مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری
دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱
صفحات ۲۳۴- ۲۱۴

Online ISSN: ٤٤٩٣-٢٤٧٦
Print ISSN: ٢٠٢٠-٢٥٣٨
www.irijournals.com

ارزیابی بیان و ارتباط تنظیمی RNA اندوژنوس رقابتی MALAT1 و میکروRNAهای ترشحی miR-145 و miR-211 در میکرووزیکول‌های خارج سلولی سرمی کارسینومای پستان

ساناز سادات طباطبایی

کارشناسی ارشد رشته ژنتیک، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سرطان پستان یکی از متداول ترین بیماری های زنانه است. اخیرا به دلیل رشد تکنولوژی توالی‌گذاری نسل بعد، RNAهـای غیـر رمزی بزرگ توجه زیادی را به خود جلب کرده اند. ژن های RNAهای غیررمزی بـزرگ (lncRNA) جمعیـت مهمـی از RNA های غیررمزی با نقش های مهم و تعریف شده در رشد عادی و فرایند تومورژنسیس هستند. شواهد حاکی از آن است که آنها مـی توانند به صورت ژن های سرکوبگر تومور یا انکوژن ها مطابق با عملکرد و الگوی بیان شان در بافت‌های تومور تقسیم بنـدی شـوند. آن‌ها پلاستیسیته ی سلول های بنیادین سرطان را تنظیم می کنند. آن‌ها می توانند به عنـوان مـارکر بـرای کشـف و پـیش بینـی سرطان و به عنوان تارگت هایی برای درمان سرطان بکار روند. ما در این پژوهش، RNAهای غیر رمزی بزرگ بـا توجـه بـر نقـش های مولکولی چندگانه از RNA های تنظیمی و بزرگ غیررمزی را مورد مطالعه قرار دادیم که تکثیـر سـلولی، تهـاجم، متاسـتاز و آپوپتوسیس را تنظیم می کند. در این مطالعه پس از جداسازی میکرووزیکول هی خارج سلولی اگزوزومی و تعیین ماهیت آن ها بـه روش میکروسکوپ الکترونیِ نگاره، به بررسی الگوی بیانی میکـرو RNA هـای miR-211 و miR-145 در میکرووزیکـول هـای خارج سلولی اگزوزومی بیماران مبتلا به کارسینومای پستان در مقایسه با افراد سالم توسط روش Real-time PCR پرداخته شد. نتایج این مطالعه تنظیم کاهشی میکرو RNA های miR-211 و miR-145 را در نمونه های اگزوزومی تومـوری در مقایسـه بـا نمونه های نرمال نشان داد (P < 0/001***). همچنین تنظیم افزایشی lncRNA MALAT1 را در نمونه هـای تومـوری در مقایسه با نمونه های نرمال نشان داد که وجود یک ارتباط تنظیمی معکوس مـابین lncRNA MALAT1 بـا دو میکـرو RNA ترشحی miR-145 و miR-211 را نشان می دهد. همچنین به بررسـی سـطوح بیـان RNA طویـل غیرکدکننـده ی تنظیمـی

مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری
دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱
صفحات ۲۳۴- ۲۱۴

Online ISSN: ٤٤٩٣-٢٤٧٦
Print ISSN: ۲۰۲۰-۲۵۳۸
www.irijournals.com

MALAT1 و میکروRNAهای ترشحی miR-145 و miR-211 پرداختیم، دیده شد سطوح بیـانی lncRNA MALAT1 در بیماران Her-2 مثبت در مقایسه با بیماران با عدم بیان Her-2، بیان بالاتری را نشـان داد و در مقابـل دیـده شـد کـه سـطوح بیانی miR-211 در بیماران Her-2 positive نسبت به بیماران Her-2 negative کمتر است. تفـاوت سـطوح بیـانی RNA های طویل غیرکدکننده ی تنظیمی MALAT1 و میکروRNAهای ترشحی miR-145 و miR-211 در میکرووزیکـول هـای اگزوزومی بیماران مبتلا به کارسینومای پستان در مقایسه با نمونه های سالم و ارتبـاط آن هـا بـا برخـی شاخصـه هـای بـالینی یـا پاتولوژیکی بیماری می تواند بیان‌گر پتانسیل بیومارکر تشخیصی این non-coding RNA ها در کارسینومای پستان باشد.

کلمات کلیدی: کارسینومای پستان، میکروRNA، وزیکول های خارج سلولی، بیومارکر تشخیصی

۱-مقدمه

سرطان پستان شایع ترین سرطان و همچنین علت اولیه مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان در سراسر جهان است. حدود ۱,۳۸ میلیون مورد جدید سرطان پستان در سال ۲۰۰۸ تقریبا ۵۰٪ از کل بیماران مبتلا به سرطان پستان و تقریبا ۶۰٪ مرگ و میر رخ داده در کشورهای در حال توسعه تشخیص داده شد. تفاوت زیادی در نرخ بقای سرطان پستان در سراسر جهان, با برآورد بقای ۵ ساله ۸۰٪ در کشورهای توسعه یافته به زیر ۴۰٪ برای کشورهای در حال توسعه وجود دارد [Coleman M،۲۰۰۶]. کشورهای در حال توسعه با محدودیت های منابع و زیرساخت هایی مواجه هستند که هدف بهبود پیامدهای سرطان پستان را با شناسایی، تشخیص و مدیریت به موقع به چالش می کشیدند [Anderson B،۲۰۰۷]. در کشورهای توسعه یافته ای مانند آمریکا حدود ۲۳۲۳۴۰ زن تشخیص داده خواهد شد و مرگ ۳۹۶۲۰ زن به دلیل سرطان پستان در سال ۲۰۱۳ رخ خواهد داد [Siegel R Naishadham D،۲۰۱۳]. خطر مادام العمر ابتلا به سرطان پستان در یک زن آمریکایی ۱۲,۳۸٪ است [Siegel R Naishadham D،۲۰۱۳]. کاهش قابل توجهی در اخلاق ناشی از سرطان پستان در ایالات متحده از سال ۱۹۷۵ تا ۲۰۰۰ به افزایش مداوم در هر دو ماموگرافی غربالگری و مدیریت نسبت داده می‌شود [Berry D،۲۰۰۵].

به گفته سازمان بهداشت جهانی، افزایش نتیجه و بقای سرطان پستان با تشخیص زودهنگام همچنان پایه و اساس مقررات سرطان پستان است. داروهای مدرن مختلفی برای درمان سرطان پستان تجویز می شوند. درمان پزشکی سرطان پستان با آنتی استروژن‌هایی مانند را لوکسی فن یا تاموکسی فن ممکن است از سرطان پستان در افرادی که در افزایش امکان ابتلا به آن هستند اجتناب کنند [Peng J،۲۰۰۹]. جراحی هر دو پستان یک اقدام پیشگیرانه اضافه شده در برخی از افزایش احتمال ابتلا به سرطان در زن است. در بیمارانی که با تومور پستان شناسایی شده اند، از استراتژی های مختلف مدیریت مانند درمان هدفمند، هورمون درمانی، پرتودرمانی، جراحی و شیمی درمانی استفاده می‌شود. در افراد مبتلا به متاستاز دور، مدیریت ها به طور معمول با هدف افزایش کیفیت زندگی و میزان بقا هستند [Reeder J،۲۰۰۸]. عوارض جانبی ناخوشایند درمان سرطان پستان یکی از انگیزه بخش ترین عوامل برای پیدا کردن برخی از روش های جایگزین است. استفاده از گیاهان برای درمان بیماران مبتلا به سرطان پستان به عنوان یک جایگزین طبیعی در نظر گرفته شده است, زیرا برخی از گیاهان ممکن است حاوی خواصی باشند که به طور طبیعی توانایی درمان سرطان پستان را دارند [Abdull R،۲۰۱۳].

سرطان پستان همچنان تهدید قابل توجهی برای سلامت و سلامتی زنان در ایالات متحده است که ۳۰٪ از کل تشخیص های جدید سرطان و سالانه تقریبا ۴۱۰۰۰ مرگ و میر را به خود جای می دهد[Siegel RL،۲۰۱۷]. اگرچه پیشرفت در تشخیص و درمان زودهنگام منجر به کاهش ۳۸٪ میزان مرگ و میر سرطان پستان شده است، اما تقریبا تمام بیمارانی که به بیماری متاستاتیک مبتلا می شوند، به آن تسلیم خواهند شد. این داده های هوشیارکننده نیاز حیاتی به رویکردهای نوآورانه به درمان سرطان پستان را نشان می‌دهد که عود و مرگ ناشی از این بیماری را کاهش می دهد. در سال های اخیر تجمع داده ها از نقش کلیدی برای سیستم ایمنی بدن در تعیین هر دو پاسخ به درمان استاندارد و بقای طولانی مدت در بیماران مبتلا به سرطان پستان حمایت می‌کند [Savas P،۲۰۱۶]. هر دو این داده ها و موفقیت بالینی قابل توجه خصومت های بازرسی ایمنی در سراسر تومورهای جامد متعدد [Emens LA،۲۰۱۷] دوباره علاقه به استراتژی های مبتنی بر ایمنی برای درمان و پیشگیری از سرطان پستان را زیاد می‌کند[Cimino-Mathews A،۲۰۱۵].

