

Association of *HOTAIR* (rs920778 C>T) Polymorphism with Thyroid Cancer Susceptibility in the Northwest of Iran

Majid Khalili Namarvar¹, Nasser Pouladi², Sara Ghaffarian³

1.MSc graduate, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. ORCID ID: 0000-0002-2629-0355

2.Associated Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. ORCID ID: 0000-0001-8125-5352

3.Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. (Corresponding Author) Tel: +98-41-31452070, Email: s.ghaffarian@azruniv.ac.ir, ORCID ID: 0000-0003-0385-8638.

ABSTRACT

Background and Aim: *HOTAIR* is a long noncoding RNA, that is transcribed from the antisense strand of the homeobox C gene and acts as an oncogene. The aim of this study was to assess the association of *HOTAIR* (rs920778 C>T) gene polymorphism with the risk of thyroid cancer in the northwest of Iran.

Materials and Methods: In this case-control study we investigated association of *HOTAIR* (rs920778 C>T) gene polymorphism with thyroid cancer susceptibility in a statistical population consisting of 109 patients and 198 healthy controls by PCR-PFLP. Statistical analysis was performed using javastat online statistics package and SPSS V.26.

Results: The frequency rates of TT, CC, and TC genotypes were 46.78%, 29.35%, and 23.85% in the case group, and 38.88%, 20.20%, and 40.90% in the control group respectively. Statistical analysis showed a significant association between TC genotype (p-value=0.003) (OR=0.452, CI 95%=0.268-0.764) and thyroid cancer risk. Also, C and T allele frequency rates, were 41.28% and 58.71% in the case group and 40.65% and 59.34% in the control group respectively. There was no significant relationship between T (p-value=0.088) and C (p-value=0.088) allele frequency rates and thyroid cancer risk in the northwest of Iran.

Conclusion: These findings suggested that rs920778 C>T polymorphism may be associated with increased susceptibility of thyroid cancer in the northwest of Iran. There was no significant association between rs920778C >T polymorphism and patient's pathological characteristics consisting of age, tumor grade, lymph node involvement, side involved, tumor size, tumor stage and type of thyroid tumor.

Keywords: Single nucleotide polymorphism, Thyroid cancer, *HOTAIR* gene, rs920778C>T, PCR-PFLP

Received: Feb 23, 2021

Accepted: Dec 21, 2021

How to cite the article: Majid Khalili Namarvar, Nasser Pouladi, Sara Ghaffarian. Association of *HOTAIR* (rs920778 C>T) Polymorphism with Thyroid Cancer Susceptibility in the Northwest of Iran. SJKU 2022;27(4):1-12.

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

همراهی چندشکلی *HOTAIR* (rs920778 C>T) در استعداد ابتلا به سرطان تیروئید در منطقه شمال غرب ایران

مجید خلیلی نمرور^۱، ناصر پولادی^۲، سارا غفاریان^۳

۱. فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. کد ارکید ۰۳۵۵-۲۶۲۹-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۲. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

کد ارکید: ۵۳۵۲-۸۱۲۵-۰۰۰۱-۰۰۰۰

۳. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. (نویسنده مسئول)، پست الکترونیک:

s.ghaffarian@azruniv.ac.ir، تلفن: ۰۴۱-۳۱۴۵۲۰۷۰، کد ارکید ۰۳۸۵-۸۶۳۸-۰۰۰۳-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: *HOTAIR* یک RNA غیرکدکننده بلند است که در جهت آنتی‌سنس از ژن *homeobox C* (*HOXC*) رونویسی می‌شود و نقش انکوژنیک دارد. این مطالعه با هدف بررسی همراهی چندشکلی *HOTAIR* (rs920778 C>T) با استعداد ابتلا به سرطان تیروئید در جمعیت شمال غرب ایران انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی، همراهی چندشکلی rs920778 ژن *HOTAIR* با استعداد ابتلا به سرطان تیروئید در جامعه آماری متشکل از ۱۰۹ مورد بیمار و ۱۹۸ فرد سالم با تکنیک PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل با استفاده از برنامه‌ی آماری آنلاین javastat و نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۶ انجام شد.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ‌های *TT*، *CC* و *TC* در بیماران به ترتیب ۴۶/۷۸، ۲۹/۳۵ و ۲۳/۸۵ درصد و فراوانی آن‌ها در افراد سالم مورد مطالعه به ترتیب ۳۸/۸۸، ۲۰/۲۰ و ۴۰/۹۰ درصد بود. تجزیه‌های آماری نشان دهنده همراهی ژنوتیپ *TC* با سرطان تیروئید ($P\text{-value} = ۰/۰۰۳$) ($OR = ۰/۴۵۲$ ، $CI\ 95\% = ۰/۲۶۸ - ۰/۷۶۴$) بود. فراوانی آلل‌های *C* و *T* در بیماران به ترتیب ۴۱/۲۸ و ۵۸/۷۱ درصد بود. در جمعیت کنترل فراوانی آلل‌های *C* و *T* به ترتیب ۴۰/۶۵ و ۵۹/۳۴ درصد بود. همچنین نتایج حاصل نشان دهنده عدم همراهی دو آلل *T* ($P\text{-value} = ۰/۰۸۸$) و *C* ($P\text{-value} = ۰/۰۸۸$) با سرطان تیروئید در شمال غرب ایران بود.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج حاصل چندشکلی rs920778 C>T می‌تواند با افزایش ریسک ابتلا به سرطان تیروئید همراهی داشته باشد. ارتباط بین ویژگی‌های پاتولوژیکی افراد مبتلا به سرطان تیروئید شامل سن بیماران، درجه تومور، درگیری لنف، سمت درگیر، اندازه تومور، مرحله تومور و نوع بیماری با توزیع ژنوتیپی این SNP معناداری نبود.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی تک نوکلوتیدی، سرطان تیروئید، ژن *HOTAIR*، rs920778، PCR-PFLP

وصول مقاله: ۹۹/۱۲/۵ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۰/۹/۲۹ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۳۰

مقدمه

تیروئید غده کوچکی با وزن متوسط ۱۰-۲۰ گرم است (۱) که از دو نوع سلول فولیکولی و پارافولیکولی تشکیل شده است و با تولید هورمون‌های تیروئیدی و کلسی‌تونین (۲) در کنترل سرعت متابولیسم و واکنش‌های بیوشیمیایی بدن دخیل بوده و بسیاری از عملکردهای ضروری آن مثل ضربان قلب، سرعت سوختن کالری‌ها، نگهداری پوست، رشد، تولید گرما، باروری و هضم را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۳).

سرطان تیروئید شایع‌ترین بدخیمی غدد درون ریز است و ۱-۲ درصد تمام موارد سرطان‌ها را تشکیل می‌دهد. میزان شیوع سرطان تیروئید بیشتر از هر بدخیمی دیگری در سال‌های اخیر افزایش داشته است و بروز افزایش یافته در هر دو جنس و تمام نژادها گزارش شده است (۴). براساس آمار انیستیتو سرطان ایران، سرطان تیروئید ۱/۸٪ کل سرطان‌ها و ۱/۷۶٪ سرطان‌های اندوکراین را تشکیل می‌دهد. میانگین سنی بیماران ایرانی ۴۳ سال و نسبت زن به مرد ۱/۸ به ۱ بوده است. در ایران سرطان تیروئید هفتمین سرطان شایع در زنان، چهاردهمین در مردان و یازدهمین سرطان شایع در هر دو جنس می‌باشد (۵). تشعشعات، فاکتورهای ژنتیکی، بیماری تیروئید زمینه‌ای، عوامل هورمونی (شیوع بیشتر در زنان) و فاکتورهای تغذیه‌ای به‌ویژه ید نقش مهمی در پاتوژنز سرطان تیروئید دارند. همچنین تفاوت‌های بارز نژادی و جغرافیایی در میزان بروز سرطان تیروئید وجود دارد (۶). واریانت‌های ژنتیکی که عمدتاً از پلی‌مورفیسم تک-نوکلئوتیدی تشکیل شده‌اند، می‌توانند تاثیرات مختلفی بر بیان یا عملکرد یک ژن خاص داشته باشند و با افزایش خطر ابتلا به سرطان‌های ارتباط نشان داده‌اند (۷ و ۸).

گره (Node) و سرطان‌های تیروئید از شایع‌ترین سرطان‌های مربوط به غدد درون ریز هستند (۹). میزان شیوع گره‌های تیروئید ۲۰-۷۰ درصد از جمعیت بالغین است (۱۰). فراوانی سرطان تیروئید در زنان سه برابر مردان است (۲۱) در مقابل ۷

مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر) اما در مقابل میزان مرگ در دو جنس مساوی است (۵/۰ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر) (۱۱). از لحاظ بافت‌شناسی انواع سرطان تیروئید در چهار گروه اصلی سرطان تیروئید تمایز یافته (WDTC: Well Differentiated Thyroid Cancer) (انواع کارسینومای تیروئید با پیش‌آگهی مثبت) (۱۲) با فراوانی حدود ۷۰-۸۰ درصد از کل سرطان‌های تیروئید، سرطان تیروئید آناپلاستیک (ATC: Anaplastic Thyroid Cancer) با فراوانی ۲ درصد کل سرطان‌های تیروئید (۱۳)، سرطان تیروئید کمتر تمایز یافته (PDTC: Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma) با فراوانی خیلی کم و پیش‌آگهی ضعیف (۱۴) و سرطان تیروئید مدولاری (MTC: Medullary Thyroid Carcinoma) تقسیم‌بندی می‌شوند (۱۵).

واریانت‌های ژنتیکی وراثتی رایج مثل چندشکلی‌های تک-نوکلئوتیدی (SNP) به عنوان بیومارکرهای قابل اندازه‌گیری در دسترس هستند (۱۶). توالی‌یابی و آنالیز گسترده ژنوم نشان می‌دهد که ۲ درصد از ژنوم به نواحی کدکننده پروتئین و بخش اعظم آن به RNA غیرکدکننده (ncRNA) رونویسی می‌شود. رونوشت‌های غیرکدکننده غیرپروتئینی با بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید تحت عنوان RNAهای غیرکدکننده بلند (lncRNA) شناخته می‌شوند، که از فاکتورهای اساسی طیف گسترده‌ای از فرآیندهای بیولوژیکی در سطح اپی‌ژنتیکی، رونویسی یا پس از رونویسی هستند و تنظیم‌کننده‌های مهم فعالیت‌های پاتوفیزیولوژیک نظیر رشد سلولی، تهاجم، آپوپتوز و متاستاز می‌باشند (۷ و ۸). *HOTAIR* (HOX antisense intergenic RNA) یک RNA غیرکدکننده بلند به طول ۲/۲ kb است و در جهت آنتی‌سنس از ژن *homebox C* (*HOXC*) در موقعیت کروموزومی 12q13.13 رونویسی می‌شود. مطالعات بالینی و بیوشیمیایی نشان داده است عدم تنظیم *HOTAIR* شاخص قدرتمند پیش‌آگهی ضعیف و

وجود نداشت، در این پژوهش همراهی این SNP با استعداد ابتلا به سرطان تیروئید در منطقه شمال غرب ایران مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه:

این مطالعه یک بررسی موردی-شاهدی بوده و جامعه مورد مطالعه در این پژوهش جمعیت شمال غرب ایران بود. نمونه-های مورد مطالعه شامل ۱۰۹ فرد مبتلا به سرطان تیروئید و ۱۹۸ فرد سالم بدون سابقه‌ی فامیلی سرطان در اقوام درجه یک و دو آن‌ها بود. نمونه‌گیری و ثبت مشخصات افراد با کسب اجازه از آن‌ها انجام شد. از هر فرد ۴ سی‌سی خون وریدی گرفته شده و تا زمان استخراج DNA در لوله‌های خون‌گیری حاوی EDTA و در یخچال نگهداری شدند.

استخراج DNA:

در این پژوهش استخراج DNA از خون وریدی به روش نمک اشباع انجام شد (۲۳). کمیت و کیفیت DNA به دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. سپس DNA استخراج شده با آب مقطر استریل رقیق شده و تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

تکنیک PCR-RFLP:

بررسی چند شکلی جایگاه C>T rs920778 ژن *HOTAIR* در جمعیت مورد مطالعه با استفاده از تکنیک Polymerase Chain Reaction-) PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism انجام شد. برای این منظور ابتدا تکثیر توالی هدف با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این جایگاه انجام شد. مشخصات و توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر توالی دربردارنده چند شکلی ژن *HOTAIR* با شماره rs920778 C>T در جدول ۱ و محل اتصال آن‌ها در ژنوم در شکل ۱ نشان داده شده است.

پیشرفت بدخیمی برای چندین سرطان از جمله سرطان‌های تخمدان، معده و ریه است. *HOTAIR* رونویسی بخش ترنس خوشه ژن *HOXD* روی کروموزوم ۲ را متوقف می‌کند و نقش انکوژنیک در توسعه سرطان انسان در بافت‌های متنوع دارد (۷ و ۸). مطالعات نشان می‌دهند که وجود SNP‌های مختلف در ژن *HOTAIR* باعث تغییر در عملکرد آن‌ها شده و در بعضی موارد با انواع مختلفی از سرطان‌ها از جمله سرطان تیروئید همراهی نشان می‌دهند.

برای اولین بار Zhu و همکاران (۲۰۱۶) همراهی آماری معنی‌دار چند شکلی rs920778 ژن *HOTAIR* با ریسک ابتلا به سرطان تیروئید پاپیلاری (Papillary Thyroid Cancer) را در زنان و نه مردان گزارش کردند (۱۷). Qichao Qi و همکاران (۲۰۱۶) همراهی معنی‌دار چند شکلی تک نوکلئوتیدی rs4759314 را با افزایش خطر سرطان معده گزارش کردند (۱۸). اما مطالعه‌ی Bayram و همکاران (۲۰۱۵)، نشان دهنده‌ی عدم همراهی چند شکلی تک نوکلئوتیدی rs920778 ژن *HOTAIR* با سرطان معده بود (۱۹). همچنین Yan و همکاران (۲۰۱۵) همراهی چند شکلی تک نوکلئوتیدی C>T rs920778 ژن *HOTAIR* با سرطان پستان را گزارش کردند (۲۰). اما مطالعه‌ی Gokmen-Polar و همکاران (۲۰۱۴) عدم همراهی بیان *HOTAIR* با متاستاز نودولی سرطان پستان و پارامترهای بالینی مورد مطالعه شامل سن، سایز و درجه تومور را نشان داد (۲۱).

با توجه به اهمیت Non-coding RNA و ژن *HOTAIR* در بروز سرطان‌های تیروئید به منظور انتخاب SNP هدف مطالعه مقاله‌های مرتبط با SNP‌های ژن *HOTAIR* مورد مطالعه قرار گرفت. چند شکلی تک نوکلئوتیدی C>T rs920778 از ژن *HOTAIR* در سال ۲۰۱۴ توسط پژوهشگران چینی شناسایی شد و در اینترون ۲ ژن *HOTAIR* در فاصله ۱۷۱۹+ تا ۲۳۵۳+ بازی از ناحیه آغاز رونویسی آن واقع شده است (۲۲). با توجه به اینکه هیچ گزارشی از SNP مورد مطالعه در جمعیت شمال غرب ایران

جدول ۱. مشخصات و توالی آغازگرهای مورد استفاده

نام آغازگر	توالی آغازگر	اندازه پرایمر
Forward	5' TTACAGCTTAAATGTCTGAATGTTCC 3'	۲۶
Reverse	5' TATGCGCTTTGCTTCCAGTT 3'	۲۰

استفاده از برنامه‌ی javastat online statistics package (http://statpages.org/ctab2x2.html) انجام شد. برای بررسی ارتباط بین ژنوتیپ‌ها و مشخصات بالینی بیماران شامل سن بیماران، درجه تومور، درگیری لنف، سمت درگیر، اندازه تومور، مرحله تومور و نوع بیماری با توزیع ژنوتیپی و همچنین شاخص میانگین از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۶ استفاده شد. در تمامی آزمون‌ها، $p < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. ملاحظات اخلاقی:

تمامی اطلاعات لازم از پرونده‌های بالینی بیماران استخراج و فرم رضایت انجام طرح تحقیقاتی توسط بیماران تکمیل‌گردیده بود. هیچ نوع مداخله اضافی از طرف محققین بر روی بیماران صورت نگرفت. تمامی اطلاعات بیماران کاملاً محرمانه بوده و در جایی نام و نشانی از آن‌ها ذکر نخواهد شد. این پژوهش با کد اخلاق به شماره IR.TBZMED.REC.1399.642 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز تصویب و در سامانه ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی ثبت شده است.

یافته‌ها

گروه کنترل شامل ۵۴ مرد و ۱۴۴ زن بودند. همه‌ی افراد گروه کنترل سالم بوده و در هیچ کدام از بستگان درجه‌ی اول و درجه‌ی دوم آن‌ها ابتلا به سرطان دیده نشده بود. در این پژوهش ۱۰۹ بیمار مبتلا به سرطان تیروئید مورد مطالعه قرار گرفتند. اطلاعات بالینی بیماران در جدول ۲ ذکر شده است. طول قطعات حاصل از واکنش PCR قبل از برش

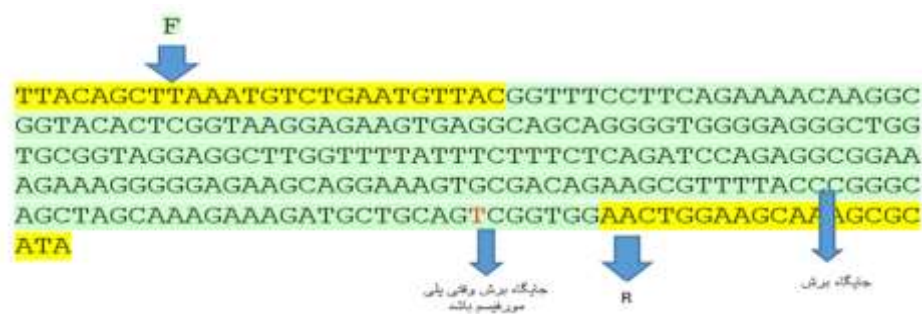
چرخه‌های حرارتی واکنش زنجیره پلیمرز شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۴۰ چرخه تکثیر در چرخه حرارتی شامل واسرشته سازی به مدت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال پرایمرها به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۵۴ درجه سلسیوس و بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت شناسایی چندشکلی تک نوکلئوتیدی جایگاه تشخیص آنزیم با استفاده از آنزیم MspI برش یافتند. واکنش در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام شد. برای این منظور ۰/۲ میکرولیتر آنزیم محدودکننده MspI، ۰/۷ میکرولیتر بافر Tango و ۴/۱ میکرولیتر آب دیونیزه به ۵ میکرولیتر محصول واکنش زنجیره پلی‌مراز اضافه شده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر تیمار شد. در نهایت محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و هضم آنزیمی به مدت ۱ ساعت، بر روی ژل آگارز ۳٪ الکتروفورز و با استفاده از DNA safe رنگ آمیزی شدند. تجزیه آماری:

با توجه به ماهیت مورد - شاهدهی مطالعه، تجزیه و تحلیل آماری نتایج بین افراد بیمار و سالم و زیرگروه‌های بیمار به صورت مقایسه‌ای انجام شد. ارتباط بین ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها بین گروه شاهد و بیمار با استفاده از آزمون مربع کای پیروسون بررسی شد. شدت ارتباط بین چند شکلی‌ها و ریسک ابتلا به سرطان با استفاده از نسبت شانس با فاصله‌ی اطمینان ۹۵٪ محاسبه گردید. تجزیه‌های آماری ذکر شده با

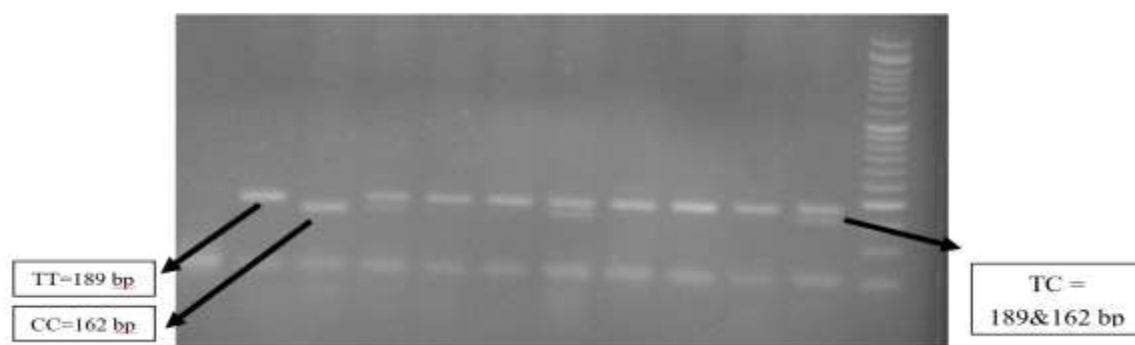
۱۸۹ جفت باز بود (شکل ۲).

توسط آنزیم *Msp I*، ۲۴۳ جفت باز بود. بعد از برش توسط

آنزیم اندازه نوار ال *C*، ۱۶۲ جفت باز و اندازه نوار ال *T*،



شکل ۱. موقعیت اتصال آغازگرهای رفت و برگشت در ژنوم



شکل ۲- الکتروفورز قطعات حاصل از هضم آنزیمی محصولات PCR افراد بیمار بر روی ژل آگارز ۲ درصد توزیع فراوانی ژنوتیپها و آللها بین دو گروه بیمار و سالم:

جدول ۲. مشخصات بالینی بیماران

ویژگی	تعداد بیماران	تعداد (%)
تعداد بیماران	زن	۸۱
	مرد	۲۸
سن	$38 <$	۶۱ (۵۵/۹۶)
	$38 \geq$	۴۸ (۴۴/۰۳)
سمت درگیر	راست	۳۸ (۵۲/۰۵)
	چپ	۲۶ (۳۵/۶۱)
	هر دو سمت	۹ (۱۲/۳۲)
	نامعلوم	۳۶ (۳۳/۰۲)
نوع بیماری	پاپیلاری	۷۲ (۶۹/۹۰)
	کارسینوما	۲۴ (۲۳/۳۰)
	فرلیکولار	۳ (۲/۹۱)
	آدنوما	۲ (۱/۹۴)
	فرلیکولار	۱ (۰/۹۷)
	کارسینوما	۱ (۰/۹۷)
	مدولاری	
	کارسینوما	
	هارتل سل	
	کارسینوما	
	Hashimoto thyroid	
درجه تومور	I	۶۶ (۸۱/۴۸)
	II	۵ (۶/۱۷)
	III	۸ (۹/۸۷)
	IV	۲ (۲/۴۶)
	نامعلوم	۲۸
اندازه تومور	$2/5 \leq$	۵۱ (۶۲/۹۶)
	$2/5 >$	۳۰ (۳۷/۰۳)
	نامعلوم	۲۸
درگیری لنف	N ₀	۳۶ (۸۵/۴۲)
	N ₁	۳۱ (۳۶/۹۰)
	NX	۱۷ (۲۰/۲۳)
	غیر قابل بررسی	۲۵

تعداد آکل C، ۹۰ (با فراوانی ۴۱/۲۸ درصد) و تعداد آکل T، ۱۲۸ (با فراوانی ۵۸/۷۱ درصد) بود. در بین ۱۹۸ فرد سالم مورد مطالعه به عنوان کنترل، فراوانی ژنوتیپ‌های TT، CC و TC به ترتیب ۷۷ (۳۸/۸۸ درصد)، ۴۰ (۲۰/۲۰) و ۸۱

از بین ۱۰۹ بیمار مورد بررسی بیشترین فراوانی به ترتیب متعلق به ژنوتیپ TT با فراوانی ۵۱ نفر (۴۶/۷۸ درصد)، ژنوتیپ CC با فراوانی ۳۲ نفر (۲۹/۳۵ درصد) و ژنوتیپ TC با فراوانی ۲۶ نفر (۲۳/۸۵ درصد) بود. در بین بیماران

(۴۰/۹۰) نفر بود. در جمعیت کنترل تعداد آلل C، ۱۶۱ (با فراوانی ۴۰/۶۵ درصد) و تعداد آلل T، ۲۳۵ (با فراوانی ۵۹/۳۴ درصد) بود. توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها در افراد بیمار و سالم در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳- توزیع فراوانی ژنوتیپ و آلل در افراد سالم و بیمار

ژنوتیپ آلل/	تیما (n=۱۰۹) (%)	کنترل (n=۱۹۸) (%)	P-value (کای اسکوتر)	OR (CI- 95%)
TT	۵۱ (۴۶/۷۸)	۷۷ (۳۸/۸۸)	۰/۱۷۹	۱/۳۸۲ (۰/۶۸۲ – ۲/۲۱۶)
TC	۲۶ (۲۳/۸۵)	۸۱ (۴۰/۹۰)	۰/۰۰۳	۰/۴۵۲ (۰/۲۶۸ – ۰/۷۶۴)
CC	۳۲ (۲۹/۳۵)	۴۰ (۲۰/۲۰)	۰/۰۷۰	۱/۶۴۲ (۰/۹۵۸ – ۲/۸۱۳)
T	۱۲۸ (۵۸/۷۱)	۲۳۵ (۵۹/۳۴)	۰/۸۸	۰/۹۷۴ (۰/۶۹۶ – ۱/۳۶۳)
C	۹۰ (۴۱/۲۸)	۱۶۱ (۴۰/۶۵)	۰/۸۸	۰/۹۷۴ (۰/۶۹۶ – ۱/۳۶۳)

اندازه تومور (P-value= ۰/۶۱۵) و درگیری غدد لنفی (P-value= ۰/۲۹۴) مشاهده نشد (جدول ۴). از ۱۰۹ بیمار مورد مطالعه اطلاعات مربوط به نوع تومور در ۱۰۳ بیمار در دسترس بود.

همراهی ژنوتیپی و آللی چند شکلی rs920778 با ابتلا به سرطان تیروئید:

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده همراهی ژنوتیپ TC با سرطان تیروئید (P-value= ۰/۰۰۳) (P-value= ۰/۷۶۴ – ۰/۲۶۸) ، 95% CI=۰/۴۵۲ OR و عدم همراهی ژنوتیپ‌های TT (P-value= ۰/۱۷۹) و CC (P-value= ۰/۰۷) با آن بود. همچنین بررسی همراهی آللی این چند شکلی با سرطان تیروئید نشان دهنده عدم همراهی این دو آلل T (۰/۰۸۸) و C (P-value= ۰/۰۸۸) با سرطان تیروئید در منطقه شمال غرب ایران بود. نتایج حاصل از بررسی‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است.

بررسی ارتباط چند شکلی rs920778 ژن HOTAIR با علائم بالینی:

با بررسی ارتباط چند شکلی rs920778 ژن HOTAIR با علائم بالینی بر اساس تجزیه‌های انجام شده ارتباط معنی داری بین توزیع فراوانی‌های ژنوتیپی چند شکلی rs920778 ژن HOTAIR و علائم بالینی شامل نوع تومور (۰/۳۱۲) (P-value= ۰/۳۴۴) ، درجه تومور (P-value= ۰/۶۴۲) ، سمت درگیر (P-value= ۰/۳۶۴) ،

جدول ۴- توزیع ژنوتیپی چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی

P-value	ژنوتیپ		
	CC (%)	TC (%)	TT (%)
درجه تومور			
۰/۳۴۴	(۸۵/۱۸) ۲۳	(۸۳/۳۳) ۱۵	(۶۸/۷۳) ۲۸
	(۱۱/۱۱) ۳	(۰) ۰	(۱۰/۵۲) ۴
	(۳/۷) ۱	(۱۶/۶۶) ۳	(۲/۲۶) ۲
	(۰) ۰	(۰) ۰	(۱۰/۵۲) ۴
سن			
۰/۳۶۴	(۵۴/۸۳) ۱۷	(۶۱/۵۳) ۱۶	(۴۵/۱) ۲۳
	(۴۵/۱۶) ۱۴	(۳۸/۴۶) ۱۰	(۵۴/۹) ۲۸
سمت درگیر			
۰/۶۴۲	(۶۰/۸۷) ۱۴	(۵۵/۵۵) ۱۰	(۴۳/۷۵) ۱۴
	(۳۰/۴۳) ۷	(۲۷/۷۷) ۵	(۴۳/۷۵) ۱۴
	(۸/۶۹) ۲	(۱۶/۶۶) ۳	(۱۲/۵) ۴
اندازه تومور			
۰/۶۱۵	(۶۹/۲۳) ۱۸	(۶۶/۶۶) ۱۲	(۵۵/۵۵) ۲۰
	(۳۰/۷۶) ۸	(۳۳/۳۳) ۶	(۴۴/۴۴) ۱۶
درگیری غدد لنفی			
۰/۲۹۴	(۵۳/۵۷) ۱۵	(۲۷/۷۷) ۵	(۴۳/۵۹) ۱۷
	(۲۵) ۷	(۵۵/۵۵) ۱۰	(۳۵/۸۹) ۱۴
	(۲۱/۴۲) ۶	(۱۶/۶۶) ۳	(۲۰/۵۱) ۸
مرحله تومور			
۰/۴۲۷	(۵۳/۸۴) ۱۴	(۴۶/۶۶) ۷	(۴۶/۸۷) ۱۵
	(۴۲/۳۰) ۱۱	(۴۶/۶۶) ۷	(۴۳/۷۵) ۱۴
	(۰) ۰	(۶/۶۶) ۱	(۱۸/۷۵) ۶
	(۳/۸۴) ۱	(۰) ۰	(۶/۲۵) ۲
نوع بیماری			
۰/۳۱۲	(۷۳/۳۳) ۲۲	(۵۷/۶۹) ۱۵	(۷۴/۴۶) ۳۵
	(۱۶/۶۶) ۵	(۳۸/۴۶) ۱۰	(۱۹/۱۴) ۹
	(۶/۶۶) ۲	(۰) ۰	(۲/۱۲) ۱
	(۳/۳۳) ۱	(۰) ۰	(۲/۱۲) ۱
	(۰) ۰	(۳/۸۴) ۱	(۰) ۰
	(۰) ۰	(۰) ۰	(۲/۱۲) ۱
پاپیلاری کارسینوما			
فرلیکولار آدنوما			
فرلیکولار			
کارسینوما			
مدولاری کارسینوما			
هارتل سل			
کارسینوما			
Hashimoto thyroid			

rs920778 C>T با مشخصات هیستوپاتولوژی بیماران

بحث

چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs920778 C>T
با سرطان پستان را نشان دادند (۲۸).

مطالعه‌ی Bayram و همکاران (۲۰۱۵)، بر روی همراهی چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs920778 C>T با سرطان معده ارتباط معنی داری بین آن‌ها نشان نداد (۱۹). همچنین مطالعه‌ی Gokmen-Polar و همکاران (۲۰۱۴) بر روی همراهی بیان *HOTAIR* با متاستاز نودولی سرطان پستان و پارامترهای بالینی مورد مطالعه شامل سن، سایز و درجه تومور نشان دهنده‌ی عدم ارتباط معنی داری بین آن‌ها بود (۲۱). چندشکلی تک نوکلئوتید به معنی تفاوت تک نوکلئوتیدی بین افراد جمعیت است، بنابراین یک SNP الی که در یک منطقه جغرافیایی یا گروه نژادی مشترک است، ممکن است بین دیگر گونه‌ها وجود نداشته باشد (۱۶). مطالعات نشان داده‌اند انواع چند شکلی تک نوکلئوتیدی، مانند چندشکلی‌های ناحیه تنظیمی و ناحیه کد کننده، احتمالاً منجر به جهش ژنی یا تغییر در ساختمان پروتئین می شود، که ارتباط نزدیکی با سرطان پستان دارد (۲۹). بر اساس مطالعات انجام شده درطیف وسیعی از بدخیمی‌های خونی و سرطانی، بیش از ۱۰۰۰ چندشکلی تک نوکلئوتیدی بطور قابل توجهی با سرطانهای انسانی ارتباط دارند. شناسایی SNPهای مرتبط با استعداد ابتلا به سرطان، باعث درک بیولوژیکی ما از تاثیر واریانت‌ها بر روی سرطان و کاربرد بالینی بیومارکرهای SNP می شود (۱۶). جهت نتیجه‌گیری بهتر و جامع تر لازم است ارتباط پلی مورفیسم rs920778 با ابتلا به سرطان تیروئید در جامعه آماری بزرگتری از افراد بیمار و سالم، بر روی اقوام مختلف با در نظر گرفتن نژاد و عرض جغرافیایی و به تفکیک انواع مختلف سرطان تیروئید مورد مطالعه قرار گیرد. همچنین مطالعه ارتباط این چندشکلی با بیان این ژن در بیماران مبتلا به سرطان تیروئید ضروری است.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه ژنوتیپ TC در جایگاه چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs920778، با سرطان تیروئید همراهی معنی - داری نشان داد ولی ژنوتیپ‌های هموزیگوت TT و TC در جمعیت شمال غرب ایران با سرطان تیروئید همراهی نشان نداد. علاوه بر این چندشکلی این جایگاه با هیچ یک از خواص پاتولوژیکی افراد بیمار شامل سن، درجه تومور، درگیری گره‌های لنفاوی، سمت درگیری (راست یا چپ)، اندازه تومور، مرحله تومور و نوع تومور همراهی موثری نداشت. برای اولین بار Zhu و همکاران (۲۰۱۶) نقش ژن *HOTAIR* و چندشکلی آن در سرطان تیروئید پاپیلاری (Papillary Thyroid Cancer: PTC) را مورد بررسی قرار دادند. بر این اساس این مطالعه بیان ژن *HOTAIR* در بافت PTC بیشتر از بافت سالم بوده و این ژن با القای ویژگی‌های سرطانی در سلول‌های PTC به عنوان یک آنکوژن عمل می کند. در این مطالعه بین چندشکلی ژنتیکی rs920778 و ریسک ابتلا به PTC فقط در زنان و نه مردان ارتباط آماری معنی داری مشاهده شد (۱۷). در مطالعه حاضر ارتباط معنی داری بین چندشکلی ژن *HOTAIR* با ریسک ابتلا به سرطان تیروئید در جمعیت متشکل از زنان و مردان مشاهده شد. Wang و همکاران (۲۰۱۸) همراهی معناداری بین چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs920778 و rs1899663 از ژن *HOTAIR* با استعداد ابتلا به سرطان ریه اولیه در مردان سیگاری (۲۴)، Li و همکاران (۲۰۱۷) همراهی چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs920778 ژن *HOTAIR* با ریسک ابتلا به کارسینومای هپاتوسلولار (HCC) (۲۵)، Pan و همکاران (۲۰۱۷) همراهی چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs920778 ژن *HOTAIR* با سرطان سر و گردن (۲۶)، Qi و همکاران (۲۰۱۶) همراهی چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs4759314 با افزایش خطر سرطان معده (۲۷) و Yan و همکاران (۲۰۱۵) همراهی

ریسک فاکتورهای نژادهای مختلف بصورت مستقل تعریف شوند.

تشکر و قدردانی

پژوهش فوق حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی با گرایش سلولی- مولکولی مصوب شورای تحصیلات تکمیلی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان به شماره ۸۲۸۶ در تاریخ ۹۷/۱۲/۲۸ است. این مطالعه در آزمایشگاه زیست شناسی سلولی - مولکولی گروه زیست دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و با بودجه اختصاص یافته معاونت پژوهش به پایان نامه دانشجو انجام یافته است. در این مطالعه تعارض منافع وجود ندارد. این پژوهش مصوب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز با کد اخلاق به شماره IR.TBZMED.REC.1399.642 است.

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه برخلاف ژنوتیپ‌های هموزیگوت، ژنوتیپ TC از جایگاه چندشکل rs920778 C>T ژن *HOTAIR* همراهی معناداری با افزایش ریسک ابتلا به سرطان تیروئید در جمعیت شمال غرب ایران دارد. اما هیچ یک از ژنوتیپ‌های مورد نظر همراهی معناداری با ویژگی‌های پاتولوژیکی افراد بیمار شامل سن بیماران، درجه تومور، درگیری لنف، سمت درگیر، اندازه تومور، مرحله تومور و نوع بیماری نداشتند. با توجه به مطالعات انجام شده و همراهی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی ژن *HOTAIR* با سرطان‌های مختلف و تفاوت در همراهی یا عدم همراهی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی بین جمعیت‌های متفاوت لازم است ارتباط چند شکلی rs920778 با ابتلا به سرطان تیروئید در جامعه آماری بزرگتری از افراد بیمار و سالم و نژادهای مختلف بصورت مستقل مورد مطالعه قرار گرفته و

منابع

1. Liyanarachchi KD, Debono M, Physiology of the pituitary, thyroid, parathyroid and adrenal glands. Surgery. 2017; 35(10): 542-55.
2. Nilsson M, Fagman H. Development of the thyroid gland. Development. 2017; 144(12): 2123-40.
3. Jerome M, Hershman MD, David MS. Overview of the Thyroid Gland. Geffen School of Medicine, UCLA. 2019.
4. Deandrea M, Gallone G, Veglio M, Balsamo A, Grassi A, Sapelli S, et al. Thyroid cancer histotype changes as observed in a major general hospital in a 21-year period. J Endocrin Invest. 1997; 20: 52-8.
5. Akbari M, Abachizadeh K, Khayamzadeh M, Tabatabaee M, Madjd Z, Esna Ashari F, et al. Iran cancer report. 1 st ed. Cancer Research Center. Shahid Beheshti University of Medical Sciences. Tehran. Iran. 2008; 101-6.
6. Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Gao YT, Ferlay J. Cancer incidence in five continents. Lyon: IARC Sci Pub. 1992; 146-7.
7. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. Nat Rev Genet. 2009; 10(3): 155-159.
8. Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. Cell. 2009; 136(4): 629-641.
9. Shokri Z, Khoshbin M, Koohpayeh A, Abbasi N, Bahmani F, Rafieian-Kopaei M, et al. Thyroid diseases: Pathophysiology and new hopes in treatment with medicinal plants and natural antioxidants. Int J Green Pharm. 2018; 12 (3): S482.
10. Marqusee E, Benson CB, Frates MC, Mary C, Frates MD, Peter M., et al. Usefulness of ultrasonography in the management of nodular thyroid disease. Ann Intern Med. 2000; 133(9): 696-700.
11. Daniela Grimm. Current Knowledge in Thyroid Cancer-From Bench to Bedside. Int J Mol Sci. 2017; 18(7): 1529
12. Sherman SI, Thyroid carcinoma. Lancet. 2003; 361: 501-11.

13. Tiedje V, Schmid KW, Weber F, Bockisch A, Fuhrer D. Differentiated thyroid cancer. *Internist*. 2015; 56: 153–166.
14. Sasanakietkul T, Murtha TD, Javid M, Korah R, Carling T. Epigenetic modifications in poorly differentiated and anaplastic thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2017; 469: 23-37.
15. Katoh H, Yamashita K, Enomoto T, Watanabe M. Classification and general considerations of thyroid cancer. *Ann Clin Pathol*. 2015; 3:1045.
16. Stracquadanio G, Wang X, Wallace MD, Grawenda AM, Zhang P, Hewitt J, et al. The importance of p53 pathway genetics in inherited and somatic cancer genomes. *Nat rev Cancer*. 2016; 16: 251-265.
17. Zhu H, Lv Z, An C, Shi M, Pan W, Zhou L, et al. Onco-lncRNA *HOTAIR* and its functional genetic variants in papillary thyroid carcinoma. *Sci Rep*. 2016; 6: 31969
18. Qi Q, Wang J, Huang B, Chen A, Li G, Li X, et al. Association of *HOTAIR* polymorphisms *rs4759314* and *rs920778* with cancer susceptibility on the basis of ethnicity and cancer type. *Oncotarget*. 2016; 7(25): 38775-84.
19. Bayram S, Ülger Y, Sümbül AT, Kaya BY, Rencüzoğulları A, Genç A, et al. A functional *HOTAIR* *rs920778* polymorphism does not contribute to gastric cancer in a Turkish population: a case-control study. *Fam Cancer*. 2015; 14(4): 561-7.
20. Yan R, Cao J, Song C, Chen Y, Wu Z, Wang K, Dai L. Polymorphisms in lncRNA *HOTAIR* and susceptibility to breast cancer in a Chinese population. *Cancer epidemiol*. 2015; 39: 978-985.
21. Gołkmen-Polar Y, Tudor Vladislav I, Neelamraju Y, Janga SC, Badve S. Prognostic impact of *HOTAIR* expression is restricted to ER-negative breast cancers. *Sci rep*. 2014; 5: 1-6.
22. Zhang X, Zhou L, Fu G, Sun F, Shi J, Wei J, et al. The identification of an ESCC susceptibility SNP *rs920778* that regulates the expression of lncRNA *HOTAIR* via a novel intronic enhancer. *Carcinogenesis*. 2014; 35: 2062-67.
23. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16 (3): 1215,
24. Wang C, Li Y, Li YW, Zhang HB, Gong H, Yuan Y, et al. *HOTAIR* lncRNA SNPs *rs920778* and *rs1899663* are associated with smoking, male gender, and squamous cell carcinoma in a Chinese lung cancer population. *Acta Pharmacol Sin*. 2018; 39(11): 1797-803.
25. Li H, Tang XM, Liu Y, Li W, Chen Q, Pan Y. Association of Functional Genetic Variants of *HOTAIR* with Hepatocellular Carcinoma (HCC) Susceptibility in a Chinese Population. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 44(2): 447-54.
26. Pan W, Wu C, Su Z, Duan Z, Li L, Mi F, et al. Genetic polymorphisms of non-coding RNAs associated with increased head and neck cancer susceptibility. *Oncotarget*. 2017; 8(37): 62508-23.
27. Qi Q, Wang J, Huang B, Chen A, Li G, Li X, et al. Association of *HOTAIR* polymorphisms *rs4759314* and *rs920778* with cancer susceptibility on the basis of ethnicity and cancer type. *Oncotarget*. 2016; 7(25): 38775-84.
28. Yan R, Cao J, Song C, Chen Y, Wu Z, Wang K, Dai L. Polymorphisms in lncRNA *HOTAIR* and susceptibility to breast cancer in a Chinese population. *Cancer epidemiol*. 2015; 39: 978-985.
29. Yuan P, Liu D, Deng M. Identification of differently expressed genes with specific SNP loci for breast cancer by the integration of SNP and gene expression profiling analyses. *Pathol Oncol Res*. 2015; 21(2): 469-75.