

Original article

Identification of Key Genes in Patients with Non-Obstructive Azoospermia

Fatemeh Zahra Mahmoudi¹, Dariush Gholami^{2*}, Ali Mohammadian², Hossein Azizi^{3*}

1. Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

2. Department of Bioinformatics and Applied Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

3. Department of Stem Cells and Cancer, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

* **Corresponding authors.** Tel: +981144442135, Fax: +981144154265, E-mail: d.gholami@ausmt.ac.ir, h.azizi@ausmt.ac.ir

Article info

Article history:

Received: Sep 6, 2025

Accepted: Nov 8, 2025

Keywords:

Non-obstructive

Azoospermia

Spermatogenesis

Hub Gene

ABSTRACT

Background: Non-obstructive azoospermia is one of the most important causes of male infertility. Its main characteristic is the frequent absence of sperm in the semen or a low number of sperm, and it is not fully developed. This study aims to find key genes in non-obstructive azoospermia patients and their role that may affect the biomarkers related to spermatogenesis.

Methods: Using transcriptome and sequencing datasets in the gene expression database (GEO), hub genes related to spermatogenesis were identified. Based on them, gene functional enrichment analysis (GO), gene and genome enrichment pathway analysis (KEGG), protein-protein interaction (PPI) network analysis, cellular analysis, and temporal analysis identified a total of 50 differentially expressed genes, of which, 5 genes related to spermatogenesis (CDC20, BUB1B, CCNB1, CCNA2 and PLK1) have been reported, and the expression of these 5 hub genes was different in each type of sperm cells.

Results: The analysis results of the 5 hub genes showed that these hub genes were expressed in primary spermatocytes, round spermatids, long spermatids, and sperm during spermatogenesis. PLK1 expression was at the highest level. During the differentiation of spermatogonia into primary spermatocytes, CDC20 expression was nearly undetectable, whereas the expression levels of BUB1B, CCNB1, and CCNA2 were elevated compared to that of BUB1B.

Conclusion: The research revealed that these five hub genes exhibit distinct differences in sperm development and may play a crucial role in the differentiation of various sperm cells. This result is crucial for elucidating the pathogenic mechanism of non-obstructive azoospermia and for further research.

How to cite this article: Mahmoudi F.Z, Gholami D, Mohammadian A, Azizi H. Identification of Key Genes in Patients with Non-Obstructive Azoospermia. J Ardabil Univ Med Sci. 2025;25(3):304-318.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

Extended Abstract

Background: Infertility is estimated to affect 10-15% of individuals of reproductive age globally, with male factors contributing to nearly half of these cases. Male infertility can arise from a wide range of conditions-including sexual dysfunction, varicocele, genital tract infections, endocrine disorders, and both obstructive and non-obstructive azoospermia. Among these, non-obstructive azoospermia (NOA) is particularly significant. It affects roughly 1% of all men and accounts for 10-15% of infertile males, making it one of the most important and challenging causes of male infertility. NOA occurs when the testes fail to produce sperm effectively. As a result, affected men have either no sperm in the ejaculate or only extremely small amounts. At the tissue level, the seminiferous tubules are often abnormal: their structure is disrupted, spermatogenic cells fail to mature properly, and meiosis does not progress as it should. Recent research has shown that spermatogenesis in NOA is not uniformly absent. Instead, it tends to be patchy and uneven. Even when most seminiferous tubules show no sperm production, small, localized areas of active spermatogenesis may still exist. This explains why some NOA patients can still achieve biological parenthood. When sperm are successfully retrieved from the testes or epididymis, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) can enable fertilization. However, because this technique bypasses many of the natural selection steps involved in reproduction, it may increase the likelihood that genetic abnormalities are passed on. Current investigations into NOA focus heavily on chromosomal abnormalities, Y-chromosome microdeletions, and epigenetic changes. Yet the gene-expression-level mechanisms behind NOA remain poorly understood. High-throughput technologies, such as transcriptomics and single-cell sequencing, generate massive datasets that require sophisticated bioinformatic analysis. Some studies have identified possible biomarkers-including autophagy-related genes and non-coding RNAs- but these have typically relied on single-gene approaches rather than comprehensive regulatory network analysis. In

this study, we used microarray transcriptome data alongside single-cell RNA-sequencing datasets from NCBI-GEO to identify differentially expressed genes (DEGs). We performed GO and KEGG enrichment analysis, constructed protein-protein interaction (PPI) networks, pinpointed key hub genes, annotated cell clusters, and examined temporal expression patterns. Together, these analyses were designed to clarify how specific genes contribute to normal spermatogenesis and how their disruption may lead to NOA.

Methods: This study followed all required ethical guidelines and was approved by the Ethics Committee of Amol University of Advanced Technologies (IR.ASMT.REC.1403.010). We retrieved the GSE45885 dataset via the GEOQuery package in R (version 4.3.2). To ensure data integrity, we assessed quality using PCA and confirmed the uniformity of pre-normalized expression values with boxplots and violin plots. Differential gene expression between Sertoli-cell-only-only samples and control samples was analyzed using the limma package, applying thresholds of $|\text{fold change}| > 1$ and adjusted $p < 0.05$. After preprocessing and quantile normalization, significant DEGs were analyzed using EnrichR for functional enrichment and visualized with ggplot2. Protein-protein interactions were evaluated through StringDB, and Cytoscape was used to construct the network. We identified the top five hub genes using the cytoHubba plugin.

Results: GO enrichment analysis of DEGs revealed strong associations across biological processes (BP), cellular components (CC), and molecular functions (MF). Most enriched categories belonged to BP and CC. Within BP, the genes were primarily linked to spermatogenesis, multicellular organism development, cell differentiation, spermatid maturation, and sperm motility-biological activities directly tied to reproductive function. In the CC category, the genes were enriched in structures such as microtubules, acrosomal vesicles, and the nucleus, all of which play crucial roles in sperm formation and structure. KEGG pathway analysis further suggested that these DEGs participate in several signaling pathways central to spermatogenesis. These included glycolysis/gluconeogenesis, protein processing in the endoplasmic reticulum, carbon metabolism, and cell-cycle regulation.

Together, the findings reinforce that NOA disrupts pathways responsible for energy production, cytoskeletal organization, and germ-cell development. We selected the GSE45885 dataset, containing testicular biopsy samples from NOA patients with Sertoli-cell-only syndrome and healthy controls, because of its strong data quality and comprehensive expression profiles. To ensure reliable identification of core genes, we assessed key nodes in the PPI network using five cytoHubba algorithms: MCC, Degree, Closeness, Betweenness, and EPC. Only genes that consistently ranked high across all methods, *PLK1*, *CDC20*, *BUB1B*, *CCNB1*, and *CCNA2*, were considered final hub genes. This multi-algorithm approach reduced potential bias compared with relying on any single centrality measure. Figure 5 shows the resulting PPI network, featuring interactions among 50 DEGs. The five overlapping genes were identified as hub genes and displayed the largest node sizes and most intense colors, reflecting their high degree of connectivity. These genes may represent key regulatory points in the molecular pathways that go awry in NOA. Spermatogenesis involves a highly coordinated sequence of events, mitosis, meiosis, and spermiogenesis, ultimately producing mature sperm capable of acquiring energy and undergoing functional maturation in the epididymis. Disruption of any of these stages can lead to NOA and infertility in men. Recent attention has shifted toward transcriptional regulation, as changes in gene expression can impact the development of

multiple germ-cell types. Our analysis of the GSE45885 dataset identified 50 downregulated DEGs in NOA compared with controls. GO enrichment revealed that these genes were concentrated in processes related to sperm formation and function, including spermatogenesis, cell differentiation, spermatid development, sperm motility, and structural organization. KEGG analysis indicated involvement in energy metabolism, protein folding, carbon metabolism, and cell-cycle pathways- mechanisms essential for chromatin remodeling, meiotic progression, and the energy demands of developing germ cells. The five hub genes- *PLK1*, *CDC20*, *BUB1B*, *CCNB1*, and *CCNA2*- exhibited dynamic expression patterns in single-cell datasets, suggesting distinct roles at different stages of germ-cell development. While these genes are well-known regulators of cell division, their specific contributions to human spermatogenesis are not yet fully understood and require further experimental validation.