ژنوم های یوکاریوت ها ممکن است چندین نوع RNAs از جمله mRNAs کد کننده پروتئین، RNAهای کوتاه و طولانی غیر کدگذاری (LncRNAs) را رونوشت کنند [Kapranov P،۲۰۰۷]. از این RNAs ها، مردم فهمیدند که RNAs های غیر کدنویسی بیشتری نسبت به کدگذاری RNAs در سلول‌های انسانی وجود دارد. بر اساس دانشنامه عناصر DNA

(ENCODE)، ۷۶٪ DNA ژنومیک انسان به RNA رونویسی می‌شود [Pennisi E،۲۰۱۲]. پروژه ژنوم انسان (HGP) نشان می‌دهد که تنها ۲٪ DNA ژنومیک به پروتئین [Lander ES،۲۰۰۱] ترجمه می‌شود کـه وجـود RNAsهـای غیـر کدگـذاری متعدد را آشکار می‌کند. در تحقیقات این سـال هـا RNAهـای کوتـاه غیـر کدگـذاری ماننـد میکـرو RNA هـا (miRNAهـا)، RNAهای مداخله کننده کوچک (siRNAs) و snoRNA ها به طور گسترده مورد مطالعـه قـرار گرفتـه انـد. در همـین حـال، LncRNAs در حال دریافت نگرانی های رو به رشد است. شواهد بیشتر و بیشتر نشان داده اند که LncRNAs به سـادگی بـه عنوان محصولات کناری ژنوم ها ظهور در نظر گرفته نمی‌شود، بلکه عملکردهای سلولی قطعی زیادی دارند که بسـیاری از آن‌هـا بـا بیماری های انسانی ارتباط دارند.

LncRNAs به طور کلی تعریف شده است که طولانی تر از ۲۰۰ هسته و هیچ قاب خواندن باز است کـه مـی توانـد بـه پـروتئین ترجمه شده است. پس از تجزیه و تحلیل آرایه های tiling ژنوم و توالی توان بالا از رونویسی، LncRNAs های متعددی کشـف شده است. در این تحلیل ها LncRNAsکشف شده است که ساختارها و خاستگاه های پیچیده ای دارنـد، بنـابراین محققـان در نظر دارند که نباید آن ها را صرفا بر اساس طول و عدم کدنویسی شان تعریف کرد. تحقیقات نشان مـی‌دهـد کـه LncRNAs در برخی از ویژگی های مشترک به عنوان زیر است. (۱) کدگذاری LncRNAs شبیه به ژن‌های پـروتئین هـای کـد کننـده از نظـر ایـالات کرومـاتین ماننـد H3K4me3 از مروجـان و H3K36me3 از منـاطق رونویسـی [Guttman M،۲۰۰۹]. (۲) بیـان LncRNAs توسـط انـواع متعـددی از عوامـل رونویسـی مشـترک تنظـیم [Yang JH،۲۰۱۳]. (۳) ماننـد ژن‌هـای کدگـذاری، LncRNAs با RNA پلیمراز II رونویسی می‌شود، به طور کلی از طریق اسپلیکئوزوم ها پیچ خورده و دم پلی A دارند. با توجـه به موقعیت قطعات DNA آنها در ژنوم ها، کدگذاری LncRNAs ممکن است به پنج دسته تقسیم شود که شـامل حـس، آنتـی حس، دو راهی، LncRNAs درون زا و اینترژنیک است. موقعیت بیشتر کمتر مربوط به عملکرد این ژن‌ها است.

در سال های اخیر LncRNAs به دلیل عملکردشان در بیماری های انسانی از جمله سرطان ها توجه افزایش یافته ای را به خود جلب کرده است. آن ها در فرایندهای زیستی متنوعی مانند تکثیر سلول ها، دیفرانتیاسیون، بازسازی کروموزوم ها، مدولاسیون اپی ژنتیک، اصلاح رونویسی و پس از رونویسی نقش دارند [Tian T،۲۰۱۸]. افزایش سرطان پستان نگرانی عمده بهداشـت عمـومی را در بر دارد به طوری که سرطان پستان نه تنها شایع ترین سرطان در زنان بلکه, همچنین دومین علت اصلی مرگ و میر مربوط بـه سرطان در زنان در سراسر جهان است [Siegel RL،۲۰۱۶]. حتی با افزایش باور نکردنی اخیر در تشخیص و کشف دارو، مقاومـت در برابر درمان سرطان یک مسئله قابل توجهی باقی می ماند [Fernández Y،۲۰۱۰]. جهش‌های بی شمار و تغییرات تعداد کپی در سرکوبگرهای تومور و انکوژن‌ها در توسعه سرطان پستان که منجر به آبشـاری از وقـایع افـزایش تکثیـر سـلول پسـتانی، تمـایز غیرطبیعی و افزایش مهاجرت و تهاجم دخیل شده است [۱۱۷، ۱۱۸]. با این حال، در زیرمجموعه بزرگی از سرطان ها عوامل عامل سرطان پستان مبهم باقی می مانند. جالب اینجاست که با اینکه خود غده پستانی برای نگهداری از زنـدگی بـی اهمیـت اسـت، امـا شروع سرطان پستان در صورتی می‌تواند کشنده باشد که بیماری آشکار شود و متاستاز به دنبال داشته باشد.

در طول تکامل غده پستانی از رویان از طریق بلوغ، بارداری، لاکتاسیون و اینولوشن، سطح پسـتانی تحـت یـک سـری نشـانه هـای مورفوژنتیک ناشی از یک کراس تاک پیچیده از عوامل مولکولی اثر تغییرات نمایشی آناتومیک و فیزیولوژیک در ایـن بیمـاری قـرار می‌گیرد [Macias H،۲۰۱۲]. جالب اینجاست که عوامل ژنتیکی مورد نیاز برای سازمان دهی ایـن چـارچوب پیچیـده نیـز نشـان داده شده است که در سرطان پستان جهش یافته اند.

ظهور فن آوری های توالی کل ژنوم تجزیه و تحلیل رونویسی ممکن را به طور شدید فعال و درک ما را از اجزایی که ژنوم پیچیده ما را تشکیل می دهند تجدید نظر کرده است [Bertone P،۲۰۰۴]. نه خیلی وقت پیش اکثریت عرصه رونوشت هنوز «بدرد نخور» در نظر گرفته می‌شد زیرا بخش های بزرگی از DNA به نظر نمی‌رسد که پروتئین های عملکردی را رونویسی کنند.

وجود پیوند ذاتی بین التهاب و سرطان بیش از یک قرن پیش مورد توجه قرار گرفته است. در سال ۱۸۶۳ رودولف ویرشو و همکارانش دریافتند که سلول‌های سفید خون در بافت های تومور وجود دارند، این فرضیه را مطرح کردند که التهاب با تومور همراه است، و پیشنهاد کردند که «نفوذ لنفورتیک» منشأ سرطان را در محل التهاب مزمن منعکس می‌کند [Balkwill F،۲۰۰۱].

در طول دهه گذشته، نقش التهاب مزمن در توسعه سرطان به طور فشرده تری مورد بررسی قرار گرفته است و شواهد رو به رشد از فرضیه ویرشو حمایت کرده است. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده اند که تقریبا ۲۵٪ تومورها در عفونت مزمن یا التهاب نقش دارند و خطر سرطان در افراد مبتلا به التهاب مزمن یا اضافه بار رادیکال های آزاد اکسیژن بسیار بیشتر از جمعیت عمومی است که ارتباط بین التهاب و سرطان نشان می‌دهد[Hussain SP،۲۰۰۷].

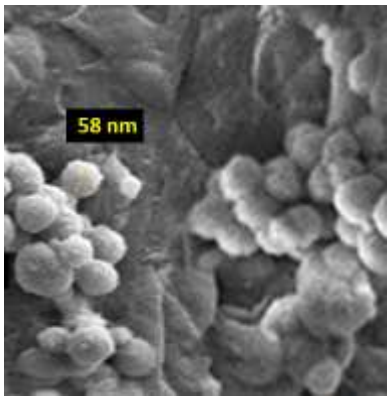
میانجی های التهابی مانند سیتوکین ها، کموکین ها، رادیکال های آزاد، پروستاگلندین ها، و هورمون های رشد می توانند باعث تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیک شوند، از جمله جهش ژن‌های سرکوبگر تومور، متیلاسیون DNA و تغییرات پس از ترجمه، و در نتیجه بی ثباتی ژنومیک و تغییرات در مسیرهای بحرانی برای نگهداری عملکردهای طبیعی سلول، و در نتیجه منجر به تبدیل سلول و کارسینوژنز می‌شود [Hussain SP،۲۰۰۷].

