

بررسی همزمان پلی مورفیسم‌های ژن‌های *GSTM1*، *GSTT1* و ارتباط آن‌ها با مقاومت نسبت به داروهای شیمی‌درمانی در بیماران مبتلابه سرطان مری

معصومه رادپور: کارشناسی ارشد زیست‌شناسی ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران.
*گلناز اسعدی تهرانی: دکتری ژنتیک مولکولی، استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران (*نویسنده مسئول).
golnaz_asaadi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۲۶

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: پلی مورفیسم‌های نوکلئوتیدی در آنزیم‌های موثر در متابولیسم کارسینوژن‌ها در استعداد بروز سرطان موثر می‌باشند. ژن‌های گلوٲاتینون - S ترانسفراز در سم زدایی رنج وسیعی از سوبستراهای توکسیک دخیل می‌باشند، از این رو احتمالاً پلی مورفیسم‌های حذف شدگی ژن‌های *GSTM1* و *GSTT1* بعنوان ریسک فاکتور برای کارسینومای مری دخیل هستند. هدف از این تحقیق بررسی ارتباط بین جهش‌های بی اثر در ژن‌های *GSTM1* و *GSTT1* با شانس ابتلا کارسینومای مری در بیماران ایرانی تحت شیمی‌درمانی با داروهای پلاتینوم بود.

روش کار: در یک مطالعه مورد - شاهدهی ۵۰ بیمار مبتلا به کارسینومای مری و ۵۰ فرد کنترل انتخاب شدند. DNA ژنومی از نمونه‌های خون تخلیص گردید. سپس حذف شدگی واریته‌های *GSTM1* و *GSTT1* توسط روش Multiplex-PCR تعیین ژنوتایپ گردید. آنالیز آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ جهت تخمین OR و درجه اطمینان ۹۵٪ استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج بدست آمده تأیید می‌کنند که فراوانی مبتلایان به کارسینومای مری با ژنوتیپ *GSTM1* نول بصورت قابل ملاحظه‌ای از افراد کنترل بیشتر است (۴۸٪ و ۱۳٪ به ترتیب) ($p=0/024$). در مقابل هیچ تفاوتی در توزیع ژنوتیپ بی اثر *GSTT1* بین افراد بیمار و کنترل نشان نداد (۳۲ و ۲۴٪ به ترتیب) ($p=0/37$). همچنین نتایج حاکی از آن بودند که استفاده از داروهای شیمی‌درمانی مبتنی بر پلاتین برای ۵۲٪ از بیماران مورد مطالعه سودمند نبوده است که ۱۸٪ موارد افرادی واجد ژنوتیپ Null در هر دو ژن خود بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر تأکید می‌کنند که ژن *GSTM1* ممکن است بعنوان فاکتور ژنتیکی مستعد کننده در وقایع اولیه توسعه سرطان مری دخیل باشد، اما پلی مورفیسم‌های *GSTT1* با افزایش خطر سرطان مری در ارتباط نمی‌باشد.

کلیدواژه‌ها: سرطان مری، شیمی‌درمانی، گلوٲاتینون -S- ترانسفراز، *GSTM1* و *GSTT1*

مقدمه

شایع در کشور به شمار می‌رود (۴ و ۵). دو نوع اصلی سرطان مری از نظر بافت‌شناسی شامل کارسینوم سلول سنگفرشی (ESCC) و آدنوکارسینوم مری (EAC) (Esophageal Adenocarcinoma) می‌باشد که هر یک واجد ویژگی‌های اتیولوژیک و پاتولوژیک ویژه‌ای بوده (۸ و ۹) اگرچه عوامل خطر و اپیدمیولوژی ESCC و EAC باهم متفاوت اند، اما پیش‌آگهی هر دو بسیار ضعیف است، به‌نحوی که بقای پنج‌ساله بیماران، ۱۰ تا ۱۳ درصد گزارش شده است (۹). درمان این نوع سرطان به انواع درمان غیر دارویی و دارویی تقسیم می‌شود. درمان دارویی شامل شیمی‌درمانی است که اغلب شامل بلئومایسین، ۵-فلورواوراسیل، میتومایسین، سیس

سرطان مری (Esophageal Cancer (EC)) از شایع‌ترین سرطان‌ها و ششمین سرطان منجر به مرگ در دنیا به شمار می‌رود (۱). بروز سرطان مری در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت است. بیشتر قربانیان در "خط سرطان مری" قرار گرفته‌اند که از شمال مرکزی چین به سمت غرب در امتداد مرکز آسیا تا شمال ایران امتداد یافته است (۲). نرخ بقاء برای سرطان مری ضعیف بوده، به‌طوری که ۷۵٪ از بیماران در طی یک سال پس از تشخیص فوت می‌کنند و بقاء ۵ ساله تنها در ۵-۱۰٪ بیماران مشاهده می‌گردد (۳). اگرچه میزان بروز این بیماری در سه دهه گذشته در ایران رو به کاهش بوده است، اما همچنان ششمین سرطان

به صورت GSTM1 null و GSTT1 null با از دست رفتن فعالیت آنزیمی و استعداد به برخی سرطان‌ها تداعی می‌گردد (۱۶ و ۱۷).

انواع ژن‌ها از جمله ژن‌های دخیل در متابولیسم الکل، متابولیسم فولات، متابولیسم کارسینوژن‌ها، تعمیر DNA و کنترل چرخه سلولی همچنین انکوژن‌ها در کارسینوژنز مری دخیل هستند؛ اما تاکنون مطالعات محدودی پیرامون ارتباط پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های GST و سرطان مری و خصوصیات بالینی مبتلایان انجام گرفته است، همچنین از آنجائی که پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های GSTT1 و GSTM1 می‌توانند به عنوان فاکتورهای کاندید جهت شناسایی عوامل پیش‌آگهی جهت ارزیابی و درمان مولکولی مبتلایان باشد؛ بنابراین در مطالعه حاضر ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های GSTT1, GSTM1 مبتلایان به سرطان مری تحت شیمی‌درمانی با داروهای پلاتینیوم و فاکتورهای بالینی بیماران مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

روش کار

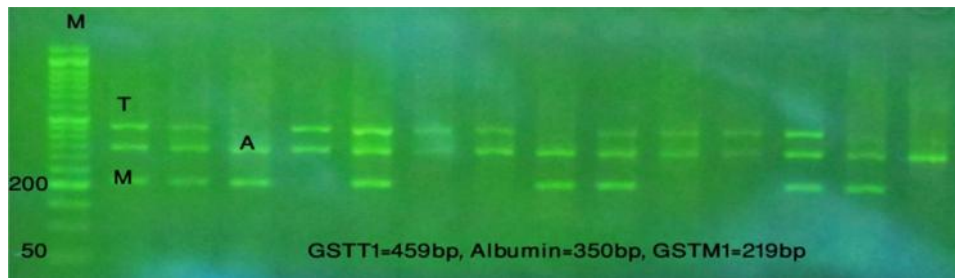
نمونه‌گیری: در این تحقیق ۵۰ بیمار مبتلابه سرطان مری نوع EScc و ۵۰ فرد سالم غیر خویشاوند با بیماران و بدون سابقه سرطان مری یا سرطان‌های گوارشی مورد مطالعه قرار گرفتند و پرسشنامه‌ای شامل سؤالاتی از قبیل سن جنسیت و نحوه تغذیه (مصرف مواد غذایی آماده از جمله انواع کنسروها، سوسیس و کالباس و همین‌طور مصرف مایعات داغ) سابقه مصرف دارویی خاص و یا بیماری مشخص و سابقه شیمی‌درمانی تهیه شد. افراد بیمار در هنگام نمونه‌گیری تحت عمل جراحی و شیمی‌درمانی قرار گرفته‌اند، افراد سالم هیچ بیماری از قبیل سرطان‌هایی مختلف نداشته‌اند. به‌منظور رعایت اخلاق پزشکی از بیماران رضایت‌نامه دریافت گردید.

تعیین ژنوتیپ: با استفاده از کیت استخراج DNA اختصاصی شرکت سینا کلون، DNA ژنومیک از خون محیطی بیماران و افراد نرمال استخراج شد. سپس واکنش زنجیره‌ی پلیمرز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *GSTT1*

پلاتین است (۱۰). تفاوت در پاسخ درمانی بیماران پس از درمان متداول می‌باشد که در ارتباط با تنوع فارموکوژنتیک می‌باشد. فاکتورهای نژادی، سن، جنس، رژیم غذایی، مصرف سیگار و الکل، کارکرد کلیه و کبد، سایر بیماری‌ها و داروها می‌توانند در این تنوع مؤثر باشند، اما تنوع ژنتیکی خصوصاً در ژن‌های رمز کننده متابولیزه کننده‌ها و ناقلین دارو می‌تواند در پروفایل فارموکوژنتیک و فارموکودینامیک داروهای ضد سرطان تأثیر بیشتری داشته و نه تنها به تفاوت در پاسخ درمانی بلکه حتی توسعه توکسیستی حاد در بیمار گردد (۱۱ و ۱۲). داروهای متابولیزه کننده و انتقال‌دهنده دارو شامل سه دسته اصلی می‌باشند: آنزیم‌های فاز I که در سم‌زدایی و فعال‌سازی مسیرهای پیش‌داروهای غیرفعال دخالت دارد (۱۳). آنزیم‌های فاز II که معمولاً محصولات فاز I یا سایر حد واسط‌ها را کانسوخته می‌کنند، (۱۴). دسته سوم پروتئین‌های غشائی هستند که در جذب و ترشح داروها دخالت دارند (۱۵).

پس از درمان سرطان، بسته به نوع تومور و فاکتورهای مرتبط با بیمار تنوع وسیعی در نرخ بقاء بیماران مشاهده شده است که در این ارتباط پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی در آنزیم‌های شیمی‌درمانی حائز اهمیت می‌باشد. مهم‌ترین این پلی‌مورفیسم‌ها که در نرخ بقاء بیمار پس از درمان مؤثر می‌باشند در ژن‌های رمز کننده آنزیم‌های سم‌زدایی فاز II، گلوکوتایون -S- ترانسفراز (GSTs) گزارش شده است. گلوکوتایون -S- ترانسفراز (GSTM1)M1 و گلوکوتایون -S- ترانسفراز T1 (GSTT1) هر دو در سم‌زدایی عوامل شیمیایی خارجی مؤثر هستند، GSTM1 بر روی کروموزوم 1P13.3 واقع شده و در طی یک فرایند نوترکیبی هومولوگوس در تکرارهای ۴/۲ kb سمت راست و چپ یک ناحیه ۱۶ kb شامل کل ژن GSTM1 متحمل حذف‌شدگی می‌گردد. ژن GSTT1 روی کروموزوم 22q11.2 واقع می‌باشد و همانند ژن GSTM1 در طی یک واقعه نوترکیبی هومولوگوس در توالی‌های تکراری ۴۰۳ bp یک ناحیه حدود ۵۴ kb واجد کل ژن GSTM1 دچار حذف‌شدگی می‌گردد. حذف هوموزیگوت این ژن‌ها

| ژن | سکانس پرایمر | اندازه محصول PCR | دمای Tm |
|----------------|--|------------------|---------|
| <i>GSTT1</i> | F: 5-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3 R: 5-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3 | ۴۵۹bp | |
| <i>GSTM1</i> | F: 5- GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3 R: 5-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3 | ۲۱۹bp | ۵۳ C |
| <i>albumin</i> | F:5- GCCCTCTGCTAACAAGTCTTAC-3 R: 5-GCCCTAAAAAGAAAATCCCCAATC-3 | ۳۵۰bp | |



شکل ۱- محصول PCR ژن‌های *GSTT1* و *GSTM1* و *Albumin* بر روی ژل آگاروز چاهک M مارکر ۵۰ bp را نشان می‌دهد چاهک‌های ۱ تا ۱۴ ژن‌های تکثیر یافته را مشخص می‌کند. (M) ژن گلوپاتینون S ترانسفرازمو، T ژن گلوپاتینون S ترانسفرازتا، A آلومین)

GSTM1 دچار حذف نول شده و فقط باند *GSTT1* قابل مشاهده است. در هر فرد ممکن است هر دو ژن دچار حذف نول شده و روی ژل فقط باند کنترل مشاهده شود و یا هر دو باند قابل رؤیت باشد. محصولات PCR با الکتروفورز روی ژل آگاروز ۳٪ از هم تفکیک شده و طول دقیق آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).

نتایج به دست آمده از تعیین ژنوتایپ پلی مورفیسم‌های ژنی *GSTT1* و *GSTM1* توسط آزمون نسبت نرم افزار SPSS19 مورد تحلیل قرار گرفت. جهت ارزیابی اختلافات در پارامترهای مورد نظر در بین گروه‌های مورد مطالعه در فراوانی‌های ژنوتیپی و آلی از نسبت شانس (OR) و فاصله اطمینان ۹۵٪ CI استفاده شد و توسط آزمون کای دو $p < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار تلقی گردید (Odd Ratio calculator).

یافته‌ها

از میان ۱۰۰ نمونه مورد بررسی (۵۰ نمونه بیمار و ۵۰ نمونه نرمال) در گروه‌های شاهد و نرمال به ترتیب (۴۶٪ خانم، ۵۴٪ آقا) (۴۸٪ خانم و ۵۲٪ آقا) قرار داشتند. میانگین سنی در گروه شاهد (خانم‌ها $3/76 \pm 61/47$ و آقایان

Albumin ۱، *GSTM1* (جدول ۱) به روش Multiplex PCR انجام گرفت. واکنش Multiplex PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومیک ۱۲.۵ نانوگرم 2X Taq Premix Master Mix (سینا ژن، ایران) ۱۰ پیکومول از هر پرایمر (Microgene، کره) (جدول ۱) ۴/۵ میکرولیتر آب دیونیزه، صورت گرفت. در هر ۳ ژن تکثیر در ۳۰ سیکل، دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و طولی سازی نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. Multiplex PCR یک روش تکثیری قدرتمند برای چند ژن است. در این روش وجود باند ۲۱۹bp بر روی ژل آگاروز حاکی از اتصال پرایمر *GSTM1* و باند ۴۵۹bp حاکی از اتصال پرایمر *GSTT1* به نواحی موردنظر است. ژن *Albumin* با ۳۵۰bp به عنوان ژن کنترل روی ژل است. اگر روی ژل فقط باند ۲۱۹bp مشاهده شود به این معنی است که ژن *GSTM1* وجود داشته و ژن *GSTT1* دچار حذف نول شده و برعکس اگر ژل فقط حاوی باند ۴۵۹bp باشد ژن

۳۴٪ و ۷۰٪ افراد به صورت هم‌زمان برای هر دو ژن دارای ژنوتایپ wild و همچنین تعداد ۱۸٪ و ۳۰٪ نفر برای هر دو ژن ژنوتایپ null دارا می‌باشند (جدول ۳). ($p=0/68$) از مطالعات انجام شده در جمعیت‌های مختلف سرتاسر دنیا، نتایج مختلفی از لحاظ تأثیر پلی‌مورفیسم ژن‌های *GSTT1* و *GSTM1* بر روی افزایش خطر ابتلا به سرطان بدست آمده است، در بعضی هر دو تأثیر معنی‌داری داشتند در بعضی تحقیقات فقدان یکی از ژن‌ها مورد نظر تأثیر معنی‌دار دارد اما در این مطالعه حذف در ژن‌های *GSTT1* و *GSTM1* افزایش معنی‌داری در خطر ابتلا به سرطان مری ایجاد نکردند.

در این تحقیق ۵۲٪ از بیماران مبتلا به سرطان مری که تحت شیمی‌درمانی بوده‌اند، از این داروها سود نبردند که میزان ۱۰٪ آن‌ها آقایان و ۸٪ خانم‌های با ژنوتایپ Null در هر دو ژن *GSTT1* و *GSTM1* بودند. ژنوتایپ Wild در هر دو ژن *GSTT1* و *GSTM1* در خانم‌ها ۶٪ و در آقایان ۱۴٪ بود. در ۱۴٪ باقی‌مانده، ۶٪ (فقط زن) در ژن *GSTT1* دارای ژنوتایپ Wild و در ژن *GSTM1* دارای ژنوتایپ Null بودند و ۸٪ باقی‌مانده (فقط مرد) در ژن *GSTT1* ژنوتایپ Null در ژن *GSTM1*

۴/۲۹ ± ۶۴/۲۵) و در گروه کنترل (خانم‌ها ۲/۹۵ ± ۵۲/۱۲ و آقایان ۵/۰۹ ± ۴۷/۳) بود. میانگین سنی کل در بیماران و کل افراد کنترل به ترتیب ۲/۹۷ ± ۶۳/۵ و ۳/۷۶ ± ۴۹/۷۵ گزارش گردید. اندازه اثر (Effect Size) ($0/8969$ و Cohen's d) ($4/0583$) محاسبه گردید (Effect Size Online Calculator). جدول شماره ۲ فراوانی‌های ژنوتیپی در ژن‌های مورد بررسی *GSTT1* و *GSTM1* را به تفکیک جنسیت نشان می‌دهد.

در ۵۰ نمونه بیمار مورد بررسی، در ژن *GSTT1*، ۶۴٪ دارای ژنوتایپ Wild و ۳۲٪ دارای ژنوتایپ Null بودند، در حالی که در افراد نرمال تعداد موارد ژنوتایپ‌های wild و null به ترتیب ۷۶٪ و ۲۴٪ گزارش شد که در نتیجه اختلاف معنی‌دار آماری را بین دو گروه نشان نمی‌دهد ($p=0/3743$). در بررسی ژن *GSTM1* در بیماران، ۲۶ نمونه (۵۲٪) دارای ژنوتایپ Wild و ۴۸٪ دارای ژنوتایپ Null بودند، در ارتباط با افراد کنترل نیز به ترتیب ۳۷ نفر (۷۴٪) و ۱۳ نفر (۲۶٪) واجد ژنوتایپ‌های wild و null بودند که آنالیز آماری اختلاف معنی‌داری را تأیید می‌نماید ($p=0/0244$). نتایج حاصل از بررسی هم‌زمان ژنوتایپ‌های wild و null نشان داد که در جمعیت بیمار و نرمال به ترتیب

جدول ۲- محاسبه در صد فراوانی ژنوتیپی پلی مورفیسم های *GSTT1* و *GSTM1* در نمونه‌های مورد بررسی در بیماران به تفکیک جنسیت

| ژنوتایپ | تعداد | درصد فراوانی | | p |
|--------------|-------|--------------|----------------------|--------|
| | | کل | میانگین سنی کل افراد | |
| <i>GSTT1</i> | wild | ۳۴ | ۶۱/۷ | ۰/۳۰۱۰ |
| | Null | ۱۶ | ۶۰/۸۳ | |
| <i>GSTM1</i> | Wild | ۲۶ | ۶۱/۷۰ | ۰/۳۰۱ |
| | Null | ۲۴ | ۶۳/۴۳ | |

جدول ۳- در صد فراوانی ژنوتیپی پلی مورفیسم های *GSTT1* و *GSTM1* در نمونه‌های مورد بررسی

| ژنوتایپ | تعداد بیماران و درصد | تعداد افراد سالم و درصد | | OR | 95% CI | p |
|--------------|----------------------|-------------------------|----|----|--------|--------|
| | | مرد | زن | | | |
| <i>GSTT1</i> | Wild | ۱۶ | ۱۸ | ۲۲ | ۱۶ | ۰/۳۷۴۳ |
| | Null | ۱۱ | ۵ | ۳ | ۹ | |
| <i>GSTM1</i> | Wild | ۱۶ | ۱۰ | ۲۳ | ۱۴ | ۰/۰۲۴۴ |
| | Null | ۱۱ | ۱۳ | ۵ | ۸ | |
| <i>GSTT1</i> | Wild | ۱۱ | ۶ | ۲۴ | ۱۱ | ۰/۶۸۱۵ |
| | Null | ۵ | ۴ | ۳ | ۱۲ | |

در ژن *GSTT1* تعداد ۲۲٪ واجد ژنوتیپ Null بودند. نتایج این مطالعه رابطه معنی‌داری را بین مصرف تنباکو و ژنوتیپ‌های *GSTM1* ($p=0/0201$) و *GSTT1* ($p=0/0011$) و مستعد شدن به سرطان مری از نوع سنگفرشی نشان می‌دهد. همچنین در بررسی ارتباط بین مصرف مشروبات الکلی با *Escc* و ژن‌های *GSTM1* و *GSTT1* نیز نتایج نشان دادند که ۳۲٪ افراد کنترل و بیماری که در طول زندگی‌شان مشروبات الکلی مصرف کرده‌اند، در افراد شاهد و کنترل به ترتیب (۴۴٪/۱۸٪) در ارتباط با ژن *GSTM1* و (۲۲٪/۱۲٪) در ارتباط با ژن *GSTT1* واجد ژنوتیپ null می‌باشند، از این نظر رابطه معناداری بین مصرف مشروبات الکلی و ژنوتیپ نول در ژن‌های *GSTM1* و *GSTT1* و استعداد ابتلا به سرطان مری از نوع سنگفرشی تأیید گردید ($p=0/0001$) و ($p=0/0629$). در مقابل نتایج بدست آمده هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری را از لحاظ آماری بین مصرف مایعات داغ و ژنوتیپ Null، *GSTT1* و *GSTM1* و مستعد شدن به سرطان مری از نوع سنگفرشی نشان نداد

دارای ژنوتیپ Wild بودند ($p=0/30012$) (جدول ۴).

نتایج نشان داد فراوانی ژنوتیپ Null در هر دو ژن به صورت هم‌زمان در افراد بیمار به طور معناداری بیشتر از افراد شاهد نمی‌باشد اما فراوانی آلل نول در ژن *GSTM1* در جمعیت بیمار به طور معناداری بیشتر از شاهد است. همین طور استفاده از داروهای شیمی درمانی مبتنی بر پلاتین برای ۵۲٪ از بیماران مورد مطالعه سودمند نبوده است که در بیشتر موارد افرادی با ژنوتیپ Null در هر دو ژن بودند؛ که یافته‌ها نشان‌دهنده این موضوع است که وجود ژنوتیپ Null در هر دو ژن *GSTM1*، *GSTT1* می‌تواند عامل ایجاد این مقاومت باشد.

نتایج آماری به دست آمده ژن‌های *GSTM1* و *GSTT1* در بیماران *Escc* نشان دادند که ۲۸٪ افراد شاهد در طول زندگی‌شان دخانیات مصرف کرده‌اند که ۴۶٪ آن‌ها برای ژن *GSTM1* و ۳۸٪ برای ژن *GSTT1* واجد ژنوتیپ null بودند و در افراد شاهد نیز ۲۶٪ در طول زندگی تنباکو مصرف نموده‌اند. از این ۲۶٪ در ژن *GSTM1* تعداد ۶۹٪ و

جدول ۴- تعداد افرادی که در ژن‌های *GSTT1* و *GSTM1* دارای آلل‌های Wild یا Null هستند و در آنها شیمی درمانی موثر نبوده است.

| ژنوتیپ افراد | تعداد کل (درصد) | تعداد زن (درصد) | تعداد مرد (درصد) |
|------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| <i>GSTT1</i> (wild genotype) | ۱۰ (۲۰٪) | ۳ (۶٪) | ۷ (۱۴٪) |
| <i>GSTM1</i> (wild genotype) | | | |
| <i>GSTT1</i> (null genotype) | ۹ (۱۸٪) | ۴ (۸٪) | ۵ (۱۰٪) |
| <i>GSTM1</i> (null genotype) | | | |
| <i>GSTT1</i> (wild genotype) | ۴ (۸٪) | ۴ (۸٪) | . |
| <i>GSTM1</i> (null genotype) | | | |
| <i>GSTT1</i> (null genotype) | ۳ (۶٪) | . | ۳ (۶٪) |
| <i>GSTM1</i> (wild genotype) | | | |

جدول ۵- بررسی ارتباط بین فاکتورهای خطر در سرطان مری با ژنوتایپ‌های *wild*، *Null* در ژن‌های مورد بررسی *GSTM1* و *GSTT1*

| فاکتور | تعداد | <i>GSTM1</i> | | p | <i>GSTT1</i> | | p |
|-----------------|-------|--------------|--------|--------|--------------|--------|--------|
| | | Wild | Null | | Wild | Null | |
| مصرف سیگار | بیمار | ۱۴ (۲۸٪) | ۵۳/۴۸٪ | ۴۶/۱۶٪ | ۶۹/۲۳٪ | ۳۸/۴۶٪ | ۰/۰۰۱۱ |
| | سالم | ۱۳ (۲۶٪) | ۶۹/۲۳٪ | ۳۰/۱۶٪ | ۸۴/۶۱٪ | ۱۵/۳۸٪ | |
| مصرف الکل | بیمار | ۱۶ (۳۲٪) | ۵۵/۵٪ | ۴۴/۵٪ | ۷۷/۷٪ | ۲۲/۳٪ | ۰/۰۶۲۹ |
| | سالم | ۱۶ (۳۲٪) | ۸۱/۲۵٪ | ۱۸/۷۵٪ | ۸۷/۵٪ | ۱۲/۵٪ | |
| مصرف مایعات داغ | بیمار | ۶ (۱۲٪) | ۶۲/۵٪ | ۳۷/۵٪ | ۷۵٪ | ۲۵٪ | ۰/۵۸۹۷ |
| | سالم | ۸ (۱۶٪) | . | . | . | . | |

($p=0/589$) و ($p=0/7994$) (جدول ۳).

بحث و نتیجه گیری

از آنجایی که ۳ خانواده مهم گلو تاتیون اس ترانسفرز ($GSTT1, GSTM1, GSTP1$) پلی مورفیک بوده و در عمل سم زدایی در مری نقش دارد، اختلال در این ژن ها به عنوان یک فاکتور خطر برای مری به حساب می آید (۱۸) به همین خاطر ۲ ژن از این ۳ ژن به عنوان یک عامل ایجاد کننده اختلال در فرایند شیمی درمانی در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفت. از مطالعات انجام شده در جمعیت های مختلف سرتاسر دنیا، نتایج مختلفی از لحاظ تأثیر پلی مورفیسیم ژن های $GSTT1$ و $GSTM1$ بر افزایش خطر ابتلا به سرطان به دست آمده است، به طوری که در بعضی از تحقیقات در جمعیت ها هیچ تأثیر معنی داری نداشتند اما در بعضی هر دو تأثیر معنی داری داشتند. این تفاوت ها می تواند ناشی از تفاوت در بیماران مورد بررسی، روش مطالعه، تعداد بیماران و اختلاف نژادی و وجود پلی مورفیسیم های مختلف در افراد باشد که منجر به تفاوت توانایی در سم زدایی مواد می شود (۱۹ و ۲۰).

در مطالعات متعددی ارتباط بین پلی مورفیسیم های $null$ در ژن های $GSTT1$ ، $GSTM1$ و ریسک وقوع انواع سرطان ها از جمله سرطان مری اشاره شده است، اما تنها در مطالعات محدودی به اثرات جانبی این پلی مورفیسیم ها در ارتباط با سمیت داروهای شیمی درمانی اشاره شده است. نتایج تحقیقات در ارتباط با انواع سرطان ها و دوزهای درمانی مورد استفاده متفاوت می باشد، به عنوان مثال در افراد واجد ژنوتیپ $null$ مبتلا به سرطان تخمدان و لوسمی با افزایش دوز دارویی، توانایی سم زدایی ترکیبات دارویی کاهش یافته، اما در مبتلایان به سرطان سینه این کارایی افزایش می یابد؛ اما در مجموع یافته ها اشاره به این واقعیت دارند که ژنوتیپ های $null$ پاسخ درمانی مؤثرتری را به درمان نشان می دهند، در مقایسه با بیماران که داروهای ضد نئوپلاستیک را سم زدایی نموده و کارایی درمان را کاهش می دهند (۲۱). در تحقیق حاضر نیز (۲۶ نفر) ۵۲٪ از بیماران مبتلا به سرطان

مری که تحت شیمی درمانی بوده اند، از این دارو ها سود نبردند؛ که میزان ۱۸٪ آن ها در هر دو ژن $GSTT1, GSTM1$ دارای ژنوتیپ $Null$ بودند. ژنوتیپ $Wild$ در هر دو ژن $GSTT1, GSTM1$ ۲۰٪ بود. ۴ فرد در ژن $GSTT1$ دارای ژنوتیپ $Wild$ و در ژن $GSTM1$ دارای ژنوتیپ $Null$ بودند و ۳ نفر در ژن $GSTT1$ ژنوتیپ $Null$ در ژن $GSTM1$ دارای ژنوتیپ $Wild$ بودند.

ارتباطات متعددی بین پلی مورفیسیم در ژن های کد کننده آنزیم های متابولیزه و انتقال دهنده داروهای و پاسخ درمانی در سرطان مشاهده شده است. تعدادی از پلی مورفیسیم های ژن کد کننده این آنزیم ها شامل فاز یک آنزیم سیتوکروم P450 ($CYP3A, CYP3A5, CYP2D6$) در فاز دو آنزیم ($GSTP1, GSTA1, GSTM1, GSTT1, GST$) کوپینگ اکسیدو ردوکتاز ($NQO1, EC1.6.99.2$) و غیره است. بیشترین مطالعات انجام شده در فاز II آنزیم است، چندین ارتباط بین پلی مورفیسیم ژن های GST و پاسخ درمانی به سرطان مشاهده شده است، در بعضی از مطالعات پلی مورفیسیم در ژن $GSTP1$ و $GSTA1$ باعث کاهش فعالیت آنزیم که در ارتباط با بهبود بیماری و بقا است گزارش شده است. حذف در $GSTM1$ و $GSTT1$ باعث کاهش یا غیرفعال شدن آنزیم در نتیجه پیش بینی قابل توجه بهبود یا وخامت بیماری در اثر شیمی درمانی می شود (۱۲).

در مطالعات آقای دکتر کاظم انوری و همکارانش که در استان خراسان انجام شد، روش شیمی درمانی در مبتلایان به کارسینوم سلول سنگفرشی مری منجر به بقاء ۵ ساله ۴۶٪ گردید؛ که نتیجه قابل قبول و خوبی برای این بیماری محسوب می شود. در یافته های ما نیز ۴۸٪ از بیماران (۴۷٪ خانم و ۵۲٪ را آقایان تشکیل می دادند که در ژن $GSTM1$ ۵۶٪ افراد ژنوتیپ $Wild$ و ۴۳٪ دارای ژنوتیپ $Null$ بودند و در ژن $GSTT1$ ۴۳٪ ژنوتیپ $Null$ و ۵۶٪ دارای ژنوتیپ $Wild$ بودند) تحت درمان به وسیله شیمی درمانی و جراحی موفق به بقاء شدند. در بعضی از مطالعات پلی مورفیسیم در ژن $GSTP1$ و $GSTA1$ باعث کاهش فعالیت آنزیم که در ارتباط با بهبود بیماری و بقا است

به نظر می‌رسد که وجود ژنوتیپ Null در هر دو ژن GSTT1 و GSTM1 عامل جلوگیری کننده در فعالیت داروی سین پلاتین و بهبود بیماران به روش شیمی‌درمانی باشد. همین طور وجود ژنوتیپ Null در ژن GSTM1 تأثیر بیشتری نسبت به همین ژنوتیپ در ژن GSTT1 دارد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از کارکنان مرکز تحقیقات بیولوژیک آزمایشگاه مسعود به دلیل همکاری صمیمانه در انجام این پروژه کمال تشکر و امتنان را دارند.

منابع

1. Abbas A, Delvinquiere K, Lechevrel M, Lebaillly P, Gauduchon P, Launoy G, et al. GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer in a French population: different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*; 2004. 23(10):3389-3393.
2. Hiyama T, Yoshihara M, Tanaka S, Chayama K. Genetic polymorphisms and esophageal cancer risk. *Int. J. Cancer*; 2007. 21: 1643-1658.
3. Stathopoulos GP, Tsiaras N. Epidemiology and pathogenesis of esophageal cancer: management and its controversial results (review). *Oncol Rep*; 2003. 10(2): 449-454
4. Brown LM. The role of race/ethnicity in the epidemiology of esophageal cancer. *J Assoc Acad Minor Phys*; 2000. 11(2-3): 32-37.
5. Wu X, Chen VW, Ruiz B, Andrews P, Su LJ, Correa P. Incidence of esophageal and gastric carcinomas among American Asians/Pacific Islanders, whites, and blacks: subsite and histology differences. *Cancer*; 2006. 106(3): 683-692.
6. Sasaki Y, Tamura M, Koyama R, Nakagaki T, Adachi Y, Tokino T. Genomic characterization of esophageal squamous cell carcinoma: Insights from next-generation sequencing. *World J Gastroenterol* 2016; 22(7): 2284-2293.
7. Rafiemanesh H, Maleki F, Mohammadian-Hafshejani A, Salemi M, Salehiniya H. The Trend in Histological Changes and the Incidence of Esophagus Cancer in Iran (2003-2008). *Int J Prev Med*; 2016. 7: 31-35.
8. O'Farrell NJ, Reynolds JV, Ravi N, Larkin JO, Malik V, Wilson GF et al. Evolving changes in the management of early oesophageal adenocarcinoma in a tertiary centre. *Ir J Med Sci*; 2013. 182(3): 363-36.

گزارش شده است. حذف در GSTM1 و GSTT1 باعث کاهش یا غیرفعال شدن آنزیم در نتیجه پیش‌بینی قابل توجه بهبود یا وخامت بیماری در اثر شیمی‌درمانی می‌شود (۲۲).

شواهد موجود در ۱۰ سال گذشته نقش مهم تعیین‌کننده GST را در پاسخ به درمان بیماران در بهبود سرطان تصدیق می‌کند. مشخص شده است که اساسی‌ترین مکانیسم GST توانایی متابولیز و غیرفعال کردن عوامل غیر سرطانی است (۲ و ۲۳). به هر حال در دیدگاه بیولوژیک تنظیمات GST دیدگاه مهمی را درباره درگیری این ژن‌ها در پیشرفت تومور و در نتیجه درمان بالینی سرطان مطرح کرده است (۲ و ۲۳). می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری کرد که وجود آلل نول در هر دو ژن GSTT1 و GSTM1 ممکن است در تأثیر داروهای شیمی‌درمانی و بهبود افراد اثر سوء داشته باشد و مانع بهبودی افراد شود که مشابه برخی از مطالعات در جمعیت‌های مختلف است که ارتباطاتی بین پلی‌مورفیسم ژن‌های GST و پاسخ‌های درمانی متفاوت در درمان سرطان گزارش کرده‌اند، مانند پلی‌مورفیسم در GSTP1 و GSTA1 به کمترین فعالیت آنزیمی که به بهبود بقا مرتبط است هدایت می‌کند. همین‌طور حذف در GSTM1 و GSTT1 به کاهش یا غیرفعال شدن GST هدایت می‌کند. در نتیجه پیش‌بینی بهبود بیماری در بیشتر بدخیمی‌ها به صورت درست به بهترین پاسخ در شیمی‌درمانی منجر می‌شود (۱۸). مشاهده نتایج متفاوت در بیماران با شرایط یکسان دور از انتظار نیست؛ بنابراین برای جراحان و غده‌شناسان بهبود دقت در پیش‌بینی نتایج بالینی از طریق شناسایی مارکرهای ژنتیکی که درمان را تسهیل می‌کنند مفید خواهد بود. در دهه‌های اخیر محققین در مطالعات خود دریافته‌اند که متغیرهای ژنتیکی در گسترش و پیشروی سرطان نقش دارند. تفاوت‌های فردی در پاسخ به شیمی‌درمانی یا رادیوتراپی احتمالاً به خاطر تفاوت‌های ژنتیکی آن‌هاست که منجر به نتایج بالینی متفاوت می‌شود. برای مثال SNPها متغیرهای ژنتیکی هستند که به‌طور متداول بررسی شده‌اند و ممکن است بر نتایج بالینی بیماران تأثیر داشته باشد (۱۳).

to Chemotherapy in Mexican Women with Advanced Breast Cancer. *Journal of Cancer Therapy*; 2011. 2: 354-361

22. Ofarasti G, Sadighi A, Mohtashami S. Esophagus cancer treatment by combination of chemotherapy and radiotherapy before surgery. *Mashhad medical science journal*; 1387. 52: 173-179(persian).

23. Zeng Y, Bai J, Deng LC, Xie YP, Zhao F, Huang Y. Association of the Glutathione S-transferase T1 Null Genotype with Risk of Gastric Cancer: a Meta-analysis in Asian Populations. *Asian Pac J Cancer Prev*; 2016. 17(3): 1141-1148.

9. Bosetti C, Levi F, Ferlay J, Garavello W, Lucchini F, Bertuccio P et al. Trends in oesophageal cancer incidence and mortality in Europe. *Int J Cancer*; 2008. 122(5): 1118-1129.

10. Behrens A, Ell C, Lordick F. Perioperative and Palliative Chemotherapy for Esophageal Cancer. *Viszeralmedizin*; 2015. 31(5): 341-346.

11. Bosch TM, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH. Genetic polymorphisms of drug-metabolising enzymes and drug transporters in the chemotherapeutic treatment of cancer. *Clin Pharmacokinet*; 2006. 45(3): 253-28.

12. Ekhart C, Rodenhuis S, Smits PH, Beijnen JH, Huitema AD. An overview of the relations between polymorphisms in drug metabolising enzymes and drug transporters and survival after cancer drug treatment. *Cancer Treat Rev*; 2009. 35(1): 18-3.

13. Ho RH, Kim RB. Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Clin Pharmacol Ther*; 2005. 78(3): 260-277.

14. Maeda K, Sugiyama Y. Impact of genetic polymorphisms of transporters on the pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicological properties of anionic drugs. *Drug Metab Pharmacokinet*; 2008. 23(4): 223-235.

15. Huang Y. Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev*; 2007. 26(1): 183-201.

16. Guo X, O'Brien SJ, Zeng Y, Nelson GW, Winkler CA. GSTM1 and GSTT1 gene deletions and the risk for nasopharyngeal carcinoma in Han Chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 2008. 17(7): 173-176.

17. Song Z, Shao C, Feng C, Lu Y, Gao Y, Dong C. Association of glutathione S-transferase T1, M1, and P1 polymorphisms in the breast cancer risk: a meta-analysis. *Ther Clin Risk Manag*; 2016. 12: 763-769.

18. Yang G, Shu XO, Ruan ZX, Cai QY, Jin F, Gao YT, et al. Genetic polymorphisms in glutathione-S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and survival after chemotherapy for invasive breast carcinoma. *Cancer*; 2005. 103(1): 52-58.

19. Zienolddiny S, Campa D, Lind H, Ryberg D, Skaug V, Stangeland LB et al. A comprehensive analysis of phase I and phase II metabolism gene polymorphisms and risk of non-small cell lung cancer in smokers. *Carcinogenesis*; 2008. 29(6): 1164-1169.

20. Altinisik J, Balta ZB, Aydin G et al. Investigation of glutathione S-transferase M1 and T1 deletions in lung cancer. *Mol Biol Rep*; 2010. 37(1): 263-267.

21. Soto-Quintana O, Cabrera-Galeana P, Téllez-Trevilla G, Barrera-Franco JL, Juárez-Ramiro A, Castillo-Cadena J.

Relationship of Polymorphisms of Glutathione S-Transferase GSTT1 and GSTM1 with the Response

Simultaneous detection of *GSTM1*, *GSTT1* polymorphisms and its relationship to resistance to chemotherapy drugs in esophagus cancer patients

Masomeh Radpoor, MSc of Biology-Genetics, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran.

***Golnaz Asaadi Tehrani**, PhD, Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran (*Corresponding author).
golnaz_asaadi@yahoo.com

Abstract

Background: Genetic polymorphisms in enzymes involved in carcinogen metabolism have been shown to influence susceptibility to cancer. The glutathione S-transferase (GST) genes are involved in the detoxification of a broad range of toxic substances, so polymorphic deletions of *GSTM1* and *GSTT1* genes may involve as a risk factor for esophagus carcinoma. The aim of this research was to investigate the association between null mutations of *GSTM1* and *GSTT1* genes with esophagus carcinoma susceptibility in Iranian patients were under chemo therapy with platinum drugs.

Methods: We conducted a case –control study of 50 esophagus carcinoma cases and 50 controls. Genomic DNA was extracted from blood samples, then *GSTM1* and *GSTT1* deletion variants were genotyped by multiplex PCR assay. Logistic regression analysis was used by SPSS 19 to estimate odds ratios and 95% confidence intervals (95% CI).

Results: Our results indicate that the frequency of esophagus cancer patients with the *GSTM1* null genotype is significantly higher than that of the normal controls (48% and 13%, respectively) with an odds ratio (OR) of 2.62 and (p=0.024), In contrast, our investigation failed to demonstrate any difference in the distribution of *GSTT1* null genotype between patients and controls (32 and 24% respectively) (p=0.37). In this study (26 patients) 52% of patients with esophageal cancer who were treated with chemotherapy, not turning a useful these drugs. In most cases (18%), they were persons with Null genotype in both genes.

Conclusion: the results of the current study indicate that *GSTM1* may be genetic susceptibility factor involved in early events leading to the development of esophageal cancer. Polymorphisms of *GSTT1* were not associated with the increased esophageal cancer risk.

Keywords: Esophageal Cancer, Chemotherapy, Glutathione- S – transferas, *GSTT1*, *GSTM1*