

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Tip 1 Diyabet (T1D)'li Türk Hastalarda Glutatyon-S-Transferaz (GSTT1 ve GSTM1) Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması

Mutlu KARKUCAK¹, Soner CANDER², Adem DELİGÖNÜL³, Gökhan OCAKOĞLU⁴,
Tuna GÜLTEN⁵, Özen ÖZ GÜL⁶, Orhan GÖRÜKMEZ⁵, Mustafa Ferhat ÖKSÜZ³,
Tahsin YAKUT⁵

¹ Sakarya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik Bölümü, Sakarya.

² Şevket Yılmaz Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Endokrinoloji Bölümü, Bursa.

³ Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa.

⁴ Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Bursa.

⁵ Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Bursa.

⁶ Çekirge Devlet Hastanesi, Endokrinoloji Bölümü, Bursa.

ÖZET

Oksidatif stres, tip 1 diyabet (T1D) ve komplikasyonlarının gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı savunma sistemlerinden biri de Glutatyon-S-Transferaz (GST)'dir. Çalışmamızda, GSTT1 ve GSTM1 gen polimorfizmleri ile T1D'li Türk hastalar arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık. Çalışmamıza, T1D tanısı konmuş 71 hasta ile 62 kontrol bireyi dahil edildi. GSTM1 ve GSTT1 gen polimorfizmini değerlendirmek için multiplex PCR yöntemi kullanıldı. İstatistiksel analizde anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak belirlendi. GSTT1 ve GSTM1 negatif(null) genotipleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$). Bu sonuçlar GSTT1 ve GSTM1 negatif(null) genotiplerinin T1D ve komplikasyonların gelişimi için katkısının olmadığını göstermektedir fakat daha geniş olgu sayılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Polimorfizm. Tip 1 diyabet. GSTT1 geni. GSTM1 geni.

Investigation of Glutathione-S-Transferases (GSTT1 and GSTM1) Gene Polymorphisms in Turkish Patients with Type 1 Diabetes(T1D)

ABSTRACT

Oxidative stress plays an important role in the development of type 1 diabetes(T1D) and its complications. Glutathione-S-Transferases (GST) is one of the defense systems against the harmful effects of oxidative stress. In our study, we aimed to investigate the relationship between GSTT1 and GSTM1 gene polymorphisms and Turkish patients with T1D. In our study, 71 patients were diagnosed with T1D and 62 control subjects were included. GSTM1 and GSTT1 gene polymorphisms were used to evaluate the multiplex PCR method. In statistical analysis, the level of significance was set at $p < 0.05$. GSTT1 and GSTM1-negative (null) genotypes were evaluated statistically, no significant difference was found between the groups ($p > 0.05$). These results show that GSTT1 and GSTM1-negative (null) genotypes may not contribute to the development of T1D and its complications but more studies with larger sample size are needed.

Key Words: Polymorphism. Type 1 Diabetes. GSTT1 gene. GSTM1 gene.

Geliş Tarihi: 28.02.2012

Kabul Tarihi: 22.03.2012

Dr. Tahsin YAKUT

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Bursa.

Tel.: 0224 295 43 71

e-posta: tyakut@uludag.edu.tr

Tip 1 diyabet (T1D), insülin üreten pankreas beta hücrelerinin T-hücre aracılı yıkımı sonucunda ortaya çıkan otoimmün bir hastalıktır. Patogenezinde genetik ve çevresel faktörlerin etkili olduğu karmaşık bir süreçtir¹⁻⁴. Diyabette gözlenen hipergliseminin hastalarda oksidatif strese neden olduğu literatürlerde bildirilmiş olup oksidatif stresin ise diyabet ve komplikasyonlarının gelişiminde önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir. Oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı savunma sistemlerinden birisi Glutatyon-S-transferaz (GST)'dir⁵⁻⁷. GST, hücre sel detoksifikasyonda ve

birçok fizyolojik ve ksenobiyotik maddelerin atılımında önemli bir rol oynayan çok fonksiyonlu bir enzim ailesidir. İnsanda GST, alpha, mu, omega, pi, sigma, theta gibi çeşitli sınıflara ayrılmış olup birçok organda sentezlenmektedir. Hücre tipine ve gen polimorfizmlerine göre ekspresyonları değişebilmektedir. Özellikle GSTT1 ve GSTM1 kodlayan genlerin yüksek polimorfik özellikte olduğu bilinmektedir^{6,8-10}. Çalışmalarda, 1. kromozomun kısa kolunda lokalize olan GSTM1 geni ile 22. kromozomun uzun kolunda lokalize olan GSTT1 genindeki homozigot delesyonlar (null genotip) sırasıyla % 40-60 ve % 10-20 oranlarında bulunmuş ve bu genotipin enzim aktivitesinde azalmalara neden olduğu saptanmış. Dolayısıyla oksidatif strese karşı savunma kapasitesinde bozulmalar sonucu diyabet ve komplikasyonlarının gelişebileceği belirtilmiştir^{7,10}. GSTT1 ve GSTM1 gen polimorfizmleri ile T1D ilişkisini araştıran çalışmalar sınırlı sayıda olup retinopati, nöropati, nefropati gibi komplikasyonlara etkisi tam olarak bilinmemektedir¹⁰⁻¹⁴.

Bu çalışmamızda, Türk T1D hastalarında GSTT1 ve GSTM1 gen polimorfizmlerinin hastalık gelişimine etkisini incelemeyi ve komplikasyonlarla olası ilişkiyi araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Çalışmaya Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji Bilim Dalı'na başvuran T1D tanısı almış 71 hasta dahil edildi. Kontrol grubu ise herhangi bir diyabet hikayesi olmayan 62 bireyden oluşmaktaydı. Kişilerin yaş, cinsiyet, genotip ve gelişen komplikasyonlar dahil olmak üzere demografik bilgileri kayıt edildi. Çalışma için Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alınmış olup çalışmaya katılan hastalar çalışma hakkında bilgilendirilmiştir.

DNA İzolasyon kiti (Dr. Zeydanlı Hayat bilimleri, Türkiye) prosedürü kullanılarak alınan kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA'larda GST M1 ve GST T1 genlerinin polimorfizmini belirlemek için multipleks PCR yöntemi kullanıldı. GST-T1 polimorfizmi için forward 5'-TTCCTTACTGGTCCACATCTC-3' ve reverse 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3' primerleri, GST-M1 polimorfizmi için forward 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' ve reverse 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3' primerleri, internal kontrol amacı için ise Albumin forward 5'-GCCCTCTGCTAACAAGTCCCTAC-3' ve reverse 5'-GCCCTAAAAGAAAATCCCCAATC-3' primerleri kullanıldı^{15,16}. PCR kondüsyonları; 5 dakika 94 °C'de ilk denatürasyon , 35 siklus (94 °C'de 1 dakika (denatürasyon), 58 °C'de 1 dakika (annealing), 72 °C'de 1 dakika(uzama) ve son olarak 72 °C'de 10 dakika(son uzama) şeklinde yapıldı. Albumin için 350 bazçifti(bç), GSTM1 için 219 bç ve GSTT1 için

459 bç PCR ürünü oluşması beklendi.. Oluşan ürünler değerlendirmek için ethidium bromide katılmış %2'lik agaroz jelde yürütüldü. Öncelikle reaksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini gösteren albumin geninin kontrol 350 bç ürün bantına bakıldı. Kontrol ürünü yoksa PCR tekrar edildi. GSTT1 geninin(459 bç) ve GSTM1 geninin(219 bç) PCR ürünü varsa 'pozitif genotip' yoksa homozigot delesyon varlığını gösteren 'negatif(null) genotip' olarak genotip tayini yapıldı.