در حال حاضر اینگونه شناخته شده است که آسیب های التهابی مزمن ممکن است به سرطان منجر شود, و سیتوکین های تولید شده توسط سلول‌های التهابی در میکرو محیطی تومور از عوامل لازم برای بقای سلول‌های سرطانی, تکثیر, تشخیص, و پیشرفت می‌شود. در همین حال، سلول‌های التهابی و سیتوکین های آزاد شده ممکن است با سلول‌های دیگر، سیتوکین ها و مواد فیزیکی و شیمیایی مضر خارجی در محیط میکرو تعامل داشته باشند و با هم، رفتار سلول‌های سرطانی را تغییر دهند. علاوه بر این، التهاب ممکن است یا عامل سرطان یا پیامد ناشی از سرطان باشد.

این داده ها به طور دسته جمعی نشان دهنده پیچیدگی التهاب و سرطان است. کشف اخیر تعامل بین microRNAها و سیستم ایمنی بدن، برخی از فهم را به درک ارتباط بین التهاب و سرطان بهم ریخته است [Hussain SP،۲۰۰۷]. علاوه بر این، با ایفای چنین نقش حیاتی در شروع تومور، توسعه و پیشرفت، مداخلات هدف قرار گرفته به این شبکه ممکن است به یک رویکرد موثر برای مبارزه با سرطان تبدیل شود.

۲-ادبیات پژوهش

کارسینومای پستان: از آن جا که اولین قدم پس از جداسازی وزیکول های سرمی تایید ماهیت آن ها است از آنالیز میکروسکوپ الکترونی نگاره برای مشاهده شکل و سایز اگزوزوم های جداسازی شده از سرم استفاده شد. شکل زیر نمونه ای منتخب از اگزوزوم های جداسازی شده از سرم یک فرد مبتلا به کارسینومای پستان را نشان می دهد. همانطور که در شکل ملاحظه می شود، میکرووزیکول ها کاملا کروی با دامنه سازی بین ۳۰ الی ۱۲۰ نانومتر هستند.



شکل ۱-بررسی میکرووزیکول های خارج سلولی جداسازی شده توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره: اگزوزوم های جداسازی شده از سرم بیماران کروی شکل با دامنه اندازه ۳۰ الی ۱۲۰ نانومتر هستند.

میکرو RNA: کشف اولین میکروRNA (miRNA) ، lin-4، در سال ۱۹۹۳ توسط گروه های Ambros و Ruvkun در Caenorhabditis elegans [۳۹، ۴۰] انقلابی در زمینه زیست شناسی مولکولی ایجاد کرده است. آن ها بعدا فهمیدند که lin-4 یک پروتئین رمزگذار RNA نبوده بلکه یک RNA غیر رمزگذار کوچک بوده است [Almeida MI،۲۰۱۱]. آنها همچنین دریافتند که lin-14 از طریق 3’ناحیه ترجمه نشده (UTR) پس از رونویسی تنظیم می‌شود و lin-4 توالی مکمل 3’ UTR از lin-14 را دارد [۳۹]. بنابراین، آنها پیشنهاد کردند کهlin-4 ، lin-14 را در سطح پس از رونویسی تنظیم می‌کند[Wightman B،۱۹۹۳]. از آن زمان، miRNA ها در تمام سیستم های مدل حیوانات شناسایی شده اند و برخی از آنها در بین گونه ها بسیار محافظت شده است [Friedlander MR،۲۰۱۴]. miRNA های جدید هنوز کشف می شوند [de Rie D،۲۰۱۷] و نقش آنها در تنظیم ژن به خوبی شناخته شده است.

وزیکول های خارجی: وزیکول های خارج سلولی (EVs) اولین بار ۵۰ سال پیش توسط ولف در پلاسما مشاهده شد که آنها را "گرد و غبار پلاکت" نامید از آن زمان به بعد، نشان داده شده است که کلیه مایعات بیولوژیکی آزمایش شده دارای وزیکول هستند و همچنین نشان داده شده است که رده های سلولی رشد یافته در شرایط آزمایشگاهی، وزیکول ها را در دامنه های مختلف آزاد می کنند [Raposo G،۲۰۱۳]. این وزیکول ها در طول سال ها نام های مختلفی دریافت کرده اند، اما امروزه اغلب به طور کلی به عنوان EV شناخته می شوند. سه نوع اصلی EV بر اساس مکانیسم انتشار و اندازه آنها شرح داده شده است: اگزوزوم ها (قطر کمتر از ۱۵۰ نانومتر)، میکرو وزیکول ها / ذرات ریخته و اجسام آپوپتوتیک (هر دو بزرگتر از ۱۰۰ نانومتر هستند).

نتایج نشان می‌دهد که اگزوزوم های ناشی از سلول سرطان پستان نقش مهمی در پیشرفت متاستاز استخوان سرطان پستان ایفا می‌کنند که مربوط به تشکیل تو رفتگی های پیش متاستاتی با انتقال miR-21 به استخوان سازی است. داده های حاصل از نمونه های بیمار بیشتر اهمیت miR-21 را به عنوان یک تارگت پتانسیلی برای تشخیص بالینی و درمان متاستاز استخوان سرطان پستان منعکس می‌کند[Yuan X،۲۰۲۱].

در پژوهش فلانی اگزوزوم های ناشی از سرطان پستان، ویژگی های متابولی را در آدیوپوسیت ها بازنویسی می کنند. سلول‌های سرطان پستان به نواحی آدیوپوسیت ها در محیط کوچک تومور حمله می کنند. در ابتدا بیان پروتئین اول انتقال دهنده ی اسید چرب (FATP1) و CD36 (ترانس لوکاز اسید چرب) را در یک گروه از 108 نمونه سرطان پستان با استفاده از ایمنوهیستوکمتری (IHC) کشف کرده‌ایم. بیان بالای CD36 و FATP1 در اکثر بافت های سرطان پستان با لوکالیزاسیون مجاور به بافت آدیپوز کشف می‌شود. آنالیز Kaplan-Meier نشان می‌دهد که پروتئین ها با بیان بیش از حد FATP1 و

CD36 در بافت سرطان پستان زمان بقای ضعیف تری نسبت به بیماران با بیان بیش از حد پروتئین دارند. این یافته ها نشان می دهند که بیان بیش از حد بافت غیر بدخیم CD36 یا FATP1 می تواند یک بیومارکر بالینی مهم برای آینده ی ضعیف بیماران دچار سرطان پستان باشد[Wu Q،۲۰۱۹].

۳-فرضیه های پژوهش

۱-مولکول RNA اندوژنوس رقابتی ۱MALAT قادر به تارگتینگ مولکول -miR۲۱۱ و -miR۱۴۵ است.

۲-مولکول RNA اندوژنوس رقابتی ۱MALAT و میکرو RNA ترشحی -miR۲۱۱ و -miR۱۴۵ در پاتوژنز سرطان دخیل اند.

۳-وضعیت بیانی -HER۲ عاملی در پیشرفت متاستاز سرطان پستان است.

۴-روش کار

۱- مخلوط واکنشی زیر به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با افزودن مواد به ازای هر نمونه تهیه شد:

- ۱۰ میکرولیتر از SYBR Green I Master Mix
- ۰/۵-۱ میکرولیتر از پرایمر ها
- ۵ نانوگرم cDNA (۱/۵ میکرولیتر)
- آب تا حجم ۲۰ میکرولیتر

۲- مخلوط واکنشی (۲۰ میکرولیتر) به درون هر یک از چاهک های پلیت ۴۸ خانه ای و یا استریپ های ۸ تایی ریخته شد.

۳- سطح پلیت با کاور شفاف و یا در صورت استفاده از استریپ درب آن ها با درپوش مخصوص پوشانده شد.

۴- پلیت یا استریپ در دستگاه قرار داده شد و برنامه دمایی و زمانی مطابق جدول ۲-۳ اجرا گردید:

آنالیز اطلاعات با استفاده از روش مقایسه ای چرخه ی آستانه مطابق جدول زیر انجام شد. نرمالیزاسیون تغییرات سطوح بیانی miRNA یا lncRNA در مقایسه با سطوح بیانی اندوژنوس U6 snRNA انجام شد.

رابطه ۲- ۳: ΔC_T = [mC_T ژن مورد نظر (کنترل) - mC_T ژن مرجع (کنترل)] : کنترل

رابطه ۲- ۴: ΔC_T = [mC_T ژن مورد نظر (تست) - mC_T ژن مرجع (تست)] : تست

رابطه ۲- ۵: $\Delta\Delta C_T$ = ΔC_T (کنترل) - ΔC_T (تست)

در ادامه نسبت تغییرات بیانی بین دو نمونه تست و کنترل با استفاده از رابطه زیر تعیین شد.

(نسبت بیانی) = $2^{-\Delta\Delta CT}$Ratio

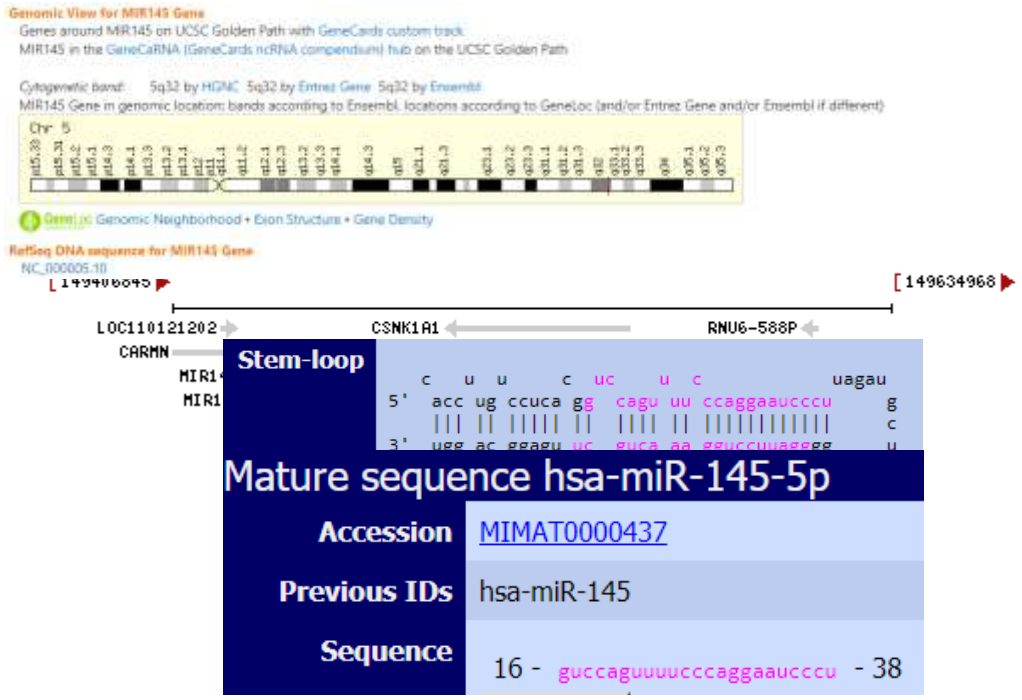
آنـالیز داده هـا بـا اسـتفاده از نـرم افـزار (Applied ABI step one Real-Time PCR Software v2.0.2 Biosystems,UK)، و آنالیز آماری شامل محاسبه میانگین، انحراف معیار و رسم نمودار ها با استفاده از نـرم افـزار GraphPad انجام شد. نرمالیزاسیون تغییرات سطوح بیانی miRNA یا lncRNA در مقایسه با سطوح بیانی ژن مرجـع U6snRNA انجـام شد.

داده ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد (SD) از دو یا سه آزمایش مستقل ارائـه شـدند و از آزمـون T-test جهـت آنـالیز آماری تغییرات داده ها استفاده گردید. مقادیر *P* values کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری با معنی در نظر گرفته شدند.

۵-یافته های پژوهش

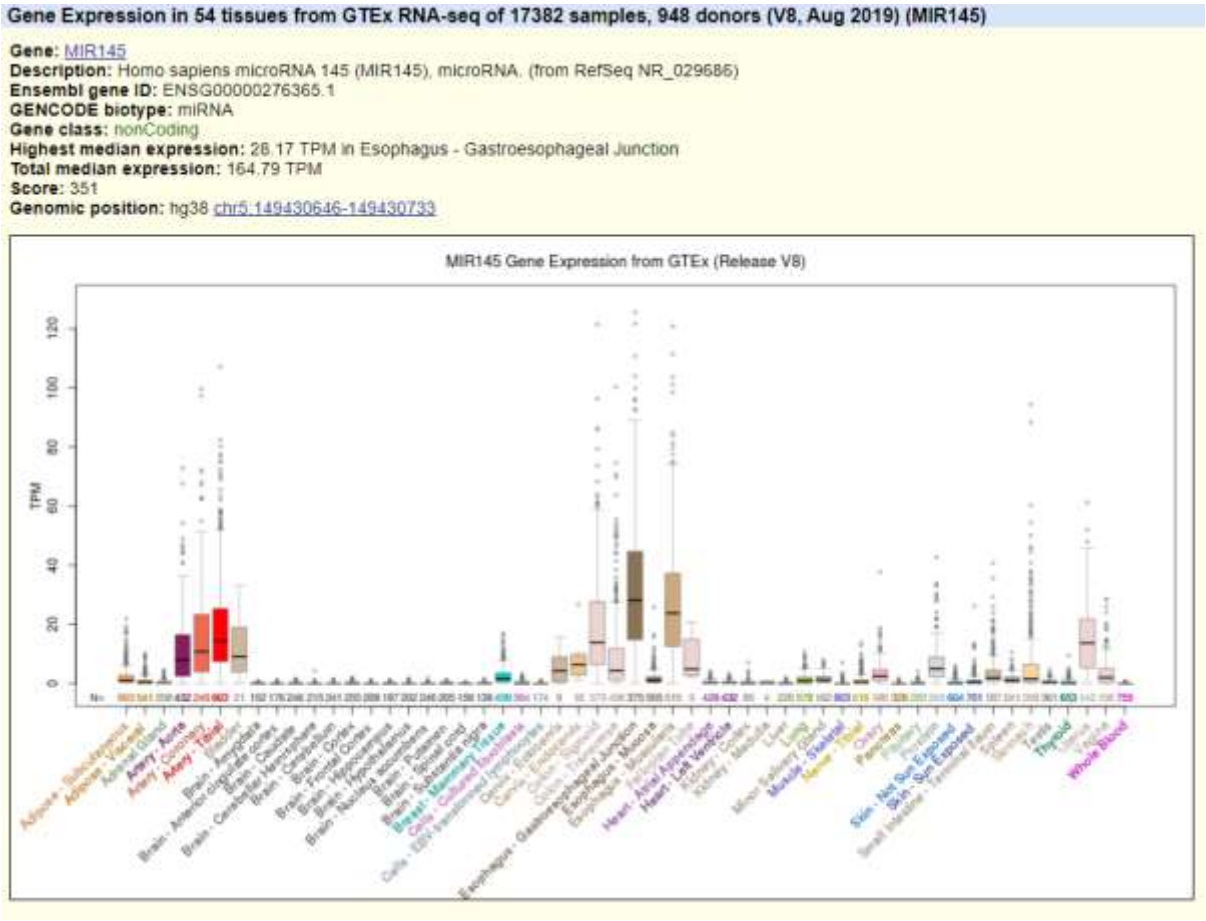
موقعیت کروموزومی hsa-mir-145

میکروRNA ی miR-145 روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۵ قرار دارد. موقعیت کروموزومی، ژن های مجاور، توالی ساقه حلقه و همچنین توالی miRNA بالغ که ۲۳ نوکلئوتید است در شکل زیر مشاهده می‌شود.



شکل ۱

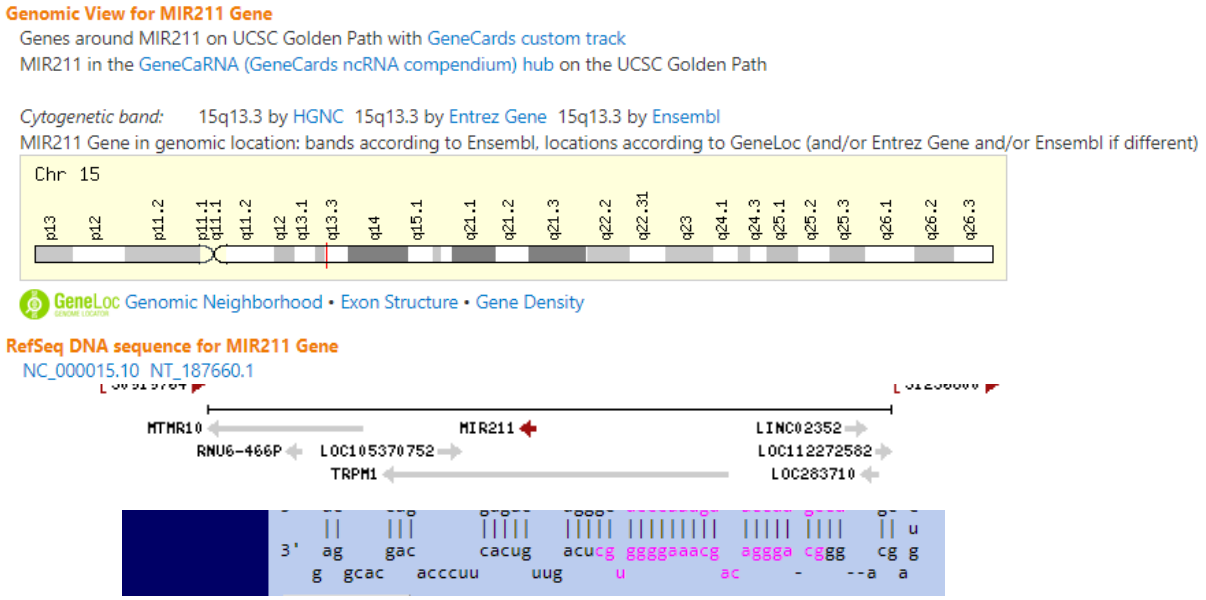
داده کاوی پایگاه UCSC برای ارزیابی بیان hsa-mir-145 در بافت هـای مختلـف از نتـایج RNA-Seq در ۱۷۳۸۲ نمونـه در شکل زیر آورده شده است.



شکل ۲- داده کاوی پایگاه UCSC برای ارزیابی بیان hsa-mir-145 در بافت های مختلف از نتایج RNA-Seq در ۱۷۳۸۲ نمونه

موقعیت کروموزومی hsa-mir-211

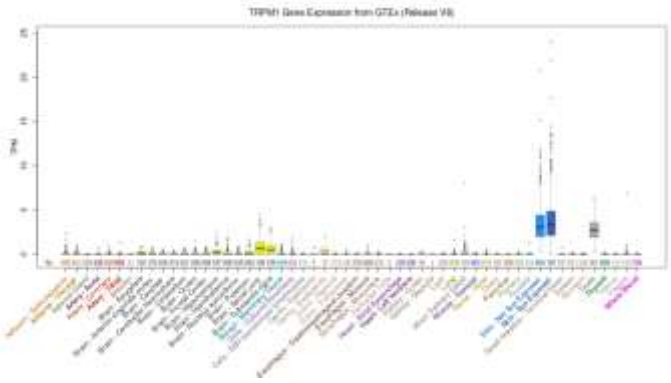
میکروRNA ی miR-211 روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۱۵ قرار دارد. موقعیت کروموزومی، ژن های مجاور، توالی ساقه حلقه و همچنین توالی miRNA بالغ که ۲۲ نوکلئوتید است در شکل زیر مشاهده می‌شود.



Mature sequence hsa-miR-211-5p	
Accession	MIMAT0000268
Previous IDs	hsa-miR-211
Sequence	26 - uucccuuugucauccuucgccu - 47

شکل ۲

داده کـاوی پایگـاه UCSC بـرای ارزیـابی بیـان ژن Transient receptor potential cation channel subfamily M member 1 (TRPM1) که ژن میزبـان یـا Host بـرای hsa-mir-211 در بافـت هـای مختلـف از نتـایج RNA-Seq در ۱۷۳۸۲ نمونه در شکل زیر آورده شده است.



شکل ۳- داده کاوی پایگاه UCSC برای ارزیابی بیان TRPM1 در بافت های مختلف از نتایج RNA-Seq در ۱۷۳۸۲ نمونه

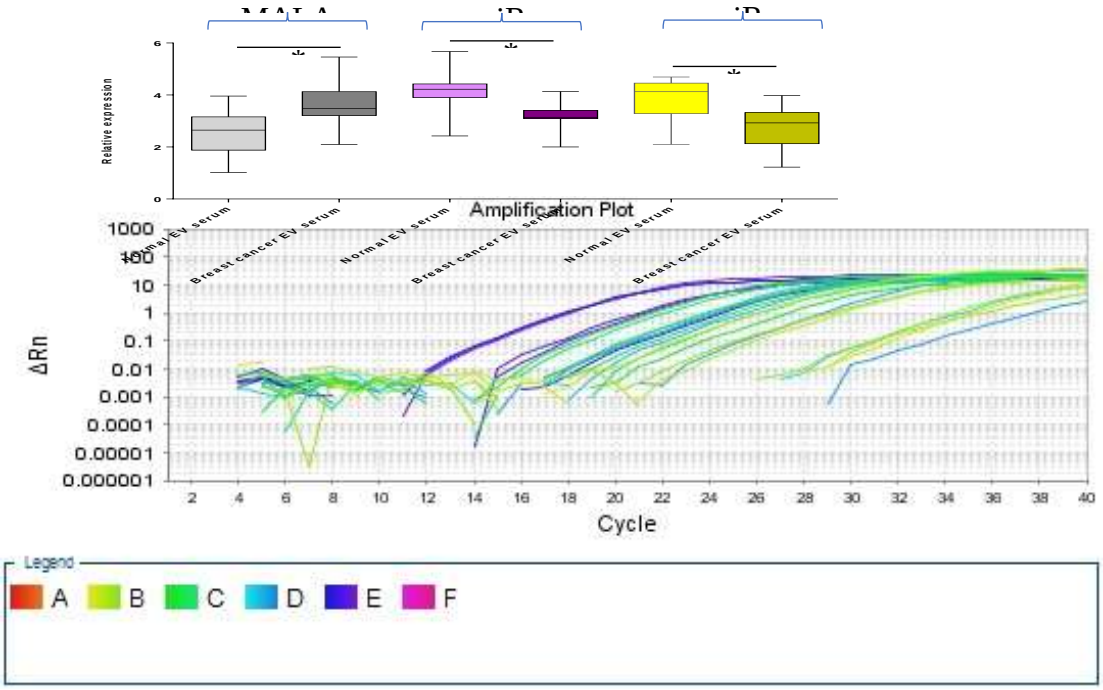
-ویژگی های بالینی و پاتولوژیکی بیماران کارسینومای پستان

در این تحقیق مجموعاً ۴۰ نمونه ی سرمی از بیماران کارسینومای مجاری پستان مورد بررسـی قـرار گرفـت. همینطـور تعـداد ۳۰ نمونه سرمی سالم بدون هیچ گونه سابقه بیماری وارد مطالعه شد. این نمونه ها تماماً توسط پزشک متخصص در بیمارسـتان لالـه و امام خمینی و با کسب رضایت نامه اخذ شد. در جدول زیر مشخصات کلینیکوپاتولوژیکی بیماران مبـتلا بـه سـرطان پسـتان مـورد بررسی در این تحقیق نشان داده شده است. دامنه سنی افراد سالم بین ۳۰ الی ۷۶ سال بدون سابقه هر گونـه بیمـاری و همینطـور اختلالات غدد بود.

مشخصات	تعداد	درصد %
سن ابتلا		
میانه (محدوده) : ۴۹/۳۲ (۷۶-۳۰)	۴۲	
۵۰ سال>	۱۸	۴۵
۵۰ سال ≤	۲۲	۵۵
سن در شروع قاعدگی		
میانگین ± انحراف معیار : ۱/۶ ± ۱۲/۴۹		
سن در اولین زایمان		
میانگین ± انحراف معیار : ۷/۱ ± ۲۱/۲		
استفاده قبلی از هورمون		
بلی	۲۴	۶۰
خیر	۱۶	۴۰
سایز تومور		
< ۳ Cm	۱۵	۳۷/۵
≤ ۳ Cm	۲۵	۶۲/۵
تومور اولیه (مرحله T)		
T1 : ≤ ۲ cm	۱۴	۳۵
T2 : ۲ < ≤ ۵ cm	۱۸	۴۵
T3 : < ۵ cm	۸	۲۰
غدد لنفاوی ناحیه ای (مرحله n)		
NX	۵	۱۲/۵
N0	۱۰	۲۵
N1	۹	۲۲/۵
N3	۱۱	۲۷/۵
N4	۵	۱۲/۵
متاستاز به فواصل دور (مرحله M)		
MX	۶	۱۵
M0	۱۴	۳۵
M1	۲۰	۵۰
متاستاز غده لنف		
منفی	۱۶	۴۰
مثبت	۲۴	۶۰
مرحله تومور		
I + II	۲۱	۵۲/۵
III	۱۹	۴۷/۵
وضعیت گیرنده استروژن		
منفی	۱۲	۳۰
مثبت	۲۴	۶۰
نا مشخص	۴	۱۰
وضعیت گیرنده پروژسترون		
منفی	۱۴	۳۵
مثبت	۲۱	۵۲/۵
نامشخص	۵	۱۲/۵
وضعیت Her2		
منفی	۱۶	۴۰
مثبت	۲۳	۵۷/۵
نامشخص	۱	۲/۵

بررسی بیان RNA طویل غیر کد کننده تنظیمی MALAT1 و میکروRNAهای ترشحی تنظیم شونده miR-211 و miR-145 در وزیکول های های خارج سلولی سرمی بیماران کارسینومای پستان

در گام اول احتمال بیومارکر بودن noncoding RNA های منتخب این مطالعه بررسی شد، برای این کار سطوح بیان آن ها در نمونه های وزیکول های اگزوزومی در گروه بیماران و افراد سالم مورد بررسی قرار گرفت . همانگونه در شکل نشان داده شده است بیان MALAT1 lncRNA در نمونه های بیماران کارسینومای پستان بطور معناداری نسبت به نمونه های نرمال بالاتر (** P < 0. 01) و همچنین بیان miR-211 و miR-145 در نمونه های بیماران کارسینومای پستان بطور معناداری نسبت به نمونه های نرمال کمتر بود. (**P < 0. 01) نتایج پیشنهاد دهنده وجود یک ارتباط تنظیمی معکوس مابین MLALAT1 lncRNA با دو میکروRNA ترشحی miR-211 و miR-145 است. این نتایج با عملکرد ceRNA ای SNHG5 در تنظیم بیان miR-211 و miR-145در تطابق است. شکل پائین منحنی تکثیر ژن ها در واکنش Real-time PCR را نشان می دهد.

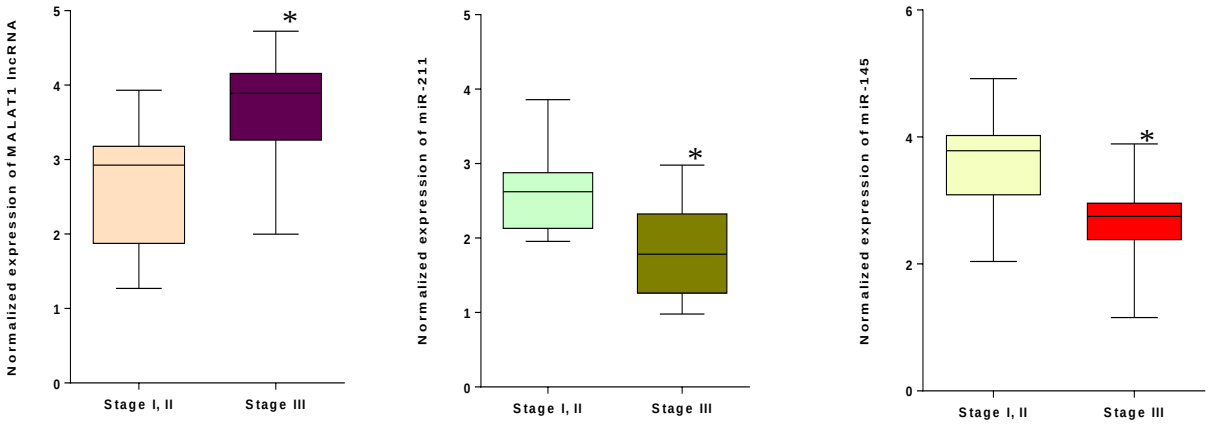


شکل ۴- ارزیابی بیان RNA تنظیمی MALAT1 و میکروRNA های ترشحی miR-211 و miR-145 در نمونه های وزیکول های اگزوزوم سرمی کارسینومای پستان نسبت به اگزوزوم سرمی افراد سالم. نتایج تغییرات بیانی سهNon-coding RNA در گروه اگزوزومی بیمار نسبت به افراد سالم را نشان می دهد. شکل پایین هم منحنی های تکثیر منتخب را نشان می دهد.

بررسی بیان RNA طویل غیر کد کننده تنظیمی MALAT1 و میکروRNA های ترشحی تنظیم شونده miR-211 و miR-145 در بیماران در مراحل Stage های مختلف بیماری

یکی از اهداف این تحقیق بررسی ارتباط سطوح بیانی Noncoding RNA های منتخب با پارامتر های بالینی پاتولوژیکی کارسینومای پستان می‌باشد، بنابراین در پی آن برآمدیم که بیان lncRNA MALAT1 و میکروRNAهای ترشحی miR-211 و miR-145 را در بین بیماران در گروه های مختلف که بر اساس stage بیماری گروه بندی شده بودند بررسی کنیم.

همانطور که در شکل مشاهده می‌شود سطح بیانی MALAT1 در stage III بیماری نسبت به گروه بیماران در stage های اولیه I و II بیان افزایش یافته ای را نسبت به گروه بیماران در Stage های اولیه I و II نشان داد (*P < 0. 05). در مورد میکروRNA های ترشحی miR-211 و miR-145 نیز نتایج نشان داد که سطح بیانی آن ها در stage پیشرفته III بیماری بیان کاهش یافته ایی را نسبت به Stage های پائین تر I, II نشان داد (*P < 0. 05). این نتایج با عملکرد ceRNA ای MALAT1 در تنظیم بیان و عملکرد میکروRNA های ترشحی تنظیم شونده miR-211 و miR-145 در تطابق است و همچنین به عملکرد انکوژنیک MALAT1 lncRNA و نقش تومورساپرسیو miR-211 و miR-145 اشاره دارد.



شکل ۵- بررسی بیان میکروRNA های ترشحی miR-211 و miR-145 و MALAT1 lncRNA در گروه‌های بیماران با Stage مختلف.

تنظیم کاهشی (Down-regulation) سطح بیانی میکروRNA های ترشحی miR-211 و miR-145 و تنظیم افزایشی (Up-regulation) سطح بیانی MALAT1 lncRNA در اگزوزوم سرمی بیماران مبتلا به کارسینومای پستان در Stage III در مقایسه با Stage I, II مشهود است.

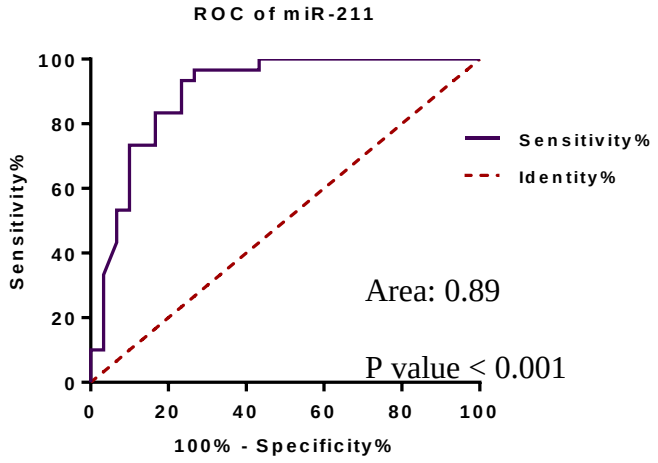
بررسی سطوح بیان RNA طویل غیر کد کننده تنظیمی MALAT1 و میکرو RNAهای ترشحی تنظیم شونده miR-211 و miR-145 در بیماران کارسینومای پستان با وضعیت فعالیت Her-2 متفاوت

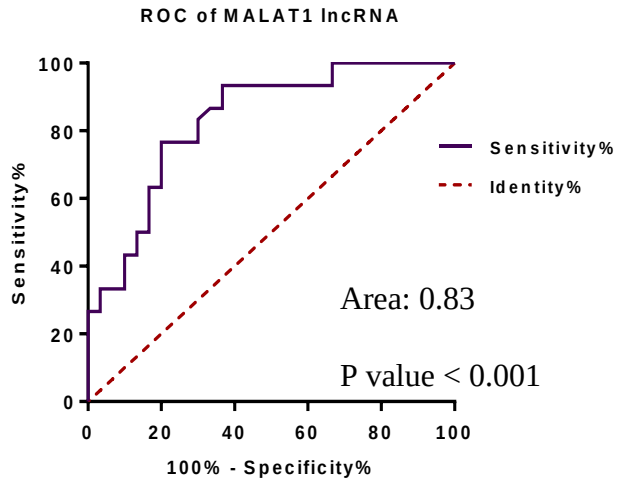
به دلیل آن که وضعیت بیانی Her2 در بیماران کارسینومای پستان ارتباط مستقیمی با روند متاستاز دارد،سطوح بیان RNA طویل غیر کد کننده تنظیمی MALAT1 و میکرو RNA های ترشحی تنظیمی miR-145 و miR-211 را در وزیکول های خارج سلولی سرمی بیماران کارسینومای پستان با وضعیت فعالیت Her-2 متفاوت مورد بررسی قرار دادیم. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود سطوح بیانی MALAT1 lncRNA در بیماران با بیان Her-2 (Her-2 positive) در مقایسه با بیماران با عدم بیان Her-2 (Her-2 negative) بیان بیشتری را نشان داد (*P < 0. 05). در مقابل به بررسی microRNA های تنظیم شونده توسط این ceRNA یعنی miR-211 و miR-145 پرداخته شد. نتایج Real-time PCR نشان داد که سطوح بیانی miR-211 در بیماران با فعالیت Her-2 (Her-2 positive) نسبت به بیماران با عدم فعالیت Her-2 (Her-2 Negative) کمتر است (*P < 0. 05). در مورد miR-145 تفاوت از نظر آماری معناداری بین دو گروه بیماران با وضعیت فعالیت و عدم فعالیت Her-2 ملاحظه نشد (ns: not significant).

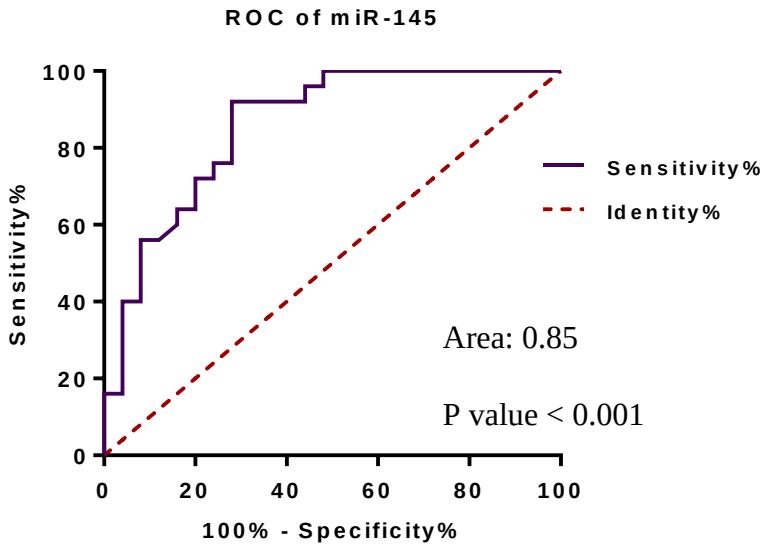
تنظیم افزایشی(Upregulation) سطح بیانی MALAT1 lncRNA و تنظیم کاهشی (Downregulation) بیان miR-211 در وزیکول های خارج سلولی سرمی بیماران مبتلا به کارسینومای پستان با فعالیت Her-2 نسبت به گروه Her-2 Negative مشهود است.

