

مقایسه‌ی تغییرات DNA در ژنوم بیماران هایپرپلازی و پاپیلاری کارسینومای تیروئید و بافت‌های سالم با روش Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction

اردشیر طالبی^۱، نگار حاجی اشرفی^۲، ابوالقاسم اسماعیلی^۳، بهنوش محمدی جزی^۲

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان تیروئید، شایع‌ترین سرطان اندوکراین است. روش‌های مختلفی برای تعیین جهش در ژن‌ها وجود دارد که یکی از این روش‌ها، Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) است. این مطالعه، با هدف مقایسه‌ی تغییرات DNA در ژنوم بیماران هایپرپلازی و پاپیلاری کارسینومای تیروئید و بافت‌های سالم با روش RAPD-PCR انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی مورد-شاهدی، ۴۹ بیمار مبتلا به کسر پاپیلاری و هایپرپلازی تیروئید که دارای سه نوع بافت طبیعی، هایپرپلازی و پاپیلاری کارسینوم تیروئید بودند، به صورت تصادفی انتخاب شدند و سپس الگوی پرایمری تسوالی '3'-AAGAGCCCGT-5' شامل ۱۰ جفت باز در بافت‌های مختلف مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها: فراوانی مشاهده‌ی باند ۳۷۰ جفت باز در بافت طبیعی، هایپرپلازی و پاپیلاری کارسینومای تیروئید به ترتیب ۶/۱، ۵۳/۱ و ۸۹/۸ درصد بود و بین سه نوع بافت، اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P < 0/001$). همچنین، بین بافت طبیعی با هایپرپلازی و پاپیلاری کارسینومای تیروئید و بین هایپرپلازی با کارسینومای تیروئید، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/050$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد استفاده از RAPD-PCR، روش مناسبی برای تشخیص و افتراق سلول‌های طبیعی، هایپرپلازی و پاپیلاری کارسینومای تیروئید باشد، اما با توجه به محدودیت‌های مطالعه، انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: هایپرپلازی، پاپیلاری کارسینومای تیروئید، RAPD-PCR

ارجاع: طالبی اردشیر، حاجی اشرفی نگار، اسماعیلی ابوالقاسم، محمدی جزی بهنوش. مقایسه‌ی تغییرات DNA در ژنوم بیماران هایپرپلازی و پاپیلاری کارسینومای تیروئید و بافت‌های سالم با روش Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. مجله

دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۱۴): ۵۵-۵۹

بیماری چندعاملی شناخته شده است که می‌تواند توسط تغییرات ژنی و عوامل محیطی ایجاد شود. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد تفاوت‌های بین فردی در ابتلا به سرطان نیز ممکن است به تغییرات اپی‌ژنتیکی بستگی داشته باشد (۳). در چند دهه‌ی اخیر، مطالعات مولکولی دانش ما را در زمینه‌ی تغییرات ژنتیکی که منجر به بدخیم شدن سرطان تیروئید می‌شوند، افزایش داد. این مطالعات، باعث شناخت بهتر تومورها بر اساس ویژگی‌های ژنتیکی و مولکولی شد. روش‌های شناسایی جهش‌ها با حساسیت بالا، امکان درمان فردی را

مقدمه

سرطان تیروئید شایع‌ترین سرطان اندوکراین است؛ به طوری که ۹۰ درصد از سرطان‌های اندوکراین را شامل می‌شود و شایع‌ترین نوع آن، سرطان پاپیلاری تیروئید است (۱). سرطان تیروئید، ۱-۲ درصد از کل سرطان‌ها را شامل می‌شود. اگر چه میزان بروز این سرطان در هر دو جنس و در همه‌ی نژادها رو به افزایش است، اما مرگ و میر ناشی از سرطان تیروئید در مقایسه با سرطان‌های دیگر در چند سال گذشته کم و پایدار بوده است (۲-۱). سرطان تیروئید، به عنوان یک

۱- دانشیار، گروه آسیب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دستیار، گروه آسیب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

Genet bio استفاده شد.

