

## بررسی ارتباط چهار پلی مورفیسم در ژن *TNP2* با روند اسپرماتوژنز و ایجاد ناباروری مردان

الهام سیاسی<sup>۱\*</sup>، احمد آل یاسین<sup>۲</sup>، جواد مولا<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

<sup>۲</sup> گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

<sup>۳</sup> گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

E-mail: emi\_biotech2006@yahoo.ca

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۰۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۴

### چکیده

در اسپرماتوژنز انسان، پروتئین‌ها به عنوان پروتئین‌های متصل شونده به DNA اسپرم جایگزین هیستون‌ها می‌شوند. برای تمایز و بلوغ اسپرم جایگزینی هیستون‌ها با پروتئین‌ها ضروری است. آسیب در ژن‌های کد کننده پروتئین‌ها می‌تواند منجر به تخریب اسپرماتوژنز و عدم تشکیل اسپرم کامل شده و در نتیجه سبب ناباروری مردان گردد. در این تحقیق به بررسی حضور چهار پلی مورفیسم در ژن *TNP2* از ژن‌های خانواده پروتئین‌ها و ارتباط آن با ایجاد ناباروری ادیوپاتیک در مردان ازواسپرمی و الیگواسپرمی ایرانی پرداخته شده است. حضور چهار پلی مورفیسم G1272C، T1019G، G deletion at 1036 and 1046 در ژن *TNP2*، پس از استخراج DNA از نمونه خون ۹۶ مرد ازواسپرمی و اولیگو اسپرم با ناباروری ادیوپاتیک و ۱۰۰ نفر گروه کنترل با روش PCR-RFLP و PCR-SSCP بررسی شد و سپس با روش Sequencing نتایج تایید شد. فراوانی ژنوتایپ CC از پلی مورفیسم G1272C بین گروه بیمار و کنترل تفاوت نشان داد ولی با آنالیز آماری اختلاف معنی‌دار بین حضور این پلی مورفیسم در مقایسه گروه بیمار با کنترل مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ). همچنین پلی مورفیسم‌های T1019G و G deletion at 1036 and 1046 در هیچ یک از گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد. مقایسه نتایج این تحقیق با مطالعات انجام شده در این زمینه نشان داد که بین حضور این چهار پلی مورفیسم بررسی شده در ایجاد ازواسپرمی و اولیگواسپرمی با ناباروری ادیوپاتیک در جمعیت مردان ایرانی ارتباط معنی‌داری وجود ندارد.

**کلیدواژه‌ها:** پلی مورفیسم، ژن *TNP2*، ناباروری مردان، PCR-RFLP، PCR-SSCP

### مقدمه

در حدود ۵۰ درصد از موارد به دلیل ناباروری در مردان<sup>۱</sup> است [۳]. برآوردها نشان می‌دهد که نیمی از موارد ناباروری به طور کامل و یا تا حدود زیادی به دلیل ناهنجاری و اختلال در اسپرم است که باعث

ناباروری از دیدگاه کلینیکی به مفهوم ناتوانی در بارداری بعد از ۱۲ ماه آمیزش طبیعی بدون استفاده از وسائل جلوگیری کننده از بارداری می‌باشد. تقریباً از هر شش زوج یک زوج به این مشکل دچار هستند که

<sup>۱</sup> Male infertility

می‌شود ناباروری مردان به عنوان یکی از شایع‌ترین علل ناباروری در نظر گرفته شود [۳].

ناحیه تعیین جنسیت در کروموزوم Y<sup>۱</sup> (SRY) در بازوی کوتاه این کروموزوم (Yp) قرار دارد، در حالی که ژن‌های کنترل کننده اسپرماتوژنز در قسمت میانی بازوی بلند (Yq) قرار دارند. چرخه ۷۰ روزه اسپرماتوژنز بوسیله سلول‌های سرتولی در تبول‌های اسپرم بر<sup>۲</sup> تغذیه می‌شود. در میان سلول‌های سرتولی، سلول‌های اسپرماتوگنی قرار دارند که طی تقسیم میتوز به اسپرماتوسیت‌ها و سپس طی تقسیم میوز به اسپرماتیدهای گرد هاپلوئید تبدیل می‌شوند. اسپرماتیدهای گرد، طویل شده و سپس به اسپرماتوزوای دارای فلاژل تبدیل شده و تمایز پیدا می‌کند. اسپرماتوزوای در طی یک دوره ۱۴-۲ روزه ضمن عبور از اپیدیدیم، محلی که در آن پتانسیل بارورسازی را پیدا می‌کند، بطور کامل بالغ می‌شود. کنترل هورمونی بر فرآیند اسپرماتوژنز بوسیله هیپوتالاموس و غده هیپوفیز و از طریق آزادسازی هورمون GnRH و به دنبال آن آزادسازی FSH<sup>۳</sup> و LH<sup>۴</sup> هماهنگ می‌شود. به علاوه میزان محلی تستوسترون که بوسیله سلول‌های لایدیگ تولید و ترشح می‌شود، ۱۰۰ برابر بیشتر از میزان آن در سرم است [۳].

اسپرماتوژنز یک فرآیند پیچیده می‌باشد که تحت تاثیر ژن‌های زیادی قرار دارد و مکانیسم‌های مولکولی دخیل در حال مطالعه می‌باشند [۱۱]. بنا بر تخمین‌های موجود در حدود ۲۰۰۰ ژن این فرآیند را کنترل می‌نمایند که بیشتر آنها بر روی کروموزوم‌های آتوزوم قرار دارند و در حدود ۳۰ ژن نیز روی کروموزوم Y

واقع شده‌اند. در حالی که ژن‌های آتوزومی با تنظیم فرآیندهای متابولیک در سایر سلول‌های بدن نیز ارتباط دارند [۱۱ و ۲]. از مهمترین عوامل ناباروری می‌توان به اختلال در تعداد، حرکت و مورفولوژی اسپرم و اختلالات ساختمانی، عدم تعادل هورمونی و عوامل ژنتیکی که در ایجاد ناباروری مردان دخالت دارند، اشاره نمود [۱۱ و ۲۱ و ۲۴]. عوامل ژنتیکی موثر در ناباروری مردان که تا به امروز مشخص شده‌اند عبارتند از: اختلالات کروموزومی، بیماری‌های تک ژنی، اختلال در میوز و اندوکراین [۱۱ و ۱۷ و ۲۴].

علی‌رغم تمام عوامل ذکر شده، ۲۵٪ از مردان نابارور دارای آنالیز اسپرم غیر طبیعی هستند که هیچ اتیولوژی برای آنها شناسایی نشده است [۴ و ۱۱]. این حالت را بنام ناباروری ادیوپاتیک مردان می‌نامند، که با دلایل ژنتیکی متعددی مشخص می‌شوند [۱۷ و ۱۸ و ۱۹]. پارامترهای اسپرم در ۳۹٪ از این بیماران دامنه وسیعی از اختلالات را نشان می‌دهد و در حدود ۲٪ از بیماران یک اولیگواسپرمی ادیوپاتیک عنوان می‌شود. نقایص در حرکت و فعالیت اسپرم در ۲۴٪ از بیماران وجود دارد و در ۱۰٪ از بیماران اختلالات ساختمانی اسپرم مشاهده می‌شود. تاریخچه پزشکی و معاینه فیزیکی و آزمایشات هورمونی در بیماران معمولاً نرمال است و گاهی فقط افزایش خفیف هورمون FSH مشاهده می‌شود که دلیل اختلال در اسپرماتوژنز نمی‌باشد [۴ و ۱۱]. از شایع‌ترین عوامل ادیوپاتیک، اختلالات در هسته سلول اسپرم و تغییر ساختمان DNA آن می‌باشد [۱۶ و ۲۳].

