



Research Article

Studying of INV2nt-124A/G Polymorphism (rs5030772) in FASL Gene and Susceptibility to Thyroid Tumor in East Azerbaijan province

Nasser Pouladi^{1*}, Javadi N², Sama Didevar Tabrizi²

¹ Associate Professor, Department of Biology, School of Science, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

² MSc Student, Department of Biology, School of Science, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

* **Corresponding author:** Nasser Pouladi, Associate Professor, Department of Biology, School of Science, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. Email: srna52@gmail.com

DOI: [10.61186/jams.28.2.99](https://doi.org/10.61186/jams.28.2.99)

How to Cite this Article:

Pouladi N, Javadi N, Didevar Tabrizi S. Studying of INV2nt-124A/G Polymorphism (rs5030772) in FASL Gene and Susceptibility to Thyroid Tumor in East Azerbaijan province. *J Arak Uni Med Sci.* 2025;**28**(2): 99-106. DOI: [10.61186/jams.28.2.99](https://doi.org/10.61186/jams.28.2.99)

Received: 2024.07.28

Accepted: 2025.01.25

Keywords:

Polymorphism;
FASL gene;
Thyroid cancer;
rs5030772.

© 2024 Arak University of Medical Sciences

Abstract

Introduction: Thyroid cancer is one of the most common types of endocrine malignancies. FASL is one of the most important apoptosis ligands expressed by tumor-infiltrating lymphocytes. This death ligand plays an important role in the elimination of cancer cells by inducing apoptosis in the Fas/FasL pathway, and its disruption induces tumorigenesis. This study investigated the association of the FASL gene polymorphism - INV2nt-124A/G (rs5030772) with the risk of thyroid cancer in the East Azerbaijan region.

Methods: In this case-control study, 115 patients with thyroid cancer and 125 healthy individuals without a family history of cancer from Tabriz city were studied. Five milliliters of peripheral blood were collected from each of these participants. Proteinase K method was used for DNA extraction and FASL gene polymorphism (rs5030772) was analyzed by ARMS-PCR technique. The results were analyzed using Javastat statistics package online software.

Results: The genotype frequencies of AA, AG and GG were 40.35%, 49.12% and 10.53% in patients and 41.6%, 52.8% and 5.6% in the control group, respectively. Genotypic and allelic frequencies did not show significant differences between the patient and control groups ($p>0.05$). By examining the clinicopathological characteristics of the patients, no significant relationship was seen between the clinical characteristics of the patients and the distribution of the genotypes of this polymorphism ($p<0.05$).

Conclusions: The results of this study indicate that the FASL gene polymorphism - INV2nt-124A/G (rs5030772) cannot be considered as a risk factor for thyroid cancer in the studied population in in East Azerbaijan province.

بررسی پلی مورفیسم INV2nt-124A/G (rs5030772) در ژن FASL و استعداد ابتلا به تومور تیروئید در استان آذربایجان شرقی

ناصر پولادی*^۱ ID، نرمین جوادی^۲ ID، سماء دیده ور تبریزی^۲ ID

^۱ دانشیار، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

* نویسنده مسئول: ناصر پولادی، دانشیار، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.
 ایمیل: srna52@gmail.com

DOI: 10.61186/jams.28.2.99

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۰۷	چکیده
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۰۶	مقدمه: سرطان تیروئید، یکی از شایع‌ترین انواع بدخیمی‌های غدد درون‌ریز است. FAS یکی از مهم‌ترین لیگاندهای آپوپتوز است که توسط لنفوسیت‌های مهاجم تومور بیان می‌شود. این لیگاند مرگ از طریق القای آپوپتوز در مسیر Fas/FasL نقش مهمی را در حذف سلول‌های سرطانی با بازی می‌کند و اختلال در آن موجب القای تومورزایی می‌شود. این مطالعه همراهی چندشکلی ژن FASL - INV2nt-124A/G (rs5030772) با خطر ابتلا به سرطان تیروئید را در منطقه آذربایجان شرقی مورد بررسی قرار داد.
واژگان کلیدی: چندشکلی؛ ژن FASL؛ سرطان تیروئید؛ rs5030772	روش کار: در این مطالعه مورد-شاهدی، ۱۱۵ بیمار مبتلا به سرطان تیروئید و ۱۲۵ فرد سالم بدون سابقه خانوادگی سرطان از شهر تبریز به عنوان گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. ۵ میلی‌لیتر خون محیطی از هر یک از این شرکت‌کنندگان جمع‌آوری شد. برای استخراج DNA از روش پروتئیناز K استفاده شد و چندشکلی ژن FASL (rs5030772) با تکنیک ARMS-PCR تحلیل گردید. نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Javastat statistics package مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.
تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.	یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپی AA، AG و GG در افراد بیمار به ترتیب ۴۰/۳۵، ۴۹/۱۲ و ۱۰/۵۳ درصد و در گروه شاهد به ترتیب ۵۲/۸، ۴۱/۶ و ۵/۶ درصد به دست آمد. فراوانی ژنوتیپی و آلی تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌های بیمار و شاهد نشان نداد ($P > ۰/۰۵$). با بررسی ویژگی‌های کلینیکی-پاتولوژیکی بیماران، ارتباط معنی‌داری بین مشخصات بالینی بیماران و توزیع ژنوتیپ‌های این چندشکلی دیده نشد ($P < ۰/۰۵$).
	نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که چندشکلی ژن FASL - INV2nt-124A/G (rs5030772) نمی‌تواند به عنوان یک عامل خطر برای ابتلا به سرطان تیروئید در جمعیت مورد بررسی در استان آذربایجان شرقی تلقی شود.
	ارجاع: پولادی ناصر، جوادی نرمین، دیده ور تبریزی سماء. بررسی پلی‌مورفیسم INV2nt-124A/G (rs5030772) در ژن FASL و استعداد ابتلا به تومور تیروئید در استان آذربایجان شرقی. مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک ۱۴۰۴؛ ۲۸ (۲): ۹۹-۱۰۶.

مقدمه

سرطان تیروئید، یکی از شایع‌ترین انواع بدخیمی‌های غدد درون‌ریز است (۱). در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای برای شناسایی عوامل مولکولی و ژنتیکی مؤثر بر بروز این بیماری انجام شده است (۲). سرطان پاپیلاری تیروئید (Papillary thyroid cancer) PTC به‌وضوح رایج‌ترین نوع سرطان تیروئید است که حدود ۸۵ درصد از موارد را شامل می‌شود و شامل چندین زیرنوع است. پس از آن، با فاصله‌ای زیاد، سرطان فولیکولار تیروئید FTC (Follicular thyroid carcinoma) قرار دارد که تقریباً ۵ درصد از موارد را به خود اختصاص داده و از لحاظ تاریخی به مناطق کمبود ید

مرتبط بوده است (۳).

تنوع ژنتیکی عامل حیاتی در تکامل و بقای گونه‌هاست که امکان سازگاری با شرایط محیطی متغیر را فراهم می‌سازد و به مقاومت در برابر بیماری‌ها و عوامل مضر کمک می‌کند. یکی از جنبه‌های کلیدی تنوع ژنتیکی، چندشکلی‌های ژنی و تأثیر آن‌ها بر ریسک ابتلا به بیماری‌ها است که سال‌ها مورد تحقیق و بررسی گسترده قرار گرفته است (۴). چندین نوع چندشکلی ژنی وجود دارد که چندشکلی‌های تک نوکلئوتید (SNPs) رایج‌ترین آن‌ها هستند. SNPها شامل تغییر در یک نوکلئوتید از توالی DNA هستند و شامل جایگزینی (تعویض یک نوکلئوتید با نوکلئوتید دیگر،

با وجود مطالعات انجام شده در این حوزه، به دلیل تفاوت‌های موجود در عوامل محیطی مانند نژاد، تغذیه و قومیت در جمعیت‌های مختلف، این پژوهش به منظور بررسی ارتباط این چندشکلی با تومور تیروئید و با در نظر گرفتن عوامل محیطی مرتبط با جمعیت مورد مطالعه انجام شده است. بنابراین، مطالعه حاضر ارتباط بین چندشکلی INV2nt-124 A/G FasL را در منطقه شمال غرب ایران ارزیابی می‌کند.

روش کار

این مطالعه مورد-شاهدی در آزمایشگاه رادیوبیولوژی دانشگاه تبریز انجام شد. در این مطالعه، ۱۱۵ فرد مبتلا به تومور تیروئید که در بیمارستان‌های امام رضا (ع) و نورنجات تبریز تحت عمل جراحی تیروئیدکتومی قرار گرفته بودند، به عنوان گروه بیماران انتخاب شدند. همچنین، ۱۲۵ فرد سالم بدون سابقه فامیلی سرطان در بستگان درجه اول و دوم، به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند. مشخصات تمامی این افراد با کسب اجازه و رضایت از آن‌ها ثبت گردید. مطالعه روی نمونه‌های انسانی مورد استفاده در این پژوهش با کد اخلاق شماره IR.TBZMED.REC.1399.1162 در دانشگاه علوم پزشکی تبریز مورد تأیید قرار گرفت. معیارهای ورود به مطالعه برای گروه بیماران، ابتلا به تومورهای تیروئیدی نیازمند جراحی تیروئیدکتومی بود و افرادی که دارای مشکلات تیروئیدی بدون نیاز به جراحی بودند، در این مطالعه شرکت نکردند. نمونه‌گیری خون وریدی انجام شد و از هر فرد مقدار ۵ سی‌سی خون گرفته شد که در لوله‌های فالتون حاوی EDTA به عنوان ماده ضد انعقاد قرار گرفت. سپس لوله‌ها به آرامی تکان داده شدند تا خون و EDTA مخلوط شده و از تشکیل لخته‌های خونی جلوگیری شود. در ادامه، استخراج DNA با روش رسوب‌گذاری با نمک اشباع انجام شد. در این روش، ابتدا با استفاده از لیز بافر گلبول‌های قرمز از خون حذف شده و سپس با سانتریفوژ کردن و هضم با پروتئیناز K (SinaClon، ایران)، DNA از گلبول‌های سفید خون استخراج گردید. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله بعد، نمونه‌های DNA استخراج شده با استفاده از سیستم واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (ARMS-PCR) تکثیر شدند.

برای این روش، برای هر فرد دو بار واکنش ARMS-PCR انجام شد. در هر واکنش، از سه پرایمر (تک‌پوزیست، ایران) استفاده شد که شامل دو پرایمر بیرونی و یک پرایمر داخلی بود. پرایمر داخلی به محل چندشکلی مرتبط است و به این معناست که آلل مربوط به این محل را تکثیر می‌کند. در واکنش PCR بعدی برای همان فرد، از پرایمر دیگری با خاصیت آلل-ویژه استفاده شد. حجم نهایی واکنش PCR برابر با ۲۵ میکرولیتر بود و شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x PCR، ۰/۷ میکرولیتر کلرید منیزیم (۱۰۰ mM)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰ mM) (SinaClon، ایران)، ۰/۷ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت (۱۰ پیکومولار)، ۰/۲ میکرولیتر Taq polymerase (SinaClon، ایران) معادل یک واحد آنزیم، ۱ میکرولیتر DNA (معادل ۲۰۰ نانوگرم) و مقدار ۱۸/۷ میکرولیتر آب مقطر دوبار یونیزه شد.

درج (اضافه کردن یک نوکلئوتید) یا حذف (برداشتن یک نوکلئوتید) می‌شوند (۵). تنوع در توالی کدگذار ژن‌ها می‌تواند بر ساختار و عملکرد پروتئین‌ها تأثیر بگذارد. علاوه بر این، چندشکلی‌ها در نواحی غیرکدگذار مانند اینترون‌ها یا نواحی تنظیمی می‌تواند بر فرایندهای رونویسی، ترجمه و تنظیم ژن تأثیر داشته باشد (۴).

حفظ هموستازی سلولی نیازمند تنظیم دقیق و بالانس ظریفی بین سیگنال‌های حفظ حیات و مرگ سلولی است. با این حال، در طول پیشرفت بیماری و درمان، این تعادل اغلب مختل می‌شود (۶، ۷). به طور خاص، در طول تومورزایی یا به عنوان پاسخ به درمان‌های سرطانی، سیگنال‌های برنامه‌ریزی شده برای بقای سلول (مانند اتوفاژی) و مرگ سلولی (مانند آپوپتوز) به طور همزمان تحریک می‌شوند. سرنوشت نهایی سلول توسط تنظیم هماهنگ سطوح اتوفاژی و آپوپتوز تعیین می‌شود. این تعادل بین اتوفاژی و آپوپتوز به طور پیچیده‌ای توسط سیگنال‌ها و مولکول‌های مختلف سلولی تنظیم می‌شود و تعامل آن‌ها پیامدهای قابل توجهی برای درمان هدمند سرطان دارد (۸، ۹).

فرار از سیستم ایمنی، استراتژی کلیدی تومور برای حفظ و پیشرفت خود است. FasL یکی از مهم‌ترین لیگاند‌های آپوپتوز است که توسط لنفوسیت‌های مهاجم تومور (TILs) بیان می‌شود (۱۰). سیستم Fas/FasL نقش مرکزی در تنظیم فیزیولوژیک آپوپتوز دارد و در پاتوژنز چندین نئوپلاسم، بیماری سیستم ایمنی و حذف سلول‌های سرطانی نقش دارد (۱۱، ۱۲). با این حال، سلول‌های توموری می‌توانند سطوح بالایی از FasL را بیان کنند که منجر به آپوپتوز در TILs می‌شود. بیان Fas/FasL به حفظ سلول‌های بنیادی سرطانی (CSCs) مرتبط است و به تهاجمی بودن تومور، متاستاز، عود و مقاومت به شیمی‌درمانی کمک می‌کند (۱۰).

ژن FasL در کروموزوم ۱q23 انسانی قرار دارد و شامل ۴ اگزون است که حدود ۸ کیلوپایه را پوشانده‌اند و ۲۸۱ اسید آمینه (پروتئین غشایی نوع II) را کد می‌کند (۱۳). دو چندشکلی مهم این ژن شامل انتقال C به T در موقعیت ۸۴۴- است که باعث افزایش سه برابری میل اتصال پروتئین‌های متصل‌شونده به CAAT و فاکتورهای رونویسی β به پروموتور می‌شود (۱۴).

همچنین دیگر چندشکلی‌های این ژن در موقعیت ۱۲۴ اینترون ۲ (FasL IVS2nt A124G) باعث تغییر A به G می‌شوند و احتمالاً بر بیان ژن FasL تأثیر می‌گذارند (۱۵). نتیجه مطالعات حاکی از این است که چندشکلی FasL -844 C/T ممکن است بر بیان FasL و سیگنالینگ با واسطه FasL و در نهایت حساسیت به سرطان تأثیر بگذارد که ممکن است این ارتباط عملکردی برای چندشکلی FasL IVS2nt A124G نیز وجود داشته باشد. مطالعات متعددی نقش چندشکلی IVS2nt A124G FasL را در علت شناسی سرطان‌های مختلف از جمله دهانه رحم، سینه، مثانه، ریه، پروستات، سر و گردن و مری بررسی کرده‌اند (۱۳). و در برخی مطالعات انجام شده بیان FasL در تومورهای مختلف دیده شده است، از قبیل رده‌های سلولی مشتق از کارسینومای کولون، کارسینومای هپاتوسلولار، مالینوما، میلوما، سرطان ریه، گلیوما و کارسینوما تخمدان (۱۶).

توالی‌های پرایمرها و طول محصول‌های حاصل از آن‌ها به ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای روش ARMS-PCR

نام پرایمر	توالی پرایمر
پرایمر (FO) رفت بیرونی	5'-GGTCTTCTTGGATTAGTCACCCAACTT-3'
پرایمر (RO) برگشت بیرونی	5'-CACTTTCTCTCAGCTCCTTTTTTCAG-3'
پرایمر (FI) رفت داخلی	5'-CTGCAGTTACAGACCTACATGATTAGTCTG-3'
پرایمر (RI) برگشت داخلی	5'-TTAAAAACCGTAAATGGCAACAGTCTAAAAT-3'

جدول ۲. اندازه محصول PCR پرایمرهای تکنیک ARMS-PCR

اندازه محصول PCR	نام پرایمرها
۴۳۸ (bp)	FO, RO
۱۹۶ (bp)	FI, RO
۳۰۰ (bp)	RI, FO

پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه توسط Hashemi و همکاران طراحی و به کار گرفته شده‌اند (۱۷). شرایط بهینه برای برگزاری واکنش PCR در جدول ۳ ارائه شده است. محصولات PCR برای اطمینان از اندازه قطعات ایجادشده روی ژل آگارز ۲ درصد بارگذاری و نهایتاً با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید (SinaClon، ایران) و دستگاه شناسایی نور ماوراءبنفش مشاهده و بررسی شدند. نتایج الکتروفورز این محصولات در شکل ۱ نشان داده شده است. برای تایید ژنوتیپ‌های به‌دست‌آمده از روش T-ARMS-PCR، تعدادی از نمونه‌ها تعیین توالی شدند. محصولات PCR برای تعیین توالی به شرکت پیشگام تهران ارسال گردید و پس از انجام توالی‌یابی، اطلاعات با نرم‌افزار Chromas بررسی شدند.

جهت بررسی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها بین گروه شاهد و بیمار از آزمون Chi-square و Pearson استفاده شد. قوت و شدت ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌ها و ریسک سرطان با استفاده از نسبت شانس با فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد محاسبه گردید و برای محاسبه‌ی آزمون‌های آماری اشاره شده از برنامه‌ی javastat online statistics package (www.statpages.info/ctab2x2.html) استفاده شد. برای تمامی آزمون‌ها، $P < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

در این تحلیل از نرم‌افزارهای آنلاین نظیر AliBaba

Spliceaid 2 و Haploreg بهره گرفته شد. از نسخه ۲/۱ وب‌سایت سایت AliBaba (www.gene-regulation.com) برای تحلیل و شناسایی جایگاه‌های اتصال فاکتورهای رونویسی در نواحی پروموتور ژن استفاده گردید. همچنین، وب‌سایت Spliceaid 2 (http://193.206.120.249/splicing_tissue.html) برای بررسی آنلاین و تجزیه و تحلیل فرایند پیرایش که به توالی pre-mRNA متصل می‌شود، مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت، نرم‌افزار HaploReg (www.pubs.broadinstitute.org) که به بررسی نواحی غیرکدکننده ژنوم و SNP‌های تنظیم‌کننده مرتبط با بیماری‌ها اختصاص دارد، برای بررسی تمایل اتصال فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌ها به چندشکلی INV2nt-124A/G ژن FASL به کار رفت.

یافته‌ها

پس از انجام PCR قطعه‌های تکثیری به اندازه‌های ۴۳۸، ۳۰۰ و ۱۹۶ جفت باز آشکار گردید. باند ۴۳۸ جفت بازی برای باند کنترل، باند ۳۰۰ جفت بازی برای آلل A و باند ۱۹۶ جفت بازی برای آلل G می‌باشد (شکل ۱).

جهت تأیید ژنوتیپ‌های به دست آمده از PCR تعدادی از نمونه‌ها جهت تعیین توالی ارسال گردید که نتایج مربوطه در شکل‌های ۲، ۳ و ۴ نمایش داده شده است.

توزیع فراوانی آللی و ژنوتیپی نمونه‌های گروه بیماران و شاهد در جدول ۴ نمایش داده شده‌است. در چند شکلی FASL INV2nt-124 A/G فراوانی ژنوتیپ AA در گروه بیمار ۴۰/۳۵ درصد و ۴۱/۰۶ درصد در گروه شاهد مشاهده شد. فراوانی ژنوتیپ AG ۴۹/۱۲ درصد در بیماران و ۵۲/۸ درصد در بین افراد سالم مشاهده گردید. ژنوتیپ GG نیز ۱۰/۵۳ درصد از بیماران و ۵/۶ درصد از گروه شاهد تشخیص داده شد که کم‌ترین شیوع را داشت. بنابراین، هیچ‌یک از ژنوتیپ‌ها ارتباط معنی‌داری بین توزیع فراوانی ژنوتیپی در گروه‌های شاهد و بیمار نشان ندادند ($P > 0.05$).

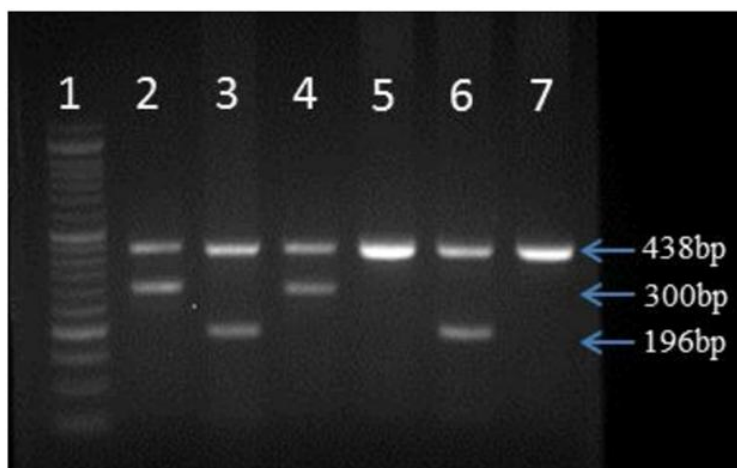
فراوانی آلل G ۳۵/۰۸ درصد در گروه بیمار و ۳۲ درصد در افراد سالم تعیین شد. فراوانی آلل A نیز ۶۴/۹۱ درصد در بیماران و ۶۸ درصد در افراد سالم ثبت گردید. از این‌رو، تفاوت معنی‌داری در فراوانی آلل‌های A و G برای چندشکلی rs5030772 بین بیمار و گروه شاهد وجود نداشت ($P > 0.05$).

مشخصات آسیب‌شناختی بیماران شامل درجه تومور، سن، اندازه‌ی تومور و درگیری گره‌های لنفاوی و همراهی آنها با چندشکلی FASL INV2nt-124 A/G مورد بررسی قرار گرفت که در جدول ۵ خلاصه شده است. ارتباط معنی‌داری بین مشخصات بالینی بیماران و توزیع ژنوتیپ‌های این چندشکلی دیده نشد.

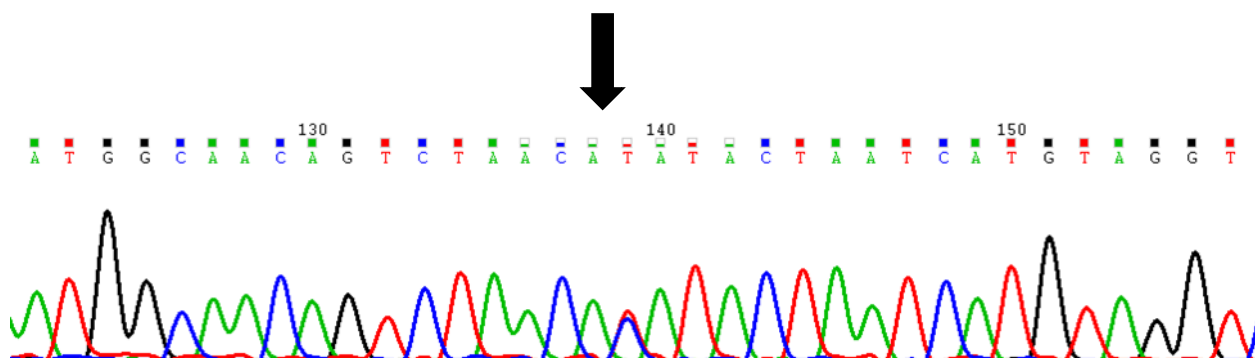
جدول ۳. شرایط واکنش PCR

تعداد سیکل	مرحله	درجه حرارت (سانتی‌گراد)	مدت زمان (دقیقه و ثانیه)
۱ سیکل	Initial Denaturation	۹۵	m۵
۳۵ سیکل	Denaturation	۹۵	s۳۰
	Annealing	۵۸	s۳۰
	Extension	۷۲	s۴۰
۱ سیکل	Final Extension	۷۲	m۱۰

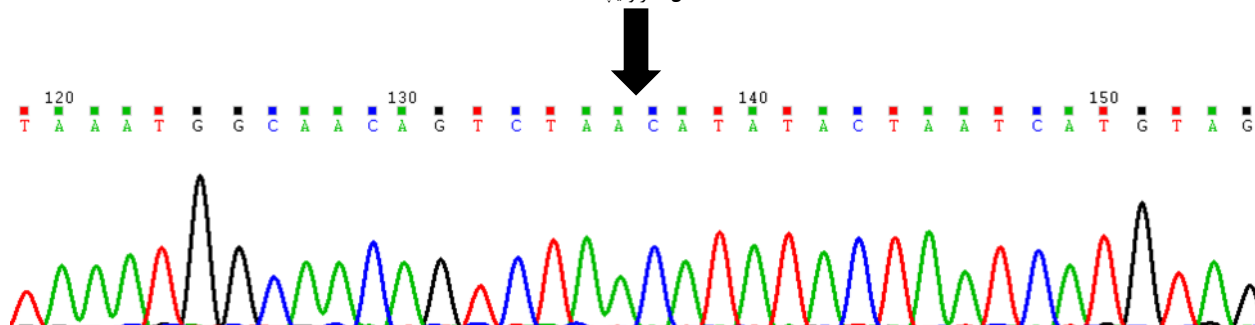
دما و مدت زمان لازم PCR برای چندشکلی FASL INV2nt-124A/G



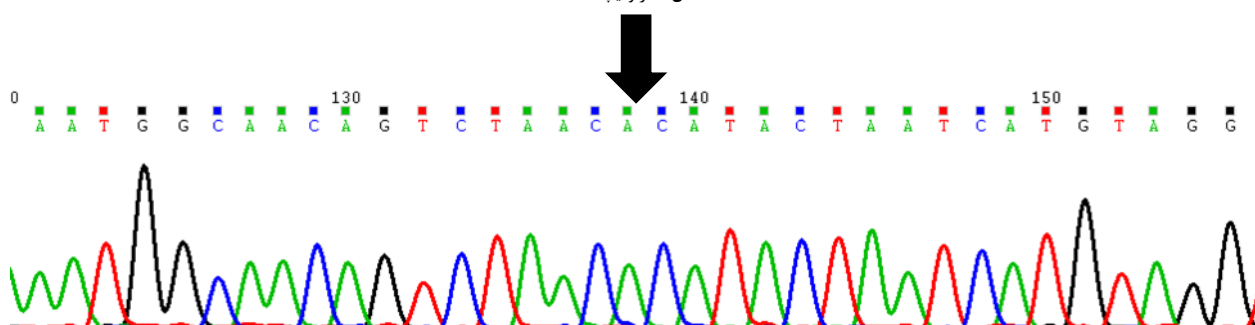
شکل ۱. الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد برای تعدادی از محصول PCR افراد بیمار و مارکر ۵۰bp اندازه قطعات تکثیری ۳۰۰، ۴۳۸ و ۱۹۶ جفت باز به ترتیب برای آللهای باند کنترل A و G می باشد. ستون ۱: نشانگر مولکولی ۵۰ جفت بازی، ستون ۲ و ۳: مربوط به فرد هتروزیگوت AG، ستون ۴ و ۵: مربوط به فرد هموزیگوت AA، ستون ۶ و ۷: مربوط به فرد هموزیگوت GG.



شکل ۲. ژنوتیپ AG



شکل ۳. ژنوتیپ AA



شکل ۴. ژنوتیپ GG

جدول ۴. توزیع فراوانی آللی و ژنوتیپی نمونه‌های بیمار و شاهد

ژنوتیپ / آلل	بیمار تعداد (درصد)	شاهد تعداد (درصد)	OR	P
GG	۱۲ (۱۰/۵۳)	۷ (۵/۶)	۱/۹۸۴ (۰/۶۲۳-۶/۵۶۶)	۰/۲
AG	۵۶ (۴۹/۱۲)	۶۶ (۵۲/۸)	۰/۸۶۳ (۰/۴۷۷-۱/۵۶۱)	۰/۶۰۳
AA	۴۶ (۴۰/۳۵)	۵۲ (۴۱/۰۶)	۰/۹۵ (۰/۵۲-۱/۷۳۵)	۰/۸۸۶
G	۸۰ (۳۵/۰۸)	۸۰ (۳۲)	۱/۱۴۸ (۰/۶۱۲-۲/۱۵۶)	۰/۶۴۵
A	۱۴۸ (۶۴/۹۱)	۱۷۰ (۶۸)	۰/۸۷۱ (۰/۴۶۴-۱/۶۳۳)	۰/۶۴۴

همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، بین چندشکلی FASL INV2nt-124 A/G و سرطان تیروئید ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$).

نتایج بررسی با نرم‌افزار AliBaba نشان داد که در حالت حضور آلل وحشی A تمایل به اتصال فاکتور رونویسی Oct-1 افزایش می‌یابد و در حالت حضور آلل جهش یافته G هیچ فاکتور رونویسی تمایل به اتصال ندارد. نتایج حاصل از بررسی آنلاین با کمک نرم‌افزار بیوانفورماتیک SpliceAid نشان داد که بر اثر تغییر نوکلئوتید A به G پروتئین ETR-3 با امتیاز مثبت ۵ به به توالی pre-mRNA مربوطه متصل می‌شود. نتایج حاصل از

بررسی SNP با نرم‌افزار HaploReg نشان داد که با تغییر آلل وحشی به آلل موتانت به ترتیب موتیف‌های فاکتورهای رونویسی Pou2f2, Lhx4, Foxp3 و Zfp187 تغییر پیدا می‌کنند. این نتایج به محققان اجازه می‌دهد تا مکان‌های بالقوه اتصال فاکتورهای رونویسی را شناسایی کنند. شناسایی این مکان‌های اتصال به ویژه در زمینه مطالعات تنظیم بیان ژن بسیار مفید هستند. نتایج در شکل ۵ آورده شده است.

جدول ۵. همبستگی علایم بالینی بیماران مبتلا به سرطان تیروئید با ژنوتیپ‌های چندشکلی FASL INV2nt-124 A/G

علایم بالینی بیماران	AA تعداد (درصد)	AG تعداد (درصد)	GG تعداد (درصد)	P
اندازه‌ی تومور (سانتی‌متر)				
≤۲/۵	۱۵ (۲۱/۱)	۲۵ (۳۵/۲)	۷ (۹/۹)	۰/۷۰۸۶
>۲/۵	۹ (۱۲/۷)	۱۳ (۱۸/۳)	۲ (۲/۸)	
وضعیت درگیری گره‌های لنفاوی				
منفی	۱۱ (۱۷/۲)	۱۹ (۲۹/۷)	۳ (۴/۷)	۰/۶۰۴۷
مثبت	۱۳ (۲۰/۳)	۱۴ (۲۱/۹)	۴ (۶/۲)	
آسیب‌شناسی				
کارسینومای مدولاری	۱ (۱/۳)	۲ (۲/۶)	۰	۰/۴۴۷۶
کارسینومای سلول هارتل	۰	۳ (۳/۹)	۰	
کارسینومای فولیکولار	۲۷ (۳۵/۵)	۲ (۲/۶)	۱ (۱/۳)	
کارسینومای پاپیلاری	۰	۳۱ (۴۰/۸)	۹ (۱۱/۸)	
درج‌ی تومور				
۱	۲۶ (۳۴/۲)	۲۸ (۳۶/۸)	۹ (۱۱/۸)	۰/۲۸۵۶
۲	۱ (۱/۳)	۴ (۵/۳)	۰	
۳	۱ (۱/۳)	۶ (۷/۹)	۱ (۱/۳)	
سن				
>۳۵	۲۵ (۲۲/۵)	۲۸ (۲۵/۲)	۶ (۵/۴)	۰/۹۶۴۶
≤۳۵	۲۱ (۱۸/۲)	۲۶ (۲۳/۴)	۵ (۴/۵)	

hr	pos (hg38)	LD (r ²)	LD (D')	variant	Ref	Alt	AFR freq	AMR freq	ASN freq	EUR freq	Promoter histone marks	Enhancer histone marks	Motifs changed	Selected eQTL hits	GENCODE genes	dbSNP func annot
1	172658724	0.92	0.98	<u>rs41309790</u>	A	T	0.01	0.09	0.00	0.13	BLD	5 tissues	4 altered motifs	1 hit	289bp 5' of FASLG	
1	172664210	1	1	<u>rs5030772</u>	A	G	0.01	0.09	0.00	0.13	BLD	BLD	4 altered motifs	1 hit	FASLG	intronic

شکل ۵. نتیجه به دست آمده از نرم‌افزار HaploReg: بر اثر تغییر نوکلئوتید A به G در چندشکلی ژن FASL INV2nt-124 A/G موتیف‌های فاکتورهای رونویسی Pou2f2, Lhx4, Foxp3 و Zfp187 تغییر پیدا می‌کند.

بحث

به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که در جمعیت شمال غرب ایران، ارتباط معنی داری میان ژنوتیپ‌ها و آلل‌های چندشکلی *FASL* (rs5030772) با خطر ابتلا به سرطان تیروئید وجود ندارد.

نتایج آنالیزهای *Insilico* در مطالعه‌ی حاضر نشان دادند، در حضور آلل وحشی A، محل اتصال برای فاکتور رونویسی Oct-1 ایجاد می‌شود. این فاکتور معمولاً نقش کلیدی در رونویسی ژن‌ها دارد و می‌تواند تأثیر زیادی بر روی بیان ژن‌ها و فرایندهای بیوشیمیایی داشته باشد. نبود محل اتصال این فاکتور رونویسی در حالت G، می‌تواند باعث کاهش یا عدم بیان برخی ژن‌ها شود و در نهایت بر روی فرایندهای بیولوژیکی مرتبط تأثیر منفی بگذارد. همچنین توانایی اتصال پروتئین ETR-3 به توالی pre-mRNA با تغییر نوکلئوتیدی A به G تحت تأثیر قرار می‌گیرد که می‌تواند به ایجاد الگوهای اتصال جدید بین پروتئین و RNA کمک کند. این اتصال ممکن است بر فرایندهای پس از رونویسی و بلوغ پروتئین‌ها تأثیر بگذارد. با تغییر نوکلئوتیدی A به G در این چند شکلی تک نوکلئوتیدی تغییراتی در موتیف‌های *Foxp3*، *Lhx4*، *Pou2f2*، *Zfp187* ایجاد می‌شود که می‌تواند به تغییرات قابل توجهی در فعالیت‌های بیولوژیکی و تنظیم بیان ژن‌ها منجر شود. این فاکتورها به طور مستقیم در تنظیم فرایندهای ایمنی، رشد و توسعه سلولی نقش دارند. این نتایج نشان‌دهنده اهمیت مطالعات بیونفورماتیک در شناسایی و درک تأثیرات واریانت‌های ژنتیکی است. اطلاعات به دست آمده می‌تواند منجر به پیشرفت‌های بیشتری در درک چگونگی تنظیم بیان ژن‌ها شود و مسیرهای جدیدی را برای پژوهش در زمینه مکانیزم‌های مولکولی بیماری‌ها معرفی کند. مطالعات مختلفی در مورد این چندشکلی و همراهی آنها با انواع سرطان‌ها در نقاط مختلف جهان انجام شده است.

در مطالعه‌ای که توسط Hashemi و همکاران در سال ۲۰۱۳ در جنوب شرق ایران بر روی چندشکلی *FASL* INV2nt-124A/G و چندشکلی‌های دیگر ژن *FASL* انجام یافته، گزارش کرده‌اند که این چندشکلی ارتباط معنی داری با خطر فزاینده سرطان پستان نشان می‌دهد (۱۳).

Erdogan و همکاران، تأثیر پلی مورفیسم‌های ژن‌های *FAS* و *FASL* را بر سرطان پاپیلاری تیروئید (PTC) به طور خاص در جمعیت ترکیه بررسی کردند. این بررسی روی ۱۰۰ نمونه سالم و ۴۵ نمونه بیمار با استفاده از روش RFLP-PCR انجام شد و مشخص گردید که پلی مورفیسم مربوطه احتمالاً در ایجاد این بیماری نقش ندارد (۱۸).

همچنین، در سال ۲۰۲۴ Tahmasebi Fard به بررسی تأثیر وضعیت یائسگی و نمایه توده بدنی بر روی چندشکلی‌های ژن‌های *Fas* و *FasL* و ارتباط آن‌ها با خطر ابتلا به سرطان پستان پرداخت. نتایج نشان داد که وضعیت یائسگی (زنان یائسه در مقایسه با غیر یائسه) تأثیر قابل توجهی بر خطر ابتلا به سرطان پستان داشته و همچنین همراهی بین چندشکلی‌های IVS-2nt و 844TT و سرطان پستان را گزارش کرد (۱۵).

علاوه بر این، Daripally و همکاران در سال ۲۰۲۲ به بررسی ارتباط چندشکلی‌های ناحیه ژنتیکی *FASL* IVS2nt-124 در بیماران هندی مبتلا به سرطان دهان پرداختند. نتایج نشان داد که چندشکلی مربوطه خطر ابتلا به سرطان مخاط باکال (Buccal mucosa cancer) را در

مردان افزایش و در زنان کاهش می‌دهد (۱۹).

در مطالعه انجام شده بر روی ۱۰۰ نمونه بیمار و ۱۰۰ نمونه شاهد توسط پریسا پورحیدر و همکاران در سال ۲۰۱۷، همراهی چندشکلی ژن *FASL* IVS2nt-124 و خطر ابتلا به سرطان پستان در آذربایجان شرقی گزارش شده است. نتایج این تحقیق نشان داد که ژنوتیپ AA با خطر افزایش سرطان پستان ارتباط دارد (۲۰). با توجه به اینکه مطالعه حاضر با مطالعه پریسا پورحیدر و همکاران (۲۰) هر دو بر روی جمعیت بیماران سرطان‌های پستان و تیروئید آذربایجان شرقی صورت گرفته است، نتایج متفاوت بدست آمده نشان می‌دهد همراهی و عدم همراهی چندشکلی ژن *FASL* IVS2nt-124 می‌تواند ویژگی بافتی داشته باشد.

در اکثر مطالعات اشاره شده، رابطه معنی داری بین بیماری‌های مختلف و چندشکلی‌های مختلف ژن *FASL* مشاهده می‌شود. با این حال، در مطالعه حاضر، برخلاف بیشتر تحقیقات پیشین، ارتباط معنی داری بین چندشکلی *FASL* INV2nt-124A/G و ریسک ابتلا به سرطان تیروئید در جمعیت آذری-ایرانی پیدا نشد. علت این نتایج متناقض ممکن است به تفاوت‌های ژنتیکی در جمعیت‌های مورد مطالعه بستگی داشته باشد. همچنین نوع سرطان مورد بررسی در هر پژوهش نیز می‌تواند در این اختلاف‌ها مؤثر باشد. عوامل دیگری از جمله شرایط محیطی، تفاوت‌های نژادی و تنوع تغذیه نیز ممکن است تأثیرگذار باشند. پیشنهاد می‌شود که ارتباط چندشکلی rs1052133 با ابتلا به سرطان تیروئید در گروه‌های بزرگ‌تر و نمونه‌های بیشتر از افراد بیمار و سالم، در سایر نقاط ایران و جهان بررسی شود.

نتیجه‌گیری

بنابراین، احتمالاً نمی‌توان چندشکلی ژن *FASL* INV2nt-124A/G را به عنوان یک عامل مستعدکننده برای ابتلا به سرطان تیروئید در نظر گرفت. عدم همراهی این چند شکلی با تومورهای تیروئیدی و همراهی آن با سرطان پستان در جمعیت آذربایجان شرقی، می‌تواند نشان دهنده ویژگی بافتی این چند شکلی ژنی را نشان دهد، این نتایج بر لزوم انجام مطالعات بیشتر در زمینه چندشکلی‌های ژنتیکی و تأثیرات آن‌ها بر بیماری‌های مختلف تأکید می‌کنند و می‌توانند به شناسایی زمینه‌های بالقوه برای پژوهش روی مکانیسم‌های مولکولی بیماری‌ها کمک کنند.

تشکر و قدردانی

این بررسی با حمایت مالی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و همکاری کارکنان محترم آزمایشگاه رادیوبیولوژی دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز به انجام رسیده است. از تمامی عزیزانی که ما را در به اتمام رساندن این پروژه یاری نمودند، کمال سپاس و قدردانی را داریم.

سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان در تمامی قسمت‌های مقاله نقش داشتند.

تضاد منافع

این مطالعه هیچ تضاد منافی با افراد یا سازمان‌ها ندارد.

References

1. Dhuli K, Medori MC, Donato K, Maltese PE, Tanzi B, Tezzele S, et al. Omics sciences and precision medicine in thyroid cancer. *Clin Ter.* 2023;174(Suppl 2(6)):11-20. **pmid:** 37994744 **doi:** 10.7417/CT.2023.2467
2. Peng X, Zhang K, Ma L, Xu J, Chang W. The role of long non-coding RNAs in thyroid cancer. *Front Oncol.* 2020;10:941. **pmid:** 32596158 **doi:** 10.3389/fonc.2020.00941
3. Leandro-García LJ, Landa I. Mechanistic insights of thyroid cancer progression. *Endocrinology.* 2023;164(9):bqad118. **pmid:** 37503738 **doi:** 10.1210/endo/bqad118
4. Gielecińska A, Kciuk M, Kołat D, Kruczkowska W, Kontek R. Polymorphisms of DNA Repair Genes in Thyroid Cancer. *Int J Mol Sci.* 2024;25(11):5995. **pmid:** 38892180 **doi:** 10.3390/ijms25115995
5. Sudan J, Sharma S, Salgotra RK, Pandey RK, Neelam D, Singh R. Elucidating the process of SNPs identification in non-reference genome crops. *J Biomol Struct Dyn.* 2023;41(24):15682-90. **pmid:** 37021361 **doi:** 10.1080/07391102.2023.2194002
6. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(6):2129-44. **pmid:** 25824729 **doi:** 10.7314/apjcp.2015.16.6.2129.
7. Wang J, Cao Z, Wang P, Zhang X, Tang J, He Y, et al. Apoptotic extracellular vesicles ameliorate multiple myeloma by restoring fas-mediated apoptosis. *ACS Nano.* 2021;15(9):14360-72. **pmid:** 34506129 **doi:** 10.1021/acsnano.1c03517
8. Morana O, Wood W, Gregory CD. The apoptosis paradox in cancer. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1328. **pmid:** 35163253 **doi:** 10.3390/ijms23031328
9. Chen R, Zou J, Zhong X, Li J, Kang R, Tang D. HMGB1 in the interplay between autophagy and apoptosis in cancer. *Cancer Lett.* 2024;581:216494. **pmid:** 38007142 **doi:** 10.1016/j.canlet.2023.216494
10. Abou Shousha S, Baheeg S, Ghoneim H, Zoheir M, Hemida M, Shahine Y. The effect of Fas/FasL pathway blocking on apoptosis and stemness within breast cancer tumor microenvironment (preclinical study). *Breast Dis.* 2023;42(1):163-76. **pmid:** 37334575 **doi:** 10.3233/BD-220077
11. Lagunas-Rangel FA. Fas (CD95)/FasL (CD178) system during ageing. *Cell Biol Int.* 2023;47(8):1295-313. **pmid:** 37132427 **doi:** 10.1002/cbin.12032
12. Xu D, Wang B, Chen PP, Wang YZ, Miao NJ, Yin F, et al. c-Myc promotes tubular cell apoptosis in ischemia-reperfusion-induced renal injury by negatively regulating c-FLIP and enhancing FasL/Fas-mediated apoptosis pathway. *Acta Pharmacol Sin.* 2019;40(8):1058-66. **pmid:** 30593588 **doi:** 10.1038/s41401-018-0201-9
13. Hashemi M, Fazaeli A, Ghavami S, Eskandari-Nasab E, Arbabi F, Mashhadi MA, et al. Functional polymorphisms of FAS and FASL gene and risk of breast cancer—pilot study of 134 cases. *PLoS One.* 2013;8(1):e53075. **pmid:** 23326385 **doi:** 10.1371/journal.pone.0053075
14. Moudi B, Salimi S, Farajian Mashhadi F, Sandoughi M, Zakeri Z. Association of FAS and FAS ligand genes polymorphism and risk of systemic lupus erythematosus. *ScientificWorldJournal.* 2013; 2013:176741. **pmid:** 24348139 **doi:** 10.1155/2013/176741
15. Tahmasebi Fard Z. Evaluation of the effect of menopausal status and BMI on polymorphisms in Fas/Fas L and the risk of breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2024; 25(1):e56-e62. **pmid:** 39214844 **doi:** 10.1016/j.clbc.2024.07.006
16. Hajimirza Shafiesoltani P, Forouzes F, Shabani M. The investigation of the role of Fas and FasL molecules in the extrinsic pathway of apoptosis as a target for cancer therapy in colorectal cancer [in Persian]. *Clin Exc.* 2020;10(3):1-17.
17. Hashemi M, Fazaeli A, Ghavami S, Eskandari-Nasab E, Arbabi F, Mashhadi MA, et al. Functional polymorphisms of FAS and FASL gene and risk of breast cancer—pilot study of 134 cases. *PLoS One.* 2013;8(1):e53075. **pmid:** 23326385 **doi:** 10.1371/journal.pone.0053075
18. Erdogan M, Karadeniz M, Berdeli A, Tamsel S, Ertan Y, Uluer H, et al. Fas/Fas ligand gene polymorphism in patients with papillary thyroid cancer in the Turkish population. *J Endocrinol Invest.* 2007;30(5):411-6. **pmid:** 17598974 **doi:** 10.1007/BF03346319
19. Daripally S, Peddi K. Differential cancer risk and survival in Indian oral cancer patients with genic region FAS and FASL polymorphisms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2022;133(3):315-25. **pmid:** 34753694 **doi:** 10.1016/j.oooo.2021.09.008
20. Poorheydar P, Hosseinpour Feizi M, Safaralizadeh R, Pouladi N, Ravanbakhsh Gavani R. Study of FasL IVS2nt-124A/G polymorphism in breast cancer patients [in Persian]. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci.* 2017;25(4):279-86.