Qom University of Medical Sciences Journal

2023. Volume 17

Research Paper

Comparative Study of PRMT1 and MAPK14 Genes Expression in Healthy and Oligospermic Individuals

Somaye Rezaei[1], Maryam Khoshsokhan-Mozaffar[1*], Naser Kalhor[2]

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
2. Department of Mesanchymal Stem Cell, Academic Center for Education Culture and Research, Qom Branch, Qom, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Rezaei S, Khoshsokhan-Mozaffar M, Kalhor N. Comparative Study of PRMT1 and MAPK14 Genes Expression in Healthy and Oligospermic Individuals. Qom Univ Med Sci J. 2023; 17:E2823.1. https://doi.org/10.32598/qums.17.2823.1

doi https://doi.org/10.32598/qums.17.2823.1

Received: 04 Feb 2023

Accepted: 09 Jul 2023

Available Online: 01 Aug 2023

Keywords:
Oligospermia, *PRMT1*, Mitogen-activated protein kinase 14, Infertility, Men, Apoptosis

ABSTRACT

Background and Objectives Male infertility is a complex disorder that affects a large portion of the male population. However, the causes of infertility are mainly unknown. Proper and complete implementation of spermatogenesis requires the expression of many genes. So, stopping or disrupting the expression of any of them may lead to blocking or upsetting the process of spermatogenesis. Identification of such genes and evaluation of their function provides valuable information about the role of these genes in adult spermatogenesis. The present study investigated the expression of *PRMT1* and *MAPK14* genes in healthy and oligospermic individuals.

Methods Semen samples of normal sperm and oligospermia were collected according to WHO standards from individuals referring to Qom University, Jihad Infertility Treatment Center, after obtaining their consent. Semen samples were assessed regarding the expression of *PRMT1* and *MAPK14* genes in normal and oligospermic groups using real-time polymerase chain reaction (PCR). The data obtained were analyzed with the independent t test using PRISM software. The significance level was set at $P<0.05$.

Results The study on cDNA from normal sperm and oligospermic individuals showed that the expression of the *PRMT1* gene in oligospermic individuals increased 3.989 times compared to the control group, but the *MAPK14* gene did not change significantly.

Conclusion Increased expression of the *PRMT1* gene in oligospermic individuals increases the process of apoptosis and ultimately reduces the number of healthy sperms.

**** Corresponding Author:***
Maryam Khoshsokhan-Mozaffar
Address: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
Tel: +98 (912) 6518508
E-Mail: m.khoshm@gmail.com

Copyright © 2023 Qom University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license(https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).
Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Extended Abstract

Introduction

Although many causes of male infertility are unknown, genetic disorders seem to play an important role, especially in cases of oligospermia. *PRMT1* and *MAPK14* are two genes likely to play a part in sperm disorders. The protein encoded by the *MAPK14* gene belongs to the group of MAP kinase proteins. Mitogenic activities and environmental stresses activate this kinase, and then a series of cascade reactions dependent on MAP kinase causes phosphorylation and activation of *MAP3K7IP1/TAB1*. *PRMT1* gene encodes a member of the family of arginine N-methyltransferases. It plays an essential regulatory role in many biological processes; PRMTs methylate arginine residues by transferring methyl groups from S-adenosyl-L-methionine to guanidine nitrogen atoms. Increased gene expression may play a role in many types of cancer. This research investigates the relationship between *PRMT1* and MAPK14 gene expression and infertility in men with oligospermia.

Methods

This study was conducted on 100 men with oligospermia and 100 healthy men as a control group. They referred to the infertility treatment center of the Jihad University of Qom, Qom City, Iran. The semen samples were collected from April 20, 2020, to December 8, 2020. Then, the sperm parameters (concentration, motility, and morphology) were investigated. The RNA of the samples was extracted using TRIzol and according to the manufacturer's instructions. The concentration of the extracted RNA was read using a NanoDrop device; the absorption ratio of 260 to 280 was calculated, and quality was measured. RNA was performed on agarose gel. To ensure accurate extraction, it was taken on 1% agarose gel, and by observing the sharp band of 28rRNA and 18rRNA and providing the extraction and no contamination with genomic DNA, the extracted RNA was stored at -70°C until the next steps. The optimal concentration of cDNA and the primers for each gene was determined by serially measuring the concentration for each one separately so that the lowest amount of dimer is observed in the polymerase chain reaction (PCR) product. Real-time PCR was performed using the appropriate concentration of cDNA. GAPDH was used as a reference gene. The 2-CTΔΔ method was used to quantify the relative expression of the desired genes. Melting curve was used to ensure specialized gene amplification. After completing the test and obtaining cycle thresholds of the reference and target genes, the fold change method was used to calculate the gene expression level. The data obtained from this study were statistically analyzed using PRISM software and statistical tests. The independent t test was performed for data analysis with a significance level of $P<0.05$.

Results

The average age of healthy people and oligospermic people was not significantly different. There was a significant decrease in the volume of semen samples and sperm concentration in the infertile group. Also, total sperm motility, progressive sperm motility, and normal sperm morphology were lower in patients with oligospermia than in fertile individuals. The results of RNA extraction from sperm were checked for contamination and the presence of rRNA bands. The average expression level of the *PRMT1* gene in oligospermia individuals was 3.98±2.4, and the expression level of this gene in healthy individuals was 1.03±0.78. These numbers show the increased expression of the said gene in sick people. MAPK14 gene expression level was 0.78±0.06 in oligospermic individuals and 0.96±0.56 in healthy individuals. The results showed that the expression level of this gene in sick people is not significantly different from that in healthy people.

Conclusion

The most important finding of the present study was that the expression of the *PRMT1* gene in oligospermic individuals increases significantly compared to healthy and fertile individuals. However, MAPK14 gene expression in oligospermic individuals did not change significantly compared to healthy individuals. *PRMT1* gene is involved in the ubiquitination process. Adding a ubiquitin to the substrate can attach more ubiquitin molecules to the first one and create a polyubiquitin chain. Damage in the structure of DNA or other structures in the testis may lead to the initiation of apoptotic pathways, and these sperms may be ubiquitinated. In addition to apoptosis, improper twisting of sperm surface antigens or loss of their structure can cause ubiquitination of damaged sperm. Considering the role of *PRMT1* and the fact that the expression of this gene has increased in the present study, it can be said that with the increase in the expression of this gene, many sperms are lost. As a result, the number of sperms decreases in oligospermic individuals. Also, the expression of this gene has a negative effect on the motility of the whole sperm and the progressive motility of the sperm. It changes the sperm shape in patients with oligospermia.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This cross-sectional study was approved by the Ethics Committee of Islamic Azad University, Qom branch, (Code: IR.IAU.QOM.REC.1399.030), and written informed consent was obtained from the participants.

Funding

This paper was extacted from master thesis of Somaye Rezaei from Department of Biology at Islamic Azad University of Qom and financially supported by Islamic Azad University, Qom Branch.

Authors contributions

Conducting experiments and writing the initial draft: Somaye Rezaei; Data analysis: Naser Kalhor; Study design, supervising and writing: Maryam Khoshsokhan-Mozaffar; final approval: All authors.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank the Vice President of Research and Technology of Islamic Azad University, Qom branch, the Infertility Center, and the Academic Jihad Research Center of Qom Province, Iran.

مقاله پژوهشی

بررسی مقایسه‌ای میزان بیان ژن‌های PRMT1 و MAPK14 در افراد سالم و الیگواسپرمی

سمیه رضایی[۱]، *مریم خوش‌سخن مظفر[۱]، ناصر کلهر[۲]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران
۲. گروه سلول های بنیادی مزانشیمال، جهاد دانشگاهی استان قم، قم، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Rezaei S, Khoshsokhan-Mozaffar M, Kalhor N. Comparative Study of PRMT1 and MAPK14 Genes Expression in Healthy and Oligospermic Individuals. Qom Univ Med Sci J. 2023; 17:E2823.1. https://doi.org/10.32598/qums.17.2823.1

doi https://doi.org/10.32598/qums.17.2823.1

تاریخ دریافت: ۱۵ بهمن ۱۴۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۸ تیر ۱۴۰۲
تاریخ انتشار: ۱۰ مرداد ۱۴۰۲

چکیده

زمینه و هدف ناباروری مردانه اختلال پیچیده‌ای است که بخش بزرگی از جمعیت مردان را تحت تأثیر قرار داده است. بااین‌حال، بسیاری از علل آن ناشناخته است. انجام صحیح و کامل روند اسپرماتوژنز مستلزم بیان تعداد زیادی ژن است؛ به‌طوری‌که توقف یا اختلال در بیان هریک از آن‌ها ممکن است به توقف یا اختلال در روند اسپرماتوژنز منجر شود. شناسایی این قبیل ژن‌ها و ارزیابی عملکرد آن‌ها اطلاعات ارزشمندی در یافتن علل بسیاری از انواع ناباروری بدون علت، فراهم می‌کند. در مطالعه حاضر بیان ژن‌های PRMT1 و MAPK14 در افراد سالم و الیگواسپرم بررسی شد.

روش بررسی نمونه مایع منی افراد دارای پارامترهای اسپرمی طبیعی و الیگواسپرم مطابق استانداردهای سازمان جهانی بهداشت، ازافراد مراجعه‌کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم پس از اخذ رضایت‌نامه جمع‌آوری شد. بیان ژن‌های PRMT1 و MAPK14 در ۲ گروه نرمال و الیگواسپرم با استفاده از روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار PRISM نسخه ۸ و تست آماری تی مستقل، با سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ تجزیه‌وتحلیل شدند.

یافته‌ها مطالعه روی cDNA حاصل از اسپرم‌های نرمال و الیگواسپرم نشان داد بیان ژن PRMT1 در افراد الیگواسپرم نسبت به گروه کنترل ۳/۹۸۹ برابر افزایش بیان داشته است، ولی بین میزان بیان ژن MAPK14 و ناباروری الیگواسپرمی تغییر معناداری وجود نداشت.

نتیجه‌گیری افزایش بیان ژن PRMT1 در افراد الیگواسپرم باعث افزایش فرایند آپوپتوز می‌شود و درنهایت باعث کاهش تعداد اسپرم‌های سالم خواهد شد.

کلیدواژه‌ها:
الیگواسپرمی، PRMT1، پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوژن ۱۴، ناباروری مردان، آپوپتوز

* نویسنده مسئول:
مریم خوش‌سخن مظفر
نشانی: قم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی .
تلفن: ۶۵۱۸۵۰۸ (۹۱۲) ۹۸+
رایانامه: m.khoshm@gmail.com

مقدمه

با اینکه بسیاری از علل ناباروری مردان ناشناخته است، به نظر می‌رسد اختلالات ژنتیکی نقش مهمی در ناباروری مردان به‌ویژه در موارد الیگواسپرمی ایفا کند [۱، ۲]. PRMT1[1] و MAPK14[2] ۲ نمونه از ژن‌هایی هستند که احتمالاً در اختلالات اسپرم نقش دارند. پروتئینی که توسط ژن MAPK14 کد می‌شود به گروه پروتئین‌های MAP کینازها تعلق دارد. این کیناز با فعالیت‌های میتوژنیک و استرس‌های محیطی فعال می‌شود و سری واکنش‌های آبشاری وابسته به MAP کیناز را فعال می‌کند و سبب فسفریلاسیون و درنتیجه فعال‌سازی MAP3K7IP1/TAB1 می‌شود [۳]. برخی فرایندهای سلولی همچون تکثیر و تمایز، کنترل رشد، آپوپتوزیس و پیری، همچنین ایجاد مقاومت در مقابل شیمی‌درمانی و رادیوتراپی توسط مسیرهای سیگنالینگ پروتئین‌کینازهای فعال‌کننده میتوژن (MAPKs) و با هدایت پیام داخل‌سلولی کنترل می‌شوند [۴].

ژن PRMT1 عضوی از خانواده آرژنین N-متیل‌ترانسفرازها را رمزگذاری می‌کند و نقش تنظیمی مهمی در بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی ایفا می‌کند. PRMTها با انتقال گروه‌های متیل از S-Adenosyle-L-Methionine به اتم‌های نیتروژن گوانیدین، بقایای آرژنین را متیله می‌کنند. افزایش بیان این ژن ممکن است در بسیاری از انواع سرطان‌ها نقش داشته باشد [۵].

نقص‌های ژنتیکی و اختلالات مولکولی در مسیرهای تکاملی فرایند اسپرماتوژنز می‌تواند به الیگواسپرمی منجر شود. یکی از مسیرهای مهمی که در روند اسپرم‌سازی دخیل است FOXO pathway است [۶]. FOXO[3] به‌عنوان یک فاکتور حیاتی اثرگذار بر مسیر PI3K/AKT[4] در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است. مسیر PI3Kinase/AKT در کنترل هم‌زمان متابولیسم و نیز رشد و تکثیر سلولی در سلول‌های سالم و بدخیم دخالت دارد. در بسیاری از انواع سرطان‌ها اجزای این مسیر دچار افزایش میزان یا عملکرد شده‌اند و این امر یکی از مهم‌ترین دلایل افزایش بقا و کاهش مرگ سلول‌های سرطانی است [۷].

فعال شدن برخی از گیرنده‌های سطح سلول ازجمله گیرنده‌های تیروزین‌کینازی یا گیرنده‌های متصل به G-پروتئین‌ها در اثر اتصال لیگاندهایی نظیر فاکتورهای رشد و انسولین، منجر به فسفریلاسیون و فعالسازی آنزیم PI3-K[5] و متعاقباً فسفریلاسیون و فعال‌سازی AKT به‌عنوان یک کیناز مرکزی در این مسیر می‌شود. AKT فعال به فسفریلاسیون برخی ترکیبات موجود در مسیرهای تنظیمی تکثیر، تمایز و بقای سلولی ازقبیل پروتئین‌های آپوپتوتیک و فاکتورهای رونویسی منجر می‌شود که نهایتاً به مهار آپوپتوز و افزایش تکثیر، رشد و بقای سلولی منجر می‌شود [۷]. طبق مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۲ صورت گرفت بیان ژن‌های FKHRL1، FKHR و AFX در جوندگان نشان داد تنظیم این ژن‌ها به‌واسطه مسیر IGF-1 است و بیان ژن‌های اعضای خانواده FOXO در سلول‌های گرانولوزا موجب تکثیر و تأثیر بر عملکرد این سلول‌ها می‌شوند [۸].

شی و همکاران در سال ۲۰۰۳ اثبات کردند که سطوح پروتئینی FOXO1 با تکوین، آتریزیا و لوتئینیزاسیون فولیکولی در رحم موش صحرایی مرتبط است [۹]. مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۴ پارک و همکاران انجام دادند به نقش FOXO1 در مهار القای سیکلین D2 و تکثیر و تمایز سلول‌های گرانولوزا اشاره می‌کند که طبق نتیجه این مطالعه، با حذف مهار وابسته به FOXO1 و اثر مثبت آن بر سیگنالینگ SMAD2/3، تکثیر و تمایز بالاتری با استفاده از FSH مشاهده می‌شود [۱۰]. در سال ۲۰۱۳ اسکارا و همکاران به این نتیجه دست پیدا کردند که بیان FOXO1 در اسپرماتوگونی و گرانولوزا در پستانداران به‌صورت حفاظت‌شده است و همچنین با حفظ اووسیت نیز در ارتباط است [۱۱]. همچنین در بررسی نقش FOXO1 و ناباروری در موش‌های نر، نتایج نشان دادند با مهار بیان FOXO1 میزان بیان ژن CEP55 که ناباروری در موش‌ها را موجب می‌شود، نیز مهار می‌شود [۱۲]. PRMT1 نیز به‌واسطه ویژگی متیل‌ترانسفرازی که دارد با متیله کردن FOXO آن را مهار می‌کند [۱۳]. باتوجه‌به دلایل عنوان‌شده در سطور قبل، هدف از این تحقیق، بررسی ارتباط بیان ژن‌های PRMT1 و MAPK14 با ناباروری در مردان مبتلا به الیگواسپرمی است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه بر روی ۲۰۰ مرد (۱۰۰ مرد مبتلا به الیگواسپرم و ۱۰۰ مرد سالم به‌عنوان گروه کنترل) مراجعه‌کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم در فاصله زمانی ۱۳۹۹/۲/۱ الی ۱۳۹۹/۹/۱۸، انجام شد. پس از تشخیص الیگواسپرمی توسط متخصص مردان، اطلاعات جمعیت‌شناختی جمع‌آوری شدند. بررسی پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی) با استفاده از میکروسکوپ نوری و براساس استاندارد جهانی (۱۹۹۹) صورت گرفت. شمارش اسپرم‌ها برحسب میلیون بر لیتر توسط لام نئوبار انجام شد. بررسی میزان تحرک اسپرم‌ها نیز براساس همین استاندارد جهانی سال ۱۹۹۹ سازمان جهانی بهداشت[6] [۱۴] اندازه‌گیری شد. درصد تحرک کل اسپرمی باید کمتر از ۴۰ درصد و حرکت پیش‌رونده کمتر از ۳۲ درصد باشد. برای بررسی مورفولوژی نرمال اسپرم‌ها از روش رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو استفاده شد. پس از رنگ‌آمیزی، ۲۰۰ اسپرم توسط میکروسکوپ

1. Protein Arginine Methyl Transferase1(PRMT1)
2. Mitogene-Activated Protein Kinase14 (MAPK14)
3. Forkhead Box O (FOXO)
4. Phosphoinositide3-Kinase/Protein Kinase B (PI3K/AKT)
5. Phosphoinositide3-Kinase (PI3-K)
6. World Health Organization(WHO)

نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر بررسی شدند.

RNA نمونه‌ها با استفاده از Trizol و براساس دستورالعمل سازنده، استخراج شد. غلظت RNA استخراج‌شده با استفاده از دستگاه نانودراپ خوانده شد و نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ محاسبه و کیفیت‌سنجی RNA روی ژل آگارز انجام شد. به منظور صحت استخراج، روی ژل آگارز ۱ درصد برده شد و با مشاهده باند شارپ 28rRNA و 18rRNA و اطمینان از استخراج و عدم آلودگی به DNA ژنومی، RNA استخراج‌شده تا زمان اقدامات بعدی در دمای منهای ۷۰ درجه ذخیره شد. بعد از انجام استخراج با ۲ میکرولیتر RNA و استفاده از کیت شرکت پارس طوس، طبق دستورالعمل شرکت سازنده، cDNA سنتز شد (جدول شماره ۱). پرایمر و آنزیم مورداستفاده به‌ترتیب رندوم هگزامر و AMV Reverse transcriptase بود.

Real Time – PCR

در ابتدا میزان غلظت بهینه cDNA و همچنین پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از آمایش سریال غلظت برای هرکدام به‌طور جداگانه تعیین شد. به‌طوری‌که کمترین میزان دایمر در محصول PCR مشاهده شود. Real Time–PCR با استفاده از غلظت مناسب از cDNA انجام شد. توالی پرایمرهای مورداستفاده در مطالعه همراه با طول قطعه تکثیرشده هر دو ژن، در جدول شماره ۱ ارائه شده است. برنامه Real Time–PCR شامل ۹۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۳ درجه به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۷ درجه به مدت ۳۵ ثانیه برای ژن PRMT1 و ۵۸ درجه به مدت ۴۰ ثانیه برای ژن MAPK14 (تکرار ۴۰ سیکل) و ۲۰ ثانیه در ۷۲ درجه بود. از GAPDH به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد. جهت کمی‌سازی بیان نسبی ژن‌های موردنظر از روش $2^{-CT_{\Delta\Delta}}$ استفاده شد. جهت اطمینان از تکثیر تخصصی ژن از melting curve استفاده شد.

محاسبه میزان بیان ژن

پس از اتمام تست و به دست آوردن CTهای ژن رفرنس و ژن موردنظر، از روش Fold Change برای محاسبه میزان بیان ژن استفاده شد (فرمول شماره ۱).

1.

$$Fold=\frac{E^{-(Ct_{Trat}-CT_{control})_{target}}}{E^{-(Ct_{Trat}-CT_{control})_{ref}}}$$

تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های حاصل از این مطالعه ازنظر آماری و با استفاده از نرم‌افزار PRISM نسخه ۸ و آزمون آماری تی مستقل[۷]، با سطح معناداری P<۰/۰۵ تجزیه‌وتحلیل شدند.

7. Independent Sample Test

یافته‌ها

مقایسه پارامترهای جمعیت‌شناختی بیماران و افراد سالم

جدول شماره ۲ میانگین پارامترهای مختلف بین ۲ گروه الیگواسپرم و سالم را نشان می‌دهد. میانگین سن افراد سالم و افراد الیگواسپرم و آزمون آماری تی مستقل مشخص کرد که اختلاف میانگین مشاهده‌شده معنادار نیست (P=۰/۸). حجم نمونه مایع منی (P=۰/۰۳۹) و غلظت اسپرم (P=۰/۰۴) در گروه نابارور کاهش معناداری داشت. همچنین میزان تحرک کل اسپرم‌ها (P=۰/۰۲۷)، تحرک پیش‌رونده اسپرمی (P=۰/۰۳) و مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم (P=۰/۰۴۵) در بیماران مبتلا به الیگواسپرمی پایین‌تر از افراد بارور بود.

بررسی بیان ژن‌های PRMT1 و MAPK14

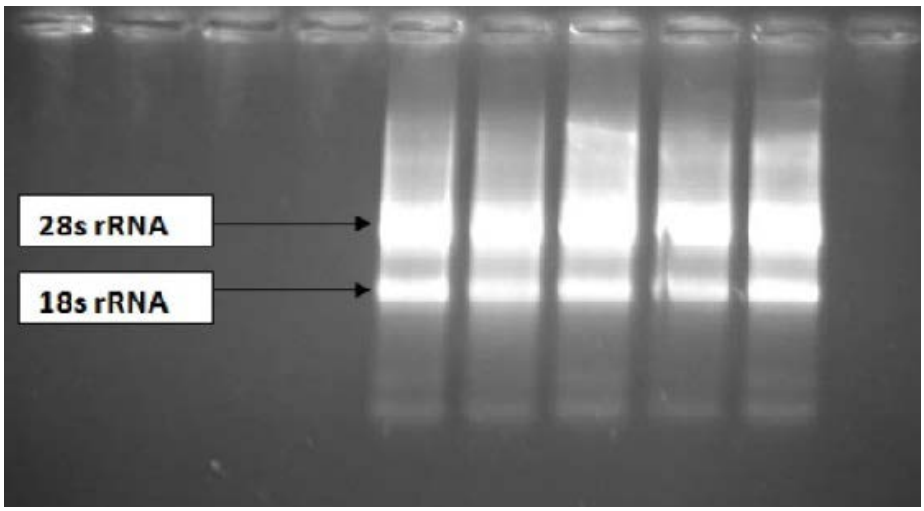
نتایج حاصل از استخراج RNA از اسپرم ازنظر آلودگی و وجود باندهای rRNA بررسی شد (تصویر شماره ۱).

میزان بیان ژن PRMT1 در افراد الیگواسپرم به‌طور میانگین ۳/۹۸±۲/۴ و میزان بیان این ژن در افراد سالم نیز ۱/۰۳±۰/۷۸ بود. این اعداد افزایش بیان ژن مزبور را در افراد بیمار نشان می‌دهد (P=۰/۰۰۰۱) (تصویر شماره ۲). میزان بیان ژن MAPK14 در افراد الیگواسپرم ۰/۷۸±۰/۰۶ و در افراد سالم ۰/۹۶±۰/۵۶ بود. نتایج نشان داد میزان بیان این ژن در افراد بیمار نسبت به سالم معنادار نیست (P=۰/۲۳) (تصویر شماره ۳).

بحث

مطالعه حاضر با هدف مقایسه بیان ژن‌های PRMT1 و MAPK14 با ناباروری مردان الیگواسپرم در مردان مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری جهاد دانشگاهی قم انجام شد. مهم‌ترین یافته مطالعه حاضر این بود که بیان ژن PRMT1 در افراد الیگواسپرم نسبت به افراد سالم و بارور افزایش چشمگیری می‌یابد، اما بیان ژن MAPK14 در افراد الیگواسپرم نسبت به افراد سالم، تغییر معناداری نداشت.

این نتیجه مؤید این مطلب است که نقش ژنتیک در ناباروری مردان بسیار حائز اهمیت است، به‌طوری‌که تخمین زده می‌شود عوامل ژنتیکی باعث ایجاد ۱۵ تا ۳۰ درصد از ناباروری‌های مردان است [۱۵] یا به نوعی دیگر ناباروری‌های ایدیوپاتیک در مردان بدون سابقه پزشکی بیشتر به دلیل تأثیر ژن‌ها مخصوصاً در مسیر اسپرماتوژنز است که به‌عنوان یکی از عوامل احتمالی ایجاد الیگواسپرمی مردان مطرح است. طی سال‌های اخیر بررسی ژن‌های مؤثر در فرایند ناباروری مردان، به دلیل نقش مهم آن‌ها در برنامه‌ریزی درمانی و امکان بررسی مشکلات ژنتیکی در فرزندان ازطریق روش‌هایی همچون تشخیص‌های ژنتیکی قبل



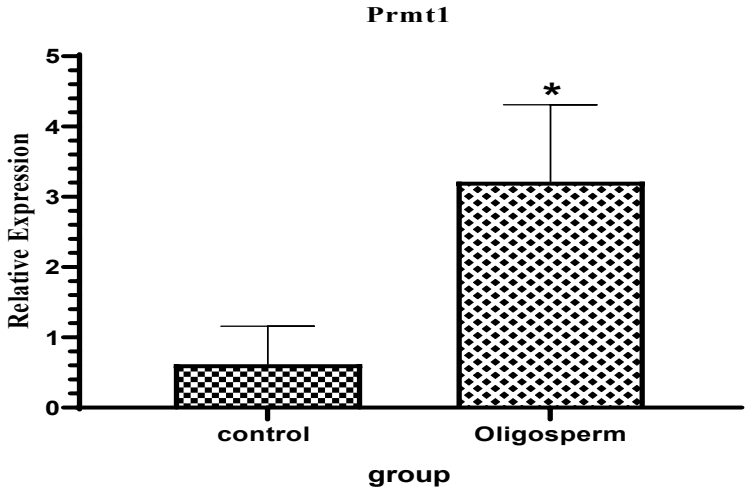
تصویر ۱. نتایج PCR حاصل از استخراج RNA بر روی ژل آگارز ۱ درصد. مشاهده باند شارپ 28rRNA و 18rRNA و حصول اطمینان از استخراج و عدم آلودگی به DNA ژنومی

از لانه‌گزینی مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۶].

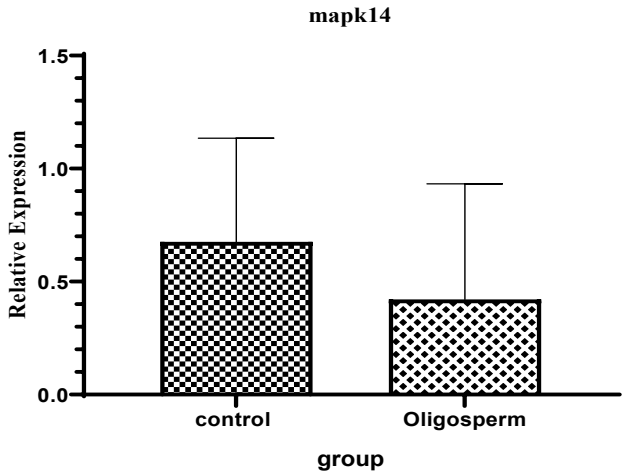
ژن MAPK14 روی کروموزوم ۶ p21/31 و ۲۲ اگزون دارد. اندازه آن ۹۵۲۵۴ جفت باز است و از روی آن ۱۳ نوع RNA ساخته می‌شود. MAPK14 یکی از ژن‌هایی است که در مسیر سیگنالینگ MAP Signaling Pathway دخالت می‌کند [۳]. غیر از برخی فرایندهای سلولی این ژن در ایجاد مقاومت در مقابل شیمی‌درمانی و رادیوتراپی توسط مسیرهای سیگنالینگ پروتیین کینازهای فعال‌کننده میتوژن (MAPKs) نقش دارد. خانواده MAPK شامل پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن ۱۴[۸]، کیناز تنظیم شده خارج سلولی[۹]، پروتئین کینازهای فعال شونده با استرس[۱۰] هستند که دارای فعالیت کینازی بوده و ازطریق فسفریلاسیون پروتئین‌های مختلف در هدایت پیام نقش دارند. بنابراین گونه‌های فعال اکسیژن با اثر بر روی MAPKs می‌توانند در وقایع مختلف سلولی نقش داشته باشند [۵]. با اینکه میزان بیان این ژن در مردان نابارور الیگواسپرم افزایش یافت، منتها این افزایش معنادار نبود و به نظر می‌رسد الیگواسپرمی تحت تأثیر مستقیم این ژن ایجاد نشود. مطالعاتی از این دست عدم ارتباط برخی ژن‌ها را با ناباروری مردان نشان داده‌اند؛ به‌طوری‌که یوسف

8. P38α (Mitogene-Activated Protein Kinase14)

9. Extracellular-Regulated Kinase (ERK1)
10. Jun N-terminal Kinase (JNK)



تصویر ۲. مقایسه بیان ژن PRMT1 در بیماران الیگواسپرمی و افراد بارور. میزان بیان ژن PRMT1 در افراد بیمار به‌طور معناداری بیشتر از افراد بارور است (ستاره نشانگر اختلاف معنادار است) (P<۰/۰۵).



تصویر ۳. مقایسه بیان ژن MAPK14 در بیماران الیگواسپرمی و افراد بارور. میزان بیان ژن MAPK14 در افراد بیمار و سالم معنادار نیست.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورداستفاده همراه با طول قطعه تکثیرشده

ژن	آغازگر رفت	آغازگر برگشت	طول قطعه تکثیرشده
PRMT1	AGAGATGGTGTCCTGTGGC	CCAAAGTGTGCGTAGGAGTC	۹۹
MAPK14	TTATGCGTCTGACAGGAACA	ATCTTCGGCATCTGAGTCAA	۱۰۰

دانشمندپور نیز در سال ۱۳۹۸ نشان داد بیان ژن‌های CX3CR1 و UBE2B نسبت به افراد گروه کنترل تغییر معناداری نداشته است [۱۷].

ژن PRMT1 کدکننده خانواده پروتئین آرژنین N-متیل‌ترانسفرازهاست و همچنین در تغییرات پس از ترجمه نقش تنظیمی مهمی را در بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی ایفا می‌کند. گزارش شده است افزایش بیان این ژن ممکن است در بسیاری از انواع سرطان‌ها نقش داشته باشد [۴]. همچنین این ژن در فرایند یوبیکوئیتیناسیون دخالت می‌کند. یوبیکوئیتین یک پپتید نشان‌گذار پروتئولیتیک سلولی است که در کنترل عملکردهای پیچیده سلول‌های انسانی و حیوانی نقش دارد. اصلی‌ترین عملکرد آن نشان‌دار کردن پروتئین‌ها برای تجزیه توسط سیستم پروتئوزومی است. این ژن پایداری، عملکرد و محل قرارگیری پروتئین‌های داخل‌سلولی را هم کنترل می‌کند [۱۸].

جدول ۲. شاخص‌های جمعیت‌شناختی افراد نابارور و بارور مراجعه‌کننده به مرکز درمان ناباروری

فاکتور اندازه‌گیری‌شده	میانگین±انحراف معیار	
	افراد نابارور (الیگواسپرم)	افراد بارور
سن (سال)	۱/۷±۳۱	۲/۱±۳۱/۱
حجم (میلی‌لیتر)	۰/۸±۳/۰۱	۱/۳±۴/۲
غلظت اسپرمی($\times 10^6$)	۵/۸±۴۰/۲	۶/۵±۵۳/۷
تحرک کل اسپرمی (درصد)	۵/۲±۳۶/۴	۵/۹±۶۸/۹
تحرک پیشرونده اسپرمی (a+b) (درصد)	۱/۸±۱۵/۶	۱/۶±۳۴/۵
مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم (درصد)	۱/۶±۹۸/۱	۱/۱±۸۷/۲

با اضافه شدن یک یوبیکوئیتین به سوبسترا، مولکول‌های یوبیکوئیتین بیشتری می‌توانند به اولی اضافه شوند و یک زنجیره پلی‌یوبیکوئیتین ایجاد می‌کنند. در حالت معمول حدود ۴ مولکول یوبیکوئیتین به سوبسترا اضافه می‌شود و در این حالت پروتئین برای تجزیه شدن به سمت کمپلکس پروتئوزوم می‌رود. پروتئوزوم که از چندین زیرواحد تشکیل شده است وظیفه تجزیه پروتئین‌های نشان‌دارشده به‌وسیله یوبیکوئیتین را انجام می‌دهد [۱۹]. یوبیکوئیتین در پلاسمای مایع منی انسان و همچنین در اسپرماتوزوآهای آسیب‌دیده وجود دارد که در طی گذر اپیدیدیمی توسط سلول‌های اپیتلیال اپیدیدیم ترشح می‌شود [۲۰]. آسیب در ساختار DNA و یا ساختارهای دیگر در بیضه ممکن است به راه افتادن مسیرهای آپوپتوز منجر شوند و این اسپرم‌ها ممکن است یوبیکوئیتینه شوند. علاوه‌بر آپوپتوز، پیچش نامناسب آنتی‌ژن‌های سطحی اسپرم و یا از بین رفتن ساختار آن‌ها می‌تواند باعث یوبیکوئیناسیون اسپرم‌های آسیب‌دیده شود [۲۱].

نتیجه‌گیری

باتوجه‌به نقش PRMT1 و اینکه در مطالعه حاضر بیان این ژن افزایش پیدا کرده است می‌توان گفت با افزایش بیان این ژن اسپرم‌های زیادی از بین می‌روند و درنتیجه تعداد اسپرم‌ها در افراد الیگواسپرم کاهش پیدا می‌کند. همچنین بیان این ژن بر تحرک کل اسپرم‌ها و تحرک پیش‌رونده اسپرمی اثر منفی داشته و باعث غیرطبیعی شدن شکل اسپرم در بیماران مبتلا به الیگواسپرمی شده است.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم با کد IR.IAU.QOM.REC.1399.026 و اخذ رضایت‌نامه کتبی از شرکت‌کنندگان انجام شده است.

حامی مالی

مطالعه حاضر از پایان‌نامه کارشناسی ارشد سمیه رضایی در دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم استخراج شده و تحت حمایت معاونت پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

انجام آزمایش‌ها، کمک در نگارش پیش‌نویس اولیه: سمیه رضایی؛ تجزیه‌وتحلیل داده‌ها: ناصر کلهر؛ طراحی مطالعه، نظارت و نگارش مقاله: مریم خوش‌سخن مظفر؛ خوانش و تأیید نهایی: همه نویسندگان.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

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

References

[1] Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Hum Reprod Update. 2003; 9(4):331-45. [DOI:10.1093/humupd/dmg027] [PMID]

[2] McLachlan RI, Rajpert-De Meyts E, Hoei-Hansen CE, de Kretser DM, Skakkebaek NE. Histological evaluation of the human testis--approaches to optimizing the clinical value of the assessment: Mini review. Hum Reprod. 2007; 22(1):2-16. [DOI:10.1093/humrep/del279] [PMID]

[3] Li N, Saitou M, Atilla-Gokcumen GE. The role of p38 MAPK in triacylglycerol accumulation during apoptosis. Proteomics. 2019; 19(13):e1900160. [DOI:10.1002/pmic.201900160] [PMID]

[4] Ríos-Arrabal S, Artacho-Cordón F, León J, Román-Marinetto E, Del Mar Salinas-Asensio M, Calvente I, et al. Involvement of free radicals in breast cancer. Springerplus. 2013; 2:404. [DOI:10.1186/2193-1801-2-404] [PMID]

[5] Infantino S, Light A, O'Donnell K, Bryant V, Avery DT, Elliott M, et al. Arginine methylation catalyzed by PRMT1 is required for B cell activation and differentiation. Nat Commun. 2017; 8(1):891. [DOI:10.1038/s41467-017-01009-1] [PMID]

[6] Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Lévy R, Czernichow S; Obesity-Fertility Collaborative Group. Obesity and increased risk for oligozoospermia and azoospermia. Arch Intern Med. 2012; 172(5):440-2. [DOI:10.1001/archinternmed.2011.1382] [PMID]

[7] Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. Nat Rev Cancer. 2002; 2(7):489-501. [DOI:10.1038/nrc839] [PMID]

[8] Richards JS, Sharma SC, Falender AE, Lo YH. Expression of FKHR, FKHRL1, and AFX genes in the rodent ovary: evidence for regulation by IGF-I, estrogen, and the gonadotropins. Mol Endocrinol. 2002; 16(3):580-99. [DOI:10.1210/mend.16.3.0806] [PMID]

[9] Shi F, LaPolt PS. Relationship between FoxO1 protein levels and follicular development, atresia, and luteinization in the rat ovary. J Endocrinol. 2003; 179(2):195-203. [DOI:10.1677/joe.0.1790195] [PMID]

[10] Park Y, Maizels ET, Feiger ZJ, Alam H, Peters CA, Woodruff TK, et al. Induction of cyclin D2 in rat granulosa cells requires FSH-dependent relief from FOXO1 repression coupled with positive signals from Smad. J Biol Chem. 2005; 280(10):9135-48. [DOI:10.1074/jbc.M409486200] [PMID]

[11] Skarra DV, Arriola DJ, Benson CA, Thackray VG. Forkhead box O1 is a repressor of basal and GnRH-induced Fshb transcription in gonadotropes. Mol Endocrinol. 2013; 27(11):1825-39. [DOI:10.1210/me.2013-1185] [PMID]

[12] Sinha D, Kalimutho M, Bowles J, Chan AL, Merriner DJ, Bain AL, et al. Cep55 overexpression causes male-specific sterility in mice by suppressing Foxo1 nuclear retention through sustained activation of PI3K/Akt signaling. FASEB J. 2018; 32(9):4984-99. [DOI:10.1096/fj.201701096RR] [PMID]

[13] Rossi BV, Abusief M, Missmer SA. Modifiable risk factors and infertility: What are the Connections? Am J Lifestyle Med. 2014; 10(4):220-231. [DOI:10.1177/1559827614558020] [PMID]

[14] World Health organization (WHO). WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and sperm-cervical mucus Interaction. Geneva: World Health organization; 1999. [Link]

[15] Tahmasbpour E, Balasubramanian D, Agarwal A. A multifaceted approach to understanding male infertility: Gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). J Assist Reprod Genet 2014; 31(9):1115-37. [DOI:10.1007/s10815-014-0280-6] [PMID] [PMCID]

[16] Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ. Gonadal cell apoptosis: Hormone-regulated cell demise. Hum Reprod Update. 1996; 2(2):103-17. [DOI:10.1093/humupd/2.2.103] [PMID]

[17] Daneshmandpour Y, Bahramzadeh B, Yousefi M, Nouri M, sakhinia E. [The analysis of expression level of UBE2B and CX3CR1 in sperm cell of infertile patients (Persian)]. Paper presented at: The 6th International Biomedical Congress. 10 November 2022; Tabriz, Iran. [link]

[18] Qin J, Wen B, Liang Y, Yu W, Li H. Histone modifications and their role in colorectal cancer (Review). Pathol Oncol Res. 2020; 26(4):2023-33. [DOI:10.1007/s12253-019-00663-8] [PMID] [PMCID]

[19] Jesenberger V, Jentsch S. Deadly encounter: Ubiquitin meets apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002; 3(2):112-21. [DOI:10.1038/nrm731] [PMID]

[20] Lippert TH, Seeger H, Schieferstein G, Voelter W. Immunoreactive ubiquitin in human seminal plasma. J Androl. 1993; 14(2):130-1. [DOI:10.1002/j.1939-4640.1993.tb01666.x] [PMID]

[21] Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. Rev Reprod. 1999; 4(1):38-47. [DOI:10.1530/ror.0.0040038] [PMID]