

بررسی ارتباط پلی مورفیسیم‌های گلو تاتیون اس ترانسفراز T1 و M1 و الیگواسپرمی شدید

الهه فتاحی^۱، کیومرث صفی‌نژاد^{۲*}، محمدرضا مهرابی^۳

تاریخ دریافت ۱۳۹۴/۰۷/۰۱ تاریخ پذیرش ۱۳۹۴/۰۹/۰۳

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: فاکتورهای مردانه عامل ۲۰ تا ۵۰ درصد موارد ناباروری بوده و ناباروری مردانه با علل آرواسپرمی و الیگواسپرمی با برخی ریسک فاکتورهای ژنتیکی مرتبط می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی وجود ارتباط بین پلی‌مورفیسیم ژن‌های گلو تاتیون اس ترانسفراز T1 و M1 و الیگواسپرمی شدید می‌باشد. **مواد و روش کار:** نوع مطالعه موردی-شاهد بوده و در این مطالعه ۱۰۳ نفر شامل ۵۱ مرد مبتلا به الیگواسپرمی شدید و ۵۲ مرد بارور به‌عنوان کنترل انتخاب شدند. الیگواسپرمی شدید به‌صورت غلظت کم‌تر از $10^6 \times 5$ اسپرم در یک میلی‌لیتر مایع منی تعریف می‌شود. نمونه‌های خون بیماران و افراد سالم جمع‌آوری شده و برای استخراج دئوکسی ریبونوکلیک اسید ژنومی (DNA) مورد استفاده قرار گرفت. پلی‌مورفیسیم‌ها به‌وسیله فن واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه (Multiplex PCR) بررسی شده و داده‌ها به‌وسیله آزمون مربع کای، آزمون دقیق فیشر و آزمون t مستقل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و $P < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: ژنوتیپ‌های نول GSTT1 و GSTM1 در مردان نابارور مبتلا به الیگواسپرمی شدید (GSTT1=41.18% and GSTM1=27.45%) فراوانی بیشتری نسبت به مردان بارور (GSTT1=13.46% and GSTM1=9.62%) نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری: تفاوت‌های حاصله از نظر آماری معنی‌دار بودند. نتایج این مطالعه تأثیر مثبت ژنوتیپ‌های نول GSTT1 و GSTM1 روی فرآیند اسپرم‌زایی را نشان داد.

کلیدواژه‌ها: گلو تاتیون اس ترانسفراز، GSTM1، GSTT1، الیگواسپرمی شدید

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و ششم، شماره دهم، ص ۸۵۱-۸۴۴، دی ۱۳۹۴

آدرس مکاتبه: بروجرد، میدان مدرس، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، تلفن: ۰۶۶۴۲۵۱۸۰۰۱

Email: q_safinejad@yahoo.com

مقدمه

است و از این‌رو این نوع نارسایی را تحت عنوان ناباروری ناشناخته می‌دانند (۱۴). با این‌وجود محققین بر این باورند که آسیب به ترکیبات ژنتیکی اسپرماتوزوآ نقش بسیار حیاتی را در باروری جنس مذکر بازی می‌کند تا آنجایی که اظهار می‌دارند، هرگونه نقص در این ترکیبات می‌تواند، از جمله دلایل اصلی ناباروری در مردان باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهند که بعضی پلی‌مورفیسیم‌های ژنتیکی با آسیب به روند اسپرماتوژنزیس در مردان نابارور همراه بوده و می‌تواند منجر به اختلالاتی همچون الیگواسپرمی و آرواسپرمی ناشناخته شود (۱۳). طبق معیارهای سازمان بهداشت جهانی تعداد اسپرم

بر اساس تعریفی از سازمان بهداشت جهانی، (WHO) ناباروری شکست در تلاش یک زوج برای باروری بدون پیشگیری، پس از یک سال است (۱۷). امروزه ناباروری به‌عنوان یک مسئله مهم جهانی، سلامت تولیدمثلی حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد از زوجین را متأثر نموده که حداقل در میان ۵۰ درصد از آن‌ها، فاکتورهای مردانه به‌عنوان مهم‌ترین عامل ناباروری منجر به زوال و به‌هم‌ریختگی کیفیت مایع منی می‌گردند (۲-۲۱). از نظر آسیب‌شناسی اگرچه عوامل زیادی برای آسیب به باروری مردان وجود دارد ولی در میان حدود ۳۰ درصد از آن‌ها، هنوز هم دلیل اصلی این ناباروری شناسایی نشده

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران

^۲ استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران

میکروملکول‌های سلولی همچون اسیدهای نوکلئیک، لپید و پروتئین‌ها، روند اسپرماتوزیس و فعالیت اسپرماتوزوایی را تحت تأثیر خود قرار دهند (۲۷). در انسان ژن GSTM1 به صورت یک خوشه ژنی متشکل از ژن‌های GSTM1-GSTM5 روی کروموزوم ۳×۱۱p1۳ قرار گرفته است و دارای انواعی از عملکردهای معمول و مهم می‌باشد، افرادی با هموزیگوت حذف جایگاه این ژن فاقد فعالیت آنزیمی سیتوزولی GST-μ می‌باشند (۱۵). گزارشات زیادی دال بر ارتباط این نوع هموزیگوت با افزایش خطر ناباروری در مردان ارائه شده است (۲۲). در یک تحقیق chen، ارتباط پلی‌مورفیسم ژن GSTM1 با ناباروری در مردان واریکوسل را بررسی کرد و نشان داد حذف این ژن در بیماران واریکوسل باعث تخریب عملکرد اسپرم شده و این در نتیجه کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مایع منی در این بیماران به دلیل ژنوتیپ نول GSTM1 می‌باشد (۳). همچنین Aydemir در مطالعه‌ای نشان داد که ژنوتیپ حذفی GSTM1، باعث افزایش آسیب‌های اکسیداتیو در مایع منی و اسپرم مردان، با ناباروری ناشناخته می‌باشد (۱). پلی‌مورفیسم GSTM1 در این بیماران ممکن است به عنوان یک منبع مهم، اسپرماتوزوآ را برای دریافت آسیب‌های اکسیداتیو، مستعد نموده و قطعه قطعه شدن DNA اسپرم را به دنبال داشته باشد (۱۹). از طرف دیگر گروه بتا آنزیم GST انسانی (GSTT) از دو زیر واحد، GSTT1 و GSTT2 تشکیل شده است که هر دو آن‌ها بر روی کروموزوم ۱۱ ۲۲q واقع شده‌اند (۲۶). پلی‌مورفیسم در جایگاه ژنی GSTT1 ناشی از حذف ژنی نیز می‌تواند در افرادی با ژنوتیپ تهی، فقدان مجازی فعالیت آنزیم را در پی داشته باشد (۱۶). مطالعات گذشته به وجود، ارتباط احتمالی میان ژنوتیپ تهی GSTT1 با مستعد شدن فرد برای بیماری‌هایی همچون سرطان، دیابت و نارسایی‌های قلبی عروقی اشاره دارند، ولی به ارتباط احتمالی این نوع ژنوتیپ با ناباروری در مردان توجهات کم‌تری شده است (۲۷). Wu مطالعه‌ای بر روی مردان شمال غربی چین انجام داد، نتایج نشان داد که گاهاً ژنوتیپ تهی GSTT1 زمینه را برای داشتن نارسایی‌های همچون آروزپرمی و اولیگواسپرمی ناشناخته، مهیا می‌سازد (۲۷). همچنین در مطالعه دیگری که بر روی مردان نابارور چینی دارای واریکوسل انجام شد، نشان داد که آسیب‌های اکسیداتیو می‌تواند دلیل ناباروری در بیماران واریکوسلی باشد و ژنوتیپ نول GSTT1 خطر آسیب‌های اکسیداتیو را در بیماران دارای واریکوسل تا حدی افزایش می‌دهد (۲۸). به هر حال بررسی‌های گسترده محققین حاکی از آن هستند که میان این نوع ژنوتیپ (ژنوتیپ تهی) در ژن‌های GSTM1 و GSTT1 با ناباروری ناشناخته در مردان ارتباط و هماهنگی وجود دارد (۲۴). با

کمتر از ۲۰ میلیون در هر میلی‌لیتر را الیگواسپرمی^۱ تحرک کمتر از ۵۰ درصد را آستنواسپرمی^۲ و ریخت‌شناسی^۳ کمتر از ۳۰ درصد را تراواسپرمی^۴ در مایع انزال شده غیرطبیعی است و می‌تواند باعث ناباروری فرد شود. Severe Oligozoospermia نمونه‌هایی هستند که در آن‌ها، تعداد اسپرم در هر میلی‌لیتر مایع انزالی کمتر از ۵ میلیون باشد (۱۸). اسپرم به دلیل وجود اسیدهای چرب غیراشباع فراوان در سطح غشای پلاسمایی و همچنین به دلیل کمبود آنزیم‌های محافظتی در سیتوپلاسم در برابر استرس‌های اکسیداتیو بسیار آسیب‌پذیر است. منشأ تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS) در مایع منی ابتدا خود اسپرماتوزوآ و سپس لوکوسیت‌های چندهسته‌ای است (۷). بدن در مقابل استرس اکسیداتیو بی‌دفاع نیست، آنزیم گلووتاتیون اس ترانسفراز (GST) به عنوان مهم‌ترین سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی شناخته شده که قادر است بر علیه استرس اکسیداتیو موجب کاهش گونه‌های واکنش‌گر اکسیژنی به مواد متابولیکی با فعالیت کم‌تر، شده (۵) و آسیب‌های DNA ناشی از لیپید پراکسیداز، تولیدات داخلی را به راحتی برطرف نماید (۱۰). بنابراین، هر نوع تغییر در ژن‌های کدکننده آنزیم گلووتاتیون اس ترانسفراز که منجر به کاهش یا فقدان فعالیت آنزیم شود، می‌تواند برای بررسی وضعیت استرس اکسیداتیو ناباروری حائز اهمیت باشد. هر گونه افزایش در سطح ملکول‌های موسوم به گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS) می‌تواند به عنوان عاملی مهم در ناباروری مردان تلقی شوند (۲۳)، چرا که این گونه‌ها قادرند از طریق استرس اکسیداتیو و آسیب به رشته DNA و شکستن آن، اسپرم‌ها را متأثر نموده و موجبات این ناباروری یا حداقل کم باروری را فراهم آورند. گلووتاتیون اس ترانسفراز به خانواده بزرگ آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو فاز II تعلق دارند که در دتوکسیفیکاسیون انواعی از مواد فیزیولوژیکی درون سلولی شرکت می‌کنند (۱۱). دانش امروزه GSTها را در ۸ گروه طبقه بندی می‌کند که شامل: آلفا، مو، کاپا، امگا، پی، سیگما، تتا و زتا می‌باشند که اساس این تفاوت در توالی آمینواسیدی آن‌ها می‌باشد، این ۸ گروه به ترتیب توسط ژن‌های GSTA، GSTM، GSTK، GSTO، GSTP، GSTS، GSTT و GSTZ کدگذاری می‌شوند (۲۲). علاوه بر این هر گروه خود نیز دارای چندین ژن و ایزوآنزیم نیز می‌باشد (۹). آنزیم گلووتاتیون اس ترانسفراز یک ترنسپورتر (انتقال دهنده) زیستی بوده که در اتصال و پیوستگی انواعی از ترکیبات اندوژن و اگزوژن از جمله توکسین‌ها (سموم) یا کارسینوژن‌ها (سرطان زا) که متابولیسم آن‌ها با کاهش گلووتاتیون همراه است، ایفای نقش می‌کند (۸-۲۵). هرگونه کاهش در GST ناشی از واکنش مواد الکتروفیلیک، می‌تواند با اثر بر روی

³ Morphology⁴ Teratozoospermia¹ Oligozoospermia² Asthenozoospermia

R: 5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3'

B-Globin:

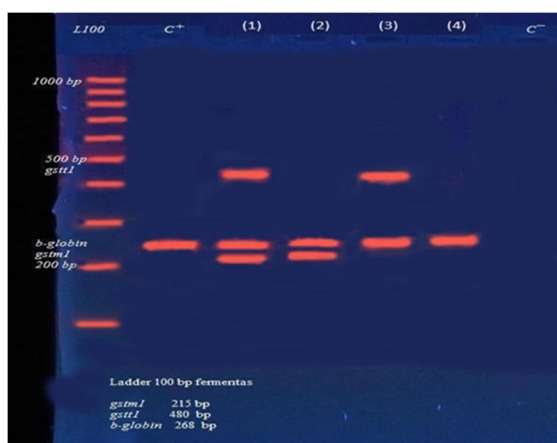
F: 5'- CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC -3'

R: 5'- GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC -3'

واکنش PCR جهت تکثیر DNA برای ۳۵ چرخه در دستگاه ترموسایکلر اجرا شد و در پی آن الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR روی ژل آگارز انجام گرفت. مقایسه فراوانی ژنوتیپ نول و مثبت GSTM1 و GSTT1 بین دو گروه بیمار و شاهد از طریق آزمون‌های t و آزمون دقیق فیشر، chi-square و آزمون مربع کای انجام گرفت.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر ۵۱ بیمار الیگواسپرمی شدید با میانگین سنی ۳۵-۲۰ و ۵۲ مرد سالم با میانگین سنی ۳۷-۲۰ مورد مطالعه قرار گرفتند. از تمام بیماران و گروه شاهد رضاینامه کتبی گرفته شد. قطعات DNA حاصل از تکثیر ژن GSTM1 و GSTT1 به ترتیب دارای طول ۴۸۰ و ۲۱۵ جفت باز طول می‌باشند و قطعات DNA حاصل از تکثیر ژن B-globin ۲۶۸ جفت باز طول دارد. نمونه‌های منفی فقدان هر کدام از ژن‌های GSTM1 و GSTT1 به‌طور جداگانه و یا با هم در حضور ژن B-Globin بیانگر ژنوتیپ نول برای هر کدام است. در نمونه‌های مثبت وجود هر کدام از ژن‌ها به‌طور جداگانه و یا با هم در حضور ژن B-Globin بیانگر ژنوتیپ وحشی است. در تصویر شماره ۱، L نشانگر Ladder یا ساینز مارکر، ستون یک کنترل مثبت و ستون آخر کنترل منفی می‌باشد (شکل ۱).



شکل (۱): محصولات Multiplex PCR ژن‌های GSTT1، GSTM1، B-globin

میزان حذف ژن GSTM1 و GSTT1 در گروه بیمار (الیگو اسپرمی شدید) و گروه شاهد (سالم) متفاوت بود، که این تفاوت

این حال برای اثبات این مهم و کمک به حفظ باروری در این افراد، تحقیقات بیشتر ضروری به نظر می‌رسد، این ضرورت ما را بر آن داشت تا با ارائه مطالعه حاضر، بر روی آنالیز و بررسی این مهم متمرکز شویم.

مواد و روش کار

این مطالعه موردی- شاهد روی نمونه خون محیطی ۵۱ بیمار مبتلا به الیگواسپرمی شدید با میانگین سنی ۲۰-۳۵ سال مراجعه کننده به بیمارستان فاطمیه همدان و کلینیک شفق پارس بروجرد و ۵۲ مرد سالم دارای حداقل یک فرزند با میانگین سنی ۲۰-۳۷ انجام گرفت. بررسی مردان نابارور دارای الیگواسپرمی شدید شامل بررسی سابقه بیمار، سابقه خانوادگی، آنالیز مایع منی و تست‌های آزمایشگاهی شامل مشخصات هورمونی بود. الیگو اسپرمی شدید به‌صورت غلظت کم‌تر از 5×10^6 اسپرم در یک میلی‌لیتر مایع منی تعریف می‌شود. عوامل مختلفی از قبیل سن، گروه خونی و شغل از پرونده بیماران استخراج شده و سپس هر دو گروه شاهد و مورد از نظر پلی مورفیسم در ژن‌های GSTM1 و GSTT1 مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA ژنومی: از تمام افراد مورد مطالعه پنج میلی‌لیتر خون محیطی دریافت شد و نمونه‌های خون به لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA منتقل شد و تا زمان استخراج DNA در دمای -20°C نگهداری شدند. از تمام نمونه‌های خون استخراج DNA به روش salting out از گلوبول‌های سفید انجام گرفت. بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام گرفت.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (multiplex PCR): برای

تشخیص حذف هموزیگوت در ژن‌های GSTM1 و GSTT1 با استفاده از روش multiplex PCR سه جفت پرایمر، (یک جفت پرایمر GSTT1، یک جفت پرایمر GSTM1 و یک جفت پرایمر B-Globin (به‌عنوان کنترل داخلی) مورد استفاده قرار گرفت. توالی سه جفت پرایمر (GSTT1، GSTM1، B-globin) مورد استفاده در این مطالعه به ترتیب به شرح زیر می‌باشد که هر جفت از این پرایمرها به‌ترتیب قطعات ۴۸۰، ۲۱۵، ۲۶۸ جفت بازی را تکثیر می‌دهند.

GSTT1:

F: 5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3'

R: 5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3'

GSTM1:

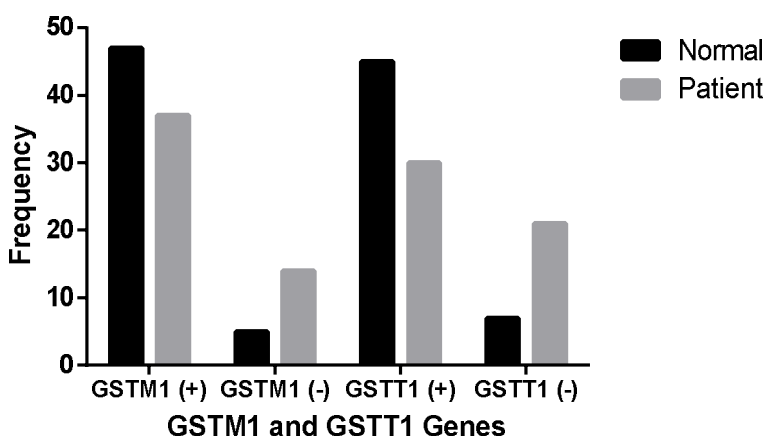
F: 5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3'

۹/۶۲ درصد بود. در حالی که حذف برای ژن GSTT1 در دو گروه بیمار و سالم به ترتیب، ۴۱/۱۸ و ۱۳/۴۶ درصد به دست آمد. که این مقادیر در جدول شماره یک نشان داده شده است.

براساس آزمون مربع کای، برای ژن GSTM1 در سطح ($P < 0.05$) و برای ژن GSTT1 در سطح ($P < 0.01$) معنی دار شد. میزان حذف برای ژن GSTM1 در دو گروه بیمار و سالم به ترتیب، ۲۷/۴۵ و

جدول (۱): درصد میزان حضور و عدم حضور ژن های GSTM1 و GSTT1 در دو گروه شاهد و بیمار

ژن	ژنوتیپ	تعداد مورد (درصد)	تعداد شاهد (درصد)	P-value
GSTM1	حذف (null)	۱۴ (۲۷/۴۵)	۵ (۹/۶۲)	۰/۰۲
	حضور (presence)	۳۷ (۷۲/۵۵)	۴۷ (۹۰/۳۸)	
GSTT1	حذف (null)	۲۱ (۴۱/۱۸)	۷ (۱۳/۴۶)	۰/۰۰۲
	حضور (presence)	۳۰ (۵۸/۸۲)	۴۵ (۸۶/۵۴)	
GSTM1 و GSTT1	حذف هر دو ژن	۵ (۹/۸۰)	۰ (۰)	۰/۰۰۰۴
	حذف یکی از ژن ها	۲۵ (۴۹/۰۲)	۱۲ (۲۳/۰۸)	
	حضور هر دو ژن	۲۱ (۴۱/۱۸)	۴۰ (۷۶/۹۲)	



نمودار (۱): میزان حضور و عدم حضور ژن های GSTM1 و GSTT1 در دو گروه کنترل و بیمار

آزمون ارتباط بین ژن ها و ریسک الیگو اسپرمی (Relative Risk) نیز انجام گردید. که این میزان برابر ژن های GSTM1 و GSTT1 به ترتیب ۲/۴ و ۲/۱ به دست آمد. برآورد آزمون نسبت شانسی (Odds Ratio) نیز برای هر دو ژن انجام شد که این میزان نیز برابر ژن های GSTM1 و GSTT1 به ترتیب ۳/۵ و ۴/۵ محاسبه شد. این مقادیر نیز گویای ارتباط معنی دار حضور ژن ها با الیگو اسپرمی دارد. این امر بدین معنی است که عدم وجود این ژن ها ریسکی برای الیگو اسپرمی محسوب می شود. (جدول شماره ۲)

طبق آزمون دقیق فیشر قدرت ارتباط بین ژن های GSTT1 و GSTM1 و بیماری الیگواسپرمی به دو صورت بررسی شد (Odds ratio, Relative Risk)، و نتایج نشان می دهد ریسک ابتلا به این بیماری با حذف ژن M1، 95% و با ژن T1 99% می باشد. آزمون دقیق فیشر برای هر دو ژن انجام گردید که با P-Value کم تر از ۰/۰۵ و ۰/۰۱ به ترتیب برای ژن های GSTM1 و GSTT1 که از ارتباط معنی دار بین حذف یا وجود ژن با الیگو اسپرمی حکایت دارد. بدین معنی که حذف این دو ژن به ویژه ژن GSTT1 در بیماران به طور معنی داری بیشتر از افراد سالم می باشد.

جدول (۲): ارتباط بین ترکیب ژنوتیپ های GSTM1 و GSTT1 و ریسک ابتلاء به الیگو اسپرمی شدید

M1 & T1 Combined	Control	Cases (Oligozoospermia)	OR(95%CI)
Both present	۴۰	۲۱	1 (reference)
Either one null	۱۲	۲۵	3/968 (1/666 to 9/451)

است. بیشتر این مطالعات روی پلی مورفیسم در ژن GSTM1 بوده، زیرا ویژگی اتصالی GSTM1 به استروئیدهای جنسی شامل استرادیول و تستوسترون آن را پروتئین ضروری در مسیر اسپرماتوژنز ساخته است همچنین فعالیت آنزیمی و آنتی اکسیدانی بالای این ژن باعث شده که بیشتر مورد توجه قرار گیرد. همانطور که در مطالعه chen نشان داده شد، ژنوتیپ حذفی GSTM1 با کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مایع منی همراه است. در مطالعه Wu و همکاران که روی ۶۹۳۴ بیمار انجام گرفت، نشان داده شد، میان پلی مورفیسم‌های تهی GSTM1 و GSTT1 و افزایش خطر ناباروری در مردان ارتباط وجود دارد (۲۹). Naveen در آزمایشات خود نشان داد، که اسپرم افراد واریکوسلی با ژنوتیپ نول برای GSTM1 نسبت به آسیب‌های اکسیداتیو آسیب پذیرتر هستند (۴). تفاوت در بعضی نتایج ممکن است به دلیل تفاوت در شرایط و نژاد افراد مورد مطالعه و نیز تأثیر عوامل دیگر بر پلی مورفیسم این خانواده ژنی باشد.

می‌توان این گونه نتیجه گرفت که فقدان این ژن‌ها به میزان قابل توجهی با کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گلو‌تاتیون اس ترانسفراز همراه بوده است. در این شرایط بدن در برابر استرس، رادیکال‌های آزاد و اکسیدان‌ها از دفاع کم‌تری برخوردار می‌باشد و در نتیجه این شرایط می‌تواند باعث الیگواسپرمی شود. این کاهش تعداد اسپرم می‌تواند ناشی از آسیب به DNA اسپرم به دلیل عدم تعادل آنتی‌اکسیدان‌ها و رادیکال‌های آزاد و اکسیدان‌ها باشد و یا به دلیل القا آسیب و ایجاد اختلال در یکی از مسیرها و مراحل اسپرماتوژنز باشد. و در نهایت می‌توان گفت ارتباط معنی‌داری بین حذف این دو ژن و وقوع الیگو اسپرمی وجود دارد البته این امر نیازمند مطالعات تکمیلی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از کلیه بیماران و خانواده‌های آن‌ها که در این مطالعه شرکت نمودند صمیمانه تشکر می‌نماییم. از مدیریت کلینیک شفق پارس بروجرد جناب آقای دکتر ملک جمشید بیرانوند و همچنین از ریاست و پرسنل بخش نازایی بیمارستان فاطمیه همدان مخصوصاً خانم دکتر یاونگی متخصص زنان و فوق تخصص نازایی که در این راه ما را یاری دادند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

آزمون t برای هر دو ژن به‌طور جداگانه انجام گردید با این آزمون نیز اختلاف معنی‌دار بین گروه بیمار و سالم مشاهده شد. به‌طوری‌که این اختلاف برای ژن GSTM1 در سطح $P < 0.05$ و برای ژن GSTT1 در سطح $P < 0.01$ معنی‌دار گردید. فراوانی حضور و حذف این دو ژن در جمعیت‌های مورد مطالعه از افراد بیمار و سالم تفاوت معنی‌داری داشت. وجود هر کدام از این ژن‌ها به‌طور جداگانه، احتمال وقوع الیگواسپرمی را به‌طور معنی‌داری کم می‌کند. وجود هر دو ژن به‌طور هم‌زمان نیز احتمال وقوع الیگو اسپرمی را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. لذا می‌توان گفت ارتباط معنی‌داری بین حذف این دو ژن و وقوع الیگو اسپرمی وجود دارد. البته این امر نیازمند مطالعات تکمیلی می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

از آنجاکه در بسیاری از موارد تعیین علت و درمان ناباروری می‌تواند موجب تداوم یک زندگی مشترک و آرامش روحی خانواده‌ها گردد، بررسی علل ناباروری می‌تواند سبب برنامه ریزی کلان در موارد قابل درمان گردد. ژن‌های متفاوت بسیاری که در سلول‌های زاینده، سلول‌های سوماتیکی در بیضه به ویژه سلول‌های سرتولی (لایدیگ) اپیدیدیم‌ها و برش‌های دیگر دستگاه تناسلی بیان می‌شود برای رشد کامل عملکرد اسپرم حیاتی هستند، به‌عبارت دیگر، تخریب بسیاری از مسیرها و شبکه‌های سلولی متفاوت ممکن است منجر به ناباروری مردان گردد (۱۲). مطالعات وجود آنزیم گلو‌تاتیون اس ترانسفراز فعال را در سطح اسپرم نشان داده است (۶). ژن‌های GST سیتوزولی انسانی قادرند پلی مورفیسم‌های ژنتیکی از خود نشان دهند که این امر ظرفیت دفاعی آنزیم را بر ضد استرس اکسیداتیو متأثر نموده و موجبات پیشرفت بعضی از نارسایی‌ها را فراهم آورده که از این بین می‌توان به افزایش خطر ناباروری در مردان اشاره نمود (۲۰). در مطالعه حاضر، فراوانی ژنوتیپ حذفی در ژن‌های GSTM1 و GSTT1 در گروه مردان الیگواسپرمی شدید به ترتیب ۴۱/۱۸ درصد و ۲۷/۴۵ درصد و در گروه شاهد به ترتیب ۱۳/۴۶ درصد و ۹/۶۲ درصد بود. این اختلاف فراوانی ژنوتیپ حذفی GSTM1 و GSTT1 بین دو گروه معنادار می‌باشد. مطالعات قبلی روی ناباروری مردان و پلی مورفیسم‌های گلو‌تاتیون اس ترانسفراز نتایج متفاوتی را داشته

1. Aydemir B, Onaran I, Kiziler AR, Alici B, Akyolcu MC. Increased oxidative damage of sperm and seminal plasma in men with idiopathic infertility is higher in patients with glutathione S-transferase Mu-1 null genotype. *Asian J Androl* 2007; 9: 108-15.
2. Boivin J, Bunting L, Collins J A, Nygren K.G. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *J Hum Reprod* 2007; 22(6): 1506-12.
3. Chen SS, Chang LS, Chen HW, Wie YH. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and male infertility in Taiwanese patients with varicocele. *Hum Reprod* 2002; 17: 718-25.
4. Chen SS, Chang LS, Wei YH. Oxidative damage to proteins and decrease of antioxidant capacity in patients with varicocele. *Free Radic Biol Med* 2001; 30(1): 1328-34.
5. Dusinská M, Ficek A, Horská A, Raslová K, Petrovská H, Vallová B, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. *J Mutat Res* 2001; 1-482(1-2): 47-55.
6. Gopalakrishnan B, Aravinda S, Pawshe CH, Totey SM, Nagpal S, Salunke DM, et al. Studies on glutathione S-transferases important for sperm function: evidence of catalytic activity-independent functions. *Biochem J* 1998; 329: 231-41.
7. Hammadeh ME, Radwan M, Al-Hasani S, Micu R, Rosenbaum P, Lorenz M, et al. Comparison of reactive oxygen species concentration in seminal plasma and semen parameters in partners of pregnant and non-pregnant patients after IVF/ICSI. *Reprod Biomed Online* 2006;13(5):696-706.
8. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:51-88.
9. Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *J Pharmacol* 2000; 61(3): 154-66.
10. Hurst R, Bao Y, Jemth P, Mannervik B, Williamson G. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases. *Biochem J* 1998;332 (Pt 1):97-100.
11. Ketterer B. A bird's eye view of the glutathione transferase field. *J Chem Biol Interact* 2001; 138(1): 27-42.
12. Liska F. Selected genetic aspects of male infertility- what animal models tell us. *Bio (Praha)* 2003;49: 129-41.
13. O'Flynn O'Brien K L, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. *J Fertil Steril* 2010; 93(1):1-12.
14. Pasqualotto F, Pasqualotto EB, Sobreiro BP, Hallak J, Medeiros F, Lucon AM. Clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation in a university hospital. *J Urol Int* 2006;76(2): 122-5.
15. Pearson WR, Vorachek WR, Xu SJ, Berger R, Hart I, Vannais D, et al. Identification of class-mu glutathione transferase genes GSTM1-GSTM5 on human chromosome 1p13. *Am J Hum Gene* 1993; 53: 220-33.
16. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM et al. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *J Biochem* 1994; 15-300 (1): 271-6.
17. Poongothai J, Gopenath TS, Manonayski S. Genetics of Human male infertility. *Singapore Med J* 2009; 50(4), 336-46.
18. Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AMA, WHO. WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the

- infertile male. Cambridge: Cambridge University Press; 2000.P. 33.
19. Rubes J, Selevan SG, Sram RJ, Evenson DP, Perreault SD. GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *J Mutat Res* 2007; 625(1-2): 20-8.
 20. Ryberg D, Skaug V, Hewer A, Phillips DH, Harries LW, Wolf CR, et al. Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *J Carcinogenesis* 1997; 18(7): 1285-9.
 21. Safarinejad MR. Infertility among couples in a population-based study in Iran: prevalence and associated risk factors. *Int J Androl* 2008; 31(3):303-14.
 22. Safarinejad MR, Dadkhah F, Ali Asgari M, Hosseini SY, Kolahi AA, Iran-Pour E. Glutathione S-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and male factor infertility risk: a pooled analysis of studies. *J Urol* 2012; 9(3): 541-8.
 23. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 2002; 23(6): 737-52.
 24. Song X, Zhao Y, Cai Q, Zhang Y, Niu Y. Association of the Glutathione S-transferases M1 and T1 polymorphism with male infertility: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30(1): 131-41.
 25. Strange RC, Jones PW, Fryer AA. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *J Toxicol Lett* 2000;112(113): 357-63.
 26. Tan KL, Webb GC, Baker RT, Board PG. Molecular cloning of a cDNA and chromosomal localization of a human theta-class glutathione S-transferase gene (GSTT2) to chromosome 22. *J Genomics* 1995; 25(2): 381-7.
 27. Wu QF, Xing JP, Tang KF, Xue W, Liu M, Sun JH, et al. Genetic polymorphism of glutathione S-transferase T1 gene and susceptibility to idiopathic azoospermia or oligospermia in northwestern China. *J Asian Androl* 2008; 10(2): 266-70.
 28. Wu Q, Xing J, Xue W, Sun J, Wang X, Jin X. Influence of polymorphism of glutathione S-transferase T1 on Chinese Patients With Varicocele. *Fertil Steril* 2009; 91(3): 960-62.
 29. Wu W, Lu J, Tang Q, Zhang S, Yuan B, Li J, et al. GSTM1 and GSTT1 null polymorphisms and male infertility risk: an updated meta-analysis encompassing 6934 subjects. *Sci Rep* 2013;3:2258.

ASSOCIATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE M1 AND T1 POLYMORPHISMS WITH SEVERE OLIGOZOOSPERMIA

Elahe Fatahi¹, Kyumars Safinejad^{*2}, Mohammadreza Mehrabi³

Received: 23 Sep, 2015; Accepted: 24 Nov, 2015

Abstract

Background & Aims: Male factors account for 20%-50% of cases of infertility and male infertility due to severe oligozoospermia and azoospermia has been associated with a number of genetic risk factors. Severe oligozoospermia was defined as a concentration of less than 5×10^6 sperm/ml. The aim of this study was to examine whether an association exists between glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 genes polymorphism and severe oligozoospermia.

Material & Methods: This case-control study was conducted on 103 subjects, including 51 infertile men with severe oligozoospermia and 52 fertile men serving as controls. Blood samples were collected from patients and healthy individuals and used for isolation of genomic deoxyribonucleic acid (DNA). The polymorphisms were analyzed using multiplex-polymerase chain reaction (multiplex-PCR) technique. The data were analyzed using Chi-square, Fisher exact test, and independent t-test. ($P < 0.05$)

Result: The frequency of GSTT1 and GSTM1 null genotypes were observed to be higher in infertile men with severe oligozoospermia (GSTT1=41.18% and GSTM1=27.45%) in comparison with the fertile men (GSTT1=13.46% and GSTM1=9.62%).

Conclusion: These differences were statistically significant. The results of this study suggest a possible positive effect of GSTT1 and GSTM1 null genotypes on the spermatogenesis process of the testis.

Keywords: Glutathions transferase, GSTT1, GSTM1, Severe oligospermia

Address: Department of Biology, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran

Tel: +98 91215107312

Email: q_safinejad@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2016; 26(10): 851 ISSN: 1027-3727

¹ M. Sc., Department of Biology, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran

² Assistant Professor, Department of Biology, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran
(Corresponding Author)

³ Assistant Professor, Department of Laboratory Sciences, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran