‌قطعه شدن DNA اسپرم از کیت کالازیست (تهران، ایران) استفاده شد. بدین منظور نمونه‌های اسپرم از افرادی که ۲ تا ۳ روز نزدیکی نداشتند، جمع‌آوری شد. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شد تا به صورت مایع درآید. پس از مایع شدن نمونه سمن به پد میکروژل انتقال داده شد و DNA اسپرم با تیمار اسیدی واسرشت شد. مرحله بعد پروتئین‌های اسپرم حذف شد. در طول رنگ‌آمیزی DNA اسپرم به صورت هاله اطراف سر اسپرم مشاهده شد. در مرحله بعد پروتئین‌های اسپرم حذف شد. در طول رنگ‌آمیزی اسپرم‌ها با DNA آسیب‌دیده این هاله تشکیل نشد یا خیلی ضعیف بود (شکل شماره ۱). برای هر بیمار ۳۰۰ نمونه اسپرم درجه‌بندی و آنالیز و آسیب بالای ۳۰ درصد به عنوان نقطه عطف ارزیابی در نظر گرفته شد [۱۹].

به منظور بررسی میزان هورمون‌های جنسی، پنج میلی‌لیتر خون از هر بیمار برای اندازه‌گیری هورمون‌ها گرفته شد. نمونه‌های خون ۱۰ دقیقه در دمای اتاق به منظور جداسازی پلاسما سانتریفیوژ شده و سپس پلاسما در منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. میزان (LH)^۲، (FSH)^۵، پرولاکتین، تستوسترون توسط کیت الایزا (Diagnostics Biochem Canada Inc) اندازه‌گیری شد.

به منظور اندازه‌گیری فعالیت کاسپاز-۹ در سمن از کیت

4. Luteinizing hormone (LH)

5. Follicle-stimulating hormone (FSH)



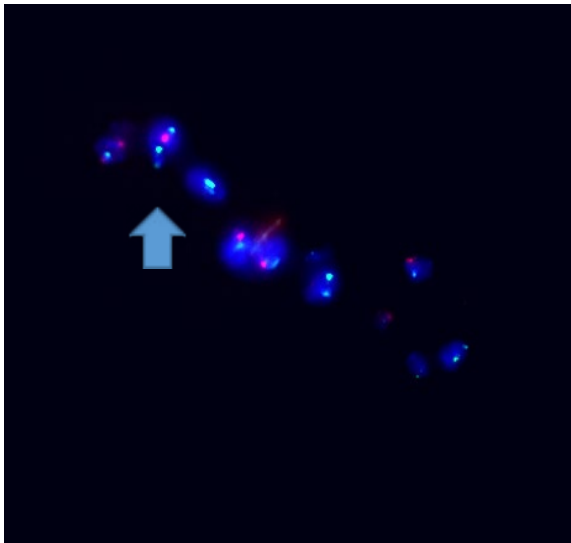
مجله علمی
دانشگاه علوم پزشکی قزوین

شکل ۱. پنج سلول اسپرم با DNA آسیب‌دیده که فاقد هاله دور سر اسپرم و هفت سلول اسپرم با DNA سالم که دارای هاله دور سر اسپرم هستند. بزرگ‌نمایی $\times 1000$

گونه‌های فعال اکسیژن به غشای سلولی آسیب می‌رسانند و باعث اکسیداسیون لیپیدها می‌شوند. در درمانگاه‌ها افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در سمن بیماران با حرکت کم و مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم مشاهده شده است [۱۲]. مطالعات نشان داده‌اند که سیتوکاین‌ها، به‌ویژه TNF- α با گونه‌های فعال اکسیژن ارتباط دارند و در نهایت باعث آسیب DNA اسپرم و مرگ سلول‌های جنسی می‌شوند [۱۳-۱۵]. مطالعات متعددی آسیب بالای DNA اسپرم و ناهنجاری‌های کروموزومی را در مردان نابارور نشان داده‌اند [۱۶، ۱۷]. هدف از این تحقیق بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم ۳۰۸-ژن TNF- α با پارامترهای مختلف اسپرم، استرس اکسیداتیو، آسیب DNA و آنیوپلوئیدی کروموزوم‌های اسپرم در جمعیت مردان نابارور ایرانی است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد شاهدهی، نمونه‌های اسپرم و خون طی سال‌های ۱۳۹۶ تا ۱۳۹۷ از مرکز ناباروری تله مدیسین جهاد دانشگاهی قزوین جمع‌آوری شد. چهار گروه در این تحقیق داوطلب مطالعه بودند: گروه مردان بارور با اسپرماتوزنیز نرمل که به دلیل ناباروری همسرشان به مرکز ناباروری مراجعه کرده بودند (۱۲۰ مورد) و سه گروه بعدی شامل مردان با اسپرماتوزنیز غیرنرمل شامل استنواسپرمیا با حرکت پایین اسپرم (A+B) ($<32\%$) (۷۰ مورد)، اولیگو اسپرمیا با تعداد پایین اسپرم کمتر از 106×10^6 (۷۰ مورد) و اولیگواستنواسپرمیا با تعداد و حرکت پایین اسپرم (۷۰ مورد) بودند [۱۸]. گروه افراد نابارور فاقد پارامترهای دیگر ناباروری مانند سیستمیک فیبروزیس، سندرم کلاین فیلتر، واریکوسل، ریز حذف کروموزوم Y و کموتراپی بودند. همچنین مردان با مصرف سیگار و مشروب از مطالعه خارج شدند. به منظور ژنوتیپینگ DNA نمونه‌های خون با استفاده از کیت استخراج QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) استخراج شد. پرایمر مستقیم 5'TCTCGGTTTCTTCTCCATCG3 و F1 و پرایمر معکوس (5'ATAGGTTTTGAGGGGCATGG3,) R1 به منظور تکثیر قطعه ۱۸۴ جفت باز ژن TNF- α که دارای سایت پلی‌مورفیک ۳۰۸- است، استفاده شد. شرایط تکثیر ژنی (PCR) به منظور تکثیر قطعه مورد نظر بدین صورت بود: دمای اولیه دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای پنج دقیقه، در ادامه ۴۰ سیکل دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای دو دقیقه، اتصال پرایمر به قطعه مورد نظر در ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه و سپس ادامه PCR در ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای پنج دقیقه و در نهایت دمای نهایی ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای پنج دقیقه. بعد از فرایند PCR محصولات بر اساس توالی‌یابی سنگر



مجله علمی
دانشگاه علوم پزشکی قزوین

شکل ۲. در این تصویر دو اسپرم که دارای کروموزوم X و چهار اسپرم که دارای کروموزوم Y هستند دیده می‌شود. یکی از اسپرم‌ها دارای کروموزوم‌های XY است (فلش آبی).

شد. تفاوت در فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها با استفاده از آزمون کای دو در نسخه ۲۰ نرم افزار SPSS انجام شد. نسبت شانس (OR) با فاصله اطمینان ۹۵ درصد تخمین زده شد. از آزمون‌های واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و تی جهت تحلیل داده‌ها استفاده و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مشخصات بیماران و پارامترهای کیفی اسپرم در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. نتایج آنالیز داده‌ها نشان داد که فراوانی ژنوتیپ‌های GG و GA در پلی مورفیسم ۳۰۸-ژن TNF- α تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های بیمار و شاهد ندارد (جدول شماره ۲) ($P=0/06$)؛ ولی تفاوت معنی‌داری در فراوانی ژنوتیپ AA و آلل A در افراد اولیگواستنوساسپرم در مقایسه با گروه شاهد دیده شد ($P=0/01$). در بیماران انتخاب‌شده پلی مورفیسم ۳۰۸-ژن TNF- α هیچ تأثیری در سطح هورمون‌های LH، FSH، تستوسترون و پرولاکتین نداشت (جدول شماره ۳). بررسی تأثیر ژنوتیپ AA در پلی مورفیسم ۳۰۸-ژن TNF- α روی پارامترهای مختلف اسپرم نشان داد که این ژنوتیپ تأثیر معنی‌داری روی کاهش تعداد اسپرم ($P\leq 0/0001$) حرکت ($P\leq 0/0001$) و مورفولوژی ($P\leq 0/0001$) داشت. همچنین در این تحقیق میزان قطعه‌قطعه شدن DNA اسپرم در گروه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد افزایش معنی‌داری در میزان آسیب DNA اسپرم در بیماران با ژنوتیپ AA در مقایسه با بیماران دارای ژنوتیپ GG و GA وجود داشت ($P\leq 0/0001$) (جدول شماره ۳).

میزان کاسپاز-۹ (شاخص آپوپتوزیس) و مالون دی‌آلدهید

کلومتریگ (R&D Systems, Minneapolis, MN) استفاده شد. به منظور جمع‌آوری محتوای سلولی اسپرم‌ها، اسپرماتوزوآ لیز شد. به منظور اندازه‌گیری فعالیت پروتئاز در سلول‌های لیز شده، پپتید اختصاصی کاسپاز که به مولکول گزارشگر p-nitroaniline متصل شده است به سلول‌ها اضافه شد. زمانی که کاسپاز-۹ مولکول گزارشگر را شکاف می‌داد رنگ nitroani-line رها می‌شد. میزان رنگ در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر کمی شد.

میزان مالون دی‌آلدهید بر اساس روش راتو^۶ و همکاران ۱۹۸۹ اندازه‌گیری شد [۲۰]. بر اساس این روش ابتدا نمونه‌های سمن در دو هزار گرم به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی (پلاسمای سمینال) به همراه ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر در لوله آزمایشگاه ریخته شد و به هر لوله ۵۰۰ میکرولیتر معرف تیوباربیتوریک اسید^۷ اضافه شد و سر لوله‌ها توسط ورقه‌های آلومینیومی کاملاً پوشانده شدند و به مدت یک ساعت در حمام آب جوش قرار گرفتند و پس از خنک شدن در دمای اتاق، لوله‌ها مجدداً در ۴ هزار گرم به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت جذب محلول رویی در طول موج ۵۳۴ نانومتر، با دستگاه اسپکتروفوتومتر UV ۱۶۰۰ خوانده شد.

دیزومی کروموزوم‌های جنسی توسط روش هیبریداسیون فلورسنت درجا که قبلاً توصیف شده بود، مورد بررسی قرار گرفت [۲۰]. بدین منظور پروب‌ها منطقه ساتلیتی کروموزوم X (Xp11.1-q11.1) با رنگ سبز و کروموزوم Y (Yp11.1-q11.1) با رنگ قرمز نشان‌دار شدند. در ابتدا پروب‌ها در ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار تا پنج دقیقه دناتورده شدند. به طور هم‌زمان اسلایدهای حاوی اسپرم به منظور دناتوراسیون وارد فورمامید ۷۰ درصد و سالیین سدیم سترات^۸ با pH=۷ شد. بعد از واسرشت شدن، پروب‌ها به منظور هیبریداسیون به اسلایدهای حاوی اسپرم اضافه شدند. مدت زمان دورگه‌سازی دو ساعت بود. سپس اسلایدها در توئین ۷۰، ۸۵ و ۱۰۰ درصد به مدت دو دقیقه قرار گرفتند. پس از انکوباسیون، اسلایدها در سالیین سدیم سترات با pH=۷ و دمای ۴۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه شسته شدند. سپس اسلایدها در محلول وکتا شیلد که دارای رنگ زمینه‌ای دپی بود توسط لامل ۲۲ در ۹۲۲ میلی‌متر ثابت شدند. سپس هزار سلول برای هر نمونه توسط میکروسکوپ (Nikon E800, Japan) فلئورسنت با بزرگ‌نمایی هزار بررسی شدند (شکل شماره ۲).

تعیین تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مورد مطالعه با آنالیزهای آماری شامل میانگین، انحراف معیار و ضریب همبستگی بررسی

6. Rao
7. Thiobarbituric acid
8. Salin-sodium-citrate

مطالعه حاضر همراهی معنی دار آلل A را با اولیگواستنواسپریمیا نشان داده است. در مطالعه دیگری، در جمعیت مصر افزایش ژنوتیپ AA در مردان نابارور با استنواسپریمیا، استنوتراواتواسپریمیا و اولیگواستنوتراواتواسپریمیا مشاهده شده است. در مطالعه آنها مشابه این مطالعه، همراهی آلل A این پلی مورفیسم با کاهش تعداد اسپرم، حرکت اسپرم و شکل نرمال اسپرم دیده شد. همچنین افزایش میزان فاکتور آپوتوتیک کاسپاز-۹ در بیماران با پلی مورفیسم و آلل A مشاهده شد [۲۴].

در سه مطالعه در جمعیت آسیا مانند چین، هند و ایران افزایش فراوانی آلل A در بیماران نابارور اولیگواسپریم، استنواسپریم، تراواتواسپریم و آزواسپریم گزارش شد. ولی در مطالعه ما افزایش آلل فقط در مردان اولیگواستنواسپریم مشاهده شد. این تفاوت در فراوانی ژنوتیپها به دلیل سازش ژنوتیپهای مختلف با نژادهای مختلف است [۲۵-۲۷]. مشابه مطالعه ما، ترونچون و همکاران و خادمی و همکاران همراهی پلی مورفیسم ۳۰۸-ژن TNF α با افزایش میزان استرس اکسیداتیو سمن و کاهش پارامترهای اسپرم را نشان دادند [۲۷، ۲۴]. برخلاف مطالعات ذکر شده، در جمعیت استرالیا همراهی این پلی مورفیسم با ناباروری و کاهش پارامترهای نرمال اسپرم نشان داده نشد [۲۸]. در این تحقیق همراهی این پلی مورفیسم با افزایش میزان کاسپاز-۹ در سمن نشان داده شد.

به طور کلی TNF α از دو مسیر در آپوتوزیس دخالت دارد: یکی از طریق اتصال به گیرنده ۱ ژن TNF α و فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ مختلف و دوم، تحریک اسپرماتوزوآ به منظور تولید گونه‌های فعال اکسیژن. گونه‌های فعال اکسیژن باعث تولید

(شاخص استرس اکسیداتیو) در بیماران با ژنوتیپ AA در مقایسه با بیماران دارای ژنوتیپ GG و GA افزایش معنی داری داشتند ($P \leq 0/0001$) (جدول شماره ۳). همان طور که در جدول شماره ۴ نشان داده شده است سه نوع دیزومی (XX، XY، YY) مورد بررسی قرار گرفت. در مورد دیزومی‌های XX، YY تفاوت معنی دار بین گروه‌های دارای آلل G و A وجود نداشت ($P = 0/332$)؛ در حالی که تفاوت معنی داری در افزایش فراوانی دیزومی XY در بیماران با آلل A نسبت به بیماران با آلل G وجود داشت ($P \leq 0/0001$). بررسی ارتباط بین میزان آسیب DNA و آنیوپلوئیدی کروموزوم‌های جنسی، یک ارتباط مستقیم معنی داری را در این زمینه نشان داد ($P = 0/028$).

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق یک ارتباط معنی دار در همراهی آلل A پلی مورفیسم ۳۰۸-ژن TNF α با اولیگواسپریمیا نشان داده شد. همچنین همراهی مؤثر این پلی مورفیسم با افزایش استرس اکسیداتیو، آسیب DNA اسپرم و آنیوپلوئیدی کروموزوم‌های جنسی اسپرم نیز در این مطالعه دیده شد. در مطالعات متفاوتی همراهی این پلی مورفیسم با استعداد در ابتلا به بیماری‌های مختلف نشان داده شده است [۲۱، ۲۲]. همراهی پلی مورفیسم ۳۰۸-ژن TNF α با ناباروری در جمعیت‌های مختلف گزارش شده است؛ برای مثال در جمعیت فرانسه ترونچون^۱ و همکاران (۲۰۰۸) همراهی آلل A این پلی مورفیسم را با اولیگواسپریمیا و استنواسپریمیا نشان دادند [۲۳]. برخلاف مطالعه آنها،

9. Thronchon

جدول ۱. ویژگی نمونه‌های مورد مطالعه (تعداد=۷۰)

نابارور (در هر گروه ۷۰ نفر)			پارامترها
اولیگواسپریم	استنواسپریم	اولیگواسپریم	بارور (تعداد=۱۲۰)
۳۳±۵/۴	۲۶/۱±۴/۲	۳۲±۴/۵	۳۲±۲/۸ سن (سال)
۲۴/۲±۱/۸	۲۳±۱/۲	۲۴/۲±۲/۱	۲۲/۲±۲/۷ شاخص توده بدنی (کیلوگرم بر مترمربع)
۴±۰/۸	۷/۸۷±۳/۱	۷/۱±۲/۱	۷/۲±۲/۲ هورمون LH (واحد بین‌المللی / لیتر)
۶/۹±۳/۲	۵/۸۸±۱/۳	۷/۱± ۲/۱	۵/۸±۰/۹۵ هورمون FSH (واحد بین‌المللی / لیتر)
۱۳/۲±۱/۱	۲/۸±۱/۹	۲/۳±۱/۸	۳/۲±۱/۵ حجم بیضه (میلی‌متر)
۱۳/۲±۱/۱	۹۹±۴/۵	۱۲±۲/۳	۱۲۰± ۶/۱ غلظت اسپرم × ۱۰۶
۱۹/۱±۳/۲	۱۳±۲/۸	۴۲±۳/۲	۷۲±۱/۵ حرکت جلورونده (A+B) (درصد)
۱۰/۱±۲/۹	۱۲/۱±۱/۵	۱۳/۵ ±۳/۲	۱۷/۲±۱/۲ شکل نرمال اسپرم (درصد)

جدول ۲. فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفیسم ۳۰۸-ژن TNF-α

پلی مورفیسم	ژنوتیپ‌ها	بارور تعداد (درصد)	استنواسپرم تعداد (درصد)	نسبت شانس فاصله اطمینان ۹۵ درصد	اولیگواسپرم تعداد (درصد)	نسبت شانس فاصله اطمینان %۹۵	اولیگواسستو اسپرم تعداد (درصد)	نسبت شانس فاصله اطمینان ۹۵ درصد
	GG	۶۲ (۵۲)	۳۸ (۵۴)	۱ (رفرنس)	۲۶ (۳۷)	۱ (رفرنس)	۲۸ (۴۰)	۱ (رفرنس)
	GA	۴۵ (۳۷)	۲۶ (۳۷)	۰/۹ (۰/۵۳-۰/۱۷)	۲۸ (۴۰)	۱/۳ (۰/۷۵-۲/۳)	۳۱ (۴۴)	۰/۹۸ (۱/۹-۳/۶)
TNFα-۳۰۸	AA	۱۳ (۱۱)	۶ (۹)	۱/۵ (۰/۲۶-۵/۶)	۱۶ (۲۳)	۲/۵ (۳/۲-۴/۷)	۱۱ (۱۶)	۰/۷۵ (۰/۸۷-۱/۸)
	G	۱۶۹ (۷۰)	۱۰۲ (۳۳)	۱ (رفرنس)	۸۰ (۵۷)	۱ (رفرنس)	۸۷ (۶۲)	۱ (رفرنس)
	A	۷۱ (۳۰)	۲۸ (۳۷)	۱/۲ (۰/۶۸-۲/۳)	۶۰ (۴۳)	۲/۹ (۲/۳-۲/۸)	۵۳ (۳۸)	۰/۶۷ (۰/۹۷-۱/۷)

مجله علمی
دانشگاه علوم پزشکی قزوین

جدول ۳. نتایج بررسی پارامترهای مختلف در بیماران با ژنوتیپ‌های GG,GA,AA پلی مورفیسم ژن TNF-α

سطح معنی داری	AA	GA	GG	متغیرها
	۳۳	۸۵	۹۲	تعداد بیماران
۰/۰۰۰۱	۱۴/۲±۱۱/۸	۵۵/۲±۱۲/۸	۵۵±۲/۱	غلظت اسپرم ۱۰۶ / میلی لیتر
۰/۰۰۰۱	۱۰/۹±۸/۲	۲۶/۲±۸/۸	۳۶/۵±۹/۴	حرکت پیش رونده اسپرم (A+B درصد)
۰/۰۰۰۱	۱۱/۲±۲/۱	۱۳/۲±۲/۱	۱۳/۱±۵/۱	شکل نرمال اسپرم (درصد)
۰/۰۰۰۱	۲۹ درصد	۱۵/۵ درصد	۱۳ درصد	آسیب DNA اسپرم >۳۰ درصد
	۶/۳۱±۱/۳۲	۶/۵۴±۱/۴۴	۶/۱۱±۲/۳	FSH (واحد بین المللی / میلی لیتر)
	۶/۹۲±۱/۱۱	۷/۱±۲/۳۳	۶/۷±۲/۱۲	LH (واحد بین المللی / میلی لیتر)
	۱۳/۳±۵/۳	۱۳/۲±۲/۱	۱۱/۵±۲/۱	تستوسترون (نانوگرم / لیتر)
	۶/۹±۱/۵	۷/۳±۱/۵۲	۷/۳±۱/۳	پرولاکتین (نانوگرم / میلی لیتر)
۱/۲±۰/۹۹	۱/۸±۰/۷۸	۲/۸±۰/۹۸	۰/۰۰۰۱	کاسپاز-۹ (واحد بین المللی / ۱۰۶)
۱/۵۵±۰/۷۸	۲/۱±۰/۶۸	۳/۹±۰/۸۴	۰/۰۰۰۱	مالون دی آلدئید (نانومول / میلی لیتر)

مجله علمی
دانشگاه علوم پزشکی قزوین

جدول ۴. فراوانی اسپرم‌های دیزومیک در نمونه‌های اسپرم با ژنوتیپ‌های GG,GA,AA پلی مورفیسم ژن TNF-α

AA	GA	GG	نوع دیزومی کروموزومی
۲۹	۱۵/۵	۱۳	تعداد بیماران (درصد)
۰/۰۶۶±۰/۰۲۱	۰/۰۵۱±۰/۰۳۱	۰/۰۵۵±۰/۰۱۱	XX
۰/۶۴۳±۰/۱۲۳*	۰/۰۵۱±۰/۰۳۱	۰/۰۷۵±۰/۰۴۵	XY
۰/۰۲۳±۰/۰۲۳	۰/۰۱۲±۰/۰۲۳	۰/۰۳۳±۰/۰۱۲	YY

مجله علمی
دانشگاه علوم پزشکی قزوین

* فراوانی بالا و معنی دار دیزومی کروموزومی‌های X,Y را در اسپرم افراد با ژنوتیپ AA نشان می‌دهد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی قزوین با کد IR.QUMS.REC.1395.200 مورد تأیید قرار گرفته است.

حامی مالی

این مطالعه حاصل پایان نامه دانشجویان الناز ریاضی و لیلا مخبر در رشته پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی، نگارش و تحلیل داده‌ها، مدیریت و نظارت بر پروژه: سحر مقبلی‌نژاد؛ تأمین مالی و ویراستاری: رضا نجفی‌پور؛ اعتبارسنجی، ویراستاری و همکاری در نمونه‌گیری: شکوه‌السادات ابوترابی؛ روش‌شناسی و انجام پروژه: الناز ریاضی و لیلا مخبر.

تعارض منافع

نویسندگان این تحقیق هیچ‌گونه تعارض منافی ندارند.

تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین کمال تشکر و قدردانی را داریم.

سیتوکروم C از میتوکندری و شروع آپوپتوز می‌شوند [۲۹-۳۱]. اگرچه این گونه‌های فعال اکسیژن در تولید و بیان یک‌سری از سیتوکاین‌ها نقش دارند، تعدادی از سیتوکاین‌ها می‌توانند تعادل بین فاکتورهای اکسیدانت و آنتی‌اکسیدانت را به هم بزنند و باعث تولید ROS شوند [۳۲، ۳۳].

در ارتباط با عملکرد TNF α (یکی از سیتوکاین‌ها) و تولید گونه‌های فعال اکسیژن، هم‌راستا با نتایج این تحقیق نشان داده شده است که افزایش TNF α در سمن باعث افزایش میزان مالون دی‌آلدهید و در نتیجه آسیب DNA اسپرم و کاهش پارامترهای نرمال اسپرم می‌شود [۳۴]. به علاوه در مطالعات دیگر نشان داده شد که خاصیت پروآپوپتوتیک TNF α از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن به وجود می‌آید که در نهایت باعث آسیب به غشای سلول اسپرم و قطعه‌قطعه شدن DNA اسپرم می‌شود [۲۹-۳۱]. در همین راستا، در این تحقیق افزایش میزان آسیب DNA اسپرم در بیماران با پلی‌مورفیسم TNF α که باعث افزایش میزان بیان و تولید آن می‌شود نشان داده شد. بخش جالب این تحقیق بررسی میزان آنیوپلوئیدی کروموزوم‌های جنسی در بیماران با ژنوتیپ‌های مختلف پلی‌مورفیسم TNF α بود. نتایج این مطالعه افزایش میزان دیزومی کروموزوم‌های جنسی در مردان با آلل A را نشان داد و یک ارتباط معنی‌دار مستقیمی بین آنیوپلوئیدی کروموزوم‌های جنسی و میزان آسیب DNA اسپرم وجود داشت. به طور کلی افزایش میزان آنیوپلوئیدی‌های کروموزوم‌های جنسی در نمونه اسپرم مردان نابارور با اولیگواسپرمیا، استنواسپرمیا و تراواسپرمیا نشان داده شده است [۳۵].

آنیوپلوئیدی کروموزوم‌های جنسی به دلیل جدانشدن صحیح کروموزوم‌ها در طی میتوز یا میوز است که آسیب DNA اسپرم می‌تواند یکی از تحریک‌کننده‌های این جدانشدن صحیح باشد. [۳۶-۳۸]. در بیماران با پلی‌مورفیسم ژن TNF α افزایش میزان آسیب DNA به دلیل افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن طبق مکانیسمی که در بالا ذکر شد است. اگرچه مکانیسم‌های متعددی برای آسیب DNA اسپرم وجود دارد، ولی مجاری باروری و اسپرم مردان به دلیل نوع فیزیولوژی مجاری و تولید اسیدهای چرب اشباع و نبود سیستم آنتی‌اکسیدانتی مهم‌ترین عامل تولید گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال آزاد است که در نهایت در جدانشدن صحیح کروموزوم‌ها تأثیر دارد [۳۹، ۴۰].

به طور کلی این مطالعه نشان داد که فراوانی آلل‌های مختلف این پلی‌مورفیسم در جمعیت‌های مختلف متفاوت است و پلی‌مورفیسم ۳۰۸-ژن TNF α باعث افزایش میزان استرس اکسیداتیو در سمن و در نتیجه کاهش پارامترهای اسپرم، آسیب DNA اسپرم و ناهنجاری‌های کروموزومی می‌شود.

References

- [1] Totonchi M, Mohseni Meybodi A, Borjian Boroujeni P, Sedighi Gilani M, Almadani N, Gourabi H. Clinical data for 185 infertile Iranian men with Y-chromosome microdeletion. *J Assist Reprod Genet.* 2012; 29: 847-53. [In Persian] [DOI:10.1007/s10815-012-9798-7] [PMID] [PMCID]
- [2] Moghbeli-Nejad S, Mozdarani H, Aleyasin A. Increased frequency of micronuclei in lymphocytes of infertile males after exposure to gamma irradiation: A possible sign of genomic instability. *J Assist Reprod Genet.* 2012; 29:89-94. [In Persian] [DOI:10.1007/s10815-011-9550-8] [PMID] [PMCID]
- [3] Yang Y, Xiao CY, Zhou-Cun A, Zhang SZ, Li X, Zhang SX. DAZ1/DAZ2 cluster deletion mediated by gr/gr recombination per se may not be sufficient for spermatogenesis impairment: A study of Chinese normozoospermic men. *Asian J Androl.* 2006; 8:183-7. [DOI:10.1111/j.1745-7262.2006.00121.x] [PMID]
- [4] Najafipour R, Rashvand Z, Alizadeh A, Aleyasin A, Moghbelinejad S. Association of G/T(rs222859) polymorphism in Exon 1 of YBX2 gene with azoospermia, among Iranian infertile males. *Andrologia.* 2016; 48:956-60. [In Persian] [DOI:10.1111/and.12537] [PMID]
- [5] Zalata AA, Hassan AH, Nada HA, Bragais FM, Agarwal A, Mostafa T. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphism and seminal anti-Müllerian hormone in fertile and infertile men. *Andrologia.* 2008; 40:392-7. [DOI:10.1111/j.1439-0272.2008.00877.x] [PMID]
- [6] Zalata AA, Mokhtar N, Badawy AEN, Othman G, Alghobary M, Mostafa T. Androgen receptor expression relationship with semen variables in infertile men with varicocele. *J Urol.* 2001; 3189:2243-7. [DOI:10.1016/j.juro.2012.11.112] [PMID]
- [7] Luo H, Li H, Yao N, Hu L, He T. Association between 3801T>C polymorphism of CYP1A1 and idiopathic male infertility risk: a systematic review and meta-analysis. *PLOS One.* 2014; 9: e86649. [DOI:10.1371/journal.pone.0086649] [PMID] [PMCID]
- [8] Mostafa T, Rashed LA, Nabil N, Fouad H, Sabry D, El-Saied DM. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism relationship with semen parameters and oxidative stress in infertile oligoasthenoteratozoospermic men. *Urology.* 2015; 85:1058-61. [DOI:10.1016/j.urology.2015.01.023] [PMID]
- [9] Marmenout A, Fransen L, Tavernier J, Van der Heyden J, Tizard R, et al. Molecular cloning and expression of human tumor necrosis factor and comparison with mouse tumor necrosis factor. *Eur J Biochem.* 1985; 4:515-22. [DOI:10.1111/j.1432-1033.1985.tb09226.x] [PMID]
- [10] Mauduit C, Besset V, Caussanel V, Benahmed M. Tumor necrosis factor alpha receptor p55 is under hormonal (follicle-stimulating hormone) control in testicular Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 224:631-7. [DOI:10.1006/bbrc.1996.1077] [PMID]
- [11] Said TM, Agarwal A, Falcone T, Sharma RK, Bedaiwy MA, Li L. Infliximab may reverse the toxic effects induced by tumor necrosis factor alpha in human spermatozoa: An in vitro model. *Fertil Steril.* 2005; 83:1665-73. [DOI:10.1016/j.fertnstert.2004.11.068] [PMID]
- [12] Qian L, Sun G, Zhou B, Wang G, Song J, He H. Study on the relationship between different cytokines in the semen of infertility patients. *Am J Reprod Immunol.* 2011; 66:157-61. [DOI:10.1111/j.1600-0897.2010.00980.x] [PMID]
- [13] Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction.* 2005; 129:505-14. [DOI:10.1530/rep.1.00531] [PMID]
- [14] Paul C, Murray AA, Spears N, Saunders A. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction.* 2008; 136:73-84. [DOI:10.1530/REP-08-0036] [PMID]
- [15] Grataroli R, Boussouar F, Benahmed M. Role of sphingosine in the tumor necrosis factor alpha stimulatory effect on iactatedehydrogenase A expression and activity in porcine Sertoli cells. *Biol Reprod.* 2000; 63:1473-81. [DOI:10.1095/biol-reprod63.5.1473] [PMID]
- [16] Barratt CL, De Jonge CJ. Clinical relevance of sperm DNA assessment: an update. *Fertil Steril.* 2010; 94:1958-9. [DOI:10.1016/j.fertnstert.2010.07.1050] [PMID]
- [17] Barratt CL, Aitken RJ, Bjorndahl L, Carrell DT, de Boer P, Kvist U, et al. Sperm DNA: Organization, protection and vulnerability: From basic science to clinical applications—a position report. *Hum Reprod.* 2010; 25:824-38. [DOI:10.1093/humrep/dep465] [PMID]
- [18] WHO: World Health Organization do that. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Geneva: WHO Press; 2013.
- [19] Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl.* 2006; 27(1):53-9. [DOI:10.2164/jandrol.05068] [PMID]
- [20] Rao B, Souflir JC, Martin M, David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Res.* 1989; 24:127-34. [DOI:10.1002/mrd.1120240202] [PMID]
- [21] Robbins WA, Vine MF, Truong KY, Everson RB. Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) to assess effects of smoking, caffeine, and alcohol on aneuploidy load in sperm of healthy men. *Environ Mol Mutagen.* 1997; 30:175-83. [DOI:10.1002/(SICI)1098-2280(1997)30:23.0.CO;2-A]
- [22] Ma L, Zhao J, Li T, He Y, Wang J, Xie L. Association between tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms and prostate cancer risk: A meta-analysis. *Diagn Pathol.* 2014; 9:74. [DOI:10.1186/1746-1596-9-74] [PMID] [PMCID]
- [23] Min L, Chen D, Qu L, Shou C. Tumor necrosis factor-alpha polymorphisms and colorectal cancer risk: A meta-analysis. *PLOS One.* 2014; 9:e85187. [DOI:10.1371/journal.pone.0085187] [PMID] [PMCID]
- [24] Tronchon V, Vialard F, El Sirkasi M, Dechaud H, Rollet J, Albert M. Tumor necrosis factor-alpha_308 polymorphism in infertile men with altered sperm production or motility. *Hum Reprod.* 2008; 23:2858-66. [DOI:10.1093/humrep/den277] [PMID]

- [25] Li T, Zhang W, Guo BH, Li GP, Luo NQ, Guo QH. Tumor necrosis factor alpha -308 polymorphism and asthenospermia. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2010; 16:998-1003.
- [26] Shukla KK, Agnihotri S, Gupta A, Mahdi AA, Mohamed EA, Sankhwar SN. Significant association of TNF α and IL-6 gene with male infertility - an explorative study in indian populations of Uttar Pradesh. *Immunol Lett*. 2013; 156:30-7. [DOI:10.1016/j.imlet.2013.08.011] [PMID]
- [27] Khademi Bami M, Dehghan Tezerjani M, Montazeri F, Ashrafzadeh Mehrjardi H R, Ghasemi-Esmailabad S, Sheikha MH, et al. Tumor necrosis factor alpha -308 G/A single nucleotide polymorphism and risk of sperm abnormalities in iranian males. *Int J Fertil Steril*. 2017; 11:112-6.
- [28] Varela MA, Amos W. Heterogeneous distribution of SNPs in the human genome: Microsatellites as predictors of nucleotide diversity and divergence. *Genomics*. 2010; 95:151-9. [DOI:10.1016/j.ygeno.2009.12.003] [PMID]
- [29] Kurz C, Bentz EK, Denschlag D, Berner I, Keck C, Tempfer CB. TNF alpha -308 C/T and -863 C/G polymorphisms and spermogram characteristics. *Gynecol Obstet Invest*. 2008; 66:63-7. [DOI:10.1159/000126494] [PMID]
- [30] Perdichizzi A, Nicoletti F La, Vignera S, Barone N, D'Agata R, Icaro E. Effects of tumour necrosis factor-alpha on human sperm motility and apoptosis. *J Clin Immunol*. 2007; 27(2):152-62. [DOI:10.1007/s10875-007-9071-5] [PMID]
- [31] Tremellen K. Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. *Hum Reprod Update*. 2008; e14:243-58. [DOI:10.1093/humupd/dmn004] [PMID]
- [32] Moretti E, Collodel G, Mazzi L, Campagna M, Iacoponi F, Figura N. Resistin, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and human semen parameters in the presence of leukocytospermia, smoking habit, and varicocele. *Fertil Steril*. 2014; 102:354-60. [DOI:10.1016/j.fertnstert.2014.04.017] [PMID]
- [33] Leandros A, Lazaros Nectaria V, Xita Anthoula L, Chatzikyriakidou Apostolos I, Kaponis Nicolaos G, Grigoriadis Elissavet G, et al. Association of TNF α , TNFR1, and TNFR2 polymorphisms with sperm concentration and motility. *J Androl*. 2012; 33:74-80. [DOI:10.2164/jandrol.110.011486] [PMID]
- [34] Calogero AE, De Palm A, Grazioso C, Barone N, Romeo R, Rappazzo G, et al. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Hum Reprod*. 2001; 16:1172-9. [DOI:10.1093/humrep/16.6.1172] [PMID]
- [35] Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: Threshold value in male fertility. *Hum Reprod*. 2005; 20:3446-51. [DOI:10.1093/humrep/dei231] [PMID]
- [36] Hassold T, Hunt P. To ERR (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Gen*. 2001; 22:80-291. [DOI:10.1038/35066065] [PMID]
- [37] Allamaneni SS, Naughton CK, Sharma R K, Thomas AJ, Agarwal A. Increased seminal reactive oxygen species levels in patients with varicoceles correlate with varicocele grade but not with testis size. *Fertil Steril*. 2004; 82:1684-6. [DOI:10.1016/j.fertnstert.2004.04.071] [PMID]
- [38] Chen H, Zhao H, Huang X, Chen G, Yang Z, Sun W et al. Does high load of oxidants in human semen contribute to male factor infertility? *Antioxid Redox Signal*. 2011; 16:754-9. [DOI:10.1089/ars.2011.4461] [PMID]
- [39] Agarwal A, Virk G, Ong Ch, Plessis S. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health*. 2014; 32:1-17. [DOI:10.5534/wjmh.2014.32.1.1] [PMID] [PMCID]
- [40] Agarwal A, Cho CL, Esteves SC, Majzoub A. Reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. *Transl Androl Urol*. 2017; 6:S695-S696. [DOI:10.21037/tau.2017.05.40] [PMID] [PMCID]

This Page Intentionally Left Blank