به منظور تأیید صحت استخراج و تعیین غلظت نسبی DNA، از دستگاه اسپکتروفتومتر Nano Drop (Optical density = ۱/۷-۱/۹) استفاده یا OD و غلظت نمونه‌ها بیشتر از ۲۰۰ نانوگرم/میکرولیتر) استفاده گردید. جهت انجام PCR از تک پرایمرهای توالی 5'-AAGAGCCCGT-3' با ۶۰ درصد GC استفاده شد و سپس، محصولات PCR بر روی ژل آگارز برده شد و از باندهای تشکیل شده با نور Ultraviolet (UV) دستگاه Gel doc عکس‌برداری شد و اندازه‌ی آن‌ها توسط شاخص وزن مولکولی تعیین گردید و باندهایی که در بافت‌های سالم، هایپرپلازی و کارسینوم تیروئید دارای اختلاف بودند، مشخص شدند.

داده‌های به دست آمده در نهایت وارد نرم افزار SPSS نسخه‌ی ۲۵ (version 25, IBM Corporation, Armonk, NY) شد. داده‌های کمی به صورت میانگین و انحراف معیار و داده‌های کیفی به صورت فراوانی یا درصد بیان شد. همچنین، از آزمون‌های آماری χ^2 و Fisher's exact جهت تجزیه و تحلیل استفاده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، ۴۹ بیمار مبتلا به سرطان تیروئید به همراه هایپرپلازی، با میانگین سنی $۴۵/۷۹ \pm ۱۰/۵۲$ سال مورد مطالعه قرار گرفتند. ۲۲ نفر (۴۴/۹ درصد) از این بیماران مرد و ۲۷ نفر (۵۵/۱ درصد) زن بودند. از هر بیمار، سه بافت تهیه شد و با استفاده از روش RAPD-PCR و پرایمر پیش‌گفته، میزان توالی در هر بافت مشخص شد. طول تقریبی در هر نمونه، بین ۴۰۰-۳۰۰ جفت باز بود. همچنین، تعداد ۱۴۷ نمونه از بافت طبیعی، هایپرپلازی و پاپیلاری کارسینوما تیروئید تهیه و فراوانی باند با ۳۷۰ جفت باز در این بافت‌ها مشخص شد. از ۴۹ بیمار، ۳ مورد دارای حضور باند ۳۷۰ جفت باز در سه بافت، ۲۴ مورد دارای حضور باند جفت باز ۳۷۰ در بافت‌های هایپرپلازی و پاپیلاری کارسینوما تیروئید، ۲۰ مورد تنها در پاپیلاری کارسینوما تیروئید و ۲ مورد تنها در هایپرپلازی تیروئید بودند (جدول ۱).

جدول ۱. حضور یا عدم حضور باند ۳۷۰ جفت باز در بافت‌های مختلف

تعداد (درصد) بیماران گروه	طبیعی	هایپرپلازی	پاپیلاری
	تیروئید	تیروئید	کارسینوما تیروئید
۳ (۶/۱)	+	+	+
۲۴ (۴۸/۹)	-	+	+
۲۰ (۴۰/۹)	-	-	+
۲ (۴/۱)	-	+	-

افزایش می‌دهد و این در حالی است که خطر وقوع متاستاز در مراحل اولیه‌ی بیماری را کاهش می‌دهد. یکی از این روش‌ها، روش Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) می‌باشد (۴).

در سال‌های گذشته، مطالعاتی با استفاده از روش RAPD-PCR بر روی سرطان روده‌ی بزرگ متاستاتیک (۵)، سرطان کبد (۶)، سرطان خون (Acute myeloid leukemia یا AML) (۷) و سرطان کلیه (۸) انجام گرفته است.

