

بررسی بیان ژن های *IFT122* و *ENTPD4* در مردان مبتلا به آستنوزواسپرمی

Investigating the expression of *IFT122* and *ENTPD4* genes in men with Asthenozoospermia

بابک ناصری^۱، نرگس زینال زاده^{۱*}، جعفر محسنی^۲، پریسا گوزلی^۱

Babak Naseri¹, Narges Zeinalzadeh^{1*}, Jafar Mohseni², Parisa Gozali¹

۱- گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، ایران.

۲- گروه ژنتیک تولید مثل، مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی استان آذربایجان شرقی، تبریز، ایران.

1. Department of Animal Sciences, Faculty of Natural Sciences, University of
Tabriz, Tabriz, Iran.

2. Reproductive Genetics Research, ACECR ART Center, East Azerbaijan ACER,
Tabriz, Iran.

*Corresponding Author, Email

nzeinalzadeh@gmail.com: پست الکترونیکی: نویسنده مسئول مکاتبات،

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۵/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۲۰)

چکیده

واژه‌های کلیدی

آستنوزواسپرمی،

ژن *ENTPD4*،

ژن *IFT122*،

ناباروری مردان،

Real-time PCR

آستنوزواسپرمی یکی از علل اصلی ناباروری مردان می‌باشد. در این افراد قدرت حرکت اسپرم کاهش یافته یا فاقد حرکت است. ناباروری مردان، در حدود ۵۰ درصد از زوجین نابارور دیده می‌شود و از دلایل متعدد ژنتیکی آن می‌توان به ناهنجاری‌های سیتوژنتیکی، نقص‌های ژنی و عوامل اپی ژنتیکی اشاره کرد. تغییرات بیان برخی از ژن‌ها می‌تواند باعث ایجاد اختلال در حرکت اسپرم و آستنوزواسپرمی شود. این پژوهش با هدف بررسی تفاوت در الگوی بیان ژنهای Ectonucleoside triphosphate (*ENTPD4*) و Intraflagellar transport 122 (*IFT122*) در نمونه مایع منی ۲۰ مرد نابارور مبتلا به آستنوزواسپرمی و ۱۰ مرد سالم نرموزواسپرمیک با روش quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) انجام شد. طبق نتایج، میزان بیان ژن *ENTPD4* در نمونه‌های بیمار نسبت به نمونه‌های سالم به صورت معنی داری افزایش ($p = 0.01$) و بیان ژن *IFT122* کاهش ($p = 0.0001$) یافته بود. ژن *IFT122* در سرهم شدن و نگهداری تاژک اسپرم و ژن *ENTPD4* در هیدرولیز نوکلئوتیدهای تری فسفات به دی فسفات و مونوفسفات در سوخت و ساز انرژی نقش دارد و مطالعه حاضر بر اهمیت این دو ژن در سازوکار ناباروری مردان تأکید دارد.

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Volume 11, Number 2, 2022

Abstract

Asthenozoospermia is one of the major causes of male infertility, the motility of the sperm is decreased or absent in these men. Male infertility occurs in approximately 50% of infertile couples and among the many genetic causes of infertility, we can mention cytogenetic abnormalities, gene defects, and epigenetic factors. The aberrant mRNA expression of some genes can also impair sperm motility. This research aims to study the difference in expression of the Intraflagellar transport 122 gene (*IFT122*) and the Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4 gene (*ENTPD4*) in the semen sample of 20 infertile men with asthenozoospermia and 10 healthy normozoospermic men with Real-time polymerase chain reaction. The results demonstrated that the expression level of the *ENTPD4* gene increased ($p = 0.01$) and the *IFT122* gene decreased significantly ($p = 0.0001$) in the asthenozoospermia group in comparison with the control group. The *IFT122* gene plays a role in the assembly and maintenance of flagella, and the *ENTPD4* gene hydrolyzes triphosphate nucleotides to diphosphate and monophosphate in energy metabolism. The current study emphasizes their importance in male infertility mechanism.

Key words: Asthenozoospermia, *ENTPD4* gene, *IFT122* gene, Male infertility, Real-Time PCR.