Çalışmada yaş değişkeni tanımlayıcı istatistik olarak medyan(minimum-maksimum) değerleriyle ifade edilmiş olup hasta ve kontrol grupları arasındaki karşılaştırması Mann Whitney U testi kullanılarak yapılmıştır. Kategorik değişkenler ise sayı ve ilgili yüzde değerleriyle ifade edilmiş olup, kategorik değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında Pearson ve Yates düzeltmeli ki-kare testi kullanılmıştır. Çalışmanın analizleri SPSS 13.0(Chicago, IL.) programında yapılmış olup p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular

Çalışma, 71 T1D hasta ve 62 kontrol olmak üzere 113 bireyden oluştu. Hasta grubunun 45'i(%63.4) kadın, 26'sı (%36.6) erkekti ve medyan yaşı 29(18-61) yılı. Kontrol grubunda ise 38 (%61.3) kadın ve 24 (%38.7) erkek olup medyan yaşı 31(20-47) yılı. Hasta ve kontrol grubu arasında cinsiyet ve yaş açısından anlamlı bir farklılık gözlenmedi (sırasıyla p=0.945,p=0.227,) (Tablo I).

Tablo I- Hasta ve kontrol gruplarında klinik özellikler ve GST gen polimorfizmlerinin dağılımı

	Hasta grubu n=71	Kontrol grubu n=62	p- değeri
Cinsiyet			
Kadın	45(63.40)	38(61.30)	0.945
Erkek	26(36.60)	24(38.70)	
Yaş (yıl)	29(18-61)	31(20-47)	0.227
GSTT1 gen polimorfizmi			
T1 Pozitif genotip	54(76)	47(76)	1.000
T1 Negatif genotip (null genotip)	17(24)	15(24)	
GST M1 gen polimorfizmi			
M1 Pozitif genotip	27(38)	28(45)	0.405
M1 Negatif genotip (null genotip)	44(62)	34(54)	

T1D hasta grubunda GSTT1 negatif (null) genotipi taşıyan hasta sayısı 17(%24) bulunurken kontrol grubunda ise 15(%24) olarak saptandı. Gruplar GSTM1

Tip 1 Diyabette GST Gen Polimorfizmleri

polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde ise negatif (null) genotipi hasta grubunda 44(%62) olup kontrol grubunda ise 34(%54) idi. GSTT1 negatif(null) genotiplerin sıklıkları hasta ve kontrol gruplarında aynı oranlarda çıktı(sırasıyla,%24,%24). Genotip sıklıkları GSTM1 açısından incelendiğinde ise hasta grubunda kontrol grubuna göre yüksek çıkmıştır(sırasıyla, %64, %52). GSTT1 ve GSTM1 negatif(null) genotipleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı (sırasıyla, p=1.000, p=0.405)(Tablo I).

T1D hasta grubu kendi içinde retinopati, nefropati ve nöropati gelişimi açısından değerlendirildi. T1D hastalarının 27'sinde retinopati, 21'inde nöropati ve 22'sinde nefropati gelişimi gözlemlendi. Hastalar, retinopati, nöropati ve nefropati gelişimi ile genotip sıklıkları açısından incelendiğinde istatistik olarak anlamlılık gözlenmedi (p=1.000)(Tablo II).

Tablo II- GSTT1 ve GSTM1 gen polimorfizmlerinin komplikasyonlara(retinopati, nöropati, nefropati) göre dağılımı ve ilişkisi

	GSTT1 Pozitif n=54	GSTT1 Negatif n=17	p değeri	GSTM1 Pozitif n=27	GSTM1 Negatif n=44	p değeri
Retinopati						
var	21(38.90)	6(35.30)	1.000	10(37.00)	17(38.60)	1.000
yok	33(61.10)	11(64.70)		17(63.00)	27(61.40)	
Nöropati						
var	16(29.60)	5(29.40)	1.000	8(29.60)	13(29.50)	1.000
yok	38(70.40)	12(70.60)		19(70.40)	31(70.50)	
Nefropati						
var	17(31.50)	5(29.40)	1.000	8(29.60)	14(31.80)	1.000
yok	37(68.50)	12(70.60)		19(70.40)	30(68.20)	

Tartışma

Hipergliseminin yol açtığı oksidatif stresin diyabet komplikasyonlarının oluşumunda kritik bir faktör olduğu kabul edilmiştir. Ayrıca diyabette, reaktif oksijen türlerinin üretiminin arttığı ve antioksidan savunmada azalma olduğu gösterilmiştir^{7,17-19}. Antioksidan savunmada rol oynayan Glutatyon S-transferazlar, çok fonksiyonlu detoksifikasyon enzimleridir. GST, toksik ara maddelerin temizlenmesi ve oksidatif stresten korunmada bireysel farklılıklara neden olabilen polimorfik genler tarafından kodlanmıştır^{20,21}.

Bu çalışmamızda, polimorfik genlerinden olan GSTT1 ve GSTM1 genlerinin negatif (null) genotipi ile T1D ve komplikasyonlarının gelişimi arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık. Çalışmamızın sonuçları incelendiğinde T1D hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel bir fark gözlenmedi. Ayrıca T1D hasta grubunda retinopati, nöropati ve nefropati komplikasyonlarının gelişimi ile GSTT1 ve GSTM1 gen polimorfizmi açısından ilişki saptanmadı.

T1D komplikasyonlarının gelişimi ile GSTT1 ve GSTM1 gen polimorfizmlerinin ilişkisini araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır. Chistiakov ve ark.¹³ yaptığı çalışmada, 216 nöropati gelişen T1D hasta ile 250 nöropati gelişmeyen T1D hasta araştırılmış. Her iki grupta polimorfizmler açısından ilişki saptanmamıştır. Yine nöropatili T1D hastalarında yapılan Zotova ve ark.¹¹ çalışmasında da genotipler arasında dağılım açısından bir fark gözlenmemiş ve negatif (null) genotipin nöropati gelişimi üzerine etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Hovnik ve ark.¹⁴ yaptığı çalışmada ise retinopati ve nefropati gelişen T1D hastalarında GSTM1 negatif(null) genotipinin retinopati gelişiminde etkisi olup nefropatiye etkisinin olmadığı bulunmuştur. GSTT1 negatif(null) genotipinin ise hem retinopati hem de nefropati ile ilişkisinin olmadığı görülmüştür. Ayrıca GSTM1 negatif genotipinin diyabette retinopati gelişme riskini arttırdığı için genetik panele bir belirteç olarak eklenebileceği önerilmiştir.

Bekris ve ark.¹⁰ yaptığı çalışmada ise GSTT1 ve GSTM1 gen polimorfizmlerinin komplikasyonlarla ilişkisi değil de hastalık gelişimine etkisi araştırmak için vaka-kontrol çalışması yapılmıştır. İsviçre popülasyonunda yapılmış bu çalışmada GSTT1 ve GSTM1 gen polimorfizmleri açısından T1D hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmamıştır. Fakat hastalar başlangıç yaşlarına göre sınıflandırıldığında, 14-20 yaş aralığındaki GSTM1 negatif(null) genotipin hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı derecede fark bulunmuştur. Bu çalışmada T1D hasta grubunda GSTT1 ve GSTM1 negatif(null) genotip sıklıkları, %14 ve %52 oranlarında bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise sırasıyla % 24 ve %62 olarak saptadık. Bu aradaki farkın genotip sıklıklarının etnik ve coğrafik olarak değişiklik gösterebilmesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Çalışmamız, yayınlamış diğer çalışmalara göre olgu sayısının az olsa da GSTT1 ve GSTM1 gen polimorfizmlerinin farklı bir toplumdaki T1D hastalarında araştırılmış olması, hem hastalık gelişimi hem de her üç komplikasyonla ilişkisinin araştırılması açısından önem arz etmektedir. Sonuç olarak bu veriler, GSTT1 ve GSTM1 gen polimorfizmlerinin Türk T1D hastalık ve komplikasyonlarının gelişiminde rolü olmadığını göstermektedir. Bu çalışma, daha geniş T1D hasta sayılı çalışmalar yapılarak ve diğer etkisi olabilecek gen polimorfizmleri de araştırılarak desteklenmelidir.

Kaynaklar

1. Zurawek M, Fichna M, Fichna P, Januszkiwicz D, Nowak J. No evidence for association of the polymorphisms in NLRP1 gene with type 1 diabetes in Poland. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;92:e49-51.
2. Cucca F, Lampis R, Congia M, et al. A correlation between the relative predisposition of MHC class II alleles to type 1 diabetes and the structure of their proteins. *Hum Mol Genet.* 2001;10:2025-37.

3. Todd JA. From genome to aetiology in a multifactorial disease, type 1 diabetes. *Bioessays*. 1999;21:164-74.
4. Mohammadnejad Z, Ghanbari M, Ganjali R, et al. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and type 1 diabetes mellitus in Iranian population. *Mol Biol Rep*. 2012;39:831-7.
5. Domínguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care*. 1998 ;21:1736-42.
6. Fujita H, Narita T, Meguro H, et al. No association of glutathione S-transferase M1 gene polymorphism with diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. *Ren Fail*. 2000;22:479-86
7. Yalin S, Hatungil R, Tamer L, et al. Glutathione S-transferase gene polymorphisms in Turkish patients with diabetes mellitus. *Cell Biochem Funct*. 2007 ;25:509-13.
8. Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*. 2000;61:154-66.
9. Wilce MC, Parker MW. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1205:1-18.
10. Bekris LM, Shephard C, Peterson M, et al. Glutathione-s-transferase M1 and T1 polymorphisms and associations with type 1 diabetes age-at-onset. *Autoimmunity*. 2005;38:567-75.
11. Zotova EV, Savost'ianov KV, Chistiakov DA, et al. Search for the association of polymorphic markers for genes coding for antioxidant defense enzymes, with development of diabetic polyneuropathies in patients with type 1 diabetes mellitus. *Mol Biol (Mosk)*. 2004;38:244-9.
12. Yang Y, Kao MT, Chang CC, et al. Glutathione S-transferase T1 deletion is a risk factor for developing end-stage renal disease in diabetic patients. *Int J Mol Med*. 2004;14:855-9.
13. Chistiakov DA, Zotova EV, Savost'anov KV, et al. The 262T>C promoter polymorphism of the catalase gene is associated with diabetic neuropathy in type 1 diabetic Russian patients. *Diabetes Metab*. 2006;32:63-8.
14. Hovnik T, Dolzan V, Bratina NU, Podkrajsek KT, Battelino T. Genetic polymorphisms in genes encoding antioxidant enzymes are associated with diabetic retinopathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32:2258-62.
15. Abbas A, Delvinquiere K, Lechevrel M, 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;10:3389-93.
16. Kiran B, Karkucak M, Ozan H, et al. GST (GSTM1, GSTT1, and GSTP1) polymorphisms in the genetic susceptibility of Turkish patients to cervical cancer. *J Gynecol Oncol*. 2010;21:169-73.
17. Lehmann R, Schleicher ED. Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta*. 2000;297:135-44
18. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*. 1999;48:1-9.
19. Tiwari AK, Prasad P, B K T, et al. Oxidative stress pathway genes and chronic renal insufficiency in Asian Indians with Type 2 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2009;23:102-11.
20. Wang G, Zhang L, Li Q. Genetic polymorphisms of GSTT1, GSTM1, and NQO1 genes and diabetes mellitus risk in Chinese population. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;341:310-3.
21. Bid HK, Konwar R, Saxena M, et al. Association of glutathione S-transferase (GSTM1, T1 and P1) gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in north Indian population. *J Postgrad Med*. 2010;56:176-81.