مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
سال ۱۳۹۸، دوره ۲۱، صفحه ۱۶۵-۱۵۷

# بررسی شیوع پلی مورفیسم ژنی GSTM1,GSTT1 و GSTP1 و ارتباط آن با معیارهای کلینیکی در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس (MS) در شهر تهران

مهدی علی عمرانی (PhD)[۱]، محمد علی صحرائیان (MD)[۲]، محمدرضا خوشایند (PhD)[۳]، طناز دانش ستا (Pharm D)[۱]، محمد شریف زاده (PhD)[۴]، محمد حسین قهرمانی (PhD)[*۳]

۱-گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲-گروه بیماری های مغز و اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳-گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴-دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

دریافت:۹۷/۲/۲۹، اصلاح: ۹۷/۶/۱۴، پذیرش: ۹۷/۷/۲۴

## خلاصه

**سابقه وهدف:** مالتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis)، التهاب مزمن دستگاه اعصاب مرکزی، با ضایعات دمیلینه (Demyelinated) در مغز- نخاع می باشد. پلی‌مورفیسم‌های ژنی مربوط به آنزیم های گلوتاتیون-اس-ترانسفراز دخیل در دفاع آنتی اکسیدانی در بیماران مبتلا در ایران مورد بررسی قرار نگرفته، لذا در این مطالعه از آنجائیکه تاکنون شیوع پلی مورفیسم ژنی Glutathione S-transferase M1, P1 & T1 و ارتباط آن با معیارهای کلینیکی بیماران مبتلا به MS بررسی گردید.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه موردی-شاهدی از ۶۹ نفر بیمار مراجعه کننده به بیمارستان سینا در شهر تهران که در ۳ ماه اخیر حمله عصبی نداشتند و ۷۴ نفر پرسنل سالم مصاحبه صورت گرفت. پس ازمعاینه توسط نورولوژیست و خونگیری، به کمک کیت Roche استخراج DNAانجام گرفت. سپس تغییرات ژنوتیپی نمونه‌ها به روش RFLP-PCR بررسی و شیوع آن با سن بروز، ماه تولد، بدخیمی(EDSS) و جنس به کمک نرم افزارGraphpad Prism تحلیل شد.

**یافته‌ها:** بیشترین بدخیمی در آقایان(۱/۹±۳/۵) و بیشترین میزان بروز بیماری در متولدین خرداد ماه (۳۰٪) مشاهده شد. هر چند نتایج ژنوتایپینگ میان گروه های مورد مطالعه و جنسیت آنها اختلاف معنی داری را نشان نداد(OR:۲-۴، p>۰/۰۵) ولی دیده شد افراد دارای نقص در GSTM1 سن شروع بیماری پائین‌تری(۸/۶±۳۲/۲ سال) در مقایسه با سایر بیماران(۸/۹±۲۹/۵ سال) داشتند(CI-95%:۲۰/۳-۲۶/۴، p=۰/۰۰۹). همچنین افراد دارای آلل نادر GSTM1 که مصرف کننده سیگار بودند EDSS بالاتری را دارا بودند (CI-95%:۲/۱-۳/۷، p=۰/۰۳).

**نتیجه گیری:** براساس نتایج این مطالعه تاثیر GSTM1 در بدخیمی بیانگر نقش آن در سم زدایی محصولات حاصل از سیگار می باشد و می توان از آن به عنوان یک عامل جهت بررسی زودهنگام بروز بیماری در افرادمستعد بهره گرفت.

**واژه‌های کلیدی:مالتیپل اسکلروزیس، چند شکلی، بروز، گلوتاتیون اس ترانسفراز، GSTT1، GSTP1، GSTM1.**

## مقدمه

بیماری مالتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis=MS) یا تصلب متعدد، یک بیماری التهابی مزمن دستگاه اعصاب مرکزی می باشد(۲و۱). این بیماری معمولاً در سنین ۲۰ تا ۴۵ سال تشخیص داده می شود (۴و۳) و تنها ۵٪ افراد که MS در آنها تشخیص داده می‌شود سن زیر ۱۰ و یا بالای ۵۰ سال دارند(۵). بروز این بیماری در خانم ها شایعتر می باشد بطوریکه نسبت خانم ها به آقایان به طور متوسط ۲ به ۱ گزارش شده است(۶). علت دقیق ابتلا به MS تاکنون مشخص نشده است. به احتمال زیاد وقوع این بیماری نتیجه ترکیبی ازفاکتورهای ژنتیکی، محیطی و عفونی می‌باشد(۷). آنچه مسلم است بیماری زایی به دنبال واکنش های التهابی و تخریب میلین با واسطه سیستم ایمنی صورت می گیرد(۹و۸). همچنین ثابت شد که تغییرات در سیستم ژنی HLA-DRB1 واقع بر روی کروموزوم ۶ انسانی موجب افزایش بروز MS می گردد(۱۰). متخصصین معتقدند که افراد مبتلا به MS احتمالاً استعداد مبتلا شدن به بیماری را از بدو تولد از نظر ژنتیکی به ارث برده اند (۱۱). به نظر می‌رسد، افرادی که مستعد ابتلا به MS هستند فقط وقتی به این بیماری دچار خواهند شد که عوامل محیطی باعث روشن شدن و شروع این بیماری در آنها گردد (۱۲و۱۰). اکسیداتیو استرس بیانگر یک عدم تعادل میان تولید رادیکال آزاد و توانایی سیستم بیولوژیک (آبشار آنتی اکسیدانی)

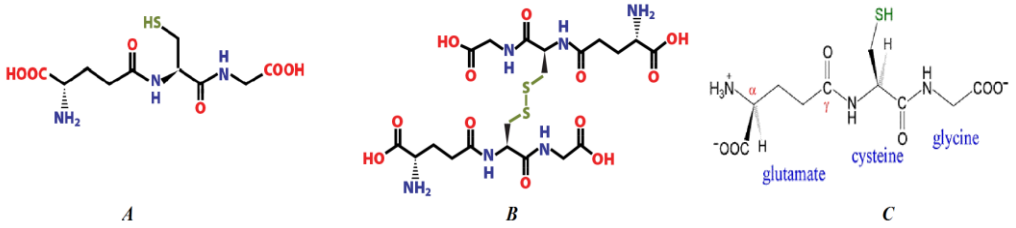
▣ این مقاله حاصل پایان نامه مهدی علی عمرانی دانشجوی رشته دکتری تخصصی سم شناسی و طرح تحقیقاتی به شماره ۹۲۰۱۳۳۲۲۱۰۱ دانشگاه علوم پزشکی تهران می باشد.
*مسئول مقاله: دکتر محمد حسین قهرمانی
آدرس: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، گروه سم شناسی و فارماکولوژی. تلفن: ۸۸۸۹۶۶۹۶-۰۲۱
E-mail: mhghahremani@tums.ac.ir

برای سم زدایی می باشد. رادیکال های آزاد اکسیژن می‌توانند به تمام بیوماکرومولکول‌های سلول (چربی، قند، پروتئین و پلی نوکلئوتید ها) آسیب وارد کرده و در نهایت منجر به ایجاد بیماری گردد(۱۳). سیستم عصبی مرکزی به دلیل سرعت زیاد در مصرف اکسیژن، کم بودن ترکیبات آنتی اکسیدانی وآنزیم های مربوطه و همچنین میزان بالای چربی غیر اشباع در خود نسبت به استرس اکسیداتیو بسیار حساس می‌باشد. در طی چند سال اخیر شواهد حاکی از سهیم بودن گونه های فعال اکسیژن (ROS) با چندین مکانیسم در پاتوژنز بیماری MS و فاگوسیتوز میلین می باشد(۱۴). همچنین اخیرا نشان داده شد که اکسیداتیو استرس نقش اساسی در پاتوژنز بیماری MS بر عهده دارد. افزایش سطح محصولات ثانویه استرس اکسیداتیو و یا کاهش در سطح آنزیم های آنتی اکسیدانی و حضور میزان کم آنتی اکسیدانها در خون و مایع CSF بیماران مبتلا به MS در طول فاز فعال بیماری مشاهده شده است. این آگاهی که مراحل بدتر شدن MS مرتبط با تخریب آکسونی بوده رو به افزایش است و اطلاعات بدست آمده حاکی از نقش بارز استرس اکسیداتیو در پاتوژنز این بیماری می باشد(۱۶و۱۵).

گلوتاتیون در تمامی سلول ها وجود داشته و وقفه طولانی یا فقدان وجود آن منجر به آسیب های جدی به سلول می گردد(۱۷). این در حالی است که آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز (GST) با اتصال ترکیبات الکتروفیل به گروه تیول سیستئین در گلوتاتیون احیا آنها را خنثی کرده و به شکل ترکیب محلول در آب برای دفع بهتر تبدیل می کند(۱۸). گلوتاتیون S–ترانسفراز (GSTs) خانواده بزرگ آنزیمی استکه اولین بار در سال ۱۹۶۱ کشف شد(۲۰و۱۹). این خانواده شامل پروتئین‌های آنزیمی سیتوزولی، میتوکندریائی و میکروزومی (MAPEG) می باشد(۲۱). نقش مهم این آنزیم‌ها در سم زدایی و دفع ترکیبات دارویی، کارسینوژن ها، زنوبیوتیک ها و آلوده کننده‌های محیطی توجه ویژه ای را به آنها معطوف داشته است(۲۲). آنچه مسلم است تفاوت در محل قرارگیری ژنی، تمایل به سوبستراهای متفاوت و داشتن توالی آمینواسیدی متغیر است که موجب شده تا در این خانواده ایزوآنزیم های گوناگونی فعالیت داشته باشند(۲۴و۲۳).

تا به امروز تغییرات آللیک(Allelic) متعددی در زیر خانواده های Alpha, Mu, Pi, Theta و Zeta گزارش شده است (۲۵و۲۴). حذف هموزیگوت یا حذف هر دو آلل در این نواحی منجر می شود تا پروتئینی برای این آنزیم ها بیان نشود که به آن Null هم گفته می شود(۲۳). همچنین در بازوی بلند کروموزوم شماره ۱۱ژن GSTP1 با ۷ اگزون قرار گرفته (۲۶) نشان داده شد که جا به جایی آدنین به گوانین در نوکلئوتید ۳۱۳ (کدون ۱۰۵) موجب تغییر کدون ایزولوسین در اگزون شماره ۵ به والین می گردد. در سال ۲۰۰۷ تحقیق انجام گرفته بر روی ۴۹ بیمار مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس در یونان گزارش کرد که فقدان ژنوتایپ GSTT1 وGSTM1 در گروه بیمار به ترتیب ۵۵/۱ و ۱۸ درصد گزارش شده است. همچنین در مطالعه انجام شده توسط Stavropoulou و همکاران مشاهده شد که اختلاف در ژنوتایپ GSTM1 وابسته به جنس نیز می‌باشد.تا به امروز نقش پلی مورفیسم GST در بیماریهای ریوی مختلف نظیر COPD و کمبود $\alpha$1– آنتی ترپیسین(۲۷)، فیبروزکیستیک (۲۸)، سرطانهای ریه (۲۹)، پروسه های آپوپتوتیک در فیبروبلاستهای ریوی (۳۰)و غیره مشخص شده است.

با توجه به نقش استرس اکسیداتیو در این بیماری، اهمیت مجموعه آنزیم های GST در دفاع آنتی اکسیدانی و اینکه پلی مورفیسم GST در بیماران مبتلا به MS در ایران تا بحال مورد بررسی قرار نگرفته است، در این مطالعه بررسی ارتباط شیوع پلی مورفیسم GSTM1, GSTT1 و GSTP1 با سن بروز بیماری، معیار های کلینیکی و بدخیمی در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس در شهر تهران انجام شد.




