

عدم ارتباط دو جهش $G>C$ ۳۶۸ و $C>T$ ۳۸۶ ژن $NR5A1$ با ناباروری مردان

Lack of association between two 367 G>C and 386 C>T mutations in NR5A1 gene with male infertility

مستانه تیموری^{۱*}، سیدغلامعلی جورسرای^۲، محمد کریمیان^۳، اباصلت حسینزاده کلاگر^{۳*}

۱- دانشجوی کاشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان

۲- دانشیار، مرکز تحقیقات باروری و ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی بابل

۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشجوی دکتری، استاد، دانشگاه مازندران، بابلسر

Teimouri M^{1,3}, Jorsarayi SGA², Karimian M³, Hosseinzadeh Colagar A^{3*}

1. MSc Student, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran

2. Associate Professor, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

3. MSc Student, PhD Student, Professor, University of Mazandaran, Babolsar

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ahcolagar@umz.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۶ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۲۵)

چکیده

ژن $NR5A1$ که تنظیم کننده رونویسی از ژن های درگیر در محور استروئیدوژنیک هیپوتالاموس-هیپوفیز است، عضوی از خانواده رسپتورهای هسته ای می باشد. برخی از موتاسیون های موجود در این ژن از قبیل $c.712G>A$ ، $c.634G>A$ ، $c.571C>T$ و $c.392C>T$ می تواند با اختلالات اسپرمزایی ارتباط داشته باشد. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط ترانسورژن $367G>C$ و ترانزیشن $386C>T$ ژن $NR5A1$ با ناباروری در مردان است. در این مطالعه مورد-شاهدی، از ۷۰ مرد نابارور و ۷۵ مرد بارور، به عنوان گروه کنترل، نمونه خون تهیه شد. پس از استخراج DNA ژنومی افراد بیمار و کنترل، ژنوتیپ $367G>C$ و $386C>T$ موجود در ژن $NR5A1$ با کمک RFLP-PCR تعیین شد. در مورد جابجایی $367G>C$ ، آنالیز آماری نشان داد که هیچ یک از ژنوتیپ های GC ($P=0/43$ ، $OR=0/46-6/26$ ، $CI=0/46-6/26$ ، $P=0/43$) و یا CC ($P=0/46$ ، $OR=3/38$ و $CI=0/13-84/41$) با ناباروری ایدیوپاتیک مردان ارتباط ندارد. آلل C هم فاقد ارتباط با ناباروری ($P=0/20$ ، $OR=2/21$ و $CI=0/65-7/52$) بود. اما در مورد جایگاه $386C>T$ ، فقط یک نمونه در گروه شاهد دارای ژنوتیپ CT بوده و بقیه نمونه ها ژنوتیپ CC داشتند. بنابراین ژنوتیپ CT فاقد ارتباط با ناباروری مردان ($P=0/52$ ، $OR=8/79$) مارکر مناسبی جهت استعداد ژنتیکی ابتلا به ناباروری ناشناخته باشد و بنابراین نیاز به بررسی رابطه سایر جهش های تک نوکلئوتیدی این ژن با ناباروری مردان است.

واژه های کلیدی

ژن $NR5A1$

موتاسیون

ناباروری مردان

PCR-RFLP

مقدمه

دلایل ناباروری در مردان، اغلب ناشناخته است. ناباروری در مردانی که سابقه خانوادگی ناباروری دارند، عمدتاً به علت موتاسیون‌های اتوزوم غالب یا مغلوب می‌باشد (Cantu et al. 1981; Tuerlings et al. 2002; Gianotten et al. 2004). ناهنجاری‌های کروموزومی (مانند سندرم کلاین فلتز) و حذف-های بازوی بلند کروموزوم Y، در ۱۰ درصد مردان نابارور دیده می‌شود (McLachlan et al. 2010). اگرچه مطالعات روی جوندگان نشان می‌دهد که ژن‌های زیادی در ناباروری مردان نقش دارد اما نقش این ژن‌ها به‌خوبی در ناباروری مردان در انسان مشخص نیست. از ژن‌های مهمی که نقش آن‌ها در ناباروری مردان مشخص شد می‌توان به *AURKC* (مرتبط با اختلالات بزرگی سر و ایجاد چند فلاژلا در اسپرم)، *SPATA16* (مرتبط با گلوبوزوسپرمیا)، *CATSPER1* (مرتبط با اختلالات مغلوب در ناباروری)، داینین (مرتبط با اختلالات حرکتی اسپرم)، *MTHFR* (مرتبط با الیگواسپرمیا) و ژن *NR5A1* اشاره کرد (Bashamboo et al. 2010; O'Flynn et al. 2010; Karimian and Colagar, 2014; Nikzad et al. 2015).

ژن *NR5A1*، به‌عنوان یک عضو از خانواده رسپتورهای هسته‌ای، نقش تنظیم‌کننده رونویسی ژن‌های درگیر در محور استروئیدوژنیک هیپوتالاموس-هیپوفیز را دارد (Morohashi et al. 1994; Luo et al. 1992). این ژن که همچنین تحت عنوان فاکتور استروئیدوژنیک ۱ نیز نام‌گذاری شد دارای یک دمین^۱ اتصال به DNA، شامل انگشت روی^۲، یک ناحیه لولای انعطاف‌پذیر^۳، یک دامنه اتصال به لیگاند و دو دامنه عملکردی می‌باشد (Krylova et al. 2010; Hoivik et al. 2009; Sablin et al. 2005). مولکول *NR5A1* در سلول‌های سرتولی و لیدیگ بیضه در حال تکوین، سلول‌های سرتولی قبل از بلوغ، بیضه بزرگسالان، انواع متعدد سلول‌های جنینی و تخمدان بالغ بیان می‌شود و به صورت مونومر به DNA متصل می‌شود (Ikeda et al. 1994; Morohashi et al. 1999; Hanley et al. 1994). این مولکول با تنظیم مثبت *SOX9*^۴

و هورمون آنتی مولرین^۵ (AMH) در تمایز بیضه پستانداران نقش دارد (Lin and Achermann, 2008; Sekido et al. 2008). مولکول *NR5A1*، بیان بسیاری از فاکتورهای درگیر در متابولیسم کلسترول و بیوستز هورمون‌های استروئیدی مثل HMG-CoA ردوکتاز^۶، پروتئین تنظیم‌کننده استروئیدوژنیک (StAR)^۷، ۳-بی-هیدروکسی استروئید دهیدروژناز (3bHSD)^۸ و چندین سیتوکروم P450 استروئید هیدروکسیلاز را تعدیل می‌کند (Lin and Achermann, 2008). جهش در ژن *NR5A1* با طیف وسیعی از فنوتیپ‌ها، شامل هیپرید گنادی و ناکفایتی تخمدانی اولیه نیز ارتباط دارد (Lin and Achermann, 2008; Sekido et al. 2008; Lourenco et al., 2009). ژن *NR5A1* دارای دو جهش مهم $3'8G>C$ و $3'8C>T$ می‌باشد. هر دوی این جابجایی‌ها در ناحیه اگزونی *NR5A1* دیده می‌شود (شکل ۱A). ترانسورژن^۹ $3'8G>C$ سبب جابجایی آلانین به جای گلیسین در جایگاه ۱۲۳ پروتئین (Gly123Ala) می‌شود در حالی که ترانسورژن $3'8G>C$ سبب جایگزینی اسید آمینه لوسین به‌جای پرولین در جایگاه ۱۲۹ پروتئین *NR5A1* (Pro129Leu) می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط این دو جابجایی در ژن *NR5A1* با ناباروری ایدیوپاتیک مردان است.

مواد و روش‌ها

گروه بیمار و شاهد

در این مطالعه از تعداد ۱۴۵ مرد مراجعه‌کننده به مرکز IVF بیمارستان فاطمه الزهرا (س) بابل ۷۰ مرد نابارور با میانگین سنی $31/98 \pm 5/54$ به‌عنوان گروه بیمار و ۷۵ مرد سالم با میانگین سنی $35/75 \pm 5/21$ به‌عنوان گروه شاهد انتخاب شد. از هریک از افراد سالم و بیمار مقدار دو میلی‌لیتر خون در داخل تیوب‌های استریل حاوی ضدانعقاد سیترات سدیم، جمع‌آوری و در 20°C - ذخیره شد. همه افراد مورد مطالعه، فرم رضایت آگاهانه مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بابل را امضاء کردند.

⁵ Anti Mullerian Hormone

⁶ 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase

⁷ Steroidogenic acute regulatory protein

⁸ 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase

⁹ Transversion

¹ Domain

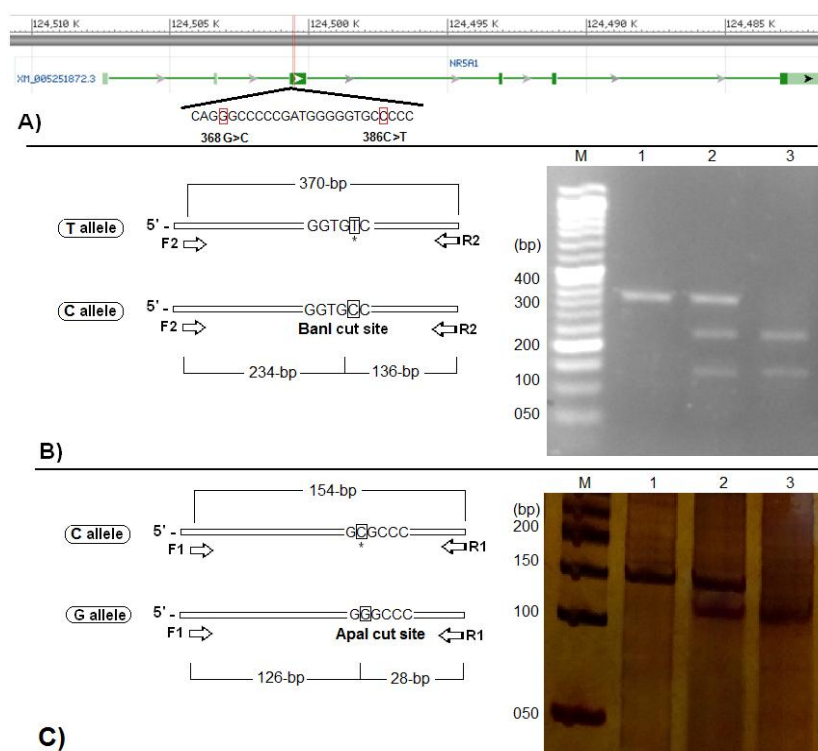
² Zinc fingers

³ Flexible hinge region

⁴ Sex determining region Y-box9

واشرشت 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال 55°C برای $G>C$ و $3'8T>C$ و 55°C برای $3'8G>C$ به مدت ۳۰ ثانیه و دمای بسط 72°C به مدت ۴۵ ثانیه و بسط نهایی 72°C به مدت ۴ دقیقه انجام شد. طول محصولات PCR در جدول ۱ ارائه شد. مطالعه ژنوتیپ موتانت‌های $3'8G>C$ و $3'8T>C$ ، با استفاده از تکنیک PCR-RFLP و مطابق جدول ۱ انجام شد. برای این منظور محصولات PCR آغازگر F1/R1 (حاوی $3'8G>C$) و F2/R2 (حاوی $3'8T>C$) به ترتیب با آنزیم *ApaI* و *BanI* مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. به منظور تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها، الگوی هضم آنزیمی برای موتاسیون $3'8T>C$ در ژل آگارز دو درصد و برای موتاسیون $3'8G>C$ در ژل پلی اکریل آمید هشت درصد بررسی شد. همچنین ژل‌های آگارز با اتیدیوم برمایند ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و ژل پلی اکریل آمید با نیترا ت نقره به روش عمومی رنگ‌آمیزی شدند (Sambrook and Russell, 2001).

استخراج DNA و PCR-RFLP استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت DNG-plus™ (SinaClon; Iran) انجام شد و کیفیت و غلظت DNA استخراج شده توسط اسپکتروفتومتری به روش عمومی (Sambrook and Russell, 2001) انجام شد. برای طراحی آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر ناحیه حاوی جابجایی‌های $3'8G>C$ و $3'8T>C$ ژن *NR5A1*، ابتدا توالی کامل ژن از بانک ژنی NCBI بدست آمد (Accession No: NC_000009) و آغازگرها توسط نرم افزار Oligo6 طراحی و توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) سنتز شدند (جدول ۱). جهت تکثیر ناحیه حاوی $3'8G>C$ و $3'8T>C$ PCR در حجم ۲۵ μl شامل ۰/۵ μM از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت؛ ۰/۲ μM مخلوط dNTP؛ ۱/۵ mM محلول MgCl_2 ؛ نانوگرم DNA الگو و ۰/۲ U آنزیم *Taq* پلیمراز (سینا ژن) انجام شد. واکنش PCR توسط دستگاه ترموسایکلر (peqSTAR: German) و با شرایط دمای واکش واکش اولیه 94°C به مدت ۵ دقیقه همراه با ۳۵ چرخه تکراری با دمای



شکل ۱- نقشه ژن *NR5A1*، شماتیک و الگوی هضم آنزیمی در ژل آگارز و پلی اکریل آمید. (A) نقشه ژنی *NR5A1* که دارای ۹ اگزون می‌باشد و جهش‌های $3'8G>C$ و $3'8T>C$ روی اگزون شماره ۳ قرار دارند؛ (B) شماتیک و الگوی ژنوتیپی $3'8T>C$ در ژل آگارز. ستون (M) مارکر ۵۰ جفت بازی؛ ستون (۱) محصول PCR؛ ستون (۲) ژنوتیپ CT؛ ستون (۳) ژنوتیپ CC؛ (C) شماتیک و الگوی ژنوتیپی $3'8G>C$ در ژل پلی اکریل آمید. ستون (M) مارکر ۵۰ جفت بازی؛ ستون (۱) ژنوتیپ CC؛ ستون (۲) ژنوتیپ GC؛ ستون (۳) ژنوتیپ GG.

جدول ۱- توالی آغازگرها، طول قطعات تکثیر شده، آنزیم‌های محدودکننده و محصولات هضم آنزیمی

SNP	نام آغازگر	توالی آغازگر (۵'-۳')	محصولات PCR به جفت باز	اندازه	طول محصولات هضم آنزیمی (bp)
$3'8G>C$	F1	5'- CGGGCCAATGGCTTCAAGCTGGAG	آنزیم برشی	محصولات	ژنوتیپ
	R1	5'- CAAAGTCGCCCAGTGGCCCAGC	ژنوتیپ	به	ژنوتیپ
$3'8C>T$	F2	5'- GAGAGAGCGGTCAGATTGTTTGG	ژنوتیپ وحشی	جفت باز	هتروزیگوت
	R2	5'- CGGCCATGGGCAGTGCTGGGGC			
			<i>ApaI</i>	۱۵۴	۲۸,۱۲۶,۱۵۴
			<i>BanI</i>	۳۷۰	۱۳۶,۲۳۴,۳۷۰

تجزیه و تحلیل آماری

برای مقایسه توزیع فراوانی آللی و ژنوتیپی جهش‌های $G>C$ و $C>T$ در گروه کنترل و بیمار از تست مربع کای استفاده شد. از OR برای تعیین ارتباط نسبی واریته‌های مورد مطالعه با ناباروری استفاده شد. تجزیه داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد.

نتایج

تعیین ژنوتیپ $3'8G>C$ به وسیله روش PCR-RFLP و با کمک آنزیم *ApaI* انجام شد. پس از هضم آنزیمی قطعه ۱۵۴ جفت بازی، نمونه‌های با ژنوتیپ وحشی (GG) دارای قطعات ۱۲۶ و ۲۸ جفت بازی بودند درحالی‌که نمونه‌های موتانت (CC) فقط دارای یک باند با ۱۵۴ جفت باز و نمونه‌های هتروزیگوت (GC) دارای سه باند ۱۵۴، ۱۲۶ و ۲۸ جفت بازی روی ژل آکریل آمید بودند (شکل ۱B). جهت تعیین ژنوتیپ $3'8C>T$ از آنزیم *BanI* استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۱C نشان داده شد، نمونه‌های با ژنوتیپ CC، دارای دو باند ۲۳۴ و ۱۳۶ جفت بازی بوده و فقط یک نمونه هتروزیگوت دارای ۳ باند ۱۳۶، ۲۳۴ و ۳۷۰ جفت بازی روی ژل آگارز بود در حالی‌که نمونه فاقد برش با ژنوتیپ TT، یافت نشد.

فراوانی ژنوتیپ‌های $3'8AGC$ ، $3'8AGG$ و $3'8ACC$ در گروه کنترل به ترتیب برابر با ۹۴/۶۷ درصد، ۵۰/۳۳ درصد و صفر درصد بود درحالی‌که این فراوانی‌ها در افراد نابارور برابر ۹۰/۰۰، ۸۰/۵۷ و ۱۰/۴۳ درصد بود (جدول ۲). آنالیز آماری نشان داد که هیچ‌یک از ژنوتیپ‌های GC ($P=۰/۴۳$ ، $CI=۰/۴۶-۶/۲۶$) و CC ($P=۰/۴۶$ ، $CI=۰/۱۳-۸۴/۴۱$) و یا $OR=۱/۶۹$ و $OR=۳/۳۸$ با ناباروری مردان ارتباط ندارد. همچنین حاملین آلل

C ($GC+CC$) هم در معرض ریسک ابتلا به ناباروری نبودند ($P=۰/۳۰$ ، $CI=۰/۵۵-۷/۰۵$ و $OR=۱/۹۷$) مقایسه فراوانی آللی بین گروه کنترل و بیمار هم نشان داد که این آلل فاقد ارتباط با ناباروری می‌باشد ($P=۰/۲۰$ ، $CI=۰/۶۵-۷/۵۲$ و $OR=۲/۲۱$). در مورد جایگاه $3'8C>T$ ، فقط یک نمونه در گروه کنترل دارای ژنوتیپ CT بود و بقیه نمونه‌ها دارای ژنوتیپ CC بودند. بنابراین ژنوتیپ CT ($P=۰/۵۲$ ، $CI=۰/۰۱-۸/۷۹$) و آلل T ($P=۰/۵۳$ ، $CI=۰/۰۱-۸/۷۸$) و $OR=۰/۳۵$ فاقد ارتباط با ناباروری مردان بود.

بحث

ژن‌های متعددی هستند که پروتئین کد شده توسط آن‌ها می‌تواند در تکوین گنادها نقش اساسی داشته باشد. از جمله این ژن‌ها می‌توان به *DAX1*، *WT1*، *WNT4*، *SOX9*، *NR5A1* و *SRY* اشاره کرد. پروتئین *NR5A1* در کنترل تکوین جنسیتی در دوران جنینی و بلوغ نقش دارد. این پروتئین یک فاکتور رونویسی درون سلولی است که توسط ژن *NR5A1* کد می‌شود. پروتئین SF1 در دوران جنینی به همراه پروتئین SRY (Sex-determining region Y) کمپلکس رونویسی جهت افزایش بیان *SOX9* تشکیل می‌دهد (Sekido et al. 2008). محصول ژن *SRY* که باعث تمایز سلول‌های پیش‌ساز به سلول‌های سرتولی می‌شود دارای دمین اتصال (HMG)-box می‌باشد که از این طریق به DNA متصل می‌شود (Koopman et al. 1991). ژن‌های خانواده SOX هم دارای همین دمین (HMG)-box می‌باشند (Sekido et al. 2008). جایگاه‌های اتصال پروتئین‌های SRY و SF1 به ناحیه تنظیمی ژن *SOX9* نزدیک به هم می‌باشد. بنابراین این دو فاکتور رونویسی در مجاورت هم قرار گرفته و باعث افزایش بیان *SOX9* می‌شوند (McElreavey et al. 1993). پس از خاموشی ژن *SRY*، بیان ژن

SOX9 به‌وسیله فاکتورهای مانند SF1 در سلول‌های سرتولی بالا باقی می‌ماند و باعث تمایز سلول‌های سرتولی می‌شوند (De Santa Barbara et al. 1998). همچنین پروتئین SOX9 به همراه SF1 یک کمپلکس رونویسی برای ژن‌های پایین دست از جمله هورمون آنتی مولرین تشکیل می‌دهد (Arango et al. 1999). هورمون آنتی مولرین به نوبه خود باعث مهار تکوین مجرای مولرین در جنس نر می‌شود (Behringer 1994). بنابراین پروتئین SF1 بوسیله برهم‌کنش با SOX9 و SRY نقش‌های کلیدی در تکوین گنادهای نر و در عملکردهای بعدی آن‌ها دارد. پس هر نوع تغییر در ژن *NR5A1* می‌تواند تکوین گنادهای نر و سیستم تولیدمثلی مردان را تحت تأثیر قرار دهد. تا به امروز مطالعات اندکی روی ارتباط ژن *NR5A1* با ناباروری در مردان انجام شده است. موتاسیون‌های بدمعنی^۱ در ژن *NR5A1* قبلاً به‌عنوان فاکتوری پرخطر در ابتلا به ناباروری در مردان گزارش شده است (Bashamboo et al. 2010). از آنجاکه ژن *NR5A1* در حرکت اسپرم دخیل می‌باشد، بنابراین در این مطالعه افراد نابارور که دچار اختلالات حرکتی اسپرم (آستنواسپرم) بودند انتخاب شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که دو جهش $C>G$ ۳۶۸ و $T>C$ ۳۸۶ ژن *NR5A1* با آستنواسپرمی در مردان ارتباط ندارد. همچنین نتایج نشان داد که فراوانی این جهش‌ها در جمعیت مورد مطالعه ما بسیار پایین می‌باشد. به‌خصوص در مورد جهش $T>C$ ۳۸۶، که فقط یک نمونه در گروه کنترل دارای ژنوتیپ CT بود و بقیه نمونه‌ها دارای ژنوتیپ CC بودند. مطالعه Bashamboo et al. (2010) نشان داد که ژن *NR5A1* با بسیاری از اختلالات اسپرمی با دلایل ناشناخته ارتباط دارد. آن‌ها همچنین نشان دادند که افراد آزوواسپرم مورد مطالعه آن‌ها با خطر اختلالات اندوکراین هم مواجه هستند. حدود ۱۵-۱۲ درصد افراد مورد مطالعه آن‌ها سطح تستوسترون پایین و LH بالایی داشتند. گروه عمده‌ای از این افراد دچار موتاسیون در ژن *NR5A1* بودند. موتاسیون‌هایی که این محققین گزارش کردند، در ناحیه لولا و یا ناحیه اتصال به لیگاند پروتئین واقع شد. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که $C>G$ ۳۶۸ و $T>C$ ۳۸۶ در نواحی مرکزی و شمالی آفریقا وجود دارد. از طرفی مطالعه Lourenco et al. (2009) هم نشان داد که این موتاسیون-

¹ Missense

ها در یک دختر بومی غرب آفریقا وجود دارد. این مسئله نشان می‌دهد که فراوانی این موتاسیون‌ها، در جمعیت‌های غیر آفریقایی، مانند جمعیت قفقازی و یا آسیایی کمتر است. فراوانی این جهش‌ها در افراد با سن بالاتر، بیشتر بود. اکثراً افراد گروه نابارور که دارای این جهش‌ها بودند، سن بالایی داشتند. بنابراین به‌نظر می‌رسد که افراد دارای این جهش با افزایش سن‌شان بیشتر در معرض ابتلا به ناباروری قرار گیرند. بنابراین سن به‌عنوان یک فاکتور محیطی اصلی در نظر گرفته می‌شود (Bashamboo et al. 2010). اما فقدان این جهش‌ها در گروه کنترل نشان داد که این جهش‌ها دارای فراوانی پایینی در جمعیت می‌باشند (Bashamboo et al. 2010). بر خلاف این دو موتاسیون، واریته Gly146Ala (rs1110061) رایج‌تر از بقیه می‌باشد. در مطالعه‌ای بر روی ۴۸۸ مرد نابارور برای غربالگری موتاسیون‌های *NR5A1* مشخص شد که سه موتاسیون بدمعنی Gly165Arg، Asp257Asn و Ile323Thr در مردان آزوواسپرم، کریپتواسپرم و لیگواسپرم یافت شد (Röpke et al. 2013). این موتاسیون‌ها نیز در ناحیه لولایی (آمینواسیدهای ۲۲۵-۹۵) و اتصال به لیگاند پروتئین بودند. موتاسیون Gly165Arg در ناحیه لولایی و موتاسیون‌های Asp257Asn و Ile323Thr در ناحیه اتصال به لیگاند پروتئین یافت شد. (Röpke et al. 2013). فراوانی موتاسیون‌های مذکور را در مردان نابارور، حدود یک درصد گزارش کردند در حالی که در مطالعه دیگر موتاسیون‌های مورد بررسی (Gly123Ala و Pro129Leu) در مردان نابارور حدود ۴ درصد گزارش شد (Bashamboo et al. 2010). علت اختلافات می‌تواند به دلیل اختلافات نژادی، جغرافیایی و ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه باشد. (Röpke et al. 2013). ۱۰ موتاسیون موجود در ژن *NR5A1* را در افراد نابارور بررسی کردند و نشان دادند همه موتاسیون‌هایی که آن‌ها بررسی کردند از نوع بدمعنی بوده که یا در ناحیه اتصال به لیگاند و یا ناحیه لولایی پروتئین وجود داشت. از میان ۱۰ موتاسیون، فقط موتاسیون $C>G$ 437 دارای فراوانی بالایی در جمعیت بود. البته فراوانی این جهش به طور معنی‌داری در افراد نابارور هم بالا بود (Röpke et al. 2013).

(Bashamboo et al. 2010). هم فراوانی این موتاسیون‌ها را بسیار پایین گزارش کردند. مطالعه پلی‌مورفیسم‌های با فراوانی زیاد

مرسوم‌تر می‌باشد اما محققان، موتاسیون‌های با فراوانی کم را هم مطالعه می‌کنند. به‌طور مثال Tu'ttelmann et al. (2009) دو جهش نادر $c.54G>A$ و $c.102G>T$ در ژن پروتامین را در افراد نابارور بررسی کردند. همچنین گروه دیگری از محققان موتاسیون‌های موجود در ژن *CFTR* را بررسی کردند (Meschede et al. 1997). در مطالعه حاضر، دو موتاسیون نادر ژن *NR5A1* بررسی شد زیرا (۱) تاکنون در جمعیت مردان ایرانی، چنین مطالعه‌ای انجام نشده بود و فراوانی آن‌ها در جمعیت مردان ایرانی نامشخص بود؛ (۲) این جهش‌ها در ناحیه کدکننده ژن قرار دارد و باعث جایگزینی اسید آمینه می‌شوند و از طرفی جایگاه این موتاسیون‌ها در نزدیکی مناطق حساس (در ناحیه لولایی و ناحیه اتصال به لیگاند) پروتئین *NR5A1* قرار گرفته، بنابراین می‌تواند اثرات زیادی بر ساختار و عملکرد پروتئین داشته باشد.

ارتباط موتاسیون‌های ژن *NR5A1* با اختلالات اسپرم‌زایی توسط یک‌سری از مکانیسم‌های مولکولی دیگری نیز توجیه شد از جمله اینکه موش‌هایی که ژن *NR5A1* در سلول‌های لیدیگ آن‌ها غیر فعال شده بود، دارای بیضه‌های هایپوپلاستیک بوده، توبول‌های سمینیفروس آن‌ها مسدود و اسپرماتوگونیای به اسپرم بالغ تبدیل نمی‌شد و بیان ژن‌های *Cyp11a* و *StAR* (دو ژن کلیدی در

بیوسنتز تستوسترون) نیز در این موش‌ها کاهش یافت (Jeyasuria et al. 2004). همچنین در مطالعه دیگر سطح بیان *NR5A1* در بافت گنادی مردان آزواسپرم با افزایش غلظت تستوسترون سرم ارتباط مثبتی را نشان داد که نشان دهنده یک ارتباط مستقیم بین این دو فاکتور است (Kojima et al. 2006). در موش‌های فاقد ژن‌های *NR5A1* و اختلالاتی همچون نارسایی در هیپوفیز قدامی که منجر به سطوح پایین LH و FSH، هایپوگنادیسم، کاهش تعداد سلول‌های لیدیگ، فقدان اسپرماتید بالغ و در نتیجه ابتلا به ناباروری گزارش شد (Zhao et al. 2001)، که بیانگر نقش اساسی *NR5A1* در سیستم تولید مثلی مردان است.

ذکر این نکته مهم است که تمامی جهش‌هایی که منجر به تغییر احتمالی فعالیت ژن *NR5A1* می‌شوند در تحقیق حاضر مورد بررسی قرار نگرفت. لذا بررسی بیشتری در خصوص ژن *NR5A1* از جمله رابطه سایر SNP‌های موجود در پروتئین *NR5A1* با ناباروری مردان بایستی انجام شود. از سوی دیگر با توجه به چند عاملی بودن ناباروری مردان و نقش مؤثر عوامل ژنتیکی و محیطی مختلف در ایجاد آن، لازم است در مطالعات مربوط به این بیماری، سایر ژن‌ها و تأثیر متقابل آن‌ها بر یکدیگر نیز مورد بررسی قرار گیرند.

جدول ۲- فراوانی آللی و ژنوتیپی $C>3\text{AG}$ در گروه بیمار و سالم

ژنوتیپ/آل	تعداد و درصد		OR (95% CI)	P-value
	بارور (n=75)	نابارور (n=70)		
GG	71 (94/67%)	63 (90/00%)	-	-
GC	4 (5/33%)	6 (8/57%)	0.1/69 (0.46-6.26)	0.43
CC	0 (0/00%)	1 (1/43%)	3/38 (0.13-84/41)	0.46
GC+CC	4 (5/33%)	7 (10/00%)	1/97 (0.55-7/05)	0.30
G	146 (97/33%)	132 (94/29%)	-	-
C	4 (2/67%)	8 (5/71%)	2/21 (0.65-7/52)	0.20

منابع

- Arango NA, Lovell-Badge R, Behringer RR (1999) Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* 99:409-419.
- Bashamboo A, Ferraz-de-Souza B, Lourenço D, Lin L, Sebire NJ, Montjean D, Bignon-Topalovic J, Mandelbaum J, Siffroi JP, Christin-Maitre S, Radhakrishna U, Rouba H, Ravel C, Seeler J, Achermann JC, McElreavey K (2010) Human male infertility associated with mutations in *NR5A1* encoding steroidogenic factor 1. *American Journal of Human Genetics* 87:505-512.
- Cantú JM, Rivas F, Hernández-Jáuregui P, Díaz M, Cortés-Gallegos V, Vaca G, Velázquez A, Ibarra B (1981) Meiotic arrest at first spermatocyte level: a new inherited infertility disorder. *Human Genetics* 59:380-385.
- De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, Sudbeck P, Scherer G, Poulat F, Berta P (1998) Direct interaction of *SRY*-related protein *SOX9* and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Molecular and Cellular Biology* 18:6653-6665.
- Gianotten J, Westerveld GH, Leschot NJ, Tanck MW, Lilford RJ, Lombardi MP, van der Veen F (2004) Familial clustering of impaired spermatogenesis: no evidence for a common genetic inheritance pattern. *Human Reproduction* 19:71-76.
- Hanley NA, Ball SG, Clement-Jones M, Hagan DM, Strachan T, Lindsay S, Robson S, Ostrer H, Parker KL, Wilson DI (1999) Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mechanism of Development* 87:175-180.
- Hoivik EA, Lewis AE, Aumo L, Bakke M (2010) Molecular aspects of steroidogenic factor 1 (SF-1). *Molecular and Cellular Endocrinology* 315:27-39.
- Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, Parker KL (1994) Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Molecular Endocrinology* 8:654-662.
- Jeyasuria P, Ikeda Y, Jamin SP, Zhao L, De Rooij DG, Themmen AP, Behringer RR, Parker KL (2004) Cell-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function. *Molecular Endocrinology* 18:1610-1619.
- Karimian M, Colagar AH (2014) Association of C677T transition of the human methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene with male infertility. *Reproduction Fertility and Development*.
- Kojima Y, Sasaki S, Hayashi Y, Umemoto Y, Morohashi K, Kohri K (2006) Role of transcription factors *Ad4bp/SF-1* and *DAX-1* in steroidogenesis and spermatogenesis in human testicular development and idiopathic azoospermia. *International Journal of Urology* 13:785-793.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 351:117-121.
- Krylova IN, Sablin EP, Moore J, Xu RX, Waitt GM, MacKay JA, Juzumiene D, Bynum JM, Madauss K, Montana V, Lebedeva L, Suzawa M, Williams JD, Williams SP, Guy RK, Thornton JW, Fletterick RJ, Willson TM, Ingraham HA (2005) Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. *Cell* 120:343-355.
- Lin L, Achermann JC (2008) Steroidogenic factor-1 (SF-1, *Ad4BP*, *NR5A1*) and disorders of testis development. *Sexual Development* 2:200-209.
- Lourenço D, Brauner R, Lin L, De Perdigo A, Weryha G, Muresan M, Boudjenah R, Guerra-Junior G, Maciel-Guerra AT, Achermann JC, McElreavey K, Bashamboo A (2009) Mutations in *NR5A1* associated with ovarian insufficiency. *New England Journal of Medicine* 360:1200-1210.
- Luo X, Ikeda Y, Parker KL (1994) A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77:481-490.
- Meschede D, Dworniczak B, Behre HM, Kliesch S, Claustres M, Nieschlag E, Horst J (1997) *CFTR* gene mutations in men with bilateral ejaculatory-duct obstruction and anomalies of the seminal vesicles. *American Journal of Human Genetics* 61:1200-1202.
- McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M (1993) A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: *SRY* represses a negative regulator of male development. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90:3368-3372.
- McLachlan RI, O'Bryan MK (2010) State of the art for genetic testing of infertile men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95:1013-1024.
- Morohashi K, Honda S, Inomata Y, Handa H, Omura T (1992) A common trans-acting factor, *Ad4-binding protein*, to the promoters of steroidogenic P-450s. *Journal of Biological Chemistry* 267:17919-17913.
- Morohashi K, Iida H, Nomura M, Hatano O, Honda S, Tsukiyama T, Niwa O, Hara T, Takakusu A, Shibata Y, (1994) Functional difference between *Ad4BP* and *ELP*, and their distributions in steroidogenic tissues. *Molecular Endocrinology* 8:643-653.
- Nikzad H, Karimian M, Sareban K, Khoshshokhan M, Colagar AH (2015) *MTHFR-Ala222Val* and male infertility: a study in Iranian men, an updated meta-analysis and an in silico-analysis. *Reproductive biomedicine online* 31:668-680.
- O'Flynn O'Brien KL, Varghese AC, Agarwal A (2010) The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertility and Sterility* 93:1-12.
- Paliwal P, Sharma A, Birla S, Kriplani A, Khadgawat R, Sharma A (2011) Identification of novel *SRY* mutations and *SF1 (NR5A1)* changes in patients with pure gonadal dysgenesis and 46,XY karyotype. *Molecular Human Reproduction* 17:372-378.
- Röpke A, Tewes AC, Gromoll J, Kliesch S, Wieacker P, Tüttelmann F (2013) Comprehensive sequence analysis of the *NR5A1* gene encoding steroidogenic factor 1 in a large group of infertile males. *European Journal of Human Genetics* 21:1012-1015.

Sablin EP, Blind RD, Krylova IN, Ingraham JG, Cai F, Williams JD, Fletterick RJ, Ingraham HA (2009) Structure of SF-1 bound by different phospholipids: evidence for regulatory ligands. *Molecular Endocrinology* 23:25-34.

Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*; End r, editor: New York, Cold Spring Harbor Press. 1.116-1.118 p.

Sekido R, Lovell-Badge R (2008) Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 453:930-934.

Tuerlings JH, van Golde RJ, Oudakker AR, Yntema HG, Kremer JA (2002) Familial oligoasthenoteratozoospermia:

evidence of autosomal dominant inheritance with sexlimited expression. *Fertility and Sterility* 77:415-418.

Tüttelmann F, Krenková P, Römer S, Nestorovic AR, Ljubic M, Stambergová A, Macek M Jr, Macek M Sr, Nieschlag E, Gromoll J, Simoni M (2010) A common haplotype of protamine 1 and 2 genes is associated with higher sperm counts. *International Journal of Andrology* 33:e240-248.

Zhao L, Bakke M, Krimkevich Y, Cushman LJ, Parlow AF, Camper SA, Parker KL (2001) Steroidogenic factor 1 (SF1) is essential for pituitary gonadotrope function. *Development* 128:147-154.