

بررسی ارتباط بین واریانت تک نوکلئوتیدی rs2228570 از ژن VDR با اختلالات اسپرما توژنز در مردان نابارور ایرانی

چکیده

دریافت: ۱۳۹۴/۰۴/۲۰ ویرایش: ۱۳۹۵/۰۳/۱۸ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۰۴ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۴/۰۵

مهدی محبی، فاطمه کرمی

محمد حسین مدرسی

سید محمد اکرمی*

گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

زمینه و هدف: نقش ویتامین D در ناباروری در مدل موشی فاقد گیرنده VDR کاهش قابل توجه در تعداد اسپرم و تحرک اسپرم مشخص شده است. با توجه به بیان VDR در سیستم تولیدمثلی مردانه انسان، مطالعه حاضر با هدف بررسی همراهی بین واریانت rs2228570 با ناباروری انجام گردید.

روش بررسی: مطالعه به صورت مورد-شاهدی (Case-control) بر روی مردان نابارور آزواسپرمی و لیگواسپرمی مراجعه کننده به پژوهشگاه ابن سینا تهران بین فروردین ۱۳۹۳ تا اردیبهشت ۱۳۹۴ انجام گرفت. واکنش Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) بر روی ۱۰۰ نمونه نرمال، ۱۰۰ بیمار آزواسپرمی و ۱۰۰ بیمار لیگواسپرمی انجام گردید. متغیرهای کمی (مثل سن) و متغیرهای کیفی (مانند فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی) بین سه گروه مقایسه شدند.

یافته‌ها: آزمون Chi-square تفاوت معناداری را بین فراوانی ژنوتیپی در بین دو گروه بیمار با گروه کنترل نشان نداد. آزواسپرم و کنترل $P=0/5$ و لیگواسپرم و کنترل $P=0/09$ در مقایسه فراوانی ژنوتیپ CC با افراد دارای ژنوتیپ CT و TT (آزواسپرم و کنترل، $OR=0/77$ $P=0/48$ و لیگواسپرم و کنترل $OR=0/77$ $P=0/17$) و در مقایسه فراوانی ژنوتیپ TT با افراد دارای ژنوتیپ CT و CC (آزواسپرم و کنترل $OR=3/03$ $P=0/49$ و لیگواسپرم و کنترل $OR=7/21$ $P=0/19$) تفاوت فراوانی این ژنوتیپ‌ها در بین دو گروه معنادار نبوده و شانس ابتلا به بیماری را زیاد نکرده و یا واجد اثر حفاظتی در برابر بیماری نبودند.

نتیجه گیری: بر اساس یافته‌ها، ارتباط بین پلی مورفیسم مورد نظر با ناباروری معنادار نبوده و بررسی دیگر واریانت‌ها ارتباط با ناباروری را ممکن است نشان دهند.

کلمات کلیدی: مطالعات مورد-شاهدی، ویتامین D، تعداد اسپرم، ناباروری، آزواسپرمی، لیگواسپرمی.

* نویسنده مسئول: تهران، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه ژنتیک پزشکی.
کد پستی: ۱۳۱۵۱-۱۴۱۷۶

تلفن: ۰۲۱-۸۸۹۵۳۰۰۵

E-mail: Akramism@tums.ac.ir

مقدمه

آزواسپرمی، اختلالات هورمونی، رشد نامناسب بیضه‌ها، برخی داروها و برخی عفونت‌های دستگاه تناسلی اشاره کرد که سبب عدم تولید اسپرم و یا تعداد بسیار کم یا کیفیت بد اسپرم‌های تولید شده می‌گردند.^۱ در ۷۰٪-۶۰ موارد دلیلی برای ناباروری مردان پیدا نمی‌شود که به آن ناباروری ایدیوپاتیک گفته می‌شود که مرد سابقه پیشین مشکلات باروری نداشته و در تست‌های فیزیکی یا هورمونی انجام شده در آزمایشگاه هیچگونه نتیجه غیرطبیعی دیده نمی‌شود.^۲

ناباروری در تعریف به معنای عدم توانایی در بروز حاملگی پس از یک سال مقاربت بدون جلوگیری است. ۱۵٪-۱۰ زوجین در سنین باروری خود با این مشکل مواجه هستند و به‌طور کلی ۵۰٪-۳۰ ناباروری زوجین مربوط به فاکتورهای مردانه می‌باشد. از جمله عوامل مردانه ناباروری می‌توان به سندرم کلاین فلتر، واریکوسل،

