

Association of rs351855 and rs1983891 Polymorphisms with Prostate Cancer in the Iranian Population

Shabnam Khazraei¹, Seyed Abdolhamid Angaji², Behnaz Beikzadeh³, Mitra Salehi⁴, Raheleh Roudi⁵, Behzad Narouie⁶

1. MSc student, Department of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0001-6214-3603

2. Associate Professor, Department of Cell and Molecular Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran (Corresponding Author), Tel: 09123058891, Email: ershad110@yahoo.com. Angaji@khu.ac.ir. ORCID ID: 0000-0001-9560-5157

3. Ph.D. Candidate, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0001-5266-6590

4. Assistant Professor, Department of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-8397-9415

5. Ph.D., Department of Radiology, Faculty of Molecular Imaging, Stanford University, CA94305, USA. ORCID ID: 0000-0001-5023-4743

6. MD., Department of Urology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran. ORCID ID: 0000-0003-1574-0055

ABSTRACT

Background and Aim: Prostate Cancer (PC) is one of the most common cancers and the second leading cause of death in Iranian men. Several factors such as age, endogenous hormone balance, genetic factors and environmental factors are involved in PC incidence. The aim of this study was to investigate the association of rs351855 and rs1983891 polymorphisms with prostate cancer risk in Iranian population.

Materials and Methods: In this case-control study 185 peripheral blood samples were taken from 101 patients with prostate cancer and 84 healthy individuals. For SNP genotyping in each sample, Tetra-ARMs PCR method was used.

Results: According to the multi-stage method, 58 individuals were selected in the first stage. $p\text{-value} < 0.4$ was considered significant. In relation to rs351855, there was a significant difference between the case and control groups ($P < 0.16$), but, there was no significant difference between the groups in regard to rs1983891 ($P < 0.62$). Therefore, rs1983891 was eliminated at this stage. In the second stage, all samples (184 samples) were analyzed in relation to rs351855 at a significance level of $P < 0.05$. A significant difference was observed between the two groups of case and control in relation to rs351855 polymorphism in all samples ($P < 0.00$). In this study, allelic and genotypic frequencies were investigated in multiplicative and additive genetic models. Our data showed a significant relationship between the multiplicative model allele (A) and the risk of prostate cancer, also the data indicated that the additive model AA vs GG and AG vs GG were associated with PC. On the other hand, this polymorphism was associated with all three levels of PSA and Gleason score.

Conclusion: In the present study rs351855 polymorphism was associated with the risk of prostate cancer in Iran, on the contrary, rs1983891 polymorphism was not associated with prostate cancer risk. rs351855 may be considered as a potential biomarker for the screening of prostate cancer.

Keywords: Prostate cancer, Polymorphism, Screening

Received: Oct 30, 2022

Accepted: Nov 4, 2023

How to cite the article: Shabnam Khazraei, Seyed Abdolhamid Angaji, Behnaz Beikzadeh, Mitra Salehi, Raheleh Roudi, Behzad Narouie. Association of rs351855 and rs1983891 Polymorphisms with Prostate Cancer in the Iranian Population. SJKU 2024;29(3):26-37.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

بررسی همراهی پلی مورفیسم های rs351855 و rs1983891 با سرطان پروستات در جمعیت ایران

شبنم خضرائی^۱، سیدعبدالحمید انگجی^۲، بهناز بیک زاده^۳، میترا صالحی^۴، راحله رودی^۵، بهزاد نارویی^۶

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران. کد ارکید: ۳۶۰۳-۶۲۱۴-۰۰۰۰-۰۰۰۰
۲. دانشیار، گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. (نویسنده مسئول)، تلفن: ۰۹۱۲۳۰۵۸۸۹۱، پست الکترونیک: ershad110@yahoo.com, Angaji@khu.ac.ir، کد ارکید: ۵۱۵۷-۹۵۶۰-۰۰۰۰-۰۰۰۰
۳. دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. کد ارکید: ۶۵۹۰-۵۲۶۶-۰۰۰۰-۰۰۰۰
۴. استادیار، گروه علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران. کد ارکید: ۹۴۱۵-۸۳۹۷-۰۰۰۰-۰۰۰۰
۵. دکتری، گروه رادیولوژی، دانشکده تصویربرداری مولکولی، دانشگاه استنفورد، CA94305، ایالات متحده آمریکا. کد ارکید: ۴۷۴۳-۵۰۲۳-۰۰۰۰-۰۰۰۰
۶. پزشک متخصص، گروه اورولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران. کد ارکید: ۰۰۵۵-۱۵۷۴-۰۰۰۰-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پروستات یکی از سرطان‌های رایج در بین مردان، دومین علت اصلی مرگ و میر و سومین سرطان شایع در مردان ایرانی است. عوامل متعددی از جمله سن، تعادل هورمونی، عوامل ژنتیکی و عوامل محیطی در بروز سرطان پروستات دخیل می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی همراهی پلی مورفیسم های rs351855 و rs1983891 با خطر سرطان پروستات در جمعیت ایران به روش چندمرحله‌ای است.

مواد و روش‌ها: بررسی مورد-شاهدی بر روی ۱۸۵ نمونه خون محیطی شامل ۱۰۱ بیمار مبتلا به سرطان پروستات و ۸۴ فرد سالم انجام شد. به منظور تعیین ژنوتیپ در هر نمونه روش Tetra-ARMS PCR به کار برده شد.

یافته‌ها: با توجه به استفاده از روش چندمرحله‌ای در مرحله اول ۵۸ نفر انتخاب شدند و سطح معنی‌داری $P < 0/4$ در نظر گرفته شد. در ارتباط با rs351855 تفاوت معناداری بین گروه‌های مورد و شاهد وجود داشت ($P < 0/16$)؛ اما در ارتباط با rs1983891 تفاوت معناداری بین گروه‌ها دیده نشد ($P < 0/62$)؛ بنابراین rs1983891 در این مرحله حذف گردید. در مرحله دوم کل نمونه‌ها (۱۸۴ نمونه) در ارتباط با rs351855 با سطح معنی‌داری $P < 0/5$ مورد بررسی قرار گرفتند. تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مورد و شاهد در ارتباط با پلی مورفیسم rs351855 در مرحله دوم بر روی کل نمونه‌ها مشاهده گردید ($P < 0/00$). در این مطالعه فراوانی اللی و ژنوتیپی در مدل‌های چندگانه و افزایشی بررسی شد. داده‌ها نشان می‌دهند که در مدل چندگانه ال (A) با خطر سرطان پروستات ارتباط معناداری دارد همچنین داده‌ها حاکی از آن هستند که در مدل افزایشی AA vs GG و AG vs GG دارای همراهی با PC هستند. از طرفی این پلی مورفیسم با هر سه سطح PSA و امتیاز گلیسون دارای همراهی است.

نتیجه‌گیری: پلی مورفیسم rs351855 با خطر ابتلا به سرطان پروستات در جمعیت ایران مرتبط است از طرفی پلی مورفیسم rs1983891 با خطر سرطان پروستات همراهی نشان نداد و ممکن است rs351855 به عنوان یک بیومارکر بالقوه در غربالگری بیماران مبتلا به سرطان پروستات در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: سرطان پروستات، پلی مورفیسم، غربالگری

وصول مقاله: ۱۴۰۱/۸/۸ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۲/۸/۸ پذیرش: ۱۴۰۲/۸/۱۳

مقدمه

سرطان پروستات (PC: Prostate cancer) یکی از سرطان‌های رایج در بین مردان می‌باشد که در ایران در طی چند دهه گذشته افزایش یافته است و از رتبه ۱۳ در سال ۱۹۸۶ به رتبه ۴ در سال ۲۰۰۵ رسیده است. در یک مطالعه اخیر در سال ۲۰۱۶، سرطان پروستات به عنوان سومین سرطان شایع در مردان و ششمین سرطان شایع در ایران گزارش شده است (۱،۲). شیوع بالینی PC در جمعیت‌های غربی بیشتر است در حالی که کمترین میزان مرگ‌ومیر در مردان نژاد آسیایی گزارش شده است. PC یکی از ناهمگن ترین تومورهای انسانی است (۳).

عوامل متعددی از جمله سن، تعادل هورمون درون زنا، عوامل ژنتیکی و عوامل محیطی در بروز PC دخیل می‌باشند. میزان این بیماری بر حسب نژاد، جغرافیا، قومیت بسیار متفاوت است (۴).

در خصوص موضوع غربالگری، تشخیص فعلی بر آزمایش آنتی‌ژن اختصاصی پروستات (PSA: Prostate Specific Antigen) و آزمون دیجیتال رکتال (DRE: Digital Rectal Examination) متکی است. DRE به تنهایی برای تشخیص بیماری کافی نیست؛ زیرا نرخ تشخیص صحیح آن ۲۶-۱۱ درصد است. اگرچه PSA در ۹۵٪ بیماران دارای PC متاستاتیک افزایش می‌یابد؛ اما تنها حدود دو سوم مردان مبتلا به PC موضعی، دارای سطح بالایی از PSA هستند. ترکیب DRE و PSA سرم در غربالگری ممکن است بازده تشخیص را بالا ببرد (۵).

تعدادی از تغییرات ژنومی باعث بروز سرطان پروستات می‌شوند که از جمله این تغییرات در ژن MYC است و از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان گیرنده آندروژن را نام برد. پیشرفت سرطان می‌تواند توسط هورمون‌های استروئیدی آندروژن صورت گیرد که با درمان محرومیت از آندروژن به تأخیر می‌افتد (۶).

یک چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP: Single Nucleotide Polymorphism)، یک تغییر در یک

موقعیت واحد در توالی DNA در بین افراد است. برخی از SNP‌ها با بیماری‌های خاصی مرتبط هستند. علاوه بر این، اگر مشخص شود که SNP‌های خاصی با یک صفت مرتبط هستند، دانشمندان ممکن است بخش‌هایی از DNA را در نزدیکی این SNP‌ها به منظور شناسایی ژن یا ژن‌های مسئول این ویژگی بررسی کنند (۷). جهت کارآمد شدن مطالعات ژنومی روش‌های متعددی وجود دارد که می‌توان به یکی از این روش‌ها یعنی روش چندمرحله‌ای (multi-stage) اشاره کرد. در این روش از تعداد افراد کم‌تری بدون کاهش توان آزمون برای تعیین ژنوتیپ استفاده می‌شود. در مرحله اول p-value آزادانه‌تر به جهت مهنی داری انتخاب می‌گردد و تمام SNP‌ها در جمعیت محدودی بررسی می‌شوند. در مراحل بعدی سطح معنی‌داری p-value سخت‌گیرانه‌تر انتخاب شده و SNP‌هایی که از مرحله اول انتخاب شده‌اند در جمعیت بیش‌تری مورد ارزیابی قرار می‌گیرند (۸ و ۹) در مطالعه حاضر نیز از این روش استفاده شده است.

