

Study of p53 and sirtuin1 gene expression levels in sperm of infertile men compared to healthy men

Fariba Ghodrati¹, Kazem Parivar¹, Iraj Amiri², Nasim Hayati Roodbari¹

¹Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Department of Anatomy and Embryology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Abstract

Background: Several factors, including molecular and genetic changes, play a role in male infertility. The p53 and SIRT1 genes are among the key molecules that play a role in regulating cellular processes such as apoptosis, DNA repair, and oxidative stress. The aim of this study was to investigate the expression levels of p53 and SIRT1 genes in the sperm of infertile men compared to healthy men.

Materials and methods: This case-control study used sperm samples from 15 fertile and 15 infertile men who referred to Omid Infertility Clinic in Hamedan for infertility-related tests. Some of the above sperm were used for fertilization and the other part was frozen for molecular studies. The expression levels of genes were measured using the RT-qPCR technique. After performing IVF and ICSI in vitro fertilization, the results were compared with the results of molecular studies.

Results: The p53 gene expression in the sperm of infertile men was significantly increased ($P \leq 0.0001$), while SIRT1 gene expression was significantly decreased ($P \leq 0.0001$). In terms of the correlation between morphology, sperm count and motility in the semen sample and blastocyst rate obtained from IVF and ICSI, no significant correlation was found with P53 and SIRT1 gene expression.

Conclusion: The findings showed that increased p53 expression causes sperm apoptosis and decreased SIRT1 expression exacerbates oxidative stress; both of which can be used as key markers in the evaluation of male fertility.

Keywords: *p53, Sirtuin1, Sperm, Infertile men.*

Cited as: Ghodrati F, Parivar K, Amiri I, Hayati Roodbari N. Study of p53 and sirtuin1 gene expression levels in sperm of infertile men compared to healthy men. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2026; 36(1): 23-33.

Correspondence to: Kazem Parivar

Tel: +98 9121304550

E-mail: kparivar.srbiau@gmail.com

ORCID ID: kparivar.srbiau@gmail.com

Received: 6 May 2025; **Accepted:** 3 Sep 2025

بررسی میان بیان ژن p53 و sirtuin1 در اسپرم مردان نابارور در مقایسه با مردان سالم

فریبا قدرتی^۱، کاظم پریور^۱، ایرج امیری^۲، نسیم حیاتی رودباری^۱

^۱ گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ گروه آناتومی و جنین شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: عوامل متعددی از جمله تغییرات مولکولی و ژنتیکی در ناباروری مردان نقش دارند. ژن های p53 و SIRT1 از جمله مولکول های کلیدی هستند که در تنظیم فرآیندهای سلولی همچون آپوپتوز، ترمیم DNA و استرس اکسیداتیو نقش ایفا می کنند. هدف این مطالعه بررسی میزان بیان ژن های p53 و SIRT1 در اسپرم مردان نابارور در مقایسه با مردان سالم بود.

روش بررسی: در این مطالعه مورد-شاهدی از نمونه های اسپرم ۱۵ مرد بارور و ۱۵ مرد نابارور که جهت انجام آزمایشات مرتبط با ناباروری به کلینیک ناباروری امید در همدان مراجعه کردند، استفاده شد. بخشی از اسپرم های فوق جهت انجام لقاح استفاده و بخش دیگر جهت بررسی های مولکولی فریز شد. میزان بیان ژن ها با استفاده از تکنیک RT-qPCR اندازه گیری شد. پس از انجام لقاح آزمایشگاهی IVF و ICSI نتایج آن با نتایج بررسی های مولکولی مقایسه شد.

یافته ها: بیان ژن p53 در اسپرم مردان نابارور به طور معنی داری افزایش داشت ($P < 0.001$)، در حالی که میزان بیان ژن SIRT1 کاهش معنی داری را نشان داد ($P < 0.001$). از نظر میزان همبستگی مرفولوژی و تعداد و حرکت اسپرم در نمونه مایع منی و نرخ بلاستوسیت حاصل از IVF و ICSI با میزان بیان ژن p53 و SIRT1 ارتباط معنی داری یافت نشد.

نتیجه گیری: یافته ها نشان داد که افزایش بیان p53 موجب آپوپتوز اسپرم و کاهش بیان SIRT1 استرس اکسیداتیو را تشدید می کند که هر دو می توانند به عنوان نشانگرهای کلیدی در ارزیابی باروری مردان به کار روند.

واژگان کلیدی: Sirtuin 1 p53، اسپرم، مردان نابارور.

مقدمه

ناباروری مردان، مشکل بهداشتی جهانی است که بر کیفیت زندگی زوجها تأثیر می گذارد و عوامل مختلفی از جمله عوامل ژنتیکی، محیطی و سبک زندگی در بروز آن نقش دارند. در سال های اخیر، مطالعات متعددی به بررسی نقش ژن ها در ناباروری مردان پرداخته اند. یکی از ژن های مهمی که در این زمینه مورد توجه قرار گرفته است، ژن سیرتوین ۱ (SIRT1)

است. سیرتوین ۱ به عنوان یک داستیلاز کلاس III هیستون شناخته می شود که به NAD⁺ وابسته است و گروه های استیل را از پروتئین ها جدا می کند، نقش بسیار مهمی در فرایندهای سلولی مختلف از جمله پیری، متابولیسم و تنظیم طول عمر سلولی، مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو و ترمیم DNA ایفا میکند (۱). SIRT1 در بیضه ها بیان می شود و بر اسپرم زایی تأثیر می گذارد. این آنزیم به کاهش استرس اکسیداتیو، تنظیم

سیگنال های هورمونی و تأثیرگذاری بر تغییرات اپی ژنتیکی کمک میکند. کاهش فعالیت SIRT1 با ناباروری مردان به دلیل اختلال در اسپرم زایی، عدم تعادل هورمونی و تغییرات اپی ژنتیکی مرتبط است. مطالعات قبلی نشان داده اند که بیان ژن SIRT1 در اسپرماتوزوئیدها با کیفیت اسپرم و توانایی باروری ارتباط دارد و کاهش بیان SIRT1 با افزایش استرس اکسیداتیو، آسیب DNA و کاهش تحرک اسپرم همراه است (۲). در مدل های حیوانی، به ویژه موش های نر دارای کمبود SIRT1، ناباروری مشاهده شده است که با اسپرم زایی ضعیف و بلوغ غیرطبیعی اسپرم مشخص می شود. این موش ها تعداد و تحرک اسپرم را کاهش دادند، همراه با وجود اسپرم های غیرطبیعی از نظر مورفولوژیکی، مانند آنهایی که سر کوچک تر یا دم های جدا شده داشتند (۳). مطالعات نشان داده اند که سطوح پایین تر SIRT1 با افزایش نشانگرهای استرس اکسیداتیو در پلاسمای منی مرتبط است که بر کیفیت اسپرم تأثیر منفی می گذارد. این رابطه نشان می دهد که SIRT1 ممکن است به کاهش آسیب DNA در سلول های اسپرم ناشی از استرس اکسیداتیو کمک کند. بیوتزن مناسب آکروزوم برای عملکرد اسپرم ضروری است. کاهش سطح SIRT1 با نقص در تشکیل آکروزوم همراه است که منجر به مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم و اختلال در توانایی لقاح می شود. در انسان، کاهش سطوح SIRT1 در پلاسمای منی با پارامترهای ضعیف اسپرم، از جمله تحرک و غلظت کمتر و همچنین نرخ های بالاتر مورفولوژی غیرطبیعی مرتبط است. این یافته ها نشان می دهد که SIRT1 می تواند به عنوان یک نشانگر زیستی برای ناباروری مردان عمل کند و ممکن است یک هدف بالقوه برای مداخلات درمانی با هدف بهبود نتایج باروری باشد (۴). افزایش فعالیت SIRT1 از طریق فعال کننده های سیرتوئین، یک رویکرد درمانی بالقوه برای بهبود باروری مردان است. در مطالعاتی نشان داده شد که کمبود SIRT1 با افزایش آپوپتوز در سلول های زایای نر مرتبط است که با افزایش فعالیت p53 - یک تنظیم کننده مهم مرگ سلولی - انجام می شود. ژن p53 به عنوان یک ژن سرکوبگر تومور شناخته می شود که در پاسخ به آسیب های DNA فعال شده و باعث توقف چرخه سلولی، ترمیم DNA یا آپوپتوز می شود (۵). پروتئین p53 به عنوان یک نگهبان ژنوم عمل می کند و در حفظ یکپارچگی سلولی، از جمله سلول های زایا، نقش بسیار مهمی دارد. این پروتئین در فرایند اسپرم زایی بیان می شود و با تنظیم آپوپتوز، به حذف سلول های معیوب کمک می کند تا از تولید اسپرم های سالم اطمینان حاصل شود. با این حال اختلال در عملکرد p53 می تواند منجر به مشکلات باروری

شود (۶). به عنوان مثال در شرایطی مانند استرس اکسیداتیو یا قرار گرفتن در معرض سموم محیطی، فعال شدن بیش از حد p53 می تواند باعث مرگ سلول های زایا و کاهش تولید اسپرم شود. همچنین جهش در این ژن می تواند به طور مستقیم بر عملکرد p53 تأثیر گذاشته و منجر به اختلال در اسپرم زایی شود. p53 ممکن است با هورمون های جنسی مانند تستوسترون تعامل داشته باشد و اختلال در این تعامل می تواند به مشکلات باروری منجر شود. التهاب مزمن نیز در بیضه ها می تواند بیان فاکتورهای پروآپوپتوزی را افزایش داده و به مرگ سلول های زایا منجر شود. ژن p53 نیز نقش مهمی در حفظ یکپارچگی ژنوم و تنظیم آپوپتوز در اسپرماتوزوئیدها دارد. تغییرات در بیان ژن p53 ممکن است منجر به افزایش آسیب DNA و کاهش کیفیت و تولید اسپرم و ناباروری شود (۷، ۸). درک دقیق مکانیسم های دخیل در این فرایند، می تواند به توسعه روش های درمانی جدید برای ناباروری کمک کند. هدف از انجام این مطالعه، بررسی بیان ژن های SIRT1 و p53 در نمونه های اسپرم مردان نابارور در مقایسه با مردان سالم است. با انجام این مطالعه، می توان به درک بهتری از نقش این دو ژن در فرایند اسپرماتوزن و ناباروری مردان دست یافت. همچنین، نتایج این مطالعه می تواند به شناسایی بیومارکرهای جدید برای تشخیص زودهنگام ناباروری مردان و توسعه روش های درمانی جدید کمک کند.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه ها

این مطالعه (کد اخلاق IR.IAU.SRB.REC.1400.167) به صورت مورد شاهدهی طراحی و انجام شد. پس از تعیین تعداد بیماران توسط محاسبات آماری و فرمول تعیین حجم نمونه از نمونه های اسپرم ۱۵ مرد بارور و ۱۵ مرد نابارور که جهت انجام آزمایشات مرتبط با ناباروری به کلینیک ناباروری امید در همدان مراجعه کردند، پس از اخذ رضایت کتبی استفاده شد. مردان بارور کسانی در نظر گرفته شدند که از نظر آنالیز اسپرم با آخرین معیارهای ارائه شده از طرف سازمان بهداشت جهانی WHO بارور محسوب شده و حداقل دارای یک فرزند سالم نیز بودند و مردان نابارور به کسانی اطلاق شد که از نظر معیارهای WHO پارامترهای اسپرم آنها آبنورمال بودند و نابارور محسوب می شدند؛ لیکن همسر آنها سالم بوده و مشکلی از نظر باروری نداشتند. از زوجین فوق رضایت کتبی اخذ شد و وارد این مطالعه شدند. پس از آنکه سیکل های درمانی برای همسر این

سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. فاز شفاف رویی حاوی RNA جدا شده و به میکروتیوب دیگری منتقل شد. به میکروتیوب های حاوی فاز شفاف رویی ایزوپروپانول اضافه شد (۵۰۰ میکرولیتر به ازای ۱ میلیلیتر ترايزول). سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای فریزر ۲۰- انکوبه شدند. به منظور رسوب RNA، نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در RPM ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتیفریوژ گردیدند. محلول رویی تخلیه و رسوبها با اتانول ۷۵٪ شستشو داده شدند. دوباره سانتیفریوژ در RPM ۷۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه انجام شد. محیط رویی تخلیه و میکروتیوب ها به مدت ۱۵ دقیقه بر روی دستمال کاغذی استریل وارونه قرار دادیه شد تا رسوب نیمه خشک شده و الکل تبخیر شود. پس از نیمه خشک شدن رسوب، مقدار ۲۰ الی ۳۰ میکرولیتر آب DEPC یا عاری از RNase به هر میکروتیوب اضافه شد تا رسوب RNA در آن حل شد. برای حل شدن رسوب میکروتیوبها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. نمونه های استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد برای نگهداری کوتاه مدت قرار داده شد.

سنتز cDNA

در ابتدا تمام مواد کیت از دمای ۲۰- درجه سانتیگراد و نمونه های RNA از ۷۰- درجه سانتیگراد درجه خارج و پس از آب شدن به روی یخ انتقال داده شدند. تمامی مواد قبل از استفاده ورتکس اسپین شدند. جهت تهیه میکس RT، طبق جدول زیر مواد لازم برای ساخت cDNA شامل بافر RT، آنزیم RT، پرایمر Oligo dT و آب DEPC با یکدیگر مخلوط شده و سپس در حجمهای ۹ μl در میکروتیوب های ۲ ml، توزیع شدند (جدول ۲).

