مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۰ ، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۱
صفحه: ۳۶۰-۳۵۰

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 20, No. 3, Jul- Aug 2012
Pages: 350-360

بررسی توزیع فراوانی حذف ژن‌های گلوتاتیون اس ترانسفراز T1 و گلوتاتیون اس ترانسفراز M1 در مردان دارای واریکوسل و ارتباط آن با پارامترهای اسپرم

مصطفی دهقانی[۱]، سراج الدین وحیدی[۲]، رضا معین[۳]، بی بی فاطمه حقیرالسادات[۴]، مریم شرف الدینی[۵]، محمدحسن شیخها*[۶]

۱-کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی یزد
۲- دانشیار گروه اورولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
۳- استادیار گروه اورولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
۴- دانشجوی دکتری تخصصی نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران
۵- کارشناسی ارشد زبان، دانشگاه فردوسی مشهد
۶- دانشیار گروه ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۲/۴

چکیده

مقدمه: ایزوآنزیم‌های GSTM و GSTT در سطح اسپرم وجود دارند که در محافظت علیه استرس االکسیداتیو نقش دارد. هدف این مطالعه بررسی پلی مورفیسم ژن GSTT1 و GSTM1 در ارتباط با پارامترهای اسپرمی می‌باشد.

روش بررسی: این مطالعه روی ۴۶ مرد مبتلا به واریکوسل و ۴۸ مرد بدون واریکوسل انجام شد. آنالیز مایع منی بر اساس روش استاندارد WHO برای هر دو گروه انجام گرفت. پس از استخراج DNA ژنومی خون با استفاده از روش Salting out، پلی مورفیسم ژن GSTM1 و GSTT1 با استفاده از Multiplex-PCR بررسی شد.

نتایج: فراوانی ژنوتیپ نول GSTM1 در گروه مورد و شاهد به ترتیب ۶۰/۹ و ۴۱/۷ درصد بود که تفاوت معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت($p>۰/۰۵$). همچنین فراوانی ژنوتیپ نول GSTT1 در گروه مورد و شاهد به ترتیب ۴۷/۸ و ۵۰ درصد بود که تفاوت معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت($p>۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: فقدان فعالیت آنزیمی مربوط به ژنوتیپ نول GSTM1 تاثیری بر مورفولوژی و حرکت کند و تند اسپرم نداشته اما باعث کاهش معناداری در تعداد اسپرم شده است. در مورد ژنوتیپ نول GSTT1 هم، تاثیر حذف GSTT1 هیچگونه تاثیری بر پارامترهای اسپرمی نداشته است که ممکن است به دلیل فعالیت جبرانی سایر ژن‌های این خانواده بزرگ ژنی باشد.

واژه‌های کلیدی: واریکوسل، گلوتاتیون- اس-ترانسفراز، پلی مورفیسم GSTT1 و GSTM1، پارامترهای اسپرم

* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۳۳۵۷۷۳۸۷، پست الکترونیکی: sheikhha@yahoo.com

www.SID.ir

مقدمه

ناباروری به ناتوانی یک زوج به بارور شدن در طی یک سال مقاربت، بدون جلوگیری اطلاق می‌گردد. نزدیک به ۱۵-۱۰ درصد از زوج‌های در سنین باروری از مشکل نازایی رنج می‌برند، بدین جهت بشر همیشه به دنبال راه حلی جهت بر طرف نمودن این معضل خانوادگی و اجتماعی بوده است(۱).

بر طبق آمار در حدود ۴۰درصد موارد مردان به نحوی در ناباروری دخیل می‌باشند. به طور کلی ناباروری مردان به کاهش و یا نقض در عملکرد تولید و دوره تکاملی اسپرم در بیضه‌ها و مجاری دستگاه تولید مثل می‌باشد که بعضی از علل ناباروری در مردان عبارت است از:

۱-عوامل پیش بیضه‌ای ۲- عوامل بیضه‌ای ۳-عوامل بعد بیضه‌ای(۲).

اختلال در اسپرماتوژنز ناشی از بیماری‌هایی است که بر بیضه تاثیر می‌گذارند. اکثریت مردان مبتلا به ناباروری دچار نوعی اختلال در اسپرماتوژنز می‌شوند. برخی از مهمترین دلایل ایجاد این نوع ناباروری شامل

الف- ناهنجاری‌های کروموزومی ب) مواد شیمیایی و شیمی درمانی ج) گنادو توکسین‌های شغلی د- پرتو درمانی ه- افزایش درجه حرارت و بیماری‌ها است(۲).

برخی از بیماری‌ها تاثیر بسزایی بر باروری دارند که عبارتند از ۱-کریپتورکیدیسم (عدم نزول بیضه) ۲- التهاب بیضه ۳-واریکوسل یا واریس سیاهرگ‌های طناب اسپرماتیک(۲).

واریکوسل به پیچ خوردگی غیر طبیعی و گشاد شدن وریدهای بیضه در مسیر طناب اسپرماتیک گفته می‌شود. شیوع واریکوسل در مردان جوان حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد ودر مردان مسن حدود ۳۰ درصد می‌باشد(۳،۴). علل ایجاد واریکوسل هنوز به روشنی مشخص نشده است ولی نظریه‌هایی علت پیدایش واریکوسل را توجیه می‌کنند، مانند ۱- تجمع ذاتی خون در شبکه پامپینی فرم ۲- پدیده فندق شکن ۳- عدم وجود دریچه لانه گبوتری به طور مادرزادی در سیاهرگ‌های بیضه ۴- افرایش فشار ناشی از مسیر طولانی و تقریباً عمودی سیاهرگ بیضوی داخل چپ(۲).