در اسپرماتیدهای تمام گونه‌ها، هستون‌ها پروتئین‌های کروموزومال اصلی هستند. هستون‌ها دارای توده کلی برابر با DNA در یوکاریوت‌ها هستند و پنج نوع اصلی دارند: H1, H2a, H2b, H3, H4

<sup>1</sup> Sex reversal on Y

<sup>2</sup> Seminiferous tubules

<sup>3</sup> Follicle-stimulating hormone

<sup>4</sup> Lutenizing hormone

دارند [۶ و ۱۵ و ۱۶]. این پروتئین‌ها با DNA تشکیل نوکلئوزوم نمی‌دهند و باید ابتدا نوکلئوزوم‌ها و هسته هیستون از حالت ترکیب بیرون آیند. در اسپرماتید متراکم و بالغ، پروتئین‌های پروتامین، جایگزین پروتئین‌های گذرا شده و با DNA ژنومی همراه می‌شوند. ترکیب پروتامین و DNA که بسیار متراکم و ثابت می‌باشند، بوسیله باندهای دی سولفیدی بین پروتامین‌ها ثابت بیشتری پیدا می‌کند [۵ و ۶ و ۱۵ و ۱۶]. این ساختمان بسیار متراکم و دارای زنجیره‌های جانبی نسبت به بسیاری از آسیب‌های خارجی که باعث نابودی بسته‌های DNA در حال میتوز می‌شوند، نفوذ ناپذیر است. بدین ترتیب هسته اسپرم در برابر اولتراسوند، هضم تریپسین، هضم آنزیمی DNase، مواد شوینده و درمان با داروهای خاص که باعث حل شدن اجزای سلولی می‌شوند، مقاوم شده و ثبوت خود را حفظ می‌کند. DNA ژنومی به میزان زیادی در اسپرم بالغ فشرده شده است و این درهم رفتن و بسته‌بندی DNA به کمک ماتریکس هسته و پروتامین‌ها انجام می‌گیرد [۱۱ و ۱۶]. علاوه بر این کمپلکس پروتامین-DNA، یک رشته DNA با شکاف بزرگ‌تر به رشته مجاور اتصال می‌یابد، بطوریکه رشته‌های DNA درون هسته اسپرم به صورت ردیف خطی و پهلوی به پهلوی بسته‌بندی می‌شوند. بر همین اساس کروماتین به وسیله باندهای کووالان دی سولفیدی هم در درون و هم در بین رشته‌های DNA محکم و ثابت می‌شود. مسئله اساسی بروز فعال ژن هنگام در هم رفتن و فشرده شدن DNA هسته اسپرم است. تغییرات مورفولوژیک در طی اسپرمیورنز و تغییرات در پروتئین‌های پایه‌ای کروموزومال، پروسه‌های پیچیده‌ایی هستند که شامل بروز صدها ژن در زمان‌های گوناگون می‌شوند. هم در نسخه برداری

علاوه بر این پنج هیستون سوماتیک، بعضی از پستانداران دارای هیستون مخصوص بیضه‌ای نیز هستند (Testis specific Histones) [۱۱ و ۱۶]. همچنین پروتامین‌ها به عنوان جایگزین هیستون‌ها در مراحل تکوین هسته اسپرم ایفای نقش می‌نمایند و نشان داده شده است که ژن‌های روی بازوی بلند کروموزوم ۱۶ نقشی اساسی در این فرآیند جانشینی دارند و وجود برخی پلی‌مورفیسم و جهش در آن‌ها می‌تواند با ناباروری مردان ارتباط داشته باشد [۵ و ۹ و ۲۰]. در واقع لوکوس مولتی ژنی در ناحیه‌ای به طول ۲۸ کیلو باز روی کروموزوم ۱۶ در روند اسپرماتوژنز با ایجاد آزواسپرمی و اولیگواسپرمی در مردان دخالت دارد [۵ و ۹ و ۲۰]. مهمترین نقش پروتامین‌ها متراکم نمودن کروماتین‌ها در هسته سر اسپرم می‌باشد که این افزایش تراکم کروماتین‌ها عامل ناباروری مردان می‌گردد [۶ و ۱۵ و ۲۰]. این ژن‌ها در ناحیه‌ایی به طول ۲۸ کیلو باز روی بازوی بلند کروموزوم ۱۶ بصورت یک لوکوس مولتی ژنیک که به صورت هماهنگ و متوالی بیان می‌شوند، قرار گرفتند. این ژن‌ها پروتئین‌های اختصاصی اسپرم (پروتامین‌ها) را تولید می‌نمایند. پروتامین‌ها از اصلی‌ترین و کوچک‌ترین پروتئین‌های هسته اسپرم هستند که بین گونه‌های مختلف دارای ساختمان ثابت می‌باشند [۹ و ۱۲ و ۲۲]. این پروتئین‌ها غنی از اسید آمینه‌های آرژنین و سیستئین هستند، که برای تشکیل باندهای DNA و پل‌های دی سولفیدی در هسته اسپرم مورد نیازند.

کلاس اول از پروتامین‌ها، PRM پروتئین‌ها می‌باشند و کلاس دوم از پروتئین‌های پروتامین اصطلاحاً پروتئین‌های گذرا یا TP (Transition proteins) نام دارند که کاملاً جانشین هیستون‌ها می‌گردند. در پستانداران دو نوع اصلی دارند: TP1, TP2 وجود

نمونه DNA دارای آن تغییر گردد. در موارد دیگر می‌تواند جایگاه اثری برای یک آنزیم را از بین ببرد و سبب شود آن آنزیم قادر به برش دادن توالی ژن مورد نظر در محل دارای تغییر نوکلئوتیدی مورد بررسی نباشد. در هر دو حالت فوق، نمونه DNA-ایی که دارای تغییر نوکلئوتیدی است اگر تحت اثر آنزیم محدودالایر ویژه قرار گیرد در مقایسه با سایر نمونه‌های معمول الگوی برش متفاوتی نشان می‌دهد [۱۰].

تکنیک SSCP تکنیک دیگری برای تشخیص پلی مورفیسم‌ها خصوصاً حذف‌های نوکلئوتیدی است و قادر به تشخیص تغییر، حتی در یک عدد باز می‌باشد. در این روش تک رشته DNA قادر به اتصال با خودش بوده که منجر به تشکیل یک شکل فضایی (ساختمان سوم) می‌گردد. ساختمان سوم یک قطعه DNA تک رشته بستگی به توالی بازی قطعه مورد نظر دارد و وقوع جهش در یک قطعه مشخص معمولاً منجر به تغییر شکل فضایی<sup>۱</sup> DNA تک رشته واجد جهش نسبت به DNA تک رشته وحشی یا نرمال می‌گردد [۱۳]. در پایان برای تایید نتایج حاصل نمونه‌هایی با روش Sequencing تعیین توالی و بررسی شدند.

