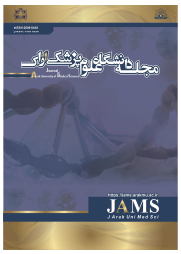
JAMS
مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک
دوره بیست و یک، شماره شش، آذر و دی ۱۳۹۷
journal homepage: http://jams.arakmu.ac.ir



مقاله پژوهشی

بررسی ارتباط بین چندشکلی ژن CPEB2 با خطر ابتلای مردان به آزواسپرمی/الیگواسپرمی شدید ایدیوپاتیک

رضا کیان بستان‌آباد[1]، سعید قربیان[1*]

۱. گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۱/۱۵
تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۱۲
تاریخ انتشار: ۹۷/۱۰/۰۱

واژگان کلیدی

آزواسپرمی
الیگواسپرمی
چندشکلی rs12643066
ژن CEBP2

*نویسنده مسئول:
سعید قربیان
آدرس پستی: ایران، اهر، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، گروه ژنتیک مولکولی.
تماس: +98 41 4422 8211
E-mail:
s_ghorbian@iau-ahar.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: ژن CPEB پروتئین مهمی را رمز می‌کند که در تنظیم فرآیند ترجمه در تخمک‌زایی و اسپرم‌زایی نقش مهمی را بر عهده دارد. هدف از این مطالعه، ارزیابی همراهی بین چندشکلی rs12643066 ژن CPEB2 با خطر ابتلای مردان به آزواسپرمی/الیگواسپرمی شدید ایدیوپاتیک بود.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر در قالب یک بررسی مورد-شاهدی بر روی ۱۰۰ نمونه خون مردان مبتلا به آزواسپرمی/الیگواسپرمی شدید ایدیوپاتیک و ۱۰۰ نمونه خون مردان بارور انجام شد. برای ارزیابی چندشکلی ژن CPEB2 از روش PCR-RFLP استفاده شد. تحلیل داده‌ها با آزمون آماری مجذور کای انجام شد.

یافته‌ها: در ارزیابی حاضر، اختلاف معناداری در فراوانی ژنوتیپی چندشکلی ژن CPEB2 بین دو گروه نشان داده نشد (CI=۰/۷۰۱-۲/۱۲۹، OR=۱/۲۲۲، p=۰/۴۷۹).

نتیجه‌گیری: مطالعه نشان داد که چندشکلی ژن CEBP2 با خطر ابتلای مردان به الیگواسپرمی/آزواسپرمی ایدیوپاتیک ارتباط معناداری ندارد. بنابراین، ممکن است ارزیابی این چندشکلی به‌عنوان یک بیوماکر تشخیصی در بررسی مردان مبتلا به آزواسپرمی/الیگواسپرمی شدید ایدیوپاتیک نقشی نداشته باشد.

تمامی حقوق انتشار این اثر، متعلق به دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد.

www.SID.ir

۱. مقدمه

ناباروری به‌عنوان ناتوانی در باردارشدن بعد از ۱ سال مقاربت منظم بدون استفاده از وسایل پیشگیری از بارداری تعریف شده است (۱). میزان ناباروری در مناطق مختلف دنیا به‌صورت متفاوت گزارش شده است، به‌طوری‌که در جوامع توسعه یافته، میزان ناباروری در حال افزایش است (۲). ناباروری و نازایی فقط به یک عامل وابسته نیست و عوامل بسیاری در آن دخالت دارد. حدود ۱۵ درصد از زوجین گرفتار مشکل ناباروری هستند که تقریباً ۳۵ درصد از علل ناباروری مربوط به مردان است (۳). تاکنون علل متعددی از ناباروری شناسایی شده است، ولی بااین‌حال، حدود ۶۰ درصد از علل ناباروری مردان نامشخص و ایدیوپاتیک باقی مانده است (۴).

ریز حذف‌ها در نواحی AZF کروموزوم Y یکی از عوامل مهم در ناباروری مردان است. بیشتر ریز حذف‌ها در بازوی (Yq) کروموزوم Y رخ می‌دهد که با نقایص اسپرماتوژنز همراه است (۵، ۶). هرچند در دهه اخیر مطالعه مولکولی، غربالگری ریزحذف‌های کروموزوم Y و دیگر روش‌ها به شناسایی علل ایجادکننده ناباروری کمک زیادی کرده است، ولی با این وجود، گاهاً علتی را برای ناباروری مردان نمی‌توان مطرح کرد (۷). نقش miRNA در فرآیندهای حیاتی متنوعی ازجمله آپوپتوز، رشد و نمو، تکثیر و تمایز سلولی ثابت شده است. MiRNAها خانواده‌ای از RNA کوچک غیررمزکننده هستند که به‌طور معمول، ۱۹ تا ۲۳ نوکلئوتید طول دارند. miRNAها در تنظیم بیان ژن بعد از فرآیند ترجمه و یا در خاموش کردن بیان ژن از طریق جفت شدن با mRNA هدف نقش دارند (۸، ۹). مولکول‌های miRNAهای غیررمزکننده متعددی در بیضه شناسایی شده است که نقش مهمی در طی فرآیند اسپرم‌زایی نشان داده است (۱۰). چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) بیشترین تنوع را در DNA انسانی ایجاد کرده‌اند. تجزیه و تحلیل SNPها در ژن‌های مرتبط با بیماری‌های سیستم قلبی و عروقی، دیابت، سرطان و ناباروری مردان بسیار مورد بحث قرار گرفته است (۱۱). حضور چندشکلی‌ها در جایگاه‌های اتصال miRNA ممکن است بر عملکرد آن تأثیر گذار بوده و باعث عدم اتصال miRNA به mRNA هدف شود و در نتیجه تنظیم بیان ژن بعد از فرآیند ترجمه انجام نگیرد (۱۲). ژن CPEB (Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein) عضوی از خانواده پروتئین‌های عنصر پلی آدنیلاسیون اتصال سیتوپلاسمی که توالی خاصی را در تنظیم فرآیند ترجمه در طی تخمک‌زایی مهره‌داران نقش دارد، رمزگذاری می‌کند (۱۲). مولکول mRNA رمزکننده این پروتئین، به شدت توسط یک توالی RNA خاص به نام عنصر پلی آدنیلاسیون سیتوپلاسمی حفاظت شده و در 3′-UTR واقع شده است. این پروتئین در سیتوپلاسم و هسته واجد عملکرد است و نقش مهمی در فرآیند تکثیر سلولی و ایجاد تومور نشان داده است (۱۳). ژن *CPEB* توالی mRNA را رمز می‌کند که پروتئین‌های خاص آن در رشد، سلامت و کنترل بیماری نقش دارد (۱۴). هم‌چنین، محصول ژن *CPEB* در کنترل رشد و تکامل اووسیت فولیکول در موش نقش به‌سزایی نشان داده است (۱۵).

