



### Glutasyon S-Transferaz Genindeki Delesyonların (GSTT1 ve GSTM1) Koroner Arter Hastalığı ve Akut Miyokart Infarktüsü ile İlişkisi

Relationship Between Glutathione S-Transferase Gene Deletions (GSTT1 and GSTM1) and Coronary Artery Disease/Acute Myocardial Infarction

Semra Koç<sup>1</sup>, Davut Alptekin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Balcalı, ADANA

*Cukurova Medical Journal 2014;39(2): 256-261.*

#### ÖZET

**Amaç:** Koroner arter hastalığı (KAH), kalp hastalıkları içerisinde en yaygın olanıdır. KAH, kalbin kendi dokusuna kan sağlayan koroner arterlerin daralması sonucunda meydana gelmektedir. Damarların daralması endotel duvarlarında kolesterol ve diğer maddelerin birikerek plak oluşumu sonucunda oluşur. Glutasyon S-Transferaz (GST) enziminin de KAH ile ilişkili olduğu bilinmektedir. GST enzimi; ksenobiyotik metabolizmasında, endojenik ve ekzojenik maddelerin detoksifikasyonunda rol oynayan önemli bir enzim grubudur. Glutasyon S-transferaz M1 (GSTM1) ve T1 (GSTT1) genleri sigara dumanında bulunan bazı kimyasalların detoksifikasyonu veya aktivasyonu ile ilişkilidir. Bu genlerde mutasyonların olması enzimin aktivitesinin azalmasına ve KAH oluşmasına neden olur. Bu çalışmada; 1.-4. kuşaklarda KAH ve Akut Miyokart Infarktüsü (AMI) öyküsüne sahip bir ailede GSTM1 ve GSTT1 genleri ile ilişkisi araştırıldı.

**Materyal ve Metod:** Bu çalışmada soy ağacı bilinen ailenin çalışmaya dahil edilen kişilerinin yaşı, sigara alkol kullanı, hastalık öyküsü kaydedildi. Probandın ortaya çıktığı kişiden başlayarak 1. ve 4. kuşakların soyağacı çıkarıldı. 1.-4. kuşaklarda yaşayan ve bulunabilen 100 kişiden venöz kan örneği alındı. GSTT1 ve GSTM1 genleri uygun primerler kullanılarak PCR yöntemi ile amplifiye edildi ve agaroz jel elektroforezinde yürütüldü.

**Bulgular:** Bu ailede 24 kişinin KAH olduğu, bu hastaların 19 (%79)'unun da sigara kullanma alışkanlığının olduğu belirlendi. Yapılan moleküler analiz sonucunda GST polimorfizmine rastlanmadı.

**Sonuç:** Çeşitli çalışmalarda GST geninin KAH ile ilişkili olduğu bildirilse de bizim çalışmamızda GSTT1 ve GSTM1 genlerinde polimorfizmin olmaması bu ailede ilişkili olmadığını göstermektedir. Yine sigara kullanımının GST enzim aktivitesini kesin azalttığı bildirilse de bu ailedeki koroner arter hastalığının sigara kullanımı ile de ilişkili olmadığını düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Akut miyokart infarktüsü, Glutasyon S-transferaz, Gen, Delesyon, Koroner arter hastalığı

#### ABSTRACT

**Purpose:** Coronary artery disease (CAD) is the most common disease in heart-related diseases. CAD arises from the contraction of coroner artery, which provides blood for heart tissue. Glutathione S-Transferase (GST) enzymes are known to be associated with CAD. Glutathione S-Transferase M1 (GSTM1) and Glutathione S-Transferase T1 (GSTT1) genes are associated with detoxification or activation of chemicals in cigarette smoke. Mutations in these genes lead decreased enzyme activities and formation of CAD. In this study the relationship between GSTM1 and GSTT1 genes and CAD were investigated in four generations (1-4) of a family with a history of CAD and acute myocardial infarction (AMI).

**Material ve Methods:** Patients of a family with known family pedigrees included in the study. The age, use of alcohol, cigarette smoking, and disease history were recorded. Starting from the proband patient the pedigrees from first to fourth generation pedigree were examined. One-hundred venous blood samples obtained from all 4 generation individuals. Glutathione S-Transferase M1 and GSTT1 genes were amplified employing gene specific primers with PCR and visualized by agarose gel electrophoresis.