#### مواد و روش‌ها

۱- نمونه‌گیری: گروه بیمار از بین مردان ناباروری که به دلایل علل ناشناخته ژنتیکی، نابارور ادیوپاتیک تشخیص داده شده بودند، ۹۶ نفر انتخاب شدند. این مردان دو زیر گروه، آواسپریم که فاقد اسپرم و ۷۷ نفر بودند و اولیگو اسپرم که دارای کمتر از پنج میلیون سلول اسپرم در میلی‌لیتر و ۱۹ نفر بودند، را شامل

و هم در ترجمه درون اسپرم عمل کنترل ژنی وجود دارد، در مورد تمامی ژن‌های پروتامین، بلافاصله پس از میوز نسخه برداری می‌شوند. همچنین یک هفته بعد نیز هنگام تجمع بصورت DNA ژنومی ترجمه می‌شوند. از آنجا که همانند سازی DNA و یا نسخه برداری RNA در اسپرماتیدهای بالغ و متراکم صورت نمی‌گیرد این اعمال باید در مراحل اولیه اسپرمیوژن برای تولید پروتئین‌های پروتامین‌ها که در مراحل بعدی برای بسته‌بندی DNA مورد نیاز هستند، انجام گیرد [۷, ۱۴, ۱۶]. با شواهدی که از مطالعات روی ژن‌های پروتامین‌ها بدست آمده است، این موضوع مطرح شده که اگر ترتیب و ردیف موقتی از ترجمه پروتامین تغییر یابد، شکل‌های غیر طبیعی هسته و حتی توقف کامل اسپرماتوژن می‌تواند القا شود [۲۳].

بنابر گزارشات متعدد در مواردی وجود پلی مورفیسم یا جهش خاص در این ژن‌ها سبب ناباروری مردان می‌شود، که در این تحقیق برای اولین بار ارتباط چهار پلی مورفیسم در ژن *TNP2* شامل G deletion at 1036 and 1046, G1272C, T1019G با ناباروری مردان ایرانی بررسی شده است. در این ژن دو پلی مورفیسم T1019G و G1272C با استفاده از روش PCR- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) و پلی مورفیسم‌های G deletion nt 1036 and 1046 (PCR- SSCP Single Strand Conformation Polymorphism) مورد بررسی قرار گرفتند.

روش RFLP یکی از راه‌های بررسی وجود پلی مورفیسم‌ها و جهش‌های نقطه‌ای، با استفاده از آنزیم‌های محدودالایر می‌باشد. تغییر یک نوکلئوتید می‌تواند جایگاه اثری برای یک آنزیم بوجود آورد و سبب ایجاد قطعات کوچک‌تر از قطعه ژن مورد نظر در

<sup>1</sup> Conformation

**۵- الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل آگارز:**

بعد از انجام واکنش PCR، جهت اطمینان از انجام صحیح واکنش PCR محصول حاصل از این واکنش روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شد. در صورت مشاهده تشکیل باندهای اختصاصی با طول ۴۷۳ bp روی ژل آگارز از تکثیر قطعه مورد نظر اطمینان حاصل می‌گردد. در این حالت ادامه مراحل کار برای انجام واکنش‌های هضم آنزیمی RFLP و SSCP و تعیین توالی یا Sequencing امکان پذیر می‌باشد.

**۵-انجام روش RFLP برای تشخیص پلی‌مورفیسم‌ها:**

پس از انجام PCR، برای بررسی حضور دو پلی‌مورفیسم T1019G و G1272C در ژن *TNP2* از روش RFLP و با استفاده از هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم‌های محدودالثر انجام گرفت. روش کار و مواد و محلول‌های مورد استفاده برای انجام RFLP عبارت بود از: برای انجام برش آنزیمی یک میکرو لیتر از محصول PCR را با یک میکرو لیتر بافر X ۱۰ و ۰/۲ میکرو لیتر آنزیم ۱۰ یونیت بر میکرو لیتر که هر ۰/۱ آن معادل ۱ میکرو لیتر است، مخلوط شد و حجم کلی را با کمک آب دیونیزه به حجم ۱۰ میکرو لیتر رسانده شد. سپس نمونه‌ها را به مدت ۱۶-۲ ساعت در دمای ۳۷°C برای آنزیم‌های Ear I و Hind III که دمای بهینه آن آنزیم‌ها بود، قرار داده شد. پس از اثر دادن آنزیم نتایج با الکتروفورز نمودن نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱/۵٪ و مشاهده تعداد و طول باندهای تشکیل شده مشخص گردید. مشخصات آنزیم‌های برش دهنده برای هضم آنزیمی محصول PCR پلی‌مورفیسم‌های مورد مطالعه در این تحقیق در جدول ۵ آورده شده است.

می‌شدند. این مردان در گروه سنی ۳۰-۴۵ سال قرار داشتند. گروه کنترل شامل ۱۰۰ نفر از مردان بارور سالم بود، که در گروه سنی مشابه قرار داشتند و از نظر پارامترهای فیزیولوژی و ساختمانی و نتایج کاریو تایپینگ دارای حالت نرمال بودند و دارای حداقل یک فرزند بودند. برای نمونه‌گیری، از کلیه افراد ۵ میلی لیتر خون محیطی در فالتون‌های حاوی ۵۰۰ میکرو لیتر محلول آنتی کوالانت EDTA (۲۰ میلی مولار با PH=8 و میزان ۱۰۰ میکرو لیتر به ازاء هر یک میلی لیتر خون محیطی) گرفته شد. نمونه‌های خون تا زمان استخراج DNA از هسته گلبول‌های سفید خون در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند.

**۲- استخراج DNA:** برای استخراج DNA ژنومیک از خون، روش استخراج نمکی DNA انجام گرفت و از مواد و محلول‌های زیر استفاده شد. بافر لیز کننده گلبول‌های قرمز - بافر P - سدیم دو دسیل سولفات (SDS) ۱۰ درصد- پروتئیناز K باغلظت ۲۰ mg/ml - کلرید سدیم (NaCl) ۶ مولار- اتانل ۱۰۰٪- اتانل ۷۰٪- بافر TE.

**۳- انجام PCR برای پلی‌مورفیسم‌های مورد مطالعه:**

واکنش PCR برای هر تکثیر هریک از پلی‌مورفیسم‌های G deletion at 1036 and 1046 و G1272C, T1019G در ژن *TNP2* انجام گرفت. مشخصات ژن و پلی-مورفیسم‌های مورد مطالعه در جدول ۱ آمده است. همچنین مواد مورد نیاز برای PCR و مشخصات پرایمرها و برنامه دستگاه PCR برای تکثیر پلی‌مورفیسم‌های مذکور به ترتیب در جداول ۲ و ۳ و ۴ آورده شده است.

جدول ۱- مشخصات پلی مورفیسم های مورد مطالعه

نام ژن	ID ژن	محل ژن	نام SNP	محل پلی مورفیسم
<i>TNP2</i>	7142	Ch 16p13.13	T1019G G1272C G deletion in 1036 and 1046	Rs 2857758 Rs 8043625 L03378

جدول ۲- مواد مورد نیاز برای واکنش PCR

ماده مورد نیاز	حجم
آب مقطر دونیزه	۱۹ میکرولیتر
بافر PCR	۲/۵ میکرولیتر
Mgcl2	۱ میکرولیتر
dNTP	۰/۵ میکرولیتر
هر یک از پرایمرهای راست و چپ	۰/۵ میکرولیتر
DNA ژنومی نمونه مورد نظر	۱-۱/۲ میکرولیتر
آنزیم Taq پلیمرز	۰/۲ میکرولیتر
حجم نهایی	۲۵ میکرو لیتر

جدول ۳- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در انجام PCR در این مطالعه

نام ژن	توالی پرایمرها	منابع مورد استفاده
<i>TNP2</i>	F- gtggttggtgatgaattggttag R- ttctccttggtgaaacacgcag	*با استفاده از برنامه SNP cutter بدست آمد.

جدول ۴- برنامه PCR برای تکثیر پلی مورفیسم های مورد مطالعه

نام ژن	دما - زمان	دنا توره شدن	اتصال آغازگر	سنتر DNA	تعداد سیکل	طول قطعه تکثیر شده
	دما - زمان	دما - زمان	دما - زمان	دما - زمان	PCR	bp
<i>TNP2</i>	۹۴°C - ۱ دقیقه	۵۷°C - ۱ دقیقه	۷۲°C - ۱ دقیقه	۷۲°C - ۱ دقیقه	۳۲	۴۷۳

\*با این توضیح که زمان و دمای دنا توره شدن اولیه برای دو پلی مورفیسم تکثیر داده شده بترتیب ۹۴°C و ۵ دقیقه و زمان و دمای سنتر DNA برای دو پلی مورفیسم تکثیر داده شده بترتیب ۷۲°C و ۵ دقیقه می باشد.

جدول ۵- قطعات ناشی از هضم آنزیمی محصولات PCR بدنبال استفاده از روش RFLP جهت تعیین پلی مورفیسم های مورد مطالعه.

ژن	پلی مورفیسم	آنزیم	سایت برش	برش الی	طول PCR	طول قطعات حاصل بعد از برش
<i>TNP2</i>	T 1019 G	Ear I	C/TCTTC	ال جهش یافته	۴۷۳	۱۲۰ و ۳۵۳ و ۴۷۳
<i>TNP2</i>	G 1272 C	Hind III	AA/GCTT	ال جهش یافته	۴۷۳	۹۴ و ۲۷۹ و ۴۷۳

بودند از: ابتدا محلول آکریل آمید جهت الکتروفورز محصولات PCR ژن *TNP2* با طول قطعه بیش از bp ۲۰۰ از ژل SSCP با ۸% اکرلامید استفاده شد. برای تهیه این ژل محلول اکرلامید - بیس اکرلامید، بافر TEMED و APS 10%، آب دو بار تقطیر، TBE 5X

۶- انجام روش SSCP برای تشخیص پلی مورفیسم ها: پس از انجام PCR، بررسی حضور دو پلی مورفیسم حذف نوکلئوتید G در موقعیت ۱۰۳۶ و ۱۰۴۶ توالی نوکلئوتیدی ژن *TNP2*، از روش SSCP انجام گرفت. در این تکنیک روش کار و مواد مورد استفاده عبارت

فیزیکی، آنالیز مایع سیمن، آنالیز هورمونی برای میزان LH, FSH، بررسی کاریوتایپ بیماران و در برخی موارد بیوپسی بیضه صورت گرفت. از بین مردان ناباروری که برای درمان مراجعه کرده بودند و آزمایشات ذکر شده را انجام داده بودند، ۲۵٪ بیماران بودند که دارای اختلال در تعداد، حرکت و ساختمان اسپرم بودند بدون آنکه اتیولوژی خاصی را نشان دهند و از نظر آزمایشات انجام شده و کاریوتایپ مشکلی نداشتند. در این افراد علل ژنتیکی ناشناخته علت ناباروری گزارش گردید. به این ترتیب که گروهی فاقد اسپرم بودند که در گروه آزواسپرمی گروه بندی شدند و در گروهی تعداد اسپرم کمتر از پنج میلیون سلول اسپرم در میلی لیتر بود که در گروه اولیگواسپرم قرار گرفتند. برای این تحقیق ۹۶ نفر از مردان بررسی شده فوق که دارای ناباروری با دلایل ژنتیکی متعدد و گاه ناشناخته گزارش شدند و در گروه مردان نابارور ادیوپاتیک قرار گرفتند، انتخاب شدند. از این مردان ۷۷ نفر آزواسپرم و ۱۹ نفر اولیگواسپرم بودند و در گروه سنی ۳۰-۴۵ قرار داشتند. گروه کنترل از ۱۰۰ نفر مرد سالم و باروری که در شرایط سنی و موقعیت جغرافیایی مشابه با گروه بیمار قرار داشتند، انتخاب شدند. نتایج دموگرافی افراد مورد مطالعه در جدول ۶ آورده شده است.

به کار برده شد. پس از تهیه محلول ژل SSCP سریعاً در فاصله دو شیشه ریخته شد. ژل ۱-۲ ساعت به ولتاژ ۲۰۰-۱۰۰ متصل شد و سپس نمونه‌های محصول PCR که با بافر مخصوص SSCP بارگیری شده بودند و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده بودند بر روی یخ منتقل شده و پس از گذشت ۵ دقیقه نمونه‌ها به چاهک‌های ژل انتقال داده شدند. ابتدا ژل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ولتاژ ۱۷۰ ولت به مدت ۲-۱ ساعت الکتروفورز شد و سپس با ولتاژ ۶۰ یک شب الکتروفورز شدند. بعد از اتمام الکتروفورز ژل اکریل امید با روش نیترا ت نقره رنگ‌آمیزی شد.

۷- مطالعات آماری: برای آنالیز نتایج تحقیق از نرم‌افزار SSPC استفاده شد و برای آزمون معنی‌دار بودن این که آیا تغییر می‌تواند معیاری برای شناسایی بیمار از سالم باشد از مجذور خی<sup>۲</sup> استفاده شد.

## نتایج

۱- گروه بیماران: گروه بیمار مردان نابارور دارای نقص در روند اسپرماتوزنیز را شامل می‌شدند. این افراد توسط پزشک متخصص اورولوژی مورد بررسی قرار گرفتند. با انجام یک سری آزمایشات اندرولوژی روی بیماران شامل بررسی تاریخچه پزشکی، معاینات

جدول ۶- دموگرافی گروه بیمار و کنترل در این مطالعه

افراد مورد مطالعه	گروه بیمار	گروه کنترل
تعداد	ازو اسپرم + اولیگواسپرم ۱۹ + ۷۷ = ۹۶	سالم و نرمواسپرم ۱۰۰
گروه سنی	۳۷-۴۵ (۳۷/۰۴ ± ۴/۵۷)	۲۶-۴۵ (۳۷/۹۲ ± ۵/۳۱)
تعداد اسپرم	۰ برای آزواسپرم‌ها کمتر از $5 \times 10^6$ برای اولیگواسپرم‌ها	بیشتر از $20 \times 10^6$
حرکت اسپرم	۰	بیشتر از ۵۰٪
مورفولوژی اسپرم	۰	بیشتر از ۳۰٪

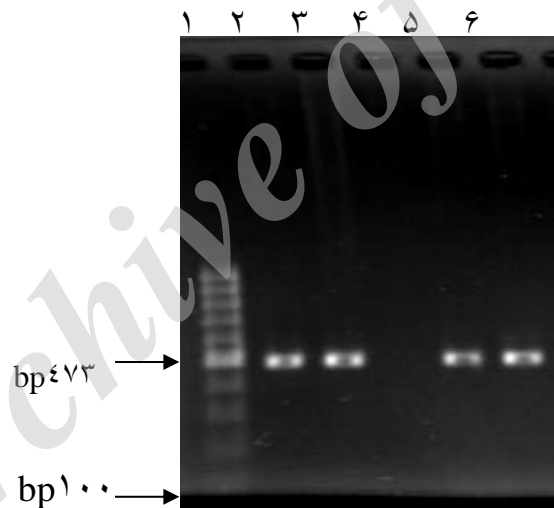
۳-۵ PCR تکثیر شد. از هر نمونه PCR شده ۳-۵ میکرولیتر بر روی ژل آگاروز ۱/۵ % الکتروفورز شد و سپس در اتیدیوم بروماید رنگ شد. تکثیر این ژن نشانگر یک باند منفرد به طول ۴۷۳ bp در ژل آگاروز بود، که در شکل ۱ آورده شده است.