واریکوسل تولید و عملکرد اسپرم را مختل می‌کند(۴،۵) اما هنوز مکانیسم دقیقی که واریکوسل از طریق آن سبب اختلال در ساختار و عملکرد اسپرم و نهایتا ناباروری می‌شود، به خوبی شناخته نشده اما به تئوری‌های متعددی از قبیل ۱- نقص در محور هیپوتالاموس– گنادی ۲-هیپوکسی بیضه‌ها ناشی از استاز وریدی ۳- افزایش درجه حرارت بیضه‌ها ۴-ریفلاکس متابولیت‌های سمی از کلیه یا آدرنال ۵- افزایش رادیکال‌های آزاد آکسیژن اشاره شده است(۶).

مطالعات اخیر نشان داده در بسیاری از مکانیسم‌هایی که واریکوسل سبب ناباروری می‌شود، با واسطه استرس اکسیداتیو و اختلال در عملکرد بیضه‌ها است(۷).

تمامی موجودات زنده جهت بقاء خود نیازمند اکسیژن هستند عمده متابولیت‌های فعال اکسیژن (ROS: Reactive Oxygen Species) شامل H_2O_2، $OH^{\cdot}$، O^{-2} بوده که قادر به حمله به بیوملکول‌ها و تغییرات زیان آور در ساختار سلولی می‌باشند(۸). گزارشات متعددی از افزایش آنیون سوپر اکساید در مایع منی و بافت بیضه افراد واریکوسلی و نیز در مطالعات حیوانی مطرح شده است(۹،۱۰) که پیشنهاد می‌کند اختلال عملکرد اسپرم شاید بخشی به دلیل افزایش گونه‌های فعال اکسیژن باشد.

تولید ros بوسیله اسپرم یک فرایند فیزیولوژیک است که نقش واسطه‌ای مهمی را در مکانیسم‌های انتقال سیگنال-ظرفیت‌پذیری اسپرم- تسهیل واکنش آکروزومی و فیوژن اووسیت-اسپرم ایفا می‌کند(۱۱). اما از آنجایی که اسپرم در غشاء پلاسمایی خود مقادیر زیادی اسید چرب غیر اشباع دارد و سیتوپلاسم آن دارای آنزیم‌های رفتگر کمی است لذا نسبت به آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو که در شرایط غیر فیزیولوژیک به وجود می‌آید حساس می‌باشد(۱۲). پراکسیداسیون لیپید اسیدهای چرب غیر اشباع در سر و قطعه میانی اسپرم سبب تغییر مرفولوژی اسپرم و کاهش قدرت تحرک و ناکارمدی واکنش فیوژن اسپرم-اووسیت می‌شود(۱۳).

بخشی از افزایش حساسیت به استرس اکسیداتیو در مبتلایان

Archive of SID
www.SID.ir

به واریکوسل ممکن است به دلیل اختلال در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (TAC: Total Antioxidant Capacity) پلاسمای مایع منی باشد(۱۴،۱۵). از آنجایی که استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش ros نقش مهمی را در اختلال در عملکرد اسپرم بیماران واریکوسلی بازی می‌کند. بنابراین بدن باید بتواند به طریقی میزان ROS را کاهش داده تا مانع از آسیب به اسپرم‌ها و کاهش باروری شود(۱۶،۱۷).

یکی از سیستم‌های دفاعی علیه آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو در مایع منی و اسپرم انسان خانواده آنزیمی گلوتاتیون –اس-ترانسفراز می‌باشد. آنزیم گلوتاتیون-اس-ترانسفراز خانواده بزرگی از آنزیم‌های فاز Π می‌باشد که در سم زدایی ترکیبات خارجی زیستی(xenobiotics) نقش دارد(۱۷). در مطالعات متعددی وجود آنزیم گلوتاتیون-اس-ترانسفراز فعال در سطح اسپرم تایید شده است(۱۸). در مقایسه با سلول‌های سوماتیک اسپرم به آسیب توسط گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن(ros) بسیار حساس است که مربوط به فزونی اسیدهای چرب غیراشباع در غشاء پلاسمایی به خصوص در ناحیه سر اسپرم می باشد. لذا چنانچه فعالیت آنزیم گلوتاتیون-اس-ترانسفراز در اسپرم با خواص آنتی اکسیدانی قوی علیه آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو به هر طریقی مختل شود باعث آسیب به غشاء اسپرم می‌شود که با از دست دادن توان واکنش آکروزومی و کاهش توانایی اسپرم برای باروری تخمک در محیط خارج رحمی است(۱۸،۱۹).

ژن GST به شش دسته شامل ایزوفرمهای آلفا- مو-پی-تتا-سیگما و زتا تقسیم می‌شود. اگر چه لوکوس پلی مورفیسم در هر شش کلاس ژن های خانواده GST شناسایی شده است اما بیشترین پلی مورفیسم‌ها در لوکوس ژن‌های GSTT1 و GSTM1 که به ترتیب روی کروموزم ۲۲ و ۱ قرار دارند تمرکز دارند . ژن‌های کلاس GSTM به صورت یک خوشه ژنی متشکل از ژن‌های GSTM1 تا GSTM5 در ناحیه کروموزمی 1P13*3 قرار گرفته اند(۲۰).

با توجه به نقش کلیدیGST در مقابله با استرس اکسیداتیو و خنثی سازی مواد سمی آلی و نیز وجود آن در سطح اسپرم و نقش آن در لقاح اسپرم با تخمک، فقدان یا کاهش فعالیت آن می‌تواند علاوه بر اختلالات روند استرس اکسیداتیو با اختلالاتی در روند ناباروری مردان همراه باشد. بنابراین هر نوع تغییر در ژن‌های کد کننده آنزیم GST که منجر به کاهش یا فقدان فعالیت آنزیم شود می‌تواند برای بررسی وضعیت استرس اکسیداتیو و ناباروری حائز اهمیت باشد(۲۱)، لذا هدف این مطالعه بررسی پلی مورفیسم ژن‌های GSTT1 وGSTM1 در افراد سالم و دارای واریکوسل و ارتباط آن با پارامترهای اسپرمی می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه موردی- شاهدی(Case-control) از افراد مراجعه کننده به بیمارستان مادر و مرکز ناباروری یزد، ۹۴ نفر به عنوان گروه شاهد و مورد انتخاب شدند که از نظر وجود پلی مورفیسم در ژن‌های GSTT1 و GSTM1 مورد بررسی قرار گرفتند که از این تعداد ۴۶ نفر دارای واریکوسل و ۴۸ نفر هم به عنوان شاهد انتخاب شد. برای تمام این افراد آنالیز مایع منی بر اساس استانداردهای WHOانجام گرفت.

استخراج DNA ژنومی:

از تمام افراد مورد مطالعه پنج میلی لیتر خون محیطی دریافت شد و نمونه‌های خون به لوله‌های حاوی ماده ضد انعقادEDTA منتقل شد و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. از تمام نمونه‌های خون استخراج DNA به روش Salting out از گلبول‌های سفید انجام گرفت. بررسی کیفی و کمی DNA استخراج شده به روش اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز با استفاده از ژل آگاروز انجام گرفت.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز(Multiplex PCR):

برای تشخیص حذف هموزیگوت در ژن‌های GSTT1 وGSTM1 با روش Multiplex PCR سه جفت پرایمر یک جفت پرایمر gstm1 و یک جفت پرایمر gstt1 و یک جفت پرایمر B-Globin برای تایید تکثیر مورد استفاده قرار گرفت.

یک جفت پرایمر gstm1 با توالی زیر طراحی شد:

F: GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC

Archive of SID
www.SID.ir

R: GTTGGGCTCAAATATACGGTGG این پرایمرها می‌توانند یک توالی نوکلئوتیدی به طول ۲۱۹ جفت باز از ژن gstm1 را تکثیر کنند. همچنین یک جفت پرایمرgstt1 با توالی زیر استفاده شد

F: TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC و

R: TCACCGATCATGGCCAGCA

که این پرایمرها می‌توانند یک توالی نوکلئوتیدی به طول ۴۸۰ جفت نوکلئوتید از ژن gstt1 را تکثیر کنند.

برای تایید PCR و تشخیص ژنوتیپ نول ژن‌های GSTT1 وGSTM1 از یک جفت پرایمر B-Globin به عنوان ژن کنترل (Houskeeping gene) استفاده شد. یک جفت پرایمر B-Globin با توالی زیر طراحی شد:

F: CAACTTCATCCACGTTCACC

و R: GAAGAGCCAAGGACAGGTAC

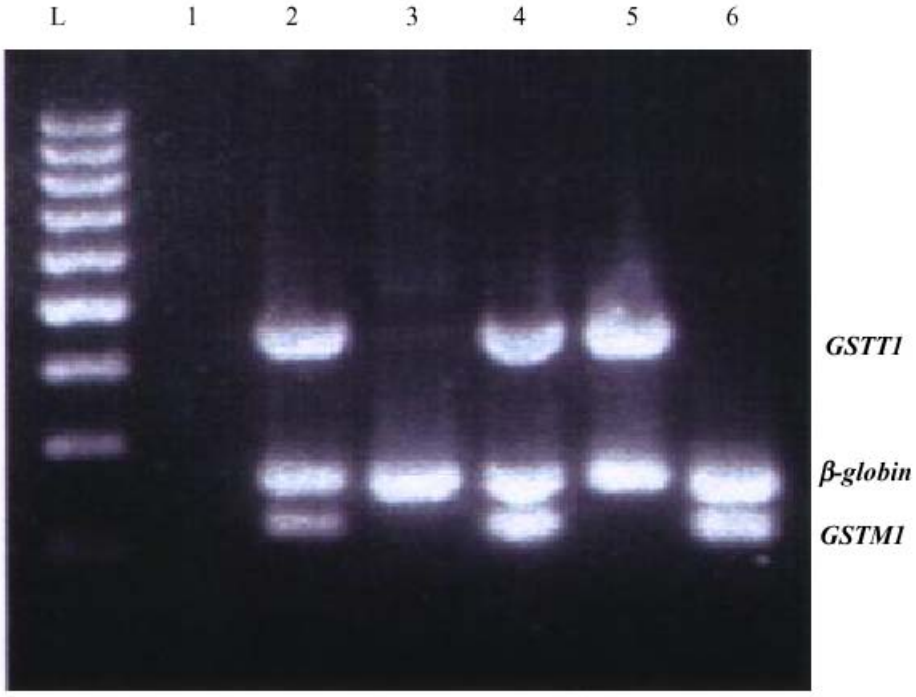
این پرایمرها یک توالی ۲۶۸ جفت بازی از ژن B-Globin را تکثیر می‌کنند.

واکنش PCR در میکروتیوب های ۰/۲ml با بافر 10X PCR همراه کلرید منیزیم ۵۰Mm به مقدار ۰/۷۵µl و مخلوط dNTP(0.1mM) به مقدار ۰/۵µl و هریک از پرایمرهای GSTT1 وGSTM1 و B-Globin به مقدار ۰/۳µl و آنزیم تک DNA پلی مراز به مقدار ۰/۱۵µl و ۲µl نمونه DNA به اضافه آب مقطر تا حجم نهایی ۲۰µl انجام شد . واکنش PCR برای ۳۵ چرخه در دستگاه ترموسایکلر اجرا شد.

الکترو فورز ژل آگارز:

محصولات PCR روی ژل آگارز ۲/۵٪ با ولتاژ ۱۱۰ ولت و ۱۲۰ دقیقه جداسازی و رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم برماید (۱۳g/ml) انجام گرفت. قطعات DNA حاصل از تکثیر ژن GSTT1 و GSTM1 به ترتیب ۲۱۹ و ۴۸۰ جفت باز طول دارند و قطعات مربوط به تکثیر ژن B-Globin دارای طول ۲۶۸ جفت بازی بودند(شکل ۱).

برای مقایسه فراوانی ژنوتیپ نول و مثبت GSTT1 و GSTM1 بین دو گروه شاهد و بیمار از آزمون t-test استفاده گردید. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گردید سطح معنی دار p کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.



شکل۱: نتایج PCR: محصولات PCR مولتی پلکس از GSTT1 و GSTM1 و بتاگلوبین روی ژل آگاروز٪۲/۵رانشان می‌دهد.

www.SID.ir
Archive of SID

نتایج

در این مطالعه ۹۴ نفردر دو گروه مردان دارای واریکوسل به تعداد ۴۶ نفر با میانگین سنی ۶/۴۶±۳۰/۷۷ و گروه شاهد مردان بدون واریکوسل به تعداد ۴۸ نفر با میانگین سنی ۴/۹۴±۳۲/۷۴ بررسی شدند. نتایج حاصل از مایع منی این افراد شامل تعداد اسپرم، مرفولوژی طبیعی اسپرم، حرکت اسپرم با درجات a و b (تند و کند) در جدول ۱ نشان داده شده است. پارامترهای اسپرمی شامل تعداد اسپرم، مرفولوژی و حرکت اسپرمی(با درجات a و b) بین دو گروه مردان دارای واریکوسل و بدون واریکوسل اختلاف معنی‌داری نشان داد(p<۰/۰۵).

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار متغیرهای مورد بررسی به تفکیک دو گروه مورد و شاهد

گروه		تعداد اسپرم	حرکت سریع اسپرم	حرکت کند اسپرم	مرفولوژی طبیعی اسپرم
مورد	میانگین	۷۵/۱۷	۱۲/۹۱	۳۲/۹۵	٪۲۴/۵۶
	انحراف معیار	۴۴/۲۹	۷/۶۱	۱۲/۱۴	٪۱۱/۳۵
شاهد	میانگین	۱۰۲/۰۸	۲۵/۳۲	۲۴/۰۲	٪۴۹/۱۸
	انحراف معیار	۴۵/۱۶	۱۲/۸۹	۲۷/۴۲	٪۱۸/۷۷
کل	میانگین	۸۸/۹۱	۱۹/۲۵	۳۳/۵۰	٪۳۷/۱۳
	انحراف معیار	۴۶/۵۰	۱۲/۲۸	۲۱/۲۵	٪۱۹/۸۳
p.value		۰/۰۰۸	۰/۰۰۰	۰/۷۹	۰/۰۰۰

برای مقایسه از آزمون t-test استفاده شده است. p<۰/۰۵ معنی‌دار می‌باشد.
تعداد اسپرم به میلیون در سانتیمتر مکعب است.

نتایج بررسی پلی مورفیسم حذف ژن GSTM1 در این افراد نشان داد فراوانی ژنوتیپ نول GSTM1 در گروه مورد و شاهد به ترتیب ٪۶۰/۹ و ٪۴۱/۷ می‌باشد که این اختلاف فراوانی ژنوتیپ نول GSTM1 بین دو گروه معنی‌دار نمی‌باشد(p=۰/۰۶). همچنین فراوانی ژنوتیپ نول GSTT1 در دو گروه بیمار و شاهد به ترتیب ٪۴۷/۸ و ٪۵۰ است که اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد(p=۰/۸۳).

اختلاف میانگین پارامترهای آنالیز مایع منی شامل تعداد، مرفولوژی و حرکت اسپرم با درجات a و b بین ژنوتیپ نول و مثبت GSTT1 در دو گروه بررسی شد که این ختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نبود(p>۰/۰۵). همچنین اختلاف میانگین پارامترهای آنالیز مایع منی شامل تعداد، مرفولوژی و حرکت اسپرم با درجه b بین ژنوتیپ نول و مثبت GSTM1 در دو گروه بررسی شد که این ختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نبود(p>۰/۰۵) اما ژنوتیپ نول GSTM1 در مردان دارای واریکوسل باعث ایجاد اختلاف معنی‌دار در میانگین تعداد اسپرم در افراد شاهد در مقایسه با میانگین تعداد اسپرم در افراد بیمار شد(p<۰/۰۵)(جدول ۲ و ۳).

برای این مطالعه میزان حذف ژن‌های GSTM1 و GSTT1 و یا هر دو آنها در ۴۶ بیمار مبتلا به واریکوسل و ۴۸ فرد بدون واریکوسل هماهنگ با گروه بیمار مورد بررسی قرار گرفت. بررسی‌های انجام شده نشان داد که از ۴۶ فرد مبتلا به واریکوسل ۲۲ نفردارای ژنوتیپ نول GSTT1(٪۴۷/۸) و ۲۴ نفر(٪۵۲/۲) بدون حذف GSTT1 بوده‌اند و از ۴۸ فرد سالم استفاده شده ۲۴ نفر(٪۵۰) دارای ژنوتیپ نول و ۲۴ نفر(٪۵۰) هم بدون حذف GSTT1 بودند که تفاوت معنی‌داری در حذف ژن GSTT1 بین افراد بیمار و سالم وجود ندارد(P=۰/۸۳). همچنین در بررسی حذف ژن GSTM1 مشاهده شد که از ۴۶

www.SID.ir
Archive of SID

بیمار مورد مطالعه ۲۸ نفر(۶۰/۹٪) دارای ژنوتیپ نول و ۱۸ مورد(۳۹/۱٪) بدون حذف بوده‌اند که تفاوت معنی‌داری بین دو گروه شاهد و بیمار از نظر حذف ژن GSTM1 وجود نداشت(P=۰/۰۶).

جدول ۲: مقایسه تاثیر حذف ژن GSTT1 برروی پارامترهای اسپرم

پارامترهای اسپرمی	گروه مورد		گروه شاهد		p.value
	ژنوتیپ GSTT1(-)	ژنوتیپ GSTT1(+)	ژنوتیپ GSTT1(-)	ژنوتیپ GSTT1(+)	
تعداد	۷۱/۷۷	۷۸/۲۹	۱۰۵/۲۰	۹۸/۹۵	۰/۴۹
مرفولوژی	٪۲۳/۱۳	٪۲۵/۸۷	٪۴۶/۵۴	٪۵۱/۸۳	۰/۲۱
حرکت سریع(درجه a)	۱۳/۶۸	۱۲/۲۰	۲۲/۹۱	۲۷/۷۵	۰/۴۴
حرکت کند(درجه b)	۳۱/۰۹	۳۴/۶۶	۳۱/۱۶	۳۶/۸۷	۰/۲۹

*برای مقایسه از آزمون t-test استفاده شده است$p<۰/۰۵$ معنی‌دار می‌باشد.

*تعداد اسپرم به میلیون در سانتیمتر مکعب است.

جدول ۳: مقایسه تاثیر حذف ژن GSTM1 برروی پارامترهای اسپرم

پارامترهای اسپرمی	گروه مورد		گروه شاهد		p.value
	ژنوتیپ GSTM1(-)	ژنوتیپ GSTM1(+)	ژنوتیپ GSTM1(-)	ژنوتیپ GSTM1(+)	
تعداد	۷۸	۷۰/۷۷	۸۳	۱۱۵/۷۱	۰/۰۳
مرفولوژی	٪۲۴	٪۲۵/۴۴	٪۴۳/۸	٪۵۳/۰۳	۰/۲۳
حرکت سریع(درجه a)	۱۲	۱۴/۳۳	۱۹/۷۵	۲۹/۳۲	۰/۰۹
حرکت کند(درجه b)	۳۲/۵۷	۳۳/۵۵	۳۰/۵۰	۳۶/۵۳	۰/۵۷۸

برای مقایسه از آزمون t-test استفاده شده است $p<۰/۰۵$ معنی دار میباشد

تعداد اسپرم به میلیون در سانتیمتر مکعب است.

در حذف توام GSTM1 و GSTT1 نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بدین ترتیب که فراوانی حذف همزمان GSTM1 و GSTT1 در ۴۶ نمونه گروه مورد ۱۶نفر(۳۴/۸٪) و در ۴۸ نمونه شاهد ۱۰مورد(۲۰/۸٪) دارای حذف همزمان بودند که این نتایج بیانگر این نکته است که افراد شاهد و کنترل از لحاظ فراوانی حذف همزمان ژن‌های GSTM1 و GSTT1 تفاوت معنی‌داری ندارند(P=۰/۰۱۸).

در بررسی مقایسه تاثیر حذف ژن GSTT1 بر روی پارامترهای اسپرم (مورفولوژی- تعداد اسپرم- حرکت سریع و کنداسپرم) نشان داده شد که حذف ژن GSTT1 تفاوت معنی‌داری را بین گروه شاهد و کنترل ایجاد نکرده است(p>۰/۰۵).

در بررسی مقایسه تاثیر حذف ژن GSTM1 بر روی مورفولوژی- حرکت سریع و حرکت کند اسپرم نشان داده شد

Archive of SID

www.SID.ir

که حذف ژنGSTM1 تاثیری بر تفاوت پارامترهای اسپرمی بین گروه شاهد و بیمار نداشته است(p>۰/۰۵)

اما در تاثیر حذف ژن GSTM1 بر روی تعداد اسپرم در گروه شاهد و بیمار نشان داده شد که حذف ژن GSTM1 باعث تفاوت معنی‌دار بین دوگروه شاهد و بیمار شده است(p=۰/۰۳).

بحث

حدود ۴۰٪ از ناباروری‌ها مربوط به مردان می‌باشد که می‌تواند علل مختلفی داشته باشد. یکی از مهمترین علت‌ها بیماری واریکوسل و عوامل ژنتیکی می‌باشد. علیرغم آزمایشات متعددی که انجام گرفته متاسفانه اتیولوژی واریکوسل هنوز ناشناخته باقی مانده است. چندین مطالعه پیشنهاد می‌کند استرس اکسیداتیو که عمدتا بوسیله رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایجاد می‌شود در پاتوژنز واریکوسل دخالت دارد.

مسلم شده که مایع منی انسان دارای مقدار معینی آنزیم گلوتاتیون- اس- ترانسفراز است که این خانواده آنزیمی می‌تواند سمیت رادیکال‌های آزاد اکسیژن را در اسپرم انسان کاهش دهد. ژن‌های گلوتاتیون اس ترانسفراز نقش کدگذاری این خانواده آنزیمی که نقش مهمی در کاتالیز اتصال و پیوستگی گلوتاتیون به انواع گسترده سوبستراهای الکتروفیلیک و هیدروفیلیک و واکنشگرهای ros دارند را بر عهده دارند. گلوتاتیون اس- ترانسفراز سلول‌ها را در مقابل سمی شدن به وسیله‌ای اتصالشان با گلوتاتیون حفظ می‌کند. گلوتاتیون در حالت ترکیب اغلب سمیت کمتری داشته و به طور کلی حلالیت آنها نسبت به ترکیبات آزاد بیشتر است، که حذف آنها را از سلول سهولت می‌بخشد.

بیان GST می‌تواند به وسیله در معرض قرار گرفتن با یک سوبسترای خارجی در ارگانیسم زنده(in vivo) القا شود که بیانگر این مطلب است که آنها بخشی از سیستم دفاعی را نسبت به استرس‌های شیمیایی را تشکیل می‌دهند. بدن انسان برای سم‌زدایی به اشکال مختلفی عمل می‌کند که این تئوری ممکن است تفاوت در پاسخ به واکنشگرهای ROS را توضیح دهد.

GSTM1 و GSTT1 با اشکال ژنتیکی متفاوتی در جمعیت انسان‌ها بیان شده است که بعضی افراد نسبت به این ژن‌ها دارای حذف هستند، این حذف بوسیله آزمون‌های پایه‌گذاری شده بر اساس PCR-DNA سلول‌های سوماتیک شناسایی می‌شود. نشان داده شده که در افراد با ژنوتیپ‌های حذفGSTM1 و GSTT1 هیچگونه فعالیت عملکردی آنزیم‌های مربوطه وجود ندارد.

ژن‌های کد کننده آنزیم‌های GSTM1 و GSTT1 در ۶۰-۱۰ درصد افراد بومی مختلف حضور نداشتند و یا هموزیگوت حذفی هستند(۲۲).

رویداد ژنوتیپ حذفی برای GSTM1 و GSTT1 در گروه‌های نژادی مختلف، متفاوت است. فراوانی ژنوتیپ حذفی GSTM1 در بین جمعیت‌های بشری زیاد است، نزدیک به ۵۰٪ سفیدپوستان قفقازی(۲۳) و ۲۰-۴۸/۹٪ سایر گروه‌های بومی و نژادی(۲۶-۲۲،۲۴) دارای حذف هستند. ژنوتیپ حذفی GSTT1، در ۱۰-۲۰٪ سفیدپوستان قفقازی(۲۳) و ۱۶/۸-۲۵۰٪ در دیگر گروه‌های نژادی مشاهده شده است(۲۶-۲۲،۲۴).

به هر حال این لوکوس‌ها متصل و پیوسته نیستند، چرا که افرادی که ژنوتیپ حذفی و ناقص GSTT1 دارند لزوما حذف GSTM1 ندارند و بالعکس.

به علاوه افرادی که هر دو ژنوتیپ حذفی GSTM1 و GSTT1 را دارند ممکن است در ریسک بالای قرار گیرند، چرا که آنها فاقد هر دو آنزیم هستند(۲۷).

با توجه به فراوانی بالای ژنوتیپ حذفی GSTM1 در جمعیت‌ها و فقدان فعالیت آنزیمی در این ژنوتیپ بررسی پلی‌مورفیسم ژن GSTM1 در ارتباط با ناباروری بیشتر مورد توجه قرار گرفته است.

در مطالعه و تحقیقی که بر روی افراد سالم و دارای واریکوسل در ترکیه انجام گرفته است نشان داده شده که تفاوت معناداری بین گروه شاهد و بیمار از نظر میزان حذف ژن‌های GSTT1 و GSTM1 وجود نداشته است(۲۸).

در مطالعه‌ای که پلی مورفیسم GSTM1 در مردان نابارور مبتلا به واریکوسل در جمعیت تایوان را مورد بررسی قرار داده از نظر فراوانی ژنوتیپ نول تفاوت معنی‌داری بین افراد سالم و

Archive of SID
www.SID.ir

بیمار مشاهده نشد(۲۹).

در مطالعه دیگری که پلی مورفیسم ژن GSTM1 را در مردان مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک در جمعیت ترکیه بررسی نموده است تفاوت معنی‌داری بین افراد سالم و نابارور وجود نداشته است(۳۰).

همچنین در مطالعه‌ای که در ایران انجام شده فراوانی ژنوتیپ نول GSTM1 و GSTP1 در افراد با پارامترهای اسپرمی معیوب و افراد با پارامترهای اسپرمی طبیعی تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد(۳۱).

چن در آزمایش‌هایی که انجام داد نشان داد که اسپرم افراد واریکوسلی با ژنوتیپ نول برای GSTM1 نسبت به آسیب‌های اکسیداتیو آسیب‌پذیرتر هستند(۱۶).

در تحقیق 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(۲۲).

از بررسی مطالعات گذشته می‌توان نتیجه گرفت که نتایج بدست آمده از این بررسی با نتایج قبلی همسو است و نشان می‌دهد که حذف ژن‌های GSTT1 و GSTM1 تاثیر چندانی بر پارامترهای اسپرمی ندارد. تفاوت در بعضی نتایج ممکن است به دلیل تفاوت در شرایط و نژاد افراد مورد مطالعه و نیز تاثیر عوامل دیگر علاوه بر این خانواده ژنی در ناباروری افراد دارای واریکوسل باشد.

در نهایت به عنوان نتیجه‌گیری کلی این مطالعه می‌تواند شروعی باشد بر مطاله گسترده‌تر در جهت یافتن ارتباط سایر پلی‌مورفیسم‌های ژنی GST با پارامترهای اسپرمی و درمان ناباروری. با توجه به اینکه حذف ژن‌های GSTM1 و GSTT1 تاثیر معنی‌داری بر پارامترهای اسپرمی نداشته، شاید سایر لوکوس‌های این خانواده ژنی نقش جبران کننده داشته‌اند و بررسی حذف این لوکوس‌ها می‌تواند گامی بلند در یافتن ارتباط این خانواده ژنی و پارامترهای اسپرمی در افراد دارای واریکوسل باشد.

References:

1- Keye WR, Chang RJ, Rebar RW, Soules MR. ***Evaluation and treatment infertility***. Saunders; 1997.p. 2-15.

2- Jafari H. ***Study of male infertility diagnosis and treatment***. Tehran: Hayan; 1995.p. 27-69. [Persian]

3- Sandlow J. ***Pathogenesis and treatment of varicocles***. BMJ 2004; 328(7446): 967-8.

4- Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Walsh PC. ***Campbell urology***. 7th ed. Philadelphia: W.B. saunders; 1998. p. 1287-322.

5- Lipshultz LI, Corrier JN Jr. ***Progressive testicular atrophy in the varicocele patient***. J Urol 1977; 117(2): 175-6.

6- Diamond DA, Zurakowski D, Atala A, Bauer SB, Borer JG, Cilento BG Jr, et al. ***Is adolescent varicocele a perogressive disease process?*** J Urol 2004;172(4 Pt 2): 1746-8.

7- Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. ***Pathophisiology of varicocele in male fertilility.*** Hum Reprod Update 2001; 7(5): 472-81.

8- Turner TT, Lysiak JJ. ***Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction*** . J Adronal 2008; 29(5); 488-98.

Archive of SID

www.SID.ir

9- Burnaugh L, Sabeur K, Ball BA. ***Generation of superoxide anion by eqine spermatozoa as detected by dihydroethidium.*** Theriogenology 2007 ;67(3): 580-9

10- Allamaneni SS, Naughton CK, Sharma Rk, Thomas AJ Jr, Agarwal A. ***Increased seminal reactive oxygen species levels in patients with varicoceles correlate with varicocele grade but not with testis size.*** Fertil Stril 2004; 82(6): 1684-6

11- Cam K, Simsek F, Yuksel M, Turkeri L, Haklar G, Yalcin S, et al. ***The role of reactive oxygen spesies and apoptosis in the pathogenesis of varicocele in a rat model and efficiency of vitamin E treatment***. Int J Androl 2004; 27(4): 228-33.

12- Saleh RA , Agarwal A. ***Oxidative stress and male infertility from research bench to clinical practice***. J Androl 2002; 23(6): 737-25.

13- de Lamirande E, Gagnon C. ***Impact of relative oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects.*** Hum Reprod 1995;10(Suppl 1): 15-21

14- Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. ***Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity.*** J Androl 1987; 8(5): 338-48.

15- Smith R, Vantman D, Ponce J, Scobar J, Lissi E. ***Total antioxidant capacity of human seminal plasma.*** Hum Reprod 1996; 11(8): 1655- 60.

16- Chen SS, Chang LS, Wei YH. ***Oxidative damage to proteins and decrease of ontioxidant capacity in patients with varicocele.*** Free Radic Biol Med 2001; 30(1): 1328-34.

17- Alkan I, Simsek F, Haklar G, Kervancioglu E, Ozveri H, Yalcin S, et al. ***Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants.*** J Urol 1997; 157(1): 140-3.

18- Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ Jr, Alvarez JG, Sikka SC. ***Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility .*** Fertile Steril 2006; 86(4): 878-85.

19- Armstrong RN. ***Structure, catalytic mechanism, and volution of the glutathione transferase***. Chem Res Toxical 1997; 10(1): 2-18.

20- Gopalakrishnan B, Shaha C. ***Inhibtion of sperm glutathione-s-transferase leads o functional impairoment due to membrane damge.*** FEBS Lett 1998; 422(3): 296-300.

21- 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(1): 108-15.

22- 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.

Archive of SID

www.SID.ir

23- Arruda VR, Grignolli CE, Goncalves MS, Soares MC, Menezes R, Saad ST, et al. ***Prevaience of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu(GSTM1) and theta(GSTTI) among distinet ethenic groups from Brazil: relevuuce to environmental carcinogenesis?*** Clin Genet 1998; 54: 210-14.

24- Norppa H. ***Genetic polymorphisrus and chromosome damage***. Int J Hyg Environ Health 2001; 204(1) : 31-8.

25- Rossini A, Rapozo DC, Amorim LM, Macedo JM, Medina R, Neto JF, et al. ***Frequencies or GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population***. Genet Mol Res 2002; 1(3): 233-40.

26- Gattas GJ, Kato M, Soares -Vieira JA, Siraque MS, Kohler P, Gomes L, et al. ***Ethnicitv and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisims in a Brazilian population***. Braz J Med Biol Res 2004: 37(4): 451-8.

27- Naveen AT, Adithan C, Padmaja N, Shashindran CH, Abraham BK, Satyannrayanarnoorthy K, et al. ***Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotype distribution in South Indians.*** Eur J Clin Phumacol 2004: 60(6): 403-6.

28- Acar H, Kilinc M, Guven S, Inan Z. ***Gluthion S-transferase M1 and T1 poly morphisms in Turkish patients with varicocele.*** Andorologia 2012; 44(1): 34-37.

29- Chen SS, Chang LS, Chen HW, Wei YH. ***Polymorphisms of glutation S-transferase M1 and mal infertility in Taiwanese patients with varicocele.*** Human Reprod 2002; 17(3): 718-25.

30- Nelson HH, Wiencke JU, Christiani DC, Cheng TJ, Zuo ZF, Schwartz BS, et al. ***Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutation S-transfrase theta.*** Carcinogenesis 1995; 16(5): 1243-5.

31- Mirfeizollahi A, Farivar Sh, Akhondi MM, Modarresi MH, Hodjat M, Sadeghi MR. ***GSTM1 and GSTP1 polimorphisms and glutathione S-transfrease activity:Iranian infertile men.*** Tehran Unive Med J 2009; 66(12): 878-87. [Persian]

Archive of SID

www.SID.ir

Investigating Frequency of GSTT1 and GSTM1 Genes Null Genotype in Men with Varicocele and Its Association with the Sperm Parameters

Dehghani M(MSc)[1], Vahidi S(MD)[2], Moin MR(MD)[3], Haghiroalsadat F(PhD Student)[4], Sharafaldini M(MSc)[5], Sheikhha M(PhD)[*6]

[1]Department of Biotechnology, Islamic Azad Univercity, yazd, Iran
[2,3]Department of Urology ,Shahid Sadughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
[4]Department of Nanobiotechnology, University of Tehran, Tehran, Iran
[5]Ferdosi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[6]Department of Genetic,Yazd University of Medical Sciences

Received: 17 Sep 2011 ***Accepted:*** 23 Feb 2012

Abstract

Introduction: GSTM and GSTT are subclasses of glutathione s-transferase that is present on human sperm surface and plays an important role against oxidative stress. This study aimed to investigate the polymorphisms of GSTT1 and GSTM1 in regard to sperm parameters.

Methods: This case-control study involved 46 men with varicocele and 48 men without varicocele. Semen analyses were carried out according to WHO guidelines. Blood DNA was extracted using salting out procedures. Polymorphism of GSTT1 and GSTM1 genes was determined trough multiplex-PCR respectively.

Results: Frequencies of GSTM1 null genotype in men with varicocelc and men without varicocele groups were 60.9 and 41.7 respectively. There were no statistically significant differences between Gstm1 null and positive genotype in two groups ($p>0.05$). Frequencies of gstt1 null genotype in case and control groups were 47.8 and 50 respectively. There were no statistically significant relationship between gstt1 null and positive genotype in two groups ($p>0.05$).

Conclusions: Deficiency of enzyme activity in gstm1 null genotype did not affect morphology as well as slow and quick progressive of sperm but caused the significant decrease in count of sperm between gstm1 null and positive genotype. In the case of gstt1, gstt1 null genotype did not affect sperm parameters that may be related to compensate activity of other genes in this super family.

Keywords: Varicocele, Glutathione s-transferase, Polymorphism of GSTT1 and GSTM1, Sperm parameters

This paper should be cited as:
Dehghani M, Vahidi S, Moin MR, Haghiroalsadat F, Sharafaldini M, Sheikhha M. ***Investigating frequency of GSTT1 and GSTM1 genes null genotype in men with varicocele and its association with the sperm parameters***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2012; 20(3): 350-60.

Corresponding author: Tel: +98 9133577387, Email: sheikhha@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir