پلی‌مورفیسم گلوتاتیون اس ترانسفراز M1 و T1 در همسران زنان مبتلا به سقط مکرر

کیومرث صفی‌نژاد[1]

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

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سقط مکرر (RPL) به‌صورت دو یا چند سقط مکرر خود به خودی تعریف می‌شود. ژن‌های گلوتاتیون اس ترانسفراز (GST) ایزوآنزیم‌هایی را تولید می‌کنند که این آنزیم‌ها، جنین را در مقابل استرس اکسداتیو حفظ می‌نمایند. هدف از این مطالعه تعیین میزان حذف دوژن GSTM1 و GSTT1 در همسران زنان مبتلا به سقط مکررمی‌باشد.

مواد و روش کار: در این مطالعه موردی - شاهدی ۱۰۲ مورد (همسران زنان مبتلا به سقط مکرر) و ۱۰۴ شاهد (همسران زنان سالم) موردبررسی قرار گرفتند. مایع منی، از گروه مورد و شاهد، جمع‌آوری و آنالیز شد. خون محیطی نیز از هر دو گروه، جمع‌آوری و پس از استخراج DNA از خون، Multiplex PCR روی نمونه‌های DNA صورت گرفت و نتایج با استفاده از آزمون آماری مربع کای، آزمون دقیق فیشر و آزمون همبستگی مورد ارزیابی آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: ما دریافتیم که ۲۶/۴۷ و ۴۲/۱۶ درصد از گروه مورد و ۸/۶۵ و ۱۴/۴۲ درصد از گروه شاهد به‌ترتیب دارای ژنوتیپ نول GSTM1وGSTT1 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 معنی‌داری نشان داد. همچنین همبستگی مثبت معنی‌داری (P<٪۵; Corr = 0.6) بین ژنوتیپ نول مرکب (حذف هم‌زمان GSTM1 و GSTT1) و مرفولوژی غیرطبیعی اسپرم مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داد که ژنوتیپ نول GSTM1 و GSTT1 در مردان، **در** وقوع سقط مکرر همسران آن‌ها نقش ایفا می‌کند. مخصوصاً اینکه در این مردان مرفولوژی غیرطبیعی در اسپرم نیز مشاهده شد. لذا احتمال دارد که عملکرد نامناسب GSTM1 و GSTT1، سبب استرس اکسیداتیو مرتبط با تراتواسپرمی و درنتیجه منجر به RPL شود.

کلیدواژه‌ها: سقط مکرر RPL ، پلی‌مورفیسم، گلوتاتیون اس ترانسفراز M1 ، گلوتاتیون 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 می‌گردد. دو یا چند سقط متوالی را سقط مکرر می‌گویند. حدود یک درصد از زوج‌ها، دارای این مشکل می‌باشند (۱). تاکنون علت‌های متنوعی برای RPL ذکر شده است (۲). بر اساس تست‌های 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 می‌شود (۳). حتی بعد از تشخیص حاملگی به‌صورت بالینی از هر ۵ تا ۶ مورد حاملگی یکی از آن‌ها بین ۴ هفتگی و ۲۰ هفتگی بارداری سقط می‌شود (۴). علل پیشنهادی برای RPL[2] ، شامل اختلالات کروموزومی والدین، اختلالات آناتومیکی رحم، عفونت‌های آندومتر، علت‌های غدد درون ریز (نقص فاز لوتئال، اختلال عملکرد تیروئید و دیابت ملیتوس غیر کنترل‌شده) سندرم آنتی‌فسفولیپید، ترومبوفیلی‌های وراثتی، علت‌های آللوایمونولوژیکی و فاکتورهای محیطی می‌باشند (۵). در میان علل پیشنهادی متنوع، به نظر می‌آید فاکتورهای ژنتیکی ارتباط بیشتری با RPL داشته باشند (۷،۶). تریزومی‌های آتوزومی مسئول ۵۰ درصد از سقط‌های سه ماهه اول حاملگی می‌باشند، این اختلالات در ابتدا قادرند در اثر Nondisjunction(NDJ) می‌وزی در طی گامتوژنز والدین با کاریوتایپ طبیعی، ایجاد شوند (۸). انواعی

