مجله علوم پزشکی رازی دوره ۳۱، شماره پیوسته ۳۹، ۸ خرداد ۱۴۰۳ https://doi.org/10.47176/rjms.31.39

مقاله پژوهشی

بررسی ارتباط میکرو RNA های منتخب با مهاجم بودن پاتولوژی تومور در بیماران سرطان پاپیلری تیروئید

سارا نظری: گروه زیست شناسی سلولی مولکولی، دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

احمد مجد: گروه زیست شناسی سلولی مولکولی، دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

ایرج حیدری: مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، پژوهشکده غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

محمدرضا مهاجری تهرانی: مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم بالینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

رضا نکوئیان: مرکز تحقیقات رشد و تکامل کودکان، پژوهشکده غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (* نویسنده مسئول) nekouian.r@iums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: شایع‌ترین بدخیمی غده تیروئید، سرطان پاپیلاری تیروئید (Papillary Thyroid Carcinoma-PTC) می‌باشد و به نظر می‌رسد که میکرو RNA (mir) های دخیل در PTC، بر تهاجم تومورها اثر می‌گذارند. در این مطالعه به بررسی بیان *mir-16-5p*، *mir-34b-5p*، *mir-146b-5p*، *mir-877-5p* و *Let-7f-5p* در نمونه‌ی سرم و بافت توموری تیروئید بیماران PTC پرداخته شده است.

روش کار: در این مطالعه‌ی مورد–شاهدی، تعداد ۳۶ بیمار دارای PTC شامل ۱۸ مورد تهاجمی و ۱۸ مورد غیر تهاجمی وارد مطالعه شدند. برر سی بیان ژن با ا ستفاده از روش real-time PCR انجام شده و مقادیر چند برابری تغییرات (FC) گزارش گردید.

یافته‌ها: به طور خلاصه، mir-16 افزایش بیان معنادار در خون (FC =۲،۸۵، P =۰،۰۲۴)، mir-34 کاهش بیان معنادار هم در خون (FC =۰،۱۹، P <۰،۰۰۱) و هم در بافت تومور (FC =۰،۱۹، P <۰،۰۰۱)، mir-146 افزایش بیان معنادار هم در خون (FC =۴۸،۱۰، P <۰،۰۰۱) و هم در بافت تومور (FC =۶۰،۶۱، P <۰،۰۰۱)، mir-877 کاهش بیان معنادار در خون (FC =۰،۲۲، P <۰،۰۰۱)، و Let-7 کاهش بیان معنادار هم در خون (FC =۰،۰۹، P <۰،۰۰۱) و هم در بافت تومور (FC =۰،۱۳، P <۰،۰۰۱) را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: میکرو RNA های منتخب مورد بررسی ارتباط معناداری با تهاجمی بودن تومورهای PTC دارد. با استفاده از مطالعات بیوانفورماتیک می‌توان سعی در تبیین مکانیسم‌های مرتبط نمود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

کلیدواژه‌ها

سرطان پاپیلاری تیروئید،
میکرو RNA،
ژن‌های سرکوب کننده تومور،
پروتوانکوژن

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۰۹

تاریخ چاپ: ۱۴۰۳/۰۳/۰۸

شیوه استناد به این مقاله:

Nazari S, Majd A, Heydari I, Mohajeri Tehrani MR, Nekouian R. Investigation of Some Selected micro RNAs Association with Aggressiveness of Tumor Pathology in Cases of Papillary Thyroid Carcinoma. Razi J Med Sci. 2024(28 May);31.39.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the CC BY-NC-SA 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.en).

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 4.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-21]

[DOI: 10.47176/rjms.31.39]

Razi Journal of Medical Sciences. 2024(28 May);31.39. https://doi.org/10.47176/rjms.31.39

Original Article

Investigation of Some Selected micro RNAs Association with Aggressiveness of Tumor Pathology in Cases of Papillary Thyroid Carcinoma

Sara Nazari: Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
Ahmad Majd: Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
Iraj Heydari: Endocrine Research Center, Institute of Endocrinology and Metabolism, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Mohammad Reza Mohajeri Tehrani: Endocrinology and Metabolism Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Reza Nekouian: Pediatric Growth and Development Research Center, Institute of Endocrinology and Metabolism, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (* Corresponding Author) nekouian.r@iums.ac.ir

Abstract

Background & Aims: Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most prevalent thyroid gland tumor arising from thyroid follicular cells. MicroRNAs (miRs) are endogenous single-stranded non-coding RNAs attaching to the different sites of the target mRNAs, leading to regulation of gene expression. Hence, miRs play a role in biological functions. Diagnostic role of miRs in PTC has been previously studied. However, the results of such molecular studies should be reinvestigated among different ancestries worldwide. Despite the fact, other than diagnosis, it is vital to have capability to discriminate aggressive cases from the non-aggressive ones to prevent over-diagnosis and over-treatment. Hence, the current investigation was performed to study the association of *let-7f*, *miR-146b-5p*, *miR-34b*, *miR-16* and *miR-877-5p* expression in blood serum and tumor tissue with aggressiveness of PTC in an Iranian population.

Methods: This was a case control study. Reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to compare blood and tumor tissue expression of the miRs between aggressive and non-aggressive PTC samples. Eighteen patients with aggressive PTC were considered as the case group and 18 patients with non-aggressive PTC as the control group. Samples were taken from three hospitals as Toos, Shariyati and Firoozgar (Tehran, Iran). A written informed consent was obtained from each participant. Fresh tissue specimens of aggressive and non-aggressive PTC tissues were obtained from tumors and instantly kept at -80 °C until assessment. Two independent pathologists assessed the samples. PTC was confirmed by light microscope using hematoxylin and eosin staining. Total RNA was extracted with columnar extraction method using total RNA purification kit (Norgen, Canada) according to the manufacturer's instructions. Sample quality control was using cel-mir-39 Spike-In Kit (Norgen, Canada) which offers a quantified synthetic RNA (cel-miR-39) for spike-in. Cel-mir-39 was used for normalization in RT-qPCR assay as the reference to state ΔCt. cDNA was synthesized with poly A polymerase technique using microScript microRNA cDNA Synthesis kit (Norgen, Canada). Afterwards, the cDNA was used for real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) using SYBR Green mastermix (Norgen, Canada). Fold changes (FC) of each miR were computed *via* the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$ in Excel 2013 calibrating with the mean of expression in non-aggressive PTC patients. Significance of individual FCs was assessed with one sample t test (FC = 1 was the null hypothesis).

Keywords
Papillary thyroid Carcinoma, microRNA, tumor Suppressor genes, Proto-oncogenes

Received: 30/12/2023
Published: 28/05/2024

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-21]

[DOI: 10.47176/rjms.31.39]

Besides, FC between blood serum and tumor tissue was performed through independent t test at the significance level of 0.05.
Results: *MiR-16* had a meaningful surge in blood (FC = 2.85; P = 0.024), while *miR-34* showed a meaningful down-regulation in blood (FC = 0.19; P < 0.001) and tumor tissue (FC = 0.19; P < 0.001). In addition, *miR-146* had a major up-regulation in blood (FC = 48.10; P < 0.001) and tumor tissue (FC = 60.61; P < 0.001), *miR-877* a momentous down-regulation in blood (FC = 0.22; P < 0.001), and *let-7* a meaningful down-regulation in blood (FC = 0.09; P < 0.001) and tumor tissue (FC = 0.13; P < 0.001). Independent t test was used to compare FC of each miR (blood expression versus tumor tissue expression). *MiR-16* exhibited a meaningful up-regulation in aggressive PTC samples (2.85 vs 0.92; P = 0.020). However, no major difference was reported between blood and tumor tissue FCs for other miRs.
Conclusion: MiRs can help to differentiate invasive PTC from non-invasive PTC. Concisely, *miR-16* and *miR-877* had an upregulation in blood, *miR-34* and *let-7* a down regulation in blood and tumor tissue, *miR-146* an upregulation in blood and tumor tissue, and *miR-146* a significant up regulation in blood and tumor tissue. Expression alteration of *miR-16* was meaningfully more prevailing in blood compared with tumor tissue in favor of upregulation. Among the studied miRs, *miR-146* was the most frequently occurring result in this study and previous studies. Predictive role of these biomarkers should be assessed in further well-designed cohort investigations, then the results can be utilized as personalized medicine in the management of PTC.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:
Nazari S, Majd A, Heydari I, Mohajeri Tehrani MR, Nekouian R. Investigation of Some Selected micro RNAs Association with Aggressiveness of Tumor Pathology in Cases of Papillary Thyroid Carcinoma. Razi J Med Sci. 2024(28 May);31.39.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the CC BY-NC-SA 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.en).

*This work is published under CC BY-NC-SA 4.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-21]

[DOI: 10.47176/rjms.31.39]

مقدمه

امروزه تعداد زیادی از مقالات درزمینه‌ی بیومارکرهای سرطان‌های مختلف ازجمله سرطان تیروئید دیده می‌شود. برخی از این مقالات اصیل به دنبال راهی برای تفکیک انواع سرطان‌های تیروئید بوده‌اند. سرطان تیروئید فرم غالب سرطان‌های با منشا غدد درون ریز می‌باشد. براساس پایگاه رصد جهانی سرطانی (https:gco.iarc.fr) بروز سرطان تیروئید در خانم‌ها ۱۰,۲ مورد و در مردان ۳,۱ مورد در ۱۰۰،۰۰۰ نفر تا سال ۲۰۱۸ گزارش شده است. فرم پاپیلاری سرطان تیروئید متداول ترین نوع سرطان تیروئید است که ۸۰٪ موارد را شامل می شود. مرگ و میر استاندارد شده‌ی سرطان تیروئید ۰,۴۲ در ۱۰۰،۰۰۰ مورد جمعیت است. میزان بروز سرطان تیروئید در ایران که پنجمین سرطان رایج است ۴,۲ مورد در ۱۰۰،۰۰۰ نفر تا سال ۲۰۲۱ است (۱). به طور کلی سرطان تیروئید به دو دسته‌ی اصلی تقسیم می‌شود، سرطان تیروئید با منشا سلول‌های فولیکولار و سرطان با منشا سلول‌های پارا فولیکولار. گروه اول شامل سرطان تیروئید فولیکولار (follicular thyroid carcinoma -FTC) و سرطان تیروئید آناپلاستیک (anaplastic thyroid carcinoma -ATC) (۲) و سرطان تیروئید پاپیلاری (papillary thyroid carcinoma -PTC) و گروه دوم شامل سرطان نوع مدولار (medullary thyroid carcinoma -MTC) می‌شود (۳). با وجود اینکه این سرطان‌ها منشا یکسانی دارند ولی شرایط هیستولوژی، دلایل ژنتیکی و رفتار زیستی متفاوتی را از خود نشان می‌دهند. بیش از ۹۵٪ سرطان‌های تیروئید از سلول‌های فولیکولار منشا می‌گیرد.

از لحاظ ژنتیکی، بسیاری از بیماران جهش ژن BRAF را نشان می‌دهند که این جهش ریسک ابتلا به سرطان تیروئید را به طور شایع افزایش می‌دهد (۴). به دلیل رشد نسبتاً آهسته‌ی این تومور، ممکن است مقدار قابل توجهی متاستاز ریوی رخ دهد و این در شرایطی است که فرد بیمار علائم خاصی را بروز نداده است. درگیری غدد لنفاوی در سرطان تیروئید نوع پاپیلاری به طور معمول قابل چشم پوشی است؛ ولی در افراد مسن خطر عود سرطان و مرگ ومیر را افزایش می‌دهد. براساس مطالعات انجام شده تغییر بیان در ژن‌هایی که مسئول کدکردن پروتئین‌های آنژیوپروتئین ۱ (Ang-1) و سیتوکراتین ۱۹ (Ck-19) و مهارکننده‌ی متالوپروتئیناز بافت رخ می‌دهد. با این وجود تشخیص دقیق و به‌موقع سرطان تیروئید نیاز به بیومارکرهای نوین دارد که میکرو RNA (mir) ها گزینه‌ی مناسبی برای بررسی می‌باشند (۵).

Mir ها RNA های تک‌رشته‌ای کوتاهی هستند که به قسمت‌های مختلفی از mRNA هدف از جمله ناحیه 3’-UTR متصل می‌شوند. بنابراین در تنظیم سیستم‌های بیولوژیکی شرکت می‌کنند (۶). درگذشته نقش mir ها در PTC مطالعه شده‌است. برای مثال mir-146b منجر به فعال کردن انکوژن RET در PTC می شود (۷). سطح بالای بیان mir-146b در بیماران با موتاسیون BRAF در مقایسه با بیماران دارای نوع وحشی BRAF مشاهده شده است (۸). در مثالی دیگر، در یک مطالعه نشان داده شده‌است که ژن‌های بسیاری مانند خانواده‌ی RAS توسط mir-16 مورد هدف قرار داده می شوند (۹). تقریباً تمام سرطان‌ها با تغییرات در بیان mir ها همراه است. PTC یک استثنا نبوده و بنابراین نقش mir ها در پاتوفیزیولوژی PTC مطالعه شده‌است. معمولاً PTC دارای پیش آگهی خوبی است و تهاجمی بودن این بیماری بر پیش آگهی آن موثر است. از آنجا که تخمین میزان تهاجم در PTC سخت بود، مطالعات متعدّدی به منظور یافتن نقش مارکرهای زیستی (مانند mir ها) انجام شد. به نظر می‌رسد mir ها بر عوامل سرکوب کننده تومور و پروتوانکوژن ها، اثربخش باشد.

با توجّه به اهمّیت شناسایی تهاجم تومور با استفاده از بیومارکرها و نیز ضرورت راستی‌آزمایی نتایج مطالعات گذشته در جمعیت ایرانی در این مطالعه به بررسی بیان mir-16-5p، mir-34b-5p، mir-146b-5p، mir-877-5p و Let-7f-5p در نمونه‌ی سرم و بافت توموری تیروئید بیماران PTC پرداخته شده است.

روش کار

طراحی مطالعه و بیماران: کار حاضر یک مطالعه‌ی مورد شاهدی برای مقایسه بیان mir های خون و بافت تومور بین بیماران تهاجمی و غیر تهاجمی PTC با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی رونوشت

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-21]

[DOI: 10.47176/rjms.31.39]

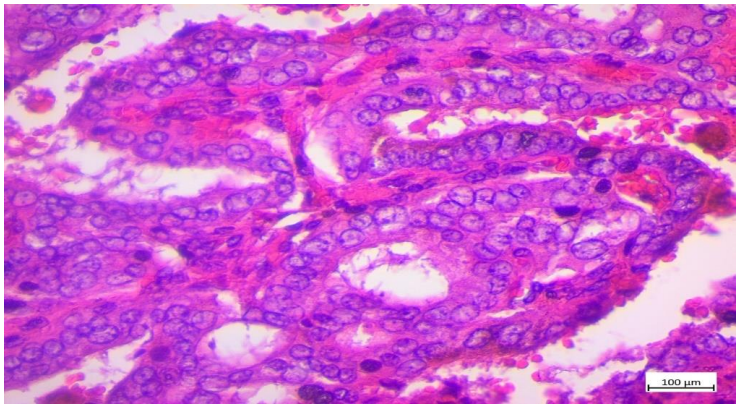
معکوس (RT-qPCR) ا ست. در مجموع ۱۸ بیمار مبتلا به PTC تهاجمی به عنوان گروه مورد و ۱۸ بیمار با PTC غیر تهاجمی به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. انتخاب موارد تهاجمی براساس مرحله بندی بالینی TNM (T: اندازه‌ی تومور، N: درگیری گره لنفاوی، M: متاستاز) بوده‌است؛ بدین صورت که در بیماران بالای ۴۵ سال مرحله‌ی ۱ و ۲ به عنوان موارد غیر تهاجمی و مرحله‌ی ۳ و ۴ به عنوان موارد تهاجمی درنظر گرفته شدند. همچنین در بیماران کمتر از ۴۵ سال وجود متاستاز به عنوان معیار تهاجمی بودن درنظر گرفته‌شد (معادل مرحله‌ی ۲ در این گروه سنّی). نمونه ها از ۳ مرکز توس، شریعتی و فیروزگر (تهران، ایران) ازشهریور تا بهمن ۱۳۹۷ به روش نمونه گیری آسان در حین عمل جراحی جمع آوری شدند. این مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق بیمارستان شریعتی (IR.TUMS.EMRI.REC.1398.008) قرار گرفت. رضایت نامه کتبی آگاهانه از همه‌ی شرکت کنندگان اخذ شد. مقالات منتشر شده‌ی قبلی برای انتخاب اولیه mir ها مورد استفاده قرار گرفت. پایگاه داده Mircancer برای یافتن ارتباط mir ها با سرطان بر اساس متون PubMed استفاده شد. پایگاه داده Mirbase برای یافتن توالی mir ها به منظور تبدیل آن ها به دنباله آغازگر استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده نشان داده شده است (جدول ۱). پایگاه داده miRDB برای یافتن ژن‌های مورد نظر استفاده شد. بر این اساس این miRها می‌توانند RAS و BRAF را هدف قرار دهند. پایگاه داده Mirandola برای درک اینکه آ یا miRs را می توان در خون در گردش و بافت تشخیص داد استفاده شد.

جمع‌آوری نمونه های خون و بافت تومور: نمونه های بافت تازه از بافت‌های PTC تهاجمی و غیر تهاجمی از تومورها به‌د ست آمد و تا زمان تجزیه و تحلیل در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تمامی نمونه‌ها تو سط دو پاتولوژی ست م ستقل ت شخیص داده شدند. تأیید PTC از طریق میکروسکوپ نوری با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین بود (شکل ۱). از هر شرکت کننده، ۲ میلی‌لیتر خون محیطی در لو له های حاوی EDTA جمع‌آوری شد و تا زمان تجزیه و تحلیل در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA کل: RNA کل از تومورها و سرم با روش استخراج ستونی با استفاده از کیت استخراج

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

میکرو RNA	پرایمر (3'→5' از سمت چپ)
Mir16-5p	TAGCAGCGTAAATATTGGCG
Mir34b-5p	TAGGCAGTGTCATTAGCTGATTG
Mir146b-5p	TGAGAACTGAATTCCATAGGCTG
Mir877-5p	GTAGAGATGGCGCAGGG
Let7f-5P	TGAGGTAGTAGATTGATAGTT



شکل ۱- تصویر پاتولوژی تومور PTC (رنگامیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگ‌نمایی ۴۰۰).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-21]

[DOI: 10.47176/rjms.31.39]

RNA کل (Norgen، کانادا) طبق د ستورالعمل سازنده به دست آمد. کمّی سازی RNA کل با استفاده از اسپکتروفتومتری نانو قطره (Thermo Scientific Wilmington، DE، آمریکا) انجام شد. کنترل کیفیت نمونه با استفاده از کیت RNA مصنوعی cel-mir-39 Spike-In (Norgen، کانادا) انجام شد. مقدار RNA cel-mir-39 بازیافت شده پس از استخراج RNA به طور مستقیم با مقدار RNA کل بازیافت شده در ارتباط است. بنابراین از cel-mir-39 به عنوان مرجع گزارش ΔCt استفاده شد.

مراحل RT-qPCR cDNA با روش پلی مراز پلی A با استفاده از کیت cDNA microRNA microScript (Norgen، کانادا) سنتز شد. سپس از cDNA برای استفاده برای RT-qPCR با استفاده از مسترمیکس SYBR Green (Norgen، کانادا) مطابق دستورالعمل سازنده به کار گرفته شد (۳۰ دقیقه اول در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و در نهایت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد). تمام واکنش‌های RT-qPCR در سه تکرار انجام شد. سطوح بیان mir با کمی سازی نسبی با استفاده از نرم افزار Rotor Gene Q Real-Time PCR (Applied Biosystems Inc.) SDS 2.3.1، کانادا) محاسبه شد. نتایج به عنوان مقادیر Ct نرمال شده ارائه شد.

تحلیل آماری: چند برابری تغییرات (FC) هر mir با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ در اکسل ۲۰۱۳ از طریق کالیبراسیون با میانگین بیان در بیماران PTC غیر تهاجمی محاسبه شد. معناداری FC های فردی با آزمون t تک نمونه‌ای بررسی شد (۱= FC فرضیه صفر بود) و مقایسه‌ی FC ها بین سرم خون و بافت تومور از طریق آزمون t مستقل انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS24 (شرکت IBM، آمریکا) استفاده شد. احتمال مقدار |t|<T (P value) کمتر از ۰،۰۵ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در مجموع ۳۶ بیمار ایرانی مبتلا به PTC در محدوده سنی ۲۰ تا ۷۲ سال مورد بررسی قرار گرفتند. دو محدوده اندازه تومور در بیماران PTC ۰،۵ تا ۸ سانتی‌متر با تعداد متاستاز در غدد لنفاوی ۰ تا ۵ بود. نمونه‌ها به گونه‌ای انتخاب شدند تا متغیّرهای زمینه‌ای شامل سن، جنس و نوع عمل جرّاحی هم سان با شند (P =۰،۷۱۱ برای گروه سنّی، P =۱،۰۰۰ برای جنس و نوع عمل، آزمون دقیق فیشر) (جدول ۲). RT-qPCR انجام شد و پس از تایید منحنی‌های ذوب، مقادیر FC محاسبه شد (جدول ۳). به طور خلاصه، mir-16 افزایش

جدول ۲- مشخّصات زمینه‌ای بیماران PTC.

متغیّر	گروه تهاجمی	گروه غیر تهاجمی
جنسیت		
زن	۱۳	۱۳
مرد	۵	۵
سن		
کمتر از ۴۵ سال	۴	۶
بالای ۴۵ سال	۱۴	۱۲
مشخّصه‌های بالینی و پاتولوژی		
تعداد گره‌های لنفی	۳-۵	۰-۴
اندازه‌ی تومور	۲،۵ تا ۸ سانتی‌متر	۰،۵ تا ۴ سانتی‌متر
مرحله برحسب TNM	II, III, IV	I, II
عمل حذف یک لوب	۲	۳
عمل برداشتن کامل تیروئید	۱۶	۱۵

TNM: معیار مرحله‌بندی بالینی براساس اندازه‌ی تومور (T)، درگیری لنف نود (N) و متاستاز (M).

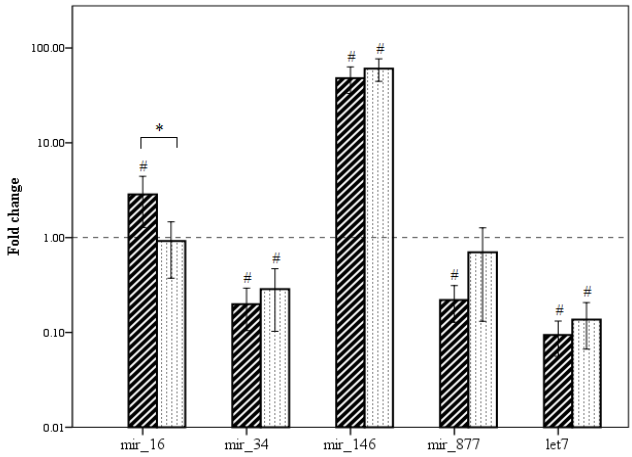
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-21]

[DOI: 10.47176/rjms.31.39]

جدول ۳- تغییرات بیان میکرو RNA ها (FC) در گروه تهاجمی نسبت به گروه غیر تهاجمی در نمونه‌های سرم و بافت تومور

میکرو RNA و منبع نمونه		تعداد نمونه	FC	انحراف معیار	آزمون t تک نمونه‌ای (P)	آزمون t مستقل (P)
mir_16	خون	۱۸	۲.۸۵۴	۳.۱۶۷	۰.۰۲۴*	۰.۰۲۰*
	بافت	۱۸	۰.۹۲۰	۱.۰۹۹	۰.۷۶۱	
mir_34	خون	۱۸	۹۰.۱۹	۰.۱۸۹	۰.۰۰۰*	۰.۳۷۷
	بافت	۱۸	۰,۲۸۷	۰.۳۷۰	۰.۰۰۰*	
mir_146	خون	۱۸	۴۸.۱۰۱	۳۰.۱۳۸	۰.۰۰۰*	۰.۲۳۹
	بافت	۱۸	۶۰.۶۱۷	۳۲.۴۸۳	۰.۰۰۰*	
mir_877	خون	۱۸	۰.۲۲۰	۰.۱۸۵	۰.۰۰۰*	۰.۰۸۸
	بافت	۱۸	۰.۷۰۰	۱.۱۴۴	۰.۲۸۲	
let_7	خون	۱۸	۰.۰۹۳	۰.۰۷۶	۰.۰۰۰*	۰.۲۶۵
	بافت	۱۸	۰.۱۳۶	۰.۱۴۰	۰.۰۰۰*	

* معنادار در سطح ۰,۰۵.



ستون‌های سیاه (چپ) برای بیان در خون و ستون‌های سفید (راست) برای بیان در بافت تومور هستند. نوارهای خطا نشان دهنده فاصله اطمینان ۹۵٪ است. خط مرجع = ۱ خط کالیبراسیون را نشان می دهد (PTC تهاجمی در مقابل PTC غیر تهاجمی). * معنادار در سطح ۰,۰۵ با آزمون تی مستقل # معنادار در سطح ۰,۰۵ با آزمون تی تک نمونه‌ای (۱= FC فرضیه صفر است).

شکل ۲- تغییرات بیان میکرو RNA ها درPTC تهاجمی و غیر تهاجمی و مقایسه‌ی آن ها در خون و بافت

بیان معنادار در خون (FC =۲,۸۵، P =۰,۰۲۴)، mir-34 کاهش بیان معنادار هم در خون (FC =۰,۱۹، P <۰,۰۰۱) و هم در بافت تومور (FC =۰,۱۹، P <۰,۰۰۱)، mir-146 افزایش بیان معنادار هم در خون (FC =۴۸,۱۰، P <۰,۰۰۱) و هم در بافت تومور (FC =۶۰,۶۱، P <۰,۰۰۱)، mir-877 کاهش بیان معنادار در خون (FC =۰,۲۲، P <۰,۰۰۱)، و Let-7 کاهش بیان معنادار هم در خون (FC =۰,۰۹، P <۰,۰۰۱) و هم در بافت تومور (FC =۰,۱۳، P <۰,۰۰۱) را نشان دادند. همچنین FC های هر mir (بیان خون در مقابل بیان بافت تومور) با استفاده از آزمون t مستقل مقایسه شد. Mir-16 بیان بیشتری را در بیماران PTC تهاجمی در مقایسه با گروه غیر تهاجمی نشان داد (P =۰,۰۲۰). تفاوت معنی داری بین بیان ژن در خون و بافت تومور برای سایر mir ها مشاهده نشد (P >۰,۰۵) (جدول ۳، شکل ۲).

بحث

مطالعه‌ی حاضر به منظور یافتن تغییرات mir های موجود در گردش خون و بافت تومور در تهاجم تومور بیماران PTC طراحی شد. Mir-16 افزایش بیان در خون، mir-34 کاهش بیان در خون و بافت تومور، mir-146 افزایش بیان در خون و بافت تومور، mir-877

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-21]

[DOI: 10.47176/rjms.31.39]

کاهش بیان در خون و let-7 کاهش بیان معنادار در خون و بافت تومور نشـــان دادند. از آنجایی که تفاوت معنی‌داری بین بیان mir ها در خون و بافت وجود نداشـت (به جز در مورد mir-16)، مطالعه‌ی بیان سـرم خون این mir ها می‌تواند در کلینیک‌ها به‌عنوان یک منبع بیولوژیک در دسترس و جایگزین بافت تومور مورد استفاده قرار گیرد.

PTC یک ســرطان با پیش آگهی خوب اســت. لزوم انجام تیروئیدکتومی کامل ممکن اســت در آینده‌ای نزدیک تحت تأثیر رفتار تهاجمی آن باشد. از آنجایی که پیش‌بینی رفتار تهاجمی PTC دشــوار بود، بســیاری از مطالعات در تلاش بودند تا بر روی نشـانگرهای زیسـتی تحقیق کنند. ییپ و همکاران یک مطالعه برروی ۱۷ بیمار با PTC مهاجم و ۱۵ بیمار با PTC غیرمهاجم انجام دادند. آن‌ها دریافتند که افزایش فعالیت mir های 31-، 153-، 222-، 221- و 146b- و کاهش فعالیت mir های 1-، 34b-، 130b- و 138- با میزان تهاجمی بودن PTC در ارتباط اســت. یافته‌های مطالعه‌ی حاضــر با یافته های این مطالعه از نظر افزایش بیان mir-146 و کاهش بیان mir-34 هم‌راستا بود (۱۰). یانگ و همکاران ۲۰ بیمار PTC تهاجمی و ۲۰ بیمار PTC غیر تهاجمی را در چین مورد مطالعه قرار دادند. آن ها افزایش بیان mir-146b-5p و mir-221/222 و کاهش بیان mir-16 و mir-613 را در PTC تهاجمی مشــاهده نمودند. در مقابل، مطالعه‌ی ما افزایش بیان را برای mir-16 در سرم نشـان داد. چنانچه خطای تکنیکال محتمل نباشـد، این تفاوت ممکن است ناشی از نقش‌های گسترده‌ی mir-16 مانند رشــد و در نتیجه تأثیرپذیری آن از عوامل مخدوشــگر و تفاوت‌های قومیتی باشــد. همچنین نتایج این مطالعه از جهت افزایش بیان mir-146 با مطالعه‌ی حاضــر هم‌راســتا بود (۱۱). لی و همکاران در اســترالیا در یافتند که در PTC، mir-222 و mir-146b دارای بیان بیش از حد می‌باشــند. آن‌ها از طریق مقایســه‌ی بافت تومور و سـرم ۹ بیمار PTC که سـرطان در آن ها مجدد شکل گرفته بود و ۱۷ بیمار غیر عود کننده نشان دادند که mir-222 و mir-146b در PTC بیان بیش از حد دارند. در این مطالعه نیز همانند مطالعه‌ی حاضــر mir-146 افزایش بیان نشــان‌داد؛ با این تفاوت که در مطالعه‌ی لی و همکاران گروه عود شده بررسی شده‌بود (۱۲). روزیگنولو و همکاران در ایتالیا ارتباط بین تنظیم mir-146b-5p و mir-222-3p با افزایش خطر عود را نشــان دادند. این نتیجه نیز از جهت افزایش بیان mir-146 با مطالعه‌ی حاضر هم‌راستا بود (۱۳).

همان‌گونه که بســیاری از مطالعات در جمعیت‌های مختلف نشـان دادند و ما نیز در جمعیت ایرانی به همان یافته رسیدیم، mir-146 قویاً با رفتار تهاجمی PTC در ارتباط بوده و این ارتباط مورد اجماع نظر پژوهشــگران می‌باشــد. محققین در ســال ۲۰۱۶ ,mir-146b را به عنوان نشانگر زیستی جدید در PTC معرفی کردند. آن ها معتقد بودند که این mir با حالت تهاجمی و پیش آگهی مرتبط اســت. مکانیســم‌های مختلفی برای نقش mir-146b در مسیرهای انکوژنیک پیشنهاد شده بود. یکی از آن ها این بود که mir-146b از طریق تنظیم کاهشی SMAD4 و در نتیجه مهار توقف چرخه سلولی، ضــد ســیگنال TGF-β را مهار می‌کند (۱۴). پیشــنهاد می‌شــود که این mir هم در جنبه‌های مختلف PTC از قبیل تشخیص، پیش‌آگهی، تعیین پلن درمان و پاسخ به درمان و هم در سایر سرطان‌های جامد بررسی شود و در صــورت حصــول نتایج مثبت کیت‌های اندازه‌گیری بیان آن به صورت دانش‌بنیان طرّاحی و تولید گردد.

مهم‌ترین محدودیت‌های این مطالعه محدودیت‌هایی هســتند که مرتبط با طرّاحی آن می‌باشــند. از جمله‌ی آن‌ها نداشــتن گروه کنترل ســالم یا کنترل با ندول خوش‌خیم اســت. امّا باید درنظر داشــت که این مطالعه اساساً برای تشخیص PTC از افراد سالم یا از افراد دارای ندول خوش‌خیم نبوده است. ایده‌ی طرّاحی این مطالعه از آن‌جایی شــکل گرفت که تعیین پلن درمانی در PTC و به خصوص در ندول‌های مشکوک چالش برانگیز بوده و موارد بســیار زیادی از over-diagnosis و over-treatment وجود دارد. محدودیت دیگر حجم نمونه‌ی پایین و درنتیجه تأثیرپذیری بیشــتر از ناهمگن بودن اطّلاعات دموگرافیک بیماران می‌باشــد. با این حال در مطالعه‌ی حاضــرعوامل دموگرافیک در دو گروه همگن بودند و ناهمگنی تعداد لنف نود های درگیر، اندازه‌ی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-21]

[DOI: 10.47176/rjms.31.39]

تومور و مرحله‌بندی TNM با توجّه به ارتباط آن‌ها با تهاجم تومور قابل توجیه بود. بسیاری از مطالعات گذشته نیز چنین محدودیتی داشته‌اند. لذا، پیشنهاد می‌گردد تا در ابتدا از شواهد به دست آمده از این مطالعات برای شناسایی خلأهای علمی استفاده شود و سپس در راستای خلأهای موجود مطالعات بزرگتری اجرا شوند.

نتیجه‌گیری

به طور کلی، مطالعه حاضر در یک جمعیت ایرانی، نتایج مطالعات قبلی را برای برخی از mir ها از جمله mir-146 تایید کرد. Mir ها می توانند به تمایز PTC تهاجمی از PTC غیرتهاجمی کمک کنند. به طور خلاصه، mir-16 افزایش بیان در خون، mir-34 کاهش بیان در خون و بافت تومور، mir-146 افزایش بیان در خون و بافت تومور، mir-877 کاهش بیان در خون و let-7 کاهش بیان معنادار در خون و بافت تومور نشان دادند. در میان mir های مورد مطالعه، mir-146 بیش‌از همه مورد اتّفاق نتیجه در این مطالعه و مطالعات گذشته بود. با توجّه به نقش قومیت‌ها به عنوان عامل مخدوشگر در مطالعات مولکولی، نیاز است چنین مطالعاتی در جمعیت های مختلف جهان به‌اجرا درآید. نقش پیش بینی کننده‌ی این بیومارکرها باید در مطالعات کوهورت با طرّاحی مناسب بررسی شود. با استفاده از مطالعات بیوانفورماتیک می‌توان سعی در تبیین مکانیسم‌های مرتبط نمود.

تقدیر و تشکر

بر خود لازم می‌دانیم که از مشارکت همه‌ی بیمارستان‌های نام‌برده بابت نمونه‌های مطالعه قدردانی کنیم. بدین وسیله از مرکز توسعه تحقیقات بالینی فیروزگر (FCRDC) دانشگاه علوم پزشکی ایران قدردانی می‌نماییم.

References

1. Salari N, Kazeminia M, Mohammadi M. The Prevalence of Thyroid Cancer in Iran: a Systematic Review and Meta-analysis. Indian J Surg Oncol. 2022 Mar;13(1):225–234.

2. Wartofsky L, Nostrand V, editors. Thyroid cancer, a comprehensive guide to clinical management 2nd edn. Ann R Coll Surg Engl. 2008;90(4): 360.

3. Gimm O. Thyroid cancer. Cancer letters. 2001 Feb 26;163(2):143-56.

4. Frasca F, Nucera C, Pellegriti G, Gangemi P, Attard M, Stella M, Loda M, Vella V, Giordano C, Trimarchi F, Mazzon E. BRAF (V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer. Endocrine-related Cancer. 2008 Mar 1;15(1):191.

5. Wojtowicz W, Balcerzak W, Mlynarz P. Metabolomics methods as a new diagnostic tool for thyroid nodules. Metabolomics: Open Access. 2016 Jan 1;2016.

6. Park JL, Kim SK, Jeon S, Jung CK, Kim YS. MicroRNA profile for diagnostic and prognostic biomarkers in thyroid cancer. Cancers. 2021 Feb 5;13(4):632.

7. Marini F, Luzi E, Brandi ML. MicroRNA role in thyroid cancer development. J Thyroid Res. 2011 Oct;2011.

8. Chou CK, Liu RT, Kang HY. MicroRNA-146b: a novel biomarker and therapeutic target for human papillary thyroid cancer. Int J Mol Sci. 2017 Mar 15;18(3):636.

9. Marotta V, Sciammarella C, Colao A, Faggiano A. Application of molecular biology of differentiated thyroid cancer for clinical prognostication. Endocr Relat Cancer. 2016 Nov 1;23(11):R499-515.

10. Yip L, Kelly L, Shuai Y, Armstrong MJ, Nikiforov YE, Carty SE, Nikiforova MN. MicroRNA signature distinguishes the degree of aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. Ann Surg Oncol. 2011 Jul;18(7):2035-41.

11. Yang Z, Yuan Z, Fan Y, Deng X, Zheng QI. Integrated analyses of microRNA and mRNA expression profiles in aggressive papillary thyroid carcinoma. Mol Med Rep. 2013 Nov 1;8(5):1353-8.

12. Lee JC, Zhao JT, Clifton-Bligh RJ, Gill A, Gundara JS, Ip JC, et al. MicroRNA-222 and MicroRNA-146b are tissue and circulating biomarkers of recurrent papillary thyroid cancer. Cancer. 2013 Dec 15;119(24):4358-65.

13. Rosignolo F, Memeo L, Monzani F, Colarossi C, Pecce V, Verrienti A, et al. MicroRNA-based molecular classification of papillary thyroid carcinoma. Int J Oncol. 2017 May 1;50(5):1767-77.

14. Saiselet M, Pita JM, Augenlicht A, Dom G, Tarabichi M, Fimereli D, et al. miRNA expression and function in thyroid carcinomas: a comparative and critical analysis and a model for other cancers. Oncotarget. 2016 Aug 9;7(32):52475.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-21]

[DOI: 10.47176/rjms.31.39]