مقدمه

ناباروری را می‌توان عدم توانایی باردار شدن در حداقل ۱۲ ماه مقاربت منظم و محافظت نشده تعریف کرد (Vander Borgh et al. 2018). در سراسر جهان بیش از ۵۰ میلیون زوج تحت تاثیر ناباروری قرار دارند که نیمی از موارد به عوامل مردانه نسبت داده می‌شود (Inhorn et al. 2015; Asgari et al. 2020). ناباروری مردان یک بیماری پیچیده است و ناهنجاری های کروموزومی و تغییرات ژنتیکی مسئول حدود ۱۵ درصد موارد می‌باشد (Siasi et al. 2020). آستنوزواسپرمی (Asthenozoospermia-AZS) یکی از علل اصلی ناباروری مردان است (Shahrokhi et al. 2020). سازمان جهانی بهداشت، آستنوزواسپرمی را بر مبنای نمونه مایع منی حاوی اسپرم متحرک کمتر از ۴۰ درصد و با تحرک پیشرونده کمتر از ۳۲ درصد تعریف می‌کند (WHO 2010). این بیماری به دو صورت AZS تنها بدون علائم دیگر و AZS سندرمی با چندین علامت بالینی دیگر مشاهده می‌شود (Tu et al. 2020).

تحرک اسپرم به در دسترس بودن انرژی، مکالمه (Crosstalk) میان چندین مسیر سیگنال دهی و یک تاژک با عملکرد کامل وابسته است و جهش در ژن های دخیل در سرهم بندی تاژک و تنظیم حرکت آن می‌تواند باعث AZS شود (Tu et al. 2020). از این رو درک علل ژنتیکی و سازو کارهای موثر در AZS بسیار مهم می‌باشند. ترابری درون تاژکی (-Intraflagellar transport IFT) برای سرهم بندی و نگهداری تاژک و مژک اکثر یوکاریوت

ها ضروری می‌باشد که در آن، محموله بر روی ذرات IFT بارگیری شده و در جهت پیش رونده از قاعده تاژک به سمت نوک تاژک توسط موتورهای کینزین ۲ و در جهت برگشتی به پایه تاژک توسط داینین ۲ سیتوپلاسمی منتقل می‌شود. این ذرات متشکل از دو کمپلکس A و B می‌باشند و هر کدام به ترتیب حاوی حداقل ۶ و ۱۰ پروتئین IFT هستند (Mul et al. 2022). ذرات IFT، علاوه بر ترابری محموله، سیگنال هایی را بین تاژک و جسم سلولی منتقل می‌کنند (San Agustin et al. 2015).

از حدود ۲۲ ژن IFT شناسایی شده، شش ژن متعلق به کمپلکس A و بقیه متعلق به کمپلکس B می‌باشند. نقص در اجزای IFT باعث ایجاد طیفی از بیماری ها، از نقص های تکوینی گرفته تا چاقی، دیابت و سرطان می‌شود. بسیاری از این بیماری ها به صورت سندرم های ژنتیکی ظاهر می‌شوند که از آنها می‌توان سندرم ژوبرت (Joubert syndrome)، باردت بیدل (Bardet-Biedel) و نفرونوفتیس (Nephronophthisis) را نام برد (Zhang et al. 2017). علیرغم مطالعه بیان ژنهای مختلف IFT در مردان نابارور، تا کنون گزارشی از بیان ژن IFT122 در مردان مبتلا به آستنوزواسپرمی ارائه نشده است و در مطالعه حاضر سطح بیان این ژن مورد بررسی قرار گرفت. ژن IFT122 توسط کروموزوم ۳ انسانی کد می‌شود و شامل ۳۱ اگزون کد کننده می‌باشد. این ژن یک پروتئین بسیار حفاظت شده متعلق به کمپلکس IFT-A را کد

می‌کند که مسئول انتقال برگشتی در تاژک است (Silveira et al. 2017).

