

Comparison of A13871G polymorphism in the cytochrome P450 3A4 (*CYP3A4*) gene in Iranian healthy people from West Mazandaran in terms of age and sex

Fatemeh Heidarian¹, Vida Hojati^{1*}, Reza Golijani Moghadam²

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

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

Abstract

Aim and Background: Cytochrome P450 3A4 (*CYP3A4*) from the family of oxidizing enzymes is the most important enzyme in the metabolism of poisons and drugs, which is usually found in the liver and intestine, and its gene is located on chromosome 7q22.1. Since few studies have been done on the polymorphisms of this gene, this study was conducted in order to investigate the polymorphism (*CYP3A4* (A13871G) in healthy male and female subjects of different ages in the west of Mazandaran.

Material and Methods: Whole blood was received. ARMS-PCR technique was used in this research, which is a simple method to detect any mutation including base changes or small deletions. Data analysis using SPSS 2016 software and the chi-square test was performed.

Results: The results showed that most of the studied subjects had the AG mutated heterozygous genotype, the frequency of which was 67.96%. There was no significant relationship between the frequency of the genotype and the age of the patients ($p < 0.05$). In the studied population, 50 people were female and 38 were male. In the female sex, 33 people have a heterozygous genotype with a frequency of 66%, 7 people have a dominant homozygous genotype with a frequency of 14%, 6 people have a recessive homozygous genotype with a frequency of 12%, and 4 people had no mutation with a frequency of 8%. In males, 25 people have a heterozygous genotype with a frequency of 65.78%, 3 people have a dominant homozygous genotype with a frequency of 7.89%, 5 people have a recessive homozygous genotype with a frequency of 13.15% the 5 people have no mutation with the frequency was 13.15%. Also, in both sexes, the heterozygous genotype showed the highest percentage of frequency.

Conclusion: According to the results, there is no significant relationship between genotype frequency and gender and genotype frequency and age ($p < 0.05$).

Keywords: Polymorphism, age, gender, *CYP3A4*, A13871G, ARMS-PCR.

مقایسه پلی‌مورفیسم A13871G در ژن سیتوکروم P450 3A4 (CYP3A4)

در افراد سالم غرب مازندران از نظر سن و جنس

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

چکیده

سابقه و هدف: CYP3A4 (سیتوکروم P450 3A4) از خانواده آنزیم‌های اکسیدکننده، مهم‌ترین آنزیم در متابولیسم سموم و داروهاست که معمولاً در کبد و روده یافت می‌شود و ژن آن روی کروموزوم 7q22.1 قرار دارد. به دلیل اهمیت این آنزیم و از آنجاکه مطالعات اندکی روی پلی‌مورفیسم‌های این ژن صورت گرفته، این مطالعه به منظور بررسی پلی‌مورفیسم CYP3A4 (A13871G) در افراد سالم مذکر و مونث در سنین مختلف در غرب مازندران انجام گردید.

مواد و روش‌ها: جهت انجام پژوهش از افراد مورد مطالعه خون تام دریافت شد. در این تحقیق از تکنیک ARMS-PCR استفاده شد و یک روش ساده برای تشخیص هرگونه جهشی شامل تغییرات پایه یا حذف‌های کوچک می‌باشد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 2016 و آزمون مربع‌کای انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که بیشترین افراد مورد مطالعه دارای ژنوتیپ هتروزیگوت جهش‌یافته AG بودند که فراوانی آن ۶۷/۹۶ درصد بود. بین فراوانی ژنوتیپ و سن بیماران ارتباط معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$). در جمعیت مورد مطالعه، ۵۰ نفر زن و ۳۸ نفر مرد بودند. در جنس مؤنث، ۳۳ نفر دارای ژنوتیپ هتروزیگوت با فراوانی ۶۶ درصد، ۷ نفر دارای ژنوتیپ هموزیگوت غالب با درصد فراوانی ۱۴ درصد، ۶ نفر دارای ژنوتیپ هموزیگوت مغلوب با درصد فراوانی ۱۲ درصد و ۴ نفر فاقد جهش با درصد فراوانی ۸ درصد بودند. در جنس مذکر، ۲۵ نفر دارای ژنوتیپ هتروزیگوت با درصد فراوانی ۶۵/۷۸ درصد، ۳ نفر دارای ژنوتیپ هموزیگوت غالب با درصد فراوانی ۷/۸۹ درصد، ۵ نفر دارای ژنوتیپ هموزیگوت مغلوب با درصد فراوانی ۱۳/۱۵ درصد و ۵ نفر فاقد جهش با فراوانی ۱۳/۱۵ درصد بودند. همچنین در هر دو جنس، ژنوتیپ هتروزیگوت بالاترین درصد فراوانی را نشان داد.

نتیجه‌گیری: بنابر یافته‌ها، بین فراوانی ژنوتیپ و جنسیت و فراوانی ژنوتیپ و سن افراد ارتباط معنی‌داری وجود ندارد ($p < 0.05$).

واژگان کلیدی: پلی‌مورفیسم، سن، جنسیت، CYP3A4، A13871G، ARMS-PCR.

مقدمه

امروزه اپیدمیولوژی مولکولی درک ما را نسبت به خطرهای گوناگون ایجادکننده بیماری‌ها گسترش داده است. نه تنها عوامل اکتسابی نظیر عوامل محیطی در ابتلا به بیماری‌ها مؤثر هستند، بلکه عوامل ارثی نظیر پلی‌مورفیسم ژنتیکی نیز در آن دخالت دارند. پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی ممکن

است باعث تغییر در عملکرد پروتئین‌ها شوند. دانشمندان با تجزیه و تحلیل نقشه‌های ژنومی باعث سرعت بخشیدن به تحقیقات در زمینه بیماری‌های انسانی شدند. در گذشته پزشکان با استفاده از عواملی از جمله: سابقه خانوادگی، شرایط اجتماعی، اقتصادی و فاکتورهای محیطی توصیه‌هایی برای درمان و پاسخ به دارو به بیماران ارائه می‌کردند، اما امروزه با استفاده از آزمایش‌های ژنتیکی، ژنومی و پروفایل پروتئوم و تجزیه و تحلیل متابولومیک، توصیه‌هایی برای پزشکی شخصی ارائه می‌نمایند. مسیرهای بسیاری برای اصلاح نقص ژنتیکی و توسعه داروها از طریق ژن-درمانی بر اساس نوع ژن و محصولات ژن وجود دارد (۱). نقش پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی به عنوان نشانگرهای زیستی جهت پیش‌بینی انواع بیماری‌ها مورد بررسی قرار گرفته

نویسنده مسئول:

گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.

