بررسی و بیان ژن CatSper در بیضه موش در سنین مختلف رشد

پروانه نیک پور M.Sc.☆، سیدجواد مولی Ph.D.☆♦، منصوره موحدین Ph.D.★

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

★ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

♦آدرس مکاتبه: تهران، صندوق‌پستی ۱۷۵-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

چکیده

* **هدف:** بررسی رابطهٔ احتمالی بین بیان ژن CatSper و قدرت باروری در موش با توجه به نقش این ژن در تحرک طبیعی اسپرم

* **مواد و روشها:** Total RNA از بیوپسی بیضه موش در سنین مختلف رشد، استخراج و کمیت و کیفیت RNA استخراج شده به‌کمک اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز تعیین گردید. ژن β2-microglobulin (β2m) به عنوان کنترل داخلی انتخاب و پرایمرهای بالا دست و پایین دست دو ژن β2m و CatSper طراحی و ساخته شدند. پس از انجام واکنش Reverse Transcription (RT) باکمک پرایمر الیگو dT و آنزیم MMLV، واکنش PCR انجام شد. بعد از الکتروفورز محصولات PCR، شدت سیگنال برای هر دو باند β2m و CatSper، سنجیده و نتایج حاصل با آزمونهای کروسکال-والیس و LSD آنالیز شد.

* **یافته‌ها:** نتایج حاصل از سه تکرار برای هر گروه سنی نشان داد که ژن CatSper در گروههای سنی یک روزه، یک هفته و دو هفته (قبل از بلوغ) بیان نمی‌شود. اما با شروع هفته سوم، بیان ژن CatSper آغاز می‌شود. هر چند با افزایش سن، افزایش بیان ژن برای گروههای مسن‌تر مشاهده شد، اما آنالیز آماری اختلاف معناداری را بین بیان ژن در گروههای سنی سه هفته تا چهار ماهگی نشان نداد ($P=0.59$).

* **نتیجه گیری:** نتایج حاصله ضمن تأیید نتایج قبلی مبنی بر ارتباط ژن CatSper با قدرت باروری در موش، ارتباط بین بیان ژن فوق و بلوغ جنسی موش را نیز نشان می‌دهد.

کل واژگان: تحرک اسپرم، بیضه، باروری، RT-PCR، CatSper

مقدمه

تولید مثل جنسی تقریباً در تمامی موجودات یوکاریوتیک به وقوع می‌پیوندد. در این فرآیند دو گامتهاپلوئید نر و ماده در طی عمل لقاح (Fertilization) با هم ادغام شده تا یک سلول تخم دیپلوئیدی را به وجود آورند. بررسی فرآیند لقاح در جانوران بیش از یک قرن قدمت دارد با این وجود ابعاد مختلف آن هنوز به درستی شناخته نشده است (۱، ۲، ۳). در طی دو دهه اخیر کوششهای زیادی به منظور شناخت اساس مولکولی لقاح به عمل آمده است. اطلاعات به دست آمده در این زمینه حاکی از وجود تنوع و پیچیدگی ساختاری و عملکردی فراوان پروتئینهای درگیر در این فرآیند است (۴، ۵). همچنین نتایج حاصل از این بررسیها افق تازه‌ای در درمان ناباروری و کنترل بی‌خطر باروری ناخواسته گشوده است.

در کلیه پستانداران، اسپرم برای انجام عمل لقاح مسافت زیادی را طی می‌کند تا به تخمک برسد. مجاری تناسلی ماده، دارای یک سری موانع طبیعی برای ورود میلیونها اسپرم رها شده در این مجاری است و تحرک اسپرم برای نفوذ به موکوسهای سرویکس، حرکت در مجاری تناسلی ماده و نفوذ به اووسیت ضروری است (۶). به مجرد رسیدن به سطح تخمک، اسپرم به کمک حرکات مکانیکی و نیز ترشح مواد اسیدی (در طی واکنش آکروزومی) از میان لایه خارجی احاطه کننده تخمک (Zona Pellucida) عبور کرده، غشاء آن با غشاء تخمک ادغام شده و فرآیند باروری تخمک آغاز می‌شود (۲، ۳). بر خلاف گونه‌های پست، اسپرماتوزوآی پستانداران بلافاصله بعد از ترک بیضه، هر چند از دید مورفولوژیکی بالغ به نظر می‌رسد اما قادر به انجام حرکات پیش‌رونده نبوده و توانایی اندکی جهت باروری تخمک دارد (۷). حرکت پیش‌رونده اسپرم پس از عبور از اپیدیدیم و توانایی باروری آن نیز پس از استقرار در سیستم تناسلی ماده تحت فرآیند ظرفیت پذیری (Capacitation) حاصل می‌شود (۱، ۷، ۸). در این مسیر اسپرمها توانایی انجام واکنش آکروزومی راکسب کرده و حرکت آنها وارد مرحله Hyper-activation می‌شود. این مراحل با تغییراتی در غلظت یونهای درون سلولی، سیالیت غشاء، متابولیسم و تحرک اسپرم همراه است (۹، ۱۰).

