

## مطالعه بیان میزان ژن های GSTP1 در سرطان پروستات با استفاده از روش نانو حسگر زیستی

صدیقه رضایی<sup>۱</sup>، دکتر فرخ کریمی<sup>۲\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی مولکولی-ژنتیک، دانشکده علوم پایه گروه زیست‌شناسی،

دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر

۲. استادیار گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه مراغه

### چکیده

مقدمه: سرطان پروستات PCa یکی از مهم‌ترین سرطان‌ها در مردان است. نرخ بروز آن در سال ۲۰۰۲، ۶۷۹۰۰۰ مرد مبتلا به سرطان پروستات در سراسر جهان بود. پنجمین سرطان شایع در جمعیت و دومین سرطان رایج در جمعیت مردان بعد از سرطان ریه است (در کشورهای غربی). بر اساس گزارش‌های کشوری ثبت سرطان ۱۳۸۷ در ایران ۸۸٫۸۳٪ است. تشخیص زودهنگام و درمان سرطان پروستات در مرحله I و II میزان مرگ‌ومیر را کاهش می‌دهد در مراحل اولیه سرطان پروستات بیشتر قابل‌درمان است تا در مراحل پیشرفته و متاستاز باشد. اولین و شایع‌ترین تغییر در سرطان پروستات هایپرمتیلاسیون گلوکوتیون S - ترانسفراز GSTP1 توصیف می‌شود جلوگیری از فعالیت GSTP1 می‌تواند حساسیت آن افزایش یافته و به DNA سلول آسیب وارد و منجر به سرطان شود.

**مواد و روش‌ها:** به منظور بهینه‌سازی شرایط واکنش برای شناسایی توالی CDNA ژن GSTP1 ابتدا کاوشگر تثبیت شده در سطح گرافن برای شناسایی توالی مکمل آن مورد استفاده قرار گرفت و شرایط واکنش برای توالی مکمل بهینه‌سازی گردید. در بهینه‌سازی عملکرد کاوشگر تثبیت شده در سطح گرافن برای شناسایی توالی مکمل (توالی هدف) فاکتورهای زمان و غلظت‌های مختلف توالی مکمل بهینه‌سازی گردید بهترین غلظت توالی مکمل، غلظتی است که بیشترین نشر فلورسانسی را نشان دهد به عبارت دیگر در اثر اتصال توالی مکمل به DNA کاوشگر در سطح گرافن جدا شده و باعث ظاهر شدن نشر فلورسانس می‌گردد.

**نتیجه‌گیری:** واکنش هیبریداسیون، cDNA مربوط به نمونه‌های بیماران سرطان پروستات و سالم در اثر هیبرید شدن الگوی نشر فلورسانس متفاوت را نشان داد. میزان بیان ژن GSTP1 نمونه بیمار نسبت به GSTP1 نمونه سالم به طور معنی‌داری کمتر ( $p < 0.01$ ) مشاهده شد.

**کلیدواژه:** سرطان پروستات، اکسیدگرافن، هیبرید کردن، بیان ژن GSTP1

\* ایمیل نویسنده مسئول: karimifm@maragheh.ac.ir

## مقدمه

سرطان پروستات PCa یکی از مهم‌ترین سرطان‌ها در مردان است. نرخ بروز آن در سال ۲۰۰۲، ۶۷۹۰۰۰ مرد مبتلابه سرطان پروستات در سراسر جهان بود. پنجمین سرطان شایع در جمعیت و دومین سرطان رایج در جمعیت مردان بعد از سرطان ریه است (در کشورهای غربی) (۲). بر اساس گزارش‌های کشوری ثبت سرطان ۱۳۸۷ در ایران ۸,۸۳٪ است. تشخیص زودهنگام و درمان سرطان پروستات در مرحله I و II میزان مرگ‌ومیر را کاهش می‌دهد در مراحل اولیه سرطان پروستات بیشتر قابل‌درمان است تا در مراحل پیشرفته و متاستاز باشد. انجمن ارولوژیست‌ها توصیه می‌کند تمام مردان غربالگری سرطان پروستات را از سن ۵۰ سال شروع کنند (۳,۴). شروع سرطان پروستات (حضور بدخیمی) احتمالاً مدت‌ها قبل از تشخیص تومور رخ می‌دهد (۵)؛ و علائم آن زمانی مشخص می‌شود که بیماری وارد مرحله‌ای پیشرفت یا وارد مرحله متاستیک شده است (۶)؛ و شانس زنده ماندن را کاهش می‌دهد (۷)

اولین و شایع‌ترین تغییر در سرطان پروستات هایپرمتیلاسیون گلوکوتاتیون S-ترانسفراز GSTP1 توصیف می‌شود (۸,۹). جلوگیری از فعالیت GSTP1 می‌تواند حساسیت آن افزایش یافته و به DNA سلول آسیب وارد و منجر به سرطان شود (۱۰)؛ و به‌عنوان یک نشانگر می‌تواند برای شناسایی سرطان پروستات مورد استفاده قرار گیرد. هایپرمتیلاسیون پروموتور GSTP1 به‌منزله بهترین نشانگر DNA بر اساس این بیماری، در حال حاضر در دسترس است (۱۰) GSTP1 میزان متیلاسیون هسته سرطانی را مشخص می‌کند. اگر سطح GSTP1 بالا باشد به‌طور یقین مقدار آستانه متیلاسیون نیز بالا است (۷). با حساسیت بالای ۹۰٪ (۱۰,۱۱,۱۸,۲۵)؛ و یک ویژگی ۸۵٪-۱۰۰٪ در سرطان پروستات یافته می‌شود (۱۰). در بعضی از مطالعات این حساسیت حدود ۱۰۰٪ گزارش شده است. (۴).

آنزیم گلوکوتاتیون S-ترانسفرازها GSTP1 یا GSTP1 پروتئینی است عضوی از خانواده GST است (۱۱). یکی از بیومارکرهایی است در سم‌زدایی مواد سرطان‌زا و سموم و در ترمیم غیرمستقیم DNA نقش دارد (۱۲). در سرطان پروستات ناحیه ۵ پروموتور این ژن متیله می‌شود. میزان این متیلاسیون در سرطان پروستات بسیار بالا است. هایپرمتیلاسیون این ژن باعث خاموشی این ژن و درنهایت منجر به کاهش بیان ژن می‌شود. دارای حساسیت ۹۰٪-۹۶٪ (۱۳)؛ و ویژگی ۸۵٪-۱۰۰٪ دارد است (۱۰). زمانی که GSTP1 خاموش است سلول‌های

پروستات نسبت به عوامل محیطی مانند اکساینده‌ها آسیب‌پذیرتر می‌شوند (۱۴). متیلاسیون پروموتور GSTP1 عمدتاً در سرطان پروستات و برخی از ضایعات نئوپلازی با درجه بالا HGPIN مشاهده می‌شود (۱۵،۱). به نظر می‌رسد PIN پیشرو سرطان پروستات است (۱۶).

## مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر سفارش ساخت کاوشگرها فلورسئین زا و توالی هدفها از شرکت Bioner کره جنوبی تهیه شد. کاوشگر و توالی هدفها به صورت خشک تهیه شدند. در جدول مشخصات کاوشگر و توالی هدفها بکار رفته در این مطالعه آورده شده است.

## ویژگی‌های حسگر زیستی بر اساس نانو مواد گرافن

این توالی با استفاده از نرم افزار oligo بر اساس توالی‌های مربوط به ژن GSTP1 طراحی شده از طریق شرکت Bioner کره جنوبی تهیه گردید (جدول ۱). لازم است که برای نشان‌دار کردن کاوشگر رنگ فلورسنت زایی FAM استفاده شد.

جدول (۱): توالی الیگونوکلوئید مورد استفاده برای بررسی بیان ژن‌های GSTP1

ژن	لوکوس	طول DNA	توالی کاوشگر (۳' به ۵')	توالی هدف
GSTP1	11q13	19	5' ATG CGA CCC TCC GGG ACG G3'	5' CCG TCC CGG AGG GTCGCAT3'

## دستگاه Spectro Fluorometer

دستگاه spectro fluorometer مدل FP-750 شرکت Jasc بکار رفته است.

## سنتز GO

پیش از استفاده، (۱۰) میلی‌گرم اکسید گرافن GO در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و پس از آن به مدت یک ساعت sonicated و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ در سانتریفوژ قرار می‌دهیم؛ و سپس در ۴ °C ذخیره می‌کنیم.

## آماده‌سازی یک روش بر پایه نانو ذرات کربنی گرافن اکسید

به منظور یک روش بر پایه نانو ذرات کربنی گرافن اکسید، ابتدا شرایط برای تثبیت الیگونوکلوئیدهای مربوط به ژن‌های هدف در سطح نانو ذرات گرافن بهینه‌سازی شده است. برای بهینه‌سازی فاکتورهای زمان، غلظت گرافن اکسید، در نظر گرفته شد. برای بهینه‌سازی غلظت گرافن اکسید، با ۱۰ میکرو لیتر توالی الیگونوکلوئیدی مخلوط گردید. با توجه به اینکه توالی الیگونوکلوئیدی DNA (DNA کاوشگر) می‌تواند از طریق پیوندهای کوالان به سطح اکسید گرافن متصل شوند و اتصال آن‌ها باعث کاهش نشر فلورسانسی کاوشگر می‌گردد. برای بهینه‌سازی زمان، مدت‌زمان واکنش DNA کاوشگر و غلظت گرافن اکسید بهینه‌سازی گردید. برای این منظور کاهش نشر فلورسانس در زمان‌های مختلف خوانده شد و بیشترین مقدار کاهش به‌عنوان بهینه‌ترین زمان در نظر گرفته شد.

## زمان بهینه برای تثبیت اکسید گرافن روی ژن GSTP1

جدول (۲): زمان بهینه برای تثبیت اکسید گرافن روی پروب GSTP1

شماره	بافر تریس ( $\mu\text{I}$ )	پروپ GSTP1 ( $\mu\text{I}$ )	GO ( $\mu\text{I}$ )	زمان بر حسب دقیقه	ماکسیمم طول موج
۱	۱۹۸۰	۱۰	۱۰	۲	۲۹۴
۲	۱۹۸۰	۱۰	۱۰	۴	۱۴۳
۳	۱۹۸۰	۱۰	۱۰	۶	۷۹
۴	۱۹۸۰	۱۰	۱۰	۸	۴۹
۵	۱۹۸۰	۱۰	۱۰	۱۰	۳۵
۶	۱۹۸۰	۱۰	۱۰	۱۲	۲۶
۷	۱۹۸۰	۱۰	۱۰	۱۴	۲۲
۸	۱۹۸۰	۱۰	۱۰	۱۶	۱۸

## غلظت‌های بهینه اکسیدگرافن برای ژن GSTP1

جدول (۳): غلظت‌های بهینه اکسیدگرافن برای پروب GSTP1:

شماره	بافر تریس ( $\mu\text{I}$ )	پروب GSTP1 ( $\mu\text{I}$ )	GO ( $\mu\text{I}$ )	ماکسیمم طول موج
۱	۱۹۹۰	۱۰	۰	۱۲۲
۲	۱۹۸۸	۱۰	۲	۶۴
۳	۱۹۸۵	۱۰	۵	۷
۴	۱۹۸۳	۱۰	۷	۴۵
۵	۱۹۸۰	۱۰	۱۰	۱
۶	۱۹۷۸	۱۰	۱۲	۱
۷	۱۹۷۵	۱۰	۱۵	۰.۵
۸	۱۹۷۰	۱۰	۲۰	۰.۶
۹	۱۹۶۵	۱۰	۲۵	۰.۵

## استخراج RNA کل از بافت تومور سرطان پروستات

استخراج RNA کل از نمونه بافت سرطانی پروستات و سالم با استفاده از روش ترايزول استخراج شد. برای استخراج RNA ابتدا ۵۰ میلی‌گرم از بافت سرطانی به هر میکروتیوب منتقل کرده به میزان ۱ میلی‌لیتر ترايزول اضافه می‌گردد. پس از مخلوط کردن، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شود سپس ۲۰۰ میکرو لیتر کلروفرم به مخلوط اضافه کرده و به مدت ۱۵ ثانیه با تکان ملایم (نه شدید) مخلوط می‌گردد. در ادامه مخلوط به دست‌آمده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌شود. بعد از سانتریفیوژ فاز رویی را به ویال‌های جدید استریل انتقال داده سپس به اندازه هم‌حجم فاز رویی ایزوپروپانول اضافه گردید. بعد از اضافه کردن ایزوپروپانول مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده می‌شود. سپس مخلوط حاصل با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌شود. بعد از سانتریفیوژ فاز رویی را دور ریخته و رسوب مربوط به RNA با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵٪ شستشو داده می‌شود. در نهایت RNA حل‌شده در اتانول، با سرعت ۷۵۰۰ rpm به مدت ۸ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ فاز رویی را دور ریخته و رسوب حاصل خشک (رسوب RNA نباید کامل خشک گردد) خواهد شد. در نهایت رسوب خشک‌شده را در



## شناسایی DNA هدف با استفاده از کاوشگر ژن GSTP1

به منظور بهینه‌سازی شرایط واکنش برای شناسایی توالی CDNA ژن GSTP1 ابتدا کاوشگر تثبیت‌شده در سطح گرافن برای شناسایی توالی مکمل آن مورد استفاده قرار گرفت و شرایط واکنش برای توالی مکمل بهینه‌سازی گردید. در بهینه‌سازی عملکرد کاوشگر تثبیت‌شده در سطح گرافن برای شناسایی توالی مکمل (توالی هدف) فاکتورهای زمان و غلظت‌های مختلف توالی مکمل بهینه‌سازی گردید بهترین غلظت توالی مکمل، غلظتی است که بیشترین نشر فلورسانسی را نشان دهد به عبارت دیگر در اثر اتصال توالی مکمل به DNA کاوشگر در سطح گرافن جدا شده و باعث ظاهر شدن نشر فلورسانس می‌گردد.

## شناسایی و بررسی میزان کمی cDNA مربوط به ژن GSTP1 با استفاده از کاوشگر تثبیت‌شده در سطح گرافن

بعد از بهینه‌سازی عملکرد کاوشگر، cDNA مربوط به نمونه‌های بیماران سرطان پروستات مورد بررسی قرار می‌گیرد. در واکنش هیبریداسیون به جای DNA مکمل توالی cDNA بیماران استفاده گردید؛ که با توجه به مکمل بودن کاوشگر با توالی، cDNA اتصال کاوشگر به cDNA موجب جدا شدن کاوشگر از سطح گرافن می‌شود.

## نتایج

بعد از سنتز نانو ذرات اکسید با میکروسکوپ TEM آنالیز شد که نتایج مربوط به میکروسکوپ الکترونی TEM نانو ذرات گرافن اکسید را تائید نمود (شکل ۱).



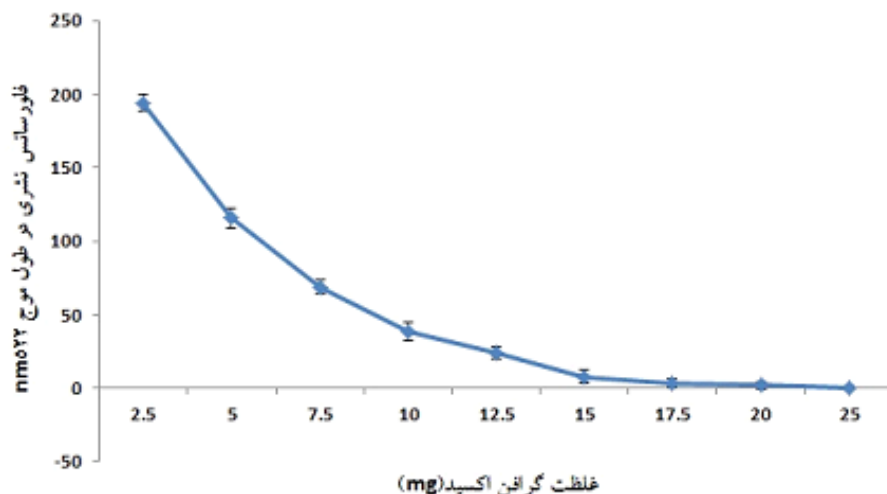
شکل (۱): نانو ذرات گرافن با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM

## سنتر cDNA مربوط به ژن های GSTP1:

CDNA مربوط به ژن GSTP1 با استفاده از RNA کل استخراج شده از بافت تومور توسط کیت آنزیم (M- Reverse Transcriptase MuLV) سنتز شد.

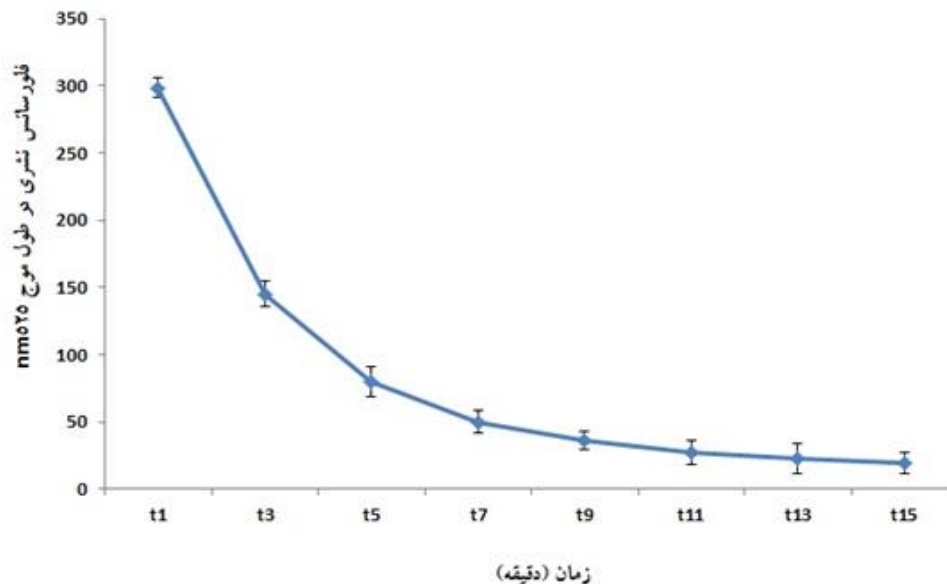
## بهینه سازی تثبیت کاوشگر مربوط به ژن های GSTP1 در سطح نانوذره گرافن

به منظور آماده سازی کاوشگر فاکتورهای مربوط به اتصال DNA مربوط به کاوشگرهای ژن GSTP1 به سطح نانو ذرات کربنی گرافن و همچنین غلظت نانوذره کربنی گرافن بهینه سازی گردید. بر اساس نتایج مربوط به نشر فلورسانس بهینه ترین زمان برای ژن های GSTP1 ۱۳ دقیقه محاسبه گردید. در این زمان ها کل مولکول های DNA کاوشگر به سطح نانو ذرات گرافن متصل شده اند به طوری که نشر فلورسانسی کاملاً خاموش گردید. علاوه بر زمان غلظت گرافن نیز بهینه سازی گردید و بهینه ترین غلظت، غلظت ۱,۵ میکروگرم ۲,۵ میکروگرم تعیین شد. در بهینه غلظت گرافن زمانی است که بتواند بیشترین کاهش در نشر فلورسانس را برای ما تولید کند. (نمودار ۱ و ۲).



نمودار (۱): بهینه سازی غلظت گرافن اکسید جهت تثبیت کاوشگر GSTP1 در سطح آن

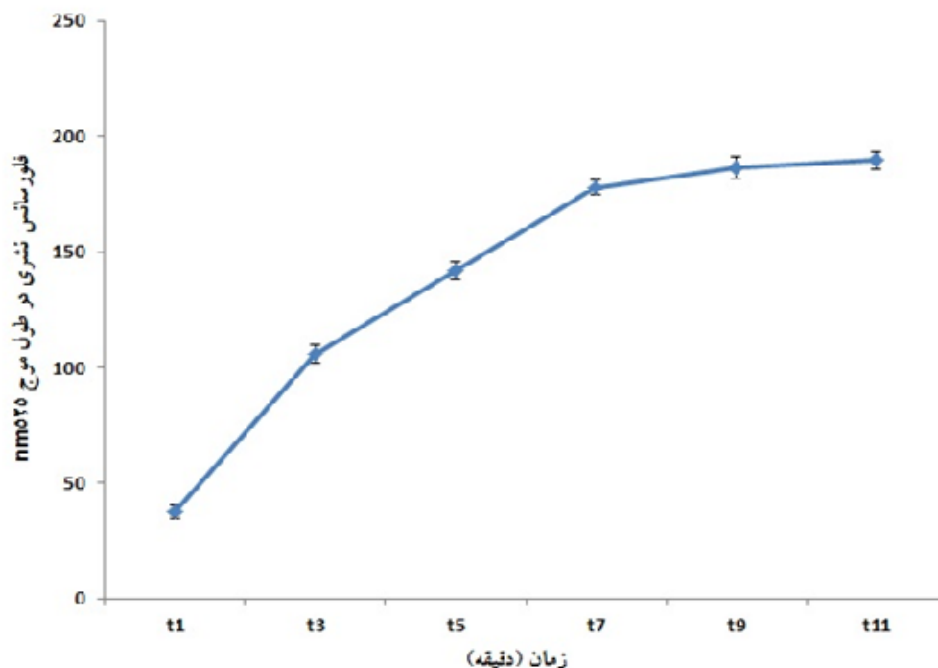




نمودار (۲): بهینه سازی زمان تثبیت کاوشگر GSTP1 به سطح گرافن اکسید

### بهینه سازی واکنش هیبریداسیون توالی کاوشگر GSTP1 تثبیت شده در سطح گرافن با توالی مکمل و توالی هدف:

در این مرحله توالی های مکمل مربوط یا هدف به کاوشگر GSTP1 در واکنش هیبریداسیون استفاده شده اند و شرایط واکنش برای هیبریداسیون بهینه سازی گردید. بهینه سازی واکنش هیبریداسیون ژن GSTP1 برابر ۷ دقیقه محاسبه شد. نتایج مربوط به نشان دار کردن با افزایش غلظت DNA هدف میزان نشر افزایش می یابد. با توجه به نتایج، بیشترین نشر فلورسانس در غلظتی مشاهده شد که تمامی مولکول های کاوشگر در سطح گرافن با توالی هدفشان بازماند بهینه شده هیبرید گردید (نمودار ۳).

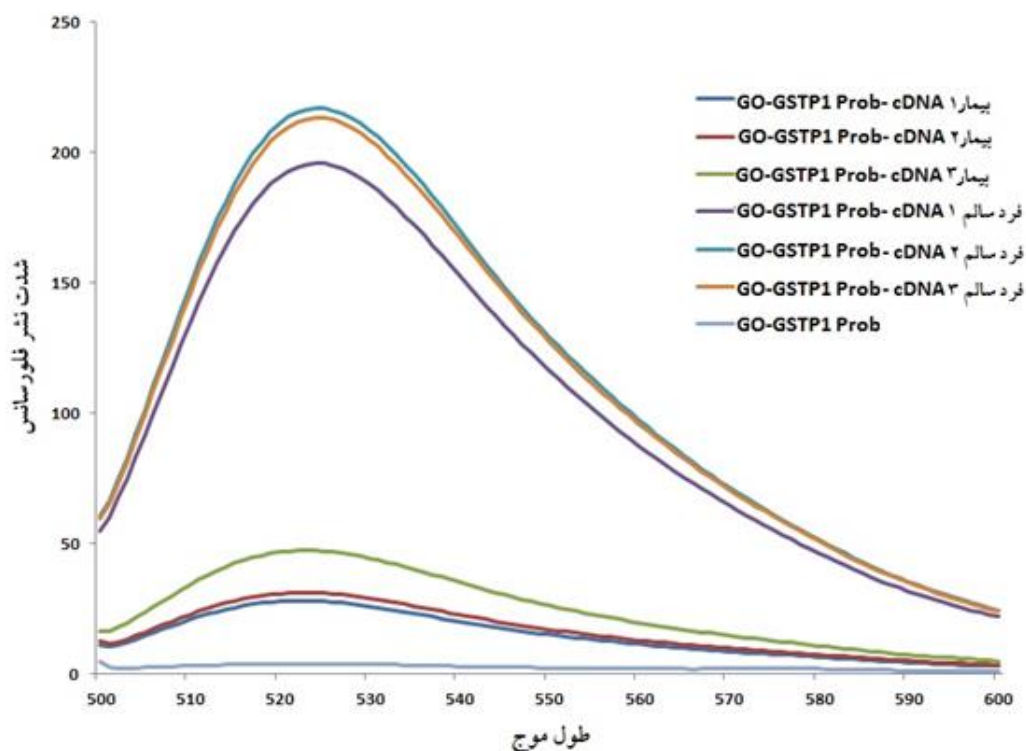


نمودار (۳): بهینه سازی زمان اتصال DNA هدف به GSTP1 تثبیت شده به سطح گرافن اکسید

شناسایی cDNA مربوط ژن GSTP1 با استفاده از کاوشگر تثبیت شده در سطح نانو ذرات گرافن

اکسید:

بعد از بهینه سازی شرایط واکنش هیبریداسیون با توالی مکمل سنتتیک واکنش هیبریداسیون با cDNA مربوط به نمونه فرد سرطانی انجام پذیرفت. نتایج نشان می دهد که میزان نشر فلورسانس در نمونه های مربوط به بیماران سرطان پروستات به طور معنی داری نسبت به نمونه های فرد سالم کمتر می باشد؛ که نشان دهنده کاهش بیان این ژن در فرد بیمار سرطان پروستات می باشد (نمودار ۴).



نمودار (۴) شناسایی SDNA مربوط ژن GSTP1 با استفاده از کاوشگر تثبیت شده در سطح نانوذرات گرافن اکسید

## بحث

سرطان پروستات یک بیماری هتروژن (۱۱) پنجمین سرطان شایع در جمعیت و دومین سرطان رایج در جمعیت مردان بعد از سرطان ریه است (در کشورهای غربی) (۲). عامل ایجاد این بیماری تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی می باشد که این تغییرات باعث تغییر عملکرد برخی ژن ها و نهایتاً سرطانی شدن سلول ها می باشد (۱۷). از ژن های مهم عامل این بیماری GSTP1 می باشد (۱۵، ۱۸)؛ که در ژن GSTP1 تغییر در الگوی متیلاسیون این ژن باعث کاهش بیان آن، در بیماران سرطان پروستات می باشد (۳). با توجه به اینکه متیلاسیون GSTP1 در ۹۰٪ سرطان پروستات، ۳۰٪ سرطان سینه، ۲۵٪ سرطان کبد، کمتر از ۱۰٪ در سرطان کلیه و مثانه یافته می شود؛ و سرطان پروستات یک بیماری مردان و سرطان کبد در غرب نادر است آنالیز متیلاسیون GSTP1 یک ویژگی در حدود ۹۰٪ ارائه می دهد (۳).

بنابراین برای استراتژی بهتر، روش‌های مبتنی بر نشانگرها، فناوری نانو و تصویربرداری موردنیاز است. اشکال مختلف فناوری نانو اغلب با روش‌های دیگر، از جمله نشانگرهای زیستی به منظور تشخیص سرطان پروستات با دقت بیشتر ترکیب شود (۷). در این پروژه سعی شده است یک روش کمی برای سنجش بیان این ژن‌ها بر پایه نانو ذرات گرافن اکسید بهینه‌سازی بشود.

نانو ذرات گرافن اکسید، ذراتی هستند که از تک لایه‌اتم کربن تشکیل شده‌اند (۱۹،۲۰)؛ و این صفحات کربنی می‌تواند به صورت کووالان و غیر کووالان با مولکول‌های زیستی اثر متقابل داشته باشد مولکول‌های DNA در حالت تک‌رشته‌ای، از طریق پیوندهای  $\pi-\pi$  و واکنش‌های آب‌گریز و پیوندهای هیدروژنی و نیروی واندروالسی به صفحات گرافن متصل شده‌اند این اتصالات پایدار بوده، به طوری که بعد از چند بار شستشو حتی جدا نمی‌شود (۲۱،۲۲).

بعد از اضافه شدن توالی مکمل DNA و هیبریداسیون آن با توالی متصل شده به گرافن DNA دو رشته‌ای از سطح صفحات گرافن جدا می‌شوند (۲۲). این جدا شدن تنها زمانی امکان‌پذیر است که رشته‌ای مکمل وجود داشته باشد. در این پروژه بر پایه خواص صفحات گرافن کاوشگرهای مربوط به ژن‌های GSTP1 به سطح صفحات گرافن تثبیت شده‌اند. کاوشگر متصل به ماده فلورسئین‌زا بوده در اثر تثبیت کاوشگر، فلورسئین نثری آن حذف شده این پدیده نشان‌دهنده این است که صفحات گرافن به‌عنوان خاموش‌کننده فلورسئین عمل می‌کنند. در منابع خاصیت خاموش‌کنندگی گرافن اثبات شده است (۱۹،۲۲،۲۳). در مراحل تثبیت کاوشگر فاکتورهای زمان و غلظت بهینه‌سازی شد تا اینکه غلظت بهینه و زمان بهینه مشخص شد که بعد از مدت زمان ۱۱ برای کاوشگر GSTP1 به دست آمد. این مدت‌زمان، زمانی است که تمامی مولکول‌های DNA کاوشگر به سطح صفحات گرافن متصل شده‌اند. در واقع بهینه زمان یا به عبارتی زمان تثبیت، زمان اتصال کاوشگر به سطح گرافن، زمانی تأیید شد که تمامی نور فلورسئین خاموش گردید. در بهینه‌سازی فاکتور غلظت ۱،۵ میکروگرم برای کاوشگر GSTP1 انتقال شد. این غلظت، غلظتی از گرافن است که تعداد مولکول‌های گرافن توانسته که کل مولکول‌های DNA کاوشگر را به سطح خود جذب کند.

بعد از تثبیت توالی هدف و مکمل مربوط به کاوشگر GSTP1 برای واکنش هیبریداسیون استفاده شده است. انجام واکنش هیبریداسیون کاوشگر GSTP1 فلورسانس نثری ظاهر شد. دلیل این پدیده دو رشته‌ای شدن در اثر هیبریداسیون با توالی مکمل می‌باشد و جدا شدن DNA دو رشته‌ای از سطح صفحات گرافن

است. در اثر جدا شدن DNA کاوشگر افزایش دوباره فلورسانس نشری در طول موج ۵۲۰ حاصل می‌شود. این پدیده در گزارشات منابع قبلی نیز تأیید شده است. با افزایش غلظت توالی پیوسته فلورسانس نشری افزایش می‌یابد. تقریباً نزدیک به مقدار فلورسانس نشری خود کاوشگر است.

بعد از بهینه‌سازی شرایط واکنش، با توالی مکمل سنتتیک، این روش برای سنجش بیان ژن GSTP1 در نمونه بیماران سرطان پروستات نیز آزمایش شد.

از نمونه بافت سرطان پروستات، با استفاده از کاوشگر میزان تعداد نسخه‌های cDNA و میزان بیان ژن GSTP1 مورد ارزیابی قرار گرفت؛ و در واکنش هیبریداسیون نمونه cDNA بافت تومور پروستات مورد استفاده قرار گرفت. در رابطه ژن GSTP1 نشر فلورسئینی کمتری نسبت به نمونه سالم نشان داد. این نشان‌دهنده این است که تعداد نسخه‌های مربوط به cDNA ژن GSTP1 در نمونه سالم بیشتر از نمونه مریض می‌باشد. در منابع نیز کاهش بیان ژن GSTP1 گزارش شده است (۱۵،۲۴).

۱- مطالعات انجام شده در مصر در مورد مردان ۵۰-۷۹ ساله در سال ۲۰۰۷-۲۰۰۹ نشان داد. در حدود ۹۰/۹٪ از DNA جمع‌آوری شده از بیماران سرطان پروستات متیلاسیون GSTP1 در آن‌ها مثبت است؛ و در گروه کنترل متیلاسیون GSTP1 مثبت در حدود ۴۰٪ مشاهده می‌شود (۲۵).

۲- Goessl و همکارانش متیلاسیون GSTP1 در ۷۲٪ در سرم و ۵۰٪ از نمونه بیماران مبتلابه سرطان پروستات و ۳۶٪ در نمونه ادرار بیماران سرطان پروستات پیدا کرده‌اند؛ اما در هیچ‌کدام از مایعات بدن بیماران گروه کنترل خوش‌خیم (BPH) نبود (۳).

این مطالعه برای اولین بار ارتباط بین ژن گلوکوتاتیون S- ترانسفراز و آنتی‌ژن اختصاصی پروستات را در بیماری سرطان پروستات را در ایران با استفاده از تکنیک‌های نانو حسگر زیستی مبتنی بر اکسیدگرافن گزارش می‌کند؛ و ارتباط معنی‌داری بین این ژن و بیماری ارائه می‌دهد؛ که می‌تواند یک خط مبنای اولیه برای ارزیابی سرطان پروستات در مراحل اولیه باشد. در این پروژه نیز افزایش نشر فلورسانسی و معنی‌دار بودن و اختلاف آن نسبت به نمونه شاهد نشان‌دهنده آن این است که بیان این ژن در نمونه‌های مریض افزایش یافته است.

نتایج تحقیق نشان داد که با استفاده از یک روش مبتنی بر نانو ذرات گرافن اکسید می‌توان میزان بیان ژن GSTP1 در نمونه‌های بیمار و سالم مورد بررسی قرار داد.

## نتیجه گیری

واکنش هیپریداسیون، cDNA مربوط به نمونه‌های بیماران سرطان پروستات و سالم در اثر هیپرید شدن الگوی نشر فلورسانس متفاوت را نشان داد. میزان بیان ژن GSTP1 نمونه بیمار نسبت به GSTP1 نمونه سالم به‌طور معنی‌داری کمتر ( $p < 0.01$ ) مشاهده شد.

## منابع

۱. کمال یآوری زهرا ابطحایی، نانو ذرات در تشخیص‌های بالینی مولکول‌های زیستی (DNA) و پروتئین در بیماری‌ها، ماهنامه فناوری نانو فرودین، ۱۸، ۱۷، ۱۶، ۱۵، ۱۰، ۱۳۸۶.
2. Nelen, Vera, Epidemiolog of prostate cancer, springer-verlag Berlin Heidelberg. 175, 2007, 6, 7.
3. Hafiz Ahmed, Promoter Methylation in Prostate Cancer and its Application for the Early Detection of Prostate Cancer Using Serum and Urine Samples, Libertos Academica. 2010, 18, 19, 21, 28, 25.
4. Raluca Dumache, Victor Dumitrascu, Radu Minciu<sup>3</sup>, Dana David, Anca Tudor, Bogdan Bumbacila, Maria Puiu, MINIMALLY INVASIVE PROSTATE CANCER DIAGNOSIS BY GLUTATHIONE S-TRANSFERASE P1(GSTP1) GENE METHYLATION ANALYSIS IN SERUM SPECIMENS, 2011, 158, 159.
5. Ann W. Hsing, Hormones and Prostate Cancer: What's Next? by the Johns Hopkins University Bloomberg School of Public Health, 2001, 42, 43, 45, 49.
6. Chikezie O. Madu and Yi Lu, Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer, Journal of Cancer. 2010, 151, 154, 169.
7. James Schwoebe, Carolyn Carlson, Yazdan Raj, Virginia Lin, Angie Kamino, Jim Overholt Pharan Evans, Rachel Spivey, and Choon Hwai Yap, Prostate cancer screening: a quantitative model for present and future method evaluation, 2011, The Journal of Young Investigators 95, 97, 98, 100.
8. Patrick J. Bastian, Srinivasan Yegnasubramanian, Ganesh S. Palapattua, Craig G. Rogers, Xiaohui Lin, Angelo M. De Marzo, William G. Nelson, Molecular Biomarker in Prostate Cancer: The Role of CpG Island Hypermethylation, European Urology 46, 2004, 700, 701.
9. Xiaohui Lin, Metin Tascilar, Wen-Hsiang Lee, Wouter J. Vles, Byron H. Lee, GSTP1 CpG Island Hypermethylation Is Responsible for the Absence of GSTP1 Expression in Human Prostate cancer cells
10. Veronique Phé, Olivier Cussenot and Morgan Rouprêt, Methylated genes as potential biomarkers in prostate cancer, BJUI. 105, 2010, 1365, 1366.
11. ALFONSO URBANUCCI, Overexpression of Androgen Receptor in Prostate. Cancer, UNIVERSITY OF TAMPERE, 2012, 18.
12. Sergio Bernardina, Roberto Mianob, Roberta Ioria, Enrico Finazzi-Agro, Giampiero Palmieric, Sabrina Ballerina, Caterina Angelonic, Augusto Orlandi, Lorenza Bellincampia, Claudio Cortesea, Giorgio Federici, Hypermethylation of the CpG islands in the promoter

- region of the GSTP1 gene in prostate cancer: a useful diagnostic and prognostic marker. 2004, *Clinica Chimica Acta* 350,182.
13. Harden Susan V, Sanderson Harriette, Goodman Steven N, al. Quantitative GSTP1 Methylation and the Detection of Prostate Adenocarcinoma in Sextant Biopsies. 2003, *Journal of the National Cancer Institute* 1634.
  14. Zdenko Herceg, Pierre Hainaut. Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection diagnosis and prognosis, 2007, *MOLECULAR ONCOLOGY* 1,31.
  15. Arul Chinnaiyan, M.D. Ph.D, Prostate and Other Urological Cancers, Principal Investigator University of Michigan, 2008, 58.
  16. Domenico Prezioso, Louis J Denis, Helmut Klocker, Alexandria Sciarra, Mario Reis, Kurt Naber, Bernard Lobel, Dalibor Pacik and Keith Griffiths, Estrogens and aspects of prostate disease, *International Journal of Urology*, 14.2007, 2,3,4,5.
  17. Jianping Lei and Huangxian Ju, Signal Amplification Using Nanomaterials for Biosensing, *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors*. 2013, 36.
  18. Xu-Hua Zhao, Qiu-Juan Maa, Xiang-Xiang Wu, Xin Zhu, biosensor for sensitive fluorescence detection of DNA, based on exonuclease III-aided signal amplification, 2012, *Analytica Chimica Acta* 727, 67.
  19. Kai 2 Xu, Junran Huang, Zunzhong Ye, Yibin Ying, and Yanbin Li Recent Development of Nano-Materials Used in DNA Biosensors, *Sensors* 9, 2009, 5535, 5536, 5541.
  20. Ying Wang, Zhaohui Li, Jun Wang, Jinghong Li and Yuehe Lin, Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology, *cell Press*, 2011, 205.
  21. Biwu Liu, Ziyi Sun, Xu Zhang, and Juewen Liu Mechanisms of DNA Sensing on Graphene Oxide, *analytical chemistry*. 85, 2013, 85, 7987, 7988.
  22. Joon Soo Park, Nam-In Goo, and Dong-Eun Kim Mechanism of DNA Adsorption and Desorption on Graphene Oxide, *pubs.acs.org/Langmuir*. 2014, 30, 12587, 12588, 12589, 12587.
  23. Liang Cui, Xiaoyan Lin, Ninghang Lin, Yanling Song, Zhi Zhu, Xi Chen and Chaoyong James Yang, Graphene oxide-protected DNA probes for multiplex microRNA analysis in complex biological samples based on a cyclic enzymatic amplification method, *ChemComm*, 48, 2012, 194.
  24. TM Beer, AJ Evans, KM Hough, BA Lowe, JE McWilliams & WD Henner, Polymorphisms of GSTP1 and related genes and prostate cancer risk, *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 2002, 22, 23.
  25. MONA L. ESSAWI, M.D; SAMY A. ABD EL-AZIM, Ph.D; AHMED A. MORSY, M.D. and HEBA A. HASSAN, B.Sc, Assessment of GSTP1 Gene Methylation in Early Detection of Prostate Cancer in Egyptian Patients, *Med. J. Cairo Univ*. 2010, 298, 298.