ORIGINAL ARTICLE

Analysis of GSTM1 Polymorphism and Abortion in Guilan Province

Rezvan Ahmadi[1],
Zivar Salehi[1],
Ziba Zahiri[2],
Mahdieh Faraji Saravani[1]

[1] Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
[2] Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

(Received May 3, 2013 ; Accepted June 29, 2013)

Abstract

Background and purpose: Spontaneous abortion (SA) is pregnancy termination prior to 20 weeks gestation or with a fetus born weighing less than 500 grams. The etiology of spontaneous abortion (SA) remains unclear, but it may be related to a possible genetic predisposition. The glutathione S-transferases (GSTs) are a family of enzymes involved in the detoxification of a wide range of chemicals. Polymorphic deletion in GSTM1 gene causes no enzyme production leading to no an antioxidant activity. In this study, the relationship between SA and GSTM1 gene polymorphism in Guilan province was investigated.

Material and Methods: Genomic DNA was extracted from 80 patients with SA and 100 healthy women. PCR was performed in two stages of Internal Standard-Controlled PCR and Nested-PCR.

Results: 37.5% of the cases with SA had the GSTM1 null genotype and 12% deletion was observed in the control group ($P<0.002$). The distribution of GSTM1-active genotypes was significantly different in patients and controls ($P= 0.0001$), as frequency of AA or AO (GSTM1) genotype in patients were 88% and in control group 15%.

Conclusion: Homozygous deletion of the GSTM1 gene in women could be a risk factor for spontaneous abortion in Guilan province

Keywords: Abortion, GSTM1, Gene Polymorphism

J Mazand Univ Med Sci 2014; 24(Supple 1): 234-241 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم ویژه نامه ۱ اسفند سال ۱۳۹۲ (۲۴۱-۲۳۴)

بررسی پلی مورفیسم ژن GSTM1 و سقط جنین در استان گیلان

رضوان احمدی[۱]
زیور صالحی[۱]
زیبا ظهیری[۲]
مهدیه فرجی سراوانی[۱]

چکیده

سابقه و هدف: سقط جنین خودبه‌خودی به عنوان ختم حاملگی قبل ازهفته بیستم حاملگی یا تولد نوزادی با وزن کم‌تر از ۵۰۰ گرم شناخته می‌شود. علت آن تا کنون نامعلوم باقی مانده، اما ممکن است با عوامل ژنتیکی در ارتباط باشد. گلوتاتیون اس- ترانسفرازها (GSTs) یک خانواده از آنزیم‌های دخیل در سم‌زدایی از طیف وسیعی از مواد شیمیایی هستند. حذف پلی‌مورفیک در ژن GSTM1 سبب عدم تولید آنزیم و در نتیجه عدم فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود. در این مطالعه، ارتباط بین سقط جنین و پلی‌مورفیسم ژن GSTM1، در استان گیلان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر از نوع مورد شاهدی بوده که در آن استخراج DNA ژنومی از خون ۸۰ بیمار مبتلا به سقط جنین و ۱۰۰ فرد سالم به عنوان کنترل صورت گرفت. آنالیز PCR طی دو مرحله Internal Standard-Controlled PCR و Nested PCR انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ۳۷/۵ درصد از موارد مبتلا به سقط جنین ژنوتیپ نول GSTM1 داشتند و ۱۲ درصد حذف در افراد سالم مشاهده گردید($p < ۰/۰۰۲$). توزیع ژنوتیپ های GSTM1 فعال، اختلاف معنی‌داری در گروه بیماران و کنترل‌ها نشان داد ($p < ۰/۰۰۰۱$)، به طوری‌که فراوانی ژنوتیپ AA یا AO ژن GSTM1 در بیماران برابر ۸۸ درصد و در گروه کنترل برابر ۱۵ درصد بود.

استنتاج: حذف هموزیگوت ژن GSTM1 در زنان استان گیلان، احتمالاً یک فاکتور خطر برای سقط جنین خود به خودی است.

واژه های کلیدی: سقط جنین، گلوتاتیون اس- ترانسفراز M1، پلی‌مورفیسم ژنی

مقدمه

سقط جنین خودبه خودی را ختم حاملگی قبل از هفته بیستم حاملگی بر اساس تاریخ اولین روز آخرین قاعدگی و یا تولد نوزادی که وزن او کم‌تر از ۵۰۰ گرم باشد، تعریف می‌کنند(۱). بیش از ۸۰ درصد سقط‌ها در ۱۲ هفته اول حاملگی رخ می‌دهند و پس از آن این میزان به سرعت کاهش می‌یابد(۲). در سقط جنین عوامل مختلفی از جمله فاکتورهای جنینی، فاکتورهای مادری، عوامل ایمونولوژیک، فاکتورهای محیطی، مصرف برخی از داروها و عوامل ژنتیکی دخیل می‌باشند(۲). مطالعاتی که تاکنون در مبحث اختلالات ژنتیکی مرتبط با سقط جنین خودبه‌خودی انجام گرفته است، ارتباط بین جهش‌های ژن‌هایی از جمله MTHFR، Mad2 و Bub1 را با سقط جنین خود به خودی گزارش نموده‌اند(۴،۳).

مولف مسئول: زیور صالحی- رشت: خیابان نامجو، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی E-mail: Geneticzs@yahoo.co.uk
۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۲. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۲/۱۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۲/۵/۷ تاریخ تصویب : ۱۳۹۲/۱۱/۹

در سال‌های اخیر ژن هایی که محصولات آن‌ها در متابولیسم Xenobiotic (مانند سموم محیطی و استرس اکسیداتیو) دخیل می‌باشند، مورد توجه قرار دارند. از جمله این ژن‌ها می‌توان به خانواده بزرگ ژنی گلوتاتیون S- ترانسفرازها (GSTs) اشاره کرد.

محصولات ژن‌های گلوتاتیون S- ترانسفرازها، آنزیم‌هایی می‌باشند که در متابولیسم ترکیبات زنوبیوتیک‌ها نقش دارند(۵). بنابراین این آنزیم‌ها در سم‌زدایی، حمایت در برابر فشار اکسیداتیو و در برخی موارد، در فعال‌سازی طیف وسیعی از مواد شیمیایی نقش دارند. به طور کلی این آنزیم‌ها را به عنوان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در نظر می‌گیرند. گلوتاتیون S- ترانسفرازها نقش آنتی‌اکسیدانی خود را از طریق کاتالیز اتصال گلوتاتیون احیاء (GSH) به طیف وسیعی از مواد شیمیایی سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک اگزوژنوس و اندوژنوسی که دارای گروه‌های الکتروفیل عملکردی‌اند (مانند محصولات استرس اکسیداتیو، آلوده کننده‌های محیطی و کارسینوژن‌ها) ایفا می‌کنند. بدین ترتیب مناطق الکتروفیل آن‌ها را خنثی کرده و دراغلب موارد آن‌ها را به متابولیت‌های با واکنش‌پذیری کم‌تر و انحلال‌پذیری بیش‌تر درآب تبدیل می‌کنند تا این‌که به راحتی از بدن دفع شوند(۶،۵).

ژن‌های کلاس GSTM به صورت یک خوشه ژنی متشکل از ژن‌های GSTM1-GSTM5 به صورت پشت سر هم در یک گروه ۲۰ kb بر روی کروموزوم 1p13.3 قرار گرفته‌اند(۶). ژن GSTM1 به طول ۱۲۹۵۰ bp بر روی کروموزوم 1p13.3 قرار گرفته و شامل ۸ اگزون و ۷ اینترون می‌باشد و بسیار پلی مورفیک می‌باشد(۷). این ژن به طور طبیعی دارای دو فرم آللی فعال به نام‌های GSTM1*A و GSTM1*B است که ژنوتیپ‌های حاصل از آن‌ها ژنوتیپ هایی فعال هستند. آلل A و B از طریق جا به جایی G←C در موقعیت باز ۵۳۴ با هم اختلاف می‌یابند که باعث جایگزینی لیزین به جای آسپاراژین در آمینواسید ۱۷۲ می‌شود(۸)، اما فعل و انفعالات عملی این آنزیم‌ها که توسط این آلل‌ها کدگذاری می‌شوند، مشابه است.این ژن بیش‌ترین فعالیت و عملکرد خود را زمانی دارد که ژنوتیپ افراد GSTM1 A/B باشد(۹).

یکی از مباحث جالب ژن GSTM1 انسانی، وجود پلی‌مورفیسم از نوع حذف (Deletion) وسیع و گسترده در این ژن است که سبب ایجاد آلل GSTM1*0 یا Null می‌شود که آلل نول GSTM1 غیرفعال است. چنان‌چه فردی برای آلل نول، هموزیگوس باشد، ژنوتیپ فرد GSTM1 0/0 یا ژنوتیپ نول نامیده می‌شود. در این حالت هیچ‌گونه mRNA یا محصول پروتئینی به واسطه حذف وسیع تولید نمی‌شود و لذا دارای هیچ‌گونه فعالیت آنزیمی نمی‌باشد(۱۰).

ژنوتیپ نول GSTM1 در ۱۰ تا ۶۰ درصد افراد مختلف وجود دارد که دارای محدوده فراوانی ۵۰ درصد در سفید پوستان و آسیایی‌ها و ۲۵ درصد در آفریقایی‌ها می‌باشد(۱۱). تصور می‌شود که آلل نول GSTM1، حاصل کراسینگ آور هومولوگ نابرابر بین دو توالی ۴/۲ Kb بسیار مشابه تکراری در اطراف ژن GSTM1 باشد که نتیجه آن، یک حذف ۱۵ کیلوبازی در بردارنده کل ژن GSTM1 است(۱۲). مطالعات نشان داده است که این حذف با قابلیت ابتلا به آسیب سیتوژنتیکی ناشی از موتاژن، افزایش خطر آزبستوزیس، استعمال سیگار مرتبط با سرطان مثانه و سرطان ریه ناشی از استعمال سیگار در ارتباط می‌باشد(۱۷-۱۳).

آنتی‌اکسیدان‌ها در حفظ سلامت جنین و بارداری طبیعی نقش بسیار مهمی دارند. نقش استرس اکسیداتیو در سقط جنین درچندین مطالعه مورد بررسی قرارگرفته است. باتوجه به نقش آنتی‌اکسیدانی محصول ژن GSTM1، هدف از این تحقیق بررسی دو پلی مورفیسم عملکردی و مهم این ژن یعنی حذف GSTM1 و پلی مورفیسم کدون ۱۷۲ بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد- شاهدی (Case-Control) ۸۰ فرد مبتلا به سقط جنین و ۱۰۰ زن سالم بدون سابقه سقط

جنین و حداقل دارای یک فرزند به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. از کلیه شرکت‌کنندگان در این پژوهش، رضایت نامه کتبی اخذ گردید. بیماران مبتلا به سقط جنین، قبل از مطالعه از نظر بیماری‌های عفونی، اختلالات کروموزومی، اختلالات انعقاد خون و بیماری‌های رحمی مورد بررسی قرارگرفتند و در صورت عدم وجود هر کدام از بیماری‌های مذکور، جزء گروه بیمار مورد مطالعه قرار گرفتند. از تمامی افراد مورد بررسی ۵۰۰ میکرولیتر خون تهیه گردید تا جهت استخراج DNA مورد ارزیابی قرار گیرند.

استخراج DNA

جهت استخراج DNA ژنومی از گلبول سفید خون، از کیت DNG (شرکت سیناژن، ایران) استفاده شد. بررسی DNA استخراج شده توسط الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد صورت گرفت. جهت تعیین غلظت DNA استخراج شده از اسپکتروفتومتری استفاده گردید. DNA استخراج شده تا زمان انجام واکنش PCR در دمای °C ۲۰- نگهداری شد.

واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)

به منظور بررسی پلی‌مورفیسم حذف ژن GSTM1 از واکنش PCR با کمک جفت پرایمرهای G1، G2 (جدول شماره ۱) استفاده گردید(۱۸). در صورت حضور ژن GSTM1 باندی به طول ۲۷۱ جفت باز تکثیر می‌گردید. در صورت حضور ژنوتیپ هموزیگوت نول باندی آشکار نمی‌شد. بنابراین از تکثیر ژن گیرنده آندروژن به عنوان کنترل داخلی، هم‌زمان در واکنش PCR استفاده گردید.

برنامه PCR شامل °C ۹۴ به مدت ۷ دقیقه، ۳۵ سیکل در دمای °C ۹۴ برای مدت زمان ۴۰ ثانیه، °C۵۹ برای مدت ۱ دقیقه و °C۷۲ برای مدت ۱ دقیقه بود. در نهایت نیز بسط نهایی در °C۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. در مرحله بعد جهت شناسایی پلی‌مورفیسم کدون ۱۷۲ ژن GSTM1، بر اساس مطالعه Baranova و همکاران، از روش Nested-PCR استفاده گردید(۱۸). بدین منظور در واکنش آغازین PCR از پرایمرهای G6 و G18 به عنوان جفت پرایمرهای خارجی و در واکنش نهایی PCR از جفت پرایمرهای G8 و G9 تحت عنوان پرایمرهای داخلی استفاده گردید.

جدول شماره ۱: پرایمرهای استفاده شده برای تعیین پلی مورفیسم در ژن GSTM1

نام پرایمر	توالی پرایمر
G1	5'-CTGCCCTACTTGATTGATGGG-3'
G2	5'-CTGGATTGTAGCAGATCATGC-3'
G6	5'-CTCAAAGCGGGAGATGAAAGTC-3'
G18	5'-ACCATATGCAGCTGGGCATGA-3'
G7	5'-AGGCGTCCAAGCAG-3'
G8	5'-AGGCGTCCAAGCAC-3'
G9	5'-TAAAGCTCTACTCAGAGT-3'
F- ژن گیرنده آندروژن	5'-CACAGGCTACCTGGTCCTGG-3'
R- ژن گیرنده آندروژن	5'-CTGCCTTACACAACTCCTTGGC-3'

برنامه مرحله اول Nested PCR شامل °C۹۴ به مدت ۷ دقیقه، ۳۰ سیکل در دمای °C۹۴ برای مدت زمان ۴۰ ثانیه، °C۵۹ برای مدت ۱ دقیقه و °C۷۲ برای مدت ۱ دقیقه بود. در نهایت نیز بسط نهایی در °C۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. بعد از انجام این مرحله از PCR، برنامه مرحله دوم Nested PCR شامل °C۹۴ به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل در دمای °C۹۴ برای مدت ۴۰ ثانیه، °C۵۸/۵ برای مدت ۱ دقیقه و °C۷۲ برای مدت ۹۰ ثانیه بود. در نهایت نیز بسط نهایی در °C۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. پرایمرهای داخلی، ۲۱۴ جفت باز را درون توالی تقویت شده توسط پرایمرهای بیرونی، تقویت می کنند. بررسی محصولات PCR توسط الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد صورت گرفت و رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید انجام شد. باندهای DNA توسط دستگاه Gel Documentation (شرکت بیوراد، آمریکا) مشاهده گردید.

آنالیزهای آماری با استفاده از تست (χ^2) Chi-Square و Med Calc (Version 9.6.4.0) انجام شد. $p < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته

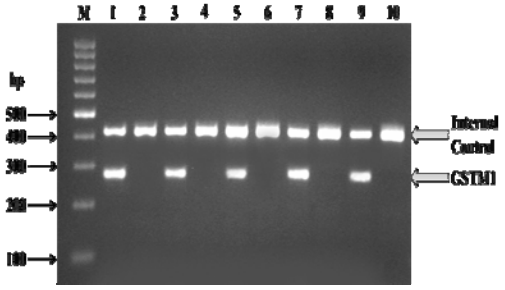
شد. آزمون Odds Ratio همراه با پارامتر CI یا فاصله اطمینان ۹۵ درصد محاسبه شد.

یافته ها

میانگین سنی بیماران ۲/۳± ۲۷/۳۲ و میانگین سنی برای گروه کنترل ۳/۶± ۲۸/۴۰ بود. بنابراین در این رابطه اختلاف معنی‌داری بین گروه بیمار و کنترل وجود نداشت.

نتایج پلی مورفیسم ژن GSTM1

ژنوتیپ‌های GSTM1 با موفقیت در تمام افراد ثبت نام شده، شناسایی شدند که فراوانی ژنوتیپ‌ها در جدول شماره ۲ ذکر شده است. حضور ژنوتیپ GSTM1 با قطعه‌ای به طول ۲۷۱ bp مشخص شد، در حالی که ژنوتیپ هموزیگوت حذف یا نول GSTM1 هیچ قطعه‌ای را نشان نداد (تصویر شماره ۱).

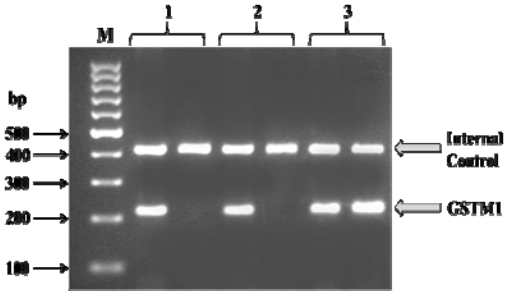


تصویر شماره ۱:تشخیص آلل نول ژن GSTM1 توسط PCR. M= DNA مارکر، نمونه های ۱، ۳، ۵، ۷ و ۹، افراد دارای ژن GSTM1 فعال، نمونه های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰، افراد دارای ژن GSTM1 غیر فعال (آلل نول) می باشند. طول قطعه تکثیر شده ژن GSTM1، bp ۲۷۱ و طول قطعه تکثیر شده به عنوان کنترل داخلی، bp ۴۱۶ می‌باشد.

حذف ژن GSTM1 در ۳۰ بیمار (۳۷/۵درصد) وجود داشت.از ۱۰۰ فرد سالم، ۱۲ نفر (۱۲ درصد) دارای حذف ژن GSTM1 بودند (جدول شماره ۲) مقدار χ^2 برای تفاوت فراوانی حذف بین افراد سالم و بیمار برابر با ۸/۸۶ با مقدار P معادل ۰/۰۰۲ بود. بر این اساس تفاوت معنی‌داری بین حذف ژن GSTM1 در دو گروه موردنظر مشاهده گردید.

آلل های A و B ژن GSTM1

جهت شناسایی آلل‌های A و B در کدون ۱۷۲ ژن GSTM1، از تمامی افراد به جز افرادی که ژنوتیپ هموزیگوت حذف داشتند، از روش Nested-PCR استفاده گردید (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۲: تشخیص آلل A و B ژن GSTM1 توسط روش Nested PCR. M= DNA مارکر، فرد شماره ۱، دارای GSTM1A/A یا GSTM1A/O، فرد شماره۲، دارای GSTM1B/B یا GSTM1B/O و فرد شماره ۳، دارای ژنوتیپ فعال GSTM1A/B می باشند. طول ناحیه تکثیر شده، bp ۲۱۴ و طول قطعه تکثیر شده به عنوان کنترل داخلی، bp ۴۱۶ می باشد.

از ۸۰ فرد بیمار که ۵۰ نفر از آن‌ها دارای GSTM1 فعال بودند، ۴۴ نفر (۸۸ درصد) دارای ژنوتیپ A0 یا AA، ۲ نفر (۴ درصد) دارای ژنوتیپ AB و۴ نفر (۸ درصد) دارای ژنوتیپ B0 یا BB بودند. از ۱۰۰ فرد سالم که ۸۸ نفر آن ها دارای GSTM1 فعال بودند، ۱۳ نفر(۱۵ درصد) دارای ژنوتیپ A0 یا AA، ۴۴ نفر (۵۰ درصد) دارای ژنوتیپ AB و ۳۱ نفر (۳۵ درصد) دارای ژنوتیپ B0 یا BB بودند (جدول شماره ۳). مقدار χ^2 برای تفاوت فراوانی آللی و ژنوتیپی برابر با ۷۰/۹۵ با مقدار P معادل ۰/۰۰۰۱ است. بر اساس این آزمون تفاوت معنی‌داری بین آلل ها و ژنوتیپ‌ها در دو گروه فوق مشاهده شد.

جدول شماره ۲: تعداد و درصد حذف (Deletion) مشاهده شده در افراد سالم و بیمار و نتیجه آزمون Odds-Ratio

ژن	آلل ها	بیماران مبتلا به سقط جنین تعداد (درصد)	کنترل ها تعداد (درصد)	فاکتور خطر (فاصله اطمینان ۹۵ درصد)	مقدار p
GSTM1	مثبت (فعال)	۵۰ ۶۲/۵ درصد)	۸۸ (۸۸)	۱/۰۰ (رفرنس)	-
	نول (غیر فعال)	۳۰ ۳۷/۵ درصد)	۱۲ (۱۲)	۴/۴ (۹/۳۵۳۱-۲/۰۶۹۹)	۰/۰۰۰۱

جدول شماره ۳: تعداد و درصد آلل ها و ژنوتیپ های مشاهده شده در دو گروه سالم و بیمار

ژن	ژنوتیپ ها	بیماران (سقط جنین) تعداد (درصد)	کنترل ها تعداد (درصد)	فاکتور خطر (فاصله اطمینان ۹۵ درصد)	مقدار p
GSTM1	AB + BB or B0	۶ (۱۲)	۸۸ (۸۵)	۱,۰۰ (رفرنس)	-
	AA or A0	۴۴ (۸۸)	۱۳ (۱۵)	۴۲/۳۰۷۷ (۱۱۹/۲۷۷۹-۱۵/۰۰۶۵)	۰۰۰۱/۰

ارتباط ابتلا به سقط جنین و ژنوتیپ های GSTM1:

همان‌طور که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود، فراوانی حذف (Deletion) در افراد بیمار ۳۷/۵ درصد می‌باشد بنابراین زنان دارای ژنوتیپ GSTM1 0/0، ۴/۴ برابر بیش‌تر در معرض خطر سقط جنین در مقایسه با زنان دارای دیگر ژنوتیپ‌ها قرار دارند (p =۰/۰۰۰۱ ۹/۳۵- ۲/۰۶= CI95%، ۴/۴= OR) توزیع ژنوتیپ‌های GSTM1 فعال، اختلاف معنی‌داری در بیماران و کنترل‌ها داشت (p =۰/۰۰۰۱)، به‌طوری‌که فراوانی ژنوتیپ AA یا AO ژن GSTM1 در بیماران برابر با ۸۸ درصد و در گروه کنترل برابر با ۱۵ درصد بود. بنابراین ژنوتیپ AA یا AO ممکن است یک فاکتور خطر برای سقط جنین باشد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که احتمالاً حذف GSTM1 در مادر می‌تواند در بروز سقط جنین مؤثر باشد.

بحث

گلوتاتیون اس- ترانسفرازها پروتئین‌های چند عاملی (مولتی فاکتوریال) هستند که واکنش‌های بسیاری را بین گلوتاتیون و ترکیبات لیپوفیلیک با مراکز الکتروفیل از جمله واکنش‌های سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک را کاتالیز می‌کنند. با توجه به نقش آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های GST و رابطه احتمالی استرس اکسیداتیو در سقط جنین، در این مطالعه به بررسی تغییر مهم ژن GSTM1 یا حذف GSTM1 و پلی‌مورفیسم کدون ۱۷۲ این ژن در سقط جنین، پرداخته شد. حذف ژن GSTM1 در ۳۷/۵ درصد از بیماران مبتلا به سقط جنین (۳۰ مورد از ۸۰ بیمار) بود. در حالی‌که از ۱۰۰ فرد سالم، تنها در ۱۲ نفر(۱۲ درصد) حذف مشاهده شد. این نتایج حاکی از این مطلب است که احتمالاً ژنوتیپ GSTM1 0/0 نقش مؤثری در بروز بیماری سقط جنین در جمعیت مورد مطالعه داشت. این یافته هم‌سو با یافته‌های مطالعه Sata و همکاران می‌باشد. در این مطالعه بین سقط جنین و ژنوتیپ هموزیگوت نول ارتباط مشخصی وجود داشت. در ضمن فراوانی ژنوتیپ نول هموزیگوت GSTM1 در زنان با سقط مکرر خود به خودی بیش‌تر از زنان با سابقه در یک یا دو سقط جنین بود(۲۰). این یافته هم‌چنین با یافته‌های مطالعه Polimanti و همکاران نیز هم‌سو می‌باشد. در این مطالعه، بین سقط جنین راجعه و ژنوتیپ هموزیگوت نول ژن GSTM1 و هم‌چنین پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی در GSTA1 ارتباط متقابل معنی‌داری وجود داشت که باعث افزایش خطر سقط جنین راجعه می‌شد(۲۱).

Hirvonen و همکاران ارتباط سقط جنین خود به خودی مکرر و ژنوتیپ نول GSTM1 را در کارولینای شمالی گزارش نمودند، در حالی‌که ارتباط معکوسی بین خطر سقط جنین خود به خودی و ژنوتیپ نول GSTM1 در نیویورک وجود داشت(۲۲). Mendola و همکارانش ۳۲ مورد را در نیویورک جنوبی جهت

بررسی ارتباط بین سقط جنین خود به خودی مکرر و ژنوتیپ نول GSTM1 مطالعه کردند اما هیچ گونه ارتباطی نیافتند(۲۳). Zusterzeel و همکاران نیز ۱۸۷ مورد را در هلند جهت بررسی ارتباط بین سقط جنین خود به خودی مکرر و ژنوتیپ نول GSTM1 مطالعه کردند. نتایج آن‌ها ارتباط مشخصی را بین سقط جنین خودبه خودی و ژنوتیپ نول GSTM1 نشان نداد.اگر چه فاکتورهای محیطی متعددی از قبیل استعمال دخانیات و مصرف الکل و کافئین در نظر گرفته شدند(۲۴). با وجود این، مطالعات بعدی ارتباطی را بین پلی‌مورفیسم GSTP1 و سقط جنین خود به خودی مکرر یافتند(۲۴). اختلاف در مطالعات پلی‌مورفیسم ژنی می‌تواند به دلیل اندازه جمعیت مورد بررسی، خزانه ژنتیکی متفاوت و حتی روش‌های مولکولی مورد بررسی متفاوت باشد.

در حالت عادی و طبیعی ژن GSTM1 به دو شکل آللی فعال وجود دارد: GSTM1*A و GSTM1*B. این دو آلل از لحاظ عملکردی کاملاً مشابه هستند و تفاوت آن‌ها فقط در نوکلئوتید شماره ۵۳۴ است و مونومرهایی را کدگذاری می‌کنند که آنزیم‌های فعال هومودایمریک و هترودایمریک را تشکیل می‌دهند. فعل و انفعالات عملی این آنزیم‌ها که توسط این آلل‌ها کدگذاری می‌شوند، مشابه است. با توجه به این‌که ژن GSTM1 بالاترین فعالیت خود را زمانی دارد که فرد دارای ژنوتیپ GSTM1 A/B باشد(۹)، در بخش دیگری از این تحقیق به بررسی توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های فعال در بین افراد سالم و بیماران که دارای ژن GSTM1 فعال بودند، با استفاده از روش Nested-PCR پرداخته شد. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که در افراد سالم فراوانی ژنوتیپ های AA یا AO ، BB یا BO و AB به ترتیب برابر با ۱۵ درصد، ۳۵ درصد و ۵۰ درصد و در افراد بیمار به ترتیب برابر ۸۸ درصد، ۸ درصد و ۴ درصد بود. تفاوت مشاهده شده بین افراد سالم و بیمار با توجه به نتیجه آزمون Chi-Square ($p < ۰/۰۰۰۱$، $\chi^2 = ۷۰/۹۵$) از لحاظ آماری معنی‌دار است. با توجه به این‌که فراوانی ژنوتیپ AA یا AO در بیماران بیش‌تر از افراد سالم بود، بنابراین افراد با ژنوتیپ AA یا AO احتمال خطر بیش‌تری برای ابتلا به بیماری سقط جنین داشتند. فراوانی ژنوتیپ AB که در گروه سالم بیش‌تر از گروه بیمار است نشان دهنده فعالیت بیش‌تر این ژن در گروه کنترل است و این احتمالاً می‌تواند دلیلی برای وجود سقط جنین در گروه بیمار باشد.

با توجه به نقش ژن GSTM1 در سم زدایی طیف وسیعی از مواد سمی، فقدان عملکرد این ژن احتمالاً می‌تواند سبب عدم تعادل و توازن هورمون‌های جنسی، تغییر فاکتورهای رشد و پاسخ‌های ایمنی بدن شود(۲۵).

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که پلی‌مورفیسم حذف ژن GSTM1 می‌تواند با سقط جنین در جمعیت مورد مطالعه مرتبط باشد. با توجه به این‌که بیماری سقط جنین یک بیماری چند عاملی است، لذا پیشنهاد می‌گردد که جهت تعیین نقش GSTM1 در این بیماری، مطالعات در جمعیت بزرگ‌تر و هم‌چنین تأثیر سایر عوامل دخیل در آن نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

سپاسگزاری

از حوزه تحصیلات تکمیلی دانشگاه گیلان به جهت تأمین منابع مالی این تحقیق سپاسگزاری می‌نمائیم.

References

1. Cunningham FG, Leveno Kenneth J, Bloom Steven L, Hauth John C, Rouse Dwight J, Spong Catherine Y. Abortion. In: *Williams* Obstetrics. 23rd ed. New York, NY: Mc Graw Hill Medical; 2010. p. 215-237.
2. Harlap S, Shiono PH. Alcohol, smoking, and incidence of spontaneous abortions in the first and second trimester. Lancet 1980; 8187: 173-176.
3. Shi Q, Hu M, Luo M, Liu Q, Jiang F, Zhang

Y, et al. Reduced expression of Mad2 and Bub1 proteins is associated with spontaneous abortions. Molecular Human Reproduction 2011; 17: 14-21.

4. Kim SY, Park SY, Choi JW, Kim DJ, Lee SY, Lim JH, et al. Association Between MTHFR 1298A>C Polymorphism and Spontaneous Abortion with Fetal Chromosomal Aneuploidy. American Journal of Reproductive Immunology In Press; 2011.
5. Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. Pharmacology 2000; 61(3): 154-166.
6. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione S-transferase family of enzymes. Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 2001; 482(1): 21-26.
7. Smith K, Vatman D, Ponce J. Genetic polymorphism and SNPs. Fertil Steril 2002; 14(3): 224-235.
8. Carlsten C, Sagoo GS, Frodsham AJ, Burke W, Higgins JPT. Glutathione S-Transferase M1 (GSTM1) Polymorphisms and Lung Cancer: A Literature-based Systematic HuGE Review and Meta-Analysis. Human Genome Epidemiology (HuGE) Review 2008; 167(7): 759-774, 104.
9. Baranov VS, Ivaschenko T, Bakay B, Aseev M, Belotserkovskaya R, Baranova H, et al. Proportion of the GSTM1 0/0 genotype in some Slavic population and its correlation with cystic fibrosis and some multifactorial disease. Human Genetics 1996; 97: 516-520.
10. Ford JG, Li Y, Osullivan MM, Demopoulos R, Garte S, Taioli E, et al. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and lung cancer risk in African-Americans. Carcinogenesis 2000; 21(11): 1971-1975.
11. La Torre G, Boccia S, Ricciardi G. Glutathione S-transferase M1 status and gastric cancer risk: a meta-analysis. Cancer Lett 2005; 217(1): 53-60.
12. Norskov MS, Frikke-Schmidt R, Loft S, Tybjaerg-Hansen A. High-throughput genotyping of copy number variation in glutathione S-transferases M1 and T1 using real-time PCR in 20687 individuals. Clinical Biochemistry 2009; 42(3): 201-209.
13. Wiencke JK, Kelsey KT, Lamela RA, Toscano WA Jr. Human glutathione S-transferase deficiency as a marker of suscept-ibility to epoxide-induced cytogenetic damage. Cancer Res 1990; 1: 1585-1590.
14. Smith CM, Kelsey KT, Wiencke JK, Leyden K, Levin S, Christiani DC. Inherited glutathione-S-transferase deficiency is a risk factor for pulmonary asbestosis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1994; 3: 471-477.
15. Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. J Natl Cancer Inst 1993; 21: 1159-1164.
16. Seidegard J, Pero RW, Miller DG, Beattie EJ. A glutathione transferase in human leukocytes as a marker for the suscept- ibility to lung cancer. Carcinogenesis 1986; 7(5): 751-753.
17. Heckbert SR, Weiss NS, Hornung SK, Eaton DL, Motulsky AG. Glutathione S-transferase and epoxide hydrolase activity in human leukocytes in relation to risk of lung cancer and other smoking-related cancers. J Natl Cancer Inst 1992; 18: 414-422.
18. Baranova H, Canis M, Ivaschenko T, Albuisson E, Bothorishvilli R, Baranov V, et

al. Possible involvement of arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione s-transferase M1 and T1 gene in the development of endometriosis. Molecular Human Reproduction 1999; 5: 636-641.

19. Mayani A, Barel S, Soback S, Almagor M. Dioxin concentrations in women with endometriosis. Human Reproduction 1997; 12: 373-375.
20. Sata F, Yamada H, Kondo T, Gong Y, Tozaki S, Kobashi G, et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms and the risk of recurrent pregnancy loss. Molecular Human Reproduction 2003; 9(3): 165-169.
21. Polimanti R, Piacentini S, Lazzarin N, Vaguero E, Re Ma, Manfellotto D, et al. Glutathione S-transferase genes and the risk of recurrent miscarriage in Italian women. Fertil Steril 2012; 98(2): 396-400.
22. Hirvonen A, Taylor JA, Wilcox A, Berkowitz G, Schachter B, Chaparro C, et al. Xenobiotic metabolism genes and the risk of recurrent spontaneous abortion. Epidemiology 1996; 7: 206-208.
23. Mendola P, Moysich KB, Freudenheim JL, Shields PG, Schisterman EF, Graham S, et al. Risk of recurrent spontaneous abortion, cigarette smoking, and genetic polymorphisms in NAT2 and GSTM1. Epidemiology 1998; 9: 666-668.
24. Zusterzeel PL, Nelen WL, Roelofs HM, Peters WH, Blom HJ, Steegers EA. Polymorphisms in biotransformation enzymes and therisk for recurrent early pregnancy loss. Mol Hum Reprod 2000; 6(5): 474-478.
25. Guo SW. Glutathione s-transferase M1/T1 gene polymorphisms and endometriosis: a mete-analysis of genetic association studies. Molecular Human Reproduction 2005; 11(10): 729-743.