

ارزیابی بیان ژن *Mirk/Dyrk1B* در بافت بیضه مردان نابارور مراجعه کننده به پژوهشگاه رویان

مأنده میرمحمدحسینی

فارغ التحصیل کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی دانشگاه غیرانتفاعی علم و فرهنگ

چکیده

ناباروری در حدود ۸-۱۲ درصد زوج‌های در سن باروری در سراسر جهان راتحت تأثیر قرار می‌دهد، مردان در حدود ۲۰-۳۰ درصد در این ناباروری سهمیم هستند. باروری مردان به‌طور کلی به کیفیت و کمیت اسپرم‌هایشان بستگی دارد، تخمین زده می‌شود که از هر ۲۰ مرد یکی از آنان دارای یک نوع مشکل ناباروری باتعداد کم اسپرم در انزال است، با این حال فقط در حدود ۱ درصد مردان فاقد اسپرم در انزال هستند. ناباروری مردان معمولاً به دلیل مشکلاتی است که تولید اسپرم و یا انتقال آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. تقریباً دوسوم مردان نابارور مشکلی در تولید اسپرم در بیضه‌هایشان دارند، یعنی اینکه تعداد اسپرم‌هایشان در عمل ناکافی است یا اینکه اسپرم‌هایشان به درستی عمل نمی‌کنند که همان نوع غیرانسدادی آزو اسپرمی است. مشکلات انتقال اسپرم تقریباً یک مورد از هر ۵ مرد نابارور را شامل می‌شود که شامل مردانی است که انسدادی در *post-testicular genital tracts* دارند که می‌تواند منجر به عدم وجود کامل اسپرم در انزال شود، روند ساخت اسپرم می‌تواند در مراحل مختلف به دلایل متعدد متوقف شود. ژن *DYRK1B* عمدتاً در ماهیچه‌های اسکلتی و بیضه بیان می‌شود و در سایر بافت‌های طبیعی به میزان بسیار کمی بیان می‌شود. در این پژوهش بیان ژن *DYRK1B* در سه گروه مردان نابارور شامل مردان *Hypospermatogenesis* (Hypo) به‌عنوان گروه کنترل مثبت و ۱۰ مرد *Compelet maturation arrest* (MA) به‌عنوان گروه *Sertoli cell only syndrome* (SC) و ۱۰ مرد *Real-time PCR* از نظر کمی مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های بافتی مورد نیاز از بانک بافت بیضه گروه آندروولوژی پژوهشگاه رویان گرفته شد. نتایج ما نشان داد که بیان ژن *DYRK1B* در گروه کنترل منفی در مقایسه با گروه کنترل مثبت کاهش معنی داری ($P > 0.05$) دارد. پیشنهاد می‌شود که بیان کمتر *DYRK1B* به‌عنوان یک عامل ژنتیکی برای ناباروری/ناباروری مردان در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: ناباروری مردان، *DYRK1B*، بیان ژن.

مقدمه

به طور کلی، ناباروری به عنوان عدم توانایی باردار شدن پس از یک سال یا بیشتر از رابطه جنسی محافظت نشده تعریف می شود (۱). ناباروری یک مشکل گسترده است، از هر ۵ زوج نابارور تقریباً یک مورد آن مربوط به مشکل مردان است و در هر ۴ زوج نابارور فقط یک مورد آن هر دو نفر یعنی هم مرد و هم زن مشکل دارند، تقریباً در هر ۷ زوج نابارور یک مورد آن را نمی توان دلیلی برایش پیدا کرد. همچنین یک مرد از هر ۲۰ مرد نوعی از ناباروری با تعداد کم اسپرم در انزال^۱ را دارد (۲).

مبانی نظری

دستگاه تولیدمثل مردان

دستگاه تولیدمثلی مردان^۲ شامل بیضه ها^۳، غده پروستات^۴، غدد وزیکول سمنال^۵ (کیسه های منی)، مجراهای اپیدیدیم^۶، مجاری واژدفران^۷، غدد بولبورتال^۸ و اندام تناسلی^۹ است.

بیضه ها

بیضه ها بصورت یک جفت اندام بیضی شکل هستند که هر کدام ۴-۵ سانتی متر طول، ۳ سانتی متر عرض و ۲٫۵ سانتی متر ضخامت دارند. بیضه ها و اپیدیدیم ها ساختارهای زوجی هستند که در داخل کیسه ی بیضه^{۱۰} قرار دارند که توسط یک پوشش^{۱۱} چند لایه پوشانده شده اند که از نوع بافت همبند هستند، در بیضه ها سه نوع از این پوشش وجود دارد، تونیکا واسکولاسا^{۱۲}، تونیکا آلبوجینی^{۱۳} و تونیکا واجینالیس^{۱۴}.

لوله های اسپرم ساز

لوله های اسپرم ساز^{۱۵} که کاملاً پیچیده شده اند، قسمت عمده ای از بیضه ها را تشکیل می دهند. هر بیضه تقریباً از ۳۰۰-۴۰۰ ساختار به نام لوبول^{۱۶} تشکیل شده است. در داخل هر لوبول ۱-۴ لوله ی پیچ خورده ی اسپرم ساز قرار گرفته اند، طول متوسط هریک از آنها بیش از ۰٫۵ متر است (۴).

اسپرماتوژنز

اسپرماتوژنز^{۱۷} فرایندی است که سلول های بنیادی^{۱۸} به اسپرماتوزوای بالغ تبدیل می شوند و دارای سه فاز می باشد (۶). (۱) اسپرماتوسیتوژنیز (میتوزیس)^{۱۹} (۲) میوزیس^{۲۰} (۳) اسپرمیوژنیز^{۲۱}
در اسپرماتوسیتوژنیز که میتوزیس هم نامیده می شود سلول های بنیادی که همان اسپرماتوگونیا نامیده می شوند تقسیم میتوز را انجام می دهند و سپس شروع به تمایز می کنند.

وظایف سلول های سرتولی

سلول های سرتولی^{۲۲} نقش های زیادی در بیضه ها دارند که عبارتند از:

¹ Ejaculation
² Male reproductive system
³ Testes
⁴ Prostat gland
⁵ Seminal vesicles
⁶ Epididymis
⁷ Vas deferens
⁸ bulbourethral glands
⁹ penis
¹⁰ scrotum
¹¹ tunica
¹² tunica vasculosa
¹³ tunica albuginea
¹⁴ tunica vaginalis
¹⁵ seminiferous tubules
¹⁶ Lobule
¹⁷ Spermatogenesis
¹⁸ stem cell
¹⁹ mitosis
²⁰ meosis
²¹ spermiogenesis
²² Sertoli cells

ترشح ترکیبی به نام فاکتورهای مهارکننده‌ی مولرین^{۲۳} است که به جلوگیری از رشد اندام جنسی زنانه پس از تعیین بیضه در جنین کمک می‌کند.

دلایل ناباروری مردان

ناباروری مردان معمولاً یا به دلیل مشکلات در تولید اسپرم و یا در انتقال اسپرم است. از طریق معاینه‌ی پزشکی، پزشک ممکن است قادر باشد که دلیل مشکل را پیدا کند، تحقیقات پزشکی همچنان به شناخت دلایل ناباروری در مردان ادامه می‌دهد(۲).

تشخیص علت ناباروری در مردان

برای تشخیص علت ناباروری در مردان روش‌های زیادی وجود دارد که در مراحل مختلف تشخیصی از آن‌ها استفاده می‌کنند. این روش‌ها شامل آنالیز مایع منی، سونوگرافی، بررسی هورمونی، بیوپسی بیضه، بررسی سابقه‌ی پزشکی، ارزیابی ژنتیکی، آزمایشات تخصصی عملکرد اسپرم و بررسی میکروبی است(۱۳).

اشکال در تولید اسپرم

دلایل مربوط به مشکل در تولید اسپرم می‌تواند ناشی از عواملی همچون ناهنجاری‌های کروموزومی یا دلایل ژنتیکی، عدم نزول بیضه‌ها، پیچ‌خوردگی‌های بیضه‌ها در کیسه‌ی بیضه، حرارت، واریکوسل^{۲۴} (واریس در بیضه‌ها)، داروها و مواد شیمیایی، آسیب‌های ناشی از تابش امواج الکترومغناطیسی، مشکلات پروستات، مشکلات ناشی از وازکتومی و دیگر مشکلات ناشناخته باشد(۲).

اشکال در انتقال اسپرم

انسداد در انتقال اسپرم می‌تواند ناشی از عفونت‌ها، مشکلات مربوط به پروستات، عدم وجود وازودفران‌ها باشد. از دیگر دلایل ناباروری مردان می‌تواند مشکلات جنسی مانند اختلال در نعوظ و انزال که شامل انزال زودرس یا انزال برگشت‌رفته، عدم انزال، اختلال در نعوظ، آسیب‌های نخاعی، جراحی پروستات، آسیب‌های اعصاب و دیگر موارد باشد(۲). از دیگر دلایل ناباروری مردان می‌توان به اختلالات هورمونی، تومورهای هیپوفیز، کمبود مادرزادی FSH/LH، سومصرف استروئیدهای آنابولیک (آندروژنیک)، آنتی‌بادی‌های تولیدشده علیه اسپرم به دلایل وازکتومی، آسیب‌ها نخاعی و یا عفونت‌های اپیدیدیم اشاره کرد(۲).