Conclusion: Overall, our findings identify *PLK1*, *CDC20*, *BUB1B*, *CCNB1*, and *CCNA2* as central regulators of cell-cycle control and germ-cell differentiation. Altered expression of these genes may contribute to the impaired spermatogenesis characteristic of NOA. Clinically, these genes show promise as early diagnostic biomarkers and potential therapeutic targets. Future research, including in vitro and in vivo studies, will be essential to confirm their mechanistic roles and evaluate their potential in clinical applications.

شناسایی ژن‌های کلیدی در بیماران مبتلا به آژواسپرمی غیرانسدادی

فاطمه زهرا محمودی^۱، داریوش غلامی^{۲*}، علی محمدیان^۲، حسین عزیزی^{۲*}

۱. گروه زیست‌فناوری میکروبی، دانشکده زیست‌فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران
۲. گروه بیوانفورماتیک و زیست‌فناوری کاربردی، دانشکده زیست‌فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.
۳. گروه سلول‌های بنیادی، دانشکده زیست‌فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران
*نویسندگان مسئول. تلفن: ۰۱۱۴۴۴۲۱۳۵ فاکس: ۰۱۱۴۴۱۵۴۲۶۵ پست الکترونیک: d.gholami@ausmt.ac.ir, h.azizi@ausmt.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: آژواسپرمی غیرانسدادی یکی از مهم‌ترین علل ناباروری در مردان است. مشخصه اصلی آن عدم وجود مکرر اسپرم در مایع منی یا تعداد کم اسپرم است و به‌طور کامل رشد نکرده است. هدف از این مطالعه یافتن ژن‌های کلیدی در بیماران آژواسپرمی غیرانسدادی و نقش آن‌ها است که ممکن است نشانگرهای زیستی مرتبط با اسپرم‌زایی را تحت تأثیر قرار دهد.

روش کار: با استفاده از مجموعه داده‌های رونویسی و توالی‌یابی در پایگاه داده ژنی بیان ژن (GEO)، ژن‌های هاب مربوط به اسپرم‌زایی شناسایی شد. براساس آن‌ها، آنالیز غنی‌سازی عملکردی ژن (GO)، آنالیز مسیر غنی‌سازی ژن‌ها و ژنوم (KEGG)، آنالیز شبکه تعامل پروتئین-پروتئین (PPI)، تجزیه و تحلیل سلولی و تحلیل زمانی در مجموع ۵۰ ژن با بیان متفاوت شناسایی شد که از این میان، ۵ ژن مربوط به اسپرم‌زایی (*CDC20*, *BUB1B*, *CCNB1*, *CCNA2* و *PLK1*) گزارش شده‌است و بیان این ۵ ژن هاب در هر نوع سلول اسپرم متفاوت بود.

یافته‌ها: نتایج تجزیه و تحلیل از ۵ ژن هاب نشان داد که طی اسپرماتوژنز، ژن‌های هاب در اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید گرد، اسپرماتید دراز و اسپرم بیان شد. بیان *PLK1* در بالاترین سطح بود. در تمایز اسپرماتوگونی و سلول‌های اولیه اسپرماتوسیت اولیه، *CDC20* تقریباً بیان نشد، در حالی که *BUB1B* کم بیان شد و بیان *CCNB1*، *CCNA2* بیشتر از *BUB1B* بودند.

نتیجه‌گیری: تحقیقات نشان داد که این ۵ ژن هاب در مسیر رشد اسپرم متفاوت هستند و ممکن است نقش مهمی در سلول‌های اسپرم مختلف ایفا کنند. این نتیجه برای آشکار کردن مکانیسم بیماری‌زایی آژواسپرمی غیرانسدادی و تحقیقات بیشتر اهمیت زیادی دارد.

واژه‌های کلیدی: آژواسپرمی غیرانسدادی، اسپرم‌زایی، ژن هاب

دریافت: ۱۴۰۴/۶/۱۵ پذیرش: ۱۴۰۴/۸/۱۷

مقدمه

دستگاه تناسلی، غدد درون‌ریز، آژواسپرمی انسدادی، آژواسپرمی غیرانسدادی و غیره دارد [۲]. بروز آژواسپرمی غیرانسدادی در مردان حدود ۱ درصد است که ۱۰ تا ۱۵ درصد مردان نابارور را شامل می‌شود و یکی از مهم‌ترین علل ناباروری مردان است

حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد از افراد در سنین باروری در جهان نابارور هستند که ناباروری مردان حدود ۵۰ درصد را تشکیل می‌دهد [۱]. ناباروری مردان ارتباط نزدیکی با اختلالات عملکرد جنسی، واریکوسل، عفونت

