مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)
جلد ۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵، ۱۰۳-۱۱۰

بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن TNFR1 با ناباروری ایدیوپاتیک مردان

متین باقری ماتک M.Sc.[۱]، فرهاد مشایخی Ph.D.[۱*]، محمدهادی بهادری Ph.D.[۲]

۱- دانشگاه گیلان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، رشت، ایران
۲- دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دانشکده پزشکی، رشت، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: mashayekhi@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۵

چکیده

هدف: در مطالعه حاضر، ارتباط پلی مورفیسم TNFR1 36A/G با ناباروری ایدیوپاتیک مردان در جمعیت گیلان بررسی شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه شامل ۱۰۶ مرد نابارور ایدیوپاتیک و ۱۱۴ مرد بارور به‌عنوان گروه کنترل می باشد. نمونه خون تهیه و DNA ژنومی استخراج شد. سپس ژنوتیپ‌ها و فراوانی آللی با استفاده از روش PCR-RFLP ارزیابی و آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار MedCalc انجام شد.

نتایج: فراوانی ژنوتیپ‌های AA, AG, GG بیماران به‌ترتیب برابر ۵۰/۹، ۷/۵ و ۴۱/۵ درصد و نمونه‌های کنترل به‌ترتیب برابر ۲۱/۱، ۳۳/۳ و ۴۵/۶ درصد بود. فراوانی نسبی آلل A و G بیماران به‌ترتیب برابر ۰/۴۵ و ۰/۵۵ بود و نمونه‌های کنترل به‌ترتیب برابر ۰/۶۲ و ۰/۳۸ بود. نتایج نشان داد در فراوانی ژنوتیپی (P=0.002) و آللی (P=0.0004) گروه‌های نابارور و کنترل ارتباط معنی‌دار دیده می‌شود.

نتیجه گیری: در نتیجه، به‌نظر می‌رسد در استان گیلان افراد با آلل G و ژنوتیپ GG بیشتر در معرض خطر ابتلا به ناباروری ایدیوپاتیک می‌باشند. مطالعات دیگری با تعداد بیشتری از بیماران جهت نشان دادن نقش پلی مورفیسم ژن TNFR1 در ناباروری مردان مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: پلی مورفیسم، ناباروری مردان، اسپرماتوژنز، سیتوکین، فاکتور نکروز دهنده‌ی تومور α

مقدمه

ناباروری می‌تواند موجب تنش‌های روحی- اجتماعی- اقتصادی در افراد نابارور اجتماع شود. سالانه ۶۰ تا ۸۰ میلیون زوج مبتلا به ناباروری در جهان شناسایی می‌شوند (۱). درمان ناباروری در مردان مشکل‌تر از زنان است، به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه که به‌دلیل هزینه بالا، افراد کمی برای درمان اقدام می‌کنند (۲). تقریبا ۱۵ درصد از زوج‌ها نابارور هستند. تشخیص عوامل ناباروری برای زوج‌ها و پزشکان، زمینه‌ای برای شروع تحقیقات و درمان است. ناباروری، به‌عنوان عدم بارداری پس از ۱۲ ماه مقاربت محافظت نشده تعریف می‌شود. در سال‌های اخیر در زمینه درمان‌های کمک باروری پیشرفت‌های متعددی وجود داشته و با این وجود، در حال حاضر بیش از ۸۰ درصد از زوج‌ها که نابارور هستند می‌توانند به داشتن فرزند امیدوار باشند (۳). ارزیابی مناسب ناباروری زمانی است که به بررسی وسیعی از عوامل قابل شناسایی احتمالی درهر دو زوج پرداخته شود (۴).

عوامل محیطی و غیر ژنتیکی در ایجاد ناباروری مردان نقش دارند. از عوامل عمده غیر ژنتیکی مانند عفونت‌های (باکتریایی) مایع منی، بیضه‌ها و مجاری تناسلی، واریکوسل، کریپتورکیدیسم، هیپوگنادیسم و غیره مواردی هستند که ناباروری مردان را موجب می شوند (۵). از مهم‌ترین عوامل موثر بر ناباروری مردان واریکوسل، الیگو اسپرمی، آزواسپرمی می‌باشد. سایر عواملی دخیل در ناباروری مردان دخیل اند شامل: انسداد مجرای اسپرم بر، اختلالات جنسی، اختلالات ژنتیکی، اختلالات کروموزوم (کاهش یا تولید نکردن اسپرم) اعتیاد به مواد مخدر از جمله مصرف سیگار، الکل، کوکائین می‌باشد (۶). ناباروری ایدیوپاتیک شرایطی است که در باروری اختلالاتی خود به‌خودی و یا به‌علت مبهم یا ناشناخته رخ می‌دهد که حدود ۳۰ تا ۵۰ درصد از موارد ناباروری مردان را تشکیل می‌دهد (۷). عوامل ژنتیکی حدود ۱۵ درصد از ناباروری در مردان را موجب می‌شود (۸ و۹). پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی فراوان‌ترین نوع تغییرات در ژنوم انسان است و می‌تواند برای شناسایی ژن‌هایی که مسبب یا مستعد ابتلا به بیماری‌های پیچیده انسانی هستند، مورد استفاده قرار بگیرد (۱۰). ژنتیک با تاثیر بر انواع فرآیندهای فیزیولوژیکی از جمله تعادل هورمونی، اسپرماتوژنز و کیفیت اسپرم موجب ناباروری مردان می‌شود. تعدادی از ژن‌ها ازجمله ژن فاکتور آزواسپرمی (zoospermia factor=AZF)، ژن هورمون جنسی متصل به گلوبولین (Sex hormone binding globulin=SHBG)، ژن گیرنده آندروژن (Androgen receptor=AR) و ژن فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (Tumor necrosis factor-α=TNF-α) و بعضی ژن‌های دیگر در ناباروری مردان دخالت دارند (۱۱).

التهاب جزء اصلی پاسخ ایمنی به پاتوژنزها و آسیب دیدگی‌های سلولی است. محرک‌های قوی التهاب شامل عوامل عفونی، فاکتورهای مکانیکی، رادیکال‌های اکسیژن، پروتئین شوک حرارتی (Heat shock protein= HSP) می‌باشند. هنگامی‌که پاسخ التهابی، مکانیزم‌های دفاعی برای عوامل آسیب رسان به سلول‌های آسیب دیده آماده می‌کند، به سلول‌های سالم موجود در جایگاه التهاب هم خساراتی وارد می‌شود. فاکتورهای التهابی شامل سیتوکین‌هایی مثل اینترلوکین‌ها و اینترفرون‌ها و فاکتور نکروزی تومور آلفا (TNF-α) هستند (۱۲). TNF-α با اتصال به گیرنده‌های خود، چندین مجموعه مسیرهای سیگنالینگ منجر به آپوپتوزیس و التهاب و تمایز سلولی را تنظیم می‌کنند. عمدتا توسط ماکروفاژها و لنفوسیت‌هایT، همچنین توسط سلول‌های مختلفی از جمله سلول‌های کشنده طبیعی (Natural killer)، ماست سل‌ها و فیبروبلاست‌ها تولید می‌شود. کاهش فعالیت TNF در پاتولوژی بسیاری از بیماری‌های خود ایمنی نقش دارد (۱۳). اصطلاح فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF-α) در سال ۱۹۷۵ توسط Carswell و همکاران او در حالی‌که نکروزیس هموراژیک توسط آندوتوکسین را مطالعه می‌کردند اطلاق شد، این فاکتور یک گلیکوپروتئین است و در پاسخ به آندوتوکسین تولید شده و ظرفیت برای از بین بردن تومور دارد (۱۳). اثرات TNF-α با اتصال به گیرنده‌های آن یعنی TNFR1 و TNFR2 انجام می‌شود. این دو گیرنده با وجودِ داشتن تفاوت‌هایی اما در فرآیندهای سیگنالینگ پایین دست خود با همدیگر واکنش می‌دهند. بررسی‌ها روی TNFR1 و TNFR2 نشان می‌دهد که TNFR1 بیشتر در تکثیر سلولی، التهاب، و فعالسازی مسیر آپوپتوز دخیل است، درحالی‌که نتیجه‌ی مسیر سیگنالینگ TNFR2 ممکن است موجب ترمیم بافت و رگ باشد (۱۴).

TNFR1 به‌دلیل توانایی در القای مرگ سلولی از طریق یک موتیف اسید آمینه ای در دومین‌های سیتوپلاسمی شناخته شده که به اصطلاح توالی مرگ (Death domain= DD) نامیده می‌شوند. پس از اتصال TNF-α به TNFR1 پروتئین آداپتور داخل سلولی به‌نام پروتئین متصل به دومین مرگ (TNFR-associated death domain) به جایگاه مرگ در گیرنده متصل می‌شود و در نهایت منجر به فعال شدن caspase ها شده و مرگ سلول (آپوپتوزیس) رخ می‌دهد. در روش دیگر، TRADD

(TNFR-associated death domain) با اتصال به TNFR1 می‌تواند موجب اتصال مهار کننده سلولی آپوپتوزیس (Cellular inhibitor of apoptosis protein= CIAP) و یا پروتئین واکنش دهنده با گیرنده (Receptor interacting protein= RIP) شود، این مسیر منجر به فعال شدن مسیر NFκB می‌شود. بنابراین TNFR1 دارای قابلیت سیگنالینگ دوگانه برای هر دو مسیر یعنی مرگ سلولی و حیات سلول است (۱۵).

سیتوکین‌های التهابی نقش مهمی در فیزیولوژی تولید مثل دارد (۱۶). حذف ژن TNF-α باعث کاهش وزن بیضه و کاهش تولید اسپرم می‌شود (۱۷). TNF-α بر غلظت اسپرم تاثیر می‌گذارد و با محدود کردن سیستم لیگاندی Fas، از آپوپتوزیس سلول‌های جنسی جلوگیری می‌کند و نسبت مطلوب بین سلول سرتولی و سلول‌های زایا را بر هم می‌زند در حالی‌که همه این‌ها به‌ترتیب برای انجام میوز و آزاد سازی اسپرماتوزوآ به‌داخل لوله اسپرم ساز و برای تولید اسپرم سالم ضروری است. میزان بالای TNF-α اثرات منفی روی تولید تستوسترون دارد که این مسئله برای حفظ اسپرماتوژنز طبیعی خیلی مهم است. افزایش مقدار TNF-α در مایع اسپرمی، با تخریب DNA اسپرم و کاهش تعداد اسپرم‌هایی که میتوکندری فعال دارند، موجب کاهش حرکت اسپرم می شود (۱۷و۱۸).

هدف از این تحقیق بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن TNFR1 با ناباروری ایدیوپاتیک مردان درجمعیت استان گیلان بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر مطالعه ای مورد- شاهدی است در آن ۲۲۰ فرد طی آبان ماه تا اسفندماه ۹۲ مورد آزمایش قرار گرفتند که از این تعداد ۱۰۶ بیمار مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک و ۱۱۴ مرد سالم به‌عنوان شاهد (با داشتن فرزند زیر ۵ سال) بودند. دامنه‌ی سنی مردان نابارور ایدیوپاتیک وسالم در این پروژه ۲۴ تا ۴۵ سال بوده است. ۳ میلی‌لیتر خون از این افراد تهیه کرده و در ونوجکت‌های حاوی EDTA ریخته شد. نمونه‌ها به‌مدت چندین ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. همه افراد مورد مطالعه ساکن استان گیلان بودند و طی پنج ماه از بیمارستان الزهرا و آزمایشگاه رازی رشت توسط متخصص اورولوژی ارجاع داده شده بودند.

استخراج DNA ژنومی توسط کیت DNG-PLUS صورت گرفت. نمونه خون با GPP– solution مخلوط شده و سپس در بن ماری (دمای ۷۰ درجه سانتی گراد) قرار داده شد. سپس زیر هود، NaCl و کلروفرم به محلول اضافه شده و در داخل دستگاه سانتریفوژ (در دور ۵۰۰۰rpm به‌مدت ۵ دقیقه) قرار داده شد. بعد از پایان سانتریفوژ ۳ فاز ایجاد شد، فاز بالایی آبی را برداشته در میکروتیوپ دیگری ریخته و در دو مرحله پیاپی به آن الکل ۷۰ و ۱۰۰ درصد اضافه شد و هر بار (دور ۶۰۰۰ rpm و به‌مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه) سانتریفوژ شد. محلول رویی را دور ریخته و میکروتیوپ به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌صورت واژگون در دمای محیط قرار داده شد سپس به میکروتیوپ، آب مقطر استریل اضافه شد تا DNA با آب مخلوط شود سپس DNA به یخچال منتقل شد. برای بررسی کیفیت DNA استخراجی از ژل الکتروفورز افقی استفاده شد. ژل مورد نظر به دستگاه Gel-Doc منتقل و با استفاده از نورUV عکس‌برداری از آن صورت گرفت. برای بررسی پلی مورفیسم مورد نظر، DNA ژنومی به‌روش PCR تکثیر شد. باتوجه به پلی مورفیسم یاد شده که حاصل تبدیل نوکلئوتید آدنین به گوانین در اگزون شماره ۱ ژن TNFR1 بود؛ دو جفت پرایمر رو به جلو (Forward) و رو به عقب (Reverse) طراحی و تهیه شدند. توالی‌های الیگو نوکلئوتیدی پرایمرهای Forward و Reverse برای تکثیر قطعه ۲۲۲ به‌ترتیب CGTGATCTCTATGCCCGAGTCT و CAGCCCACTCTTCCCTTTGTC بود. PCR به‌کمک دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad و در میکروتیوپ‌های ۰/۲ میلی‌متری حاوی 3µl Templet DNA، 1 Forward primer µl، 1 µl Reverse primer، 10 µl Tag master mix 2x و آب مقطر 5 µl انجام شد. اجزای master mix شامل 0.08 unit/µl Taq DNA polymerase در بافر، 3 mM MgCl2، 0.4 mM dATP ، 0.4 mM dCTP، 0.4 mM dGTP، 0.4 mM dTTP است.

بعد از تکثیر قطعه‌ی مورد نظر، جهت بررسی قطعات تکثیر شده الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۲ درصد انجام شد. در این پروژه جهت بررسی پلی مورفیسم A/G در ژن TNFR1، روش Restriction Fragment Length (RFLP) Polymorphism استفاده شد. آنزیم برشگر به‌کارگرفته شده در این روش BSRI می‌باشد. در جدول ۱ ویژگی‌های این آنزیم آمده است.

جدول۱: ویژگی های فعالیت آنزیم BSR1

قطعات	جهش	جایگاه برش	آنزیم
222	A/G	5′...ACTGGN▼...3 3′...TGACCN...5	*BSRI*

براساس نتایج حاصل از برش آنزیم BSRI، محصول PCR افراد سالم و بیماری که در ژن TNFR1 خود جهش (A/G) را نداشته و مورد هضم آنزیمی قرار گرفته اند در ژل آگارز به‌صورت دو قطعه مجزا باقی می‌ماند (قطعات ۳۰ و ۱۹۲ جفت بازی) بنابراین این افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت (AA) می‌باشند. افراد سالم و بیماری که محصول PCR آن‌ها در نتیجه‌ی هضم

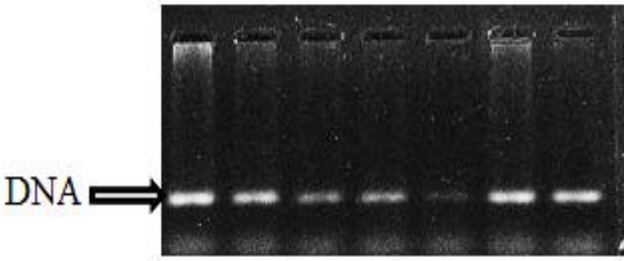
آنزیمی به‌صورت Uncut باقی می‌ماند (یک قطعه ی ۲۲۲ جفت بازی) در ژن TNFR1 خود دارای جهش مزبور بوده اند بنابراین این افراد ژنوتیپ هموزیگوت (GG) دارند. همچنین افراد سالم و بیماری که محصول PCR آن‌ها در نتیجه‌ی هضم آنزیمی در ژل آگارز به‌صورت سه قطعه به طول های ۳۰ و ۱۹۲ و ۲۲۲ جفت بازی ظاهر می شوند، دارای ژنوتیپ هتروزیگوت (AG) هستند.

آنالیز آماری

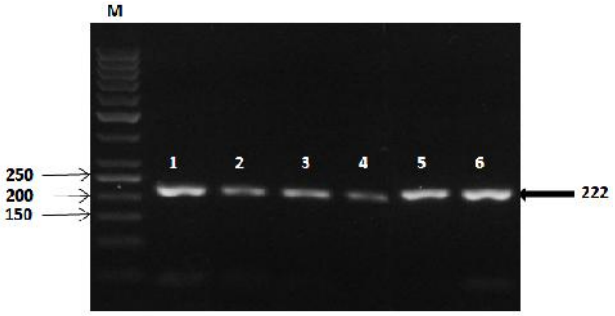
آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار MedCalc (Version. 12.1.4.0) صورت گرفت. جهت بررسی معنی‌دار بودن تفاوت بین ژنوتیپ‌ها در دو گروه بیمار و کنترل از آزمون Chi-Square استفاده شد و $p \leq ۰/۰۵$ به‌عنوان سطح معنی‌دار بودن اختلاف بین دو گروه در نظر گرفته شد.

نتایج

در این تحقیق در مجموع ۲۲۰ نفر شامل ۱۰۶ مرد مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک و ۱۱۴ مرد سالم به‌عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. برای بررسی وجود پلیمورفیسم در ناحیه ۲۲۲ ژن TNFR1 نمونه DNA افراد بیمار و کنترل تحت اثر آنزیم BSRI قرار گرفتند. در شکل ۱ نمونه DNA استخرج شده از افراد بیمار و سالم روی ژل آگارز ۱ درصد و در شکل ۲ محصولات PCR قطعه ی ۲۲۲ جفت نوکلئوتیدی روی ژل اگارز ۲ درصد نشان داده شده است.

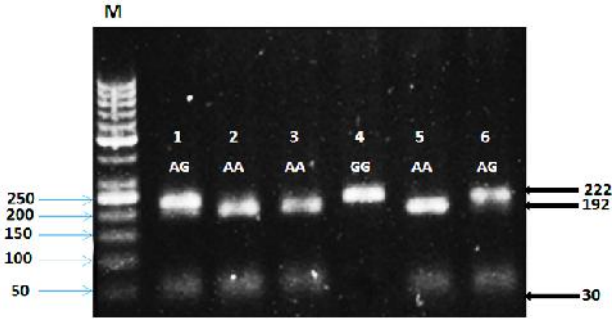


شکل۱: نمونه DNA استخراج شده از افراد شاهد و بیمار



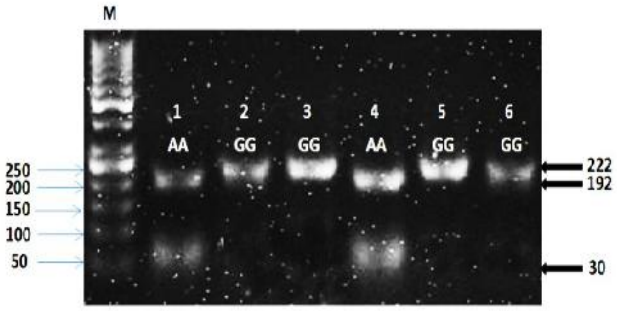
شکل۲: محصول PCR ژن TNFR1 در افراد شاهد و بیمار. طول قطعه تکثیر یافته ۲۲۲ جفت باز بوده که محل قرارگیری آن با فلش در سمت راست نمایش داده شده است. M مارکر ۵۰ جفت بازی است.

در شکل۳ و ۴ تصاویر مربوط به PCR-RFLP آورده شده است.



شکل۳: هضم انزیمی محصول PCR افراد شاهد در ژل الکتروفورز افقی. نمونه‌های۱و۶ هتروزیگوت AG است (222bp/192bp/30bp). نمونه ۴

هموزیگوت GG (222bp) و نمونه‌های ۲و۳و۵ هموزیگوت AA است (192bp/30bp). پیکان‌های سمت راست محل باندها را نشان می‌دهد. M مارکر ۵۰ جفت بازی است.



شکل۴: هضم آنزیمی محصول PCR افراد بیمار در ژل الکتروفورز افقی. نمونه‌های۱و۴ هموزیگوت AA (192bp/30bp) و نمونه ۲و۳ و۵ و۶ هموزیگوت GG است (222bp). پیکان‌های سمت راست محل دقیق باندها را نشان می‌دهد. M مارکر ۵۰ جفت بازی است.

بعد از عمل هضم آنزیمی و بردن محصول آن روی ژل، نتایج ژنوتیپی و آللی در جدول‌های ۲ و ۳ به‌دست آمد.

جدول۲: توزیع ژنوتیپی پلی مورفیسم 36A/G ژن TNFR1 در افراد بیمار و کنترل

Genotype	Patients n (%)	Controls n (%)	Odds Ratio	95% CI	P- Value
AA	44 (41.5 %)	52 (45.6%)	Ref (1.00)	-	-
AG	8 (7.5 %)	38 (33.3 %)	0.24	0.10-0.58	**0.002**
GG	54 (50.9 %)	24 (21.1 %)	2.65	1.42-4.97	**0.002**

جدول۳: توزیع آللی پلی مورفیسم 36A/G ژن TNFR1 در افراد بیمار و کنترل

Allele	Cases n	Controls N	Odds Ratio	95% CI	P- Value
A	0.45	0.62	Ref (1.00)	-	-
G	0.55	0.38	1.99	1.36 – 2.91	0.0004

باتوجه به نتایج به‌دست آمده در جدول های ۲ و ۳ در بین افراد بیمار فراوانی ژنوتیپ‌های GG، AG و AA به‌ترتیب ۵۰/۹، ۷/۵ و ۴۱/۵ درصد می‌باشد در حالی‌که در افراد سالم به‌ترتیب برابر با ۲۱/۱، ۳۳/۳ و ۴۵/۶ درصد می‌باشد. تفاوت مشاهده شده بین افراد سالم و بیمار با توجه به آزمون Chi-Square (P= 0.002) از لحاظ آماری معنی‌دار بود و افرادی که دارای این ژنوتیپ هستند ۲/۶ برابر بیشتر از سایرین درمعرض ابتلا به ناباروری ایدیوپاتیک قرار دارند (Odds ratio= 2.65, 95%CI= 1.42-4.97). در رابطه با فراوانی آللی هم نتایج نشان دادند که در بین افراد بیمار فراوانی آلل‌های A و G به‌ترتیب برابر با ۴۵/۲ و ۵۴/۷ درصد و در افراد سالم به‌ترتیب برابر با ۳۸ و ۶۲ درصد می‌باشد. طی آنالیزهای آماری مربوط به فراوانی آللی ژن

TNFR1 مقدار P=0.0004 به‌دست آمد و با توجه به مقدارOdds ratio، آلل G به‌عنوان یک فاکتور خطر برای ابتلا به این بیماری شناخته شد در نتیجه افرادی که دارای این آلل هستند ۱/۹۹ برابر بیشتر از سایرین درمعرض ابتلا به ناباروری ایدیوپاتیک قرار دارند (Odds ratio= 1.99, 95%CI= 1.36-2.91). در نتیجه نشان داده شد که تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها، در این دو گروه وجود دارد و ژنوتیپ GG وآلل G به‌عنوان فاکتور خطر برای ابتلا به ناباروری ایدیوپاتیک هستند.

بحث

عوامل مربوط به ناباروری شامل سن، قرار گرفتن در معرض بیماری‌های مقاربتی و فرکانس مقاربت و همچنین عادات رژیم غذایی، شیوه زندگی و ژنتیک است. ناباروری به‌عنوان یک بیماری مطرح شده و علت آن اختلال عمده ی سیستم‌های اندام‌های اصلی و فعالیت‌های زندگی محسوب می‌شود (۴). در ابتدا نقشTNFR1 به‌عنوان گیرنده‌ی ژن TNFα که یک سیتوکین پیش التهابی است، مورد توجه قرار گرفت. بیان این ژن در دستگاه تناسلی زن و مرد نشان می‌دهد که آن‌ها در باروری نقش دارند (۱۹). همچنین برای انجام اسپرماتوژنز، حضور TNFα بسیار ضروری است (۲۰). TNF-α، اسپرماتوژنز را تحت تاثیر قرار داده و موجب ارتباط میان سلول‌های محتلفی در بیضه شده و تنظیمات هورمونی هنگام مهاجرت سلول‌های زایا را انجام می‌دهند. اگر چه سیستم ایمنی بدن ممکن است منبع اصلی تولید سیتوکین باشد، اما سلول‌های مختلف دیگر در دستگاه ادراری– تناسلی مردان نیز سیتوکین‌ها را ترشح می‌کنند که بر عملکرد اسپرم و باروری موثر هستند (۲۱).

با توجه به چندعاملی بودن ناباروری تاکنون نقش ژن‌های مختلفی در ایجاد آن مورد بررسی قرار گرفته که یکی از این ژن‌ها TNFR1 می‌باشد. Lazaros و همکاران TNFR1 (۱۷) را به‌عنوان یک فاکتور خطر در استعداد ابتلا به ناباروری معرفی کردند. Tronchon و همکاران (۲۲) در کشور فرانسه دریافتند پلی مورفیسم ژن TNF-α با کاهش مقدار اسپرم ارتباط دارد. همچنین Zalata و همکاران (۲۰) طی تحقیقاتی که روی پلی مورفیسم ژن TNF-α انجام دادند دریافتند که موجب ناباروری در مردان می‌شود. با توجه به نقش مهم گیرنده‌های TNF-α و پلی مورفیسم‌های آن در بسیاری از بیماری‌ها مانند اختلالات عصبی، اوتیسم، آلزایمر و برخی بیماری‌های مربوط به زنان مانند اندومتریوز و... در این پژوهش به بررسی ارتباط پلی مورفیسم ناحیه 36A/G ژن TNFR1 با ناباروری ایدیوپاتیک مردان پرداخته شد. در پژوهش کنونی تفاوت معنی‌داری بین جمعیت بیمار و کنترل در توزیع فراوانی ژنوتیپی (P= 0.002, Odds ratio= 2.65, 95%CI= 1.42-4.97) و توزیع فراوانی آللی (P= 0.0004, Odds ratio= 1.99, 95%CI= 1.36-2.91) مشاهده شد. این نتیجه محدود به جمعیت مورد مطالعه حاضر(۱۱۴ مرد سالم و ۱۰۶مرد مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک) می باشد. نتایج پیشنهاد می‌کند که پلی مورفیسم TNFR1 36A/G به‌عنوان فاکتور خطر برای ناباروری ایدیوپاتیک مردان مطرح می‌باشد. اگرچه مطالعات بیشتر درمورد ژنTNFR1 جهت درک بهتر نقش این ژن در ناباروری ایدیوپاتیک مردان مورد نیاز می‌باشد.

در مجموع، شاید بتوان نقش ژنتیک را در ارتباط با پلی مورفیسم و استعداد ابتلای به ناباروری ایدیوپاتیک موثر دانست اما نتایج متفاوت در بررسی پلی مورفیسم‌های ژنی می‌تواند به‌علت خزانه ژنی متفاوت، میزان جمعیت مورد بررسی و تکنیک‌های مورد استفاده باشد و ممکن است نتیجه‌ی به‌دست آمده با تغییر خزانه‌ی ژنتیکی یا تغییر معنی‌دار اندازه‌ی جمعیت تغییر کند. در این مطالعه تنها به بررسی یک وجه از یکی از عوامل دخیل پرداخته شده لذا همچنان نقش سایر ژن‌ها، عوامل محیطی و حتی سایر پلی مورفیسم‌های شناخته شده در ژن مورد مطالعه، در ایجاد و بروز ناباروری قابل تامل و دخیل است.

نتیجه گیری

به‌طور کلی نتیجه گیری می‌شود که پلی مورفیسم TNFR1 36A/G به‌عنوان فاکتور خطر برای ناباروری ایدیوپاتیک مردان در جمعیت استان گیلان مطرح باشد.

تشکر و قدردانی

از آزمایشگاه تکوین دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان به‌دلیل فراهم آوردن تجهیزات، از همکاری کارکنان بخش ناباروری بیمارستان الزهرا (س) و همچنین آزمایشگاه رازی رشت در تهیه نمونه‌ها صمیمانه تشکر می‌شود.

منابع

1. Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. Singapore Med J. 2009; 50(4): 336-47.
2. Bayasgalan G, Naranbat D, Radnaabazar J, Lhagvasuren T. Male infertility: risk factors in Mongolian men. Asian J Androl. 2004; 6(4): 305-11.
3. Volarevic V, Bojic S, Nurkovic J, Volarevic A, et al. Stem Cells as New Agents for the Treatment of Infertility: Current and Future Perspectives and Challenges. Biomed Res Int. 2014; 507234.
4. Damario MA. General aspects of fertility and infertility. Methods Mol Biol. 2014; 1154: 3-23.
5. Imamovic Kumalic S, Pinter B. Review of Clinical Trials on Effects of Oral Antioxidants on Basic Semen and Other Parameters in Idiopathic Oligoasthenoteratozoospermia. Biomed Res Int. 2014(6); 426951.
6. Olooto WE. Infertility in male; risk factors, causes and management- A review. Journal of Microbiology and Biotechnology Research. 2012; 2(4): 641-645.
7. Al-Achkar W, Wafa A, Moassass F. Cytogenetic abnormalities and Y-chromosome microdeletions in infertile Syrian males. Biomed Rep. 2013; 1(2): 275-279.
8. Zaimy MA, Kalantar SM, Sheikhha MH, Jahaninejad T, et al. The frequency of Yq microdeletion in azoospermic and oligospermic Iranian infertile men. Iran J Reprod Med. 2013; 11(6): 453-8.
9. Ambulkar PS, Sigh R, Reddy M, Varma PS, et al. Genetic Risk of Azoospermia Factor (AZF) Microdeletions in Idiopathic Cases of Azoospermia and Oligozoospermia in Central Indian Population. J Clin Diagn Res. 2014; 8(3): 88-91.
10. Cho SM, Kim J, Ryu HJ, Kim JJ, Kim HH, Park JH, Kim HT, Kim KH, Cho HY, Oh B, Park C, Kimm K, Jo I, Lee JE, Shin HD, Lee JK. Identification of single nucleotide polymorphisms in the tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor superfamily in the Korean population. Hum Immunol. 2004; 65: 710-8.
11. Katherine LO, Flynn O, Brien BA, Alex C. Varghese, Ph.D., Agarwal A., Ph.D. The genetic causes of male factor infertility: A review by American Society for Reproductive Medicine. 2010; 93(1): 1–12.
12. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. 2009; 78(6): 539-52.
13. Kumar A, Abbas W, Herbein G. TNF and TNF receptor superfamily members in HIV infection: new cellular targets for therapy? Mediators Inflamm. 2013; 484378.
14. Wertz IE, Dixit VM. Ubiquitin-mediated regulation of TNFR1 signaling. Cytokine Growth Factor Rev. 2008; 19(3-4): 313-24.
15. Lysiak JJ. The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis. Reprod Biol Endocrinol. 2004; 2:9.
16. Eggert-Kruse W, Kiefer I, Beck C, Demirakca T, et al. Role for tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin 1-beta (IL-1beta) determination in seminal plasma during infertility investigation. Fertil Steril. 2007; 87: 810-23.
17. Lazaros LA, Xita NV, Chatzikyriakidou AL, Kaponis AI, et al. Association of TNFα, TNFR1, and TNFR2 polymorphisms with sperm concentration and motility. J Androl. 2012; 33: 74-80.
18. Kosova G, Scott NM, Niederberger C, Prins GS, et al. Genome-wide association study identifies candidate genes for male fertility traits in humans. Am J Hum Genet. 2012; 90(6): 950-61.
19. Said TM, Agarwal A, Falcone T, Sharma RK, et al. Infliximab may reverse the toxic effects induced by tumor necrosis factor alpha in human spermatozoa: an in vitro model. Fertil Steril. 2005; 83(6): 1665-73.
20. Zalata A, Atwa A, Badawy AEN, Aziz A, et al. Tumor Necrosis Factor-α Gene Polymorphism Relationship to Seminal Variables in Infertile Men. UROLOGY. 2013; 81: 962-966.
21. Shukla KK, Agnihotri S, Gupta A, Mahdi AA, et al. Significant association of TNFα and IL-6 gene with male infertility--an explorative study in Indian populations of Uttar Pradesh. Immunol Lett. 2013;156(1-2): 30-7.

22. Tronchon V, Vialard F, El Sirkasi M, Dechaud H, et al. Tumor necrosis factor-alpha -308 polymorphism in infertile men with altered sperm production or motility. Hum Reprod. 2008; 23: 2858-66.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Spring 2016; 7(1): 103-110

Original Article

Association of TNFR1 gene polymorphism and idiopathic male infertility

Bagheri Matak M, M.Sc.[1], Mashayekhi F, Ph.D.[1*], Bahadori MH Ph.D.[2]

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
2. Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

* Email corresponding author: mashayekhi@guilan.ac.ir

Received: 26 Oct. 2015 Accepted: 24 Apr. 2016

Abstract

Aim: Infertility is the failure of a couple to engender after endeavoring at least one year of unprotected intercourse. male factor infertility accounts for approximately 50 percent of causes. Tumor necrosis factor-α (TNFα) is a multifunctional cytokine. TNF-α plays important role in the regulation of cellular processes related to spermatogenesis. There are two variants of the cell receptors that interacts with TNF-α. In the present study, the association of TNFR1 36A/G polymorphisms with idiopathic male infertility in the Guilan population was studied.

Materials and Methods: This study consists of 106 infertile men and 114 fertile men as control group. Blood samples were taken and genomic DNA was extracted. Then genotypes and allele frequencies were assessed by PCR-RFLP method and the statistical analysis was performed by MedCalc software.

Results: The frequencies of AA, AG, GG genotypes in patients were 41.5%, 7.5% and 50.9%, respectively and in controls were 45.6%, 33.3%, and 21.1%, respectively. The frequencies of A and G in patients were 0.45 and 0.55, respectively and in controls were 0.62 and 0.38, respectively. The results showed that there is a significant association between genotype frequency (p= 0.002) and allele frequency (p= 0.0004) in infertile and control groups.

Conclusion: In conclusion, the subjects with G allele and GG genotype appears to be at greater risk of developing idiopathic infertility in Guilan province. Further studies with larger numbers of patients are required to elucidate the potential role of TNFR1 polymorphism in male infertility.

Keywords: Polymorphism, Male infertility, Spermatogenesis, Tumor necrosis factor-α receptor