فصلنامه رویکردهای نوین در تحقیقات علوم پایه، فنی و مهندسی
سال پنجم، شماره ۱۶، بهار ۱۴۰۱
ISSN: ۲٦٤٥-٥٤٣٩
www.jonarbset.ir

بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs1056827 در ژن CYP1B1 با استعداد ابتلا به سرطان پروستات در جمعیت ایرانی

سیدعلی عبداللهی اسکویی [۱]، زهرا طهماسبی فرد [۲]، پریسا مکوندی [۳]

[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

چکیده

مقدمه: سرطان پروستات دومین سرطان شایع و پنجمین عامل مرگ ناشی از سرطان مردان در سال ۲۰۱۲ در جهان شناخته شد. از میان عوامل ژنتیکی مرتبط با سرطان پروستات، ژن های دخیل در سم زدایی و حذف متابولیت های سمی از سلول نظیر ژن های خانواده بزرگ ژنی سیتو کروم P450 نقش اساسی در بیماری زایی این سرطان ایفا کرده و از این رو به عنوان هدفی جذاب به منظور شناسایی افراد مستعد ابتلا به سرطان پروستات شناخته می شوند. مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط میان پلی مورفیسم rs۱۰۵۶۸۲۷ واقع بر ژن CYP1B1 و ارتباط آن با سرطان پروستات در جمعیت ایرانی پرداخته است.

مواد و روش ها: تحقیق حاضر از نوع موردی – شاهدی متشکل از ۷۹ بیمار مبتلا به سرطان پروستات و ۷۹ فرد سالم بعنوان گروه شاهد بود که پس از خونگیری از انها DNAی ژنومی با روش salting out استخراج گردید و ژنوتایپ افراد به کمک روش PCR_RFLPتعیین شد.اطلاعات به دست امده به کمک نرم افزار IBMSPSS_23 و ازمونهای اماری Xو رگرسیون لجستیک مورد تجزیه وتحلیل اماری قرارگرفت.

نتایج: انالیز اماری نتایج نشان داد که ژنوتایپ TTبین دو گروه تفاوت معنی داری دارد[P=0.028,OR:0.439,CI:0.۲۰۹-۰.۹۲۴] اما از نظر نسبت شانس ابتلا به سرطان نقش محافظتی داشته واحتمال ابتلا به بیماری را کاهش میدهد.ژنوتایپGGنیز رابطه معنی داری در دوگروه دارد وشانس ابتلا به بیماری را ۲/۱۰۶برابر افزایش میدهد.(P= ۰,۰۲۳ , OR:2/106 ,CI:1/102-4/۰۲۴) اما برای ژنوتایپ هتروزیگوت اختلافی در دو گروه مشاهده نشد.

نتیجه گیری:نتایج به دست امده از این تحقیق نشان میدهد که این پلی مورفیسم در حضورالTنقش محافظتی برای سرطان پروستات دارد واز شانس ابتلا به بیماری می کاهد درحالیکه حضور الل G خطر ابتلا را افزایش می دهد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پروستات، CYP۱B۱، پلی مورفیسم، rs۱۰۵۶۸۲۷

مقدمه

پروستات یک غده مترشحه tubuloalveolar خارج از سیستم تولید مثل مردان و بسیاری از پستانداران است[۱]. پروستات سالم در انسان کمی بزرگتر از یک گردو بوده و در مردان بالغ دارای میانگین وزنی در حدود ۱۱ گرم می باشد که این میزان می تواند بطور معمول بین ۷ تا ۱۶ گرم متغیر باشد [۲]. محل قرار گیری این غده اطراف میزراه، درست در زیر مثانه بوده و می تواند از طریق یک معاینه رکتال احساس شود. سرطان پروستات نوعی بیماری است که در آن سلول های بدخیم از بافت پروستات نشأت می گیرند و بطور نامنظم و فزاینده ای تکثیر یافته و در نهایت منجر به افزایش حجم غده پروستات می شوند این سرطان یکی از شایع ترین سرطانهای مردان و دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان (بعد از سرطان ریه) در جمعیت مردان است[۳]. از سوی دیگر سرطان پروستات یکی از علل شایع مرگ و میر ناشی از سرطان در نیم کره غربی بشمار رفته [۵،۴] واز این رو به چالشی عمده برای سلامت عمومی مطرح می باشد.

علیرغم مطالعات اپیدمیولوژی وسیع صورت گرفته در زمینه عوامل مستعد کننده خطر ابتلا به سرطان پروستات، علت اصلی ابتلا به این سرطان همچنان ناشناخته باقی مانده است. با این حال تحقیقات بالینی و آماری روند بدخیمی سرطان پروستات را به عوامل مختلفی از جمله سن عوامل محیطی همچون مواد شیمیایی، عوامل هورمونی، نژاد و نیز ، عوامل ژنتیکی مرتبط می دانند [۶].

پروستات یک عضو وابسته به آندروژن بوده که تعدادی از ژن های دخیل در متابولیسم آندروژن در ابتلا به این سرطان نقش اساسی ایفا می کنند. به عنوان مثال، نتایج مطالعات متعددی نشان می دهد که استروئید ۵ آلفا ردوکتاز ، سیتوکروم(P450 ۳A٤ (CYP۳A٤ و انواع CYP3A5 ممکن است خطر ابتلا به سرطان پروستات و یا اثر تهاجمی بیماری را افزایش دهند[۷, ۸]. در مجموع، نتایج بدست آمده از مطالعات اخیر نشان می دهند که پلی مورفیسم ژنتیکی ژن های درگیر در مسیر های سم زدایی و متابولیت مواد سمی، از جمله CYP1B1، ممکن است در استعداد ابتلا به این سرطان تأثیر گذار باشند.

ژن CYP1B1 بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۲۲ و در ناحیه کروموزومی p21-22 واقع شده است[۹, ۱۰]. این ژن شامل سه اگزون (بترتیب متشکل از ۳۷۱، ۱۰۴۴ و ۳۷۰۷ جفت باز) و دو اینترون (بترتیب متشکل از ۳۹۰ و ۳۰۳۲ جفت باز) است [۱۱, ۱۲]. رونویسی از ژن CYP1B1 توسط ترکیباتی مانند tetrachlorodibenzo-P-۲،۳،۷،۸-دیوکسین و یا دیوکسین و نیز توسط چند عامل کلیدی رونویسی همچون گیرنده استروژن و گیرنده هیدروکربن آریل تنظیم می شود. علاوه بر نقش شناخته شده این ژن در سوخت و ساز مواد سمی بدن، نتایج تحقیقات انجام یافته حاکی از نقش تاثیر گذار ژن CYP1B1 در فعالیت های منجر به سرطان زایی می باشد [۱۲] [۱۳] [۱۴]. بر این اساس، ژن CYP1B1 نقش مهمی در سوخت و ساز بدن در برابر عوامل ضد سرطانی خاص ایفا می کند[۱۵]. ژن CYP1B1 در فعال شدن بسیاری از پیش کارسینوژنها و هیدروکسیل تستوسترون نقشی اساسی داشته و از این رو بروز هر گونه تغییر در ساختار این ژن ممکن است خطر ابتلا به سرطان پروستات را دست خوش تغییر کرده و آنرا افزایش دهد. تا کنون پلی مورفیسم های متعددی بر روی ژن CYP1B1 شناسایی شده اند که از میان آنها چهار پلی مورفیسم منجر به تغییر اسید امینه در زنجیره پلی پپتیدی این ژن می شوند. این تغییرات عبارتند از: rs10012، rs1056827، rs1056836 و rs1800440. مطالعات انجام یافته حاکی از آن نکته است که پلی مورفیسم های ذکر شده می توانند فعالیت آنزیمی و خصوصیت کاتالیزی CYP1B1 را تغییر دهند. 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
- P.B.S
- 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

تعداد نمونه و نحوه محاسبه آن

فرمول محاسبه حجم نمونه در شرایطی که متغیر(های) مطالعه کیفی باشند:

$$n = \frac{(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 \left[P_1(1-P_1) + P_2(1-P_2)\right]}{(P_1 - P_2)^2} \quad (۱\text{-}۲)$$

P1ـ نسبت یا سهم پیامد مورد نظر در گروه اول (مورد ـ مواجهه یافته یا مداخله)

P2ـ نسبت یا سهم پیامد مورد نظر در گروه دوم (شاهد، غیر مواجهه یافته یا مقایسه)

α - خطای نوع اول که معمولاً در سطح ۰/۰۵ ثابت در نظر گرفته می‌شود .

β - خطای نوع دوم که معمولاً در سطح ۰/۲۰ ثابت درنظر گرفته می‌شود .

$$(۲\text{-}۲)\ n = \frac{(۱.۹۶+۰.۸۵)۲\ \{\ ۰/۴(۱-۰/۴)+\ ۰/۲(۱-۰/۲)\}}{(۰/۴-۰/۲)} = ۷۸.۹$$

در هر گروه به ۷۹ فرد نیاز است.

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 rpm ۳۰۰۰ 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 cc ۵-۰/۱است آن هم به واسطه اینکه گلبولهای سفید در آب متورم شده، مقدار ml ۴/۵ (TES) Tris-EDTA Salt 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 µl ۲۵۰ SDS ۱٪ اضافه می‌کنیم SDS یک ماده پاک کننده محسوب می‌شود که اسیدهای چرب جدار گلبولهای سفید را حل می‌کند . بعد ۷۰µl پروتئیناز K با غلظت mg/ml ۱۰ اضافه می‌کنیم و از ۳ تا ۲۴ ساعت می‌توان درون بن ماری°C ۳۷ 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 cc ۲ NaCl اشباع به لوله ها اضافه کرده و آنرا یکی دوبار تکان داده تا کدر شود و به مدت۳۰ 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 ml ۱/۵ 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 ml ۱ 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.

نحوه خالص سازی نمونه‌های آلوده به پروتئین

۱- به حجم کل میکرو تیوب به میزان ۳۰۰ میکرو لیتر از محلول TES اضافه کرده و مخلوط می‌کنیم.

۲ - ۱۸ میکرو لیتر از SDS به آن اضافه و مخلوط کرده سپسµl ۳ آنزیم پروتئیناز K اضافه می‌نماییم.

۳- به مدت ۲ ساعت یا یک شبانه روز نمونه را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌نمائیم.

پس از اتمام انکوباسیون، ۲۲۰ میکرولیتر از محلول نمک اشباع اضافه کرده و ۵ دقیقه سانتیریفوژ (۱۲۰۰۰rpm) می‌کنیم. محلول رویی را جدا نموده و به آن ۵۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانل می‌افزاییم. پس از دیدن کلاف DNA آن را جدا نموده و مراحل شستشو با اتانل ۷۰ درصد را انجام می‌دهیم و پس از تبخیر الکل به مقدار کافی به آن بافر TE افزوده و اجازه داده تا DNA هیدراته شود.

بررسی غلظت و خلوص DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر

پس از استخراج DNA به منظور ارزیابی کمیت و کیفیت DNA و آگاهی از غلظت و میزان خلوص آن، جذب نمونه DNA که صد برابر رقیق شده بود با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج های۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. سپس غلظت DNA از فرمول زیر محاسبه گردید:

OD=۱۰۰ ×۵۰nm× ۲۶۰ds DNA (mg/ml)

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 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 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٪)
	۶۰-۵۰ 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٪)	
	۹۹/۹	۲۹ (۳۶.۷۱٪)	
	۱۹/۱۰-۹۹	۳۱ (۳۹.۲۴٪)	
	۴۹/۲۰-۹۹	۵ (۶.۳۳٪)	

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 ۲ خلاصه نتایج را نشان می دهد.

جدول(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

TG/GT 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 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 (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	**۰.۳۴۱.۹۶۳**

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

جدول(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/T, þ142C/G, and ۱۳G/A, ۲۶۳C/T, ۱۰۰۱C-G-C-C-G of þ355G/T) 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 GG، TT 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 ، ۷/۶۵ -۱/۹۴: CI ٪۹۵). بنابر این احتمالا این پلی‌مورفیسم (rs ۱۰۵۶۸۲۷) می‌تواند یکی از فاکتورهای دخیل در ایجاد سرطان پستان باشد.

منابع

۱.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.