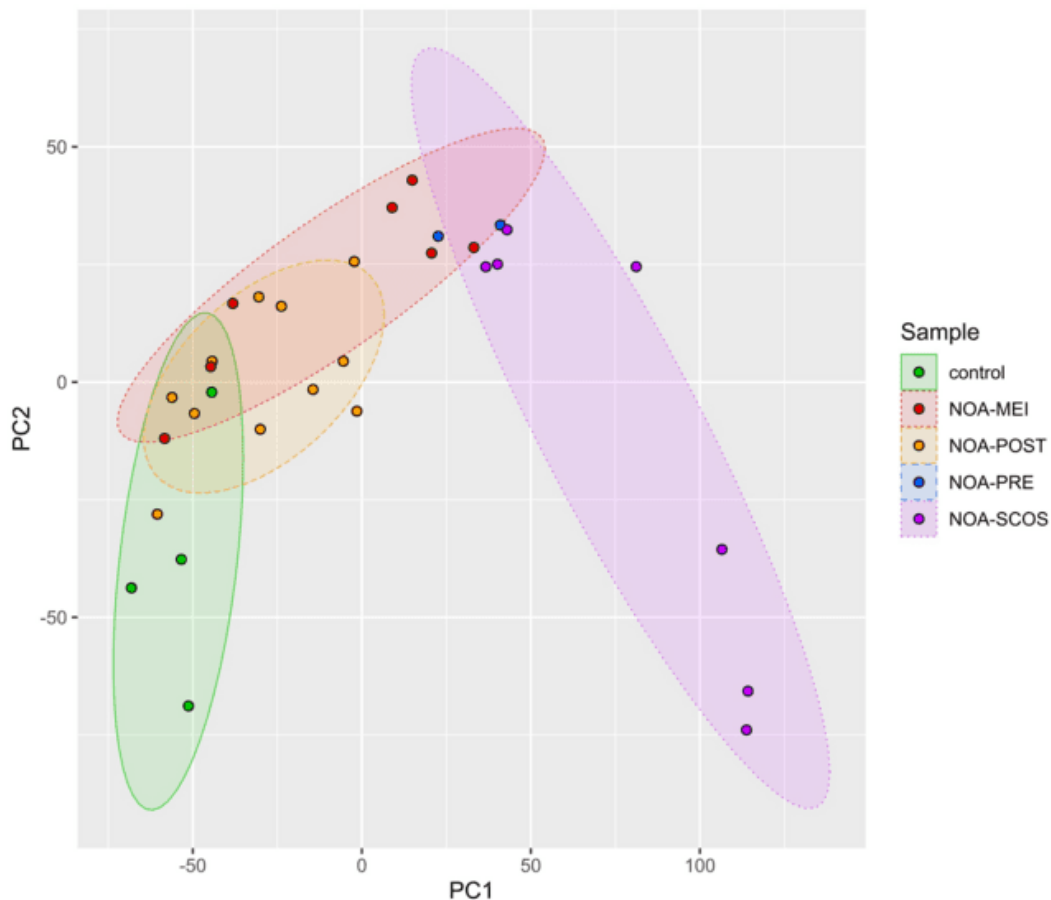
[۳]. آژواسپرمی غیرانسدادی نوعی ناباروری مردانه است که در اثر اختلال اسپرماتوژنیک بافت بیضه ایجاد می‌شود. بیماران مبتلا به آژواسپرمی غیرانسدادی نمی‌توانند اسپرم تولید کنند یا فقط می‌توانند مقدار بسیار کمی اسپرم تولید کنند. در بیماران مبتلا به آژواسپرمی غیرانسدادی، ساختار لوله‌های منی‌ساز در بیضه اختلال دارد، درحالی‌که بلوغ سلول‌های اسپرم‌ساز مسدود می‌شود و میوز سلول‌های اسپرم‌ساز متوقف می‌شود [۴]. در سال‌های اخیر، برخی از مطالعات [۵] نشان داده‌اند که در اختلال اسپرماتوژنز، بافت‌های کانونی و ناهمگن وجود دارد. حتی اگر اسپرم در اکثر لوله‌های اسپرم‌ساز در بافت بیضه یافت نشود، نمی‌توان به‌طور کامل انکار کرد که ممکن است مقدار بسیار کمی اسپرم در برخی از لوله‌های اسپرم‌ساز وجود داشته‌باشد. مطالعات تأیید کرده‌اند که برخی از اسپرم‌های یافت‌شده از بیضه یا اپیدیدیم در بیمارانی که سلول‌های اسپرماتوژنیک آن‌ها در طول میوز متوقف می‌شود، می‌تواند با تشخیص و درمان با تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم باردار شود [۶]. همچنین مطالعاتی وجود دارد که گزارش می‌دهد استفاده از اسپرم‌های گرد یا بلند نیز می‌تواند بیماران را قادر به باروری کند. فناوری تولیدمثل نیاز به مقدار و بلوغ اسپرم را در مقایسه با شرایط لقاح طبیعی بسیار کاهش داده‌است، به‌طوری‌که می‌تواند برای بیماران آژواسپرمی غیرانسدادی برای به دست آوردن فرزندان ژنتیکی به واقعیت تبدیل شود [۷]. از آنجایی که فناوری تولیدمثل مکانیسم انتخاب طبیعی را در فرآیند تشکیل اسپرم دور می‌زند، خطر انتقال نقایص ژنتیکی به نسل بعدی نیز به میزان قابل‌توجهی افزایش می‌یابد. بنابراین، درک عوامل کلیدی که بر روند رشد اسپرم تأثیر می‌گذارند، بسیار مهم است. درحال‌حاضر، تحقیقات روی آژواسپرمی غیرانسدادی عمدتاً بر روی ناهنجاری‌های کروموزومی، ریزحذف کروموزوم Y و اپی‌ژنتیک متمرکز است. بااین‌حال،

موانع اسپرم‌زایی و پاتوژنز مربوط به سطوح بیان ژن هنوز باید مورد بررسی قرار گیرد [۸]. این روش در سال‌های اخیر موجب تولید حجم انبوهی از داده‌های بیان ژنی شده‌است. با این‌حال، افزایش سرسام‌آور حجم داده‌های به‌دست آمده فرایند درک و تفسیر اطلاعات را بسیار مشکل نموده است. جهت رفع مشکل کار با داده‌های مربوط به بیان ژن‌ها روش‌های متعدد بیوانفورماتیکی ایجاد گردیده‌اند که به بهبود درک ما از شروع و توسعه بیماری‌ها در سطح ژنتیکی کمک می‌کند. چند مطالعه قبلی نشانگرهای زیستی بالقوه دخیل در وقوع آژواسپرمی غیرانسدادی را بررسی کرده‌اند [۹]. علاوه‌براین، پژوهشی نیز با استفاده از تحلیل‌های بیوانفورماتیک یکپارچه نشان داد که ژن‌های مرتبط با اتوفآژی می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای بالقوه در NOA باشند [۱۰] و تحلیل بیان RNAهای غیرکدکننده تأکید کرد نقش تنظیم‌کنندگان ncRNA در این فرآیند، مکانیسم‌های جدیدی از پاتوژنز اختلال اسپرم‌زایی را در بیماران مبتلا به آژواسپرمی غیرانسدادی شناسایی کرده‌اند که می‌تواند درک عمیق‌تری از مسیرهای مولکولی این بیماری ارائه دهد [۱۱]. اکثر این مطالعات آژواسپرمی غیرانسدادی را با یک نشانگر منفرد تشخیص داده‌اند. به علاوه، این مطالعات فاقد کاوش در مکانیسم‌های تنظیم نشانگر بودند. بررسی ژن‌های کلیدی مرتبط با بیماری می‌تواند به تجزیه و تحلیل مکانیسم‌های بیولوژیکی ژن‌های کلیدی در تنظیم بیماری کمک کند. بنابراین در این مطالعه، عمدتاً از داده‌های رونویسی ریزآرایه پروفایل بیان ژن و داده‌های توالی‌یابی تک سلولی در پایگاه داده جامع بیان ژن NCBI (NCBI-GEO) استفاده شد. با تجزیه و تحلیل داده‌های رونوشت، ژن‌های با بیان متفاوت (DEGs) بین بیماران با و بدون اختلالات اسپرم‌زایی شناسایی شدند. سپس آنالیز غنی‌سازی عملکرد ژن، تجزیه و تحلیل مسیر غنی‌سازی ژن‌ها و ژنوم (KEGG)، آنالیز شبکه تعامل پروتئین-پروتئین (PPI)

روش کار

این پژوهش براساس دستورالعمل‌های اخلاق، با تأیید کمیته اخلاق دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل و با کد اخلاق IR.ASMT.REC.1403.010 انجام شد. مجموعه داده GSE45885 با استفاده از بسته GEOQuery [۱۲] نرم‌افزار R [۱۳] نسخه ۴.۳.۲ دانلود شد. کیفیت داده‌ها با استفاده از تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) بررسی شد (شکل ۱).

و شناسایی ژن‌های هاب انجام شد. با تجزیه و تحلیل داده‌های توالی یابی تک سلولی اسپرم، خوشه‌های سلولی حاشیه نویسی شد، بیان ژن هاب در سلول آشکار شد و در نهایت تجزیه و تحلیل زمانی ژن هاب برای آشکار کردن نقش ژن هاب در توسعه اسپرم انجام شد.