امروزه مشخص شده است که در مراحل مختلف لقاح و به ویژه در تحرک اسپرم، یون کلسیم و نوکلئوتیدیهای حلقوی نقشی حیاتی دارند (۱۱). به طوری که افزایش غلظت یون کلسیم درون سلولی سبب تغییر تحرک اسپرم می‌شود (۱۲، ۱۳، ۱۴).

اخیراً در بررسی کانالهای کلسیمی مستقر در اسپرم، ژن جدیدی کلون و شناسایی شد که یک کانال کلسیمی منحصر به فرد را در اسپرم کد می‌کند. کانال فوق (CatSper) تک واحدی با شش تکرار بین غشایی است که ناحیه منفذ و همولوژی کلی آن، به کانالهای کلسیمی بزرگتر چهار واحدی شبیه است. همچنین کانال فوق تنها در بیضه (و نه در بافتهای دیگر) بیان می‌شود. ژن مذکور در انسان و موش همولوژی بالایی را نشان می‌دهد (۱۵). حذف (ناک اوت) ژن CatSper در موش مشخص کرد که حضور این کانال برای قدرت باروری در موشهای نر، تحرک طبیعی اسپرم و نفوذ آن به تخمک و نیز برای ورود یون کلسیم با واسطه نوکلئوتیدهای حلقوی ضروری است. موشهای فوق کاملاً عقیم بوده با این حال فیزیولوژی تولید مثل و سایر رفتارهای آنها، کاملاً شبیه موشهای وحشی (wild-type) بوده و هیچ گونه اثرات جانبی دیگری غیر از عدم تحرک اسپرم و ناباروری در آنها دیده نشد (۱۵). این ویژگیها، CatSper را به عنوان هدفی ایده‌آل برای ابداع داروهای ضد باروری در زن و مرد، با حداقل اثرات جانبی و نیز هدفی مناسب برای بررسی بیان و ساختار این ژن در مردان نابارور و نهایتاً یافتن یک روش درمانی مناسب برای این بیماران مطرح می‌سازد.

لذا این تحقیق جهت بررسی نقش بیان ژن CatSper در بیضه موش درگروههای سنی مختلف، به منظور فهم پروفیل بیان ژن CatSper در حین تکوین بیضه موش طراحی و اجرا شد.

مواد و روشها

* حیوان آزمایشگاهی

موشهای نر نژاد Balb/c از انستیتو رازی خریداری و تحت شرایط استاندارد از نظر آب و غذا و دیگر شرایط محیطی نگهداری شدند. در این پژوهش موشها در گروههای سنی یک روزه، یک هفته، دو هفته، سه هفته، یک ماهه، دو ماهه، سه ماهه و چهار ماهه و از هر گروه سنی تعداد سه سر موش مورد بررسی قرار گرفتند.

* بیوپسی بیضه

موشها را به روش در رفتگی مهره‌های گردن (dislocation Cervical) کشته و بعد از باز کردن حفره شکمی، هر دو بیضه را خارج نموده و یکی از آنها در میکروتیوپی استریل و RNase-free قرار داده و بعد از فریز کردن در نیتروژن مایع، تا مرحله استخراج در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. بیضه دوم به منظور بررسیهای هیستولوژیکی در فیکساتیو بوئن قرار داده شد.

* بررسی هیستولوژیکی

از نمونه‌هایی که در فیکساتیو قرار داده شده بودند مقاطع بافتی با ضخامت 5μm تهیه و پس از رنگ آمیزی به روش روتین هماتوکسیلین - ائوزین، مراحل اسپرماتوژنز با میکروسکوپ نوری بررسی شد.

* آنالیز اسپرم موش

در گروههای سنی دو تا چهار ماهه ناحیه انتهایی هر دو اپیدیدیم جداگردید و در ۱ میلی‌لیتر محیط T6 به علاوه ۱۰ درصد آلبومین سرم انسانی گذاشته شد و به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و غلظت ۵ درصد Co2 انکوبه شد. آنالیز اسپرم طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی برای آنالیز مایع منی انسان انجام گرفت (۱۶).

* استخراج RNA کل (Total RNA) از بافت بیضه

RNA کل با استفاده از محلول RNX plus (سیناژن) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج گردید. به طور خلاصه پس از هموژنیزه کردن بافت در نیتروژن مایع و افزودن ۱ میلی‌لیتر محلول RNX plus و ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم (MERCK) به مخلوط فوق اضافه شد. بعد از ۳-۲ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و دور g۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد و پس از انتقال فاز رویی به یک میکروتیوپ دیگر و افزودن ایزوپروپانل (MERCK) هم حجم آن، ۱۵ دقیقه در یخ انکوبه و سپس ۱۰ دقیقه با همان شرایط قبلی سانتریفوژ شد. به رسوب فوق یک میلی‌لیتر اتانل ۷۵ درصد اضافه و پس از ورتکس کردن، به مدت ۵ دقیقه در دور g۷۵۰۰ سانتریفوژ شد. رسوب به دست آمده در ۵۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC (۰/۰۱ درصد) (Sigma) حل شد و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

* بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده

غلظت ۱درصد از RNA تهیه شد و جذب نوری آن در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به دست آمد و غلظت RNA بر حسب $\mu g/\mu l$ به کمک رابطه زیر محاسبه شد:

[RNA] = A260 x dilution x 40/1000

نسبت A260/A280 نیز به منظور تعیین درجه خلوص RNA محاسبه شد.

ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیدیم برماید با غلظت ۰/۵ میکرو گرم در میلی‌لیتر با بافر TBE تهیه شد و در هر چاهک ۵ میکرولیتر از نمونه به علاوه ۲ میکرولیتر بافر Loading (برموفنل بلو ۰/۲۵ درصد، زیلن سیانول ۰/۲۵ درصد و گلیسرول ۳۰ درصد) ریخته شد و به مدت ۱ ساعت و با ولتاژ ۷۰-۶۰ ولت الکتروفورز گردید و سپس در زیر نور U.V. بررسی و عکسبرداری شد. از مارکر 1 kb ladder (Roche) نیز به منظور تخمین اندازه باندهای مورد نظر استفاده شد.

* پرایمرها

توالی ژنهای β2-microglobulin (β2m) و CatSper موش به ترتیب با شماره‌های دستیابی (Accession Number) X01838 و AF407332 از سایت NCBI به دست آمد (۱۷). همچنین اطلاعات مورد نیاز در مورد محل دقیق اینترونها و اگزونهای ژن β2m با شماره دستیابی AY057800 از سایت فوق استخراج شد. پرایمر بالا دست و پایین دست (Forward & Reverse) ژن β2m به ترتیب بر روی اگزونهای ۱ (از نوکلئوتید ۹۶ تا ۱۱۵) و ۳ (از نوکلئوتید ۳۹۱ تا ۴۱۱) و به کمک نرم‌افزار Gene Runne (نگارش، ۳/۰۲ کمپانی Hastings software) به صورت زیر طراحی شدند:

5'TGACCGGCTTGTATGCTATC 3' پرایمربالادست ژن β2m

5'CACATGTCTCGATCCCAGTAG 3' پرایمر پایین دست ژن β2m

با توجه به جدید بودن کشف ژن CatSper و فقدان اطلاعات مربوط به موقعیت و تعداد اگزون و اینترونهای آن، با استفاده از نرم‌افزار Blast (۱۷) محل فرضی اگزونها مشخص گردید و پرایمر بالا دست و پایین دست ژن CatSper به ترتیب روی اگزونهای فرضی ۲ (از نوکلئوتید ۹۵۹ تا ۹۷۸) و ۶ (از نوکلئوتید ۱۵۰۴ تا ۱۵۲۴) به صورت زیر طراحی شدند:

5'CACACACCGGGAATATCTTC 3' پرایمر بالا دست ژن CatSper

5'TCGGAGAACCACAGAGAAGAG3' پرایمر پایین دست ژن CatSper

پرایمرهای فوق و نیز پرایمر oligo dT با طول ۱۸ نوکلئوتید توسط شرکت MWG آلمان و با درجه خلوص HPSF ساخته شدند.

* واکنش RT (Reverse Transcription)

۱ میکروگرم از RNA به دست آمده از بیوپسی بیضه با آب به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد در دستگاه ترمال سایکلر (Techne) انکوبه شد و پس از انتقال بر روی یخ، بافر تکثیر ۵X (Gibco): ۴ میکرو لیتر، مخلوط dNTP (۲۰mM) (Gibco)، الیگو dT (۰/۵ میکرو گرم)، RNasin (۲۰U/ml) (Fermentas)، MgCl2 (۵۰ mM) (سیناژن) و آنزیم MMLV (۲۰۰U/ml) (Gibco) هر کدام ۱ میکرو لیتر اضافه و حجم نهایی با آب به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد و ابتدا به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. محصول واکنش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد (۱۸).

* واکنش PCR (Polymerase Chain Reaction)

به ۵ میکرولیتر از محصول واکنش RT، بافر تکثیر ۱۰X (Roche): ۵ میکرولیتر، مخلوط dNTP (۲۰mM) (Gibco): ۱ میکرو لیتر، آنزیم Taq Polymerase (Roche): ۱/۲۵ واحد و آب تا حجم ۳۰ میکرو لیتر اضافه شد وتیوپها به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد در دستگاه ترمال سایکلر انکوبه شدند و سپس مخلوط پرایمرها (بالا دست و پایین دست) (۲۰mM) هرکدام ۲/۵ میکرولیتر و ۱۵ میکرولیتر آب اضافه شد و ۳۰-۲۵ سیکل به صورت Denaturation (۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه) Annealing (۵۸/۵ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه) و Extention (۷۲ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه) در دستگاه ترمال سایکلر اجرا شد. همچنین در انتهای واکنش، یک سیکل Extention نهایی (۷۲ درجه سانتیگراد) به مدت ۵ دقیقه اجرا و محصول PCR با الکتروفورز ژل ۱/۵ درصد بررسی شد (۱۸).

* آنالیز آماری

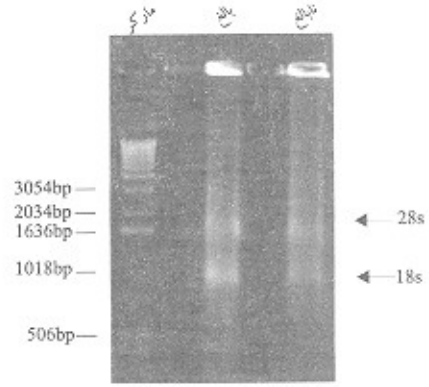
محصول PCR تحت تابش نور U.V. و به واسطه حضور اتیدیم بروماید در ژل آگاروز رؤیت و از آن عکسبرداری شد. شدت سیگنالهای هر باند به کمک نرم‌افزار Labimage (نگارش ۲/۶،

کمپانی Kapelan GmbH) سنجیده شد و نتایج حاصله از ۳ تکرار برای هر گروه سنی با آزمونهای کروسکال-والیس و LSD آنالیز آماری شد.

یافته‌ها

* بهینه سازی واکنش PCR

برای بهینه سازی شرایط واکنش PCR و انتخاب تعداد سیکل مناسب (وجود سیگنال قابل رؤیت قبل از وارد شدن واکنش PCR به فاز پلاتو (plateau) (Total RNA) حاصل ازبیوپسی بیضه موش در شرایط RNase-free تهیه و کیفیت و کمیت RNA به دست آمده به کمک اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد (شکل ۱). در بررسی ژل دو باند ۱۸S و ۲۸S RNA ریبوزومی (rRNA) به وضوح قابل رؤیت است که مؤید عدم تجزیه (degradation) RNA است. همچنین نسبت به دست آمده A260/A280 بین ۱/۸ و ۲ نشان دهنده درجه بالای خلوص RNA و نیز عدم آغشتگی آن با پروتئین و DNA ژنومی است.

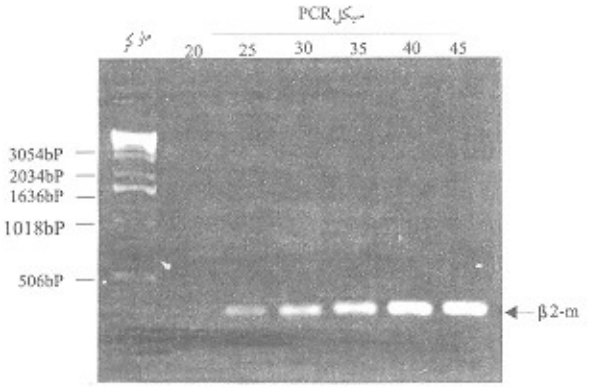


شکل ۱: بررسی کیفی RNA استخراج شده از بافت بیضه موش با محلول RNX plus با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد

در دومین مرحله از پروژه، برای انتخاب تعداد سیکل مناسب که هنوز واکنش PCR وارد فاز پلاتو نشده باشد، برای هر ژن، ۶ تیوپ همسان حاوی مخلوط PCR تهیه شد و از سیکل بیستم تا چهل و پنجم، به ازاء هر ۵ سیکل، یک تیوپ از دستگاه خارج و محصول PCR با ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. باندهای حاصل متناسب با اندازه قطعه طراحی شده برای β2m (۳۱۵ bp) است و شدت سیگنال به دست آمده یک افزایش نسبتاً خطی در راستای افزایش تعداد سیکل PCR را نشان می‌دهد (شکل ۲). این نتیجه بیانگر آن است که عامل یا عوامل محدود کننده‌ای در محتویات موجود در واکنش PCR به ویژه در سیکلهای پایین‌تر وجود ندارد. نتایج مشابهی برای تعیین تعداد سیکل مناسب واکنش PCR برای ژن CatSper به دست آمد (نتیجه نشان داده نشده است). برای ادامه تحقیق از تعداد سیکلهای ۳۰-۲۵ بسته به موقعیت استفاده شد.

* مشخص کردن زمان بیان ژن CatSper در بیضه موش

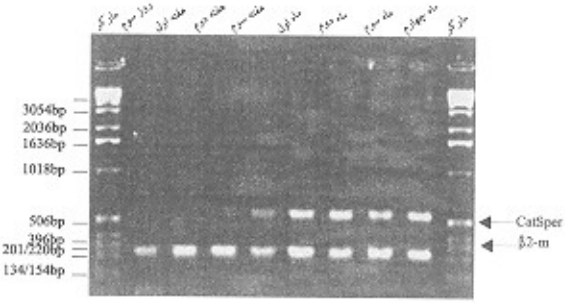
به منظور بررسی پروفیل بیان ژن CatSper در سنین مختلف رشد، بیوپسی بیضه از سنین مختلف موش (یک روزه، یک هفته، دو هفته، سه هفته، یک ماهه، دو ماهه، سه ماهه و چهار ماهه) تهیه و بیان ژن CatSper آنها به کمک تکنیک RT-PCR بررسی شد. برای حصول اطمینان از اینکه RNA به میزان برابر در هر واکنش به کار رفته و تفاوت احتمالی در شدت سیگنال باند مربوط به ژن CatSper هر گروه، ناشی از اختلاف در میزان RNA به کار رفته نیست، از ژن β2m به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. برای هر گروه سنی واکنش RT-PCR با شرایط یکسان برای دو ژن CatSper و β2m انجام شد و نتایج حاصل به طور مقایسه‌ای مورد استفاده قرار گرفت. الکتروفورز محصولات PCR، دو باند با اندازه‌های مختلف را نشان داد که اندازه‌های به دست آمده معادل با اندازه قطعه تزاید یافته برای CatSper (۵۶۶ bp) و β2m (۳۱۶ bp) است (شکل ۳). نتایج به دست آمده نشان داد که ژن CatSper در گروههای سنی یک روزه، یک هفته و دو هفته بیان نمی‌شود در حالی که در هر سه گروه، بیان ژن β2m به وضوح دیده می‌شود. علاوه بر این، با شروع هفته سوم، بیان ژن CatSper آغاز و به مرور زمان بر میزان آن افزوده و به تدریج با افزایش سن از بیان آن کاسته می‌شود.



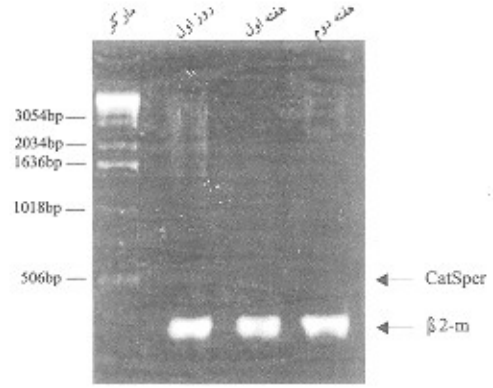
شکل ۲: طرح الکتروفورزی محصول RT-PCR مربوط به انتخاب تعداد سیکل PCR روی ژن β2m ستون ۱: مارکر و ستونهای ۲ الی ۵: به ترتیب محصول سیکلهای ۲۰ الی ۴۵ را نشان می‌دهد

این آزمایش در سه سری مختلف از موشها تکرار شد و شدت سیگنال برای کلیه باندها با نرم‌افزار Labimage سنجیده شد. نمودار ۱ میانگین شدت نسبی بیان ژن CatSper به β2m در گروههای مختلف سنی را نشان می‌دهد. داده‌ها به صورت Mean±SE نمایش داده شده‌اند. آزمون کروسکال-والیس اختلاف معناداری را در میزان بیان ژن CatSper در گروههای سه هفته تا چهار ماهگی نشان نمی‌دهد (P=0.592) و آزمون مقایسه چندگانه LSD صحت این موضوع را در مقایسه تک‌تک گروهها با هم تائید می‌کند. برای کسب اطمینان از اینکه در سه گروه اول هیچ گونه بیان ژن برای CatSper وجود ندارد واکنش PCR برای سه گروه اول و با افزایش تعداد سیکلها به ۴۵ تکرار شد

