

مقاله پژوهشی

بررسی پلی‌مورفیسم C23237T ژن Cyp3a4 در افراد سالم غرب مازندران از نظر سن و جنسیت

فاطمه حیدریان^۱، ویدا حجتی^{۱*}، رضا گلیجانی مقدم^{۲*}

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

*مسئول مکاتبات: v.hojati@damghaniau.ac.ir, rzmogadam@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۲۳

DOI: 10.22034/ascij.2023.1976847.1452

چکیده

Cyp3a4 (سیتوکروم P450 3A4) یک آنزیم مهم در بدن است که عمدتاً در کبد و روده یافت می‌شود. مولکول‌های آلی کوچک خارجی مانند سموم یا داروها را اکسید می‌کند تا بتوان آنها را از بدن خارج کرد. از آنجا که مطالعات چندانی روی پلی‌مورفیسم-های این ژن صورت نگرفته این مطالعه به منظور بررسی پلی‌مورفیسم C23237T ژن Cyp3a4 در افراد سالم مذکر و مونث هفت‌ماهه تا ۷۹ ساله در غرب مازندران انجام شد. در این تحقیق، خون تام از افراد مذکر و مونث سالم شهرهای غرب استان مازندران دریافت شد. برای هر فرد اطلاعات مربوط به سن، جنس، سابقه فامیلی، مصرف الکل و دخانیات ثبت شد. در این بررسی از تکنیک ARMS-PCR استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 2016 و آزمون مربع کای انجام شد. در جمعیت مورد مطالعه ۵۰ نفر مونث و ۳۸ نفر مذکر بودند. نتایج نشان داد در جنس مونث، ۳۳ نفر دارای ژنوتیپ هتروزیگوت با درصد فراوانی ۶۶ درصد، ۱۱ نفر دارای ژنوتیپ هموزیگوت غالب با درصد فراوانی ۲۲ درصد، ۵ نفر دارای ژنوتیپ هموزیگوت مغلوب با درصد فراوانی ۱۰ درصد و ۱ نفر فاقد جهش با درصد فراوانی ۲ درصد بودند. در جنس مذکر، ۲۲ نفر دارای ژنوتیپ هتروزیگوت با فراوانی ۵۷/۸۹ درصد، ۵ نفر دارای ژنوتیپ هموزیگوت غالب با درصد فراوانی ۱۳/۱۵ درصد، ۸ نفر دارای ژنوتیپ هموزیگوت مغلوب با درصد فراوانی ۲۱/۰۵ درصد و ۳ نفر فاقد جهش با درصد فراوانی ۷/۸۹ درصد بودند. از نظر جنسیت هم در جنس مونث و هم در جنس مذکر ژنوتیپ هتروزیگوت بالاترین درصد فراوانی را به خود اختصاص داد. همچنین بین پلی‌مورفیسم C23237T ژن Cyp3a4 با سن افراد ($p = 0/81$) و با جنسیت افراد ($p = 0/845$) ارتباط معناداری وجود ندارد.

کلمات کلیدی: پلی‌مورفیسم، ژنوتیپ، جنسیت، Cyp3a4، ARMS-PCR.

مقدمه

اثرات فنوتیپی مضر داشته و در ایجاد استعداد ابتلا به برخی از بیماری‌ها نقش دارند (۱۵). پلی‌مورفیسم ممکن است با اثر بر روی فعالیت کاتالیک، پایداری و مقدار بیان پروتئین‌ها، عملکرد پروتئین را تحت تاثیر قرار دهد. ژنوم افراد مختلف تقریباً ۹۹/۹ درصد

به وجود آلل‌های مختلف یک ژن در یک جمعیت از گونه که باعث ایجاد فنوتیپ‌های مختلف می‌شود و فراوانی آن آلل در جمعیت ۱ درصد و یا بیشتر باشد، چندشکلی یا پلی‌مورفیسم می‌گویند. برخی از پلی‌مورفیسم‌ها (واریانت‌های با شیوع بالای ۱ درصد)،

سیتوکروم P450 (CYP) یک خانواده بزرگ از آنزیم-های هموپروتئینی است که آنزیم اصلی دخیل در متابولیسم مواد مخدر، داروها (مانند استامنیوفن، کدئین، سیلاسفرین A، دیازپام و اریترومايسين)، سنتز کلسترول، استروئیدها و سایر چربی‌ها است. سوبستراهای آنزیم شامل واسطه‌های متابولیک مانند لپیدها، هورمون‌های استروئیدی، زنوبیوتیک‌ها مانند مواد مخدر و سایر مواد شیمیایی سمی هستند (۲۶). سیتوکروم P450 پلی‌مورفیسم بالایی دارد که این باعث تغییر در پاسخ به داروها در اشخاص مختلف می‌شود که نتیجه آن فعالیت زیاد، کم یا عدم فعالیت آنزیم است (۱۹). یکی از مراکز اصلی این آنزیم در بدن انسان، کبد می‌باشد (۸، ۹، ۱۰). پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی و تغییرات اپی‌ژنتیکی در ژن‌های CYP ممکن است مسئول تغییرات بین فردی و بین قومیتی در حساسیت به بیماری و اثربخشی درمانی داروها باشد. Cyp3A4 ایزوآنزیم اصلی از خانواده سیتوکروم p450 و عضوی از آنزیم‌های اکسیدازی (مونواکسیژناز) بوده که تقریباً ۲۷kb طول داشته و ناحیه کد کننده آن شامل ۱۳ آکسون واقع در کروموزوم ۲۲.۱q۷۱ است. Cyp3A4 در کبد جنین وجود ندارد اما از ۱۲ ماهگی مقدار آن در کبد افزایش می‌یابد. تفاوت بین افراد در سطوح کبدی این آنزیم زیاد است که اساس این تفاوت تا به حال ناشناخته مانده ولی می‌تواند به علل ژنتیکی، محیط زیستی، حالات پاتولوژیک، هورمونی و یا تغذیه ارتباط داشته باشد. (۲۳).

گرچه Cyp3A4 غالباً در کبد بافت می‌شود ولی در اندام‌ها و بافت‌های دیگر بدن نیز حضور دارد (۶، ۱۷).