جدول ۲. ترکیبات لازم برای ساخت cDNA

Component	Volume
Mix RT 5 μl	RT mix contains RT buffer + RT enzyme (MMLV) + oligo dT and Random hexamer primers
Oligo dT primers 1 μl	
DEPC water 3 μl	
Total volume	9 μl + 1 μl RNA (0.5 – 1 μg)

جدول ۳. برنامه دمایی برای سنتز cDNA

RT program	
RT-PCR	25 °C 10 min 60 min 47 °C 5 min 1X
Cooling	85 °C 4 °C 2 min 1X

مردان آغاز شد، در روز تخمک کشی از مردان فوق نمونه اسپرم گرفته شد. پس از پشت سر گذاشتن مراحل ذوب و آنالیز اسپرمها، آنها در دو گروه طبقه بندی شد و با دو سانتیفریوژ جداگانه نمونه سیمین از اسپرم جدا گردید و مایع سیمین منجمد و در دمای ۷۰- درجه نگهداری شد و اسپرمها نیز با استفاده از روش جداسازی گرادیان مورد پروسس قرار گرفت تا اسپرمهای سالم و با گرید حرکتی مناسب جهت انجام عمل لقاح آزمایشگاهی جدا گردد. سپس بخشی از اسپرمهای فوق جهت انجام لقاح استفاده و بخش دیگر جهت بررسیهای مولکولی فریز گردید. در نهایت به منظور بررسی میزان لقاح، تخمکهای به دست آمده به دو دسته تقسیم شدند که یک دسته به روش لقاح آزمایشگاهی IVF و دسته دیگر به روش ICSI (تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم) تحت انجام عمل لقاح قرار گرفت. پس از انجام لقاح آزمایشگاهی طبق پروتکل های استاندارد نتایج آن در روزهای بعد پیگیری و ثبت شد تا با نتایج بررسیهای مولکولی مقایسه شده و ارتباط بین نتایج بدست آمده از بررسیهای مولکولی با میزان لقاح در هر گروه یافت شود.

پژوهش های مولکولی

بررسی بیان ژن های SIRT1 , P53 در نمونه های اسپرم مردان بارور و نابارور

برای مطالعه بیان ژن های SIRT1, P53 در مایع سمینال وزیکول از تکنیک Real- Time PCR استفاده شد. جدول ۱ توالی پرایمرهای مورد مطالعه را نشان میدهد.

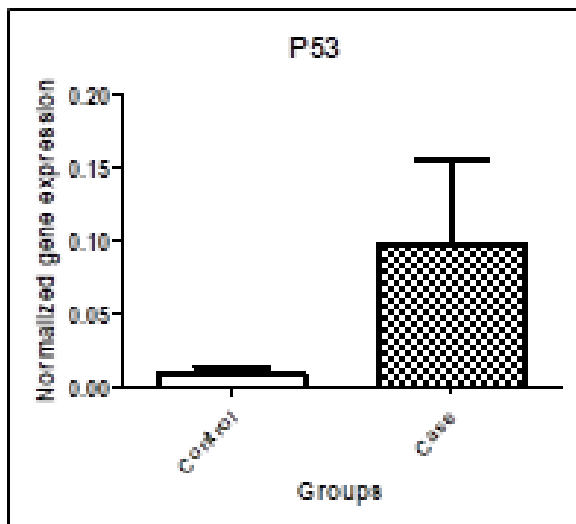
جدول ۱. توالی پرایمرهای ژنهای مورد مطالعه

h-TP53-f	TTCCGTCTGGGCTTCTTG
h-TP53-r	TGCTGTGACTGCTTGATAGAT
h-sirt1-f	GGCACCGATCCTCGAACAAT
h-sirt1-r	CGCTTTGGTGGTTCTGAAAGG
h-GAPDH-f	CTTTGGTATCGTGGAAGGAC
h-GAPDH-r	GCAGGGATGATGTTCTGG

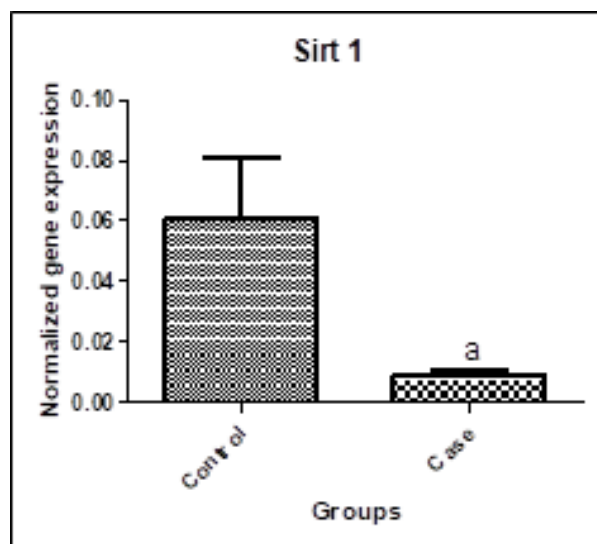
استخراج RNA

ابتدا برای خالص سازی بیشتر، مایع سمن به مدت ۵ دقیقه با دمای ۴ درجه و دور ۵۰۰۰ سانتیفریوژ گردید و مایع رویی که سمن است به ویالها منتقل گردید. سپس ۱ میلی لیتر ترايزول اضافه شد. به ازای ۱ میلیلیتر ترايزول اضافه شده در مرحله اول، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه ها اضافه گردید و میکروتیوبها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در RPM ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجه

± 0.09699 بود که در مقایسه با میانگین بیان این ژن در گروه کنترل ± 0.01509 از نظر آماری تفاوت معنی داری نشان داد ($P < 0.0001$) (شکل ۱).



شکل ۱. بررسی میزان بیان ژن P53 در نمونه اسپرم دو گروه مردان بارور (Control) و مردان نابارور (Case). ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده شد. میزان معنی داری در سطح 0.05 درصد در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد.



شکل ۲. بررسی میزان بیان ژن Sirt1 در نمونه اسپرم دو گروه مردان بارور (Control) و مردان نابارور (Case). ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده شد. میزان معنی داری در سطح 0.05 درصد در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد.

میکروتیوبهای آماده شده حاوی RT mix و نمونه RNA در دستگاه ترموسایکلر گذاشته شدند و برنامه دمایی اجرا شد. نمونهای cDNA آماده شده تا زمان استفاده در -20°C درجه سانتی گراد نگهداری شدند (جدول ۳).

بررسی کمی تغییرات بیان ژن

طبق جدول ۴، برای هر ژن مخلوطی از اجزای مختلف PCR تهیه و پس از میکس کردن و اسپین کردن در مقادیر ۹ میکرولیتری داخل میکروتیوب های مخصوص دستگاه توزیع و در هر ویال یک میکرولیتر از نمونه cDNA مورد نظر اضافه شد (حجم نهایی هر واکنش PCR، ۱۰ میکرولیتر بود).

جدول ۴. تهیه ترکیبات واکنش ریل تایم PCR برای بررسی بیان ژنها

Component	Volume
SYBR Green Master Mix	1μ5
Forward primer (10μM)	1μ0.5
Reverse primer (10μM)	1μ0.5
H2O	1μ3
Total Volume	9μl + 1μl cDNA

میکروتیوبهای آماده حاوی واکنش PCR پس از میکس و ورتکس در دستگاه قرار داده و برنامه دمایی اجرا شد (جدول ۵).

پس از پایان آزمایش، اطلاعات حاصل شامل اعداد CT یا سیکل آستانه (threshold cycle)، منحنی های تکثیر و ذوب مربوط به هر ژن جهت آنالیز آماده بود. اعداد CT مربوط به $2^{-\Delta\Delta CT}$ تغییرات ژن رفرنس و ژن اصلی هر نمونه در فرمول بیان نسبی هر ژن محاسبه شد.

یافته ها

در این مطالعه ۱۵ مرد نابارور و ۱۵ مرد سالم بررسی شدند و از نظر مرفولوژی و تحرک و تعداد اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند. تعداد تخمک و جنین و بلاستهای حاصل از دو گروه لقاح با IVF و ICSI در دو گروه کنترل و بیمار مورد بررسی قرار گرفت و به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شد (جدول ۶).

بررسی میزان بیان ژن P53 در نمونه اسپرم مردان نابارور در مقایسه با گروه کنترل سالم

به منظور بررسی میزان بیان ژن P53 در گروههای مورد بررسی شامل دو گروه مردان نابارور و مردان سالم بارور، نمونه اسپرم با روش Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. میانگین میزان بیان ژن P53 در گروه نابارور 0.1736

جدول ۵. برنامه دمایی ریل تایم

Real-Time PCR program				
Steps	Temperature	Time	Cycles	Acquisition mode
Initial denaturation	95 °C	5 min	1X	Off
Amplification	95 °C	15 sec	40X	Off
	95 °C	15-20 sec		Off
	60 °C	15-30 sec		On
	72 °C			
Melting curve	95 °C	15 sec	1X	Off
	95 °C	1 min		Off
	65 °C			On
Cooling	65--95 °C, slope: 0.3 °C/s			
	30 °C	20 sec	1X	Off

حاصل از آنالیز، همبستگی مستقیم ژن P53 با تعداد اسپرم ($R=0/1949$) و تحرک اسپرم ($P=0/6340$, $R=0/09228$)، همبستگی معکوس با مرفولوژی اسپرم ($P=0/3401$) و همبستگی معکوس با نشان داد، ولی این میزان همبستگی بین دو پارامتر از نظر آماری ارتباط معنیداری را نشان نداد (شکل ۳).

میزان همبستگی نرخ بلاستوسیت حاصل از IVF و

ICSI با میزان بیان ژن P53

به منظور بررسی ارتباط میان بیان ژن P53 و نرخ بلاستوسیت حاصل از IVF و ICSI، مقایسه همبستگی میان این پارامتر و بیان ژن P53 مورد نظر صورت گرفت. نتایج حاصل از آنالیز، همبستگی مستقیم ژن P53 با نرخ بلاستوسیت حاصل از ICSI ($R=0/3344$, $P=0/1189$) و ($R=0/2283$)، همبستگی معکوس ژن P53 با نرخ بلاستوسیت حاصل از آنالیز، همبستگی معکوس ژن P53 با نرخ بلاستوسیت حاصل از IVF ($R=0/1712$, $P=0/39$) و ($R=0/4374$)، را نشان داد (شکل ۴).

بررسی میزان همبستگی مرفولوژی و تعداد و حرکت

اسپرم در نمونه مایع منی با میزان بیان ژن SIRT1

به منظور بررسی ارتباط میان بیان ژن SIRT1 و میزان مرفولوژی و تعداد و حرکت اسپرم، مقایسه همبستگی میان این پارامترها و بیان ژن SIRT1 مورد نظر صورت گرفت. نتایج حاصل از آنالیز، همبستگی مستقیم ژن SIRT1 با تعداد اسپرم ($R=0.1707$, $P=0.3672$) و تحرک اسپرم ($P=0.0044$)، و مرفولوژی اسپرم ($R=0.5602$, $P=0.1212$) را نشان داد، ولی این میزان همبستگی بین دو پارامتر از نظر آماری ارتباط معنیداری را نشان نداد (شکل ۵).

جدول ۶. پارامترهای بررسی شده در دو گروه لقاح با IVF و ICSI

متغیرها	کنترل (تعداد=۱۵)	بیمار (تعداد=۱۵)
تعداد تخمکهای IVF شده	۱۰/۰۶ ± ۲/۷	۱۳/۲ ± ۴/۵
تعداد جنینهای حاصل از IVF	۵/۴ ± ۲/۶	۶/۶ ± ۳/۸
تعداد تخمکهای ICSI شده	۹/۹ ± ۱/۸	۱۱/۲ ± ۳/۴
تعداد جنینهای حاصل از ICSI	۶/۶ ± ۲/۴	۷/۱ ± ۲/۴
تعداد بلاستهای حاصل از IVF	۴/۱ ± ۲/۳	۴/۶ ± ۳/۳
تعداد بلاستهای حاصل از ICSI	۴/۷ ± ۲/۲	۵/۷ ± ۱/۲
مورفولوژی اسپرم	۹/۰۶ ± ۲/۰۱	۹/۵۳ ± ۱/۸۸
تحرک اسپرم	۵۳/۴ ± ۱۰/۲۷	۵۲ ± ۸/۲۷
تعداد اسپرم $\times 10^6$	۵۶/۰۶ ± ۶/۸۸	۵۷/۴ ± ۴/۸۹

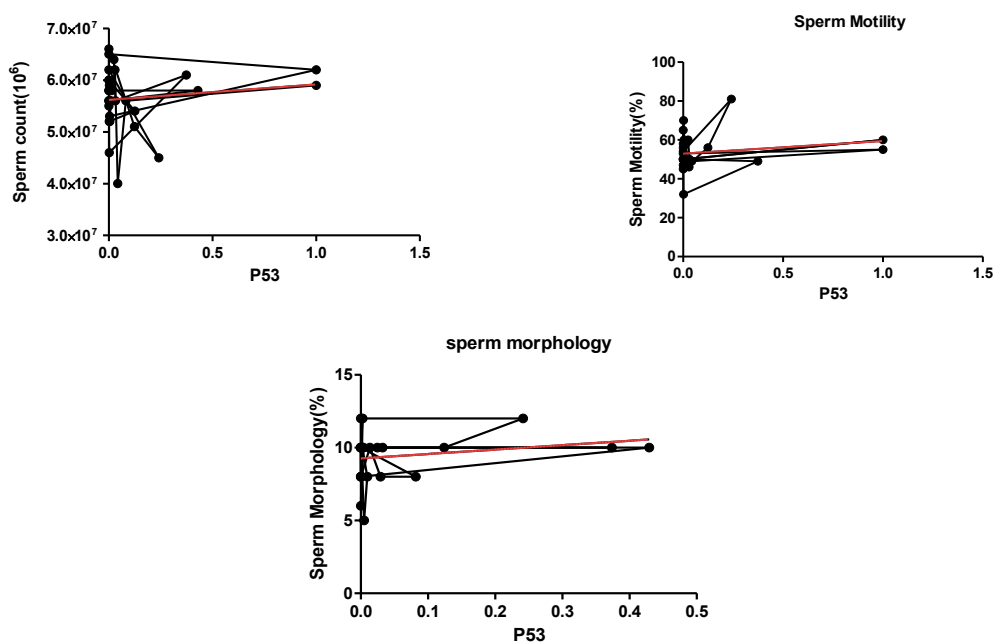
بررسی میزان بیان ژن Sirt 1 در نمونه اسپرم مردان نابارور در مقایسه با گروه سالم

به منظور میزان بیان ژن Sirt 1 در گروه های مورد بررسی شامل دو گروه مردان نابارور و مردان سالم بارور، نمونه اسپرم با روش Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که میانگین میزان بیان ژن Sirt 1 در گروه نابارور $0/005066 \pm 0/009436$ بود که در مقایسه با میانگین بیان این ژن در گروه کنترل به میزان $0/06235 \pm 0/06085$ از نظر آماری تفاوت معنیداری نشان داد ($P<0/0001$). با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که میزان بیان ژن Sirt 1 در نمونه اسپرم مردان نابارور از مردان بارور کمتر است (شکل ۲).

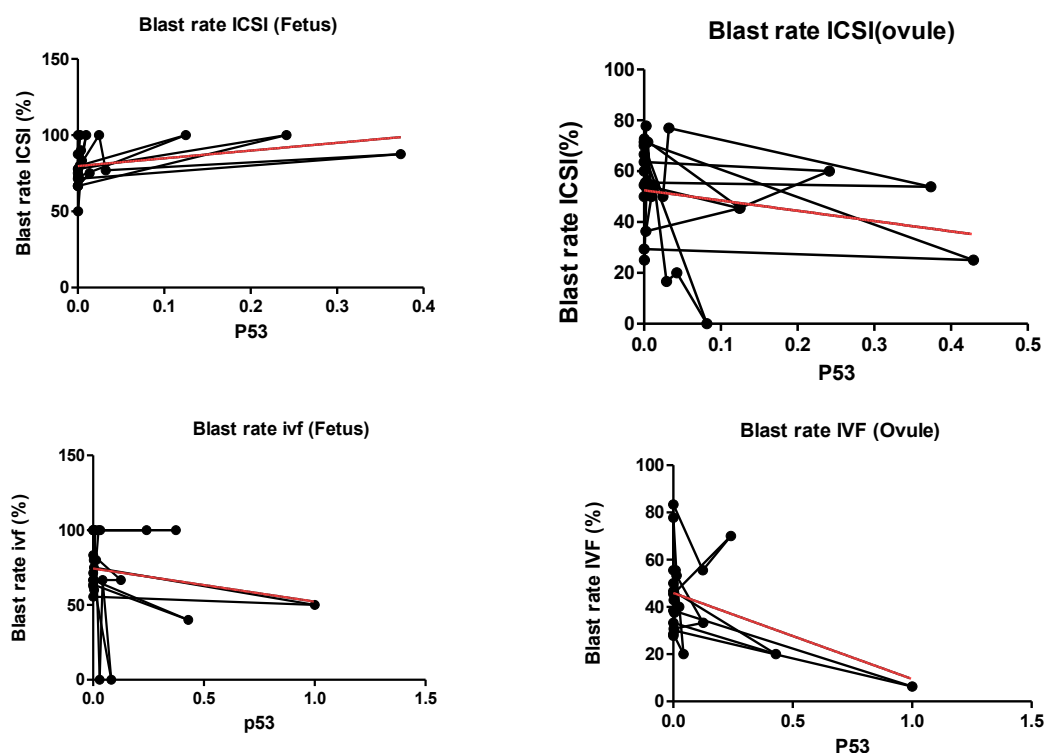
بررسی میزان همبستگی مرفولوژی و تعداد و حرکت

اسپرم در نمونه مایع منی با میزان بیان ژن P53

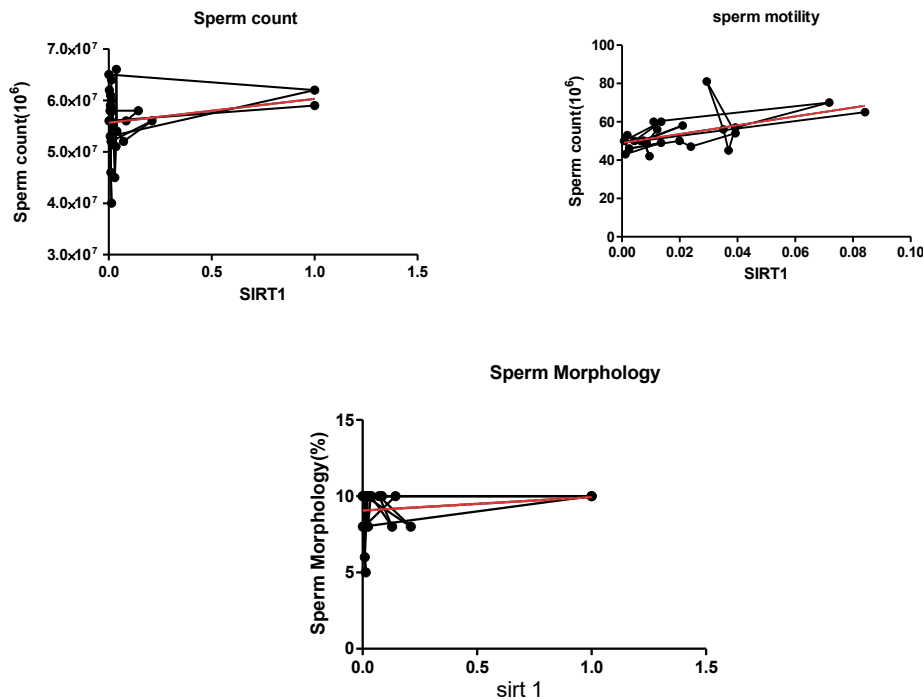
به منظور بررسی ارتباط میان بیان ژن P53 و میزان مرفولوژی و تعداد و حرکت اسپرم، مقایسه همبستگی میان این پارامترها و بیان ژن P53 مورد نظر صورت گرفت. نتایج



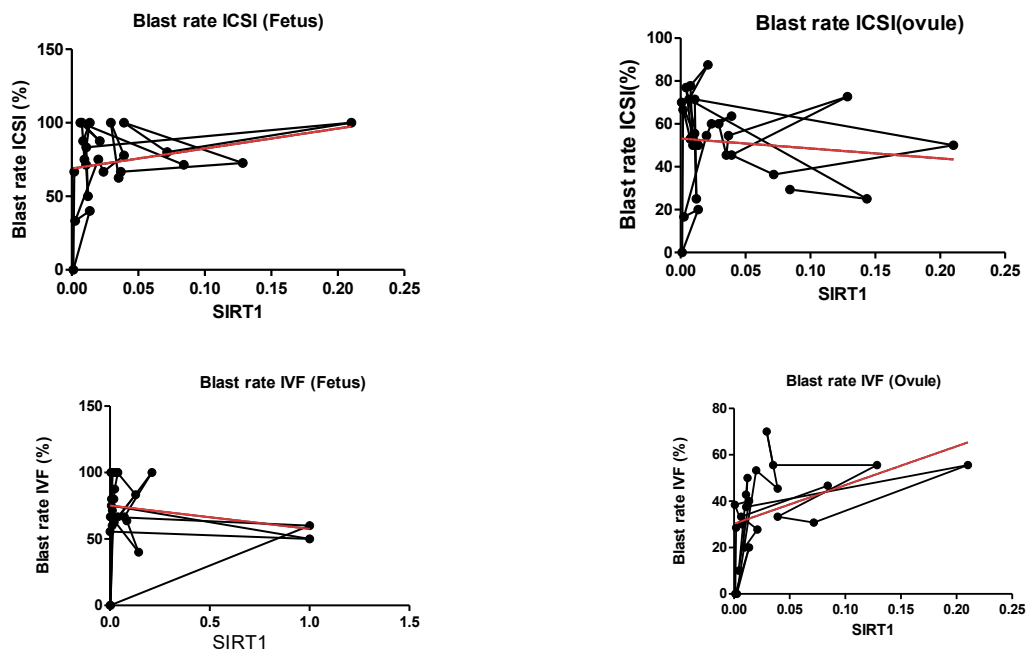
شکل ۳. بررسی میزان همبستگی مرفولوژی و تعداد و حرکت اسپرم در نمونه مایع منی با میزان بیان ژن P53. بیان ژن P53 با مرفولوژی و تعداد و حرکت اسپرم در دو جمعیت مردان بارور و نابارور با روش Regression مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان معنی داری در سطح ۰/۰۵ درصد در نظر گرفته شد. در هر گروه ۱۵ نمونه برای هر پارامتر ارزیابی شد.



شکل ۴. بررسی میزان همبستگی نرخ بلاستوسیت حاصل از ICSI و IVF با میزان بیان ژن P53. بیان ژن P53 با نرخ بلاستوسیت حاصل از ICSI و IVF در دو جمعیت مردان بارور و نابارور با روش Regression مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان معنی داری در سطح ۰/۰۵ درصد در نظر گرفته شد. در هر گروه ۱۵ نمونه برای هر پارامتر ارزیابی شد.



شکل ۵. بررسی میزان همبستگی مرفولوژی و تعداد و حرکت اسپرم در نمونه مایع منی با میزان بیان ژن sirt1. بیان ژن sirt1 با مرفولوژی و تعداد و حرکت اسپرم در دو جمعیت مردان بارور و نابارور با روش Regression مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان معنی داری در سطح ۰/۰۵ درصد در نظر گرفته شد. در هر گروه ۱۵ نمونه برای هر پارامتر ارزیابی شد.



شکل ۶. بررسی میزان همبستگی نرخ بلاستوسیت حاصل از IVF و ICSI با میزان بیان ژن sirt1. بیان ژن sirt1 با نرخ بلاستوسیت حاصل از IVF و ICSI در دو جمعیت مردان بارور و نابارور با روش Regression مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان معنی داری در سطح ۰/۰۵ درصد در نظر گرفته شد. در هر گروه ۱۵ نمونه برای هر پارامتر ارزیابی شد.

بررسی میزان همبستگی نرخ بلاستوسیت حاصل از

IVF و ICSI با میزان بیان ژن SIRT1

به منظور بررسی ارتباط میان بیان ژن SIRT1 و نرخ بلاستوسیت حاصل از IVF و ICSI، مقایسه همبستگی میان این پارامتر و بیان ژن SIRT1 مورد نظر صورت گرفت. نتایج حاصل از آنالیز، همبستگی مستقیم ژن SIRT1 با نرخ بلاستوسیت حاصل از ICSI ($R=0.2665$, $P=0.2081$) و ($R=0.1104$, $P=0.5758$) را نشان داد، ولی این میزان همبستگی بین دو پارامتر از نظر آماری ارتباط معنیداری را نشان نداد. نتایج حاصل از آنالیز، همبستگی معکوس ژن P53 با نرخ بلاستوسیت حاصل از IVF ($R=0.1625$, $P=0.3909$) و ($R=0.4620$, $P=0.0265$) را نشان داد (شکل ۶).

بحث

در این مطالعه مشاهده شد که میانگین سطح بیان P53 در مردان بارور به طور قابل توجهی کمتر از مردان نابارور است. این نتایج با تحقیقات اخیر همخوانی دارند و نشان می‌دهند که افزایش بیان P53 ممکن است به عنوان یک علامت نشان‌دهنده ناباروری در مردان در نظر گرفته شود (۹). این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<0.001$)، که تأکیدی بر اهمیت نتایج به دست آمده است. این یافته حاکی از آن است که فرآیندهای مرتبط با آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی) در مردان نابارور نسبت به مردان بارور افزایش یافته است. ژن P53 به عنوان "محافظ ژنوم"، در پاسخ به آسیب‌های DNA فعال می‌شود و نقش اساسی در القای آپوپتوز و حفظ یکپارچگی سلولی ایفا می‌کند. افزایش بیان این ژن می‌تواند به عنوان یک مکانیسم دفاعی در برابر آسیب‌های ژنتیکی ناشی از استرس اکسیداتیو در نظر گرفته شود، اما در عین حال، فعالیت بیش‌ازحد آن ممکن است تأثیر منفی بر فرآیند اسپرم‌زایی داشته باشد. پروتئین‌های پیش‌آپوپتوتیک، مانند P53، ممکن است همچنین بر باروری مردان با القای آپوپتوز در پاسخ به تنش‌های مختلف تأثیر بگذارند. P53 در رونویسی پروتئین‌های پیش‌آپوپتوتیک دخالت دارد و به همین دلیل در موارد آسیب DNA در بافت‌های بیضه و سلول‌های اسپرم به طور قابل توجهی بالا می‌رود (۱۰). در این مطالعه، اگرچه به طور مستقیم به مکانیسم فسفریله شدن P53 و ارتباط آن با فرآیندهای سلولی اشاره نشده است، اما یافته‌های ما مبنی بر افزایش معنادار بیان ژن P53 در اسپرم مردان نابارور می‌تواند نشان‌دهنده فعال‌سازی مسیرهای وابسته به این پروتئین باشد. بر اساس مطالعات معتبر، P53 پس از

فسفریله شدن در نقاط خاصی مانند Ser15 و Ser20، از تخریب توسط MDM2 جلوگیری کرده و با تجمع در هسته سلول، فرآیندهای کلیدی مانند آپوپتوز و ترمیم DNA را تنظیم می‌کند (۷، ۹). در شرایط استرس اکسیداتیو که در ناباروری مردان شایع است، فسفریله شدن P53 منجر به فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوزی از طریق افزایش بیان ژن‌های پیش‌آپوپتوزی مانند Bax و کاهش بیان عوامل ضدآپوپتوزی مانند Bcl-2 می‌شود (۶). همچنین، P53 فسفریله شده می‌تواند با تنظیم بیان ژن‌های درگیر در ترمیم DNA مانند p21، به حفظ یکپارچگی ژنومی کمک کند (۱۱). اگرچه در این پژوهش سطح فسفریله شده P53 اندازه‌گیری نشده است، اما افزایش کلی بیان این ژن می‌تواند نشان‌دهنده فعال‌شدن این مسیرها باشد. این موضوع با مطالعاتی که نشان داده‌اند در شرایط استرس اکسیداتیو، هم افزایش بیان و هم فسفریله شدن P53 رخ می‌دهد، همخوانی دارد (۱۰). به عنوان مثال Raimondo و همکارانش در ۲۰۱۴ با ارزیابی میزان P53 نشان دادند که میتوان از P53 بعنوان یک نشانگر برای اسپرماتوزوهای دارای آسیب DNA در انسان استفاده کرد (۱۱). مطالعات مشابهی نیز افزایش بیان P53 را در اسپرم مردان نابارور گزارش کرده‌اند. به عنوان مثال، پژوهشی توسط Zhang و همکارانش (۲۰۱۹) نشان داد که استرس اکسیداتیو ناشی از آسیب‌های محیطی یا اختلالات سیستم آنتی‌اکسیدانی می‌تواند منجر به فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوز و افزایش بیان P53 شود. این فرایند در نهایت کیفیت اسپرم و قابلیت باروری را کاهش می‌دهد (۱۲). از سوی دیگر، تحقیقات نشان داده‌اند که P53 از طریق تنظیم مسیرهای آپوپتوتیک داخلی، سلول‌های آسیب‌دیده را از چرخه تولیدمثلی حذف می‌کند. این مکانیسم می‌تواند در مردان نابارور بیش‌فعال باشد و به حذف گسترده سلول‌های اسپرم منجر شود. در مطالعه قبلی تأکید شد که افزایش بیان P53 اغلب با آسیب‌های DNA اسپرم و کاهش حرکت و مورفولوژی طبیعی اسپرم مرتبط است. افزایش بیان P53 در مردان نابارور ممکن است به دلیل عوامل استرس اکسیداتیو و آسیب به DNA و تنظیم مسیرهای سیگنالینگ آپوپتوز P53 از طریق افزایش بیان ژن‌هایی مانند Bax و کاهش بیان Bcl-2 باشد که تعادل بین بقا و مرگ سلولی را به سمت آپوپتوز پیش برده‌اند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ژن P53 می‌تواند به عنوان یک نشانگر زیستی مهم برای ارزیابی کیفیت اسپرم و تشخیص ناباروری مردان مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر این، هدف قرار دادن مسیرهای مولکولی مرتبط با P53 ممکن است به توسعه روش‌های درمانی جدید برای بهبود کیفیت اسپرم و افزایش احتمال باروری کمک کند (۱۳).

عامل دیگری که در باروری مردان دخیل است، SIRT1 است که اخیراً توجه زیادی را به خود جلب کرده است. SIRT1 به طور عمده در بخش هسته‌ای سلول‌های اسپرماتوژنی در بیضه قرار دارد. مدل‌های موش که فاقد SIRT1 ($SIRT1^{-/-}$) هستند، اسپرماتوژنز ضعیف، بلوغ غیرطبیعی اسپرم، کاهش اندازه اندام‌های تولید مثلی و ناهنجاری‌های مورفولوژیکی در اسپرم، مانند شکل‌های گرد و دم‌های جدا شده را نشان می‌دهند که منجر به افزایش تخریب و آپوپتوز می‌شود (۱۴). مطالعات بر روی SIRT1 تأکید دارند که این پروتئین در کنترل تنظیمات پس از ترجمه‌ای کروماتین نقش دارد. در موش‌های نر که SIRT1 حذف شده است، بیضه‌ها کوچک‌تر و تمایز سلول‌های جرمی مختل می‌شود، که منجر به کاهش تعداد اسپرم و باروری می‌شود. این نقایص بیشتر به دلیل اختلالات در فرآیند گذار پروتامین، مرحله‌ای حیاتی برای تراکم کروماتین و مورفولوژی اسپرم، به وجود می‌آیند. به عبارت دیگر، SIRT1 با تراکم مناسب کروماتین و مورفولوژی طبیعی اسپرم مرتبط است و این ارتباط برای حفظ باروری طبیعی حیاتی است (۱۵). مطالعه ما نیز هم‌سو با یافته‌های اخیر بوده و نشان داد که سطح بیان SIRT1 در مردان نابارور سالم بیشتر بود، در حالی که این سطح در مردان نابارور به طور قابل توجهی کمتر بود. این کاهش نشان‌دهنده نقش مهم SIRT1 در فرآیندهای بلوغ و باروری اسپرم در مردان است. علاوه بر این، این ارتباط از نظر آماری معنادار بود ($P < 0.001$)، که اهمیت نتایج به دست آمده را نشان می‌دهد. کاهش بیان ژن SIRT1 در نمونه‌های اسپرم مردان نابارور نسبت به مردان بارور، نشان‌دهنده اختلال در فرآیندهای تنظیمی مرتبط با بقای سلولی، استرس اکسیداتیو و فعالیت میتوکندریایی در اسپرم مردان نابارور است.

SIRT1، به عنوان یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های سلولی، در مسیرهای حیاتی متعددی نقش دارد؛ از جمله تنظیم پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی، تنظیم انرژی سلولی و محافظت در برابر آسیب‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو. کاهش بیان این ژن می‌تواند نقش مهمی در افت کیفیت اسپرم و کاهش توان باروری مردان نابارور ایفا کند. مطالعات متعددی کاهش بیان SIRT1 را با ناباروری مردان مرتبط دانسته‌اند. برای مثال، پژوهش انجام‌شده قبلی نشان داد که کاهش SIRT1 در اسپرم‌ها منجر به آسیب‌های اکسیداتیو شدیدتر و کاهش عملکرد میتوکندریایی می‌شود (۱۶). همچنین، مطالعه‌ای توسط Mao و همکاران (2019) گزارش داد که بیان پایین SIRT1 می‌تواند موجب افزایش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شود که با تخریب DNA و کاهش حرکت اسپرم مرتبط است (۱۷).

SIRT1 نقش کلیدی در جلوگیری از آپوپتوز دارد و با تنظیم ژن‌هایی همچون P53 و FOXO3، بقای سلولی را تضمین می‌کند. کاهش بیان SIRT1 می‌تواند تعادل بین بقا و مرگ سلولی را مختل کرده و منجر به حذف اسپرم‌های سالم شود (۱۸). SIRT1 با فعال‌سازی PGC-1 α عملکرد میتوکندری را بهبود می‌بخشد. کاهش بیان این ژن می‌تواند منجر به کاهش تولید انرژی در اسپرم‌ها و افت حرکت آن‌ها شود (۱۹). ارتباط متقابل این دو ژن از اهمیت بالایی برخوردار است. SIRT1 از طریق مهار مستقیم P53، آپوپتوز را کنترل می‌کند و به بقای سلول‌های سالم کمک می‌کند. کاهش بیان SIRT1 در مردان نابارور ممکن است منجر به افزایش فعالیت P53 و تشدید مرگ سلولی در اسپرم شود.

در این مطالعه، اگرچه ارتباط آماری معنیداری بین میزان بیان ژن‌های p53 و SIRT1 با پارامترهای اسپرمی شامل مورفولوژی، تعداد و حرکت اسپرم مشاهده نشد، اما می‌توان این نتایج را در چارچوب مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با استرس اکسیداتیو تفسیر کرد. استرس اکسیداتیو از طریق ایجاد آسیب DNA در اسپرم منجر به فعال شدن مسیر وابسته به p53 می‌شود که این فعال شدن به نوبه خود می‌تواند باعث القای آپوپتوز و کاهش کیفیت اسپرم گردد (۶). از سوی دیگر، کاهش بیان SIRT1 که به عنوان یک پروتئین داستیلز نقش محافظتی در برابر استرس اکسیداتیو ایفا می‌کند، ممکن است منجر به تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و تشدید آسیب اکسیداتیو در اسپرم شود (۵). نکته قابل توجه این است که تغییرات مولکولی ناشی از استرس اکسیداتیو اغلب در مراحل اولیه و قبل از ظهور تغییرات قابل مشاهده در پارامترهای استاندارد اسپرمی رخ می‌دهند که این موضوع می‌تواند دلیل عدم مشاهده همبستگی معنادار در این مطالعه باشد. علاوه بر این، وجود سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی درون‌زا در اسپرم ممکن است تا حدی اثرات منفی استرس اکسیداتیو را خنثی کند، حتی در شرایطی که تغییرات در بیان ژن‌های کلیدی مانند p53 و SIRT1 رخ داده باشد. این یافته‌ها با مطالعات قبلی که نشان داده‌اند آسیب‌های اکسیداتیو می‌توانند بر کیفیت اسپرم تأثیر بگذارند، همسو است. مهم‌ترین محدودیت این مطالعه، عدم ارزیابی مستقیم مکانیسم‌های مولکولی مانند وضعیت فسفریله شدن p53، سنجش مارکرهای آپوپتوز یا اندازه‌گیری مستقیم سطح استرس اکسیداتیو است که می‌توانست درک بهتری از چگونگی تأثیر این تغییرات بر کیفیت اسپرم ارائه دهد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده با طراحی نمونه‌های بزرگتر، استفاده از چندین ژن مرجع و ارزیابی همزمان پروتئین‌های مرتبط، این

اسپرم مرتبط است. تنظیم تعادل این ژن‌ها می‌تواند نقش حیاتی در مدیریت ناباروری مردان داشته باشد و می‌تواند هدفی بالقوه برای درمان ناباروری مردان باشد. مداخلات مبتنی بر آنتی‌اکسیدان‌ها یا داروهایی که تعادل بین این دو ژن را بازگردانند، ممکن است به بهبود کیفیت اسپرم و افزایش احتمال باروری کمک کنند.

محدودیت‌ها برطرف شوند. بررسی ارتباط این تغییرات مولکولی با نتایج بالینی مانند نرخ بارداری و تولد زنده نیز می‌تواند به درک بهتر اهمیت بالینی این یافته‌ها کمک کند.

در نتیجه، این پژوهش شواهدی ارائه می‌دهد که افزایش بیان p53 و کاهش بیان SIRT1 در مردان نابارور با کاهش کیفیت

REFERENCES

1. Khawar MB, Sohail AM, Li W. SIRT1: A key player in male reproduction. *Life* 2022;12:318.
2. Tatone C, Di Emidio G, Barbonetti A, Carta G, Luciano AM, Falone S, et al. Sirtuins in gamete biology and reproductive physiology: emerging roles and therapeutic potential in female and male infertility. *Hum Reprod Update* 2018;24:267–89.
3. Bell EL, Nagamori I, Williams EO, Del Rosario AM, Bryson BD, Watson N, et al. SirT1 is required in the male germ cell for differentiation and fecundity in mice. *Development* 2014;141:3495–504.
4. Alam F, Syed H, Amjad S, Baig M, Khan TA, Rehman R. Interplay between oxidative stress, SIRT1, reproductive and metabolic functions. *Curr Res Physiol* 2021;4:119–24.
5. Park S-A, Joo N-R, Park J-H, Oh S-M. Role of the SIRT1/p53 regulatory axis in oxidative stress-mediated granulosa cell apoptosis. *Mol Med Rep* 2021;23:20.
6. Li J, Huang X, Luo L, Sun J, Guo Q, Yang X, et al. The role of p53 in male infertility. *Front Endocrinol* 2024;15:1457985.
7. Kang H-J, Rosenwaks Z. p53 and reproduction. *Fertil Steril* 2018;109:39–43.
8. Xu X, Wang Z, Lv L, Liu C, Wang L, Sun Y-n, et al. Molecular regulation of DNA damage and repair in female infertility: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol* 2024;22:103.
9. Raimondo S, Gentile T, Gentile M, Morelli A, Donnarumma F, Cuomo F, et al. p53 protein evaluation on spermatozoa DNA in fertile and infertile males. *J Hum Reprod Sci* 2019;12:114–21.
10. Govindhasamy R, Govindhasamy P, Vanga R, Burute P. Role of TP53 gene polymorphism in male infertility. *International Journal of Infertility & Fetal Medicine*. 2021;12(2):44–8.
11. Raimondo S, Gentile T, Cuomo F, De Filippo S, Aprea GE, Guida J. Quantitative evaluation of p53 as a new indicator of DNA damage in human spermatozoa. *J Hum Reprod Sci* 2014;7:212–7.
12. Zhang X, Xia Q, Wei R, Song H, Mi J, Lin Z, et al. Melatonin protects spermatogonia from the stress of chemotherapy and oxidation via eliminating reactive oxidative species. *Free Radic Biol Med* 2019;137:74–86.
13. Mashayekhi F, Hadiyan S. A single-nucleotide polymorphism in TP53 may be a genetic risk factor for Iranian patients with idiopathic male infertility. *Andrologia* 2012;44:560–4.
14. Loganathan C, Kannan A, Panneerselvam A, Mariajoseph-Antony LF, Kumar SA, Anbarasu K, et al. The possible role of sirtuins in male reproduction. *Mol Cell Biochem* 2021;476:2857–67.
15. Iniesta-Cuerda M, Havránková J, Řimnáčová H, García-Álvarez O, Nevoral J. Male SIRT1 insufficiency leads to sperm with decreased ability to hyperactivate and fertilize. *Reprod Domest Anim* 2022;57:72–7.
16. Wahab F, Rodriguez Polo I, Behr R. SIRT1 expression and regulation in the primate testis. *Int J Mol Sci* 2021;22:3207.
17. Mao B-P, Li L, Yan M, Ge R, Lian Q, Cheng CY. Regulation of BTB Dynamics in Spermatogenesis—Insights From the Adjudin Model. *Toxicol Sci* 2019;172:75–88.
18. Pańczyszyn A, Boniewska-Bernacka E, Wertel I, Sadakierska-Chudy A, Goc A. Telomeres and SIRT1 as Biomarkers of Gamete Oxidative Stress, Fertility, and Potential IVF Outcome. *Int J Mol Sci* 2024;25:8652.
19. Ye F, Wu L, Li H, Peng X, Xu Y, Li W, et al. SIRT1/PGC-1 α is involved in arsenic-induced male reproductive damage through mitochondrial dysfunction, which is blocked by the antioxidative effect of zinc. *Environ Pollut* 2023;320:121084.