ویتامین D هستند و همچنین کمبود ویتامین D در جوندگان باعث باروری ناقص، تعداد کم اسپرم و تعداد کم اسپرمتوزوآی متحرک می‌شود. ارتباط مستقیمی بین سطوح سرمی ویتامین D و تحرک اسپرم دیده شده است. افزایش غلظت‌های درون سلولی کلسیم از طریق مخازن کلسیمی درون سلولی که به واسطه گیرنده ویتامین D کنترل می‌شوند، موجب تحرک اسپرم و واکنش آکروزوم در شرایط *in vitro* شده، باعث افزایش غلظت‌های درون سلولی کلسیم، تحرک اسپرم و واکنش آکروزوم در اسپرم بالغ شده است.^{۱۰} بیان گیرنده ویتامین D و آنزیم‌های متابولیزه‌کننده آن در اواخر اسپرمتوزن، اسپرم بالغ و مجرای خروجی مایع منی و به‌صورت شاخص در ناحیه Post-acrosome سر، گردن و ناحیه میانی اسپرم بیرون ریخته شده مشاهده شده است. بر خلاف مردان نرمال، تنها تعداد کمی از مردان نابارور، بیان قابل ردیابی از VDR و آنزیم‌های متابولیزه‌کننده ویتامین D در اسپرم شان داشته‌اند. همچنین آنزیم CYP24A1 که آنزیم غیرفعال‌کننده ویتامین D می‌باشد، بیان بارزی در ناحیه آنولوس اسپرم انسانی دارد و به‌عنوان شاخصی از تشکیل آن می‌باشد.^{۱۱}

داده‌های اپیدمیولوژیک نیز رابطه بین ویتامین D و باروری را با مشاهده تغییرات فصلی در میزان بارداری در کشورهای نیمکره شمال که در تابستان به اوج خود می‌رسد و با تغییرات فصلی در مقادیر سرمی 25-hydroxyvitamin D همخوانی دارد را تایید می‌کنند.^{۱۲} با توجه به نقش مهم تحرک و مورفولوژی اسپرم در توانایی آن در بارور کردن تخمک و اثراتی که ویتامین D و به موازات آن گیرنده ویتامین D بر فرآیند اسپرمتوزن و تحرک اسپرم (ناحیه آنولوس) دارند و از آنجایی که کلیه اثرات درون سلولی ویتامین D به گیرنده آن (VDR) که بیان ژن‌های حاوی Vitamin D response elements (VDRE) را کنترل می‌کند وابسته است، احتمال دارد ژن این گیرنده و نحوه عملکرد آن در پاتوزن ناباروری مردان موثر باشد. پلی‌مورفیسم rs2228570 در اگزون ۲ ژن VDR قرار دارد. این پلی‌مورفیسم که به کدون آغازگر (Start codon polymorphism, SCP) معروف است و شامل تغییر نوکلئوتیدی (ATG)T به (ACG)C، در اولین نقطه شروع ترجمه می‌شود و باعث جابه‌جایی متیونین از اولین اسید آمینه به چهارمین نقطه در پروتئین می‌شود و در نهایت دو گونه پروتئین تولید می‌کند. یک گونه ۴۲۴ آمینواسیدی و یک گونه ۴۲۷ آمینواسیدی که

طیف اثرات وابسته به ویتامین D در مطالعات سال‌های اخیر بسیار فراتر از تنظیم سلامت استخوان و برقراری هوموستاز کلسیم مشاهده شده است. منبع اصلی ویتامین D در گردش خون به صورت داخلی و تحت اثر اشعه UVB خورشید در پوست ساخته می‌شود که در آن 7-dehydrocholesterol به فرم غیرفعال ویتامین D یعنی Cholecalciferol تبدیل می‌شود.^۴ Cholecalciferol توسط آنزیم کبدی CYP2R1 (25-hydroxylation) به 25-OHD3 تبدیل می‌شود و سپس توسط آنزیم کلیوی CYP27B1 (1-alpha-hydroxylase) به فرم فعال 1,25-(OH)₂D₃ تبدیل می‌شود که به واسطه گیرنده ویتامین D (Vitamin D receptor, VDR) اثرات درون سلولی خود را تا زمانی که به وسیله آنزیم CYP24A1 غیرفعال شود اجرا می‌کند.^۵

VDR اثر خود را به شکل غیرژنومی از راه غشای سیتوپلاسم که بسیار سریع می‌باشد و یا به‌صورت هسته‌ای با متصل شدن به عناصر واکنش به ویتامین D (VDRE) در ژن‌های هدف اجرا می‌کند. VDR یک عامل رونویسی متصل شونده به DNA است. VDR با اتصال به RXR هترودیمری را تشکیل می‌دهد که می‌تواند عناصر واکنش به ویتامین D را در ژن‌هایی که توسط ویتامین D کنترل می‌شوند، شناسایی کند.^۶ پایین بودن نرخ باروری در جانوران نر که دچار کمبود ویتامین D هستند (مثل موش، رت، Wild boar) به نظر می‌رسد که در اثر کم شدن تحرک اسپرم و گاهی کیفیت مورفولوژیکی پایین اسپرم‌ها ایجاد شده باشد.^{۷-۸} در برخی مطالعات پیشنهاد می‌گردد که باروری با رفع هیپوکلسمی که به‌صورت همزمان با کمبود ویتامین D ایجاد می‌شود به حالت نرمال برگردانده شده، ولی بررسی دوباره داده‌ها در مطالعه‌ای دیگر نشان داد که نرخ باروری همچنان در رت‌هایی که با اسپرم رت نر با کمبود ویتامین و دارای کلسیم نرمال آمیخته شدند نسبت به رت‌های ماده‌ای که با اسپرم رت نر بدون کمبود ویتامین D و کلسیم نرمال، آمیخته شدند، ۴۳٪ کمتر است. با این مشاهدات اثر مستقیم ویتامین D بر روی باروری جنس نر پذیرفتنی است که این مشاهدات تاثیر مفید آن را نشان می‌دهند.^{۳،۲۲}

در مطالعه جامعی که بر روی باروری مدل موشی که فاقد گیرنده ویتامین D بود (VDR-null)، کاهش قابل توجهی در تعداد اسپرم (۰.۴۰٪) و تحرک اسپرم (۹ برابر کمتر) دیده شد که منجر به ناباروری این موش‌ها شد.^۹ موش‌های ناک اوت که فاقد گیرنده عملکردی

کروموزومی در کاریوتایپ بودند و همچنین افرادی که تمایل به آزمایشات تهاجمی و یا تکرار آزمایشی در فواصل زمانی نداشتند از مطالعه خارج شدند. گروه کنترل از بین مردانی انتخاب شد که دارای باروری طبیعی بوده و از نظر تمامی ویژگی‌های دیگر به جز ناباروری مشابه گروه بیماران بودند.

این ویژگی‌ها شامل گروه سنی و نژاد می‌باشند. از تمامی شرکت‌کنندگان پس از توضیحات لازم در خصوص مطالعه، رضایت‌نامه کتبی دریافت گردید. نمونه‌های خون محیطی در فالتکون ۱۵ حاوی $200 \mu\text{l}$ اتیلن دی‌آمین تتراسیتیک اسید (EDTA) به‌عنوان ضد انعقاد، در دمای 20°C (به مدت طولانی) و یا در دمای 4°C (برای مدت زمان کوتاه‌تر) نگهداری شدند و به گروه ژنتیک دانشکده پزشکی دانشگاه تهران جهت استخراج DNA، انتقال داده شدند. حدود ۵ ml از نمونه خون محیطی از هر بیمار گرفته شد. DNA با استفاده از روش استاندارد نمک اشباع استخراج و پس از بررسی کمی DNA استخراج شده توسط Spectrophotometer, NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA) 2000، در 20°C نگهداری گردید. تعیین ژنوتیپ با استفاده از روش استاندارد Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) انجام شد. توالی پرایمرها برای پلی‌مورفیسم rs2228570 در جدول ۱ آمده است.

واکنش PCR در Thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) انجام شد: مراحل PCR برای چندشکلی rs2228570 مرحله اول: یک سیکل در 95°C به مدت پنج دقیقه. مرحله دوم: ۳۵ سیکل در 95°C در ۳۰ ثانیه، 59°C به مدت ۳۰ ثانیه، 72°C در ۴۰ ثانیه. مرحله سوم: یک سیکل 72°C به مدت پنج دقیقه. برای هضم آنزیمی محصولات PCR حاوی چندشکلی rs2228570 از آنزیم محدودگر FokI, 2,500 units (Jena Bioscience GmbH, Jena, Germany) $10 \text{ u}/\mu\text{l}$ استفاده شد که $6/8 \mu\text{l}$ از محصولات PCR تحت اثر ۳ واحد آنزیم در دمای 37°C در انکوباتور به صورت طول شب (۱۵-۱۳ ساعت) قرار داده شد. پس از این مدت، میکروتیوب‌ها خارج شده و بر روی ژل آگارز ۳ رانده شد. برای چندشکلی rs2228570 اگر نمونه‌ها بر روی ژل آگارز حاوی قطعات ۲۰۳ و ۷۰ جفت باز باشد، نشانه وجود آلل T، اگر نمونه‌ها بر روی ژل آگارز حاوی محصول بدون برش به طول ۲۷۳

نوع کوتاه (424aa)، $1/7$ برابر فعال‌تر از نوع بلند (427aa) می‌باشد.^{۱۳} نوع بلند کمتر به 1,25-(OH)2D3 واکنش می‌دهد و فعالیت رونویسی آن کمتر است.^{۱۴} نشان داده شده است که نوع ۴۲۴ به شکل بهتری با عامل رونویسی TFIIIB بر همکنش نشان می‌دهد و به‌عنوان یک عامل رونویسی فعال‌تر از نوع ۴۲۷ عمل می‌کند.