گیرنده‌های فاکتور رشد فیروبلاست (FGFRs: Fibroblast Growth Factor Receptors) در شرایط متفاوتی همچون آسیب شناختی، شرایط فیزیولوژیک، تکثیر، تمایز و مهاجرت شرکت می‌کنند. SNP‌های متعددی در FGFR از جمله FGFR4 که با پیشرفت سرطان مرتبط است شناسایی شده‌اند (۱۰). rs351855 موجود در ژن FGFR⁴ باعث تغییر گلايسين به آرژنین در کدون ۳۸۸ در محدوده غشایی گیرنده می‌شود. طبق گزارش‌های انجام شده، GLY388Arg در ژن FGFR⁴ در بروز PC نقش دارد (۱۱). اتصال لیگاند‌ها به FGFR باعث ایجاد آبشار انتقال در پایین دست شده که خود موجب فعال کردن سرطان می‌گردد (۱۲). FGFR‌ها در بسیاری از انواع سرطان‌ها از جمله PC دخیل بوده و در بروز بیماری و تکثیر تومور ارتباط دارند (۱۳ و ۱۴). شواهد حاکی از آن است که این چند شکلی در ژن‌های مسیر PI3K/Akt با خطر PC ارتباط دارد (۱۵). از لحاظ

ایمونوهیستوشیمی بیان قوی این گیرنده در سلول‌های تومور بدخیم با افزایش مرحله بالینی و درجه تومور و کاهش میزان بقا بیماران ارتباط معناداری نشان می‌دهد. گیرنده $FGFR^4$ در انواع خاصی از سرطان‌ها فعال است. فعال سازی $MAPK/Raf/Ras/pI3K-AKT$ با واسطه $FGFR4$ باعث رشد تومور می‌شود. مسیرهای نام برده شده در تعدادی از سرطان‌ها فعال می‌شوند و در تنظیم تکثیر سلولی، مهاجرت، بقا و آپوپتوز نقش دارند. فعال سازی بالای مسیر $pI3K-AKT$ در تعدادی از سرطان‌ها از جمله PC مشاهده می‌شود (۱۶).

rs1983891 در ناحیه اینترونی ژن (Fork $FOXP^4$: head Box P4) قرار دارد. $FOXP4$ متعلق به زیر خانواده P از فاکتورهای رونویسی FOX بوده و عوامل رونویسی جعبه چنگال، دارای نقش مهم در تنظیم رونویسی می‌باشند. این ژن در ناحیه‌ی کروموزومی 6p21 قرار گرفته است که با سرطان پروستات ارتباط دارد (۱۷).

در این مطالعه به دلیل شیوع بالای سرطان پروستات در بین مردان ایرانی، همراهی پلی مورفیسم های rs1983891 و rs351855 با سرطان پروستات و همچنین ارتباط آن با متغیرهای بالینی افراد مانند سطح PSA، سن و درجه گلیسون (Gleason Score) در میان جمعیت ایران بررسی می‌گردد. پیش از مطالعه حاضر، این پلی مورفیسم ها در جمعیت ایران مورد بررسی قرار نگرفته بودند.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه: این مطالعه موردی-شاهدی بر روی ۱۰۱ مرد دارای سرطان پروستات به عنوان مورد و ۸۴ مرد فاقد سرطان پروستات یا هایپرپلازی خوش خیم پروستات (BPH: Benign prostatic hyperplasia) به عنوان شاهد انجام شد. تمامی افراد شرکت کننده در مطالعه حاضر، از بیمارستان هاشمی نژاد تهران انتخاب شدند. اطلاعات بالینی بیماران همچون سن، مقدار PSA، Perineural invasion (PI) و Gleason Score ثبت گردید. PSA

همان طور که پیش از این ذکر گردید، آنتی ژن اختصاصی پروستات است که جهت غربالگری افراد استفاده می‌شود و سطح نرمال آن کمتر از 4ng/ml است. PI به این معنی است که سلول‌های سرطانی در اطراف رشته های عصبی پروستات دیده می‌شوند یا در حال ردیابی هستند. هنگامی که این مورد در بیوپسی یافت می‌شود، احتمال بیشتری وجود دارد که سرطان به خارج از پروستات گسترش یابد. معمولاً نتایج بیوپسی پروستات به صورت نمره گلیسون داده می‌شود. نمره ۶ نشان دهنده سرطان پروستات با درجه پایین است. نمره ۷ نشان دهنده سرطان پروستات با درجه متوسط و نمرات ۸ تا ۱۰ نشان دهنده سرطان با درجه بالا است. این دو گروه از نظر تمامی ویژگی ها به جز نوع بیماری یا اختلال در پروستات مشابه بودند و سابقه ابتلا به بیماری‌های دیگر را نداشتند. افرادی که دارای سابقه ابتلا به سرطان در خانواده خود بودند از این مطالعه حذف گردیدند؛ همچنین در گروه مورد نمونه‌گیری از افرادی صورت گرفت که تحت رادیوتراپی و شیمی درمانی قرار نگرفته بودند. در گروه مورد تنها افرادی مورد ارزیابی قرار گرفتند که مبتلا به سرطان پروستات از نوع آدنوکارسینوما بودند.

. از هریک از این افراد مقدار ۵ میلی لیتر خون محیطی گرفته شد. نمونه های خونی در ویال های حاوی مواد ضد انعقاد (EDTA) جمع‌آوری شدند و برای انجام مراحل بعدی آزمایش در دمای ۲۰- درجه سلیسیوس نگهداری شدند. شایان ذکر است که از تمامی افراد شرکت کننده در این مطالعه، رضایت آگاهانه مبنی بر شرکت در مطالعه و عدم افشای اطلاعات آن‌ها اخذ گردید (IR.IAU.TNB.REC.1401.003).

استخراج DNA از خون محیطی: استخراج DNA ژنومی از خون محیطی مطابق با دستورالعمل کیت استخراجی Favorgen تایوان صورت گرفت. DNA استخراجی از نظر کمی و کیفی توسط دستگاه نانودراپ و ژل آگارز ۲ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه نسبت

جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نمونه های استخراجی معادل ۱۸ گزارش گردید. واکنش Tetra-Primer ARMS-PCR: در این مطالعه به منظور تعیین ژنوتیپ هر یک از افراد در هر نمونه از روش Tetra-primers PCR با نام کامل Tetra-primer Amplification refractory mutation system استفاده شد. واکنش های PCR در حجم کل ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر DNA، ۱۲.۵ میکرولیتر مسترمیکس و ۶.۵ میکرولیتر آب PCR-grade انجام شد. دماهای بهینه به منظور انجام واکنش Tetra-PCR ARMs برای پلی مورفیسم های rs351855 و rs1983891 ب در جدول (۱) آورده شده است.

جدول ۱. برنامه دمایی PCR پلی مورفیسم rs351855 و rs1983891

تعداد سیکل	زمان	دما	مرحله	تعداد سیکل	زمان	دما	مرحله
۱	۵ دقیقه	۹۵	دنا توره اولیه	۱	۵ دقیقه	۹۵	دنا توره اولیه
۳۲	۳۰ ثانیه	۹۵	دنا توره ثانویه	۳۲	۳۰ ثانیه	۹۵	دنا توره ثانویه
۳۲	۴۰ ثانیه	۶۱	اتصال	۳۲	۴۰ ثانیه	۵۸	اتصال
۳۲	۱ دقیقه	۷۲	گسترش	۳۲	۱ دقیقه	۷۲	گسترش
۱	۵ دقیقه	۷۲	گسترش نهایی	۱	۵ دقیقه	۷۲	گسترش نهایی

طراحی پرایمر برای پلی مورفیسم های rs351855 و rs1983891

در روش Tetra-ARMS PCR طراحی پرایمرها به گونه ای صورت می گیرد که بتوان دو واکنش PCR با پرایمر مختص آلل وحشی و پرایمر مختص آلل موتانت را هم زمان در یک واکنش PCR بررسی نمود. در این مطالعه به منظور طراحی پرایمرها ابتدا توالی ژن مورد نظر از بانک اطلاعاتی NCBI گرفته شد. بعد از اینکه جایگاه پلی مورفیسم rs1859962 در توالی ژن مشخص گردید، پرایمرها توسط

برنامه آنالین PRIMER1 (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>) طراحی شدند و پرایمرهای طراحی شده از نظر صحت و درستی با Primer Blast و از نظر ساختار ثانویه با mFOLD بررسی شدند. مشخصات پرایمرهای rs351855 و rs1983891 استفاده شده در این مطالعه به ترتیب در جدول (۲) و (۳) آورده شده است.

جدول ۲. مشخصات پرایمر rs351855

اندازه محصول (bp)	دما (Tm) (°C)	اندازه (نوکلئوتید)	3' → 5' توالی
۲۱۵	۷۰/۵۶	۲۴	Forward inner primer (alleleA) TGGCTGTGCTCCTGCTGCTGGACA
۴۳۱	۷۰/۵۱	۲۵	Reverse inner primer (alleleG) GGAGCGCCTGCCCTCGATACAGACC
۵۱۳	۷۲/۳۱	۲۴	Forward outer primer AGTGGGGGCTGTGGCCTGTTGGGT
	۶۹/۹۹	۲۵	Reverse outer primer TGCCGGAAGAGCCTGACTCCAGGG

جدول ۳. مشخصات پرایمر rs1983891

اندازه محصول (bp)	دما (Tm) (°C)	اندازه (نوکلئوتید)	توالی
۳۰۷	۶۹/۸۴	۲۶	Forward inner primer(alleleC) ACACGCTGGTCCCATTCTCCTCGGAC
۴۷۳	۶۹/۲۳	۲۹	Reverse inner primer(alleleT) GGCAGAGGAGCTTGGAGAGCCACAGATAA
۷۲۶	۶۸/۳۹	۲۸	Forward outer primer TTCGTCTCTGGTGCTTTGGGGTCTTCAC
	۶۸/۵۲	۲۸	Reverse outer primer CCCCAGCCTCTGTTTAAACAAGCTCCCA

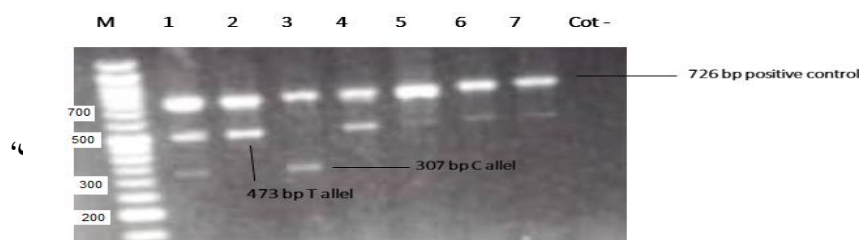
تجزیه و تحلیل آماری

با توجه به مطالعه پلی مورفیسم ها با استفاده از روش multi-stage، سطح معنی داری p-value در مرحله اول $P < 0.04$ و در مرحله دوم $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است. به منظور ارزیابی وجود اختلاف در فراوانی اللی و ژنوتیپی بین دو گروه مورد و شاهد در ارتباط با پلی مورفیسم های rs1983891 و rs351855 از آزمون مربع کای و فیشر استفاده شد. توزیع ژنوتیپ ها در بین گروه های مورد و شاهد با تعادل هاردی-واینبرگ Hardy-Weinberg (Equilibrium) بررسی شد. خطرات نسبی با odds ratio و با فاصله اطمینان ۹۵٪ (CI 95%) ارزیابی شدند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS.۲۵ انجام شد.

یافته ها

مرحله اول

با توجه به استفاده از روش multi-stage در مرحله اول ۵۸ نفر انتخاب شدند که شامل ۲۹ نفر مورد و ۲۹ نفر شاهد بودند. در گروه مورد افرادی انتخاب شدند که درجه شدیدی از بیماری را نسبت به بقیه افراد این گروه داشتند. این انتخاب با توجه به $PSA > 4$ ، نتیجه مثبت PI و $Gleason\ score \geq 8$ صورت گرفت. در گروه شاهد انتخاب افراد بر مبنای سالم ترین ها نسبت به دیگر افراد این گروه با توجه به شاخص $PSA < 4$ صورت گرفت. مشخصات سنی افراد مورد مطالعه در مرحله اول (۵۸ نفر) به این صورت است که کمترین و بیشترین سن افراد به ترتیب ۴۷ و ۸۶ سال و میانگین سنی افراد 67.14 ± 1.15 بود. در شکل شماره ۱ و ۲ عکس الکتروفورز محصولات PCR این دو پلی مورفیسم قرار گرفت.



فراوانی ژنوتیپی پلی مورفیسم rs351855(A>G) در دو گروه مورد و شاهد به ترتیب (GG=۱۵، AG=۱۲، AA=۲) و (GG=۸، AG=۱۸، AA=۳) بود. داده ها

نشان می دهند تفاوت معناداری بین گروه های ما با توجه به

همراهی پلی مورفیسم با سرطان پروستات استفاده می شود. شایان ذکر است که مدل ژنتیکی افزایشی فارغ از بررسی تعادل هاردی-واینبرگ است. بر طبق مدل چندگانه نتایج نشان داد که پلی مورفیسم rs1983891 در الل C vs T ($OR=0.7$, $P=0.53$, $95\%CI=0.11-4.37$) با خطر سرطان پروستات همراهی ندارد جدول (۵).

بر طبق مدل افزایشی نتایج نشان داد که پلی مورفیسم rs1983891 در ژنوتیپ CC vs TT ($OR=1.03$, $P=0.51$, $95\%CI=0.06-17.42$) و CT vs TT ($OR=1.03$, $P=0.74$, $95\%CI=0.06-17.42$) با خطر سرطان پروستات همراهی ندارد جدول (۵).

سطح معنی داری $P<0.4$ در مرحله اول وجود دارد ($P<0.16$). فراوانی ژنوتیپی پلی مورفیسم rs1983891 ($T>C$) در دو گروه مورد و شاهد به ترتیب ($CT=1$, $TT=28$) و ($CC=1$, $CT=0$, $TT=27$) بود. داده ها نشان می دهند تفاوت معناداری بین گروه های ما وجود ندارد ($P<0.62$). اطلاعات مربوط به فراوانی ژنوتیپی هر دو SNP در جدول (۴) آورده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده از HWE برای پلی مورفیسم rs1983891 گروه مورد ($P<0.49$) و شاهد ($P<0.61$) در تعادل قرار داشتند. با توجه به برقراری تعادل در گروه مورد و شاهد از دو مدل ژنتیکی چندگانه (multiplicative) و افزایشی (additive) برای بررسی

جدول ۴. فراوانی ژنوتیپی rs351855 و rs1983891 در گروه مورد و شاهد

مرحله	پلی مورفیسم ها	مورد	شاهد	P-value
اول	rs351855 AA(%) AG(%) GG(%)	۳(۱۰/۳)	۱۵(۵۱/۷)	۰/۱۶
	rs1983891 CC(%) CT(%) TT(%)	۱(۳/۶)	۲۸(۹۳/۳)	۰/۶۲
	rs351855 AA(%) AG(%) GG(%)	۳۴(۳۴)	۳۹(۴۶/۶)	۰/۰۰

جدول ۵. بررسی مدل ژنتیکی افزایشی و چندگانه در rs1983891

ژنوتیپ	مورد	شاهد	OR	CI(95%)	P-value
TT	۲۷	۲۸			(Reference)۱
CC vs TT	۱(۳/۶)	۱(۳/۴)	۱/۰۳	۰/۰۶-۱۷/۴۲	۰/۷۴
CT vs TT	۰	۱(۳/۴)	۱/۰۳	۰/۹۶-۱/۱	۰/۵۱
الل	مورد	شاهد	OR	CI(95%)	P-value
T	۵۴	۵۷			(Reference)۱
C vs T	۲	۳	۰/۷	۰/۱۱-۴/۳۷	۰/۵۳

مرحله دوم

برای پلی مورفیسم rs351855 مشخصات سنی افراد مورد مطالعه که شامل ۱۰۱ مرد دارای PC و ۸۴ مرد BPH کمترین و بیشترین سن به ترتیب ۴۷ و ۸۶ سال و میانگین سنی $65/52 \pm 0/58$ بود. فراوانی ژنوتیپی پلی مورفیسم rs351855 در دو گروه مورد و شاهد به ترتیب (AA=۳۴، AG=۵۵، GG=۱۲) و (AA=۳۴، AG=۳۴، GG=۳۹) بود (جدول ۴). دو گروه مورد و شاهد از نظر سنی بعد از بررسی نرمال بودن داده ها و آنالیز از طریق t-test اختلاف معنی داری نداشتند ($P < 0/01$). داده ها نشان می دهند تفاوت معناداری بین گروه های ما وجود دارد ($P < 0/00$). با توجه به نتایج به دست آمده از تعادل HWE

گروه مورد ($P < 0/62$) و شاهد ($P < 0/82$) هر دو در تعادل قرار داشتند. در این مطالعه فراوانی اللی و ژنوتیپی در مدل های چندگانه و افزایشی بررسی شد. داده ها نشان می دهند که در مدل چندگانه (A vs G) ال (A) با خطر سرطان پروستات ارتباط معناداری دارد ($OR=3/11$ ، $P=0/00$ ، $95\%CI=2/03-4/77$)؛ همچنین داده ها حاکی از آن هستند که در مدل افزایشی AA vs GG ($OR=10/04$ ، $P=0/00$ ، $95\%CI=3/93-25/67$) و AG vs GG ($P=0/00$ ، $95\%CI=2/42-11/41$ ، $OR=5/25$) با خطر سرطان پروستات ارتباط معناداری را نشان می دهد (جدول ۶).

جدول ۶. بررسی مدل های ژنتیکی چندگانه و افزایشی در پلی مورفیسم rs351855

مدل ژنتیکی	مورد	شاهد	P-VALUE	OR	95%CI
چندگانه G A VS G	۷۹ (۳۹/۱)	۱۱۲ (۶۶/۷)		۱	reference
	۱۲۳ (۶۰/۹)	۵۶ (۳۳/۳)	۰/۰۰	۳/۱۱	۲/۰۳-۴/۷۷
افزایشی GG AA VS GG AG VS GG	۱۲	۳۹		۱	reference
	۳۴ (۷۳/۹)	۱۱ (۲۲)	۰/۰۰	۱۰/۰۴	۳/۹۳-۲۵/۶۷
	۵۵ (۸۲/۱)	۳۴ (۴۶/۶)	۰/۰۰	۵/۲۵	۲/۴۲-۱۱/۴۱

در مطالعه حاضر همراهی پلی مورفیسم rs351855 با اطلاعات بالینی افراد مانند درجه گلیسون، سطح PSA و PI مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که پلی مورفیسم rs351855 با هر سه سطح PSA یعنی $PSA \leq 4$ ($OR=5/25$ ، $P=0/030$ ، $95\%CI=1/7-16/17$)، $4.1-10$ ($OR=2/23$ ، $P=0/08$ ، $95\%CI=1/22-14/05$) و $PSA \geq 10$ ($OR=3/69$ ، $P=0/02$)، $PSA \leq 4$ ($OR=4/66$ ، $P=0/00$ ، $95\%CI=2/2-9/86$)، $4.1-10$ ($OR=4/66$ ، $P=0/00$ ، $95\%CI=1/97-5/9$) و $PSA \geq 8$ ($OR=4/66$ ، $P=0/02$ ، $95\%CI=1/34-4/03$) همراهی نشان داد؛ اما بین نتایج مثبت و منفی PI اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P < 0/23$). اطلاعات بالینی افراد در جدول (۷) نشان داده شده است.

با هر سه دسته نمره گلیسون یعنی $GS < 7$ ($OR=4/66$)، $GS = 7$ ($OR=3/41$)، $GS \geq 8$ ($OR=4/66$)، $PSA \leq 4$ ($OR=4/66$ ، $P=0/00$ ، $95\%CI=2/2-9/86$)، $4.1-10$ ($OR=4/66$ ، $P=0/00$ ، $95\%CI=1/97-5/9$) و $PSA \geq 8$ ($OR=4/66$ ، $P=0/02$ ، $95\%CI=1/34-4/03$) همراهی نشان داد؛ اما بین نتایج مثبت و منفی PI اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P < 0/23$). اطلاعات بالینی افراد در جدول (۷) نشان داده شده است.

جدول ۷. بررسی همراهی rs351855 با اطلاعات بالینی افراد در دو گروه مورد و شاهد

پارامترها	گروه	AA(%)	AG(%)	GG(%)	A(%)	G(%)	P-VALUE	OR	95%CI
PSA ≤ 4	شاهد	۱(۵/۳)	۶(۳۱/۶)	۱۲(۶۳/۲)	۸(۲۱/۱)	۳۰(۷۸/۹)	۰/۰۰۳	۵/۲۵	۱/۷-۱۶/۱۷
	مورد	۴(۳۳/۳)	۶(۵۰)	۲(۱۶/۷)	۱۴(۵۸/۳)	۱۰(۴۱/۷)			
PSA = ۴.۱-۱۰	شاهد	۷(۱۴/۶)	۲۳(۴۷/۹)	۱۸(۳۷/۵)	۳۷(۳۸/۵)	۵۹(۶۱/۵)	۰/۰۰۸	۲/۲۳	۱/۲۲-۴/۰۵
	مورد	۱۴(۱۳/۳)	۲۱(۵۰)	۷(۱۶/۷)	۴۹(۵۸/۳)	۳۵(۴۱/۷)			
PSA ≥ ۱۰	شاهد	۳(۱۷/۶)	۵(۲۹/۴)	۹(۵۲/۹)	۱۱(۳۲/۴)	۲۳(۶۷/۶)	۰/۰۰۲	۳/۶۹	۱/۶-۸/۴۸
	مورد	۱۶(۳۴)	۲۸(۵۹/۶)	۳(۶/۴)	۶۰(۶۳/۸)	۳۴(۳۶/۲)			
GLEASON SCORE(GS)	شاهد	۱۱(۱۳/۱)	۳۴(۴۰/۵)	۳۹(۴۶/۴)	۵۶	۱۱۲		۱	reference
GS < 7	مورد	۱۰(۵۰)	۸(۴۰)	۲(۱۰)	۲۸(۷۰)	۱۲(۳۰)	۰/۰۰	۴/۶۶	۲/۲-۹/۸۶
GS = 7	مورد	۱۵(۳۵/۷)	۲۳(۵۴/۸)	۴(۹/۵)	۵۳(۶۳/۱)	۳۱(۳۶/۹)	۰/۰۰	۳/۴۱	۱/۹۷-۵/۹
GS ≥ 8	مورد	۹(۲۳/۱)	۲۴(۶۱/۵)	۶(۱۵/۴)	۴۲(۵۳/۸)	۳۶(۴۶/۲)	۰/۰۰۲	۲/۳۳	۱/۳۴-۴/۰۳
PI									
+									
۲۱(۲۸/۸)									
۴۲(۵۷/۵)									
۱۰(۱۳/۷)									
۰/۲۳۳									
-									
۱۳(۴۶/۴)									
۱۳(۴۶/۴)									
۲(۷/۱)									

بحث

در این مطالعه همراهی پلی مورفیسم های rs351855 و rs1983891 با PC در جمعیت ایران مورد ارزیابی قرار گرفته است که به منظور ارزیابی از روش multi-stage استفاده شد. به این صورت که در مرحله اول افراد از سالم ترین و بیمارترین انتخاب شدند. افرادی که برای بررسی در این مرحله انتخاب می گردند بر طبق منحنی زنگوله ای از دو extreme این منحنی می باشند یعنی در گروه کیس افرادی انتخاب می گردند که درجه پیشرفته تری از سرطان را نشان می دهند و جزء بیمارترین ها در این گروه محسوب می گردند. از گروه کنترل نیز آنهایی که سالم ترین هستند با توجه به $PSA < 4$ انتخاب شدند تا در مرحله اول که سطحی معنی داری p-value آزادانه تر انتخاب می گردد دو گروه کیس و کنترل بیشترین اختلاف

را با یکدیگر داشته باشند؛ که در نتیجه پلی مورفیسم rs351855 با خطر سرطان پروستات همراهی نشان داد؛ ولی پلی مورفیسم rs1983891 همراهی نشان نداد. در مرحله دوم ارزیابی های لازم مانند بررسی مدل های ژنتیکی و ویژگی های آسیب شناختی بالینی PC انجام شد. در این تحقیق به جهت محدودیت در انجام توالی یابی، برای تأیید و صحت پرایمرهای طراحی شده و روش به کار برده شده، برای SNP ها تعیین ژنوتیپ نیمی از نمونه ها دو بار صورت گرفت و نتایج یکسان از ژنوتیپ های هر فرد حاصل گردید. همچنین در هنگام طراحی پرایمر در نوکلئوتید سوم از سر ۳ یک miss match طراحی گردید تا اختصاصیت اتصال پرایمر افزایش یابد. رایج ترین روش های غربالگری سرطان پروستات مانند تست PSA معمولاً به صورت دقیق نمی توانند بیماری را در مراحل اولیه مشخص کنند،

درحالی که طی مطالعاتی که توسط پژوهشگران صورت گرفته است گاهی ارتباط معنی داری بین SNP ها و صفات مختلف زیستی می تواند یافت شود. زمانی که SNP در بین یک ژن یا در ناحیه تنظیمی نزدیک به یک ژن قرار گرفته باشد ممکن است با اثرگذاری بر فعالیت ژن ها نقش مستقیمی را در بیماری داشته باشد؛ بنابراین می توان از پلی مورفیسم ها به عنوان تست های غربالگری استفاده کرد (۱۸).

از جمله این پلی مورفیسم ها rs351855 و rs1983891 است که در تحقیق حاضر ارتباط آن با خطر و تظاهرات بالینی سرطان پروستات مورد بررسی قرار گرفت. گیرنده فاکتور رشد فیروبلست ۴ (FGFR⁴) در بسیاری از فرآیندهای حیاتی سلولی نقش دارد و با خطر PC مرتبط است. نتایج پیشین ارتباط بین FGFR4 و خطر سرطان پروستات را در موارد رادیکال پروستاتکتومی تأیید کرده است. ژن FGFR4 مهاجرت سلول های سرطانی را در شرایط آزمایشگاهی تعدیل می کند و با پارامترهای پیش آگهی سرطان سینه، کولون و پروستات مرتبط است (۱۹). هموزیگوسیتی برای آلل در Arg388 در این ژن به شدت با بروز سرطان پروستات در مردان سفید پوست مرتبط است. وجود آلل Arg388 FGFR-4 نیز با وقوع متاستاز مرتبط است (۲۰). مطالعاتی که توسط Tao و همکارانش صورت گرفته است نشان می دهد که پلی مورفیسم G388R در حالت هموزیگوت می تواند با افزایش استعداد ابتلا به سرطان همراه باشد. یافته های مشابهی برای سرطان پروستات نشان داده شد که با نتایج به دست آمده از مطالعه ما هم راستا است. آلل Arg388 در مقایسه با آلل Gly388 باعث افزایش خطر سرطان پروستات می گردد (OR=۱.۱۷، ۹۵٪ CI=۱.۰۷-۲.۲۹). در یک متاآنالیزی که توسط محققین صورت گرفته است شواهدی را نشان می دهد که پلی مورفیسم FGFR4 Gly388Arg با افزایش خطر توسعه و پیشرفت PC مرتبط است، که نشان می دهد

که با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر هم سو است (۲۱) ۲۴ هم باید اینجا قرار بگیرد. در مغایرت با نتایج مطالعه حاضر، یک مطالعه ای با ۱۴۵۸ بیمار سرطان پروستات و ۱۳۵۲ گروه کنترل که از نظر سنی تطابق داده شده بودند در سال ۲۰۰۹ صورت گرفت که هیچ یک از ژنوتیپ های این پلی مورفیسم با خطر سرطان پروستات و امتیاز گلیسون همراهی نشان نداد. در یک مطالعه مورد-شاهدی که بر روی ۴۸۱ بیمار و ۴۸۰ فرد سالم در یک جمعیت چینی صورت گرفته است نتایج حاکی از آن است که rs1983891 با خطر سرطان پروستات در مدل ژنتیکی مغلوب همراهی نشان داده است (P=۰.۰۴) که با نتایج به دست آمده از مطالعه ما هم راستا نیست (۲۲) همچنین مطالعه ای بر روی ۷۹۵۶ فرد مبتلا به سرطان پروستات و ۸۱۴۸ فرد سالم در مردان تبار اروپایی صورت گرفته بود، نشان داد rs1983891 در مدل ژنتیکی غالب با خطر سرطان پروستات همراهی داشته است (OR=۱.۱۹، ۹۵٪ CI=۱.۱۱-۱.۲۷) که با نتایج مطالعه حاضر مغایرت دارد (۲۳).

نتیجه گیری

در این مطالعه، ارتباط پلی مورفیسم rs351855 با خطر ابتلا به سرطان پروستات در جمعیت ایران مشاهده گردید از طرفی پلی مورفیسم rs1983891 با خطر سرطان پروستات همراهی نشان نداد. تحقیقات بیشتر با حجم نمونه بزرگ تر برای آشکار کردن ارتباط بین این پلی مورفیسم ها و خطر PC مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

از همکاری و مساعدت آزمایشگاه دکتر رستگار دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تشکر و قدردان به عمل می آید. تعارض منافی وجود ندارد.

منابع

1. Salavati, L. S., Tafvizi, F., & Manjili, H. K. (2017). The association between MMP2- 1306 C> T (rs243865) polymorphism and risk of prostate cancer. *Ir. J. Med. Sci. (1971-)*, 186(1), 103-111.
2. Farhood, B., Geraily, G., & Alizadeh, A. (2018). Incidence and mortality of various cancers in Iran and compare to other countries: a review article. *Iran. J. Public Health*, 47(3), 309.
3. Grozescu, T., & Popa, F. (2017). Prostate cancer between prognosis and adequate/proper therapy. *JML*, 10(1), 5.
4. Frame, F. M., & Maitland, N. J. (2019). Epigenetic control of gene expression in the normal and malignant human prostate: A rapid response which promotes therapeutic resistance. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(10), 2437.
5. Mistry, K., & Cable, G. (2003). Meta-analysis of prostate-specific antigen and digital rectal examination as screening tests for prostate carcinoma. *JABFM*, 16(2), 95-101.
6. Liu, G., Chen, T., Ding, Z., Wang, Y., Wei, Y., & Wei, X. (2021). Inhibition of FGF-FGFR and VEGF-VEGFR signalling in cancer treatment. *Cell Prolif.*, 54(4), e13009.
7. Shaw, G. (2013). Polymorphism and single nucleotide polymorphisms (SNP s). *BJU international*, 112(5), 664-665.
8. Hirschhorn, J. N., & Daly, M. J. (2005). Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat. Rev. Genet.*, 6(2), 95-108.
9. Beikzadeh, B., Angaji, S. A., & Abolhasani, M. (2020). Association study between common variations in some candidate genes and prostate adenocarcinoma predisposition through multi-stage approach in Iranian population. *BMC Med. Genet.*, 21(1), 1-10.
10. Fitzgerald, L. M., Karlins, E., Karyadi, D. M., Kwon, E. M., Koopmeiners, J. S., Stanford, J. L., & Ostrander, E. A. (2009). Association of FGFR4 genetic polymorphisms with prostate cancer risk and prognosis. *PCAN*, 12(2), 192-197.
11. Mistry, K., & Cable, G. (2003). Meta-analysis of prostate-specific antigen and digital rectal examination as screening tests for prostate carcinoma. *JABFM*, 16(2), 95-101.
12. Munkley, J., Li, L., Krishnan, S. G., Hysenaj, G., Scott, E., Dalgliesh, C., ... & Elliott, D. J. (2019). Androgen-regulated transcription of ESRP2 drives alternative splicing patterns in prostate cancer. *Elife*, 8.
13. Lawrence, M. G., Pidsley, R., Niranjan, B., Papargiris, M., Pereira, B. A., Richards, M., ... & Clark, S. J. (2020). Alterations in the methylome of the stromal tumour microenvironment signal the presence and severity of prostate cancer. *Clin. Epigenetics*, 12(1), 1-18.
14. Scott, E., & Munkley, J. (2019). Glycans as biomarkers in prostate cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(6), 1389.
15. Li, J. P., Huang, H. C., Yang, P. J., Chang, C. Y., Chao, Y. H., Tsao, T. C. Y., ... & Yang, S. F. (2020). FGFR4 Gene Polymorphism Reduces the Risk of Distant Metastasis in Lung Adenocarcinoma in Taiwan. *IJERPH*, 17(16), 5694.
16. Xu, B., Tong, N., Chen, S. Q., Hua, L. X., Wang, Z. J., Zhang, Z. D., & Chen, M. (2011). FGFR4 Gly388Arg polymorphism contributes to prostate cancer development and progression: a meta-analysis of 2618 cases and 2305 controls. *BMC cancer*, 11(1), 1-6.
17. Chen, L., Lei, Z., Ma, X., Huang, Q., Zhang, X., Zhang, Y., ... & Zheng, T. (2016). Prognostic significance of fibroblast growth factor receptor 4 polymorphisms on biochemical recurrence after radical prostatectomy in a Chinese population. *Sci. Rep.*, 6(1), 1-6.

18. Van den Broeck, T., Joniau, S., Clinckemalie, L., Helsen, C., Prekovic, S., Spans, L., ... & Claessens, F. (2014). The role of single nucleotide polymorphisms in predicting prostate cancer risk and therapeutic decision making. *Biomed Res. Int.*, 2014.
19. Peng, T., Sun, Y., Lv, Z., Zhang, Z., Su, Q., Wu, H., ... & Mi, Y. (2021). Effects of FGFR4 G388R, V10I polymorphisms on the likelihood of cancer. *Sci. Rep.*, 11(1), 1-12.
20. Zhao, J., Yang, T., & Li, L. (2020). LncRNA FOXP4-AS1 is involved in cervical cancer progression via regulating miR-136-5p/CBX4 axis. *Onco Targets Ther*, 13, 2347.
21. Huang, C., Deng, H., Wang, Y., Jiang, H., Xu, R., Zhu, X., ... & Zhao, X. (2019). Circular RNA circABCC4 as the ceRNA of miR-1182 facilitates prostate cancer progression by promoting FOXP4 expression. *JCMM*, 23(9), 6112-6119.
22. Li, X. H., Xu, Y., Yang, K., Shi, J. J., Zhang, X., Yang, F., ... & Yang, Z. (2015). Association of THADA, FOXP4, GPRC6A/RFX6 genes and 8q24 risk alleles with prostate cancer in Northern Chinese men. *Journal of BU ON.: Journal of B.U.ON.*, 20(5), 1223-1228.
23. Lindström, S., Schumacher, F. R., Campa, D., Albanes, D., Andriole, G., Berndt, S. I., ... & Kraft, P. (2012). Replication of Five Prostate Cancer Loci Identified in an Asian Population—Results from the NCI Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium (BPC3) Association of Prostate Cancer Loci across Ethnicities. *CEBP*, 21(1), 212-216.