

بررسی تغییرات متیلاسیون ژن‌های CTNNB1 و GPRASP1 در مسیر سیگنالینگ اینترلوکین‌های ۴ و ۱۳ به عنوان نشانگرهای مقاومت به پرتودرمانی در DNA آزاد سلولی سرم بیماران مبتلا به سرطان رکتوم غیرمتاستاتیک: یک مطالعه بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی

سید محمد السادات اشکوری^۱، زهرا باقری حسین آبادی^۲، سولماز خلیق فرد^۳، مهدی محمودی^۴، علی محمد علیزاده^۵

دریافت مقاله: ۱۴۰۵/۰۷/۰۴ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۱۴۰۵/۰۹/۰۵ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۱۴۰۵/۰۳/۲۵ پذیرش مقاله: ۱۴۰۵/۰۳/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: التهاب و تغییرات اپیژنتیک از عوامل اصلی در ایجاد سرطان رکتوم محسوب می‌شوند. هدف از مطالعه حاضر تعیین تغییرات متیلاسیون ژن‌های CTNNB1 و GPRASP1 در مسیر سیگنالینگ اینترلوکین‌های ۴ و ۱۳ در سرم بیماران مبتلا به سرطان رکتوم غیرمتاستاتیک می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه نیمه تجربی، ابتدا با استفاده از پایگاه‌های داده GO، UALCAN و DNMIIVD، تحلیل بیوانفورماتیکی برای شناسایی مسیرهای پیام‌رسانی ژن‌های هدف انجام شد. سپس، نمونه خون از ۴۳ بیمار مبتلا به سرطان رکتوم (قبل و بعد از پرتودرمانی) و ۱۰ فرد سالم دریافت گردید. تغییرات متیلاسیون ژن‌های CTNNB1 و GPRASP1 با روش PCR اختصاصی متیلاسیون و سطح سرمی اینترلوکین‌های ۴ و ۱۳ با روش الایزا اندازه‌گیری شد. داده‌های پارامتریک با آزمون t مستقل و داده‌های غیرپارامتریک با آزمون Mann-Whitney تحلیل شدند.

یافته‌ها: در بررسی بیوانفورماتیکی، ژن CTNNB1 به عنوان ژن هیپومتیله (با بیان بالا) و GPRASP1 به عنوان ژن هیپرمتیله (با بیان پایین) شناسایی شدند. پس از پرتودرمانی، افزایش متیلاسیون ژن CTNNB1 منجر به کاهش معنی‌دار بیان آن و در مقابل، کاهش متیلاسیون ژن GPRASP1 سبب افزایش معنی‌دار بیان آن گردید ($P < 0.05$). همچنین، سطح سرمی اینترلوکین ۱۳ کاهش معنی‌دار و سطح سرمی اینترلوکین ۴ افزایش معنی‌داری پس از پرتودرمانی نسبت به قبل از آن نشان داد ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پرتودرمانی با ایجاد تغییرات در متیلاسیون DNA همراه با تغییرات سطح سرمی اینترلوکین‌های ۴ و ۱۳، می‌تواند به عنوان یک الگوی مؤثر برای مانیتورینگ پاسخ به درمان در بیماران مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: سرطان رکتوم، DNA آزاد سلولی، متیلاسیون DNA، پرتودرمانی، اینترلوکین ۴، اینترلوکین ۱۳

ارجاع: اشکوری س.م.س، باقری حسین آبادی ز، خلیق فرد س، محمودی م، علیزاده م.ع. بررسی تغییرات متیلاسیون ژن‌های CTNNB1 و GPRASP1 در مسیر سیگنالینگ اینترلوکین‌های ۴ و ۱۳ به عنوان نشانگرهای مقاومت به پرتودرمانی در DNA آزاد سلولی سرم بیماران مبتلا به سرطان رکتوم غیرمتاستاتیک: یک مطالعه بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی. سال ۱۴۰۵، دوره ۲۵، شماره ۴، صفحات: ۴۳۲-۴۱۳.

۱- مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، پژوهشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.

۲- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

۳- پژوهشگاه توسعه فناوری‌های پیشرفته، تهران، ایران

۴- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۵- (نویسنده مسئول) مرکز تحقیقات سرطان، پژوهشکده سرطان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تلفن: ۰۱۱۹۲۵۰۱-۲۱، پست الکترونیکی: aalizadeh@sina.tums.ac.ir

مقدمه

سرطان کولورکتال (Colorectal cancer) سومین سرطان شایع و دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان محسوب می‌شود (۱). در ایران، سرطان کولورکتال نیز از جمله سرطان‌های شایع بوده و میزان بروز آن در سال‌های اخیر روند صعودی داشته است (۲). سرطان رکتوم (Rectal cancer) که زیرگروهی از سرطان کولورکتال است، به دلیل موقعیت آناتومیکی خاص و رویکردهای درمانی متفاوت، از اهمیت بالینی ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. درمان نئوادجوانت (Neoadjuvant therapy) شامل رادیو-کموترپی قبل از جراحی، به عنوان استاندارد طلایی درمان سرطان رکتوم موضعی پیشرفته (مراحل ۲ و ۳) مطرح است (۳). با این حال، پاسخ به پرتودرمانی در بیماران متفاوت بوده و برخی از بیماران مقاومت به پرتو (Radio-resistance) نشان می‌دهند که منجر به پیامدهای بالینی نامطلوب می‌شود (۴). از این رو، شناسایی نشانگرهای زیستی (Biomarkers) پیش‌بینی‌کننده پاسخ به پرتودرمانی، از اهمیت بالایی در مدیریت درمانی این بیماران برخوردار است (۵).

التهاب مزمن و تغییرات اپی‌ژنتیک (Epigenetic changes) از جمله عوامل کلیدی در ایجاد و پیشرفت سرطان رکتوم محسوب می‌شوند (۶). برخلاف تغییرات ژنتیکی، تغییرات اپی‌ژنتیک برگشت‌پذیر بوده و شامل مکانیسم‌هایی مانند متیلاسیون DNA، تغییرات هیستونی و RNAهای غیرکدکننده می‌باشند (۷). متیلاسیون DNA، شایع‌ترین مکانیسم اپی‌ژنتیک در پستانداران است که در ناحیه پروموتور ژن‌ها رخ داده و منجر به خاموشی یا فعال‌سازی بیان ژن می‌گردد (۸). در سلول‌های سرطانی، الگوی متیلاسیون DNA به‌طور قابل‌توجهی دچار اختلال می‌شود؛ به گونه‌ای که هیپومتیلاسیون (Hypomethylation) منجر به

فعال‌سازی پروتوآنکوژن‌ها و هیپرمتیلاسیون (Hypermethylation) منجر به خاموشی ژن‌های سرکوبگر تومور می‌گردد (۹). مطالعات نشان داده‌اند که پرتودرمانی می‌تواند الگوی متیلاسیون DNA را تغییر داده و از این طریق، بر پاسخ سلول‌های توموری به تابش تأثیر بگذارد (۱۰، ۱۱).

از سوی دیگر، سیستم ایمنی و پاسخ‌های التهابی نقش مهمی در پاسخ به پرتودرمانی ایفاء می‌کنند (۱۲). پرتوهای یونیزان با فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ متعدد و القاء پاسخ‌های التهابی، باعث تغییر در سطح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی می‌شوند. اینترلوکین ۴ (Interleukins 4; IL-4) و اینترلوکین ۱۳ (Interleukins 13; IL-13) از جمله سایتوکاین‌های ضدالتهابی هستند که توسط سلول‌های Th2 ترشح‌شده و نقش کلیدی در تنظیم پاسخ‌های ایمنی، التهاب، تکثیر سلولی، متاستاز و بقاء سلول‌های سرطانی ایفاء می‌کنند (۱۳). با توجه به اشتراک در گیرنده و مسیر سیگنالینگ پایین‌دستی (Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription 6; JAK/STAT6) IL-4 و IL-13 اغلب عملکردهای هم‌پوشانی دارند و می‌توانند در پاتوژنز سرطان کولورکتال نقش داشته باشند (۱۴).

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که سطح سرمی IL-4 و IL-13 در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در مقایسه با افراد سالم تغییر می‌یابد (۱۵-۱۷). با این حال، نتایج مطالعات در این زمینه متناقض بوده و به عوامل متعددی مانند مرحله بیماری، متاستاز و روش‌های اندازه‌گیری بستگی دارد (۱۸). هم‌چنین، برخی مطالعات به نقش ژن‌های CTNNB1 و GPRASP1 در مسیر سیگنالینگ اینترلوکین‌ها و ارتباط آن‌ها با مقاومت به پرتودرمانی اشاره کرده‌اند. ژن CTNNB1 (کدکننده پروتئین بتا-کاتنین) یکی از اجزای کلیدی مسیر سیگنالینگ WNT بوده و افزایش بیان آن

با مقاومت به پرتودرمانی و پیش‌آگهی ضعیف در بیماران مبتلا به سرطان رکتوم همراه است (۱۹، ۲۰). در مقابل، ژن *GPRASP1* (کدکننده پروتئین مرتبط با گیرنده G پروتئینی) به عنوان یک ژن سرکوب‌گر تومور شناخته شده است که هیپرمتیلاسیون آن منجر به کاهش بیان و افزایش تهاجم سلولی می‌گردد (۲۱). با وجود این شواهد، تاکنون مطالعه جامعی که هم‌زمان به بررسی تغییرات متیلاسیون این دو ژن و سطح سرمی IL-4 و IL-13 در پاسخ به پرتودرمانی بپردازد، در بیماران مبتلا به سرطان رکتوم غیرمتاستاتیک انجام نشده است. با توجه به مطالب فوق، هدف از مطالعه حاضر، تعیین تغییرات متیلاسیون ژن‌های *CTNNB1* و *GPRASP1* در مسیر سیگنالینگ اینترلوکین‌های ۴ و ۱۳ و ارزیابی سطح سرمی این سایتوکاین‌ها به عنوان نشانگرهای زیستی مقاومت به پرتودرمانی در DNA آزاد سلولی سرم بیماران مبتلا به سرطان رکتوم غیرمتاستاتیک قبل و بعد از پرتودرمانی بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر طی دو مرحله بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی در فواصل شهریورماه سال ۱۳۹۹ تا اردیبهشت ماه سال ۱۴۰۱، در بیمارستان امام خمینی(ره) وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران پس از اخذ کدهای اخلاق (IR.TUMS.IKHC.REC.1399.320) و (IR.RUMS.REC.1399.261) انجام گرفت. مرحله اول پژوهش، بررسی بیوانفورماتیکی داده‌های بیانی و متیلاسیون DNA و سنجش کیفیت داده‌های میکروآرای بود. برای این منظور، پروفایل بیانی ژن با کد دسترسی GSE68204 و پروفایل تغییرات متیلاسیون DNA با کد دسترسی GSE75548 در افراد مبتلا به سرطان رکتوم و افراد سالم، از پایگاه GEO که در کل اطلاعات

مربوط به مقایسه بین ۷۵ فرد مبتلا به سرطان رکتوم و ۲۷ فرد سالم بود، جمع‌آوری شد.

