مجله پژوهش های معاصر در علوم و تحقیقات
سال چهارم، شماره ۳۵، خرداد ۱۴۰۱
ISSN: ۲۶۷۶-۵۷۶٤
www.jocrisar.ir

تعیین درصد فراوانی ژنوتیپی و آللی چند شکلی rs1056827 در ژن CYP1B1 در بیماران مبتلا به سرطان پروستات

سیدعلی عبداللهی اسکویی [۱] ، زهرا طهماسبی فرد [۲] ، پریسا مکوندی [۳] ، غزال ده پور [۴]

[۱] گروه زیست شناسی، واحد بناب، دانشگاه آزاد اسلامی، بناب، ایران (نویسنده مسئول)
[۲] گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رودهن، رودهن، ایران
[۳] گروه علوم زیستی دانشگاه پردیس بین الملل تبریز واحد ارس
[۴] کارشناس زیست فناوری دانشگاه ازاد اهواز واحد اهواز

چکیده

مقدمه:در سال ۲۰۱۲، سرطان پروستات دومین سرطان شایع در مردان و پنجمین علت مرگ ناشی از سرطان در مردان بود.مطالعات ارتباط گسترده ژنوم نشان داده است که ژن‌های خاصی که در سم‌زدایی و حذف ترکیبات مضر از سلول‌ها نقش دارند، مانند ژن‌های خانواده بزرگ ژن سیتوکروم P450، نقش مهمی در ایجاد سرطان پروستات دارند. سرطان پروستات و پلی مورفیسم rs۱۰۵۶۸۲۷ بر روی ژن CYP1B1 به عنوان بخشی از این مطالعه در جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار خواهد گرفت. منابع و رویه ها: در این بررسی مورد-شاهدی، DNA ژنومی ۷۹ بیمار مبتلا به سرطان پروستات و ۷۹ فرد سالم به روش Salting out استخراج شد و ژنوتیپ شرکت‌کنندگان با استفاده از روش PCR RFLP پس از نمونه‌گیری خون شناسایی شد. برای بررسی داده های جمع آوری شده از نرم افزار IBMSPSS 23 و آزمون های آماری X و رگرسیون لجستیک استفاده شد. نتایج: بر اساس تجزیه و تحلیل آماری نتایج، بین دو گروه در خطر ابتلا به سرطان ژنوتیپ TT تفاوت معنی داری وجود دارد [P=۰/۰۲۸، OR: 0.439، CI: 0.209-0.924]، اما از نظر نسبت خطر سرطان، ژنوتیپ TT اثر محافظتی دارد و خطر ابتلا به بیماری را کاهش می دهد. هر دو گروه تفاوت زیادی در شیوع ژنوتیپ GG داشتند که خطر ابتلا به عفونت را ۱۰۶۲ برابر افزایش می دهد. هر دو گروه دارای مقدار P 0.023 بودند، اگرچه مشخص شد که ژنوتیپ هتروزیگوت تأثیری بر نتایج ندارد. آلل T یک اثر محافظتی در برابر سرطان پروستات می دهد و خطر ابتلا به این بیماری را کاهش می دهد. در مقابل، آلل G خطر ابتلا به سرطان پروستات را افزایش می دهد. پلی مورفیسم Cyp1B1 1056827rs به عنوان یک نشانگر زیستی بالقوه برای سرطان پروستات شناسایی شده است.

واژه‌های کلیدی: سرطان پروستات، CYP۱B۱ ، ژنوتیپی و آللی چند شکلی ، rs۱۰۵۶۸۲۷

مقدمه

ارگان های لگن در پشت حفره شکمی قرار گرفته اند و توسط آناتومی لگنی محاصره شده اند. غده پروستات تقریبا در وسط حفره شکمی قرار گرفته به نحوی که مثانه در بالای غده پروستات واقع شده و از میان آن مجرای پیشابراه مثانه عبور می کند [۴-۱]. از سوی دیگر رکتوم و کانال مقعد در پشت غده پروستات قرارگرفته اند (شکل ۱-۲). روده بزرگ نیز از مجاورت غده پروستات عبور کرده که گستردگی آن از استخوان ایلیوم تا مقعد بوده و می توان آن را به چهار ناحیه اصلی شامل روده کور، کولن، رکتوم و کانال مقعد تقسیم نمود [۸-۵].

پروستات در تقیسم بندی غدد بدن به درون ریز و برون ریز، بدلیل آنکه مواد ترشح شده از آن از طریق مجاری به بیرون از بدن می ریزد بعنوان یک غده برون ریز شناخته می شود. مایع تولید شده بوسیله پروستات به همراه اسپرم در کیسه های منی ذخیره می شود که این مایع در حدود یک سوم مایع منی را تشکیل می دهد. این مایع در آمیزش جنسی وظیفه حمل و تغذیه اسپرم را بر عهده دارد. از سوی دیگر حالت قلیایی این مایع، اسپرم را در محیط اسیدی واژن محافظت می کند. این غده در هنگام انزال منقبض شده و یک ماده شیری رنگ قلیایی (pH =۷/۲۹) را به منی اضافه می کند که حالت ژلاتینی مانند منی بواسطه ترشح این ماده می باشد [۹]. از جمله مواد تشکیل دهنده ترشحات پروستات می توان به کلسیم، روی، ویتامین ث (اسید سیتریک)، اسید فسفاتاز، آلبومن و آنتی ژن اختصاصی پروستات (PSA) اشاره کرد [۱۲-۱۰].

آنتی ژن اختصاصی پروستات، پروتئین مخصوص پروستات را تولید می کند که وارد مایع انزالی می شود و در زمان مناسب به حفظ حالت مایع منی کمک کرده و مانع از لخته شدن منی می شود. منی اندکی پس از وارد شدن به دستگاه تناسلی زنانه، لخته شده، به ماده ای ژلاتینی مانند تبدیل شده و به گردن رحم می چسبد. پس از ۱۵ الی ۳۰ دقیقه پس از لخته شدن منی، آنزیم PSA این لخته را حل کرده و از این پس اسپرم می تواند بطور آزادانه در رحم حرکت کند [۱۳]. جدا ازنقش پروستات در تولید مثل، این غده نقش مهمی در ادارار مردان نیز ایفا می کند. پروستات مجرای پیشابراه را در فاصله مثانه تا آلت تناسلی در برگرفته است که منقبض شدن عضلات پروستات سبب آهسته شدن جریان ادرار می شود [۱۴].

انواع مختلفی از سلول ها در غده پروستات وجود دارند. ولی تقریباً تمام سرطان‌های پروستات از سلول‌های غده‌ای منشاء می‌گیرند که در اصطلاح به این نوع سرطان، آدنوکارسینوم گفته می‌شود. برخی تغییرات بوجود آمده در DNA سلول‌های پروستات یکی از عوامل بروز سرطان می باشد. اگرچه تنها درصد کمی از سرطان‌های پروستات (حدود ۱۰/۵٪) مرتبط با این تغییرات بوجود آمده در ساختار DNA ژنومی می باشد [۱۵].

از سوی دیگر وجود سطوح بالای هورمون یکی دیگر از عوامل مرتبط با استعداد ابتلا به سرطان پروستات می باشد. بر مبنای مطالعات انجام یافته سطوح بالای هورمون مردانه یا آندروژن، نقش مهمی‌در افزایش خطر سرطان پروستات در بعضی از مردان ایفا می‌کند. تحقیقات نشان می‌دهند، مردانی که دارای سطوح بالاتری از هورمون IGF-1 می باشند، درخطر بالاتری برای ابتلا به سرطان پروستات قرار دارند [۱۶].

از آنجا که سرطان پروستات بعنوان یک سرطان شایع و رو به گسترش در کشورهای در حال توسعه و از جمله ایران شناخته می شود، بنابر این شناخت هر چه بیشتر و دقیق تر عوامل دخیل در بروز و گسترش آن می‌تواند در شناسایی افراد مستعد ابتلا به سرطان، وهمچنین پیشگیری و کنترل بیمار و نیز در زمنیه دست یابی به روش های درمانی مناسب تر مورد استفاده قرار گیرد .

مطالعات پیشین انجام یافته در زمینه شناسایی عوامل ژنتیکی مرتبط با سرطان پروستات از اهمیت ژنهای دخیل در متابولیسم آندروژن ها و نقش آنها در بروز سرطان در بافتهای وابسته به هورمون حکایت دارد . از این رو شناسایی و بررسی تغییرات ژنتیکی شناسایی شده بر روی این ژن ها همچون تغییرات تک نوکلئوتیدی شایع عملکردی که دارای نقشی مهم در پیدایش و پیشروی سرطان هستند، در کنترل بیماری موثر خواهند بود.

با توجه با مطالب ذکر شده از یک سو و نقش موثر ژن CYP1B1 در متابولیسم آندروژن ها از سوی دیگر، بنظر می رسد که بروز تغییرات تک نوکلئوتیدی در این ژن می تواند میزان عملکرد این ژن را تحت تاثیر قرار داده به نحوی که بر مبنای گزارشات انتشار یافته در این زمینه، خاصیت هیدروکسیلازی پروتئین تغییر یافته می تواند بین دو تا چهار برابر افزایش یابد.

از این رو در تحقیق پیش رو ارتباط میان یکی از پلی مورفیسم های شایع موثر بر عملکرد ژن CYP1B1 و شانس ابتلا به سرطان پروستات در جمعیت مردان ایرانی مطالعه خواهدشد تا در صورت یافتن ارتباط معنی دار، بتوان از آن بعنوان یکی از فاکتورهای دخیل مرتبط با سرطان پروستات و بعنوان یک مارکر زیستی پیشگویی کننده خطر ابتلا به این بیماری در جمعیت ایرانی استفاده نمود.

این تحقیق در قالب یک مطالعه مورد- شاهدی و بر روی مجموع۱۵۸نفر از مراجعه کنندگان به مرکز تحقیقات دستگاه ادراری_تناسلی بیمارستان امام خمینی تهران انجام گرفته است. اطلاعات مربوط به سن، جنس، قومیت و نیز سوابق ابتلا به برخی بیماری های شایع از قبیل بیماری‌های قلبی- عروقی و دیابت از پرونده پزشکی بیماران گرفته شد سپس ۳cc از خون بیمار در یک لوله آزمایش حاوی(EDTA (3mg/ml ریخته و به آرامی مخلوط گردید تا مانع عمل انعقاد شود. نمونه ها در روی یخ نگهداری شدند. نمونه خون با EDTA مخلوط شد تا از لخته شدن آن جلوگیری شود.

در مطالعه حاضر روش انتخابی برای استخراج DNA روش نمک اشباع (salting out) بوده است. مواد لازم برای این روش عبارتند از:

≠ Lysis buffer
≠ Tris-HCl (10 mM) pH 7/6
≠ MgCl2 (0/5 mM)
≠ Sucrose (0/32M)
≠ Triton X-100 %1
≠ S.B. P
≠ NaCl (8gr)
≠ KCl (0/2gr)
≠ Na2HPO4(1/44gr)
≠ KH2PO4 (0/24 gr)
≠ Up to 1000cc with dH2O pH 7/4
≠ NaOH 50m M
≠ Tris-HCl (1M) pH 7/6

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی

روش تهیه نمونه

در مرحله اول اطلاعات بالینی بیماران باتوجه به فرمهای تهیه شده، کامل شد و رضایت‌نامه کتبی با دادن آگاهی کامل از افراد مورد نظر اخذ شده سپس نمونه‌گیری آغاز گردید.

ابتدا از افراد مورد بررسی ۵ میلی لیترخون جهت استخراج DNAگرفته شد و به لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA ۰/۵ مولار ۲۰۰ میکرولیتر اضافه شد. سپس استخراج DNA بر طبق پروتکل استاندارد که در زیر به تفصیل توضیح داده شدهاست انجام گردید و نمونه‌های DNA تخلیص شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه‌داری شد.

استخراج DNA

مرحله اساسی و مهم در انجام PCR و مطالعات مولکولی، تخلیص DNA می‌باشد، لذا برای جلوگیری از اشتباهات و اشکالاتی که ممکن است در PCR پیش آید، استخراج DNA نیاز به وقت و دقت خاصی داشته و شرایط ویژه‌ای باید رعایت گردد. از شرایط اساسی نمونه استخراج شده آن است که نمونه حداقل حاوی یک زنجیره DNA سالم، در برگیرنده ناحیه مورد نظر جهت تکثیر باشد و اینکه ناخالصی تا حدی کم باشد که پلیمریزاسیون را مهار ننماید. در استخراج DNA یک سری از نکات باید مورد توجه قرار گیرند که عبارتند از:

آنزیم‌های مختلفی در سلول وجود دارد که می‌توانند DNA را تجزیه کنند. مهمترین آسیب از جانب دزاکسی ریبونوکلئازها می‌باشد که هیدرولیز اتصالات فسفودی استر را کاتالیز می‌کنند. یون های Mn^{2+} و Mg^{2+} کوفاکتور این نوکلئازها هستند، لذا با افزودن EDTA به محلول استخراج DNA ، می‌توان با شلات کردن این یون‌ها عمل مخرب این آنزیم ها را مهار کرد. pH محیط نیز باید قلیایی و ملایم و در حدود ۸ باشد، زیرا در این pH میزان بار مثبت هیستون ها کاهش یافته و در نتیجه واکنش های الکترواستاتیک بین DNA و هیستون‌ها کاهش یافته و همچنین فعالیت نوکلئازها در این pH کمتر می‌گردد. از سوی دیگر pH نسبتاً بالا در جهت دناتوره کردن پروتئین نیز عمل می‌کند.

به طور طبیعی DNA در سلول‌ها به صورت کمپلکس DNA و پروتئین می‌باشد. بعلاوه پروتئین‌ها و لیپیدهای سلول نیز باید از اسید نوکلئیک جدا شوند که در این مورد نیز از ترکیبات مختلفی استفاده می‌شود. معمولاً از مواد دترجنت برای از بین بردن واکنش‌های یونی بین هیستون‌های با بار مثبت و اسکلت حامل بار منفی DNA استفاده می‌شود.رایج‌ترین شوینده مورد مصرف دترجنت آنیونی SDS-Sodium Dodecyl Sulfateمی‌باشد که به پروتئین‌ها متصل شده و به آنها مقدار زیادی خاصیت آنیونی می‌دهد؛ در نتیجه واکنش‌های یونی کمتری بین هیستون ها وDNA ایجاد می‌شود. نقش دیگر SDS دناتوره کردن دزاکسی ریبونوکلئازها و سایر پروتئین‌ها می‌باشد تا SDS رسوب نکند. جهت دپروتئینه کردن بهتر می‌توان از پروتئیناز K که یک پروتئیناز عمومی است در حضور SDS استفاده نمود. از آنجایی که این آنزیم فعالیت بالایی داشته و قادر به هضم پروتئین‌های دست نخورده است و از سویی دیگر چون سوبستراهای مورد هضم این آنزیم بسیار متنوع می‌باشد، کاربرد قابل توجهی در مراحل تخلیص اسیدهای نوکلئیک دارد. این آنزیم فعالیت خود را در حضورSDS حفظ می‌نماید. این خاصیت آنزیم به ما امکان می‌دهد تا ازآن همراه با لیز کردن سلول ها که توام با آزادی فوری نوکلئازها است، استفاده نماییم. pH مطلوب عملکرد این آنزیم ۱۲- ۷/۵است ولی غالباً در محدوده ۹- ۷/۹ به کار می‌رود و شرایط محلول واکنش که مناسب فعالیت این آنزیم است TES با ۸ /۷ = pH می‌باشد. در انتهای این مرحله باید از NaCl اشباع استفاده کرد تا با کمک آن پروتئین های اضافی به نمک باند شده و رسوب نمایند و DNA برای مرحله رسوب دادن آماده گردد.

افزودن الکل سبب کاهش قطبیت محیط آبی شده و به توده‌ای شدن رشته‌های محلول DNA و تجمع آنها کمک کرده و در نتیجه سبب رسوب DNA می‌شود. الکل سبب توده شدن رشته های محلول DNA و نیز تجمع آنها می‌گردد.

رسوب DNA را معمولاً در بافر TE حل می‌نمایند.

با توجه به کمیت و کیفیت مناسب DNAی حاصله برای انجامPCR و بی‌ضرر بودن محلول‌های مورد استفاده، DNA ی بیماران از روش نمک اشباع شده با استفاده از پروتئیناز Kو ایزوپروپانل استخراج گردید.

روش کار

مقدار ۵ml خون وریدی را در لوله حاوی ۲۰۰ ماکرولیتر EDTAM ۰/۵ به عنوان ماده ضد انعقاد ریخته خوب مخلوط نموده تا لخته نشود. جهت لیز کردن گلبولهای قرمز خون در حدود دو برابر حجم اولیه آب مقطر سرد اضافه می کنیم و به خوبی تکان می دهیم و به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm در دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم. در پایان این مرحله یک رسوب سفید رنگ خیلی فشرده در ته لوله داریم و محلول رویی حاوی گلبولهای قرمز متلاشی شده است که با کج کردن لوله این محلول را خارج می‌کنیم و دوباره به همان میزان آب مقطر سرد به رسوب بدست آمده اضافه می‌کنیم و خوب تکان می‌دهیم و

۳۰ دقیقه با همان دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ می‌کنیم تا مابقی گلبولها را لیز کرده ، عمل شستشو را تا تمیز شدن رسوب از گلبولهای قرمز ادامه می‌دهیم. دوباره محلول رویی را خارج و به لوله‌های حاوی رسوب که در این مرحله حدود ۵-۰/۱cc است آن هم به واسطه اینکه گلبولهای سفید در آب متورم شده، مقدار ۴/۵ ml Tris-EDTA Salt (TES) اضافه کرده به خوبی تکان می‌دهیم تا رسوب بدست آمده کاملا به حالت محلول درآید. در اینجا می‌توانیم نمونه را جهت توقف کار در فریزر نگه داریم و بقیه مراحل را بعدا انجام دهیم در غیر اینصورت ادامه مراحل را طی می‌کنیم. مقدار ۲۵۰ µl ۱٪ SDS اضافه می‌کنیم SDS یک ماده پاک کننده محسوب می‌شود که اسیدهای چرب جدار گلبولهای سفید را حل می‌کند . بعد ۷۰µl پروتئیناز K با غلظت ۱۰ mg/ml اضافه می‌کنیم و از ۳ تا ۲۴ ساعت می‌توان درون بن ماری ۳۷ °C قرار می‌دهیم . این مرحله باعث پاره شدن غشاء سلولی و هسته گشته و رشته‌های DNA آزاد می‌گردد.

بعد از گذشت زمان مورد نظر و لیز شدن گلبولهای سفید، حدود ۲ cc NaCl اشباع به لوله ها اضافه کرده و آنرا یکی دوبار تکان داده تا کدر شود و به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ انجام می‌دهیم .

محلول رویی که حاوی DNA می‌باشد را به لوله دیگری انتقال داده و به ۰/۷ حجم محتویات لوله به آن ایزوپروپانول اضافه نموده که این الکل عمل آب گیری و ظاهر کردن کلاف DNA را انجام می‌دهد.

سپس DNA را به میکروتیوپ ۱/۵ ml انتقال داده با دور ۸۰۰۰ به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفوژ کرده که DNA به ته میکروتیوپ بچسبد بعد مایع رویی که حاوی ایزوپروپانل و نمک می‌باشدرا خالی کرده و سپس آنرا دوبار با الکل ۷۰ درصد شستشو می‌دهیم ، جهت شستشوی DNA مقدار ۱ ml الکل (متانل) ۷۰ درصد سرد به میکروتیوپ اضافه کرده و پس از تکان دادن تیوپ آنرا به مدت ۵ ثانیه با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم . سپس بقایای الکل را خارج نموده و تیوپ حاوی DNA را به مدت ۳۰ دقیقه در مجاورت هوا قرار می‌دهیم تا الکل باقیمانده تبخیر شود . سپس به DNA بدست آمده به نسبت حجم آن ۵۰ الی ۳۰۰ میکرولیتر محلول TE (Tris-Hcl , EDTA) اضافه کرده و آنرا در یخچال نگهداری می‌نمائیم.

تکثیر ناحیه ایی DNA به روش PCR

واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

این روش در سال ۱۹۸۳ توسط کاری مولیس طراحی شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز، در حال حاضر یک روش معمول و اغلب ضروری بوده که در بسیاری از آزمایشگاه های پژوهشی و مراکز تحقیقاتی پزشکی و بیولوژیکی از آن در زمینه های گوناگون همچون کلون سازیDNA برای تعیین توالی، تعیین فیلوژنی بر اساس DNA، تجزیه و تحلیل عملکرد ژن، تشخیص بیماریهای ارثی، شناسایی اثر انگشت ژنتیکی (مورد استفاده در علوم پزشکی قانونی و تشخیص هویت) و شناسایی و تشخیص بیماری‌های عفونی استفاده می شود.

واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت تکثیر یک منطقه خاص از یک رشته DNA که به اصطلاح DNA هدف نامیده می شود، مورد استفاده قرار می گیرد. در بیشتر روش‌های PCR به طور معمول قطعات DNA از بین ۰/۱ تا ۱۰ کیلو جفت باز (کیلو باز) تکثیر می‌شوند؛ هر چند در برخی از روش‌ها تکثیر قطعاتی با طول ۴۰ کیلو باز نیز امکان پذیر می باشد. واکنش زنجیره ای پلیمراز، معمولا در حجم واکنش ۱۰-۲۰۰ میکرولیتر در لوله‌های واکنش کوچک (حجم۰/۲-۰/۵میلی لیتر) در ترموسایکلرها انجام می‌شود و راه اندازی PCR اولیه به اجزای مختلف و معرف هایی نیاز دارد که این اجزاء عبارتند از:

- الگویDNA که حاوی منطقه هدف برای تکثیر باشد.
- دو جفت آغازگر که مکمل ناحیه ٔ۳ نواحی سنس و آنتی سنس رشته DNA هدف باشند.
- Taq پلیمراز و یا نوع دیگری از DNA پلی مراز با درجه حرارت مطلوب (حدود ۷۰ درجه سانتی گراد)
- داکسی نوکلئوتیدها (dNTPs)، که گاهی اوقات "داکسی نوکلئوتید تری فسفات‌ها" نامیده می‌شوند. نوکلئوتیدهایی که شامل گروههای تری فسفات هستند و واحدهای ساختمانی که DNA پلیمراز بوسیله آنها یک رشته DNA جدید را سنتز می‌کنند.

- محلول بافر، که یک محیط شیمیایی مناسب برای فعالیت بهینه و ثبات DNA پلیمراز ارائه می‌کند.
- کاتیونهای دو قطبی منیزیم و یا یونهای منگنز، که به طور معمول از Mg^{+2} استفاده می‌شود.
- KCL.

روش انجام PCR

به طور معمول، PCR شامل یک سری ۲۰-۴۰ تکرار تغییرات دما، به نام چرخه می‌باشد. هر چرخه که معمولا متشکل از ۲-۳ مرحله دمای مجزاست، معمولا دارای سه مرحله می‌باشد. چرخه اغلب توسط یک درجه حرارت منفرد به نام hold که درجه حرارت بالایی می‌باشد (بالاتر از ۹۰ درجه سانتیگراد) شروع می‌شود. درجه حرارت مورد استفاده و مدت زمان آنها در هر چرخه به انواع پارامترها بستگی دارد. این پارامترها عبارتند از : آنزیم مورد استفاده برای سنتز DNA، غلظت یونهای دو ظرفیتی و dNTPs در واکنش و دمای ذوب (TM) آغازگر.

مرحله اولیه: این مرحله شامل حرارت دادن محلول واکنش در درجه حرارت ۹۶- ۹۴ درجه سانتیگراد (۹۸ درجه سانتیگراد اگر پلیمرازهای بسیار مقاوم به حرارت استفاده شود) می باشد که به مدت ۹-۱ دقیقه صورت می‌گیرد. این مرحله به منظور فعال سازی گرمایی DNA پلیمراز انجام می شود. مرحله دناتوراسیون: این مرحله اولین رویداد چرخه PCR بوده و شامل حرارت دادن واکنش به اندازه ۹۸- ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰- ۲۰ ثانیه می باشد. این امر سبب ذوب شدن DNA الگو توسط شکستن پیوند هیدروژنی بین بازهای مکمل شده که نتیجه آن تک رشته ای شدن مولکول DNA می‌باشد. البته زمان داده شده به دستگاه در مراحل مختلف PCR، با توجه به میزان نوکلئوتیدهای C و G متغیر می باشد.

مرحله اتصال پرایمرها: دمای واکنش به ۶۵-۵۰ درجه سانتیگراد به مدت۴۰ -۲۰ ثانیه کاهش می‌یابد. که این امر امکان اتصال آغازگر ها به DNA الگوی تک رشته را فراهم می کند. به طور معمول دمای اتصال حدود ۵-۳ درجه سانتیگراد زیر دمای Tm پرایمر است. در این مرحله آنزیم پلی مراز به هیبرید پرایمر و الگو متصل شده و مرحله توسعه و طویل شدن رشته DNA هدف آغاز می‌شود.

مرحله توسعه یا طویل شدن: دمای این مرحله بستگی به DNA پلیمراز مورد استفاده دارد. اگرچه Taq پلیمراز دارای دمای فعالیت مطلوب در بازه دمایی ۸۰- ۷۲ درجه سانتیگراد می باشد؛ با این حال بطور معمول دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای این آنزیم استفاده می‌شود. در این مرحله DNA پلیمراز سنتز یک رشته DNA مکمل جدید برای رشته DNA الگو با اضافه کردن dNTPs در جهت ´۵ به ´ ۳ انجام می‌دهد.

طویل شدن نهایی: این مرحله تنها گاهی اوقات در درجه حرارت ۷۴-۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵-۵ دقیقه و بعد از آخرین چرخه PCR انجام می‌شود و هر گونه DNA تک رشته ای باقی مانده به طور کامل توسعه می یابد .

Hold نهایی: این مرحله می تواند دردمای ۱۵-۴ درجه سانتیگراد برای زمان نامحدود جهت ذخیره سازی کوتاه مدت واکنش استفاده شود.

الکتروفورز

در طول سال‌های گذشته روش‌های زیست شناسی مولکولی، از جمله واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) ، به طور گسترده ای برای کاربردهای پزشکی و پزشکی قانونی و همچنین تحقیق و تشخیص و شناسایی ارگانیسم‌های عفونی استفاده می‌شود. در این روش مولکول های اسید نوکلئیک بر اساس اندازه از هم جدا می شوند که این امر بر مبنای حرکت مولکول‌های با بار منفی (DNA) به سمت قطب آند (مثبت) انجام می‌شود. از این رو جریان مهاجرت صرفا با وزن مولکولی تعیین می‌شود که در آن مولکول‌های با وزن کوچک سریعتر از مولکول های بزرگتر مهاجرت می‌کنند. .

از سوی دیگر، دقت در تشخیص قطعات DNA با حساسیت ماتریکس الکتروفورز مورد استفاده دارای ارتباط مستقیم است. انتخاب ماتریکس ژل مورد استفاده، در درجه اول به اندازه قطعات مورد نظر که می بایست جدا

الکتروفورز با ژل آگارز (AGE)

آگارز یک پلیمر طبیعی استخراج شده از جلبک دریایی است هنگامیکه که در یک بافر گرم شده وسپس خنک می‌شود یک ماتریکس ژله ای با پیوند هیدروژنی را، ، شکل می‌دهد. ژل آگارز محبوبترین محیط برای جداسازی اسیدهای نوکلئیک متوسط و بزرگ می‌باشد و طیف وسیع تفکیک را نشان می‌دهد که باندهایی را بصورت مجموعه‌های فازی وپخش شده جدا از هم، در ژل تشکل می‌دهد. این باندها نتیجه اندازه منافذ ژل بوده و می‌تواند تا حد زیادی قابل کنترل باشد. با این حال استفاده از این روش همچون تمامی روش های آزمایشگاهی دارای مزایا و معایب مختص به خود بوده که در جدول ۱ به آن اشاره شده است.

جدول ۱ مزایا و معایب الکتروفورز با ژل آگارز

مزایا	معایب
محیط غیر سمی	هزینه بالای آگارز
کار کرد ساده وسریع	باندها فازی
جداکردن مولکول‌های بزرگ DNA	تفکیک ضعیف نمونه‌ها با وزن مولکولی کم

غلظت ژل آگارز

درصد آگارز استفاده شده بستگی به اندازه قطعات مورد نظر دارد. غلظت آگارز درصدی از آگارز به حجم بافر مورد استفاده می باشد که بطور معمول ژل آگارز در محدوده۰/۲٪ تا ۳٪ تهیه می‌شود. به طورکلی اگر هدف جداکردن قطعات بزرگ DNA باشد غلظت کم آگارز استفاده می‌شود و اگرهدف جداکردن قطعات کوچک DNA باشد استفاده از غلظت های بالای آگارز توصیه می‌شود

.

جدول۲-۳ :غلظت ژل آگارز برای DNA خطی حل شده

غلظت آگارز (٪)	سایز DNA (bp)
۰/۲	۴۰۰۰۰-۵۰۰۰
۰/۴	۳۰۰۰۰-۵۰۰۰
۰/۶	۱۰۰۰۰-۳۰۰۰
۰/۸	۷۰۰۰-۱۰۰۰
۱	۵۰۰۰-۵۰۰
۱/۵	۳۰۰۰-۳۰۰
۲	۱۵۰۰-۲۰۰
۳	۱۰۰۰-۱۰۰

سیستم‌های بافری الکتروفورز

جدایی موثر اسیدهای نوکلئیک با ژل آگارز بستگی به نگهداری موثر PH درماتریکس دارد. بنابراین، بافر بخش جدایی ناپذیر از هر روش الکتروفورزی می‌باشد. علاوه براین، حرکت الکتروفورتیک DNA توسط ترکیب و قدرت یونی (مقدارنمک) بافر الکتروفورز تحت تاثیر قرار می‌گیرد. بدون نمک، هدایت الکتریکی حداقل است و DNA به سختی حرکت می‌کند .

ولتاژ یا همان جریان بالاتر، مهاجرت سریعتر DNA را به دنبال خواهد داشت. باید در نظر داشت که استفاده از ولتاژ بسیار بالا سبب افزایش فوق العاده دمای بافر در زمان بسیار کوتاه می‌شود که این امر می تواند به ذوب شدن ژل و کاهش وضوح باند DNA منجر شود. بنابراین، بسیار توصیه می‌شود که ولتاژ از ۸-۵ و آمپر ۷۵ از میلی آمپر برای ژل‌های با اندازه‌های استاندارد و یا ۱۰۰ میلی آمپر برای ژل‌های کوچک تجاوز نکند. از سوی دیگر، هنگامی که ولتاژ بیش از حد کم است، تحرک مولکول های DNA کوچک کاهش یافته و گسترش باند به علت پراکندگی و انتشار رخ خواهد داد.

روش PCR–RFLP

مشخص شده است که ژنوم موجودات به طور طبیعی دارای تفاوت هایی در ردیف بازهای خطی می باشند. این تغییرات طبیعی که سبب گوناگونی در افراد یک جمعیت می شود چندشکلی ژنتیکی نام دارد. اگر این چند شکلی در ردیف بازهای DNA در جایگاه شناسایی آنزیم محدودالاثر ایجاد شده باشند به راحتی قابل ردیابی خواهند بود.RFLP وجود الگوهای غیر یکسان است که بر اثر هضم آنزیمی یک ناحیه خاص از DNA به وسیله آنزیم های محدودالاثر مشخص می شود. این الگوهای غیر یکسان به علت تفاوت DNA بسته به حضور یا عدم حضور جایگاه آنزیم های محدود کننده به وجود می آید این الگوها را به دو شکل می توان مشخص کرد.

آنزیم های برشی : دسته ای از آنزیمهای آندونوکلئاز به شمار می روند که یک ردیف اختصاصی از بازها را درون مولکول DNA دو رشته ای شناسائی می کنند. در سال ۱۹۷۰ سویه های معینی از باکتری که قادرند DNA خارجی وارد شده به سلول را تجزیه کنند، کشف شد. از آنجا که با این آنزیم ها، سویه های ویژه ای از باکتری قادر بودند عفونت فاژ یا ویروس را کاهش دهند و در واقع تعداد میزبان باکتریایی را محدود کنند به اسم آنزیم های محدودالاثر نامیده شدند. در بیشتر مواقع توالی شناخته شده این آنزیم ها پالیندرومی است که معمولا شامل چهار تا شش جفت باز دارای تقارن دوطرفی است، یعنی از چپ و راست به یک صورت خوانده می شود. زمانی که یک آنزیم برشی به DNA اضافه می شود DNA از بسیاری مکانها که از آنها قبلا به عنوان سایت برشی یاد شده، شکاف بر می دارد و در اصطلاح هضم می شود. حاصل فرآیند هضم، تعدادی قطعه است.

در روش RFLP ابتدا نمونه ای از DNA را با یک نوع آنزیم برشی، هضم می کنند که در نتیجه تعدادی قطعه با طول متفاوت به دست می آید، سپس این قطعات با استفاده از ژل آگاروز از همدیگر جدا می شوند.

طراحی و سنتز پرایمرها

اولین مرحله برای انجام PCR، طراحی پرایمرهای مناسب جهت تکثیر قطعه مورد مطالعه می‌باشد. ویژگی‌های یک پرایمر مناسب عبارت است از:

اندازه مناسب: معمولا طول پرایمرها ۲۵ تا ۳۲ bp می‌باشد.

دمای ذوب مناسب (TM): معمولا TM پرایمرها ۵۰ تا ۷۵ درجه سانتی گراد است.

محتوای CG پرایمرها: در بهترین حالت ٪۶۰-۴۰ نوکلئوتیدهای موجود در یک پرایمر، CG می‌باشند.

بهتر است انتهای ´۳ پرایمرها دارای باز آلیA یا T و انتهای ´۵ آن دارای C یا G باشد.

برای طراحی پرایمرها در ابتدا اطلاعات مربوط به پلی مورفیسم، از دو سایت dbsnp و snpedia جمع آوری گردید. اطلاعات بدست آمده از پلی مورفیسم مورد نظر درجدول ۳-۳ بیان شده است.

جدول ۳-۳:اطلاعات پلی مورفیسمrs1056827

کروموزوم	موقعیت	A1	A2	ژن کد کننده	(MAF A2)	MAF Source	Build	آلل خطر
۲	۳۸۰۷۵۰۳۴	G	T	CYP1B1	۰/۳۶	۱۰۰۰ Genomes	۱۰۷	T

انتخاب نمونه بیمار و شاهد

از این افراد اطلاعاتی مربوط به سن، مصرف سیگار، سابقه فامیلی ، محل زندگی و غیره دریافت شد. با توجه به پرونده پزشکی و گزارش پاتولوژی نیز مشخص شده ۷۹ فرد انتخاب شده مبتلا به آدنوکارسینوما بودند. مشخصات نمونه ها در جدول ۱-۴ آورده شده است.

افراد شاهد هم از ۲۸ فرد مبتلا به BPH بوده و تورم پروستات داشتند بدون آنکه علامتی از سرطان در بیوپسی آنها مشاهده شود و ۵۱ نفر هم سالم بوده و هیچ بیماری مرتبط با پروستات نداشتند.

جدول ۴-۱ : خصوصیات بیوشیمیایی و بالینی افراد

	طیف سنی	تعداد افراد بیمار (نفر) و درصد آنها	تعداد افراد شاهد (نفر) و درصد
	کمتر از ۴۰ سال	۱۱ (۱۳.۹۲٪)	۲۳ (۲۹.۱۱٪)
سن	۴۰- ۵۰ سال	۸ (۱۰.۱۳٪)	۳۱ (۳۹.۲۴٪)
	۵۰-۶۰ سال	۱۶(۲۰.۲۵٪)	۱۴ (۱۷.۷۲٪)
	۶۰- به بالاتر	۴۴ (۵۵.۷۰٪)	۱۱ (۱۳.۹۳٪)
شاخص توده بدنی	≥۲۵	۳۸ (۴۸.۱۰٪)	۳۳ (۴۱.۷۷٪)
	<۲۵	۴۱ (۵۱.۹۰٪)	۴۶ (۵۸.۲۳٪)
سابقه خانوادگی	دارد	۲۵ (۳۱.۶۵٪)	۷ (۸.۸۶٪)
	ندارد	۵۴ (۶۸.۳۵٪)	۷۲ (۹۱.۱۴٪)
عادت به سیگار کشیدن	دارد	۵۵ (۶۹.۶۲٪)	۵۷ (۷۲.۱۵٪)
	ندارد	۲۴ (۳۰.۳۸٪)	۲۲ (۲۷.۸۵٪)
بیماریهای دیگر	قلبی عروقی	۸ (۱۰.۱۳٪)	
	هایپرلیپمی	۱۰ (۱۲.۶۶٪)	

	دیابت	**۱۱ (۱۳.۹۲٪)**	
	هیچکدام	۵۰ (۶۳.۲۹٪)	
Stage بیماری	Stage I	۳۷ (۴۶.۸۴٪)	
	Stage II	۲۵ (۳۱.۶۶٪)	
	Stage III	۸ (۱۰.۱۲٪)	
	Stage IV	۹ (۱۱.۳۸٪)	
سطح PSA	۴ >	۱۴ (۱۷.۷۲٪)	
	۹۹/۴-۹	۲۹ (۳۶.۷۱٪)	
	۱۹/۱۰-۹۹	۳۱ (۳۹.۲۴٪)	
	۴۹/۲۰-۹۹	۵ (۶.۳۳٪)	

انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی CYP1B1 بر روی تمامی نمونه ها

پس از انتخاب دمای مناسب تمامی نمونه‌های سرطانی و کنترل در شرایط ذکر شده تکثیر شدند.Tm استفاده شده ۶۲,۵□□ بود. سپس محصولات PCR بر روی ژل ۱٪ با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شدند تا باند ۲۳۱□□آشکار گردد.

نتایج حاصل از هضم آنزیم محدود کننده pdi I :

پلی مورفیسم rs1056827 در ناحیه پروموتور ژن قرار می گیرد و توسط آنزیم محدود کننده pdi I شناسایی می شود این آنزیم سایت تشخیصی GCCGGCداشته و ناحیه بعد از سیتوزین را برش می دهد .

مقدار ۵ میکرولیتر از محصولات هضم شده توسط آنزیم، بر روی ژل ۲٪ برده شد تا از روی تعداد باندهای تشکیل شده ژنوتایپ افراد تعیین شود. اگر قطعه ۲۳۱□□ وجود داشته باشد نشاندهنده ژنوتایپ TT است و اگر قطعه توسط آنزیم هضم شده باشد در آنصورت قطعات ۱۱۸□□ & ۱۱۳ ظاهر می شود که نشاندهنده ژنوتایپ GG است و در صورت هتروزیگوت بودن فرد قطعات ۱۱۳□□ & ۱۱۸ ,۲۳۱ مشاهده خواهد شد.

آنالیز آماری متغیرهای بیوشیمیایی و شاخص های بالینی در دو گروه

با نرم افزار SPSS 23 و به کمک آنالیز آماری t تست متغیرهای بررسی شده در دو گروه ؛ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. جدول ۴-۲ خلاصه نتایج را نشان می دهد.

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی

جدول(۴-۲): آنالیز آماری متغیرها

Variable	Mean± Std Error Difference		P value	CI 95%
	Case	Control		
Age	۳۳.۲۶ ± ۰.۸۳	۶۵.۷۲ ± ۱.۲۴	۰.۰۰۰	۳۲.۴۹- ۳۸.۴۲
BMI	۲۵.۳۳ ± ۰.۳۶	۲۴.۵۸ ± ۰.۲۹	۰.۱	-۱.۶۵- ۰.۱۴۶

PSA serum	۳۰.۴۹±۳.۲۷	۱۶.۲۲±۲.۱۹	۰.۰۰۰	۲۴.۰۳-۳۶.۹۵
PSA Free	۶.۲۰± ۰.۷۱	۱.۰۲±۲.۳۲	۰.۰۰۰	۴.۷۸-۷.۶۲
Smoker	-		۰.۹۸۱	۰.۰۸۵- ۰.۵۲۱

نتایج بررسی متغیرها نشان داد که بین سن (p=0.000) ؛ PSA سرمی (p=0.000) و PSA متصل نشده و آزاد (p=0.000) بین دو گروه مورد مطالعه رابطه آماری معنی داری وجود دارد. اما در مورد شاخص توده بدنی یا BMI رابطه دو گروه معنی دار نیست (p=0.1) همچنین از لحاظ مصرف سیگار هم دو گروه تفاوتی ندارند. (P=0.981) متغیرهای دیگر مثل سایر بیماریها (از جمله دیابت ؛ فشار خون و هایپوگلیسمی) ؛ سابقه خانوادگی و stage بیماری مختص گروه سرطانی بود و چون در گروه شاهد وجود نداشت قابل مقایسه کردن نبود.

آنالیز آماری نتایج ژنوتایپ ها

نتایج حاصل از شمارش ژنوتیپ‌ها نشان می‌داد که ژنوتیپ هموزیگوت GG در گروه سرطانی ۴۰ نفر ٪۵۰,۶۳ و در افراد کنترلی ۵۴ مورد ٪۶۸,۳۵ بود (P-Value =0.023). ژنوتایپ هموزیگوت TT نیز ۲۶ مورد از افراد سرطانی ٪۳۲,۹۱ و ۱۴ نفر از افراد کنترلی ٪۱۷,۷۲ را شامل می‌شد (P-Value=0.028). در مورد ژنوتای هم ۱۳ مورد در افراد سرطانی ٪۱۶,۴۶ و در افراد کنترلی ۱۱ مورد ٪۱۳,۹۲ مشاهده شد. (P-Value= 0.658) فراوانی الل T در گروه سرطانی ۰,۴۱ و در افراد کنترلی ۰,۲۵ بود در مورد فراوانی الل G هم در افراد سرطانی ۰,۵۹ و در افراد کنترلی ۰,۷۵ بود(نتایج در جدول ۴-۳ ذکر شده است).

داده ها به کمک نرم افزار SPSS 23 با آزمون Chi- Square مورد ارزیابی قرار گرفت تا مشخص شود که بین دو گروه رابطه معنی داری از لحاظ ارتباط ژنوتایپها با خطر ابتلا به سرطان پستان وجود دارد یا خیر. نتایج P-Value محاسبه شده برای ژنوتایپهای هموزیگوت TT و GG نشان می‌دهد که چون کمتر از سطح بحرانی ۰,۰۵ است بنابر این تفاوت معنی‌دار بین دو گروه بیمار و شاهد در این ژنوتایپها وجود دارد و فرضیه صفر مبنی بر نداشتن تفاوت بین دو گروه رد می‌شود. اما در مورد ژنوتایپ هتروزیگوت TG/GT مقدار P-value =0.658 است که بیش از حد بحرانی بوده و نشان می‌دهد که فرضیه صفر را نمی‌توان رد کرد در نتیجه از لحاظ این ژنوتایپ بین دو گروه رابطه معنی‌داری وجود ندارد.

از سوی دیگر نسبت شانس یا Odds ratio نیز در مورد ژنوتایپها سنجیده شد. اگر odds ratio مساوی ۱ باشد نشان می دهد که آن ژنوتایپ تاثیری در ایجاد بیماری ندارد اما اگر بیشتر از ۱ باشد تاثیر زیاد آن را نشان می دهد و اگر کمتر از ۱ باشد تاثیر کم ژنوتایپ را نشان می‌دهد . نتایج بصورت خلاصه در جدول (۴-۳) آورده شده است.

جدول (۴-۳): نتایج حاصل از آنالیز آماری

Genotype	Tumor group	Control group	P Value	Odds ratio	CI 95%
TT	۲۶ (۳۲.۹۱٪)	۱۴ (۱۷.۷۳٪)	۰.۰۲۸	۰.۴۳۹	۰.۲۰۹- ۰.۹۲۴
GG	۴۰ (۵۰.۶۳٪)	۵۴ (۶۸.۳۵٪)	۰.۰۲۳	۲.۱۰۶	۱.۱۰۲- ۴.۰۲۴
TG/GT	۱۳ (۱۶.۴۶٪)	۱۱ (۱۳.۹۲٪)	۰.۶۵۸	۰.۸۲۱	۰.۳۴۴- ۱.۹۶۳

در آنالیز آماری دیگری رابطه بین متغیرها و ژنوتایپ ها در دو گروه مورد بررسی قرار گرفت که نتایج درجدول ۴-۴ خلاصه شده است.

جدول(۴-۴): نتایج آنالیز آماری برای هر ژنوتایپ پلی مورفیسم rs 1056827

Genotype	Age (p value)	BMI (p value)	PSA Serum (p value)	PSA Free (p value)	Smoker (p value)
GG	۰.۰۶۴	۰.۳۱۵	۰.۱۲۶	۰.۰۹۴	۰.۳۱۵
TT	۰.۱۳۴	۰.۳۷۵	۰.۱۳۴	۰.۳۶۷	۰.۵۵۵
TG/GT	۰.۱۴۷	۰.۷۶۵	۰.۷۸۲	۰.۲۳۳	۰.۵۱۱

بر طبق نتایج بدست آمده بین هیچکدام از ژنوتایپ ها و سایر متغیرها رابطه معنی دار مشاهده نشد.

نتیجه گیری

سرطان پروستات یکی از شایع ترین سرطان ها در انسان می باشد. اگرچه شیوع آن بالا می باشد؛ اما موارد بسیاری وجود دارند که در طول حیات شخص علی رغم مبتلا بودن شخص به سرطان پروستات علائم بالینی ظاهر نمی گردد و حتی در بین کسانی هم که علائم ظاهر می شود این بیماری دارای طیف متغیری از رفتار بیولوژیک و پتانسیل متاستاتیک متفاوتی می باشد. عوامل ژنتیکی، هورمون های آندروژنی و همچنین قرار گرفتن در معرض ترکیبات شیمیائی در ابتلا افراد به سرطان پروستات نقش مهمی ایفا می کنند. از آنجا که دفع این ترکیبات از بدن توسط آنزیم های متابولیزه کننده انجام می پذیرد، لذا میزان فعالیت این آنزیم ها رابطه مستقیمی با سرطان پروستات دارد. با توجه به افزایش چشمگیر خطر ابتلاء به سرطان پروستات با افزایش سن و پیر شدن جمعیت و عدم انجام پژوهشی مشابه در زمینه ارتباط میان پلی مورفیسم مورد مطالعه در این پژوهش و خطر ابتلا به سرطان در جمعیت ایرانی، مطالعه حاضر به علت اهمیت موضوع و جهت شناخت هر چه بهتر میزان این شیوع پلی مورفیسم ، به مطالعه آن در میان مردان ایرانی پرداخته است . مطالعات انجام یافته در زمینه عوامل ژنتیکی مرتبط با سرطان پروستات حاکی از ارتباط مستقیم میان پلی مورفیسم های شناخته شده در ژن های کد کننده گیرنده های هورمون های استروئیدی و آنزیم های متابولیزه کننده داروها در بدن و خطر ابتلا به سرطان پروستات می باشد. در این میان آنزیم های سیتوکروم P450 انسانی نقش مهمی در متابولیسم بسیاری از داروها و مواد شیمیایی موجود در محیط بازی می کند و رابطه مستقیمی بین انواع سرطان ها و میزان فعالیت این آنزیم ها گزارش شده است. آنزیم سیتوکروم P450 متابولیزه کردن دامنه وسیعی از ترکیبات ارگانیک داخلی و خارجی را به عهده دارد. بسیاری از ترکیبات دارویی که در درمان نقش دارند سوبستراهای این آنزیم محسوب می شوند. تقریبا در ۷٪ از قفقازی ها، موتاسیون در این آنزیم گزارش شده است که منجر به متابولیسم آهسته ترکیبات دارویی می شود.یافته های بدست آمده از مطالعات ژنتیکی و اپیدمیولوژی نشان می دهند که پلی مورفیسم در ژن CYP1B1 با افزایش خطر ابتلا به انواع سرطان ها از جمله پروستات، تخمدان، مثانه، سر و گردن و ریه مرتبط می باشد. پروتئین های بیان شده این ژن، مواد کارسینوژن، داروها و ترکیبات وارد شده به بدن را متابولیزه کرده و طی فرآیند سم زدایی از بدن خارج می نمایند. بدین ترتیب بروز هر گونه تغییر در ساختار ژن CYP1B1 همچون پلی مورفیسم های شناخته شده بر روی آن می تواند در نهایت منجر به متابولیسم ضعیف ترکیبات سمی شود. فاکتورهای ژنتیکی متعددی از جمله متابولیت های استروژن، نقش مهمی در تغییرات بدخیمی بازی می کند. این متابولیت ها در نتیجه فعالیت

هیدروکسیلاسیون سیتوکروم CYP1B1 P450 تشکیل می شوند. مطالعات نشان داده که واریانت های مختلف این آنزیم سبب افزایش فعالیت آن می شوند، بنابراین فرضیه ، پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی ژن CYP1B1 در اینترون یک (C به T)، کدون ۴۸ (C به G)، کدون ۱۱۹(G به T)، کدون ۴۳۲(C به G)، کدون ۴۴۹(C به T) و کدون ۴۵۳(A به G) در ۱۱۷ نمونه سرطان پروستات و ۲۰۰ مورد نرمال سالم از جمعیت ژاپن با روش PCR بررسی شد. نتایج نشان داد که تنها پلی مورفیسم کدون ۱۱۹(rs1056827) ار تباط معناداری با سرطان پروستات داشت. هیچ ارتباط معناداری بین مرحله و درجه بیماری با هیچکدام از پلی مورفیسم ها یافت نشد. در نتیجه می توان گفت پلی مورفیسم های ژن CYP1B1 در استعداد ابتلا به سرطان پروستات می توانند تاثیرگذار باشند.

به دلیل فعالیت CYP1B1 در فعال سازی پاراکارسینوژن ها و کاتالیز استروژن ها، به عنوان یک ژن کاندید در سرطان های مختلف ارزیابی شده است. برای بررسی این فرضیه در مطالعه ای توسط یانگ، ار تباط ۱۳ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی این ژن با سرطان پروستات بین گروه بیمار و کنترل بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که یکی از هاپلوتیپ ها (C-G-C-C-C/T, þ142C/G, and þ355G/T۱۳G/A, ۲۶۳C/T, ۱۰۰۱G of) با افزایش خطر ابتلا به بیماری و سایر هاپلوتیپ ها (T-A-T-G-T) با کاهش خطر ابتلا به سرطان پروستات ارتباط دارد .در ایران هم یکی از همکاران ما به بررسی رابطه بین پلی‌مورفیسم (۱۰۵۶۸۲۷) با سرطان پستان در زنان ایرانی پرداخته است.به اینصورت که مطالعه وی ازنوع case/control بود.۷۹بیمار دارای سرطان پستان و ۷۹ نمونه کنترل بعد از بررسی‌های لازم انتخاب شدند. پس از خونگیری و استخراج DNA، از تکنیک PCR- RFLP برای تعیین ژنوتایپ افراد استفاده شد. داده‌ها جمع آوری شده و با استفاده از نرم‌افزار SPSS با آزمون‌های آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد که فراوانی الل G در بیماران ۳۲/۹۱٪و در افراد کنترل ۶۸/۹۸٪ و فراوانی الل T در بیماران ۶۵/۸۲٪ و در افراد کنترل ۳۱/۰۱٪ بود. فراوانی ژنوتایپ‌های TT، GG و TG در افراد سرطانی به ترتیب ۵۳/۱۶٪، ۲۰/۲۵٪،۲۶/۵۸٪و در افراد کنترل به ترتیب۲۲/۷۸٪،۶۰/۷۵٪، ۱۶/۴۵٪ بدست آمد. از لحاظ آماری رابطه معنی‌داری بین نتایج ژنوتایپ‌های گروه سرطانی و کنترل مشاهده شد(P-value= 0). نتایج نشان می‌داد که افراد دارای ژنوتایپ TTبه نسبت ۳/۸۵ برابر بیشتر در معرض خطر ابتلا به سرطان پستان هستند (OR :۳/۸۵ ، P:۰ ، CI ٪۹۵: ۱/۹۴- ۷/۶۵). بنابر این احتمالا این پلی‌مورفیسم (rs ۱۰۵۶۸۲۷) می‌تواند یکی از فاکتورهای دخیل در ایجاد سرطان پستان باشد.

منابع:

1. Romer, A.S., The vertebrate body. 1970.
2. Tsukise, A. and K. Yamada, Complex carbohydrates in the secretory epithelium of the goat prostate. The Histochemical Journal, 1984. 16(3): p. 311-319.
3. Jemal, A., et al., Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians, 2011. 61(2): p. 69-90.
4. Jemal, A., et al., Cancer statistics, 2010. CA: a cancer journal for clinicians, 2010. 60(5): p. 277-300.
5. Siegel, R. and J. Xu, Cancer statistics, 2010. CA: a cancer journal for clinicians, 2010. 60(5): p. 277.
6. DeMarzo, A.M., et al., Pathological and molecular aspects of prostate cancer. The Lancet, 2003. 361(9361): p. 955-964.
7. Plummer, S.J., et al., CYP3A4 and CYP3A5 genotypes, haplotypes, and risk of prostate cancer. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2003. 12(9): p. 928-932.
8. Cicek, M.S., et al., Association of prostate cancer risk and aggressiveness to androgen pathway genes: SRD5A2, CYP17, and the AR. The Prostate, 2004. 59(1): p. 69-76.

9. Sutter, T.R., et al., Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. Journal of Biological Chemistry, 1994. 269(18): p. 13092-13099.
10. Tang, Y.M., et al., Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. Journal of Biological Chemistry, 1996. 271(45): p. 28324-28330.
11. Bejjani, B.A., et al., Mutations in CYP1B1, the gene for cytochrome P4501B1, are the predominant cause of primary congenital glaucoma in Saudi Arabia. The American Journal of Human Genetics, 1998. 62(2): p. 325-333.
12. Martin, F.L., et al., Constitutive expression of bioactivating enzymes in normal human prostate suggests a capability to activate pro carcinogens to DNA damaging metabolites. The Prostate, 2010. 70(14): p. 1586-1599.
13. Hayes, C.L., et al., 17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. 93(18): p. 9776-9781.
14. Spink, D.C., et al., Induction of cytochrome P450 1B1 and catechol estrogen metabolism in ACHN human renal adenocarcinoma cells. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 1997. 62(2): p. 223-232.
15. Sissung, T.M., et al., Association of the CYP1B1* 3 allele with survival in patients with prostate cancer receiving docetaxel. Molecular cancer therapeutics, 2008. 7(1): p. 19-26.
16. McNeal, J.E., The zonal anatomy of the prostate. The Prostate, 1981. 2(1): p. 35-49.

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی