

بررسی چند شکلی تک نوکلئوتیدی rs1130233 (726 G/A) ژن Akt1
در استعداد ابتلا به تومور تیروئید در شمال غرب ایران

Study of rs1130233 (726 G/A) polymorphism of Akt1 gene in
thyroid tumor susceptibility in the northwest of Iran

رضا مصطفوی کنعانی، ناصر پولادی، سیمین نامور آغداش *

Reza Mostafavie Kanani, Naser Pouladi and Simin Namvar Aghdash *

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
Departement of Biology, Faculty of basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani
University, Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: siminamvar2@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۹/۱/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۸/۲۶)

چکیده

واژه‌های کلیدی

ژن Akt1 نقش مهمی را در کنترل زنده ماندن و آپوپتوز سلول‌ها ایفا می‌کند و از این رو به عنوان عاملی موثر در تومورهای تیروئیدی به شمار می‌آید که یکی از تومورهای شایع در ایران می‌باشد. چند شکلی تک نوکلئوتیدی rs1130233 (726 G/A) ژن Akt1 می‌تواند در ایجاد و پیشرفت سرطان و یا پاسخ به درمان، نقش داشته باشد. در این مطالعه، همراهی چندشکلی rs1130233 (726 G/A) با استعداد ابتلا به تومور تیروئید در شمال غرب ایران مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی 80 بیمار مبتلا به تومورهای تیروئید و ۱۰۶ فرد سالم در یک مطالعه مورد - شاهدی مورد ارزیابی قرار گرفت. ژنوتیپ‌های چندشکلی rs1130233 (726 G/A) ژن Akt1 با روش Tetra-ARMS PCR تعیین شد و مورد مقایسه و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تفاوت معنی‌داری بین توزیع این ژنوتیپ‌ها در دو گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد. ارتباط معناداری بین نوع ژنوتیپ‌ها و اندازه تومور وجود داشت ($P>0.05$). این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند چند شکلی rs1130233 (726 G/A) در استعداد ابتلا به سرطان تیروئید در شمال غرب ایران تاثیر ندارد ولی می‌تواند در تعیین خطر نسبی گسترش تومورهای تیروئیدی سهیم باشد.

چند شکلی،

Akt1

rs1130233 (726 G/A)

تومورهای تیروئید

مقدمه

تحت شرایط یکسان محیطی خطر ابتلا به سرطان و بروز بالینی آن در افرادی با زمینه ژنتیکی متفاوت یکسان نیست. فاکتورهای ژنتیکی نقش کلیدی در افزایش خطر ابتلا به سرطان و اثر بالینی آن دارند. بطوریکه در شرایط مشابه خطر ابتلا به سرطان در افراد با زمینه ژنتیکی حساس، در مقایسه با افراد دارای ژنوتیپ مقاوم بیشتر است. چندشکلی ژنتیکی می تواند مکانیسم های محافظتی را تضعیف کرده و آسیب های حاصل از عوامل سرطان زای محیطی را افزایش دهد. مطالعات همراهی گسترده ژنوم (Genome-Wide Association Studies: GWAS) نشان داده اند که در طیف وسیعی از بدخیمی های خونی و تومورهای جامد، بیش از ۱۰۰۰ چندشکلی تک نوکلئوتیدی بطور قابل توجهی با سرطان های انسانی ارتباط دارند (Stracquadanio et al. 2016). از کل ۳۰۱ عدد چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP: single-nucleotide polymorphis) که تا سال ۲۰۱۳ در ارتباط با سرطان شناسایی شده بود تنها ۱۲ عدد (۳/۳ درصد) با تغییر در توالی آمینواسیدی پروتئین همراه بوده و نسبت بزرگی از آن ها در اینترون های ژن های کد کننده پروتئین (۴۰ درصد) یا در نواحی بین ژنی (۴۴ درصد) واقع بودند (Gökmen-Polar et al. 2015). یک ال SNP که در یک منطقه جغرافیایی یا گروه نژادی مشترک است، ممکن است بین دیگر گونه ها کمتر باشد. شناسایی مسیرهای مرتبط با سرطان که اغلب SNP های مرتبط با استعداد مبتلا به سرطان را دارند باعث درک زیست شناسانه ما از تاثیر متغیرها بر روی سرطان و کاربرد بالینی نشانگرهای زیستی SNP می شود (Zhang et al. 2014).

بازآرایی های کروموزومی و جهش های ژنی در مسیرهای MAPK و PI3K-Akt، بازآرایی PAX8/PPAR، غیرفعال سازی ژن های سرکوبگر تومور نظیر p53، تغییرات اپی ژنتیکی و عوامل مولکولی دیگر در ایجاد بدخیمی های تیروئید نقش دارند. مسیر پیام رسانی protein kinase B phosphoinositide 3-kinase (PI3K) mammalian target of rapamycin (mTOR) (PKB, AKT)، نقش حیاتی در رگ زایی و رشد سلول، تکثیر، سوخت و ساز، مهاجرت، تمایز و آپوپتوز دارد. تنوع ژنتیکی در فاکتورهای کلیدی این مسیر ممکن است عملکرد پروتئین و انتقال پیام را تحت تاثیر قرار دهد و منجر به شروع و پیشرفت بیماری ها شود.

