magiran.com

شناسایی حذف ژنی *GSTM1* به وسیله *PCR* و استعداد ابتلا به سرطان معده

ماندانا یداللهی[۱]، مصطفی سعادت[۲]، شاپور امیدواری[۳]، ایرج سعادت[۴]

چکیده

مقدمه: خانواده آنزیمی گلوتاتیون ـ اس ـ ترانسفرازها در سم‌زدایی ترکیبات، ایفای نقش می‌نمایند. GSTهای انسانی به چهار گروه α , μ, π و θ تقسیم می‌شوند که GSTM1 یکی از اعضاء گروه GSTμ می‌باشد. تحقیقات متعدد نشان داده‌اند که فقدان پروتئین GSTM1 با افزایش شانس ابتلا به چندین سرطان ارتباط دارد.

روش کار: در این مطالعه چند شکلی ژنتیکی GSTM1 بین اگزون ۵ و ۶ با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در ۴۰ بیمار مبتلا به سرطان معده و ۸۰ نفر سالم (به عنوان گروه شاهد) مقایسه گردید. همچنین در فرم جمع‌آوری اطلاعاتی با مشخصاتی همچون جنسیت، سن، عادت به استعمال سیگار و سابقهٔ بدخیمی در خویشاوندان درجه اول، ثبت گردید.

نتایج: فراوانی ژنوتیپ null (افرادی که برای حذف در ژن GSTM1 هموزیگوت می‌باشند) در گروه شاهد و سرطان معده به ترتیب ۳۱/۲ و ۶۰ درصد می‌باشد. ارتباط آماری معنی‌داری بین حذف در ژن GSTM1 و ابتلا به سرطان معده وجود دارد (X^2= 9.21 ; df= 1 ; P<0.005). صرفنظر از ژنوتیپ GSTM1 عادت به استعمال سیگار و سابقهٔ فامیلی بدخیمی با ابتلا به سرطان معده رابطهٔ آماری معنی‌داری دارند.

نتیجه‌گیری: یافته‌های پژوهش حاضر به‌خوبی نشان دادندکه‌فراوانی ژنوتیپ null درابتلابه‌سرطان معده دارای نقش مهمی است. این یافته، تأیید کنندهٔ پژوهش‌های دیگری است که بر روی سایر سرطان‌ها انجام یافته است.

واژگان کلیدی: سرطان معده، گلوتاتیون اس. ترانسفراز، حذفی ژنی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

مقدمه

امروزه به خوبی مشخص گردیده که عوامل محیطی از جمله مواد شیمیایی دارای سهم به‌سزایی در ایجاد سرطان‌های انسانی می‌باشند. ورود عوامل شیمیایی به بدن، همراه با تغییرات متعددی است که بر روی آنها صورت می‌گیرد. عوامل شیمیایی سرطان‌زا یا به‌صورت مستقیم یا پس از این که تحت تأثیر آنزیم‌هایی نظیر سیتوکروم P450 واقع شوند قادر به ایجاد آسیب در DNA می‌باشند. این مواد متحمل تغییراتی شده، فعال گشته و خاصیت سرطان‌زایی پیدا می‌کنند (۱).

خانوادهٔ آنزیمی گلوتاتیون ـ اس ـ ترانسفراز (GST; EC 2.5.1.18) درگیر در فرآیند سم‌زدایی ترکیبات فعال حاصل از مرحلهٔ اول آنزیم‌ها و یا سم‌زدایی سرطان‌زاهای مستقیم می‌باشند (۲).

تحقیقات متعدد نشان داده‌اند که خانوادهٔ ژنی GST در انسان شامل حداقل ۴ نوع متفاوت به‌نام‌های GSTθ , GSTα , GSTπ , GSTμ می‌باشد (۳). هریک از این انواع دارای چندین عضو می‌باشد. مثلاً کلاس GSTμ

۱ـ دانشگاه خاتم ـ تهران.
۲ و ۳ـ بخش زیست‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شیراز.
۴ـ بخش شیمی درمانی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز.

magiran.com

دارای ژن‌های $GSTM_1$ M_2، M_3، M_4 و M_5 می‌باشد (۴). به همین ترتیب هریک از ژن‌های این سیستم پیچیده، دارای تنوع ژنتیکی می‌باشند. ژن $GSTM_1$ دارای سه آلل متفاوت به‌نام‌های A، B و O می‌باشد (۵و۴). آلل‌های B و A تنها با تغییر یک اسید آمینه جایگاه ۱۷۲ از یکدیگر متمایز می‌شوند (۴).

$GSTM_1$ O نتیجهٔ حذف در ژن $GSTM_1$ است (۶). در انسان وجود GSTμ در کبد، لنفوسیتها و بافت‌های دیگر ثابت شده است (۵و۲). به علت اینکه $GSTM_1$ اتصال گلوتاتیون (GSH) را به متابولیت‌های اپوکسید مربوط به هیدروکربن‌های آروماتیک پلی‌سیکلیک کاتالیز می‌نماید، فقدان فعالیت آن با افزایش ریسک سرطان در افراد سیگاری ارتباط دارد. Benzo [a] Pyrene ماده سرطان‌زایی است که در سیگار یافت می‌شود و توسط فاز ۱ آنزیم‌ها به dicl-epoxide متابولیزه شده، سپس به‌وسیلهٔ $GSTM_1$ به گلوتاتیون متصل و غیرفعال می‌گردد (۴). یکی از مطالعات نشان داده که فقدان فعالیت آنزیمی GSTμ احتمال ایجاد سرطان معده را همزمان با عفونت هلیکوباکترپیلوری[1] افزایش می‌دهد (۸). در تعدادی مقالات گزارش گردیده است که ارتباط مهمی بین فقدان فعالیت آنزیمی GSTμ و یا حذف در ژن $GSTM_1$ و افزایش ریسک ابتلا به سرطان‌های ریه، (۱۰و۹) مثانه و حنجره، (۱۳و۱۱) سر و گردن، (۱۴) معده و کولون، (۱۷و۱۵و۸ و۷) لوسمی لنفوسیتیک (۱۸) و پستان (۲۱و۱۹) وجود دارد. البته تعدادی از محققان نیز هیچ‌گونه ارتباطی را گزارش ننموده‌اند (۲۴و۲۲). نظر به اینکه گزارشات منتشر شده پیرامون ارتباط حذف در ژن $GSTM_1$ و بیماری‌های سرطان ضد و نقیض می‌باشند، در این مطالعه به بررسی تأثیر چند شکلی ژنتیکی $GSTM_1$ در ابتلا به سرطان معده با توجه به عواملی همچون سن، جنسیت، عادت به کشیدن سیگار و سابقهٔ بدخیمی در خویشاوندان درجه اول در جمعیت ایرانی پرداخته شده است.

روش کار

نمونه‌گیری از دو گروه یعنی بیماران مبتلا به سرطان معده (۴۰ نفر) و افراد سالم (۸۰ نفر) (به عنوان گروه شاهد) انجام شد. مقایسهٔ سنی و تعداد افراد این دو گروه به تفکیک جنسیت در جدول ۱ آمده است. نمونهٔ خونی افراد بیمار از بیمارستان نمازی شیراز (بخش‌های شیمی درمانی و جراحی عمومی) و نمونه‌های خونی افراد سالم از شهر شیراز و توابع جمع‌آوری گردید. افراد بیمار و سالم همه از مسلمانان ایرانی بوده و هیچ رابطهٔ خویشاوندی بایکدیگر نداشتند. همچنین پرسشنامه‌ای حاوی سؤالاتی راجع به سابقهٔ استعمال سیگار، سابقهٔ سرطان در خانواده و اقوام درجه اول از تمام افراد گرفته شد. نوع ضایعهٔ بدخیمی و محل آن با استفاده از پرونده بیماران و با توجه به گزارش پاتولوژی در پرسشنامه‌ها ثبت گردید.

برای تهیه نمونه خون و استخراج DNA، از هر فرد به اندازهٔ ۱/۵-۲ml خون در تیوپ‌های حاوی EDTA گرفته شد. نمونه‌های گرفته شده بر روی یخ (۸°C-۲) قرار داده می‌شد و پس از انتقال به آزمایشگاه تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه قرار می‌گرفت. استخراج DNA از خون به روش استاندارد صورت می‌پذیرفت (۲۵).

1. Helicobacter Pylori.

magiran.com

با انجام PCR والکتروفورز، پرایمرهای مورد استفاده مربوط به ژن $GSTM_1$ دارای توالی

5′AGACAGAAGAGGAGAAGATTC3′

و

5′TCCAAGTACTTTGGCTTCAGT3′

بودند (۷). این پرایمرها می‌توانند ناحیهٔ بین اگزون ۵ و ۶ شامل اینترون ۵ را از ژن $GSTM_1$ تقویت نمایند. مواد در حجم ۵۰μ1 تهیه شده که با غلظت نهایی 1μM Primer, 200μM dNTp, 1.5mm $MgC1_2$ 1X U/μL Buffer PCR, ۰/۱ Taq Polymerase, ۱μL DNA می‌باشد. تعداد ۳۵ سیکل PCR در شرایط ۹۴°C به مدت ۱/۵ دقیقه و ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه صورت پذیرفت (۷). در اولین سیکل نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴°C قرار داده شدند. محصولات PCR بعد از الکتروفورز بر روی ژل‌آگارز (۱/۲٪) با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده و در زیر نور ماوراء بنفش مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفتند. به‌منظور ارزیابی اندازهٔ قطعه تقویت شده از شاخص DNA λ هضم شده توسط آنزیم برش دهنده Hind III استفاده شد.

به منظور مقایسهٔ فراوانی افراد هموزیگوت برای آلل $GSTM_1O$ در گروه‌های مورد مطالعه و بررسی تأثیر عواملی همچون جنسیت، سن، عادت به کشیدن سیگار و سابقهٔ بدخیمی در خویشاوندان درجه اول از آزمون X^2 با سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ استفاده گردید.

نتایج

تکثیر ناحیهٔ بین اگزون ۵ و ۶ که دربرگیرنده اینترون ۵ نیز می‌باشد، باندی که حدوداً ۱۰۵۰ جفت باز است را باعث می‌گردد. این باند را پس از الکتروفورز بر روی ژل‌آگارز (۱/۲٪) و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید می‌توان مشاهده نمود.

جدول ۱: مقایسه سنی گروه‌های مورد مطالعه به تفکیک جنسیت

گروه	شاهد	سرطان معده
تعداد کل	۸۰	۴۰
دامنه سنی گروه	۳۶-۹۵	۳۸-۷۸
میانگین سنی گروه با انحراف معیار	۵۶/۷ ± ۱۱/۲	۶۰/۷ ± ۱۰/۰
تعداد زنان	۲۶	۱۳
درصد زنان در گروه	۳۲/۵	۳۲/۵
دامنه سنی زنان	۳۶-۷۹	۳۸-۷۲
میانگین سنی زنان با انحراف معیار	۵۳/۸ ± ۱۰/۸	۵۸ ± ۱۰/۸
تعداد مردان	۵۴	۲۷
درصد مردان در گروه	۶۷/۵	۶۷/۵
دامنه سنی مردان	۳۸-۹۵	۴۲-۷۸
میانگین سنی مردان با انحراف معیار	۵۴/۱ ± ۱۱/۹	۶۱/۸ ± ۹/۶

در جدول شمارهٔ ۲ فراوانی ژنوتیپ‌های null و non null در زنان و مردان دو گروه یادداشت گردیده است. محاسبات آماری نشان می‌دهد که بین زنان و مردان گروه شاهد (X^2= 0.22 ; df =1 ; P> 0.05) و بیماران مبتلا به سرطان معده (X^2= 0.68 ; df =1 ; P> 0.05) از نظر فراوانی حذف در ژن $GSTM_1$ اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. بین حذف در ژن $GSTM_1$ و ابتلا به سرطان معده ارتباط آماری معنی‌داری وجود دارد. (X^2= 9.21 ; df =1 ; P< 0.01)

magiran.com

جدول ۲: مقایسه ژنوتیپ‌های GSTM1 در گروه‌های مورد مطالعه به تفکیک جنسیت

گروه	ژنوتیپ GSTM1					
	null			non null		
	تعداد زنان(٪)	تعداد مردان(٪)	تعداد کل (٪)	تعداد زنان(٪)	تعداد مردان(٪)	تعداد کل (٪)
شاهد	۹(۳۴/۶)	۱۶(۲۹/۶)	۲۵(۳۱/۲)	۱۷(۶۵/۴)	۳۸(۷۰/۴)	۵۵(۶۸/۸)
سرطان معده	۹(۶۹)	۱۵(۵۶)	۲۴(۶۰)	۴(۳۱)	۱۲(۴۴)	۱۶(۴۰)

مقایسهٔ گروه‌های مورد مطالعه از نظر عادت به استعمال سیگار و ژنوتیپ $GSTM_1$ و ابتلا به سرطان معده در افراد سیگاری ($X^2= 5.72$; df=1 ; P<0.05) و همچنین در افراد غیرسیگاری، رابطه آماری معنی‌دار وجود دارد ($X^2= 4.54$; df= 1 ; P <0.05). صرفنظراز ژنوتیپ $GSTM_1$، عادت به استعمال سیگار و ابتلا به سرطان معده رابطه دارد. ($X^2= 17.27$; df= 1 ; P< 0.001)

جدول ۳: مقایسه گروه‌های مورد مطالعه از نظر عادت به استعمال سیگار و ژنوتیپ GSTM1 به تفکیک جنسیت

گروه		ژنوتیپ GSTM1			
		null		non null	
		زنان	مردان	زنان	مردان
سیگاری	شاهد	۱	۱	۱	۹
	سرطان معده	۲	۱۰	۲	۶
غیرسیگاری	شاهد	۸	۱۲	۱۶	۲۴
	سرطان معده	۷	۳	۲	۴
اظهار نشده	شاهد	۰	۳	۰	۵
	سرطان معده	۰	۲	۰	۲

مقایسه ژنوتیپ $GSTM_1$ و سابقهٔ فامیلی بدخیمی در خویشاوندان درجه اول دو گروه به تفکیک جنسیت در جدول ۴ آمده است. صرفنظر از ژنوتیپ $GSTM_1$، سابقهٔ فامیلی بدخیمی با ابتلا به سرطان معده رابطهٔ آماری معنی‌دار دارد. ($X^2= 3.91$; df =1 ; P< 0.05)

جدول ۴: مقایسه ژنوتیپ GSTM1 و سابقه فامیلی بدخیمی در خویشاوندان درجه اول به تفکیک جنسیت

	گروه	ژنوتیپ GSTM1			
		null		non null	
		زنان	مردان	زنان	مردان
وجود سابقه	شاهد	۰	۳	۴	۱
	سرطان معده	۴	۲	۱	۲
بدون سابقه	شاهد	۹	۱۱	۱۶	۲۹
	سرطان معده	۵	۹	۳	۹
اظهار نشده	شاهد	۰	۲	۰	۵
	سرطان معده	۰	۴	۰	۱

بحث

سرطان‌زایی فرآیندی چند مرحله‌ای و بسیار پیچیده است که در هر مرحله از آن عوامل متعددی دخالت دارند. علیرغم اینکه مدارک محکمی در خصوص ماهیت علت اصلی ابتلا به انواع سرطان‌ها در دست نمی‌باشد، امروزه عوامل محیطی، ژنتیکی و همچنین اثرات متقابل این دو دسته را در بروز این بیماری بسیار مهم می‌دانند (۲۶). آلل $GSTM_1O$ نتیجهٔ حذف در ژن $GSTM_1$ می‌باشد. چنانچه فردی برای آلل دارای حذف به‌صورت هموزیگوت باشد، ژنوتیپ وی Null genotype خواهد بود (۶و۴). در این مطالعه افراد بیمار و سالم از مسلمانان ایرانی بوده و هیچ رابطه خویشاوندی نداشتند و انتخاب افراد براساس گروه خونی خاصی نبوده است. بنابراین در این رابطه حذف هموزیگوتی در ژن $GSTM_1$ در ارتباط با افرادی با گروه خونی خاص، بررس نشده است. تکثیر ناحیهٔ بین اگزون ۵ و ۶ شامل اینترون ۵، باندی حدود ۱۰۵۰ جفت باز را پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز و رنگ‌آمیزی نشان داد. در تحقیق حاضر ۳۱/۲ درصد افراد گروه شاهد

magIran.com

برای این حذف حالت هموزیگوت دارند؛ بنابراین فراوانی مشاهده شده در شهر شیراز و توابع مشابه فراوانی گزارش شده در مطالعات دیگر است (۱۸). یافته‌های پژوهش حاضر به خوبی نشان دادند که فراوانی ژنوتیپ null در ابتلا به سرطان معده دارای نقش بسیار مهمی است. این یافته، تأیید کنندهٔ پژوهش‌های دیگر محققینی است که بر روی سایر سرطان‌ها تحقیق نموده‌اند (۲۱و۹).

$GSTM_1$ ژن محافظی علیه تعدادی از سرطان‌زاهای شیمیایی است و این ترکیبات را به سرعت سم‌زدایی می‌کند. ماده سرطان‌زایی که در سیگار وجود دارد، یعنی Benzo[a]pyrene به وسیله فاز ۱ آنزیم‌ها به Diol-epoxide متابولیزه می‌شود. این ماده به وسیله $GSTM_1$ به گلوتاتیون متصل شده که سبب غیرفعال شدن آن می‌گردد. افرادی که دارای آلل فعال $GSTM_1$ می‌باشند، توانایی غیرفعال کردن سوبستراهای این آنزیم که شامل مواد سرطان‌زای بسیار قوی است را دارا می‌باشند. بنابراین $GSTM_1$ در سم‌زدایی سرطان‌زاهای قوی مانند epoxides و هیدروکربن‌های آروماتیک سیگار نقش دارد. افراد سیگاری فاقد فعالیت این آنزیم به دلیل عدم توانایی در فرآیند سم‌زدایی، در مخاطرهٔ بیشتری برای ابتلا به سرطان‌های متعدد قرار دارند (۴). در مورد افراد غیرسیگاری حذف ژن $GSTM_1$ به‌طور معنی‌داری باعث افزایش شانس ابتلا به سرطان معده می‌شود. این نکته بیانگر این است که سم‌های سرطان‌زا فقط از طریق سیگار به بدن منتقل نمی‌شوند و آنزیم $GSTM_1$ مسئول سم‌زدایی سم‌های دیگری نیز می‌باشد. شایان ذکر است که در افراد سیگاری، حذف در ژن $GSTM_1$ به‌طور بسیار معنی‌داری و بیش از آنچه که در غیرسیگاری‌ها مشاهده می‌گردد، باعث افزایش شانس ابتلا به سرطان معده می‌گردد (جدول ۳).

پژوهش حاضر نشان می‌دهد که سابقهٔ بدخیمی در بستگان درجه اول بیماران سرطانی به‌طور چشم‌گیری نسبت به همان سابقه در گروه شاهد افزایش نشان می‌دهد. این امر نشان دهندهٔ استعداد ژنتیکی در ابتلا به این‌گونه سرطان‌ها می‌باشد. هرچند فعالیت ژن $GSTM_1$ به‌صورت بارز غیرجنسی به ارث می‌رسد (۱۱)، عدم مشاهدهٔ ارتباط آماری معنی‌دار در بررسی افراد دارای سابقهٔ فامیلی و مبتلا به سرطان معده نسبت به ژن $GSTM_1$ به معنای نفی نقش این ژن نمی‌باشد؛ این احتمال وجود دارد که در صورت حجم نمونه مطالعه این رابطه از نظر آماری معنی‌دار اعلام گردد، علاوه برآن می‌توان اظهار داشت که سرطان یک فرآیند پیچیده بوده و چندین ژن در ایجاد آن ایفای نقش می‌نمایند. مثلاً به غیر از چند شکلی در فاز II آنزیم‌ها، چند شکلی ژنتیکی در فاز I آنزیم‌ها مانند سیتوکرم‌ها و یا (NAT1) N-acetyl transferase نیز می‌تواند با افزایش ریسک ابتلا به سرطان ارتباط داشته باشد (۲۶).

تشکر و قدردانی

از همکاری بیماران و شهروندان گرامی شیراز به خاطر اهداء خون و پرسنل محترم بخش‌های شیمی درمانی و جراحی بیمارستان نمازی شیراز وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شیراز که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری می‌گردد. این تحقیق با حمایت‌های مالی و معنوی دانشگاه شیراز (پروژه تحقیقاتی ۶۵۴-۱۱۷۹-SC-۷۸) و دانشگاه خاتم انجام پذیرفته است.

magiran.com

منابع

1. Kawajiri K., Fujii-Kuriyama Y., P450 and human cancer. Jpn. J. Cancer Res. 1991; 82: 1325-35.

2. Seidegard J., Guthenbery C., Pero R.W. and et al., The rrans-stilbene oxide-active glutathione transferase in human mononuclear leukocytes identical with the hepatic glutathione transferase μ. Biochem. J. 1987; 246: 783-5.

3. Pemble S., Schroeder K.R., Spencer S.R. and et al., Human glutathionc S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. Biochem J. 1994; 300: 271-6.

4. Mclellan R.A., Scarson M., Alexandric A.K. and et al., Characterization of a human glutathione S-transferase μ cluster containing a duplicated $GSTM_1$ gene that causes ultrarapid enzyme activity. Mol Pharmacol. 1997; 52: 958-65.

5. Mannervik B., Awasthi Y.C., Bord P.G., and et al., Nomenclature for human glutathione transferases. Biochem. J. 1992; 282: 305-8.

6. Seidegard J., Vorachek W.R., Pero R.W. and et al., Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. Pro. Natl. Acad. Sci. USA. 1988; 85: 7293-7.

7. Harada S., Takako N., and et al. Detection of GST1 gene deletion by the polymerase chain reaction and its possible correlation with stomach cancer in japanese. Hum. Genet. 1992; 90: 62-4.

8. Ng E.K., Sung J.J., Limg T.K., and et al., Helicobacter pylori and the noll genotype of glutathione s-transferase μ in patients with gastric adenocarcinoma. Cancer 1998; 82: 268-73.

9. Nazar-Stewart V., Motulsky A.G., and et al., The glutathione s-transferase mu polymorphism as a marker for susceptibility to lung carcinoma. Cancer Res. 1993; 53: 2313-19.

10. Kihara, M., Kihara M., Lung cancer risk of GSTM1 null genotype is dependent on the extent of tobacco smoke exposure. Carcinogenesis. 1994; 15: 415-18.

11. Lafuente A., Pujol F., Carretero A., and et al., Human glutathione s-transferase among smokers. Cancer lett. 1993; 63: 49-54.

12. Engel LS., Taioli E, Pfeiffer R., and et al., Pooled analysis and meta-analysis of glutathione S-transferase M1 and bladder cancer: a HUGE review. Am J. Epidemiol. 2002; 15: 156(2): 95-109.

13. Lee SJ., Cho SH., Park SK., and et al, Combined effect of glutathione S. transferase M1 and T1 jenotypes on bladder cancer risk. Cancer lett. 2002 Mar; 177(2): 173-9.

14. Oude-ophuis M.B., Van-Lieshout E.M., Roelofs, H.M., and et al., Glutathione S-transferase M1 and cytochrome P450 A1 Polymorphisms in relation to the risk for benign and malignant head and neck lesions. Cancer. 1998; 82: 936-43.

15. Slattery M., Potter J.D., Ma K.N., and et al., Family history of colorectal cancer, NAT_2 GSTM1 and risk of colon cancer. Cancer Causes. Control. 2000; 11: 1-8.

16. Gowronska-Szklarz B., Luinski F., kladny J., and et al., Polymorphis, of GSTM1 gene in patients with colorectal cancer and colonic polyps. EXP. Toxical. Pathol. 1999; 51: 321-5.

17. Katoh T., Nagata N., kuroda Y., and et al., Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) genetic polymorphism and susceptibility

magiran.com

to gastric and colorectal adenocarcinoma. Carcinogenesis. 1996; 17: 1855-59.

18. Saadat L. and Saadat M., The glutathione S-rransferase polymorphism and susceptibility to acute lymphocytic leukemia. Cancer Lett. 2000; 158: 43-5.

19. Helzlsover K.J., Selmin O., Huang-Han U., and et al., Association between glutathione S-transferase M1, P1 and T1 genetic polymorphisms and development of breast cancer. J. Natl. Cancer inst. 1998; 90: 512-18.

20. Maugard C.M., Charrier J. and Bignon Y.J. Allelic deletion at glutathione S-transferase M1 locus and its association with breast caner susceptibility. Chemico. Biol. Interactions 1998; 111-112: 365-75.

21. Zheng W., Wen WQ., Gustafson D.R. and et al., GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. Breast cancer Res treat 2002 Jul; 74(1): 9-16.

22. Gertiy D.M., Stampfer M., Haiman C., and et al., Glutathione S-trancferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and colorectal cancer risk: a prospective study. Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev. 1998; 7: 1001-5.

23. Saadat I., Omidvari S., and Saadat M. Genetic polymorphism of the Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and Development of Breast cancer. iranian Biomed. J. 2001; 5: 21-5.

24. Benhamou S., Lee WJ., Alexandrie AK,. Meta and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 pclymorphisms and smoking on lung cancer risk. Carcinogenesis. 2002 Aug; 23(8): 1343-50.

25. Newton C.R. Mutational analysis: Known mutations. [In PCR. A Practical approach, edited by Mcpherson M.J., Hames D. and Taylor G.R. IRL-Press, Oxford]. 1995. pp: 219-222.

26. Gonzalez CA., Sala N., Capella G., Genetic susceptibility and gastric cancer risk. Int J cancer. 2002 Jul; 100(3): 249-60.