ابزار GEO2R، برای تشخیص ژن‌های دیفرانسیل در مجموعه داده‌های انتخاب شده با استفاده از بسته‌های نرم‌افزار GEOQuery 2.23.2 و limma R 3.10.1 از پروژه Bioconductor، استفاده شد. GEO2R، برای ارزیابی چهار مجموعه داده GEO، استفاده گردید و ژن‌های بیان شده متفاوت (DEGs) در مجموعه داده‌ها با $P < 0.05$ و $\log FC \geq 1$ ، شناسایی شدند. سپس، ژن‌های همپوشانی از GEO و TCGA با استفاده از نرم‌افزار FunRich 3.1.3 (<http://www.funrich.org>)، شناسایی شدند. در نهایت، DEGها در بیماران مبتلا به سرطان رکتوم به عنوان ژن هاب شناسایی گردید.

تجزیه و تحلیل GO با استفاده از ابزار ClueGo در نرم‌افزار Cytoscape 3.6.1 انجام شد. مسیرهای سیگنال‌دهی نیز با استفاده از پایگاه داده REACTOME و WikiPathway شناسایی شدند (۲۲). سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد (۲۳). در ادامه، شبکه PPI با استفاده از ابزار جستجو برای نرم‌افزار بازیابی ژن‌های متقابل (STRING) (<https://string-db.org>)، ساخته شد. علاوه بر این، ژن‌های هاب با استفاده از برنامه Molecular Complex Detection (MoiceE) در نرم‌افزار Cytoscape 3.7.1 (<http://www.cytoscape.org>)، شناسایی شدند. امتیاز MCODE گره < 3 ، نود < 4 و درجه < 25 به عنوان معیارهای برش برای شناسایی ماژول، پذیرفته شد (۲۴).

پایگاه (UALCAN) با آدرس <http://ualcan.path.uab.edu> برای دسترسی به داده‌های رونویسی سرطان (TCGA and MET500 transcriptome sequencing)، طراحی شد. برای مقایسه سطح بیان هاب‌ژن‌ها در بافت طبیعی و تومور کولورکتال،

از این پایگاه استفاده شد (۲۵). برای تعیین اختلاف متیلاسیون DNA در نمونه‌های توموری و سالم و همچنین همسان‌سازی از پایگاه DNMIIVD با آدرس <http://www.unimd.org/dnmivd> استفاده شد. برای تعیین و ارتباط بین بقاء و هاب‌ژن‌های منتخب، از پایگاه اطلاعاتی Kaplan Meier-Plotter استفاده شد که نمودار بقاء، نسبت خطر و log-rank P را محاسبه می‌کند. ضریب نسبی ۵۰ درصد فوقانی به عنوان گروه پرخطر و ۵۰ درصد پایین‌تر به عنوان گروه کم خطر تعریف گردید (۲۴).

مرحله دوم مطالعه، بررسی تغییرات متیلاسیون DNA و سطح سرمی اینترلوکین‌های ۴ و ۱۳ در جامعه مورد مطالعه بوده است. این مطالعه بر روی ۴۳ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال غیرمتاستاتیک، در بیمارستان امام خمینی (ره) وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران، قبل و بعد از پرتودرمانی انجام شد. همچنین، در این مطالعه به منظور مقایسه میزان بیان هاب‌ژن‌ها و اینترلوکین‌های منتخب با بیماران، ۱۰ فرد سالم نیز به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. در این مطالعه افراد گروه سالم از نظر جنسیت و سن با گروه بیمار همسان‌سازی شدند و از بستگان درجه اول بیمار نبودند. برطبق سابقه بالینی و آزمایشات فیزیکی، همه افراد مورد مطالعه (گروه بیمار و سالم) باید معیارهای ورود به مطالعه را دارا بودند.

در این پژوهش تمامی بیماران با محدوده سنی ۷۰-۳۰ سال پس از تشخیص و تأیید ابتلاء به سرطان کولورکتال غیرمتاستاتیک در مرحله ۲ و ۳ از بیماری و کاندید به درمان نئوادجوانت بودند، به‌طور داوطلب در پژوهش شرکت نمودند. همچنین عدم سابقه خانوادگی سرطان کولون، عدم ابتلاء به سایر سرطان‌ها، نقص ایمنی ایدز و هیپاتیت، عدم مصرف داروی خاص، مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی، الکل، سیگار و مواد مخدر نیز از معیارهای دیگر

برای انتخاب بیماران در این مطالعه بود. لازم به ذکر است، گروه سالم به‌جزء ابتلاء به سرطان کولورکتال غیرمتاستاتیک، کلیه معیارهای ورود به مطالعه را مشابه گروه بیماران دارا بودند. در صورت مشاهده عدم رضایت به ادامه مطالعه، ناکافی بودن حجم خون، همولیز یا لیپمیک بودن نمونه‌ها و ناکافی بودن غلظت RNA استخراج شده از پلاسما بیمار از مطالعه خارج شد.

در ادامه، از همه افراد شرکت‌کننده در مطالعه فرم کتبی رضایت آگاهانه اخذ شد. همچنین، اطلاعات دموگرافیک، بالینی و مشخصات پاتولوژیک با مراجعه به پرونده بیماران جمع‌آوری و در چک‌لیست ثبت شد. در این پژوهش از گروه بیمار دو نوبت قبل و بعد از پرتودرمانی، خون‌گیری به‌عمل آمد. نحوه خون‌گیری از افراد مورد مطالعه به این صورت بود که مقدار ۱۰ میلی‌لیتر خون وریدی از بیماران و افراد سالم توسط پرستار کارآزموده، گرفته شد که ۵ میلی‌لیتر خون وریدی به صورت غیر لخته و در لوله‌های حاوی ضدانعقاد EDTA ریخته شد. پلاسما بعد از سانتریفیوژ (مدل Hettich، آلمان) (۲۵۰۰ دور در دقیقه) تا زمان انجام متیلاسیون در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد، نگهداری شد. ۵ میلی‌لیتر باقی مانده از خون به لوله پلی‌اتیلن ژل‌دار منتقل و جهت جداسازی سرم سانتریفیوژ شد (به مدت ۷ دقیقه با ۲۵۰۰ دور در دقیقه). سپس نمونه‌های سرمی جهت بررسی اینترلوکین‌ها، در میکروتیوب استریل در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگه‌داری شدند. لازم به ذکر است، با توجه به رژیم استاندارد ۵۰ گری منقسم به ۲۵ جلسه به مدت ۵ هفته، هفته‌ای ۵ جلسه، زمان اخذ خون محیطی، بعد از اتمام ۲۵ جلسه پرتودرمانی بیماران بود (۲۴).

بررسی سطح اینترلوکین‌های ۱۳ (مطابق با دستورالعمل کیت MBS250362, Human IL-13 ELISA Kit با محدوده حساسیت

۱۰۰۰-۶۲۵/۱۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) و اینترلوکین ۴ (مطابق با دستورالعمل کیت MBS2020632, Human IL-4 ELISA Kit با محدوده حساسیت ۱۵/۶۲۵-۱۰۰۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) توسط تکنیک الایزا (ELISA)، انجام گرفت. مراحل کار به صورت زیر بود: بعد از خارج نمودن نمونه‌های سرم از فریزر و رسیدن دمای آن‌ها به دمای محیط، در ابتدا استانداردها در رقت‌های (۰، ۱۵/۶، ۳۱/۲، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر)، آماده شد. سپس، در چاهک‌های نمونه ۴۰ میکرو لیتر از محلول نمونه و در چاهک‌های استاندارد ۵۰ میکرو لیتر استاندارد آماده شده به صورت دو بار تکرار در دو حفره مجاور، اضافه گردید. بعد از ۲ ساعت انکوباسیون (مدل Memmert، آلمان) پلیت‌ها در دمای آزمایشگاه و شستشوی حفرات، ۱۰ میکرو لیتر آنتی‌بادی بیوتینیل‌ه به هر یک از حفرات پلیت افزوده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و پلیت برای ۵ بار، شستشو شد. در ادامه محلول HRP (Horseradish peroxidase) به منظور اتصال به آنتی‌بادی بیوتینیل‌ه شده، در حجمی معادل ۱۰۰ میکرو لیتر به هر یک از حفرات پلیت، اضافه گردید. بعد از انکوباسیون به مدت ۹۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه و شستشوی مجدد، سپس ۵۰ میکرو لیتر از محلول سوبسترای HRP به درون هر چاهک اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، انکوبه شد. پس از اضافه کردن محلول متوقف کننده، میزان جذب (Optical Density) هر چاهک از پلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر با الایزاریدر (BioTek ELX800 Microplate reader)، خوانده شد (۱۶).

استخراج DNA آزاد سلولی (cell-free DNA; cfDNA) طبق دستورالعمل کیت Qiaamp MinElute ccfDNA انجام شد. قبل از شروع استخراج DNA آزاد سلولی از ۵ میلی‌لیتر پلاسما، ابتدا

دمای نمونه‌ها و محلول‌ها به دمای اتاق رسانده شد. بافرهای غلیظ ACB و ACW1 (برای تنظیم شرایط برای اتصال بهینه اسیدهای نوکلئیک در گردش به غشاء به ماده اولیه) طبق پروتکل کیت با الکل، رقیق شدند (۲۶) و به همراه ۵۰۰ میکرو لیتر پروتئیناز K (برای جلوگیری از تخریب DNA)، به لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری افزوده شد. سپس مواد اولیه به یک ستون QIAamp UCP MinElute منتقل و DNA در حال گردش روی غشاء سیلیسی جذب می‌شود، شرایط نمک و pH تضمین می‌کند که پروتئین‌ها و سایر آلاینده‌ها که می‌توانند PCR و دیگر واکنش‌های آنزیمی پایین‌دست را مهار کنند، روی غشاء QIAamp MinElute باقی نمی‌مانند. در ادامه ۴ میلی‌لیتر از بافر لیزکننده ACL به فالکون افزوده و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس و پس از به دست آمدن محلول لیز همگن، به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، ۹ میلی‌لیتر بافر ACB به محلول لیز شده افزوده و به مدت ۱۵-۳۰ ثانیه ورتکس و به مدت ۵ دقیقه لوله فالکون روی یخ قرار داده شد. در ادامه محلول رویی به ستون میکروتیوب‌های استخراج، اضافه شد. سپس به ستون میکروتیوب‌ها ۶۰۰ میکرو لیتر بافر شستشو دهنده ACW1، اضافه شد. در ادامه، ۷۵۰ میکرو لیتر بافر شستشو دهنده ACW2 به ستون میکروتیوب‌ها افزوده شد. در ادامه ۷۵۰ میکرو لیتر اتانول جهت شستشو به ستون میکروتیوب‌ها اضافه شد و با دور ۲۰۰۰ g به مدت سه دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، ستون میکروتیوب‌ها را به لوله‌های ۲ میلی‌لیتری انتقال داده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در انتها ۴۰ تا ۶۰ میکرو لیتر بافر شستشوی AVE، (RNAase free) به مرکز غشاء ستون انتقال داده شد. بعد از ۳ دقیقه انکوباسیون به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ g برای تخلیص اسیدهای نوکلئیک ستون‌ها سانتریفیوژ شدند (۲۴).

شد. در ادامه، ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو دهنده AW₂ برای حذف آلودگی از DNA به ستون اضافه و به مدت ۳ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شد و برای خارج کردن اتانول در دور rpm ۱۴۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفوژ شد. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر بافر شستشو AE برای جداسازی DNA از غشاء ستون اضافه شد و یک دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس در دور rpm ۸۰۰۰ سانتریفوژ گردید. در انتها، DNA استخراج شده در ۲۰- درجه سانتی گراد برای انجام PCR ذخیره شد (۲۴).

از کیت تیمار بی سولفیت شرکت کیاژن (EpiTect Bisulfite Kits, Cat No./ID: 59104 Germany) طبق پروتکل بی سولفیت شده حاصل شد و در ادامه، جهت شناسایی تغییرات متیلاسیون با روش MSP ارزیابی گردید. برای طراحی پرایمرهایی با محتوای CpG بالا در ژن های کاندید از MethPrimer ([http://www.Urogene.org/cgi-](http://www.Urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi)

bin/methprimer/methprimer.cgi) استفاده شد (جدول ۱) (۲۷). cfDNA تیمار شده با بی سولفیت با استفاده از MSP و پرایمرهای خاص متیله یا غیر متیله، تکثیر شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد ارزیابی شدند (۲۴).

مراحل استخراج DNA از نمونه های DNA آزاد سلولی، به شرح زیر بود: با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی شرکت کیاژن (QIAampminiki, DNA Purification from fresh Qiagen) (frozen tissue)، طبق پروتکل کیت، اجراء شد. برای این منظور ابتدا ۱۸۰ میکرولیتر بافر ATL (حاوی دترجنت آنیونی SDS و گوانیدینیوم کلرید به منظور پاره شدن غشاء سلول) و ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K به تیوب حاوی DNA آزاد سلولی افزوده شد. بعد از ورتکس کردن به مدت ۳ تا ۴ ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد به منظور لیز شدن کامل سلول انکوبه شد. در ادامه ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده برای دناتوره کردن پروتئین ها و غیر فعال کردن نوکلئازها به تیوب اضافه گردید. پس از ورتکس کردن، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد برای شستشو به تیوب اضافه و ورتکس شد. محلول حاصل، به درون ستون های موجود در کیت انتقال داده شد. این ستون همراه با تیوب خود در دور rpm ۸۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفوژ شد. در ادامه، ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو دهنده AW₁ برای حذف آلودگی از DNA به ستون اضافه و به مدت ۳ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای واکنش زنجیره های پلیمرز خاص متیلاسیون

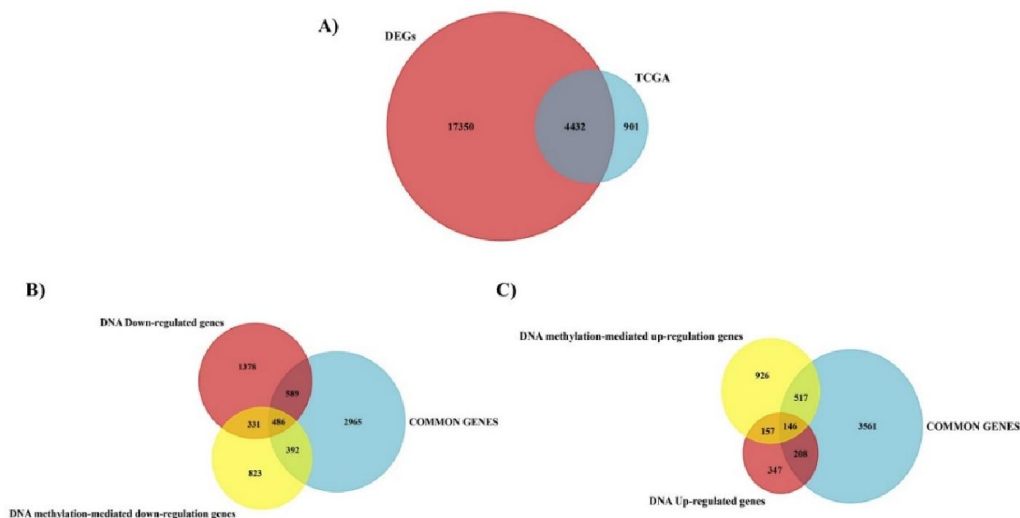
نام ژن	توالی نوکلئوتیدی	Tm °C	طول توالی محصول (bp)	منبع
GPRASP1	Methylation	55.2	139	طراحی شده در
		55.2		
	UNMethylation	52.3	141	این تحقیق
		53		
CTNNB1	Methylation	57.3	130	طراحی شده در
		56.2		
	UNMethylation	53.8	131	این تحقیق
		55.4		

استفاده شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

مجموعه داده‌های GEO و TCGA برای شناسایی ژن‌های بیان شده متفاوت در سرطان رکتوم و نمونه‌های سالم مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نرم‌افزار FunRich 3.1.3 یک نمودار Venn ایجاد کرد و مجموعه داده‌های انتخابی رایج را استخراج کرد (شکل ۱A). ابتداء ۴۴۳۲ ژن مشترک بین کدهای GSE (DEGs) برای شناسایی شده از بیان ژن‌ها و DMGs (تغییرات متیلاسیون) پایگاه اطلاعاتی GEO و TCGA، به‌دست آمد. در ادامه ۱۴۶ ژن با بیان بالا و ۴۸۶ ژن با بیان پایین در مقایسه بین DMGs، DEGs و ژن‌های مشترک مجموعه داده‌ها یافت شد که به‌صورت Venn diagram، ترسیم گردید (شکل ۱B، ۱C).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. ابتداء، نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov بررسی شد. داده‌های کمی به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین گزارش گردیدند. برای مقایسه‌های بین دو گروه مستقل (گروه بیماران قبل از پرتودرمانی در مقایسه با گروه کنترل سالم)، در صورت نرمال بودن توزیع داده‌ها، از آزمون t مستقل و در صورت عدم نرمال بودن توزیع داده‌ها، از آزمون ناپارامتریک Mann-Whitney استفاده شد. برای مقایسه‌های زوجی (گروه بیماران قبل و بعد از پرتودرمانی)، در صورت نرمال بودن توزیع داده‌ها، از آزمون t زوجی و در صورت عدم نرمال بودن توزیع داده‌ها، از آزمون ناپارامتریک Wilcoxon استفاده گردید. هم‌چنین، برای مقایسه فراوانی داده‌های کیفی (مانند وضعیت متیلاسیون ژن‌ها در گروه‌های مختلف)، از آزمون مجذور کای و یا آزمون دقیق فیشر



شکل ۱- ترسیم نمودار Venn از داده‌های میکروآرای منتخب مشترک برای هاب A) مقایسه بین ژن‌ها با اختلاف بیان معنی‌دار با داده‌های TCGA، B) مقایسه بین میکروآرای منتخب برای ژن‌ها و DNA متیلاسیون با بیان پایین با ژن‌های مشترک، C) مقایسه بین میکروآرای منتخب برای ژن‌ها و DNA متیلاسیون با بیان بالا با ژن‌های مشترک. DEGs (Differentially expressed genes)، DMGs (Differentially methylated genes).

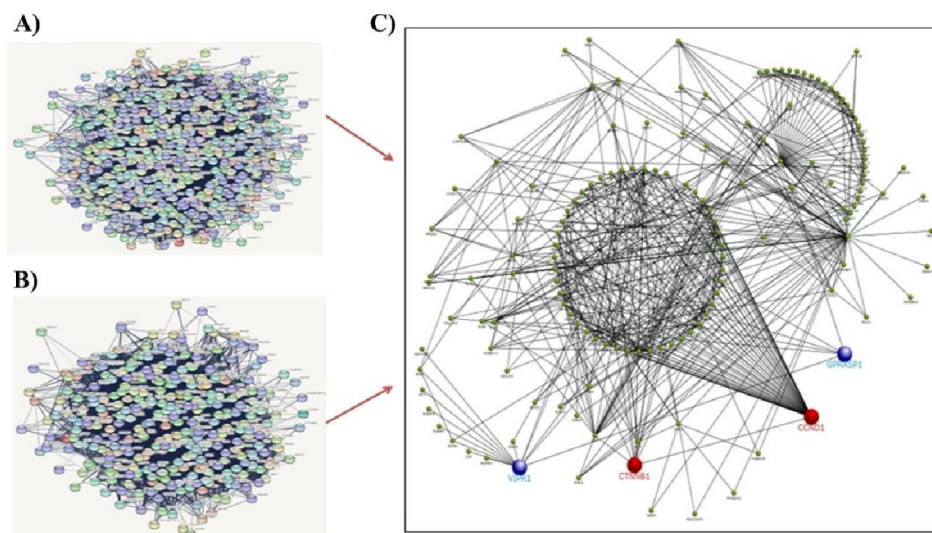
پس از تعیین ۱۴۶ ژن با بیان بالا و ۴۸۶ ژن با بیان پایین، پرداخته شد. پنج مسیر تاپ هر کدام از گروه‌های فرآیند بیولوژیکی برای شناخت نقش آن‌ها در بیماری‌زایی سرطان رکتوم، به (BP)، مؤلفه سلولی (CC)، عملکرد مولکولی (MF) در جدول ۲ شناسایی هستی‌شناسی ژن‌ها و مسیرهای پیام‌رسانی آن‌ها، آورده شده است.

جدول ۲- تجزیه و تحلیل غنی‌سازی عملکردی هستی‌شناسی از ژن‌های هیپومتیله شده و هیپرمتیله شده با اختلاف بیان معنی‌دار

Category	GO Analysis	Term	FDR
Hypomethylation	GOTERM_BP_DIRECT	cellular nitrogen compound metabolic process (GO:0034641)	5.54E-36
		nucleic acid metabolic process (GO:0090304)	2.07E-34
		nucleobase-containing compound metabolic process (GO:0006139)	4.40E-34
		heterocycle metabolic process (GO:0046483)	1.88E-31
		cellular aromatic compound metabolic process (GO:0006725)	3.68E-31
	GOTERM_CC_DIRECT	membrane-enclosed lumen (GO:0031974)	8.28E-49
		intracellular organelle lumen (GO:0070013)	1.24E-48
		organelle lumen (GO:0043233)	2.48E-48
		intracellular anatomical structure (GO:0005622)	1.79E-38
		intracellular organelle (GO:0043229)	1.88E-38
Hypermethylation	GOTERM_MF_DIRECT	RNA binding (GO:0003723)	7.92E-37
		binding (GO:0005488)	1.04E-31
		protein binding (GO:0005515)	3.28E-30
		nucleic acid binding (GO:0003676)	4.60E-24
		Unclassified (UNCLASSIFIED)	1.03E-21
	GOTERM_BP_DIRECT	detection of chemical stimulus involved in sensory perception of smell (GO:0050911)	4.47E-40
		detection of chemical stimulus involved in sensory perception (GO:0050907)	4.57E-40
		sensory perception of smell (GO:0007608)	9.16E-39
		detection of chemical stimulus (GO:0009593)	5.74E-38
		sensory perception of chemical stimulus (GO:0007606)	5.43E-37
	GOTERM_CC_DIRECT	protein-containing complex (GO:0032991)	3.23E-29
		nucleus (GO:0005634)	1.11E-28
		intracellular membrane-bounded organelle (GO:0043231)	7.23E-27
		nuclear lumen (GO:0031981)	3.18E-25
		intracellular organelle (GO:0043229)	1.16E-24
	GOTERM_MF_DIRECT	RNA binding (GO:0003723)	9.15E-14
		G protein-coupled receptor activity (GO:0004930)	5.76E-35
		transmembrane signaling receptor activity (GO:0004888)	1.47E-30
		signaling receptor activity (GO:0038023)	1.03E-28
		molecular transducer activity (GO:0060089)	1.29E-28

(شکل ۲). هاب‌ژن‌ها با توجه به برش، نمره $Mocke > 3$ و تعداد گره‌ها < 4 و معیارهای قطع درجه < 25 در طی تجزیه و تحلیل شبکه‌های با بیان بالا و بیان پایین، مشخص گردید.

شبکه بازخورد پروتئین-پروتئین توسط بانک اطلاعاتی String و نرم‌افزار FunRich نسخه 3.3.3، ترسیم گردید. رنگ مختلف گره‌ها، برای موقعیت‌ها و استحکام پروتئین-پروتئین بوده است



شکل ۲- تهیه شبکه تعاملی پروتئین-پروتئین به وسیله نرم‌افزارهای *Funrich* و *STRING*. (A)، هاب‌ژن‌ها با بیان بالا (C)، بازخورد متقابل بین هاب‌ژن‌های بیان پایین (دایره آبی) و بیان بالا (دایره قرمز).

همچنین، در میان مسیرهای به دست آمده از پایگاه‌های اطلاعاتی *REACTOME* و *WIKI*، هاب‌ژن‌های با بیان بالا و پایین جدول ۳ آورده شده‌اند.

جدول ۳- تجزیه و تحلیل هاب‌ژن‌ها با اختلاف بیان معنی‌دار در مسیرهای انتقال پیام با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی *WIKI* و *REACTOME*

مقدار P	مسیرهای سیگنال‌دهی
$1.27e^{-06}$	سیستم ایمنی
$3.85e^{-15}$	چرخه سلولی
$2.35e^{-15}$	چرخه تقسیم میتوزی
$8.83e^{-09}$	مسیرهای پیام‌رسانی سایتوکاین‌ها در سیستم ایمنی
$4.47e^{-10}$	مسیرهای سیگنالینگ اینترلوکین
$1.13e^{-03}$	سیستم ایمنی ذاتی
$2.32e^{-03}$	سیستم ایمنی اکتسابی
$1.80e^{-08}$	سایر سیگنال‌دهی‌های میانجی‌گری شده توسط اینترلوکین
$1.12e^{-03}$	نقاط بازرسی چرخه سلولی
$2.78e^{-05}$	سیگنال‌دهی مسیر <i>Notch1</i> در سرطان
$3.28e^{-04}$	سیگنال‌دهی اینترلوکین ۴ و اینترلوکین ۱۳
$6.27e^{-05}$	سیگنال‌دهی توسط مسیر <i>Notch1</i>

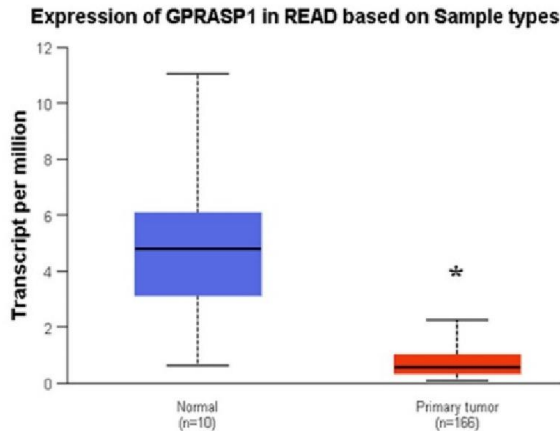
غیرمتاستاتیک اختلاف بیان قابل توجهی در مقایسه با بافت نرمال داشتند. در نهایت، هاب‌ژن *CTNNB1* و *GPRASP1* از پایگاه داده GSE، شناسایی گردید ($P < 0.05$) (شکل ۳). اعتبارسنجی بیان دو ژن در جدول ۴ آورده شده است.

لازم به ذکر است به منظور اعتبارسنجی وضعیت بیان چهار هاب ژن در سرطان رکتوم غیرمتاستاتیک در مقایسه با بافت نرمال رکتوم، از پایگاه داده *UALCAN* برای تأیید نتایج استفاده شد. هاب‌ژن‌های *CTNNB1* و *GPRASP1* در سرطان رکتوم

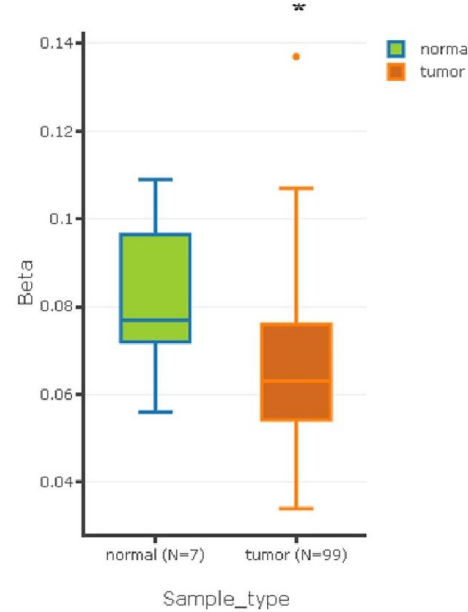
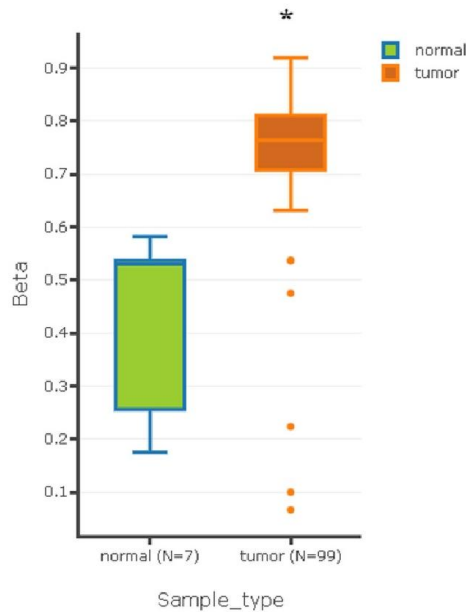
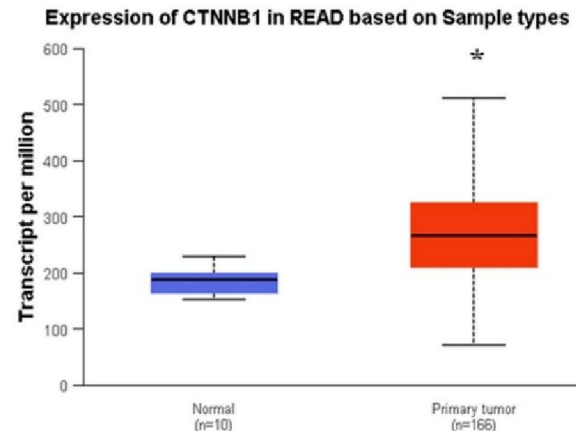
جدول ۴- اعتبارسنجی دو ژن با بیان پایین و بیان بالا توسط UALCAN

دسته‌بندی	هاب ژن	وضعیت بیان	مقدار P
هیپومتیلیسیون	CTNNB1	افزایش بیان	$7.53e^{-8}$
هایپرمتیلیسیون	GPRASP1	کاهش بیان	$3.52e^{-9}$

A)



B)



شکل ۴- اعتبارسنجی بیان دو هاب ژن با بیان بالا و بیان پایین در مجموعه داده TCGA از طریق پایگاه داده DNMIIVD. A. مربوط به بیان ژن GPRASP1 و B. مربوط به بیان ژن CTNNB1 در بافت‌های توموری در مقایسه با بافت سالم، می‌باشد. * $P < 0.05$ اختلاف معنی‌دار در مقایسه با کنترل

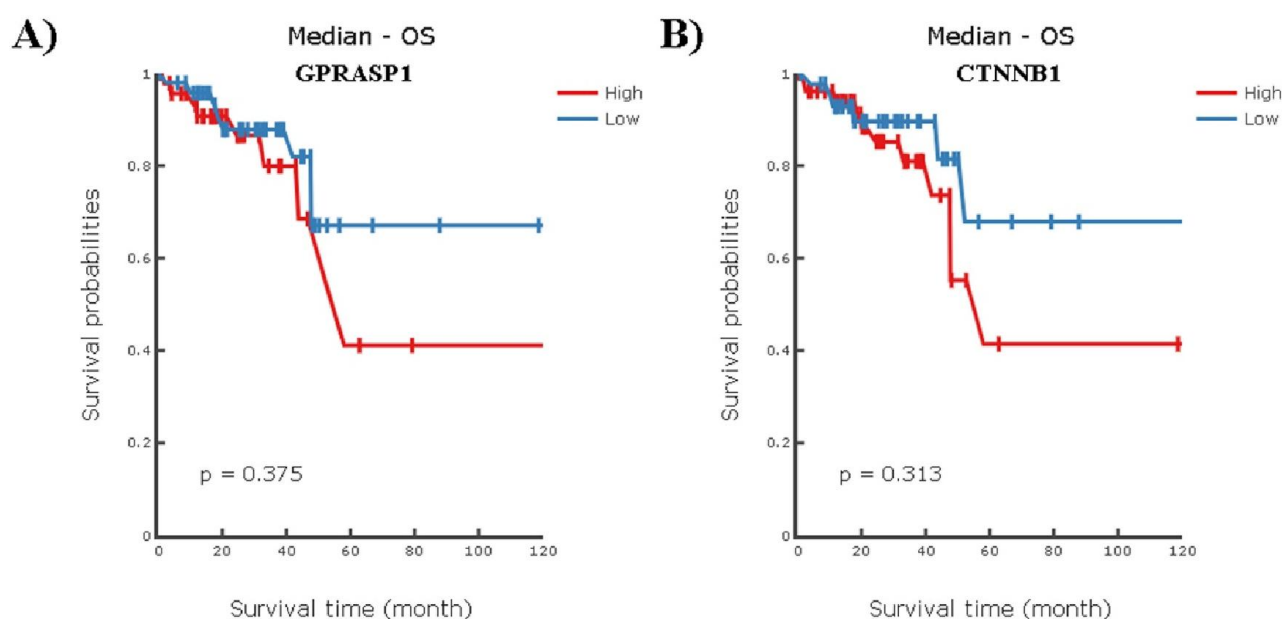
بین بافت‌های توموری در مقایسه با بافت نرمال رکتوم دارا می‌باشند (شکل ۴). اعتبارسنجی بیان دو هاب ژن‌ها به وسیله پایگاه DNMIIVD در جدول ۵ آورده شده است.

همچنین، وضعیت متیلیسیون DNA هاب ژن‌های منتخب در پایگاه داده DNMIIVD، تأیید گردید. نتایج مطالعه حاضر نشان داد هاب ژن‌های CTNNB1 و GPRASP1، اختلاف معنی‌داری در

در ادامه، ارزش پیش‌آگهی بیان متفاوت چهار هاب‌ژن در سرطان رکتوم، در بانک اطلاعاتی Kaplan-Meier-Plotter مورد جستجو قرار گرفت. افزایش بیان ژن *CTNNB1* به طور قابل‌توجهی با بقاء کلی ضعیف بیماران همراه بود. کاهش بیان ژن *GPRASP1* تأثیر معنی‌داری بر بقاء کلی ضعیف بیماران مبتلا به سرطان رکتوم نشان نداد (شکل ۵).

جدول ۵- اعتبارسنجی بیان پایین دو ژن هیپرمتیله شده و دو ژن هیپرمتیله شده به توسط DNMT3A

دسته‌بندی	هاب‌ژن	مقدار P
هیپومتیلاسیون	CTNNB1	$1.27e^{-10}$
هایپرمتیلاسیون	GPRASP1	$2.16e^{-08}$



شکل ۵- ارزیابی پیش‌آگهی هاب‌ژن‌های منتخب در سرطان رکتوم توسط پایگاه *Kaplan-Meier-plotter*. خط قرمز نشان‌دهنده بیان افزایش‌یافته ژن و خط آبی نشان‌دهنده بیان کاهش‌یافته ژن می‌باشد. (A) بقاء مربوط به ژن *GPRASP1* و (B) بقاء مربوط به ژن *CTNNB1*

پایه مانند جنسیت، قد، وزن، شاخص توده بدنی و مرحله تومور یافت نشد ($P > 0.05$).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری سطح سرمی اینترلوکین‌های ۴ و ۱۳، در گروه‌های مختلف در جدول ۷ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده، میانگین سطح سرمی اینترلوکین ۴ قبل از پرتودرمانی در بیماران مبتلا به سرطان رکتوم در مقایسه با افراد سالم، کاهش معنی‌داری نشان داد که این میزان بعد از

مشخصات دموگرافیک و بالینی افراد مورد مطالعه در جدول ۶ نشان داده شده است. در گروه بیماران، میانگین و انحراف معیار سن شرکت‌کنندگان 56.50 ± 8.50 سال که از این تعداد ۲۸ نفر مرد (59.7%) و ۱۵ نفر زن (40.3%) بودند. اکثر بیماران (۲۴ نفر) در مرحله سوم بیماری (55.8%) و بعد از آن ۱۹ نفر در مرحله دوم از بیماری (44.2%) بودند. اختلاف معنی‌داری بین گروه بیماران و افراد سالم با توجه به ویژگی‌های

پرتودرمانی در بیماران افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$). معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$), که این میزان بعد از پرتودرمانی در مقابل، میانگین سطح سرمی اینترلوکین ۱۳ قبل از پرتودرمانی در بیماران مبتلا به سرطان رکتوم در مقایسه با افراد سالم افزایش

جدول ۶- مشخصات دموگرافیک و بالینی افراد مورد مطالعه

متغیر	کنترل (تعداد=۱۰)	بیماران (تعداد=۴۳)	مقدار P
جنسیت			
مذکر	۶ (۶۰)	۲۸ (۵۹/۷)	-
مونث	۴ (۴۰)	۱۵ (۴۰/۳)	-
سن (سال)	-	-	-
وزن (کیلوگرم)	-	-	-
شاخص توده بدنی (کیلوگرم بر مترمربع)	-	-	-
مرحله تومور	-	-	-
۲	-	۱۹ (۴۴/۲)	-
۳	-	۲۴ (۵۵/۸)	-

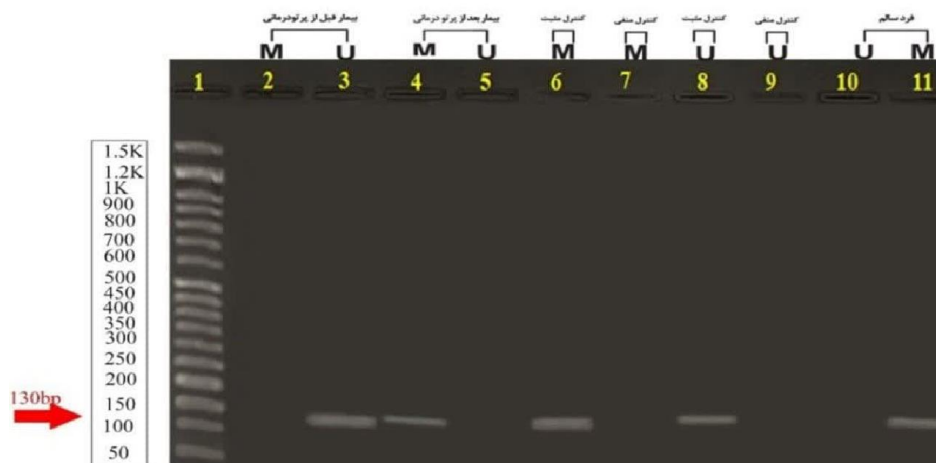
جدول ۷- نتایج الیزا اینترلوکین ۱۳ و ۴ در بیماران مبتلا به سرطان رکتوم قبل و بعد از پرتودرمانی و افراد سالم

متغیر	کنترل	بیماران قبل از پرتودرمانی	بیماران بعد از پرتودرمانی	مقدار P
اینترلوکین ۴ (پیکوگرم بر میلی‌لیتر)	۴/۴±۳۳/۸	۲/۷±۱۰/۰*	۳/۶±۳۶/۱#	$P < 0.05$
اینترلوکین ۱۳ (پیکوگرم بر میلی‌لیتر)	۱/۸±۱۶/۹	۴/۵±۳۵/۵*	۲/۵±۱۷/۳#	$P < 0.05$

داده‌ها در هر گروه به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. * آزمون زوجی، سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل، # آزمون تی زوجی، سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در مقایسه با گروه قبل از پرتودرمانی

CTNNB1 در سرطان رکتوم افزایش بیان معنی‌داری در مقایسه با فرد سالم دارد. در حالی که بعد از پرتودرمانی، این ژن متیله گردید و در نتیجه بیان آن کاهش یافت که نشان‌دهنده تأثیر پرتودرمانی بر ساختار اپی‌ژنتیکی این ژن می‌باشد.

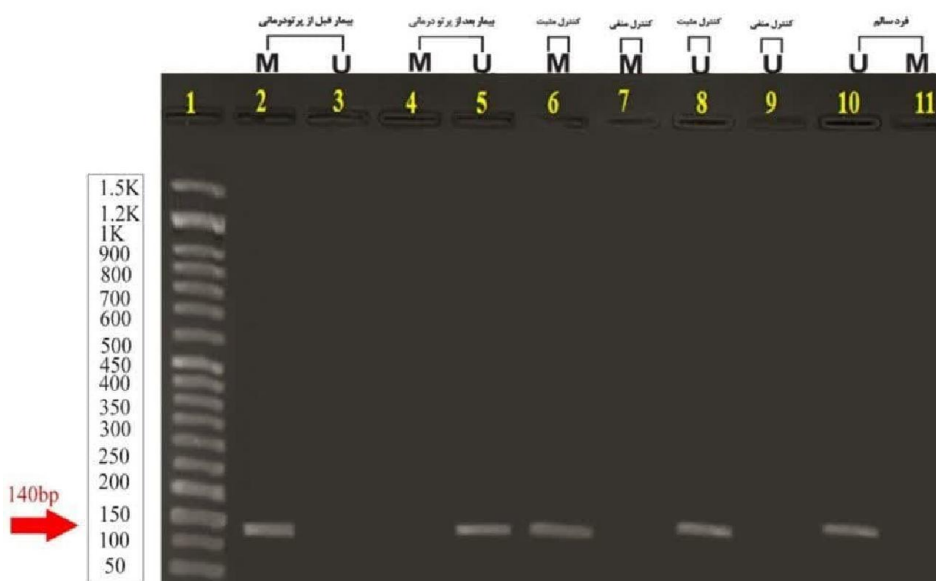
تغییرات متیلاسیون ژن CTNNB1، در نمونه پلاسمای بیمار مبتلا به سرطان رکتوم و فرد سالم، در شکل ۶ نشان داده شده است. نتایج نشان داد ژن CTNNB1 در افراد مبتلا به سرطان رکتوم قبل از پرتودرمانی غیرمتیله و در افراد سالم متیله است. این موضوع دلالت بر این نکته دارد که قبل از پرتودرمانی بیان ژن



شکل ۶- بررسی متیلاسیون ژن *CTNNB1* با روش MSP و آغازگر اختصاصی حالت متیله و غیر متیله ژن *CTNNB1* در پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان رکتوم و پلاسمای افراد سالم روی ژل آگارز ۲ درصد. چاهک ۱- مارکر، چاهک ۲- نمونه پلاسمای بیمار قبل از پرتودرمانی برای پروموتور ژن *CTNNB1* متیله، چاهک ۳- نمونه پلاسمای بیمار قبل از پرتودرمانی برای پروموتور ژن *CTNNB1* غیر متیله، چاهک ۴- نمونه پلاسمای بیمار بعد از پرتودرمانی برای پروموتور ژن *CTNNB1* غیر متیله، چاهک ۵- نمونه پلاسمای بیمار بعد از پرتودرمانی برای پروموتور ژن *CTNNB1* متیله، چاهک ۶- کنترل منفی برای حالت متیله ژن *CTNNB1*، چاهک ۷- کنترل مثبت برای حالت متیله ژن *CTNNB1*، چاهک ۸- کنترل منفی برای حالت غیر متیله ژن *CTNNB1*، چاهک ۹- کنترل مثبت برای حالت غیر متیله ژن *CTNNB1*، چاهک ۱۰- نمونه فرد سالم برای حالت غیر متیله ژن *CTNNB1*، چاهک ۱۱- نمونه فرد سالم برای حالت متیله ژن *CTNNB1*.

سالم، کاهش بیان معنی دار داشت، اما بعد از پرتودرمانی این ژن غیرمتیله گردید که این نشان دهنده تأثیر پرتودرمانی بر روی ساختار اپیژنتیکی این ژن می باشد (شکل ۷).

نتایج مطالعه حاضر هم چنین نشان داد که ژن *GPRASP1* در بیماران مبتلا به سرطان رکتوم متیله و در افراد سالم غیرمتیله است، بنابراین در سرطان رکتوم ژن *GPRASP1* در مقایسه با افراد



شکل ۷- بررسی متیلاسیون ژن *GPRASP1* با روش MSP و آغازگر اختصاصی حالت متیله و غیر متیله ژن *GPRASP1* در پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان رکتوم و افراد سالم بر روی ژل آگارز ۲ درصد. چاهک ۱- مارکر، چاهک ۲- نمونه پلاسمای بیمار قبل از پرتودرمانی برای پروموتور ژن *GPRASP1* متیله، چاهک ۳- نمونه پلاسمای بیمار قبل از پرتودرمانی برای پروموتور ژن *GPRASP1* غیر متیله، چاهک ۴- نمونه پلاسمای بیمار بعد از پرتودرمانی برای پروموتور ژن *GPRASP1* غیر متیله، چاهک ۵- نمونه پلاسمای بیمار بعد از پرتودرمانی برای پروموتور ژن *GPRASP1* متیله، چاهک ۶- کنترل مثبت برای حالت متیله ژن *GPRASP1*، چاهک ۷- کنترل منفی برای حالت متیله ژن *GPRASP1*، چاهک ۸- کنترل مثبت برای حالت غیر متیله ژن *GPRASP1*، چاهک ۹- کنترل منفی برای حالت غیر متیله ژن *GPRASP1*، چاهک ۱۰- نمونه فرد سالم برای حالت غیر متیله ژن *GPRASP1*، چاهک ۱۱- نمونه فرد سالم برای حالت متیله ژن *GPRASP1*.

نتایج حاصل از آزمون دقیق فیشر نشان داد که تفاوت معنی‌داری در الگوی متیلاسیون هر دو ژن CTNNB1 و GPRASP1 بین گروه بیماران مبتلا به سرطان رکتوم قبل از پرتودرمانی و گروه افراد سالم وجود دارد ($P < 0.05$). به‌طور مشخص، در گروه افراد سالم، ژن CTNNB1 در ۱۰۰ درصد موارد (۱۰ نفر از ۱۰ نفر) متیله بود، در حالی‌که در گروه بیماران قبل از پرتودرمانی، تنها ۲/۳۳ درصد (۱ نفر از ۴۳ نفر) متیله و ۹۷/۶۷ درصد (۴۲ نفر از ۴۳ نفر) غیرمتیله بودند. این الگو نشان‌دهنده هیپومتیلاسیون و افزایش بیان ژن CTNNB1 در بیماران مبتلا به سرطان رکتوم قبل از پرتودرمانی در مقایسه با افراد سالم می‌باشد ($P < 0.001$).

ژن GPRASP1 در گروه افراد سالم، ۸۰ درصد (۸ نفر از ۱۰ نفر) غیرمتیله و ۲۰ درصد (۲ نفر از ۱۰ نفر) متیله بودند. در مقابل، در گروه بیماران قبل از پرتودرمانی، ۱۰۰ درصد بیماران (۴۳ نفر از ۴۳ نفر) متیله و هیچ‌کدام غیرمتیله نبودند. این الگو نشان‌دهنده هیپرمتیلاسیون و کاهش بیان ژن GPRASP1 در بیماران مبتلا به سرطان رکتوم قبل از پرتودرمانی در مقایسه با افراد سالم می‌باشد ($P < 0.001$).

ژن CTNNB1 قبل از پرتودرمانی، ۹۷/۶۷ درصد بیماران (۴۲ نفر از ۴۳ نفر) غیرمتیله و تنها ۲/۳۳ درصد (۱ نفر از ۴۳ نفر) متیله بودند. پس از پرتودرمانی، این الگو به‌طور چشم‌گیری تغییر یافت به گونه‌ای که ۹۰/۷۰ درصد بیماران (۳۹ نفر از ۴۳ نفر) متیله و تنها ۹/۳۰ درصد (۴ نفر از ۴۳ نفر) غیرمتیله شدند. به عبارت دیگر، پرتودرمانی منجر به افزایش متیلاسیون ژن CTNNB1 از ۲/۳۳ درصد به ۹۰/۷۰ درصد گردید که نشان‌دهنده تأثیر پرتودرمانی در متیله‌کردن این ژن و در نتیجه کاهش بیان آن می‌باشد ($P < 0.001$).

ژن GPRASP1 قبل از پرتودرمانی، ۱۰۰ درصد بیماران (۴۳ نفر از ۴۳ نفر) متیله و هیچ‌کدام غیرمتیله نبودند. پس از پرتودرمانی، ۸۶/۰۵ درصد بیماران (۳۷ نفر از ۴۳ نفر) غیرمتیله و ۱۳/۹۵ درصد (۶ نفر از ۴۳ نفر) هم‌چنان متیله باقی ماندند. به عبارت دیگر، پرتودرمانی منجر به کاهش متیلاسیون ژن GPRASP1 از ۱۰۰ درصد به ۱۳/۹۵ درصد گردید که نشان‌دهنده تأثیر پرتودرمانی در غیرمتیله کردن این ژن و در نتیجه افزایش بیان آن می‌باشد ($P < 0.001$).

بحث

مطالعه حاضر با هدف تعیین تغییرات متیلاسیون ژن‌های CTNNB1 و GPRASP1 در مسیر سیگنالینگ اینترلوکین‌های ۴ و ۱۳ و ارزیابی سطح سرمی این سایتوکاین‌ها به عنوان نشانگرهای زیستی مقاومت به پرتودرمانی در بیماران مبتلا به سرطان رکتوم غیرمتاستاتیک انجام شد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که پرتودرمانی باعث تغییرات معنی‌داری در الگوی متیلاسیون DNA و سطح سرمی اینترلوکین‌های ۴ و ۱۳ می‌گردد. به‌طور خاص، افزایش متیلاسیون ژن CTNNB1 و کاهش متیلاسیون ژن GPRASP1 پس از پرتودرمانی مشاهده شد که به ترتیب با کاهش و افزایش بیان این ژن‌ها همراه بوده است. هم‌چنین، سطح سرمی اینترلوکین ۱۳ کاهش و سطح سرمی اینترلوکین ۴ افزایش معنی‌داری پس از پرتودرمانی نشان داد. این یافته‌ها حاکی از آن است که پرتودرمانی می‌تواند از طریق تغییرات اپی‌ژنتیکی و تعدیل پاسخ‌های ایمنی، بر روند درمانی بیماران مبتلا به سرطان رکتوم تأثیر بگذارد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژن CTNNB1 در بیماران مبتلا به سرطان رکتوم قبل از پرتودرمانی، هیپومتیله و دارای بیان

بالا بود که پس از پرتودرمانی، متیله‌شده و بیان آن کاهش یافت. این یافته با نتایج مطالعات قبلی همسو است. به عنوان مثال، Farkas و همکاران با بررسی جامع اطلاعات بیوانفورماتیکی، هیپومتیلاسیون ژن *CTNNB1* را در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال تأیید کردند (۲۸). از سوی دیگر، Wang و همکاران نشان دادند که افزایش بیان *CTNNB1* با مقاومت به پرتودرمانی در بیماران مبتلا به سرطان رکتوم همراه است و بیان هسته‌ای این پروتئین می‌تواند به عنوان نشانگر زیستی پیش‌بینی‌کننده مقاومت به پرتودرمانی مورد استفاده قرار گیرد (۲۱). نتایج مطالعه حاضر نیز این یافته را تأیید می‌کند، زیرا قبل از پرتودرمانی که بیان *CTNNB1* بالا بود، بیماران احتمالاً مقاومت بیشتری به پرتو داشتند و پس از کاهش بیان آن، پاسخ به درمان بهبود یافت.

Farkas و همکاران نیز کاهش متیلاسیون ژن *CTNNB1* را در بافت سرطان کولورکتال نسبت به بافت مخاط نرمال نشان دادند که با نتایج مطالعه حاضر همسو است (۲۸). همچنین، Galamb و همکاران کاهش متیلاسیون ژن *CTNNB1* را در مسیر سیگنالینگ WNT در بافت سرطان کولورکتال نسبت به بافت نرمال مجاور تومور گزارش کردند که با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت دارد (۲۹). Watson و همکاران در سلول‌های سرطانی پانکراس تحت تابش با پرتو نشان دادند که کاهش بیان *CTNNB1* منجر به حساسیت به پرتودرمانی می‌شود، در حالی که افزایش بیان آن با مقاومت به پرتودرمانی همراه است (۳۰). این یافته نیز با نتایج بیوانفورماتیک و تجربی مطالعه حاضر همسو می‌باشد.

در مورد ژن *GPRASP1*، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که این ژن در بیماران مبتلا به سرطان رکتوم قبل از پرتودرمانی، هیپرمتیله و دارای بیان پایین بود که پس از پرتودرمانی، غیرمتیله شده و بیان آن افزایش یافت. این یافته نیز با نتایج بیوانفورماتیک

مطالعه حاضر همسو بود که *GPRASP1* را به عنوان ژن سرکوب گر تومور با بیان پایین در بافت تومور نسبت به بافت نرمال شناسایی کرد. با وجود این که مطالعات محدودی در مورد نقش *GPRASP1* در سرطان رکتوم و پاسخ به پرتودرمانی وجود دارد، اما یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که این ژن احتمالاً می‌تواند به عنوان یک نشانگر زیستی بالقوه برای مانیتورینگ پاسخ به درمان مورد استفاده قرار گیرد. هیپرمتیلاسیون *GPRASP1* در سرطان رکتوم و کاهش بیان آن، مشابه سایر ژن‌های سرکوبگر تومور مانند p16 و RASSF1A است که در انواع سرطان‌ها گزارش شده اند (۳۱-۳۲). پرتودرمانی با کاهش متیلاسیون این ژن، باعث افزایش بیان آن و در نتیجه، مهار رشد توموری می‌گردد.

در مورد سایتوکاین‌ها، مطالعه حاضر نشان داد که سطح سرمی اینترلوکین ۱۳ در بیماران مبتلا به سرطان رکتوم قبل از پرتودرمانی در مقایسه با افراد سالم افزایش معنی‌داری داشت و پس از پرتودرمانی کاهش یافت. همچنین، سطح سرمی اینترلوکین ۴ در بیماران قبل از پرتودرمانی در مقایسه با افراد سالم کاهش معنی‌داری داشت و پس از پرتودرمانی افزایش یافت. این یافته‌ها با نتایج برخی مطالعات قبلی همسو و با برخی دیگر ناهمسو است. Johdi و همکاران نشان دادند که سطح سرمی اینترلوکین ۴ در مرحله اولیه بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در مقایسه با افراد سالم کاهش قابل توجهی دارد که با نتایج مطالعه حاضر همسو است (۳۳). همچنین، Crucitti و همکاران نشان دادند که سطح سرمی اینترلوکین ۱۳ قبل از جراحی بیماران سرطان کولورکتال در مقایسه با افراد سالم افزایش داشت و بعد از جراحی به تدریج کاهش یافت که با نتایج ما در مورد اینترلوکین ۱۳ همسو است (۳۴). با این حال، Kantola و همکاران نشان دادند که سطح سرمی اینترلوکین ۴ در مراحل ۲ و ۳ سرطان کولورکتال

افزایش بسیار جزئی در مقایسه با افراد سالم داشته است که با نتایج پژوهش حاضر در مورد کاهش اینترلوکین ۴ ناهمسو است (۳۵). هم‌چنین، Krzystek-Korpacka و همکاران نشان دادند که سطح سرمی اینترلوکین‌های ۴ و ۱۳ در تمامی تومورهای ناحیه راست و چپ کولون و رکتوم در مقایسه با افراد سالم افزایش معنی‌داری داشته است. نتایج اینترلوکین ۱۳ آن‌ها با مطالعه حاضر همسو، اما نتایج اینترلوکین ۴ آن‌ها با یافته پژوهش حاضر همسو نمی‌باشد (۱۹). احتمالاً علل این همسوس بودن می‌تواند به دلیل تفاوت در مرحله بیماری، متاستاز، سن، جنسیت، وضعیت فیزیولوژیکی، داروهای مصرفی، حساسیت کیت‌های تشخیصی، عوامل محیطی و تفاوت‌های ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف باشد. پرتودرمانی از طریق القاء استرس اکسیداتیو و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species; ROS)، می‌تواند آنزیم‌های دخیل در متیلاسیون DNA مانند DNMTها (DNA Methyltransferases) را تحت تأثیر قرار داده و الگوی متیلاسیون ژن‌ها را تغییر دهد (۳۵). هم‌چنین، پرتوهای یونیزان با فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ مانند NF- κ B و MAPK، می‌توانند بیان سایتوکاین‌ها را تعدیل کنند (۳۶). تغییرات متیلاسیون ژن‌های CTNNB1 و GPRASP1 ممکن است از طریق تأثیر بر مسیر سیگنالینگ WNT و JAK/STAT، بر سطح سرمی اینترلوکین‌های ۴ و ۱۳ تأثیر بگذارند. به عنوان مثال، کاهش بیان ژن CTNNB1 پس از پرتودرمانی می‌تواند منجر به کاهش فعالیت مسیر WNT و در نتیجه کاهش التهاب و افزایش بیان اینترلوکین ۴ به عنوان یک سایتوکاین ضدالتهابی گردد (۳۷-۳۸). از سوی دیگر، افزایش بیان ژن GPRASP1 ممکن است از طریق مهار سیگنالینگ GPCR، بر تنظیم پاسخ‌های ایمنی و سطح سایتوکاین‌ها تأثیر بگذارد (۳۷).

مطالعه حاضر با محدودیت‌هایی همراه بود. از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به حجم نمونه نسبتاً کوچک (۴۳ بیمار و ۱۰ فرد سالم) اشاره کرد که تعمیم‌پذیری نتایج را محدود می‌سازد. هم‌چنین، عدم بررسی میزان بیان ژن‌های CTNNB1 و GPRASP1 در سطح پروتئین به روش وسترن بلات یا ایمنوهیستوشیمی، از دیگر محدودیت‌های این مطالعه بوده است. علاوه بر این، عدم بررسی سایر ژن‌های دخیل در مسیر سیگنالینگ اینترلوکین‌ها و عدم بررسی طولانی‌مدت بیماران برای ارزیابی بقاء و عود بیماری، از دیگر محدودیت‌ها محسوب می‌شوند. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده با حجم نمونه بزرگ‌تر و با استفاده از روش‌های درون‌تنی (in vivo) و بررسی هم‌زمان سایر ژن‌های مرتبط، نتایج این مطالعه تأیید گردد. هم‌چنین، بررسی ارتباط بین تغییرات متیلاسیون و بیان ژن‌ها در سطح پروتئین با پاسخ بالینی بیماران (مانند بقاء بدون عود و بقاء کلی) می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را فراهم آورد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پرتودرمانی در بیماران مبتلا به سرطان رکتوم غیرمتاستاتیک، با ایجاد تغییرات معنی‌دار در الگوی متیلاسیون DNA همراه است. به‌طور خاص، افزایش متیلاسیون ژن CTNNB1 و کاهش متیلاسیون ژن GPRASP1 پس از پرتودرمانی مشاهده شد که به‌ترتیب با کاهش بیان CTNNB1 و افزایش بیان GPRASP1 همراه بوده است. هم‌چنین، پرتودرمانی باعث کاهش سطح سرمی اینترلوکین ۱۳ و افزایش سطح سرمی اینترلوکین ۴ گردید. این یافته‌ها نشان می‌دهد که احتمالاً تغییرات متیلاسیون ژن‌های CTNNB1 و GPRASP1 همراه با تغییرات سطح سرمی اینترلوکین‌های ۴ و ۱۳ می‌تواند به عنوان یک الگوی مؤثر برای مانیتورینگ پاسخ به پرتودرمانی و پیش‌بینی مقاومت به درمان در بیماران مبتلا به سرطان رکتوم

غیرمتاستاتیک مورد استفاده قرار گیرد. با این حال، به دلیل محدودیت‌های مطالعه مانند حجم نمونه کوچک، انجام مطالعات آینده با حجم نمونه بزرگ‌تر و بررسی هم‌زمان سایر ژن‌های مرتبط با مسیر سیگنالینگ اینترلوکین‌ها برای تأیید این یافته‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

از کلیه مسئولین و اعضای محترم گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان و مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه علوم پزشکی تهران که در مراحل اجرایی این پروژه همکاری و بذل توجه فرمودند سپاس‌گزاری می‌گردد. مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی می‌باشد.

تعارض در منافع: مقاله هیچ‌گونه تعارض منافی نداشت.

حامی مالی: این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی بین دانشگاهی تحت عنوان "ارزیابی متیلاسیون DNA در مسیرهای سیگنالینگ ترمیم DNA و چرخه سلولی در بیماران مبتلا به سرطان پروستات لوکالی ادونس قبل و بعد از رادیوتراپی" می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران و دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی رفسنجان اجراء شده است.

ملاحظات اخلاقی (کد اخلاق): این مطالعه، مستخرج از طرح تحقیقاتی بین دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران (IR.TUMS.IKHC.REC.1399.320) و دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی رفسنجان با مجوز کد اخلاق (IR.RUMS.REC.1399.261) می‌باشد.

مشارکت نویسندگان:

طراحی ایده: علی محمد علیزاده، زهرا باقری حسین‌آبادی، سولماز خلیق فرد
روش کار: سید محمد السادات اشکوری، سولماز خلیق فرد
جمع‌آوری داده‌ها: سید محمد السادات اشکوری، سولماز خلیق فرد

تجزیه و تحلیل داده‌ها: سولماز خلیق فرد

نظارت: زهرا باقری حسین‌آبادی، مهدی محمودی

مدیریت پروژه: علی محمد علیزاده

نگارش پیش‌نویس اصلی: سید محمد السادات اشکوری، سولماز خلیق فرد
نگارش، بررسی و ویرایش: زهرا باقری حسین‌آبادی، علی محمد علیزاده

References

1. Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppedè F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *BioMed Research International*. 2011; 2011(1): 792362.
2. Woerner SM, Benner A, Sutter C, Schiller M, Yuan YP, Keller G, et al. Pathogenesis of DNA repair-deficient cancers: a statistical meta-analysis of putative Real Common Target genes. *Oncogene*. 2003; 22(15): 2226-35.

3. Yang Z-H, Dang Y-Q, Ji G. Role of epigenetics in transformation of inflammation into colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*. 2019; 25(23): 2863.
4. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics*. 2005; 6(8): 597-610.
5. Pfeifer GP, Besaratinia A. Mutational spectra of human cancer. *Human genetics*. 2009;125(5):493-506.
6. Mangas-Sanjuan C, Jover R, Cubiella J, Marzo-Castillejo M, Balaguer F, Bessa X, et al. Vigilancia tras resección de pólipos de colon y de cáncer colorrectal. Actualización 2018. *Gastroenterología y hepatología*. 2019; 42(3): 188-201.
7. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013; 38(1): 23-38.
8. Jung G, Hernandez-Illan E, Moreira L, Balaguer F, Goel A. Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2020; 17(2): 111-30.
9. Di Maggio FM, Minafra L, Forte GI, Cammarata FP, Lio D, Messa C, et al. Portrait of inflammatory response to ionizing radiation treatment. *Journal of inflammation*. 2015; 12(1): 14.
10. Li J, Huang L, Zhao H, Yan Y, Lu J. The role of interleukins in colorectal cancer. *International journal of biological sciences*. 2020;16(13):2323.
11. Song X, Traub B, Shi J, Kornmann M. Possible roles of interleukin-4 and-13 and their receptors in gastric and colon cancer. *International journal of molecular sciences*. 2021; 22(2): 727.
12. Formentini A, Braun P, Fricke H, Link K-H, Henne-Bruns D, Kornmann M. Expression of interleukin-4 and interleukin-13 and their receptors in colorectal cancer. *International journal of colorectal disease*. 2012; 27(10): 1369-76.
13. Wang L, Zhang X-M, Li Z, Liu X-J, Chai J, Zhang G-Y, et al. Overexpression of nuclear β -catenin in rectal adenocarcinoma is associated with radioresistance. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2013; 19(40): 6876.
14. Du J, Yuan Z, Ma Z, Song J, Xie X, Chen YJMB. KEGG-PATH: Kyoto encyclopedia of genes and genomes-based pathway analysis using a path analysis model. 2014; 10(9): 2441-7.
15. Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, Creighton CJ, Ponce-Rodriguez I,

- Chakravarthi BV, et al. UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses. 2017; 19(8): 649-58.
16. Huang W-Y, Hsu S-D, Huang H-Y, Sun Y-M, Chou C-H, Weng S-L, et al. MethHC: a database of DNA methylation and gene expression in human cancer. 2015; 43(D1): D856-D61.
17. Lee H, Park C, Na W, Park KH, Shin SJNpo. Precision cell-free DNA extraction for liquid biopsy by integrated microfluidics. 2020; 4(1): 1-10.
18. Bagheri-Hosseiniabadi Z, Eshkevari SMS, Khalighfar S, Alizadeh AM, Khori V, Amirani T, et al. A systematic approach introduced some immune system targets in rectal cancer by considering cell-free DNA methylation in response to radiochemotherapy. Cytokine. 2024; 181: 156666.
19. Derks S, Lentjes MH, Hellebrekers DM, De Bruïne AP, Herman JG, Van Engeland MJACP. Methylation-specific PCR unraveled. 2004; 26(5, 6): 291-9.

Evaluation of DNA Methylation Changes in CTNNB1 and GPRASP1 Genes in the Signaling Pathway of Interleukins 4 and 13 as Radiotherapy Resistance Biomarkers in Serum Cell-Free DNA of Patients with Non-Metastatic Rectal Cancer: A Bioinformatics and Experimental Study

Seyed Mohammad Sadat Eshkevari^{1,2}, Zahra Bagheri-Hosseiniabadi^{1,2}, Solmaz Khalighfard³, Mehdi Mahmoodi^{1,4}, Ali Mohammad Alizadeh⁵

Received: 20/10/26

Sent for Revision: 26/11/26

Received Revised Manuscript: 15/06/26

Accepted: 17/06/26

Background and Objectives: Inflammation and epigenetic changes are considered major factors in developing rectal cancer. The aim of this study was to determine methylation changes of CTNNB1 and GPRASP1 genes in the signaling pathway of interleukins 4 and 13 in patients with non-metastatic rectal cancer.

Materials and Methods: In this quasi-experimental study, bioinformatics analysis was first performed using GO, UALCAN, and DNMIIVD databases to identify signaling pathways of target genes. Subsequently, blood samples were collected from 43 patients with rectal cancer (before and after radiotherapy) and 10 healthy individuals. We determined methylation changes in the CTNNB1 and GPRASP1 genes by methylation-specific PCR and measured serum levels of interleukins 4 and 13 by ELISA. We analyzed parametric data using an independent t-test and non-parametric data using the Mann-Whitney U test.

Results: In bioinformatics analysis, CTNNB1 was identified as a hypomethylated gene (with high expression), and GPRASP1 was identified as a hypermethylated gene (with low expression). After radiotherapy, increased methylation of CTNNB1 led to a significant decrease in its expression, while decreased methylation of GPRASP1 resulted in a significant increase in its expression ($P < 0.05$). Moreover, serum levels of interleukin-13 significantly decreased, and that of interleukin-4 significantly increased after radiotherapy compared to before ($P < 0.05$).

Conclusion: The results of the current study demonstrated that radiotherapy, by inducing changes in DNA methylation accompanied by alterations in serum levels of interleukins 4 and 13, could serve as an effective model for monitoring treatment response in patients with non-metastatic rectal cancer.

Keywords: Rectal cancer, Cell-free DNA, DNA methylation, Radiotherapy, Interleukin 4, Interleukin 13

Funding: This study was co-funded by Tehran University of Medical Sciences and Rafsanjan University of Medical Sciences.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Tehran University of Medical Sciences (IR.TUMS.IKHC.REC.1399.320) and Rafsanjan University of Medical Sciences (IR.RUMS.REC.1399.261) approved the study.

Authors' contributions

Conceptualization: Ali Mohammad Alizadeh, Zahra Bagheri-Hosseiniabadi, Solmaz Khalighfard

Methodology: Seyed Mohammad Sadat Eshkevari, Solmaz Khalighfard

Data collection: Seyed Mohammad Sadat Eshkevari, Solmaz Khalighfard

Formal analysis: Solmaz Khalighfard

Supervision: Zahra Bagheri-Hosseiniabadi, Mehdi Mahmoodi

Project administration: Ali Mohammad Alizadeh

Writing – original draft: Seyed Mohammad Sadat Eshkevari, Solmaz Khalighfard

Writing – review & editing: Zahra Bagheri-Hosseiniabadi, Ali Mohammad Alizadeh

Citation: Eshkevari SMS, Bagheri-Hosseiniabadi Z, Khalighfard S, Mahmoodi M, Alizadeh MA. Evaluation of DNA Methylation Changes in CTNNB1 and GPRASP1 Genes in the Signaling Pathway of Interleukins 4 and 13 as Radiotherapy Resistance Biomarkers in Serum Cell-Free DNA of Patients with Non-Metastatic Rectal Cancer: A Bioinformatics and Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2026; 25 (4): 413-32. doi: 10.66224/jrums.25.4.413. [Farsi].

1- Molecular Medicine Research Center, Research Institute of Basic Medical Sciences, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

2- Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

3- Research Center for Development of Advanced Technologies, Tehran, Iran

4- Department of Clinical Biochemistry, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

5- Cancer Research Center, Cancer Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, ORCID: 0000-0002-1147-3335

Corresponding author: Tel: (021) 61192501122, E-mail: aalizadeh@sina.tums.ac.ir

دوره ۲۵، شماره ۴، سال ۱۴۰۵

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان