

## Association the Study of between CGA rs6631A>T Gene Polymorphism with the Risk of Male Infertility

Samira Moradi (MSc)<sup>1</sup>, Saeid Ghorbian (PhD)<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

\* **Corresponding Author:** Saeid Ghorbian, Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran. Email: s\_ghorbian@iau-ahar.ac.ir

### Abstract

**Received:** 02/08/2019

**Accepted:** 09/10/2019

#### How to Cite this Article:

Moradi S, Ghorbian S. The Study of the Association between CGA rs6631A>T Gene Polymorphism with the Risk of Male Infertility. *Pajouhan Scientific Journal*. 2019; 18(1): 15-22. DOI: 10.52547/psj.18.1.15

**Background and Objective:** The CGA gene encodes alpha subunit of glycoprotein hormones that are involved in the fertility process. The aim of this study was to evaluate the association between glycoprotein hormones, alpha polypeptide (CGA) rs6631A> T gene polymorphism with the risk of men infertility with azoospermia or severe oligozoospermia.

**Materials and Methods:** This study was conducted in a case-control study on 200 blood samples consisting of 100 samples of severe oligozoospermia or azoospermia men and 100 blood samples of healthy men with normal fertility and lack of a family history of infertility. In this study, we used PCR-RFLP method to evaluate genotype frequencies of CGA polymorphism.

**Results:** The genotype frequencies of CGA gene polymorphism for AA, TA and TT was 27%, 51% and 22% and 24%, 47% and 27%, in control and case groups, respectively. There was no significant difference in genotype frequencies between two groups ( $P > 0.05$ ). In addition, there was no significant difference in allele frequency between two groups ( $P = 0.424$ ,  $OR = 0.852$ ,  $CI = 0.576-1.261$ ).

**Conclusion:** The results of this investigation showed that nucleotide change in CGA gene was not significantly associated with the risk of azoospermia or severe oligozoospermia; therefore, this polymorphism may not be a prognostic biomarker in male infertility.

**Keywords:** Gene Polymorphism; Azoospermia; Oligozoospermia; CGA Gene

## بررسی ارتباط بین چندشکلی rs6631A>T ژن CGA با خطر ناباروری مردان

سمیرا مرادی<sup>۱</sup>، سعید قربیان<sup>۱\*</sup> 

<sup>۱</sup> گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

\* نویسنده مسئول: سعید قربیان، گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران. ایمیل: s\_ghorbian@iau-ahar.ac.ir

### چکیده

**سابقه و هدف:** ژن CGA زیر واحد آلفا هورمون‌های گلیکوپروتئین را رمز می‌کند که در فرآیند باروری نقش دارند. هدف از این مطالعه ارزیابی ارتباط بین چندشکلی rs6631A>T ژن glycoprotein polypeptide hormones, alpha (CGA) با خطر ابتلا مردان به ناباروری ناشی از آژواسپرمی و یا الیگواسپرمی شدید بود.

**مواد و روش‌ها:** مطالعه‌ی حاضر در قالب یک بررسی مورد-شاهدی بر روی ۲۰۰ نمونه خونی متشکل از ۱۰۰ نمونه مردان الیگواسپرم شدید و یا آژواسپرم و ۱۰۰ نمونه خونی مردان سالم با باروری طبیعی و فاقد سوابق خانوادگی ناباروری انجام شد. در این مطالعه روش PCR-RFLP برای ارزیابی چندشکلی ژن CGA مورد استفاده قرار گرفت.

**یافته‌ها:** در گروه کنترل فراوانی ژنوتیپی برای چندشکلی ژن CGA برای ژنوتیپ‌های AA، TA و TT به ترتیب ۲۷٪، ۵۱٪ و ۲۲٪ و برای افراد بیمار به ترتیب ۲۴٪، ۴۷٪ و ۲۷٪ به دست آمد. اختلاف معناداری در فراوانی ژنوتیپی بین دو گروه نشان داده نشد ( $P > 0/05$ ). همچنین فراوانی آلی در بین دو گروه مورد ارزیابی اختلاف معناداری را نشان نداد ( $P = 0/424$ ,  $OR = 0/852$ ,  $CI = 0/576 - 1/261$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاضر نشان داد که تغییر نوکلئوتیدی در ژن CGA با خطر بروز الیگواسپرمی شدید و یا آژواسپرمی ارتباط معنی‌داری ندارد؛ بنابراین، این چندشکلی ممکن است به عنوان یک بیومارکر پیش‌آگهی دهنده در ناباروری مردان نقشی نداشته باشد.