**Results:** In this family 24 person had CAD and 19 (79%) of them were heavy cigarette smokers. As a result of the molecular analysis, we did not detect any GST polymorphisms.

**Conclusion:** Although several lines of studies indicate an association of CAD with GST gene polymorphisms, in our study no association was found between CAD and GST polymorphisms for all family members tested. Moreover, we did not establish an association between coronary artery diseases and cigarette smoking.

**Key Words:** Acute myocardial infarction, Glutathione S-transferase, Gene, Deletion, Coronary artery disease

## GİRİŞ

Koroner kalp hastalığı olarak da bilinen koroner arter hastalığı (KAH), gelişmiş batı ülkelerinde en yaygın kardiyovasküler hastalıktır. Türkiye'de de kalp hastalıkları ölüm nedenlerinin başında yer almaktadır. Amerika'da tüm ölümlerin 1/3'üne, kalp kökenli ölümlerin de %50-75'ine neden olmakta; yaklaşık olarak yılda 500 bin kişi bu hastalıktan yaşamını yitirmektedir<sup>1-3</sup>.

KAH, birincil olarak erkekleri etkilemekte, ilk miyokart infarktüsü geçirme yaşı ortalama 50 yaş civarında gözlenmektedir<sup>3</sup>. Kadınlar, erkeklerde görülen ölüm oranlarını 10 yıl geriden takip etmektedirler<sup>4</sup>. 40 yaşından önce KAH görülme oranı 1/8, 40-60 yaş arası 1/4 ve 70 yaşından sonra 1/1'dir. Erkeklerde en yüksek insidans 50-60 yaşlarında, kadınlarda ise 60-70 yaş arasındadır<sup>5</sup>. KAH'na bağlı ölüm oranı kadın ve erkeklerde 50 yaşlarında eşitlenir. Bunun nedenleri arasında, menopozdan sonra kadınlarda riskin daha fazla olması veya yüksek risk altındaki erkeklerin erken yaşlarda ölmesi gelmektedir<sup>4</sup>.

Epidemiyolojik çalışmalarla KAH, kişilik, genetik yapı ve çevre faktörleri ile ilişkilendirilmiştir. 1981'de Hopkins ve Williams, KAH ile ilgili 240 üzerinde risk etmenlerini kapsayan bir liste yayımlamışlardır. Bunlar başında sigara içimi, artmış LDL-K ve total kolesterol, düşük HDL-K, hipertansiyon, durağan yaşam, obezite ve diyabet yer almaktadır<sup>6</sup>. Bunun yanı sıra KAH'na neden olabilen pek çok genetik etmen ortaya konmuş olup, uzun süredir araştırılmaktadır<sup>7</sup>. Özellikle sigara kullananlarda toksik maddelerin atılımı için

metabolizmalarında bazı enzimlerin de aktif olması gereklidir. Bu enzimlerden en önemlisi Glutasyon S-transferaz (GST) olup ksenobiyotik metabolizması enzimlerinin süper aileleridir<sup>8</sup>. GST enzim grubu endojen ve eksojen toksinlerin ve kanserojenlerin detoksifikasyonunda önemli rol oynadığı bilinmektedir<sup>9</sup>. Bu enzimin 5 alt sınıfı vardır. Bunlar GST alfa(A), mu (M), pi (P), teta (T) ve zeta (Z)'dir. Buna ilaveten alt sınıflar birkaç gen ve izoenzimleri içerirler.

GSTM1 geni ürünü sigara da bulunan temel karsinojenlerden polisiklik aromatik hidrokarbonların parçalanmasında önemli rol oynar. Bu genin ürünü ayrıca doğal olarak oluşan monoholometanların, diklorometanların ve etilen oksitlerin detoksifikasyonunda önemli rol oynar<sup>9,10</sup>.

GSTM1 ve GSTT1 genlerindeki polimorfizmler enzim aktivitesinin azalmasına özellikle her iki gendeki homozigot delesyonlar (null genotip) enzimin tamamen aktivitesini kaybetmesine neden olmaktadır. Bu da sigara ile ilişkili kanser ve koroner arter hastalıklarının oluşumuna zemin hazırlamaktadır<sup>11-15</sup>. GSTT1 ve GSTM1 genlerindeki delesyonlar GST enziminin aktivitesini azaltmakta, özellikle sigara içenlerde koroner arter hastalığının gelişimine katkıda bulunduğu birçok çalışmada bildirilmiştir<sup>10,12-16</sup>. Hayvanlarla yapılan çalışmalarda da sigaradaki kimyasalların GST enzimini azalttığı ve aterosklerotik plak oluşumunu uyardığı bildirilmiştir<sup>17</sup>. Yine GSTM1 ve GSTT1 genindeki null genotipinin KAH'nın ya da akut miyokard infarktüsü (AMI)'ün risk faktörü olduğu da bildirilmiştir<sup>18,19</sup>.

Bu çalışmada; soy ağacı bilinen ve yaklaşık 200 kişinin oluşturduğu 1.-4. kuşaklarda KAH ve AMİ olan bir ailede koroner arter hastalıklarının GST geni ile ilişkili olup olmadığı araştırılması planlandı.

### MATERYAL ve METOD

Bu çalışma; soy ağacı bilinen, 1.-4. kuşaklarda KAH ve AMİ olan ailenin bulunabilen 100 kişisinden tam kan örneği alınarak yapıldı. Kan örneklerinin toplanması esnasında kişilerin yaşı, hastalığı, sigara alkol kullanıp kullanmadığı vb gibi gerekli bilgileri de kaydedildi. Aynı zamanda ailenin 1.-4. kuşak bireylerinin soyağacını çıkarmak için ailedeki kalp hastalıkları nedeniyle ölen bireyler ve halen kalp hastası olanlar tek tek saptandı. Buna göre; probandin ortaya çıktığı kişiden başlayarak 1. ve 4. kuşakların soyağacı çıkarıldı. Toplanan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı<sup>20</sup>. Elde edilen DNA'lardan PCR temeline dayalı moleküler analizler yapıldı. PCR işleminde GSTT1 geni için forward (5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3') ve reverse (5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'), GSTM1 geni için ise forward (5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3') ve reverse

(5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3') primerleri kullanıldı<sup>10,18</sup>. PCR amplifikasyonu için toplam hacim 50 µl olacak şekilde her bir reaksiyon tüpüne 5 µl PCR Tamponu (10X), 5 µl MgCl<sub>2</sub>, 0.4 µl dNTP, 3 µl Taq polimeraz, 1 µl Primerler, 2 µl genomik DNA, 32.6 µl deiyonize su eklenerek hazırlandı. PCR reaksiyonundaki ısı döngüleri; ön denatürasyon; 94 °C'de 2 dakika, denatürasyon; 94 °C'de 30 saniye, yapışma; 64-66°C'de 30 saniye, sentez; 72 °C'de 40 saniye, toplam döngü; 35, final sentez; 72 °C'de 10 dakika olarak yapıldı. Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve değerlendirildi.

### BULGULAR

Çalışma grubunun yaş dağılımı 35 yaşından sonra KAH görülmesi nedeniyle denek grubu 20-35 yaş ve 36 ve üstü yaş olmak üzere iki gruba ayrıldı. Denek grubunun erkek ve kadınlara göre dağılımına baktığımızda erkeklerin 20-35 yaş grubunda %42, kadınların %44 oranında olduğu, 36 ve üstü yaş grubunda ise erkeklerin %58, kadınların ise %56 oranında olduğu saptandı (Tablo 1).

**Tablo 1. Çalışma grubunun cinsiyet ve yaş grubuna göre dağılımı**

Cinsiyet	20-35 yaş (%)	36 ve üstü yaş (%)	Toplam (%)
Erkek	23 (0.42)	32 (0.58)	55 (0.55)
Kadın	20 (0.44)	25 (0.56)	45 (0.45)
Toplam	43 (0.43)	57 (0.57)	100

Çalışma grubunda koroner arter hastası olup yaşayan ve ölen kişilerin kendilerinden ve yakınlarından edinilen bilgilere göre sigara içme durumu belirlendi. Erkeklerde sigara içme oranı %89 iken, kadınlarda %40 olduğu, cinsiyet