[1] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران (نویسنده مسئول)

[2] Recurrent pregnancy loss

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 تترا پلوئیدی دو اختلال ناشی از لقاح غیرطبیعی بوده و با حیات منافات دارند. تریپلوئیدی در ۱۶ درصد سقط‌ها مشاهده‌شده و مشخص شده است که علت آن لقاح دو اسپرم با یک تخمک هاپلوئیدی بوده است (۱۰). تتراپلوییدی 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 اسپرماتوزویید، اسپرم غیرطبیعی یا ناباروری با علت اختلال در مرفولوژی اسپرم (تراتواسپرمی) شده و درنهایت باعث کاهش حاملگی و افزایش سقط می‌گردد (۱۱).

خانواده آنزیم‌های گلوتاتیون اس ترانسفراز (GST[1]) 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 فعال‌شده و به‌وسیله آنزیم‌های GST حذف می‌شوند. علاوه بر این، آنزیم‌های GST، نقش مهمی، در تنظیم میزان گلوتاتیون 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 گلوتاتیون 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 وGSTZ می‌باشند که این زیر خانواده‌ها به‌وسیله کاتالیز ترکیب گلوتاتیون با مواد الکتروفیل در مقابل توکسین‌های شیمیایی و کارسینوژن‌ها نقش ایفا می‌نمایند (۱۴-۱۶).

هدف از این مطالعه بررسی ارتباط سقط مکرر و پلی‌مورفیسم ژن‌های گلوتاتیون اس ترانسفراز GSTM1;Gen bank™ M1 (accession number NM_000561) و گلوتاتیون اس ترانسفراز GSTT1;Gen accession number NM_000853) T1 bank™) 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، موردبررسی 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 ایمونولوژیکی از این مطالعه کنار گذاشته شدند. از همسران زنان مبتلا به سقط مکرر با محدوده سنی ۴۵-۲۰ 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[2] مورد آنالیز قرار گرفت (۱۷).

ارزیابی اسپرم ازلحاظ مرفولوژی:

نمونه منی، پس از حداقل ۳ و حداکثر ۴ روز خودداری از نزدیکی در ظروف پلاستیکی استریل جمع‌آوری و در انکوباتور 37° 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 ولامل قرار گرفت و در زیر میکروسکوپ، با بزرگنمایی ۱۰۰ و ۴۰۰ موردبررسی 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 بزرگ‌نمائی ×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 موردمطالعه 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

[1] Glutathione S-transferases
[2] World Health Organization

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

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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) مورداستفاده قرار گرفت. هر جفت از این پرایمرها به‌ترتیب 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.

