

ارتباط بین سطح سرمی ویتامین D و پلی‌مورفیسم‌های گیرنده آن با سرطان مدولاری تیروئید

چکیده

دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۲۴ ویرایش: ۱۳۹۵/۰۶/۱۴ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۶/۱۹ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۶/۲۰

زمینه و هدف: سرطان تیروئید شایعترین بدخیمی غدد درون‌ریز می‌باشد. اثرات ضد سرطانی ویتامین D را در سرطان‌های مختلف نشان داده‌اند. پلی‌مورفیسم‌های گیرنده ویتامین D می‌تواند استعداد ابتلا به سرطان‌های مختلف را تحت تاثیر قرار دهد. مطالعه حاضر با هدف تعیین ارتباط سطح سرمی ویتامین D و پلی‌مورفیسم‌های FokI، BsmI و Tru9I گیرنده ویتامین D انجام گردید.

روش بررسی: مطالعه از نوع مورد-شاهدی بوده و در تیر ماه ۱۳۹۴ در پژوهشکده غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گردید. تعداد ۴۰ بیمار و ۴۰ فرد سالم وارد مطالعه شدند. DNA ژنومی نمونه‌ها پس از استخراج به روش نمک اشباع/ پروتئیناز K با روش PCR- Sequencing مورد بررسی قرار گرفت. سطح سرمی ویتامین D با استفاده از تکنیک الایزا تعیین گردید.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپی و آللی مربوط به پلی‌مورفیسم‌های FokI و BsmI بین گروه تست و کنترل تفاوت معناداری را نشان نداد. در مورد پلی‌مورفیسم Tru9I فراوانی ژنوتیپی Tt در گروه تست ۴۵٪ و در گروه کنترل ۱۷/۵٪ و فراوانی آللی t در گروه تست ۲۵٪ و در گروه کنترل ۸/۷٪ بود، این تفاوت از لحاظ آماری معنادار بود (P=۰/۰۰۶). میانگین سطح سرمی ویتامین D در گروه تست ۲۳/۳۲ ng/ml و در گروه کنترل ۱۸/۹۵ ng/ml به‌دست آمد که این تفاوت از لحاظ آماری معنادار بود (P=۰/۰۲).

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد سطح سرمی ویتامین D بر خلاف انتظار ارتباط معکوسی با سرطان مدولاری تیروئید دارد و پلی‌مورفیسم Tru9I به‌صورت معناداری با افزایش ریسک ابتلا به سرطان مدولاری تیروئید همراه است.

کلمات کلیدی: سرطان مدولاری تیروئید، ویتامین D، گیرنده ویتامین D، پلی‌مورفیسم.

مهرنوش رضانی^۱، مهدی هدایتی^۲
سعید حسینی اصل^۱
معراج طباطبایی^۳، محمد مازنی^{*۴}
شیرزاد نصیری^۴

۱- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران. ۲- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. ۳- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. ۴- جراحی عمومی و سرطان، دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه تهران، بیمارستان شریعی، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: اردبیل، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، ایران.

تلفن: ۰۴۵-۳۳۵۱۰۰۵۲
E-mail: m.mazani@arums.ac.ir

مقدمه

پارافولیکولار (سلول‌های C) و سه شکل دیگر از خاستگاه سلول‌های فولیکولار می‌باشد. چندین فاکتور در رشد غده تیروئید دخیل هستند که از بین آن‌ها هورمون تحریک‌کننده تیروئید (Thyroid stimulating hormone) نقش عمده‌ای در تنظیم رشد و تمایز سلول‌های تیروئیدی ایفا می‌نماید، هورمون تحریک‌کننده تیروئید باعث تحریک تولید مولکول‌های دخیل در انتقال سیگنال داخل سلولی از جمله cAMP، جذب ید و رشد سلولی می‌گردد.^۱ فرم فعال ویتامین D (1, 25-(OH) D

سرطان تیروئید شایعترین بدخیمی غدد درون‌ریز بوده و ۲-۱٪ سرطان‌ها را شامل می‌شود. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان دهنده افزایش میزان بروز جهانی آن می‌باشد.^{۱-۴} سرطان تیروئید از لحاظ سیتولوژیک به چهار نوع تقسیم می‌گردد: پاپیلاری، فولیکولار، مدولاری و آناپلاستیک.^۵ کارسینوم مدولاری از خاستگاه سلول‌های

هدف مطالعه حاضر بررسی سطح سرمی ویتامین D و پلی مورفیسیم‌های موجود در اگزون ۲ و ایترون ۸ ژن گیرنده ویتامین D در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید در مقایسه با گروه کنترل بود.

روش بررسی

مطالعه از نوع مورد-شاهدی بوده و در تیر ماه ۱۳۹۴ در پژوهشکده غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گردید. ۴۰ نفر از مراجعه‌کنندگان که سرطان مدولاری آن‌ها بر اساس شواهد آسیب شناختی در بیمارستان‌های دانشگاهی و مراکز درمانی نقاط مختلف کشور به تایید متخصص پاتولوژیست رسیده بود و جهت انجام اقدامات درمانی بیشتر به بیمارستان طالقانی تهران و پژوهشکده غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ارجاع داده شده بودند، به عنوان گروه مورد و ۴۰ نفر داوطلب سالم بدون هیچ سابقه فامیلی ابتلا به سرطان تیروئید به عنوان گروه کنترل قرار گرفت. همچنین افراد مورد مطالعه در هر دو گروه مورد و کنترل فاقد هرگونه بیماری خود ایمنی بوده‌اند و از لحاظ سن و جنس همسان‌سازی شدند.

مطالعه توسط کمیته اخلاق پزشکی مرکز علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم بیمارستان طالقانی تهران مورد تایید قرار گرفت. همچنین فرم رضایت‌نامه آگاهانه از هر دو گروه دریافت گردید. از هر فرد ml ۱۰ خون وریدی دریافت شده و در لوله‌های حاوی EDTA جمع‌آوری گردید. استخراج DNA از ml ۵ خون کامل توسط روش استاندارد نمک اشباع/ پروتیناز K انجام گرفت.^{۲۹} برای اطمینان از کیفیت و خلوص DNA به دست آمده، نسبت جذب نوری نمونه‌ها در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. واکنش Polymerase chain reaction (PCR) در حجم نهایی ۳۵ μl در میکروتیوب‌های آماده (Premix, Bioner, Korea) که هر کدام حاوی ۱U آنزیم Taq پلیمرز، mM) ۲۵۰ dNTP، mM) ۱۰ Tris-HCl، mM) ۳۰ KCl و mM) ۱/۵ MgCl₂ می‌باشد، انجام گرفت. به هر میکروتیوب به مقدار ۱ μl (۵-۱۰ pmole) از هر کدام از پرایمرها، ۱ μl (۵-۵۰ ng) DNA و ۳۲ μl آب مقطر استریل اضافه گردید. شرایط بهینه برای تکثیر قطعات مورد نظر شامل ۳۰ سیکل دمایی (۳۵ ثانیه در ۹۴ °C به منظور

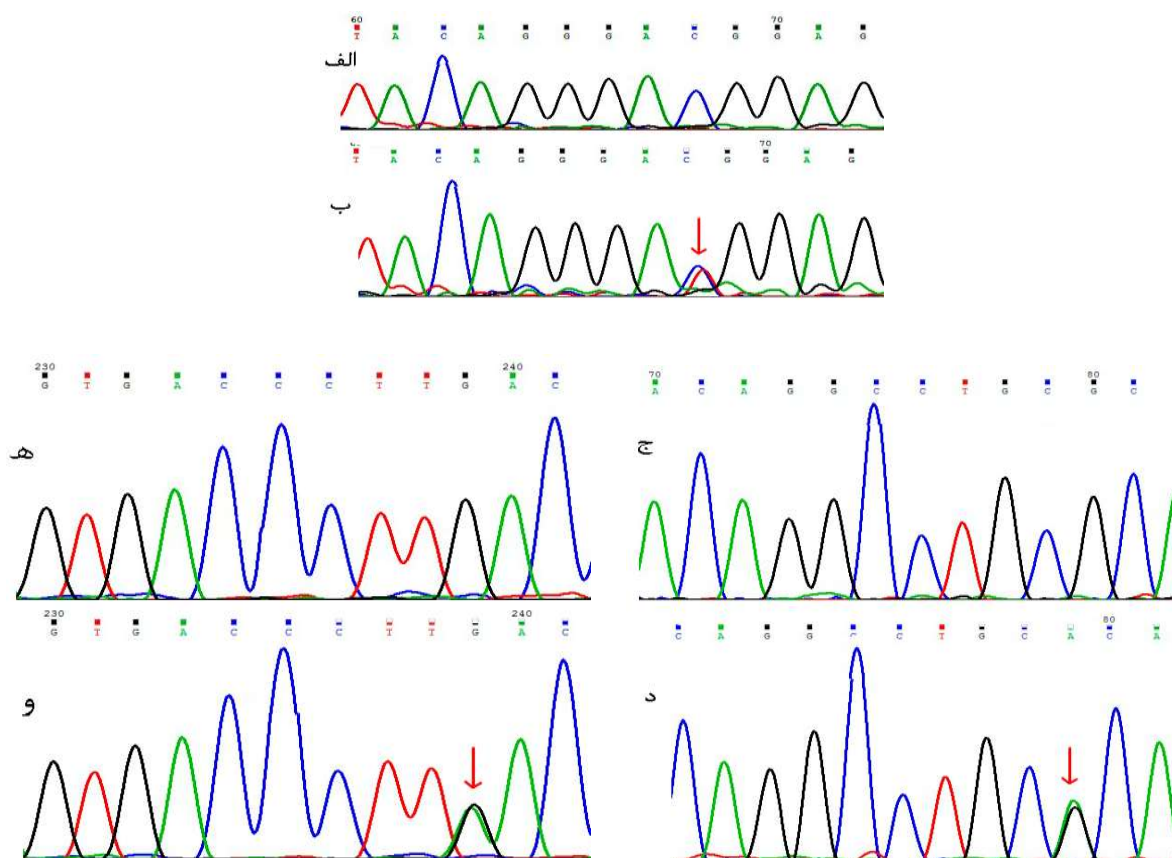
2-vitamin D3) از طریق اتصال به گیرنده خود با استفاده از مکانیسم‌های ژنومیک و غیرژنومیک باعث مهار اثر تکثیری هورمون تحریک کننده تیروئید بر سلول‌های تیروئید می‌گردد، بنابراین ویتامین D می‌تواند نقش مهمی در تنظیم تکثیر سلولی غده تیروئید داشته باشد.^۸

