Journal of Arak University of Medical Sciences
Volume 26, Issue 1
April & May 2023

Research Article

Study of some Polymorphisms of CTLA-4 Gene in Women with Breast Cancer–Markazi Province

Seyedeh Zahra Shifteh [1,*], Ahmad Hamta [2]

[1] MSc Student in Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Arak, Arak, Iran
[2] Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Arak, Arak, Iran

*** Corresponding author:** Seyedeh Zahra Shifteh, MSc Student in Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Arak, Arak, Iran. E-mail: z.shifteh96@gmail.com

DOI: 10.61186/jams.26.1.11

How to Cite this Article:
Shifteh SZ, Hamta A. Study of some Polymorphisms of CTLA-4 Gene in Women with Breast Cancer–Markazi Province. *J Arak Uni Med Sci*. 2022;**26**(1):11-17. DOI: 10.61186/jams.26.1.11

Received: 27 May 2023
Accepted: 03 Sep 2023
Keywords:
Breast Cancer
Single Nucleotide Polymorphism
CTLA4
PCR-RFLP

© 2023 Arak University of Medical Sciences

Abstract

Introduction: Breast cancer is a highly heterogeneous disease. The antigen molecule of four cytotoxic T-lymphocytes is involved in inhibition of T cell response and immune response regulation. Single nucleotide polymorphisms in the CTLA4 gene can affect the expression of the aforementioned molecule. The aim of this study was to investigate the polymorphisms of rs4553808 and rs733618 of CTLA4 gene with the risk of breast cancer.

Methods: In this study to investigation polymorphisms, the DNA of 80 patients with breast cancer and 80 healthy individuals in central province of ARAK were extracted from peripheral blood. Then, PCR-RFLP technique was used. The results were analyzed using SPSS software and SNP Analyzer. This study was approved by the Ethics Committee of the Arak University (Code: Ir.arakmu.rec.1396.25).

Results: Statistical analysis rs4553808 polymorphism showed no significant increase in the risk of patients with GG genotype compared with the control group (OR = 2/013, CI = 95% 1/721-2/353). Also, heterozygotes AG genotype analysis did not show any relationship between the genetic diversity and breast cancer (OR = 1/204, CI = 95% 0/604-2/402). The combination of AG + GG genotypes did not show any significant correlations (OR = 1/130, CI = 95% 0/569-2/242). Statistical analysis for rs733618 polymorphism showed increase in the risk of breast cancer. The results indicate that the TC (OR = 2/992, CI = 95% 1/280-1/998) showed a significant relationship between the genetic diversity and breast cancer. The analysis of the combined CC and TC genotypes was associated with increased risk for breast cancer compared to TT genotypes (OR = 0/334, CI = 95%; 0.143-0.782, P = 0.009). Considering that the distribution of CC and TC genotypes was significant between the two groups of control and the patient, so the frequency of TT genotype with the same amount of P = 0.001 was significant between the two groups of control and the patient.

Conclusions: There was a significant relationship between the genotypes rs733618 polymorphism and breast cancer. However, there was no significant relationship between rs4553808 polymorphism and breast cancer risk.

Copyright © *2023 The Author(s); Published by Journal of Arak University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک
دوره ۲۶، شماره ۱
فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۲

دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اراک

مقاله پژوهشی

مطالعه‌ی برخی از پلی مورفیسم های ژن CTLA -4 در زنان مبتلا به سرطان پستان– استان مرکزی

سیده زهرا شیفته [۱*]، احمد همتا [۲]

[۱] کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران
[۲] دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران
[*] **نویسنده مسئول:** سیده زهرا شیفته، کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران.
ایمیل: z.shifteh96@gmail.com

DOI: 10.61186/jams.26.1.11

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۲
واژگان کلیدی:
سرطان پستان
پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی
CTLA4
PCR-RFLP

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.

چکیده

مقدمه: سرطان پستان یک بیماری به شدت هتروژن بوده. مولکول آنتی ژن ۴ لنفوسیت T سایتوتوکسیک در مهار پاسخ سلول T و تنظیم پاسخ ایمنی نقش دارد. پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی در ژن CTLA4 می‌تواند بر بیان مولکول مذکور تأثیر بگذارد. هدف از این مطالعه بررسی پلی مورفیسم های rs4553808 و rs733618 ژن CTLA4 با خطر ابتلا به سرطان پستان است.

روش کار: در این مطالعه جهت بررسی پلی مورفیسم ها از خون محیطی ۸۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۸۰ فرد سالم ساکن استان مرکزی استخراج DNA انجام شد. سپس از تکنیک PCR-RFLP استفاده گردید. نتایج حاصل با استفاده از نرم افزارهای SPSSو SNP Analyzer آنالیز گردید.

ملاحظات اخلاقی: این مطالعه با کد اخلاق (Ir.arakmu.rec۱۳۹۶،۲۵) در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک به تصویب رسیده است.

