فصلنامه

زیست شناسی تکوینی

سال هشتم، شماره ۳، تابستان ۱۳۹۵

بررسی ارتباط واریانت‌های ژن *UBE2B* با تاثیر بر تکامل اسپرم و ناباروری ادیوپاتیک در جمعیتی از مردان شمال ایران

الهام سیاسی*[1]، محمد صادق صفایی[1]

[1] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

E-mail: emi_biotech2006@yahoo.ca

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۲

چکیده

ناباروری یک مشکل کلینیکی عمده است که حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد زوج ها را در سراسر جهان درگیر می‌کند. ۴۰ تا ۵۰ درصد ناباروری زوجین مربوط به مردان است که می‌تواند ناشی از برهم کنش بین فاکتورهای ژنتیکی و محیطی باشد. در ۵۸٪ -۳۷ از موارد ناباروری در مردان هیچ دلیل قابل شناسایی دیده نمی‌شود. این گروه در جایگاه ناباروری با منشأ ناشناخته قرار می‌گیرند. ژن *UBE2B* و تغییرات آن به عنوان یکی از این عوامل ژنتیکی ناشناخته محسوب می‌گردند. هدف این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیسم‌های T293G و A20016G از ژن *UBE2B* با ناباروری در جمعیت مردان شمال ایران بود. در این مطالعه نمونه خون ۶۰ مرد بارور و۶۰ مرد نابارور گرفته شد. پس از استخراج DNA از نمونه‌ها، فراوانی اللی و ژنوتیپی واریانت‌های مذکور به روش PCR-RFLP تعیین گردید. نتایج مطالعه ما اختلاف معنی داری در فراورنی آللی بین افراد بیمار و سالم در پلی‌مورفیسم‌های(P=0.66) T293G و (P=0.52) A20016G از ژن *UBE2B* نشان نداد. با توجه به اینکه در فراوانی آلل های مورد مطالعه در گروه بیمار و کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت، به نظر می‌رسد بین این پلی مورفیسم‌ها و ناباروری ادیوپاتیک مردان شمال ایران ارتباطی وجود نداشته باشد.

کلیدواژه‌ها: پلی مورفیسم ، ژن *UBE2B*، ناباروری ایدیوپاتیک مردان، PCR-RFLP

مقدمه

اگرچه علّت دقیق موارد قابل توجهی از ناباروری ناشناخته است، حذف‌های کروموزومی، جابجایی‌ها و پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در ناباروری ۳۰٪ از مردان دخیل است [۷ و ۱٤]. شناخت و درک اینکه ناهنجاری‌ها و تنوع های ژنتیکی، مکانیسم اسپرماتوژنز و لقاح را تحت تأثیر قرار می‌دهند و شانس غلبه بر ناباروری مردان را افزایش می‌دهد. از این موارد ژنتیکی می‌توان ژن *UBE2B* که از زیر واحدهای یوبی کوئیتین است را نام برد. یوبی‌کوئتین (Ubiquitin) یک پروتئین کوچک، با وزن مولکولی ۵/۸ کیلودالتن می‌باشد. از آنجا که این پروتئین در تمام سلول‌های

یوکاریوتی وجود دارد، لذا نام یوبی کوئیتین، برگرفته از Ubiqitous (همه جا موجود) بر آن نهاده شده است. سکانس آمینواسیدی این پروتئین در موجودات مختلف در طول تکامل ثابت باقی‌مانده است، که حاکی از نقش مهم این پروتئین در متابولیسم سلولی می‌باشد. یوبی‌کوئتین به طور تصادفی در اوائل دهه ۷۰ توسط Gold Stain کشف شد و در اواخر دهه ۷۰ و اوائل دهه ۸۰ دانشمندان یک سیستم پرتئولیزی غیر لیزوزومی وابسته به پروتئین یوبی کوئتین و ATP را شناسایی نمودند. اصلی‌ترین نقش این پروتئین در سلول‌های یوکاریوتی می‌باشد. در این سیستم پروتئولیزی یوبی کوئتین طی یک مسیر آنزیمی چند مراحله‌ایی به پروتئین هدف متصل شده که این امر منجر به شناسایی و تجزیه پروتئین توسط کمپلکس آنزیمی پروتئوزم می‌شود. به عبارتی این کمپلکس آنزیمی پروتئین‌هایی را شناسایی و تجزیه می‌نماید که توسط یوبی کوئتین مدیفای شده باشند. در طول اسپرماتوژنز پروتئین‌های هسیتون ساختار نوکلئوزومی هسته در نهایت جایگزین پروتامین هسته اسپرمی می‌شوند. حذف و تجزیه هیستون‌ها بایوبی کوئیتینه شدن آنها و دخالت پروتئوزوم همراه است [٤ و ٦]. مطالعات نشان داده است که سطح اسپرم‌های معیوب در حین عبور از مجرای اپی‌دیدیم یوبی کوئیتینه می‌گردند، که این امر منجر به شناسایی و فاگوسیته شدن بخشی از اسپرم‌های معیوب توسط سلول‌های اپیتـلیال اپی‌دیدیم می‌شود. در سال ۲۰۰۱ روش Immunoassay Sperm Ubiquitin جهت شناسایی اسپرم‌های معیوب در افراد نابارور پیشنهاد شد[۱۷]. لازم به ذکر است این روش می‌تواند در جائی که تست‌های آنالیز اسپرمی نمی‌تواند توصیفی در مورد علل ناباروری مردان بدهد بسیار با ارزش باشد. همچنین در جهت شناسایی صحیح اسپرم‌های معیوب درصد موفقیت در IVF و ICSI را بالا می‌برد. نقش سیستم یوبی‌کوئتین – پروتئوزوم در واکنش آکروزومی و نفوذ اسپرم به داخل Vitteline Coat نیز بررسی شده استVC70 . آنتی‌ژن سطحیCoat Vitteline در اووسیت طی فرآیندی که جزئیات آن هنوز نامشخص است. یوبی کوئیتینه شده و بدین طریق توسط پروتئوزوم S۲۰ اکروزومی شناسایی و با تجزیه این آنتی‌ژن، نفوذ اسپرم به داخل Vitteline coat میسر می‌گردد. لازم به ذکر است که اسپرموزین و اکروزین نیز پروتئین‌های مهم در عمل نفوذ اسپرم به داخل اووسیت می‌باشند. مطالعات نشان داده است که میتوکندری پستانداران منحصراً به صورت مادری به ارث می‌رسد. از آنجا که تخم‌های لقاح‌یافته و جنین تکامل یافته تنها دارای میتوکندری مادری هستند به نظر می‌آید که میتوکندری اسپرم بعد از لقاح از بین می‌رود. گزارشات بسیاری در مورد نقش یوبی‌کوئیتین در تجزیه انتخابی میتوکندری اسپرمی بعد از لقاح داده شده است. سیستم پروتئوزوم – یوبی کوئتین در تنظیم روند بلوغ اووسیت نیز نقش دارد. در طول چرخه میوتیک از یروفاز I میوز تا متافاز II میوز دو وقفه وجود دارد. اولین وقفه در پروفازI میوز می‌باشد که تا زمان بلوغ ادامه می‌یابد و با القا های گنادوتردپین‌ها دوباره سیکل آغاز می‌گردد و در متافاز II میوز مجدداً سیکل متوقف شده تا مجدداً بعد از لقاح آغاز گردد. یافته‌ها نشان می‌دهد در تنظیم این سیکل سیستم یوبی کوئتین – پروتئوزوم، هم از طریق تأثیر در فسفوریلاسیون – دفوسفوریلاسیون و هم تجزیه پروتین‌های تنظیمی سیکل نقش مهمی بر عهده دارد [۳]. این پروتئین شامل حداقل سه گروه آنزیمی با نام‌های زیر می‌باشد: آنزیم فعال E1، آنزیم

کونژوگه کننده E2، آنزیم لیگازی E3. ژن *Ubiquitin – Conjugating Enzyme 2B* (*UBE2B*) کد کننده یکی از اعضای خانواده آنزیمی E2 از یوبی کوئیتین، با شش اگزون است که در انسان روی بازوی بلند کروموزوم ۵ , در جایگاه q31.1 قرار دارد و برای ترمیم DNA آسیب دیده پس از همانند سازی لازم می باشد. این آنزیم طی تکامل یوکاریوتی در حد بسیار زیاد حفاظت شده است [۱۰]. در موش حذف این ژن با ناباروری به علت ناهنجاری‌های ساختاری اسپرم همراه بوده است [۱٦].

ژنوم هر شخص منحصر به فرد می‌باشد. داده‌های ژنوم که به صورت توالی DNA نوشته می‌شود، یک عامل مهم برای تعیین فنوتیپ‌های ژنتیکی است. اطلاعات ژنومی اگرچه برای ایجاد فنوتیپ ضروری است، امّا به تنهایی کافی نیست. پیچیدگی بیشتر یک فنوتیپ ناشی از برهمکنش‌های پویا و پیچیده بین ژنوم و فاکتورهای محیطی است. حدود ۹۹/۹ ٪ از توالی ژنوم در همه انسان‌ها همسان است، اما وجود ۰/۱٪ تفاوت بیانگر تنوع ژنتیکی است که خطر ابتلای افراد به یک بیماری، شدت بیماری و چگونگی پاسخ یک فرد به درمان را تعیین می‌کند. اشکال مختلف یک ژن که در جایگاه مشخصی از یک کروموزوم قرار گرفته‌اند، آلل نامیده می‌شوند و به وجود آلل‌های مختلف یک ژن در جمعیت یک گونه که ممکن است باعث ایجاد فنوتیپ‌های مختلف شوند و فراوانی آن‌ها در جمعیت بیشتر از 1٪ اشد، چند شکلی یا پلی‌مورفیسم اطلاق می‌گردد. پلی مورفیسم‌های ژنتیکی می‌توانند در نتیجه فرایندهای تصادفی و یا بر اثر القای عوامل خارجی (ویروس‌ها، پرتو) ایجاد شوند. یکی از انواع پلی‌مورفیسم‌ها، پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNP)[1] می‌باشند که معمول ترین منبع تنوع پلی‌مورفیسمی در ژنوم انسان (۹۰٪) محسوب می‌شوند. در حال حاضر مهمترین کاربرد SNP در مطالعات دارویی و بیماری‌های وابسته به پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی می‌باشد [۲ و ۵].

روند رو به افزایش ناباروری زوجین و تاثیر عوامل مختلفی که در بروز این عارضه به عنوان یک بیماری، سبب ایجاد مشکلات بسیاری بین زوج‌ها گردیده است، در جوامع امروزی خصوصا در کشور ایران بعنوان یک معزل بهداشتی – عاطفی مطرح است. از موثرترین روش‌های بالا بردن آگاهی طبقات اجتماع و کاهش هزینه‌های درمان را می‌توان شناخت عوامل ژنتیکی از جمله جهش‌ها و پلی مورفیسم‌های دخیل در ایجاد ناباروری در نظر گرفت. بنابراین شناسایی و تشخیص این فاکتورها می تواند در ارایه راه حل های مناسب جهت درمان این زوج‌ها و کاهش بار اقتصادی و فرهنگی جامعه به خصوص در گروه سنی جوان و کارا کمک موثری باشد. بنابراین این تحقیق برای بررسی حضور واریانت‌های جدید در ژن *UBE2B* که در جمعیت مردان نابارور سایر نقاط جهان مطرح است در جمعیت مردان شمال ایران و ارتباطی که می‌تواند با ناباروری آنان داشته باشد و به عنوان مارکر ژنتیکی مطرح باشد، پرداخته شده است. تعداد زیادی از پلی‌مورفیسم‌های ژن *UBE2B* تا کنون شناسایی و ارتباط آنان با ناباروری بررسی شده است [۱۲]. در این تحقیق به بررسی دو پلی‌مورفیسم 20016 A>G (rs3777373) و 293T>G (rs17167484) که در ناحیه غیر کد کننده این ژن می‌باشند، پرداخته شده است.

[1] SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

روش کار

۱- نمونه‌گیری- در این تحقیق از دو گروه، با اخذ رضایت نامه‌ی کتبی و اطلاعات مربوط به بیمار در قالب پرسشنامه و دادن اطلاعات لازم در مورد پروژه، نمونه خون گرفته شد. گروه اول شامل ٦٠ مرد نابارور و گروه دوم شامل ٦٠ مرد سالم و بارور بودند. از افراد گروه های بیمار و کنترل به مقدار ۲ میلی لیتر خون گرفته شد و به منظور جلوگیری از لخته شدن نمونه‌های خون درون لوله‌های آغشته به EDTA ذخیره و لوله‌های حاوی نمونه به یخچال منتقل شدند و در مراحل بعدی جهت استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند.

۲- استخراج DNA ژنومی از خون- جهت استخراج DNA از خون با Gpp Solution DNA extraction kit که محصول شرکت ژن پژوهان است، استفاده شد.

۳- ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده به کمک ژل آگارز (الکتروفورز افقی)- در این روش DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۸٪ الکتروفورز شد.

٤- واکنش PCR پلی‌مورفیسم‌های ژن *UBE2B*- واکنش PCR به منظور تکثیر قطعه‌ی حاوی 293T>G و 20016A>G انجام گرفت. پرایمرها، مواد مورد نیاز و برنامه دستگاه برای PCR در جدول‌های ۱ و ۲ و ۳ و ٤ آمده است. پس از انجام واکنش، محصولات PCR تحت تاثیر آنزیم محدود کننده قرار گرفتند.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده جهت PCR پلی مورفیسم های ژن *UBE2B*

نام پلی مورفیسم	توالی پرایمر	طول قطعه تکثیر شده
293T>G	F- 5'-GGATAGTGTTTCTGTTTCGTGGTCT-3' R- 5'-ACTGACAAACAACCCTGCAATGAC-3	240 bp
20016A>G	F- 5'-AGAAAGCTAATACAAAACTATCCTA-3' R- 5'-TGTTAAACGTTGCATAATGAAT-3'	206 bp

جدول ۲- مواد لازم در واکنش PCR ژن *UBE2B*

مواد مصرفی	غلظت	مقدار
DNA الگو	۳۰ ng	٤µl
بافر	۱۰X	۲/۵µl
منیزیم کلراید	۵۰ mM	۰/۷۵µl
دزوکسی نوکلئوتیدتری فسفات(dNTP)	۱۰mM	۰/۵µl
آنزیم Taqپلیمراز	۲/۵ U	۰/۳µl
پرایمر F	100 pmol/µ	۱µl
پرایمرR	100 pmol/µ	۱µl
آب		۱٤/۹۵µl
مجموع		۲۵µl

جدول ۳- چرخه حرارتی PCR ژن *UBE2B* برای پلی مورفیسم 293T>G

مراحل	زمان	دما (°C)
واسرشت سازی اولیه	۵ دقیقه	۹۵
واسرشت سازی	۱ دقیقه (۳۵ سیکل)	۹۵
اتصال آغازگر به رشته الگو	۱ دقیقه (۳۵ سیکل)	٦۰/۵
بسط پلیمراز	۱۰ دقیقه (۳۵ سیکل)	۷۲
بسط نهایی		۷۲
نگهداری	۵ دقیقه	٤

جدول٤- چرخه حرارتی PCR ژن *UBE2B* برای پلی مورفیسم ۲۰۰۱٦ A>G

مراحل	زمان	دما (°C)
واسرشت سازی اولیه	۵ دقیقه	۹۵
واسرشت سازی	۱ دقیقه (۳۵ سیکل)	۹۵
اتصال آغازگر به رشته الگو	۱ دقیقه (۳۵ سیکل)	۵۷/۵
بسط پلیمراز	۱۰ دقیقه (۳۵ سیکل)	۷۲
بسط نهایی		۷۲
نگهداری	۵ دقیقه	٤

۵- الکتروفورز جهت بررسی کیفیت محصول PCR- برای بررسی محصول PCR، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۲٪ برده شدند.

٦- کاربرد RFLP جهت تشخیص پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی 293T>G و 20016A>G - جهت تعیین نوع پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی در قطعه 293 و ۲۰۰۱٦ جفت بازی از ژن *UBE2B* که توسط PCR تکثیر شده بود، محصول PCR تحت تیمار با آنزیم‌های محدود کننده مناسب قرار گرفت. آنزیم محدودکننده Taq1 برای پلی مور فیسم T293G و آنزیم HpyCH4III برای پلی مور فیسم A>G۲۰۰۱٦ تهیه شده از شرکت فرمنتاز، مورد استفاده قرار گرفت. مواد مورد استفاده جهت هضم آنزیمی محصول PCR برای دو پلی‌مورفیسم مورد مطالعه به ترتیب در جدول‌های ۵ و ٦ آمده است.

پس از اضافه کردن مواد، ویال مورد نظر به آرامی مخلوط شد و سپس برای عملکرد آنزیم Taq1 نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در انکوباتور با دمای ٦۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و برای آنزیم HpyCH4III به مدت ۱ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ در جه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در پایان محصولات هضم آنزیمی به یخچال ٤ درجه سانتی-گراد منتقل شدند. سپس محصول تیمار با آنزیم بر روی ژل آگارز ۳٪ برده شدند.

۷- آنالیز آماری- به منظور تفسیر نتایج به دست آمده از بررسی‌های آزمایشگاهی، پارامترهای آماری کمی (عددی) مورد نیاز بود. بنابراین با بهره‌گیری از نرم افزار (Med Calc (Version.12.1.4.0، آزمون‌های آماری Chi-Square (χ^2) و آزمون Odd Ratio (OR) انجام گرفت و علاوه بر مقادیر χ^2 و OR، پارامترهایی

مانند *P*- value و Interval Confidence (CI) نیز به دست آمد.

نتایج

۱- خصوصیات نمونه‌ها- در این تحقیق، ۱۲۰ نمونه خون مورد بررسی قرار گرفت که از این تعداد ٦۰ نفر مردان مبتلا به ناباروری بودند و ٦۰ نفر نیز مردان باروری بودند که به عنوان گروه کنترل یا سالم در نظر گرفته شدند. آنالیز استاندارد مایع سمن بر اساس معیارهای سازمان سلامت جهانی در افراد نابارور انجام شد، که نتایج اخذ شده از پرونده‌ی پزشکی بیماران، طیفی از اختلالات اسپرم را در آن‌ها نشان داد. نتایج این بررسی ها در جدول ۷ نشان داده شده است.

۲- نتایج بررسی کیفیت DNA استخراج شده – صحت نتایج نمونه‌های استخراج DNA با الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸٪ و عکس‌برداری از ژل توسط دستگاه ژل داک تایید شد.

جدول۵- مواد مصرفی در واکنش RFLP برای آنزیم Taq1

موار مور نیاز	مقدار
محصول واکنش PCR	5µl
بافرR	2µl
آنزیم Taq1	۱-۲µl
آب مقطر استریل	۱2µl
حجم نهایی	20µl

جدول٦- مواد مصرفی در واکنش RFLP برای آنزیم HpyCH4III

موار مور نیاز	مقدار
محصول واکنش PCR	5µl
بافرR	2µl
آنزیم HpyCH4III	۱-۲µl
آب مقطر استریل	۱2µl
حجم نهایی	20µl

جدول۷- نتایج آنالیز مایع سمن بر اساس پارامتر های اسپرم در مردان نابارور

متغییرهای مایع سمن	تعداد (٪)
الیگواسپرمیا	15 (25%)
استنواسپرمیا	12 (20%)
ترتواسپرمیا	6 (10%)
الیگواستنواپرمیا	12 (20%)
نرمواسپرمیا	15 (25%)

۳- نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در مورد نمونه‌ها انجام گرفت و نتایج تکثیر دو پلی مورفیسم مورد نظر در شکل ۱ و ۲ آورده شده است.

٤- نتایج حاصل از ژنوتایپینگ پلی‌مورفیسم‌های *UBE2B*- در این تحقیق پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی موقعیت ۲۹۳ و۲۰۰۱٦ در ژن *UBE2B* مورد بررسی قرار گرفت.

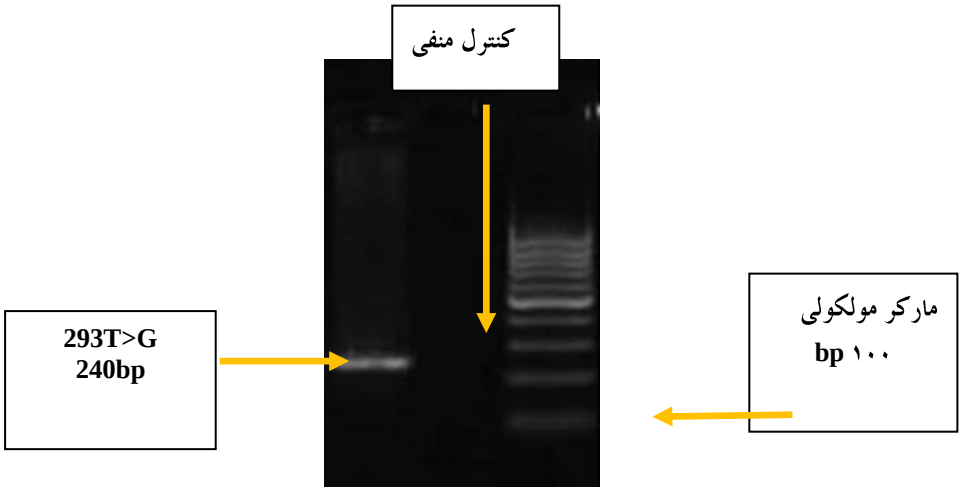
٤-۱- نتایج حاصل از ژنوتایپینگ پلی‌مورفیسم 293T>G- نتایج هضم آنزیمی پلی‌مورفیسم T293G در شکل ۳ آورده شده است. در ستون A باند ۲٤۰ bp نشانگر ژنوتیپ از نوع هموزیگوت وحشی TT می‌باشد و برش آنزیمی ایجاد نشده است. در ستون B وجود باندهای ۲٤۰ bp، ۱۷۰ و ۷۰ دلیل بر هضم آنزیمی و وجود هتروزیگوت TG می‌باشد. در ستون C برش آنزیمی ایجاد شده و دو باند ۱۷۰ bp و ۷۰ بیانگر هموزیگوت موتانت GG می‌باشد. ستون D، مارکر مولکولی ۱۰۰ bp را نشان می‌دهد.

٤-۲- نتایج حاصل از ژنوتایپینگ پلی مورفیسم 20016A>G

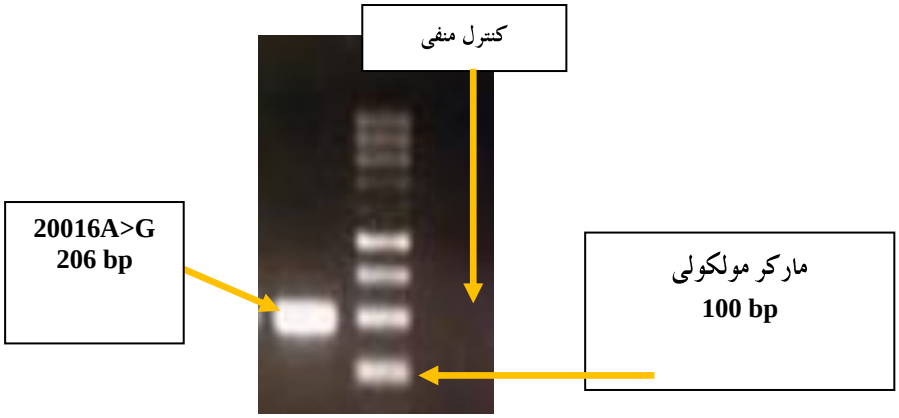
نتایج هضم آنزیمی پلی‌مورفیسم A20016G در شکل ٤ آمده است. در ستون A باند ۲٦۰ bp نشانگر ژنوتیپ از نوع هموزیگوت وحشی AA بود که برش آنزیمی ایجاد نشده است. در ستون B وجود باندهای ۲۰٦ bp، ۱٦۱و ٤٥ دلیل بر وجود هضم آنزیمی و وجود هتروزیگوت AG بود. در ستو ن C برش آنزیمی ایجاد شده و دو باند ۱٦۱و٤٥ bp بیانگر هموزیگوت موتانت GG بود. ستون D دارای مارکر مولکولی ۱۰۰ bp بود.

٥- نتایج آنالیزهای آماری پلی‌مورفیسم‌های *UBE2B*

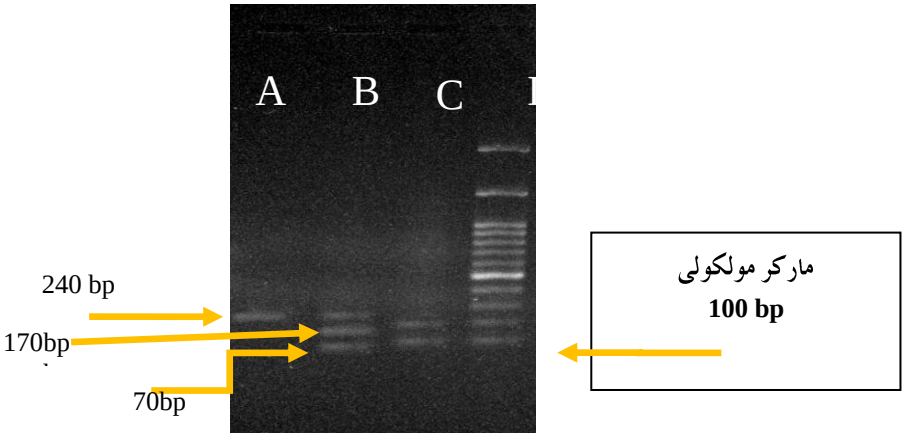
٥-۱- بررسی فراوانی آللی *UBE2B* 293T>G- نتایج فراوانی اللی در افراد بیمار و سالم به ترتیب در جدول ۸ و ۹ آمده است.



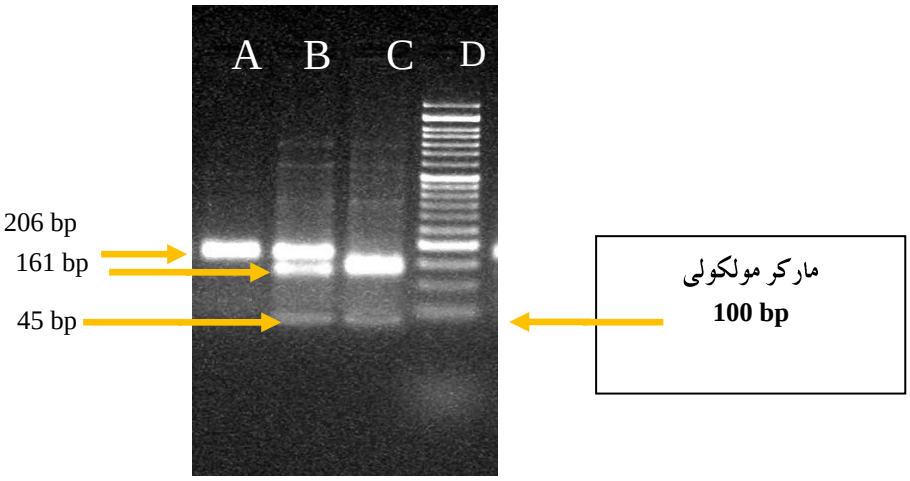
شکل ۱- باند حاصل از محصول PCR برای پلی مورفیسم *293T>G* ژن *UBE2B* (دارای طول 240 bp است).



شکل ۲- باند حاصل از محصول PCR برای پلی مورفیسم *20016A>G* ژن *UBE2B* (دارای طول 206 bp است).



شکل ۳- نتایج هضم آنزیمی پلی مورفیسم T293G از ژن *UBE2B* - از راست به چپ - خانه D: مارکر مولکولی ۱۰۰ bp- خانه C: نمونه هموزیگوت موتانت GG (170bp ,70bp)- خانه B: نمونه هتروزیگوت TG (240bp , 170bp ,70bp)- خانه A: نمونه هموزیگوت وحشی TT (240bp).



شکل ٤- نتایج هضم آنزیمی پلی‌مورفیسم A20016G از ژن *UBE2B* - از راست به چپ - خانه D: مارکر مولکولی ۱۰۰ bp- خانه C: نمونه هموزیگوت موتانت GG (٤٥bp ,١٦١ bp)- خانه B: نمونه هتروزیگوت AG (45 bp , 161 bp , 206 bp)- خانه A : نمونه هموزیگوت وحشی AA (206 bp).

جدول ۸- نتایج مربوط به فراوانی آللی افراد بیمار

پلی مرفیسم	میزان فراوانی	در صد فراوانی
TT	۵۰	۸۳/۳
GG	۲	۳/۳
GT	۸	۱۳/٤

جدول ۹- نتایج مربوط به فراوانی آللی افراد سالم

پلی‌مرفیسم	میزان فراوانی	در صد فراوانی
TT	٤۸	۸۰
GG	۱	۱/۷
GT	۱۱	۱۸/۳

۵-۲- بررسی فراوانی آللی *UBE2B* 20016A>G

– نتایج فراوانی اللی در افراد بیمار و سالم به ترتیب در جدول ۱۰ و ۱۱ آمده است.

جدول ۱۰- نتایج مربوط به فراوانی آللی افراد بیمار

پلی مرفیسم	میزان فراوانی	در صد فراوانی
AA	٤۲	۷۰
GG	٤	٦/٦
GA	۱٤	۲۳/٤

جدول ۱۱- نتایج مربوط به فراوانی آللی افراد سالم

پلی‌مرفیسم	میزان فراوانی	در صد فراوانی
AA	٤۷	۷۸/۳
GG	۲	۳/۳
GA	۱۱	۱۸/٤

۵-۳- آنالیزهای نرم‌افزاری جهت بررسی معنی‌دار بودن ارتباط پلی مورفیسم با بیماری

۵-۳-۱- پلی‌مورفیسم 293T>G- ارتباط پلی‌مورفیسم T293G ژن *UBE2B* در بیماران با افراد سالم مورد بررسی قرار گرفت. P. Value برابر با ۰/٦٦۷ و t ضریب هم بستگی (Contingency coefficient) برابر ۰/۰۸۱ بود، که نشان داد این پلی‌مورفیسم با بروز بیماری در ارتباط نمی باشد. نتایج در جدول ۱۲ نشان داده شده است.

جدول ۱۲- نتایج مربوط به فراوانی آللی پلی‌مورفیسم293T>G

Chi square	1.308
DF	2
Significance level	P:0.667
Contingency coefficient	0.081

۵-۳-۲- پلی مورفیسم 20016A>G- جهت بررسی معنی‌دار بودن نتایج از آزمون Chi-Square استفاده شد .طی آنالیز آماری مربوط به فراوانی آللی پلی مورفیسم 20016A>G ژن *UBE2B*، با توجه به مقدار P تفاوت معنی‌داری در فراوانی آللی بین دو گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد. به منظور تعیین OR، CI و P Value از آزمون Odds-Ratio با کمک برنامه نرم‌افزاری (v.12.1.4.0) Med Calc استفاده گردید. نتایج در جدول ۱۳ نشان داده شده است.

جدول ۱۳- نتایج مربوط به فراوانی آللی پلی‌مورفیسم 20016A>G

Chi square	1.308
DF	2
Significance level	P:0.5201
Contingency coefficient	0.104

بحث

اسپرماتوژنز فرایندی پیچیده است که از لحاظ آناتومی در بیضه ها و درون لوله‌های اسپرم ساز اتّفاق می‌افتد. واضح است که در چنین مجموعه فرایندهای پیچیده، بسیاری از عوامل ژنتیکی و غیرژنتیکی می‌توانند تولید اسپرم را مختل کنند [۱ و ١٤]. از آنجایی که این شکل از تقسیم منحصر به گامتوژنز است، می‌توان انتظار داشت که جمعیتی از پروتئین‌ها و بنابراین ژن‌های کد کننده‌ی آنها، مخصوصاً آن جنبه‌هایی که متمایز از میتوز هستند، منحصراً مربوط

به گامتوژنز هستند [٦]. با وجود این که تعدادی از ژن‌های دخیل در اسپرماتوژنز شناسایی شده اند اما هنوز عملکرد دقیقشان نامشخص است و می‌توانند در باروری مردان نقش موثر داشته باشند [۱۵]. اختلال در پتانسیل باروری مردان می‌تواند به دلایل مختلف مادرزادی و اکتسابی باشد، مانند کریپتوکیدیسم، سندروم کلاین فلتر، اختلالات انسدادی، واریکوسل، عفونت دستگاه تناسلی، اختلالات غدد درون‌ریز [۸]. در ٪۵۸ –۳۷ از موارد ناباروری در مردان هیچ دلیل قابل شناسایی دیده نمی‌شود. این گروه در جایگاه ناباروری با منشأ ناشناخته قرار می‌گیرند. ناباروری با منشأ ناشناخته، حالتی است که نقص در باروری به صورت خودبه‌خودی یا بر اثر دلایل ناشناخته و مبهم بروز می‌کند که به دو گروه ناباروری غیر قابل توصیف و ناباروری ایدیوپاتیک تقسیم می‌شود [۸]. از این موارد ژنتیکی که در ایجاد ناباروری ادیوپاتیک نقش دارند ژن *UBE2B* که از زیر واحدهای یوبی کوئیتین است، می‌باشد. یکی از مسیرهای تجزیه پروتئین در یوکاریوت‌ها یوبی کوئیتین است که وابسته به ATP می‌باشد. این مسیر دارای یک نقش کلیدی در تجزیه پروتئین‌ها است به ویژه مربوط به تخریب پروتئین-هایی که به صورت اشتباه چین خورده و آنزیم‌های تنظیمی با نیمه‌عمر کوتاهی هستند، می‌باشند. تحقیقات زیادی بر روی یوبی کوئیتین انجام گرفته است و نقش آن در تنظیم چرخه‌ی سلولی و ترمیم DNA اثبات شده است. در طول اسپرماتوژنز پروتئین‌های هسیتون ساختار نوکلئوزومی هسته، جایگزین پروتامین هسته اسپرمی می‌شوند. حذف و تجزیه هیستون‌ها بایوبی کوئیتینه شدن آنها و دخالت پروتئوزوم همراه است [٤]. هنگامی که یک مولکول یوبی کوئیتین به پروتئین متصل می‌شود تعداد دیگری هم متصل می‌شوند که سبب پلی یوبی کوئیتینه شدن پروتئین هدف می‌گردد. تخمین زده شده است که حداقل باید چهار مولکول یوبی کوئیتین به مولکول هدف متصل شود تا متحمل تجزیه در پروتئوزوم گردد. یوبی کوئیتین می‌تواند توسط آنزیم‌های دیوبی کویتینه کننده، از پوتئین هدف جداشود و یوبی کوئیتین آزاد می‌تواند مجددا مورد استفاده قرار گیرد [۱۳]. به دلیل اهمیت ناباروری مردان و نقش یوبی کوئیتین در آن و با در نظر گرفتن نقش احتمالی پلی مورفیسم عملکردی ژن *UBE2B* با ناباروری مردان، تحقیق حاضر با هدف بررسی پلی‌مورفیسم‌های 293T>G و 20016A>G از ژن *UBE2B* با ناباروری ایدیوپاتیک در جمعیتی از مردان استان گیلان انجام شد. در این تحقیق به منظور بررسی فراوانی آللی (T و G) در ژنوتیپ‌های *UBE2B* 293T>G (TT، GT و GG) و فراوانی آللی (A,G) در ژنوتیپ‌های *UBE2B* 20016A>G (AA، AG , GG) در جمعیت مورد مطالعه (60 فرد بیمار و 60 فرد کنترل) از روش PCR-RFLP استفاده گردید. نتایج حاصل پس از نمایش روی ژل آگارز با نرم‌افزار Med Clac مورد بررسی قرار گرفت و نشان داد که اختلاف مشاهده شده بین افراد بیمار و سالم با توجه به نتیجه آزمون Chi-Square از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. بنابراین توزیع نوع آلل مربوطه در بین افراد سالم و بیمار متفاوت نیست و حضور آلل G با توجه به نتایج یک فاکتور خطر محسوب نمی‌شود. نتایج پیشنهاد می‌کند که احتمالاً این ژنوتیپ‌ها نمی تواند خطر ابتلا به ناباروری را در مردان افزایش‌دهد و فاکتور مرتبط با ناباروری محسوب نمی‌شود.

در این زمینه تحقیقاتی در سال 2012 توسط آقای هو و همکاران بر روی ۳۱۲ فرد سالم و ۳۸۸ فرد نابارور صورت پذیرفت. در این تحقیقات فراوانی دو

پلی‌مورفیسم T293G و A20016G از ژن *UBE2B* مورد بررسی قرار گرفت و نشان داد که ارتباط معنا داری در فراوانی آللی بین دو پلی مور فیسم بین گروه کنترل و بیمار وجود ندارد و همچنین تفاوت معناداری در فراوانی ژنوتیپی این دو پلی‌مورفیسم نیز در دو گروه مشاهده نشد. آنالیز هاپلوتایپ روی این دو پلی‌مورفیسم صورت گرفت و ٤ هاپوتایپ TA, TG, GA, GG مشخص گردید و روشن شد توزیع هاپلوتایپ TA, TG, GG بین گروه کنترل و بیمار تفاوت معنا داری ندارد. اما فراوانی هاپلوتایپ GA در گروه بیمار به طور مشخصی پایین تر از گروه کنترل بود. هاپلوتیپ یک مجموعه از چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی (اسنیپ‌ها) روی یک کروموزوم از جفت کروموزومی است که به صورت آماری هم‌بسته هستند. به نظر می‌رسد با استفاده از این هم‌بستگی‌ها و شناسایی تعداد کمی از الل‌های یک بلوک هاپلوتیپی، می‌توان به صورت بدون ابهام همه مکان‌های چند شکلی را در آن ناحیه خاص تشخیص داد. چنین اطلاعاتی در تحقیق برای عوامل ژنتیکی بیماری‌های شایع بسیار ارزشمند هستند، و در پروژه بین‌المللی HapMap برای انسان‌ها مورد تحقیق قرار گرفته‌اند [۹]. در تحقیق حاضر که در شمال ایران انجام شد نیز مانند تحقیق آقای هو که در شمال چین انجام گرفت، ارتباط معنا داری بین فراوانی این پلی‌مورفیسم‌ها و ناباروری مشاهده نشد. البته تعداد افراد مورد مطالعه در تحقیقی که در ایران صورت گرفت بسیار کمتر از تحقیق انجام شده در چین بود که این امر می‌تواند در نتیجه نهایی تاثیر گذار باشد.

در سال ۲۰۱۵ آقای لیشا و همکاران, تحقیقاتی روی پلی‌مورفیسم A>G ۱۳۳۷۰۶۹۲۵ از ژن *UBE2B* و ارتباط آن با ناباروری ادیوپاتیک آزواسپرمیا انجام دادند. این پلی مورفیسم در ناحیه پرموتر واقع شده و به عنوان یک فاکتور خطر بالا برای ناباروری محسوب می شود. این یافته‌ها تائیدی بر نقش *UBE2B* در پاتوژنز آزواسپرمی ادیوپاتیک داشت [۱۲].

در سال ۲۰۰۸ آقای سوریاواتی و همکارانش به منظور بررسی نقش *UBE2B* در ناباروری دو پلی‌مورفیسم 5197 T>G و 9157 A>G در ۵۳۰ فرد نابارور و ۳۰۰ فرد سالم را مورد آزمایش قرار دادند. نتایج حاصل نشان داد که این دو جهش فقط در افراد نابارور مشاهده می‌شوند. سه پلی‌مورفیسم دیگر نیز در این طرح بررسی گردید شامل (293 T>G- rs17167484) (19765 T>G- rs11538104) و (20016 A>G- rs3777373) که از این میان پلی‌مورفیسم 19765 T>G تنها در افراد آزواسپرمیا و 293 T>G و 20016 A>G در هر دو گروه سالم و بیمار مشاهده شد و از این جهت مشابه نتایج بدست امده از تحقیقات انجام شده در شمال ایران است. تعداد ٤ هاپلوتایپ برای 5197 T>G و 9157 A>G مشاهده شد. توزیع این هاپلوتایپ‌ها بین دو گروه یکنواخت نبود. فرکانس بالای هاپلوتایپ TA در افراد سالم نسبت به افراد بیمار حاکی از این است که این هاپلوتایپ می تواند یک مزیت و فاکتور مطلوب برای باروری باشد. این در حالی است که که هاپلوتیپ TG یک عامل مستعد کننده برای نقص در اسپرماتوژنز شناخته شد. GA و GG در هر دو گروه در یک فرکانس پایین مشاهده شدند [۱٦].

در تحقیقاتی که در سال ۲۰۱۳ توسط یاتسنکو و همکاران صورت گرفت ارتباط تعییرات در mRNA از ژن *UBE2B* با ناباروری بررسی گردید. این تحقیقات بر روی ۳۲٦ فرد بیمار الیگواسپرماتیک و ٤۲۱ فرد سالم و با تکنیک RT- PCR صورت گرفت که

رویکرد آن ساخت cDNA از کل محتوای RNA اسپرم و بررسی آن بین گروه سالم و بیمار بود. نتیجه حاصل این بود که نرخ تشخیصی mRNA بین دو گروه کنترل و بیماران الیگواسپرماتیک تفاوت معناداری نداشت [۱۸].

در تحقیق آقای ایوان هونگ در آمریکا که بر روی ۹۶ مرد نابارور صورت گرفت به بررسی ژن *UBE2B* پرداخته شد. در این تحقیق پس از تکثیر بخش اگزون، قطعات با دستگاه ABI 3700 Capillary sequencer تعیین توالی شدند. این تعیین توالی بر روی اگزون ۱، ۲، ۳، ٤، ٥، ٦ و 5'-UTR صورت گرفت. در این پژوهش مشخص شده بود که پلی‌مورفیسم T293G در مردان نابارور اروپایی تبار شمال آمریکا دارای فراوانی ۵,۲ درصد بوده و که از لحاظ آماری تفاوتی با میزان فراوانی که در Hap Map ارائه شده بود نداشت [۱۰]. در تحقیق حاضر فراوانی پلی‌مورفیسم T293G باتکنیک PCR–RFLP مورد بررسی قرار گرفت و مانند تحقیق فوق ارتباط معناداری بین نا باروری و پلی‌مورفیسم فوق به دست نیامد، البته در تحقیق فوق به علت این که پلی‌مورفیسم‌های بیشتری از ژن *UBE2B* مورد بررسی قرار گرفته است از تکنیک توالی سنجی استفاده شده ولی در تحقیقی که در ایران انجام گرفت به علت بررسی دو پلی مورفیسم T293G و A20016G از تکنیک PCR–RFLP استفاده گردید. از لحاظ تکنیک به کار رفته تکنیک PCR–RFLP برای بررسی دو پلی‌مورفیسم مناسب بوده و در بیشتر موارد مطالعه در خصوص SNP ها کارایی موثری دارد. در این روش نمونه‌ای ازDNA تکثیر شده را با یک نوع آنزیم برشی، هضم می‌کنند که در نتیجه تعداد زیادی قطعه با طول متفاوت بدست می‌آید، سپس این قطعات با استفاده از ژل آگارز از هم دیگر جدا می‌شوند و جهش‌هائی از نوع نقطه‌ای و حذف و اضافه که باعث تغییر درسطح قطعه آنزیمی می‌گردند قابل تشخیص است.

با توجه به آزمایشات صورت گرفته و همچنین آنالیز آماری می‌توان این چنین گزارش کرد که فراوانی دو پلی مورفیسم T293G و A20016G ژن *UBE2B* احتمالا با بروز خطر ابتلاء به ناباروری در جمعیت شمال ایران دارای ارتباط معناداری نمی‌باشد. به عبارت دیگر حضور گوانین در موقعیت ۲۹۳ و همچنین ۲۰۰۱٦ از این ژن یک فاکتور خطر در جمعیت مورد مطالعه محسوب نمی‌شود. البته این نتیجه گیری فقط یک احتمال را نشان داده است، چرا که ممکن است با افزایش تعداد نمونه‌های مورد مطالعه خصوصا در جمعیت‌ها و سایر قومیت‌ها نتایج متفاوتی مشاهده شود و ممکن است بررسی‌های هاپلوتایپی در این زمینه معنی دار باشد و نیازمند تحقیقات بعدی در این خصوص می باشد.

فهرست منابع

[1] Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K.,Walter P. 2002. Molecular Biology of the Cell. Annals of Botany, 91(3): 401.

[2] Aston K.I., Krausz C., Laface I, Castané E.R., Carrell D.T. 2010. Evaluation of 172 Candidate Polymorphisms for Association With Oligozoospermia or Azoospermia in a Large Cohort of Men of European Descent. Hum Reprod, 25 (6): 1383-1397.

[3] Baarends W. M., Wassenaar E., Hoogerbrugge J.W., van Cappellen G., Roest H.P., Vreeburg J., Ooms M., Hoeijmakers J.H., Grootegoed J.A. 2003. Loss of HR6B ubiquitin-conjugating activity results in damaged synaptonemal complex structure and increased crossing-over frequency during the male meiotic prophase. Mol Cell Biol, 23(4): 1151-1162.

[4] Ciechanover A. 1996. Ubiquitin-mediated proteolysis and male sterility. Nat Med, 2(11): 1188-1190.

[5] Collins F.S., Brooks L.D., Chakravarti A. 1998. A DNA polymorphism discovery resource for

research on human genetic variation. Genome Res, 8(12): 1229-1231.

[6] Eliasson R. 2010. Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects. Asian J Androl, 12: 26-32.

[7] Ferlin A., Raicu F., Gatta V., Zuccarello D., Palka G., Foresta C. 2007. Male infertility: role of genetic background. Reprod Biomed Online, 14(6): 734-745.

[8] Hamadaa A., Esteves S.C., Agarwal A. 2011. The role of contemporary andrology in unraveling the mystery of unexplained male infertility. The Open Reproductive Science Journal, 4: 27-41.

[9] Hu Y., Wen W., Yu J.G., Qu S.Q., Wang S.S., Liu J., Li B.S., Luo Y. 2012. Genetic association of *UBE2B* variants with susceptibility to male infertility in a Northeast Chinese population. Genet Mol Res, 11(4): 4226-4234.

[10] HuangI., EmeryB.R., Christensen G.L., GriffinJ., Peterson C.M., Carrell D.T. 2008. Novel *UBE2B*-associated polymorphisms in an azoospermic oligozoospermic population. Asian J Androl, 10(3): 461–466.

[11] Krausz C. 2011. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 25: 271-285.

[12] Mou L., Zhang Q., Diao R., Cai Z., Gu Y. 2015. A functional variant in the **UBE2B** gene promoter is associated with idiopathic azoospermia. Reprod Biol Endocrinol, 13 : 79**.**

[13] Olayemi FO. 2010. A review on some causes of male infertility. African Journal of Biotechnology, 9: 2834-2842.

[14] Pasqualotto F.F., Agarwal A. 2009. Varicocele and male infertility: an evidence based review. Arch Med Sci, 5: S20–S27.

[15] Seshagiri P.B. 2001. Molecular insights into the causes of male infertility. J Biosci, 26(4): 429-435.

[16] Suryavathi V.N.,Khattri A., Gopal K., SelviRani D., Panneerdoss S., Gupta N., Chakravarty B., Deenadayal M., SINGH L., Thangaraj K. 2008. Novel Variants in *UBE2B* Gene and Idiopathic Male Infertility. Journal of Andrology, 29(5): 564-571.

[17] Sutovsky P., Terada Y., Schatten G. 2001. Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. Hum Reprod, 16(2): 250-258.

[18] Yatsenko A.N., Georgiadis A.P., Murthy L.J., Lamb D.J., Matzuk M.M. 2013. *UBE2B* mRNA alterations are associated with severe oligozoospermia in infertile men. Molecular Human Reproduction, 19(6): 388–394.