

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی گرایش ژنتیک

ارتباط ژن‌های *CYP* متابولیزکننده مواد زئویوتیک با احتمال ابتلا به سرطان ریه

در جمعیت ایرانی

استاد راهنما:

دکتر مجید متولی‌باشی نائینی

استادان مشاور:

دکتر کیان خداداد

دکتر زهره حجتی نجف‌آبادی

پژوهشگر:

مصطفی بیگری

اسفند ماه ۱۳۸۹

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات
و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه اصفهان می باشد.



دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی گرایش ژنتیک
آقای مصطفی بیگلری تحت عنوان

ارتباط ژن‌های CYP متابولیز کننده مواد زنبویوتیک با احتمال ابتلا به سرطان ریه
در جمعیت ایرانی

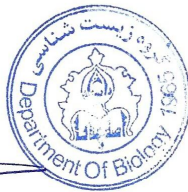
در تاریخ ۱۹/۱۲/۱۴۰۱ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

امضاء
امضاء
امضاء
امضاء
امضاء
امضاء

- ۱- استاد راهنمای پایان نامه دکتر مجید متولی‌باشی با درجه علمی استادیار
- ۲- استاد مشاور پایان نامه دکتر کیان خداداد با درجه علمی استادیار
- ۳- استاد مشاور پایان نامه دکتر زهره حجتی با درجه علمی استادیار
- ۴- استاد داور داخل گروه دکتر منوچهر توسلی با درجه علمی دانشیار
- ۵- استاد داور خارج گروه دکتر معراج پورحسین با درجه علمی استادیار

امضای مدیر گروه
دکتر سید جمال مشتاقیان

سید جمال مشتاقیان



چکیده

سرطان ریه یکی از رایج‌ترین سرطان‌ها می‌باشد که در هر سال بیش از یک میلیون مرگ و میر به جای می‌گذارد. قرار گرفتن در معرض کارسینوژن‌ها از جمله هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) و نیتروزامین‌ها که به طور عمده در دود سیگار یافت می‌شود، می‌تواند سبب القا سرطان ریه شود. کارسینوژن‌های محیطی مانند آزبوت، پرتوهای یونیزان و غبار سیلیسی نیز می‌تواند باعث سرطان ریه شود. استعمال سیگار عمده‌ترین عامل موثر در سرطان ریه است و در حدود ۹۰-۸۵ درصد مرگ‌های ناشی از سرطان ریه به علت سیگار می‌باشد. دود سیگار حاوی چندین هزار ترکیب خطرناک از جمله بیش از ۶۰ ماده کارسینوژن شناخته شده است. با این وجود تنها ده درصد از کسانی که به مدت طولانی سیگار می‌کشند، به سرطان ریه مبتلا می‌شوند. این یافته بیانگر این نکته است که ریسک فاکتورهای محیطی از جمله دود سیگار، آزبوت و ... ممکن است تحت تاثیر فاکتورهای ژنتیکی مختلف قرار گیرند.

گروهی از آنزیم‌های متابولیزه کننده مواد زنبیوتیک، آنزیم‌های سیتوکروم P450 می‌باشند که در متابولیسم انواع متعددی از ترکیبات شیمیایی درون‌زاد و برون‌زاد شامل کارسینوژن‌ها و داروها دخالت دارند و طیف وسیعی از سوبستراها شامل هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای را اکسیده و به پروکارسینوژن‌های فوق‌العاده قوی تبدیل می‌کنند. بعضی از آنزیم‌های وابسته به CYP450 دارای پلی‌مورفیسم ژنتیکی در جمعیت‌های معین می‌باشند و استعداد ژنتیکی ابتلا به بدخیمی توسط ژنوتیپ آنزیم تحت تاثیر قرار می‌گیرد. از جمله این آنزیم‌ها می‌توان به ایزوزیم‌های CYP1A1 و CYP1B1 اشاره نمود. CYP1A1 آنزیم اصلی موثر در متابولیسم هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای می‌باشد. آنزیم CYP1B1 نیز نقش مهمی در اکسیداسیون انواع متعددی از مواد کارسینوژن شامل PAHs و آریل آمین‌ها دارد و این ژن در ریه بیان می‌شود.

چندین پلی‌مورفیسم در ژن *CYP1A1* شناخته شده است که بعضی از آنها با افزایش ریسک سرطان ریه ارتباط دارند. پلی‌مورفیسم *CYP1A1 MspI* در ناحیه بدون رمز ۳' به علت یک تغییر از تیمین به سیتوزین در نوکلئوتید ۶۲۳۵ یک جایگاه برش برای آنزیم *MspI* ایجاد کرده و با افزایش ریسک سرطان ریه مرتبط است. پلی‌مورفیسم مذکور، پلی‌مورفیسم *MspI* هم نامیده می‌شود. در ژن *CYP1B1* نیز یک پلی‌مورفیسم معمول وجود دارد که به علت تغییر سیتوزین به گوانین در نوکلئوتید ۴۲۳۶ سبب تغییر اسید آمینه لوسین به والین در کدون ۴۳۲ (*CYP1B1* L432V) می‌شود. در این پلی‌مورفیسم آلل C با افزایش فعالیت آنزیم و افزایش ریسک سرطان ریه همراه است.