نتایج مطالعات حاکی از آن است که حضور SNPها در ژن *CPEB* باعث تغییر در جایگاه‌های اتصال miRNA شده و خطر بیماری‌های پیچیده ژنتیکی هم‌چون ناباروری‌های ایدیوپاتیک را در مردان افزایش می‌دهد (۱۲، ۱۶).

بررسی‌های اندکی در ارتباط با نقش و اهمیت چندشکلی‌های ژن *CPEB* با اختلالات ناباروری در مردان انجام شده است که گاهاً نتایج متناقضی گزارش گردیده است (۱۷، ۱۸). در مطالعه ژانگ و همکاران که در جمعیت چینی انجام شده بود مشخص شد که چندشکلی در ژن *CPEB1* می‌تواند استعداد ابتلا به ناباروری در مردان را افزایش دهد (۱۷). هم‌چنین، نتایج مطالعه یداللهی خالصی و همکاران در جمعیت ایرانی نشان داد که فراوانی چندشکلی ژن *CPEB1* در بین گروه‌های سالم و نابارور اختلاف معناداری داشت که ممکن است عامل مستعدکننده خطر برای ابتلا مردان به ناباروری به شمار رود (۱۸). با توجه به تفاوت در فراوانی آلل‌ها در قومیت، نژاد و زمینه‌های ژنتیکی مختلف افراد موردبررسی، این مطالعه

Archive of SID

www.SID.ir

برای اولین بار فقط بر روی نژاد خاص ترک آذری در ایران انجام شده است. از طرفی، به‌منظور ارتباط دادن یک اختلال ژنتیکی خاص به یک چندشکلی در ژن خاص، نتایج مطالعات متعددی که مؤید یکدیگر باشند مورد نیاز است. بنابراین، با توجه به تناقض در نتایج گزارش شده، هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط بین چندشکلی (rs12643066) ژن *CPEB2* با خطر ابتلای مردان به آزواسپرمی/الیگواسپرمی شدید ایدیوپاتیک در مراجعه‌کنندگان به بیمارستان الزهرای شهر تبریز بود.

۲. ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با کد ۲۲۰۳۰۵۰۳۹۵۱۰۰۱ به تصویب کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر رسیده است.

۳. مواد و روش‌ها

این مطالعه مورد-شاهدی، ۱۰۰ نمونه خون محیطی مردان آزواسپرم/ الیگواسپرم شدید ایدیوپاتیک و ۱۰۰ نمونه خون محیطی مردان سالم که طی سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۴ جهت درمان و ارزیابی به مرکز درمانی ناباروری و نازایی بیمارستان الزهرای تبریز مراجعه کرده بودند را جمع‌آوری نمود. معیارهای ورود گروه نابارور به مطالعه، مردانی بودند که در ارزیابی‌های متخصصین اورولوژی، نازایی (بر اساس نتایج اسپرموگرام) و ژنتیک پزشکی به‌صورت آزواسپرم/ الیگواسپرم شدید ایدیوپاتیک (افرادی با کمتر از ۵ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر مایع منی معیار الیگواسپرمی شدید و مردان با تعداد اسپرم زیر ۱ میلیون در هر میلی‌لیتر مایع منی آزواسپرمی در نظر گرفته شده بود) گزارش شده بودند. از طرف دیگر، معیارهای ورود گروه سالم به مطالعه، مردان بارور دارای یک فرزند، دارای باروری طبیعی، فاقد تاریخچه خانوادگی ناباروری و از نظر نتایج اسپرموگرام طبیعی بودند. بعد از اخذ رضایت‌نامه از افراد مورد بررسی و با رعایت کامل موازین اخلاقی، از هرکدام ۲ میلی‌لیتر خون محیطی به صورت کاملاً محرمانه و با کد اختصاری، دریافت و پس از استخراج DNA ژنومی با روش Salting-Out (۱۹) نمونه‌های DNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا انجام آزمایشات تخصصی نگهداری شد.

توالی پرایمرها با نرم‌افزار Oligo Analyzer نسخه ۷ طراحی و سپس به‌منظور بررسی اختصاصیت آن‌ها BLAST شدند. توالی ژن جهت انتخاب آنزیم برشی محدودالاثر اختصاصی در نرم‌افزار NEB Cutter وارد شد و در انتها آنزیم محدودالاثر Rsa I تعیین گردید (جدول ۱).

جدول ۱. پرایمرهای طراحی شده برای چندشکلی ژن 16) (CPEB2 (rs12643066)

چندشکلی ژن *CPEB2*	توالی آغازگر (′3 → ′5)	دمای اتصال (°c)	اندازه محصول (جفت باز)	آنزیم محدودالاثر
rs12643066	F: 5′–AGGTTTTTTGGGGTGTTTTG–3′ R: 5′–TTACCATTGTTGGGTGCTTT–3′	۵۰/۴	۱۹۱	Rsa I

کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific، آمریکا) و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد ارزیابی گردید. برای تعیین فراوانی چندشکلی از روش PCR-RFLP استفاده شد.

مخلوط واکنش PCR شامل ۲ میکرولیتر (۱۰۰ نانوگرم) DNAژنومی، ۱ میکرولیتر (۱۰ پیکومول) پرایمرهای مستقیم و معکوس، ۱۵ میکرولیتر از Master Mix Red 2x (Ampliqon، دانمارک) و ۷ میکرولیتر آب مقطر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود.

واکنش PCR با دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf، آلمان) انجام شد. مراحل تکثیر با یک مرحله واسرشته سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، سپس ۳۵ دور در دمای واسرشته سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۰/۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه

Archive of SID
www.SID.ir

سانتی‌گراد به مدت ۷۵ ثانیه تکرار شد. در انتها، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. جهت حصول از اطمینان تکثیر محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری و با رنگ Safe Stain (سینا ژن، ایران) رنگ‌آمیزی انجام شد. سپس محصولات PCR با آنزیم محدود الاثر Rsa I (Fermentas، آلمان) هضم شد. بدین منظور، مطابق پروتکل شرکت سازنده از ۱۰ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر Buffer 10x، ۱ میکرولیتر آنزیم و ۱۷ میکرولیتر آب مقطر استفاده و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. قطعات حاصل از هضم آنزیمی با ژل آگارز ۴ درصد جدا و با رنگ آمیزی Safe Stain شناسایی شد. بعد از هضم آنزیمی، ژنوتیپ‌های هموزیگوت سالم (AA)، هتروزیگوت (AT) و هموزیگوت جهش‌یافته (TT) به دست آمدند (جدول ۲). طول قطعات حاصل از برش در حالت AA، ۶۶ و ۱۲۵ جفت باز، برای AT، ۶۶، ۱۲۵ و ۱۹۱ جفت باز و برای TT، ۱۹۱ جفت باز حاصل شد. بعد از ارزیابی افراد گروه‌های سالم و بیمار از نظر فراوانی ژنوتیپی، نتایج حاصل با استفاده از آزمون آماری مجذور کای، نسبت شانس و در سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده با سطح معناداری $p<۰/۰۵$ مقایسه شد.

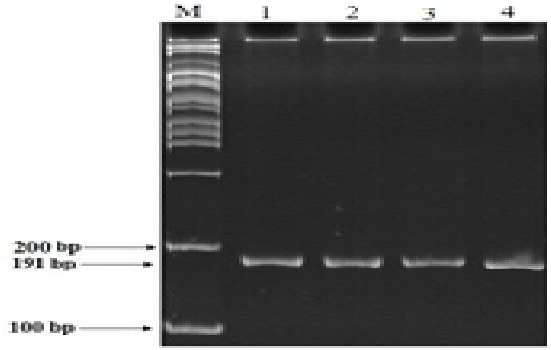
۴. یافته‌ها

میانگین سنین افراد گروه سالم مورد بررسی ۴۳ سال (در محدوده سنی ۲۳ تا ۶۳ سال) و برای گروه بیمار ۴۲ سال (در محدوده سنی ۲۵ تا ۵۹ سال) بود که اختلاف معناداری بین دو گروه مشاهده نشد ($p >۰/۰۵$). نمونه‌ای از تصویر ژل الکتروفورز محصولات تکثیری PCR در شکل ۱ نشان داده شده است. هم‌چنین، نمونه‌ای از تصویر ژل الکتروفورز PCR-RFLP در شکل ۲ نشان داده شده است، به طوری‌که در این شکل، ستون‌های ۱ و ۳ فرد هموزیگوت بیمار (TT)، ستون ۲ فردی با ژنوتیپ هتروزیگوت (AT) و ستون ۴ فردی با ژنوتیپ هموزیگوت سالم (AA) می‌باشند.

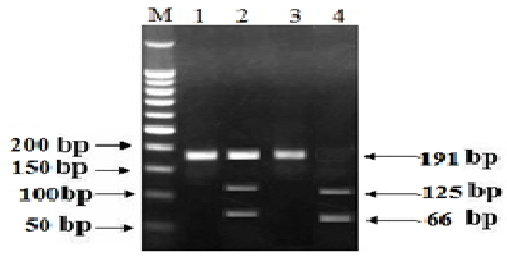
فراوانی ژنوتیپی در مردان گروه بیمار و سالم در الگوهای توارثی مختلف هم‌بارزی، غالب و مغلوب مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ارزیابی هرکدام از الگوهای توارثی به‌طور جداگانه در جدول ۳ ذکر شده است. در گروه بیمار، فراوانی‌ها به ترتیب برای ژنوتیپ‌های AA، AT و TT، ۲۱، ۵۱ و ۲۸ درصد و برای مردان گروه سالم به ترتیب ۱۵، ۴۶ و ۳۹ درصد به دست آمد که اختلاف معناداری در بین دو گروه مشاهده نشد ($p=۰/۲۱۶$). هم‌چنین، فراوانی ژنوتیپ‌ها بین دو گروه در الگوی توارثی هم‌بارزی از نظر آماری اختلاف معناداری نشان نداد ($p =۰/۴۷۹$، CI =۰/۷۰۱ -۲/۱۲۹، OR=۱/۲۲۲).

علاوه براین، در الگوی توارثی، غالب فراوانی ژنوتیپ‌ها در افراد بین دو گروه، اختلاف معناداری نشان نداد ($p =۰/۲۶۹$، CI =۰/۳۲۰ -۱/۳۷۸، OR=۰/۶۶۴). اگرچه در الگوهای توارثی مختلف، فراوانی ژنوتیپی اختلاف معنی‌داری را در بین گروه‌های سالم و بیمار نشان نداد ($p >۰/۰۵$)، این در حالی است که فراوانی هتروزیگوت‌ها در مردان گروه بیمار نسبت به گره سالم در الگوی توارثی هم بارزی بیشتر بود، ولی اختلاف از نظر آماری معنادار نبود ($p=۰/۴۷۹$). از نظر فراوانی آللی، اختلاف معناداری بین دو گروه مشاهده شد ($p =۰/۰۰۰۱$، CI =۲/۱۳۱ -۶/۲۳۰، OR=۳/۶۴۳). علاوه بر این، ارتباط بین ژنوتیپ‌های مختلف با نتایج حاصل از اسپرموگرام از جمله غلظت اسپرم دارای ساختار طبیعی (FSC; Functional Sperm Concentration) غلظت اسپرم حاوی پیش‌رونده (MSC; Motile Sperm Concentration) و شاخص حرکت اسپرم (SMI; Sperm Motility Index) و شاخص کیفیت نمونه با در نظر گرفتن تعداد در بین افراد گروه بیمار مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۴). در این ارزیابی، در هیچ کدام از خصوصیات بالینی ارتباط معنی‌داری با نوع ژنوتیپ‌ها مشاهده نشد ($p >۰/۰۵$).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱. تکثیر محصول PCR برای چندشکلی ژن CEBP2 در ژل آگارز ۱ درصد. M: شاخص وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (۱۰۰ bp)، ستون‌های ۱، ۲، ۳ و ۴: محصول تکثیری ۱۹۱ جفت بازی ژن CEBP2.



شکل ۲. نتایج PCR-RFLP برای چندشکلی ژن CEBP2 در ژل آگارز ۴ درصد. M: شاخص وزن مولکولی ۵۰ جفت بازی (۵۰ bp)، ستون ۱: هموزیگوت جهش یافته (TT)، ستون ۲: هتروزیگوت (AT)، ستون۳: هموزیگوت جهش یافته (TT)، ستون ۴: هموزیگوت سالم (AA).

جدول ۲. فراوانی ژنوتیپ‌های چندشکلی CPEB2 (rs12643066 A>T) در بین گروه‌های سالم و بیمار در الگوهای توارثی مختلف (p <۰/۰۵).

چندشکلی ژن *CPEB2* (rs12643066 A>T)		گروه: تعداد (درصد) بیمار	گروه: تعداد (درصد) سالم	جمع	نسبت شانس	فاصله اطمینان ۹۵ درصد: بالا	فاصله اطمینان ۹۵ درصد: پایین	p
الگوی هم‌بارزی	AT	۵۱ (۵۳)	۴۶ (۴۷)	۹۷	۱/۲۲۲	۲/۱۲۹	۰/۷۰۱	۰/۴۷۹
	AA+TT	۴۹ (۴۸)	۵۴ (۵۲)	۱۰۳				
الگوی غالب	AA	۲۱ (۵۱)	۱۵ (۴۹)	۳۶	۰/۶۶۴	۱/۳۷۸	۰/۳۲۰	۰/۲۶۹
	AT+TT	۷۹ (۴۷)	۸۵ (۷۳)	۱۶۴				
الگوی مغلوب	TT	۲۸ (۴۲)	۳۹ (۵۸)	۶۷	۰/۶۰۸	۴/۳۳۸	۰/۳۳۶	۰/۰۹۹
	AA+AT	۷۲ (۵۴)	۶۱ (۴۶)	۱۳۳				
فراوانی آلل جهش یافته T		۱۰۷	۱۲۴	–	۳/۶۴۳	۶/۲۳۰	۲/۱۳۱	۰/۰۰۰۱
فراوانی آلل وحشی A		۹۳	۷۶	–				

جدول ۳. فراوانی ژنوتیپ‌های چندشکلی ژن CPEB2 در افراد گروه سالم و بیمار

چندشکلی ژن *CPEB2* (rs12643066 A>T)	گروه: تعداد (درصد) بیمار	گروه: تعداد (درصد) سالم	جمع	p
(AA) هموزیگوت سالم	۲۱ (٪۵۸)	۱۵ (٪۴۲)	۳۶	۰/۲۱۶
(AT) هتروزیگوت	۵۱ (٪۵۳)	۴۷ (٪۴۱)	۹۷	
(TT) هموزیگوت جهش‌یافته	۲۸ (٪۴۲)	۳۹ (٪۵۸)	۶۷	

جدول ۴. ارتباط بین پارامترهای بالینی با نوع ژنوتیپ‌ها در مردان گروه بیمار (p <۰/۰۵).

پارامترهای بالینی		تعداد	چندشکلی ژن CPEB2 (rs12643066 A>T): AA	AT	TT	p
سن (سال)	≤ ۵۰	۷۲	۱۱	۴۰	۲۱	۰/۱۰۸
	> ۵۰	۲۸	۷	۹	۱۲	
SMI	≤ ۵۰	۴۵	۹	۲۲	۱۴	۰/۳۲۲
	> ۵۰	۴۴	۵	۲۴	۱۵	
FSC	I	۴۱	۷	۲۵	۹	۰/۲۱۹
	II	۴۵	۱۵	۲۱	۹	
	III	۱۴	۵	۵	۴	
MSC	۱–۵	۴۵	۹	۲۲	۱۴	۰/۸۵۰
	۶–۱۰	۴۴	۵	۲۴	۱۵	

FSC: Functional Sperm Concentration؛ MSC: Motile Sperm Concentration؛ SMI: Sperm Motility Index.

Archive of SID
www.SID.ir

۵. بحث

آزواسپرمی و الیگواسپرمی شدید که به علت تغییرات ژنتیکی ایجاد می‌شوند، بخش مهمی از علل ناباروری مردان را تشکیل می‌دهند. امروزه، اهمیت و نقش چندشکلی‌های ژنتیکی و استعداد ابتلا به برخی بیماری‌ها و اختلالات از جمله مباحث مطرح و قابل‌توجه در زمینه سلامت به شمار می‌رود (۲۰). حداقل ۴۰ درصد از موارد آزواسپرمی به‌عنوان موارد ایدیوپاتیک ناباروری در مردان طبقه‌بندی می‌شوند که احتمالاً با ناهنجاری‌های ژنتیکی در ارتباط است (۲۱). مطالعات نشان داده است که حضور SNPها در ژن *CPEB* باعث تغییر در جایگاه‌های اتصال miRNA شده و خطر اختلالات پیچیده ژنتیکی از قبیل ناباروری مردان را افزایش می‌دهد. این ژن به‌عنوان یک تنظیم‌کننده فرآیند ترجمه در گامت‌ها در هر دو جنس حائز اهمیت است. تغییرات ژنتیکی در ژن *CPEB* می‌تواند به‌عنوان یک عامل برای ناباروری مردان ایدیوپاتیک مطرح باشد (۲۲). محصول رمزشده ژن *CPEB*، زیرواحد آلفای هورمون گلیکوپروتئین است که با زیرواحدهای بتای گونادوتروپین‌ها و هورمون محرک تیروئید، یک هورمون عملکردی را شکل می‌دهد (۲۳). ژنی که در این مطالعه چندشکلی آن مورد بررسی قرار گرفت، *CPEB2* بود که توزیع بافتی گسترده‌ای داشته و در انواع مختلفی از بافت‌ها از جمله بیضه‌ها، تخمدان‌ها، جفت جنین و بافت‌های چربی بیان می‌شود. این ژن از نظر جایگاه سیتوژنتیکی بر روی کروموزوم 4p15.32 قرار گرفته است و واجد ۱۶ اگزون است (۲۴).

نتایج بررسی مطالعه حاضر که در واقع اولین ارزیابی این چندشکلی ژن *CPEB2* (rs12643066) در جمعیت شمال غرب ایران است نشان داده که در جمعیت مورد مطالعه، اختلاف آماری معناداری در فراوانی ژنوتیپ‌های به دست آمده با خطر ابتلای مردان به ناباروری ایدیوپاتیک ناشی از آزواسپرمی/الیگواسپرمی شدید وجود ندارد. علی‌رغم این‌که فراوانی هتروزیگوت‌ها در گروه بیماران نسبت به گروه سالم درصد بیشتر را به خود اختصاص داده، ولی از نظر آماری این اختلاف معنادار نبود. نتایج گزارش شده در مطالعه قبلی با یافته‌های مطالعه حاضر تناقض دارد. البته لازم به ذکر است که تاکنون فقط یک مطالعه در ارتباط با چندشکلی ژن *CPEB2* (rs12643066) با خطر ناباروری مردان ایدیوپاتیک انجام شده است. در اولین مطالعه ژانگ و همکاران که بر روی ۴۴۹ مرد آزواسپرم/الیگواسپرم شدید و ۳۵۷ مرد سالم انجام گرفته بود، نشان داده شد که چندشکلی در ژن *CPEB2* با افزایش خطر ناباروری مردان همراه شده است (۱۲). این در حالی است که در ارزیابی ما هیچ‌گونه افزایش خطری در نتیجه این تغییر نوکلئوتیدی در ژن *CPEB2* با ناباروری مردان جمعیت حاضر نشان داده نشد. کوری‌هارا و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی نقش ژن *CPEB2* در سلول‌های هاپلوئیدی زاینده (Haploid Germ Cells) داشتند، نشان دادند که این ژن در مرحله Postmeiotically و در طی فرآیند اسپرم‌زایی در موش بیان می‌شود. بر اساس نتایج این بررسی، پیشنهاد شده است که محصول این ژن، نقش تنظیمی مهمی در فرآیند ترجمه در مولکول‌های mRNA غیرفعال رونویسی‌شده در سلول‌های اسپرماتید هاپلوئیدی دارند. در طی فرآیند اسپرم‌زایی، ژنوم سلول‌های هاپلوئیدی از نظر رونویسی خاموش هستند (۱۵). بسیاری از مولکول‌های mRNA که در شکل‌گیری هسته و فرآیند اسپرم‌زایی در مرحله هاپلوئیدی ضروری‌اند، در سیتوپلاسم اسپرماتیدها تا زمان نیاز به ترجمه، ذخیره می‌شوند. تنظیم فرآیند ترجمه مولکول‌های mRNA اختصاصی تا این حد، حتی در غیاب این‌که فرآیند رونویسی جدیدی رخ دهد، منجر به تغییرات در سطح پروتئین خواهد شد. یکی از مکانیسم‌های تنظیم فعال‌سازی و یا غیرفعال‌سازی فرآیند ترجمه که مولکول‌های mRNA یوکاریوتی را در بر می‌گیرد، تغییرات دینامیکی در طول دم پلی A در سیتوپلاسم سلول است (۲۵). این فرآیند تحت عنوان پلی آدنیلاسیون سیتوپلاسمی شناخته شده است که به‌واسطه پروتئین متصل‌شونده به عنصر پلی آدنیلاسیون سیتوپلاسمی انجام می‌شود. این فرآیند، اولین بار در طی مطالعه بلوغ اووسیت گزنوپوس گزارش شده بود، به‌طوری‌که اضافه شدن دم پلی A با آغاز فرآیند ترجمه همراه

Archive of SID

www.SID.ir

شده بود (۲۶). در طی اسپرم‌زایی و تخمک‌زایی در پستانداران، تنظیم فرآیند ترجمه با واسطه تغییرات در میزان پلی آدنیلاسیون دم مولکول mRNA حادث می‌گردد. در طی تخمک‌زایی، دم مولکول mRNA مربوط به فعال‌کننده پلاسمینوژن مختص بافتی در سیتوپلاسم دستخوش دآدنیلاسون قرار می‌گیرد که خاموش کردن فرآیند ترجمه را در پی خواهد داشت (۲۷). در مقابل، در طی مراحل آخر اسپرم‌زایی، کوتاه شدن دم پلی A با فعال کردن ترجمه مولکول mRAN پروتامین همراه شده است. کوتاه و طویل شدن‌های اختصاصی دم پلی A در سیتوپلاسم، به‌واسطه برهمکنش عناصر سیس ویژه عنصر پلی آدنیلاسیون سیتوپلاسمی (CPE) و فاکتور ترانس پروتئین‌های متصل شونده به RNA (CPEB) خواهد بود. علاوه بر CPE در انسان و موش دو عضو اضافه دیگری نیز از خانواده این پروتئین‌ها که تحت عناوین KIAA0940 و KIAA1673 شناخته می‌شوند، وجود دارند. اگرچه عملکرد دقیق آن‌ها کاملاً شناخته شده نیست، ولی ممکن است به عنوان تنظیم‌کنندگان ترجمه در شرایط فضایی و زودگذر عمل کنند. به دلیل پیچیدگی در تنظیم بیان ژن در مرحله بعد از رونویسی (Post-transcriptional) در طی اسپرم‌زایی، احتمالاً پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA اختصاصی سلول‌های زاینده، عملکردهای حیاتی و مهمی را در سلول‌های زاینده در مردان در پی خواهد داشت (۲۸).

نتایج مطالعه بولکان و همکاران نشان داده بود که SYCE1 (Synaptonemal Complex Central Element Protein1) و *CPEB1* نقش بسیار مهم و حیاتی در فرآیند میوز و حفظ سیناپتونمال کمپلکس بین کروموزوم‌های همولوگ دارد (۲۹). از طرف دیگر، نتایج ارزیابی ژنگ و همکاران در مدل موشی نشان داده بود که در نتیجه knockout کردن ژن‌های *CPEB1* و *SYCE1*، فرآیند میوز به دلیل عدم شکل‌گیری کمپلکس سیناپتونمال متوقف شده و منجر به ناباروری می‌شود (۳۰). بنابراین، بر اساس آن‌چه از نتایج مطالعات قبلی به دست می‌آید تغییرات در سطح بیان و یا چندشکلی در این ژن‌ها، با ناباروری همراهی بوده است. اما تناقض نتایج مطالعه حاضر نسبت به مطالعه ژانگ و همکاران را می‌توان احتمالاً به دلیل متفاوت‌بودن فراوانی آللی در مناطق جغرافیایی مختلف توجیه نمود. در مطالعه حاضر، ۱۰۰ مرد نابارور و ۱۰۰ مرد سالم مورد ارزیابی قرار گرفته بودند، درحالی‌که در مطالعه مشابه تعداد بیشتری از مردان ارزیابی شده بودند. از طرف دیگر، می‌توان اذعان کرد که شاید این تناقضات به دلیل اختلافات قومی، نژادی و زمینه ژنتیکی متفاوت افراد مورد مطالعه باشد. هم چنین، معیارهایی که در انتخاب گروه‌های موردمطالعه در نظر گرفته می‌شود ممکن است به اختلاف در گزارش نتایج منتهی شود. البته، گاهی اختلافات ناشی از خطاهای آزمایش و یا تجزیه و تحلیل داده‌ها می‌باشد. ویژگی این مطالعه این بود که در انتخاب نمونه‌های مردان نابارور، معیارهای ورود و خروج از مطالعه با دقت و حساسیت بالایی انجام گرفته بود. از طرف دیگر، در این مطالعه فراوانی ژنوتیپ‌های چندشکلی rs12643066 در الگوهای مختلف توارثی مورد ارزیابی قرار گرفت که در هیچ‌کدام از این حالت‌ها، ارتباط معناداری مشاهده نشد. علاوه براین، ارتباط بین هریک از ژنوتیپ‌های چندشکلی rs12643066 با پارامترهای بالینی ازجمله سن، FSC، MSC و SMI مورد بررسی قرار گرفته بود که در این شاخص‌ها نیز ارتباط معناداری مشاهده نشده بود. قابل ذکر است که جهت تأیید نتایج گزارش‌شده، به انجام مطالعات وسیع‌تر و در جمعیت‌هایی با قومیت‌های مختلف نیاز است و نمی‌توان ژنتیکی‌بودن یک ناهنجاری خاص را با نتایج گزارش‌های چندین بررسی محدود و در جمعیتی خاص ادعا کرد.

۶. نتیجه‌گیری

در این مطالعه نشان داده شد که فراوانی چندشکلی ژن *CEBP2* در بین گروه‌های موردبررسی از نظر آماری اختلاف معناداری نداشت و احتمال می‌رود که چندشکلی ژن *CEBP2* نتواند عامل مستعدکننده خطر ابتلای مردان به آزواسپرمی/الیگواسپرمی شدید در مردان جمعیت مورد بررسی

Archive of SID
www.SID.ir

به شمار رود. لازم است جهت تأیید این مطالعه، بررسی در جمعیت‌هایی با نژاد و مناطق جغرافیایی مختلف انجام گیرد.

۷. تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه آقای رضا کیان بستان آباد است و حامی مالی خود نویسنده بوده است که با مشارکت کارکنان بیمارستان الزهرای شهر تبریز انجام گرفت. بدین‌وسیله از کلیه عزیزانی که ما را در انجام این مطالعه یاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Yu XW, Wei ZT, Jiang YT, Zhang SL. Y Chromosome Azoospermia Factor Region Microdeletions and Transmission Characteristics in Azoospermic and Severe Oligozoospermic Patients. International Journal of Clinical and Experimental Medicine. 2015; 8(9):14634.
2. Zhang YS, Li LL, Xue LT, Zhang H, Zhu YY, Liu RZ. Complete Azoospermia Factor b Deletion of Y Chromosome in an Infertile Male With Severe Oligoasthenozoospermia: Case Report and Literature Review. Urology. 2017; 102:111-5.
3. Moghbelinejad S, Mozdarania H, Ghoraeian P, Asadi R. Basic and clinical genetic studies on male infertility in Iran during 2000-2016: A review. International Journal of Reproductive Biomedicine. 2018; 16(3):131.
4. Cong J, Li P, Zheng L, Tan J. Prevalence and risk factors of infertility at a rural site of northern China. PloS one. 2016; 11(5): e0155563.
5. Hong Y, Wang C, Fu Z, Liang H, Zhang S, Lu M, Sun W, Ye C, Zhang CY, Zen K, Shi L. Systematic characterization of seminal plasma piRNAs as molecular biomarkers for male infertility. Scientific reports. 2016; 6:24229.
6. Ghorbian S. Routine diagnostic testing of Y chromosome deletions in male infertile and subfertile. Gene. 2012; 503(1):160-4.
7. Wosnitzer MS. Genetic evaluation of male infertility. Translational andrology and urology. 2014; 3(1):17.
8. Hayashi K, de Sousa Lopes SM, Kaneda M, Tang F, Hajkova P, Lao K, O'Carroll D, Das PP, Tarakhovsky A, Miska EA, Surani MA. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. PloS one. 2008; 3(3): e1738.
9. Ghorbian S. Micro-RNAs, next-generation molecular markers in male infertility field. Translational andrology and urology. 2012; 1(4):245-6.
10. Poursadegh Zonouzi A, Poursadegh Zonouzi AA, Ghorbian S. PiRNAs interacting proteins, candidate molecular marker for evaluation of idiopathic male infertility. Andrologia. 2014; 46(8):823.
11. Tüttelmann F, Rajpert-De Meyts E, Nieschlag E, Simoni M. Gene polymorphisms and male infertility–a meta-analysis and literature review. Reproductive biomedicine online. 2007; 15(6):643-58.
12. Zhang H, Liu Y, Su D, Yang Y, Bai G, Tao D, Ma Y, Zhang S. A single nucleotide polymorphism in a miR-1302 binding site in CGA increases the risk of idiopathic male infertility. Fertility and sterility. 2011; 96(1):34-9.
13. Kothandaraman N, Agarwal A, Abu-Elmagd M, Al-Qahtani MH. Pathogenic landscape of idiopathic male infertility: new insight towards its regulatory networks. NPJ genomic medicine. 2016; 1:16023.
14. Giangarrà V, Igea A, Castellazzi CL, Bava FA, Mendez R. Global analysis of CPEBs reveals sequential and non-redundant functions in mitotic cell cycle. PloS one. 2015; 10(9): e0138794.
15. Kurihara Y, Tokuriki M, Myojin R, Hori T, Kuroiwa A, Matsuda Y, Sakurai T, Kimura M, Hecht NB, Uesugi S. CPEB2, a novel putative translational regulator in mouse haploid germ cells. Biology of reproduction. 2003; 69(1):261-8.
16. Tšuiko O, Noukas M, Žilina O, Hensen K, Tapanainen JS, Mägi R, Kals M, Kivistik PA, Haller-Kikkatalo K, Salumets A, Kurg A. Copy number variation analysis detects novel candidate genes involved in follicular growth and oocyte maturation in a cohort of premature ovarian failure cases. Human Reproduction. 2016; 31(8):1913-25.
17. Zhang H, Liu Y, Su D, Yang Y, Bai G, Tao D, Ma Y, Zhang S. A single nucleotide polymorphism in a miR-1302 binding site in CGA increases the risk of idiopathic male infertility. Fertility and sterility. 2011; 96(1): 34-9.
18. YadollahyKhaless A, Kalhor N, Atri Roozbahani G. Association between CPEB1 gene polymorphism and Iranian male infertility. SSU Journals.2017; 25(8): 612-20.
19. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic acids research. 1988; 16(3):1215.
20. Chen YI, Wei PC, Hsu JL, Su FY, Lee WH. NPGPx (GPx7): a novel oxidative stress sensor/transmitter with multiple roles in redox homeostasis. American journal of translational research. 2016; 8(4):1626.
21. Liu TE, Cheng W, Gao Y, Wang HU, Liu Z. Microarray analysis of microRNA expression

Archive of SID

www.SID.ir

patterns in the semen of infertile men with semen abnormalities. Molecular medicine reports. 2012; 6(3):535-42.
22. Carrell DT. Contributions of spermatozoa to embryogenesis: assays to evaluate their genetic and epigenetic fitness. Reproductive biomedicine online. 2008; 16(4):474-84.
23. Xie T, Yu CH, Zheng Y, Zhou-Cun A. The polymorphism G4C14-to-A4T14 in p73 gene may affect the susceptibility to male infertility with severe spermatogenesis impairment in Chinese population. European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology. 2016; 204:74-7.
24. Giangarrà V, Igea A, Castellazzi CL, Bava FA, Mendez R. Global analysis of CPEBs reveals sequential and non-redundant functions in mitotic cell cycle. PloS one. 2015; 10(9): e0138794.
25. Kleene KC. A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. Mechanisms of development. 2001; 106(1-2):3-23.
26. Steger K. Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. Anatomy and embryology. 2001; 203(5):323-34.
27. Huarte J, Stutz A, O'Connell ML, Gubler P, Belin D, Darrow AL, Strickland S, Vassalli JD. Transient translational silencing by reversible mRNA deadenylation. Cell. 1992; 69(6):1021-30.
28. Stepien BK, Oppitz C, Gerlach D, Dag U, Novatchkova M, Krüttner S, Stark A, Keleman K. RNA-binding profiles of Drosophila CPEB proteins Orb and Orb2. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016; 113(45): E7030-8.
29. Bolcun-Filas E, Speed R, Taggart M, Grey C, de Massy B, Benavente R, Cooke HJ. Mutation of the mouse Syce1 gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. PLoS genetics. 2009; 5(2): e1000393.
30. Zheng P, Griswold MD, Hassold TJ, Hunt PA, Small CL, Ye P. Predicting meiotic pathways in human fetal oogenesis. Biology of reproduction. 2010; 82(3):543-51.

Archive of SID

www.SID.ir

JAMS
Journal of Arak University of Medical Sciences
2018; 21(6)
Journal Homepage: http://jams.arakmu.ac.ir

ORIGINAL RESEARCH

Study the Association Between CPEB2 Gene Polymorphism with the Risk of Idiopathic Azoospermia/Severe Oligozoospermia of Men

Reza Kian Bostanabad[1], Saeid Ghorbian[1]*

1. Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history

Received: *04 April 2018*

Accepted: *03 July 2018*

Published online: *22 December 2018*

Keywords

Azoospermia

CEBP2 gene

Oligozoospermia

Rs12643066 polymorphism

**** Corresponding Author:***

Saeid Ghorbian; Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

Fax: *+98 41 4422 8211*

Email: *ghorbian20@yahoo.com*

ABSTRACT

Background and Aim: The CPEB gene encodes an important protein, which play critical roles in translational regulation of oogenesis and spermatogenesis procedures. The aim of this study was to evaluate the association between CPEB2 rs12643066 gene polymorphism with the risk of idiopathic azoospermia/severe oligozoospermia of men.

Materials and Methods: This study was designed as a case-control investigation on 100 blood samples of men with idiopathic azoospermia/severe oligozoospermia and 100 blood samples of fertile men. To evaluate CPEB2 gene polymorphism, PCR-RFLP method was used. Data analysis was performed by chi-squat test.

Findings: In the present study, the genotype frequencies did not show a statically significant difference between groups (p=0.479, OR=1.222; CI=0.701-2.129).

Conclusion: The study showed that the CPEB2 gene polymorphism was not associated with the risk of idiopathic azoospermia/severe oligozoospermia of men. However, it is conceivable that evaluation of this gene polymorphism can not be used as a biomarker in diagnosis of men with idiopathic azoospermia/severe oligozoospermia.

© Copyright (2018) Arak University of Medical Sciences

Cite this article as: Kian Bostanabad R., Ghorbian S. Study the Association Between CPEB2 Gene Polymorphism with the Risk of Idiopathic Azoospermia/Severe Oligozoospermia of Men. J Arak Uni Med Sci. 2018; 21(6): 88-98.

This open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).

www.SID.ir