

Genetic variation of GSTP1 in Diabetic retinopathy

Abbasi N¹, Salehi Z^{2*}, Alizadeh Y³

1- Faculty of Pardis, University of Guilan, Rasht, Iran

2- Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

3- Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

Received: 9 Jun 2014, Accepted: 10 Sep 2014

Abstract

Background: Diabetic retinopathy (DR) is a severe complication of diabetes and the leading cause of blindness among working adults worldwide. Chronic extra cellular hyperglycemia in diabetes stimulates reaction oxygen species (ROS) production and increase oxidative stress. Glutathion S-transferases (GSTs) enzymes have been shown to protect human from reactive oxygen compounds damage. The aim of the present study was to investigate whether the genetic polymorphism of GSTP1 is associated with DR.

Materials and Methods: This case-control study, included 70 patients with DR and 70 healthy volunteers. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. Genotypes were determined by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). Statistical analysis was performed using the MedCalc program for Windows version 12.

Results: The prevalence of genotype frequencies of the GSTP1 Ile/Ile and Ile/Val were 71.42% and 28.57% respectively, in DR subject, while in healthy volunteers were 78.58% and 21.42%, respectively. Statistical analysis has not emerged significant difference from the comparison of either genotype ($P>0.05$).

Conclusion: There was no evidence that GSTP1 variants were associated with DR in studied population. Further research is required to clarify role of GSTP1 in DR.

Keywords: Diabetic retinopathy, gene polymorphism, GSTP1, oxidative stress

*Corresponding Author:

Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Email: geneticzs@yahoo.co.uk

تنوع ژنتیکی GSTP1 در رتینوپاتی دیابتی

نسیم عباسی^۱، زیور صالحی^{۲*}، یوسف علیزاده^۳

۱- کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، پردیس بین الملل، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲- استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳- استادیار، گروه چشم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: رتینوپاتی دیابتی یکی از عوارض شدید دیابت بوده و موجب نابینایی در بزرگسالان در سراسر جهان می‌شود. افزایش قند خارج سلولی در دیابت، محرک تولید گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن و افزایش استرس اکسیداتیو می‌باشد. گلوکاتینون S- ترانسفرازها، آنزیمی است که موجب محافظت انسان در برابر آسیب‌های حاصل از ترکیبات اکسیژنی واکنش پذیر می‌شود. در مطالعه حاضر به بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن GSTP1 با بیماری رتینوپاتی دیابتی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد- شاهدهی ۷۰ بیمار مبتلا به رتینوپاتی دیابتی و ۷۰ فرد سالم مورد بررسی قرار گرفتند. DNA از لوکوسیت‌های خون محیطی استخراج گردید. تعیین ژنوتیب با استفاده از تکنیک PCR-RFLP صورت گرفت. آنالیز آماری به وسیله برنامه MedCalc نسخه ۱۲ انجام شد.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیب‌های Ile/Ile و Ile/Val ژن GSTP1 در بیماران به ترتیب برابر با ۷۱/۴۲ و ۲۸/۵۷ درصد بود در حالی که در گروه بیمار ۷۸/۵۸ و ۲۱/۴۲ درصد به دست آمد. آنالیز آماری تفاوت معنی‌داری بین گروه بیمار و کنترل نشان نداد ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: ارتباط معنی‌دار بین پلی مورفیسم ژن GSTP1 و بیماری رتینوپاتی دیابتی در جمعیت مورد مطالعه مشاهده نشد. با این وجود جهت تعیین نقش GSTP1 در بیماری رتینوپاتی دیابتی به مطالعات وسیع‌تری نیاز است.