مطالعات اخیر حاکی از نقش بارز پلی‌مورفیسم‌های *CYP1A1 MspI* و *CYP1B1 L432V* در تشدید متابولیسم کارسینوژن‌های شیمیایی و افزایش ریسک سرطان ریه می‌باشد. بنا بر اهمیت موضوع و با توجه به تحقیقات انجام شده، بررسی رابطه احتمالی این دو پلی‌مورفیسم با سرطان ریه با استفاده از تکنیک RFLP-PCR در جمعیت ایرانی ضروری به نظر می‌رسد. به منظور نیل به این هدف، نمونه‌های خون ۶۵ بیمار مبتلا به سرطان ریه از مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماریه‌های ریوی (بیمارستان دکتر مسیح دانشوری) تهران جمع‌آوری شدند. نمونه‌های خون ۸۰ فرد سالم نیز از کسانی که برای برای پیگیری آزمایشات معمولی توسط پزشک به آزمایشگاه ارجاع داده شده بودند، تهیه گردید. جهت استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های خون تام تهیه شده، از روش نمکی میلر با مقداری

دستکاری و تغییرات پروتکل مذکور استفاده گردید. دو جفت پرایمر اختصاصی برای بررسی پلی مورفیسم‌های یاد شده طراحی و تکثیر DNA با این پرایمرها و DNA ژنومی استخراج شده از نمونه‌های خون، با برنامه‌ریزی توسط دستگاه‌های PCR ترموسایکلر انجام شد. بعد از اتمام PCR، محصولات PCR جداگانه با آنزیم‌های *MspI* و *AclI* تحت تاثیر هضم آنزیمی قرار گرفته و بر روی ژل ۱ درصد آگارز از هم جدا شدند. در پایان برای آنالیز آماری نتایج از آزمون χ^2 به منظور بررسی اختلاف میان توزیع ژنوتیپی در گروه‌های مختلف بیماران و افراد سالم استفاده شد. همانطور که انتظار می‌رفت، تعداد افراد سیگاری در جمعیت بیمار بیشتر از جمعیت شاهد بوده و تفاوت معنی‌داری در استعمال سیگار در بین دو جمعیت مشاهده شد. این یافته مؤید نتایج حاصل از مطالعات گذشته درباره نقش سیگار در القاء سرطان ریه بوده و اثبات کرد که دود سیگار مهمترین عامل خطر در ابتلا به سرطان ریه است. همچنین بررسی ارتباط استعمال سیگار با انواع هیستولوژیکی سرطان ریه نشان داد که با وجود فراوانی بیشتر آدنوکارسینوما، سرطان سلول کوچک ریه رابطه بیشتری با استعمال سیگار داشته، به نحوی که نسبت به آدنوکارسینوما، درصد زیادتری از افراد سیگاری به سرطان سلول کوچک ریه مبتلا می‌شوند.

بررسی توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های (*CYP1A1* (6235 T→C) در بین دو جمعیت بیمار و شاهد نشان داد که ریسک ابتلا به سرطان ریه در افراد حامل ژنوتیپ هتروزیگوس TC سه برابر بیش از افراد هتروزیگوت TT است و شانس رشد و گسترش سرطان ریه با آلل C مرتبط است. در این پلی مورفیسم هیچ فردی با ژنوتیپ CC وجود نداشت که نشانه کم بودن فراوانی آلل C در جمعیت ایرانی است. تفاوت دو جمعیت بیمار و شاهد در توزیع ژنوتیپ‌های (*CYP1B1* L432V (4326 C→G)، با وجود فراوانی بیشتر ژنوتیپ CC در جمعیت بیمار معنی‌دار نبود اما بررسی میانگنش این ژن با سیگار در جمعیت بیمار نشان داد که بر حسب استعمال سیگار تفاوت معنی‌داری در توزیع ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم L432V در افراد بیمار وجود دارد و افراد سیگاری واجد دو آلل Lue432 (ژنوتیپ CC)، در مقایسه با افراد سیگاری دارای دو آلل 432Val (ژنوتیپ GG) افزایش معنی‌داری برای ابتلا به سرطان ریه وجود دارد. بررسی میانگنش پلی مورفیسم‌های ژن‌های فوق با مدت زمان استعمال سیگار، سن شروع مصرف دخانیات و تعداد نخ سیگارهای مصرف شده از نکات مهمی هستند که به منظور تصدیق رابطه پلی مورفیسم‌های مذکور با استعداد روزافزون ابتلا به سرطان ریه مورد توجه می‌باشند.

کلمات کلیدی: سرطان ریه، سیتوکروم P450، RFLP-PCR، DNA adducts، کارسینوژن، هیدروکربن‌های آروماتیک
چند حلقه ای PAHs.

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل اول: مقدمه

| | | |
|---------|---|----|
| ۱-۱ | زنوبیوتیک ها | ۱ |
| ۲-۱-۱ | کارسینوژن های موجود در دود سیگار | ۲ |
| ۳-۱-۱ | هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای | ۳ |
| ۲-۱ | متابولیسم زنوبیوتیک ها | ۳ |
| ۳-۱ | سیتوکروم های P450 | ۵ |
| ۱-۳-۱ | تاریخچه شناسایی آنزیم های سیتوکروم P450 | ۵ |
| ۲-۳-۱ | نامگذاری و طبقه بندی سیتوکروم های P450 | ۶ |
| ۳-۳-۱ | ساختار مولکولی آنزیم های CYP450 | ۷ |
| ۴-۳-۱ | بیوشیمی آنزیم های CYP450 | ۹ |
| ۴-۱ | سیتوکروم های P450 (CYPs) انسانی | ۹ |
| ۱-۴-۱ | تنوع ژنتیکی در ژن های CYP انسانی | ۱۰ |
| ۲-۴-۱ | زیر خانواده CYP1A | ۱۱ |
| ۱-۲-۴-۱ | ژن CYP1A1 | ۱۱ |
| ۳-۴-۱ | ژن CYP1B1 | ۱۵ |
| ۵-۱ | تنظیم بیان آنزیم های CYP متابولیزه کننده مواد زنوبیوتیک | ۱۷ |
| ۶-۱ | فعال شدن کارسینوژن های سیگار | ۱۹ |
| ۷-۱ | القاء آسیب توسط ضمام کارسینوژن - DNA | ۲۲ |
| ۱-۷-۱ | نقاط داغ جهش | ۲۴ |
| ۲-۷-۱ | ترمیم ضمام کارسینوژن - DNA | ۲۵ |
| ۸-۱ | سرطان ریه | ۲۶ |
| ۱-۸-۱ | شاخص های ریسک سرطان ریه | ۲۸ |
| ۹-۱ | اهداف پایان نامه | ۲۸ |

