فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۵- شماره ۴- زمستان ۱۳۹۹

مقاله تحقیقی

بررسی هم بستگی پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی rs1800734 و rs4647269 ژن *MLH1* در مردان نابارور ایرانی آزواسپرمی

مهردخت دُرپوش[۱]، دکتر زهرا نورمحمدی[۲*]، دکتر مسعود شیدایی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم و فناوری های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳. استاد، گروه ژنتیک ،دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: z-nouri@srbiau.ac.ir marjannm@yahoo.com

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۵/۲۹ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۶/۲۴

چکیده

ناباروری و مشکلات ناشی از آن امروزه به عنوان یکی از مسایل مهمی است که ٪۱۵-۱۰زوج ها راتحت تأثیر قرار می‌دهد. حدود نیمی از کل ناباروری‌ها مربوط به مردان است. اسپرماتوژنز انسان وابسته به فعالیت هزاران ژن است و نقص در مکانیسم‌های ترمیم می‌تواند باعث توقف اسپرماتوژنز شود. یکی از پروتئین‌های دخیل در سیستم ترمیم، پروتئین ***MLH1*** است. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم‌های rs1800734 و rs4647269 در ژن ***MLH1*** با ناباروری آزواسپرمی مردان می‌باشد. در این تحقیق مورد- شاهدی از ۱۱۳ مرد مبتلا به ناباروری آزواسپرمی به عنوان بیمار و ۱۰۱ مرد سلم بـه عنـوان کنتـرل، نمونه خون جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA، ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم‌ها rs4647269 و rs1800734، توسط روش RFLP-PCR به ترتیب با کمک آنزیم‌های *HPY*CH4IV و *PVU*II تعیین و با توالی‌یابی تایید گردید. آزمون مربع کای، رگرسیون لجستیک و ANOVA به منظور آنالیز داده‌های ژنتیکی و دموگرافی به کمک نرم‌افزارهای SPPS و SNPSTATS صورت گرفت. در پلی‌مورفیسم rs1800734 تفاوت معناداری ($p<0.05$) بین فراوانی ژنوتیپی گروه بیمار و شاهد مشاهده نشد. در بررسی پلی‌مورفیسم rs4647269 در مدل‌های وراثتی هم بارز (CT ، TT)، بارز(CT/TT) و مغلوب (TT) تفاوت معنی‌داری بین فراوانی ژنوتیپی بین دو گروه دیده شد P=0.024 ، P=0.021 ، P=0.036). همچنین، در این پلی‌مورفیسم از نظر حجم اسپرم در صفات نیز تفاوت معنا دار مشاهده شد (P=0.000). بین پلی‌مورفیسم rs4647269 ژن *MLH1* و ناباروری آزواسپرمی در جمعیت مردان ایرانی مورد مطالعه ارتباط معنادار بوده و احتمالا می‌تواند در آن موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: ناباروری مردان، پلی‌مورفیسم، RFLP-PCR، ژن ***MLH1***

مقدمه

ناباروری به عنوان یکی از معضلات سلامت جهانی است که ٪۱۰ تا ٪۱۵زوجین را تحت تأثیر قرار می‌دهد. ناباروری به عنوان ناتوانی زوجین در بچه‌دار شدن پس از یک سال مقاربت منظم و بدون هر گونه پیشگیری تعریف می‌شود. طبق آخرین آمار سازمان بهداشت جهانی، تقریباً ۵۰ تا ۸۰

میلیون نفر در سراسر جهان از ناباروری رنج می برند (۱). ناباروری زوج‌ها ممکن است به دلیل عوامل مردانه، عوامل زنانه یا ترکیبی از عوامل زن و مرد باشد. بنابراین، ارزیابی موازی هر دو شریک همیشه لازم است (۲). ناباروری حدود ٪۵ مردان بالغ را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳). علل ناباروری در مردان شامل موارد مختلفی از جمله اختلالات هورمونی، دیابت، چاقی، مشکلات زندگی و شیوه‌ی زندگی فرد، مشکلات روانشناختی، مشکلات جنسی، شیمی درمانی، رادیوتراپی‌ها، ناهنجاری‌های کروموزومی و نقص تک ژنی است (۴). عوامل و فاکتورهای مردانه مسئولیت نزدیک به نیمی از علل بالینی این فنوتیپ را برعهده دارند و به عبارتی در حدود ٪۵۰ موارد به ناباروری کمک می‌کنند که می‌توان آنها را در چهار دسته عمده دسته‌بندی کرد: (الف) اختلال عملکرد محور هیپوتالاموس– هیپوفیز، (ب) تغییرات کمی اسپرماتوژنز، (ج) تغییرات کیفی اسپرماتوژنز و (د) انسداد مجاری/اختلال عملکرد. عوامل ژنتیکی شناخته شده، در هر یک از این دسته از علل وجود دارد و بسته به شدت اختلال اسپرماتوژنیک، حدود ٪۲۰- ۱۰ موارد را تشکیل می‌دهند (۱). ناباروری در مردان یک بیماری هتروژن به شمار می‌آید که نیاز به عملکرد و تعامل مناسب هزاران ژن دارد. بنابراین با توجه به تعداد ژن‌ها تصور بر این است که علل ژنتیکی در بیشتر موارد به ناباروری کمک می‌کنند. با ظهور استراتژی-های تعیین توالی در مقیاس بزرگ (به ویژه تجزیه و تحلیل اگزوم توسط توالی‌یابی نسل بعدی یا NGS)، گزارش شده است که ژن‌های جدید بیشتر و بیشتری با ناباروری مردان ارتباط دارند. با این حال، اکثر این ژن‌ها هنوز فاقد رابطه قطعی ژن و بیماری هستند. تشخیص نازایی در مردان عمدتا بر اساس تجزیه و تحلیل مایع منی انجام می‌شود. پارامترهای اصلی مایع منی شامل غلظت، ظاهر و تحرک اسپرم است که با توجه به شیوع بالای ناباروری در بعضی زوجین به بررسی‌های بیشتر و مشخص‌شدن علل ژنتیکی دخیل در آن مورد نیاز است. ناباروری در حال حاضر با توجه به روند ظاهری کاهش تعداد اسپرم در کشورهای صنعتی، در حدود ٪۷-٪۵ از جمعیت عمومی مردان را تحت‌تأثیر قرار داده و ممکن است در آینده بیشتر شود. علیرغم پیشرفت عظیم در درک فیزیولوژی تولیدمثل انسان، علت اصلی ناباروری مردان در حدود ۵۰ درصد موارد تعریف نشده است که به آنها ناباروری ایدیوپاتیک[1] گفته می‌شود. به احتمال زیاد بیشتر موارد ایدیوپاتیک منشأ ژنتیکی دارند، زیرا تعداد ژنهای درگیر در اسپرماتوژنز انسان در حدود بالغ بر ۱ هزار ژن است (۱،۵،۶). از جمله علل ژنتیکی شناخته شده ناباروری مردان، ناهنجاری های کروموزومی، ریزحذف‌های کروموزوم Y، جهش‌های ژن‌های وابسته به X و مرتبط با اتوزوم می‌باشد که سطوح مختلف بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی در تولیدمثل مردان، مانند هومئوستاز هورمونی، اسپرماتوژنز و کیفیت اسپرم را درگیر می‌کنند (۷،۸). هر گونه فقدان یا اکتساب به بازآرایی‌های غیرمعمول در مواد ژنتیکی در سطح کروموزومی، به عنوان ناهنجاری‌های کروموزومی شناخته می‌شود و یکی از دلایل عمده ژنتیکی است که در ناباروری مردان دخیل است (۹). ناهنجاری‌های کروموزومی نزدیک به ٪۵ ناباروری در مردان را توضیح می-دهد و در موارد آزواسپرمی تا ٪۱۵ افزایش می‌یابد (۱۰). حدود ٪۱۴ از مردان مبتلا به آزواسپرمی و ٪۲ از مردان مبتلا به الیگوسپرمی دارای ناهنجاری‌های کروموزومی هستند (۱۱،۱۲). آزواسپرمی فقدان اسپرم در مایع منی است. حدود ٪۱ از کل مردان و ٪۱۵-٪۱۰ از مردان نابارور دارای آزواسپرمی هستند. وراثت و ژنتیک در ٪۱۵-٪۱۰ از مردان با تولید اسپرم کم یا فاقد اسپرم نقش دارد (۱۰). جنبه مهمی که در مطالعه فاکتور ناباروری مردانه مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است، عملکرد همزمان احتمالی تغییرات چندشکلی خاص بر روی فنوتیپ نابارور است. نقش این واریانت‌های ژنوم با استعداد به ناباروری مرتبط بوده است (۶). برای اطمینان از ثبات و پایداری تکثیر DNA و حفظ و پایداری ژنوم، DNA به طور مداوم ترمیم می‌شود. سیستم ترمیم خطای DNA یکی از مسیرهای بیولوژیکی است که نقش مهمی در هومئوستازی DNA و نوترکیبی دارد. علاوه

[1]Idiopathic infertility

بر آن، سیستم MMR[1] نقش مهمی در سیستم‌های متابولیکی مثل میتوز و گامتوژنز نیز دارد. هر گونه غیرفعال شدن و نقص در این مسیرهای ترمیم ممکن است منجر به خطاهای تکثیر و نوترکیبی غیرطبیعی و توقف اسپرماتوژنز شود. سیستم MMR در واقع از جهش‌های مضر جلوگیری کرده و ثبات ژنومی را حفظ می‌کند (۱۳). تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در این سیستم نشان‌دهنده‌ی ارتباط معنی‌داری با باروری انسان و درمان‌های مرتبط است (۱۴). از این رو در حال حاضر توجه زیادی به اثرات احتمالی آسیب DNA اسپرم بر ناباروری مردان می‌شود. آسیب DNA در ژرم لاین مردان به عنوان یک عامل و فاکتور ریسک برای عواقب نامطلوب بالینی از جمله کیفیت مایع منی، میزان باروری و لقاح پایین، اختلال در لانه‌گزینی و سقط جنین به شمار می‌آید. چندین عضو خانواده MMR در فرآیند نوترکیبی میوز شرکت می‌کنند و در گامتوژنز دخالت دارند. سه همولوگ MLH3 MLH1 MutL (PMS2), و دو همولوگ MSH4 و MutS (MSH5) در این فرآیند دخیل هستند. این ۵ ژن MMR بر اساس عملکردهای مهم فیزیولوژیکی، ژن‌های مهمی برای توزیع ناباروری در مردان به شمار می‌آیند (۱۵). یکی از مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی، وجود SNP[2] (پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی) است. داده‌های حاصله از مقالات و مطالعات انجام شده نشان داده‌اندکه برخی از پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی در ژن‌های MMR از جمله ژن *MLH1* با آسیب DNA اسپرم، آزواسپرمی و ناباروری مردان مرتبط است (۱۶). مطالعات نشان داده‌اند که در دو پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی rs1800734 و rs4647269 در ژن *MLH1* تفاوت قابل‌توجهی در بین نمونه‌های الیگواسپرمی شدید و نمونه‌های کنترل دیده شده است و این دو پلی مورفیسم به عنوان فاکتور ریسک در آزواسپرمی و الیگواسپرمی شدید و افزایش آسیب به DNA اسپرم در جمعیت های مورد مطالعه گزارش شده اند (۱۷). این پژوهش به هدف بررسی هم‌بستگی این دو پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی در ژن *MLH1* در مردان نابارور ایرانی آزواسپرمی انجام شد.

مواد و روش ها

نمونه گیری و استخراج DNA

در این مطالعه مورد-شاهدی۱۱۳ مرد ایرانی که از نظر تمام عوامل شناخته شده ی دخیل در ناباروری مثل عوامل ایمونولوژیکی، عوامل آناتومیکی و کاریوتایپ بررسی شده و نرمال بودند، همچنین علت ناباروری آنها از عوامل شناخته شده‌ی نارسایی اسپرماتوژنیک (چون شیمی درمانی، اختلالات آناتومیک، جراحی بیضه، واریکوسل و ...) نبوده و بر اساس آنالیز مایع منی به تایید پزشک متخصص مردان هم رسیده است که آزواسپرم هستند، به عنوان گروه مورد و ۱۰۱ مرد سالم که ۲ فرزند داشته و همسران آنها به طور طبیعی باردار شده و حداکثر ۳ سال از آخرین بارداری آنها گذشته بود، به عنوان شاهد، از بین افرادی که به مرکز ناباروری قم مراجعه کرده بودند، انتخاب شدند. نمونه‌های خون این افراد پس از دریافت رضایت نامه‌ی کتبی آگاهانه برای انجام مطالعات ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت. این مطالعه پس از دریافت شناسه اخلاق (IR.IAU.SRB.REC.1399.071) دانشگاه آزاد اسلامی علوم تحقیقات تهران انجام گرفت. در این تحقیق دامنه سنی دو گروه ۳۵-۲۵ سال و از قومیت‌های مختلف ایرانی (فارس، ترک، لر، کرد و عرب) بودند. از تمام افراد شرکت کننده در گروه مطالعه اطلاعات مربوط به سن، نژاد، مصرف سیگار جمع‌آوری و دموگرافی و اطلاعات مایع منی آنها تهیه گردید. به منظور استخراج DNA، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از خون محیطی این افراد تهیه گردید و در لوله حاوی EDTA ریخته شد. DNA ژنومی با استفاده از روش Salting out از سلول-های لوکوسیت خون محیطی استخراج گردید و کمیت و کیفیت آن توسط دستگاه نانودراپ و الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های DNA تا زمان استفاده به جهت آنلیزهای مولکولی در فریزر C ° ۲۰- نگهداری گردید.

PCR-RFLP

[1]Mismatch repair
2 Single-nucleotide polymorphism

جهت تعیین ژنوتیپ از روش PCR-RFLP استفاده شد. تکنیک PCR جهت تهیه‌ی نسخه‌های زیادی از ژن مورد نظر توسط پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت. پرایمرهای اختصاصی با استفاده از بانک های اطلاعاتی و نرم افزارهای oligo7،Primer3 و ApE طراحی شد. توالی پرایمرهای اختصاصی ژن *MLH1* در دو پلی مورفیسم مورد نظر طبق جدول ۱ است.

جدول ۱ - توالی پرایمر های اختصاصی برای PCR ژن *MLH1* در دو پلی مورفیسم rs4647269 و rs1800734.

پلی مورفیسم	نوع پرایمر	توالی (۳'-۵')	دما	GC%
rs1800734	Forward	ACCAATAGGAAGAGCGGAC	55	52.6
	Reverse	GAGCGGTAAAGAAACACACG	57	50
rs4647269	Forward	TCCCAGTAGCAAAGAAAGGTCAAG	59	45.8
	Reverse	GAGCCGAGAGAGCAACTAAC	57	55

واکنش PCR توسط دستگاه ترموسایکلر Bio-RAD در حجم ۲۰ µl انجام گرفت. مواد مصرف شده در واکنش PCR، ۴µl نمونه (۲۰نانوگرم) DNA، ۰/۶µl از هر کدام از پرایمرهای (۱۰ پیکوگرم) F و R (شرکت سینا کلون، تهران، ایران)، ۱۰µl از 2X TaqPreMix (Master Mix) (شرکت پارس طوس، مشهد، ایران) و ۴/۸µl آب دو بار تقطیر بود.

برنامه تکثیر محصول PCR با طول قطعه ۵۹۱ جفت باز برای پلی مورفیسم rs4647269 با دناتوراسیون اولیه ۵ دقیقه‌ای در دمای ۹۵ °c، سپس ۳۵ سیکل با برنامه ۹۵ °c به مدت ۳۰ ثانیه برای دناتوراسیون ثانویه، دمای ۶۰ °c به مدت ۳۰ ثانیه جهت اتصال آغازگر (پرایمر) به رشته الگو، دمای ۷۲ °c به مدت ۳۰ ثانیه جهت واکنش طویل‌سازی و در نهایت به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ °c به منظور کامل شدن تکثیر قطعات و طویل سازی نهایی در دستگاه ترموسایکلر تنظیم گردید.

شرایط تکثیر محصول برنامه PCR با طول قطعه ۵۹۴ جفت باز برای پلی مورفیسم rs1800734 با دناتوراسیون اولیه ۵ دقیقه ای در دمای ۹۵ °c ، ۳۵سپس سیکل با برنامه ۹۵ °c به مدت ۳۰ ثانیه برای دناتوراسیون ثانویه، دمای ۶۳°c به مدت ۳۰ ثانیه جهت اتصال آغازگر (پرایمر) به رشته الگو، دمای ۷۲ °c به مدت ۳۰ ثانیه جهت واکنش طویل سازی و در نهایت به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ °c به منظور کامل شدن تکثیر قطعات و طویل سازی نهایی در دستگاه ترموسایکلر تنظیم گردید.

پس از انجام الکتروفورز برای اطمینان از صحت تکثیر موفق قطعه مورد نظر از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده گردید. سپس محصول PCR پلی مورفیسم rs4647269 توسط آنزیم محدودکننده (*HPY*CHIV, BioLab, UK) که توسط سایت NEBcutter انتخاب گردیده بود، مورد برش و هضم آنزیمی قرار گرفت. جایگاه شناسایی آنزیم به صورت است.

واکنش RFLP برای دو انزیم در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۴ µl محصول PCR، ۱µl آنزیم(۱ واحد)، ۵µl بافر انجام شد. انکوباسیون نمونه در دمای ۳۷°c به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت و در انتها به جهت بررسی نحوه عمل آنزیم و برش آن از الکتروفورز ژل آگارز ٪۲ استفاده گردید.

سپس محصول PCR پلی مورفیسم دیگرrs1800734 توسط آنزیم محدود کننده (*PVU*II, BioLab, UK) که توسط سایت NEBcutter انتخاب گردیده بود، مورد برش و هضم آنزیمی قرار گرفت. جایگاه شناسایی آنزیم بدین ترتیب است:

5'... C A G▼C T G ... 3'
3'... G T C▲G A C ... 5'

واکنش RFLP شامل حجم نهایی به مقدار ۱۰ µl محصول PCR، ۲µl آنزیم(۱ واحد)، **۲**µl بافر و حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر بود. انکوباسیون نمونه در دمای ۳۷° c به مدت ۱۶ ساعت انجام گرفت و در انتها به جهت بررسی نحوه

عمل آنزیم و برش آن از الکتروفورز ژل آگارز ٪۲ استفاده گردید.

تعیین توالی

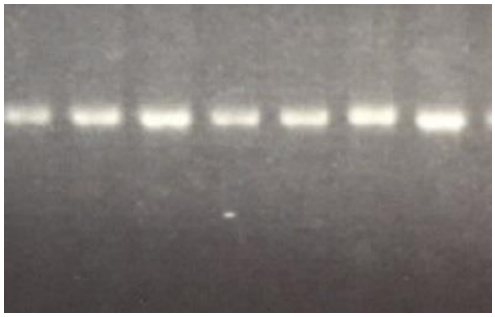
بعد از بررسی محصولات هضم آنزیمی دو پلی مورفیسم، برای اطمینان از نتایج و تایید ژنوتیپ های بدست آمده، ۵ نمونه از هر پلی مورفیسم توسط شرکت پیشگام با استفاده از پرایمرهای پیشرو (جدول۱) تعیین توالی شد.

آنالیز آماری

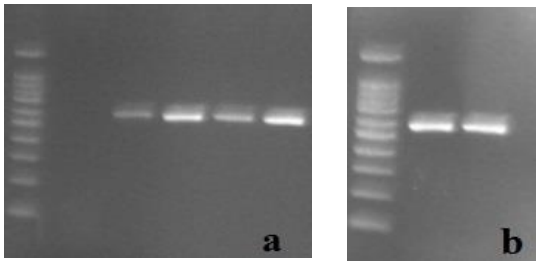
فراوانی آللی و ژنوتیپی در دو گروه بیمار و کنترل محاسبه گردید. برای آنالیز داده های ژنتیکی، ارتباط بین ژنوتیپ ها و ناباروری مردان و داده های دموگرافی از آزمون-های آماری آزمون مربع کای، رگرسیون لجستیک و ANOVA به کمک نرم‌افزارهای SPSS و SNPSTATS استفاده گردید. $P<0.05$ نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف نتایج بین دو گروه است. پس از تخمین فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی داده‌ها وجود تعادل هاردی واینبرگ (Hardy-Weinberg-Equilibrium) در هر دو پلی مورفیسم مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی ارتباط بین دو SNP مورد مطالعه و همچنین ارتباط فراوانی ژنوتیپ‌ها با سن و استعمال سیگار و قومیت و pH به نوع داده ها از آزمون مربع کای وTest Exact Fisher و Likelihood Ratio استفاده شده است.

نتایج

در مجموع تعداد کل افراد مورد مطالعه در این تحقیق ۲۱۴ نفر بودند. بعد از استخراج DNA، صحت و کیفیت ان از طریق ژل آگارز ٪۱ بررسی شد (شکل ۱). با جفت پرایمر اختصاصی F و R برای تکثیر قطعه های هر دو پلی مورفیسم در ژن *MLH1*، PCR انجام گرفت که شکل ۲(a و b) قطعات حاصل شده از PCR در دو پلی‌مورفیسم را نشان می دهند.



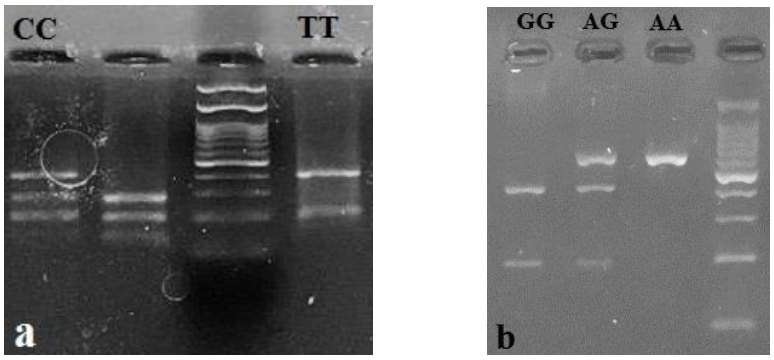
شکل ۱ - ژل آگارز ٪۱ جهت نمایان کردن DNA استخراج شده



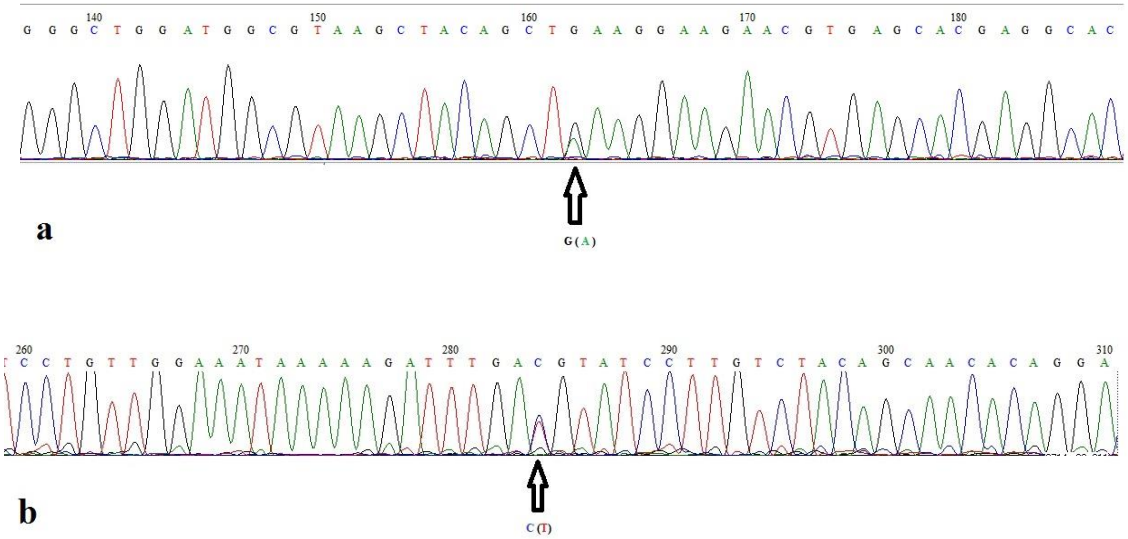
شکل ۲ - a: محصولات PCR پلی مورفیسم rs4647269 ژن *MLH1* بر روی ژل آگارز ٪۱/۵ با مارکر ۱۰۰bp-قطعه ۵۹۱bp، b: محصولات PCR پلی مورفیسم rs1800734 ژن *MLH1* بر روی ژل آگارز ٪۱/۵ با مارکر ۱۰۰bp-قطعه ۵۹۴bp.

تمامی نمونه های تکثیر شده با استفاده از PCR توسط آنزیم های محدودکننده مربوط به پلی مورفیسم هضم شدند. در پلی مورفیسم rs4647269 هضم آنزیمی با آنزیم *HPYCH*Ⅳ انجام گرفت. برش آنزیمی CC، ۳ باند (122bp.190bp.279bp) را ایجاد می کند و نمونه های TT دو باند (190bp.401bp) را ایجاد می کنند. اگر ژنوتیپ CT و هتروزیگوت باشد، ۴ باند (122bp.190bp.279bp.401bp) را ایجاد می کند. در اطلاعات بدست آمده از RFLP این پلی-مورفیسم توسط آنزیم *HPYCH*Ⅳ، هر ۳ ژنوتیپ در جمعیت ایرانی مورد مطالعه دیده شد که در شکل ۳ دیده می شود.

در پلی مورفیسم rs1800734 هضم آنزیمی با آنزیم *PVU*Ⅱ انجام گرفت. برش آنزیمی ژنوتیپ GG، دو باند (188bp.406bp) ایجاد می کند. برش آنزیمی AA، یک باند 594bp را ایجاد می کند. اگر ژنوتیپ AG و هتروزیگوت باشد، قطعات (188bp.406bp.594bp) را ایجاد می کند. در هضم آنزیمی این پلی مورفیسم نیز هر ۳ ژنوتیپ دیده شد که در شکل ۳ دیده می شود. برای اطمینان از نتایج و تایید ژنوتیپ های بدست آمده، ۵ نمونه از هر دو اسنیپ را توالی یابی کرده و در شکل ۴ دو نمونه از توالی های سکانس شده نشان داده شده است.



شکل ۳ - ژل آگارز ۱٪ جهت بررسی نتایج هضم آنزیمی مربوط به rs4647269 (a، b) و rs1800734(c).



شکل ۴ – a: توالی پلی مورفیسم rs4647269 در منطقه نوکلئوتید ۲۸۴ ژنوتیپ C(T) در نمونه ی توالی یابی شده. b: مربوط به توالی پلی مورفیسم rs1800734 در منطقه نوکلئوتید ۱۶۲ ژنوتیپ G(A).

جدول ۲ توزیع ژنوتیپ‌ها و فراوانی آللی هر دو پلی-مورفیسم در گروه کنترل و بیمار را نشان می دهد. آنالیز داده‌ها و نتایج آماری نشان داد که پلی‌مورفیسم rs4647269 بررسی شده در این تحقیق با p-value =1 در تعادل هاردی واینبرگ می باشد. پلی مورفیسم rs1800734 درگروه بیمار (P=0.007) در تعادل هاردی واینبرگ نیست، در حالی که در گروه کنترل با P = 0.21 در تعادل است.

جدول ۲ - مقایسه ژنوتیپ و آلل های پلی مورفیسم rs4647269 (الف) و پلی مورفیسم rs1800734 (ب) ژن *MLH1* در مردان نابارور آزواسپرمی و مردان کنترل.

ژنوتیپ و آلل ها (الف)	سالم N= ۱۰۱	گروه بیمار N= ۱۱۳
A/A	(۱۲)٪۱۲	(۱۵)٪۱۳
G/A	(۵۵)٪۵۴	(۷۱)٪۶۳
G/G	(۳۴)٪۳۴	(۲۷)٪۲۴
G	(۱۲۳)٪۶۱	(۱۲۵)٪۵۵
A	(۷۹)٪۳۹	(۱۰۱)٪۴۵
ژنوتیپ و آلل ها (ب)	بیمار N= ۴۶	کنترل N= ۴۰
C/C	(۱۴)٪۳۰	22(55%)
C/T	(۲۳)٪۵۰	(۱۶)٪۴۰
T/T	(۹)٪۲۰	(۲)٪۵
C	(۵۱)٪۵۵	(۶۰)٪۷۵
T	(۴۱)٪۴۵	(۲۰)٪۲۵

بررسی ارتباط بین ژنوتیپ‌ها و ناباروری در پلی-مورفیسم rs4647269 نشان داد که در مدل وراثتی هم بارز (TT، CT) با مقدار P=0.024 ارتباط معنا داری مشاهده می‌شود و افزایش ژنوتیپ های CT و TT به ترتیب با نسبت خطر ۰/۱۴ و ۰/۴۴ نسبت به CC باعث کاهش بروز بیماری می‌شوند. در مدل وراثتی بارز نیز تفاوت معنا داری مشاهده گردید (P = 0.21) و مدل وراثتیCT/TT نسبت به CC با OR=0.36 باعث کاهش بروز ناباروری می گردد. در مدل وراثتی مغلوب TT با P=0.036 ارتباط معناداری مشاهده شد. همچنین، در ارتباط بین ژنوتیپ‌ها و ناباروری در پلی-مورفیسم rs1800734 در هیچ مدل وراثتی ارتباط معناداری مشاهده نگردید (P>0.05) (جدول ۳).

آزمون آماری ANOVA در جدول(۴) مشخص کرد که اختلاف میانگین مشاهده شده بین گروه های افراد بیمار و کنترل در هر دو پلی مورفیسم rs4647269 و rs1800734 از نظر صفت pH معنا دار نیست. در ارتباط با اختلاف میانگین مشاهده شده بین ژنوتیپ ها در دو گروه شاهد و بیمار ،در پلی مورفیسم rs1800734تنها بین گروه افراد کنترل (p=0.041) معنا دار و در گروه بیمار اختلاف معنا داری مشاهده نشده است و در پلی مورفیسم rs4647269 نیز ارتباط معنا داری از نظر ژنوتیپ ها بین دو گروه دیده نشد. آنالیز داده ها بدست امده با قومیت ها تفاوت معناداری را نشان نداد.

در این مطالعه به بررسی هاپلوتایپ ها در گروه بیمار و کنترل در هر دو SNP مورد مطالعه پرداخته شده است. از میان هاپلوتایپ های بررسی شده هاپلوتایپ T-A با P<0.05 بین گروه بیمار و کنترل اختلاف معناداری را نشان داده و از میان هاپلوتایپ های مورد بررسی هاپلوتایپ T-G بیشترین فراوانی هاپلوتایپ است.(جدول ۵).

جدول ۳ - مدل های مختلف وراثتی و نسبت خطر (OR) با فاصله اطمینان ٪۹۵ در بیمار و کنترل مربوط به پلی مورفیسم rs1800734 و پلی مورفیسم rs4647269.

rs4647269	ژنوتیپ	OR (95% CI)	P-value	rs1800734	ژنوتیپ	OR (95% CI)	P-value
هم غالبی	C/C	1.00	0.024	هم غالبی	G/G	1.00	0.29
	C/T	0.44 (0.18-1.12)			A/G	0.62 (0.33-1.14)	
	T/T	0.14 (0.03-0.75)			A/A	0.64 (0.26-1.58)	
غالب	C/C	1.00	0.021	غالب	G/G	1.00	0.11
	C/T-T/T	0.36 (0.15-0.87)			A/G-A/A	0.62 (0.34-1.12)	
مغلوب	C/C-C/T	1.00	0.036	مغلوب	G/G-A/G	1.00	0.76
	T/T	0.22 (0.04-1.07)			A/A	0.88 (0.39-1.98)	
برتری هتروزیگوتی	C/C-T/T	1.00	0.35	برتری هتروزیگوتی	G/G-A/A	1.00	0.21
	C/T	0.67 (0.28-1.57)			A/G	0.71 (0.41-1.22)	

جدول ۴ - بررسی میانگین مشاهده بین گروه های بیمار و کنترل از لحاظ pH مربوط به پلی‌مورفیسم‌های rs4647269 و rs1800734.

	rs4647269	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
pH	بین تیمارها	.028	1	.028	2.855	.095
	درون تیمارها	.820	84	.010		
	کل	.848	85			
	rs1800734					
pH	بین تیمارها	0.038	1	0.038	3.446	0.065
	درون تیمارها	2.332	212	0.011		
	کل	2.37	213			

جدول ۵ - فراوانی های هاپلوتایپ.

	SNP 2	SNP1	مجموع	گروه بیمار	گروه کنترل	فراوانی تجمعی
1	C	G	0.3568	0.3285	0.39	0.3568
2	C	A	0.2886	0.2259	0.36	0.6453
3	T	G	0.2072	0.2041	0.21	0.8525
4	T	A	0.1475	0.2415	0.04	1

بحث

با توجه به اینکه ناباروری امروزه یک مشکل عمده سلامتی به شمار می‌آید و ٪۷-٪۵ مردان را با کاهش تعداد اسپرم در شهرهای صنعتی تحت تاثیر قرار داده است. همچنین، علیرغم پیشرفت عظیم در درک فیزیولوژی تولیدمثل انسان، علت اصلی ناباروری مردان در حدود ٪۵۰ موارد تعریف نشده است (ایدیوپاتیک)، بر آن شدیم تا با بررسی‌های مولکولی دقیق‌تر در زمینه تاثیر ژنتیک مولکولی

بر ناباروری، قدمی در جهت تشخیص دقیق‌تر این بیماری برداریم. برای تشخیص بهتر ناباروری مردان، به بررسی ارتباط ناباروری آزواسپرمی و دو پلی‌مورفیسم در ژن *MLH1* که یکی از ژن‌های مهم در سیستم ترمیم خطای DNA(MMR) است، پرداخته شد. بررسی‌هایی که در جمعیت‌های مختلف صورت گرفته، نتایج متفاوتی را برای ارتباط میان پلی‌مورفیسم‌های ژن *MLH1* با ناباروری نشان داده است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵، Zhang و همکارانش در ارتباط با رابطه احتمالی بین پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی در ژن‌های مرتبط با ترمیم شکستگی DNA دورشته‌ای و ناباروری ایدیوپاتیک مردان شامل آزواسپرمی یا الیگوزواسپرمی انجام دادند، توزیع فرکانس چند پلی‌مورفیسم از جمله rs1800734 به طور قابل توجهی بین بیماران و گروه‌های کنترل متفاوت بود و نتیجه گرفته شد که این پلی-مورفیسم‌ها ممکن است با ناباروری مردان مرتبط باشند. علاوه بر این، افراد دارای ژنوتیپ‌های خطرناک rs1800734 TC / TT دارای افزایش دو برابری در خطر ناباروری مردان بودند (۱۸). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۹، Zhao و همکارانش برای بررسی ارتباط rs1800734 و rs4647269 در *MLH1* در ژن‌های MMR با ناباروری انجام دادند، ۲۰۹ مرد با تشخیص بالینی و ۲۰۱ مرد بارور بررسی شدند. آنها گزارش کردند که دو پلی‌مورفیسم rs1800734 و rs4647269 در *MLH1* به طور قابل توجهی بین اولیگوزواسپرمی شدید و گروه کنترل متفاوت بود (p<۰/۰۵) (۱۷). Kadhim و همکاران در مطالعه ای در سال ۲۰۲۰ در عراق ارتباط ناباروری مردان با دو پلی‌مورفیسم rs1800734 و rs4647269 را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که بین بیماران سالم و الیگوزواسپرمی در پلی‌مورفیسم rs1800734 در هیچ‌یک از ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. از این رو می‌توان نتیجه گرفت در جمعیت مورد بررسی، این پلی‌مورفیسم هیچ ارتباطی با بروز ناباروری ندارد. اما در پلی‌مورفیسم rs4647269 بین بیماران سالم و الیگوزواسپرمی ژنوتیپ TT در بین بیماران فراوانی بالاتری دارد و می‌تواند یک ریسک فاکتور برای آزواسپرمی و الیگواسپرمی باشد (**۱۹**).

نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر در جمعیت‌های مختلف مردان ایرانی نشان می‌دهد که پلی مورفیسم rs۴۶۴۷۲۶۹ در ژن *MLH1* در بیماران نابارور آزواسپرمی و مقایسه نتایج با افراد شاهد در مدل‌های وراثتی هم بارز (p=0.024)، بارز (P=0.021) و مغلوب (P=0.036) معنادار می‌باشد و می‌توان گفت که نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد پلی-مورفیسم rs4647269 ژن *MLH1* احتمالا می‌تواند در افزایش ناباروری در مردان در جمعیت مورد مطالعه موثر باشد. در این پلی‌مورفیسم در شاخص‌های قومیت، مصرف سیگار و pH اختلاف معنادار نبوده، ولی از نظر حجم اسپرم تفاوت معنا دار بوده است (p=0.00). همچنین، در بررسی پلی‌مورفیسم rs۱۸۰۰۷۳۴ در ژن *MLH1* در بیماران نابارور آزواسپرمی و مقایسه نتایج بیماران با افراد کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (p>0.05). در این پلی‌مورفیسم بررسی‌ها در شاخص‌های قومیت و pH با توجه به مقدارهای ارزش احتمالی بدست آمده، معنادار نبوده است، اما در شاخص‌های مصرف سیگار و حجم نمونه‌های اسپرم بین دو گروه بیمار و شاهد معنادار بوده است (p=.0044 ، p=0.00).

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت بخش ژنتیک جهاد دانشگاهی قم به جهت جمع‌آوری نمونه‌ها تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1. Vockel, M., Riera-Escamilla, A., Tüttelmann, F., Krausz, C., 2019. The X chromosome and male infertility. Human Genetics 2019: 1-13.

2. Schlegel, P.N., Sigman, M., Collura, B., De Jonge, C.J., Eisenberg, M.L., Lamb, D.J., 2020. Diagnosis and treatment of infertility in men:

AUA/ASRM guideline part II. Fertility and sterility. 205(1):44-51.

3. Hodžić, A., Maver, A., Plaseska-Karanfilska, D., Ristanović, M., Noveski, P., Zorn, B., 2020. De novo mutations in idiopathic male infertility-A pilot study. Andrology. 9(1):212-220.
4. Thirumavalavan, N., Gabrielsen, J.S., Lamb, D.J., 2019. Where are we going with gene screening for male infertility? Fertility and Sterility 111(5): 842-850.
5. Babakhanzadeh, E., Nazari, M., Ghasemifar, S., Khodadadian, A., 2020. Some of the factors involved in male infertility: A prospective review. International Journal of General Medicine 13: 29.
6. Vendrell, X., 2018. New genetic point mutations in male infertility. Reproductomics, Chapter 3 PP: 47-62, Elsivier Academic Press, https://doi.org/10.1016/C2016-0-01624-8
7. Güney, A., Javadova, D., Kırac, D., Ulucan, K., Koc, G., Ergec, D., 2012. Detection of Y chromosome microdeletions and mitochondrial DNA mutations in male infertility patients. Genet Mol Res 11(2):1039-48.
8. Stouffs, K., Seneca, S., Lissens, W., 2014. Genetic causes of male infertility. Annales d'endocrinologie 75(2):109-11
9. Wang, R.X., Fu, C., Yang, Y.P., Han, R.R., Dong, Y., Dai, R.L., 2010. Male infertility in China: laboratory finding for AZF microdeletions and chromosomal abnormalities in infertile men from Northeastern China. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 27(7): 391-6.
10. Kalantari P, Sepehri H, Akbari MT, Osati Ashtiani Z, Behjati F. Chromosomal anomalies in infertile azoospermic and oligospermic men. Tehran Univ Med J. 2001; 59 (3) :60-71
11. Mafra, F.A., Christofolini, D.M., Bianco, B., Gava, M.M., Glina, S., Belangero, S.I., 2011. Chromosomal and molecular abnormalities in a group of Brazilian infertile men with severe oligozoospermia or non-obstructive azoospermia attending an infertility service. International Braz J Urol 37(2): 244-51.
12. Pylyp, L.Y., Spinenko, L.O., Verhoglyad, N.V., Zukin, V.D., 2013. Chromosomal abnormalities in patients with oligozoospermia and non-obstructive azoospermia. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 30(5): 729-32
13. Gunes, S., Al-Sadaan, M., Agarwal, A., 2015. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. Reproductive Biomedicine Online 31(3): 309-19.
14. Hu, M.H., Liu, S.Y., Wang, N., Wu, Y., Jin, F., 2016. Impact of DNA mismatch repair system alterations on human fertility and related treatments. Journal of Zhejiang University Science B 17(1): 10-20.
15. Ji, G., Long, Y., Zhou, Y., Huang, C., Gu, A., Wang, X., 2012. Common variants in mismatch repair genes associated with increased risk of sperm DNA damage and maleinfertility. BMC Medicine 10(1): 49.
16. Mukherjee, S., Ridgeway, A., Lamb, D.J., 2010. DNA mismatch repair and infertility. Current Opinion in Urology 20(6): 525.
17. Zhao, X., Mu, C., Ma, J., Dai, X., Jiao, H., 2019. The association of four SNPs in DNA mismatch repair genes with idiopathic male infertility in northwest China. International Journal of Immunogenetics 46(6): 451-8.
18. Zhang, X., Ding, M., Ding, X., Li, T., Chen, H., 2015. Six polymorphisms in genes involved in DNA double-strand break repair and chromosome synapsis: association with male infertility. Systems Biology in Reproductive Medicine 61(4): 187-93.
19. Zuhiaer, M., Kadhim, R.A., Al-Marzoqi, A.H.Y. 2020. Chromosomal microdeletion; SY127 gene related male infertility screening in Iraq. International Journal of Psychosocial Rehabilitation 24(5): 3175-83