

پلی مورفیسم گلو تاتیون اس ترانسفراز M1 و T1 در همسران زنان مبتلا به سقط مکرر

کیومرث صفی نژاد^۱

تاریخ دریافت ۱۳۹۵/۰۲/۲۵ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۵/۲۳

چکیده

پیش زمینه و هدف: سقط مکرر (RPL) به صورت دو یا چند سقط مکرر خود به خودی تعریف می شود. ژن های گلو تاتیون اس ترانسفراز (GST) ایزو آنزیم هایی را تولید می کنند که این آنزیم ها، جنین را در مقابل استرس اکسیداتیو حفظ می نمایند. هدف از این مطالعه تعیین میزان حذف دو ژن GSTT1 و GSTM1 در همسران زنان مبتلا به سقط مکرر می باشد.

مواد و روش کار: در این مطالعه موردی - شاهدی ۱۰۲ مورد (همسران زنان مبتلا به سقط مکرر) و ۱۰۴ شاهد (همسران زنان سالم) مورد بررسی قرار گرفتند. مایع منی، از گروه مورد و شاهد، جمع آوری و آنالیز شد. خون محیطی نیز از هر دو گروه، جمع آوری و پس از استخراج DNA از خون، Multiplex PCR روی نمونه های DNA صورت گرفت و نتایج با استفاده از آزمون آماری مربع کای، آزمون دقیق فیشر و آزمون همبستگی مورد ارزیابی آماری قرار گرفت. **یافته ها:** ما دریافتیم که ۲۶/۴۷ و ۴۲/۱۶ درصد از گروه مورد و ۸/۶۵ و ۱۴/۴۲ درصد از گروه شاهد به ترتیب دارای ژنوتیپ نول GSTM1 و GSTT1 بودند. ژنوتیپ نول GSTM1 (۲۶/۴۷ درصد در مقابل ۸/۶۵ درصد، $P < 0.05$) و ژنوتیپ نول GSTT1 (۴۲/۱۶ درصد در مقابل ۱۴/۴۲ درصد، $P < 0.05$) نسبت به گروه شاهد افزایش معنی داری نشان داد. همچنین همبستگی مثبت معنی داری ($P < 0.05$; $\text{Corr} = 0.6$) بین ژنوتیپ نول مرکب (حذف هم زمان GSTM1 و GSTT1) و مرفولوژی غیر طبیعی اسپرم مشاهده شد.

بحث و نتیجه گیری: نتایج ما نشان داد که ژنوتیپ نول GSTM1 و GSTT1 در مردان، در وقوع سقط مکرر همسران آنها نقش ایفا می کند. مخصوصاً اینکه در این مردان مرفولوژی غیر طبیعی در اسپرم نیز مشاهده شد. لذا احتمال دارد که عملکرد نامناسب GSTM1 و GSTT1، سبب استرس اکسیداتیو مرتبط با ترانس اسپرمی و در نتیجه منجر به RPL شود.

کلیدواژه ها: سقط مکرر RPL، پلی مورفیسم، گلو تاتیون اس ترانسفراز M1، گلو تاتیون اس ترانسفراز T1، Multiplex PCR

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره هفتم، ص ۵۶۱-۵۵۳، مهر ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: بروجرد، میدان مدرس، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، تلفن: ۰۹۱۲۱۵۱۰۷۳۱

Email: q_safinejad@yahoo.com

مقدمه

سقط، یک مشکل شایع بالینی است که در آن جنین قبل از ۲۴ هفته سقط می گردد. دو یا چند سقط متوالی را سقط مکرر می گویند. حدود یک درصد از زوج ها، دارای این مشکل می باشند (۱). تاکنون علت های متنوعی برای RPL ذکر شده است (۲). بر اساس تست های بسیار حساس تشخیص حاملگی که در حال حاضر هم در دسترس هستند، مشخص شده است که از هر دو حاملگی یک مورد در اوایل بارداری سقط می شود (۳). حتی بعد از تشخیص حاملگی به صورت بالینی از هر ۵ تا ۶ مورد حاملگی یکی از آنها بین ۴ هفتهگی و ۲۰ هفتهگی بارداری سقط می شود (۴). علل پیشنهادی

برای RPL^۲، شامل اختلالات کروموزومی والدین، اختلالات آناتومیکی رحم، عفونت های آندومتر، علت های غدد درون ریز (نقص فاز لوتئال، اختلال عملکرد تیروئید و دیابت ملیتوس غیر کنترل شده) سندرم آنتی فسفولیپید، ترومبوفیلی های وراثتی، علت های آللویمونولوژیکی و فاکتورهای محیطی می باشند (۵). در میان علل پیشنهادی متنوع، به نظر می آید فاکتورهای ژنتیکی ارتباط بیشتری با RPL داشته باشند (۷،۶). تریزومی های آتوزومی مسئول ۵۰ درصد از سقط های سه ماهه اول حاملگی می باشند، این اختلالات در ابتدا قادرند در اثر Nondisjunction (NDJ) می وزی در طی گامتوژن والدین با کاریوتایپ طبیعی، ایجاد شوند (۸). انواعی

^۱ استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران (نویسنده مسئول)

^۲ Recurrent pregnancy loss

هدف از این مطالعه بررسی ارتباط سقط مکرر و پلی مورفیسم ژن‌های گلوپتایون اس ترانسفراز M1 Gen bankTM; GSTM1; accession number NM_000561) و گلوپتایون اس ترانسفراز T1 (Gen bankTM; accession number NM_000853) در همسران زنان مبتلا به سقط مکرر می‌باشد.

مواد و روش کار

در این مطالعه یک‌صد و دو زوج مراجعه‌کننده به مراکز IVF و ژنتیک که دارای دو یا بیشتر سقط خود به خودی متوالی در سه ماهه نخست یا اوایل سه ماهه دوم حاملگی بودند، بعد از گرفتن مجوز اخلاقی تحقیق از مرکز مربوطه و رضایت‌نامه کتبی از بیماران، مورد بررسی قرار گرفتند. درباره سوابق خانوادگی، پزشکی، تولیدمثلی در پرونده‌ها، ثبت و شجره‌نامه مربوط ترسیم شده بود. موارد با دو سقط یا کم‌تر، سقط‌های بالای ۲۰ هفته، سقط‌های مربوط به دیابت، ناهنجاری‌های رحم، اختلالات هورمونی و ایمنولوژیکی از این مطالعه کنار گذاشته شدند. از همسران زنان مبتلا به سقط مکرر با محدوده سنی ۲۰-۴۵ سال و ۱۰۴ نفر از همسران زنان سالم که حداقل دارای یک فرزند سالم بودند (گروه شاهد) نمونه مایع منی و نمونه خون گرفته شد. نمونه منی طبق روش WHO^۲ مورد آنالیز قرار گرفت (۱۷).

ارزیابی اسپرم از لحاظ مرفولوژی:

نمونه منی، پس از حداقل ۳ و حداکثر ۴ روز خودداری از نزدیکی در ظروف پلاستیکی استریل جمع‌آوری و در انکوباتور ۳۷°C نگهداری شدند. با استفاده از سرنگ یک‌بارمصرف، حجم نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید. بلافاصله پس از مایع شدن یک قطره از مایع منی که به‌خوبی مخلوط شده بود، بین لام و لامل قرار گرفت و در زیر میکروسکوپ، با بزرگنمایی ۱۰۰ و ۴۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. مورفولوژی چشمی اسپرم بررسی شد. جهت بررسی مورفولوژی اسپرم علاوه بر روش چشمی، یک گسترش نازک بر روی لام، تهیه گردید. پس از خشک شدن نمونه‌ها در مجاورت هوا و تثبیت آن‌ها بر اساس روش پاپانیکولا، رنگ‌آمیزی صورت گرفته و مورفولوژی با بزرگنمایی ۱۰۰۰× مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه مورفولوژی اسپرم‌ها بر اساس تقسیم‌بندی سازمان جهانی بهداشت به چهار گروه طبیعی، دارای ناهنجاری‌های سر، دم و قطعه میانی تقسیم شد.

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

تریزومی برای کروموزوم‌های ۱۳، ۱۶ و ۲۱ در این سقط‌ها گزارش شده است و رایج‌ترین اختلال، مونوزومی کروموزوم X می‌باشد که در ۲۵-۲۰ درصد از سقط‌های با علت سیتولوژیکی، گزارش شده است (۹).

تریپلوئیدی و تتراپلوئیدی دو اختلال ناشی از لقاح غیرطبیعی بوده و با حیات منافات دارند. تریپلوئیدی در ۱۶ درصد سقط‌ها مشاهده شده و مشخص شده است که علت آن لقاح دو اسپرم با یک تخمک هاپلوئیدی بوده است (۱۰). تتراپلوئیدی معمولاً ناشی از نقص در تقسیم کروموزوم‌ها در اولین تسهیم بعد از تشکیل سلول تخم می‌باشد. اختلالات ساختاری کروموزوم‌ها، به‌طور متوسط در ۳ درصد جنین‌های با اختلال کروموزومی مشاهده شده است. این اختلالات در مردان اغلب باعث کاهش تعداد اسپرماتوزوئید، اسپرم غیرطبیعی یا ناباروری با علت اختلال در مرفولوژی اسپرم (تراواسپرمی) شده و در نهایت باعث کاهش حاملگی و افزایش سقط می‌گردد (۱۱).