سنجش پتانسیل بیومارکری RNA های غیر کد کننده MALAT1، miR-211 و miR-145 در تشخیص کارسینومای پستان

با توجه به اینکه بیان RNA طویل غیر کد کننده تنظیمی MALAT1و میکروRNA های ترشحی تنظیم شونده miR-211 و miR-145 در دو گروه بیمار و سالم اختلاف معنادار و الیته نسبت به هم معکوسی را نشان دادند و ارتباطی بین بیان آن ها با برخی شاخصه های بالینی پاتولوژیکی بیماری نظیر Stage بیماری و وضعیت فعالیت Her-2 شناسایی شد، در ادامه با بررسی منحنی ROC (Receiver Operating Characteristics) در پی تعیین قابلیت بیومارکری (نشان گری زیستی) این دو Non-coding RNA بر آمدیم. در این مطالعه miR-211 و miR-145 دچار کاهش بیان و MALAT1 lncRNA دچار افزایش بیان در وزیکول های خارج سلولی سرمی نسبت به نمونه سالم بودند و سطح زیر منحنی (Area under curve, AUC) برای miR-211 و miR-145 به ترتیب معادل ۰٫۸۹ و ۰٫۸۵ و برای MALAT1 lncRNA معادل ۰٫۸۳ محاسبه شد. این اعداد پیشنهاد کننده پتانسیل نشان گری زیستی برای این سه Noncoding RNA است.



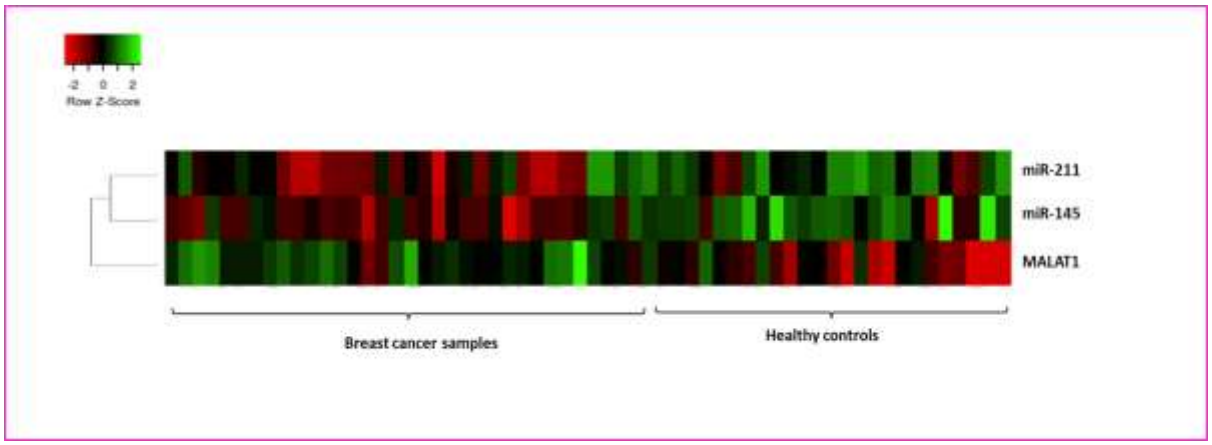




شکل ۶- سنجش قابلیت نشان گری زیستی برای miR-211 و miR-145 و MALAT1 lncRNA بر اساس داده های آنالیز منحنی ROC. سطح زیر منحنی برای miR-211 و miR-145 به ترتیب معادل ۰,۸۹ و ۰,۸۵ و برای MALAT1 معادل ۰,۸۳ پیشنهاد کننده پتانسیل نشان گری زیستی برای این سه non-coding RNA است.

آنالیز Heatmap در مورد بیان lncRNA MALAT1 و میکروRNA های miR-211 و miR-145 در نمونه هـای سرمی تومور پستان و کنترل سالم

به منظور نمایش بصری تغییرات بیانی non-coding RNA ها بین نمونه های توموری در مقایسه با افراد سـالم از آنـالیز Heat map استفاده شد. همانطور که در شکل ملاحظه می شود، رنگ سبز نشانه سطوح بیانی بالاتر و رنـگ قرمـز نشـانه سـطوح بیـانی کمتر است.



شکل ۷- آنالیز Heatmap برای non-coding RNAهای منتخب با بیان متفاوت در در گروه سرمی بیمار و سالم. تصویر Heatmap، non-coding RNAهای با بیان بالا را با رنگ سبز و non-coding RNA با بیان کمتر را با رنگ قرمز نشان می دهد.

۶-بحث و نتیجه گیری

RNA های غیر رمزی (nc RNAs) تنظیم کننده های سیگنال دهی درون سلولی و میان سلولی در سرطان پستان هستند. nc RNA ها سیگنال دهی درون سلولی را برای کنترل فرآیندهای مختلف سلولی مانند سطوح و فعالیت گیرنده ی استروژن ∝ (ER∝)، تکثیر، تهاجم، انتقال، آپوپتوسیس و ریشه داری اصلاح می‌کند. به علاوه ncRNA ها می توانند وارد اگزوزوم ها شده و ارتباط میان سلولی را از طریق انتقال میکرو RNA ها (miRNA) و lnc RNA ها برای سلول های موضعی و سیستمی ایجاد کنند. این پژوهش یک بازنگری از بیوژنسیس و نقش های nc RNA ها فراهم می سازد: RNA های کوچک هسته (snRNA)، RNA های گردشی (circ RNA) ، RNA های در برهم کنش (piRNA)، میکرو RNA ها و Inc RNA ها در سرطان پستان.

در مورد میکرو RNA ها و IncRNA ها بیشتر این را می‌دانیم که در تومورهای پستان بیان می شوند و تارگت های ثبت شده شان به عنوان محرک های آنکوژنی وسرکوبگرهای تومور بازنگری می‌شود، توجه بر میکرو RNA ها و IncRNA های مشخص شده در تومورهای پستان است ازاین رو یک تعداد از nc RNA های مشخص شده در سلول های سرطان پستان در تومور های پستان بد تنظیم نمی شوند. ماهیت و عملکرد ادعایی Inc RNA ها افزایش یافته است: رونویسی گروه پاراسپکیل هسته ی ۱(NEAT۱)، متاستاز مربوط به رونویسی آدنو کارسینومان ریه ۱ (MALAT ۱)، فعال ساز RNA گیرنده استروئید ۱ (SRA1)، رونویسی وابسته به سرطان روده بزرگ ۲(CCAT2)، نئوپلازی کلوروکتال بیان شده بصورت تمایزی (CRNED)، رونویسی مربوط به این پراکشین مایو کاردیال (MIAT) و RNA های غیر رمزی میان ژنی بزرگ، تنظیم کننده برنامه نویسی دوباره (LINC-ROR) و سطوح کاهش یافته بیان شده مادری۳(MEG3) در تومورهای پستان هم مشاهده شده اند. MIRNA ها Lnc RNA اهداف مداخله های درمانی در سرطان پستان هستند اما کار بیشتری نیاز است تا نوید بخش فعالیت شان برای کاربرد بالینی باشد.

اگزوزوم ها وزیکول های غشایی در اندازه ی نانو هستند که از طریق انواع مختلف سلول انتشار می یابند و نقش مهمی در ارتباطات میان سلولی ایفا می کنند. اگزوزوم ها در سرطان پستان از طریق انتقال افقی مولکول های مختلف فعال از لحاظ زیستی مانند پروتئین ها و به صورت واسطه های سلول به سلول موضعی و سیستمی از اطلاعات انکوژنی ظاهر شده اند و یک نقش مهم در پیشرفت سرطان ایفا می کنند. این پژوهش دانش اخیر راجع به درگیری اگزوزوم ها در پاتوژنسیس سرطان پستان را (مانند شروع تومور ، تهاجم و متاستاز، انگیوژنسیس، مدولاسیون سیستم ایمنی و میکرو محیط تومور) نشان می دهد. همچنین کاربرد پتانسیلی اگزوزوم ها به عنوان بیومارکرهای درمانی و تشخیصی نوید بخش در سرطان پستان بحث می شود.

همین طور طبق بررسی هایی که در گذشته توسط سایر محققان صورت گرفته دیده شد که miR-222 با ترشح اگزوزوم سلول های سرطانی پستان حساس به آدریامایسین را در برابر آدریامایسین مقاوم می کند. برعکس، مهار کننده های miR-222 منجر به از دست دادن مقاومت در برابر آدریامایسین می شود[Yu, D.D.;Wu, Y,۲۰۱۶]. علاوه بر این، miR-222 اگزوزومی، همراه با miR-221، از طریق تنظیم کننده های پایین P27 و ER نیز به مقاومت تاموکسیفن سلول های سرطانی پستان حساس به تاموکسیفن داده می شود[Wei, Y,۲۰۱۴].

miR-134 اگزوزومی به طور قابل توجهی در بافت های تومور پستان پایین تنظیم می شود. بیان بیش از حد miR-134 اگزوزومی به طور قابل توجهی تکثیر سلولی TNBC را سرکوب کرده و آپوپتوسیس القا شده از طریق سیس‌پلاتین را افزایش می دهد، و موجب کاهش STAT5B و متعاقبا سرکوب Hsp90 و Bcl-2 می گردد [O'Brien, K،۲۰۱۵]. علاوه بر این، miR-503 اگزوزومال مشتق از اندوتلیال انتقال یافته به سلول های TNBC، تکثیر سلولی تومور و تهاجم را از طریق تارگت سازی CCND2 و CCND3، سرکوب می کند[۱۵۳]. این تحقیق نشان می دهد که درمان با شیمی درمانی کمکی منجر به افزایش سطوح miR-503 در اگزوزوم‌های اندوتلیال می شود، اما در سلولهای اندوتلیال به طور قابل توجهی پایین تنظیم می شود. بیان زیاد اگزوزومی miR-770 با ایجاد آپوپتوسیس باعث افزایش حساسیت دوکسوروبیسین در خطوط سلولی TNBC می شود [۱۵۴]. علاوه بر این ، بیان بیش از حد miR-770 با تارگت سازی STMN1، یک فسفوپروتئین خانواده استاتمین که در سیگنالینگ داخل سلولی نقش دارد، در شرایط آزمایشگاهی مهاجرت و حمله به سلول های TNBC را سرکوب می کند.

در سال ۲۰۲۰، Yiran Liang دریافتند که بیان LncRNA BCRT1 در سرطان پستان تنظیم می شود و با پیش بینی ضعیف همراه است.

برای شناسایی lncRNA های مهم که به طور بالقوه در پیشرفت سرطان پستان شرکت می کنند، آن ها با استفاده از پایگاه‌داده عمومی (GSE112848 و یک مجموعه داده TCGA)، پروفایل بیان lncRNA را تجزیه و تحلیل کردند. در این مطالعه، آن ها عمدتا بر روی lncRNA های تنظیم شده تمرکز داشتند زیرا این lncRNA ها ممکن است به عنوان اهداف درمانی یا بیومارکرهای پیش آگهی عمل کنند. از بین آنها، lncRNA BCRT1 (سرطان پستان مربوط به رونوشت ۱)، که یکی از lncRNA های تنظیم شده برجسته در بافت های سرطانی پستان بود، برای ارزیابی بیشتر انتخاب شد. LncRNA BCRT1 در بدن انسان روی 10q25.1 واقع شده است و از ۳ اگزون با طول کامل 1013nt تشکیل شده است. علاوه بر این، با استفاده از یابنده قالب خواندن باز (ORF) و پایگاه داده دامنه محافظت شده، متوجه شدند که lncRNA BCRT1 پتانسیل کمی برای کدگذاری پروتئین ها دارد، که مطابق با نتایج پنج معیار مختلف آنلاین است. علاوه بر این، آن ها نتوانستند توالی اجماع معتبر Kozak را در lncRNA BCRT1 شناسایی کنند، پس بیشتر از این ایده پشتیبانی کردند که lncRNA BCRT1 هیچ پتانسیل رمزگذاری پروتئینی ندارد [Kozak M،۱۹۸۶].

در مقایسه با سلول های اپیتلیال پستان سالم (MCF10A)، بیان lncRNA BCRT1 در چهار رده سلول سرطانی پستان به طور قابل توجهی بالاتر بود. علاوه بر این، آن ها بیشتر با استفاده از تجزیه و تحلیل PCR در لحظه، سطح بیان lncRNA BCRT1 را در ۱۸ جفت بافت های سرطانی پستان و بافت های طبیعی پستان بررسی کردند و نتایج نشان داد که lncRNA BCRT1 در بافت های سرطانی پستان در مقایسه با بافت های طبیعی مجاور به طور قابل توجهی بیش از حد بیان شده است.

تجزیه و تحلیل تک متغیره و چند متغیره همچنین نشان داد که بیان lncRNA BCRT1 یک فاکتور مهم پیش آگهی برای بیماران سرطانی پستان است. نتایج حاصل از تقسیم RNA هسته ای / سیتوپلاسمی از روش توزیع زیر سلول تایید کرد که lncRNA BCRT1 عمدتا در سیتوپلاسم واقع شده است، که همچنین توسط فلورسنس در تجزیه و تحلیل هیبریداسیون درجا (FISH) تأیید شد. در مجموع، این یافته ها نشان داد که lncRNA BCRT1 در سرطان پستان تنظیم شده و بیان زیاد lncRNA BCRT1 با نتایج ضعیف در سرطان پستان همراه بود.

ویژگیهای موردنظر برای بیومارکر بودن یک مولکول خاص اختصاصیت و حساسیت هستند که از آنالیز منحنی ROC برای تشخیص این دو پارامتر استفاده شد. در این مطالعه miR-211 دچار کاهش بیان در اگزوزوم سرمی بیمار نسبت به نمونه سالم بود. در این راستا، سطح زیر منحنی برای miR-211 معادل ۰/۸۹ محاسبه شد که مؤید پتانسیل بیومارکری miRNA مورد نظر

میباشد. و همچنین در این مطالعه miR-145 دچار کاهش بیان در اگزوزوم سرمی بیمار نسبت به نمونه سالم بود. در این راستا، سطح زیر منحنی برای miR-145 معادل ۰/۸۵ محاسبه شد که مؤید پتانسیل بیومارکری miRNA مورد نظر میباشد . و در این مطالعه MALAT1 دچار افزایش بیان در نمونه اگزوزوم سرمی بیمار نسبت به نمونه گروه سالم بود. در این راستا، سطح زیر منحنی برای MALAT1 معادل ۸۳/۰ محاسبه شد که مؤید پتانسیل بیومارکری آن می باشد.

به نظر می رسد روش ارائه شده در ایـن مطالعـه در جهـت شناسـایی میـزان بیـان miR_211 و miR_145 و MALAT1 در میکرووزیکول های خارج سلولی اگزوزومی سرم مبتلا به کارسینومای پستان و افراد کنترل سالم بـا اسـتفاده از روش Real time PCR ، کاملا موفق و توانمند بوده و در جهت تشخیص زود هنگام کارسینومای پستان بـه وسـیله ی انـدازه گیـری miR_211 و miR_145 و LNC RNA MALAT1 پیشرفت مناسب و قابل قبولی دارد.

بنابراین طبق بررسی های انجام شده در این پژوهش می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱) در اولین گام، برای بررسی بیومارکر بودن noncoding RNA های منتخب این مطالعه، سـطوح بیـان آن‌هـا در نمونـه هـای وزیکول های اگزوزومی در گروه بیماران و افراد سالم بررسی شد، دیده شد کـه بیـان MALAT1 lncRNA، در نمونـه هـای کارسینومای پستان بالاتر و همینطور بیان miR-211 و miR-145 به طور معناداری نسبت به نمونه های نرمال کمتر بود.

که وجود یک ارتباط تنظیمی معکوس مـابین MALAT1 lncRNA بـا دو میکـرو RNA ترشـحی mir-145 و mir-211 را نشان می دهد.

۲) در گام دوم از آن جایی که یکی از اهـداف ایـن مطالعـه تعیـین ارتبـاط سـطوح بیـانی noncoding RNAهـای منتخـب بـا پارامترهای پاتولوژیکی سرطان پستان بود، در پی آن برآمدیم کـه بیـان MALAT1 lncRNA و میکـرو RNA هـای ترشـحی miR-211 و miR-145 را که بین بیماران با stage های مختلف بررسی کنیم، دیـده شـد کـه سـطح بیـانی MALAT1 در stageIII بیماری، بیان آن افزایش یافته نسبت به گروه بیماران در stage های I و II می باشـد. و در مـورد میکـرو RNA هـای ترشحی miR-211 و miR-145 نیز نتایج نشان داد که سطح بیانی آن ها در stage III بیانش کاهش پیدا کرده است نسبت به stage های I و II.

۳) گام سوم: از آنجایی که وضعیت بیانی Her2 در بیماران کارسینومای پستان ارتباط مستقیمی با روند متاستاز دارند، بـه بررسـی سطوح بیان RNA طویل غیر کد کننده ی تنظیمـی MALAT1 و میکـرو RNAهـای ترشـحی miR-211 و miR-145 در وزیکول های خارج سلولی سری بیماران کارسینومای پستان با وضعیت فعالیت Her-2 متفاوت پرداختیم.

سطوح بیانی MALAT1 lncRNA در بیماران با بیان Her-2 positive در مقایسه با بیماران Her-2 negative (عدم بیـان Her2) بیان بیشتری را نشان داد. در مقابل به بررسی microRNA های تنظیم شونده miR-211 و miR-145 پرداخته شـد، نتایج real-time PCR نشان داد که سطوح بیانی miR-211 در بیماران، فعالیت Her-2 نسـبت بـه بیمـاران بـا عـدم فعالیـت Her-2 کمتر است.

۱-۵- پیشنهادات

۱- استفاده از نتایج و روش های این تحقیق در جهت تعیین تشخیص زودهنگام سرطان پستان ر جامعه آماری بزرگتر، گروه هـای تست و کنترل با تعداد بیشتر می تواند داده های معتبرتری را حاصل نماید.

۲- بررسی پروفایل بیانی جامع microