مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۱۱، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹

بررسی ارتباط بیان ژن آنتی اکسیدانتی NRF2 و کیفیت اسپرم در مردان نابارور آستنوتراتوزواسپرمی

راحیل جنتی فر Ph.D، لیلا ناصرپور .M.Sc، سیده سعیده صحرایی .M.Sc، حمید پیروزمنش.M.Sc*

- بخش تحقیقات، گروه بیولوژی تولید مثل، مرکز جهاد دانشگاهی، قم، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول:hp457@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۴/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۱۷

چکیده

هدف: هدف این مطالعه، بررسی ارتباط بیان ژن آنتی اکسیدانتی فاکتور هسته‌ای اریتروئید ۲ مرتبط با فاکتور ۲ (NRF2) و کیفیت اسپرم در مردان نابارور آستنوتراتوزو اسپرمی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه در مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم، ایران انجام شد. در این مطالعه ۵۰ فرد نابارور آستنوتر اتوزواسپرمی و ۵۰ فرد بارور به‌عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. پارامترهای اسپرمی مطابق WHO (۲۰۱۰) مورد بررسی قرار گرفت. قطعه قطعه شدن DNA اسپرم، بیان ژن NRF2 و سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی به‌ترتیب با کیت TUNEL، Real Time PCR و ELISAبررسی شد. سطح معنی‌داری به‌صورت p<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج: نتایج نشان داد که سطح بیان ژن NRF2 در بیماران آستنوتراتوزو اسپرمی نسبت به گروه بارور کمتر بود (p<۰/۰۵).کیفیت پارامترهای اسپرمی و سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی نیز نسبت به گروه بارور پایین‌تر بود (p<۰/۰۵). ارتباط معنی‌داری بین بیان ژن NRF2، پارامترهای اسپرم و سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی مشاهده شد (p<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: یافته‌های ما نشان داد که میزان بیان ژن NRF2 در مردان آستنوتراتوز اسپرمی با پارامترهای اسپرم ارتباط معنی‌داری دارد. این نشان می‌دهد که NRF2 برای اسپرماتوژنز مهم است و می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر مفید در تشخیص ناباروری مردان باشد.

واژگان کلیدی: ناباروری، فاکتور هسته ای اریتروئید ۲، کیفیت اسپرم، آستنوتراتوزو اسپرمی

مقدمه

یکی از علل اصلی ناباروری در مردان، تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) یا کاهش سیستم آنتی اکسیدانتی در دستگاه تناسلی و اسپرم است یا در اصطلاح عدم تعادل بین میزان شکل‌گیری ROSها یا سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی است که شرایط را برای استرس اکسیداتیو ایجاد می‌کند و در نهایت منجر به اختلال در عمل‌کرد و ساختار اسپرم شامل پراکسیداسیون لیپید، از دست دادن تحرک، آسیب DNA و کاهش قابلیت بقا اسپرم می‌شود (۱). ژن‌های آنتی اکسیدانتی و آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی نقش مهمی در روند اسپرماتوژنز دارند؛ تنظیم این فرایند از طریق بیان ژن بسیار مهم است، در انسان، سطح پایین آنزیم آنتی اکسیدانتی و کاهش بیان mRNA ژن‌های آنتی اکسیدانتی باعث اختلال در چرخه سلولی و آسیب به DNA اسپرم می‌شود که در نهایت کاهش شانس لقاح و ناباروری می‌شود (۲ و ۳). اسپرماتوزوا و پلاسمای منی حاوی آنزیم‌های مهم آنتی اکسیدانتی، مانند کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) است که در برابر استرس اکسیداتیو سلول را محافظت می‌کنند (۴ و۵).

فاکتور هسته‌ای اریتروئید ۲ Nucleus erythroid factor 2 (NRF2) یک تنظیم کننده کلیدی سیستم‌های دفاعی در بدن در مقابله با استرس اکسیداتیو است. این فاکتور از اعضای فاکتورهای رونویسی خانواده Cap-N-Collar است مسیر NRF2-ARE به‌عنوان یک شاخص و تنظیم کننده اصلی استرس اکسیداتیو می‌باشد که توانایی تعدیل بیان صدها ژن آنتی‌اکسیدانت و سم زدایی را دارد (۶). این مسیر در تنظیم حالت تعادل بین وضعیت استرس اکسیداتیو و مهار آن توسط فاکتورهای آنتی اکسیدانتی سلول نقش کلیدی دارد. تحت شرایط هومئوستاتیک طبیعی، فاکتور رونویسی 2FRN در سیتوپلاسم توسط (1paeK) 1 nietorp detaicossa-HCE ekil-hcleK مهار می‌شود، در حضور SOR، 2FRN از 1paeK جدا شده و به‌درون هسته منتقل می‌شود و در ناحیه پروموتور ژن‌های کد کننده آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی متصل شده و بیان ژن آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی را القا میکند (۷، ۸). این آنزیم‌ها شامل TAC،DOS ، XPG می‌باشد که نقش مهمی در مقابل استرس اکسیداتیو ایفا می‌کنند. عامل فاکتور ۲ فاکتور اریتروپوئن هسته)2FRN(نقش مهمی در جلوگیری از رشد استرس اکسیداتیو در اسپرماتوژنز دارد (۹). یو و همکاران (۰۱) نیز نشان دادند که هم‌بستگی قوی بین اختلال عمل‌کردی در بیان ژن 2FRN و اسپرماتوژنز غیرطبیعی در انسان وجود دارد که می‌تواند حاکی از آن باشد که کاهش تولید آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی درونی به‌واسطه بیان ژن 2FRN در شرایط استرس اکسیداتیو در عمل‌کرد صحیح اسپرم دخالت دارد. استفاده از آنتی اکسیدانت‌ها می‌توانند از کاهش تحرک، افزایش مرگ‌ومیر و آسیب AND اسپرم‌ها توسط شرایط استرس اکسیداتیو در افراد نابارور جلوگیری کنند (۱۱ و ۲۱). در واقع 2FRN می‌تواند به‌عنوان مارکر مناسبی برای تشخیص SOR در ارتباط با ناباروری مردان دانست. به‌طوری‌که کیفیت پایین اسپرم در ارتباط با بیان غیرطبیعی ANRm این ژن می‌باشد (۳۱) که بسیاری از پارامترها ازجمله غلظت، میزان حرکت و مورفولوژی نرمال اسپرم‌ها وابسته به بیان مناسب آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی است که خود در گرو بیان مناسب ژن 2FRN می‌باشد (۴۱). هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط بیان ژن 2RFN و کیفیت اسپرم در مردان نابارور آستنوتراتوزواسپرمی است. نتایج این مطالعه می‌تواند در درک عمل‌کرد اسپرم‌ها از طریق تنظیم مسیر مولکولی در انسان مفید باشد.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه حاضر، کاربردی است. پس از تایید طرح در کمیته اخلاقی (IR.IAU.Qom.REC.1396.55)، رضایت‌نامه آگاهانه اخذ و اطلاعات بیماران (نام، نام خانوادگی، سن، مدت زمان ازدواج و...) به‌صورت محرمانه نگه‌داری شد. این مطالعه

به‌روش مورد شاهدی است که با نمونه‌گیری تصادفی از بین ۵۰ بیمار مرد نابارور (آستنوتراتوزواسپرمی) در محدوده سنی ۲۰ تا ۴۰ سال که توسط پزشک متخصص ارولوژیست تایید شده و برای درمان به مرکزفوق تخصصی درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم مراجعه کردند، انتخاب شدند. مردانی که دارای واریکوسل، سابقه جراحی واریکوسل، بیماری سیستمیک و یا در حال مصرف دارو برای بیماری سیستمیک، سابقه شیمی‌درمانی یا پرتودرمانی، مشکلات آناتومیکی در اندام تناسلی ازجمله آتروفی بیضه، تعداد کم اسپرم (الیگو) یا آزوسپرمی، درمان با آنتی آندروژن یا آندروژن یا تستوسترون، درمان با مهار کننده‌های آروماتاز یا آنتی استروژن، درمان با داروهای ضدافسردگی باشند، از مطالعه حذف شدند. گروه کنترل در این مطالعه ۵۰ مرد بارور بودند.

نمونه مایع منی در فاصله ۳ تا ۴ پس از مقاربت جنسی جمع‌آوری شد. هر نمونه پس از ارسال به آزمایشگاه، مدت ۲۰ دقیقه برای مایع شدگی (Liquefaction) در دمای اتاق قرار گرفت. سپس آنالیز مایع منی بر اساس استانداردها و معیارهای سازمان بهداشت جهانی (۱۵) انجام گرفت.

ارزیابی پارامترهای اسپرمی: جهت بررسی پارمترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی) با استفاده از میکروسکوپ نوری و بر اساس سازمان استاندارد جهانی (۲۰۱۰) صورت گرفت . شمارش اسپرم‌ها برحسب میلیون بر لیتر توسط لام نئوبار انجام شد. بررسی میزان تحرک اسپرم‌ها براساس (WHO,2010) اندازه‌گیری شد. درصد تحرک کل اسپرمی باید کمتر از ۴۰ درصد و حرکت پیش‌رونده (a+b) کم‌تر از ۳۲ درصد باشد. برای بررسی مورفولوژی نرمال اسپرم‌ها از روش رنگ‌آمیزی پاپانیکولا استفاده شد (۱۵). در رنگ‌آمیزی پاپانیکولا، سر به‌رنگ آبی و قطعه میانی به‌رنگ قرمز یا صورتی درمی‌آید. جهت بررسی مورفولوژی اسپرم، ابتدا از هر نمونه گسترش تهیه شد سپس به‌صورت یک‌جا رنگ‌آمیزی پاپانیکولا انجام شد. رای هر نمونه، یک لام فیکس شده از اسپرم تهیه شد. پس از رنگ‌آمیزی ۲۰۰ اسپرم توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰X بررسی شد.

ارزیابی آسیب DNA با روش TUNEL: میزان آسیب DNA با استفاده از روش TUNEL (Apoptosis Detection System Fluorescein, Promega, Mannheim, Germany) بررسی شد (۱۶). ابتدا مایع منی دوبار با بافر فسفات سالین PBS= Phosphate Buffer Saline شست‌وشو شده و پس از تهیه اسمیر برروی لام و فیکس با پارافرمالدهید ۴ درصد، در معرض هوا خشک شد. کیت TUNEL شرکت پرومگا (آلمان) خریداری شد و طبق دستورالعمل آن، اسلایدها رنگ‌آمیزی شدند. در این روش، رنگ فلئورسنت توسط آنزیم rTdT به‌انتهای قطعات شکسته DNA اتصال می‌یابد و DNA، fluorescein- 12-dUTP نشان‌دار می‌کند. رنگ سبز فلئورسنت مشاهده شده در ناحیه خلفی سر اسپرم نشانگر اسپرم‌ها با آسیب DNA رنگ قرمز نشان‌گر اسپرم‌ها با DNA سالم هستند. در هر نمونه در حدود ۵۰۰ اسپرم با استفاده از میکروسکوپ فلئورسانس (BX51, Olympus, Japan) با بزرگ‌نمایی × ۱۰۰ بررسی شد.

ارزیابی سطح فاکتورهای بیوشیمیایی (آنزیم های آنتی اکسیدانتی): ظرفیت تام آنتی اکسیدانتی (TAC) با استفاده از کیت‌های موجود در بازار (Zell Bio GmbH، Wurttemberg، Germany) اندازه‌گیری شد. دامنه تشخیص توسط ELIZA – ELIZAمیلی‌لیتر (۱۲۵-۲۰۰۰ میلی‌مول در لیتر) بود. سطح مالون‌دی‌آلدئید توسط (MAD) ELIZA Kit Catalog (Abnova Number KA3736-OD-532nm) شناسایی شد. سطح سوپراکسید دیسموتاز (SOD) توسط (Abnova ELIZA Kit Catalog Number KA0783-OD-450nm) و کاتالاز (CAT) توسط (Abnova ELIZA Kit Catalog Number KA0884-OD-570nm) تعیین شد. گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) توسط(KA0882 Abnova ELIZA Kit Catalog Number-OD-340nm) اندازه‌گیری شد.

ارزیابی بیان ژن NRF2: استخراج RNA از سلول‌ها با استفاده از کیت RNX plus(SINACLON,EX6101) و دستورالعمل ارایه شده، صورت پذیرفت. غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ خوانده شد و نسبت جذب 260 به 280 محاسبه و کیفیت سنجی RNA روی ژل آگارز انجام شد. به‌منظور صحت از استخراج روی ژل آگارز ۱ درصد برده شده و در صورت مشاهده باند شارپ 28srRNA و باند 18srRNA و صحت از اطمینان استخراج و عدم آلودگی به DNA ژنومی، RNA استخراج شده تا زمان انجام ادامه مراحل به۷۰- درجه سانتی گراد منتقل شد. ۱ میکروگرم از RNAی استخراج شده، توسط کیت (cDNA synthesis kit,catNO,YT4500,yektatajhiz) طبق دستورالعمل ارائه شده، به cDNA تبدیل شد. cDNAهای سنتز شده تا زمان انجام بقیه مراحل در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد منتقل شدند.پس از سنتز cDNA مواد واکنش برای انجام واکنشReal-Time PCR به‌صورت زیر تهیه شد؛ ۱۰ میکرولیتر مستر میکس 2X بدون رنگ ROX شرکت آمپلیکون،۱میکرولیتر پرایمر رو به جلو، ۱میکرولیتر پرایمر برگشتی،۱ میکرولیتر cDNA سپس ۷ میکرولیتر آب Nuclease-Free اضافه شد و واکنشReal-Time PCR با استفاده از دستگاه Rotor-Gene 6000 (Corbett, Australia) انجام شد. ژن GADPH به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. پرایمرهای رو به جلو و برگشتی ژن NRF2 توسط نرم افزار oligo5 طراحی شد. مرحله دناتوراسیون یک سیکل ۱۵دقیقه‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و مرحله آمپلی‌فیکاسیون ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ژن GAPDH و ۳۰ ثانیه در دمای ۵۹ درجه برای ژن NRF2 و ۲۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۴۰ سیکل انجام شد. مقادیر $\Delta\Delta Ct, \Delta Ct$ با استفاده از نرم افزار Excel و Ct حاصله از مرحله قبل محاسبه شد و با استفاده از نرم افزار spss مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

آنالیز آماری

نتایج به‌دست آمده از این مطالعه با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ۲۱ انجام شد. ابتدا با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف نرمال یا غیرنرمال بودن مشخص شد و سپس درصورتی‌که نرمال باشد از آزمون آماری independent t-test و درصورتی‌که نرمال نباشد از آزمون یومن ویتنی استفاده شد. برای بررسی هم‌بستگی بین پارامترها از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. سطح معنی‌داری به‌صورت $p<۰/۰۵$ درنظر گرفته شد. در این مطالعه نتایج به‌صورت Mean ± SD بیان شد.

نتایج

بررسی پارامترهای اسپرمی

جدول ۱ میانگین پارامترهای اسپرمی را بین دو گروه آستنوتراتوزواسپرمی و کنترل را نشان می‌دهد. حجم نمونه مایع منی و غلظت اسپرم بین دو گروه تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد ($p>۰/۰۵$) این درحالی است که میزان تحرک کل اسپرم‌ها، تحرک پیشرونده اسپرمی و مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم در بیماران مبتلا به آستنوتراتوزواسپرمی پایین‌تر از افراد بارور می‌باشد ($p<۰/۰۵$). در بررسی میزان آسیب DNA به‌روش TUNEL مشاهده شد که میزان آسیب DNA یا DNA فراگمنتاسیون در افراد نابارور آستنوتراتوزواسپرمی به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه بارور بالاتراست ($p<۰/۵۰$).

جدول ۱: مقایسه پارامترهای اسپرمی بین افراد نابارور و بارور

فاکتور اندازه گیری شده	افراد نابارور(آستنو تراتوزو اسپرمی)	افراد بارور	P-value
حجم(ml)	۳/۵۸ ± ۰/۸۸	۴/۰۲ ±۱/۳۲	p>۰,۰۵
غلظت اسپرمی($\times 10^6$)	۴۶/۵۲±۵/۸۰	۵۴/۰۶±۶/۵۱	p>۰,۰۵
تحرک کل اسپرمی(٪)	۳۶/۴۲±۵/۲۰	۶۸/۱۸±۵/۹۱	P<۰,۰۵
تحرک پیشرونده اسپرمی(a+b)(%)	۱۵/۶۰±۱/۸۱	۳۴/۵۴±۱/۶۳	P<۰,۰۵
مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم(٪)	۹۸/۱۲± ۱/۶۶	۹۰/۲ ±۱/۱۶	P<۰,۰۵
درصدآسیبDNA(٪)	۱۹/۳۴± ۲/۴۷	۱۰/۱۴±۱/۳۴	P<۰,۰۵

بررسی سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی

مقایسه سطح TAC و MDA در مایع سمینال افراد نابارور آستنوتراتوزواسپرمی و افراد بارور در جدول ۲ نشان داده شده است. نتیجه حاصل از تحقیق ما نشان می‌دهد سطح ظرفیت تام اکسیدانتی در افراد بارور به‌طور معنی‌داری بالاتر است (p<۰/۰۵). از طرفی غلظت MDA در مایع سمینال میزان پایین‌تری را نشان می‌دهد (p<۰/۰۵). بررسی سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی SOD، CAT و GPX نیز افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه نابارور آستنوتراتوزواسپرمی نشان می‌دهد (p<۰/۰۵).

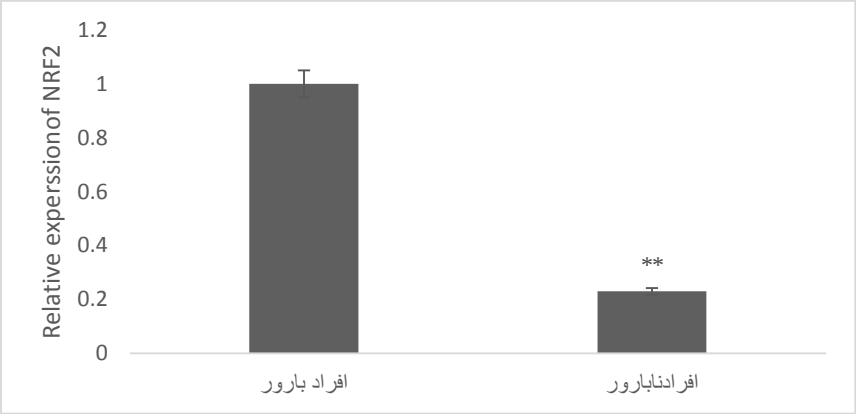
جدول ۲: مقایسه سطح آنزیم های آنتی اکسیدانتی در افراد نابارور و بارور

فاکتورهای بیوشیمیایی	افراد نابارور(آستنو تراتوزو اسپرمی)	افراد بارور	P-value
TAC(µM)	۱,۸۲±۰,۱۱	۳,۵۱±۰,۱۳	P=۰,۰۰۱
MDA(µM)	۳,۳۶±۰,۱۰	۱,۹۷±۰,۰۹	P=۰,۰۱
CAT(U/ml)	۱۳,۴۴±۲,۶۳	۳۸,۰۴±۱,۷۹	P=۰,۰۰۵
SOD(U/ml)	۰,۱۴±۰,۱۴	۰,۲۵±۰,۰۰۶	P=۰,۰۰۱
GPX(U/ml)	۱۴۴±۱۲,۶۸	۳۷۸ ±۱۳/۲۵	P=۰,۰۰۱

بررسی بیان ژن NRF2 و ارتباط با پارامترهای اسپرمی

میزان بیان ژن از طریق $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. میزان بیان ژن NRF2 در اسپرم افراد بارور نسبت به افراد نابارور آستنوتراتوزواسپرمی افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد (p<۰/۰۰۱، ۱±۰/۱۱ VS ۳/۴۹±۰/۱۴) نمودار (۱). ارتباط معنی‌داری بین بیان ژن NRF2 و پارامترهای اسپرمی مشاهده شد. بین ژن NRF2 با میزان تحرک اسپرم‌ها رابطه مستقیم دارد درحالی‌که با مورفولوژی غیرنرمال اسپرم‌ها و میزان آسیب DNA ارتباط منفی دیده می‌شود جدول (۳) (p<۰/۰۵). در این مطالعه هم‌چنین ارتباط معنی‌داری بین بیان ژن NRF2 و سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی وجود دارد جدول (۴) (p<۰/۰۵).

نمودار ۱: مقایسه بیان ژن NRF2 در بیماران آستنوتراتوزواسپرمی و افراد بارور را نشان می دهد. میزان بیان ژن NRF2 در افراد نابارور به طور معنی داری کمتر از افراد بارور است (ستاره نشانگر اختلاف معنی دار است) (P<0.05).



جدول ۳: ارتباط و همبستگی بین میزان بیان ژن NRF2 با پارمترهای اسپرمی (p<0.05).

پارامترهای اسپرمی	NRF2	
	r	p
تحرک اسپرم(٪)	۰/۳۱۱۱	۰/۰۰۶
مورفولوژی غیر نرمال اسپرم (٪)	-۰/۳۰۶	۰/۰۰۴
میزان آسیب (DNA) (٪)	-۰/۴۱۱	۰/۰۰۲

جدول ۴: ارتباط و همبستگی بین میزان بیان ژن Nrf2 با سطح آنزیم های آنتی اکسیدانتی (p<0.05).

پارامترهای اسپرمی	NRF2	
	r	p
TAC	۰/۳۳۳	۰/۰۳
MDA	-۰/۳۱۶	۰/۰۱
SOD	۰/۸۱۱	۰/۰۲
CAT	۰/۲۲۶	۰/۰۴
GPX	۰/۱۸۴	۰/۰۴

بحث

تصور می‌شود که استرس اکسیداتیو نقش اصلی را در بیماریی‌زایی دارد که منجر به تولید گونه‌های اکسیژن فعال و ایجاد آسیب‌هایی به ماکرومولکول‌ها در سلول‌های هدف می‌شود (۴، ۱۷). گزارش شده است که فاکتور هسته‌ای اریتروئید 2 مرتبط با فاکتور NRF2 یک تنظیم کننده کلیدی سیستم‌های دفاعی قابل القای داخلی در بدن است و سطح بسیاری از آنتی اکسیدانت‌ها مانند گلوتاتیون S- ترانسفراز را افزایش می‌دهد. در شرایط آسیب اکسیداتیو NRF2 به هسته منتقل می‌شود و به عنصر پاسخ آنتی اکسیدانت (ARE) متصل می‌شود و توالی را برای آغاز رونویسی از ژن های آنتی اکسیدانتی حفاظت کننده سلول افزایش می‌دهد (۱۸، ۱۹). کشف تعدادی mRNA ژن‌های آنتی اکسیدانتی در اسپرم انزال شده انسان می‌تواند به‌عنوان یک تشخیص مولکولی برای ناباروری مردان مفید باشد (۲۰، ۲۱).

در مطالعه حاضر سطح بیان ژن NRF2 در افراد نابارور آستنوتراتوزواسپرمی به‌طور معنی‌داری نسبت به افراد بارور کم‌تر است. این درحالی است که بررسی نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در افراد مبتلا به آستنوتراتوزواسپرمی تحرک و مورفولوژی طبیعی اسپرم به‌طور معنی‌داری نسبت به افراد بارور پایین‌تر است که با نتایج مطالعات دیگر مطابقت دارد (۲۲، ۲۳). هم‌چنین در افراد نابارور مبتلا به آستنوتراتوزاسپرمی میزان آسیب DNA نسبت به افراد بارور بالاتر است و اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد. ارتباط معنی‌داری که بین بیان ژن NRF2 و پارامترهای اسپرم در بیماران نابارور مشاهده شد به‌طوری‌که ارتباط مثبت و معنی‌داری بین بیان ژن NRF2 و تحرک اسپرم وجود دارد و ارتباط منفی و معنی‌داری بین اسپرم با موفولوژی غیرنرمال و میزان آسیب DNA مشاهده می‌شود. با بررسی نتایج فوق، می‌توان بیان کرد که کاهش بیان ژن NRF2 می‌تواند برکیفیت اسپرم تاثیرگذار باشد. مطالعات انجام شده نشان داده است که کاهش میزان کیفیت اسپرم با سطح mRNA ژن NRF2 در اسپرم ارتباط معنی‌داری دارد. در جدیدترین مطالعه انجام شده نشان داده شده است که اسپرم‌های که بیان ژن NRF2 کم‌تری دارند سرعت حرکت پایین‌تری را نشان می‌دهند (۲۴). در این تحقیق مشاهده شد که در افراد نابارور آستنوتراتواسپرمی میزان MDA در مایع سمینال بالا می‌باشد و سطح ظرفیت تام اکسیدانتی نیز کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد.

از آن‌جایی‌که همه غشاهای سلولی دارای دو لایه لیپید می‌باشند، بنابراین توسط عوامل اکسید کننده تحت تاثیر قرار گرفته و اکسیداسیون رخ می‌دهد (۲۵). ROS به غشای سلول حمله نموده، لیپیدها را اکسید کرده و مالون‌دی‌آلدئید MDA را ایجاد می‌نماید (۲۶). MDA یک آلدئید فعال است که در استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد (۲۷). وجود ژن NRF2 به‌عنوان ژن آنتی اکسیدانتی و MDA به‌عنوان مارکر استرس اکسیداتیو می‌تواند بیان‌گر این مسئله باشد که کاهش بیان این ژن باعث افزایش استرس اکسیداتیو و میزان MDA در اسپرم شد. هنگامی‌که سلول‌ها بیان ژن کم‌تری داشته باشند تجمع فاکتور رونویسیNRF2 در سیتوپلاسم و انتقال آن به‌داخل هسته کمتر می‌شد و در نتیجه آن، ژن‌های کد کننده آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی که پایین دست این مسیر هستند شامل SOD، CAT و GPX کاهش می‌یابد (۲۳). در این مطالعه کاهش بیان ژن NRF2 باعث کاهش سطح این آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی در سیمن پلاسمای شد. ارتباط معنی‌داری که بین بیان ژن NRF2 و آنزیم های آنتی اکسیدانتی وجود داشت نتایج فوق راکه کاهش بیان این ژن باعث کاهش فعال شدن رونویسی ژن‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی می‌شود را تایید می‌کند. در مطالعات قبلی انجام شده مشخص شده است که در اسپرم‌هایی که میزان بیان ژن NRF2 کم‌تر است سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی (SOD، CAT و GPX) کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (۲۸، ۲۹). در مطالعه‌ای گزارش شده است که کاهش سطح آنزیم SOD باعث اختلال در عمل‌کرد اسپرم می‌شود

(۳۰). هم چنین مطالعات انجام شده نشان داده است که آنزیمCAT یکی از آنزیم‌های آنتی اکسیدانت مهم داخل سلولی است و کاهش سطح این آنزیم باعث کاهش تحرک اسپرم می‌شود (۳۱).

کاهش سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی که در نتیجه کاهش بیان ژن NRF2 اتفاق می‌افتد، سبب می‌شود اسپرم‌ها بیشتر در معرض آسیب‌های استرس اکسیداتیو (ROS) قرار گیرند در واقع، عدم وجود یک سیستم آنتی اکسیدانتی کافی در سلول باعث می‌شود کیفیت پارامترهای اساسی اسپرم ازجمله غلظت، تحرک و موفولوژی اسپرم‌ها در افراد نابارور نسبت به افراد بارور پایین‌تر باشد. هم‌چنین میزان آسیب کروماتین اسپرم‌ها بیش‌تر شود و درنهایت می‌تواند موفقیت در باروری را تحت تاثیر قرار دهد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه فوق، نقش ژن آنتی اکسیدانتی NRF2 را در اسپرم در برابر آسیب‌های استرس اکسیداتیو تایید می‌کند. تفاوت معنی‌داری در سطح بیان mRNA این ژن تفاوت معنی‌داری بین گروه نابارور و بارور وجود دارد. هم‌چنین نتایج نشان می‌دهد که ارتباط بین بیان ژن NRF2 و عمل‌کرد معیوب اسپرم‌ها ممکن است ناشی از نقص سیستم محافظتی آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی در سلول اسپرم باشد. بنابراین بررسی بیان ژن NRF2 در اسپرم می‌تواند به‌عنوان یک نشان‌گر برای بررسی مارکرهای استرس اکسیداتیو، عمل‌کرد اسپرم و علل ناباروری مردان مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از پرسنل سخت کوش مرکز فوق تخصصی مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Tvrdá E, Kňažická Z, Bárdos L, Massányi P, et al. Impact of oxidative stress on male fertility—a review. Acta Veterinaria Hungarica. 2011; 59(4): 465-84.
2. Holstein A-F, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. Reproductive Biology and Endocrinology. 2003; 1(1): 1-16.
3. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Human reproduction update. 2003; 9(4): 331-45.
4. Wagner H, Cheng JW, Ko EYJAjou. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. 2018;16(1):35-43.
5. Bansal AK, Kaushik KJTI-AIJoRiaA. Role of Oxidative Stress, Reactive Oxygen Species & Antioxidants in Male Reproductive Functions. 2019; 9(1):35-45.
6. de Vries HE, Witte M, Hondius D, Rozemuller AJ, et al. Nrf2-induced antioxidant protection: a promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease? Free Radical Biology and Medicine. 2008;45(10):1375-83.
7. Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, et al. Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. Journal of Neuroscience. 2003;23(8):3394-406.

8. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, et al. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. Genes to Cells. 2003;8(4):379-91.
9. Nakamura BN, Lawson G, Chan JY, Banuelos J, et al. Knockout of the transcription factor NRF2 disrupts spermatogenesis in an age-dependent manner. Free Radical Biology and Medicine. 2010;49(9):1368-79.
10. Yu B, Lin H, Yang L, Chen K, et al. Genetic variation in the Nrf2 promoter associates with defective spermatogenesis in humans. Journal of molecular medicine. 2012;90(11):1333-42.
11. Liu F, Ng T. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. Life sciences. 2000;66(8):725-35.
12. Ng T, Liu F, Wang Z .Antioxidative activity of natural products from plants. Life sciences. 2000;66(8):709-23.
13. Robles V, Herraez P, Labbé C, Cabrita E, et al. Molecular basis of spermatogenesis and sperm quality. General and comparative endocrinology. 2017; 245: 5-9.
14. Kara R, Tasdemir P, Tuncez E, Gorkemli H, et al. NRF2 mRNA Expression in Ejaculate Spermatozoa from Men with Asthenozoospermia and Oligoasthenozoospermia. 2017; 1(2): 75-81.
15. Cooper TG, Noonan E, Von Eckardstein S, Auger J, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Human reproduction update. 2010;16(3):231-45.
16. Kheirollahi-Kouhestani M, Razavi S, Tavalaee M, Deemeh M, et al. Selection of sperm based on combined density gradient and Zeta method may improve ICSI outcome. 2009;24(10):2409-16.
17. Aitken RJ. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. 2017;84(10):1039-52.
18. Babaei Abraki S, Chavoshi-Nezhad S. Alzheimer’s disease: The effect of nrf2 signaling pathway on cell death caused by oxidative stress. 2015; 3(1): 145-56.
19. Vomund S, Schäfer A, Parnham MJ, Brüne B, et al. Nrf2, the master regulator of anti-oxidative responses. 2017;18(12):2772.
20. Lambard S, Galeraud-Denis I, Martin G, Levy R, et al. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. 2004; 1(7):535-41.
21. Jarzabek K, Mikucka-Niczyporuk A, Bielawski T, Milewski R, et al. Evaluation of Steroid Receptors mRNA Fingerprints in Two Groups of Normozoospermic Patients: Men from Unexplained Infertility Couples vs. Men from Couples with Tubal Factor Infertility. 2017;7(03):290.
22. Elsamanoudy A, Shaalan D, Abo El-khair SM, Gaballah M, et al. NRF2 gene expression and DNA fragmentation markers as possible predictors of chronic smoking induced spermatozoa dysfunction in infertility with normal seminogram. 2017;7(4):127-35.
23. Chen K, Mai Z, Zhou Y, Gao X, et al. Low NRF2 mRNA expression in spermatozoa from men with low sperm motility. 2012;228(3):259-66.

24. Jannatifar R, Parivar K, Roodbari NH, Nasr-Esfahani MH. The effect of N-acetyl-cysteine on the expression of Nrf2 Antioxidant gene in asthenoteratozoospermia men: A clinical trial study. 2020; 14(3): 171-175.
25. Masroor Sh, Muneshwar JN, Zingade US. Estimation of seminal MDA levels in infertility patients. 2013;4(4): 18-23.
26. Salimi S, Fazeli F, Khosravi P, Nabizadeh S. Association of Seminal Plasma Total Antioxidant Capacity and Malondialdehyde Levels With Sperm Parameters in Infertile Men With Varicocele. 2016;4(1):9-33540.
27. Hsieh Y-Y, Chang C-C, Lin C-SJIJoBS. Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. 2006;2(1):23-9.
28. Nakamura BN, Lawson G, Chan JY, Banuelos J, et al. Knockout of the transcription factor NRF2 disrupts spermatogenesis in an age-dependent manner. 2010; 49(9):1368-79.
29. Zelen I, Mitrović M, Jurišić-Škevin A, Arsenijević SJMp. Activity of superoxide dismutase and catalase and content of malondialdehyde in seminal plasma of infertile patients. 2010; 63(9-10):624-9.
30. Aitken RJ, Buckingham DW, Carreras A, Irvine DSJFRB, Medicine. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. 1996; 21(4): 495-504.
31. Jeulin C, Soufir J, Weber P, Laval-Martin D, et al. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. 1989; 24(2):185-96.

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Autumn 2020; 11(3)

The Correlation between NRF2Antioxidant Gene Expression and Sperm Quality in Asthenoteratozoospermia Men

Janati Far R Ph.D., Naser Pour L M.Sc., Sahraei SS M.Sc., Piroozmanesh H M.Sc.

. Research Department, Department of Reproductive Biology, University Jihad Center, Qom, Iran

* Email corresponding author: hp457@yahoo.com

Received: 22 Jun. 2020 Accepted: 7 Dec. 2020

Abstract

Aim: This study aimed to investigate the relationship between the expression of the antioxidant gene of the nuclear factor Erythroid 2 related to factor 2 (Nrf2) and sperm quality in asthenoteratozoospermia men.

Material and Methods: The study was conducted at the University Jihad Infertility Treatment Center in Qom, Iran. In this study, 50 infertile with asthenoteratozoospermia and 50 fertile individuals were enrolled as the control group. Sperm parameters were evaluated according to WHO (2010). Sperm DNA fragmentation, Nrf2 gene expression, and antioxidant enzyme levels were assessed with TUNEL, RT-PCR, and ELISA kits, respectively. The significance level was considered to be $p<0.05$.

Results: The results showed that the expression level of the NRF2 gene in patients with asthenoteratozoospermia was lower than the control group ($P <0.05$). The quality of sperm parameters and the level of antioxidant enzymes were lower than the control group ($P <0.05$). A Significant association was observed between gene expression of Nrf2 gene, sperm parameters and levels of antioxidant enzymes ($p<0.05$).

Conclusion: Our findings show that mRNA NRF2 expression is significantly associated with the quality of sperm parameters in asthenoteratozoospermia men. This suggests that NRF2 is important for spermatogenesis and may serve as a useful indicator in the diagnosis of male infertility.

Keywords: Infertility, Erythroid Nuclear Factor 2, Sperm Quality, Asthenoteratozoospermia