تردد الطرز الوراثية للجين GSTP1 للمصابين بسرطان المثانة في محافظة ذي قار

Frequencies of GSTP1 gene polymorphism and susceptibility in bladder cancer patients in the province of Thi-Qar

ا.م.د. حسن ريسان ألركابي علي جمعه محمد الحصونة*

كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ذي قار

الخلاصـــة

تعدد الأشكال polymorphisms هو المفتاح الرئيس في علم الوراثة البشرية ويبحث في القدرة على التمييز بين الأشكال الموروثة من ألجين إذ يمتلك البشر عددا كبيرا من التعدد الشكلي في القطع المختلفة من ألجين في الحامض النووي DNA ،ومن هذا التعدد يمكن تقييم مدى تأثير عوامل الخطورة والاستعداد الوراثي للكثير من الأمراض ,ومنها السرطان إذ تم قياس تردد الطرز الوراثية للجين GSTP1 عبر استخدام جهاز PCR وتقنية (RFLP) .

Restriction Fragment Length Polymorphisms. جمعت 50 عينة دم لمرضى تم تشخيص أصابتهم بسرطان المثانة بأعمار(30-85) و50 عينة دم أخرى من أشخاص أصحاء كمجموعة سيطرة اختيرت متناظرة مع المجموعة الأولى حفظت العينات بأنابيب حاوية على مادة مانعة للتخثر EDTA بدرجة حرارة 20- م° لحين استخدامها في استخلاص DNA وتقنية PCR.

وأظهرت النتائج عدم وجود ارتباط بين تعدد الشكل الوراثي للجين GSTP1 والإصابة بسرطان المثانة عند مقارنتها بمجموعة السيطرة . (OR=0.724 ;95%CI =0.309 -1.699)

(OR=0.730 ;95%CI= 0.215 – 2.483) لكلا الطرازين الوراثيين lle\val وval\val على التوالي.

الكلمات المفتاحية : سرطان المثانة، ألجين GSTP1، PCR .

* البحث مستل من رسالة ماجستير

المقدمة يحتل سرطان المثانة البولية urinary bladder cancer المرتبة الرابعة بين السرطانات الأكثر شيوعا في العالم والمرتبة الثامنة كمسبب للوفاة بين جميع أنواع السرطان ولكلا الجنسين والمرتبة الرابعة كمسبب للوفاة بالنسبة

للذكور بعد سرطان البروستات والرئة والقولون ألمستقيمي . (Jemal *et al*,2010)، إما في العراق فقد أظهرت نتائج مجلس السرطان العراقي ان سرطان المثانة يأتي في المرتبة الرابعة بين أنواع السرطان الأكثر شيوعا إذ أن نسبة الإصابة به تشكل (6.21%) في كلا الجنسين ويحتل المرتبة الثانية لأكثر الأورام وجودا عند الذكور بنسبة (10.12%) بينما يحتل المرتبة التاسعة لدى الإناث وسجلت النسبة الأعلى للإصابة على مستوى العراق في محافظة ذي قار بنسبة (12.86%) . (Iraqi cancer registry, 2008).

توجد جينات الكلوتاثيون (GST) في الحيوانات والنباتات وتشفر لعدد كبير من أنزيمات الطور الثاني phase II أنزيمات (GST) يحتوي جسم الإنسان على أربعة أصناف رئيسة من هذه الجينات هي(Pi , Mu , Theta , Alpha) ، ولهذه الأنزيمات أهمية كبيرة في تحفيز تفاعلات ازالة السمية (detoxification) عن طريق الاقتران بالكلوتاثيون منتجا مواد ذائبة أكثر في الماء لكي يستطيع الجسم طرحها الى خارج الجسم وتصبح اقل فعالية بايلوجية من مركباتها الأصلية فضلا عن تخفيض الضرر الناتج من الجذور الاوكسجينيه الحرة (reactive oxygen species) على الجزيئات الخلوية المهمة سيما الحامض النووي DNA (Liao *et al*,2010)o

تتميز أنزيمات الكلوتاثيون بدورها في إزالة سمية المركبات الناتجة من ايض الستيرويدات مثل ايض الاستروجين فضلا عن الدور الذي تلعبه في حث أنزيمات أخرى للقيام بوظائف متعددة للخلية منها عملية إصلاح DNA وتمتاز هذه الإنزيمات بحساسيتها للسرطان (Lee *et al*, 2005)

يختلف التعبير الجيني لهذة الجينات من عضو لأخر فالجين Alpha ويرمز له GSTA يكون تعبيره بصورة رئيسة في الكبد فضلا عن وجودة في الكلية والأمعاء الدقيقة اما ألجين Mu ويرمز له GSTM والجين Theta ويرمز له GSTT وتوجد هذه الجينات بمستويات واطئة في العديد من الأعضاء في حين ان ألجين Pi ويرمز له GSTP ويعبر عنه في الرئة والمثانة البولية والمشيمة والثدي (Minelli *et al*, 2010).

يقع الجين GSTP1 على الذراع الطويل للكروموسوم رقم 11 (11q13) ويمتلك هذا ألجين في الإنسان موقعين متعددا الشكل الأول في الاكسون رقم 5 exon(5) عند الكودون 105 إذ يتسبب استبدال القاعدة النايتروجينيه الادينين A إلى القاعدة النايتروجينيه الكوانين G تغير في الحامض الاميني المنتج من ذلك الكودون حيث ينتج الحامض الاميني الفالين val بدلا من الحامض الاميني ايزوليوسين Ile، بينما الشكل الثاني في الاكسون رقم 6 exon (6) عند الكودون (114) إذ تستبدل القاعدة النايتروجينيه السايتوسين إلى القاعدة النايتروجينيه الثايمين T محولا الحامض الاميني المنتج عند الكودون 114 من الالنين Ala إلى الحامض الاميني الفالين val o (Vasiera, 2011)

ولهذا الجين أهميه كبيره في إزالة سميه المواد الناتجة من الايض وسميه عوامل التأكسد المنتجة من الفعاليات الخلوية المختلفة ويعمل على إزالة سميه المادة dial epoxide والهايدروكاربونات الاروماتيه الحلقية (PAHs) وللجين GSTP1 دور أساسي في تحديد الاستعداد للإصابة بالعديد من أنواع السرطان مثل المثانة والرئة

والمريء مع زيادة العمر والتعرض لدخان السكائر. (Schneider *et al*., 2004;Lee *et al*., 2000) ويرى (Kamedak *et al*, 2004) ان دور نواتج ألجين GSTP1 في النواة هي لمنع الضرر الذي يحدثه بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 على الحامض النووي DNA.

والمريء مع زيادة العمر والتعرض لدخان السكائر. (Schneider *et al*., 2004;Lee *et al*., 2000) ويرى (Kamedak *et al*, 2004) ان دور نواتج ألجين GSTP1 في النواة هي لمنع الضرر الذي يحدثه بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 على الحامض النووي DNA.

المواد وطرائق العمل

أ. جمع العينات

جمعت 50 عينة دم لمصابين بسرطان المثانة البولية من مستشفى الامام الحسين (ع) التعليمي ومستشفى الأمل الأهلي و50 عينة دم أخرى لأشخاص أصحاء للفترة من 1\8\2011 لغاية 20\5\2012 حفظت العينات في بدرجة حرارة 20- م° لحين الاستعمال وجمعت المعلومات حول المصابين ومجموعة السيطرة.

ب.استخلاص DNA وطريقة عمل PCR

استخلص الحامض النووي DNA من خلايا الدم البيض وذلك باستعمال طريقة الفينول – كلوروفورم – كحول الايزواميل استنادا الى طريقة (*et al,* Sambrook 1989).

استخدمت تقنية PCR في تضخيم ألجين GSTP1 اعتمادا على طريقة (Harries *et al*,1997) اذ اوضع 5مايكروليتر DNA Tamplet في انبوبة PCR ثم أضيف إليه البادئات primers (F and R) 1 مايكروليتر لكل منهما بعدها أضيف 5 مايكروليتر من Master mix و 8 مايكروليتر من الماء المقطر ليصبح المجوع الكلي للإضافات 20 مايكروليتر.

واستعملت البادئات المصنعة من شركة (Bioneer ,South Korea) وكان تسلسلها كما في الجدول رقم (1).

جدول (1) تسلسل البادئ المستعمل في تقنية PCR

Primers	Primer Sequences	Length	Tm	Ta
GSTP1	P105F5-ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA-3	20	59.1	60
	P105R5-TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT-3	20	60.4	60

Ta = Annealing Temperature ; Tm = Melting Temperature

وبعد أكمال الإضافات نقلت العينات الى جهاز PCR واجري التفاعل حسب البرنامج في الجدول (2)

جدول (2) برنامج تفاعل التضاعف في PCR

رقم الخطوة	الوصف	درجة الحرارة	الزمن	عدد الدورات
1	Denaturation	94 مْ	5 min	1
2	Denaturation	94 مْ	1 min	35
3	Annealing	60 مْ	1 min	
4	Extension 1	72 مْ	2 min	
5	Extension 2	72 مْ	20 min	1

وبعد انتهاء برنامج عمل PCR رحلت النواتج بواسطة جهاز الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز بتركيز 3.5 %. بعدها نقل هلام الاكاروز إلى جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV translumintorإذ تم ملاحظة ظهور حزم عند الزوج القاعدي 176 bpمما يدل على وجود ألجين GSTP1 بعد مقارنته مع DNA marker (100 – 2000 bp). قطع ألجين GSTP1 باستعمال أنزيم القطع Alw261 وحسب النشرة المرفقة مع الأنزيم من شركة Fermentas. كما في الجدول رقم (3) 0

جدول (3) مواد التفاعل لأنزيم القطع

المادة	الحجم
PCR reaction mixture	10 µL
Nuclease – free water.	17 µL
10x buffer Tango.	2 µL
Alw261.	1 µL
Total.	30 µL

التحليل الإحصائي

تم اختبار الفروق المعنوية للعينات المدروسة باستخدام اختبار مربع كاي X^2 للمقارنة بين العينات كما استخدم البرنامج الإحصائي (SPSS Ver.11) لدراسة تردد الطرز الوراثية للجين GSTP1 .

النتائج والمناقش

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن 80 % من المرضى و 58 % من مجموعة السيطرة من الذكور بينما 20 % من المرضى و 42 % من مجموعة المقارنة من الإناث. أي أن نسبة الذكور إلى الإناث 1:4. كما في الجدول رقم (4) 0

ثم حضنت المكونات بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 16 ساعة ومن ثم رحلت العينات بواسطة جهاز الترحيل الكهربائي وكانت النتائج كالأتي : ظهور حزمة عند الزوج القاعدي 176 bp يدل على الطراز البري Wild type (Ile/Ile) ايزوليوسين/ايزوليوسين، وظهور حزم عند القواعد الزوجية 85bp, 91bp, 176bp يدل على الطراز الطافر المتباين Heterozygous (Ile/val) ايزوليوسين/فالين، في حين ظهور حزم عند القواعد الزوجية 85bp, 91bp يدل على الطراز الطافر المتجانس Homozygous (val/val) فالين/ فالين.

جدول(4) توزيع مجموعتي المرضى والسيطرة بحسب الجنس

العينة	الذكور	الإناث
المرضى n = 50	(% 80) 40	(% 20) 10
المقارنة n = 50	(% 58) 29	(% 42) 21

كانت هذه النتائج متقاربه مع ما توصلت إليه (AL-Kashwan , 2009) اذ وجدت أن نسبة الاصابة في الذكور (86.2%) وفي الإناث (13.8%) وهذا يتطابق مع ما وجدته AL-Laaeiby (2009) في ان نسبة الإصابة كانت (86%) و (14%) في كل من الذكور والإناث على التوالي،ان اختلاف نسبة الإصابة بين الذكور والإناث قد يكون السبب

في ذلك هو تعرض الذكور الى المسرطنات المهنية فضلا عن ان نسبة المدخنين في الذكور أعلى من الإناث.

بينت نتائج الدراسة الحالية أن 68 % من المرضى و40 % من مجموعة السيطرة من المدخنين بينما 32 % من المرضى و 60 % من مجموعة السيطرة من غير المدخنين . كما في الجدول رقم (5) 0

جدول (5)توزيع مجموعتي المرضى والسيطرة بحسب التدخين

العينة	مدخن	غير مدخن
المرضى n = 50	(% 68) 34	(% 32) 16
المقارنة n = 50	(% 40) 20	(% 60) 30

تتفق نتائج هذه الدراسة مع غيرها من الدراسات فقد وجدت (AL-Laaieby, 2009) ان نسبة المدخنين المصابين بسرطان المثانة هي (64%).فيما وجدت (Al-kashwan,2009)ان (72.3 %) من المصابين هم من المدخنين. كذلك تتفق مع دراسة أجريت حول تأثير التدخين على خطورة الاصابة بسرطان المثانه وجد (Jhamp *et al*, 2007) اذ سجل نسبة المدخنين المصابين بهذا المرض هي (73.1%).

وعلى الرغم من عدم وضوح الإلية التي يؤثر بها التدخين في تطور سرطان المثانة الا أن احتواء السكائر على العديد من المواد المسببة للسرطان مثل الهايدروكاربونات الاروماتيه الحلقية والامينات الاروماتية يعتقد ان لها التأثير الأكثر أهمية كونها قادرة على احداث طفرات في DNA الأنسان.

وأشارت نتائج الدراسة الحالية إلى أن (74%) من المصابين بسرطان المثانة كانوا بعمر اكبر من 50عام مقابل (26 %) بعمر اقل من 50عام0 كما في الجدول رقم (6) 0

جدول (6) توزيع مجموعتي المرضى والسيطرة بحسب العمر

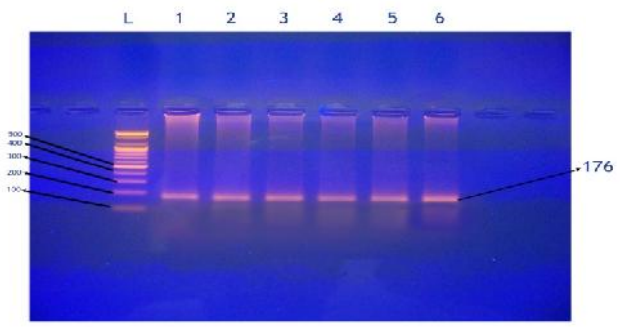
العينة	اقل من 50عام	اكثرمن 50عام
المرضى n = 50	(% 26)13	(% 74) 37
المقارنة n = 50	(% 64) 32	(% 36) 18

اتفقت هذه النتائج مع العديد من الدراسات فقد اشارت (AL-Kashwan , 2009) الى ان 50% من المرضى كانت اعمارهم اكبر من 60 عامـــــاً وكذلك اتفقت مع كل من (jiang *et al*,2007) , (wenzlaff *et al*,2005). أظهرت نتائج التحليل الإحصائي للدراسة الحالية عدم وجود ارتباط بين تعدد الطرز الوراثية للجين GSTP1 والإصابة بسرطان المثانة البولية عند مقارنة المرضى بمجموعة السيطرة .

جدول (7) تردد الطرز الوراثية للجين GSTP1 لعينات المرضى والسيطرة.

الطرز الوراثية	المرضى	المقارنة	OR	95 % CI	P Value
Ile/Ile	(% 54) 27	(% 46) 23	1.0	-	-
Ile/val	(% 34) 17	(% 40) 20	0.724	1.699 - 0.309	0.457
val\val	(% 12) 6	(% 14) 7	0.730	2.483 - 0.215	0.613