اختلال های اصلی تیروئید شامل پرکاری، کم کاری و گره های تیروئید است. گره های تیروئید توده های کوچکی هستند که با رشد غیر طبیعی سلول های تیروئید به وجود می آیند (Burman et al. 2015). تومورهای تیروئید، در چهار تا هفت درصد از افراد بزرگسال رخ می دهند (Jemal et al. 2011) و میزان ابتلا به آن در ایران و جهان پیوسته در حال افزایش است (Safavi et al. 2016). شیوع گره های تیروئید در زنان چهار برابر مردان است اما گره های مردان بیشتر مستعد بدخیم شدن هستند (Popoveniuc et al. 2012). در حال حاضر گره های تیروئید پنجمین تومور شایع در میان زنان جهان است (Delorme et al. 2015; Moley. 1995; Pacini. et al 2010). تومورهای تیروئید به دو دسته بدخیم و خوش خیم طبقه بندی می شوند. انواع تومورهای تیروئیدی شامل آدنوم تیروئید، سرطان پاپیلاری تیروئید با فراوانی ۸۵-۸۰ درصد، سرطان فولیکولار تیروئید، سرطان تیروئید نسبتا تمایز یافته، سرطان مدولاری تیروئید، سرطان تیروئید آناپلاستیک، لنفوم اولیه غده تیروئید و سرطان متاستاتیک از سایر اندام ها می باشند (Jemal et al. 2011). فاکتورهای مختلفی از قبیل قرار گرفتن در معرض تشعشع، سن، جنس، ابتلا به گواتر یا دیگر بیماری های خوش خیم تیروئید از عوامل خطر ابتلا به تومورهای تیروئیدی هستند (Liu et al. 2017; Navarro Silvera et al. 2005; Gonzalez. 1995).

تنوع ژنتیکی یا چندشکلی موجود در ژنوم انسان می تواند منجر به حساسیت یا مقاومت ژنتیکی به سرطان شود (Gonzalez. 1995). چند شکلی عبارت است از وجود اشکال مختلف آلی در یک ژن که با فراوانی بیش از یک درصد در جمعیت رخ می دهند (Bond et al. 2005). چند شکلی های تک نوکلئوتیدی متعددی در ژن Akt1 شناسایی شده اند که بیشتر آنها در نواحی غیرکد کننده قرار گرفته اند. چند شکلی های این ژن ممکن است بر بیان آن اثر گذاشته و در نتیجه احتمال دارد در ایجاد و پیشرفت سرطان و یا پاسخ به درمان، نقش داشته باشند (Whibley et al. 2009).

کنترل از جمعیت شمال غرب ایران انتخاب شدند. افراد گروه کنترل از نظر سن همسان با گروه بیمار، همگی زن و فاقد هرگونه سابقه خانوادگی سرطان بودند. تشخیص افراد کنترل با تایید پزشک متخصص صورت گرفت. از بین ۸۰ بیمار مبتلا به سرطان تیروئید، ۶۱ نفر زن و ۱۹ نفر مرد بودند که در سالهای ۱۳۸۸ تا ۱۳۹۱ در بیمارستانهای امام رضا و نورنجات تبریز جراحی تیروئیدکتومی انجام داده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. افراد بیمار مطالعه حاضر، از مناطق شهری و روستایی ناحیه شمال غرب ایران شامل بیماران استانهای آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی و اردبیل بودند. پس از اخذ رضایت از تمامی افراد مورد مطالعه نمونه خون محیطی از این افراد تهیه و استخراج DNA به روش نمک اشباع صورت گرفت.

انتخاب آغازگر و PCR: ژنوتایپها برای ژن Akt1 شامل rs1130233 (726 G/A) به روش Tetra-ARMS PCR شناسایی شدند. برای این منظور آغازگرها مطابق مطالعه‌های قبلی طراحی شدند (Taheri et al. 2014). در جدول ۱ دو آغازگر اختصاصی رفت و دو آغازگر اختصاصی برگشت برای تولید سه محصول استفاده شدند. اندازه محصولات 213 bp برای ال G، 298 bp برای ال A و 466 bp برای باند کنترل بود که در جدول ۲ نشان داده شده است. برای شناسایی چند شکلی rs1130233 (726 G/A) ژن Akt1 هر ویال از واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵/۱۲ میکرولیتر PCR Master mix (1X)، ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، ۱ میکرولیتر DNA و ۵/۷ میکرولیتر آب دیونیزه استریل انجام شد. چرخه‌های حرارتی واکنش زنجیرهای پلیمرز شامل واسرشته سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵°C، ۴۰ چرخه، واسرشته سازی در ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۶/۵°C به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C بود. محصولات تکثیر یافته به وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید جداسازی شدند.

