

## Association between KRAS Gene rs61764370 Polymorphism and Risk of developing Hashimoto's Thyroiditis

Nasser Keikha<sup>1</sup>, Mohsen Saravani<sup>2</sup>

1. Assistant Professor of Medical Mycology, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Research Institute of Cellular and Molecular Sciences in Infectious Diseases, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran. ORCID ID: 0000-0002-3328-7912

2. Assistant Professor of Clinical Biochemistry, Department of Biochemistry, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran. (Corresponding Author). Tel: 05433295706, Email:moh.saravani@gmail.com ORCID ID: 0000-0001-8492-673x

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Hashimoto's thyroiditis (HT) is the most common autoimmune thyroid disease, characterised by the destruction of the thyroid gland due to the production of autoantibodies against thyroid peroxidase and thyroglobulin. Studies have shown the interaction between some genetic changes in the cell and environmental factors as one of the risk factors for the occurrence of HT. The aim of the present study was to investigate the relationship between the rs61764370 polymorphism in the KRAS gene and the risk of development of HT.

**Materials and Methods:** 120 HT patients and 120 healthy controls who had been matched in regard to age and gender participated in this study. PCR-RFLP method was used to determine the genotypes.

**Results:** The frequency rates of AA, AC and CC genotypes were 87.5%, 8.5% and 6.7% in the control group, and 93.3%, 5.3% and 0.8% in the patient group respectively. Our results showed that the frequency of CC genotype was significantly higher in the control group than that in the patient group ( $P \leq 0.05$ ).

**Conclusion:** Our results suggested the protective effect of the CC genotype and C allele of the rs61764370 polymorphism in the KRAS gene on the development of HT.

**Keywords:** Hashimoto's thyroiditis, KRAS, Polymorphism, Zahedan

**Received:** Jan 3, 2023

**Accepted:** July 5, 2023

**How to cite the article:** Nasser Keikha, Mohsen Saravani. Association between KRAS Gene rs61764370 Polymorphism and Risk of developing Hashimoto's Thyroiditis. *SJKU* 2024;29(1):1-8.

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

## ارتباط بین پلی مورفیسم $61764370$ ژن KRAS و ریسک ابتلاء به تیروئیدیت هاشیموتو

ناصر کیخا<sup>۱</sup>، محسن سراوانی<sup>۲</sup>

۱. استادیار قارج شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، پژوهشکده علوم سلولی، مولکولی در بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران. کد ارکید: ۷۹۱۲-۳۳۲۸-۰۰۰۲-۰۰۰۰-۰۰۰۰

۲. استادیار یوشیمی بالینی، گروه یوشیمی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران. (نویسنده مسئول) تلفن ثابت: ۰۵۴-۳۳۲۹۵۷۰۶، E-mail: moh.saravani@gmail.com، کد ارکید: ۶۷۳۳-۸۴۹۲-۰۰۰۱-۰۰۰۰-۰۰۰۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** تیروئیدیت هاشیموتو شایع‌ترین بیماری خود ایمنی تیروئید است که با تخریب غده تیروئید به واسطه تولید اتوآنتی بادی بر علیه تیروپراکسیداز و تیروگلوبولین مشخص می شود. مطالعات برهمکنش بین برخی تغییرات ژنتیکی در سلول و عوامل محیطی را به عنوان یکی از ریسک فاکتورهای بروز این بیماری گزارش نموده‌اند. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم  $61764370$  ژن KRAS و ریسک ابتلاء به تیروئیدیت هاشیموتو بود.

**مواد و روش‌ها:** ۱۲۰ فرد مبتلا به تیروئیدیت هاشیموتو و ۱۲۰ فرد سالم که از لحاظ سن و جنس همسان سازی شده بودند، در این پژوهش شرکت کردند. از روش PCR-RFLP برای تعیین نوع ژنوتیپ‌ها استفاده شد.

**یافته‌ها:** فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AC و CC در گروه کنترل به ترتیب  $87/5\%$ ،  $11/5\%$  و  $1/0\%$  و در گروه بیماران  $93/3\%$ ،  $5/3\%$  و  $2/0\%$  بود. همچنین فراوانی ژنوتیپ CC بطور معنی داری در گروه کنترل بیشتر از گروه بیماران بود ( $P \geq 0/05$ ).

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ CC و آلل C پلی مورفیسم  $61764370$  ژن KRAS اثر محافظتی در بروز تیروئیدیت هاشیموتو دارند.

**کلمات کلیدی:** تیروئیدیت هاشیموتو، KRAS، پلی مورفیسم، زاهدان

وصول مقاله: ۱۴۰۱/۱۱/۱۱ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۲/۴/۱۴ پذیرش: ۱۴۰۲/۴/۱۴

## مقدمه

عملکرد طبیعی غده تیروئید برای رشد و تکامل سیستم عصبی و همچنین رشد در دوران کودکی و نوجوانی مهم است. اختلالات غده تیروئید رایج بوده و تشخیص بر اساس یافته‌های بالینی به همراه بررسی‌های آزمایشگاهی و رادیولوژی انجام می‌گردد. اختلالات اصلی غده تیروئید عبارتند از: گواتر (منتشر یا ندولار)، کم‌کاری تیروئید، پرکاری تیروئید، تیروئیدیت اتوایمیون و نئوپلاسم‌های تیروئید (۱). بیماری تیروئید خود ایمن شایع‌ترین علت اختلال عملکرد اکتسابی تیروئید است که معمولاً به صورت تیروئیدیت هاشیموتو یا بیماری گریوز بروز می‌کند (۲). تیروئیدیت هاشیموتو، تیروئیدیت لنفوسیتی مزمن یا خود ایمنی، یکی از بیماری‌های تیروئید با شیوع حدود ۱۰ تا ۱۲ درصد و شیوع فزاینده است و به عنوان شایع‌ترین اختلال تیروئید در سراسر جهان در نظر گرفته می‌شود. شیوع آن در زنان بیشتر از مردان است. ویژگی‌های اصلی تیروئیدیت هاشیموتو، نفوذ لنفوسیتی به غده تیروئید است که باعث تخریب بافت پیشرونده و تولید آنتی‌بادی‌های ضد تیروئید، آنتی‌بادی‌های پراکسیداز تیروئید (anti-TPO) و آنتی‌بادی‌های تیروگلوبولین (anti-Tg) می‌شود (۳). هاشیموتو در سال ۱۹۱۲ توسط هاکارو هاشیموتو توصیف شد؛ اما تا دهه ۱۹۵۰ جنبه خود ایمنی آن نشان داده نشد. علت اصلی بروز و پاتوژنز تیروئیدیت هاشیموتو هنوز بطور کامل مشخص نیست، با این حال، اخیراً مطالعات برهمکنش بین فاکتور محیطی و ژنتیکی در بروز آن را نشان داده‌اند (۴). ژن RAS که پروتئینی با فعالیت GTPase را کد می‌کند، به‌عنوان یک انکوژن تقریباً در ۱۹ درصد موارد نئوپلازی جهش یافته است. این پروتئین در فرایندهای مختلف سلولی مانند تکثیر، تمایز و تکامل نقش دارد (۵). خانواده ژن RAS شامل به عضو HRAS، KRAS و NRAS است. در انسان جهش KRAS اولین بار در سلول‌های سرطان ریه شناسایی شد (۶). در سیستم ایمنی KRAS در خون‌سازی

نقش دارد. جهش‌های آن می‌توانند با برهم زدن مسیر پیام‌رسانی RAS/MAPK تولید اتوآنتی‌بادی توسط لنفوسیت‌های B را تحریک کنند (۷). ارتباط جهش‌های KRAS با بیماری‌هایی مانند SLE (۷)، پانکراتیت خود ایمن (۸) پیشنهاد شده است. دو کپی از ژن KRAS در انسان وجود دارد: ۲KRAS در لوکوس ۱۲p۱۲-۱۱ و سودوژنی تحت عنوان ۱KRAS در لوکوس ۱۲p۱۲-۱۱ (۹). یکی از پلی مورفیسم‌های شناخته شده در ژن KRAS پلی مورفیسم ۶۱۷۶۴۳۷۰rs است که با جابجایی آلل T با آلل G در ۳-UTR منجر به مهار اتصال ۷-Let و افزایش فعالیت و بیان KRAS می‌گردد (۱۰). ارتباط این پلی مورفیسم با چندین نوع سرطان مورد بررسی قرار گرفته است (۱۱)، مطالعه حاضر اولین مطالعه به جهت بررسی تأثیر پلی مورفیسم ۶۱۷۶۴۳۷۰rs ژن KRAS بر تیروئیدیت هاشیموتو است.

## مواد و روش‌ها

پس از کسب رضایت آگاهانه، تعداد ۱۲۰ فرد مبتلا به تیروئیدیت هاشیموتو و تعداد ۱۲۰ فرد سالم که از لحاظ سن و جنس با گروه بیماران همسان سازی شده‌اند وارد مطالعه شدند. تظاهرات بالینی و نتایج آزمایشگاهی برای تشخیص بیماران مبتلا به HT که به کلینیک غدد و متابولیسم بیمارستان علی بن ابیطالب زاهدان، مراجعه کرده بودند، توسط متخصص غدد برای تشخیص مورد استفاده قرار گرفت. در هر دو گروه افراد مبتلا به هر نوع بیماری سیستمیک، التهابی و خودایمن (بجز HT در گروه بیماران) و در گروه کنترل نیز افراد با سابقه خانوادگی ابتلاء به HT از وارد مطالعه نشدند. کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی زاهدان پروتکل مطالعه را تأیید و کلیه شرکت‌کنندگان رضایت کتبی ارائه کردند. ۲ میلی لیتر خون حاوی EDTA جمع‌آوری شد و روش Salting out برای استخراج DNA استفاده شد. کیفیت استخراج DNA به دو روش

آزمون تی مستقل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای ارزیابی اثرات پلی مورفیسم بر خطر ابتلاء به تیروئیدیت هاشیموتو از روش لجستیک رگرسیون استفاده شد.  $P > 0/05$  از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

#### یافته ها

جدول ۱ حاوی اطلاعات مربوط به خصوصیات دموگرافیک و بالینی گروه کنترل و گروه بیماران است. دو گروه از لحاظ جنسیت و سن همسان سازی شدند (به ترتیب  $P=0/078$ ،  $P=0/066$ ). میانگین سن ابتلا  $31/4 \pm 7/10$  بود. ۳۲/۵ درصد مبتلایان دارای سابقه خانوادگی ابتلاء و ۸/۴ درصد هم دارای سابقه مصرف دخانیات بودند. دو گروه از لحاظ جنسیت و سن همسان سازی شدند (به ترتیب  $P=0/078$ ،  $P=0/066$ ). میانگین سن ابتلاء  $31/4 \pm 7/10$  بود. ۵/۳۲ درصد مبتلایان دارای سابقه خانوادگی ابتلاء و ۴/۸ درصد هم دارای سابقه مصرف دخانیات بودند. جدول شماره ۲ توزیع فراوانی ژنوتیپ ها و آلل های پلی مورفیسم KRAS را نشان می دهد. فراوانی ژنوتیپ های AA، AC و CC در گروه کنترل به ترتیب ۵/۸۷٪، ۸/۵٪ و ۷/۶٪ و در گروه بیماران ۳/۹۳٪، ۳/۵٪ و ۰/۸٪ بود. فراوانی ژنوتیپ CC بطور معنی داری در گروه کنترل بیشتر از گروه بیماران بود و این ژنوتیپ احتمالاً به عنوان فاکتور حفاظت کننده در برابر ریسک ابتلاء به تیروئیدیت هاشیموتو عمل می کند ( $P=0/045$ ). نتایج مشابه (به ترتیب با  $P=0/045$ ،  $P=0/016$ ) در مورد مدل ژنتیکی مغلوب و توزیع آلی به دست آمد.

سنجش نسبت جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر به طول موج ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز بروی ژل آگارز مورد تأیید قرار گرفت. از روش PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) برای آنالیز ژنوتیپ ها استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR عبارت بود از: - Forward primer: 5'-GAGCTGGCACAGAGACCAAAC-3' و Reverse primer: 3'-CAGGCGTGTGCCACTACT-5'. شرایط واکنش PCR به شرح زیر است: ابتدا به جهت دناتوراسیون اولیه یک مرحله در ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۳ دقیقه انجام شد. سپس یک مرحله با ۳۰ سیکل تکرار با شرایط ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه. ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام و در نهایت به جهت تکثیر نهایی یک مرحله در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه صورت پذیرفت. محصول PCR دارای طول ۳۵۷ جفت باز است که در اثر جابجایی آلل C با A جایگاه برش برای آنزیم محدودالایر Hinf I (با جایگاه برش G<sup>A</sup>ANTC ایجاد می شود. طول قطعات هضم شده آنزیمی عبارت بود از: ژنوتیپ CC: ۳۵۷ جفت باز و ژنوتیپ AA: دو قطعه ۲۵۷ و ۱۰۰ جفت باز که بروی ژل آگارز یک درصد حاوی safe stain قابل مشاهده است.

#### آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری توسط SPSS نسخه ۲۳.۰ انجام شد. متغیرهای کیفی و کمی به ترتیب با استفاده از آزمون کای و

جدول ۱: ویژگی های دموگرافیک و بالینی بیماران هاشیموتو و کنترل ها

P-value	نمونه های کنترل تعداد: ۱۲۰ نفر	بیماران هاشیموتو تعداد: ۱۲۰ نفر	ویژگی های دموگرافیک و بالینی
066/0	7/36±7/11	2/11±97/33	سن
078/0	(6/16) 20 (4/83) 100	(3/8) 10 (7/71) 110	جنس مذکر (درصد)

		مؤنث (درصد)	
		شاخص توده بدنی	
		8/5±7/26	(کیلوگرم/مترمربع)
		7/10±4/31	سن
		(5/32) 39	سابقه خانوادگی (درصد)
		(4/8) 11	مصرف دخانیات (درصد)
		013/0±485/0	<b>Free T4 (ng/dl±SEM)</b>
		034/0±63/1	<b>Free T3 (pg/ml ±SEM)</b>
0001/0>	119/0 ± 5/2	64/2±23/60	<b>TSH (mU/L±SEM)</b>
		آنتی بادی پراکسیداز تیروئید	
		56/44±20/457	<b>TPOAb ) (IU/ml±SEM)</b>
		آنتی بادی های تیروگلوبولین	
		6/128±9/729	<b>IU/ml±SEM)</b>

• این نتایج به واسطه تکمیل فرم‌های اطلاعاتی و آنالیزهای آزمایشگاهی جمع آوری شده است.

جدول ۲: فراوانی آللی و ژنوتیپی پلی مورفیسم‌های rs ۹۲۰۷۷۸HOTAIR و rs ۳۷۴۱۲۱۹H-19 در مبتلایان به تیروئیدیت هاشیموتو (HT) و گروه کنترل

OR(95%CI)	P-value	کنترل تعداد (درصد)	هاشیموتو تعداد (درصد)	پلی مورفیسم
<b>KRAS rs61764370</b>				
<b>Codominant</b>				
1		(5/87) 105	(3/93) 112	AA
(7/2-31/0) 93/0	907/0	(8/5) 7	(9/5) 7	AC
(95/0-01/0) 11/0	045/0	(7/6) 8	(8/0) 1	CC
<b>Dominant</b>				
1		(5/87) 105	(3/93) 112	AA
(22/1-3/0) 5/0	13/0	(5/12) 15	(7/6) 8	AC+CC
<b>Recessive</b>				
1		(3/93) 112	(2/99) 119	AA+AC
(95/0-014/0) 11/0	045/0	(7/6) 8	(8/0) 1	CC
<b>Overdominant</b>				
1		(2/48) 113	(4/65) 113	CC+AA
1 (9/2-34/0)	1	(8/51) 7	(6/34) 7	AC
<b>آل</b>				
1		(4/90) 217	(2/96) 231	A
(8/0-16/0) 36/0	016/0	(6/9) 23	(8/3) 9	C

نتایج جدول ۲ توسط آنالیزهای آزمایشگاهی به روش PCR-RFLP به دست آمده است.

## بحث

تیروئیدیت هاشیموتو شایع ترین بیماری خود ایمن تیروئید بوده که با تخریب غده تیروئید به واسطه تولید اتوآنتی بادی بر علیه تیروپراکسیداز و تیروگلوبین مشخص می شود. اگرچه مکانیسم خود ایمنی به عنوان یک مکانیسم مهم در پاتوژنز آن پیشنهاد شده است، با این علت دقیق بروز هنوز به طور کامل مشخص نشده و نیاز به بررسی بیشتری دارد. مطالعات برهمکنش بین برخی تغییرات ژنتیکی در سلول و فاکتور های محیطی مانند مصرف دخانیات را به عنوان یکی از ریسک فاکتورهای بروز تیروئیدیت هاشیموتو گزارش نمودند (۳). پلی مورفیسم ژنتیکی به وقوع دو یا چند آلل در یک موقعیت ژنی با شیوع بیشتر از یک درصد در جمعیت معین اشاره دارد. پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNP) شایع ترین فرم پلی مورفیسم هستند (۱۲). SNP ممکن است در ناحیه کد کننده یا غیر کد کننده رخ بدهد. آن‌ها ممکن است بر فعالیت پروموتور (بیان ژن)، پایداری mRNA و موقعیت درون سلولی mRNA ها و/یا پروتئین ها تأثیر گذاشته و منجر به تغییر در استعداد ژنتیکی در ابتلاء به بیماری‌ها شوند؛ بنابراین، شناسایی آن‌ها ممکن است منجر به درک بهتر تأثیر آن‌ها بر عملکرد ژن و سلامت فرد شود (۱۳). مطالعات متعددی ارتباط بین ریسک بروز تیروئیدیت هاشیموتو و پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی در ژن های مانند TNF- $\alpha$  (۱۴)، رسپتور اینترلوکین ۲۳- (۱۵)، miRNA-۴۹۹ (۱۶)، اینترلوکین ۱- بتا و سیکلواکسیژناز-۲ (۱۷) را گزارش نموده‌اند. KRAS پروتئینی با فعالیت GTPase که در فرایندهایی مانند تکثیر و تمایز سلولی نقش دارد جهش‌های آن می‌توانند با بر هم زدن مسیر پیام‌رسانی RAS/MAPK تولید اتوآنتی بادی توسط لنفوسیت های B را تحریک کنند (۷). ارتباط جهش‌های

KRAS با بیماری هایی مانند SLE (۷)، پانکراتیت خود ایمن (۸) پیشنهاد شده است.

برای اولین بار، نتایج ما اثر حفاظتی ژنوتیپ CC پلی مورفیسم ۶۱۷۶۴۳۷۰rs ژن KRAS بر ریسک ابتلاء به تیروئیدیت هاشیموتو را پیشنهاد کرد. پلی مورفیسم ۶۱۷۶۴۳۷۰rs ژن KRAS یکی از شناخته شده ترین پلی مورفیسم های ژن KRAS بوده که با افزایش فعالیت پروتئین KRAS مرتبط است. ارتباط این پلی مورفیسم با بروز بیماریهایی مانند سرطان پستان (۱۸)، سرطان تخمدان (۱۹) و سرطان ریه (۲۰) را گزارش کرده‌اند. Ning و همکاران ارتباط بین پلی مورفیسم های ژن KRAS و ریسک ابتلاء به سرطان پاپیلاری تیروئید و علائمی مانند گواتر را در جمعیت چین گزارش نمودند (۲۱). Al-salam و همکاران همچنین در موارد متعددی از مبتلایان به سرطان پاپیلاری تیروئید جهش‌های ژن KRAS را شناسایی کردند (۲۲).

## نتیجه گیری

این مطالعه برای اولین بار ارتباط بین پلی مورفیسم ۶۱۷۶۴۳۷۰rs ژن KRAS و ریسک ابتلاء به تیروئیدیت هاشیموتو را پیشنهاد نمود. با این حال، مطالعات در جامعه آماری بزرگ تر و نژادهای متنوع به جهت تأیید نتایج حاصل از این پژوهش مورد نیاز است.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله اظهار می‌نمایند هیچ گونه تعارض منافی در چاپ این پژوهش ندارند. این طرح توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی زاهدان (IR.ZAUMS.REC.1398.206) تأیید و حمایت شد.

## منابع

1.Boelaert K, Franklyn JA. Thyroid hormone in health and disease. J Endocrinol. 2005 Oct;187(1):1-15. doi: 10.1677/joe.1.06131. PMID: 16214936.

2. Kyritsi EM, Kanaka-Gantenbein C. Autoimmune Thyroid Disease in Specific Genetic Syndromes in Childhood and Adolescence. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Aug 19;11:543. doi: 10.3389/fendo.2020.00543. PMID: 32973676; PMCID: PMC7466763.
3. Cvek M, Kaličanin D, Barić A, Vuletić M, Gunjača I, Torlak Lovrić V, Škrabić V, Punda A, Boraska Perica V. Vitamin D and Hashimoto's Thyroiditis: Observations from CROHT Biobank. *Nutrients*. 2021 Aug 15;13(8):2793. doi: 10.3390/nu13082793. PMID: 34444953; PMCID: PMC8401592.
4. Pyzik A, Grywalska E, Matyjaszek-Matuszek B, Roliński J. Immune disorders in Hashimoto's thyroiditis: what do we know so far? *J Immunol Res*. 2015;2015:979167. doi: 10.1155/2015/979167. Epub 2015 Apr 27. PMID: 26000316; PMCID: PMC4426893.
5. Johnson DS, Chen YH. Ras family of small GTPases in immunity and inflammation. *Curr Opin Pharmacol*. 2012 Aug;12(4):458-63. doi: 10.1016/j.coph.2012.02.003. Epub 2012 Mar 7. PMID: 22401931; PMCID: PMC3374043.
6. Tang D, Kroemer G, Kang R. Oncogenic KRAS blockade therapy: renewed enthusiasm and persistent challenges. *Mol Cancer*. 2021 Oct 4;20(1):128. doi: 10.1186/s12943-021-01422-7. PMID: 34607583; PMCID: PMC8489073.
7. Law SM, Akizuki S, Morinobu A, Ohmura K. A case of refractory systemic lupus erythematosus with monocytosis exhibiting somatic KRAS mutation. *Inflamm Regen*. 2022 Apr 1;42(1):10. doi: 10.1186/s41232-022-00195-w. PMID: 35361277; PMCID: PMC8973904.
8. Kamisawa T, Tsuruta K, Okamoto A, Horiguchi S, Hayashi Y, Yun X, Yamaguchi T, Sasaki T. Frequent and significant K-ras mutation in the pancreas, the bile duct, and the gallbladder in autoimmune pancreatitis. *Pancreas*. 2009 Nov;38(8):890-5. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181b65a1c. PMID: 19752775.
9. Gallegos-Arreola MP, García Verdín PM, Magaña-Torres MT, Figuera LE, Zúñiga-González GM, Rosales-Reynoso MA, et al. Association between rs61764370, rs9266, and rs140080026 polymorphisms of the KRAS gene and breast cancer risk in a Mexican population. *Eur rev for med and pharm s j*. 2021;25(21):6454-64.
10. Zhang SY, Shi J. rs61764370 polymorphism of Kras and risk of cancer in Caucasian population: A meta-analysis. *J Cancer Res Ther*. 2016 Apr-Jun;12(2):699-704. doi: 10.4103/0973-1482.147379. PMID: 27461636.
11. Uvirova M, Simova J, Kubova B, Dvorackova N, Tomaskova H, Sedivcova M, Dite P. Comparison of the prevalence of KRAS-LCS6 polymorphism (rs61764370) within different tumour types (colorectal, breast, non-small cell lung cancer and brain tumours). A study of the Czech population. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2015 Sep;159(3):466-71. doi: 10.5507/bp.2015.029. Epub 2015 Jun 11. PMID: 26077004.
12. Vallejos-Vidal E, Reyes-Cerpa S, Rivas-Pardo JA, Maisey K, Yáñez JM, Valenzuela H, Cea PA, Castro-Fernandez V, Tort L, Sandino AM, Imarai M, Reyes-López FE. Single-Nucleotide Polymorphisms (SNP) Mining and Their Effect on the Tridimensional Protein Structure Prediction in a Set of Immunity-Related Expressed Sequence Tags (EST) in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Front Genet*. 2020 Feb 27;10:1406. doi: 10.3389/fgene.2019.01406. PMID: 32174954; PMCID: PMC7056891.
13. Shastri BS. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol*. 2009;578:3-22. doi: 10.1007/978-1-60327-411-1\_1. PMID: 19768584.
14. Morita E, Watanabe M, Inoue N, Hashimoto H, Haga E, Hidaka Y, Iwatani Y. Methylation levels of the TNFA gene are different between Graves' and Hashimoto's diseases and

- influenced by the TNFA polymorphism. *Autoimmunity*. 2018 May;51(3):118-125. doi: 10.1080/08916934.2018.1448078. Epub 2018 Mar 11. PMID: 29526119.
15. Li ZH, Han J, Wang YF, Dai J, Zhang H, Li CX, Ma Q. Association between Polymorphism of Interleukin-23 Receptor and Hashimoto's Thyroiditis in Chinese Han Population of Shandong. *Chin Med J (Engl)*. 2015 Aug 5;128(15):2050-3. doi: 10.4103/0366-6999.161362. PMID: 26228217; PMCID: PMC4717969.
16. Tabasi F, Hasanpour V, Sarhadi S, Kaykhaei MA, Pourzand P, Heravi M, Langari AA, Bahari G, Taheri M, Hashemi M, Ghavami S. Association of miR-499 Polymorphism and Its Regulatory Networks with Hashimoto Thyroiditis Susceptibility: A Population-Based Case-Control Study. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 18;22(18):10094. doi: 10.3390/ijms221810094. PMID: 34576267; PMCID: PMC8470033.
17. Heidari Z, Salimi S, Rokni M, Rezaei M, Khalafi N, Shahroudi MJ, Dehghan A, Saravani M. Association of IL-1 $\beta$ , NLRP3, and COX-2 Gene Polymorphisms with Autoimmune Thyroid Disease Risk and Clinical Features in the Iranian Population. *Biomed Res Int*. 2021 Nov 8;2021:7729238. doi: 10.1155/2021/7729238. PMID: 34790822; PMCID: PMC8592725.
18. Cerne JZ, Stegel V, Gersak K, Novakovic S. KRAS rs61764370 is associated with HER2-overexpressed and poorly-differentiated breast cancer in hormone replacement therapy users: a case control study. *BMC Cancer*. 2012 Mar 22;12:105. doi: 10.1186/1471-2407-12-105. PMID: 22436609; PMCID: PMC3342891.
19. Ghazi Jumaa, M. (2022). 'Evaluation of the Role of the KRAS Gene Polymorphism LCS6 (rs61764370) in Iraqi Women with Ovarian Cancer', *Archives of Razi Institute*, 77(1), pp. 205-211. doi: 10.22092/ari.2021.356992.1956
20. Farokhzad N, Hosseini SM, Edalat H, Sadeghi M. Association of Rs61764370 polymorphism within let-7 microRNA-binding site with lung cancer in Iranian population. *Afr Health Sci*. 2020 Sep;20(3):1299-1303. doi: 10.4314/ahs.v20i3.35. PMID: 33402978; PMCID: PMC7751538.
21. Ning L, Rao W, Yu Y, Liu X, Pan Y, Ma Y, Liu R, Zhang S, Sun H, Yu Q. Association between the KRAS Gene Polymorphisms and Papillary Thyroid Carcinoma in a Chinese Han Population. *J Cancer*. 2016 Dec 9;7(15):2420-2426. doi: 10.7150/jca.16507. PMID: 27994680; PMCID: PMC5166553.
22. Al-Salam S, Sharma C, Afandi B, Al Dahmani K, Al-Zahrani AS, Al Shamsi A, Al Kaabi J. BRAF and KRAS mutations in papillary thyroid carcinoma in the United Arab Emirates. *PLoS One*. 2020 Apr 21;15(4):e0231341. doi: 10.1371/journal.pone.0231341. PMID: 32315324; PMCID: PMC7173769.