یافته‌ها: آنالیز آماری پلی مورفیسم rs4553808 هیچ افزایش خطر چشمگیری در بیماران با ژنوتیپ GG در مقایسه با گروه کنترل نشان نمی‌دهد (OR=2/013،CI=95% 1/721-2/353). همچنین آنالیز ژنوتیپ هتروزیگوت AG هیچ ارتباطی بین تنوع ژنتیکی و سرطان پستان نشان نداد (OR=1/204، CI=95% 0/604-2/402). ترکیب ژنوتیپ های AG+GG نیز هیچ ارتباط معنی داری نشان ندادند (OR=1/130،CI=95% 0/569-2/242). آنالیز آماری برای پلی مورفیسم rs733618 نشان دهنده‌ی خطر افزایش یافته برای سرطان پستان است. نتایج حاصل بیانگر این است که ژنوتیپ TC (OR=2/992، CI= 95% 1/280-1/998) ارتباط معناداری بین تنوع ژنتیکی و سرطان پستان را نشان می‌دهد. آنالیز ژنوتیپ‌های ترکیب‌شده CC و TC با خطر افزایش یافته برای سرطان پستان در مقایسه با ژنوتیپ TT مرتبط بود (OR=0/334, CI=95%; 0/143- 0/782, P=0.009). با توجه به اینکه توزیع ژنوتیپ‌های CC و TC بین دو گروه کنترل و بیمار معنی‌دار بود؛ بنابراین فراوانی ژنوتیپ TT نیز با همین میزان P=0.001 بین دو گروه کنترل و بیمار معنی‌دار است.

نتیجه‌گیری: ارتباط معنی‌داری میان ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs733618 و سرطان پستان مشاهده شد. این در حالی بود که هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری میان ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs4553808 و خطر ابتلا به سرطان پستان مشاهده نشد.

مقدمه

سرطان پستان رایج‌ترین نوع سرطان و مهم‌ترین عامل مرگ‌ومیر زنان در جهان است (۱). بر اساس آمارهای به دست آمده در سال ۲۰۱۹، در ایالات متحده آمریکا بیشترین میزان بروز سرطان در زنان، سرطان پستان با میزان ۲۶۸۶۰۰ مورد بوده است (۲). در ایران نیز سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان است. بر طبق مطالعات در سال‌های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۹، سومین عامل مرگ و میر زنان در ایران سرطان پستان بوده است (۳). در کل بیماران آسیایی از جمله زنان ایرانی نسبت به کشورهای توسعه یافته یک دهه زودتر گرفتار این بیماری می‌شوند (۴). شیوع این بیماری در بین ژاپنی‌هایی که به آمریکا مهاجرت کرده‌اند، در یک یا دو نسل شبیه به آمریکایی‌ها شده که تأییدکننده نقش تأثیرگذار محیط در بروز سرطان پستان است (۵، ۶). سرطان پستان یک بیماری به شدت هتروژن بوده و مکانیسم‌های مولکولی آن تاکنون به طور کامل شناسایی نگردیده است. در سال‌های اخیر فاکتورهای ارثی و ژنتیکی شناسایی شده است که نقش مهمی را در گسترش سرطان پستان ایفا می‌کنند (۱). عامل دیگر بروز سرطان، پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی است. به وجود تفاوت آلل، در یک جایگاه ژنی پلی‌مورفیسم گفته می‌شود (۷).

سیستم ایمنی افراد در شناسایی و از بین بردن سلول‌های توموری نقش مهمی ایفا می‌کند. جهت ایجاد پاسخ ایمنی مناسب، سلول‌های T بکر به دو سیگنال متفاوت احتیاج دارند. اولین سیگنال به واسطه‌ی ارتباط گیرنده سلول‌های T (T Cell Receptor :*TCR*) با کمپلکس سازگاری نسجی (Major Histocompatibility :*MHC*

Copyright © 2023 The Author(s); Published by Journal of Arak University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

Complex) می‌باشد که در انسان با عنوان آنتی‌ژن لکوسیت انسانی شناخته می‌شود (۸) و روی سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (*APC*: Antigen Presenting Cell) بیان می‌گردد. دومین سیگنال مربوط به مولکول‌های تحریک کننده روی سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن است که بسته به نوع مولکول تحریکی سیگنال‌ها متفاوت هستند (۹). ترکیب این دو سیگنال تعیین می‌کند که آیا سلول لنفوسیت T فعال یا غیرفعال شود (۱۰). تحریک‌های مثبت و منفی توسط اعضای خانواده *CD28(Cluster of Differentiation 28)* برای حفظ پاسخ‌های ایمنی علیه پاتوژن‌های خارجی جهت جلوگیری از آسیب‌های بافتی التهابی، حیاتی هستند (۱۱). مولکول آنتی‌ژن شماره ۴ لنفوسیت T سایتوتوکسیک (*CTLA4*: Cytotixic T-Lymphosyte Associated proteien 4) یکی از اعضای تحریک‌کننده منفی این خانواده است (۱۲).*CTLA4* که همچنین با نام *CD152*(Cluster of Differentiation 152) شناخته می‌شود، یک سایتوکاین سرکوبگر ایمنی است که می‌تواند تکثیر و فعالیت لنفوسیت T را مهار کند (۱۲). وزن مولکول *CTLA4* ۴۱ تا ۴۳ کیلودالتون بوده و از گلیکوپروتئین‌های ترانس ممبرن نوع I از خانواده ایمونوگلوبولین‌ها است و دارای ۲۲۳ اسیدآمینه در طول خود می‌باشد (۱۳). ژن *CTLA4* دارای طول تقریبی ۶/۲ کیلو جفت باز بوده و از ۴ اگزون تشکیل می‌شود. این ژن بر روی بازوی بلند کروموزوم ۲ در موقعیت ۳۳ در انسان قرار گرفته است (۱۴). تحقیقات متعددی نشان داده‌اند مسدودسازی عملکرد *CTLA4* می‌تواند باعث بهبود ایمنی ضدتوموری شود. این نشان می‌دهد که *CTLA4* ممکن است اثر مثبت بر سرطان‌زایی داشته باشد. گزارش‌هایی درباره همراهی پلی‌مورفیسم ژن *CTLA4* با سرطان پستان و دیگر سرطان‌ها وجود دارد. دو پلی مورفیسم 1722T/C- و 1661A/G- بر روی منطقه‌ی پروموتری ژن *CTLA4* شناسایی شده‌اند. پلی‌مورفیسم (rs733618) یا 1722T/C- با افزایش بیان *CTLA4* مرتبط است. پلی‌مورفیسم (rs4553808) یا 1661A/G- هم روی پروموتر قرار گرفته است و به نظر می‌رسد در فرآیند رونویسی مرتبط با اتصال فاکتور هسته‌ای (*NF1*:Nuclear Factor1) و *C/EBPα* (CCAAT) Enhancer Binding Protein *α*درگیر شود و ممکن است باعث ویرایش متناوب غیرنرمال شده و در نتیجه بر بیان *CTLA4* تأثیر بگذارد (۱۵). به دلیل تأثیر تفاوت‌های نژادی در احتمال ابتلا به سرطان پستان مطالعه حاضر به بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم‌های1661A/G- و 1722T/C- در ژن *CTLA4* با سرطان پستان در جمعیت زنان استان مرکزی پرداخته است.

روش کار

در این مطالعه مورد-شاهدی تعداد نمونه‌ها بر اساس مطالعات منابع و مقالات مختلف صورت گرفت. این مطالعه شامل ۸۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان مراجعه کننده به بیمارستان آیت‌الله خوانساری و همچنین ۸۰ فرد سالم (داوطلب) بود. اطلاعات دموگرافیکی هر دو گروه شامل سن، وزن، تأهل، شغل، تحصیلات، رژیم غذایی، تعداد فرزندان، سن اولین بارداری، عوارض بارداری (سقط و مرده‌زایی)، وضعیت سیکل قاعدگی، سابقه خانوادگی سرطان پستان و وضعیت یائسگی و غیره به وسیله پرسشنامه جمع‌آوری گردید. سپس با رضایت کتبی افراد و طبق اصول پژوهشی،۲ سی‌سی خون در لوله‌های حاوی EDTA جمع‌آوری شد. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت DNA Iraizol (محصول شرکت زیست فناوران رنا) و طبق پروتکل انجام گردید. کیفیت و کمیت DNA استخراجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و ژل آگارز (Maxpuer اسپانیا) ۱/۵ درصد تأیید شد. شکل ۱ کیفیت نمونه‌های DNA استخراجی را بر روی ژل آگارز نشان می‌دهد.

سپس برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها از روش PCR-RFLP استفاده شد. واکنش PCR جهت تکثیر قطعه ۴۸۰ جفت بازی حاوی دو پلی مورفیسم 1722T/C- و 1661A/G- در ژن *CTLA4* با به کارگیری پرایمر رفت $5' - CTAAGAGCATCCGCTTGCACCT - 3'$ و پرایمر برگشت $5' - TTGGTGTGATGCACAGAAGCCTTT - 3'$ که از شرکت TAGC سفارش داده شدند ،انجام گرفت. واکنش PCR در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۰/۳ میکرولیتر پرایمر رفت، ۰/۳ میکرولیتر پرایمر برگشت، ۳ میکرولیتر DNA استخراج شده و ۸/۹ میکرولیتر آب مقطر انجام گرفت. برنامه دمایی PCR شامل یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر به DNA الگو در دمای ۵۶/۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، سنتز پلی‌مراز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در آخر یک چرخه سنتز نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. جهت تأیید انجام PCR و مشاهده باند محصول، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۲ درصد برده شدند. جهت تخمین اندازه قطعات تکثیر شده از مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (شرکت سیتومتین ژن) استفاده شد(شکل۲).

پس از تأیید اندازه باند ۴۸۶ جفت بازی تکثیر شده، جهت تعیین ژنوتایپ نمونه‌ها در محل پلی‌مورفیسم‌های1661A/G- و 1722T/C- به ترتیب از آنزیم‌های محدودگر DraI (گونه‌ی *Deinococcus radiophilus*) و *BbvI* (گونه‌ی Bacillus brevis) (فرمنتاز آمریکا) استفاده شد. حجم نهایی واکنش جهت انجام عمل هضم آنزیمی ۱۵ میکرولیتر تعیین گردید که برای پلی‌مورفیسم 1661A/G- مقدار ۲ میکرولیتر محصول PCR، ۰/۷ میکرولیتر آنزیم *DraI*، ۲ میکرولیتر بافر آنزیم و ۱۰/۳ میکرولیتر آب مقطر استریل استفاده شد و برای پلی‌مورفیسم 1722C/T- مقدار ۱ میکرولیتر محصول PCR، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم *BbvI*، ۱ میکرولیتر بافر، ۱۳ میکرولیتر آب مقطر استریل استفاده شد. شرایط دمایی و زمانی برای هر دو آنزیم محدودگر ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت است. همه نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۳/۵ درصد برده شدند. برای پلی‌مورفیسم1661A/G- در حضور الل وحشی A، برش آنزیمی دو قطعه ۳۳۴ و ۱۵۲ را ایجاد خواهد کرد و در حضور الل موتانت G جایگاه برش وجود نخواهد داشت و باند ۴۸۶ جفت بازی حاصل خواهد شد که در صورت هتروزیگوت بودن، هر سه قطعه مذکور حاصل می‌گردد (شکل۳). برای پلی‌مورفیسم 1722T/C- در حضور الل وحشی T، برش وجود نخواهد داشت و باند ۴۸۶ جفت بازی حاصل خواهد شد

ولی در حضور الل موتانت C برش آنزیمی دو قطعه ۲۷۰ و ۲۱۶ را ایجاد می‌کند و در صورت هتروزیگوت بودن، هر سه قطعه مذکور حاصل می‌گردد(شکل۴).

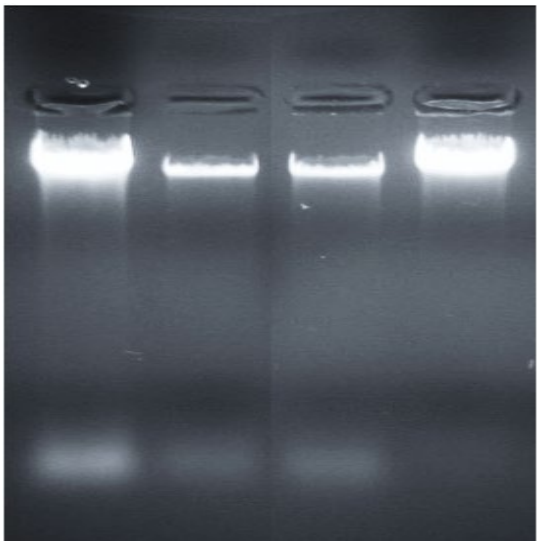
ارزیابی آماری نتایج با استفاده از $\chi 2$ در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ و هاپلوتایپ پلی‌مورفیسم‌ها در نرم‌افزار SNP Analyzer انجام شد. مقدار p پایین‌تر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

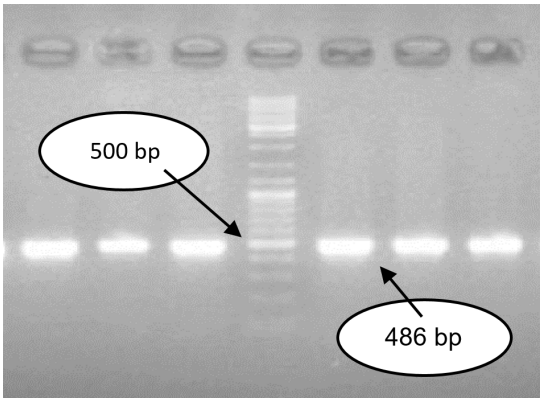
در بررسی انجام‌شده انجام تست آماری مربع کای-اسکوار برای پلی مورفیسم (rs4553808)-1661A/G حدود اطمینان P=0/539 را نشان داد؛ که مشخص شد، بین ژنوتیپ‌های حاصل و بیماری رابطه آماری معنی‌داری وجود ندارد. فراوانی پلی‌مورفیسم rs4553808(A/G) برای الل A در گروه بیمار ۸۵/۶ درصد و در گروه کنترل ۸۵ درصد محاسبه شد و برای الل G در بیماران ۱۴/۴ درصد و برای گروه کنترل ۱۵ درصد تعیین گردید. بر اساس محاسبات آماری انجام شده ارتباط معنی‌داری بین فراوانی اللی و بیماری مشاهده نگردید. فراوانی ژنوتیپی به ترتیب در گروه بیمار و کنترل برای ژنوتیپ AA، ۷۲/۵ و ۷۰ درصد، ژنوتیپ AG، ۲۶/۲۵ و ۳۰ درصد، ژنوتیپ GG، ۱/۲۵ و صفر درصد به دست آمد. در مطالعه‌ی ما آنالیز آماری پلی مورفیسم rs4553808 هیچ افزایش خطر چشمگیری در بیماران با ژنوتیپ GG در مقایسه با گروه کنترل نشان نمی‌دهد (CI=95% 1/721-2/353،OR=2/013). همچنین آنالیز ژنوتیپ هتروزیگوت AG هیچ ارتباطی بین تنوع ژنتیکی و سرطان پستان نشان نداد (OR=1/204، CI=95% 0/604-2/402). ترکیب ژنوتیپ های AG+GG نیزهیچ ارتباط معنی‌داری نشان ندادند (CI=95% 0/569-2/242،OR=1/130). هیچ ارتباطی بین پلی مورفیسم rs4553808 ژن *CTLA4* و احتمال بروز سرطان در بیماران یافت نشد.

در بررسی انجام‌شده انجام تست آماری مربع کای-اسکوار برای پلی‌مورفیسمC/T1722-(rs733618) حدود اطمینان P=0/009 را نشان داد؛ که مشخص شد، بین ژنوتیپ‌های حاصل و بیماری رابطه آماری معنی‌داری وجود دارد. فراوانی پلی‌مورفیسم rs733618(T/C) برای الل T در گروه بیمار ۸۶/۲ درصد و در گروه کنترل ۹۴/۴ درصد محاسبه شد و برای الل C برای بیماران ۱۳/۸ درصد و برای گروه کنترل ۵/۶ درصد تعیین گردید. بر اساس محاسبات آماری انجام شده ارتباط معنی‌داری بین فراوانی اللی و بیماری مشاهده شد. فراوانی ژنوتیپی به ترتیب در گروه بیمار و کنترل برای ژنوتیپ TT، ۷۲/۵ و ۸۸/۸ درصد، ژنوتیپ TC، ۲۷/۵ و ۱۱/۲ درصد، ژنوتیپ CC، برای هر دو گروه صفر درصد به دست آمد که بر اساس محاسبات آماری ارتباط معنی‌داری بین این ژنوتیپ ها و بیماری مشاهده گردید. نتایج حاصل بیانگر این است که ژنوتیپ TC (OR=2/992، CI= 95% 1/280-1/998) ارتباط معناداری بین تنوع ژنتیکی و سرطان پستان را نشان می‌دهد. آنالیز ژنوتیپ‌های ترکیب‌شده CC و TC با خطر افزایش یافته برای سرطان پستان در مقایسه با ژنوتیپ TT مرتبط بود (OR=0/334, CI=95%; 0/143- 0/782, P=0.009). با توجه به اینکه توزیع ژنوتیپ‌های CC و TC بین دو گروه کنترل و بیمار معنی‌دار بود؛ بنابراین فراوانی ژنوتیپ TT نیز با همین میزان P=0.001 بین دو گروه کنترل و بیمار معنی‌دار است.

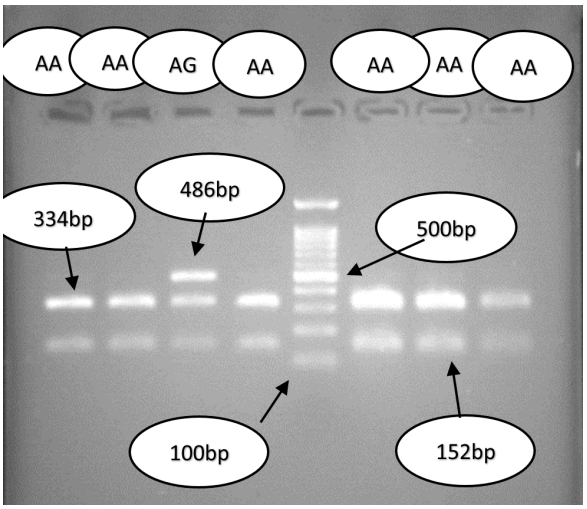
در جدول ۱ میزان کای اسکوآر برای داده‌های دموگرافیکی حاصل از پرسشنامه‌ها آمده است و میزان (P<0/05) برای هر متغیر، ارتباط آن با خطر سرطان پستان را نشان می‌دهد.



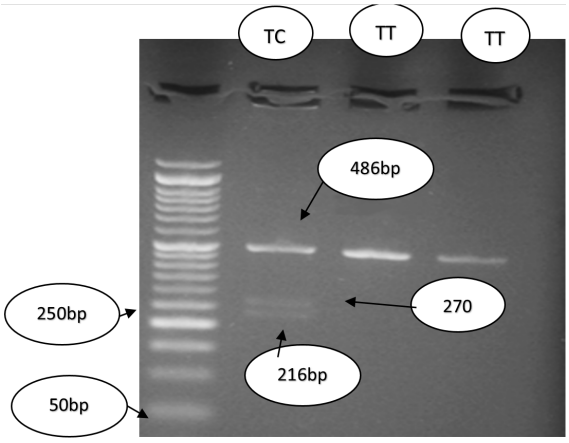
شکل ۱. بررسی و تعیین کیفیت DNA استخراجی



شکل ۲. توالی ۴۸۶ جفت بازی تکثیرشده بوسیله PCR



شکل ۳. هضم با آنزیم *DraI*



شکل ۴. هضم با آنزیم *BbvI*

جدول ۱. اطلاعات دموگرافیکی در دو گروه بیمار و کنترل

متغیرها	P*	Df	χ2
سن	۰/۰۵	۵۱	[a]۶۸/۳۹۶
تحصیلات	۰/۱۶۹	۴	[a]۶/۴۴۱
شغل	۰/۰۴۴	۲	[a]۶/۲۵۶
وضعیت تأهل	۰/۰۴۲	۲	[a]۶/۳۳۷
رژیم غذایی	۰/۴۱۴	۱	[a]۰/۶۶۷
داشتن سقط جنین	۰/۲۴۱	۲	[a]۲/۸۴۷
سن اولین بارداری	۰/۴۵۵	۲	[a]۱/۵۷۶
تعداد فرزندان	۰/۰۵۰	۲	[a]۵/۹۹۲
وضعیت یائسگی	۰/۰۴۷	۲	[a]۶/۱۰۲
میزان وزن	۰/۸۶۲	۱	[a]۰/۰۳۰
سابقه فامیلی سرطان پستان	۰/۰۰۸	۱	[a]۶/۹۴۴

