

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

مصطفی دهقانی<sup>۱</sup>، سراج الدین وحیدی<sup>۲</sup>، رضا معین<sup>۳</sup>، بی‌بی فاطمه حقیرالسادات<sup>۴</sup>، مریم شرف الدینی<sup>۵</sup>، محمدحسن شیخها<sup>\*</sup><sup>۶</sup>

- 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 تحصیلی نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه تهران
- ۵- کارشناس ارشد زبان، دانشگاه فردوسی مشهد
- ۶- دانشیار گروه ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۲/۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۶/۲۶

### چکیده

مقدمه: ایزوآنزیم‌های GSTM و GSTT در سطح اسپرم وجود دارند که در محافظت علیه استرس اکسیداتیو نقش دارند. هدف این مطالعه بررسی پلی مورفیسم ژن GSTT1 و GSTM1 در ارتباط با شاخص 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 GSTT1 و GSTM1 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( $p > 0.05$ ). 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( $p > 0.05$ ).

نتیجه‌گیری: فقدان فعالیت آنزیمی مربوط به ژنوتیپ نول GSTM1 تأثیری بر مورفولوژی و حرکت کند و تند اسپرم نداشته، اما باعث کاهش معنی‌داری در تعداد اسپرم شده است. در مورد ژنوتیپ نول GSTT1 نیز، تأثیر حذف GSTT1 هیچگونه تأثیری بر شاخص‌های 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، شاخص‌های اسپرم

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

## مقدمه

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 نهایتاً ناباروری شود، 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- ریفلакс متابولیت‌های سمی از کلیه یا آدرنال ۵- افزایش رادیکال‌های آزاد آکسیژن اشاره شده است(۶).

مطالعات اخیر نشان داده‌اند در بسیاری از مکانیسم‌هایی که واریکوسل سبب ناباروری می‌شود، به دلیل استرس اکسیدانتیو و اختلال در عملکرد بیضه‌ها است(۷).

تمامی موجودات زنده جهت بقاء خود نیازمند اکسیژن (ROS: Reactive Oxygen Species) شامل  $H_2O_2$ ,  $O^{+2}$ ,  $OH$  بوده که قادر به حمله به بیومولکول‌ها 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 بیان می‌کند ممکن است بخشی از اختلال عملکرد اسپرم به دلیل افزایش گونه‌های فعال اکسیژن باشد.

تولید ros بوسیله اسپرم یک فرایند فیزیولوژیک است که نقش واسطه‌ای مهمی را در مکانیسم‌های انتقال سیگنانل، 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 اکسیدانتیو 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 مرغولوژی اسپرم و کاهش قدرت تحرک و ناکارمدی واکنش فیوژن اسپرم - اووسیت می‌شود(۱۳).

ناباروری به ناتوانی یک زوج در بارور شدن در طی یک سال مقاربت، بدون جلوگیری اطلاق می‌گردد. نزدیک به ۱۵-۱۰ درصد از زوج‌ها در سنین باروری از مشکل نازابی 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 ۴۰ درصد از موارد، مردان به نحوی در ناباروری دخیل می‌باشند. به طور کلی ناباروری مردان به دلیل کاهش و یا نقص 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 اسپرماتوژن ناشی از بیماری‌هایی است که بر بیضه تأثیر می‌گذارند. اکثریت مردان مبتلا به ناباروری دچار نوعی اختلال در اسپرماتوژن 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 تأثیر به سزاگی 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 و در مردان مسن حدود ۳۰ درصد می‌باشد(۳,۴). علل ایجاد واریکوسل هنوز به روشنی مشخص نشده است ولی نظریه‌هایی ارائه شده است که علت پیدایش واریکوسل را توجیه می‌کنند، مانند ۱- تجمع ذاتی خون در شبکه پامپینی فرم ۲- پدیده فندق شکن ۳- عدم وجود دریچه لانه کبوتری به طور مادرزادی در سیاهرگ‌های بیضه ۴- افزایش فشار ناشی از مسیر طولانی و

با توجه به نقش کلیدی GST در مقابله با استرس اکسیداتیو و خنثی سازی مواد سمی آلی و نیز وجود آن در سطح اسپرم و نقش آن در لقاد اسپرم با تخمک، فقدان یا کاهش فعالیت آن می‌تواند علاوه بر ایجاد اختلالات در 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 و GSTM1 در افراد سالم و دارای واریکوسل و ارتباط آن با شاخص‌های اسپرمی می‌باشد.

