

بررسی پلی مورفیسم ژنی ایزوآنزیم‌های GSTM1 و GSTP1 و فعالیت آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز: مردان نابارور ایرانی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۰۷/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۱۱/۰۲

چکیده

زمینه و هدف: ایزوآنزیم GSTM1 و GSTP1 آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز در سطح اسپرم انسان وجود دارند که در محافظت علیه استرس اکسیداتیو نقش دارد. هدف این مطالعه بررسی پلی مورفیسم ژن GSTM1 و GSTP1 و ارتباط آن با فعالیت آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز و پارامترهای اسپرمی می‌باشد. **روش بررسی:** این مطالعه روی ۹۵ مرد مبتلا به الیگوآستنو تراواسپرمی و ۲۶ مرد نورمواسپرمی انجام گردید. 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 با استفاده از Multiplex-PCR و پلی مورفیسم ژن GSTP1 به کمک روش PCR-RFLP بررسی گردید. سپس فعالیت آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز در سطح اسپرم اندازه گیری شد. **یافته‌ها:** فراوانی ژنوتیپ نول GSTM1 در گروه مورد و کنترل به ترتیب ۱/۵۲٪ و ۸/۵۳٪ بود. اختلاف فعالیت آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز بین دو ژنوتیپ مثبت و نول GSTM1 در دو گروه معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). نتایج پلی مورفیسم ژن GSTP1 نشان داد همه نمونه‌های مورد بررسی دارای ژنوتیپ Ile/Ile در کدون ۱۰۵ می‌باشند. فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت (Ala/Ala)، هتروزیگوت (Ala/Val)، هموزیگوت (Val/Val) (۱۱۴) ژن GSTP1 در گروه الیگوآستنو تراواسپرمی به ترتیب ۱/۸۱٪ و ۱۷/۹٪ و ۱/۱٪ و در گروه نورمو اسپرمی به ترتیب ۸۸/۵٪ و ۱۱/۵٪ و صفر بود. **نتیجه‌گیری:** فقدان فعالیت آنزیمی مربوط به ژنوتیپ نول GSTM1 تاثیری بر پارامترهای اسپرمی و میزان فعالیت آنزیمی ندارد که ممکن است به دلیل فعالیت جبرانی سایر ایزوآنزیم‌های موجود در سطح اسپرم از جمله GSTP1 باشد که خود می‌تواند مربوط به افزایش بیان ژن GSTP1 در مواجهه با استرس اکسیداتیو باشد.

کلمات کلیدی: آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز، پلی مورفیسم GSTM1، پلی مورفیسم GSTP1، ناباروری مردان

آزاده میرفیض‌اللهی^۱، شیرین فریور^۱، محمد مهدی آخوندی^۲، محمد حسین مدرس^۳، مهشید حجت^۲، محمدرضا صادقی^{۳*}

۱- گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی
۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن‌سینا
۳- گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران

* نویسنده مسئول، تهران، اوین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن‌سینا تلفن: ۲۲۴۳۲۰۲۴
email: Sadeghi@avicenna.ac.ir

مقدمه

غیرطبیعی در مایع منی و به دنبال آن ایجاد استرس اکسیداتیو می‌تواند یکی از دلایل ناباروری در مردان باشد.^۱ بنابراین بررسی پلی مورفیسم آنزیم‌های دخیل در مقابله با استرس اکسیداتیو اهمیت دارد. یکی از سیستم‌های دفاعی علیه آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو در مایع منی و اسپرم انسان آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز می‌باشد.^۲ آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز خانواده‌ای از آنزیم‌های فاز II می‌باشد که در سم‌زدایی ترکیبات خارجی زیستی (Xenobiotics) نقش دارد.^۳ مطالعات، وجود آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز فعال را در سطح اسپرم نشان داده است.^۴ در مقایسه با سلول‌های سوماتیک، اسپرم به آسیب توسط گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) بسیار حساس می‌باشد که مربوط به فزونی اسیدهای چرب غیراشباع در غشاء پلاسمایی

حدود ۱۵-۱۰٪ زوجین با مشکل ناباروری (Infertility) مواجه می‌شوند. حدود نیمی از موارد ناباروری مربوط به فاکتورهای مردانه است.^۱ در حدود ۱۵٪ ناباروری مردان ناشی از عوامل ژنتیکی می‌باشد. آنالیز پلی مورفیسم در ژن‌های دخیل در اسپرماتوژنز یکی از زمینه‌های تحقیق در ژنتیک ناباروری مردان می‌باشد. پلی مورفیسم یا واریانت‌های ژنتیکی در این ژن‌ها می‌تواند یک عامل خطر ساز باشد که برخی از این واریانت‌ها در ژن‌های خاص باعث اختلالات خفیف تا شدید در اسپرماتوژنز و در باروری مردان می‌گردد.^۲ از طرف دیگر، تولید بیش از حد گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن Reactive oxygen species (ROS) به وسیله لوکوسیت‌ها و نیز اسپرم‌های

اگزون که روی کروموزوم ۱۳q۱۱ قرار گرفته است. چهار واریانت آلی برای ژن GSTP1 انسانی شناخته شده است که شامل GSTP1a و GSTP1b و GSTP1c و GSTP1d می‌باشد^{۱۴} آلل GSTP1a آل طبیعی و شایع می‌باشد. آلل GSTP1b حاصل تغییر نوکلئوتیدی (Transition mutation) در جایگاه ۳۱۳+ به صورت A→G می‌باشد. این تغییر باعث جایگزینی اسید آمینه والین به جای ایزولوسین در کدون ۱۰۵ می‌شود که به صورت (105 Val, 114 Ala) GSTP1b نشان می‌دهند. آلل GSTP1c همان کدون ۱۰۵ آلل GSTP1b را دارد ولی در جایگاه نوکلئوتیدی ۳۴۱+ اگزون شش نیز دچار یک تغییر نوکلئوتیدی C→T می‌باشد که باعث جایگزینی والین به جای آلانین در کدون ۱۱۴ می‌شود که به صورت (105 Val, 114 Val) GSTP1c نشان می‌دهند. این پلی مورفیسم‌ها در اگزون پنج (Ile 105 Val)، اگزون شش (Ala 114 Val) می‌باشند.^{۱۴} مطالعات مختلف نشان داد که جایگزینی والین در کدون ۱۰۵ فعالیت آنزیمی را کاهش می‌دهد^{۱۵} در افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت GSTP1 (Val 105) محصول پروتئینی پایداری دمایی کمتر و فعالیت اتصال کنندگی کمتری نسبت به هموزیگوت GSTP1(Ile 105) دارد. راندمان کاتالیتیک (kcat/km) هر دو آلل c, b برای ۱- کلرو ۲ و ۴- دی‌نیترو بنزن (CDNB) حدود ۴-۳ برابر کمتر از پروتئین تیپ وحشی است^{۱۶} با توجه به نقش کلیدی GST در مقابله با استرس اکسیداتیو و خنثی‌سازی مواد توکسیک 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 باروری مردان همراه باشد. بنابراین، هر نوع تغییر در ژن‌های کدکننده آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز که منجر به کاهش یا فقدان فعالیت آنزیم شود، می‌تواند برای بررسی وضعیت استرس اکسیداتیو و ناباروری حائز اهمیت باشد. لذا هدف این مطالعه بررسی پلی مورفیسم ژن GSTP1, GSTM1 و ارتباط آن با فعالیت آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز و پارامترهای اسپرمی می‌باشد.

روش بررسی

مطالعه مورد-شاهدی (Case control) در مدت یک سال (۱۳۸۷-۱۳۸۶) در پژوهشگاه ابن‌سینا روی ۱۲۱ نفر از مردان مراجعه‌کننده به مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری و سقط مکرر ابن‌سینا بعد از اخذ رضایت‌نامه آگاهانه برای شرکت در مطالعه انجام

به‌خصوص در ناحیه سر اسپرم می‌باشد. بنابراین فعالیت آنزیم گلوکوتایون S- ترانسفراز در ناحیه سر اسپرم که حضور یک دفاع آنزیمی آنتی‌اکسیدانی علیه آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو در یک محل حساس را نشان می‌دهد در مقایسه با آنزیم‌های دفاعی دیگر که در قسمت میانی اسپرم قرار دارند برتری دارد.^۷ مهار فعالیت آنزیمی GST اسپرم منجر به آسیب غشاء می‌شود که با از دست دادن تحرک، مهار واکنش آکروزومی و کاهش توانایی آن برای باروری تخمک در محیط خارج رحم همراه است.^۸ آنزیم گلوکوتایون S- ترانسفراز دارای ایزوزیم‌های متعددی می‌باشد و از این بین ایزوزیم‌های کلاس GSTM و GSTP در سطح اسپرم وجود دارد.^۸ ژن‌های کلاس GSTM به صورت یک خوشه ژنی متشکل از ژن‌های کلاس GSTM1 پلی مورف بوده و دارای سه آلل a, b, o می‌باشد که آلل a, b در یک اسید آمینه در کدون ۱۷۳ تفاوت دارند ولی محصول پروتئینی و فعالیت آنزیمی یکسان دارند. آلل o دچار حذف هموزیگوت بوده و فاقد فعالیت آنزیمی است^{۱۰} در واقع خوشه ژنی کلاس GSTM دارای دو ناحیه تکراری بسیار مشابه ۴/۲ کیلو بازی در طرفین ژن GSTM1 می‌باشد. حذف در آلل o ژن GSTM1 توسط نوترکیبی همولوگ بین این دو ناحیه تکراری ۴/۲ کیلو بازی طرفین ژن GSTM1 انجام می‌گیرد که منجر به حذف یک ناحیه ۱۵ کیلو بازی می‌شود که کل ژن GSTM1 را در بر می‌گیرد. ناحیه تکراری ۴/۲ کیلو بازی ممکن است یک نقطه داغ (Hot spot) برای کراسینگ‌آور نابرابر باشد که می‌تواند توجیهی برای فراوانی بالای ژنوتیپ نول GSTM1 در جمعیت‌ها باشد.^{۱۱} چندین مطالعه نشان داد، ژنوتیپ نول GSTM1 در ارتباط با افزایش حساسیت به بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو می‌باشد که پیشنهاد می‌کند GSTM1 ممکن است یک ایزوآنزیم اساسی در سم‌زدایی محصولات حاصل از استرس اکسیداتیو باشد.^{۱۱} مطالعه Chen نشان داد، بیماران مبتلا به واریکوسل که ژنوتیپ نول GSTM1 دارند ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی مایع منی پایین‌تری دارند که ممکن است منجر به تخریب عملکرد اسپرم در این بیماران شود.^{۱۲} همچنین مطالعه Aydemir نشان داد، اسپرم و مایع منی افراد دچار ناباروری ایدیوپاتیک که ژنوتیپ نول GSTM1 دارند به آسیب استرس اکسیداتیو بسیار حساس می‌باشند.^{۱۳} کلاس GSTP1 دارای یک یا دو ژن مجزا با طول سه کیلو باز و متشکل از هفت

مقدار $0.4 \mu\text{l}$ و هر یک از پرایمرهای $\beta\text{F-globin}$ و $\beta\text{R-globin}$ ($5 \text{ pmol}/\mu\text{l}$) مقدار $0.7 \mu\text{l}$ و هر یک از پرایمرهای F-GSTM1 و R-GSTM1 ($15 \text{ pmol}/\mu\text{l}$) به مقدار $1.3 \mu\text{l}$ و آنزیم تک DNA پلی مرز ($5 \text{ U}/\mu\text{l}$) به مقدار $0.2 \mu\text{l}$ و بقیه حجم آب مقطر اضافه شد و با افزودن $1 \mu\text{l}$ نمونه DNA به حجم نهایی $20 \mu\text{l}$ رسید. واکنش PCR برای ۳۵ چرخه در دستگاه ترموسایکلر اجرا شد.

الکتروفورز ژل آگارز: محصولات PCR روی ژل آگارز 2.5% با ولتاژ ۸۰ ولت و 120 دقیقه جداسازی و رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید غلظت $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ انجام گرفت. قطعات DNA حاصل از تکثیر ژن GSTM1 به طول 215 جفت باز می باشند و قطعات مربوط به تکثیر ژن $\beta\text{-globin}$ 268 جفت باز طول دارند. افراد دارای ژنوتیپ نول GSTM1 فقط باند 268 جفت بازی مربوط به ژن $\beta\text{-globin}$ مشاهده می شود و فاقد باند 215 جفت بازی ژن GSTM1 می باشند.

بررسی پلی مورفیسم اگزون پنج و شش ژن GSTP1 با استفاده از روش PCR-RFLP: بررسی پلی مورفیسم در اگزون پنج جایگاه $+313$ و در اگزون شش جایگاه $+341$ با استفاده از یک جفت پرایمر gstp1 انجام گرفت. یک جفت پرایمر gstp1 با توالی زیر طراحی شد: $5'-\text{F:CTATGGGAAGGACCAGCAGG}$ $3'-\text{R:AAGGTC}$ این پرایمرها می توانند یک توالی نوکلئوتیدی به طول 1069 جفت باز را در اگزون پنج، انترن پنج و اگزون شش از ژن GSTP1 تکثیر کنند. واکنش PCR در میکروتیوپ های 0.2 ml با بافر PCR ($10 \times$) با مقدار $2.5 \mu\text{l}$ و کلرید منیزیم (25 mM) $1.5 \mu\text{l}$ و مخلوط dNTP (10 mM) مقدار $1 \mu\text{l}$ و هر یک از پرایمرهای F-gstp1 و R-gstp1 ($10 \text{ pmol}/\mu\text{l}$) مقدار $0.7 \mu\text{l}$ و آنزیم تک DNA پلی مرز ($5 \text{ U}/\mu\text{l}$) به مقدار $0.2 \mu\text{l}$ و بقیه حجم آب مقطر اضافه شد و با افزودن $1 \mu\text{l}$ نمونه DNA به حجم $25 \mu\text{l}$ رسید. واکنش PCR برای ۳۰ چرخه در دستگاه ترموسایکلر اجرا شد. محصولات PCR روی ژل آگاروز 1.5% مورد بررسی قرار گرفت، سپس هضم آنزیمی مورد نظر انجام گرفت. هضم آنزیمی قطعات حاصل از PCR برای ژن GSTP1 : آنزیم های محدودالایر مورد استفاده در انجام RFLP به وسیله برنامه Webcutter انتخاب شد. برای بررسی جایگاه $+313$ در اگزون پنج از آنزیم محدودالایر AccI و برای بررسی جایگاه $+341$ در اگزون شش از آنزیم محدودالایر FauI استفاده شد. $10 \mu\text{l}$ محلول حاوی آنزیم AccI ، محصول PCR، بافر 4 NEBuffer ($10 \times$) و آب مقطر را در داخل

شد. از این تعداد ۹۵ فرد با پارامترهای اسپرمی معیوب (الیگو آستنوتراتو اسپرمی) به عنوان گروه مردان نابارور و ۲۶ فرد با پارامترهای اسپرمی طبیعی (نورمواسپرمی) به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد زیرا مراجعین نورمواسپرمی کمتری وجود داشت. برای تمام این افراد آنالیز مایع منی بر اساس استانداردهای WHO انجام گرفت.^{۱۷} پس از انجام آنالیز مایع منی، ابتدا حجم مورد نظر برای تهیه غلظت 1 ml اسپرم $10^6 \times 10$ از هر نمونه مایع منی محاسبه شد که بعد از شستشو با محلول PBS (0.15 M)، به مدت 10 دقیقه با دور rpm 3000 سانتریفوژ شد. رسوب اسپرمی باقیمانده، با استفاده از محلول PBS (0.15 M) به حجم 1 ml رسانده شد. این نمونه ها در داخل میکروتیوپ های 1.5 ml تا زمان اندازه گیری فعالیت آنزیم گلوکوتائین S-ترانسفراز در دمای 20°C - نگهداری شدند.

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 به روش Miller انجام گرفت.^{۱۸} بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده به روش اسپکترو-فتومتری و الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز 1% انجام گرفت.

انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز (Multiplex PCR): برای تشخیص حذف هموزیگوت در ژن GSTM1 با روش Multiplex PCR دو جفت پرایمر، یک جفت پرایمر gstm1 و یک جفت پرایمر $\beta\text{-globin}$ برای تایید تکثیر مورد استفاده قرار گرفت. یک جفت پرایمر gstm1 با توالی زیر طراحی شد: $5'-\text{F:GAACTCCCTGAAAAGCTAA}$ $3'-\text{R:AGC}$ ، $3'-\text{R:GTTGGGCTCAAATA TACGGTGG}$ این پرایمرها می توانند یک توالی نوکلئوتیدی به طول 215 جفت باز را از ژن GSTM1 تکثیر کنند. برای تایید انجام PCR و تشخیص ژنوتیپ null ژن GSTM1 از یک جفت پرایمر $\beta\text{-globin}$ به عنوان ژن کنترل (Housekeeping gene) استفاده شد. یک جفت پرایمر $\beta\text{-globin}$ با توالی زیر طراحی شد: $5'-\text{F:CAACTTCATCCACGTTCCACC}$ $3'-\text{R:GAAGAGCCAAGGACA GGTAC}$ این پرایمرها می توانند یک توالی نوکلئوتیدی به طول 268 جفت باز از ژن $\beta\text{-globin}$ را تکثیر کنند. واکنش PCR در میکروتیوپ های 0.2 ml با بافر $10 \times \text{PCR}$ همراه کلرید منیزیم 2 mM به مقدار $2 \mu\text{l}$ و مخلوط dNTP (10 mM) به

محلول واکنش شامل مقادیر $980 \mu\text{M}$ از محلول 0.1M PBS و $10 \mu\text{M}$ از محلول 100mM CDNB و مقدار $10 \mu\text{M}$ از سوپسترای 100mM GSH می‌باشد که در مرحله بعدی به $900 \mu\text{M}$ از محلول واکنش، مقدار $100 \mu\text{M}$ نمونه مورد نظر که شامل 1×10^6 اسپرم بود، اضافه گردید. سپس جذب نوری در پنج دقیقه متوالی اندازه‌گیری شد. ابتدا جذب نوری در ثانیه دهم و سپس جذب نوری در پنج دقیقه و ۱۰ ثانیه بعدی ثبت شد. اختلاف جذب نوری در هر دقیقه محاسبه می‌شود. $\Delta A (340/\text{min}) = A340(\text{Time}2) - A340(\text{Time}1) / \text{Time}2$ آنزیم گلوتاتیون S- ترانسفراز از رابطه زیر محاسبه می‌شود:

$$\text{A340}/\text{min}/0.0096 \mu\text{M}^{-1}/\text{cm} \times 1.0 \text{ml} / 0.1 \text{ml} \times \Delta \text{GST activity} = \text{Sample Dilution}$$

واحد فعالیت آنزیم به صورت مقداری از آنزیم که بتواند در یک دقیقه یک میکرو مول ترکیب CDNB-GSH را تولید کند تعریف می‌شود و بر حسب اسپرم $1 \times 10^6 / \text{min} / \text{nmol}$ می‌باشد. ضریب جذب مولی (Extinction coefficient) CDNB میزان $(\mu\text{M}^{-1}/\text{cm})$ 0.0096 می‌باشد. برای مقایسه میانگین متغیرهای کمی با توزیع نرمال شامل فعالیت آنزیم گلوتاتیون S- ترانسفراز، حرکت اسپرم با درجه d ، سن افراد بین دو گروه از آزمون t - test استفاده شد. همچنین برای مقایسه متغیرهای کمی با توزیع غیر نرمال شامل غلظت اسپرم، تعداد کل اسپرم، طول مدت ناباروری افراد، مورفولوژی و حرکت اسپرم با درجات a ، b و c بین دو گروه الیگو آستنوتراواسپرمی و نورمواسپرمی از آزمون Mann-Whitney Test استفاده شد. برای مقایسه فراوانی ژنوتیپ نول و مثبت GSTM1 بین دو گروه افراد نورمواسپرمی و افراد با پارامترهای اسپرمی معیوب از آزمون χ^2 و برای مقایسه متغیرهای توزیع نرمال بین دو ژنوتیپ نول و مثبت در دو گروه از آزمون t - test و متغیرهای توزیع غیر نرمال از آزمون Mann-Whitney Test استفاده گردید. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و پیراست $11/5$ انجام گردید. سطح معنی‌دار p کمتر از 0.05 در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۱۲۱ نفر، در دو گروه مردان نابارور با پارامترهای اسپرمی معیوب (الیگو آستنوتراواسپرمی) به تعداد ۹۵ نفر با میانگین سنی $36/26 \pm 8/12$ و گروه کنترل مردان با پارامترهای اسپرمی طبیعی (نورمواسپرمی) به تعداد ۲۶ نفر با میانگین سنی $37/19 \pm 5/6$

میکروتیوب 0.5ml تهیه می‌کنیم، سپس میکروتیوب‌ها در دمای 37°C به مدت یک ساعت انکوبه می‌شوند. همچنین $10 \mu\text{M}$ محلول حاوی آنزیم FauI، بافر 10X NEBuffer (10X)، محصول PCR و آب مقطر را در داخل میکروتیوب 0.5ml تهیه می‌کنیم، سپس میکروتیوب‌ها در دمای 55°C در طول شب انکوبه می‌شوند. محصولات حاصل هضم آنزیمی به همراه محصول PCR و مارکرهای وزن ملکولی روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰٪ و بافر TAE با ولتاژ ۲۰۰ ولت الکتروفورز گردید. سپس رنگ‌آمیزی ژل توسط نیترات نقره انجام گرفت. محصول PCR پرایمر $gstp1$ به صورت یک قطعه 1069 جفت بازی می‌باشد که در صورت وجود تغییر نوکلئوتیدی در جایگاه $313 + (A \rightarrow G)$ آگزون پنج محل برش برای آنزیم محدودالتر AccI ایجاد می‌شود. هضم آنزیمی این قطعه منجر به تولید دو قطعه 87 و 982 جفت بازی می‌شود. در صورت عدم وجود تغییر نوکلئوتیدی، این قطعه توسط آنزیم محدودالتر AccI شناسایی نشده بریده نمی‌شود و به صورت همان قطعه 1069 جفت بازی محصول PCR باقی می‌ماند. قطعه 1069 جفت بازی حاصل از PCR پرایمر $gstp1$ دارای دو محل برش برای آنزیم محدودالتر FauI می‌باشد، یک محل برش در جایگاه $341 +$ می‌باشد، در صورت عدم تغییر نوکلئوتیدی در این جایگاه قطعه حاصل از PCR پرایمر $gstp1$ در هر دو محل بریده شده و سه قطعه 602 ، 365 و 102 جفت باز حاصل می‌شود. با تغییر نوکلئوتیدی در جایگاه $341 +$ آگزون شش محل برش دوم برای آنزیم محدودالتر FauI از بین رفته و فقط در یک محل بریده می‌شود در نتیجه قطعات حاصل از هضم آنزیمی به طول 602 و 467 جفت باز می‌باشند.

سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون S- ترانسفراز: آنزیم گلوتاتیون S- ترانسفراز طیف وسیعی از واکنش‌ها را کاتالیز می‌کند که در آنها آنیون تیولات گلوتاتیون به‌عنوان یک نوکلئوفیل شرکت دارند. سوپسترای عمومی آنزیم گلوتاتیون S- ترانسفراز ترکیب ۱-کلرو ۲ و ۴-دی‌نیترو بنزن (CDNB) می‌باشد. آنزیم گلوتاتیون S- ترانسفراز واکنش گلوتاتیون با CDNB را کاتالیز می‌کند و تشکیل ترکیب CDNB-GSH یک تیو اتر دی‌نیترو فنل تولید می‌کند که در طول موج 340 نانومتر توسط اسپکتروفتومتری قابل تشخیص می‌باشد. لذا فعالیت آنزیم گلوتاتیون S- ترانسفراز با استفاده از بافر فسفات پتاسیم و محلول گلوتاتیون احیاء و CDNB به‌طور اسپکتروفتومتری با طول موج 340 نانومتر در دمای 37 درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد.^{۱۹}

دو گروه معنی‌دار نمی‌باشد ($p > 0/05$). اختلاف میانگین پارامترهای آنالیز مایع منی شامل غلظت اسپرم، تعداد کل، مورفولوژی و حرکت اسپرم با درجات a, b, c, d بین ژنوتیپ نول و مثبت GSTM1 در دو گروه بررسی شد. اختلاف میانگین این پارامترهای اسپرمی بین دو ژنوتیپ مثبت و نول GSTM1 در دو گروه از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($p > 0/05$) (جدول ۲). فعالیت آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز در دو گروه مردان الیگواستنوتراتواسپرمی و نورمواسپرمی به ترتیب (اسپرم $\times 10^6 \pm 2/84 \ 84 \ 7/43$ و $7/07 \pm 1/68$ بود که در گروه الیگواستنوتراتواسپرمی بالاتر از گروه نورمواسپرمی می‌باشد ولی این اختلاف میانگین از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($p > 0/05$). مقایسه فعالیت آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز بین دو ژنوتیپ GSTM1 در دو

بررسی شدند. نتایج حاصل از آنالیز مایع منی این افراد که شامل تعداد اسپرم، تعداد کل اسپرم، حرکت اسپرم با درجات a, b, c, d مورفولوژی اسپرم، سن و طول مدت ناباروری در جدول انشان داده شده است. پارامترهای اسپرمی شامل غلظت اسپرمی، تعداد کل اسپرم، مورفولوژی و حرکت اسپرمی (با درجه a, d) بین دو گروه مردان الیگواستنوتراتواسپرمی و نورمواسپرمی اختلاف معنی‌داری نشان داد ($p < 0/05$). ولی اختلاف میانگین حرکت اسپرم با درجه b, c و طول مدت ناباروری افراد بین دو گروه معنی‌دار نبود ($p > 0/05$). نتایج بررسی پلی‌مورفیسم حذف ژن GSTM1 در این افراد نشان داد، فراوانی ژنوتیپ نول GSTM1 در گروه مورد و کنترل به ترتیب $1/52$ و $8/53$ می‌باشد که این اختلاف فراوانی ژنوتیپ نول GSTM1 بین

جدول-۱: مقایسه پارامترهای آنالیز مایع منی در دو گروه الیگواستنوتراتواسپرمی و نورمواسپرمی

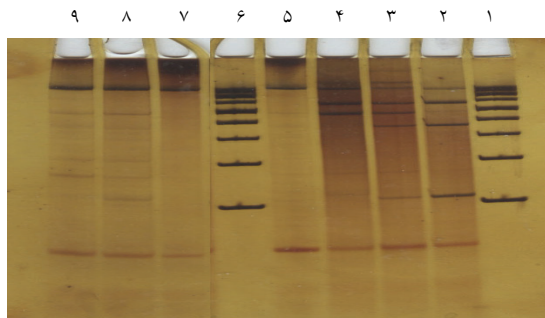
پارامتر	تابلوی بالینی افراد	الیگواستنوتراتواسپرمی (n=۹۵)	نورمواسپرمی (n=۲۶)	P ^s
غلظت اسپرم ($\times 10^6/ml$)**	۳۰ (۲-۵۰)	۱۰۳ (۲۶-۴۸۰)	۰/۰۰۱	
تعداد کل اسپرم ($\times 10^6/ml$)**	۱۰۵ (۷-۱۳۲)	۳۶۳ (۱۰۹-۱۲۹۰)	۰/۰۰۱	
مورفولوژی غیر طبیعی %**	۹۲ (۷۳-۱۰۰)	۷۳ (۵۸-۹۳)	۰/۰۰۱	
حرکت با درجه a %**	۵ (۰-۳۰)	۲۰ (۰-۵۰)	۰/۰۰۱	
حرکت با درجه b %**	۲۰ (۰-۴۰)	۲۵ (۲-۳۵)	۰/۱۱۶	
حرکت با درجه c %**	۱۰ (۰-۳۵)	۱۰ (۳-۲۵)	۰/۹۴۶	
حرکت با درجه d %*	۶۱/۶۲ \pm ۱۶/۵۶	۴۷/۲۰ \pm ۱۸/۰۳	۰/۰۰۱	
طول مدت ناباروری (سال)**	۳ (۰-۴۹)	۳ (۰-۲۱)	۰/۷۳۰	
سن*	۳۶/۲۶ \pm ۸/۱۲	۳۷/۱۹ \pm ۵۷/۶	۰/۵۹۳	

*Mean \pm SD و برای مقایسه از آزمون آماری t-test استفاده شد. **Median (range) برای مقایسه از آزمون آماری Mann-Whitney Test استفاده شد. $p < 0/05$ معنی‌دار می‌باشد.

جدول-۲: مقایسه شاخص‌های آنالیز مایع منی و فعالیت آنزیم گلوکوتایون S- ترانسفراز بین دو ژنوتیپ نول و مثبت ژن

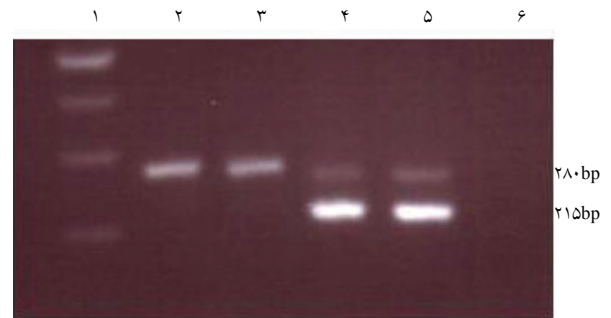
پارامترهای اسپرمی	گروه الیگواستنوتراتواسپرمی		P ^s	گروه نورمواسپرمی	
	ژنوتیپ (-) GSTM1	ژنوتیپ (+) GSTM1		ژنوتیپ (-) GSTM1	ژنوتیپ (+) GSTM1
غلظت اسپرم ($\times 10^6/ml$)	۳۱/۹۳ \pm ۱۵/۹۷	۳۱/۶۶ \pm ۱۸/۹۰	۰/۹۸۱	۱۳۳/۵۳ \pm ۶۹/۱۵	۱۳۸/۴۷ \pm ۱۲۵/۰۴
تعداد کل اسپرم ($\times 10^6/ml$)	۱۱۶/۱۳ \pm ۷۸/۸۹	۱۲۸/۵۵ \pm ۹۲/۲۹	۰/۷۹۰	۴۸۲/۷۱ \pm ۳۲۹/۲۹	۳۹۸/۵۲ \pm ۲۲۸/۹۶
اسپرم با اشکال غیر طبیعی %	۹۱/۱۳ \pm ۶/۱	۹۱/۲۵ \pm ۷/۲۰	۰/۶۳۳	۷۱/۲۳ \pm ۹/۶۵	۷۴/۰۰ \pm ۹/۳۳
حرکت با درجه a %	۹/۱۳ \pm ۷/۹۴	۷/۲۳ \pm ۶/۸۵	۰/۲۸۵	۲۱/۱۵ \pm ۱۶/۴۷	۱۶/۲۵ \pm ۸/۲۹
حرکت با درجه b %	۲۰/۵۰ \pm ۷/۶۲	۱۸/۱۴ \pm ۱۰/۹۳	۰/۴۵۰	۲۳/۲۳ \pm ۹/۹۵	۲۲/۵۰ \pm ۷/۲۳
حرکت با درجه c %	۱۱/۲۹ \pm ۶/۰۵	۱۰/۴۳ \pm ۶/۱۷	۰/۴۲۶	۹/۸۵ \pm ۴/۷۷	۱۲/۵۰ \pm ۷/۲۳
حرکت با درجه d %	۵۹/۰۸ \pm ۱۳/۴۲	۶۴/۲۰ \pm ۱۹/۳۵	۰/۱۴۱	۴۵/۷۷ \pm ۲۳/۷۹	۴۸/۷۵ \pm ۹/۳۲
فعالیت آنزیم گلوکوتایون S- ترانسفراز*	۷/۳۹ \pm ۲/۸۱	۷/۴۷ \pm ۲/۹۰	۰/۸۹۰	۷/۳۹ \pm ۱/۶۸	۶/۷۵ \pm ۱/۷۵

*Mean \pm SD، واحد فعالیت آنزیم: اسپرم $10^6 \times 1 \text{ nmol/min}$ ، برای مقایسه از آزمون t-test استفاده شد. $p < 0/05$ معنی‌دار می‌باشد.



شکل - ۲: نتایج هضم آنزیمی روی ژل پلی‌آکریل آمید. ۱ و ۶- DNA Ladder ۱۰۰ جفت بازی ۲- باندهای ۶۰۲، ۳۶۵ و ۱۰۲ جفت بازی حاصل از هضم آنزیمی FauI نشانگر ژنوتیپ هموزیگوت نرمال (114 Ala/Ala) ۳- باندهای ۶۰۲، ۴۶۷، ۳۶۵ و ۱۰۲ جفت بازی نشانگر ژنوتیپ هتروزیگوت (114 Ala/Val) ۴- باندهای ۶۰۲ و ۴۶۷ جفت بازی نشانگر ژنوتیپ هموزیگوت جهش یافته (114Val/Val) ۵ و ۹- باند ۱۰۶۹ جفت بازی محصول PCR ژن GSTP1 ۷ و ۸- باند ۱۰۶۹ جفت بازی حاصل هضم آنزیمی AccI ژنوتیپ (105Ile/Ile)

می‌باشد، ولی در جمعیت آفریقایی-آمریکایی فراوانی ژنوتیپ نول در حدود ۳۰٪ می‌باشد.^{۲۴} با توجه به فراوانی بالای ژنوتیپ نول 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 مطالعه‌ای که پلی‌مورفیسم GSTM1 در مردان نابارور مبتلا به واریکوسل در جمعیت تایوان بررسی شده است، فراوانی ژنوتیپ نول در سه گروه بیماران مبتلا به واریکوسل، بیماران مبتلا به واریکوسل تحت بالینی و گروه کنترل سالم به ترتیب ۴۳/۸٪، ۴۱/۹٪، ۴۵٪ بود و اختلاف فراوانی ژنوتیپ نول در این سه گروه از نظر آماری معنی‌دار نبود.^{۱۲} در مطالعه دیگری که پلی‌مورفیسم ژن GSTM1 را در مردان مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک در جمعیت ترکیه بررسی نموده است، فراوانی ژنوتیپ نول GSTM1 در گروه بیماران نابارور ایدیوپاتیک ۵۱/۹٪ و در گروه کنترل با پارامترهای اسپرمی طبیعی ۴۶/۷٪ می‌باشد که اختلاف معنی‌داری در فراوانی ژنوتیپ نول GSTM1 بین دو گروه وجود نداشت.^{۱۳} در مطالعه حاضر، فراوانی ژنوتیپ نول GSTM1 در گروه مردان الیگواستنوتراتواسپرمی و نرمواسپرمی به ترتیب ۵۲/۱٪ و ۵۳/۸٪ بود. ولی این اختلاف فراوانی ژنوتیپ نول GSTM1 بین دو گروه معنی‌دار نمی‌باشد که با نتایج به‌دست آمده از مطالعات پیشین مطابقت داشت. اختلاف میانگین پارامترهای اسپرمی بین دو ژنوتیپ مثبت و نول GSTM1 در دو گروه از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($p > 0.05$). بنابراین می‌توان نتیجه



شکل - ۱: نتیجه Multiplex PCR حاصل از پرایمرهای β -globin و *gstm1* روی ژل آگارز ۲/۵٪. ۱- DNA Ladder ۱۰۰ جفت بازی ۲ و ۳- باند ۲۶۸ جفت بازی ژن β -globin نشانگر ژنوتیپ نول GSTM1 ۴ و ۵- وجود همزمان باند ۲۱۵ جفت بازی ژن GSTM1 و باند ۲۶۸ جفت بازی ژن β -globin نشانگر ژنوتیپ مثبت GSTM1 ۶- کنترل منفی

گروه نشان داد، در گروه الیگواستنوتراتواسپرمی میانگین فعالیت آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز در افراد دارای ژنوتیپ نول کمتر از ژنوتیپ مثبت بود ولی این اختلاف میانگین از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). در گروه کنترل نیز فعالیت آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز بین دو ژنوتیپ نول و مثبت اختلاف معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$). بررسی پلی‌مورفیسم ژن GSTP1 در تمام این افراد با استفاده از RFLP انجام گرفت، هضم آنزیمی محصول PCR توسط آنزیم محدودالتر AccI در تمام نمونه‌ها انجام گرفت که فقط باند ۱۰۶۹ جفت بازی مشاهده شد و بیانگر آن است که همه نمونه‌های مورد بررسی دارای ژنوتیپ Ile/Ile در کدون ۱۰۵ بودند. فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت (114 Ala/Ala)، هتروزیگوت (114 Ala/Val)، هموزیگوت (114 Val/Val) ژن GSTP1 در گروه الیگواستنوتراتواسپرمی به ترتیب ۸۱/۱٪، ۱۷/۹٪ و ۱/۱٪ و در گروه نرمواسپرمی به ترتیب ۸۸/۵٪ و ۱۱/۵٪ و صفر درصد بود.

بحث

پلی‌مورفیسم ژن‌های GSTM1, GSTM3, GSTM5 در ارتباط با اسپرماتوژنز و ناباروری مردان بررسی شده است.^{۲۱،۲۲} پلی‌مورفیسم ژن GSTM1 به صورت حذف کامل ژن (ژنوتیپ نول)، مضاعف شدن ژن و ۸۳ SNP در آن شناخته شده است.^{۲۳} افراد دارای ژنوتیپ نول فاقد فعالیت آنزیمی مربوط به ژن GSTM1 می‌باشند، مطالعات نشان داده است، فراوانی ژنوتیپ نول در جمعیت عمومی در حدود ۵۰٪

بررسی پلی مورفیسم ژن GSTP1 در کدون ۱۱۴ با استفاده از روش PCR-RFLP نیز برای این ۱۲۱ نفر انجام شد. فقط در یک نمونه هضم آنزیمی در هر دو آلل انجام گرفت و بنابراین فرد دارای ژنوتیپ Val/Val ۱۱۴ بود. فراوانی ژنوتیپ‌های Ala/Ala, Ala/Val, Val/Val در گروه الیگواسنتوتراواسپرمی به ترتیب ۱/۱٪ و ۱۷/۹٪ و ۸۱/۱٪ و در گروه کنترل نورمواسپرمی به ترتیب صفر درصد، ۱۱/۵٪ و ۸۸/۵٪ بود. مطالعات نشان داده است که آلل (105 Val, 114 Ala) GSTP1 b و آلل (105 Val, 114 Val) GSTP1 c که هر دو آلل اسید آمینه والین در کدون ۱۰۵ را دارا می‌باشند، فعالیت آنزیمی کمتری دارند. پس زمانی مطالعه کدون ۱۱۴ برای تمایز آلل b و c ارزشمند خواهد بود که کدون ۱۰۵ دارای اسید آمینه والین باشد. در هیچ یک از نمونه‌های مورد بررسی در کدون ۱۰۵ جانشینی اسید آمینه والین وجود نداشت تا بتوان تاثیر همزمان ژنوتیپ نول GSTM1 و جایگزینی والین در کدون ۱۰۵ را بر پارامترهای اسپرمی مورد بررسی قرار داد. فعالیت آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز در دماهای مختلفی اندازه‌گیری شده است. در مطالعه Habig و همکاران (۱۹۷۴) فعالیت آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز با استفاده از بافر فسفات پتاسیم و محلول گلوکوتایون احیاء و CDNB به‌طور اسپکتروفتومتری در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد اندازه‌گیری شد.^{۲۵} در مطالعه دیگر، فعالیت آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز در سرم با استفاده از بافر فسفات پتاسیم و محلول گلوکوتایون احیاء و CDNB به‌طور اسپکتروفتومتری در دماهای ۲۵°C و ۳۰°C و ۳۷°C با طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و بهینه فعالیت آنزیم مربوط به دمای ۳۷°C می‌باشد.^{۲۶} در مطالعه حاضر، فعالیت آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز بر حسب nmol/min به ازاء هر یک میلیون اسپرم در دمای ۳۷°C اندازه‌گیری شد. میانگین فعالیت آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز در گروه الیگواسنتوتراواسپرمی بالاتر از گروه نورمواسپرمی بود ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. همچنین فعالیت آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز بین دو ژنوتیپ نول و مثبت GSTM1 در دو گروه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (p>۰/۰۵). در مطالعه Aydemir و همکارانش (۲۰۰۷) نیز اختلاف معنی‌داری بین میانگین فعالیت آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز در دو گروه بیماران با ناباروری ایدیوپاتیک و گروه کنترل نورمواسپرمی وجود نداشت. همچنین فعالیت آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز بین دو ژنوتیپ نول و مثبت GSTM1 در دو گروه اختلاف معنی‌داری وجود

گرفت پارامترهای اسپرمی از ژنوتیپ GSTM1 متاثر نمی‌شود. با توجه به اهمیت فعالیت آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز در مقابله با استرس اکسیداتیو و سم‌زدایی مواد آلی توکسیک که هر دو باعث اختلال در پارامترهای اسپرمی می‌شوند. لذا بایستی فعالیت سایر ایزوزیم‌های موجود در سطح اسپرم از جمله GSTP1 بتواند فقدان فعالیت آنزیمی GSTM1 را جبران نماید و بنابراین اختلافی در پارامترهای اسپرمی بین دو ژنوتیپ نول و مثبت GSTM1 مشاهده نشد.

حدود ۱۲۲ SNP در نواحی مختلف ژن GSTP1 شامل ناحیه پروموتور، اگزون، انترن، پیوستگاه اگزون/انترن و 3'UTR شناخته شده است. از این بین جایگزینی نوکلئوتیدی A→G در جایگاه +۳۱۳ که باعث جانشینی اسید آمینه والین به جای ایزولوسین در کدون ۱۰۵ می‌شود. همچنین، جایگزینی نوکلئوتیدی C→T در جایگاه +۳۴۱ که باعث جانشینی والین به جای آلانین در کدون ۱۱۴ می‌شود، بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. این تغییرات نوکلئوتیدی باعث تغییر در اسیدهای آمینه جایگاه فعال آنزیم می‌گردد. مطالعات نشان داده است جانشینی والین در کدون ۱۰۵ فعالیت آنزیمی را کاهش می‌دهد. به دلیل اهمیت فعالیت آنزیم گلوکوتایون S-ترانسفراز در مقابله با استرس اکسیداتیو، مطالعه جهش‌های ژنی که باعث کاهش فعالیت آنزیم شود، می‌تواند حائز اهمیت باشد. در مطالعه‌ای که فراوانی ژنوتیپ GSTP1 در کدون ۱۰۵ در ۲۸۷ نفر و کدون ۱۱۴ در ۱۱۴ نفر از جمعیت آمریکایی-اروپایی با استفاده از روش PCR-RFLP بررسی نموده است، فراوانی ژنوتیپ‌های Val/Val, Ile/Val, Ile/Ile در کدون ۱۰۵ به ترتیب ۷٪ و ۵۱٪ و ۴۲٪ می‌باشد و فراوانی ژنوتیپ‌های Ala/Ala, Ala/Val, Val/Val در کدون ۱۱۴ به ترتیب صفر درصد، ۱۸٪ و ۸۲٪ بود.^{۱۴} در جمعیت آفریقایی-آمریکایی فراوانی ژنوتیپ‌های Ile/Ile, Val/Val, Ile/Val در کدون ۱۰۵ در ۱۳۷ نفر از این جمعیت به ترتیب ۱۹٪ و ۴۶٪ و ۳۵٪ می‌باشد و فراوانی ژنوتیپ‌های Ala/Ala, Ala/Val, Val/Val در کدون ۱۱۴ به ترتیب صفر درصد و ۵٪ و ۹۵٪ در ۱۱۲ فرد مورد مطالعه بود.^{۱۴} در مطالعه حاضر، پلی مورفیسم ژن GSTP1 در کدون ۱۰۵ با استفاده از روش PCR-RFLP برای تمام ۱۲۱ نفر انجام گرفت. نتایج نشان داد، در هیچ یک از نمونه‌های مورد بررسی هضم آنزیمی مربوط به تغییر نوکلئوتیدی جایگاه +۳۱۳ انجام نشد و بنابراین می‌توان این گونه نتیجه گرفت که همه نمونه‌های مورد بررسی دارای ژنوتیپ Ile/Ile در کدون ۱۰۵ می‌باشند. از طرف دیگر،

تولید می‌شود، دارد.^{۳۰} در مطالعه Aydemir و همکاران نیز نشان داده شد مایع منی و اسپرم مردان مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک که ژنوتیپ نول GSTM1 دارند به آسیب استرس اکسیداتیو مستعدتر می‌باشند.^{۳۱} بنابراین پیشنهاد می‌شود پلی‌مورفیسم ژن GSTM1 در ارتباط با استرس اکسیداتیو در مایع منی و اسپرم بررسی شود. به‌طور کلی می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود فقدان فعالیت آنزیمی مربوط به ژنوتیپ نول GSTM1 تاثیری بر پارامترهای اسپرمی و میزان کل فعالیت آنزیمی ندارد که ممکن است به دلیل فعالیت جبرانی سایر ایزوزیم‌های موجود در سطح اسپرم از جمله GSTP1 باشد که می‌تواند مربوط به افزایش بیان ژن GSTP1 در مواجهه با شرایط استرس اکسیداتیو باشد. سپاسگزاری: بدینوسیله از گروه ژنتیک دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، گروه ژنتیک و گروه آندروولوژی پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی - ابن‌سینا و پرسنل محترم مرکز درمان ناباروری ابن‌سینا برای همکاری در اجرای این طرح تشکر می‌شود.

نداشت^{۳۲} که با نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر مطابقت دارد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت ژنوتیپ نول GSTM1 تاثیر چشمگیری بر میزان کل فعالیت آنزیم ندارد. بنابراین ممکن است فقدان فعالیت آنزیمی مربوط به ژنوتیپ نول GSTM1 با فعالیت سایر ایزوزیم‌ها از جمله GSTP1 جبران شود که می‌تواند مربوط به افزایش بیان ژن GSTP1 در مواجهه با شرایط استرس اکسیداتیو باشد زیرا بیان آن به‌طور معنی‌داری در الف) بسیاری از تومورهای انسانی (ب) رده سلول‌های انسانی که به عوامل شیمی درمانی مقاوم شده‌اند. (ج) در طی هپاتوکارسینوزن در رت، افزایش می‌یابد.^{۳۳} همچنین تنظیم بیان ژن GSTP1 ممکن است توسط حالت متیلاسیون جزایر CpG در ناحیه تنظیم ژن تحت تاثیر قرار گیرد.^{۳۴} در مطالعه‌ای پیشنهاد شده است که GSTM1 ممکن است یک فاکتور اساسی در سم‌زدایی محصولات استرس اکسیداتیو که در طی ترمیم اپی‌تلیوم تخمدان ایجاد می‌شود، باشد.^{۳۵} همچنین ایزو آنزیم GSTM1 راندمان کاتالیتیک بالاتری در سم‌زدایی HAE که در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدرادیکال‌های آزاد

References

- Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 331-45.
- Csilla K. Polymorphisms and Male Infertility. Humana Press Inc: 2006.
- Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996; 48: 835-50.
- Ketterer B, Coles B, Meyer DJ. The role of glutathione in detoxication. *Environ Health Perspect* 1983; 49: 59-69.
- Armstrong RN. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 1997; 10: 2-18.
- Gopalakrishnan B, Shaha C. Inhibition of sperm glutathione S-transferase leads to functional impairment due to membrane damage. *FEBS Lett* 1998; 422: 296-300.
- Toda T, Sofikitis N, Miyagawa I, Zavos P, Harada T, Mio Y, et al. The importance of the hypoosmotic swelling test and acrosin activity assay for identifying subpopulations of idiopathic infertile men. *Arch Androl* 1992; 29: 219-24.
- 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.
- 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 Genet* 1993; 53: 220-33.
- Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J Biol Chem* 1998; 273: 3517-27.
- Strange RC, Lear JT, Fryer AA. Glutathione S-transferase polymorphisms: influence on susceptibility to cancer. *Chem Biol Interact* 1998; 111-112: 351-64.
- 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.
- 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.
- Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 1998; 19: 275-80.
- Zimniak P, Nanduri B, Piłkuła S, Bandorowicz-Piłkuła J, Singhal SS, Srivastava SK, et al. Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur J Biochem* 1994; 224: 893-9.
- Eaton DL, Bammler TK. Concise review of the GST and their significant to toxicology. *Toxicol Sci* 1999; 49: 156-4.
- Rowe PJ, Comhaire FH, Timothy BH, Mahmoud A. World Health Organization (WHO) Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male. New York: Cambridge University Press; 1999.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
- Mannervik B. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1985; 57: 357-417.
- Boylard E, Chasseaud LF. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1969; 32: 173-219.
- Rowe JD, Patskovsky YV, Patskovska LN, Novikova E, Listowsky I. Rationale for reclassification of a distinctive subdivision of mammalian class Mu glutathione S-transferases that are primarily expressed in testis. *J Biol Chem* 1998; 273: 9593-601.
- Rowe JD, Tchaikovskaya T, Shintani N, Listowsky I. Selective expression of a glutathione S-transferase subclass during spermatogenesis. *J Androl* 1998; 19: 558-67.
- McLellan RA, Oscarson M, Alexandrie AK, Seidegård J, Evans DA, Rannug A, et al. Characterization of a human glutathione S-

- transferase mu cluster containing a duplicated GSTM1 gene that causes ultrarapid enzyme activity. *Mol Pharmacol* 1997; 52: 958-65.
24. Ye Z, Song H, Higgins JP, Pharoah P, Danesh J. Five glutathione s-transferase gene variants in 23,452 cases of lung cancer and 30,397 controls: meta-analysis of 130 studies. *PLoS Med*; 3: e91.
 25. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130-9.
 26. Habdous M, Vincent-Viry M, Visvikis S, Siest G. Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. *Clin Chim Acta* 2002; 326: 131-42.
 27. Sato K. Glutathione S-transferases as markers of preneoplasia and neoplasia. *Adv Cancer Res* 1989; 52: 205-5.
 28. Jhaveri MS, Morrow CS. Methylation-mediated regulation of the glutathione S-transferase P1 gene in human breast cancer cells. *Gene* 1998; 210: 1-7.
 29. Sarhanis P, Redman C, Perrett C, Brannigan K, Clayton RN, Hand P, et al. Epithelial ovarian cancer: influence of polymorphism at the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 loci on p53 expression. *Br J Cancer* 1996; 74: 1757-61.
 30. Berhane K, Widersten M, Engström A, Kozarich JW, Mannervik B. Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 1480-4.

GSTM1 and GSTP1 polymorphisms and glutathione S-transferase activity:
Iranian infertile men

Received: October 14, 2008 Accepted: January 21, 2009

Abstract

Mirfeizollahi A.¹
Farivar Sh.¹
Akhondi M.M.²
Modarresi M.H.³
Hodjat M.²
Sadeghi M.R.*²

1-Department of Genetic, Faculty of
Biological Sciences, Shahid
Beheshti University

2- Reproductive Biotechnology
Research Center, Avicenna
Research Institute.

3- Department of Medical Genetic,
Tehran University of Medical
Sciences

Background: Pi-GST and Mu-GST are subclasses of glutathione S-transferase that present on human sperm surface and play an important role against oxidative stress. Therefore, any defects in the enzyme activity may be associated with male infertility. In this study the polymorphisms of GSTM1 and GSTP1 in association with enzyme activity and sperm parameters were studied.

Methods: This case-control study involved 95 men with oligoasthenoteratozoospermia and 26 controls with normozoospermia. Semen analyses were carried out according to WHO guidelines. Blood DNA was extracted using salting out procedures. GSTM1 and GSTP1 polymorphisms gene were determined through PCR-RFLP and multiplex PCR, respectively. Finally, Glutathione S-transferase activity was measured.

Results: Frequencies of GSTM1 null genotype in oligoasthenoteratospermic and normospermic groups were 52.1% and 53.8% respectively. There were no statistically significant differences in sperm parameters and enzyme activity between GSTM1 null and positive genotypes in two groups. There were no statistically significant differences in glutathione S-transferase activity between oligoasthenoteratozoospermia and normospermic groups ($p > 0.05$). All the 121 men in this study had Ile/Ile genotypes at 105 codon of GSTP1. Frequency of normal homozygote (114Ala/Ala), heterozygote (114Ala/Val) and mutant homozygote (114Val/Val) genotypes in oligoasthenoteratospermic group were 81.1%, 17.9% and 1.1% respectively but in the control group they were 88.5%, 11.5% and null.

Conclusions: Total glutathione S-transferase activity and sperm parameters were not affected by deficient Glutathione S-transferase activity in GSTM1 null genotype. Compensate activity of other sperm surface glutathione S-transferase isozymes, like GSTP1, may justify the cause.

Keywords: Genetic polymorphism, glutathione S-transferase, GSTM1 polymorphism, GSTP1 polymorphism, male infertility, sperm.

*Corresponding author: Reproductive
Biotechnology Research Center,
Avicenna Research Institute, ACECR,
Tehran, Iran. P.O. Box: 19615-1177.
Tel: +98-21-22432024
email: Sadeghi@avicenna.ac.ir