بررسی‌های صورت گرفته پیشنهاد کرده‌اند چندشکلی rs1130233 ژن Akt1 با خطر و یا پیش آگاهی انواع مختلف سرطان‌ها مرتبط است. ژن AKT1 برای بقای سلول ضروری است و رمز کننده یکی از فاکتورهای بسیار مهم موثر بر مسیر PI3K/AKT/MTOR است که عملکردهای کلیدی سلول شامل سوخت و ساز گلوکز و سنتز پروتئین را تنظیم می‌کند. Akt دارای پنج چند شکلی مطالعه شده در سطح وسیع شامل rs3803300، rs1130214، rs2494732، rs1130233 و rs2498804 است. SNP مربوط به rs1130233 روی اگزون شماره هشت جای گرفته و تنوع G/A در مرز اگزون هشت و هفت جای دارد (Zhang et al. 2014).

فاکتور رشد اندوتلیال عروقی یکی از قوی‌ترین القا کننده‌های نفوذپذیری عروقی شناخته شده است به طوریکه ۵۰۰۰۰ بار قوی‌تر از هیستامین می‌باشد. بررسی‌ها نشان داده است که قبل از اینکه تومور بتواند بیش از ۲-۱ میلی‌متر رشد کند، به رگ‌های خونی برای تامین مواد غذایی و اکسیژن نیاز دارد. تولید فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و سایر عوامل رشدی توسط تومور موجب شروع مسیر رگ‌زایی می‌شود و به این ترتیب تومورها می‌توانند رشد کنند (Hicklin et al. 2005).

ژن Akt1 بوسیله تنظیم مثبت NF-κB که از ژن‌های ضد آپوپتوز است، سبب فعال شدن کیناز IκB می‌شود و از این طریق مانع فعال شدن آبشار آپوپتوز می‌گردد (Huang et al. 2012). علاوه براین Akt1 با فسفوریلاسیون BAD، باعث جدا شدن BAD از Bcl-2 و Bcl-X می‌شود و موجب از دست رفتن عملکرد آپوپتوزی آن می‌شود. سه ایزوفرم Akt، یعنی، Akt1، Akt2 و Akt3 در انسان وجود دارد که توسط ژن‌های مختلف کدگذاری می‌شوند (Wang et al. 2010). در این مطالعه همراهی چند شکلی تک‌نوکلئوتیدی rs1130233 (726 G/A) ژن Akt1 در استعداد ابتلا به تومور تیروئید در منطقه شمال غرب ایران مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری: در این مطالعه مورد-شاهدی ۸۰ بیمار مبتلا به سرطان تیروئید و ۱۰۶ فرد سالم غیرخویشاوند به عنوان گروه

نرم افزار SPSS vol.24 مشخص گردید. برای ژنوتیپ‌ها، آلل‌ها و ژنوتیپ‌های ترکیبی از برنامه javastat online statistics package استفاده شد. در تمامی آزمون‌ها، $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی: تمامی دانسته‌های لازم از پرونده بالینی بیماران استخراج گردید. هیچ نوع مداخله اضافی از طرف پژوهشگران بر روی بیماران صورت نگرفت. تمامی دانسته‌های بیماران به طور محرمانه می‌باشد و فرم رضایت انجام طرح تحقیقاتی توسط بیماران تکمیل گردید.

نتایج

ویژگی‌های بیماران از قبیل جنس، سن، نوع تومور، درجه تومور، اندازه تومور، درگیری غدد لنفاوی و سمت درگیر مورد بررسی قرار گرفت. از ۸۰ فرد مبتلا ۶۱ نفر زن و ۱۹ نفر مرد بودند. بیماران مورد مطالعه از نظر سنی به دو گروه کمتر و بیشتر از ۳۹ سال تقسیم شدند که میانگین سنی ۳۹/۵۴ و انحراف معیار در گروه بیمار، ۱۳/۷۹ $\pm$ بود. از بین ۸۰ بیمار مورد مطالعه، ۶۰ نفر مبتلا به کارسینوماهای تمایز یافته تیروئید و ۲۰ نفر مبتلا به آدنوماهای خوش خیم بودند. از بین ۶۰ فرد مبتلا به کارسینوماهای به خوبی تمایز یافته، ۵۲ نفر دارای کارسینومای پاپیلاری، ۳ نفر دارای کارسینومای فولیکولار، ۱ نفر مبتلا به کارسینومای مدولاری و ۲ نفر مبتلا به کارسینوم هارتل بودند. مشخصات بالینی بیماران در جدول ۳ خلاصه شده است.

در بین بیماران مبتلا به کارسینومای تیروئید، درجه تومور در ۵۷ نفر قابل محاسبه بود. در بین این ۵۷ نفر، ۴۸ بیمار دارای تومور درجه I، ۴ بیمار دارای تومور درجه II، ۴ بیمار دارای تومور درجه III و دو نفر دارای تومور درجه IV بودند بر اساس سیستم Tumor, Node, Metastasis (TNM) متغیر T در ۵۲ نفر از بیماران مبتلا به کارسینوما محاسبه شد. در ۴۴ بیمار T1 (درصد ۸۴/۸۴)، در ۶ بیمار (درصد ۵۳/۱۱) T2 و در ۲ بیمار (درصد ۸۴/۳) T4a به دست آمد.

جدول ۱- آغازگرها و شرایط Tetra-ARMS PCR برای rs1130233 (726 G/A) Akt1 ژن

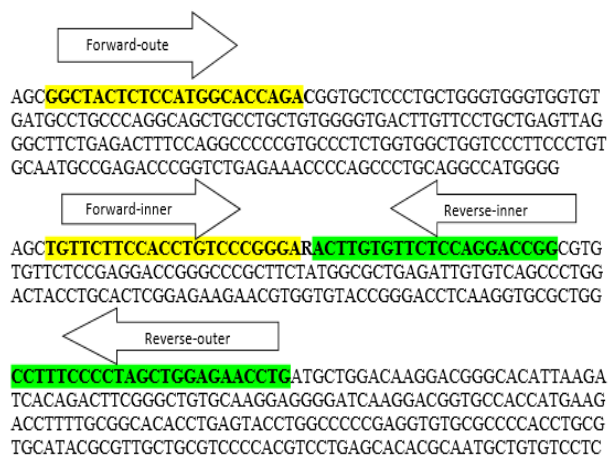
Table1. Primers and Tetra-ARMS PCR for rs1130233 (726 G/A) of Akt1 gene

آغازگر	توالی	دمای اتصال (°C)
FO	5'GGCTACTCTCCATGGCACCAGAC3'	۵۷/۵
RO	5'GAGGTTCTCCAGCTAGGGGAAAGG3'	۵۷/۵
FI	5'TGTTCTTCCACCTGTCCCGGTAG3'	۵۷/۵
RI	5'CCGGTCCTCGGAGAACAACAGT 3'	۵۷/۵

جدول ۲- محصولات Tetra-ARMS PCR برای rs1130233 (726 G/A) Akt1 ژن

Table2. Tetra-ARMS PCR products for rs1130233 (726 G/A) of Akt1 gene

گروه‌ها	جفت باز	آغازگر
آلل A	۲۹۸	FO, RI
آلل G	۲۱۳	FI, RO
باند کنترل	۴۶۶	FO, RO



شکل ۱- تصویر توالی ژن Akt1

Figure1. Image of the Akt1 gene.

بررسی آماری: در این مطالعه مورد-شاهدی، توزیع ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها و فرکانس هموزیگوت و هتروزیگوت در هر دو گروه بیمار و شاهد با استفاده از آزمون مربع کای (X^2) مورد سنجش و مقایسه قرار گرفت. رابطه بین چند شکلی ژنوتیپی و خطر ابتلا به سرطان متغیر وابسته و مستقل با استفاده از محاسبه خطر نسبی (OR) با فاصله اطمینان ۹۵ درصد تعیین شد. ارتباط بین مشخصات بالینی بیماران و ژنوتیپ‌های چند شکلی با استفاده از

جدول ۳- مشخصات بالینی بیماران و ارتباط آن با ژنوتایپ‌های مختلف

Table3. Clinical properties of patients and its association with different genotypes

ژنوتایپ‌های rs1130233 (726 G/A)		p-Value			مشخصات بالینی
GG	GA	AA			
۲۴ (۸۲/۷۵%)	۲۱ (۸۴%)	۳ (۱۰۰%)	۰/۸۲۵۳		مراحل تومور
۱ (۳/۴۴%)	۳ (۱۲%)	۰ (۰%)			Stage I
۳ (۱۰/۳۴%)	۱ (۴%)	۰ (۰%)			Stage II
۱ (۳/۴۴%)	۱ (۴%)	۰ (۰%)			Stage III
۱ (۳/۴۴%)	۱ (۴%)	۰ (۰%)			Stage IV
۸ (۲۵%)	۱۰ (۴۱/۷%)	۱ (۵۰%)	۰/۰۴۵۹		اندازه تومور (cm)
۲۴ (۷۵%)	۱۴ (۵۸/۳%)	۱ (۵۰%)			≤ ۲/۶۷ cm
۲۱ (۵۰%)	۱۸ (۵۹/۹۴%)	۳ (۷۵%)	۰/۹۳۵۰		> ۲/۶۷ cm
۲۱ (۵۰%)	۱۶ (۴۷/۰۵%)	۱ (۲۵%)			سن
۱۳ (۳۱%)	۵ (۱۴/۷%)	۱ (۲۵%)	۰/۴۲۱۵		مرد
۲۹ (۶۹%)	۲۹ (۸۵/۳%)	۳ (۷۵%)			زن
۱۲ (۴۱/۴%)	۱۰ (۳۵/۷%)	۲ (۱۰۰%)	۰/۵۶۵		گره لنفی
۷ (۲۴/۱%)	۶ (۲۱/۴%)	۰ (۰%)			N0
۱۰ (۳۴/۵%)	۱۲ (۴۲/۹%)	۰ (۰%)			NX
۲۳ (۵۴/۸%)	۲۰ (۵۸/۸%)	۳ (۷۵%)	۰/۱۵۳۶		N1
۱۲ (۲۸/۶)	۸ (۲۳/۵%)	۰ (۰%)			پاتولوژی
۱ (۲/۴%)	۱ (۲/۹%)	۰ (۰%)			کارسینومای پاپیلاری
۲ (۴/۸%)	۲ (۴/۸%)	۰ (۰%)			آدنوم فولیکولی
۰ (۰%)	۰ (۰%)	۱ (۲۵%)			آدنوم فولیکولی
۱ (۲/۲%)	۰ (۰%)	۰ (۰%)			گواتر با نودول‌های متعدد
۰ (۰%)	۰ (۰%)	۱ (۲۵%)			کارسینومای پاپیلاری متاستاتیک
۱ (۲/۲%)	۰ (۰%)	۰ (۰%)			کارسینومای مدولاری
۰ (۰%)	۱ (۲/۹%)	۰ (۰%)			پاپیلاری تیروئید پیشرفته
۱ (۲/۴%)	۱ (۲/۹%)	۰ (۰%)			کارسینومای پاپیلاری تیروئید
۲۲ (۸۱/۵%)	۲۰ (۹۰/۹%)	۲ (۶۶/۷%)	۰/۲۰۰۵		تومور اولیه
۴ (۱۴/۸%)	۲ (۹/۱%)	۰ (۰%)			T1
۱ (۳/۷%)	۰ (۰%)	۱ (۳۳/۳%)			T2
۱۳ (۵۰%)	۷ (۳۱/۸%)	۳ (۷۵%)	۰/۴۷۶۴		T4a
۹ (۳۴/۶%)	۱۱ (۵۰%)	۱ (۲۵%)			طرف
۴ (۱۵/۴%)	۴ (۱۸/۲%)	۰ (۰%)			راست
۱۵ (۳۵/۷%)	۱۰ (۲۹/۴%)	۰ (۰%)	۰/۴۶۳۱		چپ
۲۷ (۳/۶۴%)	۲۴ (۷۰/۶%)	۴ (۱۰۰%)			هر دو طرف
					خوش خیم یا بدخیمی تومور
					خوش خیم
					بدخیم

جدول ۴ - توزیع فراوانی ژنوتیپی نمونه‌های بیمار و کنترل در چندشکلی (726 G/A (rs1130233)

Table4. Frequently distribution of patients and control groups genotypes in 726 G/A (rs1130233) polymorphism

ژنوتیپ‌ها	بیمار (n=80)	کنترل (n=106)	p-value	OR (95%CI)	جفت باز چند شکلی تک نوکلئوتیدی
GG	۴۲ (۵۲/۵%)	۶۳ (۵۹/۴۳%)	0.345	0.754 (0.402-1.413)	726 G/A (rs1130233)
GA	۳۴ (۴۲/۵%)	۳۷ (۳۴/۹%)	0.291	1.0378 (0.727-2.616)	
AA	۴ (۵%)	۶ (۵/۶%)	0.843	0.877 (0.199-3.674)	

OR, odds ratio; CI, confidence interval

جدول-۵ توزیع فراوانی آلل‌های G و C در بین بیماران و گروه کنترل

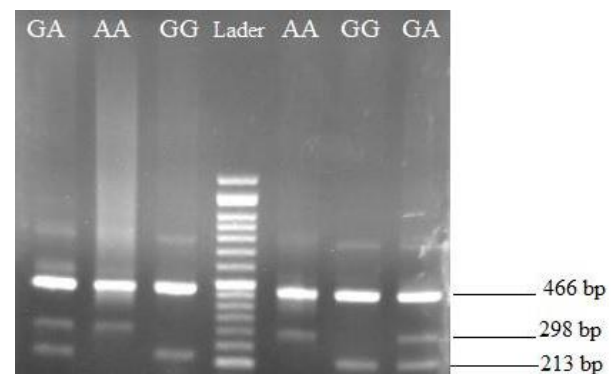
Table5. Frequently distribution of C and G alleles between patients and control groups

dbSNP	آلل	مورد (n= ۸۰)	شاهد (n= ۱۰۶)	p-value	OR (95%CI)
726 G/A (rs1130233)	G	۵۹ (۷۳/۷۵%)	۸۳ (۷۸/۲۵%)	0.456	0.781 .387-1.573)
	A	۲۱ (۷۵/۷۶%)	۲۳ (۲۱/۷۵%)	0.456	0.781 (0.387-1.573)

AA در ۱ نفر از بیماران (درصد ۵۰) با اندازه تومور زیر ۶۷/۲ سانتی‌متر وجود داشت. در بیماران با اندازه تومور بالای ۷۶/۲ سانتی‌متر، ۲۴ نفر ژنوتیپ GG (درصد ۷۵)، و ۱۴ نفر (درصد ۵۸/۳) ژنوتیپ GA و ۱ نفر (درصد ۵۰) ژنوتیپ AA داشتند. تفاوت معنی‌داری در توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های یا اندازه تومور وجود داشت ($p < 0.0459$).

بر اساس نتایج حاصل، ۴۲ نفر (درصد ۵۰/۵۲) از بیماران و ۶۳ نفر (درصد ۴۳/۵۹) از افراد سالم ژنوتیپ GG داشتند ۳۴ فرد بیمار (درصد ۵/۴۲) و ۳۷ فرد (درصد ۹/۳۴) سالم دارای ژنوتیپ هتروزیگوت GA بودند ۴ فرد بیمار (درصد ۵) و ۶ فرد سالم (درصد ۶۶/۵) دارای ژنوتیپ هموزیگوت AA بودند. ارتباط معناداری بین فراوانی ژنوتیپ GG، GA، AA برای چند شکلی تک نوکلئوتیدی rs1130233 بین بیماران و گروه کنترل یافت نشد. ارتباط معناداری بین فراوانی ژنوتیپ‌های GG، GA، AA و چند شکلی تک نوکلئوتیدی rs1130233 بین بیماران و گروه کنترل یافت نشد (جدول ۴). در گروه کنترل فراوانی آلل G (۲۵ درصد) و فراوانی آلل A (۷۵/۲۵ درصد) بود. در گروه بیمار فراوانی آلل G (۷۵/۷۳ درصد) و فراوانی آلل A (۲۵/۲۶ درصد) بود. تفاوت معنی‌داری در فراوانی آلل A و G برای چند شکلی تک نوکلئوتیدی rs1130233 بین بیماران و گروه کنترل وجود نداشت (جدول ۵).

بررسی فولدینگ RNA مربوطه rs1130233 در شکل طبیعی و چندشکل باتوجه به ΔG های بدست آمده نشان داد RNA در شکل طبیعی و چندشکل با توجه به نزدیکی ΔG ، پایدار است. همچنین مقایسه ساختار دو فولد نشان دهنده عدم تاثیر چندشکلی در فولد RNA بود. با استفاده از نرم افزار سایت PolyPhen-2 تاثیر احتمالی جایگزینی اسید آمینه در ساختار و عملکرد



شکل ۲- الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد. فرد هتروزیگوت (GA)، فرد هموزیگوت برای آلل A (AA)، فرد هموزیگوت برای آلل G (GG)

Figure2. Electrophoresis of PCR products on 2% agar gel. Heterozygous individual (GA), homozygous individual for allele A (AA), homozygous individual for allele G (GG).

در ۵۷ نفر از بیماران نوع درگیری غدد لنفاوی بررسی شد. در ۲۴ بیمار غدد لنفی درگیری تومور نداشتند و در ۱۳ بیمار وضعیت آن‌ها قابل ارزیابی نبود. تنها در ۲۲ بیمار درگیری غدد لنفی وجود داشت. از میان افراد بیمار، در ۲۳ نفر از کل بیماران لوب سمت راست، در ۲۱ نفر لوب سمت چپ و در ۸ نفر هر دو لوب تیروئید، درگیر تومور بودند. مطالعه مشخصات بیماران ارتباط معنی‌داری بین توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های GG و GA و AA با نوع تومور، درجه تومور، گروه‌های سنی، جنس، درگیری غدد لنفی، سمت درگیری تومور، متغیر T و خوش‌خیمی و بدخیمی تومور نشان نداد (جدول ۳). اما بین اندازه تومور با توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های سه گانه ارتباط معنی‌داری وجود داشت. اطلاعات اندازه تومور در ۵۸ نفر از ۸۰ نمونه بدست آمد. ژنوتیپ GG در ۸ بیمار (درصد ۲۵)، ژنوتیپ GA در ۱۰ بیمار (درصد ۴۱/۷) و ژنوتیپ

بررسی‌های موردی شاهدهی به بررسی ارتباط چند شکلی‌های rs1130233 (726 G/A) Akt1 با افزایش خطر ابتلا به سرطان‌های متعدد از جمله سرطان تیروئید پرداخته‌اند. اکثر بررسی‌ها نشان داده‌اند که این چند شکلی در میان بیماران در مقایسه با کنترل‌ها، فراوانی بالاتری دارد ولی در برخی موارد نیز ارتباطی یافت نشده است. برای مثال در یک مطالعه نشان داده شده است که چند شکلی

rs 1130233 سبب تداوم عفونت مایکوباکتریوم می شود (Hung et al. 2012). محققین ارتباط معنی‌داری بین چند شکلی این ژن و افزایش خطر ابتلا به توبرکلوزیس مشاهده نکردند (Wang et al. 2014; Taheri et al. 2010). طبق بررسی انجام شده چند شکلی rs1130233 می‌تواند به عنوان یک نشانگر پیش آگاهی دهنده در سرطان ریه مورد استفاده قرار بگیرد (Kim et al. 2012). نتایج پژوهش‌ها نشان دهنده ارتباط چند شکلی rs1130233 با افزایش خطر ابتلا به سرطان پانکراس و سرطان معده بود (Avan et al. 2014; piao et al. 2015). با توجه به مطالعه انجام شده پیشنهاد می‌شود ارتباط چند شکلی rs1130233 با ابتلا به تومورهای تیروئید در نمونه‌های بیشتری از افراد بیمار و سالم و همچنین در نقاط مختلف کشور مورد مطالعه قرار گیرد. بررسی‌های بیشتر با استفاده از تجزیه و تحلیل *in silico* بر روی این چند شکلی مفید خواهد بود.

نتیجه‌گیری کلی: تحقیق حاضر، نخستین مطالعه در ارتباط با همراهی چندشکلی Akt1 (726 G/A) rs1130233 با خطر ابتلا به سرطان تیروئید در ناحیه شمال غرب ایران می‌باشد. نتایج آن نشان داد که اختلاف آماری معنی‌داری در توزیع ژنوتیپ‌ها و آلل‌های چندشکلی rs1130233 (726 G/A) بین بیماران و افراد کنترل وجود ندارد. داده‌های این پژوهش نشان داد که چند شکلی rs1130233 (726 G/A) Akt1 در استعداد ابتلاء به سرطان تیروئید در شمال غرب ایران تاثیر ندارد. اما با توجه به نتایج این مطالعه، چند شکلی ژن Akt1 شامل rs1130233 (726 G/A) می‌تواند در تعیین خطر نسبی توسعه تومورهای تیروئیدی موثر باشد. تجزیه و تحلیل‌های *In silico* نیز نشان دهنده عدم تاثیر چندشکلی rs1130233 بر سرطان‌زایی تیروئید بود.

پروتئین‌های انسان با استفاده از ملاحظات فیزیکی بررسی شد و نتایج بدست آمده نشان دهنده عدم تاثیر چندشکلی rs1130233 (726 G/A) در ساختار و عملکرد پروتئین بود. تحلیل تابعی چندشکلی rs1130233 از طریق مدل‌های مارکف ازسایت fathmm پیش‌بینی خاصی از درگیر بودن چندشکلی rs1130233 در سرطان‌زایی و ایجاد بیماری نشان نداد.

بحث

چند شکلی rs1130233 (726 G/A) Akt1 می‌تواند بر بیان ژن Akt1 اثر گذاشته و در نتیجه در ایجاد و پیشرفت سرطان و یا پاسخ به درمان نقش داشته باشد مطالعه حاضر با هدف بررسی چند شکلی rs1130233 در مبتلایان به تومور تیروئید انجام شد. فراوانی انواع تومورهای تیروئید در زنان سه برابر مردان بود و سرطان پاپیلار تیروئید بیشترین شیوع را در بین بیماران داشت. مقایسه درجه تومور در افراد مورد مطالعه نشان داد، فراوانی تومور درجه یک نسبت به سایر درجات بیشتر بود که نشان دهنده تشخیص زود هنگام تومورهای تیروئید است. ارتباط معنی‌داری بین این چند شکلی با ویژگی‌های بالینی و آسیب شناختی شامل نوع تومور، درجه‌های تومور، گروه‌های سنی، جنس، درگیری غدد لنفی، سمت درگیری تومور، متغیر T و خوش‌خیمی و بدخیمی تومور مشاهده نشد. اما ارتباط معناداری بین نوع ژنوتیپ‌ها و اندازه تومور وجود داشت ($p < 0.0459$).

مطالعه چندشکلی rs1130233 (726 G/A) نشان داد، فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت GG در هر دو گروه بیماران مبتلا به سرطان تیروئید و افراد سالم بیشتر از ژنوتیپ‌های AA و GA بود. اما توزیع ژنوتیپ‌های GG، GA و AA بین افراد بیمار و کنترل نشان دهنده فراوانی تقریباً یکسان این ژنوتیپ‌ها در میان افراد سالم و بیمار بود و ارتباط معناداری بین توزیع این ژنوتیپ‌ها با افراد بیمار و کنترل نشان داده نشد. تجزیه و تحلیل *in silico* این مطالعه نشان دهنده عدم تاثیر چند شکلی rs1130233 بر فولد RNA، ساختار و عملکرد پروتئین‌ها و عدم پیش بینی نقش این چندشکلی در سرطان‌زایی بود.

منابع

- Avan A, Avan A, Le Large T Y S, Mambrini A, Funel N, Maftouh M, Ghayour M, Cantore M, Boggi U, Peters G J, Pacetti P, Giovannetti E. 2014. AKT1 and SELP polymorphisms predict the risk of developing cachexia in pancreatic cancer patients. PLoS ONE 9:e108057.
- Bond G L W H, Levine A. 2005. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene: From a molecular and cellular explanation to clinical effect. Cancer Research 65: 5481-5484.
- Burman KD, Wartofsky L. 2015. Thyroid Nodules. The New England Journal of Medicine 373:2347-2356.
- Delorme S, Raue F. 2015. Medullary Thyroid Carcinoma: Imaging. Recent results in cancer research 204:91-116.
- Gökmen-Polar Y, Vladish I T, Neelamraj Y, Janga S C, Badve S. 2015. Prognostic impact of HOTAIR expression is restricted to ER-negative breast cancers. Scientific Reports 5:1-6.
- Gonzalez F J. 1995. Genetic polymorphism and cancer susceptibility. Fourteenth Sapporo Cancer Seminar. Cancer Research 55:710-715.
- Hicklin D J, Ellis L M. 2005. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. Journal of Clinical Oncology 23:1011-1027.
- Huang G, Redelman-Sidi G, Rosen N, Glickman M S, Jiang X. 2012. Inhibition of mycobacterial infection by the tumor suppressor PTEN. Journal of Biological Chemistry 287:196-202.
- Jemal A, Bray F, Center M M, Ferlay J, Ward E. 2011. Forman D: Global cancer statistics. A Cancer Journal of Clinicians 61:69-90.
- Kim M J, Kang H G, Lee S Y, Jeon H S, Lee W K, Park J Y, Lee E B, Lee J H, Cha S I, Kim D S, Kim C H, Kam S, Jung T H, Park J Y. 2012. AKT1 polymorphisms and survival of early stage non-small cell lung cancer. Journal of Surgical Oncology 105:167-174.
- Liu Y, Su L, Xiao H. 2017. Review of factors related to the thyroid cancer epidemic. International Journal of Endocrinology <https://doi.org/10.1155/2017/5308635>.
- Moley J F. 1995. Medullary thyroid cancer. Surgical Clinics of North America 75:405-420.
- Navarro Silvera S A, Miller A B, Rohan T E. 2005. Risk factors for thyroid cancer: a prospective cohort study. International Journal of Cancer 116:433-438.
- Pacini F, Castagna M G, Cipri C, Schlumberger M. 2010. Medullary thyroid carcinoma. Clinical Oncology 22:475-485.
- Piao Y, Li Y, Xu Q, Liu J-w, Xing C-z, Xie Xd, Yuan Y. 2015. Association of MTOR and AKT gene polymorphisms with susceptibility and survival of gastric cancer. PLoS ONE 10:e0136447.
- Popoveniuc G, Jonklaas J. 2012. Thyroid nodules. The Medical clinics of North America 96:329-349.
- Safavi A, Azizi F, Jafari R, Chaibakhsh S, Safavi AA. 2016. Thyroid cancer epidemiology in Iran: a time trend study. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 17:407-412.
- Stracquadanio G, Wang X, Wallace M D, Grawenda A M, Zhang P, Hewitt J, Zeron-Medina P, Castro-Giner F, Tomlinson. 2016. The importance of p53 pathway genetics in inherited and somatic cancer genomes. Nature Reviews Cancer 16:251-265.
- Taheri M, Yousefi K, Naderi M, Hashemi M. 2014. Genetic variation in Akt1 and risk of tuberculosis among Iranian population. Health Scope 3:e16243.
- Wang X, Cao Z, Jiang J, Zhu Y, Dong M, Tong A, Cheng X. 2010. AKT1 polymorphisms are associated with tuberculosis in the Chinese population. International Journal of Immunogenetics 37:97-101.
- Whibley C, Pharoah D P, Hollstein M. 2009. p53 polymorphisms: cancer implications. Nature Review.9:95-107.
- Zhang X, Chen X, Zhai Y, Cui Y, Cao P, Zhang H, Zhihao W, Peiyao L, Lixa Y, Xia X, Fuchu H, Gangqiao Z. 2014. Combined effects of genetic variants of the PTEN, AKT1, MDM2 and p53 genes on the risk of nasopharyngeal carcinoma. PLoS ONE 9:e92135

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

**Study of rs1130233 (726 G/A) polymorphism of Akt1 gene in thyroid
tumor susceptibility in the northwest of Iran**

Reza Mostafavie Kanani, Naser Pouladi and Simin Namvar Aghdash *

Departement of Biology, Faculty of basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

*Corresponding Author, Email: siminnamvar2@gmail.com

Abstract

AKT1 gene, plays an important role in controlling cell survival and apoptosis and is therefore considered an effective factor in thyroid tumors, which is one of the most common tumors in Iran. Single nucleotide polymorphisms in rs1130233 (726 G / A) of Akt1 gene may be involved in the development and progression of cancer or response to treatment. In this study, the association of rs1130233 (726 G / A) polymorphism with a predisposition to thyroid tumor in northwest of Iran was investigated. In this study, 80 patients with thyroid tumors and 106 healthy individuals were evaluated in a case-control study. Polymorphic (726 G / A) rs1130233 genotypes of Akt1 gene were determined by Tetra-ARMS PCR and compared and analyzed. Significant difference was not observed between the distribution of these genotypes in the patient and control groups. There was a significant relationship between genotype type and tumor size ($P > 0.05$). These findings suggest that rs1130233 polymorphism (726 G / A) has no effect on thyroid cancer susceptibility in northwest of Iran but may contribute to the relative risk of developing thyroid tumors.

Keywords: Polymorphism, Akt1 rs1130233 (726 G/A), Thyroid tumor