#### روش بررسی

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

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

برای تشخیص حذف هموزیگوت در ژن‌های GSTT1 و GSTM1 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

بخشی از افزایش حساسیت به استرس اکسیداتیو در مبتلایان به واریکوسل ممکن است به دلیل اختلال در ظرفیت (TAC: Total Antioxidant Capacity) پلاسمای مایع منی باشد(۱۴،۱۵). از آنجایی که استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش ros نقش مهمی در اختلال عملکرد اسپرم بیماران واریکوسلی دارد، بنابراین بدن باید بتواند به طریقی میزان ros را کاهش داده تا مانع 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 II می‌باشد که در سم زدایی ترکیبات خارجی زیستی (xenobiotics) نقش دارد(۱۷). در مطالعات متعددی وجود آنزیم گلوتاتیون-اس- ترانسفراز فعال در سطح اسپرم تأیید شده است(۱۸). در مقایسه با سلول‌های سوماتیک، اسپرم به آسیب ناشی از گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ros) بسیار حساس است که به دلیل فزونی اسیدهای چرب غیراشبع در غشاء پلاسمایی به خصوص در ناحیه سر اسپرم می‌باشد. لذا چنانچه فعالیت آنزیم گلوتاتیون-اس- ترانسفراز در اسپرم با خواص آنتی اکسیدانی قوی که دارد، به هر طریقی علیه آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو مختل شود باعث آسیب به غشاء اسپرم می‌شود که منجر به از دست دادن توان واکنش کروزومی و کاهش توانایی اسپرم برای باروری تخمک در محیط خارج رحمی می‌شود(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 ژن‌های 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 تمکز دارند. ژن‌های کلاس GSTM به صورت یک خوشه ژنی مشتمل از ژن‌های GSTM1 تا GSTM5 در ناحیه کروموزمی ۱P13\*۳ قرار گرفته اند(۲۰).

همراه کلرید منیزیم  $50\text{mM}$  به مقدار  $1\mu\text{l}/0.75\mu\text{l}$  و مخلوط  $(0.1\text{mM})\text{dNTP}$  به مقدار  $1\mu\text{l}/5\mu\text{l}$  و هریک از پرایمرهای GSTT1 و B-Globin به مقدار  $1\mu\text{l}/3\mu\text{l}$  و آنزیم تک پلی مراز به مقدار  $1\mu\text{l}/0.15\mu\text{l}$  و  $2\mu\text{l}$  نمونه DNA به اضافه آب مقطر تا حجم نهایی  $1\mu\text{l}/20\mu\text{l}$  انجام شد. واکنش PCR برای ۳۵ چرخه در دستگاه ترموسایکلر اجرا شد.

محصولات PCR روی ژل آگاروز  $2\% / 2.5\%$  با ولتاژ  $110$  ولت و  $120$  دقیقه جداسازی و رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم برماید  $(13\text{g/ml})$  انجام گرفت. قطعات DNA حاصل از تکثیر ژن GSTT1 و GSTM1 به ترتیب  $219$  و  $480$  جفت باز طول  $268$  دارند و قطعات مربوط به تکثیر ژن B-Globin دارای طول  $268$  جفت بازی بودند(شکل ۱).

برای مقایسه فراوانی ژنتیپ 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 شد ضمن آنکه سطح معنی دار p کمتر از  $0.05\%$  در نظر گرفته شد.

R: GTTGGGCTCAAATACGGTGG

این پرایمرها می‌توانند یک توالی نوکلئوتیدی به طول  $219$  جفت باز از ژن GSTM1 را تکثیر کنند. همچنین یک جفت پرایمر  $\text{GSTT1}$  با توالی زیر استفاده شد:

F: TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC

R: TCACCGATCATGGCCAGCA

که این پرایمرها نیز می‌توانند یک توالی نوکلئوتیدی به طول  $480$  جفت نوکلئوتیدی از ژن GSTT1 را تکثیر کنند.

برای تایید PCR و تشخیص ژنتیپ نول ژن‌های GSTT1 و GSTM1 از یک جفت پرایمر B-Globin به عنوان ژن کنترل B-Globin با توالی زیر طراحی شد. یک جفت پرایمر

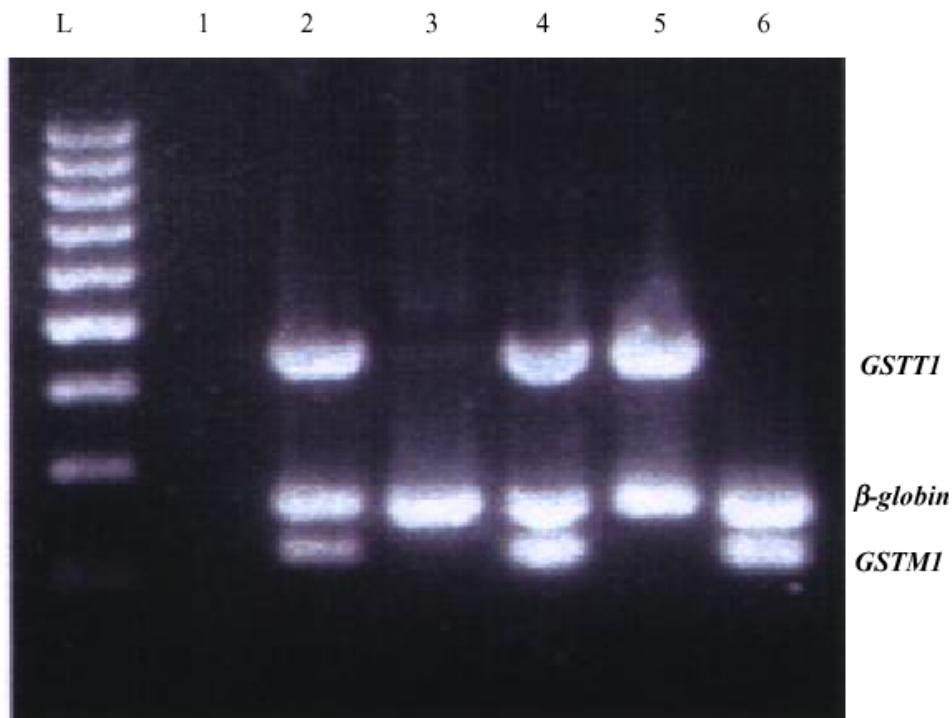
با توالی زیر طراحی شد:

F: CAACTTCATCCACGTTCAACC

R: GAAGAGCCAAGGACAGGTAC

این پرایمرها یک توالی  $268$  جفت باز از ژن B-Globin را تکثیر می‌کنند.

واکنش PCR در میکروتیوب های  $0.2\text{ml}$  با بافر  $10\text{X}$  PCR



شکل ۱: نتایج PCR: محصولات PCR مولتی پلکس از GSTT1 و GSTM1 و بتاگلوبین روی ژل آگاروز  $2\% / 2.5\%$  رانشان می‌دهد.

## نتایج

(تند و کند) در جدول ۱ نشان داده شده است. شاخص‌های اسپرمی شامل تعداد اسپرم، مرفوولوژی و حرکت اسپرمی (با درجات a و b) بین دو گروه مردان دارای واریکوسل و بدون واریکوسل اختلاف معنی‌داری نشان داد ( $p < 0.05$ ).

در این مطالعه ۴۶ نفر از مردان دارای واریکوسل با میانگین سنی  $30/77 \pm 6/46$  و ۴۸ نفر از مردان بدون واریکوسل با میانگین سنی  $32/74 \pm 4/94$  به عنوان گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از مایع منی این افراد شامل تعداد اسپرم، مرفوولوژی طبیعی اسپرم، حرکت اسپرم با درجات a و b

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

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

\*برای مقایسه از آزمون t-test استفاده شده است.  $p < 0.05$  معنی‌دار می‌باشد.

\*\*تعداد اسپرم به میلیون در سانتیمتر مکعب است.

نبود ( $p < 0.05$ )، 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 ( $p < 0.05$ ). (جدول ۲ و ۳).

برای این مطالعه میزان حذف ژن‌های GSTM1 و GSTT1 و GSTT1 بوده‌اند و از ۴۸ فرد سالم استفاده شده ۲۴ نفر ( $50\%$ ) دارای ژنوتیپ نول و ۲۴ نفر ( $50\%$ ) هم بدون حذف GSTT1 بودند که تفاوت معنی‌داری در حذف ژن GSTT1 بین افراد بیمار و سالم وجود نداشت ( $P = 0.83$ ). همچنین در بررسی حذف ژن GSTM1 مشاهده شد که از ۴۶ بیمار مورد مطالعه،

نتایج بررسی پلی مورفیسم حذف ژن GSTM1 در این افراد نشان داد فراوانی ژنوتیپ نول GSTM1 در گروه مورد و شاهد به ترتیب  $60/9\%$  و  $41/7\%$  است بنا بر این اختلاف فراوانی ژنوتیپ نول GSTM1 بین دو گروه معنی‌دار نبود ( $p = 0.06$ ). همچنین فراوانی ژنوتیپ نول GSTT1 در دو گروه بیمار و شاهد به ترتیب  $47/8\%$  و  $50\%$  بود که اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد ( $p = 0.83$ ).

اختلاف میانگین شاخص‌های آنالیز مایع منی شامل تعداد، مرفوولوژی و حرکت اسپرم با درجات a و b بین ژنوتیپ نول و مثبت GSTT1 در دو گروه بررسی شد که این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ( $p > 0.05$ ). همچنین اختلاف میانگین شاخص‌های آنالیز مایع منی شامل تعداد، مرفوولوژی و حرکت اسپرم با درجه b بین ژنوتیپ نول و مثبت GSTM1 در دو گروه بررسی شد که این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار

۲۸ نفر(۶۰/۹٪) دارای ژنتیپ 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( $P=0/06$ ).

جدول ۲: مقایسه تأثیر حذف ژن GSTT1 بر روی شاخص‌های اسپرم

p.value*	گروه شاهد		گروه مورد		شاخص‌های اسپرمی
	ژنوتیپ GSTM1(+)	ژنوتیپ GSTM1(-)	ژنوتیپ GSTM1(+)	ژنوتیپ GSTM1(-)	
۰/۴۹	۹۸/۹۵	۱۰۵/۲۰	۷۸/۲۹	۷۱/۷۷	**تعداد اسپرم
۰/۲۱	٪۵۱/۸۳	٪۴۶/۵۴	٪۲۵/۸۷	٪۲۳/۱۳	مرفولوژی
۰/۴۴	۲۷/۷۵	۲۲/۹۱	۱۲/۲۰	۱۳/۶۸	حرکت سریع(درجهa)
۰/۲۹	۳۶/۸۷	۳۱/۱۶	۳۴/۶۶	۳۱/۰۹	حرکت کند(درجهb)

\*برای مقایسه از آزمون t-test استفاده شده است  $p<0/05$  معنی‌دار می‌باشد.

\*\*تعداد اسپرم به میلیون در سانتیمتر مکعب است.

جدول ۳: مقایسه تأثیر حذف ژن GSTM1 بر روی شاخص‌های اسپرم

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

\*برای مقایسه از آزمون t-test استفاده شده است  $p<0/05$  معنی‌دار می‌باشد.

\*\*تعداد اسپرم به میلیون در سانتیمتر مکعب است.

در بررسی مقایسه تأثیر حذف ژن GSTT1 بر روی شاخص‌های اسپرم (مورفولوژی- تعداد اسپرم- حرکت سریع و کنداسپرم) نشان داده شد که حذف ژن GSTT1 تفاوت معنی‌داری را بین گروه شاهد و کنترل ایجاد نمی‌کند( $p>0/05$ ).

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

در حذف توأم GSTM1 و GSTT1 نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بدین ترتیب که فراوانی حذف همزمان GSTM1 و GSTT1 از بین ۴۶ نمونه گروه مورد(۳۴/۸٪) و از بین ۴۸ نمونه گروه شاهد، ۱۰ مورد(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 نداشتند( $p=0/018$ ).

دارای حذف هستند، این حذف بوسیله آزمون‌های پایه‌گذاری شده، بر اساس PCR-DNA سلول‌های سوماتیک شناسایی می‌شود. نشان داده شده که در افراد با ژنتیپ‌های حذف GSTM1 و GSTT1 هیچگونه فعالیت عملکردی آنزیم‌های مربوطه وجود ندارد.

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

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

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

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

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

در مطالعه‌ای 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 پلی‌مورفیسم GSTM1 در مردان نابارور مبتلا به واریکوسل در جمعیت تایوان را مورد بررسی قرار داده از نظر فراوانی ژنتیپ نول تفاوت معنی‌داری بین افراد سالم و بیمار مشاهده نشده است(۲۹).

که حذف ژن GSTM1 تأثیری بر تفاوت شاخص‌های اسپرمی بین گروه شاهد و بیمار نداشته است( $p>0.05$ ) اما در تأثیر حذف ژن GSTM1 بر روی تعداد اسپرم در گروه شاهد و بیمار نشان داده شد که حذف ژن GSTM1 باعث تفاوت معنی‌دار بین دو گروه شاهد و بیمار شده است( $p=0.03$ ).

### بحث

حدود ۴۰٪ از ناباروری‌ها مربوط به مردان است که می‌تواند علل مختلفی داشته باشد. یکی از مهمترین علت‌ها بیماری واریکوسل و عوامل ژنتیکی می‌باشد. علیرغم آزمایشات متعددی که انجام گرفته متأسفانه اتیولوژی واریکوسل هنوز ناشناخته باقی مانده است. چندین مطالعه بیان شده است، استرس اکسیداتیو که عمدتاً به وسیله رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایجاد می‌شود در پاتوزن 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 گستره 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، اغلب در حالت ترکیب سمیت کمتری داشته و به طور کلی حالیت آنها نسبت به ترکیبات آزاد بیشتر است، که این ویژگی منجر می‌شود تا حذف آنها از سلول با سهولت صورت گیرد.

بیان GST می‌تواند با قرار گرفتن در معرض یک سوبسترای خارجی، در ارگانیسم زنده(in vivo) القا شود که بیانگر این مطلب است که آنها بخشی از سیستم دفاعی در مقابل استرس‌های شیمیایی 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.

GSTT1 و GSTM1 با اشکال ژنتیکی متفاوتی در جمعیت انسان‌ها بیان شده است که بعضی افراد نسبت به این ژن‌ها

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 تأثیر چندانی بر شاخص‌های اسپرمی ندارد. تفاوت در بعضی نتایج ممکن است به دلیل تفاوت در شرایط و نژاد افراد مورد مطالعه و نیز تأثیر عوامل دیگر علاوه بر این خانواده ژنی در ناباروری افراد دارای واریکوسل باشد.

#### نتیجه‌گیری

این مطالعه می‌تواند مقدمه مطالعات گسترده‌تر در جهت یافتن ارتباط سایر پلی‌مورفیسم‌های ژنی GST با شاخص‌های اسپرمی و درمان ناباروری باشد. با توجه به اینکه حذف ژن‌های GSTT1 و GSTM1 تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های اسپرمی نداشت، 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 شاخص‌های اسپرمی در افراد دارای واریکوسل باشد.

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

همچنین در مطالعه‌ای که در ایران در رابطه فراوانی ژنوتیپ نول GSTP1 در افراد با شاخص‌های اسپرمی معیوب و افراد با شاخص‌های اسپرمی طبیعی انجام گرفته تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشده است (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).

#### 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 progressive disease process?* J Urol 2004; 172(4 Pt 2): 1746-8.
- 7- Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. *Pathophysiology of varicocele in male fertility*. 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.
- 9- Burnbaugh L, Sabeur K, Ball BA. *Generation of superoxide anion by equine 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 Steril 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 species 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 antioxidant 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 evolution of the glutathione transferase.* Chem Res Toxicol 1997; 10(1): 2-18.
- 20- Gopalakrishnan B, Shaha C. *Inhibition of sperm glutathione-s-transferase leads to functional impairment due to membrane damage.* 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.
- 23- Arruda VR, Grignolli CE, Goncalves MS, Soares MC, Menezes R, Saad ST, et al. *Prevalence of*

- homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu(GSTM1) and theta(GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis?* Clin Genet 1998; 54: 210-14.
- 24- Norppa H. *Genetic polymorphisms 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 of 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. *Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms 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 Pharmacol 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*. Andrologia 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 polymorphisms and glutathione S-transfrease activity: Iranian infertile men*. Tehran Unive Med J 2009; 66(12): 878-87. [Persian]

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

***Dehghani M(MSc)<sup>1</sup>, Vahidi S(MD)<sup>2</sup>, Moin MR(MD)<sup>3</sup>, Haghroalsadat F(PhD Student)<sup>4</sup>, Sharafaldini M(MSc)<sup>5</sup>, Sheikhha M(PhD)<sup>\*6</sup>***

<sup>1</sup>*Department of Biotechnology, Islamic Azad University, yazd, Iran*

<sup>2,3</sup>*Department of Urology ,Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran*

<sup>4</sup>*Department of Nanobiotechnology, University of Tehran, Tehran, Iran*

<sup>5</sup>*Ferdosi University, Mashhad, Iran*

<sup>6</sup>*Department of Genetic, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran*

***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 through multiplex-PCR respectively.

***Results:*** Frequencies of GSTM1 null genotype in men with varicocele 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 gstm1 null genotype in case and control groups were 47.8 and 50 respectively. There were no statistically significant relationship between gstm1 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 gstm1, gstm1 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, Haghroalsadat 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***