

# بررسی ارتباط میان آسیب DNA اسپرم و میزان بیان miRNAهای القاء کننده آپوپتوز miR-15a/16 و ژن ضد آپوپتوز BCL-2

حسین طاهری<sup>۱</sup>، دکتر سارا حسینی<sup>۲</sup>، دکتر محمد صالحی<sup>۳،۴\*</sup>

۱. کارشناس ارشد علوم تشریحی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۲. استادیار گروه جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات مام، تهران، ایران.
۳. دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۴. دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۰۷

## خلاصه

**مقدمه:** یکی از عوامل ایجاد کننده آسیب در DNA اسپرم، آپوپتوز است. با توجه به نقش حیاتی میکروRNAها در فرآیندهای مختلف پاتوفیزیولوژیک، احتمال کنترل فرآیند آپوپتوز در DNA اسپرم نیز توسط میکروRNAها مطرح شده است. مطالعه حاضر با هدف تعیین ارتباط میان میزان آسیب DNA اسپرم و سطح بیان miR-15a/16 و ژن ضد آپوپتوز BCL-2 انجام شد.

**روش کار:** این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۶ بر روی ۳۰ بیمار مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری بیمارستان طالقانی شهر تهران صورت گرفت. نمونه مایع منی بعد از ۲-۳ روز پرهیز از نزدیکی جمع‌آوری و مطابق با معیارهای سازمان جهانی بهداشت مورد آنالیز قرار گرفت. آماده‌سازی نمونه اسپرم با روش سانتریفیوژ شیب غلظت انجام شد. آسیب DNA اسپرم با تست بررسی ساختار کروماتین اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت و بر اساس میزان آسیب DNA، نمونه‌ها به دو گروه با DFI بیشتر یا مساوی ۳۰ و DFI کمتر از ۳۰ تقسیم شدند. میزان بیان miR-15a/16 و ژن BCL-2 در نمونه بیماران با روش ریل تایم اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۲) و آزمون‌های تی مستقل و بررسی بیان ژن با نرم‌افزار REST 2009 انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** ارتباط منفی معنی‌داری بین DFI بیشتر یا مساوی ۳۰ با حرکت و مورفولوژی نرمال اسپرم مشاهده شد ( $p < 0/05$ ). میزان بیان miR-15a/16 در گروه با DFI بیشتر یا مساوی ۳۰ در مقایسه با گروه کنترل (DFI کمتر از ۳۰)، به‌طور قابل توجهی افزایش و بیان BCL-2 به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود ( $p < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** کاهش بیان BCL-2 به دنبال افزایش miR-15a/16 در هسته اسپرم، منجر به افزایش آسیب DNA در اسپرم می‌شود. ارزیابی miRNAs و ژن مرتبط با آپوپتوز می‌تواند در آینده به عنوان یک ابزار تشخیصی جهت اطمینان از یکپارچگی DNA اسپرم در زوجین نابارور با عامل مردانه مطرح شود.

کلمات کلیدی: آسیب DNA، miR-15a/16، BCL-2

\* نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر محمد صالحی؛ مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.  
تلفن: ۰۲۱-۲۳۸۷۲۵۵۲ پست الکترونیک: m.salehi@sbmu.ac.ir

Fas بر روی ژرم سل‌ها، باعث مرگ سلولی از طریق آپوپتوز می‌شوند و سلول‌های آپوپتوتیک را با فاگوسیتوز حذف می‌کنند، اما فرآیند فاگوسیتوز در سلول‌های سرتولی همیشه به درستی انجام نمی‌شود. در برخی مواقع، ژرم سل‌های آپوپتوتیک با هسته آسیب دیده وارد فرآیند بسته‌بندی دوباره کروماتین در طی اسپرماتوز می‌شوند (۹). یکی از نشانه‌های آپوپتوز، شکسته شدن هسته توسط آنزیم‌های اندونوکلاز هسته‌ای است (۱۴) که در آسیب DNA اسپرم مشاهده می‌شود. تاکنون دو مسیر اصلی برای آپوپتوز در نظر گرفته شده است: مسیر بیرونی و مسیر درونی (۱۵). در مسیر خارجی (یا گیرنده مرگ)، سیگنال‌های مرگ از طریق گیرنده‌های ترانس ممبران منتقل می‌شوند، در حالی که در مسیر داخلی (یا میتوکندریایی)، پیام مرگ به میتوکندری فرستاده می‌شود. مجموعه‌ای از ژن‌ها این وقایع را تنظیم می‌کنند. پروتئین‌های خانواده BCL-2، مسیر میتوکندریایی آپوپتوز را کنترل می‌کنند. اعضای خانواده BCL-2 از پروتئین‌های ضدآپوپتوز و همچنین القاء‌کننده آپوپتوز تشکیل شده است. ژن BCL-2 به عنوان یک عضو ضدآپوپتوتیک، باعث زنده ماندن سلول می‌شود (۱۶).

علی‌رغم شناخت بسیاری از پروتئین‌های کلیدی در مسیر آپوپتوز، مکانیسم‌های مولکولی تنظیم کننده این پروتئین‌ها به طور کامل شناخته نشده است. میکرو RNAها، RNAهای غیرکدشونده کوچکی به طول ۲۳-۲۰ نوکلئوتید هستند که در کنترل پس از ترجمه‌ای بیان ژن نقش دارند. میکروRNAها از نظر تکاملی حفاظت شده هستند و نقش‌های مهمی در فرآیندهای متنوع تکوینی و فیزیولوژیکی مانند آپوپتوز، ترشح انسولین، خون‌سازی، ریخت‌زایی مغز یا تمایز بافتی، سیستم ایمنی و بیماری‌های ویروسی ایفا می‌کنند (۱۷). در انسان، تخمین زده شده است که بیش از ۵۰٪ از رونوشت‌های ژنی، ژن‌های مورد هدف miRNAs هستند. تا به امروز، بیش از ۳۰ miRNA شناخته شده است که در تنظیم آپوپتوز دخالت دارند. هر دو ژن‌های پروآپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک به طور بالقوه توسط miRNAs تنظیم می‌شوند (۱۸). در بیماری لوسمی

## مقدمه

امروزه ناباروری به یک مشکل شایع در جوامع تبدیل شده است. ۱۵٪ از زوجین که سعی در داشتن یک فرزند دارند، قادر به باردار شدن نیستند (۱). ۴۰-۵۰٪ از این زوجین، از ناباروری با عامل مردانه رنج می‌برند (۲). آنالیز سمن به طور معمول جهت ارزیابی ناباروری در مردان نابارور انجام می‌شود، اما علی‌رغم پیشرفتی که در افزایش دقت تشخیصی این آزمایش حاصل شده است (۳)، این روش اطلاعات کافی در مورد یکپارچگی ژنوم گامت نر ارائه نمی‌دهد و نمی‌تواند آسیب در DNA اسپرم را آشکار سازد (۴). ارتباط میان آسیب DNA اسپرم و پارامترهای سمن در بسیاری از مطالعات مورد بررسی قرار گرفته است (۶-۴) و کاهش پارامترهای اسپرم نظیر تعداد، تحرک و موفولوژی گزارش شده است. شواهد موجود نشان می‌دهد در مواردی که آسیب DNA اسپرم بیشتر از ۳۰٪ باشد، احتمال باروری طبیعی به شدت کاهش می‌یابد (۷). همچنین افزایش قابل توجه آسیب DNA اسپرم در مردان نابارور نسبت به مردان بارور نشان داده شده است (۸). مطالعات متعددی به بررسی تأثیر آسیب DNA اسپرم بر ناباروری با عامل مردانه و نتیجه باروری پرداخته‌اند (۹-۱۱). چوی و همکاران (۲۰۱۷) افزایش میزان سقط جنین را در سیکل IVF انجام شده در مردان با درصد بالای آسیب DNA اسپرم گزارش کردند (۱۲). بنابراین ارزیابی صحت یکپارچگی کروماتین اسپرم می‌تواند اطلاعات بهتری را در مورد ناباروری با عامل مردانه فراهم سازد (۱۳).