بحث

در مطالعه صورت گرفته ارتباط معنی‌داری میان اسنیپ rs4553808 با خطر ابتلا به سرطان پستان مشاهده نشد (P=0/539). اما ارتباط معنی‌داری میان اسنیپ rs733618 با خطر ابتلا به سرطان پستان وجود داشت (P=0/009). به طوری که در مقایسه با دیگر نتایج باید اظهار داشت در مطالعه انجام شده توسط دالین- لی و همکاران در کشور چین ۵۸۱ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۵۶۶ کنترل مطابق سن توسط PCR-RFLP مورد مطالعه قرار گرفتند نشان داده شد که پلی مورفیسم rs4553808A/G با افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان مرتبط بوده و حاملین الل G به طور قابل توجهی خطر بالاتری برای توسعه سرطان پستان در مقایسه با اشخاص حامل الل A داشتند که با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه ما در ارتباط با اسنیپ rs4553808 همخوانی ندارد (۱۶) و پلی مورفیسم rs733618T/C با افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان مرتبط بوده و حاملین الل C به طور قابل توجهی خطر بالاتری برای توسعه سرطان پستان در مقایسه با اشخاص حامل الل T داشتند که با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه ما در ارتباط با اسنیپ rs733618 همسو بود (۱۶). از دلایل مطابقت نتایج می‌تواند این باشد که نقشه ژنتیکی در جمعیت‌های آسیایی ممکن است در جایگاه‌هایی با یکدیگر شباهت داشته باشد.

در تحقیق انجام گرفته توسط عرفانی و همکاران در ایران که با ۲۸۲ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۲۳۸ کنترل توسط تکنیک PCR-CTPP صورت گرفت نشان داده شد که درگیری گره لنفاوی در افراد دارای ژنوتیپ AA نسبت به دیگر ژنوتایپ‌ها کمتر بوده است (P=0/016) و ارتباط قوی بین بیان گیرنده استروژن و پروژسترون با ژنوتیپ AA وجود دارد. اما در کل تفاوت قابل توجهی در ژنوتیپ، الل و فراوانی هاپلوتایپ بین بیمار و کنترل نبوده است که با نتایج ما سازگاری دارد. در این مطالعه فراوانی ژنوتیپ‌های مربوط به (rs4553808) به فراوانی ژنوتیپ‌ها در مطالعه ما، هم در گروه کنترل و هم در گروه بیمار نزدیک بود (در بیمار و کنترل به ترتیب AA: ۷۴/۶ و ۷۵/۱، AG: ۲۳ و ۱۷/۵ و GG: ۲/۱ و ۴/۵ درصد) که این می تواند به دلیل نزدیک بودن نژاد جمعیت در هر دو مطالعه باشد (۱۷) و در رابطه با اسنیپ rs733618 تفاوت قابل توجهی در ژنوتیپ، الل و فراوانی هاپلوتایپ بین بیمار و کنترل نبوده است (۱۷) که با نتایج ما سازگار نیست. از دلایل این عدم سازگاری می‌توان به تأثیر عوامل محیطی و هم‌چنین نقشه ژنتیکی متفاوت در دو منطقه متفاوت در ایران اشاره کرد.

در کشور هند توسط شانموگام و همکاران بر روی ۱۱۰ بیمار مبتلابه بیماری التهابی پریودنتال تهاجمی و مزمن و ۱۲۶ فرد کنترل پژوهشی انجام گردید. در این تحقیق فراوانی آلل A در هر دو گروه بالا بوده است و ارتباطی با rs4553808A/G و بیماری یافت نشد. همچنین نتایج ژنوتایپینگ، هیچ ژنوتیپ هموزیگوت GG را نشان نداده است. هیچ تفاوت فراوانی آللی در افراد کنترل پریودنتال تهاجمی و مزمن دیده نشده است (۱۸). این نتایج با نتایج ما مطابقت داشت. این امر می تواند به دلیل نزدیک بودن تعداد افراد جمعیت‌های مطالعه شده و مشابه بودن نقشه ژنتیکی در جمعیت آسیایی باشد.

در ارتباط با rs733618 در پژوهشی که توسط رحیمی فر و همکاران در کشور ایران در دانشگاه علوم پزشکی شیراز با ۵۵ بیمار مبتلابه سرطان سرویکس و ۱۱۰ کنترل با تکنیک RFLP انجام شد، فراوانی ژنوتیپی به فراوانی داده‌های ما نزدیک بود (TT:۸۳/۶، TC:۱۴/۵ و CC:۱/۸ درصد) اما نشان داده شد که توزیع rs733618T/C در محل آلل و ژنوتیپی در افراد کنترل و بیمار معنی‌دار نیست (۱۹).

بر طبق محاسبات آماری انجام‌شده بین وجود سرطان پستان در بستگان و ابتلابه بیماری ارتباط معنی‌داری وجود داشت (P=0.008) که می‌تواند به عنوان یک علامت برای پیشگیری و مراقبت از سنین پایین‌تر باشد. این نتایج با داده‌های به‌دست‌آمده توسط مرزبانی و همکاران دارای همخوانی بود (۲۰). میانگین سنی افراد بیمار ۴۹/۲۸ سال بود که کم سن ترین آن‌ها ۲۴ سال و مسن‌ترین آن‌ها ۷۵ سال سن داشت؛ بیشترین موارد ثبت‌شده مربوط به گروه سنی ۵۰-۴۱ سال بود که با مطالعه فاضلی و همکاران در استان مرکزی مطابقت داشت (۲۱). بین سطح تحصیلات و ابتلا به بیماری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (P=0/169). نتایج ما با داده‌های به‌دست‌آمده توسط مرزبانی و همکاران در استان کرمانشاه فاقد سازگاری بود (۲۰). همچنین رابطه آماری معنی‌داری میان رژیم غذایی و خطر ابتلا به بیماری مشاهده نشد (P=0.414) که با مطالعه گورابی و همکاران مطابقت داشت (۲۲). در واقع آنچه که مهم است زمان‌بندی مواجهه در رژیم غذایی است. ارتباط معنی‌داری بین وضعیت تأهل و ابتلا به بیماری مشاهده شد (P=0.042) که با مطالعه‌ی صورت گرفته توسط توسط مرزبانی و

همکاران در استان کرمانشاه همخوانی نداشت (۲۰). بین وضعیت داشتن سقط‌جنین و ابتلا به بیماری ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (P=0.241)؛ که دارای عدم سازگاری با مطالعه‌ی صورت گرفته توسط تانگ و همکاران بود (۲۳). در مورد سن اولین بارداری و ابتلا به بیماری ارتباط معنی‌داری دیده نشد (P=0.455) که با مطالعه‌ی صورت گرفته توسط بشارت و همکاران در استان گلستان (P=0.77) همسو بود (۲۴). نتایج آزمون‌های آماری معین ساخت که ارتباط معنی‌داری بین وضعیت شغلی و ابتلا به بیماری وجود دارد (P=044) که با مطالعات گورابی و همکاران همسو بود. این امر می‌تواند به دلیل مواجهه با مواد شیمیایی و استرس‌های محیطی باشد (۲۲). ارتباط معنی داری بین تعداد فرزند ابتلا به بیماری دیده شد (P=0.050) که با مطالعه عنصری و همکاران دارای تطابق بود (۲۵). دلیل آن می‌تواند این باشد که تعداد بارداری‌های بیشتر مقدار در معرض قرار گرفتن استروژن را بیشتر می‌کند و همچنین به دنبال هر بارداری مقداری به وزن اضافه می‌شود. همچنین رابطه‌ی معنی‌داری بین وضعیت یائسگی و ابتلا به بیماری دیده شد (P=0.047) که با مطالعه صورت گرفته توسط بهجت مرزبانی و همکاران سازگار است (۲۰). این امر می‌تواند به دلیل استفاده از هورمون تراپی شامل هورمون استروژن و پروژسترون باشد.

نتیجه گیری

با وجود پیشرفت در زمینه تحقیقات سرطان هنوز بسیاری از عوامل دخیل در این بیماری از جمله عوامل ژنتیکی آن به طور کامل شناخته نشده‌اند. یکی از این عوامل، ژن‌های مربوط به سیستم ایمنی است که بسیار مهم و گسترده می‌باشند. در این مطالعه ارتباط بین پلی مورفیسم‌های rs4553808 و rs733618 با بیماری سرطان پستان در جمعیت استان مرکزی بررسی شد. به‌گونه‌ای که مطالعه مزبور بر پایه مطالعات موردی شاهدی بر روی ۸۰ فرد بیمار و ۸۰ فرد سالم بر روی زنان ساکن استان مرکزی انجام گرفت. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده ارتباط معنی‌داری میان ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs733618 و سرطان پستان مشاهده شد. این در حالی بود که هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری میان ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs4553808 و خطر ابتلا به سرطان پستان مشاهده نشد. با توجه به نتایج حاصل و ارتباط میان پلی‌مورفیسم rs733618 و خطر ابتلا به سرطان پستان، این پلی‌مورفیسم می‌تواند به‌عنوان یک بیومارکر نقش مهمی در پیش‌گویی بالینی و درمان در ارتباط با خطر ابتلا به سرطان پستان داشته باشد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با کد اخلاق (Ir.arakmu.rec.1396.25) درکمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک به تصویب رسیده است.

حامی مالی

این مقاله برگرفته از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد نویسنده اول در دانشگاه علوم پزشکی اراک است.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافعی در نگارش این مقاله وجود ندارد.

سهم نویسندگان

قسمت نمونه گیری و نگارش متن: سیده زهرا شیفته؛ روش پژوهش و تحلیل داده‌ها و بازبینی: تمامی نویسندگان.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک است که در آزمایشگاه ژنتیک دانشکده علوم پایه دانشگاه اراک انجام شده است. بدین‌وسیله از پرسنل بیمارستان آیت الله خوانساری اراک و تمامی بیماران و افرادی که در این مطالعه همکاری نمودند، تشکر و سپاس گزاری می‌گردد.

References

1. Dai Z, Tian T, Wang M, Liu X, Lin S, Yang P, et al. CTLA-4 polymorphisms associate with breast cancer susceptibility in Asians: a meta-analysis. *PeerJ*. 2017;**5**:e2815. **doi:** 10.7717/peerj.2815 **pmid:** 28097051
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019;**69**(1):7-34. **doi:** 10.3322/caac.21551 **pmid:** 30620402
3. Ahmadi H. An 8 years retrospective study of breast cancer incidence in ilam province, Western iran. *J Clinic Diagn Res*. 2013;**7**(12):2923-2925.
4. Eivazi-Ziaei J, Dastgiri S, Kermani IA, Nikanfar A, Esfahani A, Sanaat Z, et al. Age pattern of the occurrence of breast cancer in the northwest of Iran. *Indian J Cancer*. 2011;**48**(4):406-409. **doi:** 10.4103/0019-509X.92256 **pmid:** 22293252
5. Anyanwu SN, Egwuonwu OA, Ihekwoaba EC. Acceptance and adherence to treatment among breast cancer patients in Eastern Nigeria. *Breast*. 2011;**20 Suppl 2**:S51-53. **doi:** 10.1016/j.breast.2011.01.009 **pmid:** 21295480
6. El Saghir NS, Adebamowo CA, Anderson BO, Carlson RW, Bird PA, Corbex M, et al. Breast cancer management in low resource countries (LRCs): consensus statement from the Breast Health Global Initiative. *Breast*. 2011;**20 Suppl 2**:S3-11. **doi:** 10.1016/j.breast.2011.02.006 **pmid:** 21392996
7. Pope JT, Read M, Medsker T, Buschi A, Brenbridge A. Breast skin thickness: normal range and causes of thickening shown on film-screen mammography. *J Canadian Associat Radiol*. 1984;**35**(4):365-368.
8. Thomas IJ, Petrich de Marquesini LG, Ravanan R, Smith RM, Guerder S, Flavell RA, et al. CD86 has sustained costimulatory effects on CD8 T cells. *J Immunol*. 2007;**179**(9):5936-5946. **doi:** 10.4049/jimmunol.179.9.5936 **pmid:** 17947667
9. Wing K, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation. *Trends Immunol*. 2011;**32**(9):428-433. **doi:** 10.1016/j.it.2011.06.002 **pmid:** 21723783
10. Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol*. 2007;**37 Suppl 1**:S116-123. **doi:** 10.1002/eji.200737593 **pmid:** 17972355
11. Bour-Jordan H, Esensten JH, Martinez-Llordella M, Penaranda C, Stumpf M, Bluestone JA. Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/ B7 family. *Immunol Rev*. 2011;**241**(1):180-205. **doi:** 10.1111/j.1600-065X.2011.01011.x **pmid:** 21488898
12. Bashyam H. CTLA-4: From conflict to clinic. *J Exp Med*. 2007;**204**(6):1243. **doi:** 10.1084/jem.2046fta **pmid:** 17632849
13. Wang XY, Zuo D, Sarkar D, Fisher PB. Blockade of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 as a new therapeutic approach for advanced melanoma. *Expert Opin Pharmacother*. 2011;**12**(17):2695-2706. **doi:** 10.1517/14656566.2011.629187 **pmid:** 22077831
14. Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol*. 2006;**24**:65-97. **doi:** 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090535 **pmid:** 16551244

15. Wang XB, Pirskanen R, Giscombe R, Lefvert AK. Two SNPs in the promoter region of the CTLA-4 gene affect binding of transcription factors and are associated with human myasthenia gravis. *J Intern Med*. 2008;**263**(1):61-69. **doi:** 10.1111/j.1365-2796.2007.01879.x **pmid:** 18088253
16. Li D, Zhang Q, Xu F, Fu Z, Yuan W, Li D, et al. Association of CTLA-4 gene polymorphisms with sporadic breast cancer risk and clinical features in Han women of northeast China. *Mol Cell Biochem*. 2012;**364**(1-2):283-290. **doi:** 10.1007/s11010-012-1228-8 **pmid:** 22249287
17. Erfani N, Razmkhah M, Talei AR, Pezeshki AM, Doroudchi M, Monabati A, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 promoter variants in breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006;**165**(2):114-120. **doi:** 10.1016/j.cancergencyto.2005.07.020 **pmid:** 16527605
18. Shanmugam S, Ramachandran V, Bhagavatheeswaran S, Gurumoorthy K, Balakrishnan A. Lack of Association Between CTLA-4-1661 A/G (rs4553808) Gene Polymorphism with Chronic and Aggressive Periodontal Disease in South Indian Population.
19. Rahimifar S, Erfani N, Sarraf Z, Ghaderi A. ctla-4 gene variations may influence cervical cancer susceptibility. *Gynecol Oncol*. 2010;**119**(1):136-139. **doi:** 10.1016/j.ygyno.2010.06.006 **pmid:** 20615526
20. Marzbani B, Taymoori P, Nouri B. Assessment of Risk Factors for Breast cancer Among Women Under 50 Years Old. *J School Pub Health Institut Pub Health Res*. 2017;**15**(1):47-60.
21. Fazeli Z, Najafian Zade M, Eshtati B, Almasi Hashiani A. Five-year evaluation of epidemiological, geographical distribution and survival analysis of breast cancer in Markazi Province, 2007-2011. *J Arak Univ Med Sci*. 2014;**16**(11):73-80.
22. Gourabi Z, Moudi M, Mesbahzadeh B. Breast cancer is a preventable disease. [Persian]. *Sci J Birjand Univ Med Sci*. 2014;**21**(2):126-141.
23. Tang MT, Weiss NS, Malone KE. Induced abortion in relation to breast cancer among parous women: a birth certificate registry study. *Epidemiology*. 2000;**11**(2):177-180. **doi:** 10.1097/00001648-200003000-00016 **pmid:** 11021616
24. Besharat S, Motie MR, Besharat M, Roshandel G. Breast cancer risk factors in women of Golestan Province in Iran: A case-control study. *Iran J Obstet Gynecol Infertilit*. 2011;**13**(6):46-51.
25. Onsori K, Ranapour S. Breast cancer in women and the role of environmental factors in creating it. *New Cellular Molecular Biotechnol*. 2011(4):60-70.