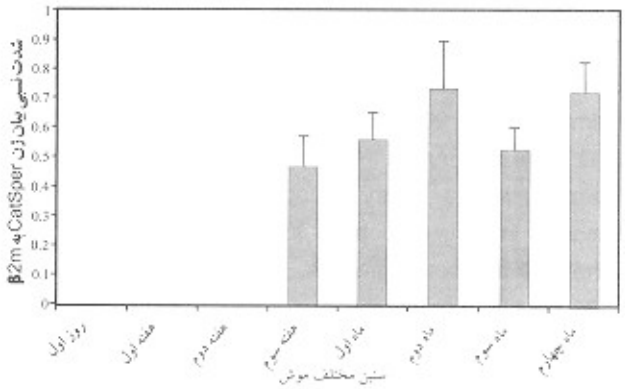
(شکل ۴). همچنان که در تصویر نیز به وضوح مشخص است افزایش تعداد سیکل، شدت سیگنال را برای ژن $\beta 2m$ افزایش داد ولی هیچ گونه سیگنالی برای CatSper رؤیت نشد.



شکل ۳: طرح الکتروفورزی محصول RT-PCR برای ژنهای $\beta 2m$ و CatSper در سنین مختلف موش. ستون اول و آخر مارکر kb ۱ و ستونهای ۲ الی ۹ به ترتیب، محصول RT-PCR روی نمونه‌های RNA از گروه سنی یک روزه تا چهار ماهه را نشان می‌دهد.



شکل ۴: طرح الکتروفورزی محصول RT-PCR با شعداد سیکل ۴۵ برای ژنهای $\beta 2m$ و CatSper ستون ۱ تا ۳ به ترتیب مربوط به گروه سنی یک روزه تا دو هفته می‌باشد.



نمودار ۱: شدت نسبی محصول RT-PCR برای ژن CatSper در سنین مختلف موش. اندازه‌گیری در هر گروه سنی به صورت نسبت شدت باند CatSper به باند b2m می‌باشد و نتایج به صورت Mean ± SE نشان داده شده است.

* هیستولوژی و آنالیز اسپرم موش

به منظور اطمینان از طبیعی بودن اسپرماتوژنز در نمونه‌ها مقاطع بافتی بررسی شد. سلولهای ژرم در مراحل مختلف اسپرماتوژنز حضور داشتند و در مجرای لوله‌های سمی نفروس (از سن دو ماهگی به بعد) اسپرم قابل تشخیص بود. آنالیز اسپرم نیز برای گروههای سنی دو تا چهار ماهه انجام گرفت و اسپرم متحرک با درصد قابل قبول در کلیه موشهای مورد بررسی، مشاهده شد (نتایج نشان داده نشده است). این نتایج حاکی از آن است که گروههای مورد آزمایش از نظر اسپرماتوژنز و تحرک اسپرم کاملاً طبیعی هستند.

بحث

در پستانداران اسپرم و تخمک رها شده در دستگاه تناسلی ماده تنها برای مدت کمی قادر به زندگی هستند و برای ادامه حیات، آنها نیازمند یافتن یکدیگر و انجام عمل لقاح (Fertilization) هستند. برای انجام عمل لقاح، اسپرم باید مسافتهای نسبتاً زیادی را طی کند. این توانایی آنها را به سمت لوله‌های رحمی رانده و نیز به آنها کمک می‌کند تا از پوشش خارجی تخمک (Zona pellucida) عبور کرده و تخمک را بارور کنند. به همین دلیل تحرک اسپرم در عمل لقاح نقشی حیاتی دارد (۶).

اثرات تحریکی یون کلسیم و نوکلئوتیدهای حلقوی در تحرک اسپرم پستانداران مشخص شده است، به طوری که میزان کلسیم و cAMP اسپرم در هنگام شروع تحرک سریعاً افزایش می‌یابد (۱۹). تاکنون کانالهای کلسیمی متعددی در اسپرم شناسایی شده‌اند، با این حال هنوز نقش این کانالها در اسپرماتوژنز یا عملکرد اسپرم بالغ کاملاً شناسایی نشده است (۱۵).

دانشمندانی که در زمینه ابداع داروهای ضدباروری و نیز درمان عقیمی مشغول به کار هستند، از مدتها قبل درصدد شناسایی مولکولهایی جهت کنترل تحرک اسپرم هستند. اخیراً Dejian Ren و همکاران ژن جدیدی را شناسایی کردند که نقشی کلیدی در کنترل تحرک اسپرم دارد. این ژن یک کانال کلسیمی را کد می‌دهد که محصول آن تنها در ناحیه دم (tail's principal piece) اسپرم مستقر بوده و جریان ورودی کلسیم نیز به داخل اسپرم را کنترل می‌کند. ورود یونهای کلسیم به توبه خود تحرک اسپرم را کنترل می‌کند. حذف ژن (knock-out) مزبور منجر به از دست رفتن تحرک اسپرمی و نیز قابلیت نفوذ این اسپرمها از پوشش خارجی تخمک در موشهای ترانس ژنیک گردید. این موشها در بقیه رفتارها از جمله رفتارهای جنسی از موشهای وحشی غیر قابل تفکیک هستند و اسپرم آنها در صورت حذف Zona pellucida تخمک قادر به بارور کردن آن است (۱۵).

به جز گزارش فوق تاکنون هیچ بررسی دیگری در مورد این ژن انجام نشده است و با توجه به اهمیت ژن CatSper در باروری و لزوم بررسی بیان ژن که خود می‌تواند در یافتن عوامل تنظیم کننده آن نقش به سزایی داشته باشد، تحقیق حاضربه منظور آشکارسازی زمانی (timing) بیان ژن CatSper در طی مراحل مختلف تکوین (بعد از تولد) بیضه در موش صورت پذیرفت.

نتایج به دست آمده نشان داد که بیان ژن CatSper در بیضه از سن ۳ هفتگی آغاز می‌شود و قبل از این سن هیچ گونه سیگنالی برای بیان این ژن (حتی با افزایش تعداد سیکلهای PCR) مشاهده نمی‌شود. بنابراین با توجه به داده‌های هیستولوژیکی مبنی بر مشاهده اسپرم در

لوله‌های سمی نفروس از سن دو ماهگی به بعد، مشخص می‌شود که ژن مذکور زودتر از بلوغ جنسی موش بیان می‌شود.

آگاهی از ساختار کانالهای کلسیم و توزیع آنها در سلولهای ژرم و اسپرم در درک تنوع عملکردی این پروتئینها در فرآیندهای اسپرماتوژنز تا لقاح سهم به سزایی خواهد داشت. علاوه بر این، مطالعات در این زمینه می‌تواند نقطه شروعی برای تحقیقات پاتوفیزیولوژی و جنبه‌های درمانی ناباروری به دلیل اختلالات ورود باشد (۲۰).

بررسی عملکرد ژن CatSper از دید بیولوژی سلولی-مولکولی، جهت به کار گیری این اطلاعات در کلینیکهای ناباروری و درمان بیماریهای ناشی از کمی تحرک اسپرم در مردان و ابداع روشهای نوین کنترل باروری بدون عوارض جانبی، ضروری است. به عنوان مثال، بررسی مقایسه‌ای پروفیل بیان ژن در دو گروه سنی دو و سه هفتگی به وسیله تکنیک micro-array می‌تواند در شناسایی ژنهایی که محصول آنها در کنترل بیان ژن CatSper دخالت دارند نقش به سزایی ایفا کند. شناسایی این عوامل می‌تواند بالقوه در ساخت دارو به منظورافزایش و یا کاهش بیان ژن در درمان ناباروری و یا ابداع روشی نوین در جلوگیری از باروری ناخواسته مؤثر واقع شود. ابداع عواملی که قادر به بلوکه کردن کانال کلسیمی CatSper می‌باشند می‌توانند به عنوان یک داروی ضدباروری غیرهورمونی به کار رود و با توجه به موقعیت محدود شده (restricted localization) کانال فوق به اسپرم بالغ، چنین داروهایی اثرات جانبی قرصهای هورمونی را نخواهند داشت و می‌توان آنها را به طور غیر مستمر (در هنگام و یا قبل از آمیزش) مصرف کرد.

بررسی بیان ژن CatSper در بیماران ناباروری که علت ناباروری آنها کاهش یا عدم تحرک اسپرمی است و مقایسه این نتایج با گروه کنترل (افراد نرمال و یا بیمارانی که علت ناباروری آنها انسداد مجاری اسپرمی است ولی تحرک اسپرم در آنها طبیعی است) می‌تواند تا حد زیادی ارتباط این ژن را با ناباروری در مردان به طور مستقیم نشان دهد. مهمترین مشکل در بررسی کلینیکی این است که هسته در اسپرم بالغ کاملاً متراکم شده است و در این مرحله هیچ گونه نسخه‌برداری انجام نمی‌گیرد (۹) و در نتیجه بررسی پروفیل بیان ژن در این بیماران بر روی مایع منی انجام‌پذیر نیست و انجام بیوپسی ازبیضه اجتناب ناپذیر است. این تحقیق هم اکنون در آزمایشگاه ما شروع شده است و نتایج به دست آمده اولیه بیانگر وجود ارتباط مستقیم بین بیان ژن CatSper و تحرک اسپرم در مردان است (۲۱).

تقدیر و تشکر

در این تحقیق از کمکها، مساعدتها و راهنماییهای اساتید محترم دانشگاه تربیت مدرس جناب آقای دکتر تقی طریحی، گروه علوم تشریح - دانشکده علوم پزشکی، جناب آقای دکتر مجید صادقی‌زاده، گروه ژنتیک - دانشکده علوم پایه، جناب آقای دکتر انوشیروان کاظم‌نژاد، گروه آمار زیستی - دانشکده علوم پزشکی و نیز جناب آقای پوربیرانوند، سرکار خانم افسانه ملک‌زاده و آناهیتا حمیدی بهره‌مند شده‌ایم که بدینوسیله از زحمات و مساعدتهای این عزیزان سپاسگزاری می‌شود. کلیه هزینه‌های این تحقیق از محل بودجه تحقیقاتی مصوب در دانشگاه تربیت مدرس پرداخت شده است.

References

1. Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES: A profile of fertilization in mammals. Nature Cell Biol 2001, 3(2): E59-64

2. Topfer-petersen E, petrounkina AM, Ekhlasi-Hundrieser M: Oocyte-sperm interactions. Animal Rep Sci 2000; 60-61: 653-662

3. O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, Florman HM: Ca^{+2}entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg zp3 and drives the acrosome reaction. Mol Biol Cell 2000; 11: 1571-1184

4. Wassarman PM: Fertilization in mammals. Sci Am 1998; 259(6): 78-84

5. Vacquier VD: Evolution of Gamete Recognition proteins. Sci 1998; 281: 1995-1998

6. Olds-Clarke P: How does poor motility alter sperm fertilizing ability? J Androl 1996; 17(3): 183-186

7. Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS: Capacitation of mouse spermatozoa: I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. Dev 1995; 121: 1129-1137

8. Austin CR: Observation of the penetration of sperm into the mammalian egg. Aust J Sci Res 1951; 4: 581-596

9. Yanagimachi R: Mammalian fertilization. In The physiology of Reproduction, Knobil E, Neill JD, Raven press, New York, 1994, 189-317

10. Storey BT: Interaction between gametes leading to fertilization: the sperm's eye view Reprod Fertil Dev 1995; 7: 927-942

11. Darszon A, Labarca P, Nishigaki T, Espinosa F: Ion channels in sperm physiology. Physiol Rev 1999; 79: 481-510

12. Ward GE, Brokaw CJ, Garbers DL, Vacquier VD: Chemotaxis of Arbacia punctulata spermatozoa to react a peptide from the egg jelly layer. J Cell Biol 1985; 101: 2324-2329

13. Cook SP, Brokaw CJ, Muller CH, Babcock DF: Sperm chemotaxis: egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. Dev Biol 1994; 165: 10-19

14. Wiesner B, Weiner J, Middendorff R, Hagen V, Kaupp UB, Weyand I: Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca^{+2}entry into sperm. J Cell Biol 1998; 142: 473-484
15. Ren D, Navarro B, perez G,Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE: A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. Nat 2001; 413: 603-609
16. World Health Organization: WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, Cambridge University press, United Kingdom 1999, 8-19
17. National Center for Biotechnology Information: http://www.ncbi.nlm.nih.gov
18. Sambrook J, Russel DW: Molecular cloning: alaboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory press 2001 8, 21-8, 53
19. Morisawa M: Cell signaling mechanisms for sperm motility. Zoolog Sci 1994; 11: 647-662
20. Serrano CJ, Trevino CL, Felix R, Darszon A: Voltage- dependent Ca^{+2} channel subunit expression and immunolocalization in mouse spermatogenic cells and sperm 1999; 462: 171-176
21. Nikpoor P, Mowla SJ, Movahedin M, Ziaee AM: CatSper gene expression is reduced in patients with poor sperm motility. The 9th Annual Scientific meeting of the middle East Fertility Society, Cairo Egypt 30 2002