سه تئوری اصلی که در مطالعات به‌عنوان عوامل ایجاد کننده آسیب در هسته اسپرم مطرح شده‌اند شامل: اختلال در جایگزینی هیستون با پروتامین، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)<sup>۱</sup> و آپوپتوز می‌باشند (۱۰). آپوپتوز، فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است که مجموعه پیچیده‌ای از حوادث منجر به مرگ سلول می‌شود. بالاترین درصد آپوپتوز در بافت بیضه مهره‌داران اتفاق می‌افتد؛ به طوری که ۷۵٪ ژرم سل‌های تولید شده از طریق فرآیند آپوپتوز از بین می‌روند. سلول‌های سرتولی، لیگاند Fas را بیان می‌کنند که با اتصال به

<sup>1</sup> Reactive oxygen species

۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. آنالیز نمونه توسط میکروسکوپ نوری (Nikon, Tokyo, Japan) بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی صورت گرفت. از روش سانتریفیوژ شیب غلظت (DGC)<sup>۳</sup> برای آماده‌سازی اسپرم استفاده شد. به‌طور خلاصه، یک گرادیان دو لایه‌ای با ۱ سی‌سی از محلول ۱۰۰٪ و ۵۰٪ AllGrad (Life Global, Guilford, CT, US) در یک لوله فالکون مخروطی تهیه شد تا یک ستون ممتد از AllGrad دولایه با دو شیب غلظت مجزا ایجاد شود. سپس ۱ سی‌سی از نمونه سمن بر روی لایه ۵۰٪ ریخته و به مدت ۱۴ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی را خارج کرده و رسوب اسپرم با پیپت پاستور آسپیره و به لوله فالکون حاوی محیط (HTF)<sup>۴</sup> غنی شده با آلبومین سرم انسانی ۱۰٪ جهت شستشو منتقل شد. شستشوی اسپرم دو مرتبه به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ انجام شد. نمونه سمن بیماران پس از آماده‌سازی به دو بخش تقسیم شد. یک بخش برای انجام تست بررسی ساختار کروماتین اسپرم (SCSA)<sup>۵</sup> و بخش دیگر برای انجام qRT-PCR مورد استفاده قرار گرفت.

**اندازه‌گیری آسیب DNA اسپرم با استفاده از تست بررسی ساختار کروماتین اسپرم (SCSA)**  
برای انجام SCSA، ابتدا ۵۰ میکرولیتر از سمن آماده شده که حاوی ۱-۲ میلیون اسپرم بود، با ۱ سی‌سی بافر TNE (pH: ۷/۴)، یک میلی مولار EDTA، ۰/۱۵ مولار NaCl، ۰/۰۱ مولار Tris-HCl مخلوط شد. این سوسپانسیون سلولی به مدت ۳۰ ثانیه در معرض یک محلول دترجنت اسیدی (pH: ۱/۲) حاوی تریتون X-۱۰۰، ۰/۱۵ مولار NaCl، ۰/۰۸ نرمال HCl قرار داده شد. سپس با ۶ میلی‌گرم بر لیتر رنگ آکریدین اورانج<sup>۶</sup> در یک بافر فسفات - سیترات با pH=۶ رنگ‌آمیزی صورت گرفت. نمونه رنگ‌آمیزی شده برای بررسی در محفظه نمونه دستگاه فلوسایتومتری قرار داده شد. بر اساس منحنی به‌دست آمده و عدد مربوط به شاخص

لنفوسیتی مزمن<sup>۱</sup>، miR-15a/16 به‌عنوان miRNAهای القاء‌کننده آپوپتوز، ژن BCL-2 را مورد هدف قرار داده و با کاهش بیان BCL-2، منجر به القای آپوپتوز می‌شوند (۱۹). صالحی و همکاران (۲۰۱۹) افزایش miR-15 و کاهش میزان بیان BCL-2 در جنین‌های حاصل از تزریق اسپرم با میزان آسیب DNA بیش از ۳۰٪ را گزارش کردند (۲۰). تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد ارتباط بین میزان آسیب DNA اسپرم و سطح بیان miRNAs القاء‌کننده آپوپتوز در اسپرم صورت نگرفته است. از آنجایی‌که شناخت هرچه بهتر و بیشتر مکانیسم‌های مولکولی دخیل در مسیر آپوپتوز در اسپرم می‌تواند منجر به ارائه رژیم‌های درمانی بهتر برای درمان ناباروری با عامل مردانه گردد، مطالعه حاضر با هدف بررسی سطح بیان miR-15a/16 و ژن BCL-2 به عنوان ژن مورد هدف آن‌ها، در نمونه‌های سمن آسیب DNA بیشتر از ۳۰٪ انجام شد و نتایج با نمونه‌های با آسیب DNA کمتر از ۳۰٪ مورد مقایسه قرار گرفت.

## روش کار

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۶ پس از تأیید در کمیته اخلاق در پژوهش (کد: ۱۳۹) دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد. حجم نمونه بر اساس مطالعات قبلی و با در نظر گرفتن خطای نوع اول ۰/۰۵ و توان آزمون ۰/۸۰، ۳۰ نفر محاسبه شد. روش نمونه‌گیری، غیراحتمالی آسان بود؛ به این‌صورت که از نمونه سمن ۳۰ فرد نابارور مراجعه کننده به مرکز ناباروری بیمارستان طالقانی پس از اخذ فرم رضایت‌نامه استفاده شد. ناباروری با علت مردانه معیار ورود به این مطالعه بود. تمام مواد مصرفی در این مطالعه از شرکت سیگما (Sigma, Ca, USA) خریداری شد، در غیراین‌صورت شرکت مورد نظر ذکر گردیده است.

## جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه سمن:

نمونه سمن بعد از ۳-۲ روز خودداری زوجین از مقاربت جمع‌آوری و برای آبکی‌شدن<sup>۲</sup> به مدت ۳۰ دقیقه در دمای

<sup>3</sup> Density Gradient Centrifuge

<sup>4</sup> Human Tubal Fluid

<sup>5</sup> Sperm Chromatin Structure Assay

<sup>6</sup> Acridine Orange

<sup>1</sup> Chronic lymphocytic leukemia

<sup>2</sup> Liquefaction

پرایمرهای اختصاصی با روش quantitative Real-time PCR (واکنش زنجیره‌ای پلمیراز کمی) با استفاده از دستگاه Rotor-Gene Q instrument (کیاژن) انجام شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است.

شکستگی DNA (DFI)، مراجعه‌کنندگان به دو گروه کنترل با DFI کمتر از ۳۰ و گروه تست با DFI بیشتر یا مساوی ۳۰ تقسیم شدند.

استخراج RNA و انجام qRT-PCR: مطالعه فراوانی بیان miR-15a/16 و ژن BCL-2 با

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای انجام qRT-PCR

Accession number	Sequences	پرایمر
XM_017025917.2	F: GTACTTAAAAAATACAACATCACAG R: CTTGATTCTGGTGTTC	BCL-2
NM_001101.4	F: CTCCTTCCTGGGCATG R: GTCTTTGCGGATGTCCAC	$\beta$ -actin
NR_029485.1	F: AGGCATAGCAGCACATAATG R: GAGCAGGGTCCGAGGT	hsa-miR-15a
NR_029486.1	F: AGCCTAGCAGCACGTAAT R: GAGCAGGGTCCGAGGT	hsa-miR-16
NR_002746.1	F: ATCACTGTAAAACCGTTCCA R: GAGCAGGGTCCGAGGT	Snord

میانگین مورفولوژی اسپرم در گروه کنترل  $2/33 \pm 0/49$  و در گروه تست  $0/75 \pm 0/2$  بود. درصد اسپرم‌های با حرکت پیشرونده در گروه کنترل  $67/39 \pm 6/65$  و در گروه تست  $25/77 \pm 1/51$  بود. با توجه به جدول ۲ در مقایسه پارامترهای اسپرم، درصد اسپرم‌های با مورفولوژی نرمال و همچنین حرکت پیشرونده در نمونه‌های با DFI بیشتر یا مساوی ۳۰٪ به‌طور قابل توجهی کمتر از گروه کنترل گروه بود ( $p < 0/05$ ). از نظر غلظت اسپرم بین دو گروه اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد ( $p > 0/05$ ).

داده‌ها پس از گردآوری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۲) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. جهت بررسی تفاوت میانگین‌ها بین دو گروه آزمون تی دانشجویی استفاده شد. مقایسه سطح بیان ژن BCL-2 و miRNAs در دو گروه با استفاده از نرم‌افزار REST 2009 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

در این مطالعه از نمونه ۳۰ فرد نابارور مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری بیمارستان طالقانی تهران استفاده شد.

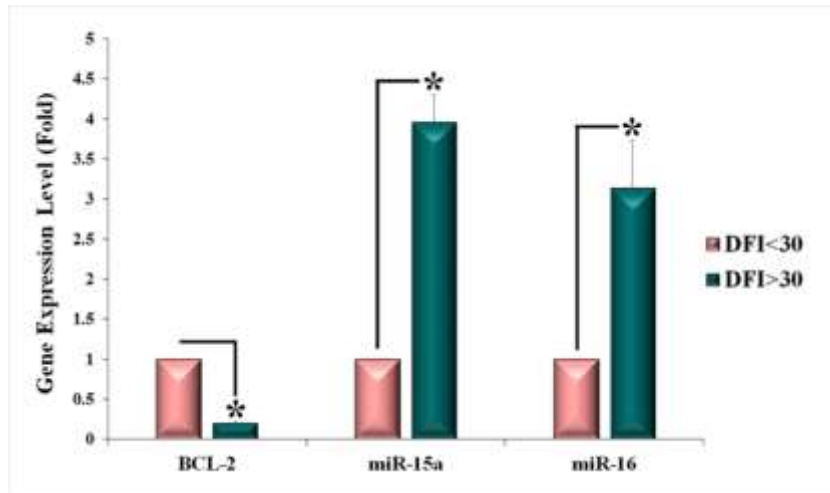
جدول ۲- مقایسه پارامترهای اسپرم بین دو گروه مورد مطالعه

	غلظت اسپرم $10^6/ml$	مورفولوژی اسپرم (درصد)	اسپرم با حرکت پیشرونده (درصد)
			A+B
DFI کمتر از ۳۰٪	$51/66 \pm 5/72$	$2/33 \pm 0/49^*$	$67/39 \pm 6/65^*$
DFI بیشتر یا مساوی ۳۰٪	$41/25 \pm 6/57$	$0/75 \pm 0/2^*$	$25/77 \pm 1/51^*$

\* بیانگر تفاوت معنی‌دار بین دو گروه مورد مطالعه با  $p < 0/05$  است، آزمون تی مستقل

به‌ترتیب ۴ و ۳ برابر افزایش پیدا کرده بود که از نظر آماری معنی‌دار بود ( $p < 0/05$ ). همچنین بر اساس نتایج مطالعه، سطح بیان BCL-2 در گروه تست نسبت به گروه کنترل با کاهش قابل توجهی همراه بود ( $p < 0/05$ ).

میزان بیان miRNA های القاء کننده آپوتوز و ژن ضد آپوتوز BCL-2 نمودار ۱، سطح بیان miR-15a/16 و ژن BCL-2 را در گروه کنترل و تست نشان می‌دهد. فراوانی رونوشت miR-15a/16 در گروه تست نسبت به گروه کنترل



نمودار ۱- مقایسه سطح بیان BCL-2 و miR15a/16 در دو گروه مورد مطالعه  
 \*بیانگر تفاوت معنی‌دار بین دو گروه مورد مطالعه با  $p < 0.01$  است.

ارتباط بین میزان آسیب DNA اسپرم و مورفولوژی اسپرم و در نتیجه عدم همخوانی با سایر مطالعات باشد (۵).

در مطالعه حاضر، بیان دو miRNA القاء‌کننده آپوپتوز و ژن ضدآپوپتوز BCL-2 در نمونه‌های با DFI کمتر و بیشتر از ۳۰٪ مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. نتایج qRT-PCR نشان داد که در بیماران با DFI بیشتر از ۳۰٪ نسبت به گروه کنترل (DFI کمتر از ۳۰٪) بیان miR-15a/16 به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است. همچنین افزایش سطح بیان این دو miRNA با کاهش قابل توجه در میزان بیان BCL-2 به عنوان یکی از ژن‌های مورد هدف miR-15a/16 همراه بود. بنابراین، با توجه به این نتایج، این miRNAs می‌توانند با مورد هدف قرار دادن ژن BCL-2، فرآیند آپوپتوز را در گامت‌ها تنظیم کنند. یکی از مهم‌ترین ژن‌ها در روند تکامل ژرم سل‌ها در مردان، BCL-2 است که آپوپتوز و بقا را در سلول‌های اسپرماتوگونی تنظیم می‌کند. اختلال در بیان BCL-2 منجر به ناباروری می‌شود (۲۴). مصطفی و همکاران (۲۰۱۴) سطح بیان BCL-2 را در مردان نابارور مبتلا به واریکوسل بررسی کردند. آن‌ها کاهش قابل توجه میزان بیان BCL-2 را در این بیماران گزارش کردند. آن‌ها همچنین نشان دادند که بین میزان بیان BCL-2 در سمن با پارامترهای اسپرم شامل غلظت، تحرک و مورفولوژی طبیعی ارتباط مثبت و معنی‌داری وجود دارد (۲۵).

## بحث

اگرچه در دهه اخیر مطالعات بسیاری در مورد اثرات آسیب DNA اسپرم بر نتایج باروری انجام شده است (۹، ۲۳-۲۱)، اما دانش ما در خصوص مکانیسم‌های مولکولی دخیل در ایجاد آسیب DNA در اسپرم بسیار محدود است. از آنجایی که یکی از علل ایجاد آسیب در کروماتین پدری، آپوپتوز است؛ درک مکانیسم‌های درگیر در این فرآیند در گامت‌ها در سطح مولکولی می‌تواند درک عمیقی را در مورد ساختار کروماتین اسپرم ایجاد کند و ممکن است بر استراتژی‌های درمان تأثیرگذار باشد. در مطالعه حاضر سطح آسیب DNA اسپرم بیش از ۳۰٪ بر حرکت پیشرونده اسپرم و مورفولوژی طبیعی اثر منفی داشت که با نتایج مطالعه ویرو و همکاران (۲۰۰۴) مطابقت داشت. در مطالعه آن‌ها نیز پارامترهای اسپرم شامل غلظت، حرکت پیشرونده و مورفولوژی در گروه با DFI بیشتر یا مساوی ۳۰٪ که با روش SCSA بررسی شده بود، با کاهش قابل توجه همراه بود (۲۳). بوشاها و همکار (۲۰۱۵) ارتباط منفی میان آسیب DNA و پارامترهای اسپرم شامل غلظت و حرکت پیشرونده را گزارش کردند، در صورتی‌که با مورفولوژی اسپرم ارتباط معنی‌دار مشاهده نکردند. در مطالعه بوشاها از تست تفرق کروماتین برای بررسی آسیب DNA استفاده شده و نمونه‌ها به دو گروه با DFI کمتر و بیشتر از ۱۸٪ تقسیم شدند که می‌تواند توجیه‌کننده عدم وجود

اسپرم‌های با آسیب DNA در مطالعه صالحی و همکاران (۲۰۱۹) نیز گزارش شده است (۲۰). همچنین ابوحلیمه و همکاران (۲۰۱۳) کاهش بیان miR-34c را به عنوان miRNA القاء کننده آپوتوز در افراد مبتلا به اولیگوآستنواسپرمی گزارش کردند (۳۰). وانگ و همکاران (۲۰۱۱) نیز کاهش بیان miR-34c را در سمینال پلاسمای بیماران مبتلا به آزوآسپرمی نشان دادند (۳۴). در این دو مطالعه علت کاهش سطح بیان این miRNA پروآپوتوتیک (miR-34c) در ناباروری با عامل مردان توضیح داده نشده است که چرا این نتیجه با سایر مطالعات انجام شده متناقض است.

### نتیجه گیری

کاهش بیان BCL-2 به دنبال افزایش miR-15a/16 در هسته اسپرم، منجر به افزایش آسیب DNA در اسپرم می‌شود. ارزیابی miRNAs و ژن مرتبط با آپوتوز می‌تواند در آینده به عنوان یک ابزار تشخیصی جهت اطمینان از یکپارچگی DNA اسپرم در زوجین نابارور با عامل مردانه مطرح شود.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران اجرا شد. بدین وسیله از تمام افرادی که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

امروزه مطالعات بسیاری بر روی نقش miRNAs در بیولوژی تولید مثل متمرکز شده است و برخی از این تحقیقات نقش کلیدی miRNAs را در اسپرماتوژنز نشان داده‌اند (۲۶، ۲۷). مطالعات نشان داده‌اند که اختلال در بیان miRNA ممکن است به ناباروری مردان منجر شود (۳۰-۲۸). بنابراین miRNAها می‌توانند در فرآیند بقای ژرم سل‌های مردانه از اهمیت بالینی برخوردار باشند (۳۱). لیان و همکاران (۲۰۰۹) برای اولین بار تغییرات پروفایل بیانی miRNA در بافت بیضه بیماران نابارور با آزوآسپرمی غیرانسدادی را با استفاده از ریزآرایه (microarray) بررسی و با افراد نرمال مورد مقایسه قرار دادند. آن‌ها تغییر در سطح بیان چندین miRNA را در بافت بیضه این بیماران نسبت به افراد سالم گزارش کردند (۳۲). مطالعات متعددی، تغییر در الگوی بیان miRNAs در اسپرم مردان نابارور را نشان داده‌اند (۲۹، ۳۰). همچنین نشان داده شده است که حتی تغییر در الگوی بیان miRNAs با مورفولوژی و تحرک اسپرم ارتباط دارد (۳۳). ابوحلیمه و همکاران (۲۰۱۳) تغییر در پروفایل بیان miRNAs در اسپرم بیماران مبتلا به اختلالات اسپرماتوژنیک مختلف (آستنواسپرمی و اولیگوآستنواسپرمی) را در مقایسه با مردان بارور با اسپرماتوژنز نرمال گزارش کردند. آن‌ها نشان دادند که بیان miR-16 در نمونه اسپرم افراد مبتلا به اولیگوآستنواسپرمی به طور چشمگیری (۱۰ برابر) نسبت به نمونه افراد نرمال کاهش می‌یابد (۳۰). تغییر در سطح بیان miR-15 در جنین‌های حاصل از

### منابع

- Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, Conway DI, Foster PA, Hinton RA, et al. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985; 291(6510):1693-7.
- Brugh VM 3rd, Lipshultz LI. Male factor infertility: evaluation and management. *Med Clin North Am* 2004; 88(2):367-85.
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva: World Health Organization; 2010.
- Evgeni E, Charalabopoulos K, Asimakopoulos B. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *J Reprod Infertil* 2014; 15(1):2-14.
- Boushaba S, Belaaloui G. Sperm DNA fragmentation and standard semen parameters in algerian infertile male partners. *World J Mens Health* 2015; 33(1):1-7.
- Osadchuk LV, Tataru DA, Kuznetsova NN, Kleshev MA, Markova EV, Svetlakov AV. Sperm DNA fragmentation: association with semen parameters in young men. *Urologia* 2016; 6:118-23.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002; 23(1):25-43.



8. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001; 75(4):674-7.
9. Avendano C, Franchi A, Duran H, Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril* 2010; 94(2):549-57.
10. Schulte RT, Ohl DA, Sigman M, Smith GD. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27(1):3-12.
11. Lin MH, Kuo-Kuang Lee R, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril* 2008; 90(2):352-9.
12. Choi HY, Kim SK, Kim SH, Choi YM, Jee BC. Impact of sperm DNA fragmentation on clinical in vitro fertilization outcomes. *Clin Exp Reprod Med* 2017; 44(4):224-31.
13. Centola GM, Ginsburg KA. Evaluation and treatment of the infertile male. Cambridge: Cambridge University Press; 2004.
14. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284(5756):555-6.
15. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35(4):495-516.
16. Wyllie AH. The genetic regulation of apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5(1):97-104.
17. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol* 2018; 9:402.
18. Subramanian S, Steer CJ. MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis. *J Cell Physiol* 2010; 223(2):289-98.
19. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(39):13944-9.
20. Salehi M, Afarinesh MR, Haghpanah T, Ghaffari Novin M, Farifteh F. Impact of sperm DNA fragmentation on ICSI outcome and incidence of apoptosis of human pre-implantation embryos obtained from in vitro matured MII oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2019; 510(1):110-5.
21. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008; 23(12):2663-8.
22. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction. *Curr Opin Urol* 2006; 16(6):428-34.
23. Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2004; 81(5):1289-95.
24. Yamamoto CM, Hikim AP, Lue Y, Portugal AM, Guo TB, Hsu SY, et al. Impairment of spermatogenesis in transgenic mice with selective overexpression of Bcl-2 in the somatic cells of the testis. *J Androl* 2001; 22(6):981-91.
25. Mostafa T, Rashed L, Nabil N, Amin R. Seminal BAX and BCL2 gene and protein expressions in infertile men with varicocele. *Urology* 2014; 84(3):590-5.
26. Hayashi K, Chuva de Sousa Lopes SM, Kaneda M, Tang F, Hajkova P, Lao K, et al. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS One* 2008; 3(3):e1738.
27. Kotaja N, Lin H, Parvinen M, Sassone-Corsi P. Interplay of PIWI/Argonaute protein MIWI and kinesin KIF17b in chromatoid bodies of male germ cells. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 13):2819-25.
28. Khazaie Y, Nasr Esfahani MH. MicroRNA and male infertility: a potential for diagnosis. *Int J Fertil Steril* 2014; 8(2):113-8.
29. Abhari A, Zarghami N, Farzadi L, Nouri M, Shahnazi V. Altered of microRNA expression level in oligospermic patients. *Iran J Reprod Med* 2014; 12(10):681-6.
30. Abu-Halima M, Hammad M, Schmitt J, Leidinger P, Keller A, Meese E, et al. Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. *Fertil Steril* 2013; 99(5):1249-55.
31. Shaha C, Tripathi R, Mishra DP. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; 365(1546):1501-15.
32. Lian J, Zhang X, Tian H, Liang N, Wang Y, Liang C, et al. Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7(1):13.
33. Curry E, Safranski TJ, Pratt SL. Differential expression of porcine sperm microRNAs and their association with sperm morphology and motility. *Theriogenology* 2011; 76(8):1532-9.
34. Wang C, Yang C, Chen X, Yao B, Yang C, Zhu C, et al. Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clin Chem* 2011; 57(12):1722-31.
- 35.