

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

الهه فتاحی^۱، کیومرث صفی نژاد^{۲*}، محمدرضا مهربانی^۳

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

چکیده

پیش زمینه 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 می باشند. هدف از این مطالعه بررسی وجود ارتباط بین پلی مورفیسم ژن های گلو تاتیون اس ترانسفراز T1 و M1 و الیگواسپرمی شدید می باشد. **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 به عنوان کنترل انتخاب شدند. الیگواسپرمی شدید به صورت غلظت کمتر از 5×10^6 اسپرم در یک میلی لیتر مایع منی تعریف می شود. نمونه های خون بیماران و افراد سالم جمع آوری شده و برای استخراج دئوکسی ریبونوکلئیک اسید ژنومی (DNA) مورد استفاده قرار گرفت. پلی مورفیسم ها به وسیله فن واکنش زنجیره ای پلیمرز چندگانه (Multiplex PCR) بررسی شده و داده ها به وسیله آزمون مربع کای، آزمون دقیق فیشر و آزمون t مستقل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و $P < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها: ژنوتیپ های 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 نتیجه گیری: تفاوت های حاصله از نظر آماری معنی دار بودند. نتایج این مطالعه تأثیر مثبت ژنوتیپ های نول GSTT1 و GSTM1 روی فرآیند اسپرم زایی را نشان داد.

کلیدواژه ها: 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 این رو این نوع نارسایی را تحت عنوان ناباروری ناشناخته می دانند (۱۴). با این وجود محققین بر این باورند که آسیب به ترکیبات ژنتیکی اسپرماتوزوآ نقش بسیار حیاتی را در باروری جنس مذکر بازی می کند تا آنجایی که اظهار می دارند، هرگونه نقص در این ترکیبات می تواند، از جمله دلایل اصلی ناباروری در مردان باشد. بررسی ها نشان می دهند که بعضی پلی مورفیسم های ژنتیکی با آسیب به روند اسپرماتوژنیز در مردان نابارور همراه بوده و می تواند منجر به اختلالاتی همچون الیگواسپرمی و آرواسپرمی ناشناخته شود (۱۳). طبق معیارهای سازمان بهداشت جهانی تعداد اسپرم

براساس تعریفی از سازمان بهداشت جهانی، (WHO) ناباروری شکست در تلاش یک زوج برای باروری بدون پیشگیری، پس از یک سال است (۱۷). امروزه ناباروری به عنوان یک مسئله مهم جهانی، سلامت تولیدمندی حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد از زوجین را متأثر نموده که حداقل در میان ۵۰ درصد از آنها، فاکتورهای مردانه به عنوان مهم ترین عامل ناباروری منجر به زوال و به هم ریختگی کیفیت مایع منی می گردند (۲-۲۱). از نظر آسیب شناسی 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 زیست شناسی، 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

