Iranian Journal of Biological Sciences.2023; 18(1):49-61

Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

https://zisti.iauvaramin.ac.ir

Study of a 96-bp Insertion Polymorphism in the Regulatory Region of *CYP2E1* in Cancer Patients in Comparison with Healthy Populations in Kashan

Hassan Ehteram[1], , Mahbube Asghari[2],Fahimeh Baghbani-Arani [3*]

1 Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Kashan University of Medical Science, Kashan, Iran.
2 Physician, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kashan University of Medical Science, Kashan, Iran.
3 Associate Professor, Department of Genetics and Biotechnology, School of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

Place of research: School of Medicine, Kashan University of Medical Science, Kashan, Iran

Article Info

Article History:

Recived 06.26.2023
Revised 06.28.2023
Accepted 07.02.2023
Online 07.05.2023

KeyWords:

Polymorphism
genotyping
Iran
cancer
CYP2E1

***Corresponding author:**
E-mail address

h_ehteram@yahoo.com
dr.ma.arani@gmail.com
fbaghbani@iauvaramin.ac.ir*

Abstract

Introduction: Cytochrome P450 2E1 (*CYP2E1*) is involved in the metabolic activation of a wide variety of potential carcinogens, and functional polymorphisms in the *CYP2E1* gene have been investigated in relation to various cancers.

Aim: : We examined the relation of the *CYP2E1* 96-bp insertion polymorphism to cancer risk and the interaction between this polymorphism and some lifestyle risk factors.

Materials and methods: This study was conducted on 101 samples of patients suffering from four types of lung, breast, stomach and colorectal cancer and 131 healthy individuals as a control group. After extracting DNA from blood samples, the genotype of *CYP2E1* 96-bp insertion polymorphism was done by molecular PCR method.

Results: We found the frequency of the *CYP2E1* 96-bp insertion to be 66.3 % (67/101) for non-insertion (i/i), 14.9 % (15/101) for heterozygous insertion (i/I) and 18.8 % (19/101) for homozygous insertion (I/I) among case group. The genotypes with allele I (II/Ii) in the CYP2E1 locus have a significant difference in both patient and healthy groups (*p value:* 0.011). We also found a positive association between smoking and cancer risk (*p value:* 0/004). In this study, the allelic frequencies in normal group were 0.16.4 for I and 0.85.6 for i allele.

Conclusion: : To conclude, this work is the first study on the genotype distribution of *CYP2E1* 96-bp insertion polymorphism in Iranian population. The molecular studies on this enzyme provide basis for further epidemiological investigations in populations where the functional mutations in the genes alter therapeutic response and as susceptibility markers for various clinical conditions as well as lifestyle risk factors for cancer.

Cite this article: Ehteram H., Asghari M., Baghbani-Arani F.*Study of a 96-bp Insertion Polymorphism in the Regulatory Region of CYP2E1 in Cancer Patients in Comparison with Healthy Populations in Kashan. Iranian Journal of Biological Sciences. 2023; 18(1):49-61

10.30495/zisti.2023.1989897.1166 DOR 20.1001.1.17354226.1402.18.1.4.1

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch Print ISSN: 1735-4226 Online ISSN: 1727-459X
This is an open access article under the: https://creativecommons.org/license/by-nc/4.0/

مقاله تحقیقی
دانش زیستی ایران
https://zisti.iauvaramin.ac.ir

بررسی پلی مورفیسم ورود قطعه 96-bp در بخش تنظیمی ژن *CYP2E1* در بیماران سرطانی و مقایسه آن با افراد سالم

حسن احترام [۱]، محبوبه اصغری [۲]، فهیمه باغبانی آرانی [۳*]

۱ دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کاشان، کاشان، ایران

۲ پزشک ، گروه طب داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کاشان، کاشان، ایران

۳ دانشیار، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

محل انجام تحقیق :دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کاشان، کاشان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
ارسال ۱۴۰۲/۰۴/۰۵
بازنگری ۱۴۰۲/۰۴/۰۷
پذیرش ۱۴۰۲/۰۴/۱۱
نمایه ۱۴۰۲/۰۴/۱۴

کلمات کلیدی
پلی مورفیسم
ژنوتایپینگ
ایران
سرطان
CYP2E1

* نویسنده مسؤل

h_ehteram@yahoo.com
dr.ma.arani@gmail.com
fbaghbani@iauvaramin.ac.ir*

چکیده

مقدمه: سیتوکروم۲E۱ P۴۵۰ (CYP2E1) در مسیر متابولیزه کردن تعداد زیادی از مواد سرطان زا در بدن نقش ایفا می کند و نشان داده شده است که پلی مورفیسم های عملکردی این ژن با ریسک ابتلا به سرطان مرتبط می باشد.

هدف: بررسی ارتباط پلی مورفیسم ورود قطعه ۹۶ نوکلئوتیدی به ناحیه پروموتر این ژن با ریسک ابتلا به سرطان در جمعیت شهرستان کاشان است.

مواد و روش ها: این مطالعه روی ۱۰۱ نمونه بیمار مبتلا به چهار نوع سرطان ریه، پستان، معده و کلورکتال و ۱۳۱ فرد سالم که فاقد علایم سرطان و سابقه ابتلا به این بیماری بودند، به عنوان کنترل انجام پذیرفت. پس از استخراج DNA از نمونه خون بیماران تعیین ژنوتایپ پلی مورفیسم *CYP2E1* 96-bp insertion با روش ملکولی PCR انجام پذیرفت.

نتایج: طبق یافته های بدست آمده، فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت i/i در افراد بیمار ۶۶/۳٪ (۶۷ نفر) ، هتروزیگوت I/i ۱۴/۹ ٪ (نفر۱۵) و هموزیگوت I/I ۱۸/۸ ٪ (۱۹ نفر) بود. در مقایسه مجموع ژنوتیپ های دارای آلل I (II/Ii) در لوکوس *CYP۲E1* در دو گروه بیمار و سالم اختلاف معنی داری دارند (*p value* ۰/۰۱۱). همچنین مطالعه حاضر نشان داد که بین استعمال سیگار و ابتلا به سرطان ارتباط معنی داری وجود دارد(*p value* ۰/۰۰۴). در این مطالعه فراوانی آللی I در جمعیت نرمال ۱۶/۴٪ و فراوانی آلل i ۸۵/۶ ٪ بود.