یکی از الزامات کلیدی برای تحرک اسپرم دسترسی کافی به انرژی ATP است (Freitas et al. 2017). پژوهش های گذشته پیشنهاد می‌کنند که علاوه بر مسیرهای گلیکولیزی و فسفریلاسیون اکسیداتیو، سایر مسیرهای سوخت و سازی نیز در تأمین انرژی لازم برای اسپرم دخیل هستند (Mauray et al. 2022). یکی از این مسیرها مسیر سوخت و ساز نوکلئوتیدها است. طبق مدل بازسازی شده توسط اصغری و همکاران (Asghari et al. 2017) که در سطح پروتئوم اسپرم در آستنوزواسپرمی می‌باشد، چندین ژن غیرگلیکولیتیک در سوخت و ساز انرژی اسپرم دخیل هستند. ژن اکتونوکلوئید تری فسفات دی فسفوهیدرولاز 4 (ENTPD4) یکی از این ژنها است که متعلق به خانواده آنزیمی اکتونوکلوئید تری فسفات دی فسفوهیدرولازها (NTPDases) می‌باشد. ژن ENTPD4 انسانی بر روی کروموزوم ۸ قرار دارد و از ۱۴ اگزون تشکیل شده است. پروتئین کد شده توسط این ژن (NTPDase4) در سطح سلول و در مجاری اندامک های خاص یافت می‌شوند و از تنظیم کننده های اصلی سیگنال دهی پورینرژیک (Purinergic) می‌باشد (Gorelik et al. 2020; Robson et al. 2006; Saito et al. 2011). در تمام بافت ها بیان می‌شود و دو شکل با الگوی مکان درون سلولی مختلف از آن شناسایی شده است. عملکرد شکل بلند آن ناشناخته است اما شکل کوتاه که فاقد یک بخش ۸ آمینواسیدی می‌باشد، در گلژی در بازیافت نوکلئوتید ها نقش بالقوه ای دارد (Gorelik et al. 2020). هدف مطالعه حاضر، بررسی تغییر در سطح بیان ژن های IFT122 و ENTPD4 در مردان مبتلا به آستنوزواسپرمی در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها

مطالعه حاضر در دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز بر روی نمونه های جمع آوری شده از بیماران مراجعه کننده به مرکز ناباروری جهاد دانشگاهی تبریز در فاصله زمانی آبان ۹۷ تا خرداد ۹۸ انجام گرفته است. نمونه مایع منی بیماران بعد از انجام فرایند های آزمایشگاهی در حدود ۲ سی سی به ما تحویل داده شد.

نمونه های کنترل از افرادی که اسپرموگرام طبیعی داشته و یا افرادی که برای انجام IUI (Intrauterine insemination) آماده بودند گردآوری شدند. در مجموع ۳۰ نمونه برای انجام پژوهش در دسترس قرار گرفت که از این تعداد، ۱۰ نمونه سالم با میانگین سنی 29 ± 3 و ۲۰ نمونه بیمار آستنوزواسپرمی با میانگین سنی 30 ± 3 بودند. سپس از روش Real-time polymerase chain reaction (qPCR) جهت بررسی میزان بیان ژنها استفاده شد. لازم به ذکر است که تمامی افراد بیمار و کنترل مصاحبه شدند و رضایت خود را در قالب رضایت نامه کتبی اعلام نمودند. مطالعه حاضر با کد اخلاق به شماره IR.TBZMED.REC.1398.156 توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تایید شده است.

استخراج RNA، انجام qPCR و بررسی آماری

استخراج RNA با استفاده از محلول تریزول RiboEx LS (GeneAll-کره) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده از نمونه های مایع منی انجام شد. بعد از استخراج RNA، کمیت و کیفیت آن با دستگاه اسپکتروفتومتری (Eppendorf-آمریکا) در طول موج ۲۶۰ نانومتر و الکتروفورز روی ژل آگاروز بررسی شد. در مرحله بعد، سنتز cDNA با استفاده از کیت PrimeScript RT reagent (Takara-ژاپن) انجام شد. هر واکنش qPCR با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر (۵ میکرولیتر ماستر میکس، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر پیشرو، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر معکوس، ۳ میکرولیتر آب دوبار تقطیر، ۱ میکرولیتر نمونه cDNA) توسط دستگاه Roche (آلمان) و کیت RealQ Plus 2X Master Mix Green (Ampliqon-دانمارک) انجام گرفت. آغازگرهای مرز اگزونی (Exon junction) مناسب برای انجام qPCR ژن های هدف IFT122 و ENTPD4 و ژن گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان کنترل داخلی با استفاده از نرم افزار Beacon Designer طراحی شدند و اختصاصیت آغازگرها توسط ابزار NCBI Primer-BLAST Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) تایید و توسط شرکت اولیگوی کره ساخته شدند (جدول ۱).

بیان mRNA برای هر نمونه استفاده شد. از آزمون t-test برای مقایسه سطح بیان ژنهای مورد مطالعه و ژن کنترل بین نمونه های بیمار و کنترل استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده ها و رسم منحنی ROC (receiver operating characteristic)، برای ارزیابی قابلیت نشانگر زیستی ژنهای مورد مطالعه، نیز با استفاده از نرم افزار R انجام گرفت.

مجموعه واکنش های qPCR در این پژوهش، به شکل سه تایی انجام گرفتند. دمای واسرشت اولیه 94°C به مدت ۴ دقیقه و سپس ۴۰ سیکل به ترتیب با دمای واسرشت 94°C به مدت ۱۰ ثانیه و دمای اتصال مناسب برای هر پرایمر به مدت ۳۰ ثانیه و دمای طولیل شدن 72°C به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد و سپس برای رسم منحنی ذوب دمای 65°C تا 95°C اعمال گردید. پس از کامل شدن واکنش qPCR از روش $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ برای محاسبه مقدار نسبی

جدول ۱- آغازگر های مورد استفاده در این پژوهش.

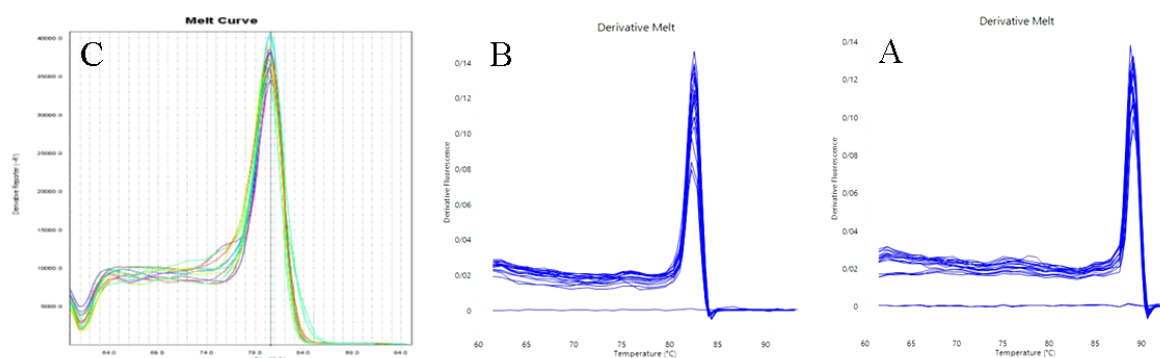
Table 1. Primers used in this study.

Gene	Primer Sequences (5'-3')	Annealing Temperature
GAPDH	F:AAGGCTGGGGCTCATTG	59
	R:AGGCTGTTGTCATACTTCTCAT	
IFT122	F:ACGACAGTGAGGAGTTGGT	59
	R:GAAGAGGCGGAGAAGATGAAG	
ENTPD4	F:CTACCATTAAGAGACATCCAGCAG	60
	R:CAGGAAGCAGCCAGAGAAC	

نتایج و بحث

غیراختصاصی در محصول PCR، نمودار منحنی ذوب برای هر کدام از ژن ها توسط دستگاه Real time PCR رسم شده و تکثیر اختصاصی قطعات تأیید شدند (شکل ۱).

پس از سنتز cDNA، qPCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژنهای *ENTPD4*، *IFT122* و *GAPDH* انجام شد. به دلیل استفاده از رنگ سایبرگرین و به منظور بررسی اختصاصیت آغازگرها و اطمینان از تکثیر اختصاصی قطعات و عدم وجود قطعات



شکل ۱- منحنی ذوب ژنهای مورد مطالعه. A. ژن *ENTPD4*، B. ژن *IFT122*، C. ژن *GAPDH*.

Fig 2. Melting curve. A. *ENTPD4* gene, B. *IFT122* gene, C. *GAPDH* gene.