کمتر از ۲۰ میلیون در هر میلی لیتر را الیگواسپرمی^۱ تحرک کمتر از ۵۰ درصد را آستنواسپرمی^۲ و ریخت شناسی^۳ کمتر از ۳۰ درصد را تراواسپرمی^۴ در مایع انزال شده غیرطبیعی است و می تواند باعث ناباروری فرد شود. Severe Oligozoospermia نمونه هایی هستند که در آن ها، تعداد اسپرم در هر میلی لیتر 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 آنزیم های محافظتی در سیتوپلاسم در برابر استرس های اکسیداتیو بسیار آسیب پذیر است. منشأ تولید گونه های واکنش گر اکسیژن (ROS) در مایع منی ابتدا خود اسپرماتوزوآ و سپس لوکوسیت های چندهسته ای است (۷). بدن در مقابل استرس اکسیداتیو بی دفاع نیست، آنزیم گلوکوتاتیون اس ترانسفراز (GST) به عنوان مهم ترین سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی شناخته شده که قادر است بر علیه استرس اکسیداتیو موجب کاهش گونه های واکنش گر اکسیژنی به مواد متابولیکی با فعالیت کمتر، شده (۵) و آسیب های DNA ناشی از لیپید پراکسیداز، تولیدات داخلی را به راحتی برطرف نماید (۱۰). بنابراین، هر نوع تغییر در ژن های کدکننده آنزیم گلوکوتاتیون اس ترانسفراز که منجر به کاهش یا فقدان فعالیت آنزیم شود، می تواند برای بررسی وضعیت استرس اکسیداتیو ناباروری حائز اهمیت باشد. هر گونه افزایش در سطح ملکول های موسوم به گونه های واکنش گر اکسیژن (ROS) می تواند به عنوان عاملی مهم در ناباروری مردان تلقی شوند (۲۳)، چرا که این گونه ها قادرند از طریق استرس اکسیداتیو و آسیب به رشته DNA و شکستن آن، اسپرم ها را متأثر نموده و موجبات این ناباروری یا حداقل کم باروری را فراهم آورند. گلوکوتاتیون اس ترانسفراز به خانواده بزرگ آنزیم های آنتی اکسیدانی فاز II تعلق دارند که در دتوکسیفیکاسیون انواعی از مواد فیزیولوژیکی درون سلولی شرکت می کنند (۱۱). دانش امروزه GST ها را در ۸ گروه طبقه بندی می کند که شامل: آلفا، مو، کاپا، امگا، پی، سیگما، تتا و زتا می باشند که اساس این تفاوت در توالی آمینواسیدی آن ها می باشد، این ۸ گروه به ترتیب توسط ژن های GSTA، GSTM، GSTK، GSTO، GSTP، GSTS، GSTT و GSTZ کدگذاری می شوند (۲۲). علاوه بر این هر گروه خود نیز دارای چندین ژن و ایزوآنزیم نیز می باشد (۹). آنزیم گلوکوتاتیون اس ترانسفراز یک ترنسپورتر (انتقال دهنده) زیستی بوده که در اتصال و پیوستگی انواعی از ترکیبات اندوژن و اگزوژن از جمله توکسین ها (سموم) یا کارسینوژن ها (سرطان زا) که متابولیسم آن ها با کاهش گلوکوتاتیون همراه است، ایفای نقش می کند (۸-۲۵). هرگونه کاهش در GST ناشی از واکنش مواد الکتروفیلیک، می تواند با اثر بروری

میکروملکول های سلولی همچون اسیدهای نوکلئیک، لیپد و پروتئین ها، روند اسپرماتوژنیزس و فعالیت اسپرماتوزوآیی را تحت تأثیر خود قرار دهند (۲۷). در انسان ژن GSTM1 به صورت یک خوشه ژنی متشکل از ژن های GSTM1-GSTM5 روی کروموزوم ۳p۱۳ قرار گرفته است و دارای انواعی از عملکردهای معمول و مهم می باشد، افرادی با هموزیگوت حذف جایگاه این ژن فاقد فعالیت آنزیمی سیتوزولی GST-μ می باشند (۱۵). گزارشات زیادی دال بر ارتباط این نوع هموزیگوت با افزایش خطر ناباروری در مردان ارائه شده است (۲۲). در یک تحقیق chen، ارتباط پلی مورفیسم 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 آنتی اکسیدانی مایع منی در این بیماران به دلیل ژنوتیپ نول GSTM1 می باشد (۳)، همچنین Aydemir در مطالعه ای نشان داد که ژنوتیپ حذفی GSTM1، باعث افزایش آسیب های اکسیداتیو در مایع منی واسپرم مردان، با ناباروری ناشناخته می باشد (۱). پلی مورفیسم GSTM1 در این بیماران ممکن است به عنوان یک منبع مهم، اسپرماتوزوآ را برای دریافت آسیب های اکسیداتیو، مستعد نموده و قطعه قطعه شدن DNA اسپرم را به دنبال داشته باشد (۱۹). از طرف دیگر گروه تتا آنزیم GST انسانی (GSTT) از دو زیر واحد، GSTT1 و GSTT2 تشکیل شده است که هر دو آن ها بر روی کروموزوم ۱۱q۲۲ واقع شده اند (۲۶). پلی مورفیسم در جایگاه ژنی GSTT1 ناشی از حذف ژنی نیز می تواند 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 بیماری هایی همچون سرطان، دیابت و نارسایی های قلبی عروقی اشاره دارند، ولی به ارتباط احتمالی این نوع ژنوتیپ با ناباروری در مردان توجهات کمتری شده است (۲۷). Wu مطالعه ای بر روی مردان شمال غربی چین انجام داد، نتایج نشان داد که گاهاً ژنوتیپ تهی GSTT1 زمینه را برای داشتن نارسایی های همچون آروسپرمی و اولیگواسپرمی ناشناخته، مهیا می سازد (۲۷). همچنین در مطالعه دیگری که بر روی مردان نابارور چینی دارای واریکوسل انجام شد، نشان داد که آسیب های اکسیداتیو می تواند دلیل ناباروری در بیماران واریکوسلی باشد و ژنوتیپ نول GSTT1 خطر آسیب های اکسیداتیو را در بیماران دارای واریکوسل تا حدی افزایش می دهد (۲۸). به هر حال بررسی های گسترده محققین حاکی از آن هستند که میان این نوع ژنوتیپ (ژنوتیپ تهی) در ژن های GSTM1 و GSTT1 با ناباروری ناشناخته در مردان ارتباط و هماهنگی وجود دارد (۲۴). با