نتیجه گیری: در مجموع مطالعه حاضر برای اولین بار اطلاعاتی پیرامون پلی مورفیسم 96-bp insertion در ژن *CYP۲E1* در جمعیت ایرانی فراهم می کند. مطالعات ملکولی بر روی این آنزیم به بررسی های اپیدمیولوژیک بیشتر در جمعیت های مختلف کمک می کند. و اطلاعاتی پیرامون جهش های عملکردی در ژن هایی که باعث تغییر پاسخ فرد به درمان می شود و یا مار کر های حساسیت به شرایط کلینیکی مختلف و ریسک فاکتور های ابتلا به سرطان که با سبک زندگی افراد مرتبط است، فراهم می کند.

شیوه آدرس‌دهی این مقاله : احترام ح.، اصغری م.، باغبانی آرانی ف.*بررسی پلی مورفیسم ورود قطعه bp-۹۶ در بخش تنظیمی ژن *CYP۲E1* در بیماران سرطانی و مقایسه آن با افراد سالم. مجله دانش زیستی ایران. ۱۴۰۲ ؛ ۱۸ (۱):۴۹-۶۱

doi 10.30495/zisti.2023.1989897.1166 DOR 20.1001.1.17354226.1402.18.1.4.1

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶ شاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷-۴۵۹X نویسندگان: © حق مؤلف

مقدمه:

سرطان بعد از بیماری های قلبی عروقی دومین علت مرگ و میر در جوامع انسانی است به طوری که عامل بیش از ۱۲ درصد از مرگ ها در سرتاسر جهان و ایران گزارش شده است (۱). در کشور ما سالیانه بیش از ۳۰۰۰۰ نفر بر اثر سرطان جان خود را از دست می دهند و تخمین زده مي شود سالانه بیش از ۷۰۰۰۰ مورد جدید سرطان در کشور اتفاق مي افتد (۲-۳). از طرفي با افزايش متوسط سني جمعيت و درصد سالمندي جمعيت كشور در سال هاي آينده ، كنترل نسبي بيماري هاي واگيردار ، آلودگي هوا و ساير ريسك فاكتورهاي كارسينوژنيك، با بروز بیشتر سرطان ها رو به رو هستیم. با توجه به شیوع بالا و عواقب سوء جسمي - رواني و اقتصادي- اجتماعي ، لزوم بررسي هرچه بيشتر در مورد جنبه هاي مختلف اين بيماري واضح و آشكار است(٤). همچنین بررسی فاکتورهای مؤثر در ایجاد سرطان مانند سن، محیط؛ جنسیت؛ ژنتیک و سابقه فامیلی و همچنین ارتباط این فاکتور ها با میزان پاسخ به درمان نیز از دیگر رویکردهای تحقیقاتی است که اطلاعات مفیدی را برای مدیریت درمان برای پزشکان فراهم می کند.

تحقیقات اخیر در سرطان نشان داده اند که یکی از عوامل مهم موثر در ایجاد سرطان در انسان؛ تغییرات ژنتیکی در ژن های مرتبط با سرطان است که توسط مواد سرطان زای محیطی ایجاد می گردد. مشخص شده که بسیاری از مواد شیمیایی سرطان زای محیطی (زنوبیوتیک ها) برای ایجاد اثرات سرطان زایی خود باید در بدن دچار تغییرات شیمیایی شده و به فرم های فعال که کارسینوژن هستند تبدیل شوند(٤-٥). از طرفی بسیاری از آنزیم های متابولیزه کننده این مواد سرطان زا در انسان از نظر ژنتیکی پلی مورف بوده و این پلی مورفیسم ژنتیکی روی فعالیت آنزیم تاثیر دارد (٦-٧). حساسیت متفاوت افراد به مواد سرطان زای محیطی , در ایجاد سرطان در یک جمعیت انسانی اهمیت دارد. در این راستا یکی از مهمترین عوامل حساسیت به مواد سرطان زای محیطی سیستم آنزیمی سیتوکروم P٤٥٠ می باشد چرا که نقش مهمی را در متابولیسم عوامل موثر در ایجاد سرطان بازی می کند.

سیتوکروم P٤٥٠ (با نام کوتاه شدهCYP) خانواده گسترده ای از آنزیم های هموپروتئینی است که وظیفه کاتالیز کردن روند اکسیداسیون ترکیبات آلی را به عهده دارند . سوبستراهای آنزیم CYP شامل واسطه‌های متابولیک مانند لیپیدها و هورمون‌های استروئیدی، و همچنین مواد زنوبیوتیک مانند مواد مخدر و سایر مواد شیمیایی سمی هستند. (۸). سیتوکروم CYP2E1 که یکی از آنزیم های این مجموعه آنزیمی است، مسئول فعال سازی بیولوژیکی بسیاری از ملکول های کارسینوژن با وزن ملکولی پایین بوده و در اکسیداسیون ترکیبات سرطان زای نیتروز شامل N- nitrosoamine نقش دارند(۹).

سیستم آنزیمی سیتوکروم P٤٥٠ در انسان دارای ۵۷ ژن و ۵۹ شبه‌ژن است که به ۱۸ خانواده ژنی سیتوکروم و ۴۳ زیرخانواده آن تقسیم‌بندی می‌شود (۱۰). در لوکوس *CYP2E1* تنها یک ژن شناسایی شده است . CYP2E1 در کبد بیان شده و آنزیمی حفاظت شده است (۱۱). سوبستراهای CYP2E1 بسیار متنوع است بیش از ۷۰ ماده شیمیایی مختلف با ساختار های شیمیایی متفاوت توسط این آنزیم متابولیزه می شوند. بسیاری از این سوبستراها ملکول های کوچک هیدروفوبیک هستند. شامل الکل ها , کتون ها , ترکیبات آروماتیک, آلکان های هالوژن , داروها و پیش ماده ملکول های جهش زایی مانند نیتروز آمین ها (که در دود سیگار و برخی از مواد غذایی وجود دارد) و نیز آزوکارسینوژن ها (۱۲-۱۳). چندین مطالعه نشان داده اند که پلی مورفیسم *CYP2E1* با ابتلا به سرطان های خاص مانند سرطان ریه , کلورکتال و پستان مرتبط است (۱٤-۱۵) اما نتایج این مطالعات در مورد پلی مورفیسم *CYP2E1* و حساسیت به سرطان دارای تناقض زیادی است.