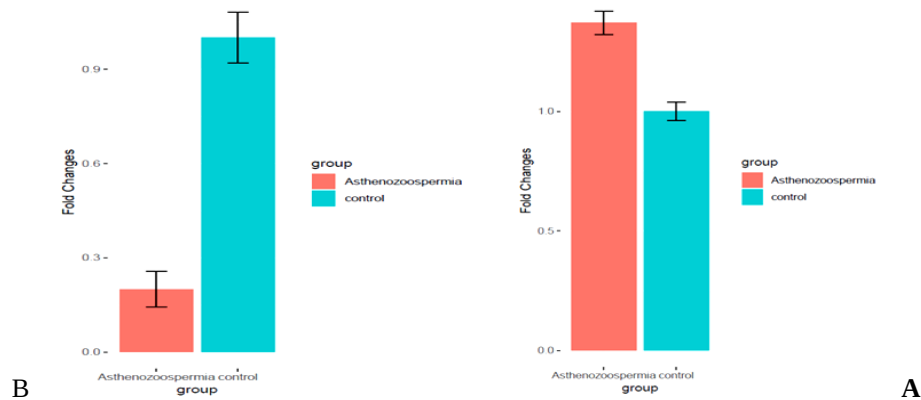


Fig 3. Gene expression alterations. **A.** The *ENTPD4* gene expression pattern in patient and control group, **B.** The *IFT122* gene expression pattern in patient and control group.

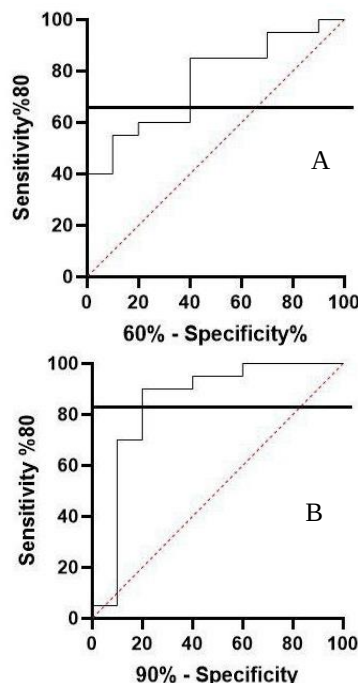


Fig 4. ROC curves of the studied genes in Asthenozoospermic and control subjects. **A.** ROC curve of *ENTPD4* gene. **B.** ROC curve of *IFT122* gene.

تاکنون پژوهش های متعددی بر روی خانواده پروتئینی IFT در سرهم شدن و تشکیل تاژک اسپرم نقش دارند، انجام شده است. در سال ۲۰۱۵ نقش ژنهای IFT در تکوین اسپرم موش مورد بررسی قرار گرفت (San Agustin et al. 2015). طبق این مطالعه، اسپرماتوسیت های *IFT88-/-* که به مراحل پایانی پاکتین، دیپلوتن و متافاز رسیده اند، دچار مرگ برنامه ریزی شده سلولی می شوند. معمولاً در طول یا قبل این مراحل، مقادیر زیادی از

بعد از انجام تجزیه و تحلیل آماری روی نتایج qPCR، مشخص شد که میزان بیان ژن *ENTPD4* در نمونه های بیمار نسبت به نمونه های سالم به صورت معنی داری افزایش ($p = 0.01$) و بیان ژن *IFT122* به صورت معناداری کاهش ($p = 0.0001$) یافته است (شکل ۲).

رسم منحنی ROC برای هر دو ژن و با استفاده از داده های بیانی در دو گروه بیمار و کنترل انجام شد و نتایج حاکی از حساسیت ۸۰٪ و اختصاصیت ۹۰٪ ژن *IFT122* ($p=0.0024$) و حساسیت ۸۰٪ و اختصاصیت ۶۰٪ ژن *ENTPD4* ($p=0.022$) برای تشخیص آستنوزواسپرمی بود (شکل ۳).

ژنتیک با اثر بر انواع فرایندهای فیزیولوژیکی از جمله هموستاز هورمونی، اسپرماتوژنز و نیز کیفیت اسپرم، نقش مهمی در ناباروری مردان دارد. از این جهت، فهم اساس ژنتیکی ناباروری برای مدیریت مناسب یک زوج نابارور ضروری است (O'Flynn et al. 2010). در سال های گذشته، پژوهشگران تلاش کرده اند هر گونه همراهی بین پروفایل RNA اسپرم و ناباروری در مردان را شناسایی کنند. طبق این مطالعات مولکول های RNA اختصاصی اسپرم نقش کلیدی در تحرک سلول های اسپرم و همچنین آماده سازی آنها برای فرایندهای ظرفیت یابی (capacitation) و واکنش آکروزومی دارند (Pelloni et al. 2018).

variable CpG) که با آستنوزواسپریمی همراهی دارند را شناسایی کردند و در نهایت پس از تجزیه و تحلیل عملکردی، ۱۶ ژن با متیلاسیون متمایز یا دارای تنوع که برای اسپرماتوژنز و تحرک اسپرم مورد نیاز هستند و یا به طور غالب در بیضه بیان می‌شوند را گزارش نمودند. ژن *IFT122* یکی از آن ژنها است که نتایج حاصل از مطالعه حاضر، نشان دهنده کاهش بیان آن می‌باشد. این نتیجه همسو با نتایج مطالعات قبلی روی سایر IFT ها می‌باشد. احتمال دارد که کاهش بیان ژن *IFT122* باعث اختلال در سرهم شدن تاژک اسپرم، کاهش تحرک اسپرم و در نهایت کاهش توان باروری در افراد مبتلا به آستنوزواسپریمیک شود.

در سالهای اخیر، استفاده از نشانگرهای زیستی در تشخیص زودهنگام و پاسخ به درمان بسیاری از بیماری ها از جمله آستنوزواسپریمی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (Tomasiuk et al. 2022) در این مطالعه نیز سطح نسبتاً بالای ROC نمایانگر توانایی هر دو ژن و بویژه ژن *IFT122* در تشخیص وضعیت مورد مطالعه در بین افراد بیمار و کنترل بود. البته استفاده از قابلیت نشانگری مستلزم تکرار مطالعه با نمونه های بیشتر در وضعیت بیماری و در طول درمان می باشد.

ATP سوختی است که توسط داینین ATPase آکسنومال تاژک مصرف می‌شود و همچنین باعث تغییرات پروتئینی وابسته به ATP مانند فسفوریلاسیون می‌گردد. بنابراین تعجب آور نیست که اسپرم در مقایسه با سلول های سوماتیکی نیاز به مقدار زیادی ATP دارد و حضور کافی و همیشگی آن مهم است (Freitas et al. 2017). گرچه گمان می‌رود سوخت و ساز انرژی در آستنوزواسپریمی دچار اختلال شده باشد اما تلاش های اندکی برای شناسایی مسیرهای سوخت و ساز اصلی آن انجام شده است. اصغری و همکاران (Asghari et al. 2017) در سال ۲۰۱۷، اولین مدل متابولیک در مقیاس پروتئوم اسپرم آستنوزواسپریمیک را با استفاده از داده های Whole proteom و الگوریتم mCADRE بازسازی کردند. سپس از این مدل برای شناسایی ژن هایی که اختلال در عملکرد آنها می‌تواند از طریق کاهش تولید ATP بر تحرک اسپرم تأثیر گذار باشند، استفاده کردند. مدل آنها چندین ژن که مسیرهای تحت تأثیر آنها در تأیید یافته های قبلی مربوط

پروتئین IFT88 ساخته می‌شود و احتمال می‌رود که اسپرماتوسیت‌ها سازو کار بسیار حساسی برای تشخیص میزان IFT88 انباشته شده داشته باشند و زمانی که مقادیر برای فرآیند های بعدی اسپرم‌زایی کافی نباشد، موجب مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌شوند. برای اثبات اهمیت IFT88 در ناباروری مردان، ۵ موش نر وحشی و ۵ موش نر *IFT88*- انتخاب شده و هر کدام با دو گروه موش ماده وحشی آمیزش داده شدند. همه ۱۰ موش ماده ای که با موش های *IFT88*- آمیزش یافته بودند، باردار نشدند. بدین ترتیب نتایج این مطالعه ضرورت *IFT88* برای اسپرماتوژنز پستانداران و باروری مردان را آشکار ساخت. همچنین در سال ۲۰۱۹، دخالت *IFT140* در فرآیند نقل و انتقال تاژکی و تعدادی از چندشکلی های این ژن که در بیماری های سیلوپاتی انسانی دخیل بودند گزارش شد. (Wang et al. 2019) در این مطالعه، پژوهشگران توالی یابی کل اگزوم را بر روی یک مرد جوان نابارور که از الیگوزواسپریمی شدید، آستنوزواسپریمی و تراتوزواسپریمی رنج می‌برد، انجام دادند. مورفولوژی اسپرم با میکروسکوپ الکترونی و بیان پروتئین *IFT140* توسط ایمونوفلئورسانس و عملکرد ژن نیز توسط پایگاه های داده "برخط" مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج مطالعه آنها منجر به شناسایی دو جهش تک نوکلئوتیدی گردید. جهش های مذکور باعث ایجاد ناهنجاری های مورفولوژیکی در قسمت سر، هسته و دم اسپرم می‌شدند و همچنین اطلاعات بیانی حاکی از عدم حضور پروتئین *IFT140* در قسمت میانی و گردن اسپرم بود.

در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۵، تغییرات اپی ژنتیکی که باعث ناباروری مردان می‌شوند مورد توجه قرار گرفت (Du et al. 2015). در این مطالعه پژوهشگران از روش هیبریداسیون مایع مبتنی بر تعیین توالی بی سولفتی (Liquid hybridization capture-based bisulfite sequencing) برای تعیین متیلاسیون DNA در CpG های مناطق پیشبری (promoter) استفاده کردند. آنها از طریق مقایسه پروفایل متیلاسیون DNA بین اسپرم های با تحرک بالا در مردان نورمواسپریم و اسپرم های کم تحرک در مردان آستنوزواسپریم، ۱۳۴ CpG متیله متمایز (Differentially methylated CpG)، ۴۱ منطقه متیله متمایز (Differentially methylated region) و ۱۳۴ CpG متنوع متمایز (Differentially

ویژه‌ای دارند. مطالعه حاضر بیان ژن های IFT122 و ENTPD4 را در مردان مبتلا به آستنوزواسپرمی و مردان نورموزواسپرمیک مورد بررسی قرار داد که نتایج بیانگر افزایش بیان در ژن ENTPD4 و کاهش بیان در ژن IFT122 بودند. همچنین نتایج ارزیابی "قابلیت نشانگر زیستی" ژنهای مورد مطالعه، حاکی از توانایی بالای ژن IFT122 در پیش بینی وضعیت آستنوزواسپرمی بود.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب قدردانی خود را از افراد شرکت کننده در این پژوهش و نیز کارکنان بخش درمان ناباروری جهاد دانشگاهی استان آذربایجان شرقی اعلام می‌دارند. همچنین بر خود واجب می‌دانیم از خانم دکتر مرضیه تولایی (مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی اصفهان) که در مرحله استخراج RNA از نمونه ها، ما را از راهنمایی های بی دریغ خود بهره مند ساختند، سپاسگزاری کنیم.

منابع

- Asgari R, Bakhtiari M. 2020.** The role of MMP9 C-1562T and MMP2 G1575A genetic variants in male infertility: review article. *Tehran Univ Med J* 78 (6):339-343. (In Farsi with English abstract).
- Asghari A, Marashi SA, Ansari-Pour N. 2017.** A sperm-specific proteome-scale metabolic network model identifies non-glycolytic genes for energy deficiency in asthenozoospermia. *Systems biology in reproductive medicine* 63(2): 100-112.
- Du Y, Li M, Chen J, Duan Y, Wang X, Qiu Y, Cai Z, Gui Y, Jiang H. 2016.** Promoter targeted bisulfite sequencing reveals DNA methylation profiles associated with low sperm motility in asthenozoospermia. *Human reproduction* (Oxford, England) 31(1): 24-33.
- Freitas MJ, Vijayaraghavan S, Fardilha M. 2017.** Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biology of reproduction* 96(1): 2-12.
- Gorelik A, Labriola JM, Illes K, Nagar B. 2020.** Crystal structure of the nucleotide-metabolizing enzyme NTPDase4. *Protein science: a publication of the Protein Society* 29(10): 2054-2061.

به سوخت و ساز انرژی بود را با موفقیت پیش بینی کرد و همچنین ۱۱ ژن غیر گلیکولیتیک که در بازده تولید انرژی اثرگذارند را برای اولین بار شناسایی نمود. از میان ژنهای غیر گلیکولیتیک مذکور، ژن ENTPD4 برای مطالعه حاضر انتخاب گردید. نتایج مطالعه حاضر، افزایش بیان ژن ENTPD4 در مایع منی مردان مبتلا به آستنوزواسپرمی در مقایسه با نمونه های کنترل را نشان داد. اگر این افزایش بیان در سطح پروتئین نیز حفظ شود می‌توان این احتمال را مطرح کرد که سلول اسپرم از مسیر سوخت و ساز نوکلئوتیدها به عنوان یک مسیر جبرانی در تأمین انرژی کاهش یافته خود در افراد آستنوزواسپرمیک استفاده می‌کند.

نتیجه گیری کلی

در دهه‌های اخیر استفاده از روش های مولکولی به عنوان ابزاری مفید در ارزیابی اختلالات ناباروری در مایع منی مردان پیشنهاد شده است. در این میان بررسی بیان ژنهای مرتبط با حرکت اسپرم، به دلیل اهمیت بالای این ژن ها در توان باروری اسپرم جایگاه

- Inhorn MC, Patrizio P. 2015.** Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human reproduction update* 21(4): 411-426.
- Maurya S, Kesari KK, Roychoudhury S, Kolleboyina J, Jha NK, Jha SK, Sharma A, Kumar A, Rath B, Kumar D. 2022.** Metabolic Dysregulation and Sperm Motility in Male Infertility. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1358: 257-273.
- Mul W, Mitra A, Peterman E. J. G. 2022.** Mechanisms of Regulation in Intraflagellar Transport. *Cells* 11 (17): 2737.
- O'Flynn O'Brien KL, Varghese AC, Agarwal A. 2010.** The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertility and sterility* 93(1): 1-12.
- Pelloni M, Paoli D, Majoli M, Pallotti F, Carlini T, Lenzi A, Lombardo F. 2018.** Molecular study of human sperm RNA: Ropporin and CABYR in asthenozoospermia. *Journal of endocrinological investigation* 41(7): 781-787.
- Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. 2006.** The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic signaling* 2(2): 409-430.

- Saito A, Fujikura-Ouchi Y, Ito C, Matsuoka H, Shimoda K, Akiyama K. 2011.** An association study on polymorphisms in the PEA15, ENTPD4, and GAS2L1 genes and schizophrenia. *Psychiatry research* 185(1-2): 9–15.
- San Agustin JT, Pazour GJ, Witman GB. 2015.** Intraflagellar transport is essential for mammalian spermiogenesis but is absent in mature sperm. *Molecular biology of the cell* 26(24): 4358–4372.
- Shahrokhi SZ, Salehi P, Alyasin A, Taghiyar S, Deemeh MR. 2020.** Asthenozoospermia: Cellular and molecular contributing factors and treatment strategies. *Andrologia* 52(2): e13463.
- Siasi E, Aleyasin A. 2020.** Association of rs737008 in PRM1 and rs4780356 in PRM2 Polymorphisms with Idiopathic Infertility in Iranian men. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal* 10 (40):103-113. (In Farsi with English abstract).
- Silveira KC, Moreno CA, Cavalcanti DP. 2017.** Beemer-Langer syndrome is a ciliopathy due to biallelic mutations in IFT122. *American journal of medical genetics Part A* 173(5): 1186–1189.
- Tomasiuk R. 2022.** N-Terminal Pro-C-Type Natriuretic Peptide: The Novel Marker in Selected Disease Units. *Protein and Peptide Letters* 29(2):125-132.
- Tu C, Wang W, Hu T, Lu G, Lin G, Tan YQ. 2020.** Genetic underpinnings of asthenozoospermia. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 34(6): 101472.
- Vander Borgh M, Wyns C. 2018.** Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical biochemistry* 62: 2–10.
- Wang X, Sha YW, Wang WT, Cui YQ, Chen J, Yan W, Hou XT, Mei LB, Yu CC, Wang J. 2019.** Novel IFT140 variants cause spermatogenic dysfunction in humans. *Molecular genetics & genomic medicine* 7(9): e920.
- WHO Organization. 2010.** WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World health organization. 286 p. Available at <https://www.who.int/srhr-documents/infertility>.
- Zhang Y, Liu H, Li W, Zhang Z, Shang X, Zhang D, Li Y, Zhang S, Liu J, Hess RA, Pazour GJ, Zhang Z. 2017.** Intraflagellar transporter protein (IFT27), an IFT25 binding partner, is essential for male fertility and spermiogenesis in mice. *Developmental biology* 432(1): 125–139.