شایع‌ترین علل ناباروری مردان که مربوط به تولید و بلوغ اسپرم است. اسپرم‌ها ممکن است به صورت نابالغ و یا غیر طبیعی باشند که این حالت تراتواسپریمیا^{۲۵} نامیده می‌شود و یا و چنانچه تعداد اسپرم‌ها کم باشد این حالت الیگواسپریمیا^{۲۶} نامیده می‌شود(۱۴).

الیگواسپریمیا

طبق معیارهای (WHO ۲۰۱۰) الیگواسپریمیا کاهش غلظت اسپرم در منی زیر ۱۵ میلیون اسپرم در میلی لیتر است الیگواسپریمیا نوعی نقص در تولید اسپرم است و ممکن است به دلایل انجام جراحی مانند واریکوسل، قرار گرفتن در معرض عوامل محیطی حرارتی یا شیمیایی مهارکننده اسپرماتوژنز، عوامل هورمونی، نقص ذاتی بیضه یا دلایل ناشناخته^{۲۷} باشد(۱۵).

آستنواسپریمیا^{۲۸}

ممکن است اسپرم‌ها نتوانند به درستی حرکت کنند که این حالت آستنواسپریمیا نامیده می‌شود، طبق معیارهای (WHO ۲۰۱۰)^{۲۹} در آزمایش آنالیز منی حداقل ۴۰ درصد اسپرم‌ها باید حرکت داشته باشند تا به‌عنوان تحرک طبیعی اسپرم در نظر گرفته شوند.

²³ anti-Mullerian hormone

²⁴ Varikose

²⁵ Teratospermia

²⁶ oligospermia)

²⁷ idiopathic

²⁸ Asthenozoospermia

²⁹ World Health Organization

عفونت در سیستم تولید مثل، التهاب در اپیدیدیم، مجرای اسپرم ساز و غدد دستگاه تناسلی که بر تحرک اسپرم ها تأثیر می گذارد و همچنین تولید نامنظم مایع منی یا عدم مایع سازی که منجر به ناباروری مردان می شود می تواند از جمله دلایل ایجاد آستنواسپرمیا باشند (۱۵).

تراتواسپرمیا^{۳۰}

تراتواسپرمیا به عنوان مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم تعریف می شود. این اختلال باعث می شود مردان اسپرم هایی با شکل غیرطبیعی و یا نابالغ تولید کنند. اسپرم های تولید شده ممکن است از نظر مورفولوژی سر، قسمت وسط و یا دم معیوب باشند، در بسیاری از مواقع، شناخت دلیل ایجاد تراتوزواسپرمی دشوار است. مسلم است که تغییرات مورفولوژیکی که در مرحله پایانی اسپرماتوژنز (فرآیند تولید اسپرم) اتفاق می افتد مسئول ایجاد تراتواسپرمی هستند، از دلایل ایجاد این حالت می توان به درمان های سرطان مانند شیمی درمانی یا رادیوتراپی، رژیم غذایی ناسالم، چاقی، مصرف تنباکو، داروها، مواد مخدر یا الکل و غیره، مننژیت، واریکوسل، تب شدید، دیابت شیرین، عفونت های مایع منی اشاره کرد (۱۶).

آزواسپرمی

آزواسپرمیا^{۳۱} شرایطی است که در آن هیچ گونه اسپرمی در انزال یافت نمی شود و آزواسپرمی به آزواسپرمی انسدادی (OA)^{۳۲} و آزواسپرمی غیرانسدادی (NOA)^{۳۳} طبقه بندی می شوند که هر کدام دارای علل و روش های درمانی بسیار مختلف است (۱۷).

آزواسپرمی از نظر علل ایجادکننده ی آن به سه دسته تقسیم می شود (۱۸):

- آزواسپرمی پیش بیضه ای^{۳۴} (غیر انسدادی)
- آزواسپرمی بیضه ای^{۳۵} (غیرانسدادی)
- آزواسپرمی پس بیضه ای^{۳۶} (انسدادی)

آزواسپرمی پیش بیضه ای

حالتی است که با تحریک ناکافی بیضه های طبیعی و دستگاه تناسلی طبیعی مشخص می شود. در این وضعیت ممکن است ناهنجاری هیپوتالاموسی و یا غده ی هیپوفیز باعث عدم تعادل هورمونی می شوند که از تحریک بیضه ها برای تولید اسپرم جلوگیری می کند. اختلالات غدد درون ریز، سطوح ناکافی FSH، اختلالات آندوکراین، تومورهای غده ی هیپوفیز، استفاده از استروئیدهای آنابولیک می تواند از دلایل این نوع از آزواسپرمی باشد (۱۹).

آزواسپرمی بیضه ای

در این نوع آزواسپرمی در خود بیضه ها اختلال در تولید اسپرم وجود دارد، این اختلال ممکن است مادرزادی و یا اکتسابی باشد، ممکن است که تولید اسپرم کاملاً وجود نداشته باشد و یا ممکن است اسپرماتوژنز در مراحل اولیه و یا اواخر بلوغ اسپرم متوقف شده باشد. از دلایل ایجاد این نوع آزواسپرمی می توان به ابتلا به عفونت های ویروسی در دوران کودکی که باعث التهاب و یا عفونت بیضه ها می شود، رادیوتراپی برای درمان سرطان، سندروم کلاین فلتز^{۳۷}، ناهنجاری های کروموزومی، ناهنجاری های ژنتیکی اشاره کرد (۱۹).

آزواسپرمی پس بیضه ای

ممکن است اسپرم طبیعی تولید شود ولی بعضی از مشکلات مانع از خروج اسپرم شود. از مهم ترین دلایل بوجود آمدن این حالت انسداد فیزیکی دستگاه تولیدمثلی پس بیضه ای می باشد، انزال برگشت دهنده، وازکتومی^{۳۸} که برای پیشگیری از بارداری

³⁰ Teratospermia

³¹ Azoospermia

³² (Obstructive)

³³ (Non-obstructive)

^{34,35} Pretesticular

³⁵ testicular

³⁶ post testicular

³⁷ Klinefelter-Syndrom, XXY

³⁸ vasectomy

انجام می‌شود، عدم حضود وازودفران، ناهنجاری‌های مجرای انزالی، اختلال در نعوظ، عفونت‌های دستگاه تناسلی از دیگر دلایل

این نوع آرواسپرمی است (۱۹). **خانواده‌ی DYRK**

^{۳۹}DYRK ها یک خانواده‌ی کینازی حفاظت شده در طول تکامل هستند که فعالیتشان بستگی به فسفریلاسیون رزیدوی تیروزین حفاظت شده در حلقه‌ی فعال سازی دومین کاتالیتیک دارد (۲۰).

فعالیت کینازی DYRK ها

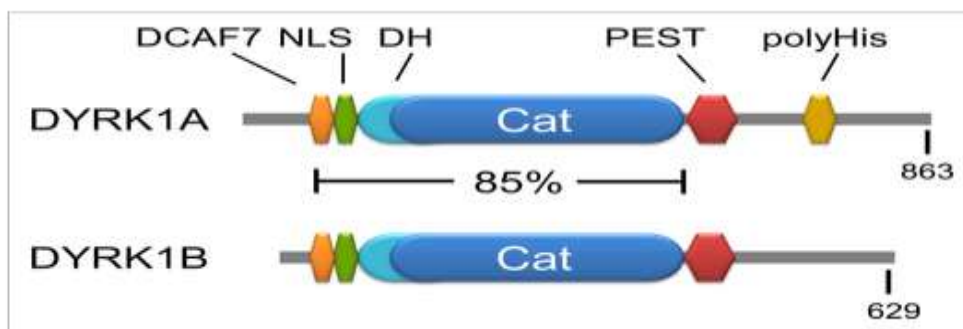
فعالیت کینازی DYRK ها بستگی به حضور موتیف YXY در لوپ فعال سازی دومین کاتالیتیک دارد که شبیه موقعیت TXY در (MAPK^{۴۰}) است، که این مساله اشاره به نقش مشابه MAPK ها و DYRK ها در انتقال سیگنال درون سلولی دارد. اگرچه برخلاف MAPK ها، تیروزین فسفریلاسیون در لوپ فعال سازی DYRK یک اتوفسفریلاسیون است و فعالیت کیناز دیگری به صورت بالادست^{۴۱} آن را فسفریله نمی‌کند، در حقیقت فسفریلاسیون در باقیمانده‌ی تیروزین دوم در این موتیف برای فعالیت کینازی اعضای خانواده‌ی DYRK ضروری است (۲۰).

اعضای خانواده‌ی DYRK

DYRK ها در پستانداران به دو کلاس یا دسته تقسیم می‌شود:

کلاس یک (DYRK1B, DYRK1A) و کلاس دو (DYRK2, DYRK3, DYRK4)، که بر اساس همولوژی توالی‌شان این دسته‌بندی صورت گرفته است (۲۱).

DYRK1A و DYRK1B در ناحیه‌ی N - ترمینال و دومین کاتالیتیک در حدود ۸۴ درصد تشابه دارند اما در ناحیه‌ی C- ترمینال مشابهت گسترده‌ای را نشان نمی‌دهند، تمام مشخصات موتیف‌های خانواده‌ی پروتئین‌کینازها را دارا می‌باشد (۲۲) (شکل ۱).

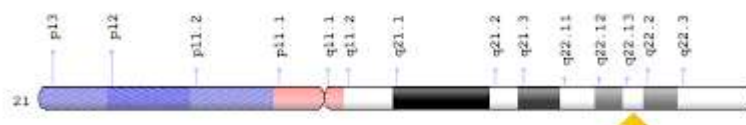


شکل ۱- شباهت ساختاری پروتئین‌های DYRK1A و DYRK1B (۲۳)

DYRK1A

چندین مطالعه نشان می‌دهد که DYRK1A در تمایز سلول‌های نورونی دخالت دارد، ژن *DYRK1A* در ناحیه‌ی مهم کروموزوم ۲۱ (شکل ۲) که مربوط به سندروم دوان قرار گرفته است، افزایش بیان *DYRK1A* در مغز جنین‌های مبتلا به سندروم دوان مشاهده شده است (۲۳).

ارتولوگ DYRK1A در دروزوفیلا پروتئین نیزمینی‌برین^{۴۲} نامیده می‌شود (۲۲).



شکل ۲- جایگاه ژن DYRK1A درون ژنوم انسان (۲۲)

^{۳۹} dual-specificity tyrosine-regulated kinases

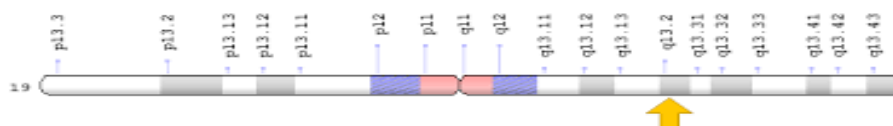
^{۴۰} Mitogen activated protein kinase

^{۴۱} up stream

^{۴۲} mini brain

DYRK1B

ژن *DYRK1B* که نام دیگر آن *Mirk* (minibrain-related kinase) است (۲۴). درون ژنوم در جایگاه 19q13.2 قرار گرفته است (۲۵) (شکل ۱-۸).

**شکل ۳- موقعیت ژن DYRK1B در ژنوم انسان (۲۷)**

پروتئین کیناز DYRK1B که به خانواده‌ی پروتئین کیناز DYRK تعلق دارد با اتوفسفیریلایسیون همراه ترجمه در رزیدوی تیروزین در حلقه‌ی فعالیت که مربوط به دومین کاتالیتیک است به نهایت فعالیت کاتالیتیکی خود می‌رسد، DYRK ها بعد از اینکه رزیدوی تیروزین را در خود فسفریله می‌کنند سوبستراهای دیگر را در سرین یا ترئونین فسفریله می‌کنند (۲۶).

نقش DYRK1B/Mirk در سلول‌های ماهیچه‌ی اسکلتی

مقدار DYRK1B/Mirk در شرایطی که میتوز وجود ندارد به شدت افزایش می‌یابد مانند هنگامی که میوبلاست‌ها از فاز رشد به فاز تمایز انتقال می‌یابند (۲۷).

DYRK1B/Mirk همچنین در میوبلاست‌ها باعث ایجاد ناپایداری سایکلین D1 بوسیله‌ی فسفریلایسیون در ترئونین ۲۲۸ می‌شود (۲۷). Mirk فاز G0 را در چرخه‌ی سلولی افزایش می‌دهد و این کار را با افزایش پایداری مهارکننده‌ی cdk1 یعنی p27kip1 بوسیله‌ی فسفریلایسیون p27 در سرین ۱۰ و حفظ p27 در هسته می‌کند، یعنی جایی که p27kip1 به عنوان مهارکننده‌ی cdk2 عمل می‌کند (۲۰).

حذف Mirk بوسیله‌ی RNA مداخله‌گر در سلول‌های C2C12 میوبلاست تمایز ماهیچه‌ی اسکلتی را متوقف می‌کند (۲۶). حذف Mirk باعث توقف تمایز میوبلاست به میوتیوپ‌های چندین هسته‌ای می‌شود در حالیکه بیان پایدار Mirk باعث افزایش ترکیب میوبلاست‌ها با هم می‌شود (۲۶).

mef2^{۴۳} که یک فاکتور رونویسی در تمایز میوبلاست‌ها است بوسیله‌ی هیستون داستیلاز کلاس دو DNA جدا شده است، Mirk این هیستون داستیلاز را در یک سایت محافظت شده درون جایگاه محلی سازی هسته‌ای فسفریله می‌کند، این کاهش هیستون داستیلاز درون هسته‌ای باعث آزادسازی mef2 و در نهایت رونویسی از میوزنین می‌شود و باعث باقی ماندن توانایی تمایز می‌شود (۲۶).

علاوه بر این در سلول‌های ماهیچه‌ای Mirk، P21^{۴۴}cip1 را در ناحیه‌ی محلی سازی هسته‌ای فسفریله می‌کند، این فسفریلایسیون بخشی از پروتئین P21cip1 را در سیتوپلاسم حفظ می‌کند جایی که این پروتئین قادر به توقف چرخه‌ی سلولی نیست و جایی که P21cip1 فعالیت کاسپاز ۳ را متوقف می‌کند و باعث کاهش میزان آپوپتوز سلول‌ها در طول فرایند تمایز می‌شود (۲۶).

نقش DYRK1B/Mirk در سلول‌های سرطانی

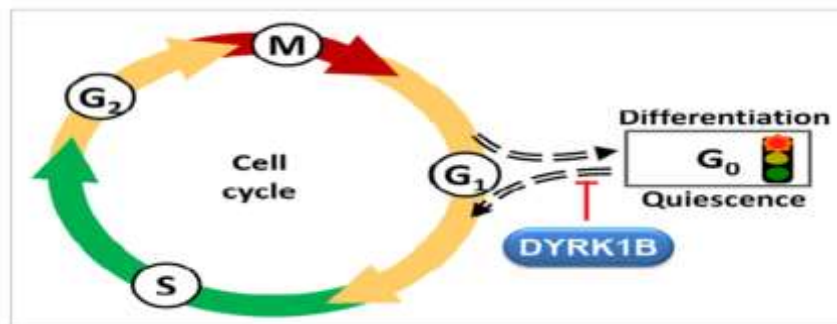
بیان *Mirk/DYRK1B* در بسیاری از تومورهای جامد و سفت افزایش می‌یابد مثل تومورهای پانکراس، ریه، تخمدان، کلون، رابدومیوسارکوما^{۴۵} و استئوسارکوما (۲۸).

Mirk/DYRK1B باعث پایداری p27kip1 و ناپایداری بیشتر سایکلین D1 می‌شود که در نهایت منجر به باقی ماندن سلول‌های سرطانی انسان در فاز G0 می‌شود (۲۹) (شکل ۴).

⁴³ myocyte enhancer factor 2

⁴⁴ CDK-interacting protein 1

⁴⁵ rhabdomyosarcoma



شکل ۴- تنظیم چرخه‌ی سلولی توسط DYRK1B (۳۲)

DYRK1B چرخه‌ی سلولی را در تمایز عضله‌ی اسکلتی به صورت غیرقابل برگشت و در سلول‌های سرطانی به صورت برگشت پذیر متوقف می‌کند و از فرایند میتوز جلوگیری به عمل می‌آورد (۳۰).
DYRK1B باعث افزایش بیان چندین ژن آنتی اکسیدان در سلول‌های سرطانی می‌شود که شامل فرواکسیداز و سوپراکسیداز دیس موتاز ۲ و ۳ هست. سلول‌های سرطانی سطوح بالاتری از ROS را نسبت به سلول‌های طبیعی حفظ می‌کنند و بنابراین ممکن است به انباشته شدن ROS^{۴۶} بیشتر حساس باشند، Mirk میزان ROS سمی یا toxic را در سلول‌های توموری کاهش می‌دهد و باعث افزایش بقایشان می‌شود (۳۱).
Mirk^{۴۷} همچنین در کارسینومای ریه افزایش بیان دارد، در کارسینومای تخمدان و ملانوما نیز شاهد این افزایش بیان هستیم که اشاره بر این دارد که Mirk اغلب درون بافت‌های توموری افزایش می‌یابد.

نقش‌های دیگر DYRK1B/Mirk

DYRK1B باعث افزایش بیان گلوکز 6-فسفاتاز (آنزیم کلیدی گلوکوئوتونیک) می‌شود (۳۲). پروتئین Mirk همچنین در هپاتوسیت‌های نرمال نیز پیدا شده است و مشخص شد که Mirk باعث فعال سازی فاکتور رونویسی HNF^{۴۸}α^۱ از طریق فسفریلاسیون آن می‌شود (۲۷).

نقش DYRK1B/Mirk در فرایند آدیپوژنیز

بیان DYRK1B در طول فرایند آدیپوژنیز افزایش می‌یابد، آدیپوژنیز فرایندی است که در طی آن سلول‌های بنیادی مزانشیمال به رده‌های آدیپوسایت تبدیل می‌شوند، DYRK1B مسیر Shh رامهار می‌کند، مهار مسیر Shh منجر به کاهش پروتئین wnt می‌شود که با افزایش پروتئین آدیپوژنیک (c/EBPα^{۴۹}) و PPAR^{۵۰} گاما و همچنین عوامل تبدیل کننده آدیپوژنیک همراهی دارد (۳۲).

تنظیمات بیان و فعال شدن DYRK1B/Mirk

در مطالعه‌ای مشخص شد که Mirk یا همان DYRK1B بوسیله‌ی بعضی از اعضای خانواده‌ی Rho مانند RhoA، Cdc42، و به میزان کمتری Rac1 در میوبلاست‌ها تحریک می‌شود (۲۴). میتوژن‌ها باعث تحریک سلول و در نتیجه وارد شدن سلول به فاز G₁ می‌شوند و همچنین سطح mirk را کاهش می‌دهند (۳۳).