یکی از علل مهم ابتلا به سرطان تیروئید، ناهنجاری‌های کروموزومی است. این روش، پروفایل ژنومی را بدون داشتن اطلاعات اولیه از توالی ژنوم فراهم می‌آورد و برای شناسایی و یافتن مکان تغییرات آلل‌ها در سرطان تیروئید استفاده می‌شود. بنابراین، از روش RAPD-PCR جهت شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با تومورهای سرطان تیروئید نیز می‌توان استفاده کرد (۹).

این روش، در فیلوژنتیک یا شجره‌شناسی کارایی عالی دارد (۱۰). از این رو، با توجه به آهنگ رشد ابتلا به سرطان تیروئید و همچنین، با توجه به عدم انجام مطالعاتی در زمینه‌ی بررسی سرطان تیروئید به روش RAPD-PCR در شهر اصفهان، این مطالعه با هدف مقایسه‌ی تغییرات DNA در ژنوم بیماران هایپرپلازی و پاپیلاری کارسینوما تیروئید و بافت‌های سالم با روش RAPD-PCR انجام شد.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی مورد-شاهدی، تعداد ۴۹ بیمار به صورت تصادفی ساده با استفاده از جدول اعداد تصادفی از بین بیمارانی که هم‌زمان مبتلا به هایپرپلازی و پاپیلاری کارسینوما تیروئید و دارای پرونده در مرکز درمانی-آموزشی الزهرای (س) اصفهان در سال‌های ۱۳۹۶ بودند، انتخاب شدند. معیارهای ورود به مطالعه، شامل بیماران مبتلا به هایپرپلازی و کارسینوم تیروئید به صورت هم‌زمان و نداشتن سابقه‌ی خانوادگی این بیماری بودند. از سوی دیگر، اگر بیمار دارای هایپرپلازی تیروئید و کارسینوم تیروئید به تنهایی بود و در صورتی که بلوک تهیه شده دارای بافت کافی و مناسب نبود، جزء معیارهای خروج از مطالعه در نظر گرفته می‌شد.

بعد از در نظر گرفتن معیارهای ورود و خروج، لام‌ها و بلوک‌های آن‌ها از بایگانی خارج و پس از بازبینی و تأیید تشخیص، بلوک مناسب از بافت طبیعی، هایپرپلازی و کارسینوم مربوط به همان بیمار جدا و از طریق میکروتوم، برش‌های جدید تهیه شد. برای هر نمونه، از تیغ یک بار مصرف استریل استفاده شد و ۵ عدد برش هر کدام به ضخامت ۱۰ میکرون در لوله‌های اپندورف ذخیره گردید و پس از یادداشت مشخصات جهت استخراج DNA از کیت

جدول ۲. مقایسه‌ی توزیع قطعه‌ی DNA به طول ۳۷۰ جفت باز در بافت پایپلازی کارسینوما و هایپرپلازی تیروئید و طبیعی

متغیر	گروه	بافت طبیعی تعداد (درصد)	بافت هایپرپلازی تیروئید تعداد (درصد)	بافت پایپلازی کارسینوما تعداد (درصد)	مقدار P
مشاهده‌ی باند ۳۷۰ (bp)	۳ (۶/۱)	۲۶ (۵۳/۱)	۴۴ (۸۹/۸)	< ۰/۰۰۱	
عدم مشاهده‌ی باند ۳۷۰ (bp)	۴۶ (۹۳/۹)	۲۳ (۴۶/۹)	۵ (۱۰/۲)		
کل	۴۹ (۱۰۰)	۴۹ (۱۰۰)	۴۹ (۱۰۰)		

طبق نتایج این مطالعه، فراوانی تعداد جفت باندهای بازی در نمونه‌های بافت طبیعی شامل ۳ مورد (۶/۱ درصد)، در نمونه بافت‌های هایپرپلازی شامل ۲۶ مورد (۵۳/۱ درصد) و در نمونه‌های بافت پایپلازی کارسینوما تیروئید شامل ۴۴ مورد (۸۹/۸ درصد) بود. همچنین، طبق آزمون χ^2 بین نمونه‌های بافت‌های ذکر شده اختلاف معنی‌داری بر اساس وجود ۳۷۰ جفت باز وجود داشت؛ به طوری که میزان آن به ترتیب از بیشتر به کمتر در نمونه‌های بافت پایپلازی کارسینوما و هایپرپلازی تیروئید و سپس، بافت طبیعی بود ($P < ۰/۰۰۱$) (جدول ۲). بر اساس آزمون Fisher's exact اختلاف معنی‌داری بین بافت سالم با بافت هایپرپلازی تیروئید و پایپلازی کارسینوما و بافت هایپرپلازی با بافت پایپلازی کارسینوم در حضور ۳۷۰ جفت باز وجود داشت ($P < ۰/۰۵۰$).

شکل ۱، پروفایل ژنی به دست آمده از RAPD-PCR و پرایمر ۳۷۰ جفت باز می‌باشد.

بافتی بیشتر شد (۱۱).

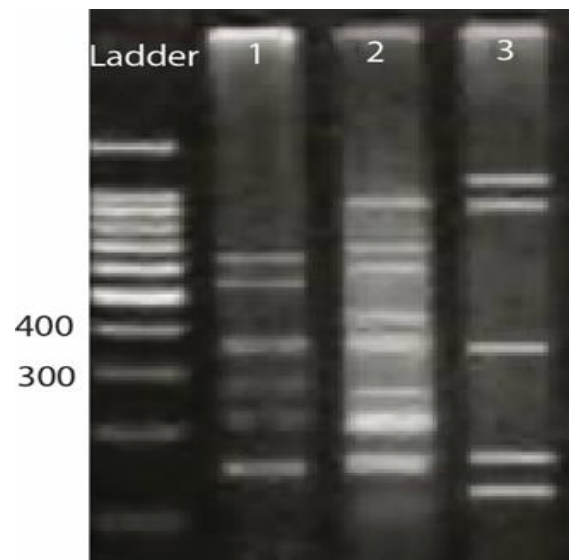
Malkhosyan و همکاران، کاربوتایپ مولکولی سرطان روده‌ی بزرگ متاستاتیک را با استفاده از روش RAPD-PCR بررسی کردند و ژن این سرطان بیشتر بر روی کروموزوم‌های ۸ و ۱۳ قرار داشت. آنان نتیجه گرفتند که هر چه بروز ژن بر روی کروموزوم بیشتر باشد، میزان پیشرفته بودن سرطان یا سرطان کلورکتال متاستاتیک بیشتر است و همچنین، کروموزوم ۴ به عنوان کروموزوم اختصاصی برای بروز متاستاز در سرطان بیان شد (۵). Luo و همکاران، تغییرات آللی موضعی را در سرطان روده‌ی بزرگ با روش RAPD-PCR در سه رده‌ی بافت سالم، پیش بدخیمی و بدخیمی مشاهده کردند و به این نتیجه رسیدند که در ۲۳/۳ درصد از موارد پیش بدخیمی و ۹۵/۷ درصد از موارد بدخیمی، DNA تغییر یافته بود و بیان شد که موارد قبل از بدخیمی را می‌توان از طریق DNA تشخیص داد (۱۲).

در مطالعه‌ی مروری Atienzar و Jha به بررسی تکنیک RAPD-PCR و به کار بردن آن در مطالعات ژنوتوکسیسیتی و کارسینوژنز پس پرداختند و روش RAPD به عنوان یک روش مؤثر و مفید برای غربالگری جهش‌های ژنی یا اثرات سینژنیک معرفی شد (۴).

El-far و همکاران، با استفاده از روش غیر تهاجمی RAPD-PCR و نمونه‌ی ادرار، ناپایداری ژنومیک سرطان کلیه را

شکل ۱، پروفایل ژنی به دست آمده از RAPD-PCR و پرایمر ۳۷۰ جفت باز می‌باشد.