ناحیه N ترمینال پروتیین VDR انسانی با ایزوفریم ۴۲۴ به‌عنوان یک فعال‌کننده رونویسی بهتر با TFIIIB واکنش می‌دهد.^{۱۵} با توجه به این تفاوت عملکردی در دو شکل متفاوت این واریانت تک نوکلئوتیدی و اینکه نوع کم فعال پروتیین (427aa) به خوبی نوع فعال‌تر (424aa) اثرات وابسته به ویتامین D را در تحرک اسپرم و باروری اعمال نمی‌کند، در این مطالعه ارتباط احتمالی بین این واریانت تک نوکلئوتیدی (rs2228570) از ژن VDR با اختلالات اسپرماتوژنز در مردان نابارور ایرانی بررسی گردید. مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط بین واریانت تک نوکلئوتیدی rs2228570 از ژن VDR و تاثیر احتمالی این پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) بر فنوتیپ مردان نابارور دارای اختلال در اسپرماتوژنز انجام گردید.

روش بررسی

مطالعه به صورت مورد-شاهدی بر روی مردان نابارور مراجعه‌کننده به پژوهشگاه ابن‌سینا تهران از فروردین ۱۳۹۳ تا اردیبهشت ۱۳۹۴ انجام گرفت.

معیارهای ورود گروه بیماران مردان نابارور دارای اختلال در اسپرماتوژنز بودند که در دو گروه متشکل از ۱۰۰ فرد مبتلا به الیگواسپرمی، ۱۰۰ فرد مبتلا به آزواسپرمی (هر دو از نوع غیر انسدادی) قرار گرفتند. تشخیص ناباروری در این افراد به روش‌های اختصاصی مانند آنالیز میکروسکوپی سیمن (انجام دو مرتبه آزمایش تجزیه مایع سیمن به فواصل چهار هفته) و آنالیز هورمونی و نیز روش‌های تهاجمی مثل بیوپسی بافت بیضه و آنالیز پاتولوژی، زیر نظر پزشک متخصص انجام شد. پس از بررسی مردانی که به دلایل شناخته شده مثل وجود واریکوسل بیضه، کم کاری ثانویه بیضه، مشکل در انزال (مثل قطع نخاع و بیماری دیابت)، فقدان مادرزادی دوطرفه وازودفران (CBAVD)، ریز حذفی کروموزوم Y، سندرم کلاین فلتر، ناباروری‌های انسدادی و جابه‌جایی‌ها و ناهنجاری‌های

معناداری را بین فراوانی ژنوتیپی در بین هر یک از دو گروه بیمار با گروه کنترل نشان نداد. برای آزو و کنترل: $P=0/5$ و برای الیگو و کنترل: $P=0/09$ بود. جدول ۳ فراوانی آلی در نمونه‌های بیمار و شاهد را نشان می‌دهد.

در مقایسه فراوانی ژنوتیپ CC با افراد دارای ژنوتیپ CT و TT مشاهده شد که تفاوت فراوانی ژنوتیپ CC در گروه شاهد و بیماران معنادار نمی‌باشد و این ژنوتیپ شانس ابتلا به بیماری را زیاد نکرده و یا وجد اثر حفاظتی در برابر این بیماری نمی‌باشد.

بین گروه آزواسپرم و کنترل $P=0/48$ ($OR=0/77$) ($OR=0/77$)
 بین گروه الیگو اسپرم و کنترل $P=0/17$ ($CI/95: 0/3171-1/2310$)
 محاسبه شد.

در مقایسه فراوانی ژنوتیپ TT با افراد دارای ژنوتیپ CT و CC نیز تفاوت فراوانی ژنوتیپ TT در گروه شاهد و بیماران معنادار نبود. مقادیر P و Odds Ratio بین گروه آزواسپرم و کنترل $P=0/49$ ($OR=0/03$) ($CI/95: 0/1220-75/2834$) و بین گروه الیگو اسپرم و کنترل $P=0/19$ ($OR=7/21$) ($CI/95: 0/3678-141/5321$) می‌باشند.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده

rs2228570	F	AGCTGGCCCTGGCACTGACT
	R	CCCTTCATGGAAACACCTTGCTTC

جفت باز باشند نشانه وجود آلل C و اگر سه قطعه با اندازه‌های ۲۷۳، ۲۰۳، ۷۰ جفت باز بر روی ژل مشاهده شود، نشانه آلل TC می‌باشد. نتایج ژنوتیپ چندشکلی rs2228570 در شکل ۱ نشان داده شده‌اند. نتایج به‌دست آمده با استفاده از SPSS software, version 22 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) مورد بررسی قرار گرفتند.

توزیع متغیرهای کمی با توجه به توزیع آن‌ها با استفاده از Student's t-test و توزیع متغیرهای کیفی با استفاده از Chi-square test بین گروه‌های مورد و شاهد و نیز بین ژنوتیپ‌های مختلف مقایسه شد. مقادیر ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۲۰۰ نمونه در گروه مورد و ۱۰۰ نمونه در گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. انتخاب افراد دو گروه مورد و شاهد طوری انجام شد که دو گروه از لحاظ جنس و سن هم‌متا باشند. به طوری که متوسط سن در گروه بیماران الیگواسپرمی $39/3 \pm 8/8$ و آزواسپرمی $39/1 \pm 7/4$ و در گروه شاهد $39/4 \pm 7/5$ بود (جدول ۲). با استفاده از آزمون One-way ANOVA مشخص شد که از لحاظ سنی تفاوت معناداری بین موارد شاهد و کنترل وجود ندارد ($P=0/67$, F statistic=0/38). ۱۰۰ نمونه اولیگو و ۱۰۰ نمونه آزو جداگانه با گروه کنترل مقایسه شدند. جدول ۲ فراوانی‌های ژنوتیپی نمونه‌های بیمار و کنترل را نشان می‌دهد. Chi-square test تفاوت

جدول ۲: فراوانی‌های ژنوتیپی نمونه‌های بیمار و کنترل در چندشکلی rs2228570

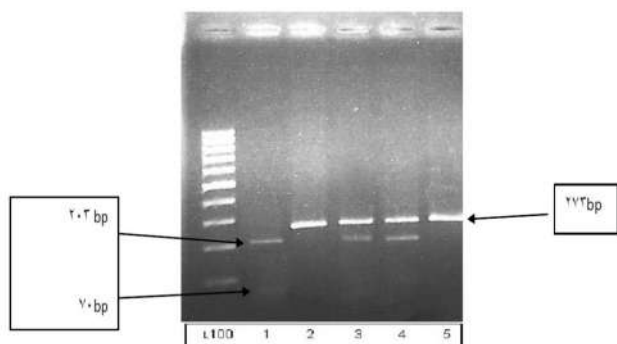
نمونه	فرکانس ژنوتیپی: Rs 2228570	مجموع			p*
		TT	CT	CC	
بیمار (درصد در گروه)	آزواسپرمی	۱(٪۱)	۲۱(٪۲۱)	۷۸(٪۷۸)	۰/۵
	الیگواسپرمی	۳(٪۳)	۲۳(٪۲۳)	۷۴(٪۷۴)	۰/۰۹
کنترل (درصد در گروه)		۰(٪۰)	۱۸(٪۱۸)	۸۲(٪۸۲)	
مجموع (درصد کل)		۴(٪۱/۳۳)	۶۲(٪۲۰/۶۶)	۲۳۴(٪۷۸)	

*آزمون آماری: Chi-square test, $P<0/05$ معنادار در نظر گرفته شد.

جدول ۳: فراوانی آللی مربوط به جایگاه چندشکلی rs2228570 در نمونه‌های بیمار و شاهد

نمونه	فرکانس آللی: ۲۲۲۸۵۷۰ Rs		مجموع	P*
	T	C		
بیمار (درصد در گروه)	۲۳(٪۱۱/۵)	۱۷۷(٪۸۸/۵)	۲۰۰(٪۱۰۰)	۰/۳
الیگواسپرمی	۲۹(٪۱۴/۵)	۱۷۱(٪۸۵/۵)	۲۰۰(٪۱۰۰)	۰/۰۸
کنترل (درصد در گروه)	۱۸(٪۹)	۱۸۲(٪۹۱)	۲۰۰(٪۱۰۰)	
مجموع (درصد کل)	۷۰(٪۱۱/۶۶)	۵۳۰(٪۸۸/۳۳)	۶۰۰(٪۱۰۰)	

*آزمون آماری: Chi-square test, $P < 0/05$. معنادار در نظر گرفته شد.



شکل ۱: نتیجه هضم آنزیمی محصولات PCR در ناحیه چندشکلی rs2228570

۱: برش آنزیمی هر دو رشته، ژنوتیپ هموزیگوت (TT یا ff)، دو قطعه به طول‌های ۲۰۳ و ۷۰ جفت باز. ۲: عدم برش آنزیمی هر دو رشته، ژنوتیپ هموزیگوت (CC یا FF) یک قطعه به طول ۲۷۳ جفت باز. ۳ و ۴: برش آنزیمی تنها یک رشته، ژنوتیپ هتروزیگوت (TC یا Ff) سه قطعه با اندازه‌های ۲۷۳، ۲۰۳ و ۷۰ جفت باز. ۵: محصول PCR پیش از برش توسط آنزیم FokI
L100: DNA marker size: 100 bp

انجام دادند فراوانی آللی در چندشکلی rs2228570 برای آلل‌های C(F) و T(f) به ترتیب ۳/۷۳ و ۶۷/۲۶٪ در گروه نرمال گزارش شد.^{۲۰} در مطالعه دیگری که توسط Shahbazi و همکاران انجام گرفته است فراوانی آللی در چندشکلی rs2228570 برای آلل‌های C(F) و T(f) به ترتیب ۷۲ و ۲۸٪ در گروه نرمال گزارش شد^{۲۱} که با فراوانی‌های ۹۱ و ۹ درصدی حاصل از این مطالعه در گروه نرمال قدری تفاوت داشتند. به‌طور کلی در این مطالعه فراوانی‌های آللی در این چندشکلی در گروه‌های بیمار و شاهد با تعدادی از فراوانی‌های آللی ثبت شده همین چندشکلی در جمعیت‌های مختلف در

جدول ۴: مقایسه افراد گروه بیمار و گروه شاهد از نظر توزیع سنی

سن	تعداد	میانگین	انحراف معیار
بیمار	۱۰۰	۳۹/۴	۵/۰۷
کنترل			
الیگواسپرمی	۱۰۰	۳۹/۳	۴/۸
آزواسپرمی	۱۰۰	۳۹/۱	۴/۷

*آزمون آماری: One-way ANOVA test, $P < 0/05$. معنادار در نظر گرفته شد.

بحث

پژوهش‌های پیشین پیشنهاد دادند که ویتامین D عملکردهایی در سیستم تولیدمثلی دارد. وجود اسپرم در مجرای تناسلی رت‌های ماده که با رت‌های نر دچار کمبود ویتامین D آمیزش داده شده بودند تا ۴۵٪ نسبت به رت‌هایی که با رت‌های نر بدون کمبود ویتامین D آمیزش داده شده بودند، کمتر بود.^۶ پلی‌مورفیسم rs2228570 به خوبی در مطالعات مربوط به بیماری‌های ایمنی و سرطان‌های مختلف بررسی شده و ارتباطات معنادار زیادی با این واریانت دیده شده است.^{۱۶-۱۸} Monticello و همکاران نقش عملکردی چندشکلی FokI را قویا تایید کردند. آن‌ها نشان دادند که غلظت سرمی ویتامین D به شکل معناداری در افراد بیمار SLE دارای ژنوتیپ F/F نسبت به بیماران دارای ژنوتیپ F/F بیشتر است که نشان‌دهنده فعالیت بیشتر پروتیین کوتاه‌تر می‌باشد.^{۱۹} در مطالعه‌ای که Rashedi و همکاران

حاصله و انجام مطالعه به شکل Family-based که نسبت به مطالعه حاضر که Population-based می‌باشد از دقت بالاتری برخوردار است و محدودیت‌های گفته شده مانند هتروژنی جمعیتی و ساختار جمعیتی در این نوع مطالعات اثری ندارد. بررسی تعداد بیشتری از چندشکلی‌های ژن VDR و اثر هر یک از آن‌ها به تنهایی و هم در ترکیب با دیگر چندشکلی‌ها زیرا که گاهی یک چندشکلی نمی‌تواند اثر خود را به تنهایی اعمال کند، بلکه در ترکیب با دیگر چندشکلی‌ها و در کنار آن‌ها نقش خود را ایفا می‌کند و خطر بیماری را بالا یا پایین می‌برد.

تجزیه و تحلیل هاپلوتیپ‌های متفاوت چندشکلی‌های واقع شده در نزدیکی یکدیگر و بررسی این که آیا هاپلوتیپ ویژه‌ای با بیماری مورد نظر ارتباط معناداری دارد. بررسی بر روی دیگر گروه‌های قومی و فاکتورهای محیطی که با ژن VDR در تعامل هستند می‌توانند در درک بهتر نقش VDR در ناباروری کمک‌کننده باشند. بررسی اثر و ارتباط دیگر ژن‌های نامزد برای ناباروری مردان با ژن VDR زیرا که میان‌کنش این ژن با دیگر ژن‌ها می‌تواند بر چگونگی پیشرفت و روند ناباروری مردان مؤثر باشد.

به علت وجود ویتامین D در مقادیر کافی در مجرای تناسلی زنان که باعث افزایش تحرک اسپرم و واکنش آکروزوم و تسهیل باروری تخمک توسط اسپرم می‌شود، می‌توان با کنترل غلظت‌های ویتامین D در محیط در مواردی مانند In vitro fertilization (IVF)، کیفیت و بازدهی را افزایش داد. از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم تعیین سطح ویتامین D سرم اشاره کرد که پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده سطح آن بررسی و ارتباط آن با پلی‌مورفیسم‌ها بررسی شود و در نهایت بررسی‌های عملکردی جهت روشن شدن مکانیسم‌های مربوط به این چندشکلی‌ها در روند اسپرمتوزن انجام گیرد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ارتباط معناداری بین گروه‌های مورد و شاهد وجود نداشته و ارتباطی بین این چندشکلی و فنوتیپ مورد مطالعه یعنی ناباروری مردان مشاهده نشد.

سپاسگزاری: این مطالعه با حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران (شماره طرح: ۲۶۵۸۱) انجام شده است. از مسئولین پژوهشکده ابن‌سینا برای همکاری و حمایت تشکر می‌کنیم. همچنین قدردانی فراوان از گروه بیماران و شاهد که حاضر به شرکت در این مطالعه شدند.