امروزه زمینه جدیدی از علم تحت عنوان فارماکوژنتیک ایجاد شده که بیانگر نقش تفاوت های ژنتیکی افراد در پاسخ به یک درمان دارویی خاص است. در تکمیل این دیدگاه واضح است که تفاوت های ژنتیکی افراد در حساسیت آن ها به مواد سمی به ویژه مواد سرطان زا نیز موثر است. به عبارتی بسته به اینکه یک فرد چه آلل هایی از یک ژن را داشته باشد خطر ابتلا به

سرطـــان در آن متغیر بـــوده و حتی قابل پیش بینی اســـت. در این راســـتا مطالعه حاضر جهت بررســـی تاثیـــر ژنوتیپ افـــراد در ژن *CYP2E1* و ریســـک ابتلا به سرطـــان طراحی گردیـــد. بـــا توجه بـــه اینکه چندیـــن مطالعه در خـــارج از کشـــور انجام شـــده امـــا عموما نتایـــج متناقضی را داشـــته اســـت این مطالعه مـــی توانـــد اطلاعات جدیـــدی در این مورد در تائیـــد یا رد نتایـــج مطالعات قبلی فراهـــم کند. از طرفی بـــا توجه بـــه اینکه ســـاختار ژنتیکـــی جمعیت های مختلـــف با یکدیگر متفاوت می باشـــد لازم اســـت در تمامی جمعیـــت های انســـانی چنین بررســـی انجام گـــردد لذا در مطالعه حاضر بـــرای اولین بار اثر پلی مورفیســـم *CYP2E1* 96-bp insertion در یـــک نمونه کوچـــک از جمعیت ایرانی مورد بررســـی قرار مـــی گیرد.

مواد و روش ها:

مطالعـــه حـــاضر از نوع مورد - شـــاهدي بوده کـــه بر روي نمونـــه های بیـــماران سرطانـــی و نمونه کنـــترل در جمعیت شهرستان کاشـــان صورت پذیرفت. این بررســـی بر روی ۱۰۱ بیمار مبتلا بـــه سرطان های ریه , کلورکتال ، معده و پســـتان (سرطـــان هایی کـــه در مطالعـــات قبل ارتبـــاط آن ها با ژن *CYP2E1* نشـــان داده شده اســـت(۱۴-۱۵)) انجام پذیرفت. معیـــار ورود به مطالعـــه تایید ابتلا به سرطـــان های مذکور توســـط پزشـــک متخصص و معیـــار خروج دریافـــت داروی شـــیمی درمانی بود. گـــروه کنترل از افراد ســـالم که هیچگونه علایـــم و ســـابقه ابتلا بـــه سرطان نداشـــتند انتخاب شـــد. بـــراي هر بیمار مشـــخصات مربـــوط به ســـن ، جنس، محل ســـکونت، شـــغل ، نوع سرطان و محـــل بـــروز آن در بدن، درمـــان دریافـــت شـــده ، میزان پاســـخ به درمان و ســـابقه فامیلی از اطلاعـــات موجود در پرونده ي بیمار اســـتخراج و در چك ليســـت مربوطـــه ثبت می گردیـــد. در انجام مطالعه به مســـائل اخلاقي و محرمانه بودن اطلاعـــات فردي بیماران توجه گردید.

پـــس از شناســـایی و تکمیل فـــرم جمـــع آوری اطلاعات ، ۵ میلی لیـــتر خون کامـــل در لوله هایـــی که از قبـــل با ماده ضد انعقاد EDTA پوشـــیده شـــده بودند، از هـــر فرد مورد مطالعـــه گرفته شـــد. ســـپس بلافاصله این لولـــه های حاوی خـــون که اطلاعـــات کامل بیمار یـــا کنترل بـــر روی آن درج شـــده اند تحـــت شرایط دمائـــی ٤ درجـــه به آزمایشـــگاه منتقـــل گردید.

در این تحقیق برای بررســـی چگونگی پلی مورفیســـم 96-bp insertion در ژن *CYP2E1* از روش ملکولی PCR اســـتفاده گردیـــد. به منظور بررســـی PCR ابتدا پرایمـــر های مربوطه از مقالـــه مربوطه انتخاب گردید (١٦). ســـپس جهت تعیین صحـــت و اختصاصی بـــودن پرایمرها آنالیـــزBLAST با نرم افزارهـــای آنلاین صـــورت پذیرفـــت. طراحی پرایمـــر ها به نحـــوی صورت گرفته کـــه اگـــر 96-bp insertion در ناحیه پروموتری ژن *CYP2E1* وجود داشـــته باشـــد محصول PCR بـــا انـــدازه ۷۲۹ bp حاصل می گـــردد. در مقابـــل اگر آلل فاقـــد این قطعه داخل شـــده در نمونه وجود داشـــته باشـــد انـــدازه محصول PCR ، ٦٣٣bp خواهد بـــود. به این ترتیب اگـــر ژنوتیـــپ هموزیگـــوت دارای قطعه دخولی باشـــد به صورت I/I نشـــان داده می شـــود طبیعتا فرد هتروزیگوت به صـــورت I/i بوده (یعنی هر دو بانـــد ٦٣٣ و ۷۲۹ نوکلئوتیدی را در نتایج PCR نشـــان می دهد) و فـــرد هموزیگوت فاقد قطعـــه مورد نظر i/i نشـــان داده می شـــود. توالـــی پرایمر های مربوطـــه و انـــدازه محصول PCR در جدول ۱ نشـــان داده شده است.

واکنش PCR در حجم نهایـــی ۲۰ میکرولیتر برای هریک از نمونه ها صـــورت پذیرفت. در هـــر واکنش ۸ میکرولیتر مســـترمیکس PCR(ســـیناژن، ایران) با غلظـــت ۲X، ۰/۵ میکرولیتر از هریک از پرایمرهـــای Forward و Reverse با غلظـــت pmol/µl10 و ۱ میکرولیتر DNA اســـتخراج شـــده با غلظت 30ng/µl استفاده شـــد و قطعه موردنظر بـــا برنامه دمایـــی دناتوراســـیون اولیه (۹۵ درجـــه، ۱۰ دقیقه)، ۳۰ چرخه دمایـــی (۹۵، ۵۸ و ۷۲ درجه هریـــک ٤٥ ثانیـــه) و تکثیر نهایـــی ۷۲ درجـــه ۱۰ دقیقه تکثیر شـــدند و DNA های سنتز شده با اســـتفاده از روش الکتروفورز آگارز ۱ درصـــد مورد بررســـی قرار گرفت.

جدول ۱: ویژگی های پرایمر های مورد استفاده جهت بررسی پلی مورفیسم 96-bp insertion در ژن *CYP2E1*

نام ژن/پلی مورفیسم	توالی پرایمرها ´ ۳ ← ´۵	طول قطعه تکثیر شده
	P F: GTGATGGAAGCCTGAAGAACA	**729bp for insertion**
CYP2E1 96-bp insertion	P R: CTTTGGTGGGGTGAGAACAG	**633bp for non-insertion**

در ایـــن مطالعـــه تفـــاوت ویژگی هـــای دموگرافی افـــراد بیمار و گـــروه کنـــترل و همچنین تفـــاوت فراوانی هر ژنوتیـــپ در لوکوس *CYP2E1* بیـــن ایـــن دو گروه مورد بررســـی با اســـتفاده از آزمون آماری x۲ آنالیـــز گردید. رابطه ژنوتیپهاي مختلـــف ژن *CYP2E1* و سرطان با تحلیل رگرســـیون لجســـتیك انجام گرفته و شـــدت رابطه با اســـتفاده از نســـبت بخـــت(OR) و فواصل اطمینـــان ۹۵٪ (CI) بیـــان گردید. تمامـــی آنالیز ها با اســـتفاده از بســـته نـــرم افزاری SPSS ver.22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) انجام شـــد. لازم به ذکر اســـت کـــه در آنالیز آمـــاری نقش عوامـــل مخدوش کننده مانند ســـن و جنســـیت با مطابقت دادن دو گروه در ایـــن دو پارامتر حـــذف گردیده و ســـپس آنالیـــز ها صورت پذ یرفت .

نتایج:

مطالعـــه حـــاضر مجموعا بـــر روي ۲۳۲ نمونه که شـــامل بیماران سرطانـــی (۱۰۱بیـــمار) و نمونه کنـــترل (۱۳۱ نمونه) اســـت انجام پذیرفـــت. گـــروه بیـــماران از افـــرادي تشـــکیل می شـــوند که از نظـــر پاتولـــوژي و علایم بالینـــي نشـــان دهنده سرطانهـــای ریه، معده،کلورکتـــال و پســـتان می باشـــند و گروه کنترل از افراد ســـالم انتخـــاب شـــدند. افراد گروه بیمار از لحاظ سرطـــان های مرتبط با پلـــی مورفیســـم ژن *CYP2E1* مورد انتخاب قرار گرفتند و بســـته به نوع سرطـــان و بافت درگیر در مجمـــوع در ٤ گروه سرطانی قرار داده شـــدند. شـــکل ۱ این ٤ گروه سرطانی و درصد افراد مربوط به هـــر گروه را نشـــان می دهـــد. در بین افراد سرطانی مورد بررســـی در این پژوهش سرطان های سیســـتم گوارشـــی بیشـــترین فراوانی را نشـــان می دهـــد و پس از آن سرطان پســـتان و ریـــه در رتبه های بعدی قـــرار دارند. اطلاعـــات دموگرافیک بیماران و افراد ســـالم در جدول ۲ نشـــان داده شـــده اســـت به طوریکه میانگین سنی افراد در گـــروه بیـــماران ۵۸/۱ و در گروه شـــاهد حدود ۵٦/۲ ســـال می باشـــد. در گروه کنـــترل ٤۸/۹٪ و در گروه بیـــماران ۵۲/٦٪ افراد مرد بودنـــد. فراوانـــی مرد و زن هـــا در دو گروه بیـــمار و کنترل تفاوت معنی داری نشـــان نداد.

در ایـــن پژوهـــش تمامی افراد مورد بررســـی از لحـــاظ فاکتور های محیطـــی و مرتبـــط با ســـبک زندگی همچـــون مصرف ســـیگار و مصرف مشروبـــات الکلـــی و ارتباط آن بـــا سرطان مـــورد مطالعه قـــرار گرفتند. همانطـــور که در جدول ۲ مشـــاهده می گـــردد، از لحـــاظ مصرف الکل تفـــاوت معنی داری بین گروه شـــاهد و بیمار وجود نـــدارد (*p value*/۱۰٦) به طوری کـــه در افراد بیمار تنها ۹ نفـــر (۸/۹ ٪) و در افراد ســـالم تنها ۵ نفـــر (۳/۸ ٪) الکل مصرف می کردند. از نظر اســـتعمال ســـیگار طبق جدول ۲ در گـــروه بیمار ۳۵ نفـــر یعنـــی ۳٤/٦٪ کل بیماران یا در حال حاضر ســـیگار مصرف می کردند یا ســـابقه مصرف ســـیگار در گذشـــته را داشـــتند. این میزان در ۱۹ ٪ گـــروه کنترل یعنی ۲۵ نفر مشـــاهده می گـــردد. تفاوت دو گروه بیمار و شـــاهد از نظر اســـتعمال ســـیگار از نظر آماری معنی دار می باشـــد(*p value* ۰/۰۰۷)

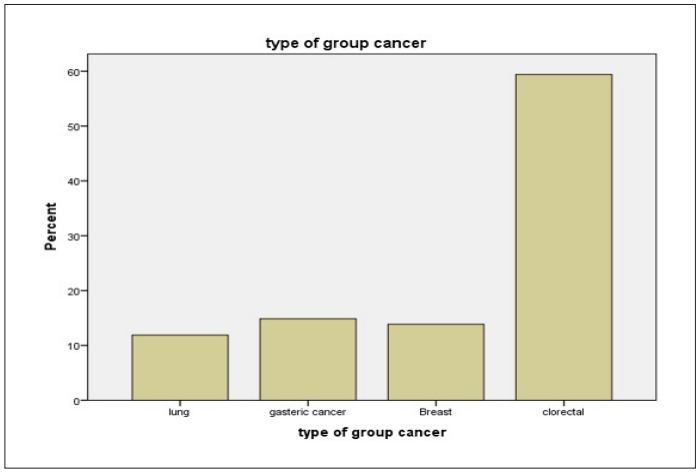
در ایـــن تحقیـــق برای بررســـی چگونگـــی پلی مورفیســـم 96-bp insertion در ژن *CYP2E1* از روش ملکولی PCR اســـتفاده گردید. به نحـــوی که DNA تمامی نمونـــه های کنترل و بیـــمار با این روش تســـت گردیدنـــد. همانطـــور که در تصویـــر۲ مشـــاهده می گردد قطعـــه مورد نظـــر با موفقیـــت تکثیـــر گردید. به طـــوری که پس از الکتروفـــورز محصـــولات PCR مربوط بـــه ژن *CYP2E1* ، باند مربـــوط به تکثیر ایـــن ژن با اندازه هـــای ۷۲۹ bp (آلل I) و یا bp ٦۳۳ (آلل I) قابل مشـــاهده هســـتند.

همانطور که در جدول ۳ نشـــان داده شـــده اســـت توزیع ژنوتیپ هـــا به طور کلـــی در دو گـــروه بیمار و ســـالم معنادار می باشـــد (*p value* ۰/۰۱۸). امـــا ژنوتیـــپ I/I در ۱۸/۸٪ (۱۹ فـــرد) بیماران

و ۱۳/۷٪ (۱۸ فرد) سالم وجود دارد که تفاوت این ژنوتیپ بین گروه بیمار و شاهد معنی دار نیست (*p value* ۰/۳۰۲) این در حالی است که ژنوتیپ هتروزیگوت I/i در ۱۵ بیمار (۱۴/۹ ٪) و ۷ (۵/۳ ٪ گروه شاهد دیده می شود و تفاوت معنی داری دارد (*p value* ۰/۰۱۴). همچنین به منظور بررسی ژنوتیپ های دارای insertion قطعه ۹۶bp به طور همزمان دو ژنوتیپ دارای insertion یعنی هموزیگوت I/I و هتروزیگوت I/i در گروه های کنترل و بیمار آنالیز شدند. طبق جدول ۳ ارتباط معنی داری بین وجود insertion و احتمال ابتلا به سرطان وجود دارد (*p value* ۰/۰۱۱).

در این مطالعه فراوانی آلل I در جمعیت نرمال ۱۶/۵٪ و فراوانی این آلل در بیماران ۲۶/۲٪ می باشد.

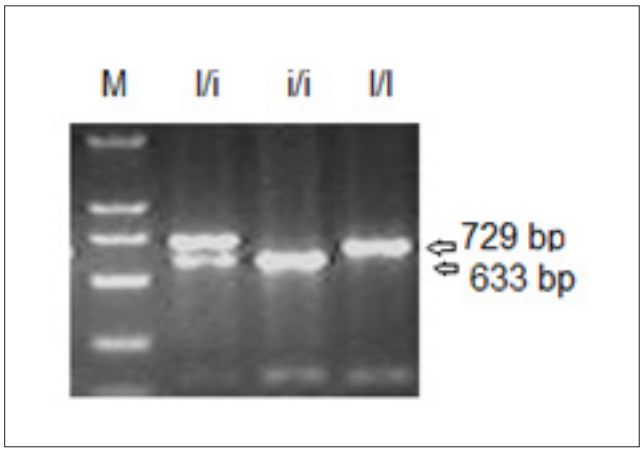
جدول ٤ توزیع ژنوتیپ های مختلف *CYP2E1* را در انواع گروههای سرطانی نشان می دهد. طبق این جدول در بیماران مبتلا به سرطان پستان ژنوتیپ i/i که فاقد قطعه ۹۶bp است فراوانی بالاتری دارد. به طوری که ژنوتیپ هموزیگوت دارای قطعه ۹۶bp فقط در یک بیمار دیده شده . هیچ بیماری نیز در این گروه ژنوتیپ هتروزیگوت ندارد. بیشترین فراوانی آلل ورود قطعه ۹۶bp به پروموتر مربوط به سرطان معده می باشد به طوریکه ۴۰٪ برای این آلل هموزیگوت و ۱۳/۳٪ هتروزیگوت می باشند.



تصویر ۱ - چهار گروه سرطانی و درصد افراد مربوط به هر گروه که در این پژوهش بررسی گردید

جدول ۲- اطلاعات دموگرافیک بیماران و افراد سالم

characteristics	control (no=131)	cases (no=101)	p value
Alcohol consumption. No (%)			
never	۱۲۶ (٪ ۹۶/۲)	۹۲ (٪ ۹۱/۱)	۰/۱۰۶
ever	۵ (٪ ۳/۸)	۹ (٪ ۸/۹)	
Smoking status, no (%)			
never	۱۰۶ (٪ ۸۰/۹)	۶۶ (٪ ۶۵/۳)	۰/۰۰۷
ever	۲۵ (٪ ۱۹/۰)	۳۵ (٪ ۳۴/۷)	



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR مربوط به ژن *CYP۲E1*. باند ۷۲۹ bp و ۶۳۳ bp مشاهده میشود. چاهک۱ : مارکر ۱۰۰۰ bp (فرمنتاز). چاهک۲: نمونه هتروزیگوت I/i . چاهک۳ : نمونه هموزیگوت i/i و چاهک ٤: نمونه هموزیگوت I/I

جدول ۳ توزیع ژنوتیپ های مختلف ژن *CYP۲E1* در گروه بیمار و شاهد

ژن	ژنوتیپ	بیمار تعداد= ۱۰۱(٪)	سالم تعداد= ۱۰۱(٪)	OR (95% CI)	P-value	X' P-value
CYP2E1	ii	۶۷ (۶۶/۳)	۱۰۶ (۸۰/۹)	۱ (رفرنس)	-	۰/۰۱۸
	Ii	۱۵ (۱۴/۹)	۷ (۵/۳)	۰/۲۹۶ (۰/۱۱۲ - ۰/۷۷۸)	۰/۰۱۴	
	II	۱۹ (۱۸/۸)	۱۸ (۱۳/۷)	۰/۶۸۰ (۰/۳۲۶ - ۰/۳۲۶)	۰/۳۰۲	
	II/Ii	۳۴ (۳۳/۷)	۲۵ (۱۹/۱)	۰/۴۶۵ (۰/۲۵۵ - ۰/۸۴۷)	۰/۰۱۱	

جدول ٤ توزیع ژنوتیپ های مختلف *CYP2E1* را در انواع گروههای سرطانی

نوع سرطان	Genotype			مجموع
	i/i	I/i	I/I	
ریه	۷	۲	۳	۱۲
	٪ ۵۸/۳	٪ ۱۶/۷	٪ ۲۵	٪ ۱۰۰
معده	۷	۲	۶	۱۵
	٪ ۴۶/۷	٪ ۱۳/۳	٪ ۴۰	٪ ۱۰۰
پستان	۱۳	۰	۱	۱۴
	٪ ۹۲/۹	٪ ۰	٪ ۷/۱	٪ ۱۰۰
کلورکتال	۴۰	۱۱	۹	۶۰
	٪ ۶۶/۷	٪ ۱۸/۳	٪ ۱۵	٪ ۱۰۰
مجموع	۶۷	۱۵	۱۹	۱۰۱
	٪ ۶۶/۳	٪ ۱۴/۹	٪ ۱۸/۸	٪ ۱۰۰

بحث:

امروزه فاکتورهای محیطی سرطان زا در محیط زیست انسان ها پراکنده شده است. در ایران نیز آلودگی محیط زیست با مواد سرطان زا روز به روز افزایش می یابد و گاها شاهد هشدارهای وزارت بهداشت در مورد آلودگی مواد غذایی و یا وجود آلاینده های خطرناک در هوا بویژه در مناطق شهری هستیم. بنابراین در این شرایط نحوه پاسخ بدن به این مواد سرطان زا می تواند در تعیین ریسک ابتلا به سرطان نقش داشته باشد. یکی از مکانیسم های مهم پاسخ فرد به آلاینده ها، داروها و ترکیبات جهش زا، سیستم سیتوکروم p۴۵۰ و بویژه آنزیم CYP۲E۱ می باشد که در بدن مسئولیت سم زدایی و ایجاد تغییر در برخی متابولیت ها را دارد (۸).

پلی مورفیسم های ژنی به تفاوت های جزئی در توالی ژن ها در جمعیت سالم انسانی اطلاق می شود که این اشکال مختلف را تحت عنوان آلل های ژنی می شناسیم. تفاوت پاسخ افراد به داروها، عوامل بیماریزا و مواد شیمیایی محیطی به علت تفاوت در آلل هایی است که در مجموعه ژن های هر فرد وجود دارد. زیرا آلل های مختلف یک ژن می تواند طیف متنوعی از کارایی محصول ژن را باعث شود. بنابراین اخیرا دیدگاه جدیدی در علم پزشکی مبنی بر توجه به تنوع ژنتیکی و نوع آلل های ژن های هر فرد در تعیین استراتژی های درمانی و پیش آگهی پیرامون ریسک ابتلا به بیماری های خاص مطرح شده است . ژن پروتئین *CYP2E1* نیز در جمعیت نرمال دارای پلی مورفیسم های متعددی می باشد که یکی از مهمترین پلی مورفیسم های این ژن ورود یک قطعه ۹۶ bp در ناحیه پروموتر این ژن است که نشانداده شده این آلل ژن *CYP2E1* بیان بالاتری نسبت به دیگر آلل ها دارد(۱۷).

مطالعات مختلفی برای بررسی این پلی مورفیسم و ارتباط آن با ابتلا به سرطان در کشور های دیگر انجام شده است که بعضا نتایج متناقضی داشته است که لزوم بررسی های بیشتر را متذکر می شود. از طرفی در ایران تاکنون روی این پلی مورفیسم مطالعه ای انجام

نشده است. از آنجایی که ساختار ژنتیکی جمعیت های مختلف متنوع می باشد لازم است اطلاعاتی نیز پیرامون این پلی مورفیسم و نقش آن در ریسک ابتلا به سرطان در جمعیت ایرانی نیز صورت پذیرد. بنابراین در این پژوهش پلی مورفیسم CYP2E196-bp insertion در جمعیت شهرستان کاشان به صورت یک مطالعه مورد-شاهد مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات انجام شده روی پلی مورفیسم ژن *CYP2E1* در کشور های دیگر نشان داده اند که نوعی ژنوتیپ ویژه یا آلل خاصی از این ژن ریسک ابتلا به سرطان های oral (۱۸)، کبد (۱۹) و ریه (۲۰) را افزایش می دهد. در پژوهش حاضر ٦٦/٣٪ بیماران ژنوتیپ فاقد قطعه ۹٦ نوکلئوتیدی (i/i) ، ۱٤/۹ ٪ هتروزیگوت I/i و ۱۸/۸٪ هم هموزیگوت I/I یعنی دارای دو آلل حاوی قطعه ۹٦ نوکلئوتیدی می باشند (جدول ۳). در بین سه ژنوتیپ این ژن فرم هتروزیگوت در دو گروه بیمار و شاهد اختلاف معنی داری را نشان داد. نتایج ما هم در مورد ژنوتیپ های هموزیگوت هم هتروزیگوت با نتایجSyed Sameer و همکارانش که بر روی جمعیت کشمیری انجام شده بود مطابقت دارد. این گروه تحقیقاتی بر روی ۸٦ بیمار سرطان کلورکتال و ۱٦۰ فرد سالم انجام شده بود (۲۱). همچنین Makiko Morita و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مطالعه ای که روی ٦۸۵ بیمار و ۷۷۸ فرد کنترل در جمعیت هاوایی انجام شده بود آلل دارای قطعه ۹٦ bp را مرتبط با سرطان کلورکتال دانست (۲۲). در مطالعه حاضر نیز فراوانی ژنوتیپ I در بیماران(۲٦/۲ ٪) اختلاف معناداری با گروه سالم (۱٦/۵٪) داشت.

در بررسی دیگری که روی جمعیت ژاپن صورت پذیرفت گزارش شده است که این آلل دارای قطعه ۹٦ bp با ابتلا به سرطان مری مرتبط است اما ارتباط معنی داری با سرطان ریه ندارد. این مطالعه روی ۸۵ بیمار سرطان ریه و ۸۲ سرطان مری و ۱۹۰ نفر کنترل انجام پذیرفت (۲۳) Le Marchand, L و همکاران نیز با مطالعه روی جمعیت هاوایی نشان ژنوتیپ های دارای آلل قطعه ۹٦ bp ریسک ابتلا به سرطان رکتوم را افزایش می دهد. این محققین استنباط کردند که ابتلا به سرطان رکتوم در جمعیت هایی که مصرف گوشت قرمز در آن ها بالا است با پلی مورفیسم 96-bp insertion مرتبط است. زیرا مصرف گوشت قرمز تولید ترکیبات N-nitroso را در روده بالا می برد و در این شرایط اگر فرد دارای آلل 96-bp insertion در لوکوس ژنی *CYP2E1* باشد بیشتر از دیگر افراد در معرض خطر ابتلا به سرطان کلورکتال خواهد بود (۲٤).

در بررسی حاضر فراوانی آللی I در جمعیت سالم۱٦/٤٪ می باشد. این فراوانی به میزان زیادی مشابه دیگر جمعیت های آسیایی است. به طوری که در جمعیت ژاپنی فراوانی آللی I ۲۳ ٪ (۲۵)، در تایوان ۱۵٪ (۲٦) ، در جمعیت کشمیر ۱۵٪ (۲۱) و در جمعیت هاوایی ۲۲٪ (۲۲) است. در جمعیت آفریقایی-آمریکایی این فراوانی ۱۰٪ (۲٦) و در قفقازی ها تنها ۲٪ (۲٦) می باشد. این نتایج علاوه بر اینکه شباهت جمعیت ایرانی را از لحاظ این ژن با دیگر کشور های آسیا نشان می دهد تاکیدی نیز به تنوع ژنوتیپ ها در جمعیت های مختلف و لزوم بررسی وضعیت این ژن در هر جمعیتی را به صورت جداگانه دارد.

در مطالعه حاضر فاکتور های محیطی مانند مصرف الکل و استعمال سیگار و ارتباط آن ها با ابتلا به سرطان نیز بررسی گردید. نتایج نشان می دهد که استعمال سیگار با ریسک ابتلا به سرطان در جمعیت مورد مطالعه ارتباط معنی داری دارد. اما نوع ژنوتیپ در افراد سیگاری و احتمال افزایش ریسک سرطان در این گروه نقشی ندارد. مطالعه Syed Sameer نیز در سال ۲۰۱۱ این یافته را تائید می کند(۲۱).

نتایج قبلی نشان می دهد مصرف مشروبات الکلی باعث افزایش ریسک ابتلا به سرطان کلورکتال در افرادی می شود که آلل فاقد I را دارند(۲۲). مطالعه دیگری که روی جمعیت هاوایی انجام شد برای اولین بار ریسک ابتلا به سرطان rectal را در افراد الکلی با 96-bp insertion مرتبط دانست . این مطالعه نشان داد که افراد الکلی که حداقل یک آلل I دارند ۱/٦ برابر برای سرطان rectal و ۱/۱ برابر افراد نرمال در معرض سرطان کلورکتال هستند (۲٤). اما مطالعه حاضر و نیز مطالعه Syed Sameer ارتباطی بین ژنوتیپ و مصرف الکل در افزایش ریسک ابتلا به سرطان را مشاهده نمی کند.

بحث:

علت این اختلافات در مطالعات مختلف مشخص نیست و لزوم افزایش این بررسی ها را متذکر می گردد. گزارشات متنوعی مصرف الکل را یک عامل مرتبط با سرطان کلورکتال می دانند(۲۷- ۲۸) اما توجیه مکانیسم این ارتباط هنوز مشخص نیست. Makiko Morita در بررسی خود نشان می دهد که مصرف الکل در افراد فاقد آلل I با ریسک سرطان کلورکتال مرتبط است (۲۲). از طرفی می دانیم که ژن *CYP2E1* در متابولیسم الکل دخیل می باشد (۲۹). اما نتایج این ارتباط و تناقض هایی که در این زمینه وجود دارد تفسیر مکانیسم عملکرد الکل در افراد با آلل I را مشکل می سازد. McCarver DG نشان داده است که القای بیان ژن *CYP2E1* با الکل در افراد دارای آلل I بیشتر است (۳۰). به طور کلی در پی مصرف الکل بیان آنزیم CYP۲E۱ در کبد افزایش می یابد (۳۱). بنابراین مطالعات بیشتری در این زمینه بویژه مطالعات سلولی و ژنتیکی نیاز است انجام پذیرد.

از محدودیت های تحقیق حاضر می توان به میزان واقعی بودن اطلاعات کسب شده از افراد مورد بررسی اشاره کرد. اینکه میزان مصرف الکل و یا حتی طول مدت مصرف سیگار دقیقا چی میزان بوده است و تا چه حد می توان در این موارد به پاسخ افراد اعتماد کرد چالشی مهم در مطالعات اینچنینی می باشد. زیرا در جامعه ایران که دارای باور های مذهبی و سنتی هستند و مصرف مشروبات الکلی حرام می باشد افراد تمایل به ابراز استفاده از این مواد حتی به یک پژوهشگر علمی ندارند. همچنین زنان در جامعه ما از ابراز بیان مصرف سیگار خودداری می کنند. بنابراین به نظر می رسد نمی توان چندان به صحت این اطلاعات در افراد تکیه داشت و می توان ادعا کرد که قطعی ترین اطلاعات مطالعه حاضر نتایج ژنوتایپینگ و ابتلا به سرطان می باشد و این نکته نیاز است مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه گیری:

مطالعه حاضر بر روی ۱۰۱ نمونه بیمار سرطانی و ۱۳۱ فرد سالم انجام پذیرفت. این افراد از نظر پارامترهای محیطی موثر در ریسک ابتلا به سرطان مانند مصرف سیگار و مصرف الکل مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص گردید که استعمال سیگار در افزایش ریسک ابتلا به سرطان در جمعیت مورد مطالعه مرتبط می باشد. همچنین این افراد از لحاظ آلل I یعنی ورود یک قطعه ۹۶ نوکلئوتیدی در پروموتر ژن *CYP2E1* مورد آزمایش ژنتیک قرار گرفتند. با توجه به اینکه این ژن مسئول متابولیزه کردن بسیاری از واسطه های کارسینوژن در بدن است ارتباط ژنوتیپ های دارای این آلل ژنی با افزایش ریسک ابتلا به سرطان مورد آنالیز قرار گرفت که نتایج نشان دادند بین ژنوتیپ های دارای این آلل ژنی و ابتلا به سرطان ارتباط معنی داری وجود دارد. همچنین مطالعه حاضر فراوانی آلل I را در جمعیت نرمال ۱۶/۴٪ گزارش می کنند که این فراوانی مشابه دیگر جمعیت های آسیایی می باشد. لازم به ذکر است مطالعه حاضر در یک جمعیت کوچک با فرهنگ سنتی که ازدواج های فامیلی هم در آن شایع است انجام شده لذا اثر کوچکی جمعیت و ازدواج های فامیلی می تواند در فراوانی آلل ها موثر باشد و لزوما این نتایج قابل تعمیم به کل جمعیت ایران نیست و پیشنهاد می گردد مطالعات گسترده تری از لحاظ جغرافیایی و با حجم نمونه بالاتر انجام گردد.

تقدیر و تشکر:

نویسندگان از پرسنل آزمایشگاه انستیتو پاستور قدردانی می کنند.

مصوبات:

این تحقیق برگرفته از پایان نامه خانم محبوبه اصغری به شماره ۹۳۱۴۷ با «عنوان بررسی پلی مورفیسم ژن *CYP2E1* و خطر ابتلا به سرطان در شهرستان کاشان» می باشد و دارای کد اخلاق با شماره ۳۵۳۵ از دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی کاشان است.

تعارض منافع:

نویسندگان این مقاله عنوان می کنند که هیچ تعارضی وجود ندارد.

References

1- Amori N, Aghajani M, Asgarian FS, Jazayeri M. Epidemiology and trend of common cancers in Iran (2004-2008). Eur J Cancer Care (Engl). 2017;26(5):10.1111/ecc.12449.

doi:10.1111/ecc.12449

2- Farhood B, Geraily G, Alizadeh A. Incidence and Mortality of Various Cancers in Iran and Compare to Other Countries: A Review Article. Iran J Public Health. 2018 Mar;47(3):309-316. PMID: 29845017; PMCID: PMC5971166.

3- Mohaghegh F, Hamta A, Shariatzade M A. The study of cancer incidence and cancer registration in Markazi province between 2001-2006 and comparison with national statistics, Iran. J Arak Uni Med Sci 2008; 11 (2) :84-93.http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-229-en.html

4- Kiran B, Karkucak M, Ozan H, Yakut T, Ozerkan K, Sag S, Ture M. GST (GSTM1, GSTT1, and GSTP1) polymorphisms in the genetic susceptibility of Turkish patients to cervical cancer. J Gynecol Oncol. 2010;21(3):169-73.

doi: 10.3802/jgo.2010.21.3.169.

