

حساسیت و ویژگی استفاده همزمان DNA متیلاسیون ژن *RASSF1A* و بیان ژن *FHL1* در تشخیص افتراقی تومورهای خوش خیم از پاپیلاری کارسینومای تیروئید

غلامعباس دیناروند ^۱M.Sc، سیده زینب پیغمبرزاده ^۲Ph.D، مهدی توانا ^۲Ph.D

- ۱- گروه بیوشیمی، دانشکده کشاورزی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران
- ۲- گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: peighambarzade@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۹

چکیده

هدف: هدف این تحقیق بررسی و تعیین حساسیت و ویژگی استفاده همزمان DNA متیلاسیون ژن *RASSF1A* و بیان ژن *FHL1* در تشخیص افتراقی تومورهای خوش خیم از پاپیلاری کارسینومای تیروئید می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ۱۶۰ نمونه از بیماران با تومورهای بدخیم تیروئید (۸۰ نمونه) و خوش خیم تیروئید (۸۰ نمونه) از بین کل بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی اهواز به این تحقیق وارد شدند، استخراج RNA از نمونه‌های پارافینه شده سپس از روی آن cDNA ساخته شد. جهت بررسی بیان ژن از مخلوط واکنش Real Time PCR حاوی ماده‌ی فلورسانت سایبر گرین استفاده شد همچنین برای بررسی هیپرمتیلاسیون ژن پس از استخراج DNA نمونه‌های مختلف به روش COBRA انجام شد در نهایت میزان حساسیت و ویژگی استفاده همزمان دو تست از محاسبات اپیدمیولوژیکی استفاده شد.

نتایج: در تومورهای بدخیم یک همبستگی معکوس معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ بین هیپرمتیلاسیون پروموتور ژن *RASSF1A* با بیان ژن *FHL1* وجود دارد همچنین حساسیت استفاده همزمان تست هیپر متیلاسیون پروموتور ژن *RASSF1A* (کیفی و کمی) و تست بیان نسبی mRNA ژن *FHL1* به ترتیب ۹۸/۲ و ۷۹/۳۲ درصد، همچنین ویژگی استفاده همزمان تست هیپرمتیلاسیون پروموتور ژن *RASSF1A* (کیفی و کمی) و تست بیان ژن *FHL1* به ترتیب ۳۹/۴۷ و ۷۵/۲۹ درصد محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: استفاده همزمان تست هیپرمتیلاسیون پروموتور ژن *RASSF1A* به صورت کیفی و تست بیان ژن *FHL1* جهت تشخیص افتراقی تومورهای خوش خیم از پاپیلاری کارسینومای تیروئید حساسیت بالاتری دارد. واژگان کلیدی: هیپرمتیلاسیون، ژن *RASSF1A*، ژن *FHL1*، حساسیت، ویژگی

مقدمه

سرطان تیروئید شایع‌ترین بدخیمی غدد درون ریز است که در دو دهه اخیر در جهان موارد ابتلا به این سرطان افزایش یافته است (۱). در آمریکا افزایش سالانه موارد ابتلا به سرطان تیروئید بین سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۹، ۶ درصد می‌باشد که در میان همه انواع سرطان‌ها بالاترین مقدار را دارد (۱). اگرچه میزان مرگ و میر ناشی از این سرطان پایین است میزان عود یا دوره درمان بیماری بالا است که موجب افزایش ناتوانی در درمان و مرگ و میر می‌شود (۲). بر اساس آمار انیستیتو سرطان ایران، سرطان تیروئید ۱/۸ درصد کل میانگین سنی بیماران ایرانی ۴۳ سال و نسبت زن به مرد ۱/۸ به ۱ بوده است. سرطان تیروئید در ایران هفتمین سرطان شایع در زنان و چهاردهمین در مردان و یازدهمین سرطان شایع در هر دو جنس است (۳).

بقا ۱۰ ساله سرطان تیروئید در بالغین میانسال ۸۰ تا ۹۶ درصد است. عود مجدد در ۵ تا ۲۰ درصد موارد پاپیلاری تیروئید کارسینوما دیده می‌شود. عود مجدد ممکن است ناشی از درمان ناقص اولیه و یا به دلیل وجود تومور با سلول‌های خیلی مهاجم باشد (۴). ریسک بدخیمی در نمونه‌های (Fine Needle Aspiration) FNA که مشکوک به سرطان بین ۱۰ تا ۴۰ درصد گزارش می‌شوند لذا تمام بیماران نیازمند برداشت ندول مشکوک خواهند بود تا جواب دقیقتر با بررسی نمونه‌های بیوپسی پاتولوژی مشخص شود و فقط در حدود ۲۰ درصد این نمونه‌های مشکوک دارای نئوپلاسم بدخیم خواهند بود (۵). از طرف دیگر در ۱۰ درصد موارد FNA جواب‌های منفی کاذب گزارش می‌شود که منجر به تشخیص دیر هنگام سرطان و در نتیجه درمان دیر هنگام می‌شود و این امر بر روی سیر بیماری تاثیر منفی می‌گذارد (۵).

ژن (Ras association domain family 1)
RASSF1A نام دیگر این ژن NORE2A است و بر روی کروموزوم ۳ در محل 3p21.3 قرار دارد. این ژن

پروتئینی را رمزبندی می‌کند که به پروتئین‌های اثرگذار (RAS RAS effector proteins) شباهت دارد (۶). تغییر بیان این ژن با پاتوژنز انواع مختلفی از سرطان‌ها ارتباط دارد که سرکوبگر تومور بودن این ژن را پیشنهاد می‌دهند. یکی از راه‌های غیر فعال شدن این ژن، هیپرمتیلاسیون جزایر CpG در پروموتور آن است. پروتئین تولید شده با پروتئین‌های سیستم ترمیم DNA مانند XPA واکنش دارد (۶). همچنین این پروتئین مانع تجمع سیکلین D1 می‌شود و بنابراین موجب توقف چرخه سلولی می‌شود (۷).