شکل ۱، پروفایل ژنی به دست آمده از RAPD-PCR و پرایمر ۳۷۰ جفت باز می‌باشد.



شکل ۱. پروفایل ژنی به دست آمده از Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) و پرایمر با ۳۷۰ جفت باز

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، استفاده از پرایمر توالی

الگوی باندها در محل به صورت معنی‌داری از بیماران دارای تیروئیدیت و بافت سالم متفاوت است. الگوی DNA در این مطالعه در افراد دارای تیروئیدیت و سالم، شبیه به هم بود، اما با افراد مبتلا به سرطان تیروئید بسیار متفاوت بود (۱۵).

در پایان، به نظر می‌رسد استفاده از RAPD-PCR روش مناسبی برای تشخیص و افتراق سلول‌های طبیعی، هایپرپلازی و پاپیلاری کارسینوما تیروئید باشد، اما با توجه به محدودیت‌های مطالعه، انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر، حاصل پایان‌نامه‌ی دکتری حرفه‌ای پزشکی عمومی است که با شماره‌ی ۳۹۶۳۲۲ در حوزه‌ی معاونت پژوهشی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تصویب و با حمایت‌های این معاونت انجام شد. از این‌رو، نویسندگان مقاله از زحمات ایشان تقدیر و تشکر می‌نمایند.

مشاهده کردند و روش RAPD-PCR به عنوان یک روش مؤثر برای اسکرین بیماران در نظر گرفته شد (۸). در مطالعه‌ی Ismaeel، استفاده از روش RAPD-PCR به عنوان یک روش مؤثر در تشخیص سرطان سینه معرفی شد (۱۳). در مطالعه‌ی Rowe و همکاران بیان شد که تشخیص جهش‌های فعال ژن BRAF در پاپیلاری کارسینوما تیروئید می‌تواند رویکردهای جدیدی برای مدیریت و درمان این بیماری ایجاد کند. شناسایی جهش فعال BRAF V600E در نمونه‌های پاتولوژی Formalin-fixed paraffin-embedded معمولی با استفاده از روش سریع آزمایشگاهی مانند Allele-specific fluorescent PCR می‌تواند ارزش قابل توجهی داشته باشد (۱۴).

در یک مطالعه‌ی دیگر، همسو با مطالعه‌ی حاضر، از روش RAPD در DNA جهت تمایز پاپیلاری کارسینوما و مدولاری کارسینوما تیروئید از بافت سالم انجام شده بود، به این نتیجه رسیدند که در پاپیلاری کارسینوما و مدولاری کارسینوما تیروئید،

References

- Mazzaferrri EL. Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Med* 1993; 328(8): 553-9.
- Cai LL, Liu GY, Tzeng CM. Genome-wide DNA methylation profiling and its involved molecular pathways from one individual with thyroid malignant/benign tumor and hyperplasia: A case report. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95(35): e4695.
- Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 2012; 150(1): 12-27.
- Atienzar FA, Jha AN. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. *Mutat Res* 2006; 613(2-3): 76-102.
- Malkhosyan S, Yasuda J, Soto JL, Sekiya T, Yokota J, Perucho M. Molecular karyotype (amplotype) of metastatic colorectal cancer by unbiased arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(17): 10170-5.
- Xian ZH, Cong WM, Zhang SH, Wu MC. Genetic alterations of hepatocellular carcinoma by random amplified polymorphic DNA analysis and cloning sequencing of tumor differential DNA fragment. *World J Gastroenterol* 2005; 11(26): 4102-7.
- Ibrahim MA, Saleh N, Mousawy KM, Al-Hmoud N, Archoukiah E, Haithum W. Al-Obaide HW, et al. Molecular analysis of RAPD-PCR genomic patterns in age related acute myeloid leukemia. *Trends Med Res* 2009; 4(3): 35-41.
- El-Far M, Abol-Enein H, Zakaria A, El-Gedamy M. Detection of genomic instability in renal cancer by random amplified polymorphic DNA analysis from urine sample as a non-invasive method: Potential use in diagnosis. *Cancer Sci Res Open Access* 2013; 1(1): 7.
- Wreesmann VB, Ghossein RA, Patel SG, Harris CP, Schnaser EA, Saha AR, et al. Genome-wide appraisal of thyroid cancer progression. *Am J Pathol* 2002; 161(5): 1549-56.
- Saxena S, Verma J, Shikha, Raj Modi D. RAPD-PCR and 16S rDNA phylogenetic analysis of alkaline protease producing bacteria isolated from soil of India: Identification and detection of genetic variability. *Genet Eng Biotechnol J* 2014; 12(1): 27-35.
- Talebi A, Daneshbakhtyiar S, Meshkat M, Meshkat M. Comparison of DNA instability in adenoma and adenocarcinoma in patients with colorectal cancer, using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR). *J Isfahan Med Sch* 2017; 35(432): 609-14. [In Persian].
- Luo L, Li B, Pretlow TP. DNA alterations in human aberrant crypt foci and colon cancers by random primed polymerase chain reaction. *Cancer Res* 2003; 63(19): 6166-9.
- Ismaeel HM. Biotechnology: Identification of genomic markers By RAPD-PCR primers in Iraq breast cancer patients. *Iraqi J Sci* 2013; 54(1): 97-104.
- Rowe LR, Bentz BG, Bentz JS. Detection of BRAF V600E activating mutation in papillary thyroid carcinoma using PCR with allele-specific fluorescent probe melting curve analysis. *J Clin Pathol* 2007; 60(11): 1211-5.
- Jabbar RN. Histopathological and molecular analysis of thyroid papillary and medullary carcinoma in a samples of Iraqi patients. *Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics* 2019; 5(1): 22-7.

Comparison of DNA Changes in the Genomes of Thyroid Hyperplasia, Papillary Thyroid Carcinoma, and Healthy Tissues Using Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction

Ardeshir Talebi¹, Negar Hajiafrafi², Abolghasem Esmaili³, Behnoosh Mohammadi-Jazi²

Original Article

Abstract

Background: Thyroid carcinoma is the most common endocrine cancer. There are several methods for determining the mutation of genes, one of them is random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR). This study aimed to compare DNA changes in the genome of thyroid hyperplasia, thyroid papillary carcinoma, and healthy tissues using RAPD-PCR.

Methods: In this case-control study, 49 patients with papillary carcinoma and thyroid hyperplasia which had normal, hyperplasia, and papillary carcinoma tissues of the thyroid gland were randomly selected. Then, the primer pattern of the sequence 5'-AAGAGCCCGT-3' containing 10 pairs base was evaluated and compared between the tissues.

Findings: The prevalence of 370-bp pair base band observed in normal, hyperplasia, and pylori thyroid carcinoma tissues was 6.1, 53.1, and 89.8 percent, respectively, and there was a significant difference between the three tissue types ($P < 0.001$). There was also a significant difference between normal tissue with hyperplasia and papillary carcinoma of the thyroid and between hyperplasia with thyroid carcinoma in this regard ($P < 0.050$).

Conclusion: It seems that using RAPD-PCR is a suitable method for the detection and differentiation of normal, hyperplasia, and papillary thyroid carcinoma cells. Bat notice to the limitation of the study, more investigation in this field is recommended.

Keywords: Hyperplasia, Papillary carcinoma of thyroid, RAPD-PCR

Citation: Talebi A, Hajiafrafi N, Esmaili A, Mohammadi-Jazi B. **Comparison of DNA Changes in the Genomes of Thyroid Hyperplasia, Papillary Thyroid Carcinoma, and Healthy Tissues Using Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction.** J Isfahan Med Sch 2019; 37(514): 55-9.

1- Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Resident, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Iran

Corresponding Author: Negar Hajiafrafi, Email: negar_ok64@yahoo.com