**شکل ۱. ساختار فضایی و گروه های عاملی در گلوتاتیون احیا (A)، گلوتاتیون دی سولفید (B) و نحوه قرار گیری اجزا پپتیدی تشکیل دهنده در آن (C)**

## مواد و روش ها

این مطالعه مورد– شاهدی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران با کد اخلاق ۹۲-۰۱-۳۳-۲۲۱۰۱ بر روی ۶۹ نفر از بیماران مبتلا بهRR-MSمراجعه کننده به بخش مربوطه در بیمارستان سینا و ۷۴ نفر کنترل سالم که به صورت تصادفی انتخاب شدند، انجام گردید. پس از مطالعه فرم رضایت نامه و کسب اجازه، مصاحبه از آنهابعمل آمد.قبل از ورود به مطالعه نوع بیماری آنها (RRMS) توسط نورولوژیست تائید شد، همچنیننداشتن حمله عصبی اخیر به مدت ۳ ماه، عدم نقص در فعالیت ارگان‌های اساسی (قلب، کلیه، کبد، ریه)، عدم مصرف مکمل های غذایی و هورمون های تیروئیدی، نداشتن پروتز های فلزی در بدن، عدم پیروی از رژیم های خاص غذایی و گیاه خواری نیز از شرایط ورود افراد به مطالعه بوده است. در گروه کنترل، نداشتن بیماری نورولوژیکی فعال و سلامت فیزیکی از معیارهای انتخاب افراد سالم بود.افرادی که ساکن منطقه مورد مطالعه نبوده یا در ۱۰ سال اخیر مهاجرت کرده بودند، دارابودن رژیم‌های گیاهی یا مصرف غیرعادی محصولاتی همچون غذاهای دریایی یا کنسروها، تماس با مکان های آلوده و کارخانه‌های ذوب فلزات یا مکمل های دارویی مصرف می کردند از مطالعه خارج شدند. در نهایت پس از تکمیل فرم پرسشنامه ازهر یک ۴ میلی لیتر خون با استفاده از لوله‌های EDTA Vacutainer (Becton Dickinson, USA) گرفته و تا زمان انتقال و استخراج در دمای $^{o}$C ۸-۲ نگهداری شد.

**ژنوتایپینگ:** در ابتدا DNA با استفاده از کیت استخراج ژنومی شرکت Roche (11667327001)بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده جداسازی گردید، در مرحله بعد با استفاده از دو نرم افزارDNA star & Oligo7، یک جفت پرایمر مناسب جداگانه برای هر کدام از ژنهای مورد نظر طراحی گردید (جدول ۱). سپس با استفاده از دستگاه PCR (peqSTAR) قطعات مورد نظر با برنامه دمایی

Touch down به صورت Multiplex PCR تکثیر گردید. پس از انجام PCR محصولات بر روی ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز گردید و با استفاده از رنگRed safe بر روی دستگاه Gel doc مشاهده و عکسبرداری شد. برای بررسی موتاسیون در GSTP1 از روشRFLP-PCR استفاده شد. بدین صورت که پرایمر ها به گونه ای طراحی شد که در صورت وجود موتاسیون قطعه تکثیر شده(300bp) توسط آنزیم ALW26I (Bsm A1) برش خورده و به دوقطعه قابل مشاهده(100 & 200bp) شکسته شودبرای انجام این واکنش ۱۰µl از محصول واکنش PCR، ۱۸µl آب فاقد نوکلئاز، ۲µl بافر تانگو و ۱-۲µl از آنزیم ALW26I (Bsm A1, Fermentase) را داخل تیوب ۰/۵ µl ریخته و در دمای ۳۷ $^{o}$C به مدت ۱۶-۱ ساعت انکوبه گردید. پس از انجام PCR محصولات بر روی ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز شد. در نهایت به دلیل وجود رنگ Red safe باند های تکثیر شده بر روی دستگاه Gel doc مشاهده و عکسبرداری شد.

**آنالیز آماری:** پس از جمع‌آوری داده‌ها از جمله؛ ژنوتیپ و سایر متغیرهای کمی وکیفی اعم از ماه تولد، سن، جنس، طول دوره بیماری، میزان بدخیمی یا EDSS با توجه به نحوه توزیع داده‌ها به کمک نرم افزار آماری Graphpad Prismوآزمونهای آماری Chi square، تست نان پارامتریک Mann-Whitneyمورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و p<۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد. نسبت شانس یا Odds ratio برای نمونه ها در هر بخش نیز گزارش شده است.

**جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده و مشخصات ژن‌های مورد بررسی**

| نام ژن ID | Accession number | مکان ژن | Aliases | باز تغییریافته | آمینو اسید تغییریافته | Variant allele frequency | توالی جفت پرایمر ها (F/R) | اندازه (bp) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GSTM1 2944 | NC_000001.11 | 1p13.3 | GST1-1, GSTM1a-1a, GSTM1b-1b, GTH4, GTM1, H-B, MU, MU-1 | Gene deletion | No protein | 0.5749 | 5′-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3′<br>5′-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3′ | 219 |
| GSTT1 2952 | NC_000022.10 | 22q11.23 | | Gene deletion | No protein | 0.4996 | 5′-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3′<br>5′-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3′ | 450 |
| β-globin* 3043 | NC_000011.10 | 11p15.5 | CD113t-C, beta-globin | - | - | - | 5′-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3′<br>5′-CAACTTCATCCACGTTCACC-3′ | 267 |
| GSTP1 2950 | NC_000011.10 | 11q13 | DFN7, FAEES3, GST3, GSTP, HEL-S-22, PI | Exon 5 (A→G) | Ile 105 Val(I 105 V) | 0.2256 | 5′-CTCCCCTCCACCCAACCCCAG-3′<br>5′-GCAGGTTGTGTCTTGTCCCAG-3′ | Ile/Ile 300<br>Ile/Val 100 & 200 & 300<br>Val/Val 100& 200 |

*** بتاگلوبین کنترل مثبت می باشد.**

## یافته‌ها

**اطلاعات دموگرافیک:** با توجه به اطلاعات ثبت شده، که علی رغم تصادفی بودن نمونه ها متولدین خرداد ماه ۳۰ درصد از جمعیت کل بیماران را به خود اختصاص دادند (نمودار ۱). میانگین سنی در گروه بیماران ۱۰/۸±۳۵/۲ سال بود که در مقایسه با گروه کنترل ۱۰/۳±۳۲/۳ سال از نظر آماری معنی دار نبود (جدول ۲).

**مشاهده نتایج PCR:** الکتروفورز محصول نهایی در مدل Multiplex PCR بر روی ژل به ترتیب باند های GSTT1 و GSTM1 در نواحی ۴۵۰ و ۲۱۹ قابل مشاهده بود (شکل ۲). همچنین ژل الکتروفورز نمونه های GSTP1 پس از اتمام PCR و نیز بعد از دایجست آنزیمی در شکل ۳ نشان داده شده است. نمونه‌های لود شده در چاهک های شماره ۹و۶و۵و۱ هموزیگوت wild type بودند. در حالی که نمونه چاهک شماره ۸ هموزیگوت موتانت بود و بقیه نمونه ها به صورت هتروزیگوت برای GSTP1 بودند.

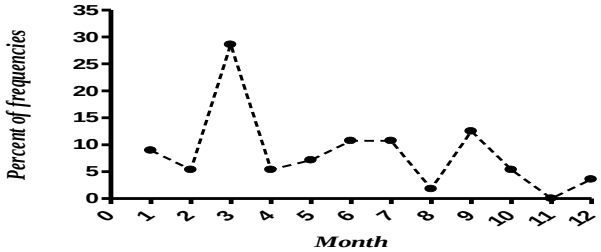
**شیوع پلی مورفیسم:** بررسی های ژنوتایپینگ انجام شده در هر دو گروه حاکی از قرار گیری نتایج پلی مورفیسم در محدوده نرمال برای جمعیت مورد مطالعه بود. علاوه بر بالا بودن میزان ژنوتایپ موتانت در گروه بیمار، تمامی این ایزوفرم آنزیمی ناقص در میان خانم ها یافت شد. این در حالی است که در گروه کنترل این ژنوتایپ بطور مساوی در میان خانم ها و آقایان تقسیم شده بود(۵۰٪)(جدول ۳).

**ارتباط با پارامتر های کلینیکی در بیماران:** میان سن تشخیص بیماری و ژنوتایپ موتانت برای GSTM1 ارتباط معنی‌داری وجود داشت (p=۰/۰۰۹). میان وقوع

پلی مورفیسم در هر یک از ژن‌های مورد نظر و طول دوره ابتلا به بیماری از نظر آماری ارتباط معنی دار نبود(CI-95%:۲۰/۳-۲۶/۴)(جدول۴).

**مقایسه بدخیمی بیماران با ژنوتایپ آنزیمی آنها:** اعداد حقیقی EDSS بدست آمده برای هر ژنوتایپ معنی دار نبود. افرادی که فاقد GSTM1 بودند بدخیمی آنها بیشتر از افراد دارای این ژنوتایپ بود (OR: ۱/۵،۵-۸۴ ،CI-95%:۰/۶۷-۲/۳) (شکل ۴).

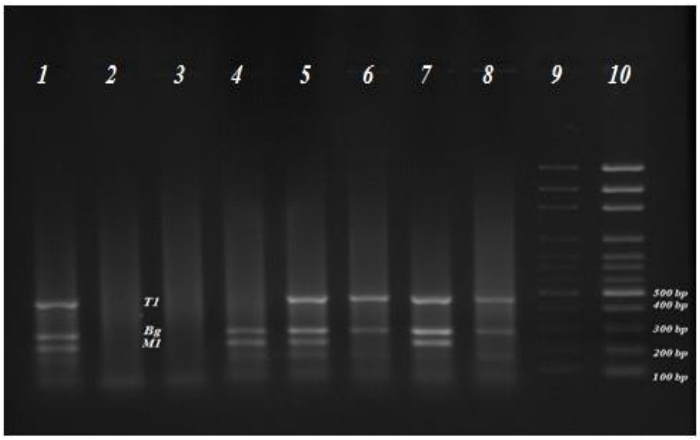
**مقایسه بدخیمی با توجه به جنسیت بیماران:** تقسیم بندی افراد و مقایسه بدخیمی آنها با توجه به جنسیت بیانگر این بود که بدخیمی با اختلاف معنی‌داری در آقایان بیشتر از خانم ها می‌باشد. هر چند دامنه بدخیمی در هر دو گروه تقریبا مشابه بوده و از ۰/۵ تا ۶/۵ در هر دو گروه مشاهده شد ولی مقایسه میانگین‌های بدست آمده (۳/۵ در آقایان و ۱/۹ در خانم ها) بیانگر اختلاف این دو گروه می باشد (p<۰/۰۵).



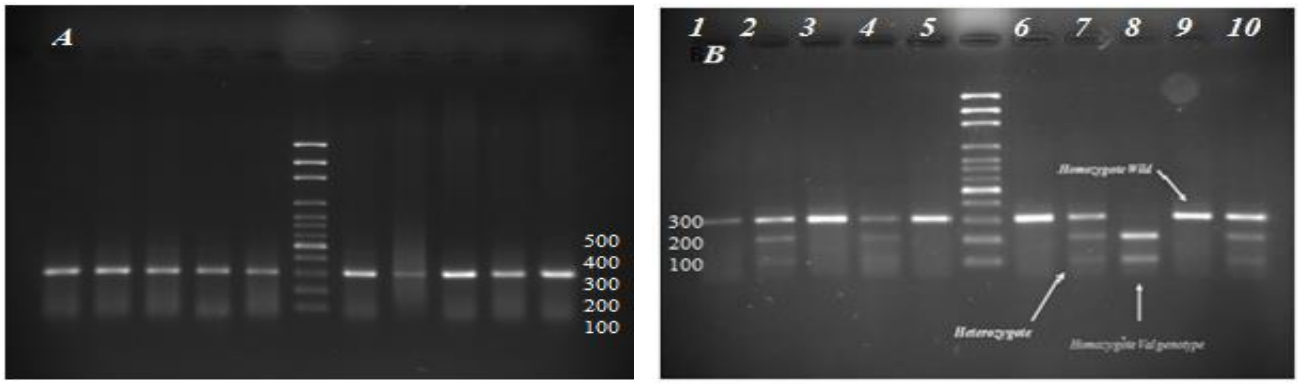

**نمودار ۱. توزیع فراوانی بیماران بر اساس ماه تولد**

**جدول ۲. توزیع فراوانی معیارهای مورد بررسی در هر گروه با توجه به جنس، سن، طول مدت بیماری، شدت بدخیمی و مصرف سیگار**

| گروه ها | متغیر | مرد تعداد(درصد) | زن تعداد(درصد) | کل |
|---|---|---|---|---|
| بیماران مالتیپل اسکلروزیس | تعداد شرکت کنندگان | ۱۱(۱۵/۹) | ۵۸(۸۴/۱) | ۶۹ |
| | سن (سال) Mean±SD | ۳۳/۲±۱۲/۷ | ۵/۳۵±۱۰/۶ | ۳۵/۲±۱۰/۹ |
| | فرد سیگاری | ۸(۳۰/۷) | ۱۸(۶۹/۲) | ۲۶ |
| | فرد غیر سیگاری | ۳(۶/۹) | ۴۰(۹۳) | ۴۳ |
| | طول مدت بیماری (سال) Mean±SD | ۷/۳±۶/۱ (۲۱-۱) | ۷/۴±۴/۸ (۲۳-۱) | ۷/۴±۴/۹ (۱-۲۳) |
| | شدت بیماری (EDSS) | ۳/۵±۱/۹ (۰/۵-۶/۵) | ۱/۹±۱/۲ (۰/۵-۶) | ۲/۲±۱/۴۳ (۰/۵-۶/۵) |
| افراد سالم | تعداد شرکت کنندگان | ۳۸(۵۲) | ۳۶(۴۸) | ۷۴ |
| | سن (سال) Mean±SD | ۲۹/۷±۹/۴ | ۳۳/۸±۱۰/۸ | ۳۱/۸±۱۰/۳ |
| | فرد سیگاری | ۴(۶۶/۶) | ۲(۳۳/۳) | ۶ |
| | فرد غیر سیگاری | ۳۴(۵۰) | ۳۴(۵۰) | ۶۸ |




**شکل ۲. ژل الکتروفورز محصول نهایی Multiplex PCR که در این ژل به ترتیب باند های GSTT1 و GSTM1 در نواحی ۴۵۰ و ۲۱۹ قابل مشاهده بود. نمونه لود شده در چاهک ۹ و ۱۰ حاوی مارکر بود. نمونه چاهک های شماره ۱، ۵ و ۷ هر سه ژن را دارا بودند در حالی که نمونه چاهک ۴تنها حاوی GSTM1 بود.**




**شکل ۳. بخش A. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز نمونه ها پس از انجام PCR و بخش B. باند های حاصل از همان نمونه ها بعد از انجام هضم توسط آنزیم Alw 26I**

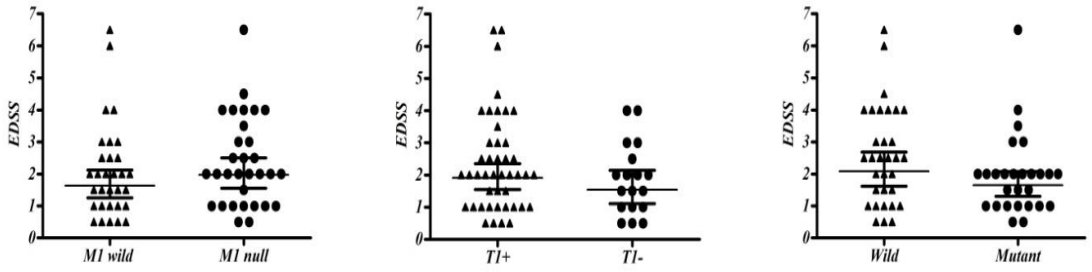
**جدول ۳. بررسی توزیع فراوانی پلی مورفیسم GSTT1و GSTM1 و ارتباط آن با جنسیت افراد در هر دو گروه**

| گروه ها | | GSTM1 Mutant تعداد(درصد) | GSTM1 Wild تعداد(درصد) | GSTM1 OR محاسبه شده درون هر گروه (P-value) | GSTT1 Mutant تعداد(درصد) | GSTT1 Wild تعداد(درصد) | GSTT1 OR محاسبه شده در هر گروه (P-value) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| کنترل | مرد | ۲۲(۵۰) | ۱۴(۴۶/۶) | ۱/۱۴ | ۲۶(۴۸/۶۱) | ۱۰(۵۰) | ۰/۹ |
| | زن | ۲۲(۵۰) | ۱۶(۵۳/۴) | (۰/۰۷۹) | ۲۸(۵۱/۸) | ۱۰(۵۰) | ۰/۸۸۴ |
| بیماران | مرد | ۳۰(۸۳/۳) | ۲۸(۸۴/۴) | ۰/۸۹ | ۱۸(۹۴/۷) | ۴۰(۸۰) | ۴/۵ |
| | زن | ۶(۱۶/۶) | ۵(۱۵/۱) | | ۱ | ۱۰ | ۰/۱۳۵ |
| OR محاسبه شده بین هر گروه (P-value) | | ۵ ۰/۰۰۱* | ۲/۲ ۰/۰۰۱* | – | ۱۹/۳ ۰/۰۰۳* | ۴ ۰/۰۱۲* | – |

**داده ها به کمک تست آماری chi square آنالیز و ضریب شانس آنها محاسبه گردید. در مقایسه با گروه کنترل سطح معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد**

**جدول ۴. مقایسه معیار های کلینیکی همچون سن شروع و طول دوره بیماری و بررسی ارتباط آنها با ژنوتایپ در بیماران مورد مطالعه**

| معیار های کلینیکی | GSTM1 Wild | GSTM1 Null | GSTT1 Wild | GSTT1 Null | GSTP1 Wild | GSTP1 Mutant |
|---|---|---|---|---|---|---|
| سن شروع (سال) | | | | | | |
| حداقل | ۱۶ | ۱۰ | ۱۴ | ۱۰ | ۱۰ | ۱۴ |
| حداکثر | ۴۶ | ۴۱ | ۵۵ | ۳۹ | ۵۵ | ۴۶ |
| Mean±SD | ۸/۹±۲۹/۵ | ۸/۶±۲۳/۲ | ۹/۹±۲۷/۳ | ۹/۷±۲۲/۶ | ۱۰/۲±۲۵/۷ | ۱۰/۱±۲۶/۹ |
| P-value | ۰/۰۰۹ | | ۰/۱۳۱ | | ۰/۷۵۲ | |
| طول دوره بیماری (سال) | | | | | | |
| حداقل | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ |
| حداکثر | ۲۲ | ۲۳ | ۲۳ | ۱۸ | ۲۳ | ۲۱ |
| Mean±SD | ۵/۸±۵/۶ | ۳/۹±۶/۴ | ۵/۲±۶/۳ | ۳/۸±۵/۴ | ۴/۸±۵/۹ | ۵/۱±۶/۴ |
| P-value | ۰/۲۴۶ | | ۰/۱۷۲ | | ۰/۵۳۴ | |




**شکل ۴. مقایسه بیماران در هر گروه بر مبنای ژنوتایپ و پراکندگی آنها از نظر بدخیمی**

## بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه مشاهده شد افرادی که فاقد ژنوتایپ GSTM1هستند در سنین پایین تری به این بیماری مبتلا شده اند یا به هر دلیلی در برابر ایجاد بیماری حساس تر هستند. هر چند این ادعا برای هیچ یک از دو ژنوتایپ دیگر یعنی GSTP1 و GSTT1 اثبات نشد.علی رغم تصادفی بودن نمونه گیری و همچنین عدم معنی دار بودن تداخل سن مشاهده شد که متولدین خرداد ماه سهم بیشتری (۳۰٪) از بیماران را به خود اختصاص دادند. تقسیم بندی و مقایسه افراد مبتلا بر مبنای ماه تولد در چندین مطالعه پیش از این مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه انجام گرفته بر روی ۶۳۹۳ نفر در سوئد نشان داده شد که بیشترین آمار در افراد مبتلا برای ماه های میلادی May و July بوده در حالی که کمترین آمار ابتلا به متولدین ماه March اختصاص دارد(۳۱). نتایج مشابه این توسط Willer وهمکاران وی گزارش شد، که در این تحقیق ۱۷۸۷۴ نفر در کانادا و ۱۱۵۰۲ نفر در انگلستان مورد بررسی قرار گرفته بودند و دیده شد که بیشترین آمار ابتلا به متولدین ماه May مربوط می شود(۳۲). تنها دلیل قانع کننده برای تحقیقات انجام گرفته که نشان می دهد آمار تولد در فصل بهار بیشتر است تماس کوتاه مدت مادر باردار در فصل زمستان با نور خورشید و کمبود در سطح ویتامین $D_3$ را می توان نامبرد که در مقالات هم به این دلیل اشاره شده است(۱۲).

در تحقیق انجام گرفته بر روی ۴۹ بیمار مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس در یونان گزارش شد که فقدان ژنوتایپ GSTT1 وGSTM1 در گروه بیمار به ترتیب ۵۵/۱ و ۱۸ درصد بود در حالی که این ژنوتایپ برای گروه کنترل به ترتیب ۵۶/۵ و ۱۸/۹ درصد بود. که این اعداد معنی دار نبود ولی آنچه در این تحقیق مورد توجه قرار گرفت نسبت ۳/۸ برابری خانم های فاقد ژنوتایپ GSTM1 به آقایان در گروه افراد مبتلا بود(۳۳). این تحقیق تأییدی بود بر مطالعه انجام شده در سال ۲۰۰۰ که در جمعیت اروپایی به بررسی این پلی مورفیسم در نژاد قفقازی پرداخته بود و در آن مطالعه نیز نتیجه بیانگر عدم وجود ارتباط میان GSTT1 و GSTM1 با بیماری بود(۳۴).

مشاهده شد که اختلاف در فقدان هر ۳ ژنوتایپ در خانم ها شیوع بیشتری نسبت به آقایان دارد. هر چند این اختلاف در تمام گروه ها دیده شد و معنی دار بود، این اختلاف در دارا بودن ژنوتایپ GSTT1 و GSTP1 می تواند دلیلی بر حساسیت خانم ها در ابتلا به بیماری باشد، همانگونه که در مقالات مرتبط نیز به این مطلب اشاره شده است. البته در تحقیق انجام گرفته توسط Stavropoulou و همکاران این اختلاف در جنسیت برای فقدان ژنوتایپ GSTM1 مشاهده شده بود (۳۳). در این مطالعه بیماران فاقد GSTM1 زودتر از افراد واجد این ژنبیماری آنها تشخیص داده شده بود. مطالعه انجام گرفته توسط Živković و همکارانش بر روی ۴۵۵ نفر بیمار مبتلا به MS در صربستان نیز حاکی از این بود که فقدان ژنوتایپ GSTM1 دلیلی برای ابتلای زود هنگام به بیماری می باشد بدین صورت که در این مطالعه افراد فاقد GSTM1 در ۲۷/۳ سالگی و افراد دارای این ژنوتایپ در ۳۰/۶ سالگی بیماری آنها تشخیص داده شده بود(۳۵).آنچه به صورت تجربی می توان بیان کرد این است که افراد فاقد ژنوتایپ GSTM1 وGSTP1 میانگین سنی بالاتری برای طول دوره بیماری در مقایسه با افراد دارای این ژن‌ها بودند.هر چند مطالعات پیش از این نیز نتوانسته بودند ارتباط معنی داری میان پلی مورفیسم در GSTs و طول دوره ابتلا به بیماری را گزارش کنند(۳۳).

در این تحقیق برای مقایسه بیماران از نظر معیارهای کلینیکی نیز از EDSS(Kurtzke Expanded Disability Status) استفاده شد، که مقایسه اعداد بدست آمده در برابر هر ژنوتایپ صورت گرفت و P value های بدست آمده هیچ یک معنی دار نبود. با بررسی اطلاعات بدست آمده می توان نتیجه گرفت، افرادی که فاقد GSTM1 بودند بدخیمی آنها بیشتر از افراد دارای این ژنوتایپ بود. شاید کم بودن تعداد نمونه ها دلیلی بر عدم اثبات آماری این مشاهده بود.برای بررسی تأثیر دود سیگار بر بدخیمی بیماری و ارتباط آن با هر ژنوتایپ، حاکی از معنی دار بودن اعداد بدست آمده پیرامون ژنوتایپ GSTM1 بود. بدین صورت که افرادی که فاقد GSTM1 بودند و در تماس با سیگار قرار گرفته بودند بدخیمی آنها در محدوده بالاتری نسبت به افراد دارای GSTM1 قرار داشت که بیانگر نقش این ژنوتایپ در دفع یا سم زدایی محصولات حاصل از سیگار می باشد. هر چند در مورد ژنوتایپ های دیگر ارتباط معنی داری یافت نشد.بطور خلاصه می توان نتیجه گرفت که هر چند ارتباط معنی دار میان پلی مورفیسم در ژن هایGSTT1 ,GSTM1 و GSTP1 با بیماری مالتیپل اسکلروزیس در بیماران مورد مطالعه دیده نشد ولی مشاهده شد که می توان از GSTM1 و ارتباط ان با بروز زود هنگام بیماری در افرادی که مستعد ابتلا به این بیماری هستند بهره مند شد.

## تقدیر و تشکر

بدینوسیله از تمام افرادی که در پیشبرد این تحقیق ما را یاری نموده اند مخصوصا بیماران مبتلا به MS تشکر و قدردانی می‌گردد.

# The Prevalence of the Genetic Polymorphism of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and Its Relationship with Clinical Criteria of Multiple Sclerosis (MS) Patients in Tehran

**M. Aliomrani (PhD)[1], M.A. Sahraeian (MD)[2], M.R. Khoshayand (PhD)[3], T. Danesh Seta (Pharm D)[1], M. Sharifzadeh (PhD)[4], M.H. Ghahremani (PhD)[4*]**

1.Department of Toxicology and Pharmacology, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R.Iran
2.Department of Neurological Disorder, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran
3.Department of Drug and Food Control, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran
4.School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R.Iran

**J Babol Univ Med Sci; 21; 2019; PP:157-65**
**Received: May 19th 2018, Revised: Sep 5th 2018, Accepted: Oct 16th 2018.**

## ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Multiple Sclerosis is the chronic inflammation of central nervous system with demyelinated lesions in the brain and spinal cord. The genetic polymorphisms associated with glutathione S-transferase enzymes involved in antioxidant defense in Iranian patients have not been investigated. Therefore, in the present study, the prevalence of the genetic polymorphism of glutathione S-transferase M1, P1 and T1 and its relationship with clinical criteria of MS patients with has been examined.

**METHODS:** In this case-control study, 69 patients who referred to Sina Hospital in Tehran and had no panic attack within the last three months and 74 healthy subjects were interviewed. After examination by neurologist and blood sampling, DNA extraction was performed using Roche kit. Then, the genotypic variations of the samples were evaluated using RFLP-PCR and its prevalence was analyzed in relation with age, birth weight, malignancy (EDSS) and gender using GraphPad Prism software.

**FINDINGS:** Most malignancies were observed in men (3.1±5.9) and the highest incidence rate was observed in those born in May (30%). Although the results of genotyping between the studied groups and their gender did not show any significant difference (OR: 2-4, p>0.05), patients with GSTM1 deficiency developed the disease at a lower age (32.8±2.6 years) compared with other patients (29.5±8.9 years) (CI-95%: 20.3–26.4, p=0.009). In addition, people with a rare GSTM1 allele who smoked cigarette had higher EDSS (CI-95%: 2.1–3.7, p=0.03).

**CONCLUSION:** Based on the results of this study, the effect of GSTM1 on malignancy is indicative of its role in detoxification of tobacco products and can be used as an agent for early diagnosis of disease in people who are susceptible to this disease.

**KEYWORDS:** *Multiple Sclerosis, Polymorphism, Incidence, Glutathione S-Transferase, GSTT1, GSTP1, GSTM1.*

**Please cite this article as follows:**

Aliomrani M, Sahraeian MA, Khoshayand MR, Danesh Seta T, Sharifzadeh M, Ghahremani MH. The Prevalence of the Genetic Polymorphism of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and Its Relationship with Clinical Criteria of Multiple Sclerosis(MS) Patients in Tehran. J BabolUniv Med Sci. 2019; 21:157-65.

* **Corresponding Author: M.H. Ghahremani (Ph.D)**
**Address:** Department of Toxicology and Pharmacology, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran
**Tel:** +98 21 88896696
**E-mail:** mhghahremani@tums.ac.ir

## References

1.Hojati S, Zarghami A, Yousefzad T, Hojati S, Baes M. Epidemiological Features of 263 Patients with Multiple Sclerosis Residing in Babol, Iran. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(1):52-6.[In Persian]

2.Sahraian MA, Khorramnia S, Ebrahim MM, Moinfar Z, Lotfi J, Pakdaman H. Multiple sclerosis in Iran: a demographic study of 8,000 patients and changes over time. Eur Neurol. 2010;64(6):331-6.

3.Ibrahim SM, Gold R. Genomics, proteomics, metabolomics: what is in a word for multiple sclerosis?. Curr Opin Neurol. 2005;18(3):231-5.

4.Reiber H, Teut M, Pohl D, Rostasy KM, Hanefeld F. Paediatric and adult multiple sclerosis: age-related differences and time course of the neuroimmunological response in cerebrospinal fluid. Mult Scler. 2009;15(12):1466-80.

5.Etemadifar M, Sajjadi S, Nasr Z, Firoozeei TS, Abtahi SH, Akbari M, et al. Epidemiology of multiple sclerosis in Iran: a systematic review. Eur Neurol. 2013;70(5-6):356-63.

6.Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. Neurology. 2014;83(11):1022-4.

7.Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. Lancet. 2008; 372(9648): 1502–17.

8.Koch MW, Metz LM, Agrawal SM, Yong VW. Environmental factors and their regulation of immunity in multiple sclerosis. J Neurol Sci. 2013;324(1):10-6.

9.Fischer MT, Wimmer I, Höftberger R, Gerlach S, Haider L, Zrzavy T, et al. Disease-specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions. Brain. 2013;136(6):1799-815.

10.Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. Lancet Neurol. 2004;3(2):104-10.

11.Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. Lancet Neurol. 2008;7(3):268-77.

12.Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. Autoimmun Rev. 2010;9(5):A387-94.

13.Miller E, Walczak A, Saluk J, Ponczek MB, Majsterek I. Oxidative modification of patient's plasma proteins and its role in pathogenesis of multiple sclerosis. Clin Biochem. 2012;45(1-2):26-30.

14.Oliveira SR, Kallaur AP, Morimoto HK, Lopes J, Panis C, Petenucci DL, et al. Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: association with the expanded disability status scale. J Neurol Sci. 2012;321(1):49-53.

15.Bressler JP, Goldstein GW. Mechanisms of lead neurotoxicity. Biochem Pharmacol. 1991;41(4):479-84.

16.Qin J, Goswami R, Balabanov R, Dawson G. Oxidized phosphatidylcholine is a marker for neuroinflammation in multiple sclerosis brain. J Neurosci Res. 2007;85(5):977-84.

17.Arias IM, Jakoby WB. Glutathione, metabolism and function. Raven Press; 1976.

18.Shen M, Zhao DK, Qiao Q, Liu L, Wang JL, Cao GH, et al. Identification of glutathione S-transferase (GST) genes from a dark septate endophytic fungus (Exophiala pisciphila) and their expression patterns under varied metals stress. PLoS One. 2015;10(4):e0123418.

19.Douglas KT. Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 1987; 59:103-67.

20.Salinas AE, Wong MG. Glutathione S-transferases-a review. Curr Med Chem. 1999;6(4):279-310.

21.Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochem J. 2001;360(Pt 1):1-16.

22.Eaton DL, Bammler TK. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. Toxicol Sci. 1999;49(2):156-64.

23.Cotton S, Sharp L, Little J, Brockton N. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. Am J Epidemiol. 2000;151(1):7-32.

24.Nebert DW, Vasiliou V. Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. Hum Genomics. 2004;1(6):460-4.
25.McIlwain C, Townsend D, Tew K. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. Oncogene. 2006;25(11):1639-48.
26.Cowell IG, Dixon KH, Pemble SE, Ketterer B, Taylor JB. The structure of the human glutathione S-transferase pi gene. Biochem J. 1988;255(1):79-83.
27.Rodriguez F, de la Roza C, Jardi R, Schaper M, Vidal R, Miravitlles M. Glutathione S-transferase P1 and lung function in patients with α1-antitrypsin deficiency and COPD. Chest. 2005;127(5):1537-43.
28.Flamant C, Henrion-Caude A, Boëlle P-Y, Brémont F, Brouard J, Delaisi B, et al. Glutathione-S-transferase M1, M3, P1 and T1 polymorphisms and severity of lung disease in children with cystic fibrosis. Pharmacogenetics. 2004;14(5):295-301.
29.Sweeney C, Nazar-Stewart V, Stapleton PL, Eaton DL, Vaughan TL. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and survival among lung cancer patients. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2003;12(6):527-33.
30.Ishii T, Fujishiro M, Masuda M, Nakajima J, Teramoto S, Ouchi Y, et al. Depletion of glutathione S-transferase P1 induces apoptosis in human lung fibroblasts. Exp Lung Res. 2003;29(7):523-36.
31.Barros P, de Sa JM, Sa JM. Month of birth and risk of multiple sclerosis in Portuguese population. Clin Neurol Neuroseurg. 2013;115(9): 1762-5.
32.Willer CJ, Dyment DA, Sadovnick AD, Rothwell PM, Murray TJ, Ebers GC, et al. Timing of birth and risk of multiple sclerosis: population based study. BMJ. 2005;330(7483):120.
33.Stavropoulou C, Korakaki D, Rigana H, Voutsinas G, Polyzoi M, Georgakakos V, et al. Glutathione-S-transferase T1 and M1 gene polymorphisms in Greek patients with multiple sclerosis: a pilot study. Eur J Neurol. 2007;14(5):572-4.
34.Mann C, Davies M, Boggild M, Alldersea J, Fryer A, Jones P, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms in MS Their relationship to disability. Neurology. 2000;54(3):552-7.
35.Živković M, Životić I, Dinčić E, Stojković L, Vojinović S, Stanković A. The glutathione S-transferase T1 deletion is associated with susceptibility to multiple sclerosis. J Neurolog Sci. 2013;334(1):6-9.