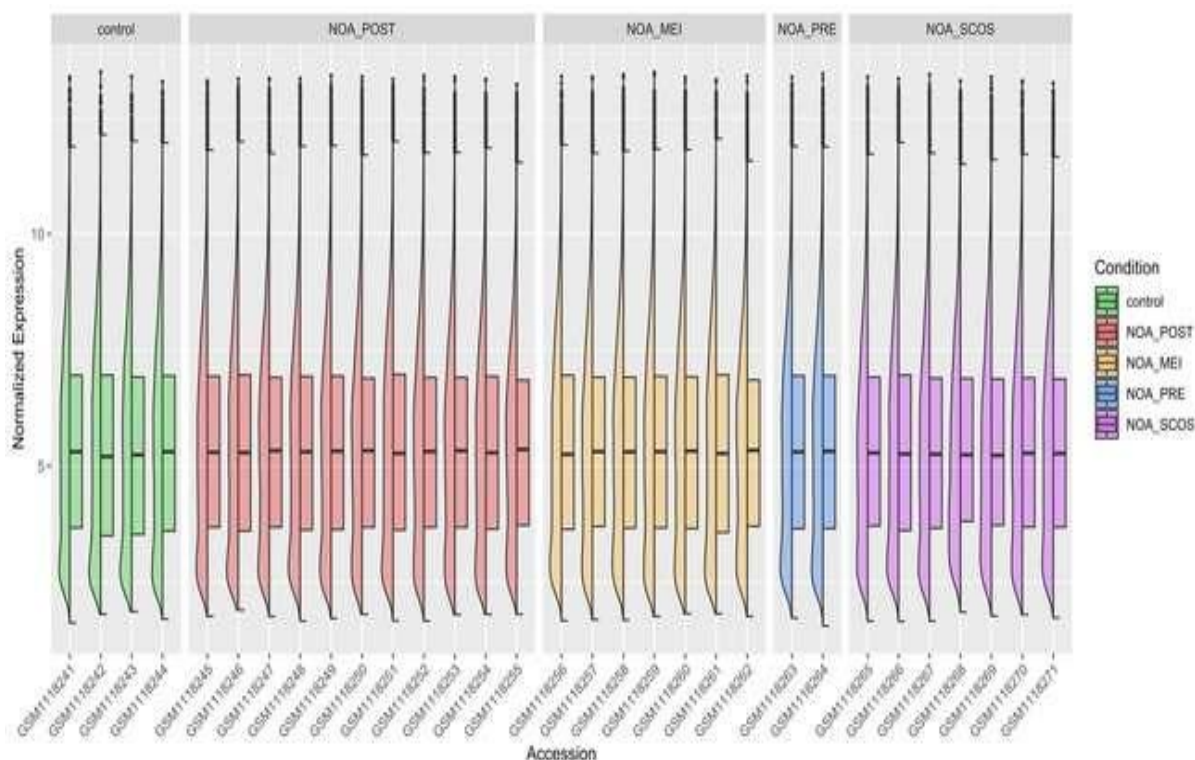


شکل ۱. کنترل کیفیت نمونه‌ها در GEO مجموعه داده GSE45885. الف) تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی PCA بیان ژن در دو مؤلفه اول. نقاط رنگی متفاوت انواع مختلف نمونه را نشان می‌دهد. فاصله اطمینان ۹۵٪ با بیضی رنگ‌های مربوطه نشان داده می‌شود.

چگالی هسته‌ای می‌باشند، توزیع داده‌ها را ارائه می‌دهند. پس از تأیید به هنجارسازی، تغییر میزان بیان ژن‌ها بین گروه‌های سندروم فقط سلول سرتولی و گروه کنترل با استفاده از بسته limma [۱۴] در R به‌دست آمد. آستانه $|\text{foldchange}| > 1$ و $p < 0.05$

داده‌ها قبلاً به شکل هنجارسازی شده ارائه شده بود که با استفاده از نمودارهای جعبه‌ای و ویولن تأیید شد (شکل ۲). نمودارهای جعبه‌ای یک خلاصه پنج عددی از داده‌ها شامل میانه، چارک‌ها، اعداد پرت و در نهایت دامنه‌ی میان چارک‌ها را نشان داده و نمودارهای ویولن که ترکیبی از نمودارهای جعبه‌ای و نمودار

به عنوان آستانه معناداری برای ژن‌های با بیان متفاوت در نظر گرفته شد.



شکل ۲. نمودارهای جعبه‌ای و ویولن نمونه موجود در GSE45885 ادغام شدند. هر نمونه به صورت ترکیبی از نیمی از نمودار ویولن (سمت چپ) و نیمی از نمودار جعبه‌ای (سمت راست) نشان داده شده است. پر کردن هر نمونه، نوع نمونه را نشان می‌دهد (شرح: وضعیت). نمونه‌ها نیز براساس نوع نمونه بر روی محور X قرار می‌گیرند.

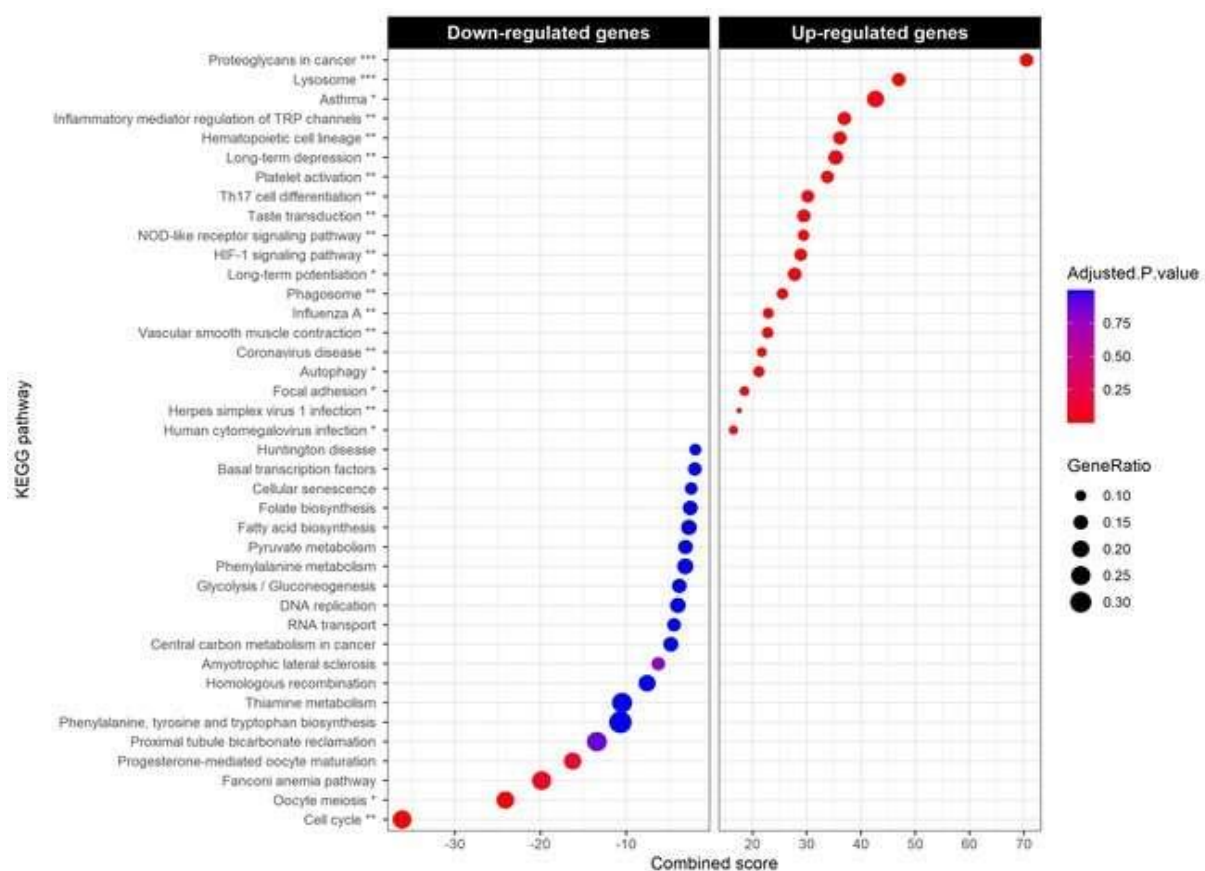
معناداری تعامل استفاده شد. شبکه حاصل با استفاده از Cytoscape [۱۸] نسخه ۳.۱۰.۱ ترسیم شد و با استفاده از افزونه cytoHubba [۱۹] cytoscape آنالیز شد. پنج پروتئین با بالاترین درجه گره به عنوان ژن هاب انتخاب شدند.

یافته‌ها

تجزیه و تحلیل غنی‌سازی عملکردی GO و تحلیل مسیر KEGG

در تجزیه و تحلیل مسیر KEGG، مشخص شد که این ژن‌های کاندید ممکن است بر مسیرهای سیگنال‌دهی اسپرماتوژنز از جمله گلیکولیز / گلوکونوژنز، پردازش پروتئین در شبکه آندوپلاسمی، متابولیسم کربن و چرخه سلولی تأثیر بگذارند (شکل ۳).

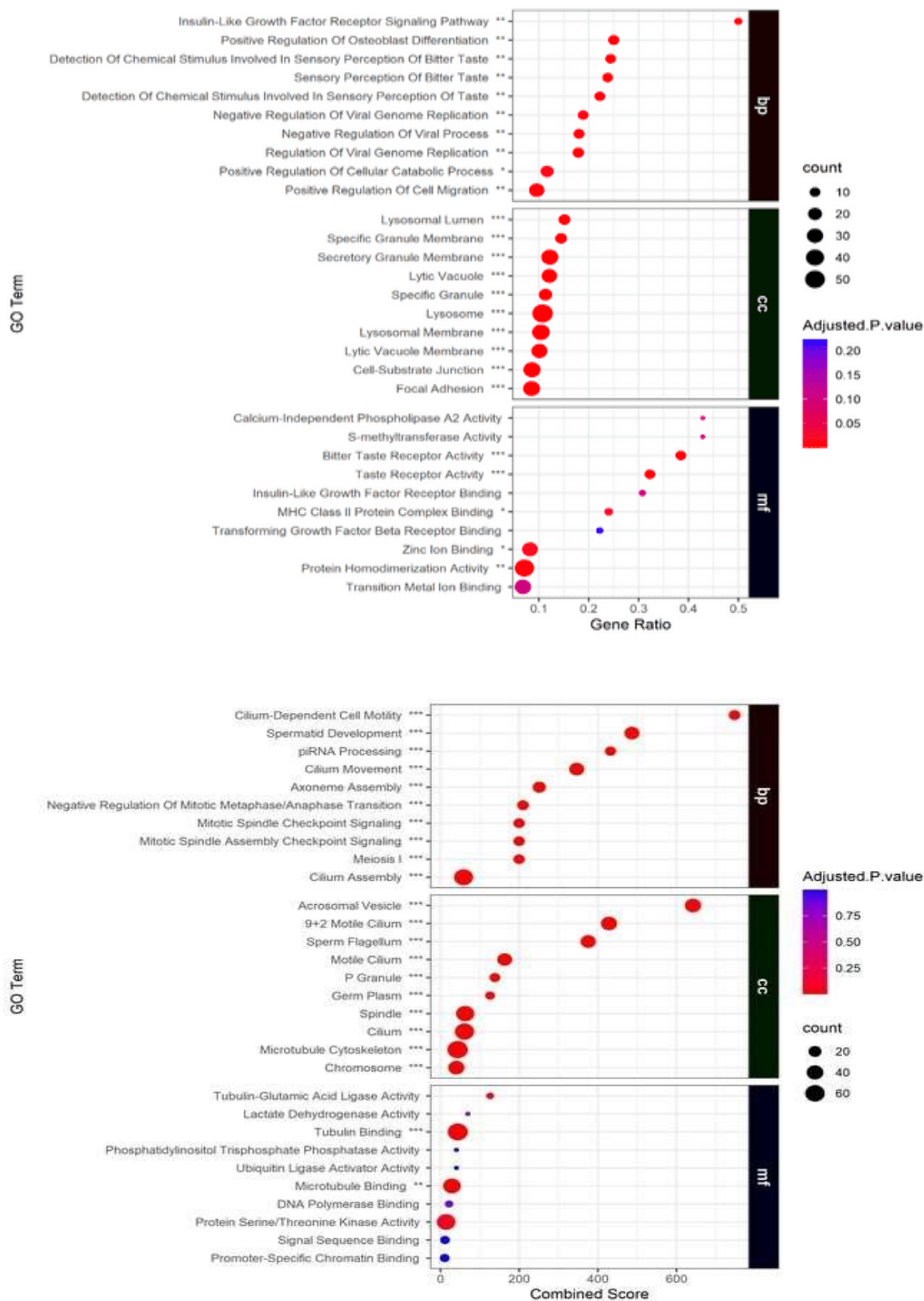
داده‌های خام شامل ماتریس‌های بیان ژنی از نوع microarray بودند. این داده‌ها چهار نمونه کنترل و چهار نمونه از بیماران مبتلا به آرواسپرمی غیرانسدادی را شامل شدند. پردازش اولیه شامل حذف مقادیر مفقود، تصحیح پس‌زمینه و نرمال‌سازی با استفاده از روش quantile normalization در بسته limma انجام شد. خروجی این مرحله، ماتریس هنجارشده‌ی بیان ژن‌ها بود. در ادامه، ژن‌های با بیان متفاوت با استفاده از مدل خطی تعمیم‌یافته در بسته limma (تابع lmFit) شناسایی شدند. سپس برای بررسی غنی‌سازی عملکردی، خروجی ژن‌های معنادار به پایگاه EnrichR [۱۵] ارسال شد و نتایج با استفاده از بسته ggplot2R [۱۶] به تصویر کشیده شد. سپس StringDB [۱۷] برای بازیابی تعامل‌های پروتئین-پروتئین استفاده شد. آستانه پیش فرض ۰/۴ برای



شکل ۳. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر KEGG.

(شکل ۴). در دسته CC، عمدتاً در میکروتوبول، وریکول آکروزوم و هسته غنی شده بودند (شکل ۴). این یافته نشان داد که عملکردهای بیولوژیکی قابل توجه بر تامین انرژی و ساخت اسکلت سلولی در طول رشد اسپرم متمرکز شده است.

نتایج تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی در فرآیندهای بیولوژیکی (BP)، اجزای سلولی (CC) و عملکردهای مولکولی (MF) در DEGها ارتباطی معنادار داشتند. در این تحقیق DEGها در شرایط BP و CC غنی شده‌اند. در دسته BP، عمدتاً در اسپرماتوژنز، رشد ارگانیسم چند سلولی، تمایز سلولی، توسعه اسپرماتید و تحرک اسپرم غنی شده بودند



شکل ۴. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر GO (Bp: biological process, Cc: cellular component, Mf: molecular function)

تجزیه و تحلیل شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین (PPI)

مجموعه داده GSE45885 شامل نمونه‌های بیوپسی بافت بیضه از بیماران مبتلا به آژواسپرمی غیرانسدادی^۱ و نمونه‌های کنترل سالم بود. به دلیل کیفیت بالا، داده‌های هنجار شده و تعداد مناسب نمونه‌ها، این مجموعه داده برای تحلیل انتخاب شد. برای افزایش اطمینان، ژن‌های کلیدی براساس پنج الگوریتم مختلف (Closeness, Degree, MCC, cytoHubba و Betweenness EPC) در افزونه‌ی

انتخاب شدند و تنها ژن‌هایی که در تمامی الگوریتم‌ها دارای رتبه‌ی بالا بودند (*BUB1B*, *CDC20*, *PLK1*, *CCNB1* و *CCNA2*) به عنوان ژن‌های هاب نهایی گزارش شدند (جدول ۱). این انتخاب چندمعیاره سبب کاهش بایاس ناشی از انتخاب یک شاخص منفرد (مانند Degree) گردید. اگرچه الگوریتم‌های دیگری نیز در cytoHubba موجود هستند، تحلیل حساسیت نشان داد که نتایج پنج الگوریتم فوق از همپوشانی بالایی برخوردارند و افزودن الگوریتم‌های بیشتر تغییری معنادار در ژن‌های برتر ایجاد نمی‌کرد.

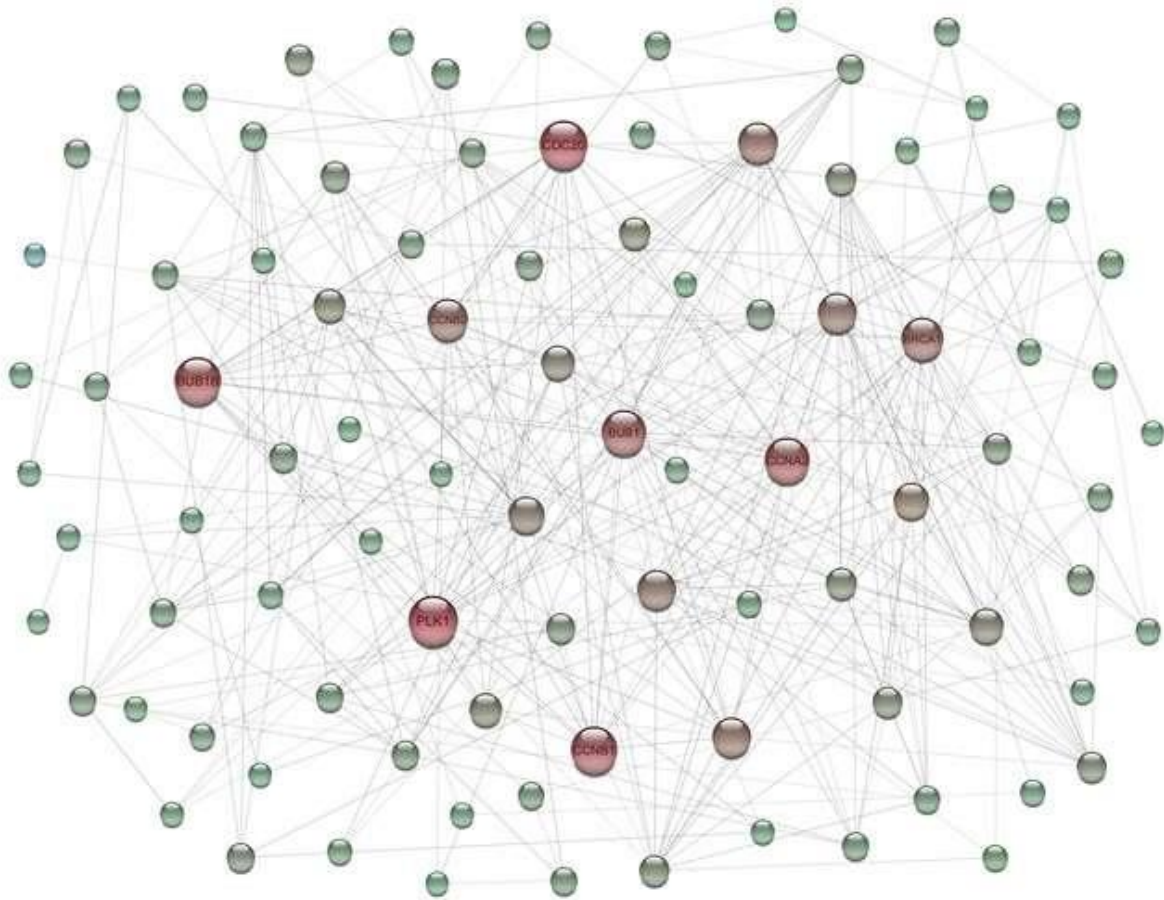
^۱ Sertoli-cell Only Syndrome

جدول ۱. پنج پروتئین با بالاترین درجه گره به عنوان ژن هاب در آژواسپرمی غیرانسدادی

Gene Name	Degree	BetweennessCentrality	ClosenessCentrality
<i>PLK1</i>	103	0.06189711	0.29773601
<i>CDC20</i>	98	0.022469738	0.288911917
<i>BUB1B</i>	94	0.015045648	0.288553095
<i>CCNB1</i>	93	0.032649774	0.301405405
<i>CCNA2</i>	89	0.0075894	0.288732394

شکل ۵، شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین (PPI)، تعامل ۵۰ DEG را نشان می‌دهد. این ژن‌های هاب ادغام شده و سپس ۵ مورد از آن‌ها در پنج الگوریتم همپوشانی داشتند. این ۵ ژن هاب به عنوان ژن‌های کلیدی در نظر گرفته شدند. در شبکه حاصل سائز و

رنگ گره‌ها براساس میزان درجه آن‌ها در شبکه تعیین شده است (رنگ قرمز و اندازه بزرگ نشان‌دهنده پروتئین‌های با بالاترین درجه گره به عنوان ژن‌های هاب نسبت به سایر ژن‌ها در بیماری آژواسپرمی غیرانسدادی است).



شکل ۵. شبکه تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) از DEGs و شناسایی ژن‌های هاب

بحث

فرآیند اسپرم‌زایی به سه مرحله میتوز، مرحله میوز و مرحله تشکیل سلول اسپرم تقسیم می‌شود. اسپرم بالغ در مجرای لوله‌های منی‌ساز آزاد می‌شود و برای انرژی و ذخیره‌سازی به بافت اپیدیدیم مهاجرت می‌کند [۲۰]. در کل فرآیند اسپرم‌سازی، هرگونه ناهنجاری در هر پیوند می‌تواند منجر به آزواسپرمی غیرانسدادی شود که می‌تواند منجر به ناباروری در مردان شود [۲۱]. فرآیند اسپرم‌زایی فرآیند پیچیده‌ای است که شامل مکانیسم‌های تنظیمی مختلفی است که در میان آن‌ها تنظیم سطح رونویسی ژن در سال‌های اخیر کانون تحقیقاتی بوده است [۲۲]. تعدادی از مطالعات نشان داده‌اند [۲۳] که تغییرات در ژن‌های رونویسی می‌تواند بر رشد انواع مختلف

سلول‌های اسپرم تأثیر بگذارد و در نهایت منجر به بروز آزواسپرمی غیرانسدادی شود. در تحلیل داده‌های مجموعه‌ی GSE45885، دو زیرمجموعه‌ی اصلی شامل گروه کنترل (GSM1118243) و گروه بیماران مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی (GSM1118271) مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه این دو گروه نشان داد که ۵۰ ژن با بیان متفاوت به‌طور مشترک بین هر دو گروه شناسایی شدند، به این معنی که این ژن‌ها در بیماران نسبت به کنترل به‌صورت معناداری کاهش بیان داشتند. تجزیه و تحلیل بعدی GO نشان داد که این ژن‌ها عمدتاً در دسته BP شامل اسپرم‌زایی، رشد ارگانیسم‌های چند سلولی، تمایز سلولی، توسعه اسپرماتید و تحرک اسپرم و همچنین در دسته CC شامل مژک متحرک،

میکروتوبول، وزیکول آکروزوم و هسته غنی شده‌اند. این‌ها همچنین کانون‌های تحقیقاتی در مورد ناباروری مردان از سطح رونوشت در سال‌های اخیر هستند [۲۴]. نتایج تجزیه و تحلیل مسیر KEGG نشان داد که مسیرهایی که DEG‌ها ممکن است بر رشد اسپرم تأثیر بگذارند عمدتاً در گلیکولیز/گلوکونئوژنز، پردازش پروتئین در شبکه آندوپلاسمی، متابولیسم کربن و چرخه سلولی غنی شده بودند. مطالعات نشان داده‌اند که متابولیسم تک‌کربنی ممکن است بر اسپرم‌زایی تأثیر بگذارد و منجر به ناباروری در مردان شود. پردازش پروتئین در مسیر سیگنال‌دهی شبکه آندوپلاسمی بر یوبی کوئیتیناسیون هیستون و استیلناسیون در طول تشکیل اسپرم تأثیر می‌گذارد که برای رشد اسپرم بسیار مهم است [۲۵]. در مطالعات پروتئومی مشخص شد که مسیر گلیکولیز/گلوکونئوژنز بین افراد عادی و بیماران مبتلا به آستروزواسپرمی متفاوت است، اما تاکنون گزارشی مبنی بر ارتباط بین گلیکولیز/گلوکونئوژنز و بیماران آرواسپرمی غیرانسدادی وجود ندارد.

در مجموع پنج ژن هاب توسط پنج الگوریتم مختلف در افزونه cytoHubba، به‌دست آمد که در چندین الگوریتم همپوشانی دارند. پس از مشورت با اسناد پایگاه داده مانند NCBI، برای اولین بار در مطالعه حاضر، پنج ژن شناسایی شدند که ممکن است ارتباط نزدیکی با اسپرم‌زایی داشته باشند (*BUB1B*, *CDC20*, *CCNB1* و *PLK1*).

به‌منظور مطالعه بیشتر بیان *BUB1B*, *CDC20*, *CCNB1* و *PLK1* در سلول‌های اسپرم برای ادغام و تجزیه و تحلیل مجموعه داده‌های توالی‌یابی تک‌سلولی مربوطه استفاده شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در طی اسپرماتوژنز، ژن‌های هاب در اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید گرد، اسپرماتید دراز و اسپرم بیان شد. بیان *PLK1* در بالاترین سطح بود. در تمایز اسپرماتوگونی و سلول‌های اولیه اسپرماتوسیت اولیه، *CDC20* تقریباً بیان نشد،

درحالی‌که *BUB1B* کم بیان شد و بیان *CCNB1*، *CCNA2* بیشتر از *BUB1B* بودند. نتایج نشان داد که بیان این پنج ژن در فرآیند تکوین اسپرم متفاوت است و ممکن است تفاوت‌هایی در مکانیسم آن‌ها وجود داشته باشد که بر اسپرم‌زایی تأثیر می‌گذارد. مکانیسم‌های بالقوه اسپرم‌زایی عمدتاً عبارتند از: (۱) ساختار عملکردی و ترکیب سلولی اسپرم‌زایی، مانند سد خونی بیضه، لوله‌های اسپرم‌ساز، سلول‌های اسپرم‌ساز و سلول‌های سوماتیک بیضه و غیره. (۲) کل فرآیند اسپرم‌زایی و سینتیک ظهور اسپرم. (۳) تنظیم غدد درون‌ریز اسپرماتوژنز و (۴) تنظیم موضعی اسپرماتوژنز بیضه و غیره می‌باشد [۲۶].

سلول‌های اسپرم مسیرهای رشدی واضحی دارند. مسیر ژن‌های *CCNA2*, *CCNB1*, *BUB1B*, *CDC20* و *PLK1* در رشد اسپرم ساخته شد و مشخص شد که بیان ژن *PLK1* همیشه در سطح پایینی حفظ می‌شود. ژن *CCNA2* در طول فرآیند از تمایز اسپرماتوگونی به تولید اسپرم ۳ برابر افزایش را نشان داد. ژن‌های *BUB1B*, *CCNB1* و *CDC20* روند صعودی آهسته‌ای را در طول کل فرآیند از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تا تشکیل اسپرم نشان داد. درحال حاضر، مقالات کمی در مورد ارتباط بین رشد اسپرم و ژن‌های *CDC20*, *BUB1B*, *CCNB1* و *CCNA2* و *PLK1* وجود دارد. بااین‌حال، ژن *CCNA2* متعلق به خانواده cyclin است که اعضای آن با برهمکنش با CDK کینازها، پیشرفت چرخه سلولی را تنظیم می‌کنند [۲۷]، اما اینکه آیا این ژن با رشد اسپرم مرتبط است یا خیر، هنوز باید بیشتر مورد مطالعه قرار گیرد. ژن در شروع فاز S سنتز می‌شود و در هسته قرار می‌گیرد، جایی که کمپلکس سیکلین A2-CDK2 در شروع و پیشرفت سنتز DNA نقش دارد. فسفوریلاسیون *CDC6* و *MCM4* توسط کمپلکس سیکلین A2-CDK2 از تکثیر مجدد DNA در طول چرخه سلولی جلوگیری می‌کند [۲۷] و ژن کد کننده *PLK1* برای اولین بار بیش از ۳۰ سال پیش با تجزیه و

تحلیل جهش یافته‌های نوروبلاست‌های لارو که دارای ناهنجاری‌های متعدد میتوزی بودند تشخیص داده شد. این کیناز به انواع عملکردهای میتوزی و غیرمیتوزی از جمله تجمع سانترومر، بلوغ سانترومر، تکه‌تکه شدن گلژی، سیتوکینز و در ارتباط با سایر کینازهای میتوزی مانند *CDK1* به تکثیر DNA، ورود میتوزی، ترکیب کروموزوم کمک می‌کند [۲۸]. همچنین *CCNB2* و *CCNA2* یک سیکلین مخصوص میوز است. برای میوز در انسان مورد نیاز هستند و در سلول‌های زایای بیضه در انسان بیان می‌شوند و در طول اسپرماتوژنز، تبادل صحیح هیستون به پروتامین باعث تراکم کروماتین می‌شوند و برای تمایز کامل اسپرماتیدها ضروری هستند [۲۹]. همیپتور *BUB1B*، در 1-q15، متعلق به خانواده SAC است. کیناز B را کد می‌کند و در عملکرد دوک و جداسازی کروموزوم نقش دارد. این پروتئین در سانترومر قرار دارد و در مهار کمپلکس محرک آنافاز، به تأخیر انداختن آنافاز و اطمینان از جداسازی مناسب کروموزوم‌ها نقش دارد [۳۰]. He و همکارانش در سال ۲۰۲۱ با استفاده از مجموعه داده‌های رونویسی و توالی‌یابی تک سلولی مهم بالینی در پایگاه داده ژنی بیان ژن (GEO)، ژن‌های هاب کاندید مربوط به اسپرم‌زایی را شناسایی کردند. بر اساس آن‌ها، آنالیز غنی‌سازی عملکردی هستی‌شناسی ژن (GO)، آنالیز مسیر غنی‌سازی دایره‌المعارف ژن‌ها و ژنوم‌های کیوتو (KEGG)، آنالیز شبکه تعامل پروتئین-پروتئین (PPI)، آنالیز مؤلفه‌های اصلی (PCA)، تجزیه و تحلیل خوشه‌ای سلولی و تحلیل شبه‌زمانی در مجموع ۴۳۰ ژن با بیان متفاوت را شناسایی کردند که از این میان سه ژن مربوط به اسپرم‌زایی (*C22orf23*، *TSACC* و *TTC25*) گزارش شده است و بیان این سه ژن هاب در هر نوع سلول اسپرم متفاوت بود. نتایج تجزیه و تحلیل شبه‌زمانی از سه ژن هاب نشان داد که *TTC25* در کل فرآیند رشد اسپرم در حالت بیان کم قرار داشت، درحالی‌که

بیان *C22orf23* دارای دو نوسان در مراحل تمایز اسپرماتوگونی و اواخر اسپرماتوسیت اولیه بود و TSACC روند صعودی از مرحله سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به مرحله اسپرماتوژنز را نشان داد [۳۱]. شن^۱ و همکاران، ارزش بالقوه ژن‌های کاندید در بیماران مبتلا به آرواسپرمی غیرانسدادی با بیان متفاوت (DEGs) را شناسایی کردند. آنالیزهای غنی‌سازی عملکردی و شبکه تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) ساخته شد و ژن‌های هاب را شناسایی کردند. بنابراین، نشان دادند که این مطالعه ژن‌های کلیدی مرتبط با آرواسپرمی غیرانسدادی و عملکردهای بیولوژیکی آن‌ها را شناسایی کرد. علاوه بر این، *CEP55* ممکن است نقش مهمی در پاتوژنز این بیماری ایفا کند که بینش جدیدی را در مورد درمان هدفمند آرواسپرمی غیرانسدادی ارائه می‌دهد [۳۲]. پژوهش حاضر از پایگاه‌های داده عمومی موجود برای ادغام ریزآرایه‌های نمایه بیان ژن و داده‌های توالی‌یابی تک‌سلولی برای تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک استفاده کرد. به این ترتیب، می‌توان نتایج قابل اعتماد و دقیق‌تری به دست آورد. با این حال، برای تأیید رابطه بین این ژن‌ها و اسپرم‌زایی، آزمایش‌های زیست‌شناسی مولکولی مورد نیاز است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که پنج ژن *PLK1*، *CDC20*، *BUB1B*، *CCNB1* و *CCNA2* نقش کلیدی در فرآیند تقسیم سلولی، کنترل چرخه میتوز و تمایز سلول‌های اسپرم دارند. کاهش یا اختلال در بیان این ژن‌ها می‌تواند موجب توقف یا ناهنجاری در اسپرم‌زایی شود. از منظر بالینی، این ژن‌ها می‌توانند به عنوان نشانگرهای زیستی برای تشخیص زودهنگام بیماران مبتلا به آرواسپرمی غیرانسدادی مورد استفاده قرار گیرند. علاوه بر این، مسیرهای دخیل در عملکرد *PLK1* و *CCNB1* اهداف بالقوه‌ای برای

^۱ Shen

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم فاطمه‌زهرا محمودی در رشته زیست‌فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، با کد اخلاق IR.ASMT.REC.1403.010 و با راهنمایی دکتر داریوش غلامی و دکتر حسین عزیزی است. نویسندگان از تمام کسانی که در پیشبرد این مطالعه کمک کردند، نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

طراحی داروهای تعدیل‌کننده‌ی چرخه سلولی در بافت بیضه محسوب می‌شوند. پیشنهاد می‌شود در آینده با انجام آزمایش‌های *in vivo* و *in vitro* امکان مداخله‌ی دارویی بر پایه‌ی این ژن‌ها بررسی گردد تا مسیرهای درمانی جدیدی برای بهبود اسپرماتوژنز فراهم شود.

References

- 1- Gifford JH. The role of WNT signaling in adult ovarian folliculogenesis. *Reproduction*. 2015;150(4):R137-48.
- 2- Arafat M, Har-Vardi I, Harlev A, Levitas E, Zeadna A, Abofoul-Azab M, et al. Mutation in *TDRD9* causes non-obstructive azoospermia in infertile men. *J Med Genet*. 2017;54(9):633-639.
- 3- Wosnitzer M, Goldstein M, Hardy MP. Review of azoospermia. *Spermatogenesis*. 2014;4(1):e28218.
- 4- Kohn TP, Pastuszak AW. Non-obstructive azoospermia and shortened leukocyte telomere length: further evidence linking poor health and infertility. *Fertil Steril*. 2018;110(4):629-630.
- 5- Vij SC, Sabanegh Jr E, Agarwal A. Biological therapy for non-obstructive azoospermia. *Expert Opin Biol Ther*. 2018;18(1):19-23.
- 6- Silber SJ, Van Steirteghem A, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Devroey P. Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. *Fertil Steril*. 1996;66(1):110-117.
- 7- Song J, Gu L, Ren X, Liu Y, Qian K, Lan R, et al. Prediction model for clinical pregnancy for ICSI after surgical sperm retrieval in different types of azoospermia. *Hum Reprod*. 2020;35(9):1972-1982.
- 8- Fang Y, Ji L, Zhu C, Xiao Y, Zhang J, Lu J, et al. Liraglutide alleviates hepatic steatosis by activating the TFEB-regulated autophagy-lysosomal pathway. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:574-602.
- 9- Dong M, Li H, Zhang X, Tan J. Weighted correlation gene network analysis reveals new potential mechanisms and biomarkers in non-obstructive azoospermia. *Front Genet*. 2021;12:133-617.
- 10- Zhong Y, Zhao J, Deng H, Wu Y, Zhu L, Yang M, et al. Integrative bioinformatics analysis to identify novel biomarkers associated with non-obstructive azoospermia. *Front Immunol*. 2023;14:1088-1261.
- 11- Qi Y, Wu Y, Pang K, Cao Y, Li H, Qiao Y, et al. Profiling of circulating extracellular vesicle microRNAs reveals diagnostic potential and pathways in non-obstructive and obstructive azoospermia. *Biol Reprod*. 2024;111(6):1297-1310.
- 12- Davis S, Meltzer PS. GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. *Bioinformatics*. 2007;23(14):1846-1847.
- 13- Core Team R. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna. R Foundation for Statistical Computing; 2020.
- 14- Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(7):e47.
- 15- Xie Z, Bailey A, Kuleshov MV, Clarke DJ, Evangelista JE, Jenkins SL, et al. Gene set knowledge discovery with Enrichr. *Curr Protoc*. 2021;1(3):e90.
- 16- Wickham H. Data Analysis. Springer. 2016.
- 17- Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any

- sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):D638-46.
- 18- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13(11):2498-2504.
- 19- Chin CH, Chen SH, Wu HH, Ho CW, Ko MT, Lin CY. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Syst Biol.* 2014;8:1-7.
- 20- Neto FTL, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology.* Amsterdam: Elsevier; 2016.
- 21- La HM, Hobbs RM. Mechanisms regulating mammalian spermatogenesis and fertility recovery following germ cell depletion. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76:4071-4102.
- 22- Singh V, Jaiswal D, Singh K, Trivedi S, Agrawal NK, Gupta G, et al. Azoospermic infertility is associated with altered expression of DNA repair genes. *DNA Repair.* 2019;75:39-47.
- 23- Law NC, Oatley MJ, Oatley JM. Developmental kinetics and transcriptome dynamics of stem cell specification in the spermatogenic lineage. *Nat Commun.* 2019;10(1):27-87.
- 24- Goto C, Tamura K, Nishimaki S, Maruyama D, Hara-Nishimura I. The nuclear envelope protein KAKU4 determines the migration order of the vegetative nucleus and sperm cells in pollen tubes. *J Exp Bot.* 2020;71(20):6273-6281.
- 25- Kavarthapu R, Anbazhagan R, Sharma AK, Shiloach J, Dufau ML. Linking phosphogonadotropin regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25) to histone ubiquitination and acetylation essential for spermatid development during spermiogenesis. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:31-40.
- 26- Rodríguez-Casuriaga R, Geisinger A. Contributions of flow cytometry to the molecular study of spermatogenesis in mammals. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3):11-51.
- 27- Kanakanthara A, Jeganathan KB, Limzerwala JF, Baker DJ, Hamada M, Nam HJ, et al. Cyclin A2 is an RNA binding protein that controls Mre11 mRNA translation. *Science.* 2016;353(6307):1549-52.
- 28- Manic G, Corradi F, Sistigu A, Siteni S, Vitale I. Molecular regulation of the spindle assembly checkpoint by kinases and phosphatases. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2017;328:105-161.
- 29- Lin YM, Teng YN, Chung CL, Tsai WC, Lin YH, Lin JSN, et al. Decreased mRNA transcripts of M-phase promoting factor and its regulators in the testes of infertile men. *Hum Reprod.* 2006;21(1):138-144.
- 30- Ma Q, Liu Y, Shang L, Yu J, Qu Q. The FOXM1/BUB1B signaling pathway is essential for the tumorigenicity and radioresistance of glioblastoma. *Oncol Rep.* 2017;38(6):3367-3375.
- 31- He H, Yu F, Shen W, Chen K, Zhang L, Lou S, et al. The novel key genes of non-obstructive azoospermia affect spermatogenesis: transcriptomic analysis based on RNA-Seq and scRNA-Seq data. *Front Genet.* 2021;12:608-629.
- 32- Shen Y, Wu X, Li Q, Huang X, Wang J, Zhao L, et al. Identification and potential value of candidate genes in patients with non-obstructive azoospermia. *Urology.* 2022;164:133-139.