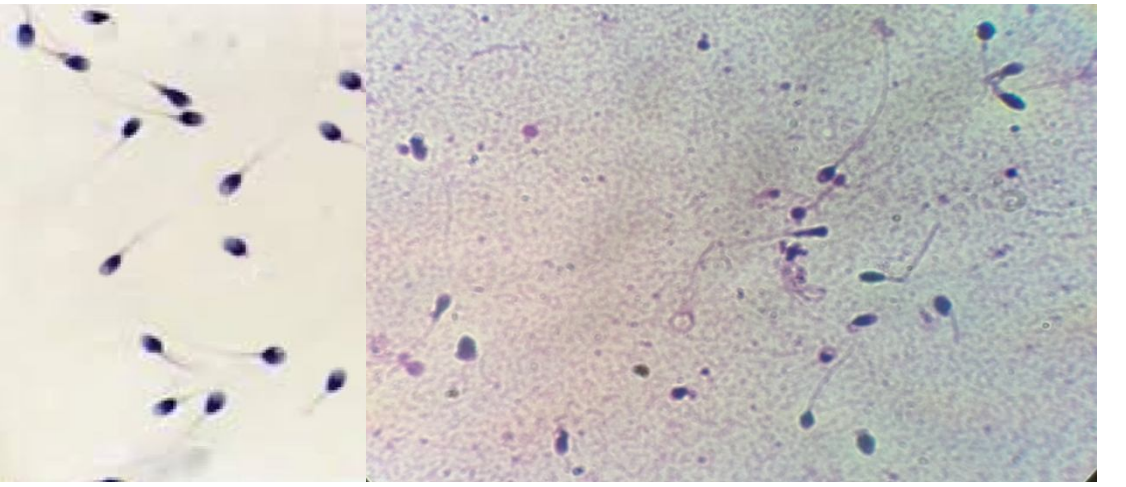
ژنو تیپ‌های GSTM1وGSTT1 به‌وسیله فن Multiplex PCR با استفاده از سه دسته پرایمر (طراحی‌شده با استفاده از نرم‌افزار gene runner و ساخته‌شده توسط شرکت ژن فن‌آوران ایران)، مورد آنالیز قرار گرفت. تکنیکMultiplex PCR به‌صورت حجم واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۵۰-۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۵۰ میلی مولار KCL، ۲,۵ میلی مولار MgCL2، ۲۰۰ میلی مولارTris-HCl (pH 8.4)، ۲۰۰ میلی مولارdNTPs، پرایمرهای GSTM1، GSTT1، B-globin(هریک به‌اندازه 0.2µM) و ۱,۵ واحد ازDNA AmpliTaq polymerase انجام شد. بعد از یک دناتوراسیون ابتدایی در درجه حرارت ۹۵ سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، تکثیر DNA به مدت ۳۵ سیکل که هر سیکل به‌ترتیب 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 ازاتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و به‌وسیله الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵درصد تفکیک شدند.

آنالیز آماری:

نتایج با استفاده از نرم‌افزار 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 به‌عنوان معنی‌دار تلقی شد. داده‌ها جدول‌بندی و مورد آنالیز قرار گرفتند. همچنین همبستگی بین ژنوتیپ نول ژن‌هایGSTM1 وGSTT1 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 ازنظر سقط، در یک محدوده سنی، موردبررسی قرار گرفتند. پس از آنالیز مایع منی گروه موردمطالعه، طبق WHO، اسپرم اکثر همسران زنان مبتلا به RPL نسبت به گروه شاهد، ازنظر مرفولوژی غیرطبیعی (مرفولوژی کم‌تر از ۲۰درصد) بودند (شکل شماره ۱).



اسپرم گروه مورد با مرفولوژی غیرطبیعی اسپرم گروه شاهد با مرفولوزی طبیعی

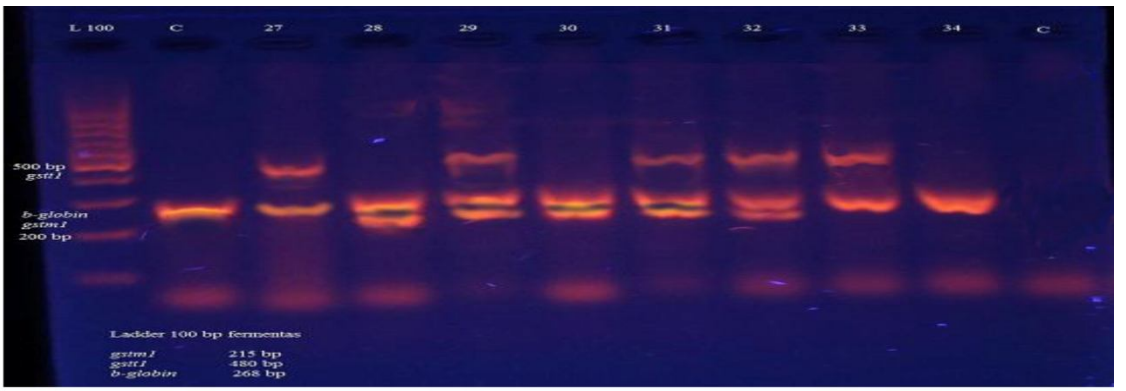
شکل (۱): دو نمونه از اسپرم گروه موردمطالعه

در پی نمونه‌گیری خون و استخراج DNA از هردو گروه مورد و شاهد و انجام تکنیک Multiplex PCR بر روی DNA، با استفاده از پرایمرهای مربوطه (جدول شماره ۱) و انجام الکتروفورز روی ژل آگارز ۱,۵درصد (شکل شماره ۲)، باندهای مشاهده شده در

روی ژل آگارز موید حضور آمپلیکون‌های GSTT1(480bp)، GSTM1 (215bp) و B-globin(268bp) می‌باشد. 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 ژن‌های مورد آزمایش

ژن	اندازه قطعه (bp)	توالي پرايمرها
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′- CAACTTCATCCACGTTCACC -3′ Reverse: 5′- GAAGAGCCAAGGACAGGTAC -3′



شکل (۲): نتایج Multiplex PCR ژن‌های GSTM1، GSTT1 وبتا گلوبین در گروه موردمطالعه

همان‌طور که در شکل شماره ۲ مشاهده می‌شود L نمایانگر Ladder bp۱۰۰ ، C در لاین دوم نشان‌دهنده کنترل مثبت، C در لاین آخر نشان‌دهنده کنترل منفی، باند 268bp محصول PCR ژن بتا گلوبین (کنترل داخلی) را نشان می‌دهد که در همه لاین‌ها مشاهده می‌گردد. محصول PCR ژن GSTT1 به‌صورت باند 480 bp (ژنوتیپ نرمال) در لاین‌های ۲۷، ۲۹، ۳۱، ۳۲ و ۳۳ قابل مشاهده می‌باشد و در لاین‌های ۲۸، ۳۰ و ۳۴ ژنوتیپ نول GSTT1 دیده می‌شود. متشابه محصول PCR ژن GSTM1 به‌صورت باند bp ۲۱۵ در لاین‌های ۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۱ و ۳۲ مشاهده می‌گردد. لاین ۲۷ و ۳۳ ژنوتیپ GSTM1 نول و GSTT1 نرمال، لاین ۲۹، ۳۱ و ۳۲ ژنوتیپ GSTM1 نرمال و GSTT1نرمال، لاین ۲۸ و ۳۰، ژنوتیپ GSTM1 نرمال و GSTT1 نول و لاین ۳۴، ژنوتیپ GSTM1 نول و GSTT1 نول (ژنوتیپ نول مرکب) را نشان می‌دهد. در تفسیر یافته‌ها، وجود ژن GST را به‌صورت ژنوتیپ نرمال و حذف آن را به‌صورت ژنوتیپ نول در نظر گرفته می‌شود. جهت آنالیز آماری، یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر، به چهار ژنوتیپ مختلف (GSTM1نرمال وGSTT1 نرمال، GSTM1 نول و GSTT1 نرمال، GSTM1 نرمال وGSTT1 نول، GSTM1نول وGSTT1 نول) دسته‌بندی شد. درصد افرادی که دارای ژنو تیپ‌های نول برای GSTM1 و GSTT1 بودند، در گروه مورد، به‌ترتیب ۲۶/۴۷درصد و ۴۲/۱۶درصد و در گروه شاهد به‌ترتیب ۸/۶۵درصد و ۴۲/۱۴ درصد بود که این نتایج اختلاف معنی‌داری بین دو گروه موردمطالعه نشان داد ($p<0.05$). فراوانی ژنوتیپ نول مرکب GSTM1 و GSTT1 در بین همسران زنان مبتلا (۱۰/۸۷ درصد) و گروه شاهد (۰ درصد) به‌طور معنی‌دار متفاوت بود ($p<0.01$). از ۱۰۲ مرد دارای همسر مبتلا به RPL شرکت‌کننده در این مطالعه، در ۴۲ مورد از آن‌ها (۴۱/۱۸درصد)، هر دو ژن نرمال (GSTM1 نرمال - GSTT1 نرمال) بودند و ژنوتیپ GSTM1 نرمال - GSTT1 نول بلعکس در ۴۹ مورد از آن‌ها (۴۸/۰۴درصد) یافت شد (جدول شماره ۲).

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

Gene	Genotype	Cases(%)	Controls(%)	P-value
GSTM1	null	(/. 26/47) 27	(/.۸/۶۵) ۹	0/02
	normal	(/. 73/53) 75	(/. 91/35) ۹۵	
GSTT1	null	(/. 42/16) 43	(/. 14/42) ۱۵	0/002
	normal	(/. 57/84) 59	(/. 85/58) 89	
GSTT1 & GSTM1	Both null	(/. 10/78) 11	(/. 0) 0	0/0004
	Either one null	(/. 48/04) 49	(/. 23/08) 24	
	Both normal	(/41/18) 42	(/. 76/92) 80	

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 T1و 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[1])با اثر اکسیداتیو روی DNA به‌عنوان یکی از فاکتورهای اصلی ناباروری مردان در نظر گرفته می‌شوند (۱۸). محصولات ژن گلوتاتیون اس ترانسفراز، یکی از مکانیسم‌های دفاعی انسان در مقابل اثرات زیان‌بار استرس اکسیداتیو می‌باشد (۱۹). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که پلی‌مورفیسم ژن گلوتاتیون 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 (۲۴، ۲۳). به‌عنوان‌مثال ژن‌های دتوکسیفیکاسیون متابولیسم شامل CYP1A1، GSTM1وGSTT1 با ناباروری مردانه مرتبط می‌باشند (۲۹-۲۵). آنزیم‌های گلوتاتیون 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 گلوتاتیون 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 ازاین‌بین می‌توان به افزایش خطر ناباروری در مردان اشاره نمود (۳۴). همچنین طبق مطالعات گذشته (۳۶،۳۵) 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

نقطه قوت مطالعه حاضر نسبت به مطالعات گذشته (۳۱) در نظر گرفت. چون در همسران زنان مبتلا درجاتی از تراتواسپرمی نیز مشاهده گردید، غیرازاینکه ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم‌های GSTM1 و GSTT1 و سقط مکرر در همسران افراد مبتلا مشاهده شد همبستگی مثبت معنی‌داری هم بین ژنوتیپ نول مرکب دوژن موردمطالعه و تراتواسپرمی مشاهده شد. ولی اینکه آیا ژنو تیپ‌های 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 غیرطبیعی 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 ازنظر 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 تراتواسپرمی و وقوع RPL در همسران آن‌ها کمک می‌کند.

نتایج بسیار اندکی در مورد ژنو تیپ‌های 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 غیرطبیعی اسپرم در همسران زنان مبتلا به RPL و مستعد بودن به RPL، ارتباط وجود دارد (P<۰/۰۵).

در مطالعه حاضر ژنوتیپ نول مرکب یا حذف هم‌زمان دوژن GSTM1 و GSTT1، در ۱۰/۷۸درصد از همسران زنان مبتلا و در هیچ‌یک از همسران زنان سالم مشاهده نگردید. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ژنوتیپ نول مرکبGSTM1 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 تراتواسپرمی در اسپرم هم مشاهده شد و همبستگی بین آن‌ها مثبت و معنی‌دار بود (P<٪۵; Corr = 0.6) که اثبات این ارتباط نیاز به مطالعات بیشتری دارد. در مطالعات قبلی، ارتباط عوامل ناباروری مردانه با ژنو تیپ‌های نول GST به‌طورکلی، مطالعه شده است (۳۵) ولی دومین نقطه قوت مطالعه حاضر بررسی اختصاصی تراتواسپرمی و ژنوتیپ نول مرکب GSTM1 و GSTT1 در کنار هدف اصلی مطالعه می‌باشد. شاید بتوان نتیجه گرفت که احتمالاً، تراتواسپرمی 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 تراتواسپرمی و درنتیجه RPL شود. ولی با توجه به اینکه تعداد افراد موردمطالعه در مطالعه حاضر در به‌دست آوردن درستی این ارتباط ناکافی می‌باشد مطالعات بیشتر در این زمینه را می‌طلبد.

تشکر و قدردانی

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

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 ontioxidant 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 Stransferases. 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, Bale rcia 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 as. 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.

Original Article

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% and14.42% 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% versus8.56%, $P < 0.05$), 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 (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)*