

بررسی همراهی چندشکلی ژن *TP53* (rs12602273C>G) با استعداد ابتلا به سرطان پستان در شمال غرب ایران

فاطمه لطفی داشبلاغ^۱، سارا غفاریان^{۱*}

مقاله پژوهشی

مقدمه: ژن *TP53* بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ که به‌عنوان ژن سرکوب‌کننده تومور شناخته شده است، کدکننده فاکتور رونویسی *p53* می‌باشد و این فاکتور پیشرفت چرخه سلولی را کنترل می‌کند. این مطالعه با هدف بررسی همراهی چندشکلی rs12602273 C>G ژن *TP53* با استعداد ابتلا به سرطان پستان در جمعیت شمال غرب ایران انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه مورد - شاهدهی، همراهی چندشکلی rs12602273 ژن *TP53* با استعداد ابتلا به سرطان پستان در جامعه آماری متشکل از ۱۰۰ مورد بیمار و ۱۰۰ فرد سالم با تکنیک Tetra ARMS-PCR مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 16 و برنامه آماری آنلاین javastat online statistics package انجام شد.

نتایج: فراوانی ژنوتیپ‌های CC، CG و GG در بیماران به ترتیب ۸۱/۵۲، ۱۶/۳۰ و ۲/۱۷ درصد و فراوانی آن‌ها در افراد سالم مورد مطالعه به ترتیب ۷۹/۳۴، ۱۷/۳۹ و ۳/۲۶ درصد بود. فراوانی آلل‌های C و G در افراد بیمار به ترتیب ۸۹/۶۷ و ۱۰/۳۲ درصد بود. جمعیت کنترل فراوانی آلل‌های C و G در افراد بیمار به ترتیب ۸۸/۰۴ و ۱۱/۹۵ درصد بود. تجزیه‌های آماری نشان دهنده عدم همراهی فراوانی ژنوتیپی ($P > 0.05$) و آلی ($P > 0.05$) چندشکلی (rs12602273C>G) ژن *TP53* با سرطان پستان بود. هم‌چنین نتایج حاصل نشان‌دهنده عدم همراهی چندشکلی مورد مطالعه با ویژگی‌های بالینی بیماران مبتلا به سرطان پستان در زنان شمال غرب ایران بود ($P > 0.05$).

نتیجه‌گیری: براساس نتایج حاصل چندشکلی rs12602273C>G ژن با *TP53* با افزایش ریسک ابتلا به سرطان پستان همراهی ندارد. همراهی توزیع ژنوتیپی این SNP با ویژگی‌های بالینی بیماران غیرمعنی دار بود.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، ژن *TP53*، Tetra ARMS-PCR

ارجاع: لطفی داشبلاغ فاطمه، غفاریان سارا. بررسی همراهی چندشکلی ژن *TP53* (rs12602273C>G) با استعداد ابتلا به سرطان پستان در شمال غرب ایران. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۳؛ ۳۲ (۱): ۲۷-۴۱۶.

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۴۴۲۰۵۴۹۹، پست الکترونیکی: s.gaffarian@azruniv.ac.ir، صندوق پستی: ۵۳۷۵۱۷۱۳۷۹

کمپلکس‌های *cdk2* - سایکلین D و *cdk2* - سایکلین E متوقف می‌کند و بدین ترتیب موجب مهار آنزیم‌های کینازی وابسته به گروهی از پروتئین‌ها به نام سایکلین‌ها می‌شود (۱۰). یکی از عملکردهای عمده ژن *TP53* در ارتباط با تومورها، سرکوب تومور از طریق تنظیم سوخت و ساز است. مطالعات نشان داده‌اند *P53* نقش مهمی در تنظیم سوخت و ساز سلولی به ویژه گلیکولیز و فسفوریلاسیون اکسیداتیو سلول‌های سرطانی دارد (۱۱). سلول‌های سرطانی برای تامین انرژی نیاز به مصرف گلوکز بالاتر و گلیکولیز هوازی بیشتری دارند (۱۲). در این سلول‌ها القای بیان ژن *TIGAR* با کاهش گلیکولیز سبب ممانعت از توسعه فرم‌های تهاجمی سرطان و با کاهش ROS از آپوپتوز القا شونده از طریق *P53* جلوگیری می‌کند و افزایش بیان *SCO2* با افزایش فسفوریلاسیون اکسیداتیو منجر به افزایش ROSها (Reactive oxygen species) و آپوپتوز وابسته به *P53* می‌شود. ژن *P53* با القای بیان ژن‌های *TIGAR* و *SCO* علاوه بر تنظیم سوخت و ساز سلول‌های سرطانی، سرنوشت این سلول‌ها را نیز کنترل می‌کند. ژن *P53* با بیان *TIGAR* در آسیب‌های با دوز پایین و قابل ترمیم، سبب توقف چرخه سلولی می‌شود، اما همین ژن در آسیب‌های شدید و غیر قابل ترمیم، ژن *SCO* را فعال و سلول را وادار به آپوپتوز می‌کند (۱۱). مشخص شده که در اغلب سرطان‌های انسانی *P53* غیر فعال و یا عملکرد آن مختل می‌شود. همچنین نشان داده شده است که این پروتئین نقش حیاتی در جلوگیری از گسترش تومور دارد (۱۳). شایع‌ترین اختلال در سرطان‌های انسانی جهش در ژن *P53* است. درصد بالایی (۸۷٪) از جهش‌های ژن *TP53* شامل جایگزینی یک باز می‌شود. (۱۴) به‌علاوه، *WRAP53* یک نسخه آنتی‌سنس طبیعی از *P53* است که رونویسی *TP53* را تنظیم و به عنوان یک پروتئین، چرخه سلولی طبیعی را تعدیل و می‌تواند منجر به حساسیت به سرطان پستان شود (۱۵). چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNPs) زمانی اتفاق می‌افتند که یک نوکلئوتید منفرد با نوکلئوتید دیگری جایگزین می‌شود و این رایج‌ترین نوع تغییر در DNA است. SNPها

