TUMJ مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، بهمن ۱۳۹۶، دوره ۷۵، شماره ۱۱، صفحه‌های ۸۱۹ تا ۸۲۷ مقاله اصیل

بررسی هورمون‌ها و بیان ژن کلاسترین در بیماران آزواسپرم غیرانسدادی

آذر مردی ممقانی[۱]
سید جلیل حسینی[۲*]
الهام مسلمی[۱]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران.
۲- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولیدمثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه آندرولوژی، تهران، ایران.

[*] نویسنده مسئول: تهران، خیابان بنی‌هاشم، میدان بنی‌هاشم، خیابان حافظ، پژوهشگاه رویان.
تلفن: ۰۲۱-۲۳۵۶۲۰۰۰
E-mail: jhosseinee@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۱۵ ویرایش: ۱۳۹۶/۰۷/۲۲ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۰۱ آنلاین: ۱۳۹۶/۱۱/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: هر گونه نقص در روند فرآیند اسپرماتوژنز می‌تواند موجب ایجاد نوعی از اختلالات ناباروری مردان به‌نام آزواسپرم غیرانسدادی شود. بررسی فاکتورهای درگیر در روند اسپرماتوژنز از جمله هورمون‌ها و ژن‌ها می‌تواند به درک مکانیسم ناباروری مردان کمک کند. هدف از انجام مطالعه بررسی بیان ژن کلاسترین در بافت بیضه بیماران آزواسپرمی غیرانسدادی می‌باشد. افزون‌براین میزان هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون نیز در خون این بیماران بررسی شد.

روش بررسی: این یک مطالعه توصیفی شامل ۴۲ مرد آزواسپرم غیرانسدادی می‌باشد که در پژوهشگاه رویان از خرداد تا اسفند ۱۳۹۵ انجام گردید. این بیماران بر اساس نتایج حاصل از نمونه‌برداری بافت بیضه، به دو گروه +TESE (دارای اسپرم) و -TESE تقسیم‌بندی شدند. نمونه خون پیش از جراحی TESE از بیماران گردآوری و اندازه‌گیری میزان هورمون‌ها با تکنیک الایزا انجام گردید. RNA ژنومی از نمونه‌های بافت بیضه استخراج و تبدیل به cDNA شده و با تکنیک Rael-time PCR بیان ژن بررسی گردید.

یافته‌ها: بر اساس نتایج کمی به‌دست‌آمده از بررسی میزان بیان ژن کلاسترین، این ژن در گروه +TESE نسبت به گروه -TESE بیان بالاتری داشت و این تفاوت از نظر آماری معنادار بود (P=۰/۰۳۵). میانگین هورمون‌های FSH و LH در گروه +TESE به‌صورت نسبی پایین‌تر از گروه -TESE بود (P=۰/۰۷ و P=۰/۰۸). میانگین هورمون تستوسترون در بین دو گروه تفاوت معناداری نداشت (P=۰/٦٦).

نتیجه‌گیری: میزان بیان ژن کلاسترین در گروه +TESE نسبت به گروه -TESE بالاتر است. به‌دلیل اینکه بیماران +TESE دارای اسپرم در بافت بیضه خود می‌باشند می‌توان نتیجه گرفت که این ژن ممکن است در فرآیند اسپرماتوژنز نقش داشته باشد.

کلمات کلیدی: آزواسپرم، کلاسترین، الایزا، بیان ژن، گنادوتروپین‌ها، ناباروری مردان.

مقدمه

ناباروری یکی از مشکلات شایع و رو به افزایش در جهان است که به عدم توانایی زوج‌ها در دستیابی به بارداری موفقیت‌آمیز پس از یک سال آمیزش جنسی بدون جلوگیری گفته می‌شود و در حدود ۱۵٪ از زوج‌ها درگیر آن می‌باشند.[۱] علل ناباروری می‌تواند در ارتباط با فاکتورهای زنانه، مردانه و یا هر دو باشد که حدود نیمی از علل ناباروری مربوط به فاکتورهای مردانه است. ناباروری در مردان را می‌توان به‌صورت یک سندرم چند عاملی تعریف کرد که طیف وسیعی از اختلالات را در بر می‌گیرد و نتیجه‌ی تمامی آن‌ها به‌صورت عدم توانایی مرد در انتقال ماده‌ی وراثتی‌اش به نسل بعد ظهور می‌یابد. مردان نابارور قادر به باروری یک زن سالم نیستند.[۲]

در کنار سوابق پزشکی و معاینات فیزیکی دقیق، آزمایش آنالیز مایع منی پایه اصلی مطالعات در ناباروری مردان است. مردان نابارور از نظر تعداد، شکل و حرکت طبیعی (ویژگی‌های سلامت) اسپرم به چندین گروه همچون آزواسپرمی طبقه‌بندی می‌شوند. آزواسپرمی به

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-05-10]

حالتی گفته می‌شود که یک فرد فاقد اسپرم در مایع منی باشد. این حالت اغلب با شانس بسیار کم باروری و یا حتی عقیمی همراه است. آزواسپرمی ۱٪ از جمعیت مردان را تحت تاثیر قرار می‌دهد و ممکن است دلیل ۱۵-۱۰٪ از موارد مشاهده‌شده در ناباروری مردان باشد که خود به دو نوع اصلی آزواسپرمی غیرانسدادی و آزواسپرمی انسدادی تقسیم‌بندی می‌شود.[۳]

در آزواسپرم انسدادی فرد دارای اسپرماتوژنز طبیعی می‌باشد اما به‌علت انسداد در مسیر حرکت اسپرم از بیضه تا انزال، هیچ اسپرمی به انزال وارد نمی‌شود، برخلاف آن در آزواسپرمی غیرانسدادی، اسپرمی ساخته نمی‌شود و گمان بر این است که این نوع آزواسپرمی به‌علت نقص در روند اسپرماتوژنز ایجاد می‌شود که می‌تواند بر اثر دلایل متعددی مانند اختلالات کروموزومی، نقص مادرزادی، بیماری‌های عفونی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی و یا به دلایل ناشناخته باشد.[۴] اسپرماتوژنز فرآیند پیچیده‌ای از تمایز و تغییرات سلولی است که از یک سلول بنیادی زایای دیپلوئید (اسپرماتوگونیوم) در نهایت یک گامت نر هاپلوئید حاصل می‌شود که تکوین و بلوغ سلول‌های زایا توسط ۲۳۰۰ ژن تنظیم می‌شود.[۵] بیان ژن‌های دخیل در فرآیند اسپرماتوژنز از جمله بیان ژن VASA، سیکلین و پروتامین توسط مطالعاتی مورد بررسی قرار گرفته است[۶و۷] اما بیان ژن‌های دیگری که ممکن است در فرآیند اسپرماتوژنز نقش داشته باشند مانند ژن کلاستورین (CLU) مورد بررسی قرار نگرفته است. ژن کلاستورین در انسان بر روی کروموزوم هشت و در جایگاه p21 q12 قرار دارد. این ژن شامل ۹ اگزون با اندازه‌های متفاوت ۱۲۶ تا ۴۱۲ جفت باز می‌باشد که در کنار یکدیگر یک گستره‌ی ۱۷۸۷۷ جفت بازی را تشکیل داده‌اند.[۸] مطالعات نشان می‌دهند که ژن کلاستورین نقش مهمی در چندین فرآیند پاتوفیزیولوژیک بدن مانند ترمیم بافت، انتقال لیپید، تولیدمثل و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی دارد و همچنین نقش این ژن در بیماری آلزایمر به‌واسطه تخریب سیستم عصبی مرکزی، بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است.[۹]

با وجود انجام معاینات بالینی، بررسی‌های هورمونی و ژنتیکی که همگی در تشخیص آزواسپرمی غیرانسدادی کمک‌کننده هستند، اما برای اطمینان از انجام فرآیند اسپرماتوژنز و وجود یا عدم وجود اسپرم در داخل بیضه، نمونه‌برداری از بافت بیضه به‌عمل می‌آید.[۲] زوجین به‌طور چشمگیری از این روش درمانی برای حل مشکل ناباروری خود استفاده می‌کنند تا اسپرم یافت‌شده از نمونه‌برداری در میکرواینجکشن استفاده گردد.[۱۰] همچنین هورمون‌ها نیز نقش مهمی در روند اسپرماتوژنز به‌عهده دارند، به‌همین‌منظور پژوهشگران به‌دنبال یافتن ارتباط بین ناباروری مردان و هورمون‌های مربوط به باروری می‌باشند.[۱۱] هدف از انجام مطالعه بررسی بیان ژن کلاستورین در بافت بیضه بیماران آزواسپرمی غیرانسدادی می‌باشد. افزون بر آن میزان هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون نیز در خون این بیماران بررسی شد.

روش بررسی

یکی از مراحل اصلی و شاید اولین قدم در ارزیابی زوجین نابارور بررسی ویژگی‌های مایع منی است. جهت انجام این بررسی روش‌های استانداردی از سوی سازمان بهداشت جهانی ارایه شده است که مورد پذیرش بیشتر مراکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری از جمله پژوهشگاه رویان می‌باشد. به‌همین منظور پژوهش کنونی که یک مطالعه توصیفی می‌باشد، توسط کمیته اخلاق پزشکی رویان با شماره ثبت IR.ACECR.ROYAN.REC.1395.119 تایید شده است و همچنین از تمامی بیماران پیش از عمل بیوپسی بیضه، فرم رضایت‌نامه آگاهانه جهت شرکت در این طرح گرفته شد.

۴۲ مرد نابارور که به‌جهت درمان ناباروری به پژوهشگاه رویان در طی ماه‌های خرداد تا اسفند ۱۳۹۵ مراجعه کرده بودند پس از انجام معاینات فیزیکی و آزمایش آنالیز مایع منی، پس از تشخیص آزواسپرم غیرانسدادی بودن توسط پزشک اورولوژیست وارد مطالعه شدند و به‌جهت آگاهی از وضعیت بالینی و ژنتیکی بیماران، داده‌های مورد نظر از پرونده آن‌ها خوانده شد. افرادی که دارای معیارهای ورود و خروج از مطالعه بودند، به مطالعه وارد و یا از آن خارج شدند. معیارهای ورود به مطالعه شامل دارا بودن کاریوتایپ طبیعی، عدم وجود هیچ‌گونه حذف در نواحی AZF و عدم مصرف داروهای هورمونی بود و معیارهای خروج از مطالعه شامل انجام جراحی واریکوسلکتومی و عدم فقدان دوطرفه مجاری وازدفران بود. بیماران انتخاب‌شده براساس نظر پزشک اورولوژیست به‌منظور بررسی احتمال حضور اسپرم در بیضه تحت عمل جراحی TESE قرار گرفتند و از بیضه‌ی آن‌ها نمونه‌برداری شد. براساس وجود و عدم وجود اسپرم بیماران به دو گروه ۲۱ نفره +TESE (دارای اسپرم) و -TESE (فاقد اسپرم) تقسیم شدند.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-05-10]

پس از انجام بررسی‌های لازم روی بافت و انجام اقدامات درمانی، باقی‌مانده بافت جهت انجام کارهای تحقیقاتی درون میکرو ویال‌های استریل به آزمایشگاه آندرولوژی پژوهشگاه رویان تحویل داده شدند. نمونه‌ها در تانک نیتروژن مایع در دمای ۱۹۶ °C– تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند. در این پژوهش که در پژوهشگاه رویان صورت گرفته است، استخراج mRNA به‌روش ترایزول انجام شد و نمونه‌ها تا زمان ساخت cDNA در فریزر ۸۰ °C– نگهداری شدند. غلظت RNA با استفاده از قرائت جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ nm توسط NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) محاسبه گردید و چنانچه نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ بالای ۱/۸ بود، نمونه‌ها برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفتند. سنتز cDNA از روی RNA با استفاده از cDNA Synthesis Kit (Takara Bio, Otsu, Japan) انجام شد.

طراحی آغازگر برای کمیت‌سنجی با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای نواحی ژنومی موردنظر، توسط PerlPrimer, version 1.1.20 (http://perlprimer.sourceforge.net) صورت گرفت (جدول ۱). پس از انتخاب یک جفت پرایمر مناسب، برای اطمینان از طراحی صحیح آن، پرایمر انتخاب‌شده توسط GeneRunner, version 6.5.47 (Hastings Software, Hudson, NY; http://www.generunner.com) و سایت‌های UCSC و NCBI Blast مورد بررسی قرار گرفت.

برای انجام Real-time PCR از Step-One Plus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) استفاده شد. واکنش‌ها در حجم نهایی ۱۰ µl از SYBR® Green Real-time PCR Master Mixes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) صورت گرفت. برنامه دمایی PCR براساس جدول ۲ انجام شد.

جدول ۱: پرایمر طراحی‌شده برای واکنش Real-time PCR

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول PCR (bp)
CLU-F	CTCTTTGACTCTGATCCCATC	۱۴۳
CLU-R	AAAGCAACATCCACATCTCA	۱۴۳
18S-F	GTAACCCGTTGAACCCCATT	۱۵۱
18S-R	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	۱۵۱

بررسی تغییرات بیان ژن در این پژوهش توسط روش (ΔΔCT آستانه مقایسه‌ای) بود و این نسبت در مقایسه با بیان ژن ۱۸ s انسانی به‌عنوان کنترل داخلی محاسبه گردید. در روش مقایسه نسبی تفاوت نسبی نمونه مورد آزمایش در مقابل نمونه‌ی کنترل با فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام گردید.

برای اندازه‌گیری میزان سرمی هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون، پیش از انجام جراحی TESE نمونه خون از بیماران گرفته شد و بلافاصله سرم به‌وسیله ساتریوفیوژ به‌مدت پنج دقیقه با ۵۰۰۰ × g از خون جدا گردید و تا زمان انجام آزمایش در فریز ۸۰ °C– نگهداری شد. برای ارزیابی هورمون‌های گفته‌شده از کیت‌های الایزا شرکت پیشتاز طب برای اندازه‌گیری هورمون‌های FSH و LH و برای سنجش میزان هورمون تستوسترون از ELISA kits for FSH/LH (Monobind Inc., Lake Forest, CA, USA) استفاده شد. نتایج آن توسط خوانشگر الایزا که نوعی اسپکتروفتومتر تخصصی بوده، خوانده شد.

متغیرهای کمی به‌صورت میانگین± (انحراف‌معیار) و متغیرهای کیفی به‌صورت فراوانی مطلق (فراوانی نسبی) نمایش داده شدند. گروه مورد و کنترل از نظر ویژگی‌های بالینی پایه و جمعیت‌شناختی با استفاده از Chi-square test و Independent t-test مقایسه و ارزیابی شدند و همچنین به‌جهت مقایسه بیان ژن کلاسترین در دو گروه از Independent t-test استفاده گردید. در این مطالعه برای تمامی آزمون‌ها دو دامنه و سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شده و آنالیز داده‌های به‌دست‌آمده توسط SPSS software, version 18 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) انجام گردید.

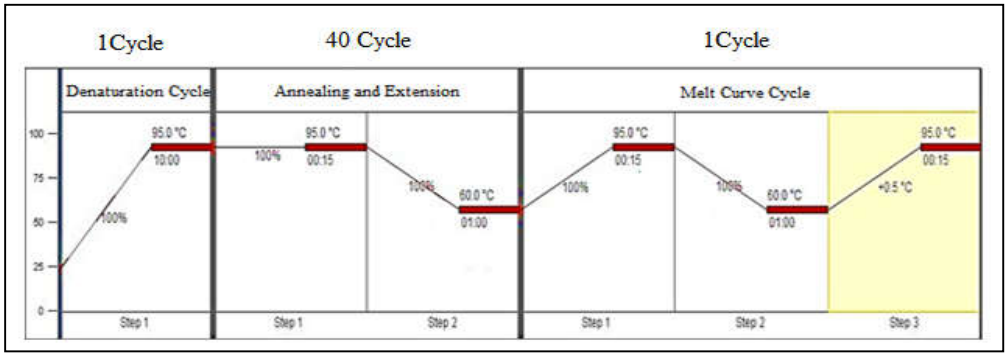
یافته‌ها

در پژوهش کنونی ۴۲ مرد نابارور (دو گروه ۲۱ نفر +TESE و -TESE) مورد بررسی قرار گرفتند. میزان بیان ژن کلاسترین و میزان سرمی هورمون‌های FSH، LH و تستوسترون در دو گروه +TESE و -TESE مورد بررسی قرار گرفت. در یک فرد بالغ طول متوسط بیضه ۴/۶ cm (محدوده ۵/۵–۳/۶)، عرض متوسط آن ۲/۶ cm (محدوده ۳/۲–۲/۱) و حجم متوسط آن ۱۸/۶ cm (۴/۶) است که در این مطالعه تفاوت معناداری بین دو گروه بر اساس ویژگی‌های سایز بیضه وجود نداشت. افزون بر این تفاوت معناداری بین دو گروه در رابطه با اعتیاد به

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-05-10]

سیگار، مواد مخدر و الکل نیز مشاهده نشده است. میانگین سنی گروه +TESE معادل (۵/۶۰)۹۵/۳۲± به‌دست آمد که تفاوت معناداری با گروه بیماران -TESE نداشت (P=۰/۶۳۸) و همچنین ویژگی‌های بالینی پایه و جمعیت‌شناختی دو گروه در جدول ۳ نشان داده شده است. محدوده

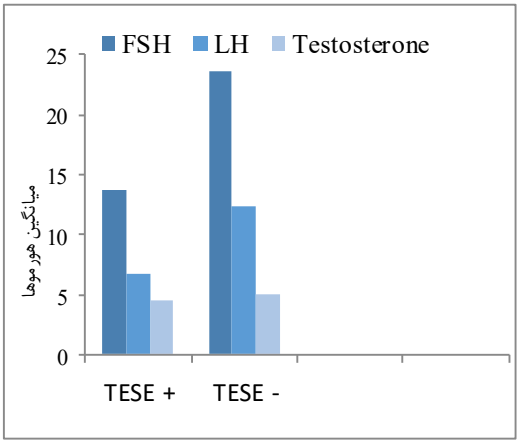
جدول ۲: برنامه‌ی دمایی Real-time PCR



جدول ۳: مقایسه ویژگی‌های بالینی پایه و سطوح هورمونی در گروه‌های مورد مطالعه

ویژگی‌ها	گروه +TESE (n=۲۱)	گروه -TESE (n=۲۱)	P
سن (سال)	۳۲/۹۵ ± (۵/۶۰)	۱۹/۳۲ ± (۴/۷۶)	۰/۶۳۸
هورمون FSH (mIU/ml)	۷۶/۱۳ ± (۱۶/۶۰)	۲۳/۶۱ ± (۱۵/۷۲)	۰/۰۷۰
هورمون LH (mIU/ml)	۷۷/۶ ± (۳/۷۲)	۱۲/۳۶ ± (۱۱/۴۲)	۰/۰۸۰
هورمون تستوسترون (ng/ml)	۴۷/۴ ± (۱/۹۴)	۵/۰۳ ± (۴/۷۲)	۰/۶۶۰
سایز بیضه (cm)			
نرمال	۱۲ (۵۷/۱)	۱۲ (۵۷/۱)	>۰/۹۹
غیرنرمال	۹ (۴۲/۹)	۹ (۴۲/۹)	
سیگار کشیدن			
بله	۵ (۲۳/۸)	۶ (۲۸/۶)	۰/۷۲۶
خیر	۱۶ (۷۶/۲)	۱۵ (۷۱/۴)	
مصرف الکل			
بله	۲ (۹/۵)	۱ (۴/۸)	۰/۵۴۹
خیر	۱۹ (۹۰/۵)	۲۰ (۹۵/۲)	
اعتیاد به مواد مخدر			
بله	۱ (۴/۸)	۱ (۴/۸)	>۰/۹۹
خیر	۲۰ (۹۵/۲)	۲۰ (۹۵/۲)	

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-05-10]

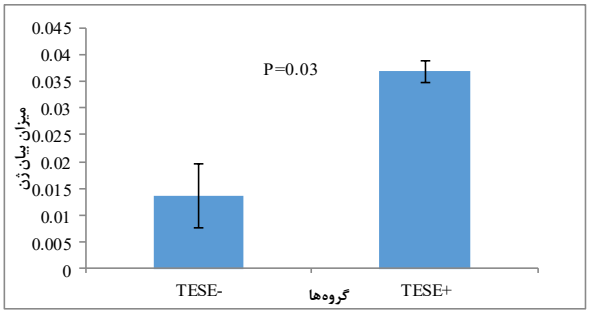


نمودار ۱: میانگین هورمون‌های تستوسترون، LH و FSH

طبیعی هورمون FSH در مردان ۱/۵–۱۲/٤ mIU/ml می‌باشد که میانگین این هورمون در گروه بیماران TESE+ mIU/ml (۱٦/٦۰) ±۱۳/۷٦ و در گروه بیماران TESE- mIU/ml (۱۵/۷۲) ±۲۳/٦۱ می‌باشد. میانگین هورمون FSH، در گروه TESE- به‌مقدار چشمگیری از گروه TESE+ بیشتر بود (P=۰/۰۷). محدوده طبیعی هورمون LH در مردان mIU/ml ۱–۱۰ می‌باشد که میانگین هورمون LH در گروه بیماران TESE+ mIU/ml (۳/۷۲) ±٦/۷۷ و میانگین هورمون LH در گروه بیماران TESE- mIU/ml (۱۱/٤۲) ±۱۲/۳٦ می‌باشد. همچنین میانگین LH نیز در گروه TESE- در مقایسه با گروه TESE+ بالاتر گزارش شد (P=۰/۰۸). محدوده طبیعی هورمون تستوسترون در مردان ng/ml ۲–۸ می‌باشد که میانگین هورمون تستوسترون بیماران گروه TESE+ ng/ml (۱/۹٤) ±٤/٤۷ و در گروه بیماران TESE- ng/ml (٤/۷۲) ±۵/۰۳ می‌باشد. با وجود میزان بالای این هورمون در گروه TESE+، میانگین این هورمون بین دو گروه TESE+ و TESE- تفاوت معناداری مشاهده نشد (P=۰/٦٦۰) (جدول ۳).

نتایج حاصل از آنالیز آماری هورمون‌های سرمی FSH، LH و تستوسترون در نمودار ۱ آورده شده است.

آنالیز منحنی ذوب که یکی از مراحل اصلی در بررسی داده‌های حاصل از Real-time PCR می‌باشد، نمودار قله ذوب ژن کلاسترین نشان‌دهنده تکثیر اختصاصی قطعه موردنظر بود.



نمودار ۲: میزان بیان ژن کلاسترین در بافت بیضه در دو گروه TESE+ و TESE-

نتایج آنالیزهای آماری بیان ژن کلاسترین حاصل از پژوهش کنونی نشان داد که میانگین بیان ژن کلاسترین در گروه TESE+ (۰/۰۲۸) ±۰/۱۳ و در گروه TESE- (۰/۰۹۱) ±۰/۰۳٦ بود. میزان بیان این ژن در گروه TESE+ به‌طور معناداری از گروه TESE- بیشتر بود (P=۰/۰۳۲). مقایسه بیان ژن کلاسترین در بافت بیضه در دو گروه در نمودار ۲ نشان داده شده است.

بحث

در زمینه ارتباط بیان ژن و پروتیین کلاسترین و روند اسپرماتوژنز و استحصال اسپرم در بافت بیضه مردان آزواسپرم در انسان مطالعات گسترده‌ای صورت نگرفته است و تنها مطالعه انجام‌شده در ارتباط با بیان پروتیین کلاسترین و انجام فرآیند اسپرماتوژنز در بافت بیضه توسط Fukuda و همکاران صورت گرفته است.[۱۲] نتایج حاصل از بررسی بیان پروتیین کلاسترین با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی در بافت بیضه ۲۸ مرد دارای آزواسپرمی غیرانسدادی که تحت عمل جراحی TESE قرار گرفته بودند، نشان داد که ارتباط معناداری بین وجود اسپرم و بیان پروتیین کلاسترین در بافت بیضه وجود دارد، به‌این‌صورت‌که سطح بیان پروتیین کلاسترین در افراد TESE+ (۹ نفر)، به‌طور چشمگیری بیشتر از افرادی بود که نتیجه جراحی آن‌ها منفی گزارش شده بود. در پژوهش کنونی برای سنجش میزان بیان ژن کلاسترین در بافت بیضه مردان آزواسپرم غیرانسدادی از تکنیک کمی Real-time PCR استفاده شد و مشاهده گردید که بیان ژن کلاسترین در افرادی که

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-05-10]

در بافت بیضه آن‌ها اسپرم دیده شده بود، به‌طور معناداری نسبت به افرادی که اسپرمی در بافت بیضه خود نداشتند، بالاتر می‌باشد. همچنین در مطالعه Fukuda و همکاران میزان پروتیین کلاسترین موجود در مایع منی ۸۹ مرد نابارور نیز با تکنیک الایزا سنجیده شده بود، که براساس نتایج حاصل میزان پروتیین کلاسترین در مایع منی مردان آزواسپرمی غیرانسدادی از دو گروه مردان الیگواسپرم و مردان نابارور با اسپرم طبیعی کمتر گزارش گردیده و بین بیان پروتیین کلاسترین در بافت بیضه و میزان پروتیین کلاسترین در مایع منی ارتباط معناداری مشاهده شده است.[۱۲] باوجودی‌که در پژوهش کنونی میزان بیان ژن بررسی گردیده، افزایش بیان ژن کلاسترین در بافت بیضه افراد +TESE در مقایسه با افراد -TESE موید اثر ژن کلاسترین بر روند اسپرماتوژنز است و همسو با نتایج پژوهش گفته‌شده می‌باشد. اما گفتنی است که بررسی بیان پروتیین و اندازه‌گیری آن در مایع منی این بیماران برای دست یافتن به نتایج بهتر، ضروری است.

Goulis و همکاران، میزان هورمون‌های FSH، Inhibin B و AMH را در سرم خون ۵۱ بیمار نابارور آزواسپرم غیرانسدادی مورد بررسی قرار دادند که افزایش میزان هورمون FSH و کاهش هر دو هورمون Inhibin B و AMH را در گروه مردان آزواسپرم نسبت به گروه کنترل مشاهده نمودند.[۱۳] این موضوع گویای این است که هورمون‌های Inhibin B و AMH به‌صورت ترکیبی و یا به‌تنهایی در مقابل قدرت پیشگویی یافت اسپرم توسط هورمون FSH، قابل اطمینان نمی‌باشند.[۱۳] در یک مطالعه‌ی گذشته‌نگر بر روی ۲۷۱ مرد نابارور آزواسپرم غیرانسدادی که توسط Guler و همکاران صورت گرفت مشخص شد که میزان سرمی هورمون FSH با وجود اسپرم در بیضه رابطه عکس دارد.[۱٤]

نتایج این مطالعات از نظر هورمون FSH و ارتباط آن با اسپرماتوژنز و وجود و عدم وجود اسپرم در بافت بیضه با نتیجه حاصل از پژوهش کنونی هم‌خوانی دارد. البته Mitchell و همکاران میزان هورمون FSH و Inhibin B را بر روی ۸۷ مرد آزواسپرم مورد بررسی قرار دادند و مشاهده نمودند که نرخ بارداری در گروه با افراد دارای سطح هورمونی FSH ۵۰۰۰–۱۰۰۰۰ mIU/L نسبت به گروه دارای سطح هورمونی FSH ۲۰۰۰–۵۰۰۰ mIU/L به‌طور معناداری کمتر بود.[۱۵] آن‌ها به این نتیجه رسیدند که سطح سرمی هورمون FSH نمی‌تواند به‌عنوان یک نشانگر برای بازیابی اسپرم به‌کارگیری شود اما سطح سرمی Inhibin B در کنار دیگر معاینات بدنی و ارزیابی دیگر فاکتورها توسط پزشک معالج می‌تواند به‌عنوان مقیاسی برای پیش‌بینی بازیابی اسپرم به‌شمار بیاید که هم‌سو با نتایج پژوهش کنونی نمی‌باشد.

بررسی تاثیر میزان سرمی هورمون‌های FSH و Inhibin B در مردان آزواسپرم غیرانسدادی به‌منظور پیشگویی یافت اسپرم در بافت بیضه در حین جراحی TESE، توسط Bohring و همکاران انجام گرفته است که براساس فرضیات در مواردی که میزان سرمی هورمون FSH بالاتر از ۱۰ mIU/mL و میزان سرمی هورمون Inhibin B پایین‌تر از ۵۸ pg/mL باشد احتمال دیده شدن اسپرم در بافت بیضه پایین است اما در پنج بیمار از ۳۰ مرد نابارور دارای آزواسپرمی غیرانسدادی حاضر در مطالعه گفته‌شده که دارای این شرایط بودند، اسپرم در بافت بیضه یافت شد.[۱٦] اما در یک بیمار که میزان هر دو هورمون در بازه نرمال قرار داشت هیچ اسپرمی مشاهده نگردید.[۱٦] نتایج گویای این موضوع است که تصمیم‌گیری بر انجام و یا عدم انجام جراحی TESE بر اساس میزان سرمی هورمون سرم خونی بیماران نابارور روش قابل اعتمادی نخواهد بود و ممکن است پیشگویی بر اساس این دو هورمون اشتباه باشد. این در حالی است که برخی از پژوهشگران افزایش سطح هورمون FSH را ناشی از عدم وجود اسپرم در بیضه دانسته و جراحی بیوپسی از بافت بیضه به‌دنبال یافتن اسپرم در بافت بیضه را غیرضروری می‌دانند.

میزان بالای سرمی هورمون FSH در همه موارد گویای عدم وجود اسپرم در بافت بیضه نمی‌باشد، زیرا در برخی موارد بخشی از بیضه سالم بوده و روند اسپرماتوژنز به‌صورت طبیعی در آن بخش از بیضه در حال انجام می‌باشد. در همین راستا مطالعاتی توسط پژوهشگران انجام شده است که از آن جمله می‌توان به مطالعه Seo و همکاران اشاره کرد که در آن در بیش از ۵۰٪ موارد آزواسپرم غیرانسدادی بدون توجه به‌میزان سطح هورمون FSH و اندازه بیضه، می‌توان اسپرم زنده را از بافت بیضه استخراج نمود.[۱۷] همچنین در مطالعه دیگری که توسط Gilbaugh و همکاران انجام شد گزارش گردید که ٤۸٪ از بیماران آزواسپرم با غلظت بیش از ۳۰ mIU/ml FSH دارای اسپرم زنده در بیوپسی بیضه بوده‌اند.[۱۸]

بررسی‌های انجام‌شده در پژوهش کنونی روی دو گروه آزواسپرم +TESE و -TESE نیز نشان داد که سطح هورمون FSH در مردان +TESE نسبت به افراد -TESE بالاتر است. بنابراین می‌توان به وجود یک رابطه معکوس بین میزان هورمون FSH و حضور اسپرم در بافت

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-05-10]

بیضه اشاره کرد. بر اساس محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گنادی و عوامل مداخله‌کننده در آن این افزایش سطح هورمونی ممکن است به‌علت کاهش Inhibin B و یا افزایش Activin اثرکننده بر هیپوفیز باشد. همچنین برخی از مطالعات نشان داده‌اند که میزان بالای هورمون‌های سرمی FSH و LH و میزان پایین آن‌ها با میزان شاخص شکست DNA اسپرم ارتباط دارد. چنانچه DNA اسپرم دچار نقص باشد اسپرم بالغ تولید نمی‌شود و در نتیجه فرآیند اسپرم‌زایی با اختلال مواجه می‌شود و فرد دچار آزواسپرمی غیرانسدادی می‌گردد.[۱۹] نتیجه پژوهش کنونی با نتایج حاصل از مطالعه Wdowiak و همکاران که در آن نشان دادند در گروه +TESE میزان سرمی هورمون FSH نسبت به گروه -TESE پایین‌تر بود نیز همخوانی دارد.[۱۹] بدین‌صورت DNA اسپرم در گروه +TESE کمتر دچار نقص و شکست خواهد شد و اسپرم مراحل بلوغ خود را به اتمام می‌رساند.

به‌منظور یافتن عوامل تاثیرگذار بر وجود و یا عدم وجود اسپرم در بافت بیضه، Ezeh و همکاران، مطالعه‌ای با جامعه آماری متشکل از ٤٠ مرد آزواسپرم غیرانسدادی که کاندید استفاده از روش کمک باروری ICSI بودند، را انجام دادند.[۲۰] این گروه با بررسی هورمون‌های FSH، LH و تستوسترون ارتباط معناداری بین یافت اسپرم و میزان سرمی هورمون‌های FSH، LH و تستوسترون مشاهده نکردند. در این مطالعه در بافت بیضه پنج نفر از ٤٠ بیمار که دارای میزان بالای FSH سرمی بودند، در حین عمل TESE اسپرم یافت شد. با وجود اینکه میزان بالای FSH سرمی احتمال امکان یافت اسپرم در بافت بیضه را کاهش می‌دهد اما نمی‌تواند مقیاس مناسبی برای پیشگویی وجود و یا عدم وجود اسپرم در بافت بیضه باشد. در این پژوهش نیز افزون بر میزان سرمی هورمون FSH، میزان سرمی هورمون‌های LH و تستوسترون نیز اندازه‌گیری گردیده که نتایج معناداری بین میزان سرمی هورمون‌های LH و تستوسترون در بین دو گروه مورد مطالعه مشاهده نشد که این نتیجه مطابق با دیگر مطالعات می‌باشد.[۲۰]

همچنین در مطالعه‌ای که توسط Althakafi و همکاران بر روی ارتباط نتایج حاصل از عمل micro TESE و سطح سرمی هورمون تستوسترون در مردان آزواسپرم غیرانسدادی انجام شد، مشاهده گردید که بین سطح سرمی هورمون تستوسترون و وجود و عدم وجود اسپرم در بافت بیضه مردان آزواسپرم غیرانسدادی ارتباط معناداری وجود ندارد.[۲۱]

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش کنونی که گویای کاهش بیان ژن کلاسترین در مردان نابارور آزواسپرم غیرانسدادی -TESE می‌باشد، می‌توان این‌گونه استدلال نمود که تقسیم سلولی اسپرماتوگونیا می‌تواند وابسته به بیان صحیح این ژن باشد. کاهش بیان این ژن منجر به عدم تقسیم سلولی اسپرماتوگونیا و در نتیجه عدم انجام اسپرماتوژنز به‌طور طبیعی شده و همین امر منجر به عدم مشاهده اسپرم بالغ در بیضه این افراد می‌شود.

وجود هرگونه نقص در سلول‌های سرتولی و در نتیجه اختلال در تولید پروتیین بر روند اسپرماتوژنز تاثیرگذار است. تغییر در فاکتورهای تولیدشده توسط سلول‌های سرتولی در مواردی موجب توقف تولید اسپرم می‌شود که کلاسترین تولیدشده در سلول‌های سرتولی با اثر ضد آپوپتوزی خود از سلول‌های زاینده محافظت می‌کند. ازاین‌رو به‌هنگام کاهش بیان کلاسترین، به‌علت عدم حفاظت از سلول‌های زاینده و مرگ آن‌ها، اسپرمی ساخته نمی‌شود. کاهش بیان کلاسترین در افراد -TESE همچنین می‌تواند به‌علت تغییر در روند بلوغ سلول‌های سرتولی باشد و این تغییر می‌تواند محرک کاهش سلول‌های زاینده و در نهایت عدم اسپرم‌زایی در بالغین شود. پس می‌توان این‌گونه بیان کرد که پروتیین‌های متصل‌شونده به گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول که در بلوغ پس بیضه‌ای اسپرم و نیز در لقاح نقش دارند از طریق وزیکول‌ها و بخش‌های محلول غشایی در سطح اسپرم قرار می‌گیرند. فرم محلول این پروتیین‌ها به‌وسیله کلاسترین از میان محلول آبی بر سطح اسپرم قرار می‌گیرد، ازآنجایی‌که کلاسترین نقش قطعی در این انتقال بر عهده دارد با کاهش بیان آن، روند بلوغ اسپرم مختل می‌گردد و ما شاهد عدم حضور اسپرم در بیضه و مایع منی خواهیم بود.

در رابطه با نقش هورمون‌های مطالعه‌شده در مردان آزواسپرم غیرانسدادی به‌علت کوچک بودن جامعه آماری نمی‌توان با قطعیت نتیجه‌گیری کرد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی میزان کلاسترین در مایع منی و بافت بیضه مردان نابارور مراجعه‌کننده به پژوهشگاه رویان به‌منظور پیشگویی استحصال اسپرم" در مقطع کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق در سال ۱۳۹۵ با کد ۲۸۳۳۰۵۲۲۹٤۲۰۱۲ می‌باشد و همچنین این طرح با همکاری مرکز تحقیقات علوم تولیدمثل پژوهشگاه رویان در سال ۱۳۹۵ و با کد مصوب ۹۵۰۰۰۱۳۸ انجام گردید.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-05-10]

References

1. Hamada A, Esteves SC, Nizza M, Agarwal A. Unexplained male infertility: diagnosis and management. *Int Braz J Urol* 2012;38(5):576-94.
2. Anawalt BD. Approach to male infertility and induction of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(9):3532-42.
3. Verheyen G, Popovic-Todorovic B, Tournaye H. Processing and selection of surgically-retrieved sperm for ICSI: a review. *Basic Clin Androl* 2017;27(1):6.
4. Zhang Y, He X-J, Song B, Ye L, Xie X-S, Ruan J, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the USF1, GTF2A1L and OR2W3 genes with non-obstructive azoospermia in the Chinese population. *J Assist Reprod Genet* 2015;32(1):95-101.
5. Xie C, Chen X, Liu Y, Wu Z, Ping P. Multicenter study of genetic abnormalities associated with severe oligospermia and non-obstructive azoospermia. *J Int Med Res* 2017:300060517718771
6. Haraguchi T, Ishikawa T, Yamaguchi K, Fujisawa M. Cyclin and protamine as prognostic molecular marker for testicular sperm extraction in patients with azoospermia. *Fertil Steril* 2009;91(4 Suppl):1424-6.
7. Ando M, Yamaguchi K, Chiba K, Miyake H, Fujisawa M. Expression of VASA mRNA in testis as a significant predictor of sperm recovery by microdissection testicular sperm extraction in patient with nonobstructive azoospermia. *J Androl* 2012;33(4):711-6.
8. Yu JT, Tan L. The role of clusterin in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis, and therapy. *Mol Neurobiol* 2012;45(2):314-26.
9. Jones SE, Jomary C. Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34(5):427-31.
10. Dohle GR, Elzanaty S, van Casteren NJ. Testicular biopsy: clinical practice and interpretation. *Asian J Androl* 2012;14(1):88-93.
11. Ramaswamy S, Weinbauer GF. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/testosterone. *Spermatogenesis* 2014;4(2):e996025.
12. Fukuda T, Miyake H, Enatsu N, Matsushita K, Fujisawa M. Seminal level of clusterin in infertile men as a significant biomarker reflecting spermatogenesis. *Andrologia*. 2016;48(10):1188-94.
13. Guler I, Erdem M, Erdem A, Demirdağ E, Tunc L, Bozkurt N, et al. Impact of testicular histopathology as a predictor of sperm retrieval and pregnancy outcome in patients with nonobstructive azoospermia: correlation with clinical and hormonal factors. *Andrologia* 2016;48(7):765-73.
14. Goulis DG, Tsametis C, Iliadou PK, Polychronou P, Kantartzi PD, Tarlatzis BC, et al. Serum inhibin B and anti-Müllerian hormone are not superior to follicle-stimulating hormone as predictors of the presence of sperm in testicular fine-needle aspiration in men with azoospermia. *Fertil Steril* 2009;91(4):1279-84.
15. Mitchell V, Robin G, Boitrelle F, Massart P, Marchetti C, Marcelli F, et al. Correlation between testicular sperm extraction outcomes and clinical, endocrine and testicular histology parameters in 120 azoospermic men with normal serum FSH levels. *Int J Androl* 2011;34(4):299-305.
16. Bohring C, Schroeder-Printzen I, Weidner W, Krause W. Serum levels of inhibin B and follicle-stimulating hormone may predict successful sperm retrieval in men with azoospermia who are undergoing testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 2002;78(6):1195-8.
17. Seo JT, Ko WJ. Predictive factors of successful testicular sperm recovery in non-obstructive azoospermia patients. *Int J Androl* 2001;24(5):306-10.
18. Kim ED1, Gilbaugh JH 3rd, Patel VR, Turek PJ, Lipshultz LI. Testis biopsies frequently demonstrate sperm in men with azoospermia and significantly elevated follicle-stimulating hormone levels. *J Urol* 1997;157(1):144-6.
19. Wdowiak A, Raczkiewicz D, Stasiak M, Bojar I. Levels of FSH, LH and testosterone, and sperm DNA fragmentation. *Neuro Endocrinol Lett* 2014;35(1):73-9.
20. Ezeh UI, Moore HD, Cooke ID. Correlation of testicular sperm extraction with morphological, biophysical and endocrine profiles in men with azoospermia due to primary gonadal failure. *Hum Reprod* 1998;13(11):3066-74.
21. Althakafi SA, Mustafa OM, Seyam RM, Al-Hathal N, Kattan S. Serum testosterone levels and other determinants of sperm retrieval in microdissection testicular sperm extraction. *Transl Androl Urol* 2017;6(2):282-7.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-05-10]

TUMJ Tehran University Medical Journal, February 2018; Vol. 75, No. 11: 819-827 Original Article

Hormonal profiling and clusterin gene expression in non-obstructive azoospermic patients

Azar Mardi Mamaghani M.Sc.[1]
Seyed Jalil Hosseini M.D.[2*]
Elham Moslemi Ph.D.[1]

1- Department of Biology, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran, Iran.
2- Department of Andrology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Royan Institute, Hafez St., Bani Hashem Sq., Bani Hashem St., Tehran, Iran.
Tel: +98 21 23562000
E-mail: jhosseinee@gmail.com

Abstract

Received: 07 Oct. 2017 Revised: 14 Oct. 2017 Accepted: 21 Jan. 2018 Available online: 30 Jan. 2018

Background: Infertility is clinically defined as failure of a couple to conceive after one year of regular sexual intercourse and occurs in both males and females for various reasons. About half of the infertility causes is due to male factors such as azoospermia and the lack of sperm in the ejaculate. Azoosperima is divided into two types: Non-obstructive azoospermia (NOA) and obstructive azoospermia (OA). NOA is a type of male infertility caused by spermatogenesis defects. Therefore, investigating the factors involved in spermatogenesis, including hormones and genes, is one of the important aspects in understanding the mechanism of infertility in men. To this end, we aimed to investigate the expression of the clusterin gene expression and LH, FSH and testosterone hormone levels in the testicular tissue and blood of NOA patients, respectively.

Methods: The study population included 42 NOA infertile men referred to Royan Institute, Tehran, Iran in June 2016 to February 2017. Their blood samples were collected and testosterone, LH and FSH hormones were measured by ELISA. Afterwards, based on the biopsy results the patients were categorized into TESE+ (positive sperm retrieval) and TESE- groups. The genomic RNA was extracted from testicular tissue samples obtained from TESE surgery. After converting to cDNA, the clusterin gene expression was investigated by Real-time PCR technique. The achieved data was analyzed using SPSS software, version 18 (Armonk, NY, USA).

Results: According to Real-time PCR results, the expression level of clusterin gene in TESE+ group was significantly higher than TESE- group (P= 0.035). The mean of FSH and LH hormone levels in the TESE+ group was relatively lower than the TESE- group (P= 0.07 and P= 0.08), but there was no significant difference in the mean of testosterone hormone levels between the two groups (P= 0.66).

Conclusion: Based on the results of this study, the clusterin gene can have a role in spermatogenesis and by evaluating FSH and LH hormones in a larger non-obstructive azoospermic patient's population significant statistical results can be achieved.

Keywords: azoospermia, clusterin, enzyme-linked immunosorbent assay, gene expression, gonadotropins, male infertility.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-05-10]