³ Morphology⁴ Teratozoospermia¹ Oligozoospermia² Asthenozoospermia

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

B-Globin:

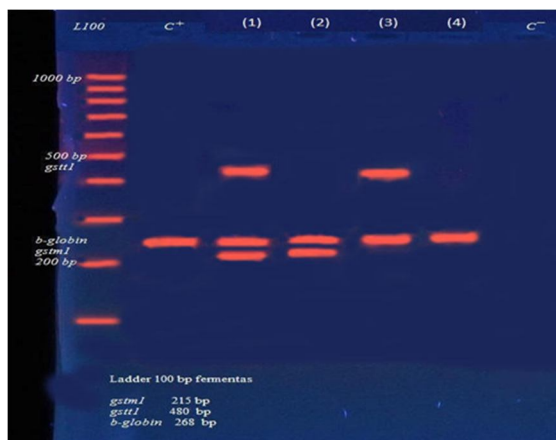
F: 5'- CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC -3'

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 آزمون های t و آزمون دقیق فیشر، chi-square و آزمون مربع کای انجام گرفت.

یافته ها

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 می باشند و قطعات DNA حاصل از تکثیر ژن B-globin ۲۶۸ جفت باز طول دارد. نمونه های منفی فقدان هر کدام از ژن های GSTM1 و GSTT1 به طور جداگانه و یا با هم در حضور ژن B-Globin بیانگر ژنوتیپ نول برای هر کدام است. در نمونه های مثبت وجود هر کدام از ژن ها به طور جداگانه و یا با هم در حضور ژن B-Globin بیانگر ژنوتیپ وحشی است. در تصویر شماره ۱، L نشانگر Ladder یا ساین مارکر، ستون یک کنترل مثبت و ستون آخر کنترل منفی می باشد (شکل ۱).



شکل (۱): محصولات Multiplex PCR ژن های 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 می رسد، 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 تست های آزمایشگاهی شامل مشخصات هورمونی بود. الیگو اسپرمی شدید به صورت غلظت کمتر از 5×10^6 اسپرم در یک میلی لیتر مایع منی تعریف می شود. 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 ژن های GSTM1 و GSTT1 مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA ژنومی: از تمام افراد مورد مطالعه پنج

میلی لیتر خون محیطی دریافت شد و نمونه های خون به لوله های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA منتقل شد و تا زمان استخراج DNA در دمای -20°C نگهداری شدند. از تمام نمونه های خون استخراج DNA به روش salting out از گلبول های 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 زنجیره ای پلیمرز (multiplex PCR): برای

تشخیص حذف هموزیگوت در ژن های 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 (به عنوان کنترل داخلی) مورد استفاده قرار گرفت. توالی سه جفت پرایمر (GSTT1، GSTM1، B-globin) مورد استفاده در این مطالعه به ترتیب به شرح زیر می باشد که هر جفت از این پرایمرها به ترتیب قطعات ۴۸۰، ۲۱۵، ۲۶۸ جفت بازی را تکثیر می دهند.

GSTT1:

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

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

GSTM1:

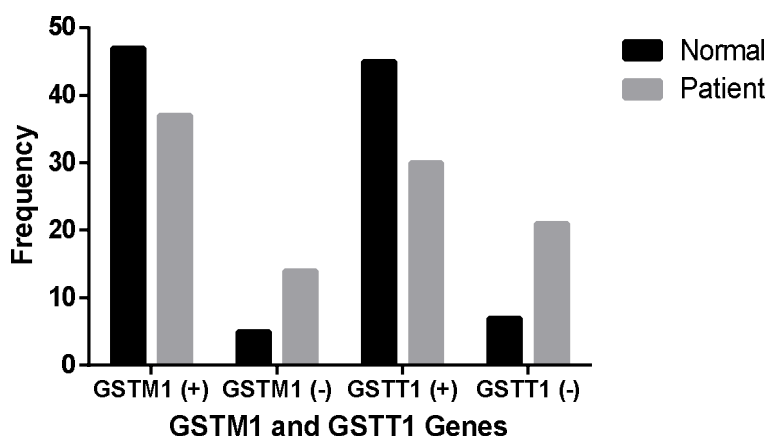
F: 5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3'

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 ۲/۱ و ۲/۴ به دست آمد. برآورد آزمون نسبت شانس (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 کمتر 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 (Oligozoo Spermia)	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 آنتی اکسیدانی مایع منی همراه است. در مطالعه Wu و همکاران که روی ۶۹۳۴ بیمار انجام گرفت، نشان داده شد، میان پلی مورفیسم های 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 آسیب های 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.

می توان این گونه نتیجه گرفت که فقدان این ژن ها به میزان قابل توجهی با کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی گلو تاتیون اس ترانسفراز همراه بوده است. در این شرایط بدن در برابر استرس، رادیکال های آزاد و اکسیدان ها از دفاع کمتری برخوردار می باشد و در نتیجه این شرایط می تواند باعث الیگواسپرمی شود. این کاهش تعداد اسپرم می تواند ناشی از آسیب به DNA اسپرم به دلیل عدم تعادل آنتی اکسیدان ها و رادیکال های آزاد و اکسیدان ها باشد و یا به دلیل القا آسیب و ایجاد اختلال در یکی از مسیرها و مراحل اسپرماتوژنز باشد. و در نهایت می توان گفت ارتباط معنی داری بین حذف این دو ژن و وقوع الیگو اسپرمی وجود دارد البته این امر نیازمند مطالعات تکمیلی می باشد.

تشکر و قدردانی

از کلیه بیماران و خانواده های آن ها که در این مطالعه شرکت نمودند صمیمانه تشکر می نمایم. 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 می گردد.

References:

آزمون t برای هر دو ژن به طور جداگانه انجام گردید با این آزمون نیز اختلاف معنی دار بین گروه بیمار و سالم مشاهده شد. به طوریکه این اختلاف برای ژن GSTM1 در سطح $P < 0.05$ و برای ژن GSTT1 در سطح $P < 0.01$ معنی دار گردید. فراوانی حضور و حذف این دو ژن در جمعیت های مورد مطالعه از افراد بیمار و سالم تفاوت معنی داری داشت. وجود هر کدام از این ژن ها به طور جداگانه، احتمال وقوع الیگواسپرمی را به طور معنی داری کم می کند. وجود هر دو ژن به طور هم زمان نیز احتمال وقوع الیگو اسپرمی را به طور معنی داری کاهش می دهد. لذا می توان گفت ارتباط معنی داری بین حذف این دو ژن و وقوع الیگو اسپرمی وجود دارد. البته این امر نیازمند مطالعات تکمیلی می باشد.

بحث و نتیجه گیری

از آنجاکه در بسیاری از موارد تعیین علت و درمان ناباروری می تواند موجب تداوم یک زندگی مشترک و آرامش روحی خانواده ها گردد، بررسی علل ناباروری می تواند سبب برنامه ریزی کلان در موارد قابل درمان گردد. ژن های متفاوت بسیاری که در سلول های زاینده، سلول های سوماتیکی در بیضه به ویژه سلول های سرتولی (لایدیگ) اپیدیدیم ها و برش های دیگر دستگاه تناسلی بیان می شود برای رشد کامل عملکرد اسپرم حیاتی هستند، به عبارت دیگر، تخریب بسیاری از مسیرها و شبکه های سلولی متفاوت ممکن است منجر به ناباروری مردان گردد (۱۲). مطالعات وجود آنزیم گلو تاتیون اس ترانسفراز فعال را در سطح اسپرم نشان داده است (۶). ژن های GST سیتوزولی انسانی قادرند پلی مورفیسم های ژنتیکی از خود نشان دهند که این امر ظرفیت دفاعی آنزیم را بر ضد استرس اکسیداتیو متأثر نموده و موجبات پیشرفت بعضی از نارسایی ها را فراهم آورده که از این بین می توان به افزایش خطر ناباروری در مردان اشاره نمود (۲۰). در مطالعه حاضر، فراوانی ژنوتیپ حذفی در ژن های 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 می باشد. مطالعات قبلی روی ناباروری مردان و پلی مورفیسم های گلو تاتیون 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