

The Association between rs763763348 and rs190628533 SNPs in CLCA4 Gene and Azoospermia

A. Jourabchi (MSc)¹, M. Khoshokhan-Mozaffar (PhD)^{*1}, N. Kalhor (MSc)²

1.Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, I.R.Iran.

2.Department of Mesenchymal Stem Cell, Academic Center for Education, Culture and Research, Qom Branch, Qom, I.R.Iran.

Article Type	ABSTRACT
Research Paper	Background and Objective: Spermatogenesis is a complex phenomenon that is influenced by various genes. One of these genes that is likely to be effective in causing azoospermia is CLCA4. This study was conducted to investigate the association between rs763763348 and rs190628533 single nucleotide polymorphisms in CLCA4 gene and azoospermia in Iranian men. Methods: In this cross-sectional study, blood samples were collected from 100 men suffering from non-obstructive azoospermia referred to Jihad Daneshgahi Infertility Treatment Center in Qom, as well as 100 fertile men who had at least one child and had healthy sperm test. The DNA of the samples was extracted by salting out method. Then, Tetra-primer ARMS PCR technique was used to check single nucleotide polymorphisms and the relationship between single nucleotide polymorphisms (SNPs) and male infertility was investigated. Findings: The mean age of healthy people was 33.12 ± 2.789 years and the mean age of patients was 32.54 ± 2.571 years. The mean level of FSH hormone in healthy and sick subjects was 6.86 ± 1.214 and 15.05 ± 2.078, respectively ($p < 0.0001$). The mean level of LH hormone in healthy people (4.12 ± 1.04) and in sick people (11.44 ± 1.54) showed a significant relationship ($p < 0.0001$). In all studied subjects, the genotype of 100% of the subjects regarding rs190628533 was CC and the genotype of 100% of subjects regarding rs763334876 was GG. There was no significant difference between the healthy and sick groups in the evaluation of these two SNPs. Conclusion: According to the results of this study, single nucleotide polymorphisms of rs190628533 and rs763334876 are not the cause of infertility due to azoospermia among Iranian men. Keywords: Azoospermia, Single Nucleotide Polymorphism, CLCA4 Gene, Male Infertility.

Received:

Oct 7th 2021

Revised:

Nov 16th 2021

Accepted:

Dec 6th 2021

Cite this article: Jourabchi A, Khoshokhan-Mozaffar M, Kalhor N. The Association between rs763763348 and rs190628533 SNPs in CLCA4 Gene and Azoospermia. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2022; 24(1): 290-8.



© The Author(S).

Publisher: Babol University of Medical Sciences

*Corresponding Author: M. Khoshokhan-Mozaffar (PhD)

Address: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, I.R.Iran.

Tel: +98 (25) 32804040. E-mail: m.khoshm@gmail.com

بررسی ارتباط دو اسنپ rs763763348 و rs190628533 در ژن CLCA4 با ناباروری مردان آزواسپرم

افسانه جورابچی (MSc)^۱، مریم خوش سخن مظفر (PhD)^{۱*}، ناصر کلهر (MSc)^۲

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

۲. گروه سلول های بنیادی مزانشیمال، جهاد دانشگاهی استان قم، قم، ایران

نوع مقاله

چکیده

مقاله پژوهشی

سابقه و هدف: اسپرماتوژنز پدیده پیچیده ای است که توسط ژن های مختلفی تحت تاثیر قرار می گیرد. یکی از این ژن ها که احتمال می رود در ایجاد آزواسپرمی مؤثر باشد CLCA4 است. این مطالعه به منظور بررسی ارتباط پلی مورفیسم دو اسنپ rs763763348 و rs190628533 در ژن CLCA4 با ناباروری آزواسپرمی در جمعیت مردان ایرانی انجام شده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی، از ۱۰۰ مرد مبتلا به ناباروری از نوع آزواسپرمی غیر انسدادی مراجعه کننده به مرکز ناباروری جهاد دانشگاهی استان قم، همچنین ۱۰۰ مرد بارور که دارای حداقل یک فرزند بوده و آزمایش اسپرم سالمی داشتند، نمونه خون گرفته شد. DNA نمونه ها به روش نمکی استخراج گردید، سپس از تکنیک Tetra-primer ARMS PCR برای بررسی پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی استفاده شد و ارتباط بین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی و ناباروری مردان بررسی گردید.

یافته ها: میانگین سنی افراد سالم $33/12 \pm 2/789$ و بیمار $32/54 \pm 2/571$ سال می باشد. میانگین میزان هورمون FSH در افراد سالم و بیمار به ترتیب $6/86 \pm 1/214$ و $15/05 \pm 2/078$ بود ($p < 0/0001$). میانگین میزان هورمون LH در افراد سالم $(4/12 \pm 1/04)$ و در افراد بیمار $(11/44 \pm 1/54)$ ارتباط معنی داری را نشان داد ($p < 0/0001$). در تمامی افراد مورد مطالعه، ژنوتیپ ۱۰۰٪ افراد مربوط به اسنپ rs190628533، CC و ۱۰۰٪ افراد با اسنپ rs763334876، GG بود. در بررسی پلی مورفیسم های دو اسنپ بالا، بین دو گروه سالم و آزواسپرم اختلاف معنی داری وجود نداشت.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه، پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی دو اسنپ rs190628533 و rs763334876 عامل ناباروری آزواسپرمی در میان جمعیت مردان ایرانی نیستند.

واژه های کلیدی: آزواسپرمی، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، ژن CLCA4، ناباروری مردان.

استناد: افسانه جورابچی، مریم خوش سخن مظفر، ناصر کلهر. بررسی ارتباط دو اسنپ rs763763348 و rs190628533 در ژن CLCA4 با ناباروری مردان آزواسپرم. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل، ۱۴۰۱؛ ۲۴(۱): ۸-۲۹.



© The Author(S).

Publisher: Babol University of Medical Sciences

این مقاله مستخرج از پایان نامه افسانه جورابچی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی قم می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر مریم خوش سخن مظفر

رایانامه: m.khoshm@gmail.com

آدرس: قم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی. تلفن: ۰۲۵-۳۲۸۰۴۰۴۰

مقدمه

ناباروری مردان یک حالت پیچیده بالینی است که می تواند علل متنوعی نظیر مشکلات آناتومیک، عفونت ها، آسیب وارده در اثر ضربات، بی نظمی های اندوکرین، مشکلات سیستم ایمنی و نقص های ژنتیکی را شامل شود. تاکنون پیرامون نقش ژنتیک در ناباروری مردان مطالعات فراوانی صورت گرفته است و تخمین زده می شود که عوامل ژنتیکی باعث ایجاد ۱۵ تا ۳۰ درصد از ناباروری های مردان هستند (۱). ناباروری به عدم توانایی زوجین در بچه دار شدن پس از حداقل یک سال مقاربت بدون استفاده از وسایل پیشگیری از بارداری اطلاق می شود (۲). بنا به گزارش سازمان بهداشت جهانی، ناباروری حدود ۸۰ میلیون زوج در سراسر دنیا را تحت تأثیر قرار داده است (۳) و ۱۵٪ از جمعیت ایران نازایی دارند (۱) که ۵۰٪ آنها وابسته به علل مردانه می باشد (۴). علت اصلی ناباروری در مردان، نقص در اسپرماتوژنز می باشد که به سه دسته کلی آرواسپرمی، الیگواسپرمی و آستوسپرمی تقسیم می شود. علاوه بر فاکتورهای مربوط به سبک زندگی (۵) جهش های ژنتیکی و ناهنجاری های کروموزومی می توانند با ناباروری مردان مرتبط باشند. اسپرماتوژنز یا فرآیند تولید سلول های جنسی مردانه در اثر تقسیمات میتوز و میوز در بیضه ها صورت می گیرد (۶).

به نظر می رسد اختلال و متاسیون هریک از ژن های مؤثر در اسپرماتوژنز، بتواند باعث ناباروری مردان شود. یکی از مشکلات اصلی در مردان نابارور، کاهش تعداد اسپرم طبیعی و یا توانایی حرکت اسپرم ها می باشد. در حال حاضر علی رغم اهمیت حرکت اسپرم در فرآیند تولید مثل، اطلاعات محدودی درباره مکانیسم های مولکولی مرتبط با ساختار و کارکرد حرکتی اسپرم در دست می باشد (۷و۱). مطالعات متعددی نشان داده است که روش های مولکولی می توانند به عنوان ابزار مفیدی در ارزیابی اختلالات اسپرماتوژنز در مردان دچار آرواسپرمی غیر انسدادی به کار روند. همچنین تأثیر ژن های اتوزومی زیادی بر ناباروری مردان بررسی شده است (۹-۷). چنانچه Arabi و همکاران، در پژوهشی بیان ژن SYCP3 (Synaptonemal Complex protection 3) را به عنوان یک مارکر مولکولی بالقوه برای اسپرماتوژنز معرفی نمودند؛ چرا که بیان این ژن در بیضه با مراحل پیشرفت اسپرماتوژنز ارتباط مشخصی دارد (۱۰). همچنین مشخص شد توسعه تکرارهای GT در پروموتور ژن Heme-Oxygenase بر ناباروری مردان الیگواسپرمی و آرواسپرمی مؤثر است (۱۱).

طبق بررسی های انجام شده، فراوانی دیزومی برای همه کروموزوم ها در بیماران نابارور نسبت به افراد شاهد بالاتر بوده و همچنین میزان آسیب DNA در اسپرم های افراد کم بارور به میزان معنی داری بالاتر از افراد طبیعی بود (۱۲). همچنین با تأثیر اشعه گاما بر ناپایداری ژنومی نواحی AZFc (Azoospermia Factors) در افراد آرواسپرمی و الیگواسپرمی، مشخص شد فراوانی ناپایداری ژنومی در نمونه های مردان نابارور نسبت به مردان بارور به میزان معنی داری بالاتر است (۱۳). Yatsenko و همکاران بر اساس آزمایشات صورت گرفته به این نتیجه دست یافتند که عامل اصلی توقف میوتیک و آرواسپرمی در مردان نابارور جهش های هموزیگوس TEX11 (Testis Expressed 11) است و تقریباً نیمی از موارد ناباروری در مردان با نقص های ژنتیکی ارتباط دارد (۱۴). در سال ۲۰۱۸ برای اولین بار درباره ژن TUSC1 (Tumor Suppressor Candidate 1) و پلی مورفسم های تک نوکلئوتیدی آن بر ناباروری مردان در جمعیت هاتریت (Hutterite) در آمریکا مطالعه ای انجام شد. در این مطالعه دانشمندان دریافتند که rs12348 در ژن TUSC1 با آرواسپرمی و الیگواسپرمی مرتبط می باشد (۵).

ژن CLCA4 در جایگاه کروموزومی 1p22.3 قرار دارد. دارای ۱۵ اگزون بوده و اندازه آن 33681bp است و از روی آن سه رونوشت ساخته می شود. این ژن به عنوان یک مهار کننده تومور است و از طریق مسیر سیگنالینگ PI3K/ AKT در سرطان ها دخالت می کند (۱۸-۱۵). این ژن تنظیم کننده کانال کلر است و با کلسیم فعال می شود و در نتیجه با ژن CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) مرتبط می باشد (۱۷). لازم به ذکر است ژن CFTR واقع در کروموزوم ۷، در بین جمعیت های اروپایی شیوع زیادی دارد و به عنوان علت اصلی آرواسپرمی غیر انسدادی شناخته شده است (۱۹). با توجه به مطالعات انجام شده و ارتباط ژن CLCA4 با ژن های دیگر و اعمال مختلف فیزیولوژیکی، دو اسنپ مربوط به این ژن انتخاب شد تا در افراد سالم و آرواسپرم بررسی شود و چنانچه این تغییر اختلاف معنی دار داشته باشد ارتباط آرواسپرمی با آنها مشخص شود. دلیل انتخاب دو اسنپ نیز مقاله Wang و همکاران (۲۰) و ارتباط آنها با آرواسپرمی، همچنین بررسی نشدن در جمعیت ایران می باشد. هدف دیگر، تعیین تفاوت در فراوانی ژنوتیپ های CC، CT و TT و آلل های C و T در اسنپ rs190628533 در دو گروه سالم و آرواسپرم و همچنین تعیین فراوانی ژنوتیپ های GA، GG، AA و آلل های G و A در rs763334876 در دو گروه سالم و آرواسپرم می باشد.

مواد و روش ها

این مطالعه مقطعی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم با کد IR.IAU.QOM.REC.1399.026 و اخذ رضایت نامه کتبی از شرکت کنندگان روی ۱۰۰ مرد مبتلا به آژواسپرمی غیر انسدادی و ۱۰۰ مرد سالم به عنوان گروه شاهد، از مراجعه کنندگان به مرکز ناباروری جهاد دانشگاهی استان قم طی سال های ۹۹-۱۳۹۸، انجام شد. گروه سالم افرادی هستند که بدون استفاده از روش های کمک باروری باردار شده و حداقل یک فرزند سالم دارند. افراد بیمار افرادی هستند که به تایید پزشک متخصص اورولوژیست رسیده اند. اختلالات آناتومیک دستگاه تناسلی، نئوپلاسم های بیضه، ناهنجاری های عددی و ساختاری کروموزومی، یا ریزحذف های کروموزوم Y ندارند.

پس از تشخیص آژواسپرمی غیر انسدادی توسط متخصص اورولوژی در مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی استان قم، پرسشنامه ای حاوی اطلاعات دموگرافیک، میزان هورمون های جنسی، شاخص توده بدنی، رابطه خویشاوندی بین والدین، سابقه بیماری در بستگان استعمال دخانیات، تهیه شد. به منظور تعیین ژنوتیپ افراد مورد مطالعه ۳ سی سی خون از آنها گرفته شد و درون تیوب های حاوی EDTA قرار داده شد. نمونه های جمع آوری شده به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. استخراج DNA از خون، با استفاده از روش نمکی (Salting out) انجام شد. نمونه های خون بعد از لیز شدن با EDTA و مراحل روتین شامل افزودن SDS و پروتئاز، نمک ۶ مولار و کلروفرم، همچنین رسوب DNA با الکل انجام شد و در نهایت DNA در ۵۰ لاندا آب مقطر دیونیزه حل شد و در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. جهت ارزیابی کمی و کیفی DNA استخراج شده، به ترتیب از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز استفاده شد. در نهایت در نمونه های DNA، با سنجش نسبت های جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر و همچنین نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر خالص ترین نمونه های DNA انتخاب و با باند های کیفی الکتروفورز تطبیق داده شدند.

در این تحقیق از روش Tetra Primer ARMS PCR برای تعیین ژنوتیپ اسنپ ها استفاده شد. این روش به دو پرایمر خارجی و دو پرایمر داخلی و اختصاصی آلل برای تعیین ژنوتیپ چند شکلی تک نوکلئوتیدی نیاز دارد. با توجه به این که روش مزبور از ۴ پرایمر در یک واکنش بهره می گیرد، بنابراین می توان هر دو آلل مارکر را به طور همزمان بررسی کرد. به همین دلیل ابتدا از سایت NCBI توالی FASTA مورد نظر استخراج شد و از طریق پایگاه اینترنت PRIMER1: primer design for tetra-primer ARMS-PCR پرایمرها طراحی شدند (جدول ۱).

جدول ۱. توالی چهار آغازگر استفاده شده برای دو اسنپ rs190628533 و rs763334876

اسنپ	شماره آغازگر	نوع آغازگر	توالی آغازگر
rs190628533	۱	درونی رفت (آلل T)	CAGAATGTGGAGAGAAAGGCGAAGAT
	۲	درونی برگشت (آلل C)	GTAGAAGGTCAGGGGTGAAGTGAAGT
	۳	بیرونی رفت (5'-3')	TTTTCTGATATTAACCATTTTTGCCACAAA
	۴	بیرونی برگشت (5'-3')	GAGCCAGGATTTGATTCTAGGGACTTT
rs763334876	۱	درونی رفت (آلل G)	TTTTCTTGCTTTTTTAATCTAGGGATCAG
	۲	درونی برگشت (آلل A)	CTTGATTCATTCGATTTAGGCGGGCT
	۳	بیرونی رفت (5'-3')	TATACGTGTCCATAATACACACCACCA
	۴	بیرونی برگشت (5'-3')	TAGGTAATCCTGCCATGAGTGTGTTTCT

جهت انجام PCR میزان مواد مخلوط و مراحل PCR برای دو اسنپ به این طریق انجام شد:

- در تکثیر اسنپ rs190628533، جهت شناسایی نوکلئوتید T، ده میکرولیتر ماستر میکس قرمز (TaqDNA Polymerase 2X Master Mix (Red)، آغازگرهای شماره ۱، ۳ و ۴ به ترتیب به میزان ۱، ۱ و ۲ میکرولیتر و DNA و آب مقطر نیز هر کدام ۳ میکرولیتر استفاده شد.
- جهت شناسایی نوکلئوتید C، نیز دقیقاً همین مواد و مقادیر فقط به جای آغازگر شماره ۱ از پرایمر شماره ۲ استفاده گردید.
- در تکثیر اسنپ rs763334876 جهت شناسایی نوکلئوتید G، ده میکرولیتر ماستر میکس قرمز، آغازگرهای شماره ۱، ۳ و ۴ به ترتیب به میزان ۰/۷۵، ۰/۷۵ و ۱/۵ میکرولیتر، DNA و آب مقطر نیز به ترتیب ۳ و ۴ میکرولیتر استفاده شدند.
- جهت شناسایی نوکلئوتید A، نیز دقیقاً همین مواد و مقادیر فقط به جای آغازگر شماره ۱ از آغازگر شماره ۲ استفاده گردید و میزان آغازگرهای ۲، ۳ و ۴ به ترتیب ۰/۷۵، ۱/۵ و ۰/۷۵ استفاده شد. پس از تهیه مخلوط، تمامی ویال ها در حد چند ثانیه اسپین شدند.

برنامه PCR برای اسنپ rs190628533: ۳ دقیقه- ۹۵ درجه سانتی گراد، (۳۰ ثانیه- ۹۳ درجه، ۴۰ ثانیه- ۵۷ درجه، ۴۰ ثانیه- ۷۲ درجه) ۳۵ دور، ۵ دقیقه- ۷۲ درجه و برای اسنپ rs763334876، مراحل مشابه اسنپ قبلی بود تنها واسرشت سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه افزایش یافت، سیکل PCR به ۳۳ دور کاهش و مرحله اتصال با دمای ۵۹ درجه و زمان ۴۵ ثانیه انجام شد. پس از PCR برای انجام الکتروفورز و مشاهده DNA تکثیر شده، باندهای DNA با دستگاه ترانس ایلومیناتور مشاهده گردید.

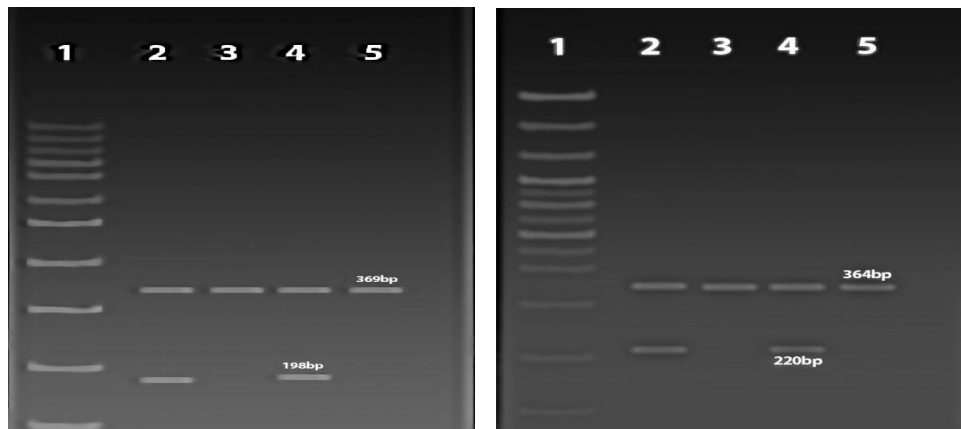
در انجام تست های آماری از نرم افزار SPSS استفاده شد. برای نرمال بودن یا نبودن یک صفت از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف استفاده گردید. در صورت نرمال بودن صفت آزمون t مستقل و در صورت نرمال نبودن از تست های آماری کای دو و یومن ویتنی، جهت تجزیه و تحلیل استفاده گردید و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

میانگین سن نمونه های مورد بررسی در این مطالعه در افراد سالم $33/12 \pm 2/789$ سال بود که در محدوده سنی ۲۷ سال تا ۳۶ سال قرار داشتند. همچنین میانگین سنی افراد بیمار $32/54 \pm 2/571$ سال و در محدوده سنی ۲۹ تا ۳۶ سال بود.

میانگین میزان هورمون FSH در افراد سالم $6/89 \pm 1/214$ و در افراد بیمار $15/05 \pm 2/078$ نشان داده شدند و بررسی ها مشخص کرد اختلاف میانگین مشاهده شده در میزان هورمون FSH، بین افراد سالم و افراد بیمار ارتباط معنی داری وجود دارد ($p < 0.0001$). میانگین میزان هورمون LH نیز در افراد سالم $4/12 \pm 1/04$ و در افراد بیمار $11/44 \pm 1/54$ بوده و اختلاف میانگین مشاهده شده معنی دار بود ($p < 0.0001$) و در گروه مردان نابارور میزان این هورمون به طور معنی داری بالاتر بود. اختلاف میانگین مشاهده شده در میزان هورمون تستوسترون در افراد سالم ($4/23 \pm 1/144$) و بیمار ($4/91 \pm 1/029$) ارتباط معنی داری نشان نداد ($p = 0.752$). هورمون های ذکر شده بر حسب mIU/ml اندازه گیری شدند.

در بررسی اسنپ rs190628533، بر اساس باند های رویت شده در الکتروفورز، تمامی افراد سالم و بیمار دارای ژنوتیپ CC بودند و سایر ژنوتیپ ها مشاهده نشدند (شکل ۱ الف) و در بررسی اسنپ rs763334876 نیز تمامی افراد دارای ژنوتیپ GG بودند (شکل ۱ ب).



ب

الف

شکل ۱. الف) ۱- مارکر 100bp، ۲ و ۳- فرد هموزیگوت GG، ۴ و ۵- فرد هموزیگوت GG و ب) ۱- مارکر 100bp، ۲ و ۳- فرد هموزیگوت CC، ۴ و ۵- فرد هموزیگوت CC

بحث و نتیجه گیری

بر طبق نتایج به دست آمده در این مطالعه، در اسنپ rs190628533 فقط ژنوتیپ CC مشاهده گردید. همچنین در اسنپ rs763334876 نیز فقط ژنوتیپ GG مشاهده شد که هر دو مورد، در سایت NCBI و قسمت مربوط به ALFA Allele Frequency فراوانی ژنوتیپ های مورد مطالعه با جمعیت های مطالعه شده در سایر کشورها همخوانی داشته و یکسان می باشد (۲۱) (شکل ۲).

Study: The 1000 Genomes Project (pha				
Go to Selection Scroll Region		rs763763348		
Populations / Samples		C=0.9998 T=0.0002		
▼ ACB African Caribb...	1 Ba...	C=1.0000 T=0.0000		
▼ ASW Americans of African An...	Hide unchecked samples	C=1.0000 T=0.0000		
▼ BEB Bengali from Bangladesh	Hide unchecked samples	C=1.0000 T=0.0000		
▶ CDX Chinese Dai in Xishuangb...		C=1.0000 T=0.0000		
▶ CEU Utah Residents (CEPH) wi...		C=1.0000 T=0.0000		
▶ CHB Han Chinese in Beijing, Ch...		C=0.9951 T=0.0049		
▶ CHS Southern Han Chinese		C=1.0000 T=0.0000		
▶ CLM Colombians from Medellin...		C=1.0000 T=0.0000		
▶ ESN Esan in Nigeria		C=1.0000 T=0.0000		
▶ FIN Finnish in Finland		C=1.0000 T=0.0000		
▶ GBR British in England and Sco...		C=1.0000 T=0.0000		
▶ GIH Gujarati Indian from Hous...		C=1.0000 T=0.0000		
▶ GWD Gambian in Western Divi...		C=1.0000		

Population	Group	Sample Size	Ref Allele	Alt Allele
Total	Global	14050	G=1.00000	A=0.00000
European	Sub	9690	G=1.0000	A=0.0000
African	Sub	2898	G=1.0000	A=0.0000
African Others	Sub	114	G=1.000	A=0.000
African American	Sub	2784	G=1.0000	A=0.0000
Asian	Sub	112	G=1.000	A=0.000
East Asian	Sub	86	G=1.00	A=0.00
Other Asian	Sub	26	G=1.00	A=0.00
Latin American 1	Sub	146	G=1.000	A=0.000
Latin American 2	Sub	610	G=1.000	A=0.000
South Asian	Sub	98	G=1.00	A=0.00
Other	Sub	496	G=1.000	A=0.000

ب

الف

شکل ۲. الف) فراوانی آلل های rs190628533 و ب) فراوانی آلل های rs763334876 در جمعیت های مورد مطالعه در دنیا (برگرفته از سایت NCBI)

ژن CLCA4 در جایگاه کروموزومی 1q21.3 قرار گرفته و به عنوان کمک فعال کننده در مسیر پیام رسانی Wnt/ B-Catenine دخالت می کند. این ژن به عنوان تنظیم کننده کانال کلر است که با کلسیم فعال می شود و انتظار می رفت به دلیل ارتباط با ژن CFTR، در ایجاد آژواسپرمی و اختلال اسپرم موثر باشد (۱۷).

در این مطالعه، در اسنیپ rs190628533 فراوانی آلل C، در هر دو گروه افراد سالم و بیمار ۱۰۰٪ بود و آلل T در جمعیت مورد مطالعه سالم و بیمار مشاهده نشد. همچنین در اسنیپ دیگر هم، rs763334876، فراوانی ۱۰۰٪ در هر دو افراد سالم و بیمار فقط متعلق به آلل G بود و آلل A اصلاً در جمعیت مورد بررسی، مشاهده نگردید. بنابراین فراوانی ژنوتیپی نیز در تمامی افراد سالم و بیمار، در دو اسنیپ rs190628533 و rs763334876 به ترتیب CC و GG، به میزان ۱۰۰٪ بود و ژنوتیپ های مورد پیش بینی یعنی ژنوتیپ های TT و TC در اسنیپ rs190628533 و همچنین ژنوتیپ های AA و GA در اسنیپ rs763334876 در جمعیت های مورد مطالعه مشاهده نگردید. با مطالعات مقایسه ای انجام شده، فراوانی ژنوتیپ های مورد مطالعه در این تحقیق با جمعیت های مورد مطالعه در سایر کشورها همخوانی دارد و یکسان می باشد (۲۲-۲۰).

به طور کلی فناوری های جدیدی که تأثیر ژنتیک را از دیدگاه جهانی تجزیه و تحلیل می کنند، ممکن است از طریق شناسایی فنوتیپ نابارور خاص، منجر به پیشرفت های بیشتر در درک علت ناباروری مردان شود (۱). در همین راستا بررسی تک به تک ژن ها و اسنیپ های خاص می تواند بسیار به این امر کمک کند. در مطالعات پیشین نقش های ژن CLCA4 بررسی شده است، به طوریکه Fröhmeser و همکارانش نشان دادند که CLCA4 نقش مهمی در اسپرماتوژنز انسان دارد و ممکن است با واسطه بیان ژن CFTR عمل کند. از این رو، اختلال در عملکرد CLCA4 ممکن است نقشی در ناباروری مردان داشته باشد. پروتئین CFTR از یک توالی پلی پپتیدی به طول ۱۴۸۰ آمینو اسید ساخته شده، که در نهایت یک پروتئین گذرنده از غشا را تشکیل می دهد. جهش در ژن CFTR عامل بیماری سیستمیک فیبروزیس است. جهش بسیار شایعی (آلل 5T) در این ژن وجود دارد که باعث بیماری سیستمیک فیبروزیس نشده ولی در کنار سایر علل ژنتیکی می تواند علت ایجاد نبود دوطرفه مادرزادی مجرای وابران و به تبع آن ناباروری باشد (۲۳). در تحقیقی دیگر نیز از دست دادن CLCA4 و تبدیل اپیتلیال به مزانشیم در سلول های سرطانی پستان در نهایت منجر به ایجاد سرطان پستان می شود (۱۶). همچنین Chen و همکارانش مشخص کردند که این ژن در مهار انتقال اپیتلیال به مزانشیم از طریق سیگنالینگ PI3K/ AKT، از تکثیر سلولی و ایجاد متاستاز در کارسینوم سلول های کبدی جلوگیری می کند (۱۷). انواع واریانت های ژن CLCA4 در ایجاد بیماری سیستمیک فیبروزیس نیز توسط Yu و همکارانش مشخص شده است (۱۸). تمام مطالعات فوق امکان تأثیر ژن CLCA4 را در ناباروری تأیید می نماید. در پی تحقیقات انجام شده در پژوهش حاضر در ژن مزبور، ارتباطی بین این دو اسنیپ انتخاب شده (rs190628533 و rs763334876) و ناباروری آژواسپرمی مردان مراجعه کننده به مرکز ناباروری جهاد دانشگاهی قم

وجود ندارد. در مطالعات دیگر نیز عدم ارتباط پلی مورفیسم ژن ها و ناباروری مردان نشان داده شده است، چنانچه Wang و همکارانش نیز، ۶ پلی مورفیسم (rs190628533) c.390C>T، (rs2231599) c.1474A>G، (rs757773924) c.2105C>G، (rs759981524)، (rs763334876) c.956G>A و (rs79822589) c.895T>C را در شمال چین بررسی کردند که مشخص شد اختلاف معنی داری بین آنها و آزواسپرمی وجود ندارد (۲۰).

Siasi و همکارانش، مشابه با نتایج تحقیق حاضر دو اسنپ rs551373 و rs683155 را در ژن DDX25 در افراد آزواسپرم بررسی نمودند. این پژوهش نیز نشان داد دو پلی مورفیسم ذکر شده در جمعیت مورد بررسی نمی تواند به عنوان فاکتور ژنتیکی در ناباروری مردان ایرانی محسوب شود (۱۱). در منطقه شمال شرق ایران نیز ارتباط ژن های دیگر مثل متیونین سینتاز (MTR) بر ناباروری مردان مورد تحقیق قرار گرفته و مشخص شد که هیچ اختلاف معنی داری در فراوانی آلل های مربوطه در افراد بیمار و سالم وجود ندارد (۲۲).

اگرچه هنوز کارهای زیادی باید انجام شود تا به طور کامل دخالت ژن ها در تولید فنوتیپ های نابارور مشخص شود، یافته های تحقیق حاضر نشان می دهد که در جامعه مورد مطالعه بین پلی مورفیسم دو اسنپ rs190628533 و rs763334876 در ژن CLCA4 با ناباروری در مردان اختلافی وجود ندارد. ولی ممکن است در بررسی های دیگر این ژن یا در جامعه بزرگتر یا قومیت های دیگر اختلاف نشان داده شود. در کل بررسی های جامع تر در این حوزه پیشنهاد می شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم و همچنین مرکز ناباروری و مرکز تحقیقات جهاد دانشگاهی استان قم قدردانی می گردد.

References

- 1.O'Flynn O'Brien KL, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril*. 2010;93(1):1-12.
- 2.Shefi S, Turek PJ. Definition and current evaluation of subfertile men. *Int Braz J Urol*. 2006;32(4):385-97.
- 3.Vahidi S, Ardalan A, Mohammad K. The epidemiology of primary infertility in the Islamic Republic of Iran in 2004-5. *J Reprod Infert*. 2006;7(3):243-51. [In Persian]
- 4.Nangia AK, Luke B, Smith JF, Mak W, Stern JE, SART Writing Group. National study of factors influencing assisted reproductive technology outcomes with male factor infertility. *Fertil Steril*. 2011;96(3):609-14.
- 5.Sato Y, Hasegawa C, Tajima A, Nozawa S, Yoshiike M, Koh E, et al. Association of TUSC1 and DPF3 gene polymorphisms with male infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(2):257-63.
- 6.Hecht NB. The making of a spermatozoon: a molecular perspective. *Dev Genet*. 1995;16(2):95-103.
- 7.Shamsi MB, Kumar K, Dada R. Genetic and epigenetic factors; role in male infertility. *Indian J Urol*. 2011;27(1):110-20.
- 8.Jedidi I, Ouchari M, Yin Q. Autosomal single-gene disorders involved in human infertility. *Saudi J Biol Sci*. 2018;25(5):881-7.
- 9.Krausz C, Escamilla AR, Chianese C. Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction*. 2015;150(5):R159-74.
- 10.Aarabi M, Modarressi MH, Soltanghorae H, Behjati R, Amirjannati N, Akhondi MM. Testicular expression of synaptonemal complex protein 3 (SYCP3) messenger ribonucleic acid in 110 patients with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril*. 2006;86(2):325-31.
- 11.Siasi E, Aleyasin A, Mowla SJ, Sahebkhshaf H. Study of GT-repeat expansion in Heme oxygenase-1 gene promoter as genetic cause of male infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2011;28(8):737-41.
- 12.Alizadeh Nili H, Mozdarani H, Pellestor F. Impact of DNA damage on the frequency of sperm chromosomal aneuploidy in normal and subfertile men. *Iran Biomed J*. 2011;15(4):122-9.
- 13.Moghbali-Nejad S, Mozdarani H, Behmanesh M, Rezaiean Z, Fallahi P. Genome instability in AZFc region on Y chromosome in leukocytes of fertile and infertile individuals following exposure to gamma radiation. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(1):53-61.
- 14.Yatsenko AN, Georgiadis AP, Röpke A, Berman AJ, Jaffe T, Olszewska M, et al. X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men. *N Engl J Med*. 2015;372(22):2097-107.
- 15.Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC, et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*. 2012;486(7403):400-4.
- 16.Wei L, Chen W, Zhao J, Fang Y, Lin J. Downregulation of CLCA4 expression is associated with the development and progression of colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2020;20(1):631-8.
- 17.Chen H, Ruan YC, Xu WM, Chen J, Chan HC. Regulation of male fertility by CFTR and implications in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2012;18(6):703-13.
- 18.Yu Y, Walia V, Elble RC. Loss of CLCA4 Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells. *PLoS One*. 2013;8(12):e83943.
- 19.Xavier MJ, Salas-Huetos A, Oud MS, Aston KI, Veltman JA. Disease gene discovery in male infertility: past, present and future. *Hum Genet*. 2021;140(1):7-19.

20. Wang R, Xi Q, Zhang H, Jiang Y, He J, Li L, et al. Chloride Channel Accessory 4 (CLCA4) Gene Polymorphisms and Non-Obstructive Azoospermia: A Case-Control Study. *Med Sci Monit.* 2019;25:2043-8.
21. National Center for Biotechnology Information. dbSNP. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
22. Tanoomand A, Hajibemani A, Abouhamzeh B. Investigation of the association of idiopathic male infertility with polymorphisms in the methionine synthase (MTR) gene. *Clin Exp Reprod Med.* 2019;46(3):107-11.
23. Frühmesser A, Vogt PH, Zimmer J, Witsch-Baumgartner M, Fauth C, Zschocke J, et al. Single nucleotide polymorphism array analysis in men with idiopathic azoospermia or oligoasthenozoospermia syndrome. *Fertil Steril.* 2013;100(1):81-7.