Mirk به صورت منفی به وسیله‌ی ERK^{۵۱} یا MAPK^{۵۲} تنظیم می‌شود، در یک مطالعه‌ای مشخص شد که مهار مسیر MEK یا ERK ها منجر به افزایش بیان Mirk ها در سلول‌های میوبلاست و سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۹).

⁴⁶ reactive oxygen species

⁴⁷ minibrain- related kinase

⁴⁸ hepatocyte nuclear factor

⁴⁹ CCAAT/enhancer-binding protein alpha

⁵⁰ peroxisome proliferator-activated receptors

⁵¹ extracellular-signal-regulated kinase

⁵² mitogen- activated kinase

همچنین مشاهده شده است که استرس سیگنالینگ منجر به فعال شدن MKK3 که یک MAP کیناز است می‌شود و آن هم منجر به فعال شدن DYRK1B/Mirk و P38 که آن هم یک MAP کیناز است می‌شود، از طرفی P38 منجر به مهار DYRK1B/Mirk می‌شود (۲۷).

جهش‌های کشف شده در ژن *DYRK1B/Mirk*

دو جهش missense در *DYRK1B*، H90P و R120C اخیراً کشف شده‌اند که با فرم اتوزومال غالب سندروم متابولیک که AOMS3 یعنی سندروم متابولیک چاقی شکمی نوع 3 همراهی دارد، در افراد مبتلا شروع زودرس بیماری قلبی عروقی، فشار خون بالا، چاقی مرکزی و دیابت دیده می‌شود (۲۰).

آلل‌های جهش‌یافته *DYRK1B* دچار کسب عملکرد^{۵۳} هستند. بیان بیش از حد *DYRK1B* که در موتاسیون‌های H90P و R120C در سلول‌های هپاتومای HepG2 منجر به افزایش تولید آنزیم گلوکونوژنیک (آنزیم گلوکز ۶-فسفاتاز) می‌شود که این میزان بیان بیشتر از بیان گلوکز ۶-فسفاتاز در حالت طبیعی است (۱۱).

آنالیز توالی نشان می‌دهد که جهش‌های ایجاد شده متعلق به یک جعبه‌ی همولوگ (DH BOX) است که در ناحیه‌ی N-ترمینال DYRK1B قرار دارد (۲۰).

مروری بر مطالعات گذشته

حضور خانواده‌ی DYRK در فرایند اسپرماتوژنز

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۶ توسط F.Sacher و همکاران وی از طریق تکنیک in situ-hybridisation بر روی موش (rat) انجام شد مشاهده شد که به جز *DYRK1A* که بیان قابل توجهی را در بیضه‌ها نشان نمی‌داد، همه‌ی همولوگ‌های این پروتئین کیناز که شامل *DYRK1B*، *DYRK2*، *DYRK3*، *DYRK4* هستند الگوی بیان بالایی را در سلول‌های زایا نشان می‌دادند. همچنین مشاهده شد که *DYRK1B* در اواخر پاکتین تا مرحله‌ی ۱۶ اسپرماتید بیان می‌شود (۳۴).

بیان *DYRK2* از مرحله‌ی ۶ اسپرماتید شروع می‌شود و تا مرحله‌ی اسپرماتید ۱۱ ادامه دارد، بیان *DYRK3* از اواخر پاکتی تا اسپرماتوسیت شروع می‌شود و تا مرحله‌ی ۷ اسپرماتید ادامه دارد.

بیان *DYRK4* هم فقط در مرحله‌ی ۸ اسپرماتید مشاهده شده است (۳۴).

همچنین در این مطالعه مشاهده شد که در موش‌های ناک‌اوت شده‌ی *DYRK4* هیچ‌گونه‌ی کاهش و یا اختلالی در اسپرماتوژنز و حرکت و عملکرد اسپرم‌ها مشاهده نشد، در واقع ممکن است ایروفرم‌های دیگر *DYRK* کمبود بیان *DYRK4* را جبران کنند (۳۴).

تأثیر *DYRK1B/Mirk* بر مسیر Hh Signaling

DYRK1B به‌عنوان تنظیم‌کننده‌ی مثبت و منفی مسیر Hh عمل می‌کند (۳۵).

در یک مطالعه‌ای مشخص شد که *DYRK1B* به‌طور غیر مستقیم باعث افزایش پایداری Gli1 می‌شود که این احتمالاً به دلیل تأثیر مولکول Akt هست. داده‌ها نشان می‌دهد که *DYRK1B* مسیر *Akt/mTOR*^{۵۴} را تحریک می‌کند که آن هم متعاقباً باعث افزایش پایداری Gli1 می‌شود (۳۵).

نتیجه‌ی نهایی پیام رسانی Desert Hedgehog (Dhh) فعال‌سازی GLI1 ها است که یک فاکتور رونویسی برای ژن‌های هدف Dhh هست، در مطالعه‌ای مشاهده شد که *DYRK1B* می‌تواند بر روی مسیر hedgehog (HH) نقش‌های متفاوتی داشته باشد و این بستگی به این دارد که در کدام قسمت از این مسیر وارد شود و تأثیر بگذارد، مثلاً هنگامی که در قسمت شروع در غشا وارد شود باعث مهار مسیر Hh می‌شود، اما هنگامی که در قسمت‌های پائین‌تری وارد شود باعث پایداری Gli1 می‌شود (۳۵).

مسیر Hh Signaling

مسیر Hh یک تنظیم‌کننده‌ی مهم در رشد جنینی، زیست سلول‌های بنیادی و تومورزایی است (۳۴).

⁵³ gain of function

⁵⁴ mammalian target of rapamycin complex

مسیر Dhh به صورت مستقیم و غیر مستقیم تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا را تنظیم می‌کند (۳۶). لیگندهای Hh به صورت Sonic Hedgehog (SHH)، Indian Hedgehog (IHH) و Desert Hedgehog (Dhh) به رسیپتورهای PTCH1 و PTCH2 متصل می‌شوند که در نهایت موجب فعال شدن فاکتورهای رونویسی GLI2، GLI1 و GLI3 در پستانداران می‌شود (۳۴).

مسیر Hh Signaling در بیضه

بیان Dhh در بیضه از جنینی تا بزرگسالی، اشاره بر این مسأله دارد که Dhh برای رشد کامل بافت بیضه و اسپرماتوژنز لازم است (۳۷).

Desert Hedgehog (Dhh) یک عضو از خانواده‌ی پروتئین hh پستانداران هست و جزء اولین ژن‌هایی است که در رشد و تکامل و گندهای جنس نر نقش دارد، متوقف کردن مسیر پیام رسانی hh بصورت دستکاری ژنتیکی و یا استفاده از داروها منجر به نقص در اسپرماتوژنز و ناباروری می‌شود (۳۸).

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده سازی نمونه ها

تعیین گروه‌های آزمایشی

این نمونه‌ها شامل بافت بیضه از مردان Sertoli cell only syndrome به‌عنوان گروه کنترل منفی، maturation arrest complete spermatogenesis به‌عنوان گروه مورد Hypospermatogenesis (case) به‌عنوان گروه کنترل مثبت می‌باشد.

مشخصات واحدهای مورد پژوهش

۱. نمونه‌های مورد بررسی ۳۰ نفر از مردان نابارور مراجعه کننده به رویان می‌باشند.
۲. نمونه های مورد مطالعه نباید شامل بیماران مبتلا به ناهنجاری‌های کروموزومی و سیستمیک فایبروزیس باشند.

نمونه‌گیری

نمونه‌های بافتی گرفته‌شده در قسمت ۲-۱-۲ از بانک بافت بیضه گروه آندروولوژی پژوهشگاه رویان گرفته شد. لازم به ذکر است که اطلاعات مربوط به BMI و هورمون‌های LH، FSH و تستسترون این بیماران نیز مطالعه شد.

انجام تست تشخیص مولکولی

تجهیزات و دستگاه‌های مورد استفاده

جدول ۱- لیست دستگاه‌های مورد استفاده در استخراج RNA و سنتز cDNA و Real time PCR و الکتروفورز

نام دستگاه	نام شرکت سازنده	نام کشور سازنده
سمپلر	Eppendorf/Brand	ایتالیا/ آلمان
هودشیمیایی	ژال تجهیز	ایران
منبع تغذیه	Bio Rad	PowerPac basic Power Supply
تانک الکتروفورز افقی	پزشکی باباپژوهش	ایران
فریزر ۸۰- درجه	Ultra Low Temperature	آمریکا
Real time PCR	Applied Biosystems	آلمان
استوانه مدرج	Brand	آلمان
ارلن	Brand	آلمان
ترازو	Sartoris	آلمان
یخچال ۴درجه	Siemens	انگلیس
فریزر ۲۰- درجه	Siemens	انگلیس

کره جنوبی	Samsung	ماکروبو
آلمان	Eppendorf	ترموسایکلر
آلمان	Thermo Scientific	نانودراپ
آلمان	Eppendorf	سانتریفوژ یخچال دار
آلمان	Kiagen	ورتکس / اسپین

جدول ۲- لیست مواد مورد استفاده در استخراج RNA و سنتز cDNA و Real time PCR و الکتروفورز

نام کشور سازنده	نام شرکت سازنده	نام مواد
آمریکا	Ambion	TRIzol
آلمان	Merk	کلروفرم
آلمان	Merk	ایزوپروپانول
آلمان	Brand	سرسمپلر
آلمان	Brand	میکروتیوپ nuclease free
ایران	داروپخش	آب مقطر
آلمان	Biomax	دستکش لاتکس
کره	Amplicon	Syber green Q-PCR
آمریکا	Fermentas	DnaseI
کره	SMOBIO	cDNA synthesis kit
ایران	کیازیت	Agarose
کره	SMOBIO	DNA-Ladder
USA	Thermo scientific	Loading dye
ایران	پیشگام	Forward Reverse primer

طراحی و بررسی کیفیت پرایمرها

برای سنتز cDNA به روش Real-Time PCR ابتدا لازم است که برای ژن مورد نظر، پرایمر طراحی گردد. طراحی پرایمر توسط نرم افزارهای متعددی می تواند صورت بگیرد. روش هایی که در این طرح به کار برده می شود شامل Gen, Perl Primer NCBI.Runner می باشد که بعد از آن در سایت UCSC اختصاصی بودن پرایمر طراحی شده برای ژن مورد نظر بررسی گردید.

