

ارتباط پلی مورفیسم Asp148Glu ژن ApE1 با ناباروری ایدیوپاتیک مردان

مصطفی یوسفی^۱، دکتر زیور صالحی*^۲، دکتر فرهاد مشایخی^۳، دکتر محمد هادی بهادری^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی سلولی تکوینی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان. ۲- استاد، گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان.

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان.

چکیده

زمینه و هدف: علی‌رغم پیشرفت‌های حاصله در شناخت فیزیولوژی تولیدمثل انسان؛ دلایل اصلی ناباروری مردان در ۵۰ درصد موارد ناشناخته باقی مانده که به آن ناباروری ایدیوپاتیک اطلاق می‌گردد و در حدود ۵-۷ درصد از جمعیت مردان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. محصول ژن ApE1 (apurinic/apyrimidinic endonuclease) یک پروتئین چند عملکردی است که در مسیر ترمیم با برداشت باز (BER) نقش مهمی دارد. پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی T>G در اگزون شماره ۵ منجر به جانشینی Asp>Glu در کدون ۱۴۸ (Asp148Glu) می‌گردد. این مطالعه به منظور تعیین ارتباط پلی مورفیسم Asp148Glu ژن ApE1 و ناباروری ایدیوپاتیک در مردان انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه مورد- شاهدهی نمونه‌های خون ۹۰ مرد مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک و ۹۰ مرد سالم جمع‌آوری و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده، با روش AS-PCR (Allele-Specific PCR) مورد بررسی قرار گرفتند و ارتباط بین فراوانی ژنوتیپی و اللی در گروه‌های مورد و شاهد تعیین گردید.

یافته‌ها: بین پلی مورفیسم کدون ۱۴۸ ژن ApE1 و ناباروری ایدیوپاتیک مردان در گروه‌های مورد مطالعه ارتباط آماری معنی‌داری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از عدم ارتباط بین پلی مورفیسم Asp148Glu با ناباروری ایدیوپاتیک مردان بود.

کلید واژه‌ها: ناباروری، مردان، پلی مورفیسم، ژن ApE1

* نویسنده مسؤول: دکتر زیور صالحی، پست الکترونیکی genetics@yahoo.co.uk

نشانی: رشت، خیابان نامجو، دانشکده علوم پایه، گروه بیولوژی، تلفن و نامبر ۰۱۳۱-۳۲۳۳۶۴۷

وصول مقاله: ۱۳۹۳/۲/۲۰، اصلاح نهایی: ۱۳۹۳/۹/۱۷، پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۹/۱۸

مقدمه

عامل مرد دخیل است. از این حیث پرداختن به مقوله ناباروری مردان امری جدی و ضروری است (۳).

امروزه بحث ارتباط پلی مورفیسم‌های ژنتیکی و استعداد ابتلا به برخی بیماری‌ها از جمله مباحث پراهمیت است (۱). به الل‌های مختلف یک ژن در جمعیت یک گونه که ممکن است موجب ایجاد فنوتیپ‌های مختلف (فراوانی بیش از یک درصد) گردد؛ پلی مورفیسم ژنتیکی گویند (۴).

با توجه به هزاران رخداد تخریبی که ژنوم روزانه با آنها روبرو است و همچنین اشتباهات زمان همانندسازی ژنوم، ضروری است که سلول‌ها دارای سیستم‌های ترمیمی کارا باشند. یکی از سیستم‌های ترمیم DNA سلول‌ها Base Excision Repair (BER) یا ترمیم با برداشت باز است. از این مکانیسم در ترمیم بسیاری از نوکلئوتیدهای تغییر یافته که در آنها باز تحت آسیب‌های نسبتاً جزئی قرار گرفته‌اند (مانند قرارگیری در معرض عوامل آلکیل‌

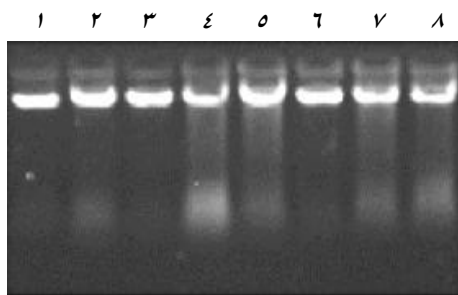
به عدم توفیق زوجین در بارداری پس از طی یک سال از مقاربت‌های منظم و متوالی بدون استفاده از روش‌های پیشگیری، ناباروری اطلاق می‌گردد. دلیل تقریباً نیمی از موارد ناباروری‌ها مربوط به مردان است (۱). امروزه ناباروری با اثرگذاری بر حدود ۱۵ درصد زوج‌هایی که برای داشتن یک فرزند تلاش می‌کنند؛ مشکلی بزرگ در حوزه سلامت محسوب می‌شود. با این که پیشرفت‌های عظیمی در شناخت فیزیولوژی تولیدمثل انسان حاصل شده؛ اما دلایل اصلی ناباروری مردان در تقریباً ۵۰ درصد از موارد ناشناخته باقی مانده که از آن به عنوان ناباروری ایدیوپاتیک یاد می‌شود. ناباروری در حدود ۵-۷ درصد جمعیت مردان را تحت تاثیر قرار می‌دهد؛ ولی این رقم در حال افزایش است (۲). امروزه ناباروری یکی از مشکلات عمده روحی، اقتصادی و اجتماعی در جوامع بشری محسوب می‌گردد که تقریباً در نیمی از آن به نحوی

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر قطعه پلی مورفیک

توالی آغازگرها (bp)	اندازه قطعه تکثیر شده (bp)	الل	پلی مورفیسم
F: 5'-GACCCTATTGATGCCTAATGCC-3'	۱۵۲	T	Asp148Glu
R: 5'-GCCTCCTGATCATGCTCCACA-3'	۱۵۲	T	الل درج
F: 5'-GACTGTTAACCCGTGCGTA-3'	۴۵۰	G	Asp148Glu
R: 5'-GCCTCCTGATCATGCTCCACC-3'	۴۵۰	G	الل حذف

آزمایشگاه منتقل گردید.

DNA ژنومی توسط کیت Gpp Solution (Gene pajouhan, Iran) و براساس پروتکل کیت از نمونه‌های خون افراد استخراج گردید. پس از ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده توسط ژل آگارز یک درصد (شکل یک)، DNA تا قبل از بررسی‌های مولکولی به فریزر با دمای ۷۰- درجه سانتی گراد منتقل شد.



شکل ۱: DNA استخراج شده از مردان سالم و نابارور به ترتیب در ستون‌های ۱-۸ مشاهده می‌شود. (ژل آگارز یک درصد)

در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) مربوط به ژن مورد نظر، از دستگاه ترموسایکلر ۴۸ چاهکی (Bio Rad, England) و برای هر کدام از نواحی پلی مورفیک از دو جفت پرایمر اختصاصی طراحی شده به منظور تکثیر محدوده ژنی قطعه پلی مورفیسم استفاده شد (جدول یک). شرایط PCR برای تکثیر ناحیه ۱۴۸-اگزون شماره ۵ (کدون ۱۴۸) و گسترش‌های رشته شامل ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۵ سیکل در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد بود. شناسایی پلی مورفیسم کدون ۱۴۸ توسط تکنیک AS-PCR صورت گرفت و برای هر الل به صورت مجزا واکنش PCR (واکنش دو تیوبی مجزا، یک تیوب حاوی واکنش همراه پرایمرهای Forward و Reverse الل T و تیوب دیگر واکنش توسط پرایمرهای Forward و Reverse الل G) انجام گردید. بدین منظور ۵μl از DNA استخراج شده، ۱۰μl کیت مخصوص PCR (PCR Master Mix; Cinnagene, Iran)، ۱μl پرایمر رو به جلو (Forward)، ۱μl پرایمر رو به عقب (Reverse) و ۳μl آب مقطر را مخلوط و تحت AS-PCR قرار دادیم. سپس صحت واکنش PCR انجام شده، توسط ژل آگارز ۲ درصد ارزیابی شد.

کننده یا اشعه یونیزه کننده؛ استفاده می‌شود (۵).

محصول ژن ApE1 (apurinic/apyrimidinic endonuclease-1) یک پروتئین چندعملکردی است که در مسیر ترمیم با برداشت باز (BER) در ترمیم DNA اکسیده یا آلکیل‌شده نقش مهمی ایفا می‌کند (۶). این ژن شامل ۵ اگزون و ۴ اینترون به اندازه ۲/۲۱ kb است که بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۱۲-q11.2-q11.۱۴ انسانی قرار دارد. ApE1 با هیدرولیز قطعات ۳ DNA اکسیده شده، 3'-OH نرمال انتهایی نوکلئوتید را که برای ترمیم DNA و امتداد تک و یا دو رشته شکسته شده لازم است؛ تولید می‌کند (۷). فقدان ApE1 می‌تواند منجر به اختلال در فرایند ترمیم DNA اسپرماتوزوا گردد (۸).

پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی T>G در اگزون شماره ۵ منجر به جانشینی Asp>Glu در کدون ۱۴۸ می‌شود. این پلی مورفیسم در دومین اندونوکلاز پروتئین تعیین محل شده و شناخته شده‌ترین پلی مورفیسم ناحیه کد کننده ApE1 است (۹). با توجه به نقش مهم این ژن در ترمیم DNA آسیب دیده سلول‌ها و تایید وجود اختلال در ترمیم DNA در بسیاری از بیماری‌ها، این مطالعه به منظور تعیین ارتباط پلی مورفیسم Asp148Glu ژن ApE1 و ناباروری ایدیوپاتیک در مردان انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه مورد-شاهدی نمونه‌های خون ۹۰ مرد مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک با میانگین سنی ۳۵/۲۶±۲/۹ سال مراجعه کننده به بخش ناباروری بیمارستان الزهرا (س) رشت و ۹۰ مرد سالم با میانگین سنی ۳۴/۵۲±۳/۲ سال طی آذر ۱۳۹۱ لغایت بهمن ۱۳۹۲ جمع‌آوری گردید.

معیار ورود به مطالعه در مردان گروه مورد وجود سابقه ناباروری به مدت دو سال و در مردان گروه شاهد دارا بودن دو فرزند بود. همچنین محدوده سنی آزمودنی‌ها بین ۲۸-۴۲ سال در نظر گرفته شد. معیار عدم ورود به مطالعه شامل آزواسپرمی، هیپوگنادیسم هیپوگنادوتروفیک، واریکوسل، ناهنجاری‌های مجرای دفران، بیماری‌های سیستمیک، مصرف استروئیدهای آنابولیک و آنتی‌بادی‌های ضد اسپرم بود.

پس از تکمیل چک لیست و اخذ رضایت‌نامه، ۲ میلی‌لیتر خون از افراد تهیه و برای استخراج DNA در لوله‌های حاوی EDTA به

سلولی می‌گردد (۱۵). در مطالعه Gu و همکاران پلی‌مورفیسم 1349T>G ژن Ape1 به عنوان یک نشانگر احتمالی برای پیشرفت سرطان معده معرفی شد (۱۶). در مطالعه Li و همکاران پلی‌مورفیسم T1349G با استعداد ابتلا به سرطان کولورکتال گزارش گردید (۱۷). از طرفی در مطالعه Wu و همکاران ارتباطی بین این پلی‌مورفیسم و افزایش خطر سرطان سینه مشاهده نگردید (۱۸). Krausz و Forti عوامل محیطی، ناهنجاری‌های کروموزومی، پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی، ریز حذف‌های کروموزوم Y و گروه‌های ژنی مختلف را از جمله عوامل موثر در ناباروری مردان معرفی کردند (۱۹). لازم به ذکر است تاکنون مطالعه‌ای در خصوص بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم 1349T>G ژن Ape1 و ناباروری مردان صورت نگرفته است.

از آنجایی که ناباروری یک بیماری چندعاملی است و تحت تاثیر عوامل مختلف ژنتیکی و محیطی قرار دارد؛ لذا نقش سایر ژن‌های دخیل در فرایند ترمیم، عوامل محیطی و حتی سایر پلی‌مورفیسم‌های شناخته شده این ژن، در ایجاد و بروز ناباروری ایدیوپاتیک مردان قابل تامل و بررسی است. هرچند نقش ویژگی‌های ژنتیکی افراد در ارتباط پلی‌مورفیسم و استعداد ابتلا به ناباروری ایدیوپاتیک موثر است؛ اما ممکن است نتایج به دست آمده، در جمعیت‌های دیگر به واسطه متفاوت بودن خزانه ژنتیکی جمعیت‌ها و یا تغییر اندازه جمعیت مورد مطالعه تغییر کند. لذا حصول نتایج قطعی نیازمند مطالعات با تعداد نمونه‌های بیشتری است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که پلی‌مورفیسم Asp148Glu ارتباط آماری معنی‌داری با ناباروری ایدیوپاتیک مردان ندارد.

تشکر و قدردانی

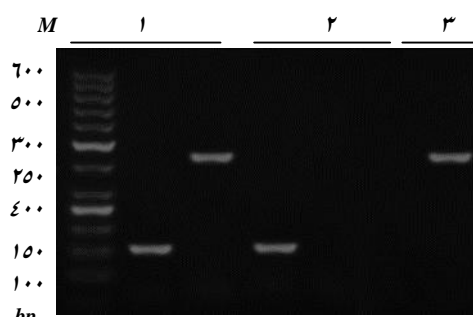
این مقاله حاصل پایان نامه آقای مصطفی یوسفی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیولوژی سلولی تکوینی از دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان بود. بدین وسیله از آزمایشگاه ژنتیک دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان به خاطر فراهم کردن تجهیزات و از کارکنان بخش ناباروری بیمارستان الزهرا (س) رشت به خاطر تهیه نمونه‌ها نهایت سپاس خود را اعلام می‌داریم.

References

- Miyamoto T, Tsujimura A, Miyagawa Y, Koh E, Namiki M, Sengoku K. Male infertility and its causes in human. *Adv Urol*. 2012; 2012:384520.
- Ferlin A, Arredi B, Foresta C. Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxicol*. 2006 Aug; 22(2):133-41.
- Zhou B, Shan H, Ying Su, Xia K, Shao X, Mao W, Shao Q. The association of APE1 -656T > G and 1349 T > G polymorphisms

یافته‌ها

انواع ژنوتیپ‌های مشاهده شده در شکل ۲ آمده است. در پلی‌مورفیسم کدون ۱۴۸ گروه مورد ۲۴ نفر (۶۶/۲۶ درصد) دارای ژنوتیپ T/T، ۵۷ نفر (۳۳/۶۳ درصد) دارای ژنوتیپ T/G و ۹ نفر (۱۰ درصد) دارای ژنوتیپ G/G بودند. در گروه شاهد ژنوتیپ T/T در ۳۶ نفر (۴۰ درصد)، ژنوتیپ T/G در ۴۲ نفر (۶۶/۴۶ درصد) و ژنوتیپ G/G در ۱۲ نفر (۳۳/۱۳ درصد) مشاهده شد. بین پلی‌مورفیسم‌های مشاهده شده دو گروه مورد و شاهد اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت. الل T گروه مورد و شاهد به ترتیب ۸۱ عدد (۵۸ درصد) و ۷۸ عدد (۶۳ درصد) و همچنین الل G در گروه‌های مورد و شاهد به ترتیب ۶۶ عدد (۴۲ درصد) و ۵۴ عدد (۳۷ درصد) تعیین شد. این مقادیر اختلاف آماری معنی‌داری را نشان ندادند.



شکل ۲: محصولات PCR با پرایمرهای حذف و درج کدون ۱۴۸

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه بین پلی‌مورفیسم ژن Ape1 و ناباروری ایدیوپاتیک مردان ارتباط آماری معنی‌داری یافت نشد. عموماً آسیب‌های DNA به‌طور مستمر ایجاد می‌شوند که به‌طور اولیه توسط مسیر ترمیم با حذف باز (BER) ترمیم می‌شوند (۱۰ و ۱۱). ژن‌های دخیل در BER می‌توانند بر توان ترمیم DNA اثرگذار باشند (۱۲). رایج‌ترین پلی‌مورفیسم ناحیه کدکننده Ape1، Asp148Glu (T1349G) است که ارتباط آن با خطر ابتلا به انواعی از سرطان‌ها نظیر سرطان ریه، مثانه، کولورکتال، سینه، پانکراس، سرگردن، مری، تیروئید و پروستات شناخته شده است (۱۳ و ۱۴). مطالعات بر روی پلی‌مورفیسم 1349T>G نشان می‌دهد که الل G توان فعالیت اندونوکلئازی، اتصال به DNA و ارتباط با پروتئین‌های دیگر را BER کاهش داده و نیز باعث تاخیر در مرحله G2 چرخه

and cancer risk: a meta-analysis based on 37 case-control studies. *BMC Cancer*. 2011; 11:521.

4. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res*. 1998 Dec; 8(12):1229-31.

5. Evans AR, Limp-Foster M, Kelley MR. Going APE over ref-1. *Mutat Res*. 2000 Oct; 461(2):83-108.

6. Izumi T, Hazra TK, Boldogh I, Tomkinson AE, Park MS, Ikeda S, et al. Requirement for human AP endonuclease 1 for repair of 3'-blocking damage at DNA single-strand breaks induced by reactive oxygen species. *Carcinogenesis*. 2000 Jul;21(7):1329-34.
7. Robson CN, Hochhauser D, Craig R, Rack K, Buckle VJ, Hickson ID. Structure of the human DNA repair gene HAP1 and its localisation to chromosome 14q 11.2-12. *Nucleic Acids Res*. 1992 Sep;20(17):4417-21.
8. Horton JK, Wilson SH. Hypersensitivity phenotypes associated with genetic and synthetic inhibitor-induced base excision repair deficiency. *DNA Repair (Amst)*. 2007 Apr;6(4):530-43.
9. Hadi MZ, Coleman MA, Fidelis K, Mohrenweiser HW, Wilson DM 3rd. Functional characterization of Ape1 variants identified in the human population. *Nucleic Acids Res* 2000 Oct; 28(20): 3871-9.
10. Skakkebaek NE, Giwercman A, de Kretser D. Pathogenesis and management of male infertility. *Lancet*. 1994 Jun; 343(8911):1473-9.
11. Demple B, Johnson A, Fung D. Exonuclease III and endonuclease IV remove 3' blocks from DNA synthesis primers in H2O2-damaged Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Oct; 83(20):7731-5.
12. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res*. 2004 Sep; 567(1):1-61.
13. Gu D, Wang M, Wang M, Zhang Z, Chen J. The DNA repair gene APE1 T1349G polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 27 case-control studies. *Mutagenesis*. 2009 Nov; 24(6):507-12.
14. Gossage L, Perry C, Abbotts R, Madhusudan S. Base excision repair factors are promising prognostic and predictive markers in cancer. *Curr Mol Pharmacol*. 2012 Jan;5(1):115-24.
15. Hu JJ, Smith TR, Miller MS, Mohrenweiser HW, Golden A, Case LD. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis*. 2001 Jun; 22(6):917-22.
16. Gu D, Wang M, Wang S, Zhang Z, Chen J. The DNA Repair Gene APE1 T1349G Polymorphism and Risk of Gastric Cancer in a Chinese Population. *PLoS ONE*. 2011; 6(12):e28971.
17. Li Y, Li S, Wu Z, Hu F, Zhu L, Zhao X, et al. Polymorphisms in genes of APE1, PARP1, and XRCC1: risk and prognosis of colorectal cancer in a northeast Chinese population. *Med Oncol*. 2013 Jun;30(2):505.
18. Wu B, Liu HL, Zhang S, Dong XR, Wu G. Lack of an association between two BER gene polymorphisms and breast cancer risk: a meta-analysis. *PLOS ONE*. 2012;7(12):e50857.
19. Krausz C, Forti G. Clinical aspects of male infertility. In: McElreavey K (Ed.): *The genetic basis of male infertility*. Berlin: Springer-Verlage. 2000; pp: 1-21.

Original Paper

Association of ApE1 gene Asp148Glu polymorphism and idiopathic male infertility

Yousefi M (B.Sc)¹, Salehi Z (Ph.D)*², Mashayekhi F (Ph.D)², Bahadori MH (Ph.D)³

¹M.Sc student in Cell and Developmental Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. ²Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. ³Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medical Sciences, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

Abstract

Background and Objective: Despite enormous progress in the understanding of human reproductive physiology, the underlying cause of male infertility remains undefined in about 50.0% of cases, which are referred to as idiopathic infertility and affects about 5.0-7.0% of the general male population. Human apurinic/aprimidinic endonuclease (ApE1) is a multifunctional protein that has an important role in the base excision repair (BER) pathway. ApE1 SNP T>G found in exon 5 led to substitution of Asp>Glu at codon 148. This study was done to evaluate the association of ApE1 Asp148Glu polymorphism and the risk of idiopathic male infertility.

Methods: In this case-control study, blood samples were collected from 90 patients diagnosed with idiopathic male infertility and 90 healthy men, genotyped by Allele-Specific PCR (AS-PCR) method by using specific primers that were designed and the association between genotype and allele frequencies in cases and controls were estimated.

Results: There was no significant association between ApE1 gene polymorphism at codon 148 in case and control groups.

Conclusion: No significant association was found between the Asp148Glu polymorphism and idiopathic male infertility.

Keywords: Infertility, Male, Polymorphism, ApE1 gene

* **Corresponding Author:** Salehi Z (Ph.D), E-mail: geneticzs@yahoo.co.uk

Received 10 May 2014

Revised 8 Dec 2014

Accepted 8 Dec 2014