پست الکترونیکی: vida.hojati@iau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۴

موتاسیون‌هایی را هم در ناحیه پروموتور و هم ناحیه کدکننده آن گزارش کرده‌اند (۲، ۱۲). با اینکه بیش از ۲۸ پلی‌مورفیسم تکنوکلوتیدی در ژن *CYP3A4* شناسایی شده، و مشخص شده است که این موضوع موجب تفاوت بین فردی قابل توجهی در داخل بدن نمی‌گردد (۷). هدف از پژوهش حاضر بررسی پلی‌مورفیسم ژن *CYP3A4* در موقعیت A13871G در جمعیت سالم غرب مازندران و بررسی رابطه بین فراوانی ژنوتیپ *CYP3A4* (A13871G) با جنسیت و سن افراد و همچنین بررسی درصد فراوانی آللی A و G در جمعیت مورد مطالعه است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

نمونه‌ها شامل ۱۰۳ فرد سالم مرد و زن در محدوده سنی ۷ ماهه تا ۷۹ ساله شهرستان‌های چالوس، تنکابن و رامسر در غرب استان مازندران بودند که تعداد ۱۵ نفر از افراد خون‌گیری شده به دلیل عدم ثبت مشخصات آن‌ها، به عنوان افراد فاقد هویت در نظر گرفته شدند. از کلیه افراد رضایت‌نامه دریافت شد. از شرکت‌کنندگان خون تام گرفته و در ویال‌های حاوی EDTA و در دمای ۲۱- درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای هر فرد مورد مطالعه اطلاعات مربوط به سن، جنس، سابقه خانوادگی، 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 شد.

مراحل استخراج DNA از خون تام

۱۰۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده سلول به ۵۰۰ میکرولیتر خون داخل ویال اضافه و تکان داده شد. سانتریفوژ rpm ۴۵۰۰ به مدت ۴ دقیقه و سپس سوپرناتانت دور ریخته شد. ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده سلول اضافه و با پیپت مخلوط شد تا رسوب به خوبی حل شد. سانتریفوژ rpm ۴۵۰۰ به مدت ۴ دقیقه انجام و سوپرناتانت دور ریخته شد. مراحل ۴ و ۵ تکرار شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده هسته اضافه و رسوب به طور کامل حل شد و در دمای محیط به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شد. ۱۰۰ میکرولیتر سدیم کلرید ۵ مولار اضافه و ترکیب شد. ۶۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه گردید و نمونه‌ها نسبتاً سریع تکان داده شدند. سانتریفوژ در rpm ۴۵۰۰ دور به مدت ۴ دقیقه انجام و فاز رویی با دقت به ویال جدید منتقل شد. ۶۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق سرد اضافه شد. نمونه (۵ تا ۶ بار میکروتیوب وارونه شد) به آرامی تکان داده شد. سانتریفوژ

است (۲). مهمترین اهمیت پلی‌مورفیسم در شناسایی تفاوت‌های فردی و شناسایی آن‌ها در افراد بیمار و مقایسه آن با افراد سالم است. ژنوم افراد مختلف تقریباً ۹۹/۹ درصد مشابه یکدیگر است اما تفاوت در همان ۰/۱ درصد منجر به ۱۱ میلیون نوع پلی‌مورفیسم ژنی می‌شود (۳). تفاوت جهش و پلی‌مورفیسم از روی میزان فراوانی آللی در جمعیت مشخص می‌شود. اگر فراوانی آللی بیش از ۱ درصد باشد پلی‌مورفیسم و اگر کمتر از ۱ درصد باشد به عنوان جهش شناخته می‌شوند (۴). سیتوکروم P450 آنزیم اصلی دخیل در متابولیسم مواد مخدر و آنزیم موجود در کبد در سطوح بالا می‌باشد و در واقع یک هموپروتئین است. وجود آنزیم‌های سیتوکروم P450 در همه موجودات زنده و در برخی ویروس‌ها مشاهده شده است (۵، ۶). *CYP3A4* (سیتوکروم P450 3A4) از خانواده آنزیم‌های اکسیدکننده و مهم‌ترین آنزیم در متابولیسم سموم و داروهاست که معمولاً در کبد و روده یافت می‌شود و ژن آن روی کروموزوم 7q22.1 قرار دارد. *Cyp3A4* ایزوآنزیم اصلی از دسته سیتوکروم P450 در کبد انسان بالغ بوده و عامل متابولیسم تعداد زیادی از ترکیبات فعال بیولوژیک با منشا خارجی و سوبستراهای آندوژن است. سطوح کبدی این آنزیم در افراد مختلف متفاوت بوده و دلیل این تفاوت تابه‌حال ناشناخته مانده است ولی می‌تواند علل ژنتیکی، محیط‌زیستی، حالت‌های پاتولوژیک، هورمونی و یا مربوط به تغذیه داشته باشد (۷). بسیاری از سوبستراهای *CYP3A4* دارای سمیت قابل توجهی هستند و برخی از بیماران ممکن است با مصرف هم‌زمان مهارکننده‌های *CYP3A4* دچار سمیت شدید شوند. برخی از داروها، مانند کلاریترومایسین، ایتراکونازول، کتوکونازول، نفازودون، نلفیناویر و ریتوناویر مهارکننده‌های قوی *CYP3A4* هستند. بیمارانی که از این داروها استفاده می‌کنند ممکن است به طور قابل توجهی دچار کاهش فعالیت *CYP3A4* شوند. سوبستراهای آنزیم *CYP* شامل واسطه‌های متابولیک مانند لیپیدها و هورمون‌های استروئیدی و همچنین به عنوان مواد زنبیوتیک مانند مواد مخدر و سایر مواد شیمیایی سمی هستند (۸). پروتئین *Cyp3A4* به وسیله ژن *Cyp3A4* کد می‌شود. گرچه *Cyp3A4* بیشترین فراوانی را در بین آنزیم‌های P450 در کبد دارد اما در اندام‌ها و بافت‌های دیگر بدن نیز حضور دارد (۹، ۱۰). سطوح فعالیت *Cyp3A4* به رژیم غذایی و عوامل محیطی مربوط می‌شود از جمله مدت زمانی که در معرض مواد زنبیوتیک (بیگانه‌زیست) قرار می‌گیرد (۱۱). اگرچه نشانه‌ای از پلی‌مورفیسم *Cyp3A4* تا سال ۱۹۹۷ در دست نبود اما بعد از آن پژوهشگران