فصل دوم: مواد و روش ها

| | | |
|-----|-------------------------|----|
| ۱-۲ | دستگاه های مورد استفاده | ۳۰ |
| ۳-۲ | مواد استفاده شده | ۳۱ |

| | | |
|-----------|---|----|
| ۳-۲ | تهیه نمونه | ۳۲ |
| ۴-۲ | شیوه استریل نمودن وسایل آزمایشگاهی | ۳۲ |
| ۵-۲ | استخراج DNA | ۳۲ |
| ۱-۵-۲ | مواد لازم جهت استخراج DNA از نمونه های خون | ۳۲ |
| ۲-۵-۲ | طرز تهیه انواع محلولهای استخراج DNA ژنومی | ۳۳ |
| ۱-۲-۵-۲ | روش تهیه Tris-Hcl | ۳۴ |
| ۱-۲-۲-۵-۲ | روش تهیه اتیلن دی آمینو تتراستیک اسید (EDTA) | ۳۴ |
| ۳-۲-۵-۲ | محلول کلوروسدیم ۶ مولار (NaCl, 6M) | ۳۴ |
| ۴-۲-۵-۲ | محلول تریس - اتیلن دی آمین تتراستیک (TE) | ۳۴ |
| ۳-۵-۲ | روش استخراج DNA از نمونه های خون | ۳۵ |
| ۶-۲ | پرایمرهای مورد استفاده و نحوه طراحی آنها | ۳۶ |
| ۱-۶-۲ | طراحی پرایمرهای لازم برای مطالعه پلی مورفیسم <i>CYP1A1*2A</i> | ۳۶ |
| ۲-۶-۲ | طراحی پرایمر و مطالعه پلی مورفیسم <i>CYP1B1 L432V</i> | ۳۷ |
| ۷-۲ | تکنیک PCR | ۳۹ |
| ۱-۷-۲ | محلول های مورد نیاز برای PCR | ۳۹ |
| ۲-۷-۲ | روش انجام تکنیک PCR | ۳۹ |
| ۸-۲ | الکتروفورز DNA | ۴۰ |
| ۱-۸-۲ | مواد و محلول های مورد نیاز جهت انجام الکتروفورز | ۴۰ |
| ۱-۱-۸-۲ | بافر TBE | ۴۰ |
| ۲-۱-۸-۲ | ژل آگارز | ۴۱ |
| ۳-۱-۸-۲ | اتیدیوم بروماید | ۴۱ |
| ۴-۱-۸-۲ | مارکر DNA | ۴۲ |
| ۵-۱-۸-۲ | لودینگ بافر | ۴۲ |
| ۶-۱-۸-۲ | الکتروفورز | ۴۲ |
| ۹-۲ | تکنیک PCR-RFLP | ۴۳ |
| ۱-۹-۲ | هضم آنزیمی محصولات PCR | ۴۳ |
| ۲-۹-۲ | روش انجام PCR-RFLP | ۴۳ |

| | |
|--|----|
| ۱۰-۲ الکتروفورز نمونه های هضم آنزیمی | ۴۴ |
| ۱-۱۰-۲ نتایج الکتروفورز نمونه ها | ۴۵ |
| ۱۱-۲ آنالیز باندهای حاصل از RFLP با استفاده از نرم افزار Image J | ۴۶ |
| ۱۲-۲ آنالیزهای آماری | ۴۶ |
| ۱-۱۲-۲ محاسبه فراوانی آلل های T/C و C/G | ۴۷ |
| ۲-۱۲-۲ آزمون χ^2 | ۴۷ |

فصل سوم: یافته‌ها و مشاهدات

| | |
|--|----|
| ۱-۳ استخراج DNA ژنومی از خون محیطی و بررسی خلوص آن | ۴۹ |
| ۲-۳ تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از تکنیک PCR | ۵۰ |
| ۳-۳ تکنیک RFLP-PCR | ۵۲ |
| ۱-۳-۳ تکنیک RFLP-PCR با استفاده از آنزیم <i>HpaII (MspI)</i> | ۵۲ |
| ۲-۳-۳ تکنیک RFLP-PCR با استفاده از آنزیم <i>EcoR571 (AclI)</i> | ۵۴ |
| ۴-۳ آنالیز نتایج RFLP با استفاده از نرم‌افزار Image J | ۵۵ |
| ۵-۳ آنالیز آماری نتایج | ۵۶ |
| ۱-۵-۳ مشخصات افراد شاهد و بیمار | ۵۷ |
| ۲-۵-۳ بررسی پلی‌مورفیسم <i>CYP1A1 MspI</i> در نمونه‌های بیماران سرطان ریه و شاهد | ۵۹ |
| ۳-۵-۳ بررسی میانکنش سیگار و ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم <i>CYP1A1 MspI</i> | ۶۱ |
| ۴-۵-۳ بررسی پلی‌مورفیسم <i>CYP1B1 L432V</i> در نمونه‌های بیماران سرطان ریه و افراد شاهد | ۶۱ |
| ۵-۵-۳ بررسی رابطه استعمال سیگار با ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم <i>CYP1B1 L432V</i> در بیماران سرطان ریه | ۶۳ |

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

| | |
|---|----|
| ۱-۴ اهمیت مطالعه سرطان ریه | ۶۴ |
| ۱-۱-۴ بررسی نقش پلی‌مورفیسم <i>CYP1A1 MspI</i> در سرطان ریه | ۶۵ |
| ۲-۱-۴ بررسی نقش پلی‌مورفیسم <i>CYP1B1 L432V (4326 C→G)</i> در سرطان ریه | ۶۶ |
| ۲-۴ بررسی نتایج مطالعه حاضر و مقایسه آن با پژوهش‌های گذشته | ۶۶ |
| ۱-۲-۴ میانکنش سیگار با انواع بافتی سرطان ریه | ۶۶ |

عنوان

صفحه

| | |
|---------|--|
| ۶۷..... | ۲-۲-۴ نقش پلی مورفیسم <i>CYP1A1 MspI</i> در سرطان ریه |
| ۶۷..... | ۳-۲-۴ نقش پلی مورفیسم <i>CYP1B1 L432V</i> در سرطان ریه |
| ۶۹..... | ۳-۴ نتیجه گیری کلی |
| ۷۰..... | ۵-۴ اهداف آینده |
| ۷۲..... | منابع و مآخذ |

فهرست شکل ها

صفحه

عنوان

- شکل ۱-۱ ساختار اولیه پروتئین‌های P450 متصل به رتیکولوم اندوپلاسمیک ۸
- شکل ۲-۱: نقشه ژن *CYP1A1* انسانی ۱۴
- شکل ۳-۱: ساختار ژن و محل پلی مورفیسم‌های ژن *CYP1B1* ۱۷
- شکل ۴-۱: تنظیم بیان آنزیم‌های CYP به وسیله AHR ۱۸
- شکل ۵-۱: متابولیسم بنزوپیرین ۲۰
- شکل ۶-۱: راه‌های تشکیل متابولیت‌های فعال دیول اپوکسید بنزوپیرین ۲۱
- شکل ۷-۱: جایگاه‌های اتصال کارسینوژن‌ها به بازهای DNA ۲۲
- شکل ۸-۱: تشکیل ضنائم اگزوسیكلیک ۲۳
- شکل ۹-۱: نقش سیگار در سرطان ریه ۲۷
- شکل ۱-۲: توالی مورد نظر، جایگاه پلی مورفیسم و محل اتصال پرایمرهای F1 و R1 ۳۷
- شکل ۲-۲: توالی مورد نظر، جایگاه پلی مورفیسم و محل اتصال پرایمرهای F2 و R2 ۳۸
- شکل ۱-۳: ژل آگارز الکتروفورز نمونه‌های استخراج DNA ۵۰
- شکل ۲-۳: الکتروفورز تفکیک محصولات تکثیر شده با پرایمرهای F1 و R1 بر روی ژل آگارز ۱ درصد ۵۱
- شکل ۳-۳: تفکیک محصولات تکثیر شده با پرایمرهای F2 و R2، بر روی ژل آگارز ۱ درصد ۵۲
- شکل ۴-۳: الکتروفورز محصولات RFLP-PCR با آنزیم *HpaII* ۵۳
- شکل ۵-۳: الکتروفورز محصولات PCR-RFLP با آنزیم *EcoR571* ۵۵
- شکل ۶-۳: استفاده از نرم‌افزار Image J جهت بررسی عملکرد هضم آنزیمی ۵۶
- شکل ۷-۳: نمودار مقایسه توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم *CYP1A1 MspI* در بیماران و افراد سالم شاهد ۶۰
- شکل ۸-۳: نمودار مقایسه توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم *CYP1B1 L432V* در بیماران و افراد سالم شاهد ۶۲

فهرست جدول‌ها

صفحه

عنوان

| | |
|----|---|
| ۱۳ | جدول ۱-۱: فهرست آللهای ژن <i>CYP1A1</i> |
| ۱۶ | جدول ۲-۱: پلی‌مورفیسم <i>CYP1B1</i> L432V |
| ۳۰ | جدول ۱-۲: دستگاههای مورد استفاده |
| ۳۱ | جدول ۲-۲: مواد مورد استفاده |
| ۳۳ | جدول ۳-۲: ترکیب شیمیایی و غلظت مواد تشکیل دهنده بافرهای A و B |
| ۳۹ | جدول ۴-۲: پرایمرها و آنزیمهای استفاده شده برای تکثیر و تعیین ژنوتیپهای <i>CYP1B1</i> و <i>CYP1A1 MspI</i> L432V، و اندازه قطعات حاصل از PCR |
| ۳۹ | جدول ۵-۲: مواد مورد نیاز PCR با مقادیر آنها |
| ۴۰ | جدول ۶-۲: برنامه PCR نمونه‌ها |
| ۴۶ | جدول ۷-۲: نتایج حاصل از RFLP-PCR نمونه‌ها |
| ۵۸ | جدول ۱-۳: ویژگیهای عمومی افراد شاهد و بیمار؛ جنس، سن و وضعیت استعمال سیگار و زیر گروه سرطان ریه |
| ۵۹ | جدول ۲-۳: بررسی ارتباط استعمال سیگار با انواع هیستولوژیکی سرطان ریه |
| ۶۰ | جدول ۳-۳: توزیع ژنوتیپهای پلی‌مورفیسم <i>CYP1A1 MspI</i> در دو جمعیت شاهد و بیمار |
| ۶۱ | جدول ۴-۳: توزیع فراوانی آللهای پلی‌مورفیسم <i>CYP1A1 MspI</i> در دو گروه شاهد و بیماران سرطان ریه |
| ۶۲ | جدول ۵-۳: توزیع فراوانی ژنوتیپهای پلی‌مورفیسم <i>CYP1B1</i> L432V در دو گروه شاهد و بیماران سرطان ریه |
| ۶۳ | جدول ۶-۳: توزیع فراوانی آللهای پلی‌مورفیسم <i>CYP1B1</i> L432V در دو گروه شاهد و بیماران سرطان ریه |
| ۶۳ | جدول ۷-۳: بررسی رابطه سیگار با ژنوتیپهای پلی‌مورفیسم <i>CYP1B1</i> L432V در بیماران سرطان ریه |

فصل اول

مقدمه

۱-۱ زنبیوتیک‌ها^۱

موجودات به صورت پیوسته و اجتناب‌ناپذیر در معرض مواد شیمیایی خارجی یا زنبیوتیک‌ها قرار دارند. زنبیوتیک (از ریشه یونانی زنوس^۲ به معنی ناآشنا) ترکیبی است که برای بدن بیگانه محسوب می شود (Murray, et al., 2003). زنبیوتیک‌ها شامل مواد شیمیایی مصنوعی و طبیعی مانند داروها، فرآورده‌های صنعتی، آفت‌کشها، آلاینده‌ها، محصولات تغییر شیمیایی غذاها در اثر حرارت، آلکالوئیدها، متابولیت‌های ثانویه گیاهی، و سموم تولید شده به وسیله کپکها، گیاهان و حیوانات می باشند. بیشتر این ترکیبات در بدن انسان دستخوش متابولیسم می شوند که به وسیله آنزیم‌های موجود در کبد و سایر بافتها کاتالیز می شود (Gaikovitch, 2003).

بسیاری از این ترکیبات ژنوتوکسیک بوده و سرطان‌زایی را القاء می کنند. ترکیباتی مانند N- نیتروزوالکیل اوره^۳، متیل و اتیل متان سولفونات^۴، دی اپوکسی بوتان^۵، بتا- پروپیولاکتون^۶، سولفور موستارد^۷ و اتیلن ایمین^۱

-
1. Xenobiotics
 2. Xenos
 3. N-nitrosoalkylurea
 4. Methyl and ethylmethanesulfonate
 5. Diepoxibotane
 6. β - propiolactone
 7. Sulformustard

می توانند به طور مستقیم سبب القاء کارسینوژنز شوند (Bozina, *et al.*, 2009). در حالی که بعضی از مواد شیمیایی موسوم به پروکارسینوژن‌ها، از قبیل بنزوپیرین^۲، افلاتوکسین^۳، آربست^۴، وینیل کلراید^۵، بعضی از داروهای ضد سرطان و ترکیبات حاوی فلزات سنگین، به وسیله آنزیم‌های خاصی فعال شده و محصولات متابولیک حاصل، سبب آسیب در DNA می گردند. سیگار یکی از منابع اصلی تامین پروکارسینوژن‌ها برای شروع و گسترش سرطان در بعضی از بافتها از جمله ریه است (Hang, 2009 و Bozina, *et al.*, 2009).

۱-۱-۲ کارسینوژن‌های موجود در دود سیگار

دود سیگار حاوی چندین هزار ترکیب شیمیایی است که از میان آنها بیش از ۶۰ ترکیب کارسینوژن شناخته شده است. از کارسینوژن‌های اصلی موجود در دود سیگار، می توان هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای^۶ (PAHs)، آمین‌های آروماتیک^۷ و ترکیبات نیتروزآمین^۸ را نام برد (Kiyohara, *et al.*, 2002). به علاوه ترکیباتی مانند بوتادین^۹، آلدئیدها^{۱۰}، بنزن و فلزات سنگین که سرطان‌زایی آنها برای انسان شناخته شده است، نیز در دود سیگار وجود دارند (Lodovici and Bigagli, 2009). کارسینوژن‌های قوی مانند PAHs، نیتروزآمین‌ها و آمین‌های آروماتیک نسبت به کارسینوژن‌های ضعیفی مانند استالدید به مقدار کمتر در دود سیگار وجود دارند. از میان N- نیتروزآمین‌ها، ترکیباتی مانند N- نیتروزودی‌متیل‌آمین^{۱۱} و N- نیتروزوپیرولیدین^{۱۲} که از ترکیبات فرار هستند و دو ترکیب شیمیایی وابسته به نیکوتین، N^۱-نیتروزونورنیکوتین^{۱۳} و ۴- (متیل نیتروزوآمینو)-۱- (۳-پیریل)-۱- بوتانون^{۱۴} که به اختصار NNN و NNK نامیده می‌شوند، و فقط در دود سیگار وجود دارند، قابل اشاره هستند. دود سیگار همچنین حاوی ترکیباتی مانند نیتریک اکساید^{۱۵} (NO) و

-
8. Ethyleimine
 1. Benzopyrine
 3. Aflatoxin B1
 3. Asbestose
 4. Vynilcoloride
 5. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
 6. Aromatic amines
 7. Nitrosoamines
 8. Butadiene
 9. Aldehydes
 10. N-nitrosodimethylamine
 11. N-nitrosopyrrolidine
 12. N'-nitrosornicotine
 13. 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
 14. Nitric oxide

مخلوطی از هیدروکینون‌ها^۱ و سمی کینون‌ها^۲ است و بنابراین می‌تواند سبب آسیب‌های اکسیداتیو در DNA گردد (Voho, 2005).