روش آماده سازی پرایمرها

ابتدا بر طبق دستورالعمل ارسال شده توسط شرکت سازنده پرایمر، مقدار مشخصی آب تزریقی استریل به ظرف اصلی پرایمرها اضافه گردید و

به مدت یک ساعت در یخچال up& down شد بعد از این مرحله تیوپ ها را از یخچال درآورده و آن ها را خوب تکان داده و اسپین کرده و بعد دوباره در دمای °C ۴-۳ یخچال به مدت یک شبانه روز گذاشته شد.

سپس برای رقیق سازی پرایمر ۵ µl از ظرف اصلی هر پرایمر را با ۹۵ µl آب تزریقی استریل مخلوط گردید و بعد در دمای ۲۰- نگه داری شد.

جدول ۳- توالی پرایمر DYRK1B و GAPDH

نام پرایمر	توالی پرایمر (۵' به ۳')	طول محصول PCR (bp)
DYRK1B	F:CATCATTCCTGCGACCTC R:ATATACTGGTAGATCCTCTGGC	120
GAPDH	F:CTCATTTCCTGGTATGACAACGA R:CTTCCTCTTGTGCTCTTGCT	122

مراحل استخراج RNA از بافت بیضه انسانی

آنزیم RNase به وفور در محیط اطراف وجود دارد و باعث تجزیه ی RNA می‌شود و از آنجایی که غیرفعال کردن RNase ها بسیار مشکل است و حتی مقدار کمی از آنها برای تخریب RNA کافی است، پس برای جلوگیری از آلودگی، محیط باید استریل باشد. تمامی مراحل استخراج RNA در زیر هود شیمیایی و بر روی یخ انجام می‌گیرد. برای جلوگیری از آلودگی با DNA و از دست رفتن RNA توسط آنزیم RNase از ویال های فاقد نوکلئاز استفاده می‌شود. حدود ۲۰ دقیقه قبل از کار هود شیمیایی روشن می‌شود تا محیط زیر هود حداقل امکان عاری از آلودگی باشد و پس از آن سطح داخلی هود به دقت الکل کشی می‌گردد.

۱. ابتدا با استفاده از اسکارپل مقداری از بافت بیضه را جدا کرده و با ترازو وزن می‌کنیم تا وزنش ۰.۰۵ گرم باشد. ۲. سپس بافت را روی پتری‌دیش ویا پلیت قرار می‌دهیم، به مقدار کافی بافت را با ضربه زدن بوسیله اسکارپل خورد می‌کنیم به‌طوری‌که بافت به صورت یک مایع غلیظ در بیاید سپس بافت را به ویال ۱.۵ انتقال می‌دهیم.

۳. به مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر تریزول را به بافت اضافه می‌کنیم و حدود ۱۵ دقیقه پیپتاژ می‌کنیم، به‌طوری‌که مایع یکنواختی از بافت و تریزول بدست آید و بافت در تریزول کاملاً حل شود سپس حدود ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه می‌کنیم و در این حالت ویال را چند بار up & down می‌کنیم و در این حالت رنگ سبز-آبی کدری به دست می‌آید، این مخلوط را به مدت ۱۵ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rcf^{۵۵} در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ می‌کنیم.

۴. بعد از انجام سانتریفوژ محلول درون ویال به سه فاز تقسیم می‌شود، فاز رویی را که بی‌رنگ و شفاف و حاوی RNA است را به ویال جدید انتقال می‌دهیم و هم حجم آن ایزوپروپانل به آن اضافه می‌کنیم و ویال را به مدت یک شبانه روز در فریزر -۲۰- درجه سانتی‌گراد می‌گذاریم.

۵. در این مرحله ویال را از -۲۰- در آورده و سانتریفوژ را ۱۵ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rcf و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام می‌دهیم.

بعد از سانتریفوژ مایع رویی را دور می‌ریزیم، رسوبی به دست می‌آید که همان total RNA ماست.

۶. سپس ۵۰۰ میکرولیتر الکل اتانول ۷۰٪ را به این رسوب که ته ظرف است اضافه می‌کنیم و دوباره سانتریفوژ را به مدت ۸ دقیقه با دور ۷۵۰۰ rcf و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام می‌دهیم، بعد از سانتریفوژ اتانول را از ویال خارج می‌کنیم ولی رسوب می‌ماند.

۷. ویال را به صورت افقی روی گاز استریل روی میز هود می‌گذاریم تا رسوب خشک شود، بعد از گذشت ۱۰ دقیقه رسوب خشک می‌شود.

۸. سپس ۲۰ میکرولیتر آب نوکلئاز فری^{۵۶} به آن رسوب اضافه می‌کنیم و بعد پایپت انجام می‌دهیم تا محلول یکنواختی بدست بیاید.

⁵⁵ Relative centrifugal force

⁵⁶ nuclease free

۹. مایع درون ویال محتوی RNA خواهد بود، از آن به مقدار $1 \mu\text{l}$ برای جذب خوانی با دستگاه نانودراپ برداشته و مابقی برای تیمار کردن RNA یا حذف آلودگی‌های احتمالی RNA نگه‌داری شد.

بررسی کیفی و کمی RNAهای استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ

نانودراپ دستگاهی است که در آن از تابش الکترومغناطیسی در ناحیه مرئی و ماوراء بنفش برای خواندن میزان جذب ماده استفاده میشود. ۱۵ دقیقه قبل از استفاده از دستگاه نانودراپ باید این دستگاه روشن شود. دستگاه بر روی اسید نوکلئوتید و RNA تنظیم گردید. ابتدا لنز دستگاه به وسیله آب مقطر و یک تکه کاغذ کاملاً پاک شد و پس از آن بوسیله یک میکرولیتر آب مقطر دستگاه کالیبر گردید. سپس ۱ میکرولیتر RNA استخراج شده پس از چندبار پایپت کردن روی لنز دستگاه قرار داده شد و میزان جذب آن خوانده شد. با استفاده از این روش، غلظت RNA به دست می‌آید. برای بررسی خلوص RNA استخراج شده از نسبت جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ و (A_{260}/A_{280}) استفاده کرد، این نسبت در بهترین حالت باید بین ۲-۱/۸ باشد و نسبت‌های کمتر نشان‌دهنده ی آلودگی RNA با DNA است، استفاده از نسبت جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۳۰ نانومتر (A_{260}/A_{230}) هم اطلاعات مفیدی از خلوص و کیفیت RNA می‌دهد، این نسبت هم در بهترین حالت باید بین ۲/۲-۱/۸ باشد. نسبت‌های کمتر نشان‌دهنده ی آلودگی با پروتئین و نمک‌ها می‌باشد.

تیمار RNA استخراج شده و حذف آلودگی DNA

برای سنتز ژن‌های موردنظر از روی RNA، لازم است DNA از محتویات ویال حذف گردد. برای این کار باید بر اساس غلظت محلول RNA حجم مشخصی از محلول را برای تیمار جدا کنیم. برطبق جدول زیر $2 \mu\text{l}$ از بافر ۱۰x و $2 \mu\text{l}$ از DNase I به آن اضافه کرده، حجم آب بسته به مقدار RNA متغیر می‌باشد و باید حجم کلی را به $20 \mu\text{l}$ برسانیم

جدول ۴- مواد مورد استفاده برای تیمار RNA

مقدار	نام ترکیب
$2 \mu\text{l}$	Dnase I
$2 \mu\text{l}$	Buffer 10x
$20-(4+x) \mu\text{l}$	Nuclease free water
$x \mu\text{l}$	RNA
$20 \mu\text{l}$	حجم نهایی

Nuclease free water : $20-(4+x)$

$x : 2000 \div \text{concentration of RNA}$

پس از ترکیب مواد، محلول را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 37°C داخل ترموستات می‌گذاریم. سپس به محلول مورد نظر $1.5 \mu\text{l}$ EDTA اضافه کرده و در دمای 65°C به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه کرده تا فعالیت آنزیم خنثی گردد.

به این ترتیب DNA استخراج شده با RNA حذف گردیده و RNA به‌طور خالص جداسازی می‌شود. برای اطمینان از خلوص و کیفیت RNA، با استفاده از دستگاه نانودراپ غلظت آن را به دست می‌آوریم.

EDTA در این مرحله برای غیرفعال کردن آنزیم Dnase I به کار می‌رود.

اگر حجم نهایی ویال $10 \mu\text{l}$ باشد باید $1 \mu\text{l}$ EDTA به آن اضافه کنیم.

در این مرحله دور ویال را با پارافیلیم می‌پیچیم و دوباره در ترموستات به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 65°C می‌گذاریم بماند.

• در این مرحله هم با استفاده از دستگاه نانودراپ غلظت RNA را می‌خوانیم.

سنتز cDNA

بعد از تیمار کردن RNA سنتز cDNA را با استفاده از کیت SMOBIO انجام می‌دهیم.

برای سنتز cDNA مطابق با کیت SMOBIO ترکیبات زیر را که mix A نامیده می‌شود، ابتدا در یک ویال ۰.۵ ریختیم.

این ترکیبات را به مدت ۵ دقیقه در دمای 70°C انکوبه می‌کنیم، سپس به مدت ۱ دقیقه آن را روی یخ می‌گذاریم تا بماند.

Mix A:

جدول ۵- مواد مورد استفاده برای سنتز cDNA

نام ترکیب	مقدار
Total RNA	x μ l
dntp mix	1 μ l
Oligo dt primer	1 μ l
Random Hexamer	1 μ l
DEPC-Treated H ₂ O	To 10 up final vol
حجم نهایی	10 μ l

ترکیبات زیر را که mix B نامیده می‌شود را در یک ویال ۰.۵ می‌ریزیم و در ادامه این ترکیبات را روی mixA می‌ریزیم، حال این ویال حاوی این دو ترکیب mixA و mixB را اسپین می‌کنیم و بر طبق برنامه‌ی مندرج در جدول (۷) درون دستگاه PCR می‌گذاریم.

Mix B:

جدول ۶- مواد مورد استفاده در سنتز cDNA

نام ترکیب	مقدار
5x RT buffer(DTT)	4 μ l
DEPC-Treated H ₂ O	4 μ l
Rnase Inhibitor	1 μ l
Reverse Transcriptase	1 μ l
حجم کل	10 μ l

جدول ۷- برنامه‌ی دمایی سنتز cDNA

زمان	دما
۲۰ دقیقه	۲۵ درجه سانتی گراد
۵۰ دقیقه	۴۲ درجه سانتی گراد
۵ دقیقه	۸۵ درجه سانتی گراد

اکنون می‌توانیم با استفاده از روش Real Time -PCR مقایسه‌ی میزان بیان ژن *DYRK1B* را در گروه‌های مختلف انجام دهیم.

بررسی کمی ژن‌های مورد نظر توسط روش Real time PCR

در این مطالعه از نمونه‌های cDNA بدست آمده به‌عنوان الگو در انجام Real-time PCR استفاده گردید. این واکنش با استفاده از سایبرگرین (SYBER Green, PCR master mix) و سیستم آشکارساز (ABI) انجام گرفت. Syber Green Master mix به صورت آماده دارای Taq polymerase، dntp، mgcl₂ و آنزیم لازم برای انجام Real time PCR می‌باشد، همچنین دارای یک نوع رنگ به نام سایبرگرین است که دستگاه PCR با استفاده از منبع نور تنگستن هالوژن آن را تحریک می‌کند. این ماده به دو رشته‌ی DNA متصل می‌شود و نور فلورسانس از خود ساطع می‌کند. مقدار فلورسنت منتشر شده مستقیماً به مقدار محصول تولید شده در هر سیکل PCR نسبت داده می‌شود، بنابراین واکنش PCR می‌تواند به‌عنوان یک سنجش کمی به کار رود. برای انجام Real-Time PCR ابتدا باید Master Mix ساخت که شامل موارد زیر می‌باشد:

در این تحقیق ژن هدف به وسیله‌ی ژن مرجع *GAPDH* نرمال شدند.

ابتدا باید محلول Master Mix برای ژن مورد مطالعه شامل *DYRK1B* و ژن *GAPDH* به عنوان ژن مرجع به طور جداگانه طبق جدول تهیه گردد.

جدول ۸- مواد مورد استفاده در Real time PCR

مقدار	نام ترکیب
5µl	Syber Green Qpcr Master mix
1µl	Forward primer
1µl	Reverse primer
11µl	Water
18µl	حجم کل

این مقدار لازم برای انجام یک بار Real-Time PCR یک ژن می باشد.

برای هر ژن یک تکرار و یک non template control (ntc) هم لازم هست که ntc فاقد cDNA است، بنابراین ما باید برای هر ژن مقدار master mix را سه برابر در یک ویال ۱٫۵ ساخت و در یک ویال هم باید cDNA رقیق شده هر نمونه را ساخت.

حال درون چاهک هر استریپ ۱۸µ از master mix و ۲µ هم از cDNA با غلظت مناسب می ریزیم برای افزایش دقت هر نمونه ۲ بار تکرار شد، در چاهک سوم که ntc قرار دادیم ۱۸µ از master mix و ۲µ هم آب مقطر می ریزیم. و در دستگاه قرار می دهیم و با برنامه‌ی دمایی و زمانی مشخص تنظیم می کنیم.

پس از افزودن سایبرگرین ادامه‌ی کار در تاریکی انجام شد، زیرا این ماده در اثر برخورد نور تا حدی غیر فعال می شود همچنین تمام مراحل کار روی یخ انجام می گیرد، پس از اتمام کار استریپ‌های حاوی نمونه به داخل دستگاه منتقل و پس از دادن برنامه‌ی دمایی طبق جدول Real time PCR آغاز شد.

جدول ۹- برنامه‌ی دمایی Real-time PCR

تکرار	زمان (دقیقه)	دما (درجه سانتی گراد)	عملکرد هر مرحله
۱ سیکل	۱۰ دقیقه	۹۵	Initial denaturation
۴۰ سیکل	۱۵ ثانیه	۹۵	Denaturation
	۱ دقیقه	۶۰	Annealing- Extention

آنالیز داده‌ها

داده‌ها ابتدا وارد نرم افزار Excel شدند، بیان نسبی ژن‌ها به وسیله‌ی مقایسه‌ی میزان بیان این ژن‌ها در سه گروه با استفاده از ژن مرجع *GAPDH* و توسط روش ΔCT اندازه گیری گردید. به طور خلاصه محاسبات به این صورت انجام شد که در هر گروه ابتدا CT ژن‌های هدف در هر نمونه از CT ژن مرجع *GAPDH* در همان نمونه کسر شد و ΔCT برای هر گروه به طور جداگانه به دست آمد. سپس مقدار $\Delta\Delta CT$ برای هر نمونه طبق فرمول زیر به دست می آوریم.

$$\Delta CT \text{ test} - \Delta CT \text{ control} = \Delta\Delta CT$$

اعداد حاصل را به صورت $2^{-\Delta\Delta CT}$ تبدیل کرده و سپس آنالیزهای لازم بر روی اعداد $2^{-\Delta\Delta CT}$ هر فرد انجام می شود.

* عدد CT عبارت است از اولین افزایش معنی دار در محصول PCR، که به آن سیکل آستانه نیز گفته می شود.

آنالیز آماری

داده‌های حاصل از نرم افزار Excel وارد نرم افزار SPSS شدند و آنالیز آماری با استفاده از آزمون Anova one way صورت گرفت. معنی دار بودن نتایج در سطح ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد.

الکتروفورز بر روی ژل آگارز

برای اطمینان از انجام سنتز ژن مورد نظر در Real time PCR می‌توانیم ژل الکتروفورز انجام دهیم. الکتروفورز فرایند حرکت مولکول‌های باردار در میدان الکتریکی است. طی این روش محصول PCR بر اساس خواص فیزیکی و وزن مولکولی خود در چاهک‌های ژل حرکت کرده و برحسب اندازه از هم جدا می‌شوند، در واقع شکل مولکول‌های پلیمر از حالت حلقوی نامنظم به شکل مولکول‌های مارپیچ دوتایی تبدیل می‌شود. این پدیده شبکه ای از منافذ با قطر ۱۰۰ الی ۳۰۰ نانومتری ایجاد می‌کند که اندازه‌ی این منافذ به عوامل مختلفی بستگی دارد. با توجه به وزن مولکولی قطعات تکثیر شده، سرعت حرکت آن‌ها نیز متفاوت است. قطعات کوچکتر سرعت بیشتر و قطعات بزرگتر سرعت کمتری دارند. بدین منظور باید ژل آگارز ۲ درصد را با توجه به طول محصول PCR تکثیر شده درست کنیم.

به این ترتیب که ابتدا مقدار ۲ گرم آگارز را در مقدار ۱۰۰ ml بافر TAE1 X حل کرده و پس از گرم کردن آن به مدت ۱ دقیقه در ماکروویو، کمی صبر می‌کنیم تا سرد شود سپس محلول را به آرامی داخل tray ای که شانه را رویش قرار داده‌ایم می‌گذاریم بعد از حدود ۳۰ دقیقه ژل سرد شده و قابل استفاده می‌باشد، حال می‌توانیم به آرامی شانه را از روی tray برداریم، و بعد در چاهک اول، دوم، سوم از مخلوط رنگ‌های Loading die و Gel Red به ترتیب چاهک‌های اول تا سوم به مقدار $12\mu\text{l}$ ، $13\mu\text{l}$ ، $13\mu\text{l}$ می‌ریزیم و سپس در چاهک اول $12\mu\text{l}$ از DNA Ladder و در چاهک دوم هم $15\mu\text{l}$ از محصول Real time PCR را می‌ریزیم و در چاهک سوم هم $15\mu\text{l}$ از NTC می‌ریزیم.

سپس دستگاه را به جریان الکتریکی ۱۲۰ ولت وصل می‌کنیم ورشته‌های مورد نظر بر حسب اندازه و بارالکتریکی در طول ژل حرکت می‌کنند و بعد از حدود ۱ الی ۱٫۵ ساعت ژل را از دستگاه خارج کرده و با دستگاه Gel DocTM باندها مشاهده شده و عکس برداری انجام می‌گردد.

چنانچه قطعه‌ی مورد نظر در محل اصلی خود تشکیل باند دهد نمونه‌ی حاصل از Real time PCR شامل ژن مورد نظر ما می‌باشد و سنتز به درستی انجام شده است.

بافر TAE1X

حرکت محصولات PCR تحت تأثیر قدرت یونی بافر است. اگر قدرت یونی بافر خیلی زیاد باشد مقادیر قابل توجهی گرما تولید می‌شود و ممکن است باعث دناتوره کردن محصولات PCR شود. اگر قدرت یونی بافر کم باشد، هدایت الکتریکی حداقل و مهاجرت محصولات PCR کند خواهد بود.

Gel Red

برای رنگ آمیزی مولکول‌های زیستی در ژل آگارز الکتروفورز استفاده می‌شود. نحوه‌ی رنگ‌آمیزی این ماده به این صورت است که در لابه‌لای مولکول DNA نفوذ کرده و به آن متصل می‌شود، در نتیجه در مقابل نور UV رشته‌های DNA قابل رویت خواهند بود.

Ladder

شامل مولکول‌های DNA با طول مشخص است که به ترتیب معینی از هم دور می‌شوند، انواع مختلفی از این مارکرها وجود دارند که با توجه به طول قطعه‌ی مورد نظر انتخاب می‌شوند. در این مطالعه سایز Ladder ما ۵۰ جفت بازی می‌باشد.

بافر Loading dye

بافر بارگذاری Loading dye شامل رنگ گزین سیانول و رنگ برومواتیلن بلو و آب و گلیسرول می‌باشد. از این ماده در هنگام Load کردن محصولات PCR^{۵۷} استفاده می‌شود. بافر بارگذاری باعث می‌شود که دانسیته محصولات PCR هنگام Load شدن افزایش یابد و کامل درون چاهک قرار گیرند. در هنگام برقراری جریان چون دو رنگ ذکر شده اختلاف وزن دارند با دوسرعت متفاوت حرکت می‌کنند و در نتیجه محدوده‌ی حرکتی مشخص می‌شود. گلیسرول باعث مقاومت به گرما در نمونه‌ها نیز می‌شود.

⁵⁷ Polymerase chain reaction

نتایج کمی حاصل از بیان ژن DYRK1B

نتایج حاصل از Real-time PCR نشان داد که بیان ژن *DYRK1B* در گروه Sertoli cell only syndrome نسبت به گروه Hypospermatogenesis کاهش معنی داری دارد ($P=0.01$).

جدول ۱۰- آزمون one way ANOVA سه گروه مورد مطالعه

ANOVA

gene	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.998	2	.499	5.231	.061
Within Groups	2.099	22	.095		
Total	3.098	24			

جدول ۱۱- آزمون one way ANOVA بین گروه های مورد مطالعه

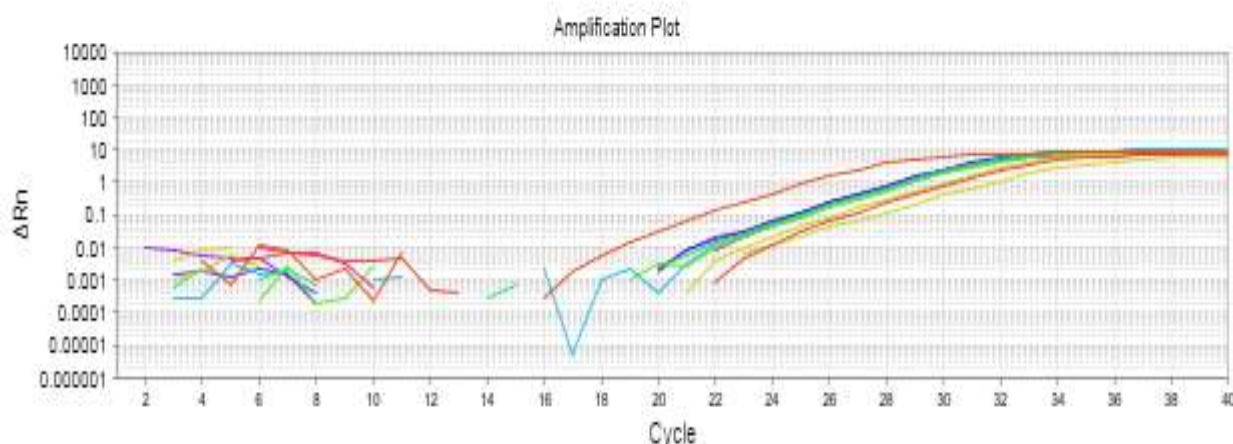
Multiple Comparisons

Dependent Variable: gene

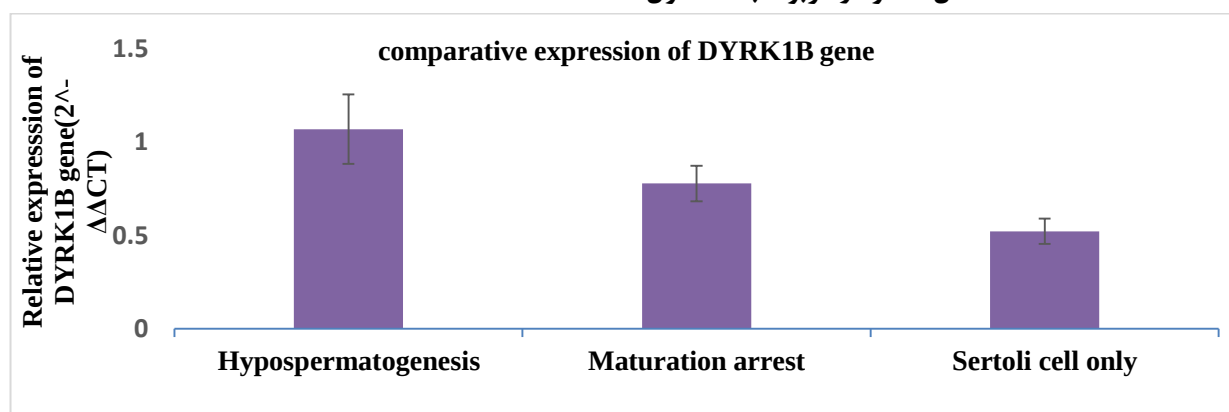
Tukey HSD

(I) groups	(J) groups	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
hypospermatogenesis	maturation arrest	.29164	.16661	.210	.1269	.7102
	sertoli cell only	.55058*	.17230	.011	.1178	.9834
maturation arrest	hypospermatogenesis	.29164	.16661	.210	.7102	.1269
	sertoli cell only	.25894	.13884	.173	.0898	.6077
sertoli cell only	hypospermatogenesis	.55058*	.17230	.011	.9834	.1178
	maturation arrest	.25894	.13884	.173	.6077	.0898

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



شکل ۱- نمودار مربوط به محصول DYRK1B Real time PCR



نمودار ۲- پروفایل بیان ژن DYRK1B در سه گروه مورد مطالعه

بحث و نتیجه‌گیری

حدود ۲۵ درصد از زوجین در عرض یک سال به بارداری دست نمی‌یابند، ۱۵ درصد از این زوجین به دنبال درمان پزشکی ناباروری هستند و در نهایت کمتر از ۵ درصد از آنان بدون فرزند باقی می‌مانند (۴۰). تقریباً ۵۰ درصد از ناباروری‌ها مربوط به مردان است. در بسیاری از زوج‌های نابارور هر دو عامل مردانه و زنانه وجود دارد. کاهش قدرت باروری در مردان می‌تواند نتیجه‌ی ناهنجاری مادرزادی و یا اکتسابی در دستگاه ادراری-تناسلی باشد. عفونت غدد جانبی، افزایش دمای کیسه‌ی بیضه، واریکوسل، اختلالات غدد درون‌ریز، ناهنجاری‌های ژنتیکی و عوامل مربوط به سیستم ایمنی می‌تواند از جمله این عوامل باشد (۴۱). در ۴۰ تا ۶۰ موارد ناهنجاری‌ها تنها مربوط به تجزیه و تحلیل مایع منی است و هیچ‌گونه سابقه یا ناهنجاری در معاینه‌ی فیزیکی و تست آزمایشگاهی غدد درون‌ریز وجود ندارد (۴۱). ۳۰ درصد مردان نابارور با فنوتیپ‌های رایج آلیگواسپرمی یا آزواسپرمی دارای منشأ ژنتیکی هستند، اما از نظر چگونگی پیدایش نارسایی اسپرماتوژنتیک همچنان مبهم است (۴۲).

در فرایند تولید اسپرم سالم در بافت بیضه مسیرهای cell signaling متعددی برای پیشرفت مراحل اسپرماتوژنز وجود دارد.

- با توجه به مطالعات صورت گرفته دریافتیم که :

الف) پروتئین کیناز DYRK1B می‌تواند به‌عنوان تنظیم‌کننده‌ی مثبت و منفی مسیر Hh در سلول‌های مختلف عمل کند (۳۵).

ب) در پستانداران، مسیر Hedgehog (Hh) به صورت مستقیم و غیر مستقیم تکثیر و تمایز spermatogonial stem cell ها را تنظیم می‌کند (۴۳)

پ) ژن *DYRK1B* به میزان نسبتاً بالایی در بافت ماهیچه‌های اسکلتی و بافت بیضه بیان می‌شود و در بافت‌های دیگر به میزان بسیار کمی بیان می‌شود و نقش کلیدی در تکثیر، تمایز و بقای سلول همانند تنظیم‌کننده‌های چرخه سلولی ایفا می‌کند (۴).

ت) در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۶ توسط F.Sacher و همکاران وی انجام شد مشاهده شد که به جز *DYRK1A* که بیان قابل توجهی را در testis نشان نمی‌داد، همه‌ی همولوگ‌های این پروتئین‌کیناز که شامل *DYRK2*، *DYRK1B*، *DYRK3* و *DYRK4* هستند الگوی بیان بالایی را در germ cell ها نشان می‌دادند. همچنین مشاهده شد که *DYRK1B* در اواخر پاکتین تا مرحله‌ی ۱۶ اسپرماتید بیان می‌شود (۳۴).

با در نظر گرفتن این چهار مطلب شاید بتوان این نتیجه را گرفت که احتمالاً یکی از نقش‌های *DYRK1B* در بیضه‌ها تاثیر بر مسیر Hh و به دنبال آن تاثیر بر تکثیر و تمایز spermatogonial stem cell هاست.

• همچنین با توجه به مطالعات صورت گرفته فرضیات زیر را نیز می‌توان مطرح کرد:

الف) همان‌طور که *DYRK1B* در سلول‌های ماهیچه‌ای اسکلتی در حال تمایز با افزایش پایداری مهارکننده‌ی *cdk1* و *cdk2* یعنی *P27kip1* باعث حفظ چرخه سلولی در فاز *G0* می‌شود (۲۰)، شاید بتوان گفت که این پروتئین‌کیناز در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا در حال تمایز نیز باعث حفظ چرخه سلولی در فاز *G0* می‌شود و مانع از تقسیم میتوز این سلول‌های در حال تمایز می‌شود.

ب) از طرف دیگر *DYRK1B* در سلول‌های ماهیچه‌ای اسکلتی باعث فسفریلاسیون *P21cip1* می‌شود که آن هم در سیتوپلاسم این سلول‌ها فعالیت کاسپاز ۳ را متوقف می‌کند و باعث کاهش میزان آپوپتوز سلول‌ها در طول فرایند تمایز می‌شود (۲۶)، شاید بتوان این نکته را مطرح کرد که *DYRK1B* در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا نیز باعث کاهش فرایند آپوپتوز این سلول‌ها در طول جریان اسپرماتوژنز می‌شود.

پ) احتمال می‌رود که *DYRK1B* مانند آنچه که در سلول‌های ماهیچه‌ای اسکلتی در حال تمایز مشاهده شد در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا در حال تمایز نیز باعث فسفریلاسیون هیستون داستیلازهای کلاس دو و غیرفعال شدن این آنزیم‌ها و در نهایت فعال شدن برخی از فاکتورهای رونویسی مورد نیاز شود.

در این مطالعه با استفاده از تکنیک Real-time PCR میزان بیان ژن *DYRK1B* را در سه گروه

Compelet maturation arrest و Hypospermatogenesis, Sertoli cell only syndrome

بررسی گردید.

در این راستا ابتدا بافت بیضه‌ی سه گروه مردان نابارور مراجعه کننده به رویان از بانک بیضه بخش آندرولوژی پژوهشگاه رویان گرفته شد، سپس استخراج RNA از این بافت‌ها به روش گفته شده، صورت گرفت و در مرحله‌ی بعد سنتز cDNA انجام گرفت، سپس از طریق تکنیک Real-time PCR بر روی cDNA هر نمونه ارزیابی بیان این ژن صورت گرفت.

* نتایج حاصل از Real-time PCR نشان داد که :

۱) میزان بیان *DYRK1B* در گروه ($SC^{\Delta 8}$) نسبت به گروه ($MA^{\Delta 9}$) کاهش قابل ملاحظه‌ای دارد، همچنین میزان بیان این ژن در گروه (MA) نسبت به گروه ($Hypo^{\Delta 6}$) به میزان قابل توجهی کاهش یافته است.

اما میزان بیان ژن *DYRK1B* در گروه (SC) نسبت به گروه (Hypo) کاهش معنی‌داری دارد ($P_{value} = 0.01$).

* باتوجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت :

کاهش بیان *DYRK1B* در گروه sertoli cell only syndrome (کنترل منفی) نسبت به دو گروه دیگر شاید به این دلیل باشد این گروه فاقد spermatogonial stem cell هاستند.

⁵⁸ sertoli cell only syndrome

⁵⁹ Complete maturation arrest spermatogenesis

⁶⁰ hypospermatogenesis

کاهش بیان *DYRK1B* در گروه maturation arrest نسبت به گروه hypospermatogenesis (کنترل مثبت) احتمالاً به دلیل توقف اسپرماتوژنز است و به همین دلیل بیان این ژن نیز ادامه نیافته است.

پیشنهادهای

با توجه به نتایج به دست آمده و بررسی‌های انجام شده پیشنهاد می‌شود:

- ۱- برای بررسی حضور پروتئین *DYRK1B* در بافت بیضه افراد گروه نابارور از تکنیک ایمونوهیستوشیمی استفاده شود.
- ۲- بررسی مقایسه‌ای روند و میزان اسپرماتوژنز در یک مرد بارور در صورت مصرف مهارکننده‌ی مصنوعی پروتئین *DYRK1B* انجام شود.
- با ناک دان کردن *DYRK1B* در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا، تاثیر بر چرخه‌ی سلولی و همچنین روند اسپرماتوژنز در *in vitro* بررسی شود.

منابع :

۱. <https://www.cdc.gov/reproductivehealth/infertility/index.htm>.
۲. OWN ACOO. Male Infertility. ۲۰۰۴
۳. Cooper TG, Noonan E, Von Eckardstein S, Auger J, Baker H, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Human reproduction update. ۲۰۱۰; ۱۶(۳): ۴۵-۲۳۱
۴. <https://www.britannica.com/science/human-reproductive-system/The-testes>.
۵. <https://www.merckmanuals.com/home/men-s-health-issues/biology-of-the-male-reproductive-system/structure-of-the-male-reproductive-system>.
۶. M. D, deKretser, Kate Loveland, Moira O'Bryan. Endocrinology: Adult and Pediatric. Edition) S, editor: Current Biology; ۲۰۱۶
۷. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK/۵۵۶۰۰۷>.
۸. <https://teachmeanatomy.info/pelvis/the-male-reproductive-system/testes-epididymis/>.
۹. <https://www.britannica.com/science/human-reproductive-system/Accessory-organs>.
۱۰. Nieschlag E, Cüppers H-J, Wickings E, Krüskemper H. Androgene im Plasma nach oraler Verabreichung von Testosteron. DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift. ۱۹۷۵; ۱۰۰(۳۶): ۸۰-۱۷۷۳
۱۱. Mahadevan MM, Trounson AO. Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen. Fertility and sterility. ۱۹۸۴; ۴۱(۲): ۹۳-۲۸۷
۱۲. Weber R, Dohle G, Romijn J. Clinical laboratory evaluation of male subfertility. Advances in clinical chemistry. ۲۰۰۵; ۶۴-۴۰: ۳۱۷
۱۳. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/male-infertility/diagnosis-treatment/drc-۲۰۳۷۴۷۸۰>.
۱۴. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/oligospermia>.
۱۵. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/asthenospermia>.
۱۶. <https://www.elawoman.com/blog/male-fertility/causes-types-and-treatment-of-teratozoospermia>.
۱۷. Wosnitzer M, Goldstein M, Hardy MP. Review of azoospermia. Spermatogenesis. ۲۰۱۴; ۴(۱): e.۲۸۲۱۸
۱۸. Vinaya Kumar N. Occupational Exposure to Heat and Incidence of Male Infertility in Occupational Drivers.
۱۹. Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism. ۲۰۱۱; ۲۵(۸۵-۲۷۱): (۲

۲۰. Jhaisha SA, Widowati EW, Kii I, Sonamoto R, Knapp S, Papadopoulos C, et al. DYRK¹B mutations associated with metabolic syndrome impair the chaperone-dependent maturation of the kinase domain. Scientific reports. ۲۰۱۷;۷(۱):. ۱۳-۱
۲۱. Ashford AL, Dunkley TP, Cockerill M, Rowlinson RA, Baak LM, Gallo R, et al. Identification of DYRK¹B as a substrate of ERK ۲/۱ and characterisation of the kinase activity of DYRK¹B mutants from cancer and metabolic syndrome. Cellular and Molecular Life Sciences. ۲۰۰۰-۸۸۳:(۴)۷۳:۲۰۱۶
۲۲. Leder S, Weber Y, Altafaj X, Estivill X, Joost H-G, Becker W. Cloning and characterization of DYRK¹B, a novel member of the DYRK family of protein kinases. Biochemical and biophysical research communications. ۱۹۹۹;۲۵۴(۲):. ۹-۴۷۴
۲۳. Lucas B, Fields C, Hofmann MC. Signaling pathways in spermatogonial stem cells and their disruption by toxicants. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews. ۲۰۰۹;۸۷(۱):. ۴۲-۳۵
۲۴. Deng X, Ewton DZ, Pawlikowski B, Maimone M, Friedman E. Mirk/dyrk¹B is a Rho-induced kinase active in skeletal muscle differentiation. Journal of Biological Chemistry. ۲۰۰۳;۲۷۸(۴۲):. ۵۴-۴۱۳۴۷
۲۵. Friedman E. Mirk/Dyrk¹B in cancer. Journal of cellular biochemistry. ۲۰۰۷;۱۰۲(۲):. ۹-۲۷۴