اتصال فرم فعال ویتامین D (کلسی‌تریول) به گیرنده آن اثرات پلیوتروپیک بسیاری را در بر دارد از جمله: تنظیم متابولیسم کلسیم و فسفات، تقسیم سلولی، تمایز، آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی)، آنژیوژنز و متاستاز سلولی. بنابراین کلسی‌تریول می‌تواند به عنوان یک عامل بسیار مهم پاسخ‌های ضد سرطانی مطرح باشد.^۹ مطالعات بسیاری اثرات ضد سرطانی ویتامین D را در سرطان‌های پروستات، پستان، کولون و تومورهای اندوکراین نشان داده‌اند. مهار تکثیر سلولی و القای تمایز سلولی به همراه القای آپوپتوز و مهار آنژیوژنز بازوهای اصلی ضد سرطانی ویتامین D به حساب می‌آیند.^{۱۰،۹}

ویتامین D اثرات ضد سرطانی خود را از طریق اتصال فرم فعال آن به گیرنده ویتامین D که عضوی از گیرنده‌های استروئید/ تیروئید-رتینوئیک اسید و جزء سوپر فامیلی گیرنده‌های هسته‌ای محسوب می‌شود اعمال می‌کند.^{۱۱} در پستانداران، بیان گیرنده ویتامین D در بافت‌های متابولیک از جمله روده، کلیه، پوست و غده تیروئید بالا بوده و در سایر بافت‌ها بیان به نسبت متوسطی دارد. همچنین گیرنده ویتامین D به میزان زیادی در بافت‌های سرطانی از جمله کولون، پستان و پروستات بیان می‌شود.^{۱۲} عملکرد این گیرنده هسته‌ای به واسطه بودن چندین پلی مورفیسیم ژنتیکی تحت تاثیر قرار می‌گیرد.^{۱۳} چندین پلی مورفیسیم در ایترون‌ها و اگزون‌های مختلف ژن گیرنده ویتامین D شناسایی شده است از جمله Tru9I و BsmI در ایترون ۸، FokI در اگزون ۲ و TaqI در اگزون ۹، که هر کدام از این پلی مورفیسیم‌ها تغییراتی را در عملکرد پروتیین یا بیان گیرنده ویتامین D اعمال می‌نمایند.^{۱۴-۱۶} FokI در قسمت ۵' و سه پلی مورفیسیم دیگر در ۳' ژن گیرنده ویتامین D قرار دارد.^{۱۷} از طرف دیگر ارتباط بین پلی مورفیسیم‌های ژن گیرنده ویتامین D و ریسک ابتلا به سرطان‌های مختلف توسط مطالعات زیادی نشان داده شده است.^{۱۸-۱۲} همچنین ارتباط بین پلی مورفیسیم ژن‌هایی از جمله RET، PI3K/AKT و سرطان مدولاری تیروئید در مطالعات پیشین مشخص شده است.^{۲۸-۲۲}

دنا تورا سیون، ۱ دقیقه در $60/5^{\circ}\text{C}$ برای واکنش Annealing، ۴۵ ثانیه در 72°C برای واکنش Extension، ۱۰ دقیقه در 72°C برای Final Extension) و ۱۰ دقیقه در دمای 94°C به منظور دنا تورا سیون اولیه، تعیین گردید و توسط دستگاه Thermal cycler (TC-XP-E, Bioner, China) به انجام رسید. در تمامی مراحل انجام کار میکرو تیوپ‌ها در ظرف حاوی یخ قرار گرفته بودند. به منظور تایید تکثیر DNA مورد نظر از ژل پلی‌آکریل آمید (۸٪) ولتاژ ۲۰۰، مدت زمان ۹۰ دقیقه و رنگ آمیزی نیترات نقره، استفاده گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعات 237bp (FokI- rs2228570) و 339bp (BsmI- rs1544410 و Tru9I-rs757343) در جدول ۱ آورده شده است. محصولات جهت تعیین توالی بر اساس پرایمر Forward در میکرو تیوپ‌های ۱/۵ ml به کشور کره جنوبی ارسال گردید. پس از تعیین توالی، سکانس‌ها توسط نرم‌افزار Chromas ver. 2.4.3 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia) تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و جهت اطمینان از وجود تغییر تک نوکلئوتیدی در پایگاه (National Center for Biotechnology Information, NCBI) تحت (Basic local alignment search tool, BLAST) کردن قرار گرفتند (شکل ۱).

دنا تورا سیون، ۱ دقیقه در $60/5^{\circ}\text{C}$ برای واکنش Annealing، ۴۵ ثانیه در 72°C برای واکنش Extension، ۱۰ دقیقه در 72°C برای Final Extension) و ۱۰ دقیقه در دمای 94°C به منظور دنا تورا سیون اولیه، تعیین گردید و توسط دستگاه Thermal cycler (TC-XP-E, Bioner, China) به انجام رسید. در تمامی مراحل انجام کار میکرو تیوپ‌ها در ظرف حاوی یخ قرار گرفته بودند. به منظور تایید تکثیر DNA مورد نظر از ژل پلی‌آکریل آمید (۸٪) ولتاژ ۲۰۰، مدت زمان ۹۰ دقیقه و رنگ آمیزی نیترات نقره، استفاده گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعات 237bp (FokI- rs2228570) و 339bp (BsmI- rs1544410 و Tru9I-rs757343) در جدول ۱ آورده شده است. محصولات جهت تعیین توالی بر اساس پرایمر Forward در میکرو تیوپ‌های ۱/۵ ml به کشور کره جنوبی ارسال گردید. پس از تعیین توالی، سکانس‌ها توسط نرم‌افزار Chromas ver. 2.4.3 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia) تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و جهت اطمینان از وجود تغییر تک نوکلئوتیدی در پایگاه (National Center for Biotechnology Information, NCBI) تحت (Basic local alignment search tool, BLAST) کردن قرار گرفتند (شکل ۱).



شکل ۱) شکل‌های (الف-ب) نتیجه تعیین توالی DNA در ناحیه اگزون ۲ ژن گیرنده ویتامین D را نشان می‌دهد. پیک مشخص شده در شکل (الف) توالی طبیعی و پیک مشخص شده در شکل (ب) تغییر نوکلئوتیدی مورد انتظار (FokI- rs2228570 T>C) را که به صورت هتروزیگوت می‌باشد نشان می‌دهد. شکل‌های (ج-د) و (ه-و) نتیجه تعیین توالی DNA در ناحیه اینترون ۸ ژن گیرنده ویتامین D را نشان می‌دهد. پیک مشخص شده در شکل (ج) و (ه) توالی طبیعی و پیک مشخص شده در شکل (د) و (و) تغییر نوکلئوتیدی مورد انتظار (BsmI- rs1544410 A>G) و (Tru9I- rs757343 A>G) را که به صورت هتروزیگوت می‌باشد نشان می‌دهد.

آنالیزهای آماری در مورد پلی مورفیسم‌های FokI و BsmI تفاوت معناداری را در هیچ یک از ژنوتیپ‌ها نشان نداد (۰/۸۷۶، ۰/۶۱۱، ۰/۵۰۲ و ۰/۹۵۳). (P=۰/۹۵۳ و ۰/۵۰۲).

در پلی مورفیسم Tru9I فراوانی ژنوتیپی Tt در گروه تست در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری را از لحاظ آماری نشان داد (P=۰/۰۰۶). فراوانی، نسبت شانس و مقدار ژنوتیپ‌ها در جدول ۲ آورده شده است. آنالیز آماری نشان داد توزیع فراوانی پلی مورفیسم‌های ژن گیرنده ویتامین D در جمعیت مورد مطالعه در تعادل Hardy-Weinberg قرار دارد (P=۰/۳۲۷).

فراوانی آلی t در بین گروه تست و کنترل از لحاظ آماری تفاوت معناداری را نشان داد (P=۰/۰۰۶). فراوانی، نسبت شانس و مقدار آلل‌ها در جدول ۳ آورده شده است.

نتایج حاصل از بررسی سطح سرمی ویتامین D با استفاده از

اندازه‌گیری ۲۵-هیدروکسی ویتامین D در پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید و گروه کنترل، توسط کیت الیزا (Calbiotec, Austin, USA) و بر اساس دستورکار شرکت سازنده انجام گرفت. برای مقایسه سطح سرمی ویتامین D دو گروه مورد و کنترل، از آزمون Mann-Whitney و برای آنالیز پلی مورفیسم در گروه تست و کنترل از Chi-square test استفاده گردید. توزیع فراوانی پلی مورفیسم‌های ژن گیرنده ویتامین D برای بررسی تعادل Hardy-Weinberg از Chi-square test با درجه آزادی یک استفاده شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از GraphPad Prism, version 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) و SPSS software, version 20 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) تجزیه و تحلیل گردید و P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بر اساس یافته‌های این مطالعه، از ۸۰ نمونه، ۴۰ بیمار مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید (متوسط سن ۳۶ سال) به عنوان گروه مورد و ۴۰ مورد گروه کنترل (متوسط سن ۳۳ سال) بوده‌اند که آنالیز آماری نشان داد میانگین سنی در دو گروه مورد و کنترل اختلاف معناداری ندارد. توزیع بیماران بر اساس جنسیت در گروه مورد و به صورت همسان‌سازی شده در گروه کنترل، شامل ۲۳ زن و ۱۷ مرد بودند.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای PCR ژن گیرنده ویتامین D

توالی پرایمرهای مورد استفاده	
F:5-GATGCCAGCTGGCCCTGGCA-3 R:5-ATGGAACACCTTGCTTCT-3	FokI
F:5-CAGAGTGTGCAGGCG-3 R:5-CCCTCTTGGACCTCATCAC-3	Tru9I و BsmI

جدول ۲: فراوانی ژنوتیپی پلی مورفیسم‌های FokI, BsmI و Tru9I در دو گروه تست و کنترل

پلی مورفیسم	ژنوتیپ	بیمار (تعداد=۴۰)	کنترل (تعداد=۴۰)	P*	نسبت شانس (حدود اطمینان ۹۵٪)
FokI	FF	۱ (۲/۵)	۳ (۷/۵)		ژنوتیپ مرجع
	Ff	۱۲ (۳۰)	۱۲ (۳۰)	۰/۸۷۶	۱/۰۸ (۰/۴۱-۲/۸۴)
	ff	۲۷ (۶۷/۵)	۲۵ (۶۲/۵)	۰/۶۱۱	۳/۲۴ (۰/۳۲-۳۳/۲۲)
BsmI	BB	۲۳ (۵۷/۵)	۱۶ (۴۰/۰)		ژنوتیپ مرجع
	Bb	۱۱ (۲۷/۵)	۲۰ (۵۰/۰)	۰/۵۰۲	۲/۶۱ (۰/۹۸-۶/۹۲)
	bb	۶ (۱۵/۰)	۴ (۱۰/۰)	۰/۹۵۳	۰/۹۶ (۰/۲۳-۳/۹۵)
Tru9I	TT	۲۱ (۵۲/۵)	۳۳ (۸۲/۵)		ژنوتیپ مرجع
	Tt	۱۸ (۴۵/۰)	۷ (۱۷/۵)	۰/۰۰۶	۰/۲۴ (۰/۰۹-۰/۶۹)
	tt	۱ (۲/۵٪)	۰ (۰٪)	۰/۲۱۷	-

*آزمون آماری: Chi-square test. P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

جدول ۳: فراوانی آلی پلی مورفیسم‌های FokI, BsmI و Tru9I در دو گروه مورد و کنترل

نسبت شانس (حدود اطمینان ۹۵٪)	P*	کنترل (تعداد=۴۰)	بیمار (تعداد=۴۰)	ژنوتیپ	پلی مورفیسم
ژنوتیپ مرجع		۱۸(۰/۲۲/۵)	۱۴(۰/۱۷/۵)	F	
۱/۳۷(۰/۶۳-۲/۹۸)	۰/۴۲۹	۶۲(۰/۷۷/۵)	۶۶(۰/۸۲/۵)	f	FokI
ژنوتیپ مرجع		۵۲(۰/۶۵/۰)	۵۷(۰/۷۱/۲۵)	B	
۱/۳۳(۰/۶۸-۲/۶۰)	۰/۳۹۶	۲۸(۰/۳۵/۰)	۲۳(۰/۲۸/۷۵)	b	BsmI
ژنوتیپ مرجع		۷۳(۰/۹۱/۲۵)	۶۰(۰/۷۵/۰)	T	
۰/۲۹(۰/۱۱-۰/۷۳)	۰/۰۰۶	۷(۰/۸/۷۵)	۲۰(۰/۲۵/۰)	t	Tru9I

*آزمون آماری: Chi-square test, P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

ارتباطی معناداری را بین پلی مورفیسم‌های ApaI, TaqI, Tru9I و BsmI نشان نداد، ولی در فراوانی آلی پلی مورفیسم Tru9I تفاوت معناداری بین گروه بیمار و کنترل مشاهده شده بود.^{۳۰}

بررسی پلی مورفیسم‌های ApaI, TaqI, Tru9I و BsmI در سرطان‌های مختلفی از جمله سرطان پروستات، پستان، تخمدان و ملانوما ارتباط معناداری را با افزایش ریسک ابتلاء نشان داده‌اند.^{۳۱-۳۵} در مقابل، مطالعات دیگر ارتباط معناداری را بین این پلی مورفیسم‌ها با سرطان تخمدان و پروستات مشاهده نکرده‌اند.^{۳۶،۳۷}

در مطالعه حاضر سطح سرمی ۲۵-هیدروکسی ویتامین D بر خلاف انتظار در گروه بیمار در مقایسه با گروه کنترل به طور معناداری بالاتر بود. در حالیکه مطالعات بسیاری ارتباط معکوسی را بین سطح سرمی ویتامین D و سرطان‌های مختلف از جمله، سرطان کولون،^{۳۸} سرطان پستان،^{۳۹} پروستات^{۴۰} و سرطان تیروئید نوع فولیکولار و پاپیلاری^{۴۱} گزارش کرده بودند. با این وجود شواهد اپیدمیولوژیک موجود نتایج محدود و بحث‌انگیزی را در مورد این ارتباط مطرح می‌نمایند.^{۴۰،۳۹}

در مطالعه‌ای که اثر ویتامین D را بر روی سل‌ل‌های سرطانی مختلف مورد بررسی قرار داده بود، مشاهده گردید که افزودن ویتامین D به کشت سلولی اکثر سلول‌های سرطانی اثر مهاری بر تکثیر آن‌ها دارد، برخلاف انتظار افزودن ویتامین D به رده سلولی سرطان مدولاری تیروئید (سلول‌های TT) به طور قابل توجهی باعث افزایش تکثیر سلولی و مهار ترشح کلسیتونین گشته و ۴/۸ برابر سنتز DNA و

تکنیک الیزا نشان داد میانگین سطح سرمی ویتامین D در گروه تست ۲۳/۳۲ ng/ml و گروه کنترل ۱۸/۹۵ ng/ml بوده و این اختلاف از لحاظ آماری معنادار می‌باشد (P=۰/۰۲).

بحث

در مطالعه حاضر، در بررسی پلی مورفیسم‌های FokI و BsmI، هیچکدام از ژنوتیپ‌ها و آلل‌های مورد بررسی با ریسک ابتلا به سرطان مدولاری تیروئید ارتباط معناداری را نشان نداد. بررسی پلی مورفیسم Tru9I-rs757343 نشان داد که ژنوتیپ هتروزیگوت موتانت (Tt) در گروه مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید در مقایسه با گروه کنترل تفاوت آماری معناداری را نشان می‌دهد و بررسی آلل‌ها نشان داد، آلل t به طور معناداری ریسک سرطان مدولاری تیروئید را افزایش می‌دهد.

در مطالعه مشابه که پلی مورفیسم‌های گیرنده ویتامین D را در بیماران مبتلا به سرطان تیروئید نوع فولیکولار و پاپیلاری مورد ارزیابی قرار داده بود، نتایج حاصل ارتباط معناداری را بین پلی مورفیسم‌های ApaI و FokI با سرطان فولیکولار تیروئید و نه نوع پاپیلاری آن نشان داد و پلی مورفیسم‌های TaqI و BsmI ارتباط معناداری را در هیچکدام از دو نوع سرطان تیروئید بررسی شده نشان نداد.^{۴۱} در مطالعه مشابه دیگری بر روی جمعیت ایرانی مبتلا به سرطان تیروئید نوع فولیکولار و پاپیلاری، نتایج به دست آمده هیچ

در رژیم غذایی این افراد به احتمال تاثیر مثبتی بر روند درمان این بیماران نخواهد داشت. پلی مورفیسم Tru9I با استعداد ابتلا به سرطان مدولاری تیروئید ارتباط معناداری را نشان داد.

سپاسگزاری: این مقاله بخشی از پایان نامه تحت عنوان "بررسی ارتباط بین سطح سرمی ویتامین D و پلی مورفیسم های FokI- rs2228570, BsmI- rs1544410 و Tru9I-rs757343) گیرنده آن با سرطان مدولاری تیروئید، در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۹۵-۹۶ می باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل اجرا شده است. همچنین مولفین از حمایت پژوهشکده غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی قدردانی می نمایند.

بیان ژن C-myc (افزایش بیان این ژن با سرطانی شدن ارتباط دارد) را افزایش داد.^{۴۱} این نتایج تا حدودی می تواند تناقض حاصل در سطح سرمی ویتامین D مطالعه حاضر با مطالعات دیگر را توجیه نماید. با این وجود از آنجایی که این مطالعه برای اولین بار بر روی بیماران مبتلا به سرطان مدولاری انجام گرفته است و محدودیت نمونه به دلیل پایین بودن نرخ شیوع این نوع سرطان، به مطالعات جامع تر با تعداد نمونه بیشتر برای تایید نتایج حاصل از این مطالعه ضروری می باشد.

از این پژوهش می توان نتیجه گرفت که برخلاف انتظار، سطح ویتامین D سرمی در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید در مقایسه با افراد سالم بالاتر بوده و افزایش میزان ویتامین D خوراکی

References

- Nikiforov YE. Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135(5):569-77.
- Patel SS, Goldfarb M. Well-differentiated thyroid carcinoma: the role of post-operative radioactive iodine administration. *J Surg Oncol* 2013;107(6):665-72.
- Shah JP. Exploiting biology in selecting treatment for differentiated cancer of the thyroid gland. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008;265(10):1155-60.
- Nozhat Z, Hedayati M, Azizi F. Thyroid Cancer Epidemic: A Peril or an Alarm? *Int J Endocrinol Metab* 2015;13(4):e28491.
- Lang BH, Chow SM, Lo CY, Law SC, Lam KY. Staging systems for papillary thyroid carcinoma: a study of 2 tertiary referral centers. *Ann Surg* 2007;246(1):114-21.
- Ghazi AA, Bagheri M, Tabibi A, Sarvghadi F, Abdi H, Hedayati M, et al. Multiple endocrine neoplasia type 2A in an Iranian family: clinical and genetic studies. *Arch Iran Med* 2014;17(5):378-82.
- Jameson JL, Anthony PW. Disorders of thyroid gland. In: Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Janson LJ, editors. *Harrison's Principle of Internal Medicine*. 16th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2005. p. 2123.
- Mehta RG, Mehta RR. Vitamin D and cancer. *J Nutr Biochem* 2002;13(5):252-64.
- Ordóñez-Moran P, Larriba MJ, Pendas-Franco N, Aguilera O, Gonzalez-Sancho JM, Munoz A. Vitamin D and cancer: an update of in vitro and in vivo data. *Front Biosci* 2005;10:2723-49.
- Slattery ML. Vitamin D Receptor Gene (VDR) Associations with Cancer. *Nutr Rev* 2007;65(8 Pt 2):S102-S104.
- Carlberg C, Dunlop TW. The impact of chromatin organization of vitamin D target genes. *Anticancer Res* 2006;26(4A):2637-45.
- Haussler MRI, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α ,25(OH) $_2$ vitamin D: genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25(4):543-59.
- Buttiglierio C, Monagheddu C, Petroni P, Saini A, Dogliotti L, Ciccone G, et al. Prognostic role of vitamin d status and efficacy of vitamin D supplementation in cancer patients: a systematic review. *Oncologist* 2011;16(9):1215-27.
- Hutchinson PE, Osborne JE, Lear JT, Smith AG, Bowers PW, Morris PN, et al. Vitamin D receptor polymorphisms are associated with altered prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 2000;6(2):498-504.
- Ntais C, Polycarpou A, Ioannidis JP. Vitamin D receptor gene polymorphisms and risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12(12):1395-402.
- Ye WZ, Reis AF, Velho G. Identification of a novel Tru9 I polymorphism in the human vitamin D receptor gene. *J Hum Genet* 2000;45(1):56-7.
- Kostner K, Denzer N, Muller CS, Klein R, Tilgen W, Reichrath J. The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer Res* 2009;29(9):3511-36.
- Peters U, McGlynn KA, Chatterjee N, Gunter E, Garcia-Closas M, Rothman N, et al. Vitamin D, calcium, and vitamin D receptor polymorphism in colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(12):1267-74.
- Sillanpaa P, Hirvonen A, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Uusitupa M, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism as an important modifier of positive family history related breast cancer risk. *Pharmacogenetics* 2004;14(4):239-45.
- Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta* 2006;371(1-2):1-12.
- Penna-Martinez M, Ramos-Lopez E, Stern J, Hirsch N, Hansmann ML, Selkinski I, et al. Vitamin D receptor polymorphisms in differentiated thyroid carcinoma. *Thyroid* 2009;19(6):623-8.
- Hedayati M, Zarif Yeganeh M, Sheikholeslami S, Afsari F. Diversity of mutations in the RET proto-oncogene and its oncogenic mechanism in medullary thyroid cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2016;53(4):217-27.
- Nozhat Z, Hedayati M. PI3K/AKT Pathway and Its Mediators in Thyroid Carcinomas. *Mol Diagn Ther* 2016;20(1):13-26.
- Yeganeh MZ, Sheikholeslami S, Hedayati M. RET proto oncogene mutation detection and medullary thyroid carcinoma prevention. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16(6):2107-17.

25. Yeganeh MZ, Sheikholeslami S, Dehbashi Behbahani G, Farashi S, Hedayati M. Skewed mutational spectrum of RET proto-oncogene Exon10 in Iranian patients with medullary thyroid carcinoma. *Tumour Biol* 2015;36(7):5225-31.
26. Sheikholeslami S, Zarif Yeganeh M, Hoghooghi Rad L, Golab Ghadaksaz H, Hedayati M. Haplotype Frequency of G691S/S904S in the RET Proto-Onco-gene in Patients with Medullary Thyroid Carcinoma. *Iran J Public Health* 2014;43(2):235-40.
27. Hedayati M, Zarif Yeganeh M, Sheikhol Eslami S, Rezaghi Barez S, Hoghooghi Rad L, Azizi F. Predominant RET Germline Mutations in Exons 10, 11, and 16 in Iranian Patients with Hereditary Medullary Thyroid Carcinoma. *J Thyroid Res* 2011;2011:264248.
28. Alvandi E, Akrami SM, Chiani M, Hedayati M, Nayer BN, Tehrani MR, et al. Molecular analysis of the RET proto-oncogene key exons in patients with medullary thyroid carcinoma: a comprehensive study of the Iranian population. *Thyroid* 2011;21(4):373-82.
29. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):12-5.
30. Haghpanah V, Ghaffari SH, Rahimpou rP, Abbasi A, Saeedi M, Pak H, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms in patients with thyroid cancer. *Gene Ther Mol Biol* 2007;11:299-304.
31. Cheteri MB, Stanford JL, Friedrichsen DM, Peters MA, Iwasaki L, Langlois MC, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and prostate cancer risk. *Prostate* 2004;59(4):409-18.
32. Lurie G, Wilkens LR, Thompson PJ, McDuffie KE, Carney ME, Terada KY, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and epithelial ovarian cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(12):2566-71.
33. Gapska P, Scott RJ, Serrano-Fernandez P, Huzarski T, Byrski T, Kladny J, et al. Vitamin D receptor variants and breast cancer risk in the Polish population. *Breast Cancer Res Treat* 2009;115(3):629-33.
34. Sinotte M, Rousseau F, Ayotte P, Dewailly E, Diorio C, Giguère Y, et al. Vitamin D receptor polymorphisms (FokI, BsmI) and breast cancer risk: association replication in two case-control studies within French Canadian population. *Endocr Relat Cancer* 2008;15(4):975-83.
35. Barroso E, Fernandez LP, Milne RL, Pita G, Sendagorta E, Floristan U, et al. Genetic analysis of the vitamin D receptor gene in two epithelial cancers: melanoma and breast cancer case-control studies. *BMC Cancer* 2008;8:385.
36. Clendenen TV, Arslan AA, Koenig KL, Enquist K, Wirgin I, Agren A, et al. Vitamin D receptor polymorphisms and risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett* 2008;260(1-2):209-15.
37. Oakley-Girvan I, Feldman D, Eccleshall TR, Gallagher RP, Wu AH, Kolonel LN, et al. Risk of early-onset prostate cancer in relation to germ line polymorphisms of the vitamin D receptor. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(8):1325-30.
38. Gorham ED, Garland CF, Garland FC, Grant WB, Mohr SB, Lipkin M, et al. Optimal vitamin D status for colorectal cancer prevention: a quantitative meta analysis. *Am J Prev Med* 2007;32(3):210-6.
39. Rohan T. Epidemiological studies of vitamin D and breast cancer. *Nutr Rev* 2007;65(8 Pt 2):S80-3.
40. Giovannucci E. Strengths and limitations of current epidemiologic studies: vitamin D as a modifier of colon and prostate cancer risk. *Nutr Rev* 2007;65(8 Pt 2):S77-9.
41. Baier R, Grauer A, Lazaretti-Castro M, Ziegler R, Raue F. Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on cell proliferation and calcitonin gene expression. *Endocrinology* 1994;135(5):2006-11.

Association of vitamin D levels and receptor gene polymorphisms with medullary thyroid cancer

Abstract

Received: 13 Jun. 2016 Revised: 04 Sep 2016 Accepted: 09 Sep 2016 Available online: 10 Sep 2016

Mehrnoosh Ramezani M.Sc.¹
Mehdi Hedayati Ph.D.²
Saeed Hoseini Asl Ph.D.¹
Meraj Tabatabaei M.Sc.³
Mohammad Mazani Ph.D.^{1*}
Shirzad Nasiri Ph.D.⁴

1- Department of Biochemistry,
School of Medicine, Ardabil
University of Medical Sciences,
Ardabil Iran.

2- Cellular and Molecular Research
Center, Research Institute for En-
docrine Sciences, Shahid Beheshti
University of Medical Sciences, Te-
hran, Iran.

3- Department of Immunology,
School of Medicine, Shahid Be-
heshti University of Medical Sci-
ences, Tehran, Iran.

4- General Surgery and Cancer,
Associate Professor of Tehran Uni-
versity of Medical Sciences, Sharia-
ti Hospital, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Department of
Biochemistry, School of Medicine,
Ardabil University of Medical Sciences,
Ardabil, Iran.
Tel: +98- 045-33510052
E-mail: m.mazani@arums.ac.ir

Background: Thyroid cancer is the most common endocrine malignancy. Accounting for approximately 1-2% of all cancers. Thyroid cancers have been divided into four main types: papillary, follicular, medullary and anaplastic. The active form of vitamin D (1,25- (OH) 2-vitamin D3) by binding to its receptor, using genomic and non-genomic mechanisms inhibits the proliferative effect of TSH on thyroid cells. Therefore, vitamin D may have a role in regulating of thyroid gland cell proliferation. Many studies have shown anti-cancer effects of vitamin D in cancers. Polymorphisms of Vitamin D receptor can influence the prevalence to various cancers. In the present study, serum level of vitamin D and FokI, BsmI and Tru9I polymorphism of vitamin D receptor was investigated.

Methods: This case-control study was performed in the summer of 2015 in Endocrinology and Metabolism Center of Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Forty medullary thyroid cancer patients and 40 healthy controls were investigated. Genomic DNA of subjects was extracted with saturated salt/proteinase K and polymorphisms of vitamin D receptor gene investigated by polymerase chain reaction-sequencing. Serum level of vitamin D evaluated by ELISA technique. The results were analyzed by SPSS, ver. 20 (Chicago, IL, USA) and GraphPad Prism, ver. 5 (GraphPad, Inc., CA, USA) softwares.

Results: Genotypic and allelic abundance of FokI and BsmI polymorphisms between test and control groups have not shown significant different. In Tru9I polymorphism, Tt genotype abundance in test group were 45 percent and in control group were 17.5 percent and t allelic abundance in test group were 25 percent and in control group were 8.7 percent which this different were significant. Average serum level of vitamin D in test group was 23.32 ng/ml and in control group was 18.95 ng/ml which was statistically significant.

Conclusion: Unexpectedly, serum levels of vitamin D in test group were higher than control group. Tru9I polymorphism is significantly correlated to medullary thyroid carcinoma prevalence.

Keywords: case-control studies, polymorphism, thyroid neoplasms, vitamin D, vitamin D receptor.