**واژگان کلیدی:** چندشکلی ژن؛ آژواسپرمی؛ الیگواسپرمی؛ ژن CGA

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۵/۱۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۷/۱۷

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

### مقدمه

کمک باروری نظیر تلقیح داخل رحم (IUI) و یا لقاح خارج رحمی (IVF) جهت بارداری موفقیت‌آمیز می‌توانند استفاده کنند [۶]. در حالت آژواسپرمی، فرد تقریباً فاقد اسپرم در منی است که این حالت اغلب با شانس بسیار کم باروری و یا حتی عقیمی همراه می‌شود. آژواسپرمی به سه حالت پیش بیضه‌ای، بیضه‌ای و پس بیضه‌ای تقسیم‌بندی شده است که در دو حالت اول از نوع غیر انسدادی و حالت سوم از نوع انسدادی است. مطالعات نشان می‌دهد که ریز حذف‌ها در مردان با آژواسپرمی و یا الیگواسپرمی شدید شایع است [۷].

ژن glycoprotein hormones, alpha polypeptide (CGA) یا زیر واحد آلفای گونادوتروپین کوربونیکی نیز نامیده می‌شود که زیر واحد آلفا با طول ۱۱۶ ریشه‌های هورمون‌های گلیکوپروتئین را رمز می‌کند. این ژن بر روی کروموزوم 6q14-q21 قرار گرفته است [۸]. این زیر واحد ساختار

اختلالات ناباروری وابسته به یک عامل نیستند بلکه عوامل متعددی در آن دخالت دارند [۱]. علت ناباروری مردان تقریباً در ۴۰٪ از موارد قابل تشخیص خواهد بود و در ۶۰٪ از موارد علل پاتولوژیکی آن ناشناخته باقی مانده است. درمان ناباروری در مردان مشکل‌تر از زنان است به طور معمول عوامل ژنتیکی و محیطی دو عامل مهم و اصلی ناباروری در مردان به جز عوامل عفونی به شمار می‌روند [۲].

آژواسپرمی یا الیگواسپرمی شدید و بدون علت که به علت تغییرات ژنتیکی ایجاد می‌شود بخش مهمی از ناباروری مردان را تشکیل می‌دهند [۳، ۴]. در حالت الیگواسپرمی، تعداد اسپرم در هر میلی‌لیتر مایع منی کمتر از حالت نرمال است و به سه دسته الیگواسپرمی شدید، متوسط و الیگواسپرمی شدید تقسیم می‌شود [۵]. بسیاری از زوج‌هایی که با مشکل تعداد کم اسپرم جهت دستیابی به بارداری طبیعی مواجه‌اند از تکنیک‌هایی

ژن *CGA* (rs6631A>T) با خطر ابتلا مردان به آژواسپرمی/الیگواسپرمی شدید در افراد مراجعه‌کننده به بیمارستان الزهرا شهر تبریز انجام شد.

### مواد و روش‌ها

این مطالعه، در قالب یک بررسی مورد-شاهدی طراحی شد. تعیین حجم نمونه با استفاده از فرمول کوکران و با در نظر گرفتن  $P=0/1$ ، فاصله اطمینان ۹۵٪ و میزان خطای قابل تحمل ۰/۰۴ به تعداد ۱۰۰ فرد سالم دارای یک فرزند به عنوان گروه شاهد و ۱۰۰ فرد با الیگواسپرمی شدید و یا آژواسپرم با علت نامشخص برآورد شد. بر اساس معیارهای ورود و خروج از مطالعه بعد از اخذ فرم رضایتمندی، با رعایت کامل موازین اخلاقی و به صورت کاملاً محرمانه از بیماران مراجعه‌کننده به مرکز درمانی ناباروری و نازایی بیمارستان الزهرا شهر تبریز در طی سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۵ انجام گرفت. معیارهای گروه بیماران شامل کلیه افرادی است که در طی ارزیابی‌های انجام شده توسط متخصصین اورولوژی و نازایی برای علل ناباروری ناشی از الیگواسپرمی شدید و یا آژواسپرمی علتی ذکر نشده بود، انتخاب گردیدند.

معیارهای گروه شاهد شامل مردان سالمی که دارای فرزند، باروری طبیعی، فاقد سوابق خانوادگی ناباروری و از نظر تعداد اسپرم طبیعی بودند. از هرکدام از افراد مورد بررسی به میزان ۳ میلی‌لیتر نمونه خون محیطی در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA دریافت شد. کلیه نمونه‌ها تا قبل از استخراج DNA و انجام آزمایش‌ها تخصصی در دمای ۸۰- سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های خون محیطی افراد، از روش نمک اشباع استفاده گردید [۱۹]. به‌منظور حصول اطمینان از کمیت و کیفیت DNA ژنومی استخراج شده به ترتیب از روش‌های اسپکتروفتومتری UV و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۵٪ استفاده گردید. میانگین غلظت به دست آمده ۵۰۰ میلی‌گرم بر میکرو لیتر و (در محدوده ۸۰۰-۲۵۰ میلی‌گرم بر میکرو لیتر) و نسبت جذب نوری در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ برابر ۱/۸۹ به دست آمد. به منظور طراحی آغازگرهای اختصاصی، ابتدا توالی ژن هدف از دیتا بانک Ensemble استخراج و محل اتصال آغازگرها، جایگاه موتاسیون و محل برش آنزیمی مشخص شد. با استفاده از نرم‌افزار بیوانفورماتیکی 7 Oligo Analyzer آغازگرها طراحی و به جهت انتخاب آنزیم محدودالتر اختصاصی، از نرم‌افزار NEB cutter استفاده گردید (جدول ۱).

جهت تکثیر ناحیه واجد چندشکلی ژن *CGA* (rs6631)، از ۲ میکرو لیتر (۱۰۰ نانوگرم) DNA، ۱ میکرو لیتر (۱۰ پیکو مول) آغازگرهای مستقیم و معکوس، ۱۲ میکرو لیتر مستر میکس (Ampliqon Red 2x، دانمارک) و ۴ میکرو لیتر آب مقطر در حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتر ترکیب شدند. از دستگاه

محافظت‌شده‌ای دارد که با زیر واحدهای بتای گونادوتروپین‌ها و هورمون محرک تیروئید یک هورمون عملکردی را تشکیل می‌دهد که می‌تواند به گیرنده‌های مربوطه به *TSHR*، *FSHR* و *LHR* متصل شوند [۹]. این ژن واجد ۴ اگزون و ۳ اینترون است که طولی در حدود ۹/۴ کیلو باز دارد. رونویسی این ژن پروتئینی را رمز می‌کند که واجد ۲۴ اسیدآمینو است. پروتئین‌های *FSH*، *LH* و *CGA* همگی هتروداایمر هستند که در ساختار زیر واحد آلفا مشترک هستند ولی هرکدام زیر واحد بتا مجزایی دارند که در اتصال اختصاصی به گیرنده مربوطه نقش دارند [۱۰]. حذف ژن *CGA* در موش منجر به هیپوگنادیسم و هیپوتیروئیدیسم می‌شود. بروز این نوع فنوتیپ‌ها در اثر فقدان هورمون‌های لوتئینیزه‌کننده (*LH*)، هورمون محرک فولیکولی (*FSH*) و تیروتروپین (*TSH*) است. در فقدان زیر واحد آلفا، زیر واحد بتا به‌تنهایی قادر به ترشح نیست و موش فاقد زیر واحد آلفا نمی‌تواند هورمون‌های فعال *LH*، *TSH* و *FSH* را تولید و ترشح کند. در غیاب این هورمون‌ها گندهای جنسی و غدد تیروئید تکامل نمی‌یابند. سطح غیرطبیعی از این هورمون‌های خطر ناباروری را بسیار افزایش می‌دهد [۱۱]. نقش بیولوژیکی *LH* و *FSH* تحریک عملکرد تخمدان و بیضه از طریق تنظیم گامتوژنیز و سنتز هورمون استروئیدی در گندهاست، درحالی‌که *TSH* غده تیروئید را برای تولید و رهاسازی هورمون‌های تیروئید، *T4* و *T3* تحریک می‌کند [۱۲]. مولکول‌های *miRNAs* از طریق اتصال به ناحیه 3'-UTR در ژن‌های هدف، منجر به تنظیم آن می‌گردند. چندشکلی در جایگاه اتصال *miRNAs* در توانایی اتصال *miRNAs* به ژن هدف تأثیر خواهد گذاشت که در نتیجه بیان ژن تغییر و بیماری‌های مختلفی از جمله ناباروری مردان شکل خواهد گرفت [۱۳]. از طرفی، وجود چندشکلی‌های ژنتیکی در *pre-miRNA* یا *miRNA* های بالغ می‌تواند از طریق تغییر در میزان بیان و یا فرآیند بلوغ *miRNA*، برهمکنش بین *miRNA* با ژن هدف را تنظیم کنند [۱۴]. به دلیل نقش‌های متعدد مولکول‌های *miRNA* بر روی فرآیند اسپرم‌زایی، وجود هر نوع چندشکلی در ژن‌های مرتبط ممکن است با ناباروری مردان همراه گردد [۱۵، ۱۶]. Zhang و همکاران اولین گزارش مبنی بر ارتباط بین ناباروری مردان و چندشکلی جایگاه اتصال *miRNA* ارائه شده بود. نتایج آن‌ها نشان داد که جایگزینی T→A در چندشکلی (*rs6631A>T*) منجر به کاهش توانایی اتصال *miR-1302* به جایگاه خودش در ژن *CGA* می‌شود که پیامد آن افزایش بیان ژن *CGA* خواهد بود؛ بنابراین اولین ارتباط بین این چندشکلی با ناباروری مردان گزارش شد [۷]. تاکنون مطالعات اندکی در این رابطه صورت گرفته است که با توجه به تناقض در نتایج گزارش شده [۱۰، ۱۷، ۱۸] و از طرفی در جهت تأیید ارتباط این چندشکلی با ناباروری مردان در جمعیت شمال غرب ایران، مطالعه‌ای مبنی بر ارزیابی ارتباط بین چندشکلی

**جدول ۱:** توالی آغازگرها، اندازه محصولات تکثیری PCR و طول قطعات حاصل از برش هضم آنزیمی

نام آغازگرها	توالی آغازگرها	اندازه محصولات PCR	آنزیم محدودالایتر	طول قطعات محصول PCR بعد از هضم آنزیمی
CGA -F	5'-ATACCACTTTGACACGCTTC-3'	۱۷۲ جفت باز	Mse I	AA=۳۱+۱۴۱ (هموزیگوت سالم)
CGA -R	5'-TAAAAGGCTTTATTTGACAGTGG-3'			AT=۱۷۲+۳۱+۱۴۱ (هتروزیگوت)
				TT=۱۷۲ (هموزیگوت جهش یافته)

TTGATGACTGCTGATTTTCTGGAATGGAAAATTAAGTTGTTTGTAGTGTATGGC  
TTTGTGAGATAAACTCTCCTTTTCCTTACCATACCACTTTGACACGCTTCAA  
GGATATACTGCAGCTTTACTGCCTTCCTCCTTATCCTACAGTACAATCAGCAG  
TCTAGTTCTTTTCATTTGGAATGAATACAGCA**TTWA**GCTTGTTCCTGCAAA  
TAAAGCCTTTTAAATCAT

**MseI**

5'... T T A A ... 3'  
3'... A A T T ... 5'

**شکل ۱:** جایگاه برش آنزیم محدودالایتر MseI برای چندشکلی rs6631A>T زن CGA

و تحلیل قرار گرفت. مقدار  $P < 0.05$  به صورت معنی دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

میانگین سن افراد گروه سالم  $38 \pm 2/36$  سال (در محدوده سنی ۲۶-۵۵ سال) و گروه بیمار  $40 \pm 4/18$  سال (در محدوده سنی ۲۷-۵۲ سال) بود که اختلاف معنی داری بین دو گروه مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). برای این چندشکلی (rs6631A>T) انواع ژنوتیپ های احتمالی شامل (هموزیگوت سالم) AA، (هتروزیگوت) AT و هموزیگوت جهش یافته (TT) بودند (جدول ۲).

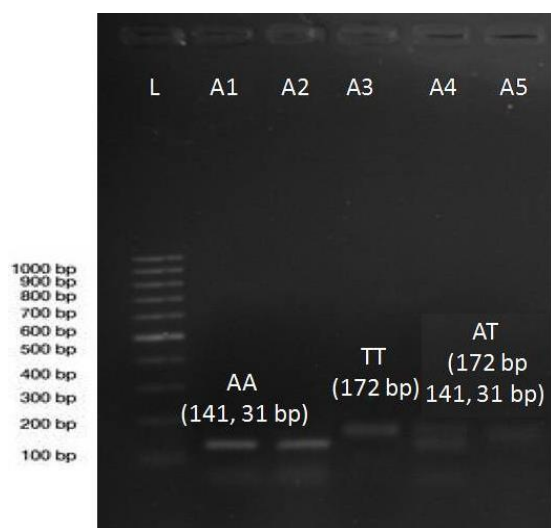
تصویری از ژل الکتروفورز محصولات تکثیری PCR و PCR-RFLP در شکل های ۲ و ۳ نشان داده شده است. در تصویر ۲، محصولات تکثیر قبل از برش با طول ۱۷۲ جفت بازی را نشان می دهد. در شکل ۳، نمونه های A1 و A2 هموزیگوت سالم (AA)، نمونه A3 هموزیگوت جهش یافته (TT)، نمونه های A4 و A5 هتروزیگوت (AT) می باشند. فراوانی ژنوتیپی چندشکلی (rs6631A>T) در بین گروه های سالم و بیمار اختلاف معناداری را نشان نداد ( $P > 0.05$ ) (جدول ۳). علاوه بر این، به منظور ارتباط احتمالی این چندشکلی با ناباروری مردان در الگوی های توارثی مختلف شامل، الگوی

ترموسایکلر (Eppendorf، آلمان) به جهت تکثیر قطعه مورد نظر استفاده گردید. واکنش زنجیر پلیمرز با چرخه های واسرشته سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۲ چرخه با مرحله واسرشته سازی در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، سنتز در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شده است. محصولات تکثیری قبل از برش با آنزیم محدودالایتر اختصاصی Mse I، بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ بارگذاری و بارنگ Safe Stain (سینا ژن، ایران) آشکارسازی شدند.

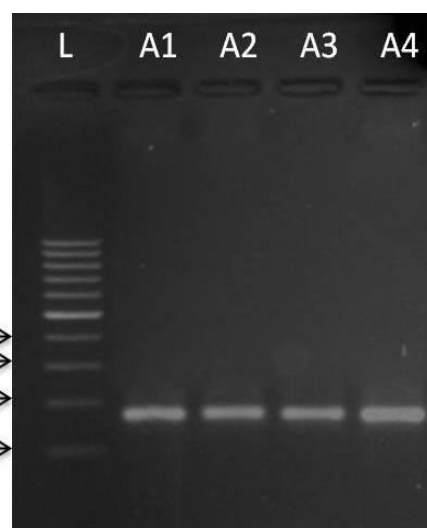
محصول واکنش PCR با آنزیم محدودالایتر اختصاصی Mse I (Fermentas، آلمان) و بر اساس پروتکل شرکت سازنده برش داده شد (شکل ۱). در این واکنش از ۱۰ میکرو لیتر محصول واکنش، ۲/۵ میکرو لیتر از بافر 10x، ۰/۵ میکرو لیتر آنزیم اختصاصی Mse I و ۱۸ میکرو لیتر آب مقطر مخلوط و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. بعد از برش محصولات، بر روی ژل آگارز ۳٪ جدا و با رنگ آمیزی Safe Stain شناسایی شدند. جهت تعیین فراوانی چندشکلی rs6631A>T در افراد گروه های سالم و بیمار از نرم افزار SPSS نسخه ۲۵ و آزمون آماری مربع کای مورد تجزیه

**جدول ۲:** مقایسه فراوانی ژنوتیپ های چندشکلی زن CGA (rs6631A>T) در بین گروه های سالم و بیمار

مقدار P	گروه		چندشکلی CGA (rs6631 A>T)
	جمع	تعداد (درصد) سالم	
۰/۷۰۴	۵۳	۲۵ (۴۷٪)	۲۸ (۵۳٪) هموزیگوت سالم (AA)
	۹۶	۴۷ (۴۹٪)	۴۹ (۵۱٪) هتروزیگوت (AT)
	۵۱	۲۸ (۵۵٪)	۲۳ (۴۵٪) هموزیگوت جهش یافته (TT)



**شکل ۳:** الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۳٪ محصولات تکثیری-PCR. نمونه‌های A1 و A2 هموزیگوت سالم، نمونه A3 هموزیگوت جهش‌یافته، نمونه‌های A4 و A5 هتروزیگوت. L: مارکر ۱۰۰ جفت بازی



**شکل ۲:** الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ محصولات تکثیری-PCR. نمونه‌های A1-A4 محصولاتی با طول ۱۷۱ جفت بازی. L: مارکر ۱۰۰ جفت بازی

**جدول ۳:** مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های چندشکلی ژن *CGA* (rs6631A>T) در بین افراد سالم و بیمار

مقدار <i>P</i>	فاصله اطمینان ۹۵٪		نسبت شانس	جمع	گروه		چندشکلی <i>CGA</i> (rs6631 A>T)
	پایین	بالا			تعداد (درصد) سالم	تعداد (درصد) بیمار	
۰/۷۷۷	۰/۶۲۲	۱/۸۸۷	۱/۰۸۳	۹۶	۴۷ (۴۹٪)	۴۹ (۵۱٪)	الگوی هم‌بازی AT
				۱۰۴	۵۳ (۵۱٪)	۵۱ (۴۹٪)	AA+TT
۰/۶۳۱	۰/۴۵۷	۱/۶۰۷	۰/۸۵۷	۵۳	۲۵ (۴۷٪)	۲۸ (۵۳٪)	الگوی غالب AA
				۱۴۷	۷۵ (۵۱٪)	۷۲ (۴۹٪)	AT+TT
۰/۴۱۷	۰/۴۰۶	۱/۴۵۴	۰/۷۶۸	۵۱	۲۸ (۵۵٪)	۲۳ (۴۵٪)	الگوی مغلوب TT
				۱۴۹	۷۲ (۴۸٪)	۷۷ (۵۲٪)	AA+AT
۰/۴۲۴	۱/۵۷۶	۱/۲۶۱	۰/۸۵۲	۱۹۸	۱۰۳ (۵۲٪)	۹۵ (۴۸٪)	T فراوانی آلل جهش‌یافته
				۲۰۲	۹۷ (۴۸٪)	۱۰۵ (۵۲٪)	A فراوانی آلل وحشی

باقی مانده است که تحت عنوان ناباروری ایدیوپاتیک نام می‌برند. ناباروری به عنوان عدم موفقیت در ایجاد حاملگی بعد از یک سال رابطه جنسی بدون استفاده از عوامل بازدارنده حاملگی، تعریف می‌شود [۲۰، ۲۱]. حدود نیمی از موارد ناباروری به علت عوامل مردانه است. آرواسپرمی یا الیگواسپرمی شدید و بدون علت که به علت تغییرات ژنتیکی ایجاد می‌شود بخش مهمی از ناباروری مردان را تشکیل می‌دهند [۲۲].

با توجه بر فرضیات این تحقیق که انتظار می‌رفت ارتباط معناداری بین چندشکلی *CGA* (rs6631 A>T) با خطر ابتلا مردان به الیگواسپرمی شدید و آرواسپرمی با علت نامعلوم وجود داشته باشد؛ ولی نتایج آنالیز آماری ژنوتیپ

وراثتی هم‌بازی، غالب و مغلوب مورد بررسی قرار گرفته شد. ژنوتیپ‌ها در گروه‌های مورد مطالعه در هیچ کدام از الگوهای توارثی هم‌بازی ( $OR=1/083$ ;  $CI=0/622-1/887$ ;  $p=0/777$ )، غالبی ( $OR=0/857$ ;  $CI=0/457-1/607$ ;  $p=0/631$ ) و مغلوبی ( $OR=0/768$ ;  $CI=0/406-1/454$ ;  $p=0/417$ ) از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P>0/05$ ) و نقشی در افزایش احتمالی خطر ناباروری در مردان را نشان نداد (جدول ۳). همچنین فراوانی آللی در بین دو گروه مورد ارزیابی قرار گرفت که اختلاف معناداری نشان داده نشد ( $P>0/05$ ).

### بحث

در بیش از نیمی از مردان نابارور، دلیل ناباروری ناشناخته

باروری و ناباروری اصفهان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه و تحلیل فراوانی ژنوتیپی و آلیلی‌ها آن‌ها نشان داد که بین گروه مورد و شاهد برای چندشکلی rs6631 اختلاف معنی‌دار بود. بر این اساس، ارتباط معنی‌داری بین این چندشکلی و ناباروری مردان نشان داده شد. همچنین این چندشکلی دارای فراوانی هتروزیگوسیتی بالا است که لازم است برای مطالعات بیشتر در جمعیت‌های مختلف با قومیت و نژاد متفاوت مورد ارزیابی قرار گیرد [۱۸].

مولکول‌های miRNAs یکی از اعضای گروه‌های RNA های غیر رمز کننده با طول ۲۵-۱۸ نوکلئوتیدی به شمار می‌روند که از طریق اتصال به ناحیه 3'-UTR ژن‌های هدف، در تنظیم آن نقش دارند [۱۶]. تغییرات تک نوکلئوتیدی در جایگاه اتصال مولکول‌های miRNAs ممکن است توانایی اتصال miRNAs به ژن هدف را تحت تأثیر قرار دهد و در نتیجه منجر به تغییر بیان ژن و شکل‌گیری بیماری‌های مختلفی گردد [۱۳]. از طرفی، وجود چندشکلی‌های ژنتیکی در pre-miRNA یا miRNA های بالغ می‌تواند از طریق تغییر در میزان بیان و یا فرآیند بلوغ miRNA، برهمکنش بین miRNA با ژن هدف را تنظیم کنند [۱۴، ۱۵]. به دلیل نقش‌های متعدد مولکول‌های miRNA بر روی فرآیند اسپرم زایی، وجود هر نوع چندشکلی در ژن‌های مرتبط ممکن است منجر به ناباروری گردند. نتایج بررسی‌ها نشان داده است که جایگزینی T بجای A در چندشکلی (rs6631A>T) منجر به کاهش توانایی اتصال miR-1302 به جایگاه خودش در ژن CGA می‌شود که پیامد آن افزایش بیان ژن CGA خواهد بود [۱۰].

فرضیات مختلفی مبنی بر توجیه تضاد در نتایج گزارش شده در مطالعات قبلی مطرح خواهد بود، ممکن است ناشی از تفاوت در اندازه جامعه آماری، اختلاف نژادی، قومیتی و زمینه ژنتیکی افراد مورد مطالعه باشد. از طرفی، معیارهای ورود و خروج از مطالعه افراد مورد بررسی که در انتخاب گروه شاهد و بیمار لحاظ می‌گردد، می‌تواند به تضاد در نتایج بررسی‌های انجام‌گرفته، گردد. البته گاهی این اختلافات ناشی از اشتباهات در نمونه‌گیری و تجزیه و تحلیل نتایج باشد. ویژگی‌های این بررسی این بود که در انتخاب افراد مورد بررسی با دقت و حساسیت بالایی انجام شد و از طرفی فراوانی این چندشکلی را در الگوهای توارثی مختلف مورد ارزیابی قرار داد که در هیچ کدام یک از الگوها اختلاف معنی‌داری در فراوانی ژنوتیپی در بین دو گروه نشان داده نشد.

به طور کلی در جهت تایید نتایج نیاز به انجام مطالعات گسترده‌تر در نژادها و قومیت‌های مختلف خواهد بود تا اثر تغییرات تک نوکلئوتیدی بر روی یک بیماری خاص آشکار گردد. از طرفی نمی‌توان با نتایج گزارش‌های معدودی در جمعیت‌هایی با نژاد خاص به نقش مؤثر چندشکلی ژنتیکی در

های به دست آمده در ژن مورد مطالعه هیچ ارتباط معنی‌داری را نشان نداد. البته تاکنون مطالعات اندکی در این رابطه صورت گرفته است که در نتایج گزارش‌شده تناقضاتی نشان داده شده است.

Zhang و همکاران طی مطالعه‌ای رابطه‌ی احتمالی بین چندشکلی تک نوکلئوتیدی در جایگاه اتصال به mi-RNA ژن‌های مرتبط با اسپرم‌توزن و ناباروری ایدیوپاتیک را مورد بررسی قرار دادند. این محققین در این مطالعه ۴۹۴ مرد مبتلابه آرواسپرمی و یا الیگواسپرمی شدید و ۳۵۷ مرد سالم و بارور را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه، توالی‌های انتهایی 3'-UTR در ۱۴۰ ژن مرتبط با ناباروری را بر اساس الگوریتم‌های مختلف از جمله Pictar، miRanda، RNAhybrid و Targetscan مورد بررسی قرار داده بودند. نتایج این مطالعه تعداد ۳۹ عدد SNP را در جایگاه متصل شونده به mRNA مشخص کردند. رابطه احتمالی بین ۶ نوع SNP عملکردی و بروز ناباروری در مردان با کمک مطالعات مورد-شاهدی مورد بررسی بیشتر قرار گرفت. در پایان عملکرد این SNP ها با عقیمی مردان با سنجش لوسیفراز دوگانه آنالیز شد. نتایج این مطالعه نشان داد که دو مورد از SNP ها از جمله در ژن CGA با ناباروری ایدیوپاتیک در مردان در ارتباط است [۱۰].

Mohseni Sani و همکارانش در مطالعه‌ای ارتباط چندشکلی در ژن CGA با ناباروری مردان در قومیت‌های مختلف ایرانی شامل لر، فارس، گیلکی، کرد، عرب و ترک را بر روی ۱۳۱ مرد مورد ارزیابی قرار دادند. بر اساس تجزیه و تحلیل آماری به‌منظور بررسی ارتباط این تغییر تک نوکلئوتیدی در ژن CGA با ناباروری مردان، فراوانی ژنوتیپی در CGA به‌طور معناداری با آرواسپرمی ارتباط نشان داده بود. تجزیه و تحلیل فراوانی ژنوتیپ بین مردان بارور و نابارور اختلاف معنی‌داری را نشان داد؛ بنابراین این SNP ممکن است خطر ناباروری مردان به‌ویژه آرواسپرمی را افزایش دهد [۱۷]. البته تعمیم دادن چنین نتایجی با این تعداد کم افراد از نژادهای متفاوت احتمالاً نیاز به بررسی بیشتری داشته باشد. در مطالعه حاضر بر روی ۱۰۰ مردی با الیگواسپرمی شدید و یا آرواسپرمی با نژاد ترک آذری انجام گرفت. نتایج کاملاً در تضاد با نتایج قبلی گزارش شد. علت این تضاد بین نتایج بررسی‌های صورت گرفته ممکن است ناشی از اختلاف در فراوانی آلیلی در مناطق جغرافیایی مختلف باشد.

Jamalvandi و همکارانش در طی بررسی‌ای تحت عنوان رابطه چندشکلی T/A در محل اتصال miR-1302 در ژن CGA با ناباروری مردان در جمعیت اصفهان انجام شد. در این مطالعه مورد-شاهدی، با استفاده از تکنیک Tetra primer-ARMS-PCR فراوانی چندشکلی rs6631 را در ۲۲۴ مرد نابارور و ۱۹۶ مرد سالم و بارور مراجعه‌کننده به مرکز

آزاد اسلامی واحد اهر است. این تحقیق با مشارکت کارکنان بیمارستان الزهرا شهر تبریز انجام گرفته است که بدین وسیله از کلیه شرکت‌کنندگان و پرسنل بیمارستان تشکر و قدردانی می‌گردد.

### تضاد منافع

این مطالعه برای نویسندگان هیچگونه تضاد منافی نداشته است.

### ملاحظات اخلاقی

پژوهش حاضر در معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر با کد مصوب پایانامه ۹۶۱۰۰۱ مورد تایید قرار گرفته است.

### سهم نویسندگان

سمیرا مرادی و سعید قربیان در جمع آوری داده ها و نگارش علمی مقاله نقش داشته اند.

### حمایت مالی

پژوهش حاضر با حمایت مالی دانشجو انجام شده است.

ایجاد یک اختلال اذعان کرد. از طرفی پیشنهاد می‌گردد که میزان بیان ژن‌های *miR-1302* و *CGA* را در نمونه‌های افرادی با ژنوتیپ های هموزیگوت سالم، هتروزیگوت و هموزیگوت جهش یافته مورد ارزیابی قرار گیرد تا عملکردهای بیولوژیکی آن بیشتر شناخته گردد. در این بررسی نشان داده شد که وجود چندشکلی rs6631 ژن *CGA* در ابتلا مردان به ناباروری ناشی از الیگواسپرمی شدید و یا آزواسپرمی در جمعیت مورد بررسی نقشی نداشته باشد.

### نتیجه‌گیری

به طور کلی در جهت تأیید نتایج فوق، نیاز به انجام مطالعات گسترده‌تر در نژادها و قومیت‌های مختلف خواهد بود؛ بنابراین، تأثیر اختلالات ژنتیکی بر روی یک بیماری خاص را نمی‌توان با نتایج گزارش‌های معدودی در جمعیت‌هایی با نژاد خاص اذعان کرد. در این بررسی نشان داده شد که وجود چندشکلی rs6631 ژن *CGA* در ابتلا مردان به ناباروری ناشی از الیگواسپرمی شدید و یا آزواسپرمی در جمعیت مورد بررسی نقشی نداشته باشد.

### تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از پایان‌نامه سمیرا مرادی از دانشگاه

## REFERENCES

- Iammarrone E, Balet R, Lower AM, Gillott C, Grudzinskas JG. Male infertility. Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology. 2003;17(2):211-29.
- Anderson JE, Farr SL, Jamieson DJ, Warner L, Macaluso M. Infertility services reported by men in the United States: national survey data. Fertility and sterility. 2009;91(6):2466-70.
- Ahmed A, Bello A, Mbibu NH, Maitama HY, Kalayi GD. Epidemiological and aetiological factors of male infertility in northern Nigeria. Nigerian journal of clinical practice. 2010;13(2):205-9.
- Carpi A, Sabanegh E, Mechanick J. Controversies in the management of nonobstructive azoospermia. Fertility and sterility. 2009;91(4):963-70.
- Cheng YS, Lu CW, Lin TY, Lin PY, Lin YM. Causes and Clinical Features of Infertile Men With Nonobstructive Azoospermia and Histopathologic Diagnosis of Hypospermatogenesis. Urology. 2017;105:62-8.
- Bahadur G, Homburg R, Muneer A, Racich P, Alangaden T, Al-Habib A, et al. First line fertility treatment strategies regarding IUI and IVF require clinical evidence. Human reproduction (Oxford, England). 2016;31(6):1141-6.
- Abdel Raheem A, Garaffa G, Rushwan N, De Luca F, Zacharakis E, Abdel Raheem T, et al. Testicular histopathology as a predictor of a positive sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. BJU International. 2013;111(3):492-9.
- Bieche I, Latil A, Parfait B, Vidaud D, Laurendeau I, Lidereau R, et al. CGA gene (coding for the alpha subunit of glycoprotein hormones) overexpression in ER alpha-positive prostate tumors. Eur Urol. 2002;41(3):335-41.
- Kendall SK, Samuelson LC, Saunders TL, Wood RI, Camper SA. Targeted disruption of the pituitary glycoprotein hormone alpha-subunit produces hypogonadal and hypothyroid mice. Genes & development. 1995; 9(16):2007-19.
- Zhang H, Liu Y, Su D, Yang Y, Bai G, Tao D, et al. A single nucleotide polymorphism in a miR-1302 binding site in CGA increases the risk of idiopathic male infertility. Fertility and sterility. 2011;96(1):34-9.e7.
- Troppmann B, Kossack N, Nordhoff V, Schuring AN, Gromoll J. MicroRNA miR-513a-3p acts as a co-regulator of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene expression in human granulosa cells. Mol Cell Endocrinol. 2014;390(1-2):65-72.
- Bernstein LR, Mackenzie AC, Lee SJ, Chaffin CL, Merchenthaler I. Activin Decoy Receptor ActRIIB:Fc Lowers FSH and Therapeutically Restores Oocyte Yield, Prevents Oocyte Chromosome Misalignments and Spindle Aberrations, and Increases Fertility in Midlife Female SAMP8 Mice. Endocrinology. 2016;157(3):1234-47.
- IGHorbian S. Micro-RNAs, next-generation molecular markers in male infertility field. Translational andrology and urology. 2012;1(4):245-6.
- Kian R, Moradi S, Ghorbani S. Role of components of microRNA machinery in carcinogenesis. Experimental oncology. 2018;40(1):2-9.
- Ogorevc J, Dovc P, Kunjic T. Polymorphisms in microRNA targets: a source of new molecular markers for male reproduction. Asian journal of andrology. 2011;13(3):505-8.
- Khazaie Y, Esfahani MHN. MicroRNA and male infertility: a potential for diagnosis. International journal of fertility & sterility. 2014;8(2):113.
- Mohseni Sani N, Sheidai M, Noormohammadi Z, Kalhor N, Atri Roozbahani G. Study of association of the single nucleotide polymorphisms (rs6631) in 3'-UTR CGA gene with male infertility in Iranian population. Gene Reports. 2018;12:61-5.
- Jamalvandi M, Motovali-Bashi M, Amirmahani F, Darvishi P, Jamshidi Goharrizi K. Association of T/A polymorphism in miR-1302 binding site in CGA gene with male infertility in Isfahan population. Molecular biology reports. 2018;45(4):413-7.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988;16(3):1215.

20. Miyamoto T, Minase G, Shin T, Ueda H, Okada H, Sengoku K. Human male infertility and its genetic causes. *Reprod Med Biol.* 2017;16(2):81-8.
21. Miyamoto T, Minase G, Okabe K, Ueda H, Sengoku K. Male infertility and its genetic causes. *J Obstet Gynaecol Res.* 2015;41(10):1501-5.
22. Poursadegh A, Poursadegh AA, Ghorbian S. PiRNAs interacting proteins, candidate molecular marker for evaluation of idiopathic male infertility. *Andrologia.* 2014;1;46(8):823.