بررسی بر روی وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن *RASSF1A* نشان داده است که در ۳۵ درصد تومورهای خوش خیم و بدخیم تیروئید این ژن متیله می‌شود (۸). در تحقیقی هیپرمتیلاسیون پروموتور این ژن در سرطان‌ها از جمله تیروئید گزارش شده بود و از آن به‌عنوان یک نشان‌های زیستی مولکولی که امکان تشخیص سلول‌های سرطانی را فراهم می‌سازد، ذکر شده بود (۹). هیپرمتیلاسیون *RASSF1A* در خون و مایعات بدن افراد مبتلا به برخی بدخیمی‌ها مثل سرطان‌های تیروئید هم مشاهده شده بود و بنابراین می‌تواند به‌عنوان یک نشان‌های زیستی در تشخیص زودرس سرطان تیروئید کاربرد داشته باشد (۹). در یک بررسی بر روی ۸۹ تومور تیروئید و ۳ رده سلولی نشان داده شد که در هر سه رده سلولی و در ۳۵ درصد موارد تومورهای خوش خیم و بدخیم هیپرمتیلاسیون *RASSF1A* دیده می‌شود، این تحقیق نشان داد که میزان هیپرمتیلاسیون *RASSF1A* با مقدار بیان آن ارتباط دارد.

ژن (Four and a half LIM domains) FHL1

FHL1: این ژن بر روی کروموزوم X و در محل Xq26 قرار دارد و شماره شناسایی آن ۲۲۷۳ و از ۷ اگزون تشکیل شده است. محصول آن از رشد سلول‌های سرطانی از طریق مسیر پیام‌رسانی مشابه با TGFb جلوگیری می‌کند. این ژن کنترل کننده پرولیفراسیون، تکامل و

گذاشته شد. دو عدد از این لام‌ها برای استخراج RNA و دو عدد دیگر برای استخراج DNA در نظر گرفته شدند و یک لام هم با رنگ همتوکسلین ائوزین (Sigma) رنگ آمیزی شد تا در زمان میکروداایسکشن به‌عنوان راهنما برای شناسایی محدوده سلول‌ها استفاده شود. لام‌های مخصوص برای استخراج RNA در فریزر ۸۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند و لام‌های مخصوص برای استخراج DNA در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس با مقایسه بین لام‌های رنگ‌آمیزی شده با رنگ همتوکسلین ائوزین و لام‌های رنگ‌آمیزی شده با متیلین گرین و با کمک دستگاه لیزر میکرو دایسکشن (LEICA) و یا با کمک استریومیکروسکپ و تیغ جراحی سلول‌های مورد نیاز از سطح لام‌ها برش داده شده و در میکرو تیوب‌های ۱/۵ میکرولیتری قرار داده شدند و تا زمان استخراج DNA و یا RNA در فریزر ۸۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای استخراج DNA از نمونه‌های پارافینی از کیت QIAamp DNA Micro Kit شرکت QIAGEN استفاده شد. برای استخراج DNA از بافت تازه از روش فنل و کلروفرم استفاده شد.

در سال ۱۹۹۷ برای اولین بار روش Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) برای بررسی کمی هیپر متیلاسیون ابداع شد (۱۳). در این روش بعد از تیمار DNA با بی‌سولفیت و انجام PCR، محصولات آن تحت برش آنزیمی قرار می‌گیرند. با توجه به ردیف بازهای اولیه DNA این آنزیم به‌گونه‌ای انتخاب می‌شود که عمل برش را فقط در جزایر CpG دارای هیپرمتیلاسیون انجام دهد. میزان هیپرمتیلاسیون در DNA اولیه با میزان کمی برش محصولات PCR متناسب است (۱۳). اگر CpG در DNA اولیه فاقد هیپرمتیلاسیون باشد در اثر تیمار بی‌سولفیت سیتوزین تبدیل به تیمین شده و جایگاه برش آنزیم از بین می‌رود و عمل برش انجام نخواهد شد. اگر در DNA اولیه مخلوط آل‌های متیله و غیرمتیله وجود داشته باشد در زمان هضم آنزیمی، میزان برش‌ها وابسته به مقدار CpG‌های متیله

آپوپتوز سلولی است (۱۰). در تحقیقی مشخص شد که ژن *FHL1* بیشترین تفاوت بیان نسبی mRNA را در بین دو گروه تومورهای فولیکولار خوش خیم و بدخیم تیروئید دارد و نتیجه‌گیری شده بود که با بررسی تعداد اندکی ژن مانند *FHL1* امکان افتراق تومورهای خوش خیم از بدخیم تیروئید وجود دارد (۱۱).

تاکنون هیچ نشان زیستی منفردی که بتواند تمام تومورهای خوش خیم را از بدخیم افتراق دهد شناخته نشده است و به‌همین دلیل از ترکیب‌های انواع مختلف نشان‌های زیستی استفاده می‌شود تا بهترین نتایج به‌دست آید (۱۲). به‌رحال، به‌جز تعداد اندکی از این ژن‌ها که در مطالعات گوناگون به‌عنوان نشان‌های زیستی برای بدخیمی معرفی شده‌اند، بیشتر آن‌ها فقط در یک مطالعه بررسی شده‌اند و در مطالعات جداگانه دیگر کارایی آن‌ها به اثبات نرسیده است. در این تحقیق تصمیم گرفته شد تا حساسیت و ویژگی استفاده همزمان تست‌های تشخیصی مولکولی DNA متیلاسیون ژن *RASSF1A* و بیان ژن *FHL1* در تشخیص افتراقی تومورهای خوش خیم از پاپیلاری کارسینومای تیروئید بررسی و تعیین شود.

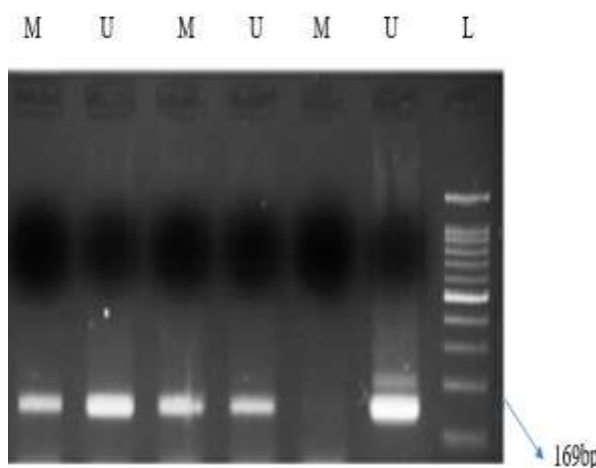
مواد و روش‌ها

حجم نمونه در این تحقیق ۱۶۰ مورد بود و ۸۰ نمونه از بیماران با تومورهای بدخیم تیروئید و ۸۰ نمونه با تومورهای خوش‌خیم تیروئید در این تحقیق وارد شدند. بلوک‌های پارافینی بعد از بازبینی مجدد توسط یک پاتولوژیست مناسب‌ترین آن‌ها انتخاب شدند. سه نمونه که در گزارش پاتولوژی هیچ ضایعه خوش خیم یا بدخیم گزارش نشده بود به‌عنوان بافت نرمال انتخاب شدند. برای انجام میکروداایسکشن در ابتدا به‌وسیله میکروتوم برش‌های ۶ میکرونی از بلوک‌های پارافینی داده شد. سپس این برش‌ها در یک محیط عاری از RNase بر روی لام‌های مخصوص میکرو دایسکشن گذاشته شدند. از هر بلوک ۵ لام تهیه شد و در هر لام بین ۲ تا ۳ برش

در بررسی هیپرمتیلاسیون از DNA محصول شرکت Millipore به نام CpGenome™ Universal Methylated DNA به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در این DNA تمام جزایر CpG دارای هیپرمتیلاسیون هستند. همچنین از DNA نفوسیت‌های خون محیطی (PBL) به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای انجام تیمار بی‌سولفیت از کیت EZ DNA Methylation Kit™ (CA, USA) (Zymo Research) استفاده شد.

پرایمرهای مورد نیاز برای بررسی هیپرمتیلاسیون با *RASSF1A* با کمک سایت Primer 3 طراحی شد (جدول ۱). در ابتدا توالی DNA در محدوده اگزون شماره یک این ژن‌ها در سایت Meth Primer وارد شد و جزایر CpG در این منطقه شناسایی شدند. سپس ردیف بازهای DNA بعد از تیمار با بی‌سولفیت به دست آمد (مطابق راهنمای کیت متیلاسیون). سپس یک جایگاه برش آنزیمی که واجد یک CpG باشد انتخاب و پرایمر لازم در اطراف این جایگاه طراحی شد. به دلیل این که نمونه‌های DNA از بافت‌های پارافینی به دست آمده بودند سعی شد که طول محصول PCR زیر ۹۰ جفت باز طراحی شود.

دارد. سپس با غلظت سنجی باندها در ژل پلی‌اکریل‌آمید (با کمک نرم‌افزار ImageJ) میزان کمی هیپرمتیلاسیون محاسبه می‌شود. درصد هیپرمتیلاسیون براساس فرمول $100\% \text{Methylation} = C / (C + B)$ که در آن B دانسیته باند محصولات قبل از برش و C دانسیته باند حاصل از برش آنزیمی است (شکل ۱).



شکل ۱: نتایج بررسی هیپرمتیلاسیون *RASSF1A*: نتایج آنالیز MS-PCR برای ژن *RASSF1A* در نواری M و نواری N به ترتیب مقصود متیله شده و غیرمتیله شده است، نوار انتهایی (L) به عنوان مارکر با جرم مولکولی ۱۰۰ bp می‌باشد.

جدول ۱: ردیف بازی، طول محصول و آنزیم استفاده شده برای بررسی هیپر متیلاسیون به روش COBRA

نم	ردیف بازی پرایمرها	طول قطعه	طول بعد از برش	آنزیم
RASSF1	F:GGTTYGYGTTTGTAGYGTAAAGTT R:CTCAAACCTCCCCRACATAA	70	35-35	RsaI

برای استخراج RNA از نمونه‌های مایکرو دایسکت شده از کیت شرکت Roche به نام High Pure RNA Paraffin Kit استفاده شد. همچنین برای ساخت cDNA از کیت شرکت Qiagen به نام Quanti TechRT بر اساس دستور العمل شرکت سازنده استفاده شد.

سه آنزیم استفاده شده برای بررسی هیپرمتیلاسیون دارای جایگاه برش به شرح زیر بودند. آنزیم TaqI (TCGA)، آنزیم RsaI (GTAC) و آنزیم BstUI (CGCG). شرایط دمایی و مدت زمان تیمار بر اساس توصیه شرکت سازنده عمل شد.

دمای ۶۵ تا ۹۵ درجه محاسبه می‌شود (مطابق راهنمای کیت مورد استفاده).

برای بررسی بیان *FHL1* با تکنیک Real Time PCR از پرایمرهایی استفاده شد که با کمک سایت اینترنتی Primer3 طراحی شده بودند. پرایمرها طوری طراحی شدند که هر کدام در اگزون جداگانه‌ای قرار بگیرند تا از تکثیر DNA ژنومیک جلوگیری شود. طول محصول PCR کمتر از ۸۰ جفت باز طراحی شد تا برای تکثیر نمونه‌های پارافینی مشکلی ایجاد نشود. از ژن *GAPDH* به‌عنوان کنترل استفاده شد. ردیف بازی پرایمرها و طول قطعه تکثیر شده در جدول ۲ ارائه شده است. بعد از انجام موفقیت‌آمیز PCR، مقدار Cycle Ct (threshold) که نمایان‌گر سیکل آستانه‌ای PCR است محاسبه شد. این کار با استفاده از منحنی‌های تکثیر PCR که توسط دستگاه Real Time تهیه می‌شود و نرم‌افزار دستگاه CORBET انجام شد. برای هر ژن میزان تعدیل شده بیان mRNA بر حسب درصد با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$= \text{بیان نسبی mRNA (درصد)} \\ [2^{-(\text{Ct of gene of interest} - \text{Ct of GAPDH})} \times 100\%]$$

واکنش Real Time PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر و به‌صورت دوپلیکیت انجام گرفت. از مخلوط واکنش Real Time PCR که دارای ماده فلورسانس سایبر گرین و محصول شرکت TAKARA به‌نام SYBR®Premix Ex Taq™ استفاده شد چون نسبت به مخلوط واکنشی رنگ EvaGreen جواب‌های بهتری به‌دست آمده بود. در هر تیوب واکنش، مواد با مقادیر زیر اضافه شد.

10 µl	1-PreMix 2X
1 µl	2-primer 2µM each
7 µl	3-D.W
2µl	4-cDNA

واکنش‌های Real Time PCR هم با دستگاه مارک CORBET به‌نام Rotor-Gene 6000 انجام شد. چرخه دمایی به‌صورت ۱۰ ثانیه ۹۵ درجه سپس ۴۵ سیکل شامل ۵ ثانیه ۹۵ درجه، ۱۵ ثانیه ۶۰ درجه و ۱۰ ثانیه ۷۲ درجه بود. در انتهای هر سیکل در دمای ۷۲ درجه نور سنجی با نور سبز و طول موج تابش ۴۷۰ و بازتاب ۵۱۰ نانومتر انجام می‌گرفت. سپس منحنی ذوب از

جدول ۲: ردیف بازی پرایمرها و طول محصول PCR در آزمایش بررسی بیان نسبی mRNA

نام ژن	ردیف بازی پرایمر	طول قطعه (bp)
FHL1	F: GCCAACACCTGTGTGGAAT R: GCCAGAAGCGGTTCTTATAGTG	76
GAPDH	F: ATGGGGAAGGTGAAGGTCTG R: GTTAAAAGCAGCCCTGGTGA	72

استفاده شد. برای بررسی ارتباط احتمالی بین مقدار کمی هیپرمتیلاسیون و بیان mRNA با متغیرهایی مانند گروه سنی، جنس، تهاجم و متاستاز از آزمون t استفاده شد. در تمامی آزمون‌های استفاده شده ارزش p برابر ۰/۰۵ ملاک عمل قرار گرفت.

برای انجام محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. از آزمون مجذور مربع کای برای بررسی ارتباط بین متغیرهایی همچون گروه سنی، جنس، تهاجم و متاستاز با وضعیت کیفی هیپرمتیلاسیون استفاده شد. در موارد خاصی از آزمون دقیق فیشر برای این منظور

نتایج

نتایج اطلاعات توصیفی بیماران

در تحقیق جاری تعداد ۱۶۰ نمونه بلوک پارافینی مربوط به نمونه‌های بایگانی طی سال‌های ۱۳۸۵ تا ۱۳۹۵ از آزمایشگاه‌های پاتولوژی مراکز درمانی شهر اهواز بعد از بازبینی توسط یک پاتولوژیست جمع آوری و انتخاب شدند. نمونه‌ها مشتمل بر ۸۰ مورد تومورهای بدخیم و همچنین تعداد ۸۰ مورد تومورهای خوش خیم شامل ۴۰ مورد گواتر، ۱۳ مورد تیروئیدیت هاشیماتو، ۱۲ مورد آدنوم فولیکولار بودند که در تحقیق حاضر مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه بر این تعداد ۲۳ نمونه بافت تازه تیروئید در خلال انجام طرح مربوط به ۴ مورد تومورهای CV-PTC و ۱۹ مورد تومورهای خوش خیم از اتاق عمل به‌طور مستقیم جمع‌آوری شد. در جدول ۳ اطلاعات مربوط به گسترش جنسی، سنی و نوع هیستولوژیک تومورها ارائه شده است.

بررسی ارتباط هیپرمتیلاسیون ژن *RASSF1A* با

نوع تومورها

بررسی هیپرمتیلاسیون در ۱۶۰ مورد تومورهای خوش خیم و بدخیم تیروئید نشانگر ۱۳۸ مورد هیپرمتیلاسیون مثبت بود. از این تعداد ۶۷ مورد خوش‌خیم و ۷۱ مورد بدخیم بودند. مابقی ۲۲ نمونه‌هایی که هیپرمتیلاسیون را نشان ندادند ۹ مورد بدخیم و ۱۳ مورد خوش‌خیم بودند (جدول ۳). اگر چه فراوانی هیپرمتیلاسیون در نمونه‌های بدخیم (۸۸/۷۵ درصد) بیشتر از خوش‌خیم (۸۳/۷۵ درصد) بود اما تفاوت این دو گروه از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p=0/123$).

بررسی کمی هیپرمتیلاسیون ژن *RASSF1A*

بررسی کمی هیپرمتیلاسیون در ژن *RASSF1A* به‌صورت میانگین و انحراف از معیار به تفکیک گروه‌های مختلف انجام و مشخص شد که در گروه تومورهای بدخیم میزان آلل‌های دارای هیپرمتیلاسیون ۲۸/۲۸ درصد بود درحالی‌که در گروه تومورهای خوش‌خیم این میزان ۱۱/۴۰ درصد بود و تفاوت بین این دو گروه معنی‌دار بود ($p=0/01$).

برای محاسبه حساسیت (Sensitivity)، ویژگی (Specificity)، ارزش اخباری مثبت (Positive predictive value) و ارزش اخباری منفی (Negative predictive value) و صحت (Accuracy) جواب آزمایش از فرمول‌های زیر استفاده شد. در این محاسبات جواب گزارشات پاتولوژی به‌عنوان آزمایش استاندارد در نظر گرفته شد که حقیقی یا کاذب بودن نتایج هیپرمتیلاسیون و بیان mRNA در مقایسه با گزارشات پاتولوژی سنجیده شد. (مثبت حقیقی (TP): شخص بیمار، به‌درستی بیمار تشخیص داده شود. مثبت کاذب (FP): شخص سالم، به اشتباه بیمار تشخیص داده شود. منفی حقیقی (TN): شخص سالم، به‌درستی سالم تشخیص داده شود. منفی کاذب (FN): شخص بیمار، به اشتباه سالم تشخیص داده شود).

$$Sensitivity(\%) = \frac{TP}{TP + FN} \times 100$$

$$Specificity(\%) = \frac{TN}{TN + FP} \times 100$$

$$PPV(\%) = \frac{TP}{TP + FP} \times 100$$

$$NPV(\%) = \frac{TN}{TN + FN} \times 100$$

$$Accuracy(\%) = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN} \times 100$$

همچنین برای محاسبه حساسیت دو تست همزمان حاصلضرب حساسیت دو تست از مجموع حساسیت دو تست کم شد و برای محاسبه ویژگی دو تست همزمان؛ ویژگی دو تست در هم ضرب شدند.

از آزمون ROC برای محاسبه بهترین مقدار مرزی در بررسی های نتایج هیپرمتیلاسیون DNA بیان نسبی mRNA استفاده شد. این آزمون بهترین مقدار مرزی برای نتایج هر آزمایش را که بالاترین حساسیت و ویژگی را به‌دست آورد در اختیار ما قرار می‌دهد و با محاسبه سطح زیر منحنی (AUC) کارایی آزمایش برای افتراق تومورهای خوش‌خیم از بدخیم محاسبه شد.

جدول ۳: میانگین و انحراف معیار سن در زمان تشخیص بیماری (سال) و فراوانی جنس در بیماران مبتلا به تومورهای خوش خیم و بدخیم تیروئید به تفکیک

طبقه‌بندی هیستوپاتولوژی (n=183)

نوع تومور	نوع هیستوپاتولوژی	جنس (تعداد)		توزیع سنی (سال)		
		زن	مرد	Mean ± SD	Min – Max	
پارافینی	بدخیم (n=80)	CV-PTC	۳۲	۱۸	۴۱/۲۰ ± ۲۱/۱۷	۱۵ – ۸۲
		TC-PTC	۶	۶	۴۸/۰۱ ± ۳۹/۱۸	۲۱ – ۷۸
		FV-PTC	۱	۵	۱۳/۰۰ ± ۰/۰۰	۱۳ – ۱۳
		UTC	۶	۶	۷۱/۵۱ ± ۱۸/۱۹	۵۸ – ۸۵
	خوش خیم / طبیعی (n=80)	HT	۱۲	۱	۴۴/۳۳ ± ۱۱/۲۲	۲۹ – ۵۶
		FA	۱۰	۲	۵۶/۴۱ ± ۱۵/۷۸	۳۸ – ۸۳
		GT	۳۵	۵	۴۶/۷۴ ± ۱۴/۸۷	۲۲ – ۶۸
		N	۹	۶	۴۹/۳۳ ± ۲۶/۹۹	۲۲ – ۷۲
بافت تازه	بدخیم (n=4)	CV-PTC	۴	۰	۴۷/۰۰ ± ۱۲/۱۶	۲۸ – ۵۷
	خوش خیم / طبیعی (n=19)	HT	۱	۰	۴۲/۰۰ ± ۰/۰۰	۴۲ – ۴۲
		FA	۵	۰	۳۸/۲۷ ± ۱۳/۴۲	۲۶ – ۵۵
		GT	۱۰	۱	۳۸/۸۲ ± ۱۳/۶۸	۲۵ – ۶۵
		N	۱	۱	۳۸/۵۲ ± ۲۲/۹۳	۲۳ – ۵۶

CV-PTC, Classic Variant Papillary Thyroid Carcinoma. TC-PTC, Tall cell variant papillary thyroid carcinoma. FV-PTC, follicular variant papillary thyroid carcinoma. UTC, Undifferentiated thyroid carcinoma. HT, Hashimoto's thyroiditis. FA, Follicular adenoma. GT, goiter. N, Normal.

بررسی هیپر متیلاسیون ژن *RASSF1A* در جهت افتراق تومورها

اما اگر بررسی کمی به‌عنوان ملاک تشخیصی قرار می‌گرفت بهترین نقطه مرزی برای افتراق تومورهای خوش‌خیم از بدخیم میزان بالاتر از ۴۰ درصد هیپرمتیلاسیون در ژن *RASSF1A* بود و با این میزان نقطه مرزی تعداد ۲۲ مورد بدخیم و ۷۹ مورد خوش‌خیم درست تشخیص داده می‌شدند. اما ۵۸ مورد بدخیم و یک مورد خوش‌خیم به‌طور کاذب تشخیص داده می‌شدند. بنابراین حساسیت و ویژگی این آزمایش به ترتیب ۲۷/۵ و ۹۸/۷۵ درصد به‌دست بود (جدول ۴).

بررسی هیپر متیلاسیون به‌صورت کیفی نشان داد که اگر هیپرمتیلاسیون ژن *RASSF1A* به‌عنوان یک آزمایش تشخیصی برای سرطان تیروئید استفاده می‌شد برای ۷۳ مورد بدخیم و ۱۲ مورد خوش‌خیم درست تشخیص داده می‌شدند. اما ۷ مورد بدخیم و ۶۸ مورد خوش‌خیم به‌طور کاذب تشخیص داده می‌شدند. حساسیت و ویژگی این آزمایش به ترتیب ۹۱/۲۵ و ۱۵ درصد به‌دست بود (جدول ۴).

جدول ۴: نتایج صحت تشخیص تومورهای خوش‌خیم و بدخیم بر اساس بررسی کیفی و کمی هیپر متیلاسیون ژن *RASSF1A*

متغیر	نتایج کیفی هیپرمتیلاسیون تعداد/درصد	نتایج کمی هیپرمتیلاسیون تعداد/درصد
مثبت حقیقی	۷۳	۲۲
منفی حقیقی	۱۲	۷۹
مثبت کاذب	۶۸	۱
منفی کاذب	۷	۵۸
حساسیت	%۹۱/۲۵	%۲۷/۱۵
ویژگی	%۱۵	%۹۸/۷۵
ارزش اخباری مثبت	%۵۱/۷۷	%۹۵/۶۵
ارزش اخباری منفی	%۶۳/۱۵	%۵۷/۶۶
صحت آزمایش	%۵۳/۱۲	%۶/۱۲

بررسی بیان ژن *FHL1*

تومورهای خوش خیم از بدخیم میزان کمتر از ۰/۵۷ درصد بود و با این میزان نقطه مرزی تعداد ۶۳ مورد بدخیم و ۶۱ مورد خوش خیم درست تشخیص داده شدند. اما ۱۷ مورد بدخیم و ۱۹ مورد خوش خیم به طور کاذب تشخیص داده شدند. بنابراین حساسیت و ویژگی این آزمایش به ترتیب ۷۸/۷۵ و ۷۶/۲۵ درصد به دست آمد (جدول ۵).

بیان در ژن *FHL1* در گروه بدخیم برابر ۰/۵۰ درصد بود در حالی که در گروه خوش خیم این میزان خیلی بالاتر بود (۵/۲۹ درصد) و تفاوت بین این دو گروه معنی دار بود ($p=0/019$). تجزیه و تحلیل ROC نشان داد که این ژن برای افتراق بین دو گروه تومورهای خوش خیم و بدخیم تیروئید کارایی خوبی دارد ($AUC=0/92$). اگر بررسی بیان ژن *FHL1* به عنوان ملاک تشخیصی قرار می گرفت بهترین نقطه مرزی برای افتراق دو نوع

جدول ۵: نتایج صحت تشخیص تومورهای خوش خیم و بدخیم بر اساس بررسی بیان ژن *FHL1*

متغیر	نتایج بیان تعداد / درصد
مثبت حقیقی	۶۳
منفی حقیقی	۶۱
مثبت کاذب	۱۹
منفی کاذب	۱۷
حساسیت	% ۷۸/۷۵
ویژگی	% ۷۶/۲۵
ارزش اخباری مثبت	% ۷۶/۸۲
ارزش اخباری منفی	% ۸۰/۷۶
صحت آزمایش	% ۷۷/۱۵

DNA متیلاسیون پروموتور ژن *RASSF1A* به صورت کمی و کیفی و بیان ژن *FHL1* در جدول ۷ ارائه شده است.

در تومورهای بدخیم یک همبستگی معکوس ($r = -0.431$) معنی دار در سطح ۰/۰۵ بین هیپرمتیلاسیون پروموتور ژن *RASSF1A* با بیان نسبی ژن *FHL1* وجود دارد. با توجه به اطلاعات جدول ۶ مقدار حساسیت و ویژگی کلی استفاده همزمان (*Simultaneously*) دو تست

جدول ۶: خلاصه حساسیت و ویژگی تست هیپرمتیلاسیون پروموتور ژن *RASSF1A* (کمی و کیفی) و تست بیان نسبی mRNA ژن *FHL1* به طور جداگانه

	هیپرمتیلاسیون پروموتور ژن <i>RASSF1A</i> (کمی)	هیپرمتیلاسیون پروموتور ژن <i>RASSF1A</i> (کیفی)	بیان نسبی mRNA ژن <i>FHL1</i>
حساسیت تست	٪ ۲۷/۵	٪ ۹۱/۲۵	٪ ۷۸/۷۵
ویژگی تست	٪ ۹۸/۷۵	٪ ۱۵	٪ ۷۶/۲۵

جدول ۷: حساسیت و ویژگی کلی استفاده همزمان تست هیپرمتیلاسیون پروموتور ژن *RASSF1A* (کمی و کیفی) و تست بیان ژن *FHL1*

	استفاده همزمان تست هیپر متیلاسیون پروموتور ژن <i>RASSF1A</i> (کیفی) و تست بیان ژن <i>FHL1</i>	استفاده همزمان تست هیپر متیلاسیون پروموتور ژن <i>RASSF1A</i> (کمی) و تست بیان ژن <i>FHL1</i>
حساسیت کلی استفاده همزمان دو تست	٪ ۹۸/۲	٪ ۷۹/۳۲
ویژگی کلی استفاده همزمان دو تست	٪ ۳۹/۴۷	٪ ۷۵/۲۹

بحث

ریه، باعث توقف رشد سلولی می شود (۱۶، ۱۷). عملکرد آن باعث توقف پیشرفت چرخه سلولی و جلوگیری از تجمع سیکلین D1 می شود (۱۸). غیر فعال شدن آن در انواعی از تومورها منجمله ریه، پستان، کلیه، پروستات، تخمدان، کولون و تیروئید و دیگر سرطانها گزارش شده است (۱۶، ۱۹). هیپرمتیلاسیون این ژن موجب کاهش بیان پروتئین آن می شود (۱۶، ۲۰، ۲۱). این ژن یکی از شایع ترین ژن های سرکوبگر تومور است که به طور معمول در نئوپلاسمها دچار هیپرمتیلاسیون می شود (۱۶، ۲۲).

تکامل و پیشرفت تومورهای تیروئید توسط انکوژن ها و ژن های سرکوبگر تومور کنترل می شوند که تنها تعداد محدودی از آنها تاکنون شناسایی شده اند (۱۴، ۱۵). ژن *RASSF1A* به عنوان یک ژن سرکوبگر تومور است که در سال ۲۰۰۰ مشخص شد بیان آن با هیپرمتیلاسیون کنترل می شود. این ژن در انواع مختلفی از سلول های بدن بیان می شود (۱۶). فرم جهش یافته آن به طور معنی داری باعث کاهش فعالیت توقف رشد سلولی می شود (۱۷). بیان مجدد آن در انواع رده های سلولی مانند پروستات و

سلول‌ها به سمت مراحل بعدی تومورزایی پیشرفت می‌کنند.

در بررسی هیپرمتیلاسیون توسط Schagdarsurengin و همکارانش بر روی نمونه‌های تیروئید؛ ارتباط معنی‌داری بین هیپرمتیلاسیون ژن *RASSF1A* با سن شناسایی کرده بودند. یعنی با افزایش سن فراوانی هیپرمتیلاسیون هم بیشتر مشاهده شده بود (۲) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. در بررسی هیپر متیلاسیون ژن *RASSF1A* در سلول‌های اپیتلیال پستان نشان داده شده بود که سن می‌تواند باعث افزایش فراوانی هیپرمتیلاسیون در سلول‌های اپیتلیال شود (۲۵). بنابراین نتایج پژوهش حاضر تایید کننده این نظریه است که در افراد مسن احتمالاً سرکوب بعضی از ژن‌های سرکوب‌گر تومور مانند *RASSF1A* به وسیله هیپرمتیلاسیون آن‌ها را بیشتر مستعد ابتلا به سرطان تیروئید می‌کند.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در ژن مورد بررسی برای هیپرمتیلاسیون ارتباط معنی‌داری با جنسیت بیماران نداشتند که تایید کننده نتایج به دست آمده از تحقیقات قبلی است و با آن‌ها هم‌خوانی دارد (۲۶). نظر به اینکه سرطان تیروئید بیشتر در خانم‌ها رخ می‌دهد و این تفاوت بروز باید علت و اساس مولکولی داشته باشد. در این بررسی نشان داده شد که تفاوتی در هیپرمتیلاسیون بین دو جنس در ژن بررسی شده وجود ندارد بنابراین می‌توان از نتایج پژوهش حاضر چنین برداشت کرد که احتمالاً هیپر متیلاسیون ژن *RASSF1A* عامل ایجاد تفاوت بروز سرطان تیروئید در دو جنس نیست.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بین تهاجم و متاستاز در تومورهای بدخیم تیروئید با هیپرمتیلاسیون ژن *RASSF1A* ارتباط معنی‌داری وجود ندارد که تایید کننده نتایج مطالعات Schagdarsurengin و Hu می‌باشد (۲۶، ۲). عدم وجود ارتباط بین هیپرمتیلاسیون این ژن‌ها با متاستاز و تهاجم را می‌توان این‌گونه تفسیر کرد که ژن‌های درگیر در روند متاستاز و تهاجم در مراحل

در تحقیق حاضر بررسی کیفی هیپرمتیلاسیون ژن *RASSF1A* نشان داد که هم در تومورهای خوش‌خیم و هم بدخیم هیپرمتیلاسیون یافت می‌شود. فراوانی هیپرمتیلاسیون در تومورهای خوش خیم بیشتر بود اما در تومورهای بدخیم سطح کمی هیپرمتیلاسیون بالاتر بود. این نتایج تایید کننده گزارشات قبلی مشابه است که عنوان کرده‌اند هیپرمتیلاسیون *RASSF1A* در هر دو نوع تومورهای خوش خیم و بدخیم تیروئید مشاهده می‌شود. در تحقیقی توسط Xing و همکاران (۲۰) که بر روی تومورهای تیروئید انجام شده بود مشخص شد که هیپرمتیلاسیون در هر دو گروه تومورهای خوش‌خیم و بدخیم مشاهده می‌شود. نتایج پژوهش حاضر با نتایج مطالعه Nakamura و همکاران (۲۳) نیز هم‌خوانی دارد در نتایج آنها هیپرمتیلاسیون ژن *RASSF1A* در تومورهای PTC، ATC و FA با فراوانی نسبتاً یکسانی مشاهده شده بود. همچنین در مطالعه‌های دیگر روی تومورهای تیروئید، نتایج مشابهی به دست آمده بود. در آن تحقیق با بررسی ۲۲ مورد تومورهای خوش خیم و ۲۲ مورد تومورهای بدخیم تیروئید به این نتیجه رسیده بودند که در ۶۲ درصد موارد PTC، ۷۷ درصد موارد UTC، ۷۵ درصد موارد گواتر و ۷۰ درصد موارد آدنوم فولیکولار هیپرمتیلاسیون ژن *RASSF1A* مشاهده شده بود (۲).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در هر دو گروه تومورهای خوش خیم و بدخیم، هیپرمتیلاسیون ژن *RASSF1A* به وفور مشاهده می‌شود و از این یافته می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که احتمالاً هیپرمتیلاسیون در مراحل اولیه تومورزایی تیروئید رخ می‌دهد که تایید کننده نتایج به دست آمده در تحقیقات قبلی است (۲۳، ۲۴). *RASSF1A* یک ژن سرکوب‌گر تومور است در اثر هیپرمتیلاسیون، احتمالاً بیان پروتئین آن کاهش یافته و میزان تکثیر سلولی افزایش می‌یابد و

تومورهای بدخیم فولیکولار تیروئید نسبت به خوش خیم کاهش می یافت (۱۱).

مطالعه Fryknaas و همکاران تنها مطالعه‌ای بود که بر روی تیروئید انجام شده بود. اما چندین مطالعه دیگر بر روی انواع مختلف سرطان‌ها از جمله پروستات، کلیه، پستان (۲۷)، معده (۲۸) و کبد (۱۱) نشان داده‌اند که در تمام این نوع سرطان‌ها بیان mRNA این ژن در تومورهای بدخیم نسبت به گروه خوش خیم و بافت طبیعی کاهش بیان دارد و به‌عنوان یک نشان زیستی خوب برای تشخیص بدخیمی‌ها معرفی شده بود. محصول ژن *FHL1* از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند بنابراین با کاهش بیان، باعث افزایش رشد سلول‌ها می‌شود. اگر چه نقش دقیق آن در تکامل سلول‌های سرطانی هنوز مشخص نشده است (۲۷).

نتیجه‌گیری

از این نتایج می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که: استفاده همزمان تست هیپرمتیلاسیون پروموتور ژن *RASSF1A* به‌صورت کیفی و تست بیان ژن *FHL1* جهت تشخیص افتراقی تومورهای خوش خیم از پاپیلاری کارسینومای تیروئید حساسیت بالاتری دارد. همچنین بررسی همبستگی بین هیپرمتیلاسیون با بیان نسبی mRNA نشان داد که هیپرمتیلاسیون ژن *RASSF1A* یک همبستگی منفی با بیان نسبی mRNA داشت و افزایش هیپرمتیلاسیون در ژن *RASSF1A* احتمالاً موجب کاهش بیان *FHL1* می‌شود و احتمالاً این کاهش بیان به‌وسیله هیپرمتیلاسیون در پروموتور ژن *FHL1* ایجاد می‌شود. یعنی کاهش بیان *RASSF1A* با کاهش بیان *FHL1* هماهنگ است. بنابراین توصیه می‌شود که ارتباط هیپرمتیلاسیون بین دو ژن *RASSF1A* با *FHL1* در تحقیقات بعدی مورد بررسی بیشتری قرار گیرد.

انتهایی تومورزایی درگیر هستند و سلول‌ها را وادار به مهاجرت می‌کنند. اما ژن بررسی شده در پژوهش حاضر در تومورهای خوش خیم هم هیپرمتیلاسیون را نشان دادند بنابراین عملکرد احتمالی آنها در تومورزایی در همان مراحل اولیه است (۲۴، ۲۳).

یکی از اهداف پژوهش حاضر این بود تا با بررسی وضعیت هیپر متیلاسیون ژن، بتوان از آن در افتراق تومورهای خوش خیم از بدخیم کمک گرفت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بررسی های کیفی برای این منظور قابل استفاده نیست. به دلیل اینکه هیپرمتیلاسیون این ژن فقط مختص تومورهای بدخیم تیروئید نبوده و به‌وفور در تومورهای خوش خیم هم دیده می‌شود و این از نقاط ضعف های بررسی هیپرمتیلاسیون به‌عنوان یک نشان زیستی در تشخیص سرطان‌ها است.

با بررسی سطح کمی هیپرمتیلاسیون بهتر از بررسی کیفی دو گروه تومورهای خوش خیم را از بدخیم افتراق داده شدند. چون در ژن بررسی شده سطح کمی هیپرمتیلاسیون در گروه بدخیم بالاتر از گروه خوش خیم به‌دست آمد و با تعیین نقطه‌ای مرزی برای ژن توانستیم تعدادی از تومورهای بدخیم را از خوش خیم افتراق دهیم. با وجود این در تعدادی از تومورهای بدخیم این کار عملی نبود.

در تحقیق حاضر مشخص شد که بیان نسبی mRNA ژن *FHL1* در تومورهای بدخیم خیلی کمتر از خوش خیم بود و این تفاوت در سطح $0/019 =$ معنی‌دار بود به‌طوری‌که شاید بتواند به‌عنوان یک نشان زیستی برای افتراق تومورهای بدخیم از خوش خیم تیروئید قابل استفاده شود. این نتیجه تایید کننده گزارش Fryknaas و همکارانش است. در مطالعه آنها برای شناسایی نشان‌های زیستی جدید برای افتراق تومورهای بدخیم از خوش خیم فولیکولار تیروئید که با روش میکروآرری انجام داده بودند چندین ژن را معرفی کرده بودند و بهترین این ژن‌ها، *FHL1* معرفی شده بود که بیان mRNA آن در

through a TGF-beta-like signaling pathway. *J Clin Invest*. 2009; 119: 349-61.

11. Fryknas MU, Wickenberg-Bolin H, Goransson MG, et al. Molecular markers for discrimination of benign and malignant follicular thyroid tumors. *Tumour Biol*, 2006; 27(4): 211-20.

12. Asa SL. The role of immunohistochemical markers in the diagnosis of follicular-patterned lesions of the thyroid. *Endocr Pathol*. 2005; 16(4): 295-309.

13. Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25(12): 2532-4.

14. Soares P, Maximo V, Sobrinho-Simoes M. Molecular pathology of papillary, follicular and Hurthle cell carcinomas of the thyroid. *Arkh Patol*, 2003; 65: 45-7.

15. Segev DL, Umbricht C, Zeiger MA. Molecular pathogenesis of thyroid cancer. *Surg Oncol*. 2003; 12(2): 69-90.

16. Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, et al. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet*. 2000; 25(3): 315-9.

17. Dreijerink K, Braga E, Kuzmin I, Geil L, et al. The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(3): 7504-9.

18. Shivakumar LJ, Minna T, Sakamaki R, Pestell R, et al. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol Cell Biol*. 2002; 22(12): 4309-18.

19. Schagdarsurengin UO, Gimm C, Hoang-Vu H, Dralle GP, et al. Frequent epigenetic silencing of the CpG island promoter of RASSF1A in thyroid carcinoma. *Cancer Res*. 2002; 62(13): 3698-701.

20. Xing M, Cohen Y, Mambo E, Tallini G, et al. Early occurrence of RASSF1A hypermethylation and its mutual exclusion

منابع

1. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, et al. Editors. SEER Cancer Statistics Review, 1975- 2009 (Vintage 2009 Populations), National Cancer Institute [Internet]. 2012 Apr [cited 2018 Jan 15].
2. Tuttle RM, Ball DW, Byrd D, Dilawari RA, et al. National Comprehensive Cancer Network. Thyroid carcinoma. *J Natl Compr Canc Netw*. 2010; 8(11): 1228-74.
3. Taghavi Kojidi H, Farzadfar F, Peykari N, Larijani B, et al. A comprehensive study on national and sub national trend in thyroid cancer prevalence in the Iranian population, 1990-2010. *Iran J Diabetes Metab*. 2016; 15(2): 91-100.
4. Lee, JH, Lee ES, Kim YS. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis. *Cancer*. 2007; 110(1): 38-46.
5. Kebebew E, Peng M, Reiff E, Duh QY, et al. Diagnostic and prognostic value of angiogenesis-modulating genes in malignant thyroid neoplasms. *Surgery*. 2005; 138: 1102-9; discussion 1109-10.
6. Dammann RC, Li JH, Yoon PL, Chin S, et al. Pfeifer, Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet*. 2000. 25(3): 315-9.
7. Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, et al. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 4309-18.
8. Nakamura N, Carney JA, Jin L, Kajita S, et al. RASSF1A and noreia methylation and BRAFV600E mutations in thyroid tumors. *Lab Invest*. 2005; 85(9): 1065-75.
9. Pfeifer GP, Dammann R. Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. *Biochemistry (Mosc)*, 2005; 70(5): 576-83.
10. Ding L, Wang Z, Yan J, Yang X, et al. Human four-and-a-half LIM family members suppress tumor cell growth

- with BRAF mutation in thyroid tumorigenesis. *Cancer Res.* 2004; 64(5): 1664-8.
21. Ruebel KH, Jin L, Qian X, Scheithauer BW, et al. Effects of DNA methylation on galectin-3 expression in pituitary tumors. *Cancer Res.* 2005; 65(4): 1136-40.
22. Burbee DG, Forgacs E, Zochbauer-Muller S, Shivakumar L, et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93(9): 691-9.
23. Nakamura N, Carney JA, Jin L, Kajita S, et al. RASSF1A and NORE1A methylation and BRAFV600E mutations in thyroid tumors. *Lab Invest.* 2005; 85(9): 1065-75.
24. Trovisco V, Soares P, Sobrinho-Simoes M. B-RAF mutations in the etiopathogenesis, diagnosis, and prognosis of thyroid carcinomas. *Hum Pathol.* 2006; 37(7): 781-6.
25. Sakashita K, Mimori K, Tanaka F, Kamohara Y, et al. Clinical significance of loss of Fhl1 expression in human gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 2008; 15(8): 2293-300.
26. Hu S, Liu D, Tufano RP, Carson KA, et al. Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Int J Cancer.* 2006; 119(10): 2322-9.
27. Strunnikova M, Schagdarsurengin U, Kehlen A, Garbe JC, et al. Chromatin inactivation precedes de novo DNA methylation during the progressive epigenetic silencing of the RASSF1A promoter. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(10): 3923-33.
28. Ding L, Wang Z, Yan J, Yang X, et al. Human four-and-a-half LIM family members suppress tumor cell growth through a TGF-beta-like signaling pathway. *J Clin Invest.* 2009; 119(2): 349-61.

Sensitivity & Specificity of Simultaneous use of RASSF1A gene DNA methylation and FHL1 gene Expression technique in Differential Diagnosis of Benign Tumors from Papillary Carcinoma tumor in Thyroid gland

Dinarvand GA, Ph.D.¹, Peighambarzadeh SZ, Ph.D.^{2*}, Tavana M, Ph.D.²

1. Department of Biochemistry, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran
2. Department of Veterinary medicine, Faculty of Medical Science, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran

* Email corresponding author: peighambarzade@yahoo.com

Received: 18 Jun.2019

Accepted: 1 Oct.2019

Abstract

Aim: The aim of this study is determining the sensitivity and specificity of simultaneous use of both DNA methylation of RASSF1A gene and expression of FHL1 gene in the differential diagnosis of benign tumors from malign papillary carcinoma tumor in the thyroid gland.

Material and Methods: 160 samples of patients with malign thyroid tumors (80 samples) and benign thyroid (80 samples) were used in this study. The RNA was extracted from paraffinic samples, and then cDNA was made from it. Gene expression was investigated by Real Time PCR mixture containing the Cyber Green fluorescence material. After DNA extraction, the hypermethylation of the gene was performed using COBRA method. Finally, an epidemiological calculation was used for calculating the effects of sensitivity and specificity of two simultaneous tests.

Results: There was a negative significant correlation ($P \leq 0.05$) between promoter hypermethylation of the RASSF1A gene and the FHL1 gene expression. Net sensitivity of simultaneous use of the promoter methylation of the RASSF1A gene (quantitative and quantitative) and expression of the FHL1 gene were 98.2% and 79.32%, respectively. The Net specificity of simultaneous use of the promoter methylation of the RASSF1A gene (quantitative and quantitative) and the FHL1 gene expression test were 39.47 and 75.29%, respectively.

Conclusion: simultaneous use of the hypermethylation of the RASSF1A gene promoter as a qualitative and expression test for FHL1 gene is more sensitive and more reliable in differential diagnosis of benign tumors from malign papillary carcinoma tumors.

Keywords: Hypermethylation, RASSF1A gene, FHL1 gene, Sensitivity, Specificity.