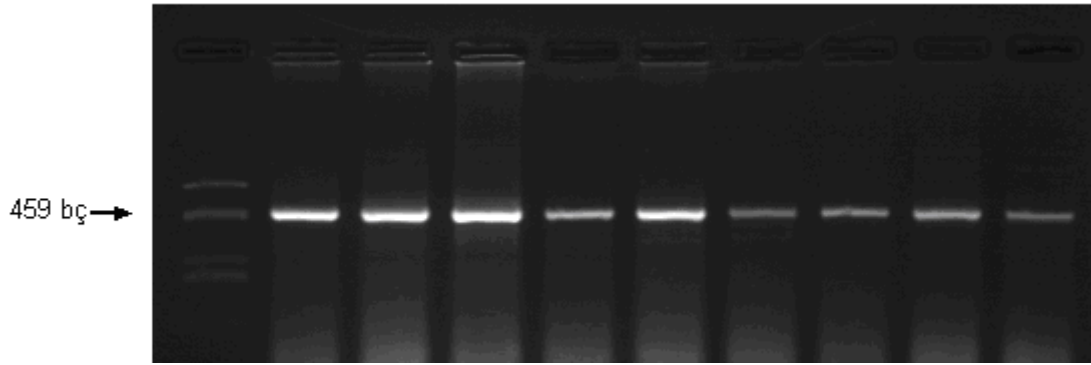
gözetmeksizin baktığımızda ise %79 olduğu belirlendi. Çalışmamızda 19'u erkek, 5'i kadın olmak üzere ölen veya yaşayan 24 koroner arter hastası olduğu tespit edildi. (Tablo 2).

**Tablo 2. KAH olup, yaşayan ve ölen kişilerin cinsiyet ve sigara içme durumuna göre dağılımı**

Hasta Grubu	Sigara içen (%)	Sigara içmeyen (%)	Toplam (%)
Erkek	17 (0.89)	2 (0.11)	19 (0.74)
Kadın	2 (0.4)	3 (0.6)	5 (0.21)
Toplam	19 (0.79)	5 (0.21)	24

GSTT1 polimorfizmi için; uygun primerler ile optimizasyon denemeleri yapıldıktan sonra 459 bç'lik DNA alanı PCR ortamında çoğaltıldı. Tüm örneklerden elde edilen PCR amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde 459 bç'lik fragmanı belirlemeye olanak verecek bantları içeren marker ile beraber yürütüldü ve jel

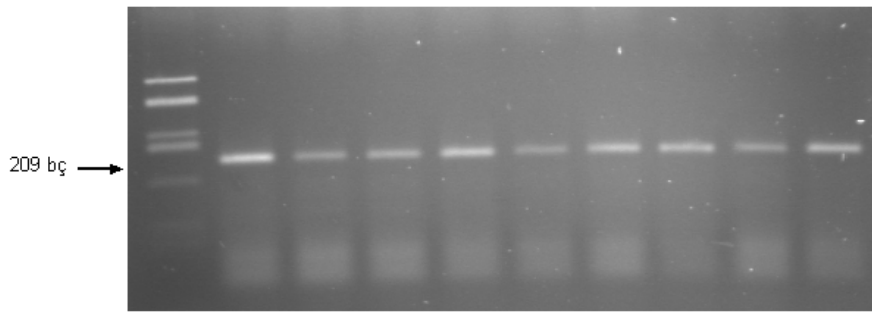
görüntüleri bilgisayar ortamına aktarıldı. Tüm örneklerin PCR'larının uygun olduğu yani istenilen DNA bölgesinin çoğaltıldığı saptandı. Denemelerimize göre çalışılan 100 kişinin tamamında GST genindeki GSTT1 geninin bulunduğu ( $T^{wild}$ ) yani polimorfizmin olmadığı ( $T^{null}$ ) saptandı (Şekil 1).



Şekil 1. GSTT1 polimorfizmi için bazı örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü.

GSTM1 polimorfizmi için; uygun primerler ile optimizasyon denemeleri yapıldıktan sonra 209 bç'lik DNA alanı çoğaltıldı. Tüm örneklerden elde edilen PCR amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde 209 bç'lik fragmanı belirlemeye olanak verecek bantları içeren marker ile beraber yürütüldü ve jel görüntüleri bilgisayar ortamına

aktarıldı. Tüm örneklerin PCR'larının uygun olduğu istenilen DNA bölgesinin çoğaltıldığı saptandı. Denemelerimize göre çalışılan 100 örneğin tamamında GST genindeki GSTM1 geninin bulunduğu ( $M^{wild}$ ) yani polimorfizmin olmadığı ( $M^{null}$ ) saptandı (Şekil 2).

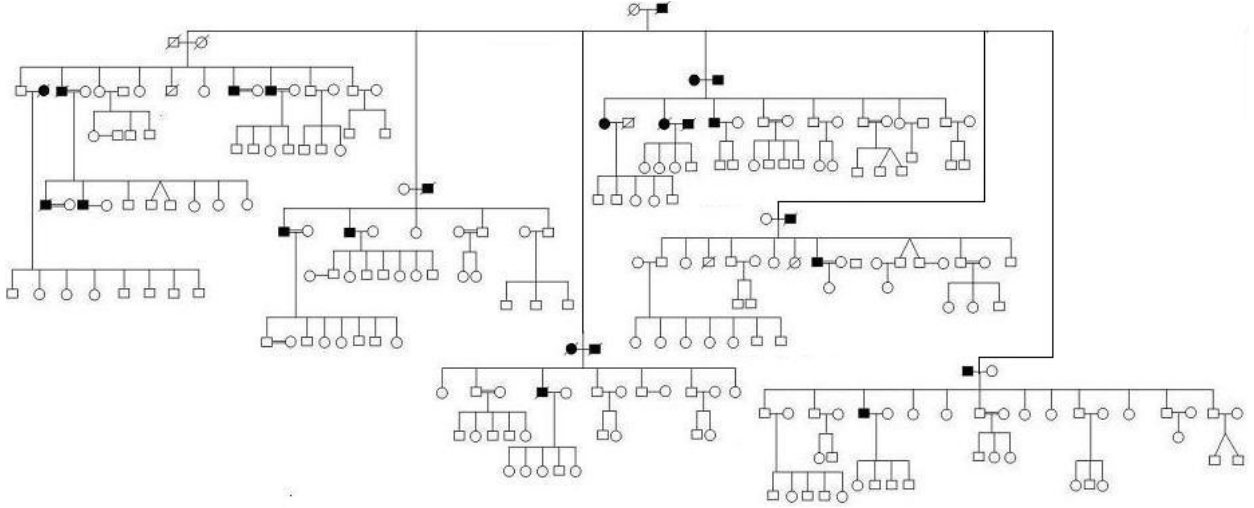


Şekil 2. GSTM1 polimorfizmi için bazı örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü.

## TARTIŞMA

Bu çalışmada çalışma grubunun genel bilgilerine baktığımızda yaklaşık 200 kişilik bir aile olmasına

rağmen KAH birinci kuşakta 54 yaşında ölümle ortaya çıkmasından sonra ikinci kuşakta ölüm vakaları 65-75 yaşlarında olmuştur (Pedigri 1).



**Pedigri 1.** Çalışma grubundaki bireylerin soy ağacı.

Üçüncü kuşakta ise 40 yaşında ilk ölüm vakası, 35 yaşında ise KAH ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, çalışma grubunda 20 yaş üzerindeki bireyler dikkate alınarak erkek ve kadınlarda yaş grubu iki kategoriye (20-35 yaş ile 36 ve üstü yaş) ayrılmıştır. Yirmi yaşın altındaki bireyler KAH'nın 35 yaşından sonra gözükmesi nedeniyle dikkate alınmamıştır. Ancak ikinci kuşakta 65-75 yaşları arasında olan ölümler üçüncü kuşakta 40 yaşına inmiştir. Bu da dördüncü kuşakta hastalığın daha da aşağı yaşlara ineceğini düşündürmektedir. Edinilen bilgilere göre ikinci kuşaktaki kalp hastalığı nedeniyle ölenlerin sigara içmediği, ancak üçüncü ve dördüncü kuşaktaki hasta bireylerin çoğunluğunun sigara içmesi KAH'nın sigara kullanımı ile erken yaşlara inebileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada pedigri verilerine göre bu ailede KAH'nın genetik geçişli olduğunu

göstermektedir. Ancak, edindiğimiz bilgilere göre KAH olanların büyük çoğunluğunun sigara içmesinin GST geni ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Nitekim yapılan çalışmalarda da her ne kadar null genotipler olmasa da sigaranın GST enzim aktivitesini kesin azalttığı bildirilmektedir<sup>14-16,18,19</sup>. Ancak bulgularımıza göre sigara kullanımının bu ailede KAH ile direk ilişkili olmadığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda GSTT1 için 459 bç ve GSTM1 için 209 bç büyüklüğünde iki bandın gözükmesi genotipin sağlam olduğunu yani T<sup>wild</sup> M<sup>wild</sup> genotipinin olduğunu göstermektedir. Bu iki bandın elektroforezde gözükmesi ailedeki koroner arter hastalığının GSTT1 ve GSTM1 genindeki delesyonlarla ilişkili olmadığını göstermektedir.

\*Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (TF.2007YL3 Nolu Proje).

**KAYNAKLAR**

1. Kültürsay H. Koroner Kalp Hastalığı, Primer ve Sekonder Koruma. 1.Baskı, İstanbul: ARGOS İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Tic. A.Ş., 2001;63-75.
2. Weitzman LB. Coronary artery Disease: Heart Attack. Erişim: <http://www.heartcenteronline.com/myheartdr/common/articledes.cfm?ARTID=29> (Erişim Tarihi: 05.07.2008).
3. Cheitlin MD, Sokolow M, McIlroy MB. *Clinical Cardiology*. 6<sup>th</sup>. Ed., USA: Prentice-Hall International Inc, 1993;42-52
4. Tuzcu M. Kardiyovasküler Hastalıklar. Yalçın A. Cecil Essentials of Medicine. 2. Baskı, İstanbul: Yüce Yayınları A.Ş. 1991;89-115.
5. Kök H. Klinik Kardiyoloji. 2.Baskı, Konya: Nobel Tıp Kitapevleri Ltd.Şti, 2002;201-14.
6. Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, et al. Apolipoprotein E Polymorphism and Cardiovascular Disease: A HuGE Review, *Am J Epidemiol*. 2002;155:487-95.
7. Salazar LA, Hirata MH, Giannini SD, et al. Seven DNA Polymorphisms at the candidate genes of atherosclerosis in Brazilian women with angiographically document coronary artery disease. *Clinica Chemica Acta*. 2000;300:139-49.
8. Ketterer B. Glutathione S-transferases and prevention of cellular free radical damage. *Free Radical Research*. 1998;28:647-58.
9. Hanna E, MacLeod S, Vural E, et al. Genetic deletions of glutathione-S-transferase as a risk factor in squamous cell carcinoma of the larynx: a preliminary report. *Am J Otolaryngol*. 2001;22:121-3.
10. Abu-Amero KK, Al-Boudari OM, Mohamed GH, et al. T null and M null genotypes of the glutathione S-transferase gene are risk factor for CAD independent of smoking. *BMC Med Genet*. 2006;7:1-7.
11. Zhong S, Howie AF, Ketterer B, et al. Glutathione S-transferase mu locus: use of genotyping and phenotyping assays to assess association with lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis*. 1991;12:1533-7.
12. Tamer L, Ercan B, Camsari A, et al. Glutathione S-transferase gene polymorphism as a susceptibility factor in smoking-related coronary artery disease. *Basic Res Cardiol*. 2004;99:223-9.
13. Cora T, Tokac M, Acar H, et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes and myocardial infarction. *Mol Biol Rep*. 2013;40:3263-7.
14. Phulukdaree A, Khan S, Moodley D, et al. GST polymorphisms and early-onset coronary artery disease in young South African Indians. *S Afr Med J*. 2012;102:627-30.
15. Taspınar M, Aydos S, Sakiragaoglu O, et al. Impact of genetic variations of the CYP1A1, GSTT1, and GSTM1 genes on the risk of coronary artery disease. *DNA Cell Biol*. 2012;31:211-8.
16. Wilson MH, Grant PJ, Kain K, et al. Association between the risk of coronary artery disease in South Asians and a deletion polymorphism in glutathione S-transferase M1. *Biomarkers*. 2003;8:43-50.
17. Penn A, Snyder CA. Butadiene inhalation accelerates arteriosclerotic plaque development in cockerels. *Toxicology*. 1996;113:351-4.
18. Van Schooten FJ, Hirvonen A, Maas LM, et al. Putative susceptibility markers of coronary artery disease: association between VDR genotype, smoking, and aromatic DNA adduct levels in human right atrial tissue. *Faseb J*. 1998;12:1409-17.
19. Girisha KM, Gilmour A, Mastana S, et al. T1 and M1 polymorphism in glutathione S-transferase gene and coronary artery disease in North Indian population. *Indian J Med Sci*. 2004;58:520-6.
20. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988;16:125.

**Yazışma Adresi / Address for Correspondence:**

Dr. Davut Alptekin  
 Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi  
 Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
 Balcalı, Sarıçam-ADANA  
 e-mail:alptekin@cu.edu.tr

geliş tarihi/received :15.11.2013

kabul tarihi/accepted:18.12.2013