بررسی جهش های ژن CFTR در بیماران ایرانی مبتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی

رضا میرفخرایی*، دکتر سید مهدی کلانتر**، دکتر ناصر سلسبیلی***، مریم منتظری****
حسین فضلی**، دکتر سیدمسعود هوشمند****، دکتر فرزانه میرزاجانی****

* دانشگاه آزاد اسلامی تهران ، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی
** مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری یزد
*** دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان میرزا کوچک خان
**** پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران

تاریخ دریافت مقاله : ۸۷/۱۰/۷
تاریخ پذیرش مقاله : ۸۷/۱۰/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: عوامل ژنتیکی علت حدود ۱۰ درصد از موارد ناباروری در مردان است. جهش های ژن CFTR یکی از دلائل نسبتاً شایع ابتلاء مردان به ناباروری است. این جهش‌ها می‌توانند باعث بیماری فیبروز کیستیک(CF) شوند که یکی از شایع ترین اختلالات اتوزومال مغلوب است و با بیماری ریوی مزمن، اختلالات اگزوکرین پانکراس و ناباروری در مردان به دلیل آزواسپرمی انسدادی همراه است. هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر جهش های ژن CFTR در ابتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی می باشد.

مواد و روش کار: در تحقیق حاضر وقوع جهش های شایع ΔF508، G542X، N1303K و W1282X با استفاده از روش PCR-ARMS ، جهش R117H و چندشکلی IVS8-5T به کمک روش PCR-RFLP و نیز جهش های احتمالی در اگزون ها ی ۴، ۷، ۱۰، ۱۱، ۲۰و ۲۱ با استفاده از روش SSCP در ۱۰۶ بیمار مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی و نیز ۵۰ فرد بارور به عنوان گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفت. نمونه ها از مراکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری یزد ، کوثر و بخش IVF بیمارستان دی در فاصله زمانی مرداد ماه ۱۳۸۶ تا تیر ماه ۱۳۸۷ جمع آوری گردید.

یافته ها: ۱۳ بیمار (۱۲/۲۶٪) وقوع جهش های 406-6T>C، A120T، I148T، ΔF508، 1525-18 A>G، G542X، L1304M و نیز چندشکلی IVS8-5T را نشان دادند که در این میان جهش L1304M اولین بار در دنیا و در این تحقیق گزارش شده است. در گروه شاهد هیچ یک از جهش های ژن CFTR مشاهده نگردید و فراوانی آللی چندشکلی IVS8-5T در این گروه ۳ درصد برآورد گردید.

نتیجه گیری: نتایج تحقیق حاضر بیانگر ارتباط میان جهش های ژن CFTR و ابتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی است. از این رو غربالگری جهش های ژن مذکور در زوج هایی که جهت درمان ناباروری از روش های کمک باروری نظیر تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) استفاده می نمایند توصیه می گردد. **(مجله طبیب شرق، دوره ۱۰، شماره ٤، زمستان ۱۳۸۷، ص ۲۷۳ تا ۲۸۰)**

کلید واژه ها: آزواسپرمی غیر انسدادی، CFTR، جهش

مقدمه

آزواسپرمی[1] به معنای فقدان اسپرم در مایع منی[2] است که علل آن در دو گروه انسدادی[3] و غیر انسدادی[4] قابل طبقه بندی می باشد. در نوع انسدادی اسپرماتوژنز بصورت عادی انجام می شود ولی به دلیل وقوع انسداد در سطوح مختلف مانند مجاری

1 Azoospermia
2 Semen
3 Obstructive
4 Non-obstructive

آدرس نویسنده مسئول:دانشگاه آزاد اسلامی تهران ، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی Email: reza_mirfakhraie@yahoo.com

www.SID.ir

وازدفران، اپیدیدیم و شبکه بیضه اسپرم در مایع منی وجود ندارد. در آزواسپرمی غیر انسدادی یا ترشحی نقصی در اسپرماتوژنز وجود دارد که می‌تواند به دلیل نارسائی هیپوفیز و یا نقص اولیه بیضه باشد و با عدم تولید اسپرم بالغ همراه است.[۱] اولین بار Holsclaw و همکاران در سال ۱۹۷۱ اساس ژنتیکی مشترکی را برای فیبروز سیستیک (CF[5])و فقدان مادر زادی وازدفران (CBAVD[6]) فرض نمودند.[۲] بیست سال بعد کلونیزاسیون ژن CFTR[7] و شناسائی جهش های این ژن در بیماران CF و CBAVD نشان داد که CBAVD و سایر اشکال آزواسپرمی انسدادی در واقع اشکال غیر تیپیک CF هستند.[۳،۴] تا سال ۱۹۹۰ درمان ناباروری مردان آزواسپرم مبتلا به CF یا اشکال غیر تیپیک آن امکان پذیر نبود. Silber و همکاران در سال ۱۹۹۰ از طریق بکارگیری روش‌های MESA[8] و IVF[9] موفق به بارور نمودن زوجی شدند که شوهر به CBAVD مبتلا بود.[۵] بعد از آن ثابت شد که ترکیب MESA و ICSI[10] موفقیت آمیزتر خواهد بود. اگرچه به کارگیری MESA/ICSI در مردان مبتلا به آزواسپرمی انسدادی باعث افزایش خطر ابتلاء فرزندان به CF می‌شود.[۲]

گزارشاتی مبنی بر نقش ژن CFTR در سایر اشکال ناباروری به جز CBAVD نیز وجود دارد.[۶-۸] مهمترین نقش پروتئین CFTR انتقال یون های کلراید از طریق غشاء سلول های اپی تلیال است. جهش های این ژن باعث عدم توازن مایعات در برخی از ارگان ها از جمله سیستم تناسلی می شود.[۲] در مطالعه‌ای بر روی ۱۷ بیمار که در آنها مجاری واز دفران و یا اپیدیدیم دچار انسداد شده بود، جهش در ۸ آلل از ۳۴ آلل CFTR (۲۳/۵٪) گزارش گردید و از این ۸ جهش ۵ مورد به صورت آلل T5 مشاهده شد.[۹] در مطالعه دیگر، ۱۴ نفر از ۸۰ بیمار (۱۷/۵٪) که فنوتیپ‌های متغیری از اولیگواسپرمی تا اولیگواستنوتراتوزواسپرمی[11] داشتند جهشی را در ژن CFTR نشان دادند.[۱۰] در مطالعه ای دیگر بر روی ۷۵ بیمار مبتلا به الیگواستنوتراتوزواسپرمی تفاوت معنی داری بین بیماران و گروه شاهد از نظر فراوانی جهش های CFTR مشاهده نشد[۱۱]. بنابراین نقش CFTR در سایر اشکال ناباروری مردان چندان واضح نیست و نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه هست. تنظیم بیان ژن CFTR در طی تولید اسپرماتوزوآ در rat نشان داده شده است.[۱۲]رونوشت های CFTR تنها در اسپرماتیدهای مدور پس- میوزی[12] قابل ردیابی هستند. در طی این مرحله تکاملی، اسپرماتیدهای هاپلوئید به اسپرماتوزوآ تبدیل می‌شوند و متراکم شدن هسته و کاهش در حجم سیتوپلاسم که احتمالاً به دلیل کاهش میزان آب درون سلولی است در این مرحله رخ می‌دهد.[۴] هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر جهش های ژن CFTR در ابتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی می باشد. با توجه به وسعت ژن CFTR استراتژی غربالگری جهش های ژن CFTR و انتخاب اگزون های مورد بررسی بر پایه فراوانی وقوع جهش ها در دنیا و در ایران صورت گرفت.از این جهت علاوه بر جهشهای شایع ΔF508، G542X، N1303K، W1282X، R117H و چندشکلی IVS8-5T[13]، اگزون های ۴، ۷، ۱۰، ۱۱، ۲۰ و ۲۱ نیز از نظر وقوع جهش های احتمالی مورد بررسی قرار گرفتند.

روش کار

این تحقیق بر روی ۱۰۶ مرد مبتلا به ناباروری از نوع آزواسپرمی غیر انسدادی که از مراکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری ، کوثر و بخش IVF بیمارستان دی یزد در فاصله زمانی مرداد ماه ۱۳۸۶ تا تیر ماه ۱۳۸۷ معرفی شده بودند انجام گرفت. تعیین نوع ناباروری بر اساس آنالیز مایع منی بر مبنای دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی صورت پذیرفت و میزان FSH و LH بیماران

5 Cystic fibrosis
6 Congenital bilateral absence of vas deferens
7 Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
8 Micro epididymal sperm aspiration
9 In-vitro fertilization
10 Intra cytoplasmic sperm injection

11 Oligoastenoteratozoospermia
12 Post-meiotic
13 Polymorphism

www.SID.ir
Archive of SID

تعیین گردید. تعداد ۵۰ نفر مرد بارور که دارای حداقل ۱ فرزند بودند و هیچ نوع سابقه ابتلاء به ناباروری در خانواده آنها وجود نداشت به عنوان گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. به این منظور از کلیه افراد مورد نظر بعد از کسب رضایت نامه ۵ میلی لیتر خون محیطی در فالکونهای حاوی ۵۰۰ میکرولیتر محلول EDTA (۲۰ میلی مولار، pH=8) (۱۰۰میکرولیتر به ازاء هر یک میلی لیتر خون محیطی) اخذ گردید. نمونه ها در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان استخراج نگهداری شدند. استخراج DNA ژنومی از لنفوسیت های خون محیطی با استفاده از کیت تجاری (Qiagene Cat.No.51204) انجام شد. در مرحله اول وقوع جهش های شایع ΔF508، G542X، N1303K و W1282X با استفاده از واکنش Multiplex ARMS-PCR و وقوع جهش R117H و چندشکلی 5T با استفاده از روش PCR-RFLP مطابق پروتکل های استاندارد مورد بررسی قرار گرفتند.[۷] در مرحله دوم جهت غربالگری جهش ها در اگزون های ۴، ۷، ۱۰، ۱۱، ۲۰ و ۲۱ از روش SSCP[۱۴] مطابق پروتکل های استاندارد استفاده گردید[۱۳]. نمونه هایی که دارای الگوی باند متفاوتی از گروه شاهد بودند جهت تعیین توالی به کمپانی Macrogen (کره جنوبی) ارسال شدند.

در مورد بررسی تفاوت فراوانی چند شکلی IVS8-5T در میان بیماران و جمعیت شاهد از آزمون Pearson (نرم افزار SPSS 16.0) استفاده گردید و مقدار عدد P<۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

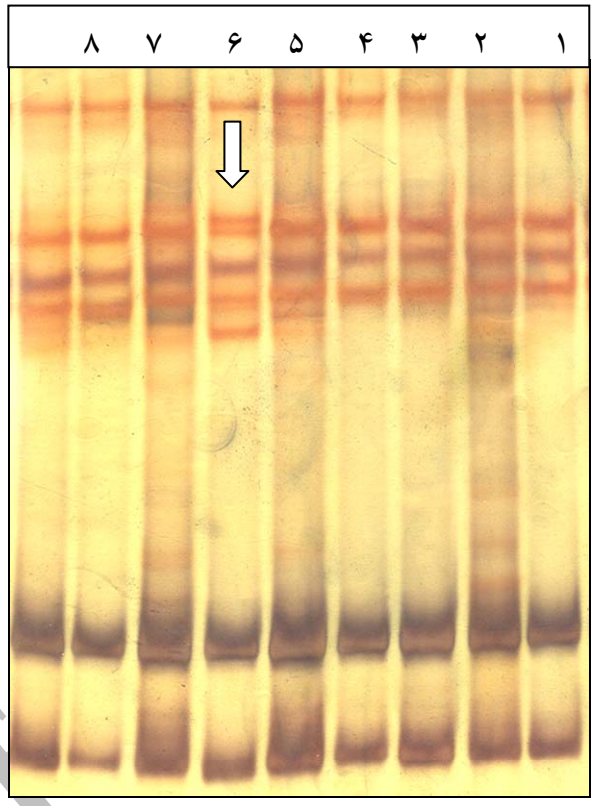
یافته های این مطالعه نشان داد که پایین ترین سن ابتلا به ناباروری در بین مراجعه کنندگان ۲۱ سال و بالاترین سن ۶۰ سال بود. هم چنین میانگین سن ابتلا به ناباروری در بیماران مورد مطالعه ۶/۴۳±۳۲/۴۱ سال محاسبه گردید. میزان شمارش اسپرم در کلیه بیماران مطابق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی در ۱ میلی لیتر مایع منی برابر صفر تعیین گردید. نتایج حاصل از بررسی جهش های ژن CFTR در بیماران مورد مطالعه در جدول ۱ ذکر شده است. شکل ۱ نشان دهنده نمونه ژلSSCP در مورد اگزون ۴ است. بجز بیمار شماره Y20 که برای دو جهشA120T و L1304M هتروزیگوت مرکب بود، سایر بیماران برای جهش یافت شده هتروزیگوت بودند. در کل ۱۳ نفر از بیماران (۱۲/۲۶٪) وقوع جهش را نشان دادند. جهش 1525-18A/G با فراوانی ۱۹/۲۳ درصد فراوان ترین جهش مشاهده شده در بین بیماران بود و سایر جهش ها با فراوانی ۳/۸۵ درصد در بیماران مشاهده شدند. فراوانی چندشکلی 5T نیز در گروه بیماران ۱۱/۵۴ درصد تعیین گردید. فراوانی هتروزیگوسیته در بیماران ۱۲/۲۶ درصد و در گروه شاهد ۲/۵ درصد برآورد گردید. در گروه شاهد ۳ نفر به صورت هتروزیگوت چند شکلی 5T را نشان داد که بررسی آماری اختلاف معنی داری را بین بیماران و گروه شاهد در این مورد نشان نداد (X^2=۰/۱۱۲ ؛ P=۰/۷۳۸).

جدول ۱. جهش های مشاهده شده در ژن CFTR در بیماران مورد مطالعه

شماره	سن	FSH mIU/ml	LH mIU/ml	جهش	اگزون	انترون
Y25	۳۶	۳۴	۱۲	406-6T>C	-	۳
Y20	۲۶	۵۰	۱۱	A120T L1304M	۴ ۲۱	- -
K101	۳۶	۳۷	۱۲	I148T	۴	-
Inf5	۳۷	۳۷	۱۲	IVS8-5T	-	۸
Inf16	۳۳	۲۴	۱۲	IVS8-5T	-	۸
K105	۲۸	۱۸	۱۲	IVS8-5T	-	۸
K108	۳۲	۳۷	۹/۸	IVS8-5T	-	۸
Inf45	۲۷	۵۴	۱۲	IVS8-5T	-	۸
Y13	۳۸	۲۱	۱۲	1525-18A>G	-	۹
K120	۳۴	۳۰	۲۵	1525-18A>G	-	۹
Y38	۴۰	۲۳	۱۲	1525-18A>G	-	۹
K103	۳۸	۲۰	۱۲	ΔF508	۱۰	-
Inf28	۳۱	۲۳	۱۲	G542X	۱۱	-

14 Single Strand Conformation Polymorphism

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۱. نمونه ای از ژل SSCP در مورد اگزون ۴ ژن CFTR. ستون ۱ نمونه فرد طبیعی، ستون های ۹-۲ نمونه بیماران. ستون ۶ نشان دهنده جهش 406-6T>C به حالت هتروزیگوت می باشد.

بحث

ناباروری در مردان مبتلا به CF غالباً به دلیل ناهنجاری‌های رشدی و تکاملی در مجاری واز دفران یا نیمه دیستال اپیدیدیم است. در ۹۸-۹۷ درصد مردان مبتلا به CF، وقوع CBAVD باعث بلوکه شدن مسیر انتقال اسپرماتوزوآ از بیضه یا اپیدیدیم به مجرای تناسلی خارجی و در نتیجه آزواسپرمی می‌شود.[۱۴،۱۵]

مطالعات Patrizio حاوی نکته جالبی بود و آن اینکه اسپرم های بازیابی شده از افراد مبتلا به CAVD دارای جهش ΔF508 در مقایسه با اسپرم مردان مبتلا به CAVD فاقد جهش از قدرت بارورسازی کمتری برخوردار بودند.[۱۶] صرف نظر از CBAVD برخی مطالعات نشان داده اند که فرکانس جهش های CF در مردان نابارور به میزان معنی داری بیشتر از حاملین CF در جمعیت عمومی است . پروتئین CFTR می‌تواند علاوه بر تاثیر بـر رشد و تکامل اپیدیدیم، و ازودفران و وزیکول های سمینال در فرآیند اسپرماتوژنز و یا بلوغ اسپرم نیز موثر باشد [۱۵]

در مطالعه حاضر طراحی نحوه شناسایی جهش های ژن CFTR به گونه ای بود که تقریبا اکثریت جهش هایی که تا کنون در بیماران ایرانی مبتلا به CF و CBAVD گزارش گردیده در نظر گرفته شود و وقوع آنها در بیماران مورد مطالعه و افراد بارور بررسی گردید.[۱۷،۱۸] در گروه شاهد هیچ نوع جهشی مشاهده نگردید در حالیکه ۸ بیمار(۷/۵۵٪) وقوع جهش های G542X ،ΔF508،I148T،A120T،406-6T>C وL1304M را هر یک با فراوانی ۰/۹۴ درصد و جهش -1525 18A>G را با فراوانی ۲/۸۳ درصد در ژن CFTR نشان دادند. همه بیماران ازنظر جهش یافت شده دارای وضعیت هتروزیگوت بودند و تنها ۱ بیمار برای جهش های A120T و L1304M هتروزیگوت مرکب بود. جهش L1304M اولین بار در دنیا و در این تحقیق گزارش شده است. این جهش باعث تبدیل اسیدآمینه لوسین به متیونین در کدون ۱۳۰۴ میشود که در منطقه حفظ شده پروتئین قرار دارد و احتمال دارد این تغییر در پروتئین تغییرات ساختاری و عملکردی ایجاد نماید.

جهش 406-6T>C در ناحیه مرزی اینترون [۳]۱اگزون [۴] رخ می دهد و احتمالا بر فرآیند Splicing مؤثر است. این جهش با علائـم شدیـد CF همـراه نیست و اولین بار در جنـوب فرانسه گزارش گردید. جهش A120T باعث جایگزینی اسیدآمینه آلانین با ترئونین در موقعیت ۱۲۰ در اگزون ۴ می شود. این جهش بسیار نادر است که اولین بار بوسیله Chillon در یک پسر ۴ ساله همراه با چندشکلی 5T در آلل دیگر گزارش گردیده است. این جهش در مطالعاتی که در زمینه بیماری CF در ایران، ایتالیا و سوئیس انجام شده با فراوانی کم گزارش شده است[۱۹]. جهش I148T با تبدیل ایزولوسین به ترئونین در موقعیت ۱۴۸ همراه است. این جهش اولین بار در بیماری با ناکارآمدی پانکراس بوسیله Bozon گزارش گردید.[۱۹] گزارشی مبنی بر مشاهده این جهش در ایران پیش از این وجود نداشته است.[۱۷،۱۸] جهش 1525-18A>G در ناحیه

Archive of SID

www.SID.ir

مرزی بین انترون ۹ و اگزون ۱۰ رخ می دهد و بنابراین احتمال می رود که بر فرآیند Splicing مؤثر باشد. این جهش اولین بار در ژاپن همراه با جهش 1742delAC توسط Abo گزارش گردید.[۱۹] جهش ΔF508 که منجر به حذف ۳ نوکلئوتید و در نتیجه برداشته شدن اسیدآمینه فنیل آلانین در جایگاه ۵۰۸ میشود شایع ترین جهشی است که با بیماری CF در ارتباط است. وقوع این جهش از گلیکوزیله شدن صحیح پروتئین جلوگیری کرده مانع از قرار گرفتن آن در غشاء می شود. گزارش های پیشین در ایران فراوانی این جهش را حدود ۱۶ درصد تخمین زده اند که یکی از پائین ترین فراوانی های گزارش شده در جهان محسوب می شود[۱۷]. جهش G542X منجر به ایجاد کدون خاتمه نابجا در موقعیت ۵۴۲ در اگزون ۱۱ می شود که با کاهش شدید mRNA و فقدان محصول پروتئین همراه است. فراوانی این بیماری در ایران پیش از این ۳/۳ درصد تعیین گردیده است.[۱۷] صرف نظر از جهش های ΔF508 و G542X سایر جهش های مشاهده شده در تحقیق حاضر به گروه جهش های ملایم در ژن CFTR تعلق دارند که با فنوتیپ های ملایم تر در ارتباط هستند.

در رابطه با فرکانس جهش های CFTR در مردان نابارور فاقد CBAVD گزارشات متناقضی وجود دارد. جهت بررسی اثر احتمالی جهش های ژن CFTR در فرآیند اسپرماتوژنز و تمایز و بلوغ اسپرم، Van der Ven و همکارانش در سال ۱۹۹۶ نشان دادند که فراوانی جهش های CFTR در مردان آزواسپرم بالاتر از گروه شاهد می باشد[۱۰]. Jakubiczka و همکاران در مطالعه بر روی ۱۹۷ مرد که به ناباروری ایدیوپاتیک مبتلا بودند افزایش ۲ برابری در جهش های ژن CFTR نسبت به جمعیت عمومی را گزارش نمودند.[۲۰] همچنین Cruger و همکاران نشان دادند که میزان این جهش در مبتلایان به کریپتوزواسپرمی[۱۵] بالاست[۲۱]. در مقابل Traystman و همکاران در سال ۱۹۹۴ نشان دادند که فراوانی جهش های CFTR در مردان مبتلا به الیگوآستنوتراتوزواسپرمی تفاوتی با فراوانی یافت شده در جمعیت عمومی ندارد [۹،۲۲]. تحقیقات Larriba و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز بیانگر افزایش میزان ناقلین CFTR در جمعیت نابارور نسبت به افراد بارور بود اما این افزایش از نظر آماری معنی دار نبود. بنابراین چنین نتیجه گیری شد که ژن CFTR بر فرآیند اسپرماتوژنز موثر نیست[۶]. Schulz و همکاران در سال ۲۰۰۶ از تحقیقات خود چنین نتیجه گرفتند که فرکانس هتروزیگوسیته در مردان نابارور ۲ برابر بیشتر از جمعیت عمومی است. جهش هایی که توسط این گروه گزارش شدند عبارت بودند از ΔF508 و R117H که به ترتیب جزء جهش های شدید و ملایم این ژن هستند.[۲۳]

بنا به گزارش Cuppens و همکاران در سال ۱۹۹۸ آلل 5T در لوکوس Tn در واقع یک جهش بیماریزا است که دارای نفوذ ناقص می باشد. وجود این آلل باعث ایجاد رونوشت هایی از CFTR می گردد که فاقد اگزون ۹ می باشند و فراوانی این آلل در جمعیت عمومی ۱۰-۵ درصد گزارش شده است[۲۴]. در مطالعه ای که به وسیله Chillon و همکاران انجام گرفته نشان داده شد که ۶۳ درصد بیماران مبتلا به CBAVD دارای یک آلل 5T همراه با یک آلل جهش یافته دیگر و ۲۴ درصد بیماران نیز تنها دارای یک آلل 5T بودند درحالیکه فرکانس این آلل در جمعیت ۵ درصد برآورده شده بود[۲۵]. تحقیق مشابهی به وسیله Radpour و همکاران بر روی بیماران CBAVD ایرانی انجام شد و فراوانی آلل 5T در بیماران ۲۵/۹۴ درصد تعیین گردید حال آنکه هیچ یک از افراد شاهد حامل چنین آللی نبودند[۱۸]. اما از مطالعات انجام شده در مورد نقش آلل5T در آزواسپرمی غیر انسدادی و الیگو اسپرمی نتایج متضادی بدست آمده است. Boucher و همکاران تفاوت معنی داری را در فراوانی آلل 5T بین بیماران مبتلا به آزواسپرمی و جمعیت عمومی مشاهده نکردند و در نهایت چنین نتیجه گیری کردند که پروتئین CFTR نقش مستقیمی در اسپرماتوژنز و یا بلوغ اسپرم درمردان نابارور فاقد CAVD ندارد بلکه احتمالا همراه

15 Cryptozoospermia

Archive of SID

www.SID.ir

با پیش زمینه ژنتیکی مناسب یا عوامل خاص محیطی می تواند موثر باشد.[۲۲] در تحقیق حاضر در گروه بیماران از مجموع ۲۱۲ آلل CFTR ، ۵ آلل(۲/۳۶٪) 5T مشاهده گردید در حالی که فراوانی آلل مذکور در گروه شاهد ۳درصد برآورد گردید اما این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود. بنابراین به نظر می رسد در تایید مطالعات پیشین نتوان نقش خاصی برای این چندشکلی در فرآیند اسپرماتوژنز قائل شد، هر چند که نمی توان منکر اثر آن در کاهش رونوشت های کامل CFTR گردید. در مجموع چنانچه افراد دارای چندشکلی 5T را هم در گروه بیماران دارای جهش در نظر بگیریم، ۱۳ بیمار (۱۲/۲۶٪) وقوع جهش را در حداقل یک آلل ژن CFTR نشان دادند که با توجه به عدم مشاهده جهش در گروه کنترل به نظر می رسد که جهش های ژن CFTR در ابتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی و یا از نگاه فراتر بر فرآیند اسپرماتوژنز اثر دارند. صرف نظر از اثر این جهش ها بر ابتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی، فرکانس نسبتا زیاد آن لزوم انجام غربالگری جهش های این ژن را در افرادی که کاندید استفاده از روش های کمکی درمان ناباروری نظیر ICSI+TESE[16] هستند نشان می دهد.

با استفاده از این روشها افراد آزواسپرم امکان فرزنددار شدن را می یابند و چنانچه از اسپرم حامل جهش استفاده شود فنوتیپ فرزندان بر حسب نوع جهش می تواند ازحالت طبیعی تا اختلالات ریوی، ناباروری و در نهایت CF متغیر باشد. اگر بیمار آزواسپرم دارای جهش به صورت هموزیگوت باشد با احتمال ۰/۵ این جهش را به فرزند انتقال می دهد. چنانچه همسر وی با احتمال ۱:۲۵ (فراوانی ناقلین در جمعیت سفیدپوست) ناقل جهش باشد، وی نیز با احتمال ۰/۵ این جهش را به فرزند انتقال می دهد و به این ترتیب احتمال ابتلا فرزند ۱:۱۰۰ خواهد بود (در مقایسه با خطر ۱:۲۵۰۰ در جمعیت عمومی).

با در نظر گرفتن ضریب همخونی و با توجه به درصد بالای ازدواج های فامیلی در جامعه ایران احتمال خطر بیشتر خواهد بود. مسئله دیگری که باید به آن توجه نمود هتروژن بودن جمعیت ایران است و اینکه در اغلب روشهای تشخیصی ژنتیکی غربالگری تنها در مورد جهش های شایع انجام می شود بنابراین همیشه این احتمال وجود دارد که بعضی از جهش ها ناشناخته باقی بماند. تحقیق حاضر بیانگر آن است که در مردان ناباروری که کاندید درمان از طریق روش های کمک باروری نظیر ICSI هستند، انجام غربالگری در مورد جهش های ژن CFTR به اتخاذ روش درمانی مناسب تر کمک خواهد نمود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از بخش IVF بیمارستان دی، مرکز درمانی ناباروری کوثر، مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری یزد و پرسنل محترم مربوطه به جهت همکاری صمیمانه در انجام تحقیق قدردانی می گردد.

References

1. Ezeh UIZO. Beyond the clinical classification of azoospermia. Hum Reprod. 2000; 15: 2356-2359.
2. Holsclaw DS, Perlmutter AD, Jockin H, et al. Genital abnormalities in male patients with cystic fibrosis. J Urol. 1971; 106: 568-574.
3. Stuhrmann M, Dork T. CFTR gene mutations and male infertility. Andrologia. 2000; 32: 71-83.

16 Testicular Sperm Extraction

Archive of SID
www.SID.ir

4. Cuppens H, Cassiman JJ. CFTR mutations and polymorphisms in male infertility. Int J Androl. 2004; 27: 251-256.
5. Silber SJ, Nagy ZP, Liu J, et al. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. Hum Reprod. 1994; 9: 1705-1709.
6. Larriba S, Bonache S, Sarquella J, et al. Molecular evaluation of CFTR sequence variants in male infertility of testicular origin. Int J Androl. 2005; 28: 284-290.
7. Mennicke K, Klingenberg RD, Bals-Pratsch M, et al. Rational approach to genetic testing of cystic fibrosis (CF) in unfertile men. Andrologia. 2005; 37: 1-9.
8. Dinic J, Kusic J, Nikolic A, et al. Analysis of the Y chromosome microdeletions and CFTR gene mutations as genetic markers of infertility in Serbian men. Vojnosanit Pregl. 2007; 64: 253-256.
9. Jarvi K, Zielenski J, Wilschanski M, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and obstructive azoospermia. Lancet. 1995; 345: 1578.
10. Van der Ven K, Messer L, van der Ven H, et al. Cystic fibrosis mutation screening in healthy men with reduced sperm quality. Hum Reprod. 1996; 11: 513-517.
11. Tuerlings J, Mol B, Kremer J, et al. Mutation frequency of cystic fibrosis transmembrane regulator is not increased in oligozoospermic male candidates for intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 1998; 69: 899–903.
12. Trezise A, Linder C, Grieger D, et al. CFTR expression is regulated during both the cycle of the seminiferous epithelium and the oestrous cycle of rodents. Nat Genet. 1993; 3: 157–164.
13. Liechti-Gallatia S, Schneider V, Neeser D, et al. Two buffer PAGE system-based SSCP/HD analysis: a general protocol for rapid and sensitive mutation screening in cystic fibrosis and any other human genetic disease. Eur J Hum Genet. 1999; 7: 590-598.
14. Sadeghi-Nejad H, Farrokhi F. Genetics of azoospermia: Current knowledge, clinical implications, and future directions. Part II. Urol J. 2007; 4: 192-206.
15. Gazvani R, Lewis-Jones DI. Cystic fibrosis mutation screening before assisted reproduction. Int J Androl. 2004; 27: 1-4.
16. Patrizio P, Asch RH, Handelin B, et al. Etiology of congenital absence of vas deferens: genetic study of three generations. Hum Reprod. 1993; 8: 215-220.

Archive of SID

www.SID.ir

17. Jalalirad M, Houshmand M, Mirfakhraie R, et al. First study of CF mutations in the CFTR gene of Iranian patients: detection of delta F508, G542X, W1282X, A120T, R117H, and R347H mutations. J Trop Pediat. 2004; 50: 359-361.
18. Radpour R, Gourabi H, Sadeghi-Gilani M, et al. Molecular study of (TG) m(T)n polymorphisms in Iranian males with congenital bilateral absence of the vas deferens. J Androl. 2007; 28: 541-547.
19. Cystic Fibrosis Mutation Database. Available at: http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/Home.html. Accessed December 20, 2008.
20. Jakubiczka S, Bettecken T, Stumm M, et al. Frequency of CFTR gene mutations in males participating in an ICSI programme. Hum Reprod. 1999; 14: 1833-1834.
21. Cruger GG, Agerholm I, Byriel L, et al. Genetic analysis of males from intracytoplasmic sperm injection couples. Clin Genet. 2003; 64: 198-203.
22. Boucher D, Creveaux I, Gizard G, et al. Screening for CFTR gene mutations in men included in an intracytoplasmic sperm injection programme. Mol Hum Reprod. 1999; 5: 587-593.
23. Schulz S, Jakubiczka S, Kropf S, et al. Increased frequency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in infertile males. Fertil Steril. 2006; 85: 135–138.
24. Cuppens H, Lin W, Jaspers M, et al. Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes - The polymorphic (TG)m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. J Clin Invest. 1998; 101: 487–496.
25. Chillon M, Casals T, Mercier B, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. N Engl J Med. 1995; 332: 1475-1480.

Archive of SID

www.SID.ir

Analysis of CFTR Gene Mutations in Iranian Non-Obstructive Azoospermic Patients

Mirfakhraie R, PhD;* Kalantar SM, PhD; Salsabili N, PhD***; Montazeri M, MSc****; Fazli H, BSc**; Houshmand M, PhD****; Mirzajani F, PhD******

Received: 27 /Dec/2008
Accepted: 17/Jan /2009

Background: *Genetic factors cause about 10% of male infertility. Cystic fibrosis conductance regulator (CFTR) gene mutations are among relatively frequent causes of male infertility. Therefore, these mutations can cause Cystic fibrosis (CF), which is the most common autosomal recessive disorder, characterized by chronic lung disease, pancreatic exocrine insufficiency, and male infertility. The aim of the present study was to evaluate the effect of CFTR gene mutations in non-obstructive azoospermia.*

Materials and Methods*: In this study, we examined the occurrence of common CFTR gene mutations in 106 non obstructive azoospermic patients as test group and 50 fertile individuals as control group. The investigated mutations were ΔF508, G542X, N1303K, W1282X, R117H, also IVS-5T polymorphism, and probable mutations in exons 4, 7, 10, 11, 20 and 21 in the CFTR gene, using ARMS-PCR, PCR-RFLP and SSCP methods. Patient's samples were collected from Yazd Research & Clinical Centre for infertility, Kowsar Infertility Centre and IVF section of Day Hospital during July 2007 till June 2008.*

Results*: Thirteen patients (21.26%) showed 406-6T>C, A120T, I148T, ΔF508, 1525-18A>G G542X, L1304M mutations and IVS8-5T polymorphism. To the best of our knowledge, this is the first report on the L1304M mutation worldwide. None of the CFTR gene mutations were observed in the control group. The allelic frequency of IVS8-5T was 3% in controls.*

Conclusion*: The present study indicates that there is a relationship between CFTR gene mutations and developing non-obstructive azoospermia. Therefore, the couples undergoing assisted reproductive technologies such as intra cytoplasmic sperm injection (ICSI) are advised to be screened for these gene mutations.*

KEY WORDS: *Azoospermia, CFTR, Mutation*

*** Dept of Biology, Science & Research Branch of Islamic Azad University (IAU), Tehran, Iran**
**** Clinical & Research Centre of Infertility, Yazd, Iran**
***** Mirza Kouchak Khan Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran**
****** National Institute for Genetic Engineering & Biotechnology, Tehran, Iran**

Archive of SID
www.SID.ir