

متیلاسیون ناحیه پرموتوری ژن *GSTM1* در مردان ایرانی مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی

نسترن خزامی پور^۱، مهرداد نوروزی نیا^{۲*}، سعید صاحبکشاف^۳، پریسا فاتح‌منش^۴

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه ژنتیک پزشکی و هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- پزشک، متخصص اورولوژی، مرکز ناباروری نوید، تهران، ایران
- ۴- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات سلولی صارم، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۸/۰۲/۲۹

دریافت مقاله: ۸۷/۱۲/۱۲

چکیده

هدف: تقریباً در ۵۰ درصد موارد از ناباروری فاکتورهای مردانه به‌تنهایی یا همراه با فاکتورهای زنانه دخالت دارند. یکی از ناهنجاری‌هایی که اخیراً نقش آن در ناباروری بررسی شده است تغییرات نابه‌جا در الگوی اپی‌ژنتیک خصوصاً متیلاسیون است که می‌تواند باعث تغییر در بیان و حتی خاموشی ژن شود. *GSTM1* (گلوکوتایون S-ترانسفراز *mu1*) به‌عنوان پروتئین انتقالی درون سلولی در انتقال هورمون‌ها و استروئیدهای جنسی ضروری برای اسپرماتوژنز شرکت می‌کند. گزارش‌های اخیر بیانگر نقش داشتن ژن *GSTM1* در ناباروری مردان می‌باشد. به دلیل عملکرد مهم این ژن در اسپرماتوژنز و محافظت از اسپرم‌ها، گزارش نقش تغییرات اپی‌ژنتیکی این ژن در ناباروری مردان در بعضی جمعیت‌ها و همچنین نقش تغییرات اپی‌ژنتیکی این ژن در بیماری‌های مختلف دیگر و فرضیه نقش این ژن و تغییرات اپی‌ژنتیکی آن در بیماران ایرانی مبتلا به ناباروری مردان بررسی شد.

مواد و روش‌ها: این تحقیق روی نمونه خون محیطی ۵۰ مرد نابارور مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی و ۵۰ فرد بارور به‌عنوان کنترل، همچنین نمونه بافت بیضه از ۳۲ فرد نابارور مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی و ۵ فرد نابارور انسدادی به‌عنوان کنترل انجام گرفت. روش استفاده شده در این تحقیق برای بررسی متیلاسیون *Methylatoin Specific PCR* است.

نتایج: در مورد ژن *GSTM1* در همه نمونه‌های خون و بافت بیمار و کنترل، آلل متیله و غیرمتیله مشاهده شد، به‌جز در مورد ۲ نمونه (۶/۲۵ درصد) بافت نابارور غیرانسدادی که تنها آلل متیله وجود داشت. **نتیجه‌گیری:** با این که در نتایج حاصل از این تحقیق، تمایل به سمت متیله شدن ژن *GSTM1* در بیماران ایرانی مبتلا به آزواسپرمی مشاهده شد ولی این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نیست ($P\text{-value}=0/3$). براساس این تحقیق به‌نظر می‌رسد که ارتباط بین متیلاسیون ناحیه پرموتوری ژن *GSTM1* که در بعضی از تحقیقات انجام شده در بیماران مبتلا به آزواسپرمی متیله شده است؛ در بیماران ایرانی نقش نداشته باشد.

کلیدواژگان: *GSTM1*، ناباروری، متیلاسیون، آزواسپرمی غیرانسدادی

۱- مقدمه

عدم ایجاد باروری پس از یک سال نزدیکی جنسی بدون جلوگیری را ناباروری می‌نامند [۱]. به‌طور کلی حدود ۱۵ درصد زوجها در دوره‌ای از زندگی خود نابارورند که در کمتر از ۵۰ درصد موارد فاکتورهای مردانه نقش دارند. در ۲۰ درصد از این موارد تنها عوامل مردانه و در ۲۷ درصد موارد هر دو فاکتورهای مردانه و زنانه دخیل‌اند؛ در حدود ۳۸ درصد تنها عوامل زنانه درگیر و در ۱۵ درصد باقی‌مانده هنوز علت مشخصی یافت نشده است [۲].

آزواسپرمی (Azoospermia) یکی از علل ناباروری با منشاء مردانه است. شیوع این علامت در بیش از ۲ درصد جمعیت و ۱۰-۲۰ درصد جمعیت نابارور گزارش شده است [۳]. بر طبق معیارهای سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization: WHO) تعداد اسپرم کمتر از 20×10^6 در هر میلی‌لیتر (Oligozoospermia)، تحرک کمتر از ۵۰ درصد (Asthenozoospermia) و ریخت‌شناسی (Morphology) طبیعی کمتر از ۳۰ درصد (Teratozoospermia) در مایع انزال شده غیرطبیعی است و می‌تواند باعث ناباروری فرد شود [۴]. عوامل متعددی بر تعداد، شکل، بلوغ و حرکت اسپرم تأثیر منفی دارند [۴]. این عوامل عبارتند از بیماری‌های عفونی، اختلالات هورمونی و مشکلات دستگاه ایمنی.

از طرف دیگر تاکنون ناهنجاری‌های ژنتیکی متعددی در ناباروری مردان بررسی و تأیید شده است. ناهنجاری‌های کروموزومی، ریزحذف‌های کروموزوم Y، جهش در ژن‌های *HUMARA*، *CFTR*، *LHR*، *FSH LH* و *FSHR* از علل ژنتیکی ناباروری است. البته به‌نظر می‌رسد که کماکان علل دیگری اعم از ژنتیکی یا اپی‌ژنتیکی باید روی ناباروری مردان نقش داشته باشد [۵].

طی تمایز گامت مردانه، ژنوم تغییرات عمده‌ای را متحمل می‌شود که نه‌تنها روی توالی DNA و اطلاعات ژنتیکی مؤثرند بلکه ساختار هسته‌ای و اطلاعات اپی‌ژنتیکی را نیز تغییر

می‌دهند. در سال‌های اخیر نقش متیلاسیون ژن‌ها در ناباروری مردان بررسی بیشتری شده است [۶] ولی هنوز تمام تغییرات متیلاسیون DNA در ناباروری مردان بررسی نشده است [۷]. در این میان متیلاسیون DNA شایع‌ترین مکانیسم اپی‌ژنتیک است که در ژنوم ارگانسیم‌های متعددی از جمله یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها دیده می‌شود. این تغییرات وقتی در نواحی معروف به جزایر CpG (CpG island) اتفاق می‌افتند می‌توانند در بیان ژن‌ها تأثیر داشته و عامل بیماری باشند.

تاکنون تحقیقات متعدد نقش پروتئین GSTM1 در ناباروری مردان را بررسی کرده است [۸-۱۱]. این ژن روی کروموزوم ۱ در ناحیه 1p13.3 واقع شده، دارای طول ۵۹۲۶ جفت‌باز است و پروتئینی از خانواده آنزیمی گلوکوتاتیون S-ترانسفراز (Glutathions S-Transferase: GST) را کد می‌کند. این خانواده آنزیمی شامل تعداد قابل توجهی از آنزیم‌های سیتوزولی، میکروزومی و میتوکندریایی است که قادرند با سوبستراهای متنوعی از جمله ترکیبات سمی داخلی و خارجی واکنش دهند و در متابولیسم آن‌ها و محافظت سلول‌ها در برابر این سموم و رادیکال‌های آزاد اکسیژن شرکت کنند [۱۲].

فعالیت GST در کبد و بافت‌های دیگر مثل تخمدان، بیضه و سرم به فراوانی وجود دارد و نشان داده شده است که GST می‌تواند طی اسپرماتوژنز نقش حفاظتی داشته باشد [۱۳].

برخی مطالعات روی مردان نابارور بدون علت مشخص نشان دادند که پلاسمای سمینال (Seminal plasma) و اسپرماتوزوای (Spermatozoa) آن‌ها نسبت به مردان بارور سطح تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species: ROS) بالاتری دارد [۱۴]. این افزایش ROS می‌تواند ناشی از کاهش یا عدم عملکرد آنتی‌اکسیدان‌ها باشد. وجود مقادیر زیاد GST در مسیر ساخت اسپرم می‌تواند نشان‌دهنده عملکرد مهم این پروتئین در آن باشد.

