مجله پلاسما و نشانگرهای زیستی
شماره پیاپی ۶۴، دوره ۱۶، شماره ۴، پاییز۱۴۰۲، صفحه ۶۵ تا ۷۶
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

بررسی ارتباط miR34c ، miR15b ،کیفیت پارامترهای اسپرمی و میزان شکست DNA اسپرم در افراد نابارور اولیگو آستنو تراتوزو اسپرمی

فاطمه دهقانی[۱]، فاطمه توحیدی[۱]، **راحیل جنتی فر**[۲]

۱- استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، موسسه آموزش عالی آل طه، تهران، ایران.

۲-مربی بخش تحقیقات، گروه بیولوژی تولید مثل، مرکز جهاد دانشگاهی، قم، ایران. نویسنده مسئول : rahiljanati2016@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۳۱ **تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۵**

چکیده

زمینه و هدف: miRNA : ها نقش مهمی فرایندهای مختلف پاتوفیزیولوژیک در سلولها و کنترل فرایند آپوپتوز در اسپرم دارند. هدف این پژوهش بررسی ارتباط بیان miR34cو miR15bهای ، کیفیت پارامترهای اسپرمی و میزان شکست DNA اسپرم در افراد نابارور اولیگو استنو تراتوزواسپرمی می باشد.

مواد و روش ها: این مطالعه بر روی ۲۵ بیمار دارای اولیگو آستنو تراتوزواسپرمی که به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم مراجعه کرده بودند انجام شد. ۲۵ نفر از افراد بارور هم به عنوان گروه کنترل انتخاب شده اند. بعد از جمع آوری نمونه های اسپرمی ، پارامترهای اسپرمی بر اساس سازمان بهداشت جهانی (WHO2010) آنالیز شدند. میزان شکست DNA اسپرم با استفاده از تکنیک (SCD) بررسی شد. میزان بیان miR34cو miR15bبا استفاده از تکنیک Rael-time PCR اندازه گیری شد.

نتایج: طبق نتایج به دست آمده پارامترهای اسپرمی از جمله غلظت ، تحرک و مورفولوژی اسپرم در افراد نابارور اولیگو آستنو تراتوزواسپرمی نسبت به افراد بارور کاهش معنی داری را نشان می دهد (P<0.05) و میزان شکست DNA اسپرم در افراد اولیگو آستنو تراتوزواسپرمی افزایش معنی داری داشت(P<0.05). آزمون همبستگی مشخص کرد که بین متغیرهای اسپرم شامل غلظت، تحرک ، مورفولوژی نرمال، میزان شکست DNA اسپرم و میزان بیان miR34c وmiR15b همبستگی معنی داری وجود دارد .

نتیجه گیری: یافته های ما نشان داد که بین بیان miR34c ، miR15b ، پارامترهای اسپرمی و سلامت DNA اسپرم ارتباط معنی داری وجود دارد. در واقع این نتایج می تواند بینش جدیدی برای تشخیص ناباروری مردان در سطح مولکولی ارائه کند.

کلمات کلیدی: miR34c، miR15b ، اسپرم، اولیگو آستنو تراتوزواسپرمی

مقدمه

ناباروری یکی از موضوعات اساسی و نگرانی‌های این روزهای جوامع بین‌المللی است. طبق تعریف سازمان بهداشت جهانی (WHO)، ناباروری عبارت است از «عدم باروری موفقیت آمیز یک زوج که در طی یک سال از نظرجنسی و بدون انجام اقدامات پیشگیرانه فعال بودند» (۱). حدود ۱۵ درصد از تمام زوج ها نابارور هستند و به دنبال راه درمانی برای این مسئله هستند. ۵۰ درصد ناباروری‌ها با یک عامل مرتبط با ناباروری مردانه، و پارامترهای غیرطبیعی مایع منی همراه است(۲). علل شناخته شده ناباروری مردان عبارتند از: ناهنجاری های مادرزادی یا اکتسابی دستگاه تناسلی، بدخیمی ها، عفونت های دستگاه ادراری تناسلی، افزایش دمای کیسه بیضه، اختلالات غدد درون ریز، عوامل ایمنی و برخی ناهنجاری های ژنتیکی. در زمینه اپی‌ژنتیک مطلعات بسیاری در زمینه MicroRNAها و تاثیرات آنان بر باروری انجام شده است(۳). MicroRNA (mir) مولکولهای RNA تنظیمی کوچکی به طول ۱۹-۲۲ نوکلئوتید هستند که در تنظیم انواع فرایندهای متابولیسمی بدن از جمله اسپرماتوژنز دخالت دارند(۴). درمطالعات مختلفی بسیاری ازmiRNA ها که مسئول تنظیم مراحل مختلف اسپرماتوژنز بوده اند، شناسایی شده اند. بدیهی است کهmiRNA ها در اسپرم سازی نقش دارند و وجود یا عدم وجود آنها در اسپرم بالغ میتواند بیانگر رشد نابجا، عملکرد و یا ناباروری در افراد باشد(۵). خانواده miR۳۴، از ۳ رونوشت همولوگ تشکیل شده است miR34a، miR34b، وmiR34c این خانواده به عنوان سرکوبگرهای تومور شناخته شده اند زیرا آنها اهداف مستقیم ژن ۵۳ pسرکوبگر تومور هستند(۶). اگرچه miR34a در تمام بافتهای بدن انسان بیان میشود، miR34b/c در زیر مجموعه کوچکی از بافتها، به ویژه غدد جنسی شناسایی می شود (۷). طبق این مطالعات سطح بیان miR34b در اسپرماتوزوا و همچنین در اسپرماتوسیت افزایش پیدا میکند . سطح بیان miR34b/c در منی و اسپرم ، با ناباروری مردان مرتبط است (۸).ابرخانواده miR ۱۵ از هشت عضو تشکیل شده است که به طور بالقوه از یک جد مشترک تکامل یافته اند. دو خوشه miR15/16به نام های miR15/16aوmiR15/16bدر پستانداران شناسایی شده اند که هر دوآنها در بین گونه های پستانداران بسیار حفاظت شده بودند(۹) . miR15b .یک عضو خانواده miR ۱۶/۱۵است که نقش مهمی در اسپرم زایی دارد(۱۰). مطالعات بیانگر این موضوع است که miR15b به طور مکرر در بیوپسی بیضه بیماران مبتلا به نارسایی اسپرم زایی دچار اختلال میشود(۱۰). در این مطالعه ما به بررسی ارتباط میان میزان بیان miR-34cو miR- 15b های ،کیفیت پارامترهای اسپرمی و میزان شکست DNA اسپرم در افراد نابارور اولیگو آستنو تراتوزواسپرمی می‌پردازیم.

