

Original Article

## The Study of Nitric Oxide Synthase 3 (NOS3) T-786C and 4a4b Gene Polymorphism in Iranian Men with Varicocele

Seyede Nafise Tabatabaei<sup>1</sup>, Mohammad Mehdi Heidari<sup>1\*</sup>, Mehri Khatami<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology,  
School of Sciences, Yazd  
University, Yazd, Iran.

### Abstract

**Background and Objectives:** Varicocele is one of the most common causes of male infertility. Varicocele is an abnormal dilatation and tortuosity of veins of the pampiniform plexus, which drain the testis. Studies have shown that elevated level of oxidative stress markers, such as nitric oxide (NO) in the dilated veins of patients with varicocele impair testicular function. The aim of this study, was to investigate the relationship between nitric oxide synthase 3 (NOS3), T-786C, and 4a4b gene polymorphism as a common genetic factor with the risk of varicocele in Iranian men.

**Methods:** The association of NOS3 T-786C and 4a4b gene polymorphisms in 60 Iranian men with varicocele and 61 control samples, were investigated using Multiplex-ARMS PCR and conventional PCR techniques. Data were statistically analyzed by t-test at the significance level of  $p < 0.05$ .

**Results:** The results revealed that among 60 men with varicocele, 95% had -786 TT genotype, 3.3% had heterozygotic genotype T-786C, and 1.6%, were CC in T-786C polymorphism. In addition, just 5% were heterozygote (ab) in 4a4b polymorphism and 95% had wild type genotype (aa), which was not statistically significant.

**Conclusion:** In this study, the majority of individuals had wild-type genotypes TT and aa in T-786C and 4a4b polymorphisms, respectively. According to this data, no significant differences were found between NOS3 gene T-786C and 4a4b polymorphisms in the individuals with varicocele. It is worth noting that further studies should be performed to confirm these findings.

**Keywords:** Infertility; Male; Varicocele; Nitric oxide synthase 3; Polymorphism; Genetics; Multiplex polymerase chain reaction.

DOI: 10.29252/qums.13.12.45

\*Corresponding Author:  
Mohammad Mehdi  
Heidari; Department of  
Biology, Faculty of Sciences,  
Yazd University, Yazd, Iran.

Email:  
heidarimm@yazd.ac.ir,  
heidarimm1393@gmail.com

Received: 19 Oct, 2019  
Accepted: 15 Feb, 2020

## بررسی پلی مورفیسم های T-786C و 4a4b ژن نیتریک اکسید سنتاز ۳ (NOS3) در مردان ایرانی مبتلا به واریکوسل

سیده نفیسه طباطبایی<sup>۱</sup>، محمد مهدی حیدری<sup>۱\*</sup>، مهری خاتمی<sup>۱</sup>

### چکیده

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم،  
دانشگاه یزد، یزد، ایران.

**زمینه و هدف:** یکی از رایج‌ترین دلایل ناباروری در مردان، واریکوسل می‌باشد که عبارت است از اتساع و پیچ‌خوردگی غیرطبیعی سیاهرگ‌های شبکه پامپینفرم که در نهایت باعث کوچک‌شدن بیضه می‌گردد. مطالعات نشان داده است که افزایش سطح مارکرهای استرس اکسیداتیو، از جمله نیتریک اکسید (NO) در وریدهای گشاد شده‌ی بیماران مبتلا به واریکوسل، سبب اختلال در عملکرد بیضه می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی پلی‌مورفیسم‌های T-786C و 4a4b ژن NOS3 به‌عنوان یک فاکتور ژنتیکی رایج و بررسی ارتباط آن با خطر ابتلا به واریکوسل در بیماران ایرانی بود.

**روش بررسی:** با استفاده از تکنیک‌های Multiplex-ARMS PCR و PCR به‌ترتیب ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های T-786C و 4a4b ژن NOS3 در ۶۰ مرد ایرانی مبتلا به واریکوسل و ۶۱ نمونه کنترل بررسی شد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از آزمون t-test انجام شد. سطح معنی‌داری،  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** نتایج مطالعه حاضر نشان داد از این ۶۰ فرد مبتلا به واریکوسل، ۹۵ درصد دارای ژنوتیپ -TTV۸۶، ۳/۳ درصد دارای ژنوتیپ هتروزیگوت -TCV۸۶ و ۱/۶ درصد افراد CC برای پلی‌مورفیسم T-786C بودند. علاوه‌براین، فقط ۵ درصد برای پلی‌مورفیسم 4a4b هتروزیگوت (ab) و ۹۵ درصد دارای ژنوتیپ نرمال aa بودند که از نظر آماری هیچ ارتباط معناداری مشاهده نشد.

**نتیجه‌گیری:** در این مطالعه، بیشتر افراد دارای دو ژنوتیپ TT و aa به‌ترتیب برای پلی‌مورفیسم‌های T-786C و 4a4b بودند. براساس این داده‌ها، ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم های ژن NOS3 و افراد مبتلا به واریکوسل مشاهده نشد. شایان ذکر است که مطالعاتی با نمونه‌های بیشتر برای تأیید این یافته‌ها باید انجام شود.

**کلیدواژه‌ها:** ناباروری مردان؛ واریکوسل، نیتریک اکسید سنتاز ۳؛ پلی‌مورفیسم؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Tabatabaei SN, Heidari MM, Khatami M. The Study of Nitric Oxide Synthase 3 (NOS3) T-786C and 4a4b Gene Polymorphism in Iranian Men with Varicocele. Qom Univ Med Sci J 2020;13(12):45-54. [Full Text in Persian]

\*نویسنده مسئول مکاتبات:

محمد مهدی حیدری؛ گروه  
زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه  
یزد، یزد، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:

heidarimm@yazd.ac.ir ,  
heidarimm1393@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۶

## مقدمه

براساس گزارش سازمان بهداشت جهانی

(WHO: World Health Organization)، ناباروری (Infertility) ۶۰ تا ۸۰ میلیون زوج را در دنیا تحت تأثیر قرار داده است که ۵۰ درصد آن‌ها وابسته به علل مردانه (Male factors) می‌باشد (۱). واریکوسل (Varicocele) یکی از رایج‌ترین دلایل ناباروری در مردان می‌باشد (۲). در یک جمعیت کلی، میزان بروز واریکوسل در مردان، حدود ۴/۴ تا ۲۲/۶ درصد است؛ درحالی‌که بروز آن در جمعیت مردان نابارور، به رقمی متفاوت، ۲۱-۴۱ درصد در مردان با ناباروری اولیه و ۷۵-۸۱ درصد در افراد با ناباروری ثانویه می‌رسد (۳،۴). همه افراد مبتلا به واریکوسل نابارور نیستند. در حقیقت عوامل ژنتیکی و مولکولی در بیماری زایی واریکوسل مرتبط با ناباروری نقش دارند. مکانیسم‌های آسیب‌شناسی (Pathophysiology) واریکوسل که منجر به ناباروری می‌شوند هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است (۵). با این وجود، دو مکانیسم مهم که در بیماری‌زایی واریکوسل و تأثیر آن بر عملکرد بیضه نقش اساسی دارند عبارتند از: نقص در عملکرد پروتئین‌های شرکت‌کننده در فرآیند بسته‌بندی DNA اسپرم و استرس‌های اکسیداتیو (Oxidative Stress) (۶،۸).

اسپرماتوزئوز موفق، نیازمند مجموعه‌ای از رویدادهای اپی‌ژنتیکی دقیق است که سبب برداشته‌شدن هیستون‌ها از روی کروماتین و جانشینی پروتئین‌های انتقالی هسته

(TNP: Transition Nuclear Proteins)، پروتامین‌ها (PRMs, Protamiens) و در نهایت، تراکم کروماتین اسپرم می‌باشد. بیان کافی و به جای TNP و PRMs در فشرده‌سازی موفق هسته اسپرم و باروری جنس نر اهمیت به‌سزایی دارد. اختلال در بیان و یا عملکرد پروتئین‌هایی که در بسته‌بندی ژنوم اسپرم دخالت دارند سبب ناپایداری ژنوم اسپرم در مبتلایان به واریکوسل می‌شود. جهش در ژن TNF1 و TNF2 و ارتباط آن با افراد مبتلا به واریکوسل گزارش شده است (۹،۱۰).

استرس اکسیداتیو نتیجه عدم تعادل بین رادیکال‌های آزاد اکسیژنی (ROS: Reactive Oxygen Species) (اکسیدانت‌ها) و آنتی‌اکسیدان‌ها در پلاسمای مایع منی می‌باشد که می‌تواند منجر به آسیب اسپرم، تغییر شکل و در نهایت ناباروری شود (۱۱).

مطالعات نشان داده است که افزایش سطح مارکرهای استرس اکسیداتیو، از جمله نیتریک اکسید (Nitric Oxide: NOx)، در وریدهای گشادشده‌ی بیماران مبتلا به واریکوسل سبب اختلال در عملکرد و حرکت اسپرماتوزوآ و در نهایت منجر به آپوپتوز اسپرم‌های بیضه می‌شود (۱۱).

نیتریک اکسید در پستانداران توسط آنزیم نیتریک اکسید سنتاز (NOS: Nitric Oxide Synthases)، تولید می‌گردد (۱۲). NOS3 یا نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیایی (eNOS) یکی از سه ایزوفرم ژن NOS می‌باشد. این ژن در سال ۱۹۹۳ کلون شد و مشخص شد که جایگاه ژنی آن در کروموزوم q35-36 قرار گرفته است و ۲۱ کیلوباز از DNA ژنومی کروموزوم ۷ را به خود اختصاص داده است. دارای ۲۶ اگزون است. ژن NOS3، mRNAی با طول ۴۰۵۲ نوکلئوتید و پروتئینی با وزن مولکولی ۱۳۵ کیلودالتون با ۱۲۰۳ اسید آمینه، کد می‌کند (۱۳،۱۴). از نیمه دهه ۱۹۹۰ تا به حال، پلی مورفیسم‌های مختلفی برای این ژن شناسایی شده است که مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از: جهش تک نوکلئوتیدی G894T (rs1799983) (آلل اصلی G) در اگزون شماره ۷ (جایگزینی گلوتامات به جای آسپارتات در اسید آمینه ۲۹۸) (۱۵،۱۶)، پلی مورفیسم T-786C (آلل اصلی T) در نوکلئوتید شماره ۷۸۶ در ناحیه پروموتور ژن eNOS که در آن تیمین (T) به سیتوزین (C) تبدیل می‌شود و پلی مورفیسم 4a4b که تکرار توالی‌های تکراری پشت سرهم

(VNTR, Variable Number of Tandem Repeats) ۲۷ جفت بازی، ۴ تا ۵ مرتبه در اینترون ۴ می‌باشد (۱۷).

پلی مورفیسم‌های ژن NOS3 به‌طور گسترده در بسیاری از بیماری‌های عروقی و التهابی بررسی شده است (۱۸). در سال‌های اخیر، محققان ارتباط بین پلی مورفیسم‌های ژن NOS3 و ناباروری در مردان را مورد مطالعه قرار داده‌اند (۱۹،۲۰)؛ ولی ارتباط بین پلی مورفیسم‌های ژن NOS و واریکوسل همراه با ناباروری هنوز به‌طور وسیع مطالعه نشده است. بنابراین در مطالعه حاضر، دو پلی مورفیسم مهم این ژن (T-786C, 4a4b) به‌عنوان یک فاکتور ژنتیکی رایج در خطر ابتلا به واریکوسل در مردان ایرانی بررسی شد.

## روش بررسی

این مطالعه، از نوع مورد-شاهدی است. نمونه خونی مربوط به ۶۰ بیمار مبتلا به واریکوسل مراجعه کننده به مرکز ناباروری یزد، پس از انجام معاینات بالینی توسط پزشک معالج و تأیید بیماری و همچنین نمونه های خون ۶۱ فرد کنترل با اسپرم های طبیعی که سابقه باروری داشتند (دارای فرزند زیر ۵ سال) به عنوان کنترل، جمع آوری شد. افراد کنترل از نظر سنی تقریباً با افراد بیمار تطابق داشتند و هیچ گونه سابقه فامیلی با افراد بیمار نداشتند. به منظور نمونه گیری خون و انجام طرح، از جلسه کمیته اخلاق در گروه زیست شناسی دانشگاه یزد تأییدیه گرفته شد و تمام افراد مورد

مطالعه رضایت نامه تدوین شده را آگاهانه امضا کردند. استخراج DNA از ۲۰۰ میکرولیتر لکوسیت های خون محیطی افراد بیمار و کنترل با روش استاندارد رسوب نمکی انجام و در لوله های حاوی EDTA نگهداری شد. شناسایی پلی مورفیسم (rs2070744) T-786C واقع در ۵' flanking region ژن NOS3 با استفاده از پرایمرهای زیر که توسط نرم افزار Gene Runner ۵.۳ طراحی شدند (جدول ۱)، انجام و با روش Multiplex-ARMS PCR (شکل ۱) در یک واکنش PCR تکثیر شدند.

جدول شماره ۱: توالی و موقعیت پرایمرهای طراحی شده برای پلی مورفیسم T-786C ژن NOS3 در روش Multiplex-ARMS PCR

| توالی پرایمر                                   | ژن (شناسه پلی مورفیسم)     | اندازه محصولات PCR  |
|------------------------------------------------|----------------------------|---------------------|
| F <sub>1</sub> : 5'-CTACAAACCCAGCATGCACTC-3'   | NOS3<br>(SNPID: rs2070744) | باند کنترل (317 bp) |
| R <sub>1</sub> : 5'-CATTAGGGTATCCCTTCCCTC-3'   |                            | آل T (151 bp)       |
| F <sub>2</sub> : 5'-GGGCATCAAGCTCTTCCCTGTCC-3' |                            | آل C (211 bp)       |
| R <sub>2</sub> : 5'-TAGGGCTGAGGCAGGGTCAGACA-3' |                            |                     |

در یک لوله ی PCR، ۵ میکرولیتر محصول PCR و ۵ میکرولیتر از بافر سنگین کننده، دناتوره کننده (Denaturing loading buffer) اضافه شد. پس از این که به طور کامل با یکدیگر مخلوط شدند، میکروتیوب ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و سپس ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد تا شکل فضایی مناسب را به خود بگیرند. ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد بارگذاری و در ولتاژ ۱۱۶ ولت به مدت ۲۰ ساعت در دمای محیط الکتروفورز شد (شکل ۲). در پی آن، نمونه هایی که دارای شیفت (Shift) باندی در ژل SSCP بودند جهت تعیین توالی برای شرکت ماکروژن کره فرستاده شد. نتایج تعیین توالی با استفاده از نرم افزار Chromas Lite مورد بررسی قرار گرفت. هم ردیفی توالی به کمک نرم افزار آنالیزی MEGA 4 با (Bank ID: NG-011992 Gene) توالی مرجع ژن انسانی مقایسه شد (شکل ۳). پلی مورفیسم (rs61722009) 4b4a با روش PCR معمولی با دو پرایمر (R و F) (طراحی شده با استفاده از نرم افزار Gene Runner ۵.۳) انجام شد (جدول ۲).

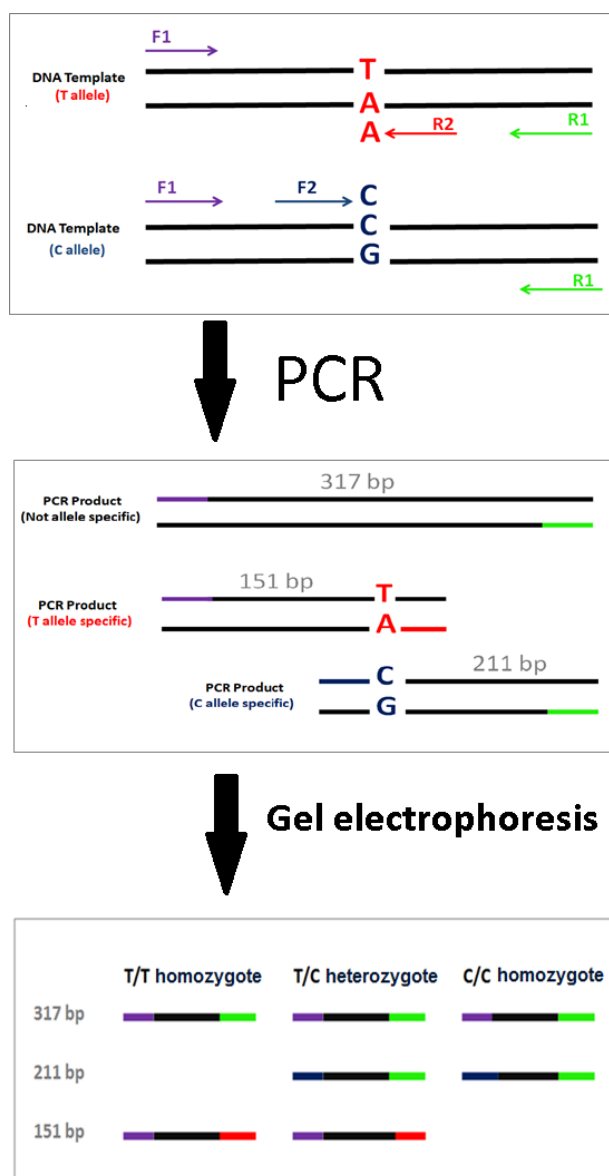
واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۵ پیکومول از هر یک از پرایمرهای خارجی (F1 و R1)، ۱۰ پیکومول از پرایمر داخلی (F2 و R2) و محلول X1، PCR Master Mix (شرکت یکتا تجهیز آزما، تهران، ایران) صورت گرفت. برنامه زمانی و دمایی واکنش PCR بدین صورت انجام شد: مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و تعداد ۳۵ سیکل، مرحله واسرشت (دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه)، مرحله اتصال (دمای ۶۱/۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه)، مرحله تکثیر یا طولی شدن (دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه) انجام شد و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه تنظیم شد. در نهایت برای اطمینان از تکثیر قطعات و تعیین ژنوتیپ هر نمونه، محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. برای اطمینان از صحت نتایج، نمونه های هتروزیگوت و هموزیگوت موتانت مشخص شده در ژل آگارز مربوط به پلی مورفیسم T-786C، به همراه تعدادی نمونه تصادفی دیگر، با تکنیک PCR-SSCP نیز بررسی شد. در SSCP قطعات روی ژل های پلی آکریل آمید با استفاده از الکتروفورز در شرایط دناتوره کردن جدا می شوند.

جدول شماره ۲: توالی و موقعیت پرایمرهای طراحی شده برای پلی مورفیسم 4b4a ژن NOS3 در روش Conventional PCR

| اندازه محصولات PCR | توالی پرایمر                   | ژن (شناسه پلی مورفیسم) |
|--------------------|--------------------------------|------------------------|
| آلل a (421 bp)     | F: 5'-AGGCCCTATGGTAGTGCCTTG-3' | NOS3                   |
| آلل b (394 bp)     | R: 5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC-3'  | (SNPID: rs61722009)    |

اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله تکثیر یا طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه بود. در نهایت محصول PCR برای تأیید صحت واکنش در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. آنالیز داده ها به وسیله آزمون t-test و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ۲۰ انجام شد. مقادیر  $P > 0.05$  بیانگر معنادار بودن تفاوت بین دو گروه است.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر و محلول X1، PCR Master Mix (شرکت یکتا تجهیز آزما، تهران، ایران) صورت گرفت. سیکل حرارتی بهینه واکنش PCR به صورت ۲ دقیقه دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، مرحله واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله



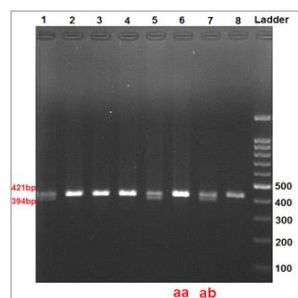
شکل شماره ۱: طرحی شماتیک از تکنیک Tetra-primer ARMS PCR.

جهش تک نوکلئوتیدی، جایگزینی سیتوزین به جای تیمین (T-C) است. دو پرایمر خارجی (F و R) قطعه ژنی ۳۱۷ bp را تکثیر می کنند. دو امپلیکون ویژه آلل با استفاده از دو جفت پرایمر تولید می گردد، پرایمرهای (به ترتیب F و R) امپلیکون ویژه آلل T (قطعه ۱۵۱ bp) و جفت دیگر (به ترتیب F و R) امپلیکون ویژه آلل C (قطعه ۲۱۱ bp) را تکثیر می کنند. با قرارگیری دو پرایمر خارجی در فواصل مختلف از نوکلئوتیدهای پلی مورفیک، دو امپلیکون ویژه آلل با طول های مختلف توسط الکتروفورز ژل آگارز تفکیک می شود. افراد دارای ژنوتیپ TT (هموزیگوت نرمال) دو باند ۳۱۷ bp و ۱۵۱ bp، افراد دارای ژنوتیپ TC (هتروزیگوت) سه باند ۳۱۷ bp، ۲۱۱ bp و ۱۵۱ bp و افراد دارای ژنوتیپ CC (هموزیگوت موتانت) دو قطعه ۳۱۷ bp و ۲۱۱ bp را تکثیر می کنند.

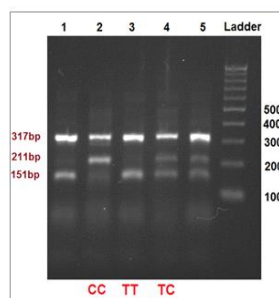
بررسی نتایج حاصل از PCR افراد مبتلا و آشکارسازی محصول آنها (شکل ۲ قسمت الف) نشان داد ژنوتیپ های T-786C در گروه بیمار به ترتیب ۵۷ نفر TT، ۲ نفر TC و فقط ۱ نفر CC بود و در گروه کنترل همه با ژنوتیپ TT بودند (جدول ۳). بنابراین با توجه به سطح معنادار ( $P=0/314$ ) مشخص شد که پلی مورفیسم T-786C از نظر آماری ( $P>0/05$ ) تفاوت معناداری در گروه کنترل و بیمار وجود ندارد. پس نمی تواند دلیلی برای افزایش ریسک ناباروری افراد مبتلا به واریکوسل باشد.

بررسی نتایج حاصل از PCR پلی مورفیسم a4b4 (شکل ۲ قسمت ب) نشان داد در گروه بیمار ۵۷ نفر ژنوتیپ aa و فقط ۳ نفر ab بودند. در بین بیماران هیچ فردی با ژنوتیپ هموزیگوت موتانت bb یافت نشد. در گروه کنترل همه افراد aa بودند (جدول ۳). بنابراین نتایج حاصل نشان داد که ارتباط معناداری ( $P=0/128$ ) بین پلی مورفیسم a4b4 با افزایش ریسک ناباروری افراد مبتلا به واریکوسل وجود ندارد.

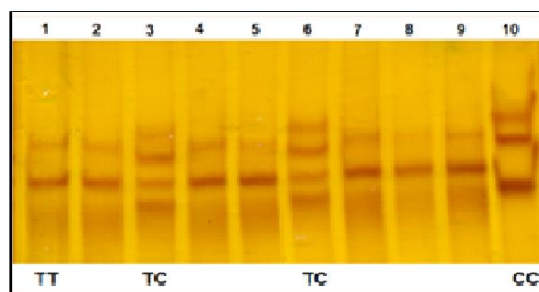
ب) 4a4b



الف) T-786C



ج) نتایج حاصل از SSCP

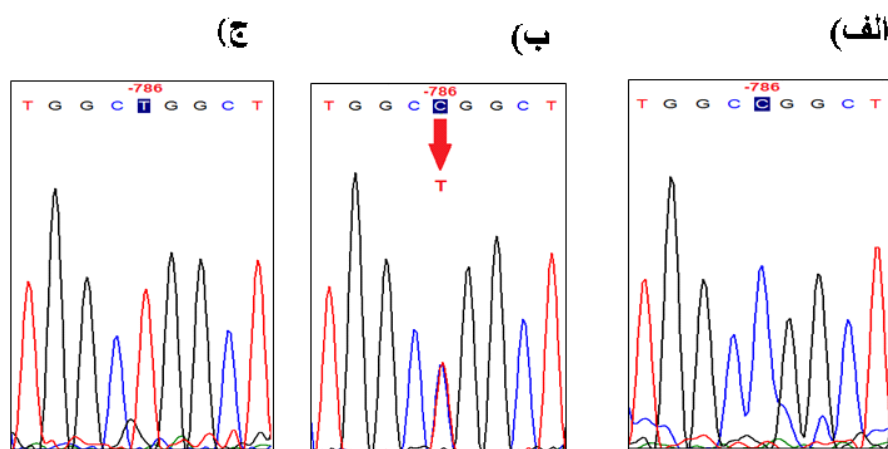


شکل شماره ۲: تصویر ژل آگارز ۱/۵ درصد پلی مورفیسم T-786C و a4b4 ژن NOS3 و ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد پلی مورفیسم T-786C در مردان مبتلا به واریکوسل.

قسمت الف) T-786C تکثیر شده با روش

Multiplex ARMS-PCR. افراد هموزیگوت نرمال (TT) دارای دو باند ۳۱۷ bp و ۱۵۱ bp و افراد هتروزیگوت (TC) دارای ۳ باند ۳۱۷، ۲۱۱ و ۱۵۱ bp هستند. فرد هموزیگوت موتانت (CC) فقط دو باند ۲۱۱ و ۳۱۷ bp را تکثیر می کند. قسمت ب) 4a4b تکثیر شده با روش Conventional PCR. آشکارسازی محصول PCR این پلی مورفیسم دو قطعه ی ژنی را نشان می دهد.

افرادی که ۴ نسخه از تکرار ناحیه ۲۷ جفت بازی را داشته باشند، قطعه ای به طول ۳۹۴ bp (نشان دهنده ی آلل b) و دارنده ۵ بار تکرار ناحیه ۲۷ جفت بازی، قطعه ۴۲۱ bp (آلل وحشی a) را نشان می دهند. (ab) ژنوتیپ هتروزیگوت دارای دو باند ۴۲۱ bp و ۳۹۴ هستند. یک مارکر DNA استاندارد ۱۰۰ bp در آخرین چاهک الکتروفورز شد. قسمت ج) نتایج ژل آکریل آمید SSCP، لاین ۱ ژنوتیپ وحشی TT، لاین ۳ و ۶ فرد هتروزیگوت (TC) و لاین ۱۰ جهش هموزیگوت CC را نشان می دهد.



شکل شماره ۳: بررسی گراف های حاصل از تعیین توالی پلی مورفیسم T-786C در موقعیت نوکلئوتیدی ۷۸۶ در ناحیه ۵ پروموتور ژن نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیالی با بیان های آللی مختلف.

الف) ژنوتیپ هموزیگوت (TT) نوع وحشی. ب) ژنوتیپ هتروزیگوت (TC)، همان طور که در شکل قسمت ب مشاهده می شود در موقعیت نشان داده شده دو گراف حاصل از نوکلئوتید C و نوکلئوتید T روی هم قرار گرفته اند که نشان دهنده هتروزیگوت بودن این نمونه است. ج) ژنوتیپ هموزیگوت جهش یافته (CC) را نشان می دهد.

جدول شماره ۳: فراوانی ژنوتیپی و آللی پلی مورفیسم های T-786C و 4a4b ژن NOS3

| P-value | OR (CI95%) | گروه کنترل (n=۶۱)<br>تعداد (درصد) | گروه بیمار (n=۶۰)<br>تعداد (درصد) | پلی مورفیسم<br>T-786C |
|---------|------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| ۰/۳۱۴   | ۰/۱۸۱      | ۶۱ (۱۰۰)                          | ۵۷ (۹۵)                           | ژنوتیپ TT             |
|         |            | ۰                                 | ۲ (۳/۳)                           | TC                    |
|         |            | ۰                                 | ۱ (۱/۷)                           | CC                    |
| ۰/۱۲۸   | ۰/۰۶۴      | ۱۲۲ (۱۰۰)                         | ۱۱۶ (۹۶/۷)                        | فراوانی آللی T        |
|         |            | ۰                                 | ۴ (۳/۳)                           | C                     |
|         |            | ۶۱ (۱۰۰)                          | ۵۷ (۹۵)                           | پلی مورفیسم 4a4b      |
| ۰/۱۲۸   | ۰/۰۶۴      | ۶۱ (۱۰۰)                          | ۵۷ (۹۵)                           | ژنوتیپ aa             |
|         |            | ۰                                 | ۳ (۵)                             | ab                    |
|         |            | ۰                                 | ۰                                 | bb                    |
| ۰/۱۲۸   | ۰/۰۶۴      | ۱۲۲ (۱۰۰)                         | ۱۱۷ (۹۷/۵)                        | فراوانی آللی a        |
|         |            | ۰                                 | ۳ (۲/۵)                           | b                     |



## بحث

تاکنون مطالعات متعددی در ارتباط با همراهی پلی مورفیسم های ژن NOS3 و ناباروری در کشورهای مختلف انجام شده است. این پلی مورفیسم ها، در افراد و اقلیم های مختلف، اثرات متفاوتی بر ناباروری مردان دارند (۲۰). در سال ۲۰۱۰ ارتباط بین سه پلی مورفیسم ژن NOS3 در ۳۵۲ بیمار ایرانی مبتلا به ناباروری آیدیوپاتیک و ۳۵۶ فرد سالم بررسی شد (۲۰). نتایج نشان داد که ژنوتیپ -CCV۸۶، TTA۹۴ و aa۴ به طور معناداری در افراد نابارور فراوان تر است؛ بنابراین تفاوت معناداری بین گروه نابارور مبتلا به آزواسپریمیا و الیگواسپریمیا در مقایسه با توزیع ژنوتیپی آنها وجود دارد (-CCV۸۶ در مقابل -TTA۹۴، TTV۸۶- در مقابل -GG۸۹۴ و aa۴ در مقابل -bb۴). همچنین آنها ارتباط آلل های -CV۸۶، T۸۹۴ و a را با افزایش خطر پارامترهای ضعیف مایع منی به دست آوردند؛ بنابراین اذعان کردند که ارتباط معناداری بین ژنوتیپ های NOS3 و فنوتیپ ناباروری وجود دارد. در سال ۲۰۱۴ Song و همکاران تأثیر سه پلی مورفیسم T-786C، G894T و 4a4b ژن NOS3 را در مردان نابارور چینی مبتلا به آیدیوپاتیک آستنوازواسپریمیا بررسی کردند (۲۱). نتایج متاآنالیز نشان داد، واریانت 4a4b در سطح آللی با آیدیوپاتیک آستنوازواسپریمیا ارتباط معناداری وجود دارد؛ درحالی که تفاوت معناداری بین دو پلی مورفیسم دیگر با آیدیوپاتیک آستنوازواسپریمیا چه در سطح آللی و چه در سطح ژنوتیپی یافت نشد. آنها همچنین بیان mRNA ژن NOS3 موجود در مایع منی بیماران را، با استفاده از تکنیک RT-qPCR بررسی کردند. بیان ژن NOS3 نسبت به افراد سالم افزایش یافته بود. در سال ۲۰۱۶ ارتباط بین سه پلی مورفیسم ژن NOS3 در ۱۰۲ مرد مبتلا به واریکوسل و ۱۰۰ نمونه کنترل مورد بررسی قرار گرفت (۲۲). آنالیزهای آماری نشان داد، پلی مورفیسم 4a4b در هر دو سطح ژنوتیپی و آللی ارتباط معناداری در گروه کنترل نسبت به بیمار داشت؛ درحالی که پلی مورفیسم T-786C نه در سطح آللی و نه در سطح ژنوتیپی هیچ تفاوت معناداری در گروه کنترل و بیمار نشان نداد. پلی مورفیسم G894T در گروه کنترل و بیمار هیچ تفاوت معناداری برای ژنوتیپ های GG، GT و TT و برای آلل های G و T نشان نداد؛ ولی آنالیز آماری برای ژنوتیپ های پلی مورف (GG+GT) تفاوت

قابل توجهی بیان داشتند. گفته شده ممکن است این پلی مورفیسم در وقوع واریکوسل با کاهش دادن سطح NO دخیل باشد (۲۲). با نگاهی بر مطالعات انجام شده، می توان فهمید تأثیر پلی مورفیسم های ژن NOS3 در جمعیت های نابارور مختلف متفاوت می باشد. این خود می تواند ناشی از عواملی متعددی باشد. به طور کلی، نتایج متاآنالیز نشان می دهد که دو پلی مورفیسم 4a4b و T-786C ارتباط معناداری با ناباروری در جمعیت مردان آسیایی و سفیدپوستان (۲۱) از جمله در جمعیت مردان ایرانی دارد. با این وجود، نتایج مطالعه حاضر نشان داد، دو پلی مورفیسم T-786C و 4a4b هیچ ارتباط آماری با خطر ابتلا به ناباروری در افراد مبتلا به واریکوسل ندارد. این تناقص می تواند نشان دهد که ناهمگنی ژنتیکی یا تفاوت در حجم نمونه، نوع طراحی مطالعه، جمعیت مورد مطالعه و فاکتورهای محیطی می تواند بر بیان فنوتیپیک پلی مورفیسم های مختلف ژن ها تأثیر گذار باشد.

## نتیجه گیری

در این مطالعه، عدم ارتباط پلی مورفیسم T-786C و 4a4b با افزایش ریسک ابتلا به واریکوسل دیده شد؛ به عبارت دیگر، وجود پلی مورفیسم -CCV۸۶ یا حالت هتروزیگوت آن TC نمی تواند احتمال ابتلا به واریکوسل را افزایش دهد. همچنین در پلی مورفیسم 4a4b وجود سه نمونه با پلی مورفیسم هتروزیگوت، نمی تواند دلیلی برای افزایش احتمال ابتلا به واریکوسل همراه با ناباروری باشد. با وجود این که در مطالعه حاضر هیچ گونه ارتباط آماری معناداری بین این دو پلی مورفیسم و خطر ابتلا به واریکوسل یافت نشد؛ اما احتمالاً این تغییرات می توانند به عنوان عامل بیماری بلکه به عنوان یک فاکتور تعدیل کننده در افزایش وخامت به بیماری تأثیر گذار باشند. گفتنی است یافتن نتایج دقیق تر با افزایش حجم نمونه و همچنین بررسی ژن های دیگر می تواند مفید باشد.

## تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک مولکولی بوده و توسط دانشگاه یزد حمایت مالی شده است.



## تضاد منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را گزارش نکرده اند.

بدین وسیله از همه بیماران به دلیل تهیه نمونه خون برای تحقیقات علمی، همچنین مرکز تحقیقات و کلینیکی ناباروری (یزد، ایران) که پژوهشگران را در انجام پژوهش یاری نمودند، تشکر و قدردانی می گردد.

## References:

1. Nangia AK, Luke B, Smith JF, Mak W, Stern JE, Group SW. National study of factors influencing assisted reproductive technology outcomes with male factor infertility. *Fertil Steril* 2011;96(3): 609-14. PMID: 21733503
2. Dhamija E, Das CJ, Razik A. Intratesticular varicocele: a rare cause of male factor infertility. *BMJ Case Rep* 2018;2018:224547. PMID: 29545445
3. Miyaoka R, Esteves SC. A critical appraisal on the role of varicocele in male infertility. *Adv Urol* 2012;2012:597495. PMID: 22162682
4. Moein MR, Vahidi S, Ghasemzadeh J, Tabibnejad N. Comparison of reactive oxygen species in neat and washed semen of infertile men. *Iran J Reprod Med* 2014;12(5): 301-6. PMID: 25031573
5. Sheehan MM, Ramasamy R, Lamb DJ. Molecular mechanisms involved in varicocele-associated infertility. *J Assist Reprod Genet* 2014;31(5): 521-6. PMID: 24643631
6. Talebi AR, Moein MR, Tabibnejad N, Ghasemzadeh J. Effect of varicocele on chromatin condensation and DNA integrity of ejaculated spermatozoa using cytochemical tests. *Andrologia* 2008;40(4): 245-51. PMID: 18727735
7. Nayeri M, Talebi AR, Heidari MM, Seifati SM, Tabibnejad N. Polymorphisms of sperm protamine genes and CMA3 staining in infertile men with varicocele. *Rev Int Androl* 2018;18(1): 7-13. PMID: 30482464
8. Heidari MM, Khatami M, Talebi AR. The POLG gene polymorphism in Iranian varicocele-associated infertility patients. *Iran J Basic Med Sci* 2012;15(2): 739-44. PMID: 23493802
9. Heidari MM, Khatami M, Talebi AR, Moezzi F. Mutation analysis of TNP1 gene in infertile men with varicocele. *Iran J Reprod Med* 2014;12(4): 257-62. PMID: 24976820
10. Heidari MM, Danafar A, Moezzi F, Khatami M, Talebi AR. The association between TNP2 gene polymorphisms and Iranian infertile men with varicocele: a case-control study. *Int J Reprod Biomed* 2019;17(8): 557-66. PMID: 31583373
11. Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* 2008;59(1): 2-11. PMID: 18154591
12. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012;33(7): 829-37. PMID: 21890489
13. Fish JE, Marsden PA. Endothelial nitric oxide synthase: insight into cell-specific gene regulation in the vascular endothelium. *Cell Mol Life Sci* 2006;63(2): 144-62. PMID: 16416260
14. Tai SC, Robb GB, Marsden PA. Endothelial nitric oxide synthase: a new paradigm for gene regulation in the injured blood vessel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(3): 405-12. PMID: 14656742
15. Shin SJ, Lee HH, Cha SH, Kim JH, Shim SH, Choi DH, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T> C, 4a4b, 894G> T) and haplotypes in Korean patients with recurrent spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010;152(1): 64-7. PMID: 20728041

16. Heidar MM, Khatami M. Designing and validation of one-step T-ARMS-PCR for genotyping the eNOS rs179983 SNP. Iran J Biotechnol 2017;15(3): 208-12. PMID: 29845071
17. Hyndman ME, Parsons HG, Verma S, Bridge PJ, Edworthy S, Jones C, et al. The T-786--> C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. Hypertension 2002;39(4): 919-22. PMID: 11967250
18. Srivastava K, Narang R, Sreenivas V, Das S, Das N. Association of eNOS Glu298Asp gene polymorphism with essential hypertension in Asian Indians. Clinica Chim Acta 2008;387(1-2): 80-3. PMID: 17935708
19. Bianco B, Ghirelli-Filho M, Cavalleiro CM, Cavalcanti V, Peluso C, Gava MM, et al. Variants in endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene in idiopathic infertile Brazilian men. Gene 2013;519(1): 13-7. PMID: 23419608
20. Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. The role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) T-786C, G894T, and 4a/b gene polymorphisms in the risk of idiopathic male infertility. Mol Reprod Dev 2010;77(8): 720-7. PMID: 20586099
21. Song P, Zou S, Chen T, Chen J, Wang Y, Yang J, et al. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) T-786C, 4a4b, and G894T polymorphisms and male infertility: study for idiopathic asthenozoospermia and meta-analysis. Biol Reprod 2015;92(2): 38. PMID: 25505202
22. Kahraman CY, Tasdemir S, Sahin I, Marzioglu Ozdemir E, Yarali O, Ziypak T, et al. The relationship between endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) polymorphisms, NOS3 expression, and varicocele. Genet Test Mol Biomarkers 2016;20(4): 191-6. PMID: 26866567