اگرچه نشانه‌ای از پلی‌مورفیسم Cyp3A4 تا سال ۱۹۹۷ در دست نبود ولی بعد از آن محققین موتاسیون‌هایی را هم در ناحیه پروموتور و هم ناحیه کدکننده گزارش کردند (۵). با اینکه بیش از ۲۸ پلی-

مشابهت دارند اما همان تفاوت در ۰/۱ درصد ژنوم نیز منجر به ۱۱ میلیون نوع پلی‌مورفیسم ژنی می‌شود (۱۳). پلی‌مورفیسم ممکن است ناشی از فرآیندهای تصادفی مانند خطا در آنزیم همانندسازی (DNA پلیمراز) و دامیناسیون بازها باشد. همچنین ممکن است توسط عوامل خارجی نظیر ویروس‌ها یا تشعشعات (پرتوهای فرابنفش و اشعه X) القا گردند (۳۱). پلی‌مورفیسم ژنتیکی ژن‌های کدکنندهی آنزیم-های متابولیزه کننده دارو باعث تنوع در متابولیسم داروها می‌شود. شناخت ظرفیت متابولیکی افراد از طریق ژنتیکی یک وسیله مهم برای تجویز ایمن داروها می‌باشد. در دسترس بودن اطلاعات ژنومی و درک ما از ارتباط ژنتیکی و پاسخ به درمان و بهبود بیماری، تصمیم پزشکان به استفاده یا عدم استفاده از دارو را امکان‌پذیر می‌کند (۱۹). ساده‌ترین و رایج‌ترین نوع پلی‌مورفیسم ژنتیکی در ژنوم انسان، پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) می‌باشد که به تنوع ژنتیکی افراد یک گونه یا کروموزوم‌های همولوگ یک فرد به دلیل جایگزینی یک نوکلئوتید با نوکلئوتید دیگر گفته می‌شود. اکثر SNPها خاموش هستند و عملکرد بیان ژن را تغییر نمی‌دهند. SNPها در ژنوم بسیار شایع هستند، به طوری که در هر ۱۰۰۰ باز یک عدد SNP وجود دارد، یعنی به طور متوسط بین هر دو ژنوم انسانی حدود ۳ میلیون تفاوت وجود دارد. (۲۷). وجه تمایز بین جهش و پلی‌مورفیسم بر اساس میزان فراوانی آللی در جمعیت مشخص می‌شود. در صورتیکه فراوانی آللی بیش از ۱ درصد باشد پلی-مورفیسم و در صورتی که فراوانی آللی کمتر از ۱ درصد باشد به عنوان جهش شناخته می‌شود (۴).

سیتوکروم پروتئین حامل و رنگدانه‌ای است که اغلب به غشای داخلی میتوکندری متصل می‌شوند و در زنجیره انتقال الکترون و تشکیل ATP فعالند (۲).

داخل ویال اضافه و تکان داده شد. سانتریفیوژ ۴۵۰۰ rpm به مدت ۴ دقیقه و سپس اوت سوپرناتانت صورت گرفت. ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده سلول اضافه و پیپت میکس شد تا رسوب به خوبی حل شد. سانتریفیوژ ۴۵۰۰ به مدت ۴ دقیقه انجام و سوپرناتانت اوت شد. مراحل ۴ و ۵ تکرار شد. سپس اضافه کردن ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده هسته و حل کردن رسوب به طور کامل، ماندن در دمای محیط به مدت ۱۰ دقیقه، اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر سدیم کلرید ۵ مولار و میکس شد. اضافه کردن ۶۰۰ میکرولیتر کلروفرم، تکان دادن نسبتاً سریع نمونه‌ها، سانتریفیوژ در ۴۵۰۰ به مدت ۴ دقیقه، انتقال با دقت فاز رویی به ویال جدید، اضافه کردن ۶۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق سرد، تکان دادن آرام نمونه (۵ تا ۶ بار میکروتیوپ سر و ته شد)، سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه و فاز رویی اوت شد، خشک کردن نمونه با درب باز (به مدت یک روز) که در Dry plate گذاشته شد. ۷۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط برای حل شدن DNA قرار داده و در نهایت به فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد منتقل گردید.

الکتروفورز نمونه‌ها بر روی ژل آگارز: پس از استخراج DNA جهت آنالیز کیفی و اطمینان صحت استخراج و سالم بودن DNA انجام شد. نمونه‌های حاوی DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد برده شد. مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه حاوی DNA استخراج شده با ۲ میکرولیتر ژل رد مخلوط گردید و درون چاهک بارگذاری شد. پس از انجام بارگذاری و اتصال الکتروود مثبت و منفی تانک الکتروفورز به ولتاژ ۱۰۰، برای نیم ساعت برقرار شد. در حین انجام عمل الکتروفورز، قطعات DNA به دلیل داشتن بار منفی به سمت الکتروود مثبت حرکت می‌کنند. سرعت حرکت رشته‌های کوتاه‌تر و سبک‌تر

مورفیسیم تک نوکلئوتیدی در ژن CYP3A4 شناسایی گردیده، ولی به تنوع بین فردی قابل توجهی منجر نمی‌شود (۳۲). متابولیسم حدود ۵۰ درصد داروها توسط آنزیم CYP3A4 انجام می‌شود. هرگونه تغییر نوکلئوتیدی در ناحیه کدکننده‌ی این ژن باعث افزایش خطر ابتلا به سرطان می‌گردد. بارزترین تغییر نوکلئوتیدی که باعث جابجائی آدنین (A) به گوانین (G) و ایجاد موتانت این ژن یعنی CYP3A4*1B می‌شود نقش مهمی در سرطان‌زایی ایفا می‌کند (۲۵).

از آنجا که مطالعات چندانی روی پلی‌مورفیسیم‌های این ژن بخصوص در ایران صورت نگرفته تحقیق حاضر با هدف بررسی پلی‌مورفیسیم ژن cyp3A4 در موقعیت C23237T در افراد سالم غرب مازندران و بررسی رابطه بین فراوانی ژنوتیپ CYP3A4(C23237T) با سن و جنسیت افراد انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: نمونه‌ها شامل ۱۰۳ فرد سالم مذکر و مونث در محدوده‌ی سنی ۷ ماهه تا ۷۹ ساله‌ی شهرستان‌های چالوس، تنکابن و رامسر در غرب استان مازندران بودند که ۱۵ نفر از آنها خون را داده ولی برگه هویت، پر نکرده بودند که بعنوان افراد فاقد هویت در نظر گرفته شدند. از افراد خون تام دریافت شد. خون گرفته شده در ویال‌های حاوی EDTA و در دمای منفی ۲۱ درجه سانتیگراد نگهداری شد. برای هر فرد مورد مطالعه اطلاعات مربوط به سن، جنس، سابقه فامیلی، مصرف الکل و دخانیات، داروی مصرفی بیمار ثبت شد. با استفاده از اطلاعات موجود در سایت NCBI توالی ژن cyp3A4 و اطلاعات مربوط به این ژن استخراج خواهد شد.

مراحل استخراج DNA از خون تام: مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده سلول به ۵۰۰ میکرولیتر خون

باشد. پرایمرهای مورد استفاده در این آزمایش با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 و CLC-Work Bench طراحی و از شرکت ligo از دانمارک خریداری شد (جدول ۱).

بررسی آلی C و T در جمعیت: برای بررسی

فراوانی آلی C و T از فرمول‌های زیر استفاده شد:

$$C \text{ فراوانی آلی} = \frac{CT \text{ تعداد} + (CC \times 2) \text{ تعداد}}{2 \times \text{تعداد کل}} \times 100$$

$$T \text{ فراوانی آلی} = \frac{CT \text{ تعداد} + (TT \times 2) \text{ تعداد}}{2 \times \text{تعداد کل}} \times 100$$

تجزیه و تحلیل آماری: از نرم‌افزار SPSS 16 و آزمون مربع کای برای آنالیز آماری داده‌ها استفاده شد. وجود یا عدم وجود ارتباط معنادار با سطح احتمال ۹۵ درصد ($p < 0/05$) در نظر گرفته شد.

بیشتر از قطعات بلندتر و سنگین‌تر DNA است. بعد از انجام الکتروفورز و اتمام آن، ژل بر روی صفحه دستگاه ترانسلمومیناتور مجهز به دوربین تحت اشعه UV برده شد و پس از عبور از ژل باعث آشکار شدن باندهای DNA گردید. جهت ارزیابی محصولات PCR از DNA ladder (Thermo Scientific-تایوان) با وزن مولکولی ۱۰۰ bp استفاده گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR): واکنش‌های

تکثیر ژن با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Biorad

(USA) تحت شرایط آنزیمی با آنزیم Taq پلیمرز

انجام شد. عمل تکثیر با Taq DNA polymerase به

منظور شناسایی ژن انجام شد. سرعت سنتز

(پلیمریزاسیون) آنزیم Taq DNA polymerase در

حالت مطلوب و در درجه حرارت ۷۰-۸۰ درجه

سانتیگراد برابر با ۳۵-۱۰۰ نوکلئوتید در هر ثانیه می-

جدول ۱- پرایمرهای ژن Cyp3A4 (C23237T)

نام	جهت	توالی	دما
C23237T	Forward (M)	5'-GGG ATG GGA AAA GGT GTC TT-3'	۶۵/۳
C23237T	Forward (W)	5'-GGG ATG GGA AAG GTG CCT C-3'	۶۲/۱
C23237T	Reverse	5'-TGT AAC CAT TTC CTC CCC TG-3'	۵۴/۲

نتایج

PCR ژن Cyp3A4 (C23237T): در این مرحله با استفاده از این پرایمرها و DNA بدست آمده از خون افراد سالم، حضور قطعه تکثیری (C23237T) بررسی شد و نتایج حضور یک باند معادل ۲۳۰ جفت باز را نشان داد. شکل ۱ پلی‌مورفیزم Cyp3a4(C23237T) را نشان می‌دهد.

فراوانی ژنی پلی‌مورفیزم (C23237T) از نظر سن: در جمعیت مورد نظر، ۶۳ نفر حالت هتروزیگوت ژنوتیپ جهش یافته CT بودند که فراوانی آن ۶۱/۱۶ درصد بوده است (جدول ۳، نمودار ۱). همچنین

جامعه آماری: ۴۸/۵۴ درصد افراد مونث، ۳۶/۸۹ درصد افراد مذکر و ۱۴/۵۶ درصد هم فاقد هویت بودند. ۲/۹۱ درصد بین ۷ ماه تا ۹ سال، ۸/۷۳ درصد بین ۱۰ تا ۱۹ سال، ۸/۷۳ درصد بین ۲۰ تا ۲۹ سال، ۶/۷۹ درصد بین ۳۰ تا ۳۹ سال، ۵/۸۲ درصد بین ۴۰ تا ۴۹ سال، ۳۹/۸۰ درصد بین ۵۰ تا ۵۹ سال، ۸/۷۳ درصد بین ۶۰ تا ۶۹ سال، ۲/۹۱ درصد بین ۷۰ تا ۷۹ سال و ۱۴/۵۶ نیز درصد فاقد هویت بودند (جدول ۲).

اختصاص داد (جدول ۵، نمودار ۲). درصد فراوانی ژنی پلی‌مورفیسم (C23237T) در هر گروه سنی نیز از نظر جنسیت بررسی و مشخص شد ارتباط معنی‌داری بین فراوانی ژنوتیپ و جنسیت افراد وجود ندارد ($p = 0/845$) (جدول ۶ و ۷).

بررسی آللی C و T در جمعیت مورد مطالعه: برای

بررسی فراوانی آللی C و T از فرمول زیر استفاده شد:

$$C \text{ فراوانی آللی} = \frac{GT \text{ تعداد} + (CC \times 2) \text{ تعداد}}{2 \times \text{تعداد کل}} \times 100$$

$$T \text{ فراوانی آللی} = \frac{CT \text{ تعداد} + (TT \times 2) \text{ تعداد}}{2 \times \text{تعداد کل}} \times 100$$

نتایج نشان داد که در جمعیت مورد مطالعه در کل جمعیت ۱۰۳ نفری، فراوانی افراد دارای ژنوتیپ CC ۱۹ نفر بوده که از این تعداد ۱۱ نفر دارای جنسیت مونث، ۵ نفر دارای جنسیت مذکر و ۳ نفر هم فاقد هویت بود. همچنین در جمعیت مورد مطالعه ۱۴ نفر دارای ژنوتیپ TT بوده که از این تعداد ۵ نفر دارای جنسیت مونث، ۸ نفر دارای جنسیت مذکر و ۱ نفر فاقد هویت بودند. فراوانی ژنوتیپ AG در کل جمعیت ۶۳ نفر می‌باشد که ۳۳ نفر دارای جنسیت مونث، ۲۲ نفر دارای جنسیت مذکر و ۸ نفر هم فاقد هویت بودند. همچنین در کل جمعیت مورد مطالعه، ۷ نفر فاقد آلل C و T بودند (جدول ۸).

درصد فراوانی ژنوتیپ‌های C و T در هر گروه سنی نیز محاسبه شد (جدول ۴). نتایج بررسی رابطه بین میزان فراوانی ژنوتیپ‌ها و سن افراد در جدول ۵ آمده است. از آنجا که $p = 0/801$ بدست آمد بین فراوانی ژنوتیپ و سن افراد ارتباط معنی‌داری وجود ندارد.

فراوانی ژنی پلی‌مورفیسم (C23237T) از نظر

جنسیت: در جمعیت مورد مطالعه ۵۰ نفر مونث و ۳۸ نفر مذکر بودند که فراوانی آللی پلی‌مورفیسم (C23237T) در مورد جنس مونث نشان داد که، ۳۳ نفر دارای ژنوتیپ هتروزیگوت با درصد فراوانی ۶۶ درصد، ۱۱ نفر دارای ژنوتیپ هموزیگوت غالب با درصد فراوانی ۲۲ درصد، ۵ نفر دارای ژنوتیپ هموزیگوت مغلوب با درصد فراوانی ۱۰ درصد و ۱ نفر فاقد جهش با درصد فراوانی ۲ درصد بودند. بررسی فراوانی آللی پلی‌مورفیسم (C23237T) در مورد جنس مذکر نشان داد که ۲۲ نفر دارای ژنوتیپ هتروزیگوت با فراوانی ۵۷/۸۹ درصد، ۵ نفر دارای ژنوتیپ هموزیگوت غالب با درصد فراوانی ۱۳/۱۵ درصد، ۸ نفر دارای ژنوتیپ هموزیگوت مغلوب با درصد فراوانی ۲۱/۰۵ درصد و ۳ نفر فاقد جهش با درصد فراوانی ۷/۸۹ درصد بودند. از نظر جنسیت هم در جنس مونث و هم در جنس مذکر ژنوتیپ هتروزیگوت بالاترین درصد فراوانی را به خود





شکل ۱- DNA تکثیر یافته ژن Cyp3a4(C23237T) در افراد سالم روی ژل آگارز ۱/۵ درصد محصول ARMS-PCR. ردیف‌های ۱، ۲، ۴، ۷، ۸، ۱۰ دارای ژنوتیپ TT (هموزیگوت مغلوب) هستند. ردیف‌های ۵، ۶ و ۹ دارای ژنوتیپ CT (هتروزیگوت) می‌باشند. ردیف ۳ دارای ژنوتیپ CC می‌باشد. M خط‌کش مولکولی ۱۰۰bp است. طول قطعه تکثیر شده ۲۳۰bp می‌باشد.

جدول ۲- آمار توصیفی مربوط به هر گروه سنی مورد مطالعه

گروه سنی (سال)	تعداد	درصد گروه سنی	مونث (نفر)	مذکر (نفر)
۷ ماه تا ۹ سال	۳	۲/۹۱	۲	۱
۱۰-۱۹	۹	۸/۷۳	۵	۴
۲۰-۲۹	۹	۸/۷۳	۶	۳
۳۰-۳۹	۷	۶/۷۹	۵	۲
۴۰-۴۹	۴۱	۳۹/۸۰	۲۵	۱۷
۵۰-۵۹	۷	۶/۷۹	۲	۵
۶۰-۶۹	۹	۸/۷۳	۵	۴
۷۰-۷۹	۳	۲/۹۱	۱	۲
نامشخص	۱۵	۱۴/۵۶	-	-

جدول ۳- ژنوتیپ‌ها و درصد فراوانی ژنی پلی‌مورفیسم (C23237T) در جمعیت مورد مطالعه

نوع ژنوتیپ	تعداد در کل افراد مورد بررسی	درصد در کل افراد مورد بررسی
ژنوتیپ CT (هتروزیگوت)	۶۳	۶۱/۱۶
ژنوتیپ CC (هموزیگوت غالب)	۱۸	۱۷/۴۷
ژنوتیپ TT (هموزیگوت مغلوب)	۱۴	۱۳/۶۱
فاقد جهش	۸	۷/۷۶
جمع	۱۰۳	۱۰۰

جدول ۴- ژنوتیپ‌ها و درصد فراوانی ژنی پلی‌مورفیسم (C23237T) در هر گروه سنی مورد مطالعه

گروه سنی (سال)	تعداد	ژنوتیپ CT (هتروزیگوت)	ژنوتیپ CC (هموزیگوت غالب)	ژنوتیپ TT (هموزیگوت مغلوب)	فاقد جهش
۷ ماه تا ۹ سال	۳	۳۳/۳۳	۶۶/۶۶	-	-
۱۰-۱۹	۹	۶۶/۶۶	-	۳۳/۳۳	-
۲۰-۲۹	۹	۳۳/۳۳	۲۲/۲۲	۳۳/۳۳	۱۱/۱۱
۳۰-۳۹	۷	۸۵/۷۱	۱۴/۲۸	-	-
۴۰-۴۹	۴۱	۶۶/۶۶	۱۶/۶۶	۱۶/۶۶	-
۵۰-۵۹	۷	۷۱/۴۲	۱۴/۲۸	۱۴/۲۸	-
۶۰-۶۹	۹	۵۵/۵۵	۲۲/۲۲	۱۱/۱۱	۱۱/۱۱
۷۰-۷۹	۳	۶۶/۶۶	۳۳/۳۳	-	-

جدول ۵- ژنوتیپ‌ها و درصد فراوانی ژنی پلی‌مورفیسم (C23237T) در جمعیت مورد مطالعه از نظر جنسیت

جنسیت/نوع ژنوتیپ	ژنوتیپ CT (هتروزیگوت)	ژنوتیپ CC (هموزیگوت غالب)	ژنوتیپ TT (هموزیگوت مغلوب)	فاقد جهش
مونث	درصد ۶۶ (نفر ۳۳)	درصد ۲۲ (نفر ۱۱)	درصد ۱۰ (نفر ۵)	۲ درصد (نفر ۱)
مذکر	درصد ۵۷/۸۹ (نفر ۲۲)	درصد ۱۳/۱۵ (نفر ۵)	درصد ۲۱/۰۵ (نفر ۸)	۷/۸۹ درصد (نفر ۳)

جدول ۶- ژنوتیپ‌ها و درصد فراوانی ژنی پلی‌مورفیسم (C23237T) در جنس مونث در هر گروه سنی

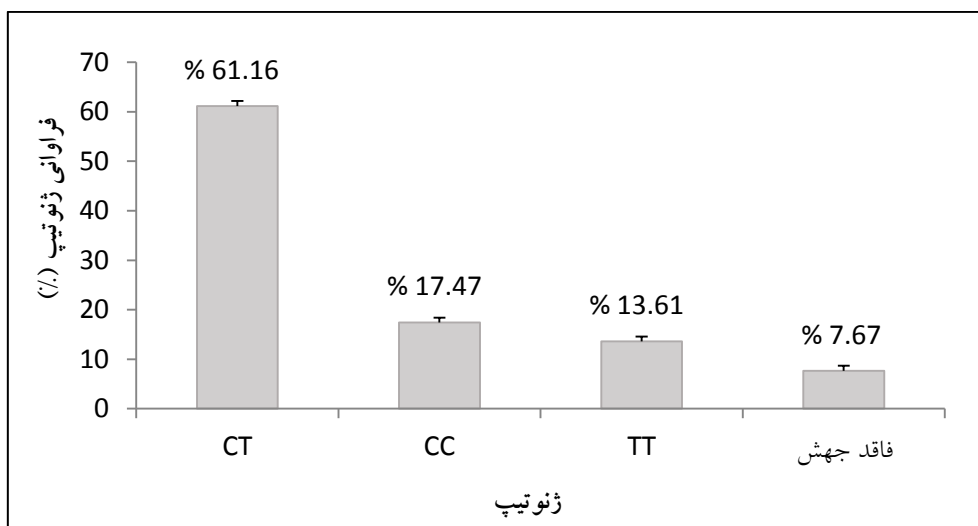
گروه سنی	تعداد	مونث (نفر)	ژنوتیپ CT (هتروزیگوت)	ژنوتیپ CC (هموزیگوت غالب)	ژنوتیپ TT (هموزیگوت مغلوب)	فاقد جهش
۷ ماه تا ۹ سال	۳	۲	۵۰	۵۰	-	-
۱۰-۱۹	۹	۵	۸۰	-	۲۰	-
۲۰-۲۹	۹	۶	۳۳/۳۳	۳۳/۳۳	۳۳/۳۳	-
۳۰-۳۹	۷	۵	۸۰	۲۰	-	-
۴۰-۴۹	۴۱	۲۵	۳۳/۳۳	۳۳/۳۳	۳۳/۳۳	-
۵۰-۵۹	۷	۲	۱۰۰	-	-	-
۶۰-۶۹	۹	۵	۶۰	۴۰	-	-
۷۰-۷۹	۳	۱	-	۱۰۰	-	-

جدول ۷- ژنوتیپ‌ها و درصد فراوانی ژنی پلی‌مورفیسم (C23237T) در جنس مذکر در هر گروه سنی

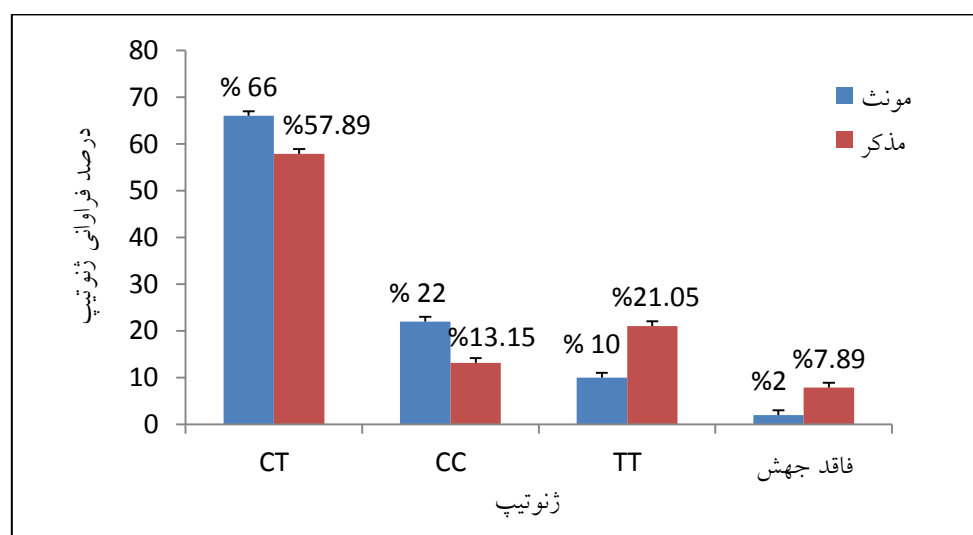
گروه سنی	تعداد	مذکر (نفر)	ژنوتیپ CT (هتروزیگوت)	ژنوتیپ CC (هموزیگوت غالب)	ژنوتیپ TT (هموزیگوت مغلوب)	فاقد جهش
۹-۷ ماه	۳	۱	-	۱۰۰	-	-
۱۰-۱۹	۹	۴	۵۰	-	۵۰	-
۲۰-۲۹	۹	۳	-	-	۶۶/۶۶	۳۳/۳۳
۳۰-۳۹	۷	۲	۱۰۰	-	-	-
۴۰-۴۹	۴۱	۱۷	۱۰۰	-	-	-
۵۰-۵۹	۷	۳	۶۰	۲۰	۲۰	-
۶۰-۶۹	۹	۴	۵۰	-	۲۵	۲۵
۷۰-۷۹	۳	۲	۱۰۰	-	-	-

جدول ۸- درصد فراوانی آللی T و C در جمعیت مورد مطالعه

جنسیت/نوع آلل	درصد فراوانی آللی C	درصد فراوانی آللی T
کل جمعیت	۴۹/۰۲	۴۴/۱۷
مونث	۲۶/۶۹	۲۰/۸۷
مذکر	۱۵/۵۳	۱۸/۴۴
فاقد هویت	۶/۷۹	۴/۸۵



نمودار ۲- نمودار نتایج درصد فراوانی ژنوتیپ (C23237T) در جمعیت مورد مطالعه



نمودار ۳- درصد فراوانی ژنوتیپ (C23237T) در جمعیت مورد مطالعه از نظر جنسیت

بحث

سال، ۹ نفر (۸/۷۳ درصد) بین ۶۰ تا ۶۹ سال، ۳ نفر (۲/۹۱ درصد) بین ۷۰ تا ۷۹ سال و ۱۵ نفر (۱۴/۵۶ درصد) فاقد هویت بودند. نتایج بیانگر این بود که هر دو پلی‌مورفیسم از نظر سن و جنسیت در افراد سالم غرب مازندران تفاوت معنی‌داری در سطح ۹۵ درصد نشان نمی‌دهند. در مورد پلی‌مورفیسم‌های این ژن مطالعاتی در جمعیت‌های مختلف جهان صورت گرفته که برخی ارتباط با بیماری‌ها را تایید و برخی تکذیب کرده‌اند. اسپوردل و همکارانش نشان دادند پلی-

در این مطالعه ۱۰۳ نمونه از افراد مذکر و مؤنث مورد بررسی قرار گرفتند که ۴۸/۵۴ درصد آنها افراد مؤنث، ۳۶/۸۹ درصد آنها افراد مذکر و ۱۴/۵۶ درصد هم دارای هویت نامشخص بودند. سن افراد مورد مطالعه به این صورت بود که ۳ نفر (۲/۹۱ درصد) بین ۷ ماه تا ۹ سال، ۹ نفر (۸/۷۳ درصد) بین ۱۰ تا ۱۹ سال، ۹ نفر (۸/۷۳ درصد) بین ۲۰ تا ۲۹ سال، ۷ نفر (۶/۷۹ درصد) بین ۳۰ تا ۳۹ سال، ۶ نفر (۵/۸۲ درصد) بین ۴۰ تا ۴۹ سال، ۴۱ نفر (۳۹/۸۰ درصد) بین ۵۰ تا ۵۹

انسانی می‌باشد. همچنین تاکشیتا و همکاران نشان دادند میتوتان سطوح mRNA cyp3a4 و فعالیت آنزیم cyp3a4 را افزایش می‌دهد. میتوتان می‌تواند موجب بیان ژن cyp3a4 شود و در اثرات دارویی متقابل احتیاط مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۰).

فلوریانو-سانچز و همکارانش طی پژوهشی متوجه شدند که در نواحی ترش‌حی افراد مبتلا به سرطان سینه بیان بسیار بالای cyp3a4 نسبت به بافت سالم آنها وجود دارد. همچنین وابستگی قابل توجهی بین بیان پروتئین با سیگار کشیدن، اعتیاد به الکل و استفاده وسایل هورمونی جلوگیری از بارداری مشاهده نمودند (۱۱). در تحقیق دیگری که توسط حسانی و نصیری انجام شد، هومولوژی و منطقه عملکردی ژن‌های CYP3A4 و CYP2D6 در انسان، گاو و مرغ مطالعه شد. ابتدا توالی ژن‌ها و پروتئین‌های رفرنس مربوط به CYP3A4 و CYP2D6 که در پایگاه داده‌ای مرکز ملی بیوتکنولوژی داده‌ها وجود دارد، برای انسان، گاو و مرغ بازیابی و Blast انجام شد. نتایج نشان داد که رونوشت ژن CYP3A4 در مرغ و گاو با رونوشت ژن CYP3A22 در شتر به ترتیب ۳۳ و ۵۸ درصد و رونوشت ژن CYP2D6 مربوط به گاو با سه رونوشت مختلف از همین ژن در انسان به ترتیب ۸۳ و ۸۴ درصد و با رونوشت CYP2D14 در شتر ۵۶ درصد شباهت داشتند. همچنین نتایج نشان داد که دو ژن CYP3A4 و CYP2D6 در سه گونه دارای ارتباط تکاملی بوده و در بخش‌های عملکردی میزان شباهت و حفاظت بازها در توالی نوکلئوتیدی و توالی‌های پروتئینی، معنی‌دار می‌باشد (۲۰).

تنوع ژنتیکی در ژن CYP4A3 و ارتباط آن با بیماری دیابت نوع دو در جمعیت استان سیستان و بلوچستان بررسی شد. تفاوت معنی‌داری در سطح توالی نوکلئوتیدی در ژن CYP3A4 در نمونه‌های DNA بیماران دیابتی نوع دو نسبت به نمونه‌های سالم

مورفیسیم CYP3A4*1B هیچ اهمیت عملکردی ندارد و با خطر سرطان سینه یا تخمدان مرتبط نیست (۲۸) در حالی که آسیس و همکارانش نشان دادند تعیین نمودار فعالیت cyp3a4 می‌تواند به عنوان مارکر مولکولی برای پیش‌بینی پیامد کلینکی بیماران مبتلا به سرطان سرورزی تخمدان، مفید باشد (۱). همچنین طی مطالعه دیگری مشخص شده پلی‌مورفیسیم‌های CYP3A4 عوامل خطر بالقوه برای سرطان سینه و پروستات هستند (۲۲، ۳۴). نتایج مطالعه دیگری نشان داده وجود پلی‌مورفیسیم در ژن CYP3A4 رابطه‌ی معناداری با ابتلای افراد به سرطان مثانه ندارد (۲۵). همچنین دالی و همکارانش نشان دادند آلل CYP3A4*1B خطر ابتلا به سرطان ریه سلول کوچک را افزایش می‌دهد (۷).

پلی‌مورفیسیم‌های ژنتیکی سیتوکروم‌های P450 شامل CYP2C9، CYP2C19 و CYP2D6 در یک جمعیت کرواسی بررسی و مشاهده شد که شیوع واریانت‌های آلی و ژنوتیپ‌های پیش‌بینی‌شده در جمعیت کرواسی مطابق با سایر جمعیت‌های اروپایی است و می‌توان آن را بین مقادیر جمعیت‌های اروپایی میانی و مدیترانه‌ای در نظر گرفت (۳).

لیو و همکارانش بر روی القای cyp3a4 توسط داروها مطالعه نموده و نتیجه گرفتند که سنجش ژن pxx روشی کامل و معتبر برای سنجش پتانسیل القایی cyp3a4 از داروها و دیگر زنوبیوتیک‌هاست (۲۴).

تاکشیتا و همکارانش نقش فرضی گیرنده هسته‌ای یتیم SXR (گیرنده استروئیدی و زنوبیوتیک) در مکانیسم مهار CYP3A4 توسط زنوبیوتیک‌ها را بررسی و نشان دادند که یک همبستگی معینی بین سطح کل mRNA در cyp3a4 و نسبت بیان آلی وجود دارد. این نشان-دهنده‌ی نگرشی نو به دارودرمانی فردی وابسته به cyp3a4 و اهمیت عدم تعادل بیانی تنوع فتوتیپ

نتیجه‌گیری

با بررسی فراوانی آللی و ژنوتیپی و بررسی ارتباط این پلی‌مورفیسم‌ها مشخص شد که بین پلی‌مورفیسم ژن Cyp3a4(C23237T) با سن افراد ($p = ۰/۸۱$) و با جنسیت افراد ($p = ۰/۸۴۵$) ارتباط معناداری وجود ندارد. نتیجه‌ی این تحقیق نشان می‌دهد که زنان و مردان در هر سنی به طور مساوی در خطر ابتلا به بیماری می‌باشند.

منابع

1. Assis J, Pereira D., Gomes M., Marques D., Marques I., Nogueira A., Catarino R., Medeiros R. 2013. Influence of CYP3A4 genotypes in the outcome of serous ovarian cancer patients treated with first-line chemotherapy: implication of a CYP3A4 activity profile. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 6(7):552-561.
2. Barnes H.J., Jenkins C.M., Waterman M.R. 1994. Baculovirus expression of bovine cytochrome P450c17 in Sf9 cells and comparison with expression in yeast, mammalian cells, and *E. coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315:489-494.
3. Bozina N., Granić P., Lalić Z., Tramisak I., Lovrić M., Stavljanić-Rukavina A. 2003. Genetic polymorphisms of cytochromes P450: CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 in Croatian population. *Croatian Medical Journal*, 44(4):425-428.
4. Bull L. 2013. Genetics, Mutations, and Polymorphisms. Landes Bioscience. Bookshelf ID: NBK6475.
5. Cavaco I., Piedade R., Gil P. 2006. Cyp2c8 polymorphism among the Portuguese. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44(2):168-170.
6. Dai D., Darryl C., Joyce A., Sherry J. 2001. Polymorphisms in human cyp2c8 decrease metabolisms of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics*, 11:597-607.

مشاهده نشد که عدم ارتباط پلی‌مورفیسم در ژن CYP3A4 با خطر بروز بیماری دیابت نوع دو را نشان داد (۱۸).

گلیستانیان و همکاران در ۱۳۹۶، ارتباط بین متیلاسیون ناحیه پروموتوری ژن cyp3a4 و بروز سرطان معده در استان مازندران بررسی کرده و نشان دادند که میزان متیلاسیون دی نوکلئوتیدهای ناحیه‌ی amp-8، در بافت سرطانی تفاوت آماری معنی‌داری نسبت به بافت سالم دارد (۱۴).

نتایج تحقیق دیگری نشان داد که پلی‌مورفیسم ژنتیکی و آللی سیتوکروم p450(2C19) در قوم ترکمن و فارس در ایران ممکن است با هم متفاوت باشد. این فراوانی‌ها با نتایج دیگر جمعیت‌های جهانی مقایسه شدند و مشخص شد که تفاوت قابل ملاحظه‌ای در بین برخی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های جمعیت‌های دیگر وجود دارد. این اختلافات احتمالاً نشان‌دهنده لزوم تغییرات در دوز دارویی با توجه به خاستگاه نژادی افراد می‌باشد و در انتخاب دوز دارویی مناسب برخی داروها و کاهش اثرات جانبی و سمیت‌زدایی آنها در جمعیت‌های مختلف کمک‌کننده می‌باشد (۱۲).

همچنین پلی‌مورفیسم‌های m1 و m2 ژن CYP1A1 و ارتباط آن با ابتلا به سرطان در غرب استان مازندران بررسی شد و نتایج نشان داد که حضور آلل C از پلی‌مورفیسم m1 و آلل G از پلی‌مورفیسم m2 ژن *CYP1A1* منجر به افزایش خطر ابتلا به سرطان در جمعیت مورد مطالعه می‌شود (۲۱).

با توجه به بررسی پیشینه‌ی تحقیق، مطالعه حاضر برای اولین بار در ایران انجام شده و از آنجا که Cyp3a4 و پلی‌مورفیسم‌های آن نقش مهمی در متابولیسم داروها و ترکیبات زنبوتیک دارد، مطالعات بیشتر برای شناسایی مکانیسم دقیق بیان این ژن ضروری به نظر می‌رسد.

- Pharmacology and Toxicology*, 104:130-137.
16. Hamzei H., Dastmalchi S. 2014. Analysis of the arrangement of three heterozygous mutations in human cyp3a4 female with long distances from each other. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(4):63-69.
17. Hashimoto H., Toide K., Kitamura R., Fujita M., Tagawa S., Itoh S., Kamataki T. 1993. Gene structure of CYP3A4, an adult-specific form of cytochrome P450 in human livers, and its transcriptional control. *European Journal of Biochemistry*, 218(2): 585-595.
18. Heydari Qaraei H., Rashki A., Bahari A., Rashki Ghaleno Z. 2017. Investigation of genetic variation in CYP3A4 gene and its relationship with type 2 diabetes in Sistan and Baluchistan province. *Diabetes Nursing*, 6(3):538-538.
19. Hojgard L., Zic Fuchs M., Gyllenberg M. 2012. Personalised Medicine for the European Citizen. European Science Foundation. www.esf.org.
20. Hosani J., Nasiri M. 2014. Homology and functional region prediction in CYP3A4 and CYP2D6 genes and their comparison in human, cow and chicken. International Conference on Research in Engineering, Science and Technology, <https://civilica.com/doc/398475>.
21. Hosseini S.S., Keyhanian S., Vosoughi E., Ahangar N. 2018. Polymorphisms of CYP1A1 Gene Variants m1 and m2 and Their Association with the Incidence of Cancer in West of Mazandaran Province, Iran. *Journal of Mazandaran University of Medical Science*, 28(165):57-68.
22. Keshava C., McCanlies E.C., Weston A. 2004. CYP3A4 polymorphisms--potential risk factors for breast and prostate cancer: a HuGE review. *American Journal of Epidemiology*, 160(9):825-41.
23. Lee S.J., Goldstein JA. 2005. Functionally defective or altered CYP3A4
7. Dally H., Edler L., Jäger B., Schmezer P., Spiegelhalder B., Dienemann H., Drings P., Schulz V., Kayser K., Bartsch H., Risch A. 2003. The CYP3A4*1B allele increases risk for small cell lung cancer: effect of gender and smoking dose. *Pharmacogenetics*, 13(10):607-18.
8. Danielson PB .2002. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Current Drug Metabolism*, 3:561-597.
9. Evans W.E., Relling M.V. 2004. Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature*, 429: 464-468.
10. Fintan R. 2009. personalized medicine: something old, something new. *Personalized Medicine*, 6:1-5.
11. Floriano-Sanchez E, Rodriguez NC, Bandala C, Coballase-Urrutia E, Lopez-Cruz J. 2014. CYP3A4 expression in breast cancer and its association with risk factors in Mexican women. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(8):3805-3809.
12. Ghias-Tabari R. 2012. Investigation of genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzyme (2C19) in Turkmen and Fars people. Master's Thesis in Clinical Biochemistry, Golestan University of Medical Sciences, 83 p.
13. Goldstein J.A. 2001. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 52: 349-355.
14. Golestanian R., Barzegar A., Rahimi Q., Ebrahimzadeh M.A. 2016. The relationship between methylation of the promoter region of the cyp3a4 gene and the occurrence of gastric cancer in Mazandaran province. International Conference on Agricultural Sciences, Medicinal Plants and Traditional Medicine.
15. Gréen H., Söderkvist P., Rosenberg P., Mirghani R.A. .2009. Pharmacogenetic studies of Paclitaxel in the treatment of ovarian cancer. *Basic Clinical*

28. Spurdle A.B., Goodwin B., Hodgson E., Hopper J.L., Chen X., Purdie D.M., McCredie M.R., Giles G.G., Chenevix-Trench G., Liddle C. 2002. The CYP3A4*1B polymorphism has no functional significance and is not associated with risk of breast or ovarian cancer. *Pharmacogenetics*, 12(5):355-66.
29. Such E., Cervera J., Terpos E. 2011. Cyp2c8 gene polymorphism and bisphosphate related osteonecrosis of jaw in patients with multiple myeloma. *Haematologica*, 96(10):1557-9.
30. Takeshita A., Igarashi-Migitaka J., Koibuchi N., Takeuchi Y. 2013. Mitotane induces CYP3A4 expression via activation of the steroid and xenobiotic receptor. *Jornal of Endocrinology*, 216:297-305.
31. Totah R.A., Rettie A.E. 2005. Cytochrome P450 2C8: substrates, inhibitors, pharmacogenetics, and clinical relevance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 77: 341-352.
32. Watkins P.B. 1994. Noninvasive tests of CYP3A enzymes. *Pharmacogenetics*, 4(4):171-184.
- and CYP3A5 single nucleotide polymorphisms and their detection with genotyping tests. *Pharmacogenomics*, 6(4):357-71.
24. Luo G., Cunningham M., Kim S., Burn T, Lin J., Sinz M., Hamilton G., Rizzo C., Jolley S., Gilbert D., Downey A., Mudra D., Graham R., Carroll K., Xie J., Madan A., Parkinson A., Christ D., Selling B., LeCluyse E., Gan L.S. 2002. CYP3A4 induction by drugs: correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(7):795-804.
25. Onsori K., Bakhtiari Tajar M., Haji Z., Nouri M. 2014. Investigation of genetic polymorphism of CYP3A4 gene in patients with bladder cancer. *Genetics in the Third Millennium*, 12(3): 3612-3621.
26. Paul R. 2015. Ortize Montellano Editor Cyto chrome P450. 4th edition. New York. Springer Cham Heidelberg Dordrecht London. 912 p.
27. Schork N.J., Fallin D., Lanchbury S. 2000. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clinical Genetics*, 58:250-264.

Investigating C23237T Polymorphism of Cyp3a4 Gene in Healthy People of West Mazandaran in Terms of Age and Gender

Fatemeh Heidarian¹, Vida Hojati^{1*}, Reza Golijani Moghadam^{2*}

1- Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

2- Department of Biology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran

Abstract

Cyp3a4 (cytochrome P450 3A4) is an important enzyme in the body that is mainly found in the liver and intestine. It oxidizes small foreign organic molecules such as poisons or drugs so that they can be removed from the body. Since not many studies have been done on the polymorphisms of this gene, this study was conducted to investigate the C23237T polymorphism of the Cyp3a4 gene in healthy male and female subjects aged 7 months to 79 years in the west of Mazandaran. In this research, whole blood was collected from healthy male and female individuals in the western cities of Mazandaran province. For each person, information about age, sex, family history, alcohol consumption and smoking was recorded. ARMS-PCR technique was used in this study. Data analysis was done using SPSS 2016 software and chi square test. There were 50 females and 38 males in the studied population. The results showed that in females, 33 people have a heterozygous genotype with a frequency of 66%, 11 people have a dominant homozygous genotype with a frequency of 22%, 5 people have a recessive homozygous genotype with a frequency of 10%, and 1 person has no mutation with a frequency of were 2 percent. In males, 22 people have heterozygous genotype with a frequency of 57.89%, 5 people have a dominant homozygous genotype with a frequency of 13.15%, 8 people have a recessive homozygous genotype with a frequency of 21.05% and 3 people have no mutation with a percentage of The frequency was 7.89%. In terms of gender, the heterozygous genotype had the highest frequency in both females and males. Also, there is no significant relationship between C23237T polymorphism of Cype3a4 gene with age ($p = 0.81$) and gender ($p = 0.845$).

Keywords: Polymorphism, Genotype, Gender, Cyp3a4, ARMS-PCR.