سرطان پستان ناشی از تکثیر غیرطبیعی سلول‌ها در بافت پستان، شایع‌ترین بدخیمی در زنان و عامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان سراسر جهان می‌باشد (۱). طبق آمار ارائه شده توسط GLOBOCAN، از مجموع موارد ابتلای زنان به سرطان در سطح جهان در سال ۲۰۲۰، میزان بروز سرطان پستان ۳۹/۴ درصد، میزان شیوع آن ۴۷/۲ درصد و میزان مرگ و میر ناشی از آن ۲۴/۵ درصد از جمعیت بوده است، این موارد در ایران به ترتیب ۳۸ درصد، ۵۱ درصد و ۲۰ درصد از جمعیت گزارش شده است. بر اساس آمارها بروز سالانه این سرطان در کشورهایی که دارای میزان پایینی از بروز سرطان پستان بوده‌اند از جمله ایران در حال افزایش است (۲). فاکتور *p53* پیشرفت چرخه سلولی را کنترل می‌کند. جهش‌های *TP53* در سرطان‌ها رایج هستند (۳). این جهش‌ها تقریباً در نیمی از تومورهای انسانی یافت می‌شوند و به نظر می‌رسد که بقیه تومورها نیز به علت نقص در مسیرهای مرتبط با *P53* ایجاد می‌شود (۴). طبق تحقیقات جدید مبتنی بر توالی یابی نسل جدید، جهش‌های *TP53* شایع‌ترین تغییرات ژنتیکی در سرطان پستان بوده و به‌طور متوسط ۳۰ درصد از آن‌ها را تشکیل می‌دهند. از سوی دیگر، توزیع این جهش‌ها به شدت با زیرگروه‌های تومور مرتبط است (۵). ژن *TP53* مستقر بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۱۷ به طول ۲۰ کیلو باز و با ۱۱ اگزون عملکردی (۶)، به عنوان مهم‌ترین ژن مهارکننده تومور، پروتئین *P53* را کد می‌کند که یک فسفوپروتئین هسته‌ای متشکل از ۹۳۹ اسید آمینه و چندین دومین عملکردی است و بیان بیش از ۲۵۰۰ ژن هدف را تنظیم می‌کند (۷). عملکردهای قابل توجه *p53* شامل برهمکنش با پروتئین‌های اتصال یابنده به TATA و مهار رونویسی، کنترل چرخه سلولی، پاسخ به آسیب DNA و ترمیم DNA آسیب دیده یا القای آپوپتوز، و ویژگی‌های بازدارندگی توموری و آنکوژنی هستند (۸). پروتئین تومور *p53* چرخه سلولی را از طریق اتصال مستقیم DNA کنترل می‌کند (۹). فرآورده ژن *p53* چرخه سلولی را در G1 و با ممانعت از فعالیت

برای محاسبه تعداد نمونه از رابطه کوکران استفاده شد و تعداد افراد نمونه کنترل نیز مطابق با نمونه بیمار تعیین شد. نمونه‌گیری و ثبت مشخصات افراد با کسب اجازه از آنها انجام شد و از هر فرد ۴ سی‌سی خون وریدی گرفته شد. استخراج DNA از خون به روش نمک اشباع (out Salting) انجام شد. سپس بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراجی با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد و اسپکتروفتومتر انجام شد.

تکنیک **Tetra ARMS-PCR**: بررسی چندشکلی rs12602273C>G ژن TP53 با استفاده از تکنیک Tetra-primer Amplification Refractory Mutation System (Tetra ARMS-PCR) Polymerase Chain Reaction انجام شد. توالی آغازگرها بر مبنای مطالعه Lin و همکاران طراحی (۲۰) و سنتز آنها توسط شرکت Metabion (Germany) انجام شد (جدول ۱). مشخصات و توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر توالی چندشکلی rs12602273 در جدول ۱ و محل اتصال آغازگرها در شکل ۱ نشان داده شده است. چرخه‌های حرارتی واکنش زنجیره پلیمرز شامل واسرشته‌سازی (Denaturing) اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه تکثیر در چرخه حرارتی شامل واسرشته‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمرها به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و یک چرخه گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. بعد از بهینه‌سازی چرخه‌ها و ترکیبات واکنش PCR، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۱۰/۷۵ میکرولیتر با اجزای ۳/۵ میکرولیتر MasterMix (AMPLIQON, Denmark)، ۱/۲۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای خارجی و ۲ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای داخلی در میکروتیوب ۰/۵ با یکدیگر مخلوط شدند تمام مراحل روی یخ انجام شد. نمونه‌ها جهت انجام واکنش در دستگاه Thermal Cycler (ABI, Thermo Fisher Scientific, USA) قرار گرفت. چرخه‌های حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل یک چرخه در دمای ۹۴ °C به مدت

فراوان‌ترین و پایدارترین تنوع ژنتیکی در ژنوم‌ها هستند (۱۶). بیش از ۲۰۰ چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) در ژن p53 شناسایی شده‌اند که بالای ۹۰ درصد آنها در نواحی غیر کدکننده قرار گرفته‌اند. این تغییرات ممکن است بر عملکرد پروتئین p53 تأثیر و در نتیجه بر خطر سرطان، پیشرفت یا پاسخ به درمان تأثیر بگذارد (۱۷). پولادی و همکاران در مطالعه‌ای روی زنان آذری ایرانی، ژن TP53 را به عنوان یک ژن مهم در تنظیم چرخه سلولی دانسته و هاپلوتایپ CAGC را به عنوان یک عامل خطر و هاپلوتایپ GACC را به عنوان یک عامل محافظتی در برابر سرطان پستان معرفی کردند (۱۵). سامانی و همکاران در مطالعه‌ای SNP شماره rs1625895 ژن p53 با بروز سرطان پستان در زنان ژنوتیپ هموزیگوت GG متداول‌ترین ژنوتیپ در ارتباط با افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان زنان ایرانی است (۱۸). بر اساس مطالعه رو و همکاران هیچ‌کدام از ۵ rs9895829, rs8064946, rs1042522, rs12951053SNP, و rs12602273 ژن TP53 ارتباط معنی‌داری با بیماری استئوسارکوما در جمعیت چینی نداشتند ($P < 0.05$) (۱۹). لین و همکاران همراهی دو آلل rs9895829G و rs1788227C از ژن p53 را با سرطان مثانه بر روی جمعیت کائوسینگ تایوان با استفاده از روش Tetra ARMS-PCR نشان دادند (۲۰). با توجه به اهمیت ژن TP53 و شناسایی جهش‌های آن در اغلب موارد ابتلا به سرطان، بررسی منابع انجام شده و عدم وجود گزارش قبلی از چند شکلی SNP rs12602273C>G ژن TP53 در جمعیت شمال غرب ایران، در این مطالعه همراهی چندشکلی rs1972820G>A واقع در موقعیت 17:7679695 (GRCh38) در ناحیه 3'UTR این ژن و دارای دو آلل C و G (۲۱) با استعداد ابتلا به سرطان پستان در شمال غرب ایران مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

نمونه‌گیری: این مطالعه یک بررسی موردی-شاهدی بوده و انتخاب بیماران به صورت تصادفی انجام شد. جمعیت مورد مطالعه شامل ۱۰۰ زن مبتلا به سرطان پستان و ۱۰۰ زن سالم بدون سابقه فامیلی سرطان در اقوام درجه یک و دو آنها بود.

بین گروه شاهد و بیمار با استفاده از آزمون مربع کای پیرسون بررسی شد. شدت ارتباط بین چند شکلی‌ها و ریسک ابتلا به سرطان با استفاده از نسبت شانس با فاصله اطمینان ۹۵٪ محاسبه گردید. کاوش‌های آماری ذکر شده با استفاده از برنامه javastat online statistics package به آدرس <http://statpages.org/ctab2x2.html> انجام شد. برای بررسی ارتباط بین مشخصات بالینی بیماران شامل سن بیماران، درجه تومور، درگیری لنف، سمت درگیر، اندازه تومور، مرحله تومور و نوع بیماری با توزیع ژنوتیپی و شاخص میانگین از نرم‌افزار SPSS version 16 استفاده شد. در تمامی آزمون‌ها، $p < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. هم‌چنین آنالیزهای *In silico* برای این چندشکلی با استفاده از نرم‌افزارهای SplicAid2، Alibaba و RNAsnp انجام گرفت.

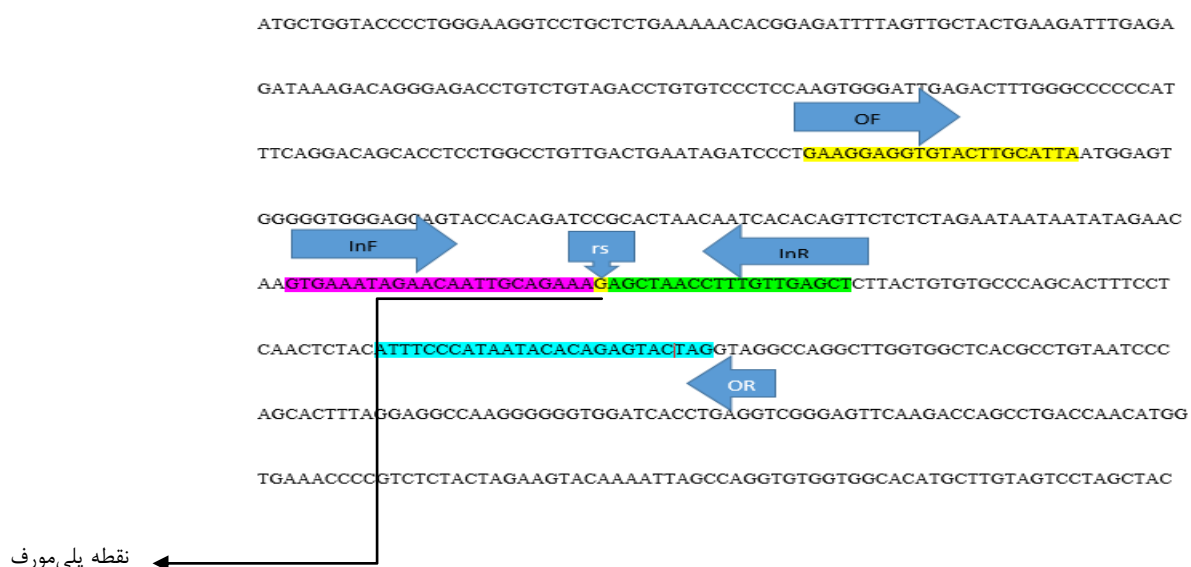
۳۰۰ ثانیه جهت واسرشته‌سازی اولیه، سپس واسرشته‌سازی در 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای 40°C به مدت ۴۰ ثانیه و بسط در دمای 72°C به مدت ۴۰ ثانیه برای ۳۵ چرخه و یک چرخه بسط نهایی در 72°C به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند. اندازه قطعات تکثیر شده بر روی ژل آگارز با استفاده از نشانگر اندازه DNA، 1000bp (SinaClon, Iran) تعیین شد. رنگ‌آمیزی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از Safe Stain (SinaClon, Iran) انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

با توجه به ماهیت مورد - شاهدهی مطالعه، تجزیه و تحلیل آماری نتایج بین افراد بیمار و سالم و زیرگروه‌های بیمار به‌صورت مقایسه‌ای انجام شد. ارتباط بین ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده و اندازه قطعات تکثیری طی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

Primer	Sequence	SNP	Product length (bp)
Outer Forward	5'GAAGGAGGTGTACTTGCATTA3'		203
Outer Reverse	5'CTAGTACTCTGTGTATTATGGGAAAT3'		
Inner Forward	5'GTGAAATAGAACAATTGCAGATAC3'	G	102
Inner Reverse	5'AGCTCAACAAAGGTTAGGTC3'	C	143

