

# تأثیر تغییرات متیلاسیون ژن CDKN2A بر روی بیان ژن های CDK-4 و

## CDK-6 در بافت های تومور و حاشیه تومور بیماران مبتلا به سرطان

### تیروئید

#### The Effect of CDKN2A Gene Methylation Alterations on the Expression of CDK-4 and CDK-6 in Tumor and Tumor-Margin Tissues of Patients with Thyroid Cancer

علی یزدانیان<sup>۱</sup>، امیرمحمد آقایی<sup>۲</sup>، امیر هوشنگ حسین زاده مقبلی<sup>۳</sup>، مرتضی اکبری<sup>۴</sup>، الهه مقصودی نیا<sup>۵</sup>، حبیب ذره دار<sup>۶</sup>،  
نیما افشار مقدم<sup>۱</sup>، سید احمد حسینی<sup>۱</sup>، داریوش شانه بندی<sup>۱\*</sup>

۱- به ترتیب پزشک عمومی، دانشجوی ارشد، استادیار، تحقیقات ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۲- دانش آموخته دکترای حرفه ای، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۳- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۴- استادیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۵- استادیار مرکز تحقیقات سل و بیماری های ریوی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۶- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

Yazdani A<sup>1</sup>, Aghaei AM<sup>2</sup>, Hosseinzadeh Moghbeli AH<sup>3</sup>, Akbari M<sup>4</sup>, Maghsoudinia E<sup>1</sup>,  
Zarrehdar H<sup>5</sup>, Afshar Moghaddam N<sup>1</sup>, Hosseini SA<sup>6</sup>, Shanebandi D<sup>\*1</sup>

1- MD, MSc, Assistant Professor, Immunology Research Center, Tabriz University of  
Medical Sciences, Tabriz, Iran

2- DVM, Faculty of Veterinary, Tabriz Branch Medical Sciences, Islamic Azad University,  
Tabriz, Iran

3- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Ta.C., Islamic Azad  
University, Tabriz, Iran

4- Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Medical  
Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences,  
Tabriz, Iran

5- Assistant Professor, Tuberculosis and Lung Disease Research Center, Tabriz University of  
Medical Sciences, Tabriz, Iran

6- Assistant Professor, Department of Biology, Ker.C., Islamic Azad University, Kermanshah,  
Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: dariush.shanebandi@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۰۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۱۷)

### چکیده

سرطان تیروئید شایع ترین بدخیمی غدد درون ریز در سراسر جهان می باشد. شایع ترین نوع این بیماری زیر گروه پاپیلاری است. مانند سایر سرطان های شایع این بدخیمی نیز در اثر تغییرات در مکانیسم های مولکولی سلول های نرمال همانند چرخه سلولی و مرگ برنامه ریزی شده سلولی ایجاد می شود. کینازهای وابسته به سایکلین مانند CDK-4 و CDK-6 دو تنظیم کننده عمده چرخه سلولی می باشند. در مقابل، CDKN2A که یکی دیگر از ژن های درگیر در روند چرخه سلولی است، تأثیر منفی بر عملکرد کینازهای وابسته به سایکلین می گذارد که در نتیجه از تکثیر کنترل نشده سلول جلوگیری می کند. تغییرات اپی ژنتیکی یکی دیگر از عوامل تنظیم منفی بیان ژن ها می باشد. در برخی بدخیمی ها متیلاسیون پروموتور ژن CDKN2A باعث کاهش بیان آن و در نتیجه نقش کنترلی آن می شود. با توجه به اهمیت چرخه سلولی در روند سرطان زایی در مطالعه حاضر، به بررسی تغییر سطح بیان ژن های CDK-4 و CDK-6 در نمونه های بافتی بیماران مبتلا به سرطان تیروئید و ارتباط آن ها با میزان متیلاسیون ژن CDKN2A در جمعیت شمال غرب ایران پرداخته شد.

در این مطالعه ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان تیروئید با کسب رضایت نامه آگاهانه وارد مطالعه شدند. تغییرات بیان ژن های CDK-4 و CDK-6 در نمونه های توموری نسبت به نمونه های مارژین با روش qRT-PCR بررسی شد. برای بررسی متیلاسیون ناحیه مورد نظر ژن CDKN2A از روش Methylation Sensitive High Resolution mMelting (ms-HRM) استفاده شد. در آزمون های آماری Pvalue < ۰/۰۵ معنی دار تلقی شد.

در مورد بیان تغییرات بیان هر سه ژن مورد بررسی در نمونه های توموری با نمونه های مارژین معنی دار بود. در این بین CDK-4 و CDK-6 دارای افزایش بیان و CDKN2A دارای کاهش بیان در نمونه های توموری بود. از طرفی میزان متیلاسیون ژن CDKN2A در نمونه های توموری نسبت به نمونه های مارژین بیشتر بود که می تواند دلیلی بر تغییرات بیان آن باشد. به علاوه طبق یافته های بررسی ما تغییرات با برخی شاخص های کلینیکوپاتولوژیک بیماران شامل متاستاز به غدد لنفاوی و متاستاز دور دست بیماری مرتبط است.

### واژه های کلیدی

سرطان تیروئید

CDK-4

CDK-6

CDKN-2A

## مقدمه

بر اساس آمار نئوپلازی غده‌ی تیروئید ۲/۵٪ از همه‌ی سرطان‌ها و ۹۳/۵٪ از سرطان‌های اندوکراین را تشکیل می‌دهد. که در مقایسه با آمارهای جهانی در زنان (۴/۴٪) و مردان (۱/۳٪) تقریباً برابری می‌کند (Dobrinja 2014; Pacini and DeGroot 2013). میزان شیوع سرطان تیروئید در ایران رو به افزایش است به‌طوری‌که در سال ۱۳۸۴ در زنان و مردان به‌ترتیب ۳/۴۷ و ۱/۱۶ درصد بود ولی در سال ۱۳۸۸ به‌ترتیب ۴/۲ و ۱/۳۶ درصد می‌باشد (Pizzato et al. 2022; Rahimzadeh 2023). اگرچه هنوز علت دقیق و مشخصی برای ایجاد سرطان تیروئید تشخیص داده نشده است لیکن عوامل متعددی را در ایجاد آن دخیل می‌دانند ولی آنچه که حائز اهمیت است این است که قرار گرفتن در معرض تشعشع، عوامل هورمونی و تولیدمثلی، میزان نامتعادل ید در رژیم غذایی، تاریخچه‌ی خانوادگی و ابتلا به گواتر یا دیگر بیماری‌های تیروئیدی خوش‌خیم نقش بسیار مهمی دارند (Parangi and Phitayakorn 2010; Pellegriti et al. 2013). *CDKN2A* یکی از ژن‌های تومور ساپرسور شناخته شده در انواع سرطان‌ها است که در بیشتر سرطان‌ها از جمله سرطان‌های کولون، معده و پستان دارای بیان کاهش یافته بوده و این کاهش بیان منجر به برهم ریختن چرخه سلول و در نهایت رشد لجام گسیخته سلول‌های سرطانی می‌شود (Agarwal et al. 2012). همان‌گونه که اشاره شد یکی از مکانیسم‌های اصلی تغییرات ژنومیک در سلول‌های سرطانی تغییرات اپی‌ژنتیکی می‌باشد که در بین این تغییرات شایع‌ترین تغییر مربوط به افزایش یا کاهش گروه‌های متیل به جزایر CpG در بالا دست یا ابتدای توالی ژن‌های مورد هدف این مکانیسم می‌باشد (Chakravarthi et al. 2016; Grønbaek et al. 2007; Kanwal and Gupta 2012). افزایش گروه‌های متیل به این جایگاه‌ها را اصطلاحاً هایپرمتیلاسیون و حذف متیل از توالی را هایپومتیلاسیون می‌نامند. در سرطان عموماً هایپرمتیلاسیون بر روی تومورساپرسور ژن‌ها و هایپومتیلاسیون بر روی انکوژن‌ها صورت می‌پذیرد که نتیجه آن کاهش بیان در ژن‌های تومورساپرسوری و افزایش بیان انکوژن‌های درون سلولی است (Dunn 2003; Frigola et al. 2005; Garinis et al. 2002). ژن *CDKN2A* نیز که فعالیت و بیان آن در سلول باعث کاهش میزان تقسیم سلولی می‌شود و با توجه

به فعالیت ضد رشد در چرخه سلولی در ردیف تومور ساپرسور ژن‌ها قرار می‌گیرد بیان آن در اکثر سرطان‌ها با فرآیند هایپر متیلاسیون کاهش پیدا می‌کند و در نتیجه بیان ژن‌های هدف آن افزایش یافته و سلول‌های سرطانی تقسیم لجام گسیخته‌ای را شروع می‌کنند (Bailon-Moscato et al. 2017; Yoon et al. 2017). *CDK-4* و *CDK-6* دو تنظیم‌کننده عمده چرخه سلولی می‌باشند که در *check point*های مختلف چرخه سلولی نقش به‌سزایی در تحریک رشد و تقسیم سلول‌ها به عهده دارند و با عنایت به نقششان در فرآیندهای سلولی جز انکوژن‌های مهم سلولی به شمار می‌روند. این دو انکوژن از جمله هدف‌های مهم ژن *CDKN2A* بوده و به نظر می‌رسد تغییرات بیان و متیلاسیون *CDKN2A* با تغییرات بیان *CDK-4* و *CDK-6* در ارتباط باشد (Mir and Jan 2023).

از این رو در بررسی حاضر تصمیم به بررسی تغییرات بیان این سه ژن کلیدی تنظیم‌کننده چرخه سلولی و همچنین تغییرات اپی‌ژنتیک ژن *CDKN2A* در نمونه‌های توموری و مارژین سرطان تیروئید به‌منظور آشنایی بهتر با مکانیسم‌های مولکولی ایجاد کننده این بیماری گرفتیم.

## نوع پژوهش: جمع‌آوری نمونه‌های بافتی

در این مطالعه مورد-شاهدی، از ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان تیروئید پاپیلاری که بین سال‌های ۱۳۹۹ و ۱۴۰۱ جهت عمل جراحی به مرکز آموزشی درمانی امام رضای تبریز مراجعه نموده بودند، دو نمونه بافتی (شامل نمونه توموری و حاشیه تومور) اخذ شد. نمونه‌ها بلافاصله در تانک ازت مایع (در داخل کرایو ویال‌های مخصوص) جهت انجام آزمایشات مولکولی به مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انتقال یافتند. بخش دیگری از نمونه‌های اخذ شده جهت تعیین ویژگی و خصوصیات پاتولوژیکی به متخصص مربوطه ارجاع داده شد (جدول ۱).

لازم به ذکر است که قبل از نمونه‌گیری، کلیات مطالعه برای همه‌ی بیماران مورد مطالعه توضیح داده شده و از همه‌ی شرکت کنندگان رضایت‌نامه‌ی آگاهانه کتبی که مورد تأیید کمیته‌ی اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز بود، اخذ شد.

## معیارهای انتخاب افراد بیمار

و سپس cDNA تولید شده به‌عنوان الگو برای انجام واکنش quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش qRT-PCR با استفاده از دستگاه LightCycler ساخت شرکت Roche انجام گرفت. این عمل در حجم نهایی ۲۰ μl شامل ۸ میکرولیتر آب، ۱۰ میکرولیتر پری میکس‌سایر گرین (BioFact)، ۱ میکرولیتر cDNA و ۰/۵ μl از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های مورد بررسی (در رقت ۱ pmol) انجام شد. از فرمول  $2^{-\Delta CT}$  برای محاسبه بیان نسبی نمونه‌ها استفاده شد پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ قابل مشاهده است.

معیارهای ورود به مطالعه شامل: امضای رضایت‌نامه آگاهانه کتبی، ابتلا به سرطان تیروئید، سکونت در شمال‌غرب ایران، عدم سابقه ابتلا به سرطان‌های دیگر و عدم دریافت درمان قبلی بود.

### روش اجرای آزمایشات مولکولی

#### استخراج RNA و بررسی بیان ژن‌های مورد نظر:

ابتدا RNAی تام از بافت‌ها با توجه به دستورالعمل محلول RNX-Plus شرکت سیناژن استخراج شد و بررسی کمی و کیفی آن‌ها با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه نانودراپ انجام گرفت. واکنش رونویسی معکوس مطابق دستورالعمل کیت M-MLV cDNA Synthesis محصول کمپانی BioFact کره جنوبی انجام شد

جدول ۲- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در بررسی

| Primer name              |   | Sequenece                 | Tm | Product size |
|--------------------------|---|---------------------------|----|--------------|
| CDKN2Amethylation primer | F | AAATTTTATTTTAAAGGGTTT     | 59 | 288bp        |
|                          | R | CTTCTCAATAACTTCCTATTCATAC |    |              |
| CDK4 RT-PCR primer       | F | AGCTTGCGCCTGTGTCTATG      | 57 | 134bp        |
|                          | R | GATCAAGGGAGACCTCACGC      |    |              |
| CDK6 RT-PCR primer       | F | AGAAGAAGACTGGCCTAGAG      | 59 | 186 bp       |
|                          | R | TGGAAGTATGGGTGAGACAGG     |    |              |
| GAPDH                    | F | AAGGTGAAGTCGGAGTCAAC      |    |              |
|                          | R | GGGGTCATTGATGGCAACAA      |    |              |

آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism version 6.00 در نمونه‌های تومور و حاشیه تومور بر اساس برنامه‌ی Unpaired T-TEST انجام شد. برای بررسی ارتباط دو ژن از ضریب همبستگی spearman استفاده شد. برای تمامی روابط P-value محاسبه شده کوچک‌تر یا مساوی ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد.

#### ملاحظات اخلاقی

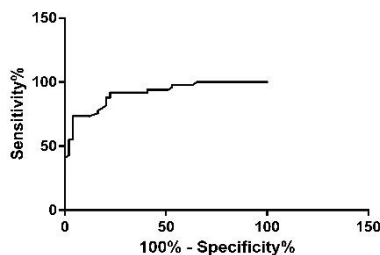
۱. قبل از تمام مراحل، کلیات طرح از نظر اخلاق پزشکی در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز بررسی و تأیید شد (کد اخلاق IR.TBZMED.REC.1400.948).
  ۲. قبل از انجام عمل جراحی کلیات طرح به تمام بیماران توضیح داده شده و از تمام افراد رضایت‌نامه آگاهانه کتبی جهت انجام پژوهش بر روی نمونه آن‌ها اخذ شد.
  ۳. اطلاعات افراد محرمانه بوده و ارائه نتایج بدون ذکر مشخصات افراد و با کد بوده است.
- یافته‌ها

#### استخراج DNA و بررسی متیلاسیون:

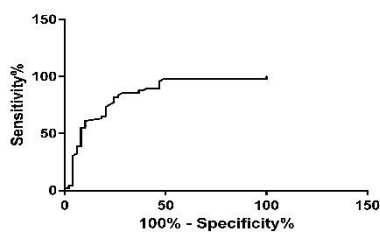
استخراج DNA از بافت‌ها به‌وسیله DNeasy Blood and Tissue Kit محصول کمپانی QIAGEN انجام گرفت. DNAهای استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه نانودراپ مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور بررسی الگوی متیلاسیون نواحی پروموتری، تیمار بی سولفیت (bisulfite) بر روی ۱۰۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده با استفاده از کیت تولیدی کمپانی Zymo research و مطابق با دستورالعمل مربوطه انجام گرفت. این تیمار باعث تغییر سیتوزین‌های غیرمتیله به یوراسیل می‌شود، که باعث افتراق توالی‌های CpG متیله از غیرمتیله می‌شود. متعاقباً MS- (methylation sensitive high resolution melt analysis) HRM انجام گرفت. این تکنیک مقدار متیلاسیون نمونه‌ها را بر اساس تغییرات دمای منحنی ذوب محصول PCR در حضور نمونه‌های کنترل به‌صورت نیمه کمی اندازه‌گیری می‌کند.

#### آنالیزهای آماری مورد استفاده در این مطالعه

و ( $p < 0.0001$ ) از این نظر کاندید مناسب‌تری برای اهداف فوق یا پروگنوز بیماری به نظر می‌رسد (نمودار ۲).



Area: 0.9115  
Std. Error: 0.016  
P value < 0.0001



Area: 0.8363  
Std. Error: 0.042  
P value < 0.0001

نمودار ۲- آنالیز منحنی ROC مربوط به بیان ژن‌های *CDK-4* و *CDK-6*

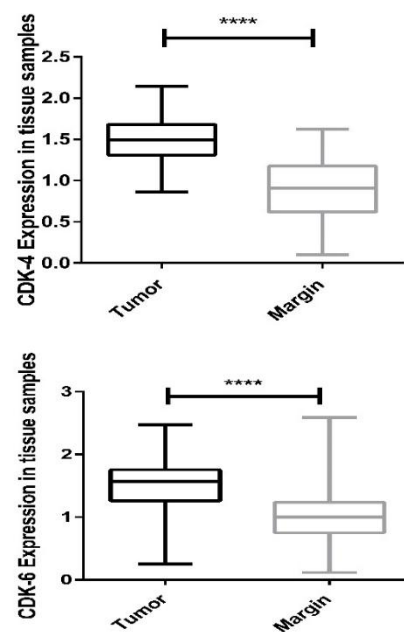
میزان متیلاسیون *CDKN2A* در بافت‌های توموری تیروئید در این مطالعه از روش *MS-HRM* برای بررسی متیلاسیون ژن *CDKN2A* استفاده شد. با بررسی نتایج مشخص شد که این ژن در بافت‌های توموری تیروئید دارای متیلاسیون بیشتری نسبت به بافت‌های حاشیه تومور می‌باشد (نمودار ۳). به علاوه، آنالیز منحنی ROC نشان داد که از میزان متیلاسیون این ژن می‌توان برای پروگنوز بیماری (یا به عنوان نشانگر زیستی / هدف درمانی) سرطان تیروئید استفاده کرد (سطح زیر نمودار  $0.7236$  و ( $p < 0.0001$ )).

همبستگی بین بیان ژن‌های *CDK-6*، *CDK-4* و متیلاسیون ژن *CDKN2A* نتایج این مطالعه نشان داد که بین بیان ژن‌های *CDK-6* و *CDK-4* یک همبستگی مثبت وجود دارد (نمودار 3a)  $p = 0.0018$ . همچنین بیان هر کدام از ژن‌های *CDK-6* و *CDK-4* با متیلاسیون ژن *CDKN2A* یک همبستگی مثبت دارند (نمودار 3b و 3c). ولی این مقدار از همبستگی از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $p = 0.2901$  برای *CDK-4* و  $p = 0.2966$  برای *CDK-6*)

ارتباط بیان ژن‌های *CDK-4* و *CDK-6* و متیلاسیون ژن *CDKN2A* با خصوصیات بالینی

در بررسی حاضر ۵۰ نمونه توموری و بافت حاشیه متناظر (از همان بیمار) مورد بررسی قرار گرفت که خلاصه اطلاعات بالینی در جدول ۱ آورده شده است. بررسی نتایج این جدول نشان می‌دهد که تغییرات بیان ژن‌های *CDK-4* و *CDK-6* و همچنین متیلاسیون ژن *CDKN2A* ارتباط معنی‌داری با خصوصیات بالینی بیماران مانند سن، جنسیت، سابقه خانوادگی، مصرف سیگار و استیج بیماری ندارند. ولی هر سه متغیر با درگیری غدد لنفاوی متاستاز دور دست در بیماران ارتباط معنی‌داری داشتند ( $p < 0.05$ ).

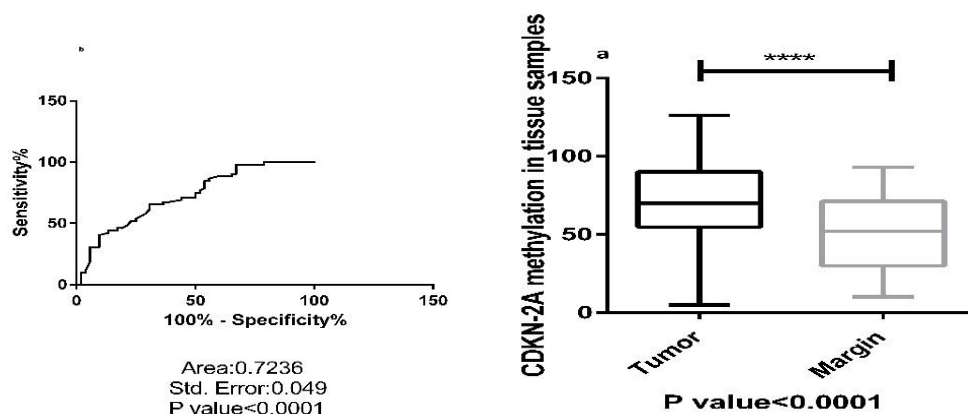
بیان *CDK-6* و *CDK-4* در بافت‌های توموری تیروئید نتایج *qRT-PCR* نشان داد که بیان ژن‌های *CDK-4* و *CDK-6* در بافت‌های سرطانی نسبت به بافت‌های حاشیه تومور بیشتر بود ( $p < 0.0001$ ). نمودار ۱ نشانگر این تغییر بیان می‌باشد.



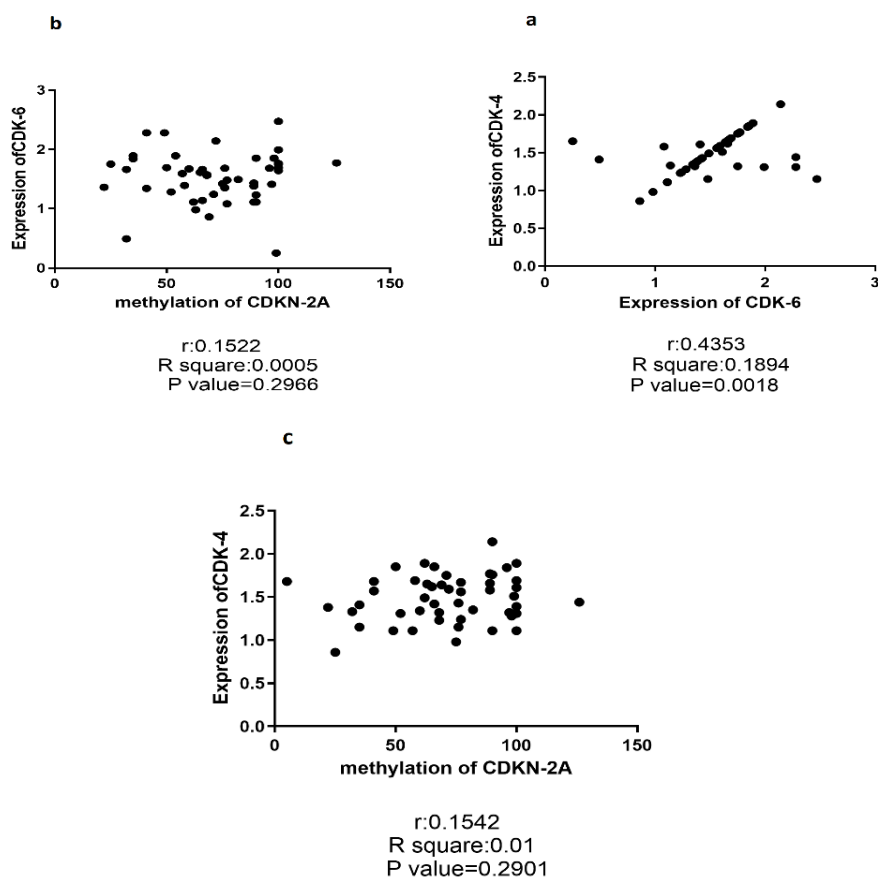
نمودار ۱- مقایسه بیان ژن‌های *CDK-4* و *CDK-6* در بافت‌های تومور و حاشیه تومور

### آنالیز منحنی ROC

آنالیز منحنی ROC (Receiver Operating Characteristic Curve) نشان داد که *CDK-6* با سطح زیر نمودار  $0.8363$  می‌تواند به عنوان کاندیدی به عنوان نشانگر زیستی یا هدف درمانی مد نظر قرار گیرد ( $p < 0.0001$ ). حتی *CDK-4* با دارا بودن سطح زیر نمودار  $0.9115$



نمودار ۳- تغییرات متیلاسیون ژن *CDKN2A* در بافت‌های توموری تیروئید نسبت به مارژین (a) و منحنی ROC مربوطه (b)



نمودار ۴- همبستگی بین بیان ژن‌های CDK-4 و CDK-6 (a)، همبستگی بین بیان ژن CDK-6 و متیلاسیون ژن *CDKN2A* (b) و همبستگی بین بیان ژن CDK-4 و متیلاسیون ژن *CDKN2A* (c)

جدول ۱- مشخصات کلینیک و پاتولوژیک بیماران

| ویژگی‌های بالینی | تعداد    | CDK4<br>Expression<br>P value | CDK6<br>Expression<br>P value | CDK-N2A<br>Methylation<br>P value |
|------------------|----------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| سن               | >۶۰      | ۲۹                            | ۰.۰۹۸                         | ۰.۰۷۸                             |
|                  | <۶۰      | ۲۱                            |                               | ۰.۰۹۶                             |
| جنس              | مونث     | ۲۷                            | ۰.۰۹۲                         | ۰.۰۷۵                             |
|                  | مذکر     | ۲۳                            |                               | ۰.۰۶۴                             |
| تاریخچه خانوادگی | مثبت     | ۹                             | ۰.۰۸۹                         | ۰.۰۹۲                             |
|                  | منفی     | ۴۱                            |                               | ۰.۰۹۱                             |
| مصرف سیگار       | مثبت     | ۳۱                            | ۰.۰۷۹                         | ۰.۰۶۸                             |
|                  | منفی     | ۱۹                            |                               | ۰.۰۶۴                             |
| درگیری لنف نود   | مثبت     | ۱۰                            | ۰.۰۲۷                         | ۰.۰۳۱                             |
|                  | منفی     | ۴۰                            |                               | ۰.۰۴۲                             |
| متاستاز          | مثبت     | ۹                             | ۰.۰۲۱                         | ۰.۰۰۴                             |
|                  | منفی     | ۴۱                            |                               | ۰.۰۳۲                             |
| استیج            | I & II   | ۱۰                            | ۰.۰۵۶                         | ۰.۰۵۳                             |
|                  | III & IV | ۴۰                            |                               | ۰.۰۶۱                             |

## بحث و نتایج

## اهمیت موضوع و تفسیر نتایج:

این مطالعه با هدف بررسی تغییرات متیلاسیون ژن CDKN2A و بیان ژن‌های CDK-4 و CDK-6 در بافت توموری و حاشیه تومور بیماران مبتلا به سرطان تیروئید و وجود همبستگی بین فاکتورهای مذکور انجام شد. در بررسی حاضر میزان بیان CDK-4 و CDK-6 در نمونه‌های توموری نسبت به نمونه‌های مارژین دارای افزایش معنی‌دار بود. همچنین، میزان متیلاسیون ژن CDKN2A در نمونه‌های توموری کاهش معنی‌دار داشت.

خانواده INK4 مجموعه‌ای از عوامل سرکوبگر تومور ذاتی است که شامل پروتئین‌های p16INK4A که توسط ژن CDKN2A کدگذاری می‌شود p15INK4B کدگذاری شده توسط ژن (CDKN2B) p18INK4C کدگذاری شده توسط ژن (CDKN2C) p19INK4D کدگذاری شده توسط ژن (CDKN2D) است. اعضای این خانواده با رقابت برای اتصال به CDK4/6، تشکیل کمپلکس سیکلین-D-CDK4/6 را مختل می‌کنند و همچنین انتقال سلول‌ها از فاز G1 به فاز S را به‌طور مؤثری مهار می‌کنند.

بیان ژن CDKN2 در سلول‌های توموری اغلب سرکوب می‌شود، که این امر منجر به فعال‌سازی مداوم CDK4/6 و در نتیجه مقاومت دارویی در برابر مهارکننده‌های CDK4/6 می‌گردد. با این حال، هنگامی که این مهارکننده‌ها به میزان بیش از حد بیان شوند، به دلیل

مهار کمپلکس سیکلین D-CDK4/6، پیشرفت چرخه سلولی تومور ممکن است تا حدی به مسیرهای سیگنال‌دهی دیگر، غیر از سیگنال‌دهی CDK4/6، وابسته شود، که این امر به مقاومت در برابر مهارکننده‌های CDK4/6 منجر می‌شود.

موتاسیون CDK4 (آرگ-۲۴ به سیس) که آن را در برابر مهار توسط پروتئین سرکوبگر تومور p16INK4a مقاوم می‌کند، شناسایی شده است. به‌طور مشابه، حذف یا جهش در ژن p16INK4a نیز منجر به مهار ناقص CDK4 و فعالیت نامنظم این کیناز می‌شود. در نهایت، غیرفعال‌سازی ژنتیکی p16INK4 یکی از شایع‌ترین جهش‌های سرکوبگر تومور در سرطان‌های انسانی است. به‌طور کلی، این داده‌ها نشان می‌دهند که یک مسیر CDK4/6 سیکلین D1 بدون کنترل یا بیش‌فعال ممکن است مسئول افزایش تکثیر سلولی در سرطان‌ها باشد. این مسیر که به شدت فعال شده است، همچنین حاکی از آن است که CDK4 می‌تواند به‌عنوان یک هدف امیدوارکننده برای توسعه درمان‌های ضدسرطانی محسوب شود (Ahmadi Aghdam, 2023; Mir and Jan 2023).

در مطالعه‌ای که توسط نوساکا و همکاران انجام شد، وضعیت متیلاسیون ژن CDKN2A در بیماران مبتلا به انواع مختلف لوسمی سلول T بزرگسالان (ATL) با استفاده از روش‌های تحلیل ساترن بلات، PCR خاص متیلاسیون (MSPCR) و توالی‌یابی نوکلئوتیدها

بررسی شد. نتایج نشان داد که ژن *CDKN2A* در سلول‌های توموری تازه جدا شده از بیماران مبتلا به ATL حاد (۴۷٪) یا ATL نوع لنفوم (۷۳٪) به‌طور قابل‌توجهی بیشتر متیله شده بود، در حالی که در بیماران مبتلا به ATL مزمن کمتر بدخیم (۱۷٪) و ATL اهسته پیش رونده (۱۷٪) متیلاسیون کمتری مشاهده شد. علاوه بر این، حذف‌های ژن *CDKN2A* در ۲۴٪ از بیماران مبتلا به ATL حاد شناسایی شد؛ بنابراین، ناهنجاری‌های ژن *CDKN2A* در مجموع در ۷۱٪ از بیماران مبتلا به ATL حاد مشاهده شد. در مقابل، هیچ متیلاسیونی در ژن *CDKN2A* در حاملان بدون علامت یا افراد غیرمبتلا یافت نشد. همچنین، متیلاسیون ژن p15 در هیچ یک از نمونه‌های ۳۶ بیمار مبتلا به ATL مشاهده نشد. توالی‌یابی مستقیم ژن *CDKN2A* پس از درمان DNA ژنومی با بی‌سولفیت سدیم نشان داد که متیلاسیون سایت‌های CpG در ۲۴ مورد از ۳۲ مورد ATL (۷۵٪)، شامل ATL مزمن و اهسته پیش رونده، رخ داده است، حتی در مواردی که MSPCR و ساترن بلات قادر به تشخیص متیلاسیون ژن *CDKN2A* نبودند. در میان نمونه‌های تازه ATL که متیلاسیون در آن‌ها مشاهده شد، متیلاسیون در ناحیه پروموتور و اگزون در ۱۷ مورد از ۲۴ مورد شناسایی شد، در حالی که متیلاسیون تنها در اگزون (بدون درگیری ناحیه پروموتور) در ۷ مورد از ۲۴ مورد مشاهده شد. در یک مورد خاص، الگوی متیلاسیون بین سلول‌های خون محیطی و سلول‌های غدد لنفاوی متفاوت بود، که این تفاوت نشان‌دهنده وجود چندین زیرکلون با الگوهای متیلاسیون متمایز است، با وجود یکسان بودن محل ادغام ویروس HTLV-I. بررسی‌ها با استفاده از PCR کمی نشان داد که بیان mRNA ژن *CDKN2A* در سلول‌هایی با ژن *CDKN2A* متیل‌شده به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافته است، به‌ویژه در مواردی که ناحیه پروموتور متیل‌دار بود. این یافته‌ها حاکی از آن است که متیلاسیون CpG بیان ژن *CDKN2A* را کاهش می‌دهد و به‌عنوان یک عامل کلیدی در پیشرفت بیماری ATL نقش دارد (Nosaka et al. 2000).

در مطالعه‌ای دیگر که توسط ماندا و همکاران انجام شد، وضعیت متیلاسیون ژن *CDKN2A* در سرطان‌های اولیه روده بزرگ با استفاده از روش PCR خاص متیلاسیون در زمان واقعی (MethyLight)، که امکان اندازه‌گیری کمی سطح متیلاسیون را

فراهم می‌کند، مورد تحلیل قرار گرفت. متیلاسیون ناحیه پروموتور ژن *CDKN2A* در ۵۵ مورد (معادل ۶۱.۱٪) از ۹۰ نمونه توموری قابل شناسایی بود، و مقدار میانه متیلاسیون ۰.۱۸۷ (با دامنه ۰.۰۰ تا ۰.۹۱۹) گزارش شد. سطح متیلاسیون ژن *CDKN2A* با برخی ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک خاص، از جمله تمایز تومور ( $p=0.018$ ) و مرحله دوکس ( $p=0.016$ )، همبستگی آماری داشت. در تحلیل بقا، سطح متیلاسیون *CDKN2A* با پیش‌آگهی ضعیف بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ، چه در کل موارد ( $p=0.014$ ) و چه در موارد مرحله Dukes C ( $p=0.004$ ) که مورد بررسی قرار گرفتند، ارتباط نشان داد. این نتایج حاکی از آن است که وضعیت متیلاسیون ژن *CDKN2A* می‌تواند به‌عنوان یک عامل پیش‌آگهی در سرطان کولورکتال عمل کند و ممکن است در طراحی درمان‌های اختصاصی برای بیماران مفید باشد (Maeda et al. 2003).

در مطالعه‌ای دیگر که توسط هوانگ و همکاران انجام شد، پایگاه‌های داده اطلس ژنومی سرطان (TCGA) و ژنومیک حساسیت دارویی در سرطان (GDSC) بررسی شدند تا ژن‌هایی با فراوانی بالای جهش و ترکیبات حساس احتمالی نسبت به این جهش‌ها شناسایی شدند. برای تأیید یافته‌های درون‌سکوپی، مطالعات درون کشتگاهی انجام شد. نتایج نشان داد که ژن *CDKN2A* در سرطان معده به‌طور مکرر دچار جهش شده است، که این امر در پایگاه داده TCGA به‌خوبی مستند شده است. مهارگر CDK4/6 به نام PD-0332991 در سلول‌های سرطانی دارای جهش *CDKN2A* حساسیت نشان داد، که این موضوع در پایگاه داده GDSC تأیید شد. مطالعات درون کشتگاهی نشان دادند که PD-0332991 قادر است به‌طور انتخابی تکثیر سلول‌های سرطانی معده با جهش *CDKN2A* را مهار کند. همچنین، این مهارگر تهاجم سلولی، مهاجرت و تشکیل کلونی سلول‌های سرطانی معده با جهش *CDKN2A* را کاهش داد PD-0332991. چرخه سلولی را متوقف کرد، اما آپوپتوز را القا نکرد. این ترکیب همچنین توانست رشد مدل موشی پیوندی سرطان معده را مهار کند. به‌طور کلی، سرطان معده با جهش *CDKN2A* به مهارکننده‌های CDK4/6 حساس است، و PD-0332991 به‌عنوان یک عامل درمانی بالقوه برای این نوع سرطان مطرح می‌شود (Huang et al. 2015).

## نتیجه‌گیری کلی

با عنایت به نتایج بررسی حاضر دو ژن CDK-4 و CDK-6 در نمونه‌های توموری سرطان تیروئیدپایلاری نسبت به نمونه‌های مارژین دارای افزایش بیان معنی‌دار هستند. بر خلاف دو ژن CDK-4 و CDK-6 بررسی‌ها در مورد ژن CDKN2A حاکی از کاهش بیان این ژن و افزایش متیلاسیون در ناحیه پروموتور ژن است که احتمالاً این کاهش بیان در نتیجه تغییرات اپی ژنتیکی در پروموتور ایجاد شده است. از طرفی بین بیان سه ژن مورد بررسی همبستگی وجود دارد. در نهایت تغییرات ژن‌های مورد نظر با برخی یافته‌های بالینی نیز دارای ارتباط است.

با عنایت به بررسی مطالعات قبلی نتایج به‌دست آمده بررسی ما به‌طور کلی در راستای مطالعات قبلی و دارای همخوانی با آن‌هاست و نشان می‌دهد که در نمونه‌های توموری میزان افزایش یافته‌ای از بیان ژن‌های CDK-4 و CDK-6 و کاهش بیان ژن CDKN2A در نمونه‌های توموری به میزان معنی‌داری است. در مورد متیلاسیون ژن CDKN2A بررسی حاضر و مطالعات قبلی تأیید کننده هایپرمتیلاسیون ناحیه پروموتور در این ژن است. با این حال از نوآوری بررسی حاضر نسبت به مطالعات قبلی بررسی همزمان هر سه ژن و ارتباط بیانی سه ژن مذکور با یکدیگر است که در مطالعات قبلی کمتر مشاهده می‌شود.

## منابع

Agarwal, Payal, Farruk Mohammad Lutful Kabir, Patricia DeInnocentes, and Richard Curtis Bird. 2012. 'Tumor suppressor gene p16/INK4A/CDKN2A and its role in cell cycle exit, differentiation, and determination of cell fate', *Tumor suppressor genes*, 3: 27882.

Ahmadi Aghdam, Shahrzad. 2023. 'Evaluating the expression and methylation of CDKN2A and CDK-4 and CDK-6 expression as its targets in tumoral and marginal tissues of colorectal cancer patients', Tabriz University of Medical Sciences, Faculty of Medicine.

Bailon-Moscato, Natalia, Gabriela Cevallos-Solorzano, Juan Carlos Romero-Benavides, and Maria Isabel Ramirez Orellana. 2017. 'Natural compounds as modulators of cell cycle arrest: application for anticancer chemotherapies', *Current genomics*, 18: 106-31.

Chakravarthi, Balabhadrapatruni VSK, Saroj Nepal, and Sooryanarayana Varambally. 2016. 'Genomic and epigenomic alterations in cancer', *The American Journal of Pathology*, 186: 1724-35.

Dobrinja, Chiara. 2014. 'Papillary thyroid cancer gender disparity'.

Dunn, Barbara K. 2003. 'Hypomethylation: one side of a larger picture', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 983: 28-42.

Frigola, Jordi, Xavier Solé, Maria F Paz, Victor Moreno, Manel Esteller, Gabriel Capellà, and Miguel A Peinado. 2005. 'Differential DNA hypermethylation and hypomethylation signatures in colorectal cancer', *Human molecular genetics*, 14: 319-26.

Garinis, George A, George P Patrinos, Nick E Spanakis, and Panayiotis G Menounos. 2002. 'DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent', *Human genetics*, 111: 115-27.

Grønbaek, Kirsten, Christoffer Hother, and Peter A Jones. 2007. 'Epigenetic changes in cancer', *Apmis*, 115: 1039-59.

Huang, Shiliang, Hua Ye, Wenying Guo, Xianwen Dong, Nali Wu, Xie Zhang, and Zhigang Huang. 2015. 'CDK4/6 inhibitor suppresses gastric cancer with CDKN2A

mutation', *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8: 11692.

Kanwal, R, and S Gupta. 2012. 'Epigenetic modifications in cancer', *Clinical genetics*, 81: 303-11.

Maeda, Kazuya, Kazuyuki Kawakami, Yoshinori Ishida, Kaname Ishiguro, Kenji Omura, and Go Watanabe. 2003. 'Hypermethylation of the CDKN2A gene in colorectal cancer is associated with shorter survival', *Oncology reports*, 10: 935-38.

Mir, Manzoor Ahmad, and Ulfat Jan. 2023. 'Cdk4/Cdk6 dysregulation in Estrogen-Positive receptor breast cancers.' in, *therapeutic potential of cell cycle kinases in breast cancer* (Springer).

Nosaka, Kisato, Michiyuki Maeda, Sadahiro Tamiya, Tatsunori Sakai, Hiroaki Mitsuya, and Masao Matsuoka. 2000. 'Increasing methylation of the CDKN2A gene is associated with the progression of adult T-cell leukemia', *Cancer research*, 60: 1043-48.

Pacini, Furio, and Leslie J DeGroot. 2013. 'Thyroid cancer', *Endotext [Internet]*.

Parangi, Sareh, and Roy Phitayakorn. 2010. *Thyroid disease* (Bloomsbury Publishing USA).

Pellegriti, Gabriella, Francesco Frasca, Concetto Regalbuto, Sebastiano Squatrito, and Riccardo Vigneri. 2013. 'Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors', *Journal of cancer epidemiology*, 2013: 965212.

Pizzato, Margherita, Mengmeng Li, Jerome Vignat, Mathieu Laversanne, Deependra Singh, Carlo La Vecchia, and Salvatore Vaccarella. 2022. 'The epidemiological landscape of thyroid cancer worldwide: GLOBOCAN estimates for incidence and mortality rates in 2020', *The lancet Diabetes & endocrinology*, 10: 264-72.

Rahimzadeh, S. 2023. 'Spatio-temporal modelling of breast cancer incidence between 2000 and 2021 at sub-national levels in Iran: Bayesian disease mapping', 88wwz.

Yoon, Jung Hwan, Won Suk Choi, Olga Kim, and Won Sang Park. 'The role of gastrokeine 1 in gastric cancer', *Journal of gastric cancer*, 14: 147-55.