واژگان کلیدی: رتینوپاتی دیابتی، پلی مورفیسم ژنی، GSTP1، استرس اکسیداتیو

*نویسنده مسئول: رشت، خیابان نامجو، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

Email: geneticzs@yahoo.co.uk

مقدمه

رتینوپاتی دیابتی یکی از عوارض شدید دیابت می‌باشد که ناشی از تغییرات مزمن عروق خونی می‌باشد. این بیماری از علل اصلی نابینایی به ویژه در بزرگسالان در سراسر جهان است (۱). در بیماری رتینوپاتی دیابتی، عروق خونی شبکه‌یکه دچار آسیب و حتی انسداد می‌شوند (۲). رتینوپاتی دیابتی یک بیماری چند عاملی است. پاتوژنز این بیماری بسیار پیچیده بوده و فاکتورهایی از قبیل سن، مدت ابتلا به دیابت، میزان چربی خون، فشار خون و عوامل ژنتیکی در آن دخیل می‌باشند (۳). در طول چند دهه اخیر بررسی‌های متعددی در رابطه با نقش عوامل ژنتیکی و شناسایی ژن‌های مؤثر در رتینوپاتی دیابتی صورت گرفته است (۴، ۵). از جمله ژن‌های مورد بررسی می‌توان به ژن کدکننده آلدوزردوکتاز (ALR2) و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor-VEGF) (۶) را نام برد.

برخی از مطالعات مؤید نقش استرس اکسیداتیو در توسعه رتینوپاتی دیابتی می‌باشند (۷-۹). شبکه‌یکه یک بافت سرشار از اسیدهای چرب غیر اشباع است و نسبت به سایر بافت‌ها از اکسیژن بیشتری استفاده می‌کند (۱۰). استرس اکسیداتیو بر اثر عدم تعادل بین تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و ظرفیت سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن ایجاد می‌شود (۱۱). استرس اکسیداتیو، آسیب‌ها و اختلالات گوناگونی در بدن به وجود می‌آورد و در نهایت باعث ایجاد بیماری رتینوپاتی دیابتی می‌شود (۱۲، ۱۳). از ژن‌های تولیدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، خانواده ژنی گلوتاتیون-S-ترانسفرازها (Glutathion s-transferases-GSTs) می‌باشد. گلوتاتیون-S-ترانسفرازها، خانواده ژنی از آنزیم‌های چند عملکردی هستند که در سم زدایی ترکیبات الکتروفیلک مانند؛ کارسینوژن‌ها، سموم محیطی، داروها و مواد غذایی نقش اساس دارند و هم‌چنین در نقل و انتقالات داخل سلولی و محافظت در برابر استرس اکسیداتیو مؤثر می‌باشند. یکی از اعضای خانواده GST، GSTP1 می‌باشد که محل قرارگیری این ژن بر روی بازوی بلند کروموزوم

۱۱ (11q13.2) است. محصول این ژن، پروتئینی با ۲۰۹ اسید آمینه و وزن مولکولی ۲۳ کیلو دالتون می‌باشد (۱۴). این پروتئین با فعالیت آنزیمی، در فاز II سم زدایی داروها نقش دارد و قادر به متابولیزه و غیر فعال کردن تعدادی از داروهای ضد سرطان می‌باشد (۱۵). GSTP1 دارای چندین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی می‌باشد که یکی از مهم‌ترین آنها Ile105Val است که منجر به تغییر اسید آمینه در موقعیت ۱۰۵ پروتئین حاصله می‌گردد. جایگزینی Ile105Val باعث تغییر در جایگاه فعال آنزیم GSTP1 می‌شود، در نتیجه اختصاصیت آنزیم تغییر کرده و به سوبستراهایی کم حجم‌تر متصل می‌شود (۱۶).

علی‌رغم اهمیت رتینوپاتی دیابتی و نقش GSTP1 به عنوان یک آنتی‌اکسیدان، تا کنون مطالعه‌ای در ایران در خصوص ارتباط پلی مورفیسم ژن GSTP1 و رتینوپاتی دیابتی صورت نگرفته است، لذا هدف از این پژوهش، بررسی پلی مورفیسم Ile105Val ژن GSTP1 در بیماری رتینوپاتی در جمعیتی از استان گیلان بوده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد - شاهدهی ۷۰ نفر (۴۰ زن و ۳۰ مرد) مبتلا به رتینوپاتی دیابتی و ۷۰ فرد (۴۰ زن و ۳۰ مرد) سالم به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. محدوده سنی در بیماران و گروه شاهد ۳۰-۷۰ سال بود. فرآیند تهیه نمونه طی ۶ ماه (مرداد تا بهمن ۱۳۹۲) صورت گرفت. از داوطلبین شرکت در مطالعه رضایت‌نامه آگاهانه کتبی اخذ گردید، هم‌چنین تمام نکات اخلاقی در این پژوهش رعایت شد. افراد مورد بررسی تحت تمام آزمایشات لازم (به منظور تایید ابتلا به بیماری دیابت و یا سالم بودن) و معاینات کامل چشم شامل معاینه شبکه‌یکه با گشاد کردن مردمک و استفاده از افتالموسکوپ غیر مستقیم و لنز تماسی توسط پزشک فوق تخصص فلوشیب شبکه‌یکه در بیمارستان امیرالمؤمنین رشت قرار گرفتند. پس از تایید پزشک از افراد مورد مطالعه، ۱ میلی‌لیتر خون محیطی جهت بررسی‌های ژنتیکی دریافت و جهت استخراج مورد استفاده

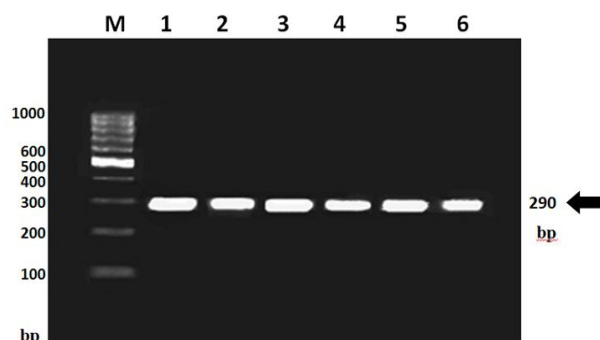
مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر (شرکت BioRad) تنظیم گردید. به منظور اطمینان از تکثیر قطعه مورد، محصولات حاصل از PCR (تمامی نمونه‌ها) روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید. سپس محصول PCR جهت هضم آنزیمی به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، در مجاورت آنزیم *ALW26I(BsmI)* (فرمتتاز) قرار گرفت. سپس محصول تیمار با آنزیم بر روی ژل آگارز ۳ درصد الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند. در پایان با استفاده از آنالیز آماری نسبت شاناس (OR) و فاصله اطمینان ۹۵ درصد (CI) محاسبه و ارتباط بین پلی مورفیسم و بیماری مشخص گردید. آنالیزهای آماری توسط نرم افزار Med Calc نسخه ۱۲ صورت گرفت.

قرار گرفت. به منظور جلوگیری از لخته شدن، نمونه خون درون لوله آغشته به EDTA ذخیره گردید. استخراج DNA توسط کیت GPP Solution (شرکت ژن پژوهان، ایران) و بر اساس پروتکل مربوطه صورت گرفت. DNA استخراج شده توسط اسپکتروفتومتری و الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. تعیین ژنوتیپ با استفاده از واکنش PCR-RFLP انجام شد. در این واکنش از پرایمرهای GSTP-F و GSTP-R جهت تکثیر قطعه‌ای به طول ۲۹۰ جفت باز مربوط به ژن GSTP1 استفاده شد (۱۶) (جدول ۱). برنامه PCR با واسرشته سازی اولیه ۷ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۵ سیکل با برنامه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت به

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن GSTP1

ژن	دمای اتصال	اندازه قطعه تکثیر شده (bp)	توالی آغازگرها
GSTP1	64	290	F: TCCTTCCACGCACATCCTCT R: AGCCCCTTTCTTTGTTTCAGC

ژنوتیپ هموزیگوت Ile/Ile (A/A) برشی توسط آنزیم *BsmAI* صورت نمی‌گیرد.

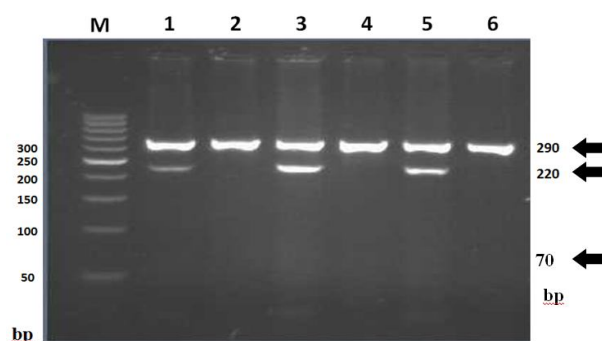


شکل ۱. تصویر ژل آگارز ۲ درصد محصولات PCR. در تمامی نمونه‌ها باند مورد نظر با کیفیت مناسب وجود دارد. M، DNA مارکر ۱۰۰ جفت بازی می‌باشد. ستون‌های ۱-۶، محصولات حاصل از PCR، GSTP1 نشان داده شده است.

یافته‌ها

DNA از تمامی نمونه‌های مورد بررسی استخراج گردید. سپس با استفاده از تکنیک PCR-RFLP به بررسی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های GSTP1 پرداخته شد. با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی تکثیر قطعه‌ای از ژن GSTP1 به طول ۲۹۰ جفت باز از تمامی نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در شکل ۱ وجود باندهای ۲۹۰ جفت بازی نشان دهنده ژن GSTP1 می‌باشد. بر اثر موتاسیون A313G در ژن GSTP1 یک جایگاه برش برای آنزیم (*Alw26I*) *BsmAI* ایجاد می‌شود. جایگاه برش آنزیم *BsmAI* در دو حالت ژنوتیپی وجود خواهد داشت، ژنوتیپ هموزیگوت Val/Val با برش آنزیم دو قطعه ۲۲۰ و ۷۰ جفت بازی ایجاد می‌شود و در ژنوتیپ هتروزیگوت Ile/Val، سه قطعه ۲۲۰، ۲۹۰ و ۷۰ جفت بازی به دست خواهد آمد (شکل ۲). بدیهی است که در صورت وجود

نتایج آزمایشات نشان داد که در ۷۰ فرد بیمار در مجموع ۱۲۰ آلل Ile و ۲۰ آلل Val وجود داشت. در ۷۰ فرد سالم، ۱۲۵ آلل Ile و ۱۵ آلل Val وجود داشت. در رابطه با فراوانی ژنوتیپ‌های بیماران، ۵۰ نفر (۷۱/۴۲ درصد) دارای ژنوتیپ Ile/Ile، ۲۰ نفر (۲۸/۵۷ درصد) دارای ژنوتیپ Ile/Val بودند. در بین ۷۰ فرد سالم ۵۵ (۷۸/۵۷ درصد) نفر دارای ژنوتیپ Ile/Ile و ۱۵ (۲۱/۴۲ درصد) نفر دارای ژنوتیپ Ile/Val بودند. در هیچ یک از افراد بیمار و سالم، ژنوتیپ Val/Val مشاهده نشد. آنالیز آماری داده نشان داد تفاوت معنی‌داری بین دو گروه بیمار و کنترل از نظر پلی مورفیسم Ile105Val ژن GSTP1 وجود ندارد.



شکل ۲. ژل آگارز ۲ درصد. ستون‌های ۲، ۴ و ۶ که ژنوتیپ Ile/Ile، ستون‌های ۱، ۳ و ۵ ژنوتیپ هتروزیگوت Ile/Val را نشان می‌دهد. M، DNA مارکر ۵۰ جفت بازی. قطعات ۲۹۰ و ۲۲۰ جفت بازی قابل رویت و با فلش مشخص شده‌اند. اما قطعه ۷۰ جفت بازی به علت کوچک بودن قابل رویت نبود.

جدول ۲. نتایج مربوط به آنالیز آماری ژنوتیپ‌های ژن GSTP1 در بیماران مبتلا به رتینوپاتی دیابتی و افراد سالم

ژن	ژنوتیپ‌ها	مورد(درصد)	کنترل (درصد)	OR (95% CI)	p
GSTP1	Ile/Ile	۵۰ (۷۱/۴۲)	۵۵ (۷۸/۵۷)		
	Ile/Val	۲۰ (۲۸/۵۷)	۱۵ (۲۱/۴۲)	۱/۴۶ (۰/۶۷-۳/۱۷)	۰/۳۳
	Val/Val	۰	۰	۱/۰۹ (۰/۰۲-۵۶/۴۲)	۰/۹۶

بحث

رتینوپاتی دیابتی، بیماری چشمی خطرناکی است که از علل اصلی نابینایی در بین بزرگسالان در سراسر جهان می‌باشد (۱). شیوع رتینوپاتی دیابتی در آسیایی‌ها ۵/۷ درصد، آمریکایی‌های آفریقایی تبار ۳۶/۷ درصد، سفیدپوستان آمریکایی ۲۴/۸ درصد و اسپانیایی‌ها ۳۷/۴ درصد گزارش شده است (۱۷، ۱۸). این بیماری شبکه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. شبکه یک بافت غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع است که از رگ‌های خونی فراوانی تشکیل شده و نسبت به سایر بافت‌های بدن از اکسیژن بیشتری استفاده می‌کند. بنابراین در مقایسه با سایر بافت‌های بدن، نسبت به گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن و فرآیند استرس اکسیداتیو آسیب پذیرتر می‌باشد. به دلیل اهمیت بیماری رتینوپاتی دیابتی و با در نظر گرفتن نقش آسیب اکسیداتیو در بروز این بیماری، تحقیق حاضر با هدف بررسی پلی مورفیسم Ile105Val ژن GSTP1 که از آنزیم‌های آنتی کسیدانت می‌باشند و احتمال افزایش خطر ابتلا به بیماری رتینوپاتی دیابتی، با

استفاده از روش PCR-RFLP در جمعیتی از استان گیلان انجام شد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در بین افراد بیمار، فراوانی آلل‌های Ile و Val به ترتیب برابر ۸۵/۷۱ و ۱۴/۲۸ درصد و در افراد سالم به ترتیب برابر با ۸۹/۲۸ و ۱۰/۷۱ درصد بود. تفاوت مشاهده شده بین افراد بیمار و سالم با توجه به نتیجه آزمون کای اسکور معنی‌دار نبود ($p > 0/05$)، بنابراین به عنوان فاکتور خطر محسوب نمی‌شود. در رابطه با فراوانی ژنوتیپ‌های GSTP1 نتایج نشان داد که در بین افراد بیمار و سالم، ژنوتیپ Ile/Ile دارای بیشترین فراوانی و ژنوتیپ Val/Val دارای کمترین فراوانی می‌باشد. نتایج نشان دهنده عدم ارتباط این پلی مورفیسم با بیماری رتینوپاتی دیابتی می‌باشد. به عبارت دیگر در جمعیت مورد مطالعه، احتمالاً این پلی مورفیسم تاثیری در بروز و پیشرفت رتینوپاتی دیابتی ندارد.

در رابطه با پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی Ile105Val ژن GSTP1 در بیماری رتینوپاتی دیابتی،

2. Kowluru Ra, Chan Ps. Oxidative Stress And Diabetic Retinopathy. *Exp Diabetes Res*, 2007; 2007: 43603-4.
3. Kwon Dd, Lee Jw, Han Dy, Seo Iy, Park Sc, Jeong Hj, Yang Ys, Chae Sc, Na Ks, Mo Kj, Kim Jj, Rim Js. Relationship Between The Glutathione-S-Transferase P1, M1, And T1 Genotypes And Prostate Cancer Risk In Korean Subjects. *Korean J Urol*, 2011; 52: 247-52.
4. Liew G, Klein R, Wong Ty. The Role Of Genetics In Susceptibility To Diabetic Retinopathy. *Int Ophthalmol Clin*, 2009; 49: 35-52.
5. Abhary S, Hewitt Aw, Burdon Kp, Craig Je. A Systematic Meta-Analysis Of Genetic Association Studies For Diabetic Retinopathy. *Diabetes*, 2009; 58: 2137-47.
6. Van Lieshout Em, Roelofs Hm, Dekker S, Mulder Cj, Wobbles T, Jansen Jb, Peters Wh. Polymorphic Expression Of The Glutathione S-Transferase P1 Gene And Its Susceptibility To Barrett's Esophagus And Esophageal Carcinoma. *Cancer Res*, 1999; 59: 586-9.
7. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative Stress & Male Infertility. *Indian J Med Res*, 2009; 129(1): 357-367.
8. Uhlmann K, Kovacs P, Boettcher Y, Hammes Hp, Paschke R. Genetics Of Diabetic Retinopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2006; 114: 275-94.
9. Du Y, Miller Cm, Kern Ts. Hyperglycemia Increases Mitochondrial Superoxide In Retina And Retinal Cells. *Free Radical Biol Med*, 2003; 35: 1491-19.
10. Moyer Am, Salavaggione Oe, Wu Ty, Moon I, Eckloff Bw, Hildebrandt Ma, Schaid Dj, Wieben Ed, Weinshilboum Rm. Glutathione S-Transferase P1: Gene Sequence Variation And Functional Genomic Studies. *Cancer Res*. 2008; 68: 4791-801.
11. Ryc C, Berggren P, Kumar R, Hemminki K, Larsson P, Steineck G, Lambert B, Hou Sm. Influence Of Gstm1, Gstt1, Gstp1 And Nat2 Genotypes On The P53 Mutational Spectrum In Bladder Tumours. *Int J Cancer*. 2005; 113: 761-8.
12. Cilensek I, Mankoc S, Petrovic Mg, Petrovic D. Gstt1 Null Genotype Is A Risk Factor For Diabetic Retinopathy In Caucasians

مطالعه‌ای توسط کلنسک و همکاران روی جمعیتی از قفقازی‌های مبتلا به رتینوپاتی دیابتی (۶۰۴ فرد شامل ۲۸۴ نفر بیمار و ۳۲۰ نفر به عنوان گروه کنترل) صورت گرفت. در این بررسی، فراوانی ژنوتیپ‌های Ile/Val، Ile/Ile و Val/Val در افراد بیمار به ترتیب برابر با ۴۰/۵، ۴۴/۴ و ۱۱/۴ درصد و در افراد سالم به ترتیب برابر با ۴۶/۴، ۴۴/۴ و ۹/۶ درصد به دست آمد. با توجه به نتیجه آزمون کای اسکوئر ($\chi^2=1.8$ و $P=0.373$) تفاوت معنی‌داری بین افراد بیمار و سالم مشاهده نشد (۳). هم‌چنین رابطه خاصی در خصوص این پلی مورفیسم با بیماری‌هایی نظیر سرطان پروستات (۱۹)، سرطان حنجره (۲۰)، بیماری دیابت تیپ II (۲۱) مشاهده نشد، در حالی که در برخی از مطالعات ارتباطی بین پلی مورفیسم Ile105Val ژن GSTP1 با بیماری‌هایی مانند سرطان سینه (۲۲)، آدنو کارسینوم مری (۲۳) و آلزایمر (۲۴) گزارش شده است.

نتیجه گیری

به طور کلی نتایج حاصل از این بررسی نشان دهنده عدم وجود ارتباط معنی‌دار بین پلی مورفیسم Ile105Val ژن GSTP1 با بیماری رتینوپاتی دیابتی می‌باشد. گرچه برای ارزیابی دقیق‌تر نقش پلی مورفیسم Ile105Val ژن GSTP1 در رتینوپاتی دیابتی به مطالعات بیشتر و بررسی در جمعیت‌های بزرگ‌تر و اقوام گوناگون نیاز می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از تحصیلات تکمیلی دانشگاه گیلان به دلیل حمایت مالی بخشی از پروژه کمال تشکر را داریم. در ضمن از تمامی بیماران و افراد سالم شرکت کننده در این تحقیق تشکر می‌نماییم.

منابع

1. El-Bab Mf, Shawky N, Al-Sisi A, Akhtar M. Retinopathy And Risk Factors In Diabetic Patients From Al-Madinah Al-Munawarah In The Kingdom Of Saudi Arabia. *Clin Ophthalmol*. 2012; 6: 269-76.

With Type 2 Diabetes, Whereas Gstm1 Null Genotype Might Confer Protection Against Retinopathy. *Dis Markers*. 2012; 32: 93-9.

13. Phillips M, Cataneo Rn, Cheema T, Greenberg J. Increased Breath Biomarkers Of Oxidative Stress In Diabetes Mellitus. *Clin Chim Acta*. 2004; 344: 189-94.

14. Ola Ms, Nawaz Mi, Siddiquei Mm, Al-Amro S, Abu El-Asrar Am. Recent Advances In Understanding The Biochemical And Molecular Mechanism Of Diabetic Retinopathy. *J Diabetes Complications*. 2012; 26: 56-64.

15. Valko M, Morris H, Cronin Mt. Metals, Toxicity And Oxidative Stress. *Curr Med Chem*. 2005; 12: 1161-208.

16. Sarhanis P, Redman C, Perrett C, Brannigan K, Clayton Rn, Hand P, Musgrove C, Suarez V, Jones P, Fryer Aa, Farrell We, Strange Rc. Epithelial Ovarian Cancer: Influence Of Polymorphism At The Glutathione S-Transferase Gstm1 And Gstt1 Loci On P53 Expression. *Br J Cancer*. 1996; 74: 1757-61.

17. Ramprasath T, Senthil Murugan P, Prabakaran Ad, Gomathi P, Rathinavel A, Selvam Gs. Potential Risk Modifications Of Gstt1, Gstm1 And Gstp1 (Glutathione-S-Transferases) Variants And Their Association To Cad In Patients With Type-2 Diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 407: 49-53.

18. Allen A , Tresini M. Oxidative Stress And Gene Regulation. *Free Radic Biol Med*, 2000; 28: 463-99.

19. Helzlsouer Kj, Selmin O, Huang Hy, Strickland Pt, Hoffman S, Alberg Aj, Watson M, Comstock Gw, Bell D. Association Between Glutathione S-Transferase M1, P1, And T1 Genetic Polymorphisms And Development Of Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90: 512-8.

20. Unal M, Tamer L, Ates Na, Akbas Y, Pata Ys, Vayisoglu Y, Ercan B, Gorur K, Atik U. Glutathione S-Transferase M1, T1, And P1 Gene Polymorphism In Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Am J Otolaryngol*. 2004; 25: 318-22.

21. Parl Ff. Glutathione S-Transferase Genotypes And Cancer Risk. *Cancer Lett*. 2005; 221: 123-9.

22. Wong Ty, Klein R, Islam Fm, Cotch Mf, Folsom Ar, Klein Be, Sharrett Ar, Shea S. Diabetic Retinopathy In A Multi-Ethnic Cohort In The United States. *Am J Ophthalmol*. 2006; 141: 446-55.

23. Scanlon Ph. Diabetic Retinopathy. *Medicine*. 2010; 38: 656-60.

24. Zuntar I, Kalanj-Bognar S, Topic E, Petlevski R, Stefanovic M, Demarin V. The Glutathione S-Transferase Polymorphisms In A Control Population And In Alzheimer's Disease Patients. *Clin Chem Lab Med*. 2004; 42: 334-9