از بین ایزوفرم‌های مختلف GST، GSTM1 علاوه بر فعالیت آنزیمی و آنتی‌اکسیدانی توانایی اتصال به استروئیدهای

و ۵ کنترل مبتلا به آزواسپرمی انسدادی در گروه کنترل بافت قرار داشته است. نمونه‌های خون به روش نمک اشباع (Salting out) و نمونه‌های بافت با استفاده از کیت استخراج DNA از بافت شرکت Roche و براساس برنامه شرکت سازنده انجام شده است. پس از بررسی کیفیت و اندازه DNA استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری، نمونه‌ها با استفاده از سدیم بی‌سولفات تیمار شدند.

به‌طور خلاصه ۱۰ میکرولیتر DNA (۱ میکروگرم) نمونه به ۴۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه اضافه شده و ۵/۵ میکرولیتر NaOH ۲ مولار به آن افزوده و ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. ۳۰ میکرولیتر هیدروکینون ۱۰ میلی‌مولار تازه تهیه شده، اضافه شد. ۵۲۰ میکرولیتر سدیم بی‌سولفات ۳ مولار تازه تهیه شده به تیوب اضافه و به کمک روغن معدنی سطح محلول پوشانده شده با نوار پارافیلیم درب میکروتیوب بسته شد. سپس ۱۶ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. DNA با استفاده از کیت QIAGEN از محلول استخراج می‌شود. ۱۵/۵ میکرولیتر از NaOH ۳ مولار اضافه شده، ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. این مرحله با انجام دسولفوناسیون (Desulfonation)، تبدیل شیمیایی سیتوزین به یوراسیل را کامل می‌کند. سپس DNA به روش اتانول استات آمونیوم رسوب کرده و در ۳۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر حل می‌شود.

۲-۱-۱ (MSP) Methylation Specific PCR

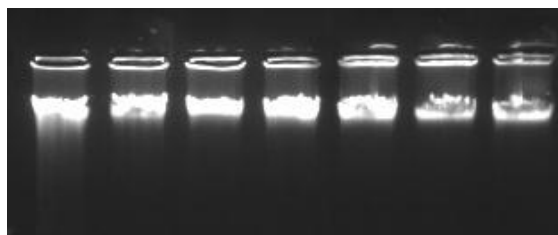
در این روش از آغازگرهایی (Primers) که برای DNA تیمار شده متیله یا غیرمتیله اختصاصی هستند، استفاده می‌شود. به‌طور خلاصه واکنش MSP در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. غلظت نهایی مواد برای واکنش PCR در هر دو جفت آغازگر عبارت بود از: ۰/۱ میلی‌مولار، dNTP، ۰/۱ میلی‌مولار، MgCl₂ ۲ میلی‌مولار، بافر PCR 1X، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگر، ۰/۵ میلی‌لیتر از Taq DNA Polymerase (همگی از شرکت

جنسی شامل استرادیول (Estradiol) و تستوسترون (Testosterone) را دارند و از آن‌جا که استروئیدها برای سلول‌های ژرمینال (Germ cells) و اسپرماتوژنز ضروری‌اند غلظت آن‌ها در (Seminiferous Tubular Fluid) STF بسیار زیاد است و برای انتقال این مولکول‌ها به جایگاه‌های متفاوت سلولی و نیز سلول‌های متفاوت نیاز چشمگیری به پروتئین‌های متصل‌شونده و حمل‌کننده استروئیدها وجود دارد و این ویژگی اتصال GSTM1 به استروئیدها آن را پروتئین ضروری در مسیر اسپرماتوژنز ساخته است [۱۵].

با توجه به تمام مطالب ذکر شده و این‌که نقش تغییرات اپی‌ژنتیکی این ژن در ناباروری مردان در جمعیت دیگری بررسی شده و رابطه معنی‌داری با ناباروری نشان داده است [۱۶]، تغییرات ژنومی همانند چندشکلی‌ها (Polymorphisms) و حذف این ژن نیز رابطه معنی‌داری با ناباروری مردان نشان داده است [۹، ۱۰، ۱۷، ۱۸]. از طرف دیگر می‌دانیم که اولاً متیلاسیون می‌تواند فنوتیپی همانند انواع جهش‌ها ایجاد کند [۱۹]؛ ثانیاً الگوی متیلاسیون در مواردی می‌تواند در جمعیت‌های مختلف متفاوت باشد [۲۰]. بنابراین در این تحقیق نقش این عامل در مردان نابارور ایرانی بررسی شده است.

۲- مواد و روش‌ها

این مطالعه از دی ماه سال ۱۳۸۶ تا دی ماه سال ۱۳۸۷ در بیمارستان صارم انجام شده است. این تحقیق در دو گروه اصلی خون و بافت بیضه انجام شده است. بیماران به هیچ‌وجه همپوشانی نداشته‌اند. نمونه خون بیماران از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان صارم مبتلا به آزواسپرمی و افراد سالم از همراهان مراجعه‌کنندگان به این بیمارستان و پس از مشاوره ژنتیک استاندارد گرفته شده است. نمونه‌های بافت بیضه از بیماران مراجعه‌کننده به انستیتو نوید و مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی (بیماران) و آزواسپرمی انسدادی (کنترل) گرفته شده است. تعداد ۳۵ بیمار در گروه بافت بیضه



شکل ۱ کیفیت DNA استخراج شده با روش نمک اشباع بر روی ژل آگاروز بررسی اسپکتروفتومتری نشان‌دهنده نسبت OD₂₆₀/OD₂₈₀ معادل ۱/۸ بوده است که نشان‌دهنده کیفیت خوب DNA است.

به منظور بررسی متیلاسیون CpG در این ژن نیز دو جفت آغازگر استفاده شده و برای هر جفت آغازگر یک PCR جداگانه راه‌اندازی شد. پس از راه‌اندازی آغازگرها برای هر نمونه دو بار واکنش PCR انجام شد، یکبار با آغازگر متیله و یکبار با آغازگر غیرمتیله. سپس محصولات PCR روی ژل اکریل آمید ۷/۵ درصد الکتروفورز شدند و در نهایت با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند. قطعه حاصل از آغازگر متیله ۱۵۷ و محصول آغازگر غیرمتیله ۱۶۱ جفت‌باز طول دارند.

از بین ۵۰ مرد نابارور مورد بررسی همگی برای هر دو آغازگر متیله و غیرمتیله جواب مثبت نشان دادند (۱۰۰ درصد).

از بین ۳۲ نمونه بافت، تمام نمونه‌ها نشان‌دهنده آلل متیله و غیرمتیله بوده‌اند به جز دو نمونه که فقط آلل متیله را نشان داده‌اند (۶/۲۵ درصد). بررسی آماری با استفاده از آزمون این نتایج نشان می‌دهد که هرچند که گروه نابارور انسدادی تمایلی به متیلاسیون نشان می‌دهند و وجود دو نمونه کاملاً متیله گواه آن است ولی این اختلاف در تحقیق حاضر از نظر آماری با اهمیت نبود.

شکل ۲ تعدادی از نمونه‌ها را نشان داده است و نتایج کلی خون و بافت به ترتیب در جداول ۱ و ۲ مشخص شده است.

CinnaGen) و ۱/۵ میکرولیتر (حدود ۵۰ نانوگرم) از DNA تیمار شده با سدیم بی‌سولفایت. در واکنش غیرمتیله از آغازگرهای:

GSTM1(U)-F: TTTTGATTTTGTTTTTTGAATTTTT
GSTM1(U)-R: AAAACCTTACTACAACCCCA

استفاده شد. شرایط PCR به صورت شروع داغ (Hot Start) بود؛ به عبارت دیگر افزودن آنزیم *Taq DNA Polymerase* در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. به طور خلاصه پس از افزودن آنزیم، واسرشتگی اولیه (Initial Denaturing) در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۴۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال (Annealing) ۴۰ ثانیه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد، و بسط (Extension) ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. واکنش PCR با آغازگر متیله با همان غلظت‌ها و به همان صورت آغازگرهای غیرمتیله صورت گرفت با این تفاوت که دمای اتصال ۶۶ درجه سانتی‌گراد بود. در این واکنش از آغازگرهای متیله:

GSTM1(M)-F: GATTCGTTTTTCGGAATTTTC
GSTM1(M)-R: GAAACCTTACTACGACCCCG

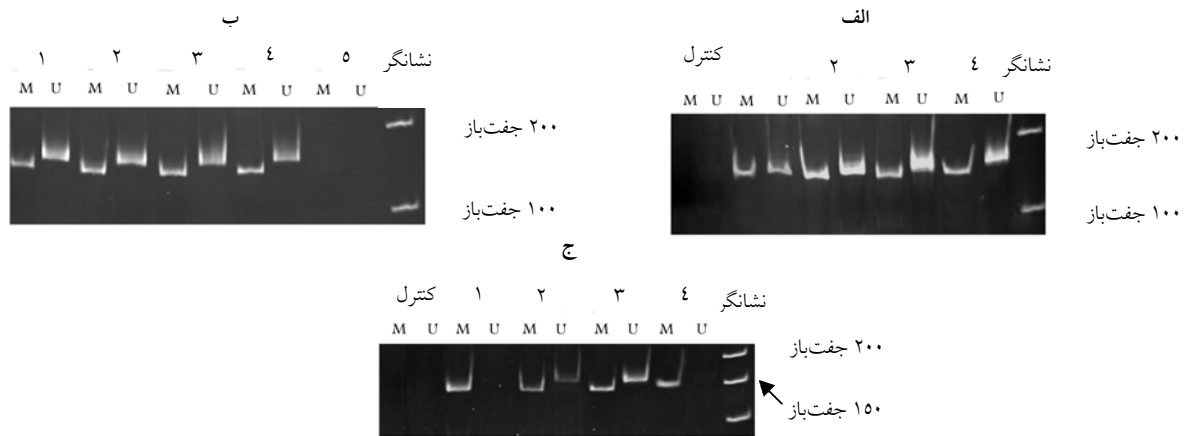
استفاده شد.

نتایج روی آگارز ۱/۳ درصد برده شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) در نور ماورای بنفش (Ultra violet: UV) مشاهده شد.

برای بررسی تواتر مشاهده شده آلل‌های اپی‌ژنتیک مختلف در گروه کنترل و گروه بیمار از آزمون من-ویتنی (Mann-Whitney Test) استفاده شد.

۳- نتایج

برای بررسی نمونه‌ها در این پژوهش ابتدا کیفیت DNAهای استخراج شده تعیین شد. بدین منظور ۳ میکرولیتر از DNA که با روش نمک اشباع استخراج شد روی ژل آگارز ۱/۳ درصد الکتروفورز شد. شکل ۱ کیفیت چند نمونه از DNA را نشان می‌دهد.



شکل ۲ نتایج حاصل از راه اندازی روش MSP برای آغازگر متیله (M) و غیرمتیله (U) ژن *GSTM1*؛ الف) نتایج انجام روش MSP روی بافت بیضه ناشی از بیوپسی بیضه افراد مبتلا به ناباروری انسدادی؛ C کنترل منفی است، نمونه های ۱ تا ۴ بیمار هستند. همان طور که مشاهده می شوند تمام بیماران دارای آلل های متیله و غیرمتیله هستند. ب) نتایج انجام روش MSP روی نمونه های خون؛ نمونه ۱: فرد طبیعی، نمونه ۲: فرد نابارور غیرانسدادی، نمونه ۳: فرد نابارور انسدادی، نمونه ۴: فرد طبیعی و نمونه ۵: کنترل منفی، ج) نتایج حاصل از انجام روش MSP روی بافت بیضه ناشی از بیوپسی بیضه مردان مبتلا به ناباروری غیرانسدادی است. C کنترل منفی است، نمونه ۱ و ۳ نمونه بیمارانی است که تنها آلل متیله را نشان می دهند. نمونه ۲ و ۳ نمونه بیمارانی است که هر دو آلل متیله و غیرمتیله را نشان می دهد.

جدول ۱ نتایج بررسی الگوی متیلاسیون پروموتور ژن *GSTM1* در نمونه خون بیماران نابارور غیرانسدادی و گروه کنترل

جمع کل	M/M	M/U	U/U	
۵۰	۰	۵۰ (۱۰۰ درصد)	۰	نابارور غیرانسدادی
۵۰	۰	۵۰ (۱۰۰ درصد)	۰	کنترل

جدول ۲ نتایج بررسی الگوی متیلاسیون پروموتور ژن *GSTM1* در نمونه بافت بیضه بیماران نابارور غیرانسدادی و گروه کنترل نابارور انسدادی

جمع کل	M/M	M/U	U/U	
۳۲	۲ (۶۲۵ درصد)	۳۰ (۹۴ درصد)	۰	غیرانسدادی
۵	۰	۵ (۱۰۰ درصد)	۰	انسدادی

۴- بحث

در این تحقیق مشخص شد که متیلاسیون در ناحیه پروموتوری ژن *GSTM1* رابطه معنی داری با آزواسپرمی غیرانسدادی در مردان ایرانی ندارد. ژن *GSTM1* یک آنتی اکسیدان قوی را کد می کند که مهم ترین نقش آن در مسیر اسپرماتوژنز حفاظت اسپرم های در حال رشد در برابر عوامل اکسیدکننده داخلی و خارجی است. چندین مطالعه اپیدمیولوژی گزارش کردند که ژنوتیپ *GSTM1 null* با افزایش حساسیت به بیماری های مرتبط با استرس اکسیداتیو همراه است و پیشنهاد شده که *GSTM1* یک ایزوآنزیم ضروری در سم زدایی محصولات استرس اکسیداتیو است [۲۱]. همچنین نتایج تحقیق

آیدمیر (Aydemir) و همکارانش (۲۰۰۷) نشان داد که حساسیت اسپرم و پلاسمای سمینال به استرس اکسیداتیو به طور چشمگیری در مردان نابارور با ژنوتیپ *GSTM1 null* در مقایسه با مردان بارور با ژنوتیپ طبیعی، بیشتر است [۲۲]. با این حال مطالعه حاضر نشان می دهد که تغییرات متیلاسیون که خود می تواند از عوامل کاهش بیان ژن باشند در مردان ایرانی مبتلا به آزواسپرمی نقش کمی دارد. این یافته خلاف یافته تحقیق دیگری است که نشان داده در جمعیت هند، هایپرمتیلاسیون (Hypermethylation) ناحیه پروموتوری این ژن و کاهش بیان ناشی از آن ارتباط معنی داری با ناباروری مردان داشته است [۲۳].

وجود هایپرمتیلاسیون را در گروه نابارور مشاهده کرد اما الگوی متیلاسیون مشاهده شده در نمونه‌های مورد بررسی آن‌ها با الگوی متیلاسیون نمونه‌های تحقیق حاضر متفاوت است. در بررسی حاضر همه افراد طبیعی در خون محیطی و بافت هر دو آل متیله و غیرمتیله را دارند ولی در تحقیق انجام شده توسط دهیلون افراد طبیعی در خون و بافت فقط الگوی غیرمتیله را نشان می‌دهند و متیلاسیون را در تعدادی از نمونه‌های بافت نابارور گزارش کردند [۲۳]. البته در تحقیقات لودیگین در مورد نقش الگوی متیلاسیون ژن *GSTMI* در سرطان پروستات الگوی متیلاسیون در بافت طبیعی غیرسرطانی مشابه الگوی متیلاسیون در نمونه‌های طبیعی بررسی شده در تحقیق حاضر و تأییدکننده آن بوده است. بنابراین به نظر می‌رسد که نتایج تحقیقات دهیلون بیشتر نشان‌دهنده تفاوت در جمعیت مورد مطالعه باشد تا نقش فراگیر متیلاسیون در ناحیه پروموتری ژن *GSTMI* در جوامع مختلف.

به‌طور خلاصه بررسی حاضر تأییدکننده نقش اپی‌ژنتیکی ژن *GSTMI* در ناباروری مردان ناشی از آزواسپرمی نیست. با این حال وجود دو نمونه کاملاً متیله می‌تواند نشانه‌ای از تأثیر هرچند اندک این ژن در ناباروری مردان است. بررسی‌های ژنومی بیشتر می‌تواند مشخص کند که آیا تغییرات این ژن در مردان نابارور می‌تواند منشاء ژنتیکی داشته باشد یا خیر؟

۵- تشکر و قدردانی

مؤلفین بدین وسیله از کمک‌های ارزشمند جناب آقای دکتر صارمی رئیس بیمارستان صارم و پژوهشکده سلولی صارم در این پژوهش نهایت تشکر را می‌نمایند. این تحقیق در چارچوب کار تحقیقاتی سرکار خانم خزامی پور دانشجوی کارشناسی ارشد انجام شده است.

با این حال مطالعاتی که روی آلل‌های مختلف این ژن انجام شده بیانگر نقش داشتن چندشکلی‌های متعدد این ژن در مردان مبتلا به لیگواسپرمی است. در یک بررسی در مورد ارتباط چندشکلی‌های این ژن و ناباروری مشاهده شد که آلل *GSTM1B* به‌طور مشخصی در بین گروه نابارور مورد مطالعه فراوان‌تر است [۱۸].

در تحقیق حاضر نقش تغییرات اپی‌ژنتیک و متیلاسیون در جزیره CpG پروموتری این ژن بررسی شد. این جزیره CpG ۱۴۴ جفت‌باز طول دارد و محتوی بیش از ۷۰ درصد GC است که ۷۶ درصد آن به‌صورت CpG هستند. الگوی متیلاسیون این جزیره CpG در پروموتری ژن *GSTMI* قبلاً در تحقیقات دیگر نیز بررسی شده است. لودیگین (Lodygin) و همکارانش تغییرات الگوی متیلاسیون این ناحیه را در سرطان پروستات و دهیلون (Dhillon) و همکارانش نقش متیلاسیون آن را در ناباروری بررسی کردند و نتایج هر دو تحقیق بیانگر نقش هایپرمتیلاسیون این توالی در خاموشی بیان ژن و افزایش احتمال بیماری است [۲۳، ۲۴].

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که در نمونه‌های خون افراد نابارور غیرانسدادی و گروه کنترل تفاوتی در الگوی متیلاسیون وجود ندارد. تغییر در الگوی متیلاسیون پروموتری این ژن در خون محیطی نمی‌تواند از دلایل ناباروری از نوع آزواسپرمی در مردان ایرانی باشد. در گروه بافت وجود تنها آلل متیله در ۶/۲۵ درصد نمونه‌ها (۲ نمونه) هرچند ثابت‌کننده ارتباط معنی‌داری نیست ($P\text{-value}=0/07$)؛ با این حال نشان‌دهنده تمایل به متیلاسیون است. هرچند انجام تحقیق بزرگ‌تری شاید بتواند در اثبات یا رد نقش ژن *GSTMI* کمک‌کننده باشد ولی علت اختلاف در نتایج این تحقیق با تحقیق در جمعیت هند می‌تواند به دلیل وجود تفاوت در الگوی متیلاسیون وابسته با فاکتورهای بومی نیز باشد. هر چند دهیلون نیز در تحقیقات خود

۶- منابع

- [1] Krausz C, Forti G. Clinical aspects of male infertility. *Results Probl Cell Differ* 2000; 28: 1-21.
- [2] Huynh T, Mollard R, Trounson A. Selected genetic factors associated with male infertility. *Human Reprod Update* 2002; 8(2): 183-98.
- [3] McElreavey K, Krausz C, Patrat C, Fellous M. [Male infertility and microdeletions of the Y chromosome]. *Gynecol Obstet Fertil* 2002; 30(5): 405-12.
- [4] Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AMA. WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. Cambridge: Cambridge University Press, 2000; p: 33.
- [5] Dohle GR, Halley DJ, Van Hemel JO, van den Ouwel AM, Pieters MH, Weber RF, Govaerts LC. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod* 2002; 17(1): 13-6.
- [6] Khazamipour N, Fatehmanesh P, Keyhaneh M, Pujol P. MTHFR promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility. *Hum Reprod* 2009; In Press .
- [7] Cisneros FJ. DNA methylation and male infertility. *Front Biosci* 2004; 9: 1189-200.
- [8] Wu Q, Xing J, Xue W, Sun J, Wang X, Jin X. Influence of polymorphism of glutathione S-transferase T1 on Chinese infertile patients with varicocele. *Fertil Steril* 2009; 91(3): 960-2.
- [9] Wu QF, Xing JP, Tang KF, Xue W, Liu M, Sun JH, Wang XY, Jin XJ. Genetic polymorphism of glutathione S-transferase T1 gene and susceptibility to idiopathic azoospermia or oligospermia in northwestern China. *Asian J Androl* 2008; 10(2): 266-70.
- [10] Rubes J, Selevan SG, Sram RJ, Evenson DP, Perreault SD. GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutat Res* 2007; 625(1-2): 20-8.
- [11] Rozati R, Giragalla SB, Bakshi H, Doddamaneni S, Khaja N, Sharma RS. The CYP1A1 and GSTM1 Genetic Polymorphisms and Susceptibility to Endometriosis in Women from South India. *IJFS* 2008; 2(3): 105-12.
- [12] Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 30(6): 445-600.
- [13] Pajarinen J, Savolainen V, Perola M, Penttilä A, Karhunen PJ. Glutathione S-transferase-M1 'null' genotype and alcohol-induced disorders of human spermatogenesis. *Int J Androl* 1996; 19(3): 155-63.
- [14] Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, Borini A. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2007; 14(6): 746-57.
- [15] Mukherjee SB, Aravinda S, Gopalakrishnan B, Nagpal S, Salunke DM, Shaha C. Secretion of glutathione S-transferase isoforms in the seminiferous tubular fluid, tissue distribution and sex steroid binding by rat GSTM1. *Biochem J* 1999; 340(Pt 1): 309-20.

- [16] Dhillon VS, Shahid M, Husain SA. Associations of MTHFR DNMT3b 4977 bp deletion in mtDNA and GSTM1 deletion, and aberrant CpG island hypermethylation of GSTM1 in non-obstructive infertility in Indian men. *Mol Hum Reprod* 2007; 13(4): 213-22.
- [17] Paracchini V, Garte S, Taioli E. MTHFR C677T polymorphism, GSTM1 deletion and male infertility: a possible suggestion of a gene-gene interaction? *Biomarkers* 2006; 11(1): 53-60.
- [18] Chen SS, Chang LS, Chen HW, Wei YH. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and male infertility in Taiwanese patients with varicocele. *Hum Reprod* 2002; 17(3): 718-25.
- [19] Copley JE, Martin DI, Suter CM. Germline epimutation in humans. *Pharmacogenomics* 2008; 9(12): 1861-8.
- [20] Terry MB, Ferris JS, Pilsner R, Flom JD, Tehranifar P, Santella RM, Gamble MV, Susser E. Genomic DNA methylation among women in a multiethnic New York City birth cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(9): 2306-10.
- [21] Park EY, Hong YC, Lee KH, Im MW, Ha E, Kim YJ, Ha M. Maternal exposure to environmental tobacco smoke, GSTM1/T1 polymorphisms and oxidative stress. *Reprod Toxicol* 2008; 26(3-4): 197-202.
- [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(1): 108-15.
- [23] Dhillon VS, Shahid M, Husain SA. Associations of MTHFR DNMT3b 4977 bp deletion in mtDNA and GSTM1 deletion, and aberrant CpG island hypermethylation of GSTM1 in non-obstructive infertility in Indian men. *Mol Hum Reprod* 2007; 13(4): p. 213-22.
- [24] Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, Diebold J, Hermeking H. Functional epigenomics identifies genes frequently silenced in prostate cancer. *Cancer Res* 2005; 65(10): 4218-27.