خانواده آنزیم‌های گلوپتایون اس ترانسفراز (GST) اعضای مهم مسیرهای دتوکسیفیکاسیون بوده که انواعی از مواد الکتروفیلیک را کاتالیز و باعث حذف آن‌ها از بدن می‌شوند. معمولاً مواد خارجی به‌وسیله واکنش‌های فاز ۱ فعال شده و به‌وسیله آنزیم‌های GST حذف می‌شوند. علاوه بر این، آنزیم‌های GST، نقش مهمی، در تنظیم میزان گلوپتایون ایفا می‌نمایند. بنابراین هر کاهشی در فعالیت آنزیم‌های GST می‌تواند سبب تجمع محصولات فاز ۱ شده که آن نیز به‌نوبه خود باعث آسیب‌های شدید می‌گردد (۱۲). با توجه به نقش کلیدی GST در مقابله با استرس اکسیداتیو و خنثی نمودن مواد سمی آلی و نیز وجود آن در سطح اسپرم و نقش آن در لقاح اسپرم و تخمک، فقدان یا کاهش فعالیت آن می‌تواند علاوه بر ایجاد اختلالاتی در روند استرس اکسیداتیو، با اختلالاتی در روند ناباروری مردان همراه باشد. بنابراین هر نوع تغییر در ژن‌های کدکننده آنزیم‌های گلوپتایون اس ترانسفراز که منجر به کاهش یا فقدان فعالیت آنزیم شود، می‌تواند برای بررسی وضعیت استرس اکسیداتیو و ناباروری مردان حائز اهمیت باشد (۱۳). اعضای خانواده سوپر ژن GST شامل زیر خانواده‌های GSTA، GSTK، GSTM، GSTO، GSTP، GSTS، GSTT و GSTZ می‌باشند که این زیر خانواده‌ها به‌وسیله کاتالیز ترکیب گلوپتایون با مواد الکتروفیل در مقابل توکسین‌های شیمیایی و کارسینوژن‌ها نقش ایفا می‌نمایند (۱۴).

¹ Glutathione S-transferases

² World Health Organization

دقیقه، تکثیر DNA به مدت ۳۵ سیکل که هر سیکل به ترتیب شامل درجه حرارت ۹۴، ۵۶، ۷۲ درجه سانتی گراد هرکدام به مدت ۱ دقیقه بود و در پایان ۳۵ سیکل، یک مرحله extension نهایی به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. محصولات PCR با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و به وسیله الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد تفکیک شدند.

آنالیز آماری:

نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۱۱/۵ مورد آنالیز قرار گرفتند. مقایسه فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها بین همسران بیماران و افراد شاهد با استفاده از آزمون‌های مربع کای و آزمون دقیق فیشر انجام شد. p value کم‌تر از ۰/۰۵ به عنوان معنی دار تلقی شد. داده‌ها جدول بندی و مورد آنالیز قرار گرفتند. همچنین همبستگی بین ژنوتیپ نول ژن‌های GSTM1 و GSTT1 و مرفولوژی غیرطبیعی اسپرم با استفاده از آزمون همبستگی (Correlation test) انجام گرفت.

یافته‌ها

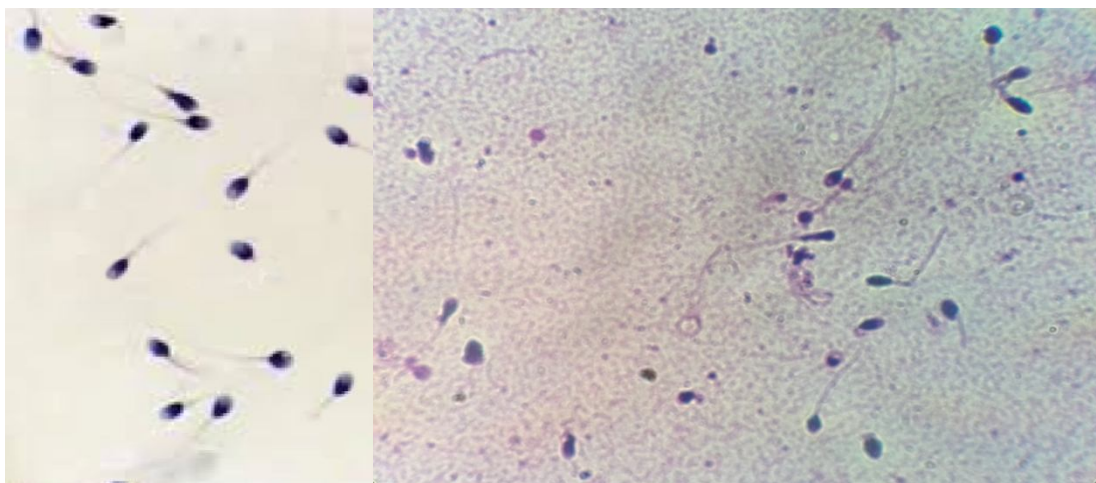
در این مطالعه ۱۰۲ نفر از همسران زنان مبتلا به سقط مکرر و ۱۰۴ نفر از همسران زنان سالم از نظر سقط، در یک محدوده سنی، مورد بررسی قرار گرفتند. پس از آنالیز مایع منی گروه مورد مطالعه، طبق WHO، اسپرم اکثر همسران زنان مبتلا به RPL نسبت به گروه شاهد، از نظر مرفولوژی غیرطبیعی (مرفولوژی کم‌تر از ۲۰ درصد) بودند (شکل شماره ۱).

۲۰°C- نگهداری شدند. از تمام نمونه‌های خون، استخراج DNA از گلبول‌های سفید به روش salting out انجام گرفت. بررسی کیفی و کمی DNA استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام گرفت.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مالتیپلکس (Multiplex PCR): برای تشخیص حذف در ژن‌های GSTT1 و GSTM1 با استفاده از روش Multiplex PCR، سه جفت پرایمر، (یک جفت پرایمر از هرکدام از ژن‌های GSTT1، GSTM1 و B-Globin) مورد استفاده قرار گرفت. هر جفت از این پرایمرها به ترتیب قطعات ۴۸۰، ۲۱۵، ۲۶۸ جفت بازی را تکثیر می‌دهند.

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.

ژنوتیپ‌های GSTM1 و GSTT1 به وسیله فن Multiplex PCR با استفاده از سه دسته پرایمر (طراحی شده با استفاده از نرم افزار gene runner و ساخته شده توسط شرکت ژن فن آوران ایران)، مورد آنالیز قرار گرفت. تکنیک Multiplex PCR به صورت حجم واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۵۰-۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۵۰ میلی مولار KCL، ۲،۵ میلی مولار MgCl₂، ۲۰۰ میلی مولار Tris-HCl (pH 8.4)، ۲۰۰ میلی مولار dNTPs، پرایمرهای GSTM1، GSTT1، B-globin (به اندازه ۰.۲ μM) و ۱،۵ واحد از DNA AmpliTaq polymerase انجام شد. بعد از یک دناتوراسیون ابتدایی در درجه حرارت ۹۵ سانتی گراد به مدت ۵



اسپرم گروه شاهد با مرفولوژی طبیعی

اسپرم گروه مورد با مرفولوژی غیرطبیعی

شکل (۱): دو نمونه از اسپرم گروه مورد مطالعه

استفاده از پرایمرهای مربوطه (جدول شماره ۱) و انجام الکتروفورز روی ژل آگارز ۱،۵ درصد (شکل شماره ۲)، باندهای مشاهده شده در

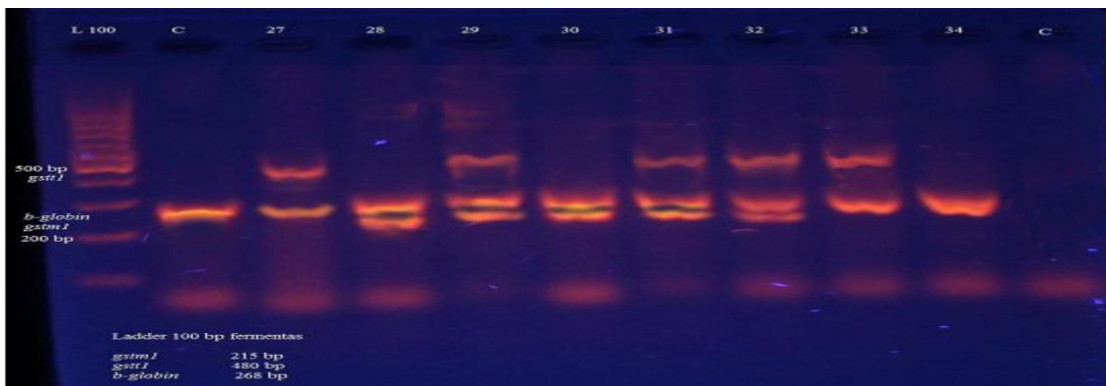
در پی نمونه‌گیری خون و استخراج DNA از هر دو گروه مورد و شاهد و انجام تکنیک Multiplex PCR بر روی DNA، با

روی ژل آگارز موید حضور آمپلیکون های (GSTT1(480bp).
GSTM1 (215bp) و B-globin(268bp) می باشد. برای
اطمینان از واکنش PCR، کنترل مثبت یعنی پرایمرهای ژن β -
globin برای هر نمونه استفاده شد، همچنین برای بررسی آلودگی
مواد PCR، از کنترل منفی (که شامل آب مقطر استریل، پرایمرها
و Master mix بود)، استفاده گردید.

روی ژل آگارز موید حضور آمپلیکون های (GSTT1(480bp).
GSTM1 (215bp) و B-globin(268bp) می باشد. برای
اطمینان از واکنش PCR، کنترل مثبت یعنی پرایمرهای ژن β -
globin برای هر نمونه استفاده شد، همچنین برای بررسی آلودگی
مواد PCR، از کنترل منفی (که شامل آب مقطر استریل، پرایمرها
و Master mix بود)، استفاده گردید.

جدول (۱): توالی پرایمرها، اندازه آمپلیکون و نوع ژن های مورد آزمایش

ژن	اندازه قطعه (bp)	توالی پرایمرها
GSTT1	480	Forward: 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' Reverse: 5'-TCACCGGATCAT GGCCAGCA-3'
GSTM1	215	Forward: 5'- GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' Reverse: 5'- GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'
B-globin	268	Forward: 5'- CAACTTCATCCACGTTCCACC -3' Reverse: 5'- GAAGAGCCAAGGACAGGTAC -3'



شکل (۲): نتایج Multiplex PCR ژن های GSTT1، GSTM1 و بتا گلوبین در گروه مورد مطالعه

آنالیز آماری، یافته های حاصل از مطالعه حاضر، به چهار ژنوتیپ
مختلف (GSTM1 نرمال و GSTT1 نرمال، GSTM1 نرمال و GSTM1 نول و
GSTT1 نرمال، GSTM1 نرمال و GSTT1 نول، GSTM1 نول و
GSTT1 نول) دسته بندی شد. درصد افرادی که دارای ژنو
تیپ های نول برای GSTM1 و GSTT1 بودند، در گروه مورد،
به ترتیب ۲۶/۴۷ درصد و ۴۲/۱۶ درصد و در گروه شاهد به ترتیب
۸/۶۵ درصد و ۴۲/۱۴ درصد بود که این نتایج اختلاف معنی داری
بین دو گروه مورد مطالعه نشان داد ($p < 0.05$). فراوانی ژنوتیپ نول
مربک GSTM1 و GSTT1 در بین همسران زنان مبتلا (۱۰/۸۷
درصد) و گروه شاهد (۰ درصد) به طور معنی دار متفاوت بود
($p < 0.01$). از ۱۰۲ مرد دارای همسر مبتلا به RPL شرکت کننده
در این مطالعه، در ۴۲ مورد از آن ها (۴۱/۱۸ درصد)، هر دو ژن نرمال
(GSTM1 نرمال - GSTT1 نرمال) بودند و ژنوتیپ GSTM1
نرمال - GSTT1 نول بلعکس در ۴۹ مورد از آن ها (۴۸/۰۴ درصد)
یافت شد (جدول شماره ۲).

همان طور که در شکل شماره ۲ مشاهده می شود L نمایانگر
۱۰۰ bp Ladder، C در لاین دوم نشان دهنده کنترل مثبت، C در
لاین آخر نشان دهنده کنترل منفی، باند ۲۶۸ bp محصول PCR ژن
بتا گلوبین (کنترل داخلی) را نشان می دهد که در همه لاین ها
مشاهده می گردد. محصول PCR ژن GSTT1 به صورت باند ۴۸۰
bp (ژنوتیپ نرمال) در لاین های ۲۷، ۲۹، ۳۱، ۳۲ و ۳۳ قابل
مشاهده می باشد و در لاین های ۲۸، ۳۰ و ۳۴ ژنوتیپ نول GSTT1
دیده می شود. متشابه محصول PCR ژن GSTM1 به صورت باند
۲۱۵ bp در لاین های ۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۱ و ۳۲ مشاهده می گردد.
لاین ۲۷ و ۳۳ ژنوتیپ GSTM1 نول و GSTT1 نرمال، لاین ۲۹،
۳۱ و ۳۲ ژنوتیپ GSTM1 نرمال و GSTT1 نرمال، لاین ۲۸ و
۳۰ ژنوتیپ GSTM1 نرمال و GSTT1 نول و لاین ۳۴، ژنوتیپ
GSTM1 نول و GSTT1 نول (ژنوتیپ نول مرکب) را نشان
می دهد. در تفسیر یافته ها، وجود ژن GST را به صورت ژنوتیپ نرمال
و حذف آن را به صورت ژنوتیپ نول در نظر گرفته می شود. جهت

جدول (۲): حضور ژن‌ها و ژنوتیپ‌های GST (M1 و T1) در همسران زنان مبتلا به سقط مکرر و گروه شاهد

P-value	Controls (%)	Cases (%)	Genotype	Gene
0/02	۹ (۸/۶۵)	۲۷ (۲۶/۴۷)	null	GSTM1
	۹۵ (۹۱/۳۵)	۷۵ (۷۳/۵۳)	normal	
0/002	۱۵ (۱۴/۴۲)	۴۳ (۴۲/۱۶)	null	GSTT1
	۸۹ (۸۵/۵۸)	۵۹ (۵۷/۸۴)	normal	
0/0004	۰ (۰)	۱۱ (۱۰/۷۸)	Both null	GSTT1 & GSTM1
	۲۴ (۲۳/۰۸)	۴۹ (۴۸/۰۴)	Either one null	
	۸۰ (۷۶/۹۲)	۴۲ (۴۱/۱۸)	Both normal	

این نتایج وقوع بیشتری ژنوتیپ نول در بین مردان دارای زنان مبتلا به RPL نسبت به گروه شاهد را نشان می‌دهد (جدول شماره ۳).

جدول (۳): ارتباط بین ژنوتیپ T1 و M1 در همسران زنان مبتلا به سقط مکرر و گروه شاهد

GSTM1 & GSTT1 Combined	Controls	Cases	OR(95 %CI)
Both normal	80	42	1 (reference)
Either one null	24	49	3/968(1/666 to 9/451)

بحث و نتیجه‌گیری

گونه‌های اکسیژن واکنشگر (ROS) با اثر اکسیداتیو روی DNA به‌عنوان یکی از فاکتورهای اصلی ناباروری مردان در نظر گرفته می‌شوند (۱۸). محصولات ژن گلوکوتایون اس ترانسفراز، یکی از مکانیسم‌های دفاعی انسان در مقابل اثرات زیان‌بار استرس اکسیداتیو می‌باشد (۱۹). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که پلی‌مورفیسم ژن گلوکوتایون اس ترانسفراز قادر است توانایی دفاع در مقابل استرس اکسیداتیو را مختل کرده و منتج به توسعه برخی سرطان‌ها گردد (۲۰). یکی از فاکتورهای زیان‌بار در مستعد کردن اسپرماتوزوا به آسیب اکسیداتیو، پلی‌مورفیسم ژن GSTM1 می‌باشد (۲۱). همچنین مطالعات قبلی نشان داده‌اند که پدیده فرگمانتاسیون اسپرم به‌وسیله پلی‌مورفیسم ژن GSTM1 تنظیم و تعدیل می‌شود (۲۲).

توکسین‌ها محیطی در ناباروری مردانه دخیلند (۲۳، ۲۴). به‌عنوان مثال ژن‌های دتوکسیفیکاسیون متابولیسم شامل CYP1A1، GSTM1 و GSTT1 با ناباروری مردانه مرتبط می‌باشند (۲۵-۲۹). آنزیم‌های گلوکوتایون اس ترانسفراز M1 و T1، گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن را سم‌زدایی می‌کنند و بدین‌وسیله از

حمله مستقیم آن‌ها به DNA و آسیب به DNA جلوگیری می‌کنند (۳۰). نقش ژنوتیپ نول GSTM1 در ارتباط با RPL تحت مطالعه بوده است (۳۱).

تخریب بسیاری از مسیرها و شبکه‌های سلولی متفاوت ممکن است منجر به ناباروری مردانه گردد (۳۲). مطالعات مختلف، وجود آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز فعال را در سطح اسپرم نشان داده است (۳۳). ژن‌های GST سیتوزولی انسانی قادرند پلی‌مورفیسم‌های 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 (۳۴). همچنین طبق مطالعات گذشته (۳۵، ۳۶) بین پلی‌مورفیسم GSTM1 و GSTT1 و ناباروری با علت مردانه ارتباط وجود دارد و در یکی از این مطالعات ارتباط پلی‌مورفیسم‌های ذکر شده و الیگو اسپرمی شدید در مردان معنی‌دار می‌باشد (۳۶). در مطالعات قبلی به‌طور اختصاصی، ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های GSTM1 و GSTT1 و سقط مکرر در همسران افراد مبتلا بررسی و مطالعه نشده است که در مطالعه حاضر، بررسی این ارتباط به‌طور اختصاصی انجام شده است که آن را می‌توان اولین

¹ Reactive oxygen species

نتیجه گرفت که ژنوتیپ نول مرکب GSTM1 و GSTT1. در مردان، در استعداد به سقط مکرر همسران آن‌ها نقش ایفا می‌کند. لذا شاید بتوان ژنوتیپ نول مرکب را به‌عنوان یک ریسک فاکتور سقط مکرر، در نظر بگیریم. مخصوصاً اینکه در این مردان تراواسپرمی در اسپرم هم مشاهده شد و همبستگی بین آن‌ها مثبت و معنی‌دار بود ($P < .05$; $\text{Corr} = 0.6$) که اثبات این ارتباط نیاز به مطالعات بیشتری دارد. در مطالعات قبلی، ارتباط عوامل ناباروری مردانه با ژنوتیپ‌های نول GST به‌طور کلی، مطالعه شده است (۳۵) ولی دومین نقطه قوت مطالعه حاضر بررسی اختصاصی تراواسپرمی و ژنوتیپ نول مرکب GSTM1 و GSTT1 در کنار هدف اصلی مطالعه می‌باشد. شاید بتوان نتیجه گرفت که احتمالاً، تراواسپرمی نسبت به سایر عوامل مسبب ناباروری مردان در ایجاد سقط مکرر نقش بیشتری داشته باشد که باز نیاز به مطالعات پیگیری‌کننده بیشتری دارد. لذا احتمال دارد که عملکرد نامناسب GSTM1 و GSTT1 سبب استرس اکسیداتیو مرتبط با تراواسپرمی و در نتیجه RPL شود. ولی با توجه به اینکه تعداد افراد مورد مطالعه در مطالعه حاضر در به‌دست آوردن درستی این ارتباط ناکافی می‌باشد مطالعات بیشتر در این زمینه را می‌طلبید.

تشکر و قدردانی

این مطالعه به‌طور کامل با حمایت و بودجه دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد به انجام رسیده است. نویسندگان این مطالعه و سایر محققین کمک‌کننده به انجام مطالعه حاضر، از دانشگاه فوق‌الذکر و کلیه افراد شرکت‌کننده در این مطالعه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

نقطه قوت مطالعه حاضر نسبت به مطالعات گذشته (۳۱) در نظر گرفت. چون در همسران زنان مبتلا در جاتی از تراواسپرمی نیز مشاهده گردید، غیر از اینکه ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم‌های GSTM1 و GSTT1 و سقط مکرر در همسران افراد مبتلا مشاهده شد همبستگی مثبت معنی‌داری هم بین ژنوتیپ نول مرکب دو ژن مورد مطالعه و تراواسپرمی مشاهده شد. ولی اینکه آیا ژنوتیپ‌های نول ژن‌های GSTM1 و GSTT1 به‌طور مستقیم و بدون آسیب ظاهری به اسپرم باعث وقوع سقط مکرر در همسران خود می‌شوند یا پس از ایجاد شکل غیر طبیعی در اسپرم باعث سقط مکرر یا RPL می‌شوند نیاز به مطالعه بیشتری دارد. در حال حاضر می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که نقص در آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفرازهای GSTM1 و GSTT1 باعث نقص در سلامت اسپرم از نظر مرفولوژی می‌گردد و مشکل اخیر سبب سقط مکرر در همسران آن‌ها گردد ولی مطالعه با نمونه افراد بیشتر در آینده، به روشن شدن بیشتر ارتباط بین حذف این دو ژن در مردان مبتلا به تراواسپرمی و وقوع RPL در همسران آن‌ها کمک می‌کند.

نتایج بسیار اندکی در مورد ژنوتیپ‌های مرکب نول GSTM1 و GSTT1 در دست می‌باشد. همچنین تابه‌حال تعداد انگشت‌شماری مطالعه نشان‌دهنده ارتباط بین علت مردانه و وقوع سقط مکرر می‌باشد (۱۱). مطالعه ما نشان داد که بین ژنوتیپ نول مرکب هر دو ژن GSTM1 و GSTT1 و مرفولوژی غیر طبیعی اسپرم در همسران زنان مبتلا به RPL و مستعد بودن به RPL، ارتباط وجود دارد ($P < .05$).

در مطالعه حاضر ژنوتیپ نول مرکب یا حذف هم‌زمان دو ژن GSTM1 و GSTT1، در ۱۰/۷۸ درصد از همسران زنان مبتلا و در هیچ‌یک از همسران زنان سالم مشاهده نگردید. بنابراین می‌توان

References:

1. Ford MD, Danny HB, Schust J. Recurrent Pregnancy Loss: Etiology, Diagnosis, and Therapy. *Rev Obstet Gynecol* Spring 2009;2(2): 76-83.
2. Stray-Pedersen B, Stray-Pedersen S. Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1984;148: 140-6.
3. Macklon NS, Geraedts JPM, Fauser BCJM. Conception to ongoing pregnancy: the "black box" of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 333-43.
4. Gracia C, Sammel M, Chittams J, Hummel A, Shaunik A. Risk factors for spontaneous abortion in early symptomatic first-trimester pregnancies. *Obstet Gynecol* 2005;106: 759-66.
5. Kutteh WH. Recurrent pregnancy loss: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999; 11: 435-9.
6. Byrne J, Ward K. Genetic Factors in Recurrent Abortion. *Clinical Obstet and Gynecol* 1994;37(3): 693-704.
7. Sierra S, Stephenson M. Genetics of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2006; 24(1): 17-24.

8. Lebedev N, Nazarenko SA. Tissue-Specific Placental Mosaicism for Autosomal Trisomies in Human Spontaneous Abortuses. *Russian J Genet* 2001; 37(11): 1224-37.
9. Uematsu A, Yorifuji T, Muroi J, Kawai M, Mamada M. Parental origin of normal X chromosomes in Turner syndrome patients with various karyotypes: Implications for the mechanism leading to generation of a 45, X karyotype. *Am J Med Genet* 2002; 111: 134-9.
10. Knapen MF, Zusterzeel PL, Peters WH, Steegers EA. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999a;82: 171-84.
11. Zaragoza MV, Surti U, Redline RW, Millie E, Chakravarti A, et al. Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1807-20.
12. Puscheck E E, Jeyendran R S. The impact of male factor on recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 2007; 19(3): 222-8.
13. 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.
14. Knapen MF, Peters WH, Mulder TP, Merkus HM, Jansen JB. Glutathione and glutathione related enzymes in decidua and placenta of controls and women with preeclampsia. *Placenta* 1999b;20: 541-6.
15. Strange RC, Fryer AA. The glutathione S-transferase: influence of polymorphism on cancer susceptibility. In Boffetta P, Caporaso N, Cuzick J, Lang M, Vineis P. *Metabolic polymorphisms and cancer*. IARC, Lyon: IARC Scientific Publications; 1999; P. 231-49.
16. Zhong S, Wyllie AH, Barnes D, Wolf CR and Spurr NK. Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1821-4.
17. Curran JE, Weinstein S R and Griffiths L R. Polymorphisms of glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and breast cancer susceptibility. *Cancer letters* 2000; 153: 113-20.
18. World Health Organization. *Laboratory manual for the examination of human semen and semen cervical mucus interaction*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press, Cambridge, UK; 1992.
19. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 2002;23: 737-52.
20. Awasthi YC, Sharma R, Singhal SS. Human glutathione S-transferases. *Int J Biochem* 1994;26: 295-308.
21. Ryberg D, Skaug V, Hewer A. Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis* 1997;18: 1285-9.
22. 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.
23. Rubes J, Selevan SG, Sram RJ, Evenson DP, Oishi S, Perreault SD. GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated. Effects of butyl paraben on the male reproductive system in mice. *Arch Toxicol* 2002;76: 423-9.
24. Chen Y, Zuo Z, Chen S, Yan F, Yang Z, Wang C. Reduction of spermatogenesis in mice after

- tributyltin administration. *Toxicology* 2008;251: 21-7.
25. Fritsche E, Schuppe HC, Dohr O, Ruzicka T, Gleichmann E, Abel J. Increased frequencies of cytochrome P4501A1 polymorphisms in infertile men. *Andrologia* 1998;30: 125-8.
 26. Baccetti B, Collodel G, Estenoz M, Manca D, Moretti E, Piomboni P. Gene deletions in an infertile man with sperm fibrous sheath dysplasia. *Hum Reprod* 2005;20: 2790-4.
 27. Guarducci E, Nuti F, Becherini L, Rotondi M, Balecia G, Forti G, Krausz C. Estrogen receptor alpha promoter polymorphism: stronger estrogen action is coupled with lower sperm counts. *Hum Reprod* 2006;21: 994-1001.
 28. Aydos SE, Taspinar M, Sunguroglu A, Aydos K. Association of CYP1A1 and glutathione S-transferase polymorphisms with male factor infertility. *Fertil Steril* 2009;92: 541-7.
 29. Finotti AC, Costa ESRC, Bordin BM, Silva CT, Moura KK. Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphism in men with idiopathic infertility. *Genet Mol Res* 2009;8: 1093-8.
 30. Harries L W, Stubbins M J, Forman D, Howard 18. Carless M A, Lea R A, Curran J E, Appleyard B, Gaffney P, Green, A and Griffiths L R. The GSTM1 null genotype confers an increased risk for solar keratosis development in an Australian Caucasian population. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 1373-8.
 31. Hirvonen A, Taylor J A, Wilcox A J. Xenobiotic metabolism genes and the risk of recurrent spontaneous abortion. *Epidemiology* 1996; 7, 206-8.
 32. Liska F. Selected genetic aspects of male infertility- what animal models tell us. *Bio (Praha)* 2003;49: 129-41.
 33. 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.
 34. Ryberg D, Skaug V, Hewer A, Phillips DH, Harries L W, Wolf C R, 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.
 35. Safarinejad MR, Dadkhah F, Asgari MA, Hosseini SY, Kolahi AA, Iran-Pour E. Glutathione S-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and male factor infertility risk: a pooled analysis of studies. *Urology J* 2012;9(3):541.
 36. Fatahi E, Safinejad K, Mehrabi M. Association of glutathione s-transferase m1 and t1 polymorphisms with severe oligozoospermia. *Urmia Med J* 2016;26(10):844-51.

POLYMORPHISMS OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE M1 AND T1 IN MALE PARTNER OF COUPLES HAVING RECURRENT PREGNANCY LOSS

Kyumars Safinejad^{1}*

Received: 15 May, 2016; Accepted: 14 Aug, 2016

Abstract

Background & Aims: Recurrent Pregnancy Loss (RPL) is defined as two or more consecutive spontaneous abortions. Glutathione S-transferase genes produce isoenzymes that protect embryo against oxidative stress. The aim of this study was to determine the removal of the two genes, GSTT1 and GSTM1 in male partners of couples having RPL.

Materials & Methods: A case-control study of 102 cases was conducted including male partner of the patients with RPL, and 104 controls, male partner of the normal couples. The semen samples of the cases and controls were collected and analyzed. Peripheral blood from the cases and controls were collected. DNA was extracted and subsequently multiplex PCR based genotyping assays were used. Chi square-analysis, Fisher's exact test and correlation test were used for statistical evaluation.

Results: We found that 26.47% and 42.16% of the cases with RPL and 8.56% and 14.42% of the controls had the GSTM1 and GSTT1 null genotype (asynchronously). The GSTM1 null genotype was found significantly more often in cases than in controls (26.47% versus 8.56%, $P < 0.05$), the GSTT1 null genotype was found significantly more often in cases than in controls (42.16% versus 14.42%, $P < 0.05$). Also significant positive correlation ($\text{Corr}=0.6$; $P < 5\%$) between combined null genotype (simultaneous removal of GSTM1 and GSTT1) abnormal sperm morphology was seen.

Conclusion: The GSTM1 and GSTT1 null genotype in cases with RPL was found to be a risk factor in male partners of couples having RPL.

Keywords: Recurrent pregnancy loss, Polymorphisms, Glutathione S-transferase M1, Glutathione S-transferase T1, Multiplex PCR

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

Tel: +989121510731

Email: q_safinejad@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2016; 27(7): 561 ISSN: 1027-3727

¹ Assistant Professor, Department of Biology, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran (Corresponding Author)