مواد و روش ها

در این پژوهش نمونه مایع منی ۲۵ فرد الیگوآستنوتراتوزواسپرمی که برای درمان به مرکز ناباروری جهاد دانشگاهی قم مراجعه کرده و ناباروری آنها توسط ارولوژیست تایید شده بود، با رضایت شخصی جمع آوری گردید. معیار سنجش افراد الیگواستنوتراتوزواسپرمی براساس سازمان جهانی بهداشت (WHO-2010) (۱۱) بررسی شد. ۲۵ فرد بارور به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. مایع منی افراد گرفته شده و به مدت ۳۰ دقیقه داخل انکوباتور۳۷ درجه قرار داده شد تا از حالت ژالتینی خارج شود و به فرم مایع تبدیل شود. افراد دارای واریکوسل، سابقه جراحی واریکوسل، افراد با سابقه شیمی درمانی، مصرف داروی خاص، دارای مشکلات آناتومیک، آزواسپرمی، درمان با مهارکننده‌های آروماتاز یا آنتی استروژن از مطالعه حذف شدند. به منظور انجام این ازمایش ابتدا پارامترهای اسپرمی،

میزان آسیب DNA اسپرم بین گروه بیمار و کنترل اندازه گیری شد. سپس با کمک روش Real Time PCR به بررسی میزان بیانmiR34c و miR15bدر نمونه منی افراد بیمار و کنترل پرداختیم و درنهایت ارتباط میان این میزان بیان این miRNA ها ، پارامترهای اسپرمی و میزان سلامت DNA اسپرم مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی پارامترهای اسپرمی

جهت بررسی پارمترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی) با استفاده از میکروسکوپ نوری و بر اساس سازمان استاندارد جهانی (۲۰۱۰) صورت گرفت(۱). شمارش اسپرم ها از بر حسب میلیون بر لیتر توسط لام نئوبار انجام شد. بررسی میزان تحرک اسپرم ها بر اساس (WHO2010) اندازه گیری شد. درصد تحرک کل اسپرمی باید کمتر از ۴۰٪ و حرکت پیشرونده (a+b) کمتر از ۳۲٪ باشد. برای بررسی مورفولوژی نرمال اسپرم ها از روش رنگ آمیزی پاپانیکولا استفاده شد. در رنگ آمیزی پاپانیکولا ، سر به رنگ آبی و قطعه میانی به رنگ قرمز یا صورتی در می آید. جهت بررسی مورفولوژی اسپرم ، ابتدا از هر نمونه گسترش تهیه شد. سپس به صورت یکجا رنگ آمیزی پاپانیکولا انجام شد. برای هر نمونه ،یک لام فیکس شده از اسپرم تهیه می شود. پس از رنگ آمیزی ۱۰۰ اسپرم توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی X100 بررسی شد.

بررسی شکست DNA اسپرم

روش بررسی سلامت DNA اسپرم شامل تست سنجش پراکندگی کروماتین اسپرم (SCD) است. ارزیابی فراگمانتاسیون DNA به روش (Sperm Chromati Dispersion SCD) انجام شد. برطبق روش Fernandez مقدار ۳۰ میکرولیتر از نمونه اسپرمی آماده شده با ۷۰ میکرولیتر از آگاروز با درجه ذوب پایین دردمای ۳۷ درجه سانتیگراد مخلوط شد . سپس نمونه مخلوط شده برروی لامی که از قبل با آگاروز ۰/۶۵ درصد پوشیده شده، قرار گرفت و با گذاشتن یک لامل روی آن، به مدت ۴ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد گذاشته شد . سپس با دقت لامل از سطح لام جدا شده و هرلام به صورت افقی در محلول اسید کلریدریک ۰/۰۸ نرمال به مدت ۷ دقیقه دردمای اتاق و درتاریکی قرارداده شد و در درجه حرارت اتاق، به مدت ۱۰ دقیقه درمحلول های تجزیه کننده قرار داده شد و سپس شستشو شد و به ترتیب در الکل ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد هرکدام به مدت ۲ دقیقه آبگیری شده و بعد از خشک شدن، با محلول رنگ دیفکوئیک رنگ آمیزی شد و توسط میکروسکوپ نوری بررسی شد . با استفاده از این روش می توان میزان فراگمانتاسیون DNA را با توجه به وجود هاله اطراف هسته و اندازه آن بررسی نمود. در اسپرمهای با فراگمانتاسیون DNA(هسته اسپرم با هاله کوچک و بدون هاله) و بدون فراگمانتاسیون DNA(هسته اسپرم با هاله بزرگ و هاله متوسط) تعیین می شود. جهت بررسی فراگمانتاسیون DNA تعداد ۲۰۰سلول شمارش گردید.

استخراج miRNA

برای لیز سلول اسپرم به تیوب نمونه میزان۴۰۰ میگرولیتر ترایزول و ۱۰ میکرولیتر بتا مرکاپتواتانول به ۱ میلی‌لیتر از مایع منی اضافه شد. ویال به‌آرامی سر و ته شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه زیر هود در دمای اتاق قرار داده شد تا غشای سلول‌ها لیز شوند. محتویات ویال را به ستون دارای فیلتر، در ستون استخراج RNA منتقل کرده و سپس به‌مدت ۱ دقیقه با دور ۱۱۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. مایعات عبورکرده از فیلتر که در کف لوله جمع‌آوری تجمع یافته بود، کاملا دور ریخته شد.۴۰۰ میکرولیتر از محلول GW1 به فیلتر اضافه گردیده و با دور rpm ۱۱۰۰۰ به‌مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع تجمع یافته در لوله جمع‌آوری و دور ریخته شد. ۷۵۰ میکرولیتر از بافر RNW به فیلتر اضافه گردید و سپس با دور

rpm ۱۱۰۰۰ به‌مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع تجمع-یافته در لوله جمع‌آوری و دور ریخته شد. مجدداً سانتریفیوژ با دور rpm ۱۱۰۰۰ به‌مدت ۲ دقیقه انجام شده و بار دیگر مایع تجمع یافته در لوله جمع‌آوری و دور ریخته شد. ستون استخراج، به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری استریل و عاری از RNase منتقل گردید. مقدار ۳۰ میکرولیتر، آب عاری از RNase داخل ستون ریخته شد. پس از یک دقیقه فیلتر به-طور کامل از آب اشباع می‌شود. سانتریفیوژ با دور rpm ۱۱۰۰۰به‌مدت ۱ دقیقه انجام شد تا RNA متصل‌شده به فیلتر به‌طور کامل شسته شده و از فیلتر جدا و در کف میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتر تجمع یابد. مایع تجمع یافته در ته ویال، تنها حاوی RNA بوده و پس از بستن درب ویال، با استفاده از پارافیلم درب ویال مسدود و ویال به فریزر۷۰- درجه سانتی-گراد منتقل گردید.

انجام qRT-PCR

مطالعه فراوانی بیان miR15b و miR34c با پرایمرهای اختصاصی با روش quantitative Real-time PCR با استفاده از دستگاه کیا ژن انجام شد توالی پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است. در این پژوهش با کمک پلتفورم NCBI پرایمرهای forward و reverse برای هرکدام از miRNAهای مدنظر طراحی شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده

primer		Sequence (5'->3')	Length	Tm
U6	Forward	TGCTTCGGCAGCACATATAC	19	59.93
	Reverse	AGGGGCCATGCTAATCTTCT	19	58.45
miR15b	Forward	AGGCATAGCAGCACATAATG	22	59.48
	Reverse	GAGCAGGGTCCGAGGT	22	59.02
miR34c	Forward	AGGCAGTGTAGTTAGC	22	53.76
	Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT	22	56.79

نتایج

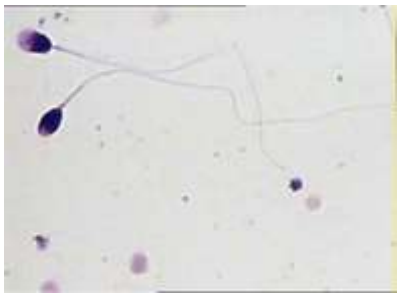
بررسی پارامترهای اسپرمی

بررسی تعداد اسپرم (غلظت اسپرم) بیانگر تفاوت معنی داری بین گروه بیمار و کنترل بود ($P<0.05$)و کاهش معناداری در گروه بیمار وجود داشت. همچنین میزان تحرک کلی و پیشرونده اسپرم نیز بین بیمار و کنترل متفاوت بود ($P<0.05$)و میزان تحرک در بیماران کاهش معناداری داشت. بررسی مورفولوژی اسپرم با کمک رنگ آمیزی پاپانیکولار انجام شد و تفاوت معنا داری بین بیمار و کنترل نشان داد ($P<0.05$) (شکل۱). در واقع میزان مورفولوژی نرمال در بیماران با کاهش معناداری همراه بود.بررسی شکستگی DNA اسپرم با تست SCD انجام شد و نتایج بیانگر افزایش قابل توجه در میزان شکستگی DNA اسپرم در بیماران الیگوآستوتراتوزواسپرمی نسبت به گروه کنترل بود ($P<0.05$) (شکل۲) (جدول۲).

جدول۲: مقایسه پارامترهای اسپرمی بین گروه کنترل و بیماران اولیگو آستنوتراتوزواسپرمی

فاکتور اندازه گیری شده	بیمار	کنترل	P-value
حجم (ml)	۳/۵۸ ± ۰/۸۸	۳/۰۲ ±۱/۳۲	P>۰.۰۵
غلظت اسپرمی ($^{(\times ١٠^{٦})}$)	١٠/٢±٥/٨٠	٧۴/٠۶±۶ /٥١	P<۰.۰۵
تحرک کل اسپرمی (٪)	٣۶/۴٢±٣/٢٠	۵۵/١٨± ٢/٩١	P<۰.۰۵
تحرک پیشرونده اسپرمی(a+b) (٪)	٢٠/۶٠± ١/٨١	٣۴/۵۴±٢/۶٣	P<۰.۰۵
تحرک غیر پیشرونده اسپرمی (٪)	١۶/١٠±١/٧۶	٢١/٠٠±١/٠٩	P<۰.۰۵
اسپرم های غیر متحرک (٪)	۶٣/٠٠±٢/١١	۴۵/٨٢± ١/١٧	P<۰.۰۵
درصد مورفولوژی نرمال اسپرم (٪)	١/٩۶ ± ٠/٠٢	۶/۵٣ ± ١/۴۵٧	P<۰.۰۵
درصد شکست DNA اسپرم (٪)	٣٢/۴٢±٣/٢٠	١٠/١±٧/٨٠	P<۰.۰۵

ب

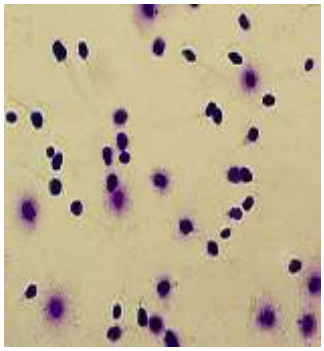


الف

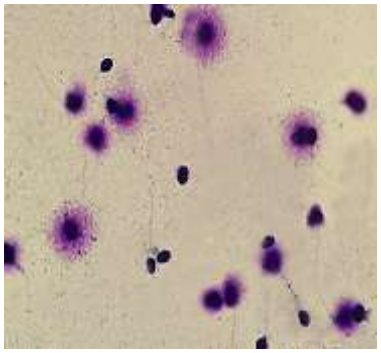
شکل ۱:بررسی میزان مورفولوژی طبیعی اسپرم با رنگ آمیزی پاپانیکولا) میکروسکوپ نوری Olympus cx21 بزرگنمایی(.Objective 1000) الف: گروه اولیگوآستنوتراتزواسپرم،ب: گروه کنترل

بررسی بیان miR15b و miR34c

در این پژوهش میزان بیان miR15b و miR34c نیز بین بیمار و کنترل به کمک تست Real Time PCR مورد بررسی قرارگرفت. میزان بیان هردو miR بین بیماران الیگواستنوتراتوزواسپرمی و گروه کنترل تفاوت معناداری داشت (P<۰.۰۵). میزان بیان miR15b دربیماران الیگوآستنوتراتوزواسپرمی به شکل چشم گیری افزایش پیدا کرده است(P<۰.۰۵)(نمودار۱). همچنین میزان بیان miR34c در بیماران الیگواستنوتراتوزواسپرمی نسبت به گروه کنترل به شکل معناداری کاهش پیدا کرده است(P<۰.۰۵)(نمودار۲).

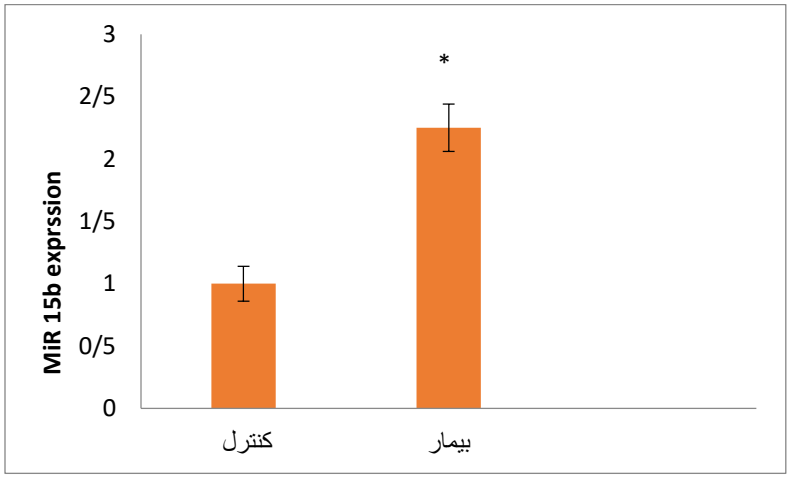


الف



ب

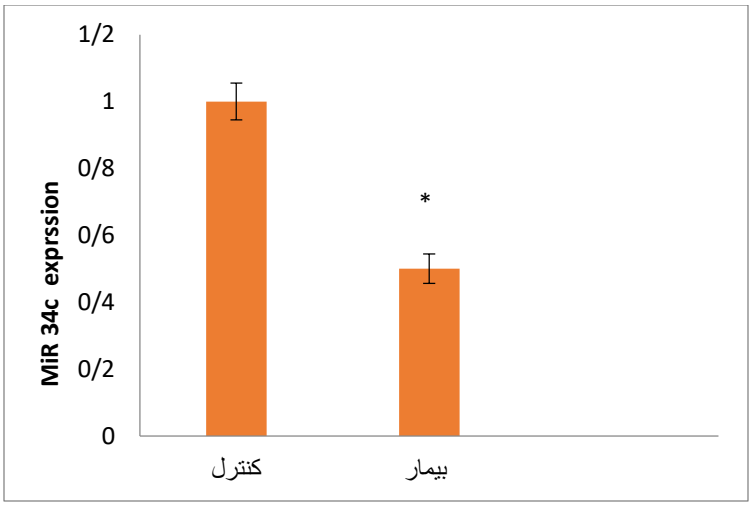
شکل۲: شکل قطعه‌قطعه شدن DNA اسپرم براساس تشکیل هاله در گروه‌های مختلف- تست SCD بررسی توسط میکروسکوپ نوری Olympus cx21 بزرگنمایی 1000X.الف: گروه بیمار آستنوتراتواسپرم. ب: گروه کنترل . هسته اسپرم با هاله بزرگ (بدون قطعه‌قطعه شدن DNA)، هسته اسپرم با هاله کوچک (دارای قطعه‌قطعه شدن DNA) و هسته اسپرم بدون هاله (دارای DNA با آسیب شدید) است.



نمودار۱:مقایسه میزان بیان miR15b در بیماران الیگو آستنوتراتوزواسپرمی و گروه کنترل

بررسی ارتباط میان پارامترهای اسپرمی و میزان بیان miR15bو miR34cدر مردان اولیگوآستنوتراتوزواسپرم

آزمون همبستگی پیرسون مشخص کرد که بین متغیرهای اسپرم شامل غلظت، تحرک و هورفولوژی نرمالو میزان بیان miR34cهمبستگی از نوع مستقیم وجود دارد بین میزان شکست DNA و میزان بیان miR34c همبستگی غیرمستقیم وجود دارد. نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که بین پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و هورفولوژی نرمال)و میزان بیانmiR15b ارتباط غیر مستقیم و ین میزان شکست DNA و میزان بیان miR15b همبستگی وجود دارد(جدول ۳).



نمودار۲:مقایسه میزان بیان miR34c بین بیماران الیگواستنوتراتوزواسپرمی و گروه کنترل

جدول ۳: ارتباط بین میزان بیان miR15b و miR34c با پارامترهای اسپرمی و شکست DNAاسپرم

پارامترها		miR15b		miR34c	
		r	P	r	p
علظت اسپرم (10^6)	بیمار	-۰/۳۷۵	۰/۰۳	۰/۳۵۵	۰/۰۳
	کنترل	-۰/۳۵۹	۰/۰۱	۰/۳۲۷	۰/۰۴
تحرک اسپرم(٪)	بیمار	-۰/۴۸۸	۰/۰۴	۰/۳۳۲	۰/۰۳
	کنترل	-۰/۴۰۵	۰/۰۲	۰/۳۷۶	۰/۰۱
مورفولوژی اسپرم (٪)	بیمار	-۰/۴۰۵	۰/۰۳	۰/۳۰۳	۰/۰۵
	کنترل	-۰/۳۹۲	۰.۰۱	۰/۳۳۴	۰/۰۳
میزان آسیب (DNA) (٪)	بیمار	۰/۴۰۱	۰/۰۷	-۰/۳۹۹	۰/۰۵
	کنترل	۰/۳۷۲	۰/۰۴	-۰/۳۷۲	۰/۰۳

بحث

در این مطالعه مشخص شد که میانگین تعداد اسپرم بین گروه بیماران الیگواتنوتراتوزواسپرمی و گروه کنترل تفاوت معناداری وجود دارد. این پارامتر در بیماران با کاهش قابل توجهی همراه بود. درصد تحرک اسپرم، میزان مورفولوژی نرمال از دیگر پارامترهایی بود که بین گروه بیماران الیگواستنوتراتوزواسپرمی و گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که بین تمامی این پارامترها در بیماران و کنترل تفاوت معناداری وجود دارد. در واقع میزان تحرک اسپرم، و مورفولوژی نرمال در بیماران نابارور الیگواستنوتراتوزواسپرمی کاهش پیدا کرده بود. شواهد به دست آمده در این پژوهش نشان میدهد که میزان بیان miR15b در بیماران به طرز معناداری افزایش پیدا کرده و میزان بیان miR34c کاهش پیدا کرده‌است. در این آزمایش

این مسئله مشخص شد که بین میزان بیان این miR ها و پارامترهای اسپرمی ارتباط معنی داری وجود دارد.

در مطالعه ای مشخص شده است که microRNAها با تنظیم بیان ژن در اپیدیدم بر تنظیم بلوغ و ذخیره اسپرم تاثیرگذار است(۱۲). در واقع مشخص است که حذف microRNAها منجربه کاهش بیان ژن‌های دخیل در اسپرماتوژنز شده و موجب کاهش بلوغ اسپرم، تغییر پروفایل غشایی آن و در نهایت ناباروری را به دنبال دارد(۱۳). درمطالعه‌ای اثر miR17-92 مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که سرکوب این microRNA موجب افزایش بیان bim,kit,socs3,stste3 میشود. این قبیل ژن ها سلول های اسپرماتوگونی را در حالت تمایز نیافته متوقف میکنند و موجب کوچکتر شدن بیضه و کاهش تعداد اسپرم میشوند(۱۴).

در مطالعه‌ای اثر مستقیم mir 34b/499 مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد با حذف اثر این microRNA تعداد اسپرم و مورفولوژی نرمال آن کاهش پیدا میکند. همچنین مشخص شد این microRNA آپوپتوز سلول‌های زایا را به دنبال دارد که در نهایت منجربه ناباروری در افراد میشود(۱۵). همچنین گزارش شده که miR34c نقش تنظیمی مهمی در میوز، آپوپتوز سلول های زایا و تمایز سلول های بنیادین ایفا میکند(۱۶). در مطالعاتی گزارش شده که miR15 نقش بسیار مهمی در فرایند اسپرماتوژنز دارد بنابراین تغییر در میزان این miR میتواند به ناباروری در مردان ختم شود. همچنین مشخص شده که افزایش بیان این miR از طریق تاثیر بر ژن bcl2 موجب القای آپوپتوز شده و از این طریق بر قابلیت حیات اسپرم و سلامت DNA آن تاثیرگذار است (۱۷) . در آزمایش دیگر نشان داده شد که افزایش miR15 موجب کاهش رشد جنین های حاصل از تزریق سیتوپلاسمی اسپرم میشود(۱۸). مطالعات مختلفی بیانگر این مسئله بودند که miR15b به طور مکرر در بیضه بیماران مبتلا به نارسایی اسپرم بیان میشود(۱۹). شواهد به دست آمده در این پژوهش نشان میدهد که میزان بیان miR15b در بیماران به طرز معناداری افزایش پیدا کرده و میزان بیان miR34c کاهش پیدا کرده‌است. باتوجه به شواهد به‌دست آمده در این پژوهش و مطالعات انجام شده میتوان استنباط کرد که تغییر در بیان microRNAها میتواند به تغییر در پروفایل بیانی ژنهای دخیل در فرایندهایی از جمله اسپرماتوژنز شود و از این طریق بر باروری افراد اثر گذار باشد. در این آزمایش این مسئله به اثبات رسید که میزان بیان miR15b در بیماران الیگواستنوتراتوزواسپرمی افزایش پیدا کرده‌است. پس میتوان نتیجه گرفت که بین میزان بیان این miR و پارامترهای اسپرمی رابطه عکس وجود دارد. میزان بیان miR34c در بیماران الیگواستنوتراتوزواسپرمی به شکل معناداری کاهش پیدا کرده بود پس میتوان نتیجه گرفت بین بیان این miR و پارامترهای اسپرمی رابطه مستقیم وجود دارد. با تغییر بیان mir34c و miR15b بیان ژنها دخیل در اسپرماتوژنز، ژنهای دخیل در بلوغ اسپرم ژن‌های دخیل در قابلیت حیات اسپرم از جمله bcl2 تغییر میکند. همچنین ممکن است بیان ژن‌های دخیل در تمایز و رشد جنین نیز در اثر این تغییر بیان، تغییر کند. در نتیجه این تغییرات پروفایل بیانی و پروتئومی سلول تغییر میکند و برپارامترهای اسپرمی از جمله غلظت اسپرم، تحرک، مورفولوژی نرمال و تاثیر میگذارد. پس میتوان این ادعا را مطرح کرد که تغییر در بیان miR34c و miR15b میتواند از طریق تغییر بر پارامترهای اسپرمی بر باروری افراد تاثیرگذار باشد. تغییرات اپی ژنتیکی

عوامل مهم دیگری هستند که اسپرم زایی و باروری مردان را تنظیم می کنند. اپی ژنتیک تنظیم ژن را بدون هیچ تغییری در توالی DNA تنظیم می کند. این تغییرات شامل متیلاسیون DNA، تغییرات هیستون پس از ترجمه و بازآرایی کروماتین است(۲۰).

اصلاح هیستون یک تنظیم کننده کلیدی میتوز و اسپرم زایی است. برخی از مطالعات نشان داده اند که تغییرات غیرطبیعی هیستون در طی اسپرم زایی ممکن است منجر به آسیب شدید به رشد اسپرم و باروری مردان شود(۲۱). میلر و همکاران (۲۲)، نشان داد که بسته بندی نادرست DNA در اسپرم موش باعث ناباروری می شود. بسته بندی صحیح DNA برای اسپرم زایی طبیعی ضروری است زیرا تقریباً ۸۵ درصد هیستون ها توسط پروتامین ها در طول فرآیند اسپرم زایی جایگزین می شوند. با توجه به نقش حیاتی PRM1 و PRM2 در عملکرد طبیعی اسپرم و فرآیند لقاح، ناکافی بودن این پروتئین ها می تواند با کاهش مقدار پروتئین مربوطه مرتبط باشد که به نوبه خود باعث افزایش درصد اسپرم با ساختار کروماتین غیرطبیعی و DNA آسیب دیده می شود(۲۱). در مطالعات مختلفی دانشمندان به نقش microRNA ها بر سلامت DNA اسپرم پرداخته اند. به طور مثال در پژوهشی تاثیر مستقیم mir-469 بر اسپرم زایی مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت به این نتیجه رسیدند که miR-469 از طریق تاثیر بر پروتئین‌های مختص بسته بندی کروماتین از جمله TPs و PRMs بر بازسازی و سلامت DNA اسپرم تاثیر میگذارد(۲۳).

در واقع miR-469 از طریق سرکوب ترجمه پروتئین‌های TPs و PRMs بر سلامت DNAاسپرم تاثیرگذار است. شواهد به دست آمده در این پژوهش نشان میدهد که ارتباط معنی داری بین بیان miR15b و miR34c و میزان آسیب DNA اسپرم وجود دارد. باتوجه به نقش microRNAها بر بسته بندی صحیح کروماتین و همچنین بازسازی DNA اسپرم میتوان استنباط کرد که تغییر در پروفایل بیانی این microRNAها موجب تغییر در بیان ژنهای پروتئین های دخیل در فرایند بسته بندی کروماتین از جمله TPs و PRMs می شود. تغییر در میزان این پروتئین ها داخل اسپرم موجب عدم بسته بندی صحیح کروماتین و درنتیجه آسیب DNA اسپرم و قطعه قطعه شدن آن می‌شود. آسیب DNA اسپرم به نوبه خود موجب کاهش قابلیت حیات اسپرم شده و ممکن است ناباروری فرد را به دنبال داشته باشد.

نتیجه گیری

کاهش بیان miR34c وافزایش بیان miR15b در اسپرم منجر به کاهش کیفیت اسپرم و افزایش میزان آسیب DNA اسپرم در افراد نابارور اولیگو آستنو تراتوزواسپرمی می شود.ارزیابی miR34c و ژن های مرتبط با آنها می تواند در اینده به عنوان ابزار تشخیصی مهمی در تشخیص ناباروری مردان باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از پرسنل سخت کوش مرکز فوق تخصصی مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی میشود.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله تعارض در منافع ندارند.

فهرست منابع

1. Organization WH. Improving the quality and use of birth, death and cause-of-death information: guidance for a standards-based review of country practices. 2010.

2. Cooper TG, Noonan E, Von Eckardstein S, Auger J, Baker HG, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Human reproduction update. 2010;16(3):231-45.

3. Burgos C, Cikutovic R, Alarcon M. MicroRNA expression in male infertility. Reproduction, Fertility and Development. 2022.

4. 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.

5. Amanai M, Brahmajosyula M, Perry AC. A restricted role for sperm-borne microRNAs in mammalian fertilization. Biology of reproduction. 2006;75(6):877-84.

6. Agostini M, Knight RA. miR-34: from bench to bedside. Oncotarget. 2014;5(4):872.

7. Bouhallier F, Allioli N, Lavial F, Chalmel F, Perrard M-H, Durand P, et al. Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. Rna. 2010;16(4):720-31.

8. Abu-Halima M, Hammadeh M, Backes C, Fischer U, Leidinger P, Lubbad AM, et al. Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. Fertility and sterility. 2014;102(4):989-97. e1.

9. Yue J, Tigyi G. Conservation of miR-15a/16-1 and miR-15b/16-2 clusters. Mammalian Genome. 2010;21:88-94.

10. Ramaiah MJ. Functions and epigenetic aspects of miR-15/16: Possible future cancer therapeutics. Gene Reports. 2018 Sep 1;12:149-64.

11. Organization WH. World health statistics 2010: World Health Organization; 2010.

12. Belleannée C, Calvo E, Thimon V, Cyr DG, Légaré C, Garneau L, et al. Role of microRNAs in controlling gene expression in different segments of the human epididymis. PloS one. 2012;7(4):e34996.

13. Björkgren I, Gylling H, Turunen H, Huhtaniemi I, Strauss L, Poutanen M, et al. Imbalanced lipid homeostasis in the conditional Dicer1 knockout mouse epididymis causes instability of the sperm membrane. The FASEB Journal. 2015;29(2):433-42.

14. Tong MH, Mitchell DA, McGowan SD, Evanoff R, Griswold MD. Two miRNA clusters, Mir-17-92 (Mirc1) and Mir-106b-25 (Mirc3), are involved in the regulation of spermatogonial differentiation in mice. Biology of reproduction. 2012 Mar 1;86(3):72-1.**15.** Comazzetto S, Di Giacomo M, Rasmussen KD, Much C, Azzi C, Perlas E, et al. Oligoasthenoteratozoospermia and infertility in mice deficient for miR-34b/c and miR-449 loci. PLoS genetics. 2014;10(10):e1004597.

16. Zhang S, Chen L, Jung EJ, Calin GA. Targeting microRNAs with small molecules: from dream to reality. Clinical Pharmacology & Therapeutics. 2010;87(6):754-8.

17. Tomic M, Bolha L, Pizem J, Ban-Frangez H, Vrtacnik-Bokal E, Stimpfel M. Association between Sperm Morphology and Altered Sperm microRNA Expression. Biology. 2022;11(11):1671.

18. Taheri H, Hosseini S, Salehi M.The relationship between Sperm DNA fragmentation and differential expression of human sperm pro-apoptotic miR-15a/16 and anti-apoptotic BCL-2 gene. The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility.2019;22(10);42-48.

19. Buñay J, Larriba E, Patiño-Garcia D, Urriola-Muñoz P, Moreno RD, Del Mazo J. Combined proteomic and miRNome analyses of mouse testis exposed to an endocrine disruptors chemicals mixture reveals altered toxicological pathways involved in male infertility. MHR: Basic science of reproductive medicine. 2019;25(3):156-69.

20. Shaoqin G, Zhenghui Z, Xueqian Z, Yuan H. Epigenetic modifications in human spermatozoon and its potential role in embryonic development. Yi chuan= Hereditas. 2014;36(5):439-46.

21. Rajender S, Avery K, Agarwal A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 2011;727(3):62-71.

22. Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. Reproduction. 2010;139(2):287-301.

23. Pradeepa M, Manjunatha S, Sathish V, Agrawal S, Rao M. Involvement of importin-4 in the transport of transition protein 2 into the spermatid nucleus. Molecular and cellular biology. 2008;28(13):4331-41.

Journal of Plasma & Biomarkers
Volume 16, Issue 4, Number 64, Pages 65 - 76
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: 9880-1735

The relationship between miR34c, miR15b, the quality of sperm parameters and sperm DNA damage rate in infertile oligoasthenoteratozoospermia men

Fatemeh Dehghani[1], Fatemeh Tohidi[1], **Rahil Jannatifar[2]**

1-Assistant professor, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Al Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran
2-Instructor, Department of Reproductive Biology, Academic Center for Education, Culture, and Research (ACECR), Qom Branch, Qom,

Received:2023.08. 22 **Accepted: 2023.09.16**

Abstract

Background & aim: MiRNAs play an important role in various pathophysiological processes in cells and controlling the process of apoptosis in sperm. The aim of this study is to investigate the relationship between the expression of miR34c and miR15b, the quality of sperm parameters and the rate of sperm DNA breakage in oligoasthenoteratozoospermia infertile individuals.

Materials & Methods: This study was conducted on 25 patients with oligoasthenoteratozoospermia who had referred to Jihad University Infertility Treatment Center in Qom. 25 fertile people have been selected as the control group. After collecting sperm samples, sperm parameters were analyzed according to the World Health Organization (WHO 2010). The amount of sperm DNA breakage was checked using the SCD technique. The expression levels of miR34c and miR15b were measured using the Rael-time PCR technique.

Results: According to the obtained results, sperm parameters such as concentration, motility and morphology of sperm in infertile oligoasthenoteratozoospermia individuals show a significant decrease compared to fertile individuals ($P<0.05$), and the rate of sperm DNA breakage in oligoasthenoteratozoospermia individuals increases. It was significant ($P<0.05$). Correlation test revealed that there is a significant correlation between sperm variables including concentration, motility, normal morphology, sperm DNA breakage rate and the expression level of miR34c and miR15b.

Conclusion: Our findings showed that there is a significant relationship between the expression of miR34c, miR15b, sperm parameters and sperm DNA health. In fact, these results can provide new insights for the diagnosis of male infertility at the molecular level.

Key words: miR34c, miR15b, sperm, oligoasthenoteratozoospermia