

## ارتباط پلی مورفیسم‌های آنزیم گلوکوتایون S- ترانسفراز با خطر مرحله نهایی بیماری کلیه

حمید نعمانی<sup>۱</sup>؛ علی ایدی<sup>۱\*</sup>؛ اسد ویسی رایگانی<sup>۱</sup>؛ لیدا حق نظری<sup>۱</sup>؛ داریوش رئیسی<sup>۲</sup>؛ هادی مظفری<sup>۱</sup>

### چکیده

زمینه: مرحله نهایی بیماری کلیه (ESRD)، از بین رفتن پیش‌رونده و غیرقابل برگشت عملکرد کلیه است که در آن توانایی حفظ تعادل متابولیک، مایعات و الکترولیت‌ها را از دست می‌دهد. گلوکوتایون S- ترانسفرازها اعضای یک خانواده چندزنی هستند که به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت مهم در سلول ایفای نقش می‌کنند. در این مطالعه به بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های GST T1, M1 & P1 در بیماران ESRD و مقایسه آن با گروه کنترل پرداخته شد تا ارتباط احتمالی بین پلی مورفیسم ژن این آنزیم و بروز ESRD را بررسی نماییم.

روش‌ها: تعداد ۱۳۶ بیمار مبتلا به ESRD و ۱۳۷ نفر به‌عنوان گروه کنترل انتخاب و ژنوتیپ‌های گلوکوتایون S- ترانسفراز T1 & M1 با روش multiplex- PCR و پلی مورفیسم گلوکوتایون S- ترانسفراز P1 با روش PCR-RFLP تعیین شد.

یافته‌ها: توزیع ژنوتیپی ژن‌های GSTT1&M1 برای ژنوتیپ‌های (wild), T1<sup>+</sup>-M1<sup>+</sup>, T1<sup>+</sup>-M1<sup>0</sup>, T1<sup>-</sup>-M1<sup>0</sup> و T1<sup>-</sup>-M1<sup>-</sup>(null) در گروه کنترل به ترتیب ۴۵٪ (۳۲/۸)، ۴۰٪ (۲۹/۲)، ۲۸٪ (۲۰/۴) و ۲۴٪ (۱۷/۵) و در بیماران دیابتی ۱۷٪ (۱۲/۸)، ۴۶٪ (۳۴/۶)، ۲۱٪ (۱۵/۸) و ۴۹٪ (۳۶/۸) بود (P<۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: با توجه به کاهش فراوانی ژنوتیپ GST T1<sup>0</sup> & M1<sup>0</sup> در بیماران ESRD نسبت به گروه کنترل (۱۲/۸٪) در مقابل (۳۲/۸٪)، این ژنوتیپ می‌تواند با خطر ESRD مرتبط باشد.

کلیدواژه‌ها: گلوکوتایون S- ترانسفراز، مرحله نهایی بیماری کلیه، PCR-RFLP

«دریافت: ۱۳۹۲/۱/۲۴ پذیرش: ۱۳۹۲/۶/۱۹»

۱. گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

۲. دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

۳. مرکز پیوند کلیه، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

\* عهده‌دار مکاتبات: ایلام، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دانشکده پیراپزشکی، تلفن: ۰۹۱۸۷۶۹۷۹۰۶

Email: Aliaidi11@yahoo.com

### مقدمه

$\alpha$  یا A،  $\mu$  یا M،  $\theta$  یا T و  $\pi$  یا P نام‌گذاری می‌شوند (۳). ژن GST  $\pi$  در انسان به‌عنوان یک ژن عملکردی منفرد وجود دارد درحالی‌که خانواده‌های  $\alpha$ ،  $\mu$  و  $\theta$  چندین ناحیه ژنی مشخص دارند که به ترتیب تقریباً ۵۵، ۶۵ و ۵۰ درصد همسانی دارند (۴). در GST M1 و GST T1 آلل واریانت یک حذف ژنی دارد و افرادی که حایز آلل حذف‌شده هوموزیگوت هستند، گفته می‌شود که واجد ژنوتیپ "null" هستند و آنزیم در بدن آن‌ها بیان نمی‌شود (۵). ژن GST P1 در ناحیه کدکننده آن واجد

گلوکوتایون s- ترانسفرازها (GST= Glutathione s-transferase) یک سوپر خانواده از آنزیم‌های القاپذیر هستند که در ۷ گروه پروتئین‌های سیتوپلاسمی طبقه‌بندی می‌شوند ( $\alpha$ ،  $\mu$ ،  $\pi$ ،  $\sigma$ ،  $\theta$ ،  $\kappa$ ،  $\xi$ ) (۱). GST ها جزء آنزیم‌های متابولیک فاز ۲ سم‌زدایی هستند که واکنش گوئزوغاسیون گلوکوتایون احیاشده را با ترکیبات الکترون‌دوست مختلف کاتالیز می‌کنند (۲). ژن‌های GST انسان به ۴ زیرخانواده اصلی تقسیم می‌شوند که به‌عنوان