#### ۴- نتایج RFLP برای تشخیص پلی مورفیسم‌های

**T1019G و G1272C** در ژن *TNP2* برای بررسی این دو پلی مورفیسم مورد مطالعه از تکنیک PCR - RFLP (هضم آنزیمی با آنزیم‌های برش دهنده محصول PCR) استفاده گردید. محصولات هضم آنزیمی در این آزمون در جدول‌های ۷ و ۸ و شکل‌های ۲ و ۳ آمده است.

۲- نتایج استخراج DNA از نمونه‌های خون گروه بیمار و کنترل: پس از استخراج DNA از نمونه‌های خون گروه بیمار و کنترل و تعیین غلظت آن با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر، به میزان ۱-۰/۵ میکرولیتر از نمونه‌های DNA روی ژل آگاروز ۱ % الکتروفورز شدند. باندهای تشکیل شده روی ژل آگاروز نشانگر اطمینان از حضور DNA در نمونه بود.

۳- نتایج تکثیر پلی مورفیسم‌های **T1019G و G1272C** و **G deletions nt 1036 and 1046** در ژن *TNP2*: قطعه ۴۷۳ bp از ژن *TNP2* حاوی ۴ پلی مورفیسم **T1019G و G1272C و G deletions nt 1036 and 1046** در گروه بیمار و کنترل با روش



شکل ۱- نتایج مربوط به تکثیر قطعه ۴۷۳ bp از ژن *TNP2*. چاهک ۱ مارکر با وزن مولکولی ۱۰۰ bp می‌باشد و چاهک‌های ۲ و ۳ و ۵ نمونه‌های محصول PCR از DNA بیمار و کنترل برای ژن *TNP2* (۴۷۳ bp) می‌باشد و چاهک ۴ و ۵ به ترتیب نمونه کنترل منفی و کنترل مثبت می‌باشند.

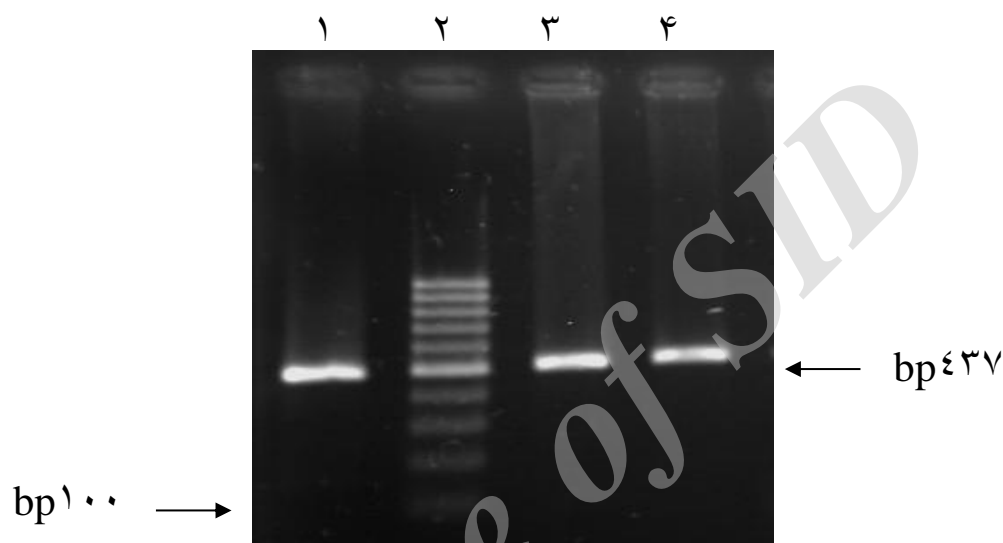
جدول ۷- نتایج مربوط به محصولات هضم آنزیمی برای پلی مورفیسم‌های مورد مطالعه

نام ژن	نام پلی مورفیسم	طول محصول PCR	نام آنزیم	نوع ژنوتیپ	طول قطعات ایجاد شده با آنزیم
<i>TNP2</i>	T 1019 G	473 bp	EarI	TT	473bp
				TG	473bp, 353bp, 120bp
				GG	353bp, 120bp
<i>TNP2</i>	G 1272 C	473 bp	HindIII	GG	473bp
				GC	473bp, 378bp, 95bp
				CC	378bp, 95bp

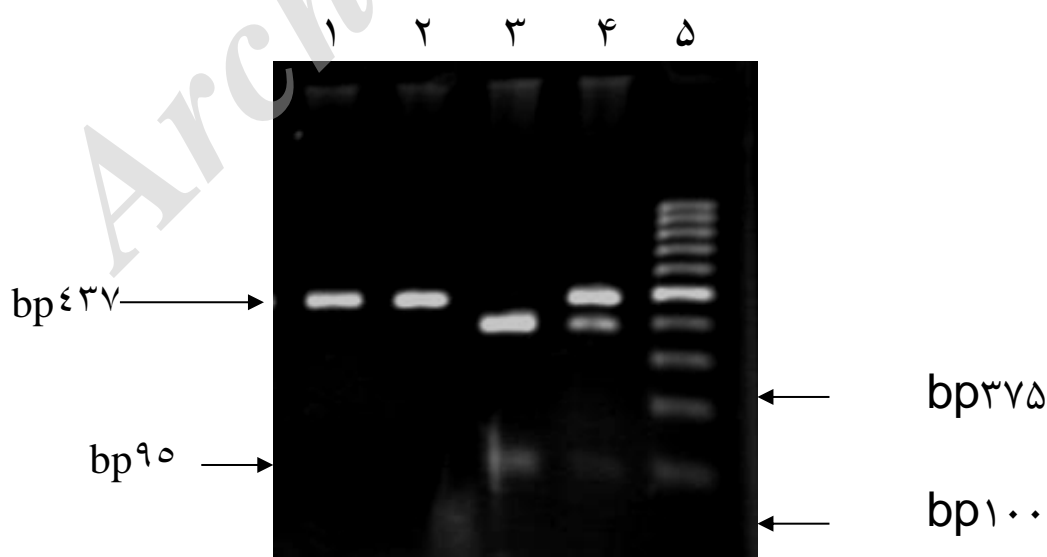


جدول ۸. نتایج فراوانی ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم T1019G و G 1272 C از ژن TNP2 در گروه بیمار و گروه کنترل

نام ژن و پلی مورفیسم	نوع ژنوتیپ	فراوانی در گروه بیمار	فراوانی در گروه کنترل
TNP2 T 1019 G	TT	٪۱۰۰	٪۱۰۰
	TG	۰	۰
	GG	۰	۰
TNP2 G 1272 C	GG	٪۵۱	٪۵۰
	GC	٪۳۶،۵	٪۳۳
	CC	٪۱۲،۵	٪۱۷



شکل ۲- محصولات هضم آنزیمی برای پلی مورفیسم T1019G در ژن TNP2. چاهک ۲ مارکر ژنتیکی ۱۰۰ bp، چاهک ۱ نمونه uncut (۱۰۰ bp)، چاهک ۳ و ۴ نمونه هموزیگوت وحشی فاقد برش (TT) (۴۳۷ bp)، نمونه هتروزیگوت برش یافته (TG) (۴۳۷ bp و ۳۵۳ bp و ۱۲۰ bp) و نمونه هموزیگوت موتان برش یافته (GG) (۳۵۳ bp و ۱۲۰ bp) در هیچ یک از نمونه‌های بیمار و کنترل یافته نشد.



شکل ۳- محصولات هضم آنزیمی برای پلی مورفیسم G1272C در ژن TNP2، چاهک ۵ مارکر ژنتیکی ۱۰۰ bp، چاهک ۱ نمونه uncut (فاقد برش) (۴۳۷ bp)، چاهک ۲ نمونه هموزیگوت وحشی فاقد برش (GG) (۴۳۷ bp)، چاهک ۳ نمونه هموزیگوت موتان برش یافته (CC) (۴۳۷ bp) و چاهک ۴ نمونه هتروزیگوت برش یافته (GC) (۴۳۷ bp و ۳۷۵ bp و ۹۵ bp).

بررسی شد. نتایج بررسی این دو پلی مورفیسم پس از رنگ آمیزی ژل آکریل امید برای دو گروه بیمار و گروه کنترل چنین نشان داد که بین الگوهای باندهای DNA تک رشته در ردیف‌های بالاتر ژل و باندهای مربوط به DNA دو رشته‌ای در ردیف‌های پایینی در ژل در این جمعیت ها تفاوت معنی‌داری با یکدیگر مشاهده نشد. در نتیجه هیچ یک از افراد بیمار دارای حذف گوانین در منطقه ۱۰۳۶ و ۱۰۴۶ و دو پلی مورفیسم مذکور نبودند. نتایج برای این دو پلی مورفیسم در جدول ۱۰ آمده است. نمونه‌هایی از الگوهای باندهای تک رشته و دو رشته DNA تشکیل شده در روی ژل آکریل امید پس از انجام روش SSCP، در شکل ۴ آمده است.

۵- آنالیز نتایج پلی مورفیسم‌های **T1019G** و **G 1272 C** در ژن **TNP2**: با آنالیز آماری نتایج دو پلی مورفیسم **T1019G** و **G 1272 C** در ژن **TNP2**، و مقایسه بین داده‌های دو گروه بیمار و کنترل نشان داد بین این دو گروه تفاوت قابل ملاحظه‌ای وجود ندارد. بنابراین چنین می‌توان نتیجه گرفت که بین حضور پلی مورفیسم‌های **T1019G** و **G 1272 C** در ژن **TNP2** ایجاد ازواسپرمی و اولیگواسپرمی در ناباروری مردان ایرانی از نظر آماری ارتباط معنی‌داری وجود ندارد ( $P>0.05$ ). نتایج آنالیز آماری این دو پلی مورفیسم در جدول ۹ آمده است.

۶- نتایج بررسی جهش‌های حذفی نوکلئوتید **G** در ژن **TNP2** با روش SSCP: دو پلی مورفیسم **G deletion** at 1036 and 1046 در ژن **TNP2** با روش SSCP

جدول ۹- نتایج آنالیز آماری برای دو پلی مورفیسم مورد مطالعه در مقایسه بین دو گروه بیمار و کنترل.

نام ژن	پلی مورفیسم	نوع ال	فراوانی در گروه بیمار	فراوانی در گروه کنترل	ارزش آماری
<i>TNP2</i>	T1019G	T G	٪۱۰۰ ۰	٪۱۰۰ ۰	P= 0
<i>TNP2</i>	G 1272 C	G C	٪۶۸,۶۱ ٪۳۱,۳۷	٪۶۷ ٪۳۳	P=0. 6

جدول ۱۰- نتایج فراوانی ژنوتیپ‌های جهش‌های حذفی گوانین در نوکلئوتیدهای ۱۰۳۶ و ۱۰۴۶ در گروه بیمار و گروه کنترل

نام ژن و پلی مورفیسم	نوع ژنوتیپ	فراوانی در گروه بیمار	فراوانی در گروه کنترل
<i>TNP2</i> T 1019 G	GG	۰	۰
	G/-	۰	۰
	-/-	۰	۰
<i>TNP2</i> G 1272 C	GG	۰	۰
	G/-	۰	۰
	-/-	۰	۰

آزواسپرمی ارتباط معنی داری وجود ندارد ( $P > 0/05$ ). نتایج آنالیز آماری این پلی مورفیسم در جدول ۱۱ آمده است.

#### ۸- نتایج تعیین توالی محصولات PCR: نمونه

محصول قطعه PCR برای ژن *TNP2* تعیین توالی گردید و نتایج تعیین توالی و همولوژی در بلاست آن در شکل ۵ آورده شده است.

۷- آنالیز نتایج جهش‌های حذف گوانین در نوکلئوتیدهای ۱۰۳۶ و ۱۰۴۶ در ژن *TNP2*: نتایج آنالیز آماری پلی مورفیسم حذف گوانین در نوکلئوتیدهای ۱۰۳۶ و ۱۰۴۶ در ژن *TNP2*، با مقایسه بین داده‌های دو گروه بیمار و کنترل نشان داد بین این دو گروه اختلاف معنی داری وجود ندارد. بنابراین چنین نتیجه داد که بین حضور پلی مورفیسم حذف گوانین در نوکلئوتیدهای ۱۰۳۶ و ۱۰۴۶ در ژن *NP2* با جمعیت مردان نابارور ایرانی و ایجاد اولیگواسپرمی و

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷



شکل ۴- نتایج SSCP و تشکیل باندهای تک رشته و دو رشته DNA در روی ژل آکریل امید برای بررسی G deletions nt 1036 and 1046 در ژن *TNP2*، چاهک ۱ تا ۴ نمونه DNA بیمار و خانه ۵ تا ۷ نمونه DNA کنترل (تمامی نمونه‌های گروه بیمار و کنترل دارای الگوی مشابه بودند).

جدول ۱۱- نتایج آنالیز آماری برای دو جهش حذف گوانین در نوکلئوتیدهای ۱۰۳۶ و ۱۰۴۶ در ژن *TNP2* در مقایسه بین دو گروه بیمار و کنترل.

نام ژن	پلی مورفیسم	نوع الل	فراوانی در گروه بیمار	فراوانی در گروه کنترل	ارزش آماری
<i>TNP2</i>	G deletion in 1036 and 1046 nt	G G Deletion	٪۱۰۰ .	٪۱۰۰ .	P= 0

#### *TNP2*

Homo sapiens *TNP2* gene for transition protein 2, complete cds  
Length=1547

Score = 771 bits (854), Expect = 0.0  
Identities = 427/427 (100%), Gaps = 0/427 (0%)  
Strand=Plus/Plus

Query 16 AGTTTTGATGGGTTGGTTTGGATTGGTTAAATATTATCTTAATAGAGTAATATAGAGTAAT 75

|||||

Sbjct 978 AGTTTTGATGGGTTGGTTTGGATTGGTTAAATATTATCTTAATAGAGTAATATAGAGTAAT 1037

Query 76 TGAATAAACAGAGAGAAGAATAGATATCTAGACTAATGGGATAGAATGGGAAAGAAATGT 135

|||||

Sbjct 1038 TGAATAAACAGAGAGAAGAATAGATATCTAGACTAATGGGATAGAATGGGAAAGAAATGT 1097

Query 136 TGAATAAATGAATGGAATGAGTGAACCTAATGAATGGTGGATGACAAATGGAAGGGATAA 195  
 |||  
 Sbjct 1098 TGAATAAATGAATGGAATGAGTGAACCTAATGAATGGTGGATGACAAATGGAAGGGATAA 1157

Query 196 ATGGATGGATACCTGGATTCACATAGGTCAAAAAGGACACTGACGGTAGTCTAAACTCTAT 255  
 |||  
 Sbjct 1158 ATGGATGGATACCTGGATTCACATAGGTCAAAAAGGACACTGACGGTAGTCTAAACTCTAT 1217

Query 256 CTATGTCCCATATTCAATCACAATGAGTAGTTGTAAGACCTTACAGGAGGTCAAGGAGG 315  
 |||  
 Sbjct 1218 CTATGTCCCATATTCAATCACAATGAGTAGTTGTAAGACCTTACAGGAGGTCAAGGAGG 1277

Query 316 TCACTGACTTCATGAAGTGCTCAGCTATTAAGGTTCCCTTTCCCACTCTTATCCCTTAGG 375  
 |||  
 Sbjct 1278 TCACTGACTTCATGAAGTGCTCAGCTATTAAGGTTCCCTTTCCCACTCTTATCCCTTAGG 1337

Query 376 ATGGAAATCCAACCTAATGAGACCGCACTCCTTGGCTTGTCTGCGTGTTCACCCAAAG 435  
 |||  
 Sbjct 1338 ATGGAAATCCAACCTAATGAGACCGCACTCCTTGGCTTGTCTGCGTGTTCACCCAAAG 1397

Query 436 GAGAAAA 442  
 |||  
 Sbjct 1398 GAGAAAA 1404

شکل ۵- نتایج همولوژی در بلاست قطعه تکثیر شده از ژن *TNP2* با PCR.

## بحث

آمد، تفاوت معنی دار بین گروه بیماران و گروه کنترل مشاهده نشد و نتایج نشان داد که بین آنها با جمعیت مردان نابارور ایرانی و ایجاد اولیگواسپرمی و آزواسپرمی ارتباطی وجود ندارد. پلی مورفیسم های *T1019G* و *G deletion at nt 1036 and 1046* در ژن *TNP2* در هیچ یک از گروه های بیماران و کنترل مشاهده نشد و دارای فراوانی صفر گزارش شدند، در نتیجه ارتباطی با ناباروری آدیوپاتیک در مردان ایرانی نشان ندادند.

اخیرا مطالعات زیادی در مورد پلی مورفیسم و جهش ها در ژن های پروتامین در جمعیت های مختلف انجام گرفته است و نتایج متفاوتی از این تحقیقات بدست آمده است و تعدادی از این مطالعات ارتباط معنی داری را بین پلی مورفیسم های مورد مطالعه در ژن پروتامین ها گزارش نموده اند [۵، ۷، ۸، ۹ و ۱۵]. بررسی چهار پلی مورفیسم *T1019G* و *G1272C* و *G* deletions nt 1036 and 1046 در ژن *TNP2* در جمعیت ایرانی و مقایسه حضور آنها در سایر جمعیت ها، نتایج متفاوتی را نشان می دهد که ممکن

بر اساس مطالعات انجام شده کمتر از یک سوم دلایل ژنتیکی برای ناباروری هنوز ناشناخته هستند که بنام دلایل ژنتیکی آدیوپاتیک نامیده شده اند [۱]. با وجود این که فاکتورهای محیطی می توانند نقش مهمی در ناباروری مردان داشته باشند، مطالعات امروزه تغییرات ژنتیکی را عامل موثری در این امر می داند و خصوصا توجه زیادی به علل ناباروری آدیوپاتیک شده است [۱، ۸ و ۲۲].

بر این اساس در این تحقیق به بررسی ارتباط پلی مورفیسم های معمول در ژن هایی که بصورت آدیوپاتیک در ناباروری مردان نقش دارند پرداخته شده است. این پلی مورفیسم ها عبارتند از:

*T1019G* و *G1272C* و *G deletions nt 1036 and 1046* در ژن *TNP2* و روش های مولکولی رایج شامل RFLP SSCP و sequencing در این بررسی انجام گرفت. برای پلی مورفیسم *G1272C* در ژن *TNP2* ( $P=0.6$ ) با فراوانی ۳۱/۳۷٪ برای الل C در گروه بیمار در مقایسه با گروه کنترل که ۳۳٪ بدست

در ژن *TNP2* ( $P=0.6$ ) با ناباروری مردان وجود ندارد. همچنین پلی‌مورفیسم T1019G و دو جهش حذفی G deletion at nt 1036 and 1046 در ژن *TNP2* در هیچ یک از نمونه‌های مردان نابارورو بارور ایرانی یافت نشد و چنین گزارش شد که بین حضور آن‌ها در جمعیت مردان نابارور ایرانی و ایجاد اولیگواسپرمی و آواسپرمی ارتباطی وجود ندارد.

مطالعات اخیر نشان داده است که ژن‌های پروتامین بصورت کلاستر می‌باشند و بطور اختصاصی در روند اسپرماتوزن (در تشکیل اسپرم بالغ) در پستانداران نقش دارند، به طوری که تغییرات کوچک در آن‌ها می‌تواند اثرات مهمی در تغییر بیان یا تغییر رونویسی و ترجمه این ژن‌ها در پروسه اسپرماتوزن دارا باشد [۵، ۸ و ۲۳]. بنابراین چنین نتیجه‌گیری می‌شود که ژن‌های پروتامین، ژن‌هایی اختصاصی و با ساختمان ثابت هستند که برای روند اسپرماتوزن نرمال ضروری‌اند و حضور پلی‌مورفیسم و جهش‌ها در این ژن‌ها می‌تواند سبب ناباروری مردان گردد. گرچه با توجه به این تحقیق و مطالعات گذشته این اثرات به ندرت سبب ایجاد ناباروری می‌شود ولی حضور این پلی‌مورفیسم‌ها و همچنین تغییرات اپی ژنتیک که در روند تغییرات پس از ترجمه این ژن‌ها اعمال می‌گردد می‌تواند به عنوان عاملی در تخریب روند اسپرماتوزن مطرح باشند. همچنین با توجه به دامنه وسیع مطالعات در سال‌های اخیر و گستردگی مباحث مورد بحث در زمینه‌های ناباروری و تخصصی شدن هر یک از شاخه‌های مربوط به این دانش، لازم است تحقیقات‌ها با روش‌های جدید و شیوه‌های نوین در بررسی جهش‌ها و پلی‌مورفیسم‌ها انجام پذیرد. همچنین برای برآورد نتایج دقیق‌تر و کامل‌تر شدن آن‌ها به بررسی در جمعیت‌های مختلف و هاپلو تایپ‌های متفاوت

است به دلایل تفاوت مناطق جغرافیایی و آب و هوایی که روی شرایط محیطی و عادات زندگی این افراد تاثیر مستقیم دارد باشد و یا به دلیل تفاوت تعداد افراد مورد بررسی و سن آن‌ها باشد که می‌تواند در نتایج تحقیق اثر گذار باشد. همچنین ممکن است نوع تغذیه یا ابتلا به بیماری‌های خاص و داروهایی که به طور زمینه‌ای در بیماران مصرف شده، عاملی برای این تفاوت‌ها در جمعیت‌های مختلف مردان باشد که به این موارد پرداخته شده است.

برای ژن *TNP2* در NCBI چندین پلی‌مورفیسم ثبت شده است. از جمله این پلی‌مورفیسم‌ها می‌توان به T76G, G117C, C301T, C391T, C78T اشاره نمود که توسط ایمکن و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در ۱۳۵ مرد نابارور موروکایی و فرانسوی بررسی شدند و نتایج آنان نشان داد که تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشتند [۹]. همچنین دو پلی‌مورفیسم T1019G و G1272C در جمعیت ۲۸۲ مرد نابارور ژاپنی بررسی شدند و در نتایج مطالعات انجام گرفته، تفاوت معنی‌داری با گروه مردان بارور گزارش نشد [۱۵]. در پلی‌مورفیسم‌های دسته دیگری از ژن‌های پروتامینی TP که ژن *TNP1* است نیز مطالعاتی صورت گرفته است که مطالعه حیدری و همکارانش در سال ۲۰۱۴ روی ۸۲ مرد نابارور ایرانی نشان داد در ۱۵ مورد پلی‌مورفیسم T75C در گروه مردان نابارور مشاهده شد در حالیکه در هیچ یک از ۸۰ مرد نرمال گزارش نشد و در نتیجه امکان تاثیر آن بر روند ناباروری مطرح گردید [۶].

در این تحقیق نیز که به بررسی ارتباط بین چهار پلی‌مورفیسم در ژن پروتامینی *TNP2* با ناباروری مردان ایرانی انجام گرفته است نتایج نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین حضور پلی‌مورفیسم G1272C

- [7] Hogarth C., Itman C., Jans D.A. 2005. Regulated nucleocytoplasmic transport in spermatogenesis: a driver of cellular differentiation? *Bioessays*, 27: 1011-1025 .
- [8] Iguchi N., Yang S., Lamb D.J. 2006. An SNP in protamine 1: a possible genetic cause of male infertility? *J Med Genet*, 43: 382-384.
- [9] Imken L., Rouba H., El Houate B., Louanjli N., Barakat A., Chafik A. 2009. Mutations in the protamine locus: association with spermatogenic failure? *Molecular Human Reproduction*, 7: 1-22.
- [10] Jeffreys A.J. 2013. The man behind the DNA fingerprints: an interview with Professor Sir Alec Jeffreys. *Investigative Genetics*, 4(21): 1-7.
- [11] Katherine L., Varghes A.C., Agarwa A. 2010. The genetic causes of male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 93(1): 1-12.
- [12] Kempisty B., Depa-Martynow M., Lianeri M., Jedrzejczak P., Darul-Wasowicz A. 2007. Evaluation of protamines 1 and 2 transcript contents in spermatozoa from asthenozoospermic men. *Folia Histochemica ET Cytobiologica*, 45: 109-113 .
- [13] Konstantinos K.V., Panagiotis P., Antonios V.T., Agelos P., Argiris N.V. 2008. PCR-SSCP: A Method for the Molecular Analysis of Genetic Diseases. *Mol Biotechnol*, 38: 155-163.
- [14] Lewin J.D., Abbott D.W.J. 2003. A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem Cell Biol*, 81: 131-140.
- [15] Miyagawa Y., Nishimura H., Tsujimura A., Matsuoka Y., Matsumiya K., Okuyama A., Nishimune Y.H.T. 2005. Single-nucleotide polymorphisms and mutation analyses of the *TNP1* and *TNP2* genes of fertile and infertile human male populations. *Journal of Andrology*, 26(6): 779-786.
- [16] Oliva R. 2006. Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update*, 12(4): 417-435 .
- [17] Park Sh. 2016. Genetic Factors and Environmental Factors Affecting Male Infertility. *International Research Journal of Advanced Engineering and Science*, 1(3): 115-118.
- [18] Poongothai J., Gopenath T.S., Manonayaki S. 2009. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J*, 50(4): 336-347.

پرداخته شود. با توجه به این مسئله که روز به روز بر تعداد این جهش‌ها و پلی مورفیسم‌های جدید مرتبط با ناباروری افزوده می‌شود و تکنیک‌های *High through put* و مدرن نیز در این رشته در حال افزایش است لزوم به کارگیری این متدها در این زمینه ضروری است، خصوصا در بررسی‌هایی که به بررسی تعداد زیاد نمونه پرداخته می‌شود. بعنوان مثال روش *HRM-RT PCR* یا *Size Fragmentation Analysis* و یا روش‌هایی که از *microRNA* ها استفاده می‌شود و با *Real Time PCR* نتایج بررسی می‌شود می‌تواند راهگشایی برای مطالعات جامع‌تر و متمرکزتری برای آینده باشد. خصوصا در زمینه درمان و فارماکولوژی این مطالعات می‌توانند مکملی بر کارهای گذشتگان باشد.

#### منابع

- [1] Aston K.I., Krausz C., Laface I., Ruiz-Castane E.D.T. 2010. Evaluation of 172 candidate polymorphisms for association with oligozoospermia or azoospermia in a large cohort of men of European descent. *Human Reproduction* 2010, 5: 1-15.
- [2] Dada R., Thilagavathi J., Venkatesh S., Esteves S.C., Agarwa A. 2011. Genetic Testing in Male Infertility. *The Open Reproductive Science Journal*, 3: 42-56.
- [3] El-Toukhy T.P.B. 2002. Male infertility and ICSI. *Current Obstetrics and Gynaecology*, 12: 276-285.
- [4] Ferlin A., Arredi B.C.F. 2006. Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxicol*, 22: 133-141 .
- [5] Gazouez C., Oriola J., De Mateo S., Vidal-Taboada J.M., Balleca J.I. 2008. A common protamine 1 promoter polymorphism (C190A) correlates with abnormal sperm morphology and increased protamine P1/P2 ratio in infertile patients. *Journal of Andrology*, 29: 540-548 .
- [6] Heidari M.M., Khatami M., Talebi A.R., Moezzi F. 2014. Mutation analysis of *TNP1* gene in infertile men with varicocele. *Iran J Reprod*, 12(4): 257-262.

- [19] Raheem A.A., Ralph D. 2011, Male infertility: causes and investigations. Trends in urology and mens health, 2(5): 8-11.
- [20] Ravel C., Chantot-bastarand S., El Houate B., Berthaut I., Verstraete L., De Larouziere V., Lourenco D., Dumaine A, Antoine J.M., Mandelbaum J. 2007. Mutations in the protamine 1 gene associated with male infertility. Molecular Human Reproduction, 5: 1-4.
- [21] Shamsi M.B., Kumar K., Dada R. 2011. Genetic and epigenetic factors: Role in male infertility. Indian Journal of Urology, 27(1): 110-120.
- [22] Tanaka H., Miyagawa Y., Tsujimura A., Matsumiya K., Okuyama A.Y.N. 2003. Single-nucleotide polymorphisms in the protamine-1 and -2 genes of fertile and infertile human male populations. Molecular Human Reproduction, 9: 69-73.
- [23] Venkatesh S., Kumar R., Deka D., Deecaraman M., Dada R. 2011. Analysis of sperm nuclear protein gene polymorphisms and DNA integrity in infertile men. Systems biology in reproductive medicine, 57(3): 124-132.
- [24] Vogt P.H. 2004. Molecular Genetic of Human Male Infertility: From Genes to New Therapeutic Perspectives. Current Pharmaceutical Design, 10(1): 1-30.

Archive of SID