

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

سیدعلی عبداللہی 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 آزاد 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 ژن های خاصی که در سم زدایی و حذف ترکیبات مضر از سلول ها نقش دارند، مانند ژن های خانواده بزرگ ژن سیتوکروم P450، نقش مهمی در ایجاد سرطان پروستات دارند. سرطان پروستات و پلی مورفیسم rs1056827 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 شرکت کنندگان با استفاده از روش PCR RFLP پس از نمونه گیری 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=0.028، 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.

واژه های کلیدی: سرطان پروستات، CYP1B1، ژنوتیپی و آللی چند شکلی، rs1056827

مقدمه

ارگان های لگن در پشت حفره شکمی قرار گرفته اند و توسط آناتومی لگنی محاصره شده اند. غده پروستات تقریباً 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 قرار گرفته اند (شکل ۱-۲). روده بزرگ نیز از مجاورت غده پروستات عبور کرده که گستردگی آن از استخوان ایلیم 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 تقسیم 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 ($pH = 7/29$) 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، آلبومین 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 از نقش 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 ادارار می شود [۱۴].

انواع مختلفی از سلول ها در غده پروستات وجود دارند. ولی تقریباً تمام سرطان های پروستات از سلول های غده ای منشاء می گیرند که در اصطلاح به این نوع سرطان، آدنوکارسینوم گفته می شود. برخی تغییرات بوجود آمده در DNA سلول های پروستات یکی از عوامل بروز سرطان می باشد. اگرچه تنها درصد کمی از سرطان های 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 مهمی در افزایش خطر سرطان پروستات در بعضی از مردان ایفا می کند. تحقیقات نشان می دهند، 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 می تواند در شناسایی افراد مستعد ابتلا به سرطان، و همچنین پیشگیری و کنترل بیمار و نیز در زمینه 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 خواهد شد 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- شاهدهی و بر روی مجموع ۱۵۸ نفر از مراجعه کنندگان به مرکز تحقیقات دستگاه اداری_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 بیماری های قلبی- عروقی و دیابت از پرونده پزشکی بیماران گرفته شد سپس ۳cc از خون بیمار در یک لوله آزمایش حاوی (3mg/ml) EDTA 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

روش تهیه نمونه

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

ابتدا از افراد مورد بررسی ۵ میلی لیتر خون جهت استخراج DNA گرفته شد و به لوله های 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 شده است انجام گردید و نمونه های 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 می باشد، 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 ویژه ای باید رعایت گردد. از شرایط اساسی نمونه استخراج شده آن است که نمونه حداقل حاوی یک زنجیره DNA سالم، در برگرفته 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:

آنزیم های مختلفی در سلول وجود دارد که می توانند DNA را تجزیه کنند. مهمترین آسیب از جانب دزاکسی ریبونوکلازها می باشد که هیدرولیز اتصالات فسفودی استر را کاتالیز می کنند. یون های Mg^{2+} و Mn^{2+} کوفاکتور این نوکلئازها هستند، لذا با افزودن EDTA به محلول استخراج DNA، می توان با شلات کردن این یون ها 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 هیستون ها کاهش یافته و همچنین فعالیت نوکلئازها در این pH کمتر می گردد. از سوی دیگر pH نسبتاً بالا در جهت دناتوره کردن پروتئین نیز عمل می کند.

به طور طبیعی DNA در سلول ها به صورت کمپلکس DNA و پروتئین می باشد. بعلاوه پروتئین ها و لیپیدهای سلول نیز باید از اسید نوکلئیک جدا شوند که در این مورد نیز از ترکیبات مختلفی استفاده می شود. معمولاً از مواد دترجنت برای از بین بردن واکنش های یونی بین هیستون های با بار مثبت و اسکلت حامل بار منفی DNA استفاده می شود. رایج ترین شوینده مورد مصرف دترجنت آنیونی SDS-Sodium Dodecyl Sulfate می باشد که به پروتئین ها متصل شده و به آنها مقدار زیادی خاصیت آنیونی می دهد؛ در نتیجه واکنش های یونی کمتری بین هیستون ها و DNA ایجاد می شود. نقش دیگر SDS دناتوره کردن دزاکسی ریبونوکلازها و سایر پروتئین ها می باشد تا SDS رسوب نکند. جهت دپروتئینه کردن بهتر می توان 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 پروتئین های دست نخورده است و از سویی دیگر چون سوبستراهای مورد هضم این آنزیم بسیار متنوع می باشد، کاربرد قابل توجهی در مراحل تخلیص اسیدهای نوکلئیک دارد. این آنزیم فعالیت خود را در حضور SDS حفظ می نماید. این خاصیت آنزیم به ما امکان می دهد تا از آن همراه با لیز کردن سلول ها که توام با آزادی فوری نوکلئازها است، استفاده نماییم. pH مطلوب عملکرد این آنزیم ۱۲-۷/۵ است ولی غالباً در محدوده ۹-۷/۹ به کار می رود و شرایط محلول واکنش که مناسب فعالیت این آنزیم است TES با pH = ۷/۸ می باشد. 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 توده ای شدن رشته های محلول DNA و تجمع آنها کمک کرده و در نتیجه سبب رسوب DNA می شود. الکل سبب توده شدن رشته های محلول DNA و نیز تجمع آنها می گردد. رسوب DNA را معمولاً در بافر TE حل می نمایند.

با توجه به کمیت و کیفیت مناسب DNA حاصله برای انجام PCR و بی ضرر بودن محلول های مورد استفاده، DNA ی بیماران از روش نمک اشباع شده با استفاده از پروتئیناز K و ایزوپروپانل استخراج گردید.

روش کار

مقدار ۵ml خون وریدی را در لوله حاوی ۲۰۰ ماکرولیتتر 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 می کنیم. 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 می کنیم و دوباره به همان میزان آب مقطر سرد به رسوب بدست آمده اضافه می کنیم و خوب تکان می دهیم 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 ۵-۱۰ cc 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 کاملاً به حالت محلول درآید. در اینجا می‌توانیم نمونه را جهت توقف کار در فریزر نگه داریم و بقیه مراحل را بعداً انجام دهیم در غیر اینصورت ادامه مراحل را طی می‌کنیم. مقدار ۲۵۰ µl SDS ۱٪ اضافه می‌کنیم SDS یک ماده پاک کننده محسوب می‌شود که اسیدهای چرب جدار گلبولهای سفید را حل می‌کند. بعد ۷۰ µl 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 لوله‌ها 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 ایزوپروپانول و نمک می‌باشد را 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 پلیمرز (PCR)

این روش در سال ۱۹۸۳ توسط کاری مولیس طراحی شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز، 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 سازی DNA 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 پلیمرز جهت تکثیر یک منطقه خاص از یک رشته DNA که به اصطلاح DNA هدف نامیده می شود، مورد استفاده قرار می گیرد. در بیشتر روش های PCR به طور معمول قطعات DNA از بین ۰/۱ تا ۱۰ کیلو جفت باز (کیلو باز) تکثیر می شوند؛ هر چند در برخی از روش ها تکثیر قطعاتی با طول ۴۰ کیلو باز نیز امکان پذیر می باشد. واکنش زنجیره ای پلیمرز، معمولاً در حجم واکنش ۱۰-۲۰۰ میکرولیتر در لوله های واکنش کوچک (حجم ۰/۲-۰/۵ میلی لیتر) در ترموسایکلرها انجام می شود و راه اندازی PCR اولیه به اجزای مختلف و معرف هایی نیاز دارد که این اجزاء عبارتند از:

- الگوی DNA که حاوی منطقه هدف برای تکثیر باشد.
- دو جفت آغازگر که مکمل ناحیه ۳ نواحی سنس و آنتی سنس رشته DNA هدف باشند.
- Taq پلیمرز و یا نوع دیگری از DNA پلی مرز با درجه حرارت مطلوب (حدود ۷۰ درجه سانتی گراد)
- داکسی نوکلئوتیدها (dNTPs)، که گاهی اوقات "داکسی نوکلئوتید تری فسفات ها" نامیده می شوند. نوکلئوتیدهایی که شامل گروه های تری فسفات هستند و واحدهای ساختمانی که DNA پلیمرز بوسیله آنها یک رشته DNA جدید را سنتز می کنند.

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

روش انجام PCR

به طور معمول، PCR شامل یک سری ۲۰-۴۰ تکرار تغییرات دما، به نام چرخه می باشد. هر چرخه که معمولاً متشکل از ۲-۳ مرحله دمای مجزاست، معمولاً دارای سه مرحله می باشد. چرخه اغلب توسط یک درجه حرارت منفرد به نام hold که درجه حرارت بالایی می باشد (بالاتر از ۹۰ درجه سانتیگراد) شروع می شود. 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 ۹۴-۹۶ درجه سانتیگراد (۹۸ درجه سانتیگراد اگر پلیمرازهای بسیار مقاوم به حرارت استفاده شود) می باشد که به مدت ۹-۱ دقیقه صورت می گیرد. 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 می باشد. 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 مدت ۴۰-۲۰ ثانیه کاهش می یابد. 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 مزاز به هیبرید پرایمر و الگو متصل شده و مرحله توسعه و طولیل شدن رشته DNA هدف آغاز می شود.

مرحله توسعه یا طولیل 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 می شود. 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 می دهد.

طولیل 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 می شود و هر گونه DNA تک رشته ای باقی مانده به طور کامل توسعه می یابد.

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

الکتروفورز

در طول سال های گذشته روش های 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 ارگانیسم های عفونی استفاده می شود. در این روش مولکول های اسید نوکلئیک بر اساس اندازه از هم جدا می شوند که این امر بر مبنای حرکت مولکول های با بار منفی (DNA) به سمت قطب آند (مثبت) انجام می شود. از این رو جریان مهاجرت صرفاً با وزن مولکولی تعیین می شود که در آن مولکول های با وزن کوچک سریعتر از مولکول های بزرگتر مهاجرت می کنند.

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 و سپس خنک می شود یک ماتریکس ژله ای با پیوند هیدروژنی را، شکل می دهد. ژل آگارز محبوبترین محیط برای جداسازی اسیدهای نوکلئیک متوسط و بزرگ می باشد و طیف وسیع تفکیک را نشان می دهد که باندهایی را بصورت مجموعه های فازی و پخش شده جدا از هم، در ژل تشکیل می دهد. این باندها نتیجه اندازه منافذ ژل بوده و می تواند 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 و سریع	باندها فازی
جداکردن مولکول های بزرگ DNA	تفکیک ضعیف نمونه ها 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 محدوده ۰/۲٪ تا ۳٪ تهیه می شود. به طور کلی اگر هدف جداکردن قطعات بزرگ DNA باشد غلظت کم آگارز استفاده می شود و اگر هدف جداکردن قطعات کوچک DNA باشد استفاده از غلظت های بالای آگارز توصیه می شود

جدول ۲-۳: غلظت ژل آگارز برای DNA خطی حل شده

غلظت آگارز (%)	سایز DNA (bp)
۰/۲	۴۰۰۰-۵۰۰۰
۰/۴	۳۰۰۰-۵۰۰۰
۰/۶	۱۰۰۰-۳۰۰۰
۰/۸	۷۰۰-۱۰۰۰
۱	۵۰۰-۵۰۰
۱/۵	۳۰۰-۳۰۰
۲	۱۵۰-۲۰۰
۳	۱۰۰-۱۰۰

سیستم های 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 می باشد. علاوه بر این، حرکت الکتروفورتیک DNA توسط ترکیب و قدرت یونی (مقدارنمک) بافر الکتروفورز تحت تاثیر قرار می گیرد. بدون نمک، هدایت الکتریکی حداقل است و DNA به سختی حرکت می کند. 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 می شود که این امر می تواند به ذوب شدن ژل و کاهش وضوح باند DNA منجر شود. بنابراین، بسیار توصیه می شود که ولتاژ از ۵-۸ و آمپر ۷۵ از میلی آمپر برای ژل های با اندازه های استاندارد و یا ۱۰۰ میلی آمپر برای ژل های 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 محدودالایر 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 محدودالایر 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 آنزیم های آندونوکلاز به شمار می روند که یک ردیف اختصاصی از بازها را درون مولکول DNA دو رشته ای شناسایی 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 محدودالایر نامیده شدند. در بیشتر مواقع توالی شناخته شده این آنزیم ها پالیندرومی است که معمولاً 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 قبلاً 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 می باشد. ویژگی های یک پرایمر مناسب عبارت است از:

اندازه مناسب: معمولاً طول پرایمرها ۲۵ تا ۳۲ bp می باشد.

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

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

بهتر است انتهای ۳ پرایمرها دارای باز آلی A 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 در جدول ۳-۳ بیان شده است.

جدول ۳-۳: اطلاعات پلی مورفسم rs1056827

کروموزوم	موقعیت	A1	A2	ژن کد کننده	(MAF A2)	MAF Source	Build	آل خطر
۲	۳۸۰۷۵۰۳۴	G	T	CYP1B1	۰/۳۶	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 ۴-۱ 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 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 (۱۳.۹۳٪)	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٪)	
	۹-۹۹/۴	۲۹ (۳۶.۷۱٪)	
	۹۹/۱۰-۹۹	۳۱ (۳۹.۲۴٪)	
	۹۹/۲۰-۹۹	۵ (۶.۳۳٪)	

انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی CYP1B1 بر روی تمامی نمونه ها

پس از انتخاب دمای مناسب تمامی نمونه های سرطانی و کنترل در شرایط ذکر شده تکثیر شدند. Tm استفاده شده ۶۲,۵۰۰ بود. سپس محصولات PCR بر روی ژل ۱٪ با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شدند تا باند ۲۳۱۰۰ 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 GCCGCGC داشته 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 ۲۳۱۰۰ وجود داشته باشد نشاندهنده ژنوتایپ TT است و اگر قطعه توسط آنزیم هضم شده باشد در آنصورت قطعات ۱۱۸۰۰ & ۱۱۳ & ۱۱۳۰۰ ظاهر می شود که نشاندهنده ژنوتایپ GG است و در صورت هتروزیگوت بودن فرد قطعات ۱۱۳۰۰ & ۱۱۸۰۰, ۲۳۱۰۰ 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.

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 ژنوتایپ ها نشان می داد که ژنوتایپ هموزیگوت GG در گروه سرطانی ۴۰ نفر ۵۰.۶۳٪ و در افراد کنترلی ۵۴ مورد ۶۸.۳۵٪ بود ($P\text{-Value}=0.023$). ژنوتایپ هموزیگوت TT نیز ۲۶ مورد از افراد سرطانی ۳۲.۹۱٪ و ۱۴ نفر از افراد کنترلی ۱۷.۷۲٪ را شامل می شد ($P\text{-Value}=0.028$). در مورد ژنوتای هم ۱۳ مورد در افراد سرطانی ۱۶.۴۶٪ و در افراد کنترلی ۱۱ مورد ۱۳.۹۲٪ مشاهده شد. ($P\text{-Value}=0.658$) فراوانی ال T در گروه سرطانی ۰.۴۱ و در افراد کنترلی ۰.۲۵ بود در مورد فراوانی ال G هم در افراد سرطانی ۰.۵۹ و در افراد کنترلی ۰.۷۵ بود (نتایج در جدول ۳-۴ 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 می دهد که چون کمتر از سطح بحرانی ۰.۰۵ است بنابراین تفاوت معنی دار بین دو گروه بیمار و شاهد در این ژنوتایپها وجود دارد و فرضیه صفر مبنی بر نداشتن تفاوت بین دو گروه رد می شود. اما در مورد ژنوتایپ هتروزیگوت TG/GT مقدار $P\text{-value}=0.658$ است که بیش از حد بحرانی بوده و نشان می دهد که فرضیه صفر را نمی توان رد کرد در نتیجه از لحاظ این ژنوتایپ بین دو گروه رابطه معنی داری 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 می دهد. نتایج بصورت خلاصه در جدول (۳-۴) آورده شده است.

جدول (۳-۴): 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 در جدول 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. تقریباً 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) ارتباط 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، ارتباط 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- of ۱۰۰۱G، ۲۶۳C/T، ۱۳۳G/A، ۱۴۲C/G، and C/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 پلی مورفیسم (۱۰۵۶۸۲۷) با سرطان پستان و ۷۹ نمونه کنترل بعد از بررسی های لازم انتخاب شدند. پس از خونگیری و استخراج DNA، از تکنیک PCR-RFLP برای تعیین ژنوتایپ افراد استفاده شد. داده ها جمع آوری شده و با استفاده از نرم افزار SPSS با آزمون های آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد که فراوانی ال G در بیماران ۳۲/۹۱٪ و در افراد کنترل ۶۸/۹۸٪ و فراوانی ال T در بیماران ۶۵/۸۲٪ و در افراد کنترل ۳۱/۰۱٪ بود. فراوانی ژنوتایپ های GG، TT و TG در افراد سرطانی به ترتیب ۵۳/۱۶٪، ۲۰/۲۵٪ و ۲۶/۵۸٪ و در افراد کنترل به ترتیب ۲۲/۷۸٪، ۶۰/۷۵٪ و ۱۶/۴۵٪ بدست آمد. از لحاظ آماری رابطه معنی داری بین نتایج ژنوتایپ های گروه سرطانی و کنترل مشاهده شد (P-value=0). نتایج نشان می داد که افراد دارای ژنوتایپ TT به نسبت ۳/۸۵ برابر بیشتر در معرض خطر ابتلا به سرطان پستان هستند (OR: ۳/۸۵، P: ۰، CI: ۱/۹۴- ۷/۶۵، ۹۵٪). بنابر این احتمالاً این پلی مورفیسم (rs ۱۰۵۶۸۲۷) می تواند 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.