ارزیابی بیان ژن miR-378 و اندازه‌گیری سطح پلاسمایی کوآنزیم Q10 در مردان نابارور با الگوی اسپرماتوژنز نرمال

سهیلا ترکاشوند[۱]، دکتر فلورا فروزش[۲]، دکتر عبدالرضا محمدنیا[۳*]

۱. کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳. استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۱۰ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۰۶/۰۵

خلاصه

مقدمه: ناباروری یکی از مشکلات مهم بهداشتی- درمانی جوامع مختلف محسوب می‌شود. اخیراً توجه زیادی به نقش miRNA در مسیر اسپرماتوژنز شده است. miR-378 نقش مهمی در تنظیم تکثیر و تمایز در مسیر اسپرماتوژنز دارد. همچنین کوآنزیم Q10، آنتی‌اکسیدانی است که دارای نقش در محافظت از سلول در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد. مقادیر ناکافی از کوآنزیم Q10، می‌تواند عامل مهمی در اسپرماتوژنز ناموفق باشد. مطالعه حاضر با هدف بررسی سطح پلاسمایی کوآنزیم Q10 و همراهی آن با بیان ژن miR-378 در مردان نابارور با الگوی اسپرماتوژنز نرمال انجام شد.

روش‌کار: این مطالعه مورد شاهدی در سال ۱۳۹۸ بر روی ۴۵ فرد نابارور و ۴۵ نمونه فرد سالم به‌عنوان کنترل انجام شد. تعیین میزان بیان miR-378 با روش qRT-PCR و اندازه‌گیری سطح آنزیم Q10 با روش ELISA انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۰) و آزمون تی تست استفاده شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج مطالعه، تیتر کوآنزیم Q10 به‌طور معنی‌داری در گروه مبتلا به ناباروری پایین‌تر از افراد سالم مورد مطالعه بود ($p<۰/۰۵$). همچنین در افراد نابارور، بیان ژن miR-378 به‌طور میانگین ۰/۰۲۰±۱/۱۹۶ برابر افراد سالم بود که این افزایش از نظر آماری معنی‌داری نبود ($p=۰/۴۵$).

نتیجه‌گیری: به‌طورکلی در این مطالعه تغییر کوآنزیم Q10 در سرم بیماران نسبت به نمونه‌های کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین در افراد نابارور، بیان ژن miR-378 نسبت به افراد سالم افزایش داشت که این افزایش از نظر آماری معنی‌داری نبود. این موارد در اسپرماتوژنز در ناباروری مردان می‌توانند مؤثر باشند. البته شاید بتوان با افزایش تعداد نمونه به نتایج بهتری دست یافت.

کلمات کلیدی: اسپرماتوژنز، کوآنزیم Q10، ناباروری مردان، miR-378

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر عبدالرضا محمدنیا؛ مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. **تلفن:** ۰۲۱-۴۴۰۴۹۳۰۹؛ **پست الکترونیک:** mohamadnia.ar@gmail.com

مقدمه

ناباروری معمولاً به‌عنوان عدم بارداری پس از یک‌سال ضمن برخورداری از تماس جنسی منظم و بدون پیشگیری از بارداری تعریف می‌شود. امروزه با پیشرفت علم و تکنولوژی، برای تمام محققان عرصه ناباروری معلوم گشته که نازایی تنها یک مشکل زنانه نیست، بلکه فاکتورهای مردانه نیز دخالت دارند (۳-۱).

طیف وسیعی از شرایط، از جمله مشکلات آناتومیکی، عدم تعادل هورمونی و نقص‌های ژنتیکی نیز منتهی به عدم توانایی در باروری می‌شوند (۱، ۴). مطالعات جدید نشان می‌دهند یکی از تغییرات اپی‌ژنتیکی مؤثر در ناباروری مردان، تغییرات پلی‌مورفیک، جهش و تغییر در بیان miRNAها می‌باشد (۵، ۶). میکروRNAها، مولکول‌های RNA تک‌رشته‌ای کوچک کدگذاری نشده و متشکل از تقریباً ۲۲ نوکلئوتید هستند که از لحاظ فیزیولوژیکی در سلول‌های یوکاریوتی تولید شده‌اند (۱).

miRNAها نقش مهمی در تنظیم تکثیر و تمایز مناسب سلول‌های جنسی در مسیر اسپرماتوژنز دارند. همچنین نشان داده شده است که با توجه به نقش miRNA در مسیر اسپرماتوژنز، استفاده از مهارکننده‌های آنها باعث اختلال در مسیر اسپرماتوزنز و جلوگیری از بارداری می‌شود (۷، ۸).

miR-378 یکی از miRNAهاست که در تنظیم بیان ژن نقش دارد. در مطالعات قبلی نقش تنظیمی این miRNA در سرطان‌های تخمدان و پروستات گزارش شده است (۹). miR-378، یکی از مولکول‌های غیرکدشدنی کوچک RNA می‌باشد که قادر به تنظیم بیان ژن در سطح پس از رونویسی است. همچنین miR-378 می‌تواند عملکردهای وسیع‌تری را با افزایش بقای سلول، کاهش آپوپتوز و تقویت مهاجرت و تهاجم سلولی ایجاد کند (۱۰).

اسپرم به‌دلیل وجود اسیدهای چرب غیراشباع فراوان در سطح غشای پلاسمایی و همچنین به‌دلیل کمبود آنزیم‌های محافظتی در سیتوپلاسم در برابر استرس‌های اکسیداتیو بسیار آسیب‌پذیر است (۱۱). رادیکال‌های آزاد اکسیژن در اندام‌های مختلف بدن می‌توانند بر عملکرد صحیح اندام مورد نظر اثر منفی بگذارند. در مسیر اسپرماتوژنز، وجود رادیکال‌های آزاد اکسیژن باعث کاهش کیفیت و کمیت اسپرماتوژنز می‌گردد. در بدن، کوآنزیم Q10 که با نام یوبی‌کوئینون نیز شناخته می‌شود، آنتی‌اکسیدانی است که به‌طور طبیعی در غشای داخلی میتوکندری تمام بافت‌ها یافت می‌شود و نقش آن محافظت از سلول در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد. میزان این کوآنزیم در خون و مایع سمینال افراد مختلف متفاوت است و مقادیر ناکافی از کوآنزیم Q10 در پلاسما یا مایع سمینال، می‌تواند عامل مهمی در اسپرماتوژنز ناموفق باشد (۱۲، ۱۳). مطالعه حاضر با هدف بررسی سطح پلاسمایی کوآنزیم Q10 و همراهی آن با بیان ژن miR-378 در مردان نابارور انجام شد تا بتوان به تشخیص و درمان‌های بهتری دست یافت.

روش‌کار

این مطالعه مورد شاهدی در سال ۱۳۹۸ بر روی نمونه‌های مربوط به ۴۵ بیمار مبتلا به ناباروری مراجعه کننده به مراکز ناباروری و همچنین ۴۵ فرد سالم به‌عنوان گروه کنترل انجام شد.

معیارهای ورود به مطالعه شامل: تمایل به شرکت در مطالعه، گذاشتن حداقل یک‌سال از زمان تصمیم برای فرزنددار شدن، عدم استفاده از وسایل پیشگیری کننده از بارداری و معیار خروج از مطالعه شامل: وجود علتی شناخته شده برای ناباروری (مانند اختلالات هورمونی)، مصرف الکل، مصرف مواد مخدر، دیابت و بیماران کلیوی بود.

پس از مراجعه بیماران و تأیید بیماریشان توسط متخصص، نمونه خون از بیماران و افراد سالم گرفته شد و اطلاعات بالینی شامل سن ابتلاء و تاریخچه خانوادگی ثبت شد.

استخراج RNA توسط کیت شرکت MN آلمان به شماره کاتالوگ 740304 و سنتز cDNA با استفاده از کیت رونویسی معکوس Quanti Tect با Cat No./ID;205310 انجام شد.

به‌منظور بررسی بیان ژن miR-378 انجام Real-Time PCR صورت گرفت. واکنش Q-RT-PCR با استفاده از Master Mix 2x از شرکت Takara به

شماره کاتالوگ RR036A در واکنش‌های ۱۰ میکرولیتری انجام شد.
پروتکل استفاده از Master Mix شرکت Takara (Tli RNaseH Plus) (RR036A) در دستگاه Eco Biosystem در جدول ۱ و برنامه دمایی در جدول ۲ ذکر شده است.

جدول ۱- دستورالعمل انجام واکنش بر اساس کیت سازنده

حجم	اجزای واکنش
µl ۵	Precision Mastermix(with low ROX)
µl ۰/۵	Forward Primer (5 pmol/µ)
µl ۰/۵	Reverse Primer (5 pmol/µ)
µl ۱/۵	Template(25ng)
µl ۲/۵	DEPC Treated Water
µl ۱۰	Final volume

جدول۲- برنامه زمانی Real-Time PCR

مرحله	دما	درجه
Enzyme activation-Hotstart (1 Cycle)	۹۵ درجه سانتی‌گراد	۱۰ دقیقه
Denaturation(45 Cycles)	۹۵ درجه سانتی‌گراد	۱۰ ثانیه
Annealing(45 Cycles)	۶۰ درجه سانتی‌گراد	۴۰ ثانیه
Extension(45 Cycles)	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۱۵ ثانیه

بررسی سطح کوآنزیم Q10 به روش ELISA

سطح آنزیم کوآنزیم Q10 با بکارگیری کیت ELISA (Elabscience Biotechnology Inc) Human Q10 (Q10) Kit به شماره کاتالوگ MBS701260 و با رعایت کامل دستورالعمل شرکت سازنده، از نمونه پلاسمای بیماران مبتلا به ناباروری و سالم انجام شد.

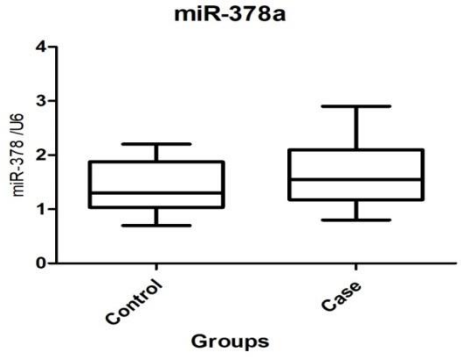
تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۰) انجام شد. جهت بررسی اختلاف میان میانگین دو گروه افراد سالم (کنترل) و افراد نابارور (مورد) جهت بررسی تغییر بیان نسبی miR-378 از آزمون آماری تی تست استفاده شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر جمعیت مورد مطالعه را ۴۵ فرد بیمار مبتلا به ناباروری و ۴۵ فرد سالم تشکیل می‌دادند.

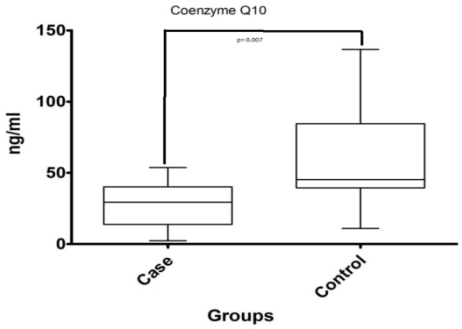
تعداد نمونه با توجه به مقاله بائو و همکاران (۲۰۱۲) و با در نظر گرفتن ۵٪ خطای نوع اول (۰/۰۵) و ۲۰٪ خطای نوع دوم (۰/۰۲) و با توجه به فرمول‌های آماری فصل ۶ کتاب Designing clinical research، ۴۵ نفر در گروه مورد و ۴۵ نفر در گروه شاهد برآورد شد (۱۴، ۱۸). مردان در گروه بیمار دارای میانگین سنی ۱/۳۲±۳۱/۰۵ و محدوده سنی ۳۵-۲۵ سال و مردان گروه سالم دارای میانگین سنی ۱/۳۲±۲۹/۷۱ و محدوده سنی ۳۷-۲۳ سال بودند که بر اساس نتایج آزمون تی تست، دو گروه از نظر میانگین سنی تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (p=۰/۴۴۲).

در نمونه بیماران نابارور، بیان ژن miR-378 مورد ارزیابی قرار گرفت که بر اساس نتایج حاصل، در افراد نابارور، بیان ژن miR-378 به‌طور میانگین ۰/۰۲۰±۱/۱۹۶ برابر افراد سالم بود که این افزایش از نظر آماری معنی‌داری نبود (p=۰/۴۵) (نمودار ۱).



نمودار ۱- تغییر بیان miR-378 در سرم بیماران نابارور به عنوان گروه مورد در مقایسه با نمونه‌های افراد سالم به‌عنوان گروه کنترل

تغییرات تیتر کوآنزیم Q10 در سرم بیماران نابارور در مقایسه با نمونه‌های کنترل در نمودار ۲ نشان داده شده است که بر اساس نمودار، اختلاف معناداری از نظر تیتر این آنزیم میان دو گروه مورد مطالعه وجود داشت (p=۰/۰۰۷).



نمودار۲- تغییر تیتر کوآنزیم Q10 در پلاسمای بیماران نابارور به‌عنوان گروه مورد در مقایسه با نمونه‌های افراد سالم به‌عنوان گروه کنترل

به‌طورکلی بر اساس نتایج حاصل، تیتر کوآنزیم Q10 به‌صورت خطی و معنی‌داری در گروه مبتلا به ناباروری پایین‌تر از افراد مورد مطالعه بود (p<۰/۰۵). علاوه بر این، افزایش بیان ژن miR-378 در گروه مبتلا به ناباروری در مقایسه با افراد سالم اختلاف معنی داری نداشت (p>۰/۰۵).

بحث

بر اساس تحقیقات، اسپرماتوژنز دارای طیف گسترده‌ای از RNAها، از جمله miRNها می‌باشد که از اسپرم‌های پستانداران به اووسیت منتقل می‌شود (۱۲). بنابراین miRNAها نقش بسیار مهمی در اسپرماتوژنز و در فرآیند لقاح تخمک دارند و حتی ممکن است بر فنوتیپ فرزندان تأثیر بگذارند (۱۵، ۱۶).

اسپرماتوژنز فرآیند تولید اسپرماتوئید بالغ یا اسپرم از سلول‌های زایای اسپرماتوگونی دیپلوئید است. در پستانداران، فرآیند اسپرماتوژنز به‌شدت توسط مکانیسم‌های رونویسی و همچنین پس از رونویسی تنظیم می‌شود (۱۵).

میکروRMAها تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر رشد اسپرم‌ها در فرآیند اسپرماتوژنز، به‌خصوص در سلول‌های زایا و سلول‌های سوماتیک دارند. قابل تصور است که هرگونه بی‌نظمی در الگوهای بیان میکروRNA به‌طور قابل توجهی بر مسیر اسپرماتوژنز تأثیر می‌گذارد و در نهایت منجر به چندین نوع ناهنجاری‌های تولید مثلی می‌شود (۱۵، ۱۷).

مطالعه بائو و همکاران (۲۰۱۲) در مورد نقش میکروRNA در تنظیم بیان ژن‌های میوتیک و پست میوتیک در طول اسپرماتوژنز نشان داد که miR-449a و miR-449b به شدت در اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها نقش تنظیمی مثبت دارند (۱۸).

همچنین miRهای دیگر مانند miR-469 و miR-184 در اسپرماتوژنز مورد مطالعه قرار گرفتند و نقش آنها در مراحل مختلف اسپرماتوژنز به شدت مورد توجه است (۱۹).

قابل ذکر است که miR-372 و miR-373 به عنوان یک فاکتور شروع کننده تومورزایی در سلول‌های جنسی شناخته شده‌اند که به‌عنوان یک عنصر در تومور سلول‌های جنسی بیضه عمل می‌کنند (۲۰).

در مطالعه حاضر، در نمونه بیماران نابارور بیان ژن miR-378 مورد ارزیابی قرار گرفت که بر اساس نتایج، بیان ژن miR-378 افزایش بیان معنی‌داری در گروه مبتلا به ناباروری در مقایسه با افراد سالم نداشت. کوآنزیم Q10 یک مولکول آنتی‌اکسیدانی است که جزء زنجیره تنفسی می‌باشد. به تازگی مطالعات متعددی انجام شده است تا نقش مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی را در مردان نابارور بر پارامترهای سمینال بررسی کند.

در مطالعه حاضر تیتر کوآنزیم Q10 به‌صورت خطی و معنی‌داری در گروه مبتلا به ناباروری پایین‌تر از افراد سالم مورد مطالعه بود. در همین راستا مطالعه صفری‌نژاد و همکاران (۲۰۱۲) با هدف بررسی اثر کاهش کوآنزیم Q10 بر روی پارامترهای مایع سمینال نیز به همین نتیجه رسیدند (۲۱). همچنین در مطالعه گرانبرگ و همکاران (۲۰۰۵)، کوآنزیم Q10 به‌عنوان مکمل در مردان نابارور مبتلا به آستنواسپرمی ایدیوپاتیک بررسی شد و به این نتیجه رسیدند که سطح کوآنزیم Q10 در پلاسمای منی و در سلول‌های اسپرم پس از درمان به‌طور قابل توجهی افزایش یافت (۱۳).

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی در این مطالعه تغییر کوآنزیم Q10 در سرم بیماران نسبت به نمونه‌های کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین در افراد نابارور، بیان ژن miR-378 نسبت به افراد سالم افزایش داشت که این افزایش از نظر آماری معنی‌داری نبود. این موارد در اسپرماتوژنز در ناباروری مردان می‌توانند مؤثر باشند. البته شاید بتوان با افزایش تعداد نمونه به نتایج بهتری دست یافت.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات استادان محترم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم زیستی، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Lamb JC, Foster PM. Physiology and toxicology of male reproduction: Elsevier; 2016.
2. Herrera AM, Brennan PL, Cohn MJ. Development of avian external genitalia: interspecific differences and sexual differentiation of the male and female phallus. Sex Dev 2015; 9(1):43-52.
3. Hashemzadeh M, Tagizadeh Z, Behboodi Mogadam Z, Montazeri A, Rashidi B, Shams M, et al. Relationship between obesity and sperm parameters in men with idiopathic infertility. Iran J Obstet Gynecol Infertil 2018; 21(9):35-41.
4. Mori H, Christensen AK. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. J Cell Biol 1980; 84(2):340-354.
5. Clyde HR, Walsh PC, English RW. Elevated plasma testosterone and gonadotropin levels in infertile males with hyperthyroidism. Fertil Steril 1976; 27(6):662-666.
6. Nayak SR, Wakim AN. Random-start gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist-treated cycles with GnRH agonist trigger for fertility preservation. Fertil Steril 2011; 96(1):e51-4.
7. Breznik R, Borko E. Effectiveness of antiestrogens in infertile men. Arch Androl 1993; 31(1):43-8.
8. Mifsud A, Sim CK, Boettger-Tong H, Moreira S, Lamb DJ, Lipshultz LI, et al. Trinucleotide (CAG) repeat polymorphisms in the androgen receptor gene: molecular markers of risk for male infertility. Fertil Steril 2001; 75(2):275-81.
9. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature 2005; 435(7043):834-838.
10. Yan N, Lu Y, Sun H, Tao D, Zhang S, Liu W, et al. A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues. Reproduction 2007; 134(1):73-79.
11. Gharghanipour S, Taebi M, Salehi P, Heidari-Beni M. Relationship between dietary antioxidant intake and semen analysis parameters. Iran J Obstet Gynecol Infertil 2018; 21(6):47-54.
12. Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. Fertil Steril 2006; 86(3):503-512.

13. Groneberg DA, Kindermann B, Althammer M, Klapper M, Vormann J, Littarru GP, et al. Coenzyme Q10 affects expression of genes involved in cell signalling, metabolism and transport in human CaCo-2 cells. Int J Biochem Cell Biol 2005; 37(6):1208-18.
14. Hulley SB. Designing clinical research: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
15. Lotti F, Maggi M. Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health. Hum Reprod Update 2015; 21(1):56-83.
16. Seyed Hashemi E, Dargahi R, Entezari M, Hosseini Asl SS. Expression of miR200a as a biomarker in women with preterm delivery. Iran J Obstet Gynecol Infertil 2019; 22(7):39-46.
17. Hayashi K, Chuva de Sousa Lopes SM, Kaneda M, Tang F, Hajkova P, Lao K, et al. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. PloS one 2008; 3(3):e1738.
18. Bao J, Li D, Wang L, Wu J, Hu Y, Wang Z, et al. MicroRNA-449 and microRNA-34b/c function redundantly in murine testes by targeting E2F transcription factor-retinoblastoma protein (E2F-pRb) pathway. J Biol Chem 2012; 287(26):21686-98.
19. Dai L, Tsai-Morris CH, Sato H, Villar J, Kang JH, Zhang J, et al. Testis-specific miRNA-469 up-regulated in gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25)-null mice silences transition protein 2 and protamine 2 messages at sites within coding region implications of its role in germ cell development. J Biol Chem 2011; 286(52):44306-18.
20. Voorhoeve PM, Le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, et al. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. Cell 2006; 124(6):1169-81.
21. Safarinejad MR, Safarinejad S, Shafiei N, Safarinejad S. Effects of the reduced form of coenzyme Q10 (ubiquinol) on semen parameters in men with idiopathic infertility: a double-blind, placebo controlled, randomized study. The Journal of Urology 2012; 188(2):526-31