5- Slattery ML, Edwards SL, Samowitz W, Potter J. Associations between family history of cancer and genes coding for metabolizing enzymes (United States). Cancer Causes Control. 2000;11(9):799-803. **doi:10.1023/a:1008912317909**

6- Gonzalez FJ, Kimura S. Understanding the role of xenobiotic-metabolism in chemical carcinogenesis using gene knockout mice. Mutat Res. 2001;477(1-2):79-87. **doi:10.1016/s0027-5107(01)00109-9**

7- Uno Y, Uehara S, Yamazaki H. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes in cynomolgus and rhesus monkeys and common marmosets in preclinical studies for humans. Biochem Pharmacol. 2018;153:184-195.

doi:10.1016/j.bcp.2017.12.015

8- Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism and toxicology--with emphasis on cytochrome p450. Toxicol Sci. 2011;120(1):1-13. **doi:10.1093/toxsci/kfq374**

9- Morse MA, Lu J, Stoner GD, Murphy SE, Peterson LA. Metabolism of N-nitrosobenzylmethylamine by human cytochrome P-450 enzymes. J Toxicol Environ Health A. 1999; 10;58(7):397-411.

doi: 10.1080/009841099157133.

10- Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. Pharmacogenetics. 2004;14(1):1-18.

doi: 10.1097/00008571-200401000-00001

11- Bozina, Nada et al. "Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk." Arhiv za higijenu rada i toksikologiju. 2009; 60,2: 217-42. **doi:10.2478/10004-1254-60-2009-1885**

12- Villeneuve, J-P, and V Pichette. "Cytochrome P450 and liver diseases." Current drug metabolism. 2004; 5,3. 273-82.

doi:10.2174/1389200043335531

13- Bolt, Hermann M et al. "The cytochrome P-450 isoenzyme CYP2E1 in the biological processing of industrial chemicals: consequences for occupational and environmental medicine." International archives of occupational and environmental health 2003; 76,3 : 174-85.

doi:10.1007/s00420-002-0407-4

14- Liu, S et al. "Elucidation of CYP2E1 5' regulatory RsaI/PstI allelic variants and their role in risk for oral cancer." Oral oncology 2001; 37,5: 437-45.

doi:10.1016/s1368-8375(00)00099-3

15- Kiss I, Sándor J, Pajkos G, et al. Colorectal cancer risk in relation to genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1, 2E1, and glutathione-S-transferase M1 enzymes. Anticancer Research. 2000;20(1B):519-522. PMID: 10769717.

16- Morita M, Le Marchand L, Kono S, et al. Genetic polymorphisms of CYP2E1 and risk of colorectal cancer: the Fukuoka Colorectal Cancer Study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009;18(1):235-241. **doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0698**

17- Nomura, Fumio et al. "Transcriptional activity of the tandem repeat polymorphism in the 5'-flanking region of the human CYP2E1 gene." Alcoholism, clinical and experimental research 2003; 27,8: 42S-46S. **doi:10.1097/01.ALC.0000078612.01626.96**

18- Wang, Yadong et al. "Association between CYP2E1 genetic polymorphisms and lung cancer risk: a meta-analysis." European journal of cancer (Oxford, England : 1990) 2010; 46,4: 758-64.

doi:10.1016/j.ejca.2009.12.010

19- Chen, Junhong et al. "Relationship of ALDH2 rs671 and CYP2E1 rs2031920 with hepatocellular carcinoma susceptibility in East Asians: a meta-analysis." World journal of surgical oncology 2020. 18,1 21. 27 **doi:10.1186/s12957-020-1796-0**

20- Li, Meng et al. "Gene polymorphism of cytochrome P450 significantly affects lung cancer susceptibility." Cancer medicine 2019; 8,10: 4892-4905.

doi:10.1002/cam4.2367

21- Syed S, Saniya N, Qurteeba Q, Shafia A, Shahid M, Mushtaq A. et al. "Role of CYP2E1 genotypes in susceptibility to colorectal cancer in the Kashmiri population." Human genomics 2011; 5,6: 530-7. **doi:10.1186/1479-7364-5-6-530**

22- Morita M, Le Marchand L, Kono S, et al. Genetic polymorphisms of CYP2E1 and risk of colorectal cancer: the Fukuoka Colorectal Cancer Study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009;18(1):235-241. **doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0698**

23- Itoga S, Nomura F, Makino Y, et al. Tandem repeat polymorphism of the CYP2E1 gene: an association study with esophageal cancer and lung cancer. Alcohol Clin Exp Res. 2002;26(8 Suppl):15S-19S.

doi:10.1097/01.ALC.0000026828.13868.B5

24- Le Marchand L, Donlon T, Seifried A, Wilkens LR. Red meat intake, CYP2E1 genetic polymorphisms, and colorectal cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002;11(10 Pt 1):1019-1024.

25- Zhou, Guo-Wu et al. "CYP2E1 PstI/RsaI polymorphism and colorectal cancer risk: a meta-analysis." World journal of gastroenterology vol. 16,23 (2010): 2949-53. **doi:10.3748/wjg.v16.i23.2949**

26- Fritsche E, Pittman GS, Bell DA. Localization, sequence analysis, and ethnic distribution of a 96-bp insertion in the promoter of the human CYP2E1 gene. Mutat Res. 2000;432(1-2):1-5.

doi:10.1016/s1383-5726(99)00009-6

27- Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, et al. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. Ann Intern Med. 2004;140(8):603-613. **doi:10.7326/0003-4819-140-8-200404200-00007**

28- Rahimi, M., kadkhoda, S., fard-esfahani, P. Relation between polymorphisms of DNA repair genes and thyroid cancer. Iranian Journal of Biological Sciences, 2017; 12(3): 39-46.

29- Chaudhry H, Sohal A, Iqbal H, Roytman M. Alcohol-related hepatitis: A review article. World J Gastroenterol. 2023;29(17):2551-2570.

doi:10.3748/wjg.v29.i17.2551

30- McCarver DG, Byun R, Hines RN, Hichme M, Wegenek W. A genetic polymorphism in the regulatory sequences of human CYP2E1: association with increased chlorzoxazone hydroxylation in the presence of obesity and ethanol intake. Toxicol Appl Pharmacol. 1998;152(1):276-281.

doi:10.1006/taap.1998.8532

31- Teschke R. Alcoholic Liver Disease: Alcohol Metabolism, Cascade of Molecular Mechanisms, Cellular Targets, and Clinical Aspects. Biomedicines. 2018;6(4):106. Published 2018 Nov 12.

doi:10.3390/biomedicines6040106