مقاله پژوهشی

بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs7816345 با سرطان پستان در جمعیت آذربایجان شرقی

اوزنور بهروز قائمی[۱]، محمدرضا علی‌وند[۲*]، حسین سلطانزاده[۳*]، اصغر تنومند[۳]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بناب، بناب، ایران
۲- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۳- دانشکده علوم پزشکی مراغه، مراغه، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۱۲/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان از شایع‌ترین انواع سرطان در بین زنان بوده و اولین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در زنان به شمار می‌آید. کاربرد درمان‌های هدف‌دار بر اساس بیومارکرها و هدف‌های خاصی است که به‌وسیله‌ی روش‌های مختلف شناسایی می‌شود. به نظر می‌رسد وجود پلی‌مورفیسمrs7816345 در تومور زایی نقش داشته باشد. هدف این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs7816345 (نزدیک ژن *ZFN703*) با وقوع سرطان پستان در جمعیت آذربایجان شرقی است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۱۰۰ نمونه از افراد بیمار و ۱۰۰ نمونه خونی از افراد سالم به‌عنوان گروه کنترل انتخاب شد. پس از استخراج DNA در مرحله بعد نمونه‌ها با پرایمر اختصاصی، PCR شد. نهایتاً محصولات PCR، با آنزیم محدودکننده TaqI تیمار شده و بر روی ژل آگارز، الکتروفورز گردید. داده‌های حاصل‌شده با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ توسط آزمون توصیفی و chi-square موردبررسی قرار گرفت و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج: درصد آلل T در افراد سالم و بیمار به ترتیب ۴۴/۵٪ و ۶۹/۵٪، درصد آلل C در افراد سالم و بیمار به ترتیب ۵۵/۵٪ و ۳۰/۵٪ گزارش شد. بررسی این داده‌ها نشان می‌دهد که آلل T در افراد بیمار نسبت به افراد سالم ۲۵٪ افزایش نشان می‌دهد و آلل C در افراد بیمار نسبت به افراد سالم ۲۵٪ کاهش نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: احتمالاً بین افزایش آلل T (به‌اندازه ۲۵٪) و وقوع سرطان پستان ارتباط وجود دارد. به دلیل اینکه تشخیص زودهنگام سرطان‌ها و سرطان پستان مهم‌ترین گام در درمان آن‌ها است، وجود مارکری جهت تشخیص زودهنگام و قبل از پیشرفت بیماری و حتی مطلع ساختن فرد سالم از داشتن استعداد ابتلا به بیماری سرطان پستان، می‌تواند بسیار راه گشا بوده و امیدهای تازه‌ای برای کشف روش‌های نوین مقابله با سرطان در دنیا ایجاد کند.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، پلی مورفیسم، rs7816345

مقدمه

سرطان یک فرایند پویا است که توسط متغیرهای ناشناخته و مستقل متعددی موجب تغییرات مولکولی سلول، تداخل در سیستم تکثیر آن می‌شود سرطان مسئول بیش از ۲۰ درصد تمام موارد مرگ‌ومیر است (۱). سرطان پستان به‌صورت تغییرات رشد خارج از کنترل سلول‌ها در بافت پستان تعریف می‌شود که این رشد غیرطبیعی، در غدد تولیدکننده شیر (لوبول)ها یا در مجاری که لوبول‌ها را به نوک پستان مرتبط می‌سازند (داکت) ایجاد می‌گردد (۲). سرطان پستان یکی از شایع‌ترین انواع سرطان در زنان است که در کشورهای درحال‌توسعه یک افزایش ۵ درصدی در هرسال گزارش‌شده است (۳). در جمعیت‌های مختلف، میزان بروز سرطان پستان تفاوت زیادی دارد. به‌طوری‌که در زنان آمریکای شمالی و اروپای غربی بیشترین میزان این نوع سرطان

*نویسندگان مسئول: ۱- **حسین سلطانزاده**، دانشکده علوم پزشکی مراغه، مراغه، ایران
Email: Hossien4040@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-4416-7593
۲- **محمدرضا علیوند**، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
Email: mohammadreza_alivand@yahoo.com
https://orcid.org/0000-0002-5847-3594

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-04-04]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.4.3.9]

مشاهده می‌شود و در زنان ژاپنی و چینی، این میزان تا یک‌هشتم کمتر است (۴).

سرطان پستان از شایع‌ترین انواع سرطان در بین زنان بوده و اولین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در زنان به شمار می‌آید. بر اساس آمارهای جهانی بهداشت از هر ۸ تا ۱۰ زن، یک نفر دچار سرطان پستان می‌شود. بر اساس آمارهای ایران، در کشور ما از هر ۱۰ تا ۱۵ زن، احتمال ابتلای یک زن به سرطان پستان وجود دارد. سن بروز سرطان پستان در ایران حداقل یک دهه پایین‌تر از زنان کشورهای توسعه‌یافته است. میانگین سن تشخیص سرطان پستان در کشورهای غربی ۵۶ سال و در ایران ۴۵ سال است (۵). سوابق بچه‌دار شدن و قاعدگی عوامل خطر کاملاً شناخته‌شده برای سرطان پستان هستند. خطر ابتلا به سرطان پستان در زنانی که فرزند دارند در مقایسه با زنانی که فرزندی به دنیا نیاورده‌اند پایین‌تر است. بعلاوه هر چه سن اولین بارداری یک زن کمتر باشد، خطر ابتلا به سرطان پستان کمتر است. همچنین هر چه سن شروع دوره‌های قاعدگی دیرتر باشد خطر ابتلا به سرطان پستان کاهش بیشتری پیدا می‌کند (۱).

زمینه ژنتیکی در ریسک ابتلا به سرطان پستان مؤثر است که البته در قومیت‌های مختلف به اشکال گوناگون تظاهر می‌کند و همین امر ضرورت بررسی‌های ژنتیکی را در هر نژاد و قومیت خاص روشن می‌سازد. نقش ژنتیک در افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان: حدود ۵٪ سرطان‌های شایع نظیر سرطان پستان و روده درنتیجه یک حساسیت ارثی به سرطان رخ می‌دهد. فراوانی ابتلا دیگر اعضاء خانواده به همان سرطان، می‌تواند دلیلی بر تنش ژنتیک باشد. مطالعات خانوادگی نشان داده‌اند که برای خانمی که یک خویشاوند درجه‌یک مبتلابه سرطان پستان دارد، خطر ابتلا به سرطان پستان ۱/۵ تا ۳ برابر جمعیت عادی است (۶).

پلی مورفیسم یا SNP (Single Nucleotide polymorphism) به تفاوت‌های فردی ژنتیکی که بااستعداد ابتلا به برخی بیماری‌ها در ارتباط باشند گفته می‌شود. مطالعه‌های ژنتیکی قومی و منطقه‌ای درزمینهٔ اختلافات تک نوکلئوتیدی می‌تواند مبنای تشخیص و درمان فارماکولوژیک برخی از انواع بدخیمی‌ها شود. نتایج حاصل از مطالعات GWAS (Genome Wide Association Studies) حاکی از آن بوده که واریانت‌های ژنی بسیاری موسوم به تفاوت‌های تک نوکلئوتیدی SNP وجود دارند که می‌توانند بااستعداد ابتلا به سرطان پستان در ارتباط باشند بررسی این پلی مورفیسم‌ها یا تفاوت‌های فردی ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف می‌تواند قدرت تشخیص را بسیار افزایش دهد. مطالعات همراهی (linkage) و GWAS طی سال‌های گذشته باعث تشخیص شمار زیادی از SNPهای در ارتباط با سرطان پستان شدند که در لکوس‌های خاصی قرار دارد (۷).

در حال حاضر، پیش‌آگهی و تعیین خط‌مشی درمان در سرطان پستان بر اساس تعیین وضعیت گیرنده‌های هورمونی استروژن، پروژسترون و *HER-2* است. با استفاده از این نشانگرها، می‌توان گروه‌های کارکردی تومورها را تعیین کرد:

الف) گیرنده هورمون مثبت و *HER2* منفی

ب) گیرنده هورمون منفی و *HER2* منفی (تومور سه‌گانه منفی)

ج) تومورهای بابیان بیش‌ازحد *HER2* با یا بدون بیان گیرنده هورمون

کاربرد درمان‌های هدف‌دار بر اساس بیومارکرها و هدف‌های خاصی است که به‌وسیله‌ی روش‌های مختلف شناسایی می‌شود. در سرطان پستان به‌طور عمده دو هدف درمانی رسپتور استروژنی و رسپتور فاکتور رشد انسانی (*HER*) در نظر گرفته می‌شود (۸).

یکی از داروهای مهمی که در مبتلایان سرطان پستان تجویز می‌شود داروی تاموکسیفن است که فقط بیماران با گیرنده استروئیدی مثبت پاسخ مناسبی به آن می‌دهند. این دارو بیش از ۳۰ سال است که به‌عنوان داروی بعد از عمل جراحی به بیماران مراحل اولیه سرطان پستان و همچنین نوع متاستازی سرطان پستان تجویز می‌شود (۹).

ZNF703 به‌عنوان یک عامل مهم در رفتارهای تجمعی توموری در زیرمجموعه‌ای از گیرنده‌های استروژنی مثبت سرطان‌های پستان عمل می‌کند.

ZNF703 در مقاومت به تاموکسیفن ناشی از فعال شدن مسیر AKT/MTOR و تنظیم کاهشی ER نقش داشته و از این طریق در تومور زایی مؤثر است (۱۰). مکانیسم‌های ممکنه برای فعال شدن آن شامل جهش‌های نقطه‌ای، تکثیر ژن، بازترتیبی ژن و درج پروموترها و بهبوددهنده‌های قوی است. همچنین تغییرات اپی ژنتیکی شامل دمتیلاسیون و داستیلاسیون ممکن است مسئول نقش *ZNF703* در تومور زایی باشد. علی‌رغم این مکانیسم‌های دقیق نیاز به مطالعات دقیق‌تر دارد (۱۰).

متأسفانه این بیماری در بسیاری از اوقات در مراحل پیشرفته آن تشخیص داده می‌شود که منجر به یک پیش‌آگهی ضعیف

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-04-04]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.4.3.9]

می‌گردد. اگرچه انواع روش‌های غربالگری برای تشخیص زودرس موجود است، اما ارزش تشخیصی آن‌ها به علت فقدان حساسیت، قیمت بالا و یا ایجاد ناراحتی و دردسر برای بیمار، محدود است؛ بنابراین شناسایی بیومارکرهای تشخیصی زودهنگام و قبل از پیشرفت بیماری و حتی مطلع ساختن فرد سالم از داشتن استعداد ابتلا به بیماری سرطان پستان، می‌تواند بسیار راه گشا باشد. کاربرد درمان‌های هدف‌دار بر اساس بیومارکرها و هدف‌های خاصی است که به‌وسیله‌ی روش‌های مختلف شناسایی می‌شود. rs7816345 در نزدیکی ژن *ZNF703* ارتباط قوی با سرطان پستان، تنظیم استروژن و رشد سینه دارند *ZNF703* ژن تنظیم‌کننده پیشرفت چرخه سلولی است و بخشی از یک کمپلکس رپرسور هسته‌ای است و یک اثر کاهنده در مسیر سیگنالینگ TGF β اعمال می‌کند. همین‌طور با فرمی از p53 همکاری می‌کند. *ZNF703* (پروتئین انگشت روی ۷۰۳) انکوژن جدید سرطان پستان و یک نشانگر پیش‌آگهی و هدف درمانی در سرطان پستان *ER* (رسپتور استروژن) مثبت بسیار تهاجمی است (۱۱).

نقش و اهمیت این بلی مورفیسم در ارتباط با سرطان سینه در تنظیم استروژن و رشد سینه‌ها باعث گردید که هدف این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs7816345 (نزدیک ژن *(ZNF703)* با وقوع سرطان پستان (در بیماران گیرنده هورمون استروژن مثبت و *HER2* منفی) در جمعیت آذربایجان شرقی باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

در این مطالعه مورد-شاهد به تعداد ۱۰۰ نفر بیمار زن مبتلابه سرطان پستان بستری (مراجعه‌کننده) به بیمارستان شهید مدنی تبریز (گیرنده هورمون مثبت و *HER2* منفی) و به تعداد ۱۰۰ نفر کنترل زن بدون سابقه مبتلابه انواع سرطان در خودشان و در خویشاوندان درجه اول آن‌ها که به اداره تأمین اجتماعی شهرستان بناب مراجعه کرده بودند، به‌طور تصادفی انتخاب شدند و پس از کسب رضایت‌نامه کتبی به مقدار ۵ سی‌سی از خون وریدی آن‌ها در داخل لوله‌های استریل CBC حاوی ماده ضد انعقاد EDTA گرفته شد و پس از تکمیل پرسشنامه موردبررسی قرار گرفتند. هر دو گروه ازلحاظ مشخصات سنی، جنسیت و منطقه جغرافیایی با یکدیگر مطابقت داشتند.

استخراج DNA و سنجش کمی و کیفی آن

در این تحقیق DNA ژنوم با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناکلون) طبق پروتکل استخراج گردید و به‌منظور تعیین کمیت DNA از دستگاه نانودراپ NanoDrop1000-ND استفاده گردید و ازنظر کیفی به روش الکتروفورز موردبررسی قرار گرفت.

تکثیر توالی rs7816345 نزدیک ژن *ZFN703*

با استفاده از پرایمرهای F,R طراحی‌شده با نرم‌افزار Oligo ۵ ناحیه مربوط به پلی مورفیسم rs7816345 که در نزدیک ژن *ZFN703* قرار دارد با توالی پرایمر-**3'** F ATGGCCACAAAAGGGAAGAC-**5'** و پرایمر R با توالی **3'**-TCACTGGAGAGGCTGAAGATC-**5'**، تکثیر شد.

بخشی از توالی ژن *ZNF703* در زیر آورده شده است:

GTGCATTGAAATGCCTTTGGTGGTTCTTGCTTTG
GTCAGAAGTCACAAAGGGATTGAACGTCGTTTT
GGCTGCTCCCACTTTGGTGATGGCCACAAAAGG
GAAGACAGCCACATGCTGTGTCGTTATGTGCTT
TTATGAAAGATCTTGGTTTGGGGAATTTTTTAA
CTTTGTTCTTCAGATTGTATATTTCCTACTGCTC
AGTCTTCAAATTTACTGACACTTCTGTCATCTCC
AATT**C/T**GTTCTTCAGCCTCTCCAGTGATTTTTT
AAAATAAACGTTTTTATTTGGGAATAATTTTAC
ACTAACAGAAAAGTT

11
55

برای انجام PCR، ابتدا پرایمرهای F و R به نسبت رقیق‌سازی شد. بدین منظور ابتدا پرایمرهای مذکور از فریزر ۲۰- خارج شد. به‌اندازه ۲۱۰ میکرولیتر آب دیونیزه به داخل میکروتیوپ حاوی پرایمر F و ۲۰۹ میکرولیتر آب دیونیزه به داخل میکروتیوپ حاوی پرایمر R منتقل شد و هر دو میکروتیوب تکان داده شد. سپس ۱ میکرولیتر از هر پرایمر در میکروتیوپ مجزا ریخته شد و به داخل هرکدام به‌اندازه ۴ میکرولیتر آب دیونیزه افزوده شد. متعاقباً یک میکروتیوپ ۰/۵ میلی‌لیتری خالی، بر روی یخ آماده شد و داخل آن ۱ میکرولیتر از پرایمر F و ۱ میکرولیتر از پرایمر R رقیق‌شده ریخته شد. غلظت نهایی پرایمرها یک میکرومولار است. سپس ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix و ۹/۵ میکرولیتر آب دیونیزه به همان میکروتیوپ منتقل شد و محتویات آن یک دور کوتاه به‌آرامی اسپین گردید سپس به داخل آن ۱ میکرولیتر معادل یک میکروگرم از محتویات میکروتیوپ DNA استخراج‌شده منتقل‌شده و یک دور کوتاه به‌آرامی اسپین گردید. نهایتاً میکروتیوپ با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، در دستگاه PCR قرار داده شد. بعد این‌که نمونه‌ها در

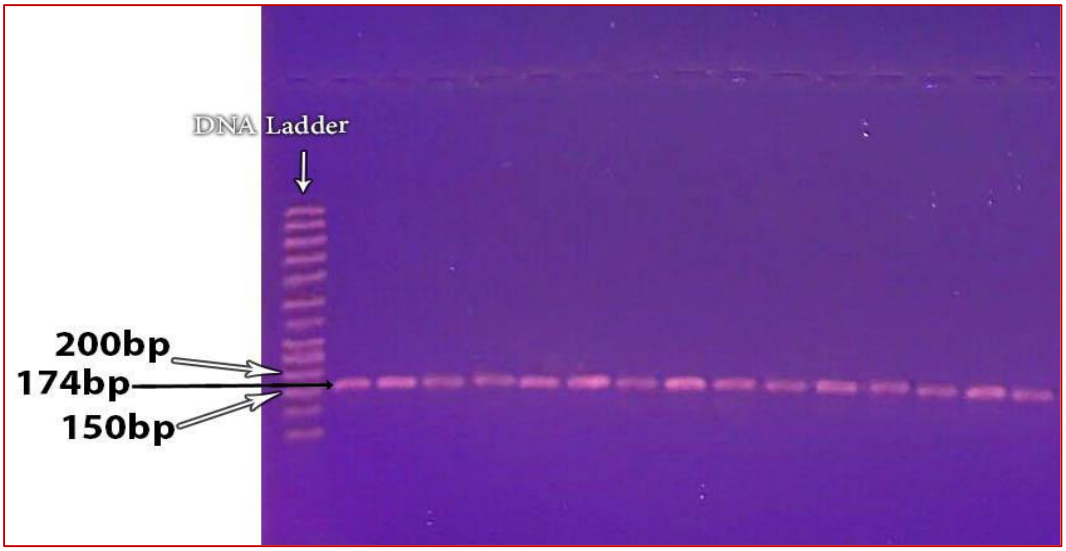
[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-04-04]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.4.3.9]

دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد دستگاه طبق جدول ۱ تنظیم گردید. برای اطمینان از کیفیت محصول PCR، قطعه تکثیرشده بر روی ژل آگارز ۳٪ که با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شده بود، الکتروفورز گردید طول قطعه موردنظر ۱۷۴ جفت باز است (شکل ۱).

میکرولیتر آب دیونیزه به آن افزوده شد. همچنین به‌اندازه ۵ میکرولیتر از بافر TaqI x۱۰ و ۱۰ یونیت از آنزیم محدودکننده TaqI (یک میکرولیتر) به داخل آن اضافه شد. سپس به‌آرامی با عمل پیپتینگ مخلوط شد و درب میکروتیوپ محکم بسته شد و پارافیلم گذاری گردید. این مراحل برای سایر نمونه‌ها هم تکرار

جدول ۱. برنامه زمانی و دمایی دستگاه PCR

تعداد سیکل	زمان	دما C°	مرحله
۱	۱۰ دقیقه	۹۵	دناتوراسیون اولیه
۳۴	۱ دقیقه	۹۵	دناتوراسیون
	۱ دقیقه	۶۰	اتصال پرایمر
	۱ دقیقه	۷۴	طویل شدن
۱	۵دقیقه	۷۴	طویل شدن نهائی



شکل ۱. نمونه ژل الکتروفورز محصولات اصلی PCR (قبل از اضافه کردن آنزیم) طول قطعه موردنظر ۱۷۴ جفت باز است که در فاصله بین باندهای ۱۵۰ و ۲۰۰ جفت بازی از لدر تشکیل‌شده است.

تعیین ژنوتیپ

روش RFLP برای تعیین ژنوتیپ حاصل از پلی مورفیسم rs7816345 به کار گرفته شد. محصول به‌دست‌آمده از PCR تحت اثر آنزیم محدودکننده TaqI (شرکت (Frementas) قرار گرفت. برای این منظور ابتدا به‌اندازه ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR یکی از نمونه‌ها، داخل میکروتیوپ ریخته شد سپس ۹

گردید. نهایتاً میکروتیوپ در داخل بن ماری در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شد. محصول هضم شده برای تعیین ژنوتیپ بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید. طول قطعه موردنظر ۱۷۴ جفت باز است که در فاصله بین باندهای ۱۵۰ و ۲۰۰ جفت بازی از لدر تشکیل خواهد شد. در صورت تبدیل آلل C به T، آنزیم موردنظر جایگاه برش نداشته و قطعه

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-04-04]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.4.3.9]

۱۷۴ جفت بازی برش نخواهد یافت. در صورت هموزیگوت بودن C، دو قطعه ۱۵۲ و ۲۲ جفت بازی خواهیم داشت و در صورت هتروزیگوت بودن، ۳ قطعه ۱۷۴، ۱۵۲ و ۲۲ جفت بازی خواهیم داشت.

داده‌های حاصل با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ و آزمون توصیفی و Chi Square مورد آنالیز قرار گرفت و میزان معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد ($P<0.05$).

نتایج

ازنظر جنسی و سنی دو گروه بیمار و کنترل مورد ارزیابی قرار گرفتند که اختلاف معناداری بین این دو گروه مشاهده نشد. پارامترهای دموگرافیک و بالینی در بیماران با سه ژنوتیپ باهم موردبررسی قرار گرفت و اختلاف معناداری بین این پارامترها و ژنوتیپ بیماران مشاهده نشد ($p<۰/۰۵$). در قسمت‌های که Pvalue اختلاف معنی‌دار مشاهده نشده p بزرگ‌تر نشان داده‌شده.

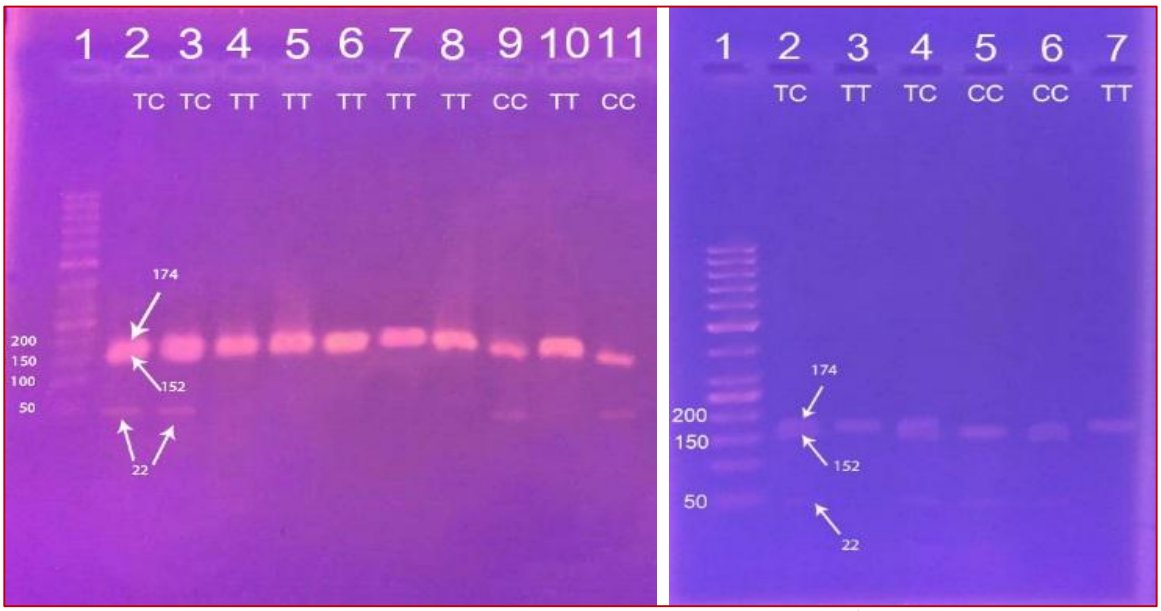
محصولات PCR حاصل از DNA استخراج‌شده از نمونه‌های خونی افراد مبتلابه بیماری سرطان پستان و افراد سالم، (شکل ۱) با آنزیم محدودکننده TaqI اثر داده شد و بر روی آن‌ها الکتروفورز انجام گردید (شکل ۲).

محل برش آنزیم TaqI، $\frac{T/CGAT/CGA}{AGC/TAGC/T}$ است که آلل غالب C و آلل مرتبط با بیماری T است؛ بنابراین در صورت تبدیل آلل C به T، این آنزیم جایگاه برش نداشته و قطعه ۱۷۴ جفت بازی برش نخواهد یافت. در صورت هموزیگوت بودن C، دو قطعه ۱۵۲ و ۲۲ جفت بازی خواهیم داشت و در صورت هتروزیگوت بودن، ۳ قطعه ۱۷۴، ۱۵۲ و ۲۲ جفت بازی خواهیم داشت.

نتایج بررسی فرکانس ژنوتیپ‌ها در جامعه هدف موردمطالعه

سه نوع ژنوتیپ موردنظر در این تحقیق شامل TT، CC و TC بود که فرکانس‌ها آن‌ها در جامعه هدف موردمطالعه در این تحقیق که از ۱۰۰ نفر سالم و ۱۰۰ نفر بیمار تشکیل‌شده بودند، موردبررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که فراوانی ژنوتیپ‌های TT، CC و TC در افراد سالم به ترتیب ۳۹، ۵۰ و ۱۱ مورد و فراوانی ژنوتیپ‌های TT، CC و TC در افراد بیمار به ترتیب ۶۱، ۲۲ و ۱۷ مورد است. نمودار ۱ این نتایج را نشان می‌دهد.

نمودار یک نشان می‌دهد که در بین افراد سالم، ژنوتیپ CC بیشترین و ژنوتیپ TC کمترین فراوانی را دارد و در بین افراد بیمار ژنوتیپ TT بیشترین و ژنوتیپ TC کمترین فراوانی را دارد. فراوانی هرکدام از ژنوتیپ‌ها باهم نوع آن‌ها در افراد سالم و بیمار



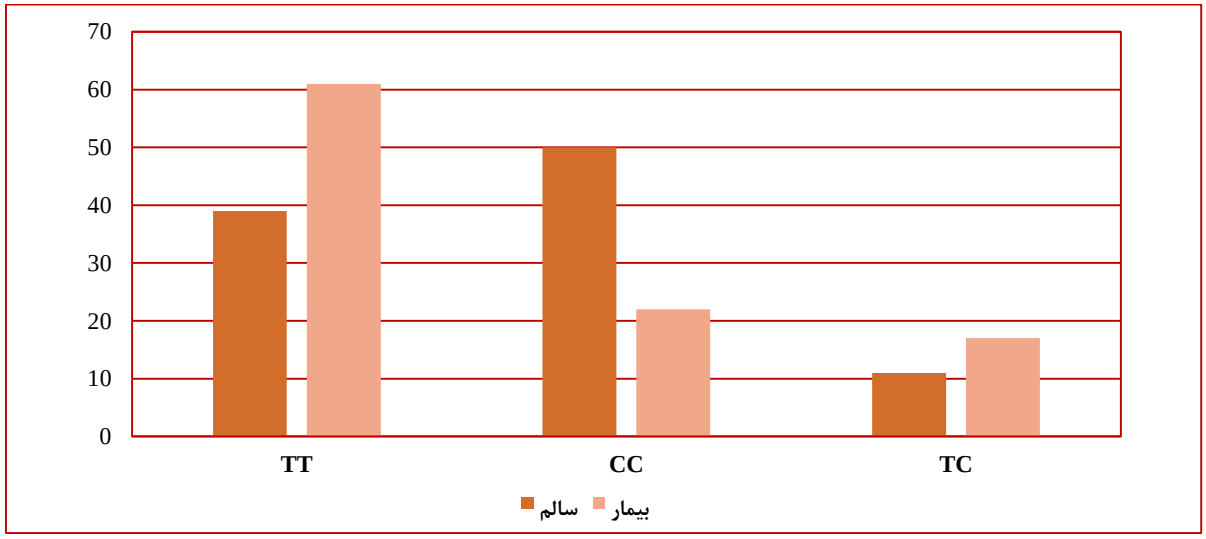
شکل ۲. محل برش آنزیم TaqI، $\frac{T/CGA}{AGC/T}$ است که آلل غالب C و آلل مرتبط با بیماری T است. بنابرین در صورت تبدیل آلل C به T، این آنزیم جایگاه برش نداشته و قطعه ۱۷۴ جفت بازی برش نخواهد یافت. در صورت هموزیگوت بودن C، دو قطعه ۱۵۲ و ۲۲ جفت بازی خواهیم داشت و در صورت هتروزیگوت بودن ۳، قطعه، ۱۷۴، ۱۵۲ و ۲۲ جفت بازی خواهیم داشت.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-04-04]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.4.3.9]

مقایسه شده و معنی‌داری آن بررسی گردیده است. مقایسه فراوانی ژنوتیپ TC بین افراد سالم و بیمار معنی‌دار نبوده (p<۰/۰۵) ولی بین فراوانی مابقی ژنوتیپ‌ها در افراد سالم و بیمار اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P<0.05).

نتایج بررسی فرکانس آلل‌ها در جامعه هدف موردمطالعه

پس از حصول فراوانی ژنوتیپ‌ها و بررسی آن‌ها، فرکانس آلل‌ها و درصد آن‌ها بر اساس اصل هاردی- وینبرگ محاسبه گردید. نتایج این محاسبه در جدول ۲ آورده شده است.



نمودار۱. فراوانی ژنوتیپ‌های موردمطالعه در پلی مورفیسم C/T در جایگاه rs7816345. همچنین فراوانی ژنوتیپ‌های TT ، CC و TC در افراد سالم (رنگ آبی) به ترتیب ۳۹، ۵۰ و ۱۱ مورد و فراوانی ژنوتیپ‌های TT، CC و TC در افراد بیمار (رنگ سبز) به ترتیب ۶۱، ۲۲ و ۱۷ مورد است. در ضمن نام ژنوتیپ‌ها در زیر نمودار آن ذکر گردیده است.

نام آلل	افراد بیمار (تعداد)	افراد سالم (تعداد)	درصد اختلاف بین افراد سالم و بیمار	P- value	OR (CI 95%)
T	۱۳۹	۸۹	٪۲۵	۱/۰۰۰	۲/۸۴۲
C	۶۱	۱۱۱	٪۲۵	--	--
TTغالبیت	۶۱	۳۹	-	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰
CC+CT	۳۹	۶۱	-	-	-

جدول ۲. فراوانی آلل‌های موردمطالعه و اختلاف درصد آن‌ها و ریسک ابتلا و در افراد سالم و بیمار. آلل T در افراد بیمار ۱۳۹ و در افراد سالم ۸۹ است که فراوانی الل T در افراد بیمار نسبت به افراد سالم ٪۲۵ افزایش نشان می‌دهد و آلل C در افراد بیمار ۶۱ و در افراد سالم ۱۱۱ است که فراوانی الل C در افراد بیمار نسبت به افراد سالم ٪۲۵ کاهش نشان می‌دهد.

بررسی این داده‌ها نشان می‌دهد که آلل T در افراد بیمار نسبت به افراد سالم ٪۲۵ افزایش نشان می‌دهد و آلل C در افراد بیمار نسبت به افراد سالم ٪۲۵ کاهش نشان می‌دهد که این اختلاف بین فرکانس آلل‌های مذکور معنی‌دار بوده و نتایج به‌احتمال وجود ارتباط بین افزایش آلل T (به‌اندازه ٪۲۵) و وقوع سرطان پستان اشاره می‌کند.

بحث

پلی مورفیسم rs7816345 یک SNP در کروموزم ۸ انسان است و با سایز پستان ارتباط دارد. این پلی مورفیسم در ناحیه کرومزومی ۸p۱۱,۲۳ واقع‌شده است و به‌طورمعمول با سرطان پستان وابسته به گیرنده استروژن (*HER*) زیرگروه لومن B که

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-04-04]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.4.3.9]

دارای پیامدهای بالینی هستند ارتباط دارد. *ZNF703* تنها ژن نزدیک به این منطقه، احتمالاً یک محرک انکوژن این بیش فعالی است (۱۱ و ۱۲).

ZNF703 در روی کروموزوم ۸ (8p11.23) قرار دارد. برخی از مطالعات ارتباط بین تکثیر ژن ناحیه 8p11.23 با سرطان پستان را با اثبات رسانده‌اند (۱۳). هولند و همکاران از رویکردهای ژنومی استفاده کردند و نشان دادند که ۱۲p۸ در ۱۳ درصد از سرطان‌های پستان نوع لومینال B تکثیر می‌یابد. آن‌ها این‌گونه استنباط کردند که *ZNF703* احتمالاً مهم‌ترین عملکرد را در آمپلیکون 8p12 دارد چراکه این ژن تنها ژن تکثیر یافته در دو نوع تومور موردمطالعه بود (۱۴ و ۱۵).

بر اساس مطالعات اسپکترومتری جرمی، مشخص گردید که *ZNF703* به‌عنوان فاکتور همراه در کمپلکس هسته‌ای شامل DCAF7، ۲PHB و ۲NCOR عمل می‌کند. همچنین بیان *ZNF703* منجر به فعال شدن بیان ژن مرتبط با سلول ساقه که با افزایش سرطان سلول‌های ساقه همراه است، می‌شود (۱۶ و ۱۷). تکثیر *ZNF703* با درجات بالا و تومورهای تجمعی (تومورهای پستانی لومینال B) مرتبط است که علت ضعف در پیش‌بینی کلینیکی را بیان می‌کند. اخیراً مشخص‌شده است که بیان بالای *ZNF703*، مستقل از تکثیر، با تشخیص ضعیف برای بیماران سرطان پستان با تومورهای زیرمجموعه لومینال B همبستگی دارد (۱۸). همچنین مشخص‌شده است که بیان خارجی *ZNF703* ممکن است NIH3T3 فیبروبلاست موشی را تغیر داده و تکثیر سلول های اپیتلیالی پستان را تنظیم کند. در تحقیقات دیگر بیان شد که بیان افزایش‌یافته ارتولوگ‌های موشی *ZNF703* (Zeppol[1]) در مدل الوگرافی با استفاده از تومورهای پستانی موش متاستاتیک، میزان تهاجم و نیز متاستاز تومورهای سرطان پستان را افزایش می‌دهد (۱۹). بااین‌حال مکانیسم‌های بالقوه *ZNF703* در سرطان‌زایی مشخص نبوده و تحقیقات کمی برای درک مکانیسم‌های دخیل صورت گرفته است (۲۰).

از بهترین روش‌ها برای شناسایی عوامل ژنتیکی مستعد کننده بیماری‌های پیچیده و چندعاملی مثل سرطان پستان، Genome-wide association studies (GWAS) است که در آن شیوع و فراوانی یک آلل خاص در افراد بیمار در مقایسه با افراد سالم (گروه کنترل) موردبررسی قرار می‌گیرد. این نوع مطالعات، پلی مورفیسم‌هایی از ژن‌های مختلف را به‌عنوان ریسک فاکتورهای ژنتیکی برای همراهی با نوع خاصی از بیماری در جمعیت‌ها نشان می‌دهد (۲۱).

یکی از این نوع مطالعات، مطالعه لیندستروم و همکاران است که بر روی زنان با نژاد اروپایی در سال ۲۰۱۵ صورت گرفته است. در این تحقیق تعدادی از جایگاه‌های ژنی شامل *(AREG, ESR1, ZNF365, LSP1/TNNT3, IGF1, TMEM184B /SGSM3/MKL[1]) و (PRDM6, 8p11.23, TMEM184B)* موردبررسی قرارگرفته است و نتیجه حاصل این است که تراکم ماموگرافی و خطر ابتلا به سرطان پستان به ترتیب در هفت ژن بالایی در جایگاه‌های پلی مورفیسم‌های rs703556-rs3817198- rs10995190-rs1266560-rs10034692-rs7289126- rs17001868 رابطه وجود دارد (۲۲).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ توسط استون و همکاران در رابطه بااستعداد ابتلا به سرطان پستان و تراکم ماموگرافی صورت گرفته است، پلی مورفیسم‌های (*EBF1*), rs1432679 (*MIR*1972-2*: FTO*) rs12710696 (2p24.1), rs17817449 (*ZNF365*) (در ناحیه ژن rs3757318 (*ESR1*), rs10995190 با تراکم ماموگرافی و درنتیجه سرطان پستان رابطه داشتند (۲۳).

تراکم ماموگرافی یک ریسک فاکتور تعیین‌شده برای سرطان پستان است که در میان زنانی که تحت هورمون درمانی یائسگی (MHT[2])می‌باشند، می‌تواند افزایش داده باشد. در این راستا مطالعه‌هایی در سال ۲۰۱۵ توسط رودولف و همکاران بر روی ارزیابی تعامل بین تنوع ژنتیکی و استفاده از هورمون درمانی یائسگی بر تراکم ماموگرافی صورت گرفته است.

پلی مورفیسم‌های کارشده در این مطالعه AREG-rs10034692, *PRDM6*-rs186749, *ESR1*-rs12665607, *ZNF365*-rs10995190, 8p11.23-rs7816345, *LSP1*-rs3817198, *IGF1*-rs703556, 12q24-rs1265507, *TMEM*184B-rs7289126, *SGSM3*-rs17001868)

بودند که درنتیجه مطالعه، rs ۹۳۵۸۵۳۱ از PRL قوی‌ترین تعامل را با سرطان پستان داشته است (۲۴).

علاوه بر آن در مطالعه دیگر توسط این محقق در همان سال ارتباط سه پلی مورفیسم rs7192724، rs17202296 و rs4888190 موجود در ژن *PLCG2* در استفاده از هورمون درمانی یائسگی بر تراکم ماموگرافی مشخص شد این سه پلی مورفیسم و می‌تواند یک ریسک فاکتور تعیین‌کننده درخطر سرطان پستان باشد (۲۵).

[1] zinc finger elbow-related proline domain protein 1
[2] menopausal hormone therapy

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-04-04]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.4.3.9]

مطالعه‌های در سال ۲۰۱۶ توسط پتریدیس و همکاران در رابطه بااستعداد ژنتیکی ابتلا به کارسینوم مجرای درجا (DCIS) صورت گرفت و نتایج نشان داد که (DCIS) اغلب با (IDC[3]) در ارتباط است. از بین پلی مورفیسم‌هایی که موردمطالعه قرار گرفتند سه نوع پلی مورفیسم ارتباط بسیار قوی با بیماری سرطان پستان داشتند که شامل (rs2981582-FGFR2, rs889312-*MAP3K* ،rs3803662-*TOX3*) است (۲۶).

از ژن‌های مهمی که رابطه قوی با سرطان پستان دارد، *ZNF703* است که در ناحیه کروموزومی 8p12 قرارگرفته است. اهمیت این ژن در تحقیق ما این است که پلی مورفیسم موردمطالعه در تحقیق ما (rs7816345) در نزدیک این ژن قرار دارد. رابطه بیان این ژن با بروز سرطان پستان از نوع لومینال B توسط سیرکولومب و همکاران در سال ۲۰۱۱ موردبررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش بیان ژن *ZNF703* در تومورهای لومینال B اتفاق میافتد که بررسی نتایج نشان داد که این ژن در تنظیم جمعیت سلول‌های بنیادی سرطان لومینال B، از طریق کنترل رونویسی فرآیندهای سلولی نقش ایفا می‌کند (۲۷).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مورد-شاهدی، ارزیابی پلی مورفیسم rs7816345 (نزدیک ژن *ZFN703*) مرتبط با خطر سرطان پستان در منطقه آذربایجان شرقی موردمطالعه قرار گرفت.

نتایج حاصل از مطالعه ما نشان می‌دهد انواع پلی مورفیسم‌ها که عامل تنوع ژنتیکی بوده و تعیین‌کننده تنوع فنوتیپی بین افراد می‌باشند، به نظر می‌رسد در حساسیت افراد به بیماری‌ها و پیشرفت بیماری‌ها دخیل هستند. نظر به اینکه پلی مورفیسم‌های ژنی یکی از عوامل خطرساز ابتلا به بیماری سرطان پستان به شمار می‌رود و با توجه به اینکه این پلی مورف‌های ژنی، توزیع فراوانی متفاوتی در جوامع و نواحی جغرافیایی مختلف نشان می‌دهد، لذا مطالعه‌ی واریانت‌های ژن‌های کاندید در جمعیت‌های مختلف برای یافتن ارتباط آن‌ها با بیماری سرطان پستان امری ضروری به نظر می‌رسد.

در این تحقیق احتمال ارتباط پلی مورفیسم rs7816345 با سرطان پستان مشخص شد؛ بنابراین می‌توان پلی مورفیسم مذکور را با بررسی‌های دقیق‌تر به‌عنوان مارکری جهت تشخیص استعداد ابتلا به بیماری سرطان پستان در جمعیت‌های مختلف پیشنهاد کرد.

به دلیل اینکه تشخیص زودهنگام سرطان‌ها و سرطان پستان مهم‌ترین گام در درمان آن‌ها است و از طرف دیگر عوارض داروهای شیمی‌درمانی مورداستفاده در درمان سرطان بسیار بالا است، وجود مارکری جهت تشخیص زودهنگام و قبل از پیشرفت بیماری و حتی مطلع ساختن فرد سالم از داشتن استعداد ابتلا به بیماری سرطان پستان، می‌تواند بسیار راه گشا بوده و امیدهای تازه‌ای برای کشف روش‌های نوین مقابله با سرطان در دنیا ایجاد کند.

در پایان با توجه به نتایج به‌دست‌آمده پیشنهاد می‌شود این پلی مورفیسم در قومیت‌های دیگر ایران همچنین ژن‌ها و پلی مورفیسم‌های دیگر دخیل در این بیماری نیز بررسی گردد.

تشکر و قدردانی

با تقدیر و تشکر از دانشگاه علوم پزشکی تبریز که با همکاری در این طرح ما را یاری کردند. این مقاله از پایان‌نامه به شماره 1421 کارشناسی ارشد از دانشگاه آزاد اسلامی بناب مستخرج شده است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی باهم ندارند.

References

1. Oldenburg RA, Meijers-Heijboer H, Cornelisse CJ, Devilee P. Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? Crit Rev Oncol Hematol. 2007; 63: 125.

2. Antoniou AC, Easton DF. Models of genetic susceptibility to breast cancer. Oncogene 2006; 25: 5898.

[3] Invasive ductal carcinoma

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-04-04]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.4.3.9]

3. Tan T, Zhang K, Sun WC. Genetic variants of ESR1 and SGSM3 are associated with the susceptibility of breast cancer in the Chinese population. Breast Cancer.2017; 24(3):369-374.
4. Shann YJ, Cheng C, Chiao CH, Chen DT, Li PH, Hsu MT. Genome-wide mapping and characterization of hypomethylated sites in human tissues and breast cancer cell lines. *Genome Res.* 2008;18(5):791-801.
5. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000; 7;100(1):57-70.
6. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Targeting the DNA repair defect of BRCA tumours. Curr Opin Pharmacol. 2005; 5: 388-93.
7. Shann YJ, Cheng C, Chiao CH, Chen DT, Li PH, Hsu MT. Genome-wide mapping and characterization of hypomethylated sites in human tissues and breast cancer cell lines. *Genome Res.* 2008; 18(5):791-801.
8. Rosa M. Advances in the molecular analysis of breast cancer: pathway toward personalized medicine. *Cancer Control.* 2015; 22(2):211-9.
9. Jung JA, Lim HS. Association between CYP2D6 genotypes and the clinical outcomes of adjuvant tamoxifen for breast cancer: a meta-analysis. *Pharmacogenomics.* 2014; 15(1):49-60.
10. Reynisdottir I, Arason A, Einarsdottir BO. High expression of ZNF703 independent of amplification indicates worse prognosis in patients with luminal B breast cancer. Cancer Med. 2013; 2:437-446.
11. Eriksson N, Benton GM, Do CB. Genetic variants associated with breast size also influence breast cancer risk. BMC Med Genet. 2012; 13: 53.
12. Nakamura M, Choe SK, Runko AP, Gardner PD, Sagerström CG. Nlz1/ZNF703 acts as a repressor of transcription. BMC Dev.2008; 8: 108.
13. Chin K, DeVries S, Fridlyand J. Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. Cancer Cell. 2006; 10: 529-541.
14. Holland DG, Burleigh A, Git A. ZNF703 is a common Luminal B breast cancer oncogene that differentially regulates luminal and basal progenitors in human mammary epithelium. EMBO Mol Med. 2011; 3: 167-180.
15. Pereira-Castro I, Costa AM, Oliveira MJ. Characterization of human NLZ1/ZNF703 identifies conserved domains essential for proper subcellular localization and transcriptional repression. J Cell Biochem.2013; 114: 120-133.
16. Dorfman R, Glazer L, Weihe U, Wernet MF, Shilo BZ. Elbow and Noc define a family of zinc finger proteins controlling morphogenesis of specific tracheal branches. Development. 2002; 129: 3585-3596.
17. Bazarov AV,Yaswen P. Who is in the driver's seat in 8p12 amplifications? ZNF703 in luminal B breast tumors. Breast Cancer Res.2011; 13: 308.
18. Reynisdottir I, Arason A, Einarsdottir BO. High expression of ZNF703 independent of amplification indicates worse prognosis in patients with luminal B breast cancer. Cancer Med. 2013; 2:437-446.
19. Slorach EM, Chou J and Werb Z. Zeppo1 is a novel metastasis promoter that represses E-cadherin expression and regulates p120-catenin isoform expression and localization. Genes Dev. 2011; 25: 471-484.
20. Spellman P and Gray J. A new treasure in the breast cancer gene hunt. Nat Med. 2011; 17: 422-423.
21. FORD, E.B. Polymorphism. Biological Reviews. 1945; 20, 73-88.
22- Lindström S1, Thompson DJ2. (2014) Genome-wide association study identifies multiple loci associated with both mammographic density and breast cancer risk. Nat Commun. 2014; 5:5303.
23. Stone J, Deborah J. Thompson a, Christopher S, Rulla M. Tamimi N, et al. Olson: Novel Associations between Common Breast Cancer Susceptibility Variants and Risk-Predicting Mammographic Density Measures. Cancer Res. 2015; 17: 20.
24. Rudolph, Jenny Chang-ClaudeGene–environment interaction and risk of breast cancer British. Journal of Cancer volume. 2015*:*125–133.
25. Rudolph1, Peter A. Fasching, Sabine Behrens1. A comprehensive evaluation of interaction between genetic variants and use of menopausal hormone therapy on mammographic density. Breast Cancer Research. 2015; 17:110
26. Petridis C, Brook M, Shah V, Kohut K, Gorman P, Caneppele M, et al, Genetic predisposition to ductal carcinoma in situ of the breast, Breast Cancer Res. 2016; 18: 22.
27. Sircoulomb F, Nicolas N, Ferrari A, Finetti P, Bekhouche I, Rousselet E, et al, ZNF703 gene amplification at 8p12 specifies luminal B breast cancer. EMBO Mol Med. 2011;3:153–166.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-04-04]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.4.3.9]

Original Article

Evaluation of Association between rs7816345 Polymorphism and Breast Cancer in East Azarbaijan Population

Behrooz Ghaemi O[1], Alivand MR[2*], Soltanzadeh H[3*], Tanomand A[3]

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Bonab Branch, Islamic Azad University, Bonab, Iran
2. Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz,Iran
3. Maragheh University of Medical Sciences, Maragheh, Iran

Received: 04 Jan 2021 Accepted: 28 Feb 2021

Abstract

Background & Objective: Breast cancer is one of the most common types of cancer among women and is the first cause of cancer death in women. The use of targeted therapies is based on biomarkers and specific targets that are identified by different methods. The presence of rs7816345 polymorphism seems to be involved in tumorigenesis. The aim of this study was to investigate the association between rs7816345 polymorphism (close to *ZFN703* gene) and the incidence of breast cancer in the East Azerbaijan population.

Materials & Methods: In this study, 100 blood samples from patients with breast cancer and 100 blood samples from healthy persons as the control group were selected. Then, the DNA was extracted from all samples. In the next step, the specimens with specific primer were amplified by PCR. Finally, PCR products were treated with TaqI restriction enzyme and electrophoresed on agarose gel. Data were analyzed by SPSS software version 21 by descriptive and chi-square test.The significance level was considered to be less than 0.05

Results: The percentage of T allele in healthy persons and patients was 44.5% and 69.5%, respectively, and the percentage of allele C was 55.5% and 30.5% in healthy persons and patients, respectively. The results of this study show that the T allele in patients is 25% higher than normal people, and the C allele in patients is 25% lower than healthy ones.

Conclusion: There is probably a relationship between the increase in the T allele frequency (25%) and the incidence of breast cancer, because early diagnosis of cancer and breast cancer is the most important step in its treatment. The presence of a marker for early diagnosis before disease progression and even informing the healthy person of having a potential for breast cancer can be very promising and have new hopes for discovery and create new ways to cope with cancer in the world.

Keywords: Breast Cancer, Polymorphism, rs7816345

***Corresponding Authors: 1. Soltanzadeh Hossein**, Maragheh University of Medical Sciences, Maragheh, Iran
Email: Hossien4040@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-4416-7593
2. Alivand Mohammad Reza, Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz,Iran
Email: mohammadreza_alivand@yahoo.com
https://orcid.org/0000-0002-5847-3594

Journal of Advanced Biomedical Sciences; 10 (2020): 2955-2964

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-04-04]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2020.10.4.3.9]