بخش Diversity population پایگاه اینترنتی dbSNP بسیار نزدیک می‌باشند.

در مورد rs2228570 ژنوتیپ مشاهده شده در بین افراد گروه‌های مورد و شاهد تفاوت معناداری را نشان نداد، بنابراین ارتباط معناداری بین آن دو گروه وجود نداشته و بر این اساس ارتباطی بین این چندشکلی و فنوتیپ مورد مطالعه یعنی ناباروری مردان مشاهده نشد. در این مطالعه فراوانی آلل T در جایگاه FokI در بین بیماران بیشتر از گروه کنترل بود که می‌توان این نتیجه را به شکل‌های مختلف تفسیر کرد، به این معنی که فراوانی بالاتر برخی از چندشکلی‌ها در بیماران را نمی‌توان در نظر نگرفت زیرا می‌تواند نشانه‌ی وجود ارتباط بین چندشکلی مورد نظر و بیماری باشد، ولی محدودیت‌های مطالعه حاضر موجب شده که مقدار P به کمتر از ۰/۰۵ نرسیده و نتایج از نظر آماری معنادار نشان ندهند.

از جمله دلایل نتایج به‌دست آمده در مورد چندشکلی rs2228570 می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: تعداد به نسبت کم نمونه‌ها. تعداد نمونه‌ها در چنین مطالعاتی اثر بسیار مهمی بر قدرت مطالعه در نشان دادن ارتباط چندشکلی‌ها با بیماری دارد. زیرا احتمال است که افزایش تعداد نمونه‌ها تاثیر بسزایی بر مقدار P داشته و می‌تواند میزان آن را تغییر دهد.

نکته بسیار مهم دیگر، ژنتیک هتروژن و فراوانی‌های گوناگون آللی در جمعیت‌ها با نژادها و قوم‌های گوناگون است. کشور ایران و به ویژه استان تهران متشکل از جمعیت‌های بسیار متنوع با نژادهای گوناگون می‌باشد.

به دلایل گوناگون اجتماعی- فرهنگی مانند ازدواج‌های خویشاوندی و تعصب‌های خاص نژادی در بین قوم‌های متفاوت ایرانی، جمعیت‌های گوناگون ایرانی تا حدودی جدا از هم بوده و از نظر ژنتیکی تفاوت دارند.

از طرفی به دلیل مهاجرت فراوان از نقاط مختلف کشور به استان تهران جمعیت آن متشکل از جمعیت‌های کوچکتری از نژادهای مختلف کشور می‌باشد و این باعث ایجاد ساختار جمعیتی متفاوتی در گروه‌های بیمار و شاهد و ایجاد نتایج وجود یا عدم وجود همبستگی به شکل غیرواقعی می‌گردد.

پیشنهادات: ادامه پژوهش با تعداد نمونه‌های بیشتری از گروه بیمار و شاهد و انجام مطالعات Cohort و تجزیه و تحلیل نتایج

References

1. Shefi S, Turek PJ. Definition and current evaluation of subfertile men. *Int Braz J Urol* 2006;32(4):385-97.
2. Skakkebaek NE, Giwercman A, de Kretser D. Pathogenesis and management of male infertility. *Lancet* 1994;343(8911):1473-9.
3. Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 1993;341(8857):1392-5.
4. Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 : genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25(4):543-59.
5. Blomberg Jensen MI, Dissing S. Non-genomic effects of vitamin D in human spermatozoa. *Steroids* 2012;77(10):903-9.
6. Kwiecinski GG, Petrie GI, DeLuca HF. Vitamin D is necessary for reproductive functions of the male rat. *J Nutr* 1989;119(5):741-4.
7. Audet I, Laforest JP, Martineau GP, Matte JJ. Effect of vitamin supplements on some aspects of performance, vitamin status, and semen quality in boars. *J Anim Sci* 2004;82(2):626-33.
8. Sood S, Reghunandan R, Reghunandan V, Marya RK, Singh PI. Effect of vitamin D repletion on testicular function in vitamin D-deficient rats. *Ann Nutr Metab* 1995;39(2):95-8.
9. Kinuta K, Tanaka H, Moriwake T, Aya K, Kato S, Seino Y. Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology* 2000;141(4):1317-24.
10. Blomberg Jensen M, Bjerrum PJ, Jessen TE, Nielsen JE, Joensen UN, Olesen IA, et al. Vitamin D is positively associated with sperm motility and increases intracellular calcium in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2011;26(6):1307-17.
11. Blomberg Jensen M, Nielsen JE, Jørgensen A, Rajpert-De Meyts E, Kristensen DM, Jørgensen N, et al. Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. *Hum Reprod* 2010;25(5):1303-11.
12. Rojansky N, Brzezinski A, Schenker JG. Seasonality in human reproduction: an update. *Hum Reprod* 1992;7(6):735-45.
13. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res* 1997;12(6):915-21.
14. Colin EM, Weel AE, Uitterlinden AG, Buurman CJ, Birkenhäger JC, Pols HA, et al. Consequences of vitamin D receptor gene polymorphisms for growth inhibition of cultured human peripheral blood mononuclear cells by $1, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 . *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000;52(2):211-6.
15. Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK, Thompson PD, Hsieh JC, Zitzer H, et al. The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol* 2000;14(3):401-20.
16. McCullough ML, Bostick RM, Mayo TL. Vitamin D gene pathway polymorphisms and risk of colorectal, breast, and prostate cancer. *Annu Rev Nutr* 2009;29:111-32.
17. Karray EF, Ben Dhifallah I, Ben Abdelghani K, Ben Ghorbel I, Khanfir M, Houman H, et al. Associations of vitamin D receptor gene polymorphisms FokI and BsmI with susceptibility to rheumatoid arthritis and Behçet's disease in Tunisians. *Joint Bone Spine* 2012;79(2):144-8.
18. Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Vitamin D receptor ApaI, TaqI, BsmI, and FokI polymorphisms and psoriasis susceptibility: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2012;39(6):6471-8.
19. Monticciolo OA, Brenol JC, Chies JA, Longo MG, Rucatti GG, Scalco R, et al. The role of BsmI and FokI vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25 -hydroxyvitamin D in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2012;21(1):43-52.
20. Rashedi J, Asgharzadeh M, Moaddab SR, Sahebi L, Khalili M, Mazani M, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and vitamin D plasma concentration: correlation with susceptibility to tuberculosis. *Adv Pharm Bull* 2014;4(Suppl 2):607-11.
21. Shahbazi S, Alavi S, Majidzadeh-A K, Ghaffarpour M, Soleimani A, Mahdian R. BsmI but not FokI polymorphism of VDR gene is contributed in breast cancer. *Med Oncol* 2013;30(1):393.
22. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 2008;87(4):1080S-6S.
23. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci* 2004;29(12):664-73.

Association study of rs2228570 SNP of the VDR gene with spermatogenesis disorders in infertile men in Iranian population

Mehdi Mohebi M.Sc.
Fateme Karami Ph.D.
Mohammad Hossein Modarressi M.D., Ph.D.
Seyed Mohammad Akrami M.D., Ph.D.*

Department of Medical Genetics,
Tehran University of Medical Sciences,
Tehran, Iran.

* Corresponding author: Department of Medical Genetics, Tehran University of Medical Sciences, Poursina St., Tehran, Iran.
Post Code: 14176-13151
Tel: +98- 21- 88953005
E-mail: akramism@tums.ac.ir

Abstract

Received: 11 Jul. 2015 Revised: 07 Jun. 2016 Accepted: 24 Jun. 2016 Available online: 25 Jun. 2016

Background: Lots of vitamin D functions are mediated by its steroid family receptor (VDR). Vitamin D role in infertility is reported by significant fertility reduction in many male laboratory animals with vitamin D deficiency. The reason for reduced fertility in male VDR-null mouse model has been reported to be reduced sperm count and sperm motility. Vitamin D has effects on sperm motility, sperm-ovum coupling, and acrosome reaction stimulation. As VDR is expressed in human male reproductive system, the aim of the current study was to investigate the role of rs2228570 polymorphism of VDR gene in male infertility.

Methods: Investigation was done as a case-control study on infertile azoospermic or oligospermic men referring to Avicenna Research Institute from March 2014 to April 2015. Rs2228570 single nucleotide polymorphism (SNP) located in exon 1 of VDR gene was chosen according to its role on protein function. Blood sampling was done on cases and control groups and after DNA extraction the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) reaction was designed and performed on 100 normal cases, 100 azoospermic and 100 oligospermic control samples. Distribution of quantitative age variable was done using Student's t-test and qualitative variables (genotype and allelic frequencies) was done using SPSS, ver. 22 (Chicago, IL, USA).

Results: Chi-square test didn't show significant difference between two case groups and controls (Azoosperm and control $P=0.5$ and oligosperm and control $P=0.09$). Comparing CC genotype frequency with TT and CT genotypes (azoosperm and control $P=0.48$ OR=0.77, oligosperm and control, $P=0.17$ OR=0.77) and in comparing between TT genotype with CT and CC genotypes (azoosperm and control $P=0.49$ OR=3.03, oligosperm and control $P=0.19$ OR=7.21) the difference between these groups was not significant and didn't increase the probability of disease and didn't show protective role against it.

Conclusion: According to the findings, the association between rs2228570 polymorphism of vitamin D receptor gene and infertility was not significant and investigation of other polymorphisms might show a relationship with male infertility.

Keywords: azoospermia, case-control studies, genes, infertility, oligospermia, sperm count, vitamin D.