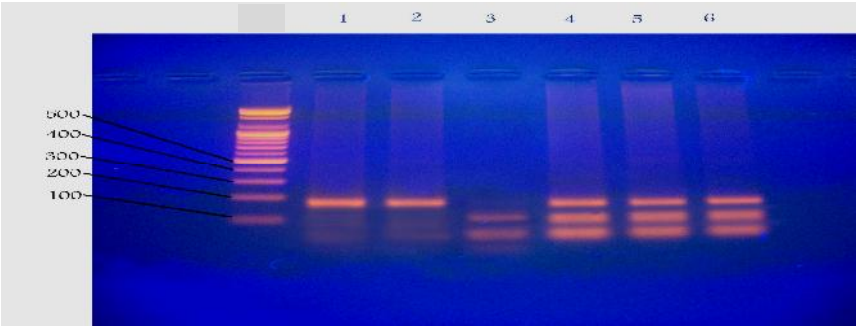
P≤ 0.05 OR= Odd ratio 95%CI =Confidence Interval



صورة (1) الترحيل الكهربائي Electrophoresis لنواتج تقنية PCR على هلام الاكاروز

L - DNA القياسي (2000_100 bp)

1 - 6 Lane نواتج PCR للجين GSTP1



صورة (2) تحليل نواتج PCR للجين GSTP1 بأستخدام انزيم القطع ALW261 وتقنية RFLP

L -DNA القياسي (100bp_2000).

Lane 1.2 الطراز المتجانس البري lle\lle .(176bp)

Lane 3 الطراز الطافر المتجانس val\val .(91, 85bp)

Lane 4-6 الطراز الطافر المتباين lle\val .(176, 91,85bp)

من نتائج الدراسة الحالية نلاحظ ان تردد الطراز الوراثية للجين GSTP1 في مجموعتي المرضى والسيطرة كانت كالاتي :

الطراز الوراثي lle\ lle الطراز البري wild type (54%). الطراز الوراثي lle\val الطراز المتباين (34%) Heterozygous.الطراز الوراثي val\valالطراز المتجانس (12%) Homozygous 0 بالمقابل كان توزيع الطرز الوراثية في مجموعة السيطرة هي (40%)و(46%) و (14%)على التوالي.وأظهرت نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود فروق معنوية بين الطراز المتباين lle\val (OR=0.724 ; %95 Cl=0-309-1.699) والطراز المتجانس الطافر (OR=0.730; %95 Cl=0.215-2.483) val\val

وهذه النتائج تدل على عدم وجود ارتباط بين تعدد الأشكال الوراثية للجين GSTP1 والاصابه بسرطان المثانة البولية .

وجاءت نتائج هذه الدراسة متطابقة مع ماتوصل اليه (Grando, *et al*,2009) اذ لاحظ عدم وجود فروق معنوية بوجود الطراز الوراثية val\val, lle\val (OR=0.75;%95Cl=0.41-1.38) .وكذلك اتفقت نتائج هذه الدراسة مع (pradubkaew, *et al*.,2009) بعدم ارتباط الاصابة بسرطان المثانة مع تعدد الأشكال الوراثية للجين GSTP 1.

SUMMARY

Polymorphisms are key elements in all human genetics. The ability to distinguish different inherited forms of a gene or different segments of the genome provides tools that are crucial for a wide array of application. We have witnessed an explosion in the number and utility of DNA polymorphisms. Detection of heterozygous carriers of genetic disease evaluation of high and low risk persons with a predisposition to common adult disorders, such as cancer. Genotypes frequency of GSTP1 gene was measured by in PCR and (PCR-RFLP) technique.

We collected(50) blood samples of the bladder cancer cases aged between (30-85) years old and (50) from healthy volunteers as control. In sterilized tube with EDTA blood samples were collected and kept directly in -20 Cº till used for DNA extraction and PCR technique.

The results showed , there was no significant association between bladder cancer risk and GSTP1 genotype as compared in control group, (OR=0.724 ; 95%CI= 0.309 – 1.699)

(OR=0.730 ; 95%CI = 0.215 – 2.483). Both genotypes Ile\val and val\val respectively.

المصادر

- Jaing X.; Jian-Min Yuan; Paul L.Skipper; steven R.Tannebaum; and Mimi C. Yu. (2007). Environmental tobacco smoke and bladder cancer risk in never smokers of Los Angeles county, Cancer Research 67:7540-7545
- Jemal,A. ;Siegel,R. ;Xu,J. and Ward,E.(2010).Cancer statistics, cancer J. Clin 61(2):133-134.
- Jhamp, M.; Jie Lin ; Rebecea Ballow ;Ashish M.Kamat ;H.Barton Grossman ;Xifeng Wu ;(2007) Urinary tract diseases and bladder cancer risk :a case –control study. Cancer causes control 18:839-845.
- Kamada , K . ; Goto , S . ; Okunaga , T, *; etal* (2004). Nuclear glutathione S-transferase Pi prevents apoptosis by reducing the oxidative stress-induced formation of exocyclic DNA products . Free Radic Biol . Med . 37 : 1875 – 1884 .
- Lee,J. ; Tsang ,W.; Lee , Y. ; Yang , S. ; Hung , P. and Chen,C.(2005) Association of GsTP1 polymorphism and Survival for Esophagel. American association for cancer research. 11: 4749 – 4753
- AL-kashwan, T.A. (2009). Study of tumor suppressor genes of bladder cancer carcinoma patients by molecular genetics and immunohistochemical approaches. Ph.D. thesis ,college of sciences, Baghdad university:163
- AL laaeiby,A.I.(2009).genetic polymorphisms of CYP2D6, GSTM1and GSTT1 genes in Bladder cancer patients. M.SC. thesis, College of Sciences, Basrah University:110
- Grando,J.;HellenKuasne;Roberta.L.;Rodrigues,I.S.; Matsuda,H.;Fuganti,P.;Gregorio,E.;Junior,F.;Menezes,R.;Rodrigues,M.;Colus,I.M.S. (2009) Association between polymorphisms in biometabolism genes CYP1A1 GSTM1 ,GSTT1 and GSTP1 in bladder cancer. Clin Exp Med 9:21-28.

- **Harries,L.;Stubbins,M.;For man,D.;Howard,G.;Wolf,C. (1997) Identification of genetic polymorphisms the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder ,testicular and prostate cancer Carcinogenesis 18(4):641-644.**
- **Iraqi cancer Registry (2008) Baghdad –Iraq.**
- **Pradubkaew,K.;Pramyothin ,P.;Limwongse,C.;Suwannas ri,P.and Assawamakin,A. (2009) GlutathioneS-transferase polymorphisms and risk of bladder cancer in Thais. Thal J. Pharm. Sci 33:67-73.**
- **Sambrook,K.;Fritsh,E. and Maniatis,T.(1989).Molecula r cloning laboratory manual, 2nd ed.,cold spring Harbor laboratory prees.U.S.A.**
- **Schneider , J . ; Bernges , U. ; philipp , M. ; Woitowitiz , H . (2004) . GSTT1 , GSTM1 and GSTP1 polymorphism and lung cancer risk in relation to tobacco smoking . cancer let . 208 : 65 - 74 .**
- **Vasieva,O. (2011). The many Faces of Glutathione transferase Picurrent molecular medicine 11 : 129 – 139**
- **Wenzlaff,A.;Cote,M.;Bock,C .;Land,S.and Schwart, A. (2005) .GSTM1,GSTT1 and GSTP1 polymorphisms environmental tobacco smoke exposure and risk of lung cancer a among never smokers : apopulation – based study . Carcinogenesis 26(2): 395-401**
- **Lee,J. ; Lee,Y.; Yang,S. *etal* (2000).Genetic polymorphism of P^{53} and GsTP1 but not NAT2 are associated with Susceptibility to squamous cell Carcinoma of the esophagus Int. J.cancer 89:458 – 64**
- **Liao,C.; Cao,Y.; Wu,L.; Huang ,J. and Gao ,F.(2010). An updating meta –analysis of the glutathione-S-transferase T polymorphisms and colorectal cancer risk :aHuGE review, Int.J. of colorectal Disease, 25(1):25-37**
- **Minelli,C.;Granell,R.; Newson,R.;Rose-Zerilli, M.J.**