در ۱۲۰۰۰ rpm دور به مدت ۵ دقیقه انجام و فاز رویی خارج شد. خشک کردن نمونه با درب باز به مدت یک روز که در Dry plate گذاشته شدند، انجام شد. ۷۰ میکرولیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط برای حل شدن DNA قرار گرفته و در نهایت به فریزر ۲۰- درجه سلسیوس منتقل گردید.

الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگارز

پس از استخراج DNA جهت آنالیز کیفی و اطمینان از 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^۱ (ژل رد بیوتیوم) 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 بیشتر از قطعات بلندتر و سنگین‌تر DNA است. بعد از انجام الکتروفورز و اتمام حرکت مولکول‌ها به سمت قطب مخالف، جریان الکتریکی قطع می‌شود. ژل روی صفحه دستگاه ترانسلومیناتور مجهز به دوربین اشعه UV برده شد و پس از عبور از ژل باعث آشکار شدن باندهای DNA 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 سلسیوس برابر با ۳۵-۱۰۰ نوکلئوتید در هر ثانیه می‌باشد. جدول ۱ شرایط PCR برای تکثیر ژن Cyp3A4 را نشان می‌دهد. پرایمرهای مورد استفاده در این آزمایش با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 و CLC-Work Bench طراحی و از شرکت Ligo از دانمارک خریداری شدند (جدول ۲).

جدول ۱- شرایط PCR برای تکثیر ژن *Cyp3A4*

دنا تورا سیون اولیه	۹۵ درجه درجه سلسیوس - ۵ دقیقه
۳۵ سیکل	۹۵ درجه درجه سلسیوس - ۴۰ ثانیه
	۷۰ درجه درجه سلسیوس - ۳۰ ثانیه
	۷۲ درجه درجه سلسیوس - ۳۰ ثانیه
	۷۲ درجه درجه سلسیوس - ۱۰ دقیقه
طویل سازی نهایی	

جدول ۲- پرایمرهای ژن *Cyp3A4* (A13871G)

دما (Tm)	توالی	جهت	موقعیت ژن
53.0	5'-TGAGCCTCAGTTTCTACATCTG-3'	Forward (M)	A13871G
52.1	5'-TGAGCCTCAGTTTCTATGCTA-3'	Forward (W)	A13871G
54.4	5'-ACCCAAGTTCTGTGTCTGCC-3'	Reverse	A13871G

PCR ژن *Cyp3A4* (A1387G)

از پرایمرهای اختصاصی ژن *CYP3A4* انسانی A13871G F و A13871G R برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز استفاده شد. در این مرحله با استفاده از این پرایمرها و DNA به دست آمده از خون افراد، حضور قطعه تکثیری (A13871G) بررسی شد و نتایج حضور یک باند معادل ۴۰۵ جفت باز را نشان داد (شکل ۱).

یافته ها

جامعه آماری

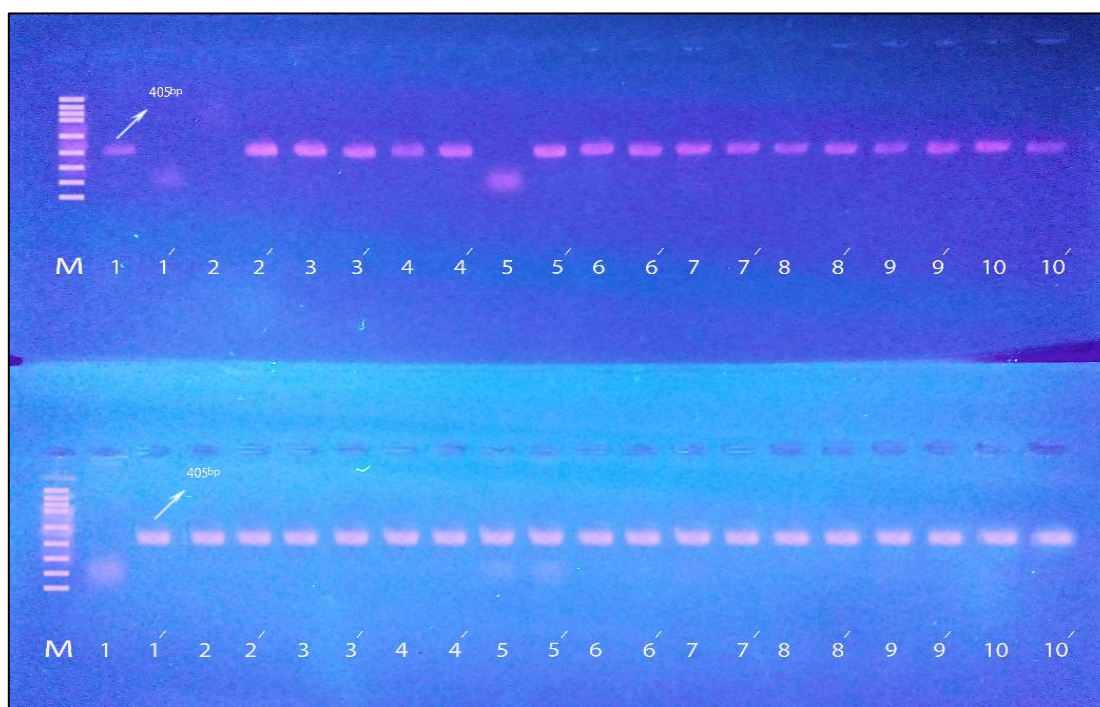
در این مطالعه ۱۰۳ نمونه از مرد و زن مورد بررسی قرار گرفت که ۴۸/۵۴ درصد آن ها زنان، ۳۶/۸۹ درصد آن ها مردان بودند و ۱۴/۵۷ درصد هم هویتشان نامشخص بود. سن افراد مورد مطالعه به این صورت بود که ۳ نفر (۲/۹۱ درصد) بین ۷ ماه تا ۹ سال، ۹ نفر (۸/۷۳ درصد) بین ۱۰ تا ۱۹ سال، ۹ نفر (۸/۷۳ درصد) بین ۲۰ تا ۲۹ سال، ۷ نفر (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 سال، ۹ نفر (۸/۷۳ درصد) بین ۶۰ تا ۶۹ سال، ۳ نفر (۲/۹۱ درصد) بین ۷۰ تا ۷۹ سال و ۱۵ نفر (۱۴/۵۷ درصد) فاقد هویت بودند. داده های آمار توصیفی در هر گروه سنی در جدول ۳ نشان داده شده است.

نتایج کیفیت DNA استخراج شده

به منظور بررسی کیفیت DNA استخراج شده، روش الکتروفورز افقی انتخاب شد. پس از انجام الکتروفورز نمونه های DNA بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، عکس برداری از ژل صورت گرفت (شکل ۱).

جدول ۳- آمار توصیفی مربوط به هر گروه سنی مورد مطالعه

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



شکل ۱- بالا: تصویر ژل آگارز ۱/۵٪ محصول ARMS-PCR مربوط به ژن *CYP3A4* (A13871) در افراد سالم می‌باشد. ردیف‌های ۳، ۴، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ دارای ژنوتیپ AG هستند و ردیف‌های ۲ و ۵ دارای ژنوتیپ GG می‌باشند و ردیف ۱ دارای ژنوتیپ AA می‌باشد. M خط‌کش مولکولی ۱۰۰bp است. طول قطعه تکثیرشده ۴۰۵bp می‌باشد.

پایین: تصویر ژل آگارز ۱/۵٪ محصول ARMS-PCR مربوط به ژن *CYP3A4* (A13871) در افراد سالم می‌باشد. ردیف‌های ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ دارای ژنوتیپ AG هستند و ردیف ۱ دارای ژنوتیپ GG می‌باشد. M خط‌کش مولکولی ۱۰۰bp است. طول قطعه تکثیرشده ۴۰۵bp می‌باشد.

بود (جدول ۴). همچنین درصد فراوانی ژنوتیپ‌های ژن A13871G در هر گروه سنی در جدول ۵ نشان دادند. بین فراوانی ژنوتیپ و سن بیماران ارتباط معنی‌داری وجود ندارد ($p = 0/702$).

فراوانی ژنی پلی‌مورفیسم (A13871G) در جمعیت مورد مطالعه از نظر سن
بیشتر افراد مورد مطالعه (۷۰ نفر) حالت هتروزیگوت ژنوتیپ جهش‌یافته AG بودند که فراوانی آن ۶۷/۹۶ درصد

جدول ۴- ژنوتیپ‌ها و درصد فراوانی ژنی پلی‌مورفیسم A13871G در کل افراد مورد مطالعه

نوع ژنوتیپ	تعداد	درصد
ژنوتیپ AG (هتروزیگوت)	۷۰	۶۷/۹۶
ژنوتیپ AA (هموزیگوت غالب)	۱۰	۹/۷۰
ژنوتیپ GG (هموزیگوت مغلوب)	۱۱	۱۰/۶۸
فاقد جهش	۱۲	۱۱/۶۵
جمع	۱۰۳	۱۰۰

جدول ۵- ژنوتیپ‌ها و درصد فراوانی ژنی پلی‌مورفیسم A13871G در هر گروه سنی مورد مطالعه

گروه سنی	تعداد	ژنوتیپ AG (هتروزیگوت)	ژنوتیپ AA (هموزیگوت غالب)	ژنوتیپ GG (هموزیگوت مغلوب)	فاقد جهش
۹-۷ ماه	۳	۱۰۰	-	-	-
۱۹-۱۰	۹	۷۷/۷۷	۲۲/۲۲	-	-
۲۹-۲۰	۹	۴۴/۴۴	۱۱/۱۱	۱۱/۱۱	۳۳/۳۳
۳۹-۳۰	۷	۴۲/۸۵	۲۸/۵۷	۲۸/۵۷	-
۴۹-۴۰	۴۱	۱۰۰	-	-	-
۵۹-۵۰	۷	۴۲/۸۵	۱۴/۲۸	۲۸/۵۷	۱۴/۲۸
۶۹-۶۰	۹	۷۷/۷۷	-	۱۱/۱۱	۱۱/۱۱
۷۹-۷۰	۳	۶۶/۶۶	-	۳۳/۳۳	-

۳ نفر (۷/۸۹ درصد) دارای ژنوتیپ هموزیگوت غالب، ۵ نفر (۱۳/۱۵ درصد) دارای ژنوتیپ هموزیگوت مغلوب و ۵ نفر (۱۳/۱۵ درصد) فاقد جهش بودند. در هر دو جنس، ژنوتیپ هتروزیگوت بالاترین درصد فراوانی را داشت (جدول ۶). نمودار ۱ درصد فراوانی ژنوتیپ A13871G در جمعیت مورد مطالعه از نظر جنسیت را نشان می‌دهد. جداول ۷ و ۸ ژنوتیپ‌ها و درصد فراوانی ژنی پلی‌مورفیسم A13871G در زنان و مردان را نشان می‌دهد. نتایج نشان دادند که بین فراوانی ژنوتیپ و جنسیت بیماران ارتباط معنی‌داری وجود ندارد ($p = 0/081$).

فراوانی ژنی پلی‌مورفیسم (A13871G) در جمعیت مورد مطالعه از نظر جنسیت
جمعیت مورد مطالعه شامل ۵۰ نفر زن و ۳۸ نفر مرد بودند که نتایج بررسی فراوانی آللی پلی‌مورفیسم A13871G در زنان نشان داد که ۳۳ نفر (۶۶ درصد) دارای ژنوتیپ هتروزیگوت، ۷ نفر (۱۴ درصد) دارای ژنوتیپ هموزیگوت غالب، ۶ نفر (۱۲ درصد) دارای ژنوتیپ هموزیگوت مغلوب و ۴ نفر (۸ درصد) فاقد جهش بودند. همچنین نتایج بررسی فراوانی آللی پلی‌مورفیسم A13871G در مورد مردان نشان داد که ۲۵ نفر (۶۵/۷۸ درصد) دارای ژنوتیپ هتروزیگوت،

جدول ۶- ژنوتیپ‌ها و درصد فراوانی ژنی پلی‌مورفسم A13871G در کل افراد مورد مطالعه از نظر جنسیت

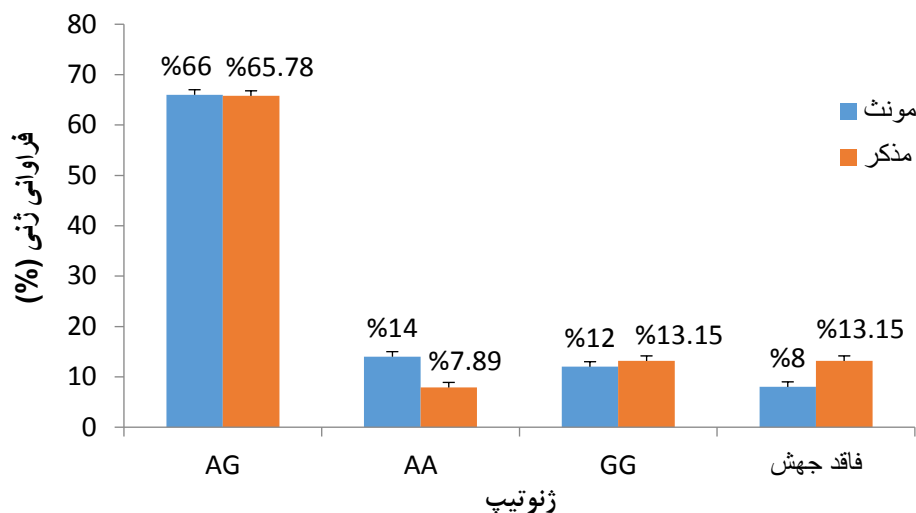
جنسیت/نوع ژنوتیپ	ژنوتیپ AG (هتروزایگوت)	ژنوتیپ AA (هموزایگوت غالب)	ژنوتیپ GG (هموزایگوت مغلوب)	فاقد جهش
مونث	۶۶	۱۴	۱۲	۸
مذکر	۶۵/۷۸	۷/۸۹	۱۳/۱۵	۱۳/۱۵

جدول ۷- ژنوتیپ‌ها و درصد فراوانی ژنی پلی‌مورفسم A13871G در زنان در هر گروه سنی مورد مطالعه

گروه سنی	تعداد	زن (نفر)	ژنوتیپ AG (هتروزایگوت)	ژنوتیپ AA (هموزایگوت غالب)	ژنوتیپ GG (هموزایگوت مغلوب)	فاقد جهش
۷ ماهه تا ۹ سال	۳	۲	۱۰۰	-	-	-
۱۰-۱۹	۹	۵	۶۰	۴۰	-	-
۲۰-۲۹	۹	۶	۵۰	۱۶/۶۶	۱۶/۶۶	۱۶/۶۶
۳۰-۳۹	۷	۵	۴۰	۴۰	۲۰	-
۴۰-۴۹	۴۱	۲۵	۱۰۰	-	-	-
۵۰-۵۹	۷	۲	۵۰	-	۵۰	-
۶۰-۶۹	۹	۵	۸۰	-	۲۰	-
۷۰-۷۹	۳	۱	۱۰۰	-	-	-

جدول ۸- ژنوتیپ‌ها و درصد فراوانی ژنی پلی‌مورفسم A13871G در مردان در هر گروه سنی

گروه سنی	تعداد	مرد (نفر)	ژنوتیپ AG (هتروزایگوت)	ژنوتیپ AA (هموزایگوت غالب)	ژنوتیپ GG (هموزایگوت مغلوب)	فاقد جهش
۷ ماهه تا ۹ سال	۳	۱	۱۰۰	-	-	-
۱۰-۱۹	۹	۴	۱۰۰	-	-	-
۲۰-۲۹	۹	۳	۳۳/۳۳	-	-	۶۶/۶۶
۳۰-۳۹	۷	۲	۵۰	-	۵۰	-
۴۰-۴۹	۴۱	۱۷	۱۰۰	-	-	-
۵۰-۵۹	۷	۳	۴۰	۲۰	۲۰	۲۰
۶۰-۶۹	۹	۴	۷۵	-	-	۲۵
۷۰-۷۹	۳	۲	۵۰	-	۵۰	-



نمودار ۱- درصد فراوانی ژنوتیپ A13871G در جمعیت مورد مطالعه از نظر جنسیت

فراوانی آللی G و A در جمعیت مورد مطالعه

برای بررسی فراوانی آللی A و G از فرمول‌های زیر استفاده شد:

$$\text{فراوانی آللی G} = \frac{(\text{تعداد GG} \times 2) + \text{تعداد GA}}{\text{تعداد کل} \times 2} \times 100$$

$$\text{فراوانی آللی A} = \frac{(\text{تعداد AA} \times 2) + \text{تعداد GA}}{\text{تعداد کل} \times 2} \times 100$$

نتایج نشان دادند که در جمعیت مورد مطالعه ۱۰۳ نفری، فراوانی افراد دارای ژنوتیپ GG ۱۲ نفر بوده که از این تعداد

۷ نفر زن، ۴ نفر مرد و ۱ نفر هم فاقد هویت بودند. همچنین در جمعیت مورد مطالعه ۱۱ نفر دارای ژنوتیپ AA بوده که از این تعداد ۷ نفر زن، ۳ نفر مرد و ۱ نفر فاقد هویت بودند. فراوانی ژنوتیپ AG در کل جمعیت ۶۸ نفر می‌باشد که ۳۳ نفر زن، ۲۵ نفر مرد و ۱۰ نفر هم فاقد هویت بودند. همچنین در کل جمعیت مورد مطالعه، ۱۲ نفر فاقد آلل G و A بودند (جدول ۹).

جدول ۹- درصد فراوانی آللی A و G در جمعیت مورد مطالعه

جنسیت/ نوع آلل	درصد فراوانی آللی A	درصد فراوانی آللی G
کل جمعیت	۴۳/۶۸	۴۴/۶۶
زن	۲۲/۸۱	۲۲/۸۱
مرد	۱۵/۰۴	۱۶/۰۱
فاقد هویت	۵/۸۲	۵/۸۴

بحث

با توجه به منابع داخلی و خارجی موجود، مطالعه حاضر برای اولین بار در ایران انجام شده و تاکنون روی این پلی-مورفیزم پژوهشی صورت نگرفته است. در مطالعه حاضر، تعداد ۱۰۳ نمونه از مردان و زنان مورد بررسی قرار گرفت که ۴۸/۵۴ درصد آن‌ها زن، ۳۶/۸۹ درصد آن‌ها مرد و ۱۴/۵۶ درصد هم دارای جنسیت 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 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 آن بود که هر دو پلی‌مورفیزم از نظر سن و جنسیت در افراد سالم غرب‌مازندران تفاوت معنی-داری در سطح ۹۵ درصد نشان ندادند. به‌علاوه پاسخ هر فرد به درمان یا دارویی خاص، بر اساس نقشه ژنوم آن فرد بوده که منحصر به فرد است. بر مبنای این موضوع، روشی برای درمان مطرح می‌گردد که پزشکی شخصی (فردمحور) یا شخصی‌سازی درمان نام دارد. در این روش برای هر فرد بر اساس نقشه ژنوم خود و خصوصیات رفتاری‌اش دارو با دوز مناسب تجویز می‌شود. ریسک ابتلا به انواع بیماری‌ها برای هر فرد از نقشه ژنی استخراج می‌شود و با این کار می‌توان از ابتلا به بسیاری از بیماری‌ها پیشگیری نمود (۱۳). همچنین متابولیسم حدود ۵۰ درصد داروها توسط آنزیم CYP3A4 انجام می‌شود. هرگونه تغییر نوکلئوتیدی در ناحیه کد کننده این ژن باعث افزایش خطر ابتلا به سرطان می‌گردد. مهمترین تغییر نوکلئوتیدی که باعث جابه‌جایی A به G و ایجاد آلل موتانت این ژن یعنی CYP3A4*B1 می‌گردد نقش مهمی در سرطان‌زایی ایفا می‌کند. شواهد حاکی از آن است که پلی‌مورفیزم در ژن CYP3A4 ممکن است در ابتلای افراد به سرطان مثانه نقش داشته باشد، اما نتایج یک مطالعه نشان داده که وجود پلی-مورفیزم در ژن CYP3A4 رابطه معناداری با ابتلای افراد به سرطان مثانه ندارد (۱۴). مطالعات گذشته نشان داده که SNP ها در CYP3A4 با پیامد درازمدت سرطان پروستات در ارتباط هستند. پروموتور SNP A-290G در CYP3A4

که یک ژن فعال اکسیداسیون تستوسترون است، احتمالاً با شدت بیماری در ارتباط است. این اثر در مردان مسن بدون سابقه خانوادگی سرطان پروستات، قوی‌تر است (۱۵، ۱۶ و ۱۷). Spurdle و همکاران در ۲۰۰۲ نشان دادند که پلی-مورفیزم CYP3A4*1B هیچ اهمیت عملکردی ندارد و با خطر سرطان پستان یا تخمدان مرتبط نیست (۱۸). درحالی‌که طی پژوهش دیگری مشخص شده که پلی-مورفیزم‌های CYP3A4 عوامل خطر بالقوه‌ای برای سرطان پستان و پروستات هستند (۱۹). همچنین تعیین نمودار فعالیت CYP3A4 می‌تواند به‌عنوان مارکر مولکولی برای پیش‌بینی پیامد بالینی بیماران مبتلا به سرطان سרוزی تخمدان، مفید باشد (۲۰). بنابر چندمطالعه دیگر که ارتباط SNP و سرطان را نشان می‌دهند، SNP در جایگاه‌های هدف microRNA حساسیت تومور را تحت‌تأثیر قرار می-دهد. برای مثال ژنوتیپ‌ها و هاپلوتیپ‌های CYP3A4، CYP3A5 و CYP3A43 در علت و شدت سرطان پروستات نقش دارند (۲۱). ارتباط پلی‌مورفیزم‌های CYP3A4 و CYP3A5 با خطر ابتلا به سرطان ریه را در یک جمعیت بنگلادشی (۲۲) و ارتباط بین پلی‌مورفیزم‌های سیتوکروم CYP3A4، CYP3A43، CYP17A1 و خطر ابتلا به سرطان پروستات و پرخاشگری در یک جمعیت کره‌ای نشان داده شده است (۲۳). Dally و همکاران در ۲۰۰۳ نشان دادند آلل CYP3A4*1B خطر ابتلا به سرطان ریه سلول کوچک را افزایش می‌دهد (۲۴). در یک مطالعه فارماکوژنومیک، ژنوتیپ سیتوکروم P450 3A4*1B و 3A5*3 برای ۲۵ مورد مرگ با فنتانیل^۱ بررسی و ارتباط معنی‌داری بین آن‌ها با ژنوتیپ وحشی در پاسخ به سمیت حاصل از فنتانیل مشاهده شد (۲۵). بررسی پلی‌مورفیزم‌های CYP3A4*1B و CYP3A5*3 در یک جمعیتی از بوسنی‌وهرزگوین نشان داده که توزیع آلل‌های CYP3A4*1B و CYP3A5*3 مطابق با جمعیت قفقازی‌های اروپا بوده است. آلل جهش‌یافته CYP3A4*1B در قفقازی‌ها نادر بود و تنها در ۵/۱ درصد افراد وجود داشت. باین‌حال، پلی‌مورفیزم CYP3A5*3 در جمعیت بوسنیایی با شیوع ۹۴ درصد، غالب بوده است. همچنین یک عدم تعادل پیوندی قوی بین آلل‌های CYP3A5*3 و CYP3A4*1B نیز نشان داده شد. در نهایت هیچ تفاوت معنی‌داری در فراوانی آللی CYP3A4*1B و CYP3A5*3 بین افراد مرد و زن شرکت‌کننده مشاهده نشد (۲۶). در مطالعه حاضر نیز فراوانی آللی پلی‌مورفیزم

جنسیت افراد ($p = 0/081$) ارتباط معناداری وجود ندارد که این موضوع بیانگر این حقیقت می‌باشد که زنان و مردان در هر سنی به‌طور مساوی در خطر ابتلا به بیماری می‌باشند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که تعارض منافی ندارند.

سپاسگزاری

نویسندگان بدین‌وسیله از تمامی افراد شرکت‌کننده در مطالعه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

A13871G بین مردان و زنان تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. همچنین تحقیق دیگری نشان داد که اردنی‌ها از نظر فراوانی آللی گونه‌های آزمایش‌شده *CYP1A1*، *CYP2C9*، *CYP2C19*، *CYP3A4* و *CYP3A5* بیشتر شبیه به قفقازی‌ها بودند (۲۷). یک همبستگی معینی بین سطح کل mRNA در *CYP3A4* و نسبت بیان آللی وجود دارد که همچنین می‌تواند سطوح mRNA *CYP3A4* و فعالیت آنزیم *CYP3A4* را افزایش دهد (۲۸، ۲۹). در پژوهشی بر روی بیان ژن *CYP3A4* در سرطان پستان و پیوستگی آن با عوامل خطرناک در زنان مکزیک‌ای مشخص شد که در بافت ترش‌هی افراد مبتلا به سرطان پستان نسبت به بافت‌های سالم بیان بالاتر *CYP3A4* وجود دارد. همچنین وابستگی قابل توجهی بین بیان پروتئین با سیگار کشیدن، اعتیاد به الکل و استفاده از وسایل هورمونی جلوگیری از بارداری مشاهده شد و پیشنهاد نمودند که *CYP3A4* باعث گسترش سرطان پستان شده و می‌توان از آن در پیش‌بینی پاسخ به تومور در درمان‌های مختلف استفاده کرد و حتی یک راه درمانی می‌تواند انسداد عملکرد *CYP3A4* نیز باشد (۳۰). حمزه‌ای و همکارانش در سال ۱۳۸۴ آلل جدیدی از ژن *CYP3A4* تحت‌عنوان *CYP3A4*15B* را معرفی کردند (۳۱). نتایج تحقیق دیگری نیز نشان داد که ژن‌های *CYP3A4* و *CYP2D6* در انسان، گاو و مرغ دارای ارتباط تکاملی بوده و در بخش‌های عملکردی و حفاظت بازها در توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمین‌ها در توالی‌های پروتئینی دارای شباهت معنی‌داری می‌باشد (۳۲). همچنین تنوع ژنتیکی در ژن *CYP3A4* و ارتباط آن با بیماری دیابت نوع دو در استان سیستان و بلوچستان بررسی و مشخص شد که پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی یا SNP در ژن *CYP3A4* با خطر بروز بیماری دیابت نوع دو ارتباط معنی‌داری ندارد (۳۳). به‌علاوه بیمارانی که ژنوتیپ *CYP3A4* 1G/1G دارند در مقایسه با بیمارانی دارای *CYP3A4* 1/1 رد پیوند کلیه حادتری داشته‌اند (۳۴). از آنجاکه *CYP3A4* و پلی‌مورفیسم‌های آن نقش مهمی در متابولیسم داروها و ترکیبات زنبیوتیک دارند، مطالعات بیشتری برای شناسایی مکانیسم دقیق بیان این ژن، ضروری به‌نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

با بررسی فراوانی آللی و ژنوتیپی همچنین بررسی ارتباط این پلی‌مورفیسم‌ها مشخص شد که بین پلی‌مورفیسم *CYP3A4* (A13871G) با سن افراد ($p = 0/702$) و با

منابع

1. Hojgaard L, Zic Fuchs M, Gyllenberg M. Personalised Medicine for the European Citizen. European Science Foundation. www.esf.org. December 16, 2012.
2. Cavaco I, Piedade R, Gil JP, Ribeiro V. CYP2C8 polymorphism among the Portuguese. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2006; 44(2):168-170.
3. Goldstein JA. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2001; 52:349-355.
4. Bull L. Genetics, mutations, and polymorphisms. In: *Madame Curie Bioscience Database [Internet]* 2013. Landes Bioscience.
5. Oritz de Montellano PR. Cytochrome P450. 4th edition. New York. Springer Cham Heidelberg Dordrecht London. 2015; 912 p.
6. Lamb DC, Lei L, Warrilow AG, Lepesheva GI, Mullins JG, Waterman MR, Kelly SL. The first virally encoded cytochrome P450. *Journal of Virology*. 2009; 83(16):8266-8269.
7. Lee SJ, Goldstein JA. Functionally defective or altered CYP3A4 and CYP3A5 single nucleotide polymorphisms and their detection with genotyping tests. *Pharmacogenomics*. 2005; 6(4):357-371.
8. Horn JR, Hansten PD. Drug interactions with CYP3A4: an update. *Pharmacy Times*. 2015; 81:12.
9. Hashimoto H, Toide K, Kitamura R, Fujita M, Tagawa S, Itoh S, Kamataki T. Gene structure of CYP3A4, an adult-specific form of cytochrome P450 in human livers, and its transcriptional control. *European Journal of Biochemistry*. 1993; 218(2):585-595.
10. Pechandova K, Buzkova H, Matouskova O, Perlik F, Slanar O. Genetic Polymorphisms of CYP2C8 in the Czech Republic. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012; 16(7):812-816.
11. Arun Kumar AS, Chakradhara Rao US, Umamaheswaran G, Ramu P, Kesavan R, Shewade DG, Balachandrar J, Adithan C. Haplotype structures of common variants of CYP2C8, CYP2C9, and ADRB1 genes in a South Indian population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2011; 15(6):407-13.
12. Caro AA, Cederbaum AI. Role of cytochrome P450 in phospholipase A2- and arachidonic acid-mediated cytotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006; 40:364-375.
13. O'Donnell JC. Personalized medicine and the role of health economics and outcomes research: issues, applications, emerging trends, and future research. *Value in Health*. 2013; 16(6):1-3.
14. Onsoni K, Bakhtiari Tajar M, Haji Z, Nouri M. 1393 Investigation of genetic polymorphism of CYP3A4 gene in patients with bladder cancer. *Genetics in the Third Millennium*. 2014; 12(3):3612-3621.
15. Zeigler-Johnson C. CYP3A4: A Potential Prostate Cancer Risk Factor for High-Risk Groups. *Clinical Journal of Oncology Nursing*. 2001; 5(4):153-154.
16. Bangsi D, Zhou J, Sun Y, Patel NP, Darga LL, Heilbrun LK, Powell IJ, Severson RK, Everson RB. Impact of a genetic variant in CYP3A4 on risk and clinical presentation of prostate cancer among white and African-American men☆. In: *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2006 Jan 1 (Vol. 24, No. 1, pp. 21-27). Elsevier.
17. Karimpour Zahmatkesh, A. Investigating the relationship between CYP17 and CYP19 gene polymorphisms and CYP3A4 genetic variant with prostate cancer in patients referred to Shahid Beheshti University of Medical Sciences. Master's thesis in Genetics, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, 2013.
18. Spurdle AB, Goodwin B, Hodgson E, Hopper JL, Chen X, Purdie DM, McCredie MR, Giles GG, Chenevix-Trench G, Liddle C. The CYP3A4*1B polymorphism has no functional significance and is not associated with risk of breast or ovarian cancer. *Pharmacogenetics*. 2002; 12(5):355-366.
19. Keshava C, McCanlies EC, Weston A. CYP3A4 polymorphisms--potential risk factors for breast and prostate cancer: a HuGE review. *American Journal of Epidemiology*. 2004; 160(9):825-841.
20. Assis J, Pereira D, Gomes M, Marques D, Marques I, Nogueira A, Catarino R, Medeiros R. 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*. 2013; 6(7):552.
21. Zeigler-Johnson C, Friebel T, Walker AH, Wang Y, Spangler E, Panossian S, Patacsil M, Aplenc R, Wein AJ, Malkowicz SB, Rebbeck TR. CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A43 genotypes and haplotypes in the etiology and severity of prostate cancer. *Cancer Research*. 2004; 64(22):8461-8467.
22. Islam MS, Mostofa AG, Ahmed MU, Bin Sayeed MS, Hassan MR, Hasnat A. Association of CYP3A4, CYP3A5 polymorphisms with lung cancer risk in Bangladeshi population. *Tumour Biology*. 2014; 35(2):1671-1678.
23. Han JH, Lee YS, Kim HJ, Lee SY, Myung SC. Association between cytochrome CYP17A1, CYP3A4, and CYP3A43 polymorphisms and prostate cancer risk and aggressiveness in a Korean study population. *Asian Journal of Andrology*. 2015; 17(2):285-291.

24. Dally H, Edler L, Jäger B, Schmezer P, Spiegelhalder B, Dienemann H, Drings P, Schulz V, Kayser K, Bartsch H, Risch A. The CYP3A4* 1B allele increases risk for small cell lung cancer: effect of gender and smoking dose. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2003; 13(10):607-618.
25. Jin M, Gock SB, Jannetto PJ, Jentzen JM, Wong SH. Pharmacogenomics as molecular autopsy for forensic toxicology: genotyping cytochrome P450 3A4* 1B and 3A5* 3 for 25 fentanyl cases. *Journal of Analytical Toxicology*. 2005; 29(7):590-598.
26. Semiz S, Đujić T, Ostanek B, Prnjavorac B, Bego T, Malenica M, Mlinar B, Marc J, Causević A. Analysis of CYP3A4*1B and CYP3A5*3 polymorphisms in population of Bosnia and Herzegovina. *Medicinski Glasnik (Zenica)*. 2011; 8(1):84-89.
27. Yousef AM, Bulatova NR, Newman W, Hakooz N, Ismail S, Qusa H, Zahran F, Anwar Ababneh N, Hasan F, Zaloom I, Khayat G, Al-Zmili R, Naffa R, Al-Diab O. Allele and genotype frequencies of the polymorphic cytochrome P450 genes (CYP1A1, CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9 and CYP2C19) in the Jordanian population. *Molecular Biology Reports*. 2012; 39(10): 9423-9433.
28. Takeshita A, Igarashi-Migitaka J, Koibuchi N, Takeuchi Y. Mitotane induces CYP3A4 expression via activation of the steroid and xenobiotic receptor. *J Endocrinol*. 2013; 216:297-305.
29. Takeshita A, Taguchi M, Koibuchi N, Ozawa Y. Putative role of the orphan nuclear receptor SXR (steroid and xenobiotic receptor) in the mechanism of CYP3A4 inhibition by xenobiotics. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277(36): 32453-32458.
30. Floriano-Sanchez E, Rodriguez NC, Bandala C, Coballase-Urrutia E, Lopez-Cruz J. CYP3A4 expression in breast cancer and its association with risk factors in Mexican women. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014; 15(8):3805-3809.
31. Hamzei H, Dasmalchi S. Analysis of the arrangement of three heterozygous mutations in human cyp3a4 female with long distances from each other. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014;11(4):63-69.
32. Hesani J, Nasiri M. Homology and functional region prediction in CYP3A4 and CYP2D6 genes and their comparison in human, cow and chicken. 2nd International Conference on Research in Engineering, Science and Technology, <https://civilica.com/doc/398475>. 2014.
33. Heydari Qaraei H, Rashki A, Behari A, Rashki Ghaleno Z. Investigation of genetic variation in CYP3A4 gene and its relationship with type 2 diabetes in Sistan and Baluchistan Province. *Journal of Diabetes Nursing*. 2017; 6(3):530-538.
34. Wang YY, Zhang M, Lu FM, Jiao Z, Qiu XY. CYP3A4 genetic polymorphisms predict cyclosporine-related clinical events in Chinese renal transplant recipients. *Chinese Medical Journal*. 2012; 125(23): 4233-4238.