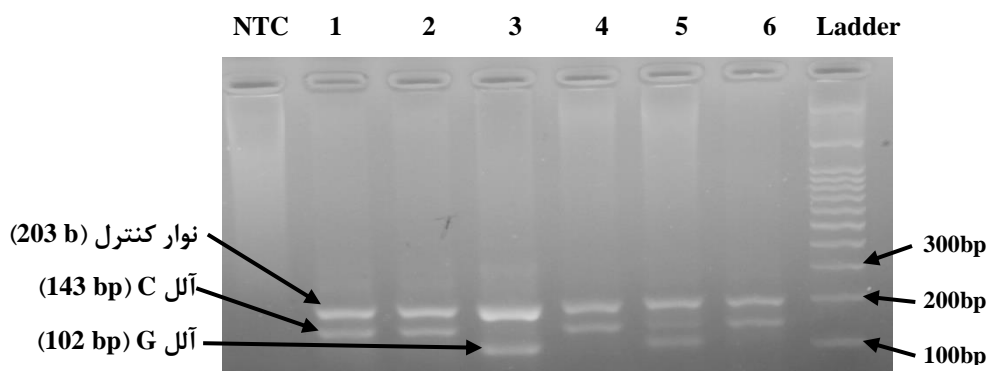


شکل ۱: محل اتصال پرایمرها بر روی توالی ژن TP53

نتایج

از بین ۱۰۰ بیمار بررسی شده، تکثیر DNA به روش Tetra ARMS-PCR در ۹۲ بیمار با موفقیت انجام شد. از بین ۹۲ بیمار دارای تکثیر موفق، ویژگی‌های بالینی شامل سمت درگیر برای ۱۱ بیمار، سن برای ۱۰ بیمار، نوع تومور برای ۱۹ بیمار، مرحله تومور برای ۳۵ بیمار، سایز تومور برای ۱۹ بیمار و درگیری لنفی برای ۲۵ بیمار در دسترس نبود. اطلاعات بالینی بیماران در جدول ۳ ذکر شده است. طول قطعات حاصل از

واکنش PCR برای نوار کنترل حاصل تکثیر توسط پرایمرهای Outer Forward و Outer Reverse، ۲۰۳ جفت باز، برای نوار C مربوط به آلل وحشی حاصل تکثیر توسط پرایمرهای Outer Forward و Inner Reverse، ۱۴۳ جفت باز و برای نوار G مربوط به آلل جهش یافته حاصل تکثیر توسط پرایمرهای outer Reverse و Inner forward، ۱۰۲ جفت باز بود (شکل ۲).



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR مربوط به ژنوتیپ‌های CC، CG و GG افراد بیمار بر روی ژل آگارز ۲ درصد

آلل G، ۱۱/۹۵ درصد (با تعداد ۲۲) بود. در جمعیت بیمار فراوانی آلل G، ۸۸/۰۴ درصد (با تعداد ۱۶۵) و فراوانی آلل C، ۱۰/۳۲ درصد (با تعداد ۱۹) بود. در هر دو گروه بیمار و کنترل آلل C بیشترین فراوانی را داشت. مقدار P برای هر دو آلل C و G برابر با ۰/۶۱ بود. نتایج نشان دهنده عدم همراهی فراوانی آللی چندشکلی جایگاه rs12602273C>G ژن TP53 با سرطان پستان بود (جدول ۲). همراهی فراوانی آللی چندشکلی جایگاه rs12602273C>G ژن TP53 با سرطان پستان در بیماران دارای تومورهای IDC نیز غیرمعنی‌دار بود (P=0.186). همراهی چندشکلی rs1260073 ژن TP53 با علائم بالینی بیماران: با بررسی ارتباط چندشکلی rs12602273 ژن TP53 با علائم بالینی بر اساس تجزیه‌های انجام شده ارتباط معنی‌داری بین توزیع فراوانی‌های ژنوتیپی چندشکلی rs12602273 ژن TP53 با علائم بالینی شامل نوع تومور (P=0.56)، درجه تومور (P=0.11)، سن (P=0.09)، سمت

توزیع فراوانی ژنوتیپی بین دو گروه بیمار و کنترل: بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش در جمعیت کنترل بیشترین فراوانی متعلق به ژنوتیپ CC با فراوانی ۷۹/۳۴ درصد (۷۳ نفر) و کمترین فراوانی متعلق به ژنوتیپ GG با فراوانی ۲/۲۶ درصد (۳ نفر) بود. فراوانی هتروزیگوت‌های CG برابر با ۱۷/۳۹ درصد (۱۶ نفر) بود. در جمعیت بیماران مورد مطالعه بیشترین فراوانی و کمترین فراوانی به ترتیب متعلق به ژنوتیپ‌های CC و GG با فراوانی ۸۱/۵۲ (۷۵ نفر) و ۲/۱۷ (۲ نفر) درصد بود. فراوانی ژنوتیپ CG، ۱۶/۳ درصد (۱۵ نفر) بود. برای ژنوتیپ‌های CC، CG و GG مقادیر P به ترتیب ۰/۷۱، ۰/۸۴ و ۰/۶۵ بود. ارتباط معنی‌داری بین فراوانی هیچ‌کدام از ژنوتیپ‌های جایگاه چندشکل rs12602273C>G ژن TP53 با احتمال ابتلا به سرطان پستان مشاهده نشد (جدول ۲).

توزیع فراوانی آللی بین دو گروه بیمار و کنترل: در جمعیت کنترل فراوانی آلل C، ۸۹/۶۷ درصد (با تعداد ۱۶۲) و فراوانی

درگیر (P=0.87)، اندازه تومور (P=0.61) و درگیری غدد لنفی (P=0.56) مشاهده نشد (جدول ۳). با توجه به تعداد زیاد افرادی با تومورهای IDC، تجزیه همراهی این چندشکلی با سن این دسته از بیماران نیز انجام شد که نشان دهنده عدم همراهی سن با تومورهای IDC بود (P=0.20).

آنالیز In silico جایگاه چندشکل rs1260073 ژن TP53

تغییرات ساختار فضایی ناشی از چندشکلی TP53 rs12602273 ژن TP53 توسط نرم‌افزار آنالین RNAsnp در شکل شماره ۳ نشان داده شده است. بر این اساس تغییر ساختار فضایی ناشی از چندشکلی rs12602273 ژن TP53 منجر به کاهش ΔG آلل جهش یافته ($\Delta G = -47.80$ kcal/mol) در مقایسه با آلل طبیعی ($\Delta G = -51.60$ kcal/mol) شد که غیرمعنی‌دار بود (P>0.2). نتایج حاصل از آنالیز چندشکلی‌های مورد نظر بر روی ژن TP53 توسط نرم‌افزار Splice Aid2 نشان داد که در حالت جهش‌یافته دو پروتئین SC35 و ETR-3 با امتیاز +۵ به RNA متصل می‌شوند. اتصال با امتیاز مثبت منجر به تسهیل پیرایش اگزون، و با امتیاز منفی باعث تسهیل پیرایش اینترون می‌شود. اطلاعات حاصل از این آنالیز در شکل ۴ قابل مشاهده است. نتایج حاصل از آنالیز چندشکلی مورد نظر بر روی ژن TP53 توسط نرم‌افزار ALIbaba2.1، نشان‌دهنده تمایل فاکتورهای رونویسی متفاوت به ناحیه مورد نظر در حالت وحشی و جهش‌یافته است. نتایج حاصل از این آنالیز در جدول ۳ قابل مشاهده است.

جدول ۲: توزیع فراوانی ژنوتیپی و آللی در افراد کنترل و بیمار

ژنوتیپ/ آلل	بیمار (تعداد=۹۲)	درصد فراوانی	کنترل (تعداد=۹۲)	درصد فراوانی	P	OR CI=95%
CC	۷۵	۸۱/۵۲	۷۳	۷۹/۳۴	۰/۷۱	۱/۱۴۸
CG	۱۵	۱۶/۳۰	۱۶	۱۷/۳۹	۰/۸۴	۰/۹۲۵
GG	۲	۲/۱۷	۳	۳/۲۶	۰/۶۵	۰/۶۵۹
C	۱۶۵	۸۹/۶۷	۱۶۲	۸۸/۰۴	۰/۶۱	۱/۱۷۹
G	۱۹	۱۰/۳۲	۲۲	۱۱/۹۵	۰/۶۱	۰/۸۴۸

جدول ۳: ویژگی‌های بالینی بیماران و توزیع چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs12602273 آلل C در ارتباط با مشخصات بالینی بیماران (n=92)

P	GG (%) تعداد(درصد)	CG (%) تعداد(درصد)	CC (%) تعداد(درصد)	گروه	ویژگی‌های پاتولوژی
۰/۰۹	۱(٪۲)	۳(٪۸)	۳۲(٪۸۸)	45≥	سن(سال)
	۰(٪۰)	۱۰(٪۲۱)	۳۶(٪۷۸)	45>	
	۱(٪۱۰)	۱(٪۱۰)	۶(٪۶۰)	نامعلوم	
۰/۸۷	۱(٪۲)	۶(٪۱۳)	۳۶(٪۸۳)	راست	سمت درگیر
	۰(٪۰)	۶(٪۱۷)	۲۸(٪۸۲)	چپ	
	۰(٪۰)	۱(٪۲۵)	۳(٪۷۵)	هر دو طرف	
	۱(٪۹)	۲(٪۱۸)	۸(٪۷۲)	نامعلوم	
۰/۶۱	۰(٪۰)	۵(٪۱۷)	۲۲(٪۷۸)	T1	*اندازه
	۱(٪۲)	۳(٪۷)	۳۵(٪۹۲)	T2	تومور(سانتیمتر)
	۰(٪۰)	۱(٪۱۴)	۶(٪۸۵)	T3	
	۱(٪۵)	۶(٪۳۱)	۱۲(٪۶۳)	نامعلوم	
۰/۵۶	۰(٪۰)	۸(٪۲۰)	۳۱(٪۷۹)	N0	**درگیری لنفی
	۱(٪۶)	۱(٪۶)	۱۴(٪۸۷)	N1	
	۰(٪۰)	۲(٪۱۸)	۹(٪۸۱)	N2	
	۰(٪۰)	۰(٪۰)	۱(٪۱۰۰)	N3	
	۱(٪۴)	۴(٪۱۶)	۲۰(٪۸۰)	نامعلوم	
۰/۱۱	۱(٪۳)	۲(٪۶)	۳۰(٪۹۰)	Stage 1	درجه تومور
	۰(٪۰)	۴(٪۱۷)	۱۹(٪۸۲)	Stage 2	
	۰(٪۰)	۱(٪۱۰۰)	۰(٪۰)	Stage 3	
	۱(٪۲)	۸(٪۲۲)	۲۶(٪۷۴)	نامعلوم	
۰/۵۶	۱(٪۲)	۷(٪۱۳)	۴۴(٪۸۴)	IDC	نوع تومور
	۰(٪۰)	۰(٪۰)	۵(٪۱۰۰)	ILC	
	۰(٪۰)	۱(٪۱۲)	۷(٪۸۷)	Fibroadenoma	
	۰(٪۰)	۰(٪۰)	۶(٪۱۰۰)	Fibrocystic	
	۰(٪۰)	۱(٪۱۰۰)	۰(٪۰)	Phyllodes	
	۰(٪۰)	۰(٪۰)	۱(٪۱۰۰)	Comodo	
	۱(٪۵)	۶(٪۳۱)	۱۲(٪۶۳)	نامعلوم	

* T1≤2cm, T2: 2-5cm, T3> 5cm, ** N0: 0, N1: 1-3cm, N2: 4-9cm, N3≥ 10cm



شکل ۳: تغییرات ساختار فضایی ناشی از چندشکلی rs12602273 ژن

TP53 A: آلل حالت جهش یافته $\Delta G = -47.80 \text{ kcal/mol}$ و B: آلل طبیعی $(\Delta G = -51.60 \text{ kcal/mol})$.



شکل ۴: آنالیز چندشکلی ژن *TP53* توسط نرم‌افزار آنلاین Splice Aid2
 A: عدم اتصال دو پروتئین SC35 و ETR-3؛ B: اتصال دو پروتئین SC35 و ETR-3.

جدول ۳: آنالیز چندشکلی ژن *TP53* توسط نرم‌افزار آنلاین ALIbaba2.1

SNP	Rs12602273
الل وحشی	C
الل جهش یافته	G
فاکتورهای رونویسی در حالت وحشی	C/EBPalp
فاکتورهای رونویسی در حالت جهش یافته	C/EBPalp

عروق خونی اشاره کرد. جهش‌های *TP53* در سرطان‌ها رایج هستند بطوریکه جهش‌های ژن *p53* بیشترین فراوانی را در سرطان‌های انسان دارد. جهش‌های این ژن تقریباً در ۲۵ تا ۳۰ درصد موارد سرطان پستان شناسایی شده‌است (۲۲). ارزیابی دقیق جهش‌های این ژن در مبتلایان به سرطان پستان می‌تواند در تشخیص، پیش‌آگهی یا درمان آن اهمیت داشته باشد. نجفی درچه و همکاران در مطالعه‌ای روی جمعیت زنان اصفهان ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم تکرار TAAAA در ژن *p53* و خطر ابتلا به سرطان پستان گزارش کردند. در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین این ژنوتیپ‌ها با درجه‌ی پیشرفت بیماری، وضعیت بیان گیرنده‌های استروژن، پروژسترون و Her2 و سن مشاهده نشد (۲۳). هم‌چنین شیخ‌پور و تقی‌پور ظهیر در مطالعه‌ای بر روی زنان مبتلا به سرطان پستان یزد، توزیع پلی‌مورفیسم کدون ۷۲ برای ژنوتیپ‌های آرژنین/آرژنین، پرولین/پرولین و آرژنین/پرولین را در بیماران به ترتیب

بحث

فراوانی ژنوتیپ‌های CC، CG و GG در بیماران به ترتیب ۸۱/۵۲، ۱۶/۳۰ و ۲/۱۷ درصد و فراوانی آلل‌های C و G در افراد بیمار به ترتیب ۸۹/۶۷ و ۱۰/۳۲ درصد بود. در جمعیت کنترل فراوانی آلل‌های C و G در افراد بیمار به ترتیب ۸۸/۰۴ و ۱۱/۹۵ درصد بود. تجزیه‌های آماری نشان دهنده عدم همراهی فراوانی ژنوتیپی و آللی چندشکلی (rs12602273C>G) با *TP53* در سرطان پستان بود. هم‌چنین بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، همراهی معناداری بین چندشکلی مورد مطالعه با ویژگی‌های بالینی بیماران مبتلا به سرطان پستان در زنان شمال‌غرب ایران مشاهده نشد. ژن *TP53* یک ژن سرکوب‌کننده تومور است که نقش کلیدی در بسیاری از مسیرهای سلولی دارد. از مهم‌ترین عملکردهای *P53* می‌توان به نقش آن در فعالیت‌های ضروری سلول مانند تکثیر، تمایز، مرگ سلولی، ترمیم DNA و تشکیل

سرطان مثانه ($P=0.041$) نشان داد. همچنین براساس نتایج مطالعه حاضر هیچ‌یک از ژنوتیپ‌های چندشکل با علائم بالینی افراد بیمار از قبیل سن، اندازه تومور، درجه تومور، درگیری غدد لنفاوی، سمت درگیری و نوع تومور همراهی معناداری نداشتند. با توجه به اینکه این اولین گزارش از ارتباط چندشکلی rs12602273 ژن TP53 با احتمال ابتلا به سرطان پستان در شمال‌غرب ایران است می‌تواند نشان‌دهنده عدم همراهی چندشکلی مورد مطالعه با سرطان پستان در زنان این منطقه باشد. عدم تغییر در ساختار فضایی ناشی از چندشکلی rs12602273 ژن TP53 با وجود تغییر در ΔG و اتصال فاکتور رونویسی مشابه به اینجا برای دو آلل وحشی و جهش یافته نشان دهنده مطابقت نتایج حاصل از پژوهش در جهت عدم همراهی این چندشکلی با ریسک ابتلا به سرطان در جمعیت مورد مطالعه بود. توصیه می‌شود در مطالعات مشابه یک نمونه از هر ژنوتیپ توالی‌یابی و از صحت نوارهای تکثیر شده اطمینان حاصل شود. همچنین جهت اطمینان بررسی ارتباط چندشکلی rs12602273 با احتمال ابتلا به سرطان پستان در جامعه آماری بزرگتری از افراد بیمار و سالم، مطالعه بیان افتراقی این ژن در افراد بیمار و سالم، آنالیزهای *in silico* بیشتر با استفاده از داده پایگاه‌های متعدد توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر هیچ‌کدام از ژنوتیپ‌های CC، CG و GG چندشکلی rs12602273 ژن TP53 در جمعیت مورد بررسی همراهی معناداری با سرطان پستان نداشتند. همچنین هیچ‌یک از ژنوتیپ‌های مورد نظر با علائم بالینی افراد بیمار از قبیل سن، اندازه تومور، درجه تومور، درگیری غدد لنفاوی، سمت درگیری و نوع تومور همراهی موثری نداشتند. با توجه به اینکه این اولین گزارش از ارتباط چندشکلی rs12602273 ژن TP53 با احتمال ابتلا به سرطان پستان در زنان شمال‌غرب ایران است می‌تواند نشان دهنده عدم همراهی چندشکلی مورد مطالعه با سرطان پستان در زنان این منطقه باشد.

۴/۰۴، ۵/۱۱، ۱/۲۹ درصد و در گروه کنترل به ترتیب ۱۵/۲۱، ۲۶/۹۲، ۵۱/۳۹ درصد گزارش کردند. بر این اساس تفاوت آماری معنی‌داری بین توزیع ژنوتیپ آرژنین/ آرژنین و آرژنین/ پرولین ژن TP53 در افراد سرطانی و کنترل دیده شد ($p<0.05$). بر اساس این مطالعه ژنوتیپ Arg/Arg یک عامل ژنتیکی مستعدکننده برای ابتلا به سرطان پستان و ژنوتیپ Arg/Pro دارای نقش حفاظتی در برابر سرطان پستان شناخته شد (۲۴). در مطالعه‌ای توسط Pouladi و همکاران اثرات ترکیبی ژنوتیپ چندشکلی‌های TP53 و PAI-1 در حساسیت به سرطان پستان بررسی شد. در این مطالعه مورد-شاهدی ۲۰۰ فرد مبتلا به سرطان پستان و ۱۷۹ فرد سالم مورد مطالعه قرار گرفتند. یافته‌ها نشان داد که چندشکلی کدون ۷۲ ژن TP53 به طور معنی‌داری با مرحله تومور مرتبط است ($P=0.023$) (۲۵). در مطالعه‌ای که توسط Lin و همکاران بر روی همراهی چندشکلی ۵ SNP ژن TP53 از جمله rs12602273 با سرطان مثانه، در جمعیت کائوسینگ تایوان متشکل از ۲۰۱ بیمار و ۳۱۱ کنترل بدون سرطان انجام گرفت، نشان داده شد در این جمعیت آلل‌های ($P=0.003$) rs9895829G و آلل rs1788227C ($P=0.027$) هر دو با بروز سرطان مثانه مرتبط هستند. همچنین هاپلوتیپ‌های GTT ($P=0.001$) و GGTC ($P=0.001$) با بروز کم سرطان مثانه در ارتباط بودند. در مقابل، هیچ‌یک از هاپلوتیپ‌های SNPهای rs9895829، rs12602273، rs17882227 و rs2287497 ارتباط معنی‌داری با درجه بالای تومور یا تهاجم عضلانی نداشتند (۲۰). در مطالعه حاضر که اولین گزارش از ارتباط چندشکلی rs12602273 ژن TP53 با احتمال ابتلا به سرطان پستان در شمال‌غرب ایران است، همانند مطالعه Lin و همکاران، که همراهی چندشکلی rs12602273 را بر روی سرطان مثانه مورد بررسی قرار دادند (۲۰)، هیچ‌کدام از ژنوتیپ‌های CC، CG و GG چندشکلی rs12602273C>G ژن TP53 در جمعیت‌های مورد بررسی به ترتیب با سرطان پستان ($P=0.7$) و سرطان مثانه ($P=0.054$) همراهی معناداری نشان ندادند. اما فراوانی آللی همراهی معناداری با

ملاحظات اخلاقی

تمامی اطلاعات مربوط به بیماران پرونده‌های آن‌ها بیماران استخراج، فرم رضایت انجام طرح تحقیقاتی توسط بیماران تکمیل، و هیچ نوع مداخله اضافی از طرف محققین بر روی بیماران صورت نگرفت. نام و نشانی بیماران کاملاً محرمانه خواهد بود. این پژوهش با کد اخلاق به شماره IR.AZARUNIV.REC.1401.018 در کمیته اخلاق دانشگاه شهید مدنی آذربایجان تصویب شد.

مشارکت نویسندگان

سارا غفاریان در ارائه ایده و طراحی مطالعه، فاطمه لطفی در جمع‌آوری داده‌ها، سارا غفاریان و فاطمه لطفی در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

سپاس‌گزاری

پژوهش فوق حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی با گرایش سلولی - مولکولی مصوب شورای تحصیلات تکمیلی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان در تاریخ ۱۴۰۱/۰۶/۰۶ است. این مطالعه در آزمایشگاه زیست‌شناسی سلولی - مولکولی گروه زیست دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و با بودجه اختصاص یافته معاونت پژوهش به پایان‌نامه دانشجو انجام یافته است.

حامی مالی: این پژوهش با بودجه اختصاص یافته معاونت پژوهش دانشگاه شهید مدنی آذربایجان به پایان‌نامه دانشجو انجام یافته است.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

References:

- 1-Afrasiabifar A, Hamzhiokia SH, Hosseini NA. *The Effect of Self-Care Program Using Orem's Self-Care Model on the Life Quality of Women with Breast Cancer Undergoing Chemotherapy: A Randomized Controlled Trial*. Armaghane Danesh 2018; 23(1): 1-13.
- 2-Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin 2021; 71(3): 209-49.
- 3-Zhao P, Chen H, Wen D, Mou S, Zhang F, Zheng S. *Personalized Treatment Based on Mini Patient-Derived Xenografts and WES/RNA Sequencing in a Patient with Metastatic Duodenal Adenocarcinoma*. Cancer Commun (Lond) 2018; 38(1): 54.
- 4-Leroy B, Ballinger ML, Baran-Marszak F, Bond GL, Braithwaite A, Concin N, et al. *Recommended Guidelines for Validation, Quality Control, and Reporting of TP53 Variants in Clinical Practice*. Cancer Res 2017; 77(6): 1250-60.
- 5-Prabhu KS, Raza A, Karedath T, Raza SS, Fathima H, Ahmed EI, et al. *Non-Coding Rnas as Regulators and Markers for Targeting of Breast Cancer and Cancer Stem Cells*. Cancers(Basel) 2020; 12(2): 351.
- 6-Kamada R, Toguchi Y, Nomura T, Imagawa T, Sakaguchi K. *Tetramer Formation of Tumor Suppressor Protein P53: Structure, Function, and Applications*. Biopolymers 2016; 106(4): 598-612.
- 7-Wang SP, Wang WL, Chang YL, Wu CT, Chao YC, Kao SH, et al. *P53 Controls Cancer Cell Invasion by Inducing the MDM2-Mediated Degradation of Slug*.

- Nat Cell Biol 2009; 11(6): 694-704.
- 8-Nooridalooi MR, Abdollah Zade R. *Role of P53 in Apoptosis and Cancer Therapy*. Quarterly Horiz Med Sci 2014; 20(3): 191-201.
- 9-Coskun KA, Tutar M, Al M, Yurttas AG, Abay EC, Yurekli N, et al. *Role of P53 in Human Cancers*. 1st ed. Budapest: IntechOpen; 2022: 1-19.
- 10-Noori-Dalooi MR. *Medical Molecular Genetics in the Third Millennium*. 4 ed. Tehran: Jame-e-Negar; 2009. [Persian]
- 11-Kim SH, Choi SI, Won KY, Lim SJ. *Distinctive Interrelation of P53 with SCO2, COX, and TIGAR in Human Gastric Cancer*. Pathol Res Pract 2016; 212(10): 904 -10.
- 12-Humpton TJ, Vousden KH. *Regulation of Cellular Metabolism and Hypoxia by P53*. Cold Spring Harb Perspect Med 2016; 6(7): a026146.
- 13-Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. *Surfing the P53 Network*. Nature 2000; 408(6810): 307-10.
- 14-Hainaut P, Hollstein M. *P53 and Human Cancer: The First Ten Thousand Mutations*. Adv Cancer Res 2000; 77: 81-137.
- 15-Pouladi N, Abdolahi S, Farajzadeh D, Hosseinpour-Feizi MA. *Haplotype and Linkage Disequilibrium of TP53-WRAP53 Locus in Iranian-Azeri Women with Breast Cancer*. Plus One 2019; 14 (8): e0220727.
- 16-Zhang J, Yang J, Zhang L, Luo J, Zhao H, Zhang J, et al. *A New SNP Genotyping Technology Target SNP-Seq and its Application in Genetic Analysis of Cucumber Varieties*. Sci Rep 2020; 10(1): 5623.
- 17-Cohen HJ, Rao AV. *Geriatric Oncology, an Issue of Clinics in Geriatric Medicine*. 1st ed. Elsevier; 2015: 690-749.
- 18-Samani LA, Javadirad SM, Parsafar S, Tabatabaieian H, Ghaedi K, Azadeh M. *TP53 Rs1625895 is Related to Breast Cancer Incidence and Early Death in Iranian Population*. Indian J Clin Biochem 2019 34(4): 485-9.
- 19-Ru JY, Cong Y, Kang WB, Yu L, Guo T, Zhao JN. *Polymorphisms in TP53 are Associated with Risk and Survival of Osteosarcoma in a Chinese Population*. Int J Clin Exp Pathol 2015; 8(3): 3198-203.
- 20-Lin HY, Yang MC, Huang CH, Wu WJ, Yu TJ, Lung FW. *Polymorphisms of TP53 are Markers of Bladder Cancer Vulnerability and Prognosis*. Urol Oncol 2013; 31(7): 1231-41.
- 21-Lane D, Levine A. *P53 Research: The Past Thirty Years and the Next Thirty Years*. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010; 2(12): a000893.
- 22-Silwal-Pandit L, Langerød A, Børresen-Dale AL. *TP53 Mutations in Breast and Ovarian Cancer*. Cold Spring Harb Perspect Med 2017; 7(1): a026252.
- 23-Najafi-Dorche S, Tavassoli M, Hemati S, Safari F. *The Study of TAAAA Polymorphism in P53 Gene and its Association with Breast Cancer*. J Isfahan Med Sch 2015; 33: 134-43. [Persian]
- 24-Sheikhpour R, Taghipour Zahir S. *Evaluation of TP53 Codon 72 Polymorphism and Resulted Protein in Breast Cancer Patients in Yazd City*. ijbd 2014; 7(3): 20-9. [Persian]
- 25-Pouladi N, Shavali M, Abdolahi S. *Combined Genotype Effects of TP53 and PAI-1 Polymorphisms in Breast Cancer Susceptibility: Multifactor Dimensionality Reduction and in Silico Analysis*. Hum Hered 2020; 85(2): 51-60.

Study the Association between *TP53* (rs12602273C>G) Gene Polymorphism with Susceptibility to the Breast Cancer in North West of Iran

Fatemeh Lotfi Dashbelagh¹, Sara Ghaffarian^{*1}

Original Article

Introduction: The *TP53* gene on the short arm of chromosome 17p, which is known as a tumor suppressor gene, encodes the transcription factor *p53*, and this factor controls cell cycle progression. This study was done to assess the association of *TP53* (rs12602273C>G) gene polymorphism with the risk and prognosis of breast cancer in women of northwest of Iran.

Methods: In this case-control study, the association of *TP53* (rs12602273C>G) gene polymorphism with breast cancer risk was studied in a population, including 100 patients and 100 healthy individuals was investigated by Tetra ARMS-PCR technique. The analysis of the resulting data was done using SPSS version 16 software and JavaStat online statistics package.

Results: In the case group, the frequency of CC, CG, and GG genotypes were 81.52, 16.3, 2.17 percent, respectively and they were 79.34, 17.39, and 3.26 percent for the control group. Similarly, C and G allele frequency in case group was 89.67 and 10.32 percent and those in the control group was 88.04 and 11.95 percent, respectively. Statistical analyzes showed no association between genotypic ($P>0.05$) and allelic ($P>0.05$) polymorphism (rs12602273C>G) of *TP53* gene with breast cancer. Also, the results showed that the studied polymorphism was not associated with the clinical characteristics of breast cancer patients in the Northwest of Iran ($P>0.05$).

Conclusion: These research findings suggest that *TP53* polymorphism of rs12602273C>G is not related to the risk of breast cancer. The association of the genotypic distribution of this SNP with the clinical characteristics of the patients was insignificant.

Keywords: Breast cancer, Single nucleotide polymorphism, *TP53* gene, Tetra ARMS-PCR.

Citation: Lotfi Dashbelagh F, Ghaffarian S. Study the Association between *TP53* (rs12602273C>G) Gene Polymorphism and Susceptibility to the Breast Cancer in North West of Iran. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2024; 32(1): 7416-27.

¹Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

*Corresponding author: Tel: 09144205499, email: hadidarvishi87@gmail.com