۱-۱-۳ هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه ای

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای گروه متنوعی از کارسینوژن‌های قوی هستند که به صورت موضعی عمل می‌کنند (Voho, 2005). خصوصیات ساختاری آنها داشتن چند حلقه بنزنی به هم پیوسته می‌باشد. این ترکیبات آب‌گریز بوده و علاوه بر حضور در سوخت‌های فسیلی مانند نفت، زغال سنگ و سایر آلاینده‌های محیطی، در نتیجه سوختن ناقص موادی مانند چوب، تنباکو و چربی حاصل می‌شوند (Alexadrie, 2003).

بنزو(آ)پیرین^۳، بنزو(آ)آنتراسن^۴، بنزو(جی، کا)فلوئورانتن^۵، دی‌بنزوآنتراسن^۶، کریسین^۷ و ایندول^۸، ۱،۲،۳ سی، دی پیرین^۹ از مهمترین هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای کارسینوژن در انسان می‌باشند. بنزو(آ)پیرین نخستین کارسینوژن شناخته شده انسانی، از پنج حلقه بنزنی متصل به هم تشکیل شده و یکی از کارسینوژن‌های موجود در دود سیگار است. در گوشت کباب شده، حبوبات و سبزیجات نیز مقداری بنزوپیرین وجود دارد. بنزوپیرین کارسینوژنی بسیار قوی بوده، به طوری که می‌تواند در تماس آزمایشی و به مقدار اندک با حیوانات تومور ایجاد کند (Hetch, 1999 و Hang, 2009).

۱-۲ متابولیسم زنبیوتیک‌ها

برای سهولت، متابولیسم زنبیوتیک‌ها به دو مرحله تقسیم می‌شود:

-
1. Hydroquinones
 2. Semiquinones
 3. Benzo(a)pyrene
 4. Benzo(a)anthracene
 5. Benzo(g,K)anthracene
 6. Dibenzoanthracene
 7. Chrycine
 8. Indol 1,2,3 C-dipyrine

در مرحله اول که عمدتاً به وسیله یک گروه از آنزیم‌های مونواکسیژناز،^۱ موسوم به سیتوکروم P450^۲ (CYP) کاتالیز می‌شود، یک ریشه قطبی مانند OH- وارد مولکول می‌گردد. علاوه بر هیدروکسیلاسیون^۳ که واکنش اصلی است، این آنزیم‌ها طیف وسیعی از واکنش‌های اکسیداسیون^۴ و احیا^۵ را کاتالیز می‌کنند. به طور معمول واکنش‌های مرحله اول، ترکیبات غیرفعال اولیه را به متابولیت‌های ناپایدار فعالی تبدیل می‌کنند که بسیار واکنشگر بوده و می‌توانند ماکرومولکول‌های سلولی، از جمله ژنوم را مورد حمله قرار داده و تغییراتی در آن ایجاد نمایند (Murray, et al., 2003).

در مرحله دوم که توسط گروه‌هایی از ترانسفرازها کاتالیز می‌شود، ترکیبات هیدروکسیله یا سایر محصولات مرحله اول با مولکول‌های آب دوست کوچکی مانند گلوکوکورونیک اسید، گلوکاتیون، سولفات، سیستین، استات، اسیدهای آمینه و یا متیل متصل شده و به مولکول‌هایی با قطبیت بیشتر تبدیل می‌شوند. به این ترتیب، محصولات فعال مرحله اول را به انواع کمتر فعال یا غیرفعال تبدیل شده که در ادامه، این مواد به راحتی توسط ادرار یا صفرا دفع می‌شوند (Murray, et al., 2003).

هدف کلی از متابولیسم زئوبیوتیک‌ها، افزایش حلالیت آنها در آب (قطبیت) و تسهیل دفع آنها از بدن به منظور رهایی سلول از سموم است. خاصیت لیوفیلی مواد زئوبیوتیک که بسیاری از آنها را قادر می‌سازد از راه پوست، ریه‌ها و مجرای گوارش جذب شوند، مانعی برای حذف آنها می‌باشد. در صورتی که زئوبیوتیک‌های بسیار هیدروفوب به مواد محلول در آب تبدیل نشوند، ممکن است که تقریباً به طور دائم در بافت چربی باقی بمانند (Murray, et al., 2003).

عبارت سم زدایی^۶ که گاهی برای توصیف بسیاری از واکنش‌های مربوط به متابولیسم زئوبیوتیک‌ها بکار می‌رود، همیشه مناسب نیست، زیرا همان‌طور که اشاره شد در بعضی از موارد این واکنش‌ها عملاً سبب افزایش فعالیت زیستی و سمیت ترکیبات اولیه می‌گردند (Murray, et al., 2003).

-
1. Monooxygenases
 2. Cytochrome P450
 3. Hydroxilation
 4. Oxidation
 5. Reduction
 6. Detoxification

۳-۱- سیتوکروم‌های P450

سیتوکروم‌های P450 یک ابرخانواده بزرگ و متنوع از هموپروتئین‌ها هستند که در همه قلمروهای زندگی از آرکیباکترها تا یوکاریوت‌های عالی یافت می‌شوند. این آنزیم‌ها محصول خانواده بزرگ ژن‌های CYP بوده و در زمره مهمترین آنزیم‌های متابولیسم‌کننده زنبیوتیک‌ها می‌باشند. به نظر می‌رسد که وجود این سیتوکروم‌ها، در گونه‌های یوکاریوتیک و نه باکتری‌ها غیرقابل اجتناب است، زیرا بعضی از باکتری‌ها فاقد آنزیم‌های CYP می‌باشند. یوکاریوت‌ها برای بیوسنتز استرول‌ها که از اجزاء تشکیل‌دهنده غشاء پلاسمایی هستند، به آنزیم‌های CYP نیاز دارند (Hukkanen, 2000).

به جزء تعدادی از انواع باکتریایی، همه سیتوکروم‌های CYP، پروتئین‌های غشایی هستند. از لحاظ ساختاری این پروتئین‌ها به غشاء رتیکولوم اندوپلاسمیک یا غشاء داخلی میتوکندری متصل بوده و عمدتاً در سمت سیتوزولی غشاء‌های رتیکولوم اندوپلاسمایی صاف قرار دارند (Vrzal, et al., 2004). بیشترین مقدار این آنزیم‌ها در کبد و روده باریک وجود دارد، ولی تقریباً در تمام بافت‌ها بیان می‌شوند، گرچه مقدار آنها در مقایسه با کبد زیاد نیست. در میکروزوم‌های کبدی، سیتوکروم‌های P450 تا ۲۰ درصد کل پروتئین‌ها را تشکیل می‌دهند (Murray, et al., 2003).

۱-۳-۱- تاریخچه شناسایی سیتوکروم‌های P450

نخستین گزارش از وجود آنزیم‌های CYP و یا "رنگدانه میکروزومی متصل به مونوکسیدکربن" که در آن زمان به این اسم نامیده می‌شدند، در سال ۱۹۵۸ توسط کلینگنبرگ^۱ و همکارانش منتشر شد. این آنزیم دارای حداکثر جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر می‌باشد و هنگامی که ساختار طبیعی آن شناسایی شد، در سال ۱۹۶۴ اومورا^۲ و همکاران، به آن عنوان سیتوکروم P450 دادند (Hukkanen, 2000).

در سال ۱۹۶۵ نقش سیتوکروم P450 به عنوان یک اکسیداز نهایی، در متابولیسم استروئیدها و زنبیوتیکها توسط کوپر^۳، روزنتال^۴ و استابروک^۵ توضیح داده شد (Snyder, 2000). این یافته‌ها بلافاصله، با شناسایی

1. Klingenberg
2. Omura
3. Cooper
4. Rosenthal
5. Estabrook

اشکال متعدد سیتوکروم P450 در قطعات رتیکولوم اندوپلاسمیک به نام میکروزوم‌ها ادامه یافت. متعاقباً مطالعاتی صورت گرفت که اهمیت انواع متفاوت سیتوکروم P450 را در متابولیسم داروها و مواد شیمیایی، و نیز در فعال سازی سموم مختلف، تراژون‌ها و کارسینوژن‌ها شرح داد. سپس پلی‌مورفیسم‌های انسانی در انواع سیتوکروم P450، و اثراتشان بر روی متابولیسم زنبوبیوتیک‌ها مورد توجه قرار گرفت (Stoilovl, *et al.*, 2001).

در سال ۱۹۹۹ نلسون^۱ برآورد کرد که حداقل ۵۳ ژن و ۲۴ ژن کاذب^۲ مختلف CYP در ژنوم انسان وجود دارد (Hukkanen, 2000). بلافاصله اهمیت آنزیم‌های CYP در توسعه عوامل درمانی جدید شناخته شد و اکنون منابع قابل توجهی به مطالعه میانکنش این عوامل با اشکال مختلف سیتوکروم P450 می‌پردازند. ترکیبات شیمیایی که به تازگی به عنوان دارو مصرف می‌شوند، به طور معمول از لحاظ متابولیسم به وسیله اشکال مختلف سیتوکروم P450 انسانی بررسی می‌شوند، زیرا این عوامل مسیرهای متفاوتی برای حذف دارند و به طور معمول برای فعالیت‌های فارماکولوژیکی غربالگری می‌شوند (Stoilovl, *et al.*, 2001).

۱-۳-۲ نامگذاری و طبقه‌بندی سیتوکروم‌های P450

دلیل نامگذاری سیتوکروم P450 این است که این پروتئین‌های سلولی، رنگی بوده و در حالت احیاء و اتصال به CO، نور را در طول موج ۴۵۰ نانومتر جذب می‌کنند. در ابتدا سیتوکروم P450، به عنوان یک نام موقتی پیشنهاد شد، اما متأسفانه این اسم باقی ماند، زیرا این پروتئین‌ها سیتوکروم واقعی نبوده و در انتقال الکترون نقش ندارند. نام صحیح برای آنها مونواکسیژنازهای متصل به هم^۳ تیولات می‌باشد (Vrzal, *et al.*, 2004)، چرا که آنها به عنوان مونواکسیژنازهای نهایی عمل کرده و در انتقال اکسیژن مولکولی به درون سوبسترا نقش ایفا می‌کنند (Hannemann, *et al.*, 2006).

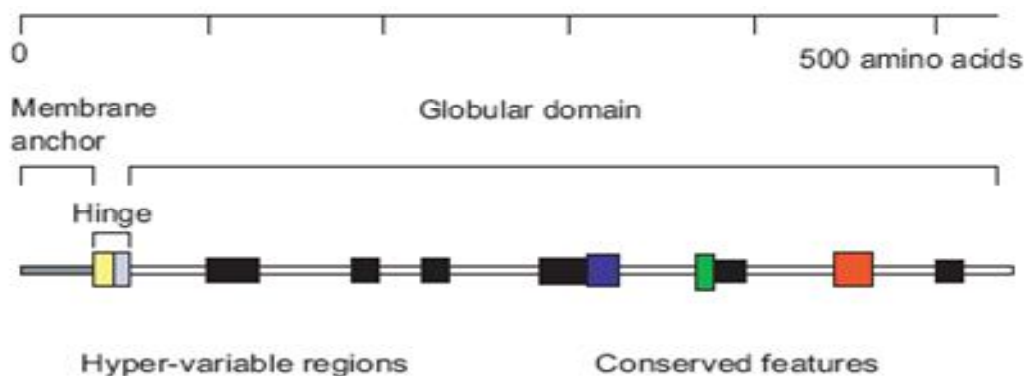
نظر به تعداد خیلی زیاد انواع سیتوکروم‌های P450 که کشف شده است، و وجود شباهت توالی در بین انواع آن در گونه‌های مختلف، یک نامگذاری سیستماتیک برای ایزوفرم‌های P450 و ژن‌های آنها ضروری است. این روش هم اکنون موجود است، کاربرد گسترده‌ای داشته و اساس آن میزان شباهت توالی آمینواسیدی است. عبارت اختصاری CYP که مخفف سیتوکروم P450 است، نمایانگر ژن‌ها و آنزیم‌های سیتوکروم

1. Nelson
2. Pseudogene
3. Heme

P450 است. پس از حروف CYP یک عدد می آید که بیانگر خانواده است. سیتوکروم های P450 در صورتی در یک خانواده قرار می گیرند که حداقل در ۴۰ درصد توالی های آنها تشابه وجود داشته باشند. پس از این عدد، یک حرف انگلیسی بزرگ می آید که نشان دهنده زیر خانواده است. اعضا یک زیر خانواده در بیش از ۵۵ درصد توالی هایشان تشابه دارند. سپس هر کدام از آنزیم های P450 به صورت جداگانه با اعدادی شماره گذاری می شوند. این عمل بدون ترتیبی خاص و به شکل دلخواه انجام می شود. روش نامگذاری زن ها و آنزیم ها مشابه است، با این تفاوت که طبق قاعده از نام ایتالیک برای زن و غیر ایتالیک برای آنزیم استفاده می شود (Stoilovl, et al., 2001 و Murray, et al., 2003).

۳-۳-۱ ساختار مولکولی آنزیم های CYP450

پروتئین های CYP450 حدود ۵۰ کیلو دالتون وزن دارند و هر کدام دارای یک گروه پروستتیک پروتوپورفیرین IX (هم) می باشند که به یک سیستمین تیولات متصل است. گروه پروستتیک هم، این خانواده را به آنزیم های مونواکسیژناز تبدیل کرده است. ساختار این آنزیم ها از سه ناحیه متمایز تشکیل شده است (شکل ۱-۱). ناحیه انتهای آمینی پروتئین که خیلی آب گریز است، دارای یک توالی است که به درون غشاء نفوذ می کند. به علاوه اینکه در این ناحیه یک توالی متوقف کننده انتقال وجود دارد که مانند یک لنگر درون غشاء عمل کرده و جهت یابی توپولوژیک سیتوکروم P450 را تعیین می کند (Stoilovl, et al., 2001).



شکل ۱-۱ ساختار اولیه پروتئین‌های P450 متصل به رتیلولوم اندوپلاسمیک. نقش دومین‌ها و مناطق مختلف که با رنگ‌های متفاوت متمایز شده‌اند، به تفصیل در متن ارائه شده است. (Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000).

بعد از این ناحیه آب‌گریز، یک ناحیه لولاماند غنی از پرولین وجود دارد که سبب انعطاف‌پذیری در بین ناحیه تراغشایی و قسمت کاتالیزکننده کروی پروتئین می‌گردد. ناحیه اخیر در سیتوزول قرار گرفته یا اینکه رو به ماتریکس میتوکندری آرایش پیدا می‌کند. انعطاف‌پذیری برای جهت‌یابی قسمت سیتورولی مولکول نسبت به غشاء، به منظور دسترسی به سوبسترا و نیز میانکنش با زنجیره انتقال الکترون لازم است. قسمت انتهایی کربوکسیلی سیتوکروم P450 از یک ساختار مرکزی حفاظت شده تشکیل شده است که در بین همه اعضای ابرخانواده CYP450 مشترک می‌باشد. این ساختارها از تعدادی مارپیچ آلفا و صفحات بتا و یک ناحیه پیچیده تشکیل شده‌اند که برای جهت‌یابی ساختاری مناسب گروه پروستتیک ضروری است (Stoilovl, et al., 2001).

از لحاظ توالی آمینواسیدی، پروتئین‌های CYP450 یک موتیف پپتیدی حفاظت شده (Phe-X(6-9)-Cys-X-Gly) در نزدیکی انتهای کربوکسیل دارند، که بیشترین خاصیت آنزیم‌های P450 به این موتیف مربوط می‌شود. این سیستمین که در نزدیک پاکت اتصال به سوبسترا قرار گرفته، به آهن هم هشت‌وجهی در موقعیت پنج متصل می‌شود و در انتقال یک اتم اکسیژن اتمسفری به سوبسترا نقش دارد. با تشکیل محصول اکسیژنه و سپس آزادی آن، محصول ناپایداری بدست می‌آید که در چند هزارم ثانیه به یک ترکیب هیدروکسیله