

Original Article**Evaluation of Expression Levels of Micro-RNA-378, Micro-RNA -103, and Micro-RNA-497 in Melanoma**Faria Aslani[✉], Zohreh Abdolrahimi[✉], Shahram Gasembaglou^{*✉}

Department of Ear, Nose, and Throat Diseases, Imam Reza Hospital, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

ARTICLE INFO**Article History:**Received: 3 Apr 2023
Accepted: 13 Jun 2023
ePublished: 24 Apr 2024**Keywords:**

- miR-497
- miR-378
- miR-103
- Melanoma

Abstract**Background.** The aim of this study was to investigate the relative changes in the expression levels of these genes in melanoma tumor samples.**Methods.** During this study, 40 tumor samples and 40 samples of marginal tissue around the tumor were collected as control samples. After collecting RNA, the samples were extracted and the expression of the desired gene was evaluated using real-time polymerase chain reaction. Differences in the expression levels of the three groups were assessed by appropriate statistical tests. In statistical tests, $P < 0.05$ was considered significant.**Results.** The expression level of all three genes in the tumor samples was significantly different from marginal samples. In addition, the genes were significantly associated with patients' clinical features such as metastasis and lymph node involvement.**Conclusion.** Our findings revealed that microRNA expression can be used as a pathological biomarker in melanoma. However, it is better to perform more research in this regard among different communities with larger sample sizes.**Practical Implications.** This biomarker is effective in the early diagnosis of melanoma, causing higher survival rates in patients.**How to cite this article:** Aslani F, Abdolrahimi Z, Gasembaglou Sh. Evaluation of Expression Levels of Micro-RNA-378, Micro-RNA -103, and Micro-RNA-497 in Melanoma. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2024;46(2):. doi: 10.34172/mj.2024.022. Persian.**Extended Abstract****Background**

Cutaneous melanoma is one of the deadliest cancers in young adults. This disease spreads quickly and is highly aggressive. The average survival time of patients with metastatic melanoma is only 6–10 months. Less than 10% of them can live for five years. However, no significant improvement has been observed in the survival of these patients over the past few decades. Similar to other cancers, in addition to environmental factors, genetic factors can be involved in this disease as well. Less than one-fifth of early diagnosed melanomas become

metastatic. Cranial metastases are common in patients with metastatic melanoma. Metastasis to the liver, bones, abdomen, or distant lymph nodes is the most common type of melanoma metastasis. A large group of small non-coding RNAs with a length of 1825 nucleotides are microRNAs, which can act as oncogenes or tumor suppressors. Genetics can pave the way for a better understanding of the mechanisms that cause this disease and its treatment. The lack of examination of the expression of these genes in melanoma, as well as the importance of their role in tumorigenesis has prompted us to examine the

*Corresponding author; Email: shahramGasembaglou@yahoo.com

© 2024 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

expression level of these genes in melanoma cancer samples and their possible relationship with the clinical findings of patients. This study aimed to better understand the pathogenesis of melanoma.

Methods

This case-control study examined 100 samples (50 tumor samples and 50 healthy margin samples). Patients participated in the study after receiving a consent form from them or their guardians. On the other hand, patients who had a history of chemotherapy, radiotherapy, or drugs that could interfere with target gene expression, suffered from any other type of malignancy, or were unwilling to cooperate were excluded from the study. Before implementing all the steps, the plan was reviewed and approved in terms of medical ethics by the Ethics Committee of Tabriz University of Medical Sciences (Code of ethics: IR.TBZMED.REC.1400.443). People were assured of data confidentiality, and the results were presented without mentioning people's details. Sampling was completed from 2016 to 2019. During this time, the samples were stored in a nitrogen tank at a temperature of -70 degrees Celsius.

Two tissue samples were taken from each person by the surgeon. A part of the fresh sample was sent to the laboratory in a sterile Eppendorf tube containing a solution of RNase Later (Qiagen®). In the laboratory, first, the desired samples were homogenized for RNA extraction. The RNAs were extracted, and cDNA synthesis was initiated to ensure the correct synthesis using a real-time polymerase chain reaction. The standard curve slope was used to evaluate each gene's efficiency. The standard curve for each gene was calculated using the cycle threshold (Ct). A standard curve obtained using Ct was determined from serial dilutions of target gene products versus logarithmic concentrations of cDNA. Then, the results of the expression of each gene (the expression ratio) in two tumor tissues and margins were analyzed by GraphPad Prism (version 6) in order to study gene expression levels in tumor samples and tumor margins based on the Unpaired T-TEST program. Spearman's correlation coefficient was utilized to

check the relationship between the two genes. A *P*-value was calculated for all relationships, and *P*<0.05 was considered statistically significant.

Results

Expression changes and biomarker analysis of miR-378 were performed in tumor samples and healthy tissues. The expression of miR-378 in melanoma samples was significantly lower compared to healthy samples (*P* = 0.0022). Moreover, receiver operating characteristic (ROC) analysis demonstrated that this gene can be used as a suitable diagnostic tool, with an area under the curve of 0.63% and a *P*-value of 0.0027 (Figure 1). Additionally, the expression level of this gene was associated with metastasis and lymph node involvement. There was a significant decrease in miR-497 expression in cancer samples compared to healthy samples (*P* = 0.0002). ROC analysis showed that this gene, with an area under the graph of 0.71% and a *P*-value of 0.0002, can be employed as a suitable parameter (Figure 2-A). In addition, the expression level of this microRNA was related to metastasis and lymph node involvement. Changes in miR-103 expression in cancer samples, compared to healthy samples, represented a significant increase (*P* = 0.0026). The ROC analysis revealed that this gene can be utilized as a suitable diagnostic indicator with an area under the curve of 0.67% and a *P* of 0.0003 (Figure 2-B). Furthermore, the expression level of this gene was associated with metastasis and lymph node involvement.

Conclusion

Based on the results of this study, the expression level of miR-497 was reduced in tumor cells compared to healthy tissues, and studies conducted on miR-378 confirmed the role of tumor and reduced expression in cancer samples in comparison to healthy samples and its relationship with the rate of metastasis. In line with previous studies, the expression level of miR-378 in tumor cells was decreased compared to healthy tissues, and changes in miR-103 expression in cancer samples were noticeable compared to healthy samples.

ارزیابی میزان بیان میکرورنا-۳۷۸ و میکرورنا-۱۰۳ و میکرورنا-۴۹۷ در ملانوما

فریا اصلانی^{۱*}، زهره عبدالرحیمی^{۲*}، شهرام قاسم بگلو^{۳*}

گروه گوش و حلق و بینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۱۴
پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۲۳
انتشار برخط: ۱۴۰۳/۲/۰۵

کلید واژه‌ها:

- miR-۴۹۷
- miR-۳۷۸
- miR-۱۰۳
- ملانوما

چکیده

زمینه. هدف از این مطالعه، بررسی تغییرات نسبی در سطح بیان نمونه‌های میکرورنا-۳۷۸ و میکرورنا-۱۰۳ و میکرورنا-۴۹۷ در تومور ملانوما است.

روش کار. ۴۰ نمونه از تومور و ۴۰ نمونه از بافت حاشیه‌ای سالم اطراف تومور به‌عنوان نمونه کنترل در این مطالعه جمع‌آوری شد. پس از جمع‌آوری نمونه‌ها، RNAها استخراج و بیان ژن‌های مورد نظر با استفاده از روش Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. تفاوت در سطح بیان این سه گروه با آزمون‌های آماری مناسب ارزیابی شد و $P < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها. سطح بیان هر سه ژن در نمونه‌های تومور با نمونه‌های حاشیه سالم تفاوت معنی‌داری داشت. همچنین، ژن‌ها به‌طور قابل توجهی با ویژگی‌های بالینی بیماران مانند متاستاز و درگیری غدد لنفاوی مرتبط بودند.

نتیجه‌گیری. یافته‌های ما نشان داد که میکرو RNAهای مورد بررسی می‌توانند به‌عنوان بیومارکر پاتولوژیک در ملانوما مورد استفاده قرار گیرند. با این حال، انجام تحقیقات بیشتر در جوامع مختلف با حجم نمونه بزرگتر لازم است.

پیامدهای عملی. بیومارکرهای مورد بررسی در تشخیص زود هنگام ملانوما مؤثر هستند و در نتیجه با تشخیص زود هنگام باعث بقای بهتر در بیماران می‌شوند.

مقدمه

از تابش مصنوعی دستگاه‌های سولاریوم منشا گیرند^۱. تشخیص قطعی این بیماری با نمونه‌برداری و معاینات پاتولوژیک انجام می‌شود^۲. علائم اولیه ملانوما تغییر در شکل یا رنگ خال‌های موجود و ظاهر شدن یک خال یا توده جدید در هر نقطه از پوست است. در استیج‌های بعدی، این خال‌ها ممکن است خارش، زخم یا خونریزی داشته باشند. حاشیه‌های نامتقارن، شکل نامنظم، رنگ‌های مختلف و قطرهای بیشتر از ۶ میلی‌متر نشانگرهای تشخیصی این بیماری هستند^۳. ملانوما متاستاتیک ممکن است علائم پارائتوپلاستیک غیراختصاصی از جمله از دست دادن اشتها، حالت تهوع، استفراغ و خستگی ایجاد کند. متاستاز در ملانوما نسبتاً نادر است، کمتر از یک پنجم ملانوماهایی که زود تشخیص داده می‌شوند متاستاتیک می‌شوند. متاستاز به کبد، استخوان‌ها، شکم یا غدد لنفاوی دور، شایع‌ترین نوع متاستاز ملانوما است. متاستاز به جمجمه در بیماران مبتلا به ملانوما متاستاتیک شایع است^۴. علاوه بر عوامل محیطی، عوامل ژنتیکی نیز می‌توانند در بروز این بیماری دخیل باشند؛ مانند اختلال ژنتیکی

یکی از کشنده‌ترین سرطان‌ها در جوانان ملانوم پوستی است. این بیماری به سرعت گسترش می‌یابد و بسیار تهاجمی است^۱. این بیماری در هر دو جنس از شیوع یکسانی برخوردار است. با این حال، در اکثر موارد در درجه اول می‌تواند پوست ناحیه پا در زنان و پوست ناحیه پشت در مردان را تحت تأثیر قرار دهد. از دیدگاه اپیدمیولوژیک، بیشترین شیوع این بیماری مربوط به کشورهای استرالیا و ایالات متحده آمریکا می‌باشد^۲. متوسط زمان بقای بیماران مبتلا به ملانوما متاستاتیک تنها ۶ تا ۱۰ ماه است. کمتر از ۱۰ درصد آنها می‌توانند پنج سال زندگی کنند. در طول چند دهه گذشته بهبود قابل توجهی در بقای این بیماران مشاهده نشده است^۳. ملانوما خطرناک‌ترین نوع سرطان پوست است. در سال ۲۰۱۲، بروز جهانی آن ۲۳۲۰۰۰ نفر بود. ۳/۱ میلیون نفر در سال ۲۰۱۵ بیماری فعال داشتند که منجر به مرگ ۵۹۸۰۰ نفر شد^۴. اولین عامل خطر این بیماری قرار گرفتن در معرض اشعه یونیزان به ویژه اشعه ماوراء بنفش است که منجر به آسیب DNA در سلول‌های پوست می‌شود. این اشعه‌ها می‌توانند از منابع طبیعی مانند خورشید و یا

* نویسنده مسؤول؛ ایمیل: shahramgasembaglou@yahoo.com

آزمایشگاه فرستاده شد. در آزمایشگاه نمونه‌های مورد نظر برای استخراج RNA همگن شدند. ابتدا حدود ۱۰۰ میکروگرم از بافت‌ها جداسازی شد. ۸۰۰ میکرولیتر Trizol Reagent (ROCHE®) اضافه گردید و محصول بدست آمده به صورت کامل توسط یک خردکن همگن شد. بعد از همگن‌سازی، محلول حاصل در یخ برای ۱۰ الی ۱۵ دقیقه اینکوبه شد. حدود ۳۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه گردید و در یخ به مدت ۱۰ دقیقه اینکوبه شد. مخلوط دوباره همگن‌سازی شد و در یخ برای ۱۰ الی ۱۵ دقیقه اینکوبه شد. سپس تیوب در سانتیفریوژ یخچالی (SIGMA®) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتیفریوژ شد. پس از سانتیفریوژ، محلول داخل لوله در ۳ فاز ظاهر شد. فاز بالایی آبی شفاف حاوی RNA، فاز میانی سفید بود و فاز پایین میکرولوله قرمز حاوی پروتئین و DNA (مواد آلی) بود. RNA به یک میکرولوله جدید انتقال یافت. ۱ میلی‌لیتر ایزوپروپانول در دمای ۲۴- درجه به آن اضافه شد. میکروتیوب به مدت ۴۵ الی ۶۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. لوله به مدت ۱۰ الی ۲۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، برای رسوب RNA به شکل صفحه سفید در کف میکروتیوب، سانتیفریوژ شد. ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به میکروتیوب اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ الی ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتیفریوژ شد. محلول رویی (مایع و الکل) برداشته شد و مرحله شستشو با اتانول ۷۵ درصد تکرار شد تا نتیجه مطلوب‌تری حاصل شود. اتانول خارج شد و پلیت به مدت ۲۰ دقیقه در هوا خشک شد. حدود ۲۰ میکرولیتر محلول Depc water (cinagene®) اضافه شد و لوله به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه Dry Bath در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در این مدت، لوله‌ها چندین بار تکان داده شدند تا رسوب و RNA در آب حل شود. در نهایت لوله‌ها به فریزر ۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. برای اندازه‌گیری غلظت، ۲ میکرولیتر از RNA استخراج شده را در دستگاه NanoDrop قرار دادیم و شکل غلظت RNA را به دست آوردیم. نسبت جذب RNA استخراج شده در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ به عنوان شاخص خلوص RNA در نظر گرفته می‌شود. با افزودن آب DEPS غلظت نهایی RNA در نمونه‌ها به ۲ الی ۳ میکروگرم بر میکرولیتر رسید. حجم نهایی مخلوط آب و RNA معادل ۸/۵ میکرولیتر بود که به آن ۱ میکرولیتر پرایمر Randomhexmer و ۵/۰ میکرولیتر پرایمر Oligodt اضافه شد. در نهایت ۱۰ میکرولیتر از بافر PrimeScript اضافه کردیم و حجم کل محلول به ۲۰ میکرولیتر رسید. برای این منظور از دستگاه ترموسایکلر (BIORAD®) در

آگزودرمپیگمانتاسیون که خطر ابتلا به ملانوما را افزایش می‌دهد. ژنتیک می‌تواند برای درک بهتر مکانیسم‌های ایجادکننده این بیماری و درمان آن به کار رود.^{۹،۸} گروه بزرگی از RNAهای کوچک غیر کد کننده با طول ۱۸-۲۵ نوکلئوتید وجود دارند که نام آن‌ها microRNA است. این miRNAها ابتدا از مناطق بین ژنی یا درون ژنی توسط RNA پلیمراز II رونویسی می‌شوند. پس از بلوغ، آنها به توالی مکمل خود در ناحیه ۳' UTR mRNA هدف متصل می‌شوند یا باعث تخریب آن mRNA می‌شوند. این RNAها می‌توانند فرآیند ترجمه را مختل کنند. بسته به ژن هدف خود، این miRNAها می‌توانند به عنوان انکوژن یا سرکوبگر تومور عمل کنند.^{۱۰-۱۲} مطالعات اخیر نشان داده است که الگوی بیان miRNAها می‌تواند سرطان‌های مختلف مانند ریه، پروستات، سینه، تخمدان، روده بزرگ و کبد را با دقت زیادی شناسایی کند.^{۱۳،۱۴} با توجه به اینکه بیان این ژن‌ها در ملانوما مورد بررسی قرار نگرفته است و همچنین با توجه به اهمیت و نقش آن‌ها در تومورزایی، مطالعه حاضر با هدف بررسی سطح بیان این ژن‌ها در نمونه‌های سرطان ملانوما و ارتباط احتمالی آن‌ها با یافته‌های بالینی بیماران، برای درک بهتر پاتوژنز ملانوما، طراحی و اجرا گردید.

روش کار

مطالعه مورد-شاهدی حاضر، ۱۰۰ نمونه (۵۰ نمونه تومور و ۵۰ نمونه با حاشیه سالم) را مورد بررسی قرار داد. یک متخصص پوست ابتدا نمونه‌های مبتلا به این بیماری را تشخیص داد. پس از تأیید بیماری توسط پاتولوژیست، بیماران به جراح گوش، حلق و بینی ارجاع داده شدند. بیمارانی که رضایت‌نامه آنها توسط خودشان یا سرپرست آنها امضا شده بود در مطالعه شرکت کردند. بیمارانی که سابقه شیمی‌درمانی، رادیوتراپی، یا مصرف داروهایی که می‌توانند با بیان ژن هدف تداخل داشته باشند، از هر نوع بدخیمی دیگر رنج می‌برند یا تمایلی به همکاری نداشتند، از مطالعه حذف شدند. قبل از انجام کلیه مراحل، کلیات طرح از نظر اخلاق پزشکی توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز بررسی و با کد اخلاق IR.TBZMED.REC1400/443 تصویب شد. رضایت کتبی از همه افراد اخذ شد. به مشارکت‌کنندگان اطمینان داده شد که اطلاعات آنها محرمانه بوده و نتایج بدون ذکر مشخصات آنها ارائه می‌شود. نمونه‌برداری از سال ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۸ انجام شد و در این مدت نمونه‌ها در مخزن نیتروژن در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جراح از هر فرد شرکت‌کننده در مطالعه دو نمونه بافت تهیه کرد. بخشی از نمونه تازه گرفته شده در یک لوله Epidhroff استریل حاوی محلول RNase (Qiagen®) Later به

۵۰ نمونه موجود، ۱۰ نمونه به دلیل نداشتن اطلاعات لازم از مطالعه حذف شدند و نتایج ۴۰ بیمار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نمونه‌های بافت در بیمارستان امام رضا توسط جراح طرح و زیر نظر متخصصان مربوطه جمع‌آوری شد. نمونه‌ای از حاشیه از افراد به عنوان گروه کنترل جمع‌آوری شد. اطلاعات بالینی آسیب‌شناسی بیماران در جدول زیر قابل مشاهده است (جدول ۱).

جدول ۱. اطلاعات جمعیت‌شناختی و آسیب‌شناسی بالینی

متغیر	فراوانی (درصد)
سن	≥ ۵۰ سال (۳۷/۱۵٪)
	< ۵۰ سال (۶۲/۲۵٪)
جنسیت	مرد (۵۵٪) ۲۲
	زن (۴۵٪) ۱۸
درگیری گره لنفی	مثبت (۴۲/۱۷٪) ۱۷
	منفی (۵۷/۲۳٪) ۲۳
محل	سر و گردن (۳۷/۱۵٪) ۱۵
	پا (۳۰٪) ۱۲
مرحله (استیج)	دست (۳۲/۱۳٪) ۱۳
	II (۴۲/۱۸٪) ۱۸
	III (۴۵/۱۹٪) ۱۹
	IV (۱۱/۵٪) ۵
متاستاز	مثبت (۲۰٪) ۸
	منفی (۸۰٪) ۳۲

تجزیه و تحلیل تغییرات بیان بیومارکر miR-۳۷۸ در نمونه‌های تومور و حاشیه سالم انجام شد. بیان miR-۳۷۸ در نمونه‌های ملانوما به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه‌های سالم کاهش یافته بود ($P=0/0022$). همچنین، تجزیه و تحلیل مشخصه عملکرد گیرنده (ROC) نشان داد که این ژن می‌تواند به‌عنوان یک شاخص تشخیصی مناسب با سطح زیر شکل ۶۳٪ درصد و $P=0/0027$ (شکل ۱) استفاده شود. میزان بیان این ژن با متاستاز و درگیری غدد لنفاوی مرتبط بود. کاهش معنی‌داری در بیان ژن ۴۹۷-miR در نمونه‌های سرطانی نسبت به نمونه‌های سالم مشاهده شد. تجزیه و تحلیل ROC نشان داد که این ژن با سطح زیر شکل ۷۱٪ درصد و $P=0/0002$ می‌تواند به‌عنوان یک شاخص تشخیصی مناسب استفاده شود (شکل ۲-A). تغییرات بیان ژن miR-۱۰۳ در نمونه‌های سرطانی نسبت به نمونه‌های سالم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P=0/0026$). تجزیه و تحلیل ROC نشان داد که این ژن می‌تواند به‌عنوان یک شاخص تشخیصی مناسب با سطح زیر شکل ۶۷٪ درصد و $P=0/0003$ استفاده شود (شکل ۲-B). میزان بیان این ژن‌ها با متاستاز و درگیری غدد لنفاوی مرتبط بود. سطح بیان نسبی هر سه ژن مورد مطالعه در نمونه‌های بیمار نسبت به بافت سالم تغییرات معنی‌داری داشت. همچنین هر سه

شرایط دمایی خاص دستگاه استفاده شد. برای اطمینان از سنتز صحیح cDNA، Real-time PCR انجام شد (Real-time PCR (®) میکرولیتر ۳/۵، LightCycler 96، Roche) ۵ میکرولیتر آب، ۱ میکرولیتر Cybergreen، ۴ پیکومول (پیکومول) پرایمر اختصاصی ژن TMPO-AS۱ به غلظت ۱۰ میکرولیتر cDNA رقیق شده و ۵/۰ میکرولیتر داخل دستگاه Real-time PCR قرار داده شدند. غلظت ۱۰ پیکومول پرایمر مورد نیاز است و پرایمرها عمدتاً به‌صورت لیوفیلیزه (Freeze-drying) هستند که با افزودن مقدار معینی آب به غلظت ۱۰۰ پیکومول رسید. از این محلول، محلولی به غلظت ۱۰ پیکومول به روش رقیق‌سازی تهیه و به‌عنوان محلول اصلی استفاده شد. شیب منحنی استاندارد برای ارزیابی کارایی هر ژن استفاده شد که منحنی استاندارد برای هر ژن با استفاده از آستانه چرخه (Ct) محاسبه شده است. منحنی استاندارد به دست آمده با استفاده از Ct از رقت‌های پی در پی محصولات ژن هدف در مقابل غلظت لگاریتمی cDNA محاسبه شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، ابتدا دلتا Ct ژن در هر نمونه از تفاوت بین Ct ژن هدف و ژن GAPDH به‌عنوان ژن مرجع محاسبه شد. بیان ژن‌ها در حالت پایه نیز در مقایسه با ژن‌های مرجع با فرمول $2^{-\Delta CT}$ مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. سپس نتایج نهایی بیان هر ژن (نسبت بیان) در دو بافت و حاشیه تومور توسط نرم‌افزار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای بررسی و محاسبه بیان ژن هدف و ژن خانه‌بان (Housekeeping gene) و به دست آوردن نسبت آن‌ها از فرمول زیر و بر اساس بازده و تفاوت در Ct استفاده کردیم:

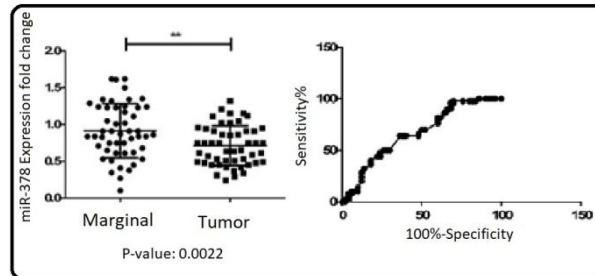
$$\begin{aligned} \text{ژن خانه‌بان (تومور)} - \text{Ct} - \text{ژن هدف (تومور)} &= \Delta CT \\ \text{ژن خانه‌بان (حاشیه)} - \text{Ct} - \text{ژن هدف (حاشیه)} &= \Delta CT \\ \text{نسبت بیان} &= 2^{-\Delta CT} \end{aligned}$$

برای ارزیابی داده‌های سطح بیان این ژن‌ها در نمونه‌های تومور و حاشیه تومور از نرم‌افزار Graphpad Prism نسخه ۶ استفاده شد و اساس تحلیل بر روی T-TEST جفت نشده بود. برای بررسی رابطه بین دو ژن از ضریب همبستگی اسپیرمن استفاده شد. P-value برای همه روابط محاسبه شد و مقدار کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

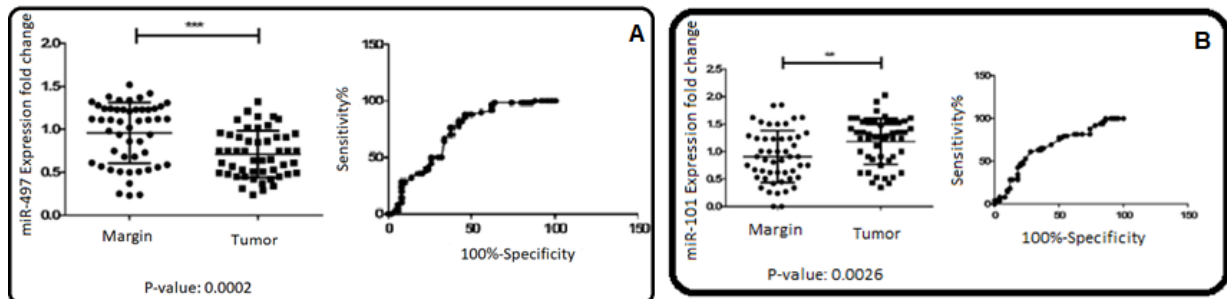
یافته‌ها

صد نمونه بافت (شامل ۵۰ نمونه تومور و ۵۰ نمونه حاشیه سالم) از ۵۰ بیمار جمع‌آوری و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از

ژن با متاستاز و درگیری غدد لنفاوی مرتبط بودند. ارتباط سن، جنس، درگیری غدد لنفاوی و متاستاز با بیان ژن در جدول زیر نشان داده شده است (جدول ۲).



شکل ۱. تغییرات بیان و تجزیه و تحلیل بیومارکر miR-۳۷۸



شکل ۲. تغییرات بیان و تجزیه و تحلیل بیومارکر miR-۴۹۷ (A) و تغییرات بیان و تجزیه و تحلیل بیومارکر miR-۱۰۳ (B)

جدول ۲. ارتباط سن، جنس، درگیری غدد لنفاوی و متاستاز با بیان ژن

متغیر	P
سن	miR-۳۷۸ / ۰/۰۶۷۸
	miR-۱۰۳ / ۰/۰۹۲
	miR-۴۹۷ / ۰/۰۸۳
جنسیت	miR-۳۷۸ / ۰/۰۹۳
	miR-۱۰۳ / ۰/۰۸۷
	miR-۴۹۷ / ۰/۰۹۲
متاستاز	miR-۳۷۸ * / ۰/۰۰۳
	miR-۱۰۳ * / ۰/۰۱۷
	miR-۴۹۷ * / ۰/۰۲۹
درگیری گره لنفوی	miR-۳۷۸ * / ۰/۰۰۴۱
	miR-۱۰۳ * / ۰/۰۳۸
	miR-۴۹۷ * / ۰/۰۱۴

$P < ۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

بحث

ملانوما یکی از بدخیمی‌های نسبتاً شایع در ناحیه پوست با منشاء ملانوسیت‌ها است^۱. مانند سایر سرطان‌ها، عوامل محیطی و ژنتیکی می‌توانند در بروز این بیماری دخیل باشند. اعتقاد بر این است که بررسی عوامل ژنتیکی می‌تواند به درک

بهرتر مکانیسم‌های ایجاد و در نتیجه درمان مؤثرتر منجر شود.^{۱۵} تلاش بر این است که بتوان از miRNA علاوه بر تشخیص و طبقه‌بندی سرطان‌ها، در درمان آن‌ها نیز استفاده کرد. MicroRNAها (miRNAها) ژن‌های درون‌زا غیر کد کننده هستند

ژن‌ها در پاسخ به درمان‌های دارویی را می‌توان در داخل بدن آزمایش کرد.

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر، بیان miR-103 در نمونه بیماران مبتلا به ملانوما نسبت به بافت حاشیه افزایش معنی‌داری در بیان داشت، در حالی که بیان دو ژن دیگر miR-378 و miR-497 در نمونه‌های تومور کاهش قابل توجهی داشته است. از طرفی بیان هر سه ژن با متاستاز و درگیری غدد لنفاوی ارتباط معنی‌داری داشت و می‌توان گفت که این سه ژن می‌توانند به عنوان بیومارکرهای تشخیصی مورد استفاده قرار گیرند. با این حال، برای تأیید این ادعا به مطالعات بیشتری نیاز است.

قدردانی

تیم نویسندگان از تمامی کسانی که در تسهیل انجام پژوهش حاضر نقش داشتند؛ کمال تشکر را دارد.

مشارکت پدیدآوران

فریا اصلائی در طراحی و ایده‌پردازی، زهره عبدالرحیمی در تهیه پیش‌نویس و نقد و بررسی مطالعه و شهرام قاسم‌بگلو در تحلیل و تفسیر داده‌ها شرکت داشتند.

منابع مالی

این مطالعه به‌صورت خودکفا (Self-fund) صورت گرفته است.

دسترس‌پذیری داده‌ها

داده‌های ایجاد شده در مطالعه فعلی در صورت درخواست معقول از نویسنده مسؤول ارایه می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

کلیه ملاحظات اخلاقی در مطالعه رعایت شد و کد اخلاق مطالعه IR.TBZMED.REC.1400.915 است.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع وجود ندارد.

و با بیان خاص خود در بافت، به کنترل دقیق فرآیندهای بیولوژیکی مختلف کمک می‌کنند.^{۱۳} اختلال در عملکرد miRNAها در سرطان‌های مختلف یافت شده است. بیان درون miRNA را می‌توان در طبقه‌بندی انواع سرطان استفاده کرد.^{۱۴} چندین miRNA که بیان بالایی را در بافت سرطانی نشان می‌دهند به‌عنوان نشانگرهای تشخیصی مناسب یا نشانگرهای پیش‌آگهی گزارش شده‌اند.^{۱۵} در مطالعه دیگری، محققان نشان دادند که افزایش بیان miR-103 ارتباط نزدیکی با متغیرهای بالینی دارد. کاهش بیان miR-103 با هدف قرار دادن LTAS2 از تکثیر، تهاجم و مهاجرت سلول‌های سرطانی در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری می‌کند. این یافته با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مطابقت دارد و بر نقش انکوژنیک miR-103 تأکید دارد.^{۱۸} در مطالعات انجام شده، معمولاً miR-497 در نمونه‌های تومور نسبت به نمونه‌های سالم بیان کمتری دارد. القای بیان این میکرو RNA به‌طور کلی با افزایش آپوپتوز در سلول‌های سرطانی و کاهش متاستاز در این سلول‌ها همراه است. در نتایج این مطالعه مانند مطالعات انجام شده، میزان بیان miR-497 در بافت‌های تومور نسبت به بافت‌های سالم کاهش یافته است.^{۱۹} مطالعات انجام شده بر روی miR-378 نقش سرکوب‌کننده تومور و کاهش بیان آن در نمونه‌های تومور در مقایسه با نمونه‌های سالم و همچنین ارتباط آن با میزان متاستاز را ثابت کرده است. در مطالعه حاضر، مطابق با مطالعات قبلی، سطح بیان miR-378 در بافت‌های تومور نسبت به بافت سالم کاهش یافته است.^{۲۰} تغییرات میکرو RNAها در طول فرآیند بدخیمی می‌تواند مبنای طراحی روش‌های جدید و مؤثر برای پیشگیری از پیشرفت سرطان در بیمارانی باشد که به موقع تشخیص داده شده‌اند. این مولکول‌ها می‌توانند به‌عنوان اهداف جدیدی برای استراتژی‌های درمانی مورد استفاده قرار گیرند. به‌طور کلی نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر با مطالعات قبلی مطابقت و همخوانی دارد و نشان می‌دهد که micro-RNA می‌تواند به‌عنوان نشانگر زیستی در تشخیص ملانوما مورد استفاده قرار گیرد. در مطالعات آتی، پیشنهاد می‌شود که سطح تغییرات بیان ژن‌ها در نمونه‌های بیشتری در نظر گرفته شود. تجزیه و تحلیل تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه در سایر بافت‌های تومور قابل بررسی است. استفاده از روش‌های دیگری را می‌توان برای کشف مکانیسم عمل این مولکول‌ها در فرآیند سرطان‌زایی پیشنهاد کرد و تغییرات این

References

1. Eggermont AM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. *The Lancet*. 2014;383(9919):816-27. doi: 10.1016/s0140-6736(13)60802-8
2. Goldstein BG, Goldstein AO. Diagnosis and management of malignant melanoma. *Am Fam Physician*. 2001;63(7):1359-68, 1374.
3. Sandru A, Voinea S, Panaitescu E, Blidaru A. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. *J Med Life*. 2014;7(4):572-6.
4. Vos T, Allen C, Arora M. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The lancet*. 2016;388(10053):1545-1602. doi: 10.3410/f.731220.250.793569875
5. Kanavy HE, Gerstenblith MR. Ultraviolet radiation and melanoma. *Semin Cutan Med Surg*. 2011;30(4):222-8. doi: 10.1016/j.sder.2011.08.003.
6. Wang H, Naghavi M, Allen C. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The lancet*. 2016;388:1459-544. doi: 10.1016/s0140-6736(14)61682-2
7. Austoker J. Cancer Prevention in Primary Care: Melanoma: prevention and early diagnosis. *Bmj*. 1994;308:1682-6. doi: 10.1136/bmj.308.6945.1682
8. Fidler IJ. Critical determinants of melanoma metastasis. In: *The Journal of Investigative dermatology. Symposium Proceedings*. 1996;1(2):203-8.
9. Garbe C, Krüger S, Orfanos CE. Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *Journal of investigative dermatology*. 1994;102(5):695-9. doi: 10.1111/1523-1747.ep12374280
10. Li C, Feng Y, Coukos G, Zhang L. Therapeutic microRNA strategies in human cancer. *Aaps j*. Dec 2009;11(4):747-57. doi: 10.1208/s12248-009-9145-9
11. Redova M, Poprach A, Nekvindova J, Iliev R, Radova L, Lakomy R, et al. Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *Journal of translational medicine*. 2012;10(1):1-8. doi: 10.1186/1479-5876-10-55
12. Lee DY, Deng Z, Wang CH, Yang BB. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(51):20350-5. doi: 10.1073/pnas.0706901104
13. Scapoli L, Palmieri A, Muzio LL, Pezzetti F, Rubini C, Girardi A, et al. MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2010;23(4):1229-34. doi: 10.1177/039463201002300427
14. Esquela K, Slack J. Oncomirs miRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:259-569. doi: 10.1038/nrc1840
15. Kumar AB, Peters MS, Jakub JW, Harmsen W, Baum CL. Primary cutaneous melanoma features predict development of in-transit metastases/satellite lesions: Mayo Clinic experience, 2010 to 2014. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2023;88(2):455-7. doi: 10.1016/j.jaad.2022.06.010
16. Bracken CP, Scott HS, Goodall GJ. A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer. *Nature Reviews Genetics*. 2016;17(12):719-32. doi: 10.1038/nrg.2016.134
17. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer science*. 2010;101(10):2087-92. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01650.x
18. Shivapurkar N, Weiner LM, Marshall JL, Madhavan S, Deslattes Mays A, Juhl H, et al. Recurrence of early stage colon cancer predicted by expression pattern of circulating microRNAs. *PloS one*. 2014;9(1):84686. doi: 10.1371/journal.pone.0084686
19. Lajer CB, Garnaes E, Friis-Hansen L, Norrild B, Therkildsen MH, Glud M, et al. The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers: bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer. *British journal of cancer*. 2012;106(9):1526-34. doi: 10.1038/bjc.2012.109
20. Eichner LJ, Perry MC, Dufour CR, Bertos N, Park M, St-Pierre J, et al. miR-378* mediates metabolic shift in breast cancer cells via the PGC-1 β /ERR γ transcriptional pathway. *Cell metabolism*. 2010;12(4):352-61. doi: 10.1016/j.cmet.2010.09.002