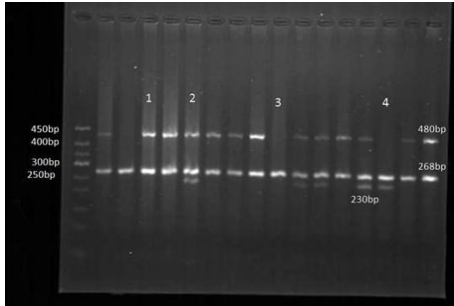
چند پلی مورفیسم است. یکی از این پلی مورفیسم‌ها تبدیل A به G در موقعیت ۱۵۷۸ است، که باعث قرار گرفتن والین به جای ایزولوسین در کدون ۱۰۵ در اگزون ۵ می‌شود. جهش دیگر تغییر باز C به T در موقعیت ۲۲۹۳ که سبب قرار گرفتن آلانین به جای والین در موقعیت ۱۱۴ آمینواسیدی در اگزون ۶ می‌شود (۸-۶). در نتیجه این پلی مورفیسم‌ها، فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد (۶). آنزیم‌های متابولیزه‌کننده فاز ۲ سم‌زدایی از جمله GST در غیرفعال کردن ترکیبات شیمیایی نقش دارند (۹). GSTها عموماً در سمیت‌زدایی ترکیبات مضر نقش دارند اما آن‌ها همچنین در فعال‌سازی و غیرفعال کردن متابولیت‌های اکسیداتیو ترکیبات سرطان‌زا که با سرطان‌ها همراه هستند، نقش ایفا می‌کنند (۱۰). عملکردهای دیگر GST شامل محافظت در برابر آسیب اکسیداتیو به لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک و مشارکت در متابولیسم برخی از استروئیدها و لکوترین‌ها می‌باشد (۱۱). GST به مقدار زیادی در اریتروسیت‌های انسان وجود دارد (۱۲) و به دو شکل می‌باشد: یک آنزیم کاملاً کاتیونی که مسئول ۵ درصد فعالیت کل GST می‌باشد و آنزیم آنیونی اصلی که به نوع P نسبت داده می‌شود (۱۳). به دلیل فراوانی نوع P، دایمر GST P1 اغلب به عنوان آنزیم GST در اریتروسیت‌ها در نظر گرفته می‌شود (۱۴-۱۱). مرحله نهایی بیماری کلیه (ESRD= End stage renal disease) یک بیماری مزمن و پیش‌رونده و غیرقابل برگشت است که در آن عملکرد کلیه‌ها مختل می‌شود به طوری که بدن دیگر قادر به برقراری اعمال متابولیکی و حفظ تعادل مایعات و الکترولیت‌ها نیست. بروز کلی ESRD، ۲۴۲ مورد در هر یک میلیون نفر جمعیت در سال است. جمعیت بیماران مبتلا به مرحله نهایی کلیوی تقریباً ۸ درصد در سال افزایش می‌یابد (۱۵). پراکسیداسیون کنترل‌نشده لیپیدها می‌تواند باعث اختلال عملکرد و آسیب آندوتلیوم عروق شود. با توجه به این که اختلال عملکرد آندوتلیوم یکی از محورهای اصلی پاتوژنز (ESRD) می‌باشد، امروزه پراکسیداسیون لیپیدها در ایجاد مرحله نهایی بیماری

کلیوی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. در برخی تحقیقات، سطوح بالای پلاسمایی محصولات پراکسیداسیون لیپیدی در بیماران ESRD در مقایسه با گروه کنترل گزارش شده است (۱۶). در بیماران با نارسایی مزمن کلیه (CRD)، تعادل بین ظرفیت پرو- و آنتی‌اکسیدانی به سمت افزایش استرس اکسیداتیو تغییر می‌کند. چندین نقص در اجزاء مختلف مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی شرح داده شده‌اند که شامل کاهش میزان ویتامین C، کاهش غلظت داخل سلولی ویتامین E، کاهش میزان سلنیوم و نقص در سیستم زباله روب گلوکوتاتیون (GSH) می‌باشند (۱۷ و ۱۸). کاهش میزان ویتامین C عمدتاً به دلیل محدودیت در مصرف میوه و سبزیجات تازه برای جلوگیری از هیپرکالمیا (افزایش پتاسیم خون) و از دست دادن ویتامین‌ها حین دیالیز اتفاق می‌افتد. در این میان آنزیم‌های گلوکوتاتیون s-ترانسفراز در شکل‌گیری و عملکرد سیستم دفاعی بدن در برابر مواد مضر و اکسیدان نقش عمده دارند. فاکتورهای ژنتیکی مشابه فاکتورهای خارجی موجب تغییر در سطح یا فعالیت ایزوآنزیم‌های GST می‌شوند که این تغییرات با تغییر توانایی فرد در پاسخ به ترکیبات الکترون‌دوست و اکسیدان در ارتباط است (۱۹). در این مطالعه فراوانی ژنوتیپی GST M1 null، GST T1 null و پلی مورفیسم GST P1 A/G برای بررسی ارتباط آن‌ها با ESRD مورد مطالعه قرار گرفت. هدف از این مطالعه، فراهم‌سازی یک پایگاه داده اولیه برای مطالعات ژنتیکی و کلینیکی بعدی در کرمانشاه می‌باشد.

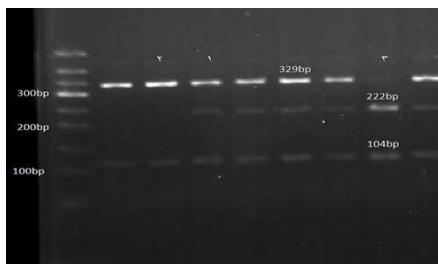
### مواد و روش‌ها

این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه تأیید شد و از تمام افراد شرکت‌کننده فرم رضایت‌نامه اخذ گردید. جمعیت بیمار مورد مطالعه ۱۳۶ بیمار دیالیزی (با میانگین سنی  $58/1 \pm 13/3$  سال) مراجعه‌کننده به بخش دیالیز بیمارستان امام رضا دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه بودند که حداقل ۳ بار در هفته

روی آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند. بر حسب ژنوتیپ شخص طبیعی (AA)، هتروزیگوت (AG) و هموزیگوت (GG) به ترتیب دو قطعه ۳۲۹ و ۱۰۴ جفت بازی، سه قطعه ۳۲۹، ۲۲۲ و ۱۰۴ جفت بازی و یا دو قطعه ۲۲۲ و ۱۰۴ جفت بازی ایجاد می‌شود (تصویر ۲).



**تصویر ۱-** تصویر مربوط به تکثیر ژنوتیپ‌های GST M1 & T1 در تعدادی از افراد مورد مطالعه است. در سمت چپ DNA marker (50bp) قرار دارد. ستون شماره ۲ واجد هر دو ژنوتیپ GST T1 و GST M1 است، زیرا قطعات 480 bp مربوط به GST T1 و 230 bp مربوط به GST M1 در آن تکثیر شده‌اند. قطعه میانی 268 bp مربوط به بتاگلوبین است. ستون شماره ۱ فقط GST T1 را دارد و واجد ژنوتیپ GST M1-null می‌باشد، زیرا قطعه مربوط به ژن GST M1 آن‌ها تکثیر نشده است. ستون شماره ۴ واجد ژنوتیپ‌های GST M1 و GST T1-null است. ستون شماره ۳ واجد ژنوتیپ‌های GST T1-null و GST M1-null است.



**تصویر ۲-** تصویر مربوط به تکثیر GST P1 در تعدادی از افراد مورد مطالعه است. در سمت چپ DNA marker (50 bp) قرار دارد. ستون شماره ۲ واجد قطعات 329 bp و 104 bp است و ژنوتیپ Wild (AA) یا طبیعی را دارد. ستون شماره ۳ واجد قطعات 222 bp و 104 bp بوده و واجد ژنوتیپ هموزیگوت یا GG است. ستون شماره ۱ واجد قطعات 329 bp، 222 bp و 104 bp بوده که واجد ژنوتیپ هتروزیگوت یا AG می‌باشد.

دیالیز می‌شدند. انتخاب بیماران توسط متخصص نفرولوژی صورت گرفت. تعداد ۱۳۷ نفر نیز با میانگین سنی  $55/7 \pm 7/3$  سال به‌عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. افراد گروه کنترل بر اساس تست‌های عملکردی کلیه از لحاظ بیماری کلیوی، سالم و از نظر سن و جنس با گروه بیماران همتا بودند.

#### خون‌گیری

در این تحقیق که از نوع مورد-شاهد بود، از افراد گروه بیمار (قبل از انجام دیالیز) و گروه کنترل، 5ml خون اخذ شد. از خون گرفته‌شده 2ml در لوله بدون ضد انعقاد برای گرفتن سرم و 3ml در لوله حاوی EDTA جهت استخراج DNA استفاده شد.

#### استخراج DNA

استخراج DNA در تمام نمونه‌ها به روش فنل-کلروفرم و پروتیناز k صورت گرفت (۲۰). خلوص و غلظت DNAهای استخراج‌شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر Nanodrop مدل Thermo 2000C محاسبه گردید. سپس با روش multiplex-PCR و PCR-RFLP، ژنوتیپ‌های مختلف GST M1&T1 و P1 تعیین گردید. پرایمرهای رفت و برگشت مورد استفاده در مطالعه و شرایط دستگاه ترموسایکلر در جدول ۱ معرفی گردیده است. در روش multiplex-PCR ژن بتا-گلوبین ( $\beta$ -globin) به‌عنوان کنترل داخلی عملکرد PCR استفاده گردید. تمام محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد که از اتیدیوم برمایید برای رنگ کردن باندها استفاده شده بود، الکتروفورز شدند (تصویر ۱). در این تحقیق، محصول حاصل از PCR ژن GSTT1 یک قطعه 480bp بود. در حالی که انجام PCR برای ژن GSTM1 منجر به تکثیر قطعه 230bp شد. تکثیر بتا-گلوبین در تمام نمونه‌های PCR شده، بانندی در ناحیه 268bp ایجاد می‌نماید. محصول PCR برای GSTP1 قطعه‌ای به طول ۴۳۳bp می‌باشد. سپس بر روی محصول اولیه PCR آنزیم ALW26I اثر داده شد و قطعات حاصل از برش آنزیم بر

آنالیز آماری

برای مقایسه ژنوتیپ‌ها و واریانت‌های آن‌ها در دو گروه از آزمون  $\chi^2$  و برای همسان‌سازی متغیرهای زمینه‌ای در دو گروه از آزمون‌های  $\chi^2$  و independent t-test استفاده شد. ابتدا آزمون Kolmogorov-Smirnov را برای بررسی توزیع نرمال در داده‌ها انجام دادیم. برای تعیین خطر نسبی بروز عوارض کلیوی در گروه‌ها از محاسبه نسبت برتری (Odds Ratio) به‌وسیله روش رگرسیون لجستیک استفاده شد. نرم‌افزار مورد استفاده SPSS 16 بود.

یافته‌ها

افراد مورد مطالعه شامل گروه بیماران دیالیزی (ESRD) ۱۳۶ نفر (با میانگین سنی  $58/1 \pm 13/3$  سال) (۸۹ مرد و ۴۴ زن) و گروه کنترل ۱۳۷ نفر (با میانگین سنی  $55/7 \pm 7/3$  سال) (۸۵ مرد و ۵۲ زن) بودند. میانگین سن و جنس در افراد دو گروه مشابه بود.

ژنوتیپ‌های GST M1&T1 در بیماران ESRD

توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های GST M1&T1 در بیماران ESRD و گروه کنترل بررسی شد. درصد فراوانی ژنوتیپ‌های  $T1^+-M1^+$ (wild) و  $T1^--M1^+$  در گروه کنترل

نسبت به گروه بیمار بیشتر بود درحالی‌که درصد فراوانی ژنوتیپ‌های  $T1^+-M1^-$  و  $T1^--M1^-(null)$  در گروه بیماران ESRD بیشتر و به‌طور کلی این اختلاف در توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها بین گروه بیمار و گروه کنترل از لحاظ آماری معنادار بود ( $P < 0/001$  و  $df=3$  و  $\chi^2=22/6$ ). در مقایسه بین افراد با ژنوتیپ  $T1^+-M1^+$ (wild) با افرادی که یکی از ژنوتیپ‌های  $T1$ ،  $M1$  و یا  $null$  را داشتند، فراوانی ژنوتیپ‌ها در گروه بیماران به‌صورت معناداری بیشتر بود ( $P < 0/001$  و  $df=1$  و  $\chi^2=15/4$ ). همچنین در مقایسه بین افراد با ژنوتیپ  $T1^+-M1^+$ (wild) با افرادی که ژنوتیپ  $T1^+-M1^-$  را داشتند، فراوانی ژنوتیپ‌ها در گروه بیماران بالاتر بود و اختلاف معنادار بود ( $P = 0/002$  و  $df=1$  و  $\chi^2=10/0$ ). در مقایسه بین افراد با ژنوتیپ  $T1^+-M1^+$ (wild) با افرادی که یکی از ژنوتیپ‌های  $T1^+-M1^+$  یا  $T1^+-M1^-$  را داشتند، فراوانی ژنوتیپ‌ها در گروه بیماران به‌صورت معناداری بیشتر بود ( $P = 0/003$  و  $df=1$  و  $\chi^2=8/57$ ) (جدول ۲).

میزان خطر نسبی ژنوتیپ‌های  $T1$  &  $M1$  در افرادی که دارای یکی از ژنوتیپ‌های  $T1^+$  یا  $M1^+$  بودند، سبب ۲/۶۱ برابر شدن و در افرادی که واجد یکی از

جدول ۱- لیست پرایمرها و شرایط PCR

مارکر	پرایمر	شرایط PCR	رفرنس
	$M1: 5'- TTC TGG ATT GTA GCA GAT CA- 3'$	دنا تورا سیون ابتدایی در $94^\circ C$ به مدت ۵min و سپس ۳۵ سیکل در $94^\circ C$ به مدت ۱min، Annealing در $60^\circ C$ به مدت ۱min، طولیل سازی در $72^\circ C$ به مدت ۱min	(۲۴)
GST	$M2: 5'- CGC CAT CTT GTG CTA CAT TGC CCG- 3'$		
T1&M1&Glob in	$T1: 5'- TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC- 3'$		
	$T2: 5'- TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA- 3'$		
multiplex PCR	$B1(\beta\text{-Globin}): 5'- CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC- 3'$	۱min و طولیل سازی نهایی در $72^\circ C$ به مدت ۵min	(۲۴)
	$B2(\beta\text{-Globin}): 5'- GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC- 3'$		
GST P1	$P1: 5'- GTA GTT TGC CCA AGG TCA AG- 3'$	دنا تورا سیون ابتدایی در $94^\circ C$ به مدت ۵min و سپس ۳۵ سیکل در $94^\circ C$ به مدت ۱min، Annealing در $61^\circ C$ به مدت ۱min، طولیل سازی در $72^\circ C$ به مدت ۱min و طولیل سازی نهایی در $72^\circ C$ به مدت ۵min	(۲۴)
	$P2: 5'- AGC CAC CTG AGG GGT AAG- 3'$		

ژنوتیپ‌های  $T1^+$ ،  $M1^+$  و یا null بودند، سبب  $3/3$  برابر شدن خطر ابتلا به ESRD می‌شود. میزان خطر نسبی ژنوتیپ‌های  $T1$  &  $M1$  در افرادی که  $T1^+$  ژنوتیپ‌های  $T1$  &  $M1$  در افرادی که واجد ژنوتیپ  $T1^-$   $M1^-$  (null) بودند، سبب  $1/8$  برابر شدن خطر ابتلا به ESRD می‌شود (جدول ۳).

$M1^-$  بودند سبب  $3/04$  برابر شدن خطر ابتلا به ESRD

جدول ۲- مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های GST T1&amp;M1 در بیماران ESRD با گروه کنترل

گروه کنترل n=۱۳۷	بیماران ESRD n=۱۳۳	ژنوتیپ GST M1&T1
۴۵ (/۳۲/۸)	۱۷ (/۱۲/۸)	$T1^+-M1^+$ (wild)
۴۰ (/۲۹/۲)	۴۶ (/۳۴/۶)	$T1^+-M1^-$
۲۸ (/۲۰/۴)	۲۱ (/۱۵/۸)	$T1^-M1^+$
۲۴ (/۱۷/۵)	۴۹ (/۳۶/۸)	$T1^-M1^-$ (null)
$\chi^2=22/6$ و $df=3$ و $P<0/001$		
۴۵ (/۳۹/۸)	۱۷ (/۲۰/۲)	$M1^+ + T1^+$
۶۸ (/۶۰/۲)	۶۷ (/۷۹/۸)	$M1^+ \text{ or } T1^+$
$\chi^2=8/57$ و $df=1$ و $P=0/003$		
۴۵ (/۳۲/۸)	۱۷ (/۱۲/۸)	$T1^+-M1^+$
۹۲ (/۶۷/۲)	۱۱۶ (/۸۷/۲)	$M1^+ \& T1^+ \& \text{null}$
$\chi^2=15/4$ و $df=1$ و $P=<0/001$		
۴۵ (/۵۲/۹)	۱۷ (/۲۷/۰)	$T1^+-M1^+$ (wild)
۴۰ (/۴۷/۱)	۴۶ (۷۳/۰)	$T1^+-M1^-$
$\chi^2=10/0$ و $df=1$ و $P=0/002$		

جدول ۳- خطر نسبی ژنوتیپ‌های GST T1&amp;M1 به‌عنوان ریسک‌فاکتور بیماری ESRD

گروه کنترل n=۱۳۷	بیماران ESRD n=۱۳۳	ژنوتیپ GST T1&M1
گروه مرجع (n=۴۵)	گروه مرجع (n=۱۷)	$M1^+ + T1^+$ (wild)
n=۱۱۳	(n=۸۴ و $P=0/004$ و $1/4-5/0$ )	$M1^+ \text{ or } T1^+$
گروه مرجع (n=۴۵)	گروه مرجع (n=۱۷)	$T1^+-M1^+$ (wild)
n=۹۲	(n=۱۱۶ و $P=<0/001$ و $1/8-6/2$ )	$T1^+ \text{ and } M1^+ \text{ and null}$
گروه مرجع (n=۴۵)	گروه مرجع (n=۱۷)	$T1^+-M1^+$ (wild)
n=۲۴	(n=۴۹ و $P=<0/001$ و $1/8-2/3$ )	$T1^-M1^-$ (null)
گروه مرجع (n=۴۵)	گروه مرجع (n=۱۷)	$T1^+-M1^+$ (wild)
n=۴۰	(n=۴۶ و $P=0/002$ و $1/5-6/1$ )	$T1^+-M1^-$
گروه مرجع (n=۴۵)	گروه مرجع (n=۱۷)	$T1^+-M1^+$ (wild)
n=28	(n=۲۱ و $P=0/091$ و $0/95-2/1$ )	$T1^-M1^+$

خطر نسبی (OR= Odds Ratio) ژنوتیپ‌های GST T1&M1 در ابتلا به ESRD توسط آنالیز رگرسیون لجستیک

CI(Confidence Interval)=%95 (فاصله اطمینان) محاسبه شده است.

بیماران ESRD بیشتر از گروه کنترل بود و فراوانی آلل‌های موتانت در گروه کنترل بالاتر بود و این اختلاف‌ها از نظر آماری معنادار نبود ( $P=0/506$  و  $df=1$  و  $\chi^2=0/443$ ) (جدول ۴). هیچ‌کدام از ژنوتایپ‌ها و آلل‌ها اثر معنادار آماری بر روی بروز بیماری ESRD نداشتند (جدول ۵).

ژنوتیپ‌ها و آلل‌های GSTP1 در بیماران ESRD فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های GSTP1 استخراج شد (جدول ۴). درصد فراوانی ژنوتیپ‌های GSTP1 در گروه کنترل بیشتر از گروه بیماران ESRD بود و این اختلاف از لحاظ آماری معنادار نبود ( $P=0/744$  و  $df=2$  و  $\chi^2=0/592$ ). درصد فراوانی آلل‌های طبیعی در گروه

جدول ۴- مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های GST P1 و آلل‌های مرتبط با آن در بیماران ESRD با گروه کنترل

ژنوتیپ	بیماران ESRD n = 133	گروه کنترل n = 137
Wild	74 (55/6%)	70 (51/1%)
Heterozygous	50 (37/6%)	56 (40/9%)
Homozygous	9 (6/8%)	11 (8/0%)
$\chi^2=0/592$ و $df=2$ و $P=0/744$		
آلل‌های	198 (74/4%)	197 (71/9%)
Wild allele	68 (25/6%)	71 (28/1%)
Mutant allele	$\chi^2=0/443$ و $df=1$ و $P=0/506$	

جدول ۵- خطر نسبی ژنوتیپ‌های GST P1 و آلل‌های (طبیعی نسبت به جهش یافته) آن به‌عنوان ریسک‌فاکتور بیماری ESRD

ژنوتیپ GST P1	بیماران ESRD n = 133	گروه کنترل n = 137
Wild	گروه مرجع (n=74)	گروه مرجع (n=70)
Heterozygous	(n=50 و $P=0/510$ و $0/84$ (0/51-1/40))	n=56
Wild	گروه مرجع (n=74)	گروه مرجع (n=70)
Homozygous	(n=9 و $P=0/593$ و $0/88$ (0/55-1/4))	n=11
Wild	گروه مرجع (n=74)	گروه مرجع (n=70)
Heterozygous + Homozygous	(n=59 و $P=0/45$ و $0/833$ (0/52-1/34))	n=67
آلل‌های GST P1		
Wild allele	گروه مرجع (n=198)	گروه مرجع (n=197)
Mutant allele	(n=68 و $P=0/506$ و $0/879$ (0/60-1/3))	n=71

خطر نسبی (OR) ژنوتیپ‌های GST P1 در ابتلا به ESRD توسط آنالیز رگرسیون لجستیک CI (فاصله اطمینان) محاسبه شده است.

## بحث

مطالعه حاضر اولین گزارش در غرب ایران است که نقش واریانت‌های مختلف ژنتیکی ژن‌های GSTT1، GSTM1 و GSTP1 را در احتمال خطر ابتلاء به ESRD مورد مطالعه قرار می‌دهد. مطالعاتی در مورد ارتباط GST با سایر بیماری‌ها در جمعیت ایران وجود دارد، ولی تاکنون هیچ مطالعه‌ای به بررسی نقش پلی مورفیسم آنزیم GST در ایجاد بیماری مزمن کلیوی (CKD) در جمعیت ایران نپرداخته است.

میزان فراوانی ژنوتیپ‌های  $T1^+-M1^+(wild)$  و  $T1^-M1^+$  در گروه کنترل بالاتر بود درحالی‌که میزان فراوانی ژنوتیپ‌های  $T1^+-M1^-$  و  $T1^-M1^-(null)$  در گروه بیماران ESRD به‌طور معناداری بیشتر بود ( $P < 0.001$ ). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژنوتیپ null در GST T1 و GST M1 با افزایش خطر ابتلاء به ESRD همراه است. ژنوتیپ  $T1^+-M1^-$  GST خطر ابتلاء به ESRD را  $3/04$  برابر و ژنوتیپ  $T1^-M1^+$  GST  $1/41$  برابر و ژنوتیپ  $T1^-M1^-$  GST  $1/8$  برابر خطر ابتلاء به ESRD را افزایش می‌دهند. خطر نسبی ژنوتیپ‌های  $T1$  &  $M1$  در افرادی که دارای یکی از ژنوتیپ‌های  $T1^+$ ،  $M1^+$  و یا null بودند، سبب  $3/3$  برابر شدن خطر ابتلاء به ESRD می‌شود و تمام این اختلاف‌ها از نظر آماری معنادار بود.

درصد فراوانی آلل‌های طبیعی GSTP1 در گروه بیماران ESRD بیشتر از گروه کنترل بود و فراوانی آلل‌های جهش‌یافته در گروه کنترل بالاتر بود اما این اختلاف‌ها از نظر آماری معنادار نبود. Agrawal و همکارانش نشان دادند که پلی مورفیسم null در آنزیم‌های GSTT1، GSTM1 و GSTP1 با افزایش خطر گسترش ESRD در جمعیت شمال هند همراه است (۲۱). به علاوه Datta و همکارانش نشان دادند که حذف در GSTT1 و GSTM1 به‌تنهایی یا با هم با کاهش سطح GST و افزایش استرس اکسیداتیو در بیماران CKD با دیابت و بدون دیابت همراه می‌باشد (۲۲). Fujita و همکارانش نشان دادند که ارتباطی بین ژنوتیپ null در GSTM1 و

بروز نفروپاتی وجود ندارد (۲۳). از سوی دیگر Nomani و همکارانش نشان دادند که کاهش فراوانی ژنوتیپ‌های GST T1-null و GST M1-null می‌تواند در بیماری‌زایی عروق کرونر در این جمعیت نقش داشته باشد (۲۴).

GSTs سیتوزولی انسان به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته و به‌عنوان آنزیم‌های پلی مورفیک شناخته شده‌اند، که فراوانی متغیری در نژادهای مختلف دارند (۲۵). درصد افرادی که آنزیم‌های GST M1&T1 را به‌دلیل حذف ژنی هوموزیگوس بیان نمی‌کنند در نژادهای قفقازی و آسیایی بیشتر از نژاد آفریقایی است (۲۶). در حدود ۶۰ درصد از آسیایی‌ها، ۴۰ درصد از آفریقایی‌ها و ۲۰ درصد از قفقازی‌ها آنزیم‌های GST M1&T1 را بیان نمی‌کنند. پلی مورفیسم در ژن‌های GSTM1، GSTT1 و GSTP1 نشان داده شده که با افزایش خطر ابتلاء به اشکال مختلف سرطان همراه است (۲۷). همچنین افزایش بیان GST در اریتروسیت‌های بیماران مبتلا به نارسایی مزمن کلیه نشان داده شده است (۲۸). گلوکوتایون S- ترانسفراز، لپیدها و اسیدهای نوکلئیک را از آسیب اکسیداتیو محافظت کرده و در متابولیسم برخی از استروئیدها و لکوترین‌ها شرکت دارد (۲۹). بنابراین در حضور اشکال غیرفعال آنزیم (ژنوتیپ null، GSTM1 و GSTT1) میزان محافظت در برابر آسیب اکسیداتیو کاهش پیدا می‌کند که احتمالاً می‌تواند به بروز ESRD ختم شود.

## نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به‌دست آمده و تجزیه و تحلیل آماری و با توجه به کاهش فراوانی  $T1^+-M1^+(wild)$  GST  $12/8\%$  در گروه کنترل در مقابل  $32/8\%$  در گروه بیماران ESRD، این ژنوتیپ می‌تواند در پیشرفت بیماری ESRD نقش داشته باشد. این نتایج مشابه با مطالعات قبلی بود فقط در بررسی Fujita و همکارانش هیچ ارتباطی بین ایجاد نفروپاتی با GSTM1 مشاهده نگردید. در مورد GSTP1 در بین دو گروه مورد مطالعه و هر کدام از گروه‌ها اختلاف معناداری با بروز ESRD دیده نشد.

## References

- Buzio L, De Palma G, Mazzoni P, Tondel M. Glutathione S-transferase M1-1 and T1-1 as risk modifiers for renal cell cancer associated with occupational exposure to chemicals. *Occup Environ Med.* 2003;60:789-93.
- Mannervick B. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1985; 57: 357-417.
- Mannervick B, Awasthi YC, Board PG, Hayes JD. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem J.* 1995;282:305-6.
- Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX. Molecular cloning, characterization and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase *f* variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem.* 1997;272:10004-11112.
- Board PG. Gene deletion and partial deficiency of the glutathione S-transferase (ligandin) system in man. *FEBS Lett.* 1981;135:14-16.
- 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;30:445-600.
- Pemble S, Schroeder KR, Spencer SS, Meyer DJ. Human glutathione S-transferase  $\epsilon$  (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J.* 1994;300:271-6.
- Peter H, Deutschmann S, Reichel C, Hallier E. Metabolism of methyl chloride by human erythrocytes. *Arch Toxicol.* 1989;63:351-5.
- Weber WW. Human drug metabolizing enzymes variants. London: Oxford University Press; 1997;204-10.
- Gibbs GW, Amsel J, Soden K. A cohort mortality study of cellulose triacetate-fiber workers exposed to methylene chloride. *J Occup Environ Med.* 1996;38:693-7.
- Becktt J, Hayes JD. Glutathione S-transferases: Biochemical application. *Adv Clin Chem.* 1993;230:281-380.
- Marcus JC, Habig HW, Jakoby WB. Glutathione transferase from human erythrocytes. Non-identity with the enzyme from liver. *Arch Biochem Biophys.* 1978;188:287-93.
- Awasthi YC, Singh SV. Purification and characterization of a new form of glutathione S-transferases from human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;125:1053-60.
- Fazi A, Accoris A, Piatti E, Magnani M. Cell age dependent decay of human erythrocytes glutathione S-transferases. *Mech Ageing Dev.* 1991;58:255-66.
- Longo DL, Fauci AS, Kasper DL. *Harrison's Principles of Internal Medicine.* 18<sup>th</sup> ed. New York: Mc Graw Hill Co; 2011; 1010-1016.
- De Vecchi AF, Bamonti F, Novembrino C, Ippolito S, Guerra L, Lonati S, et al. Free and total plasma malondialdehyde in chronic renal insufficiency and in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(8):2524-9.
- Canaud B, Cristol JP, Morena M, Leray-Moragues H, Bosc JY. Imbalance of oxidants and antioxidants in haemodialysis patients. *Blood Purif.* 1999;17:99-106.
- Descamps-Latscha B, Druke T, Witko-Sarsat V. Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. *Semin Dial.* 2001;14:193-9.
- Vos RM, Van Bladeren PJ. Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem Biol Interact.* 1990;75(3):241-65.
- Old JM, Purvis-Smith S. Prenatal exclusion of ornithine transcarbamylase deficiency by direct gene analysis. *The Lancet.* 1985;325:73-5.
- Agrawal S, Tripathi G, Khan F, Sharma R, Baburaj VP. Relationship between GSTs gene polymorphism and susceptibility to end stage renal disease among North Indians. *Ren Fail.* 2007;29(8):947-53.
- Datta SK, Kumar V, Pathak R, Tripathi AK, Ahmed RS, Kalra OP, et al. Association of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphism with oxidative stress in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease. *Ren Fail.* 2010;32(10):1189-95.
- Fujita H, Narita T, Meguro H, Shimotomai T. No association of glutathione S-transferase M1 gene polymorphism with diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. *Ren Fail.* 2000;22(4):479-86.
- Nomani H, Mozafari H, Ghobadloo SM, Rahimi Z, Raygani AV, Rahimi MA. The association between GSTT1, M1, and P1 polymorphisms with coronary artery disease in Western Iran. *Mol Cell Biochem.* 2011;354(1-2):181-7.
- Bailey LR, Roodi N, Verrier CS, Yee CJ, Dupont WB, Parl FF. Breast cancer CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism: Evidence of a lack of association in Caucasians and African-Americans. *Cancer Res.* 1998;58:65-70.
- Roth MJ, Dawsey SM, Wang G, Tangrea JA. Association between GSTM1 and squamous dysplasia of the esophagus in the high risk region of Linxin, China. *Cancer Lett.* 2000;156:73-81.



27. Strange RC, Fryer AA. The glutathione S-transferase: Influence of polymorphism on cancer susceptibility. In: Vineis P. Metabolic polymorphism and susceptibility to cancer. France: IARC Scientific Publication; 1999;231-49.
28. Cannagnol F, Sine PM, Rapin J, Jerome H. GST of human RBC assay, values in normal subjects and in two pathological circumstances: Hyperbilirubinemia and impaired renal fuction. Clin Chim Acta. 1981;117:209-17.
29. Becktt J, Hayes JD. Glutathione S-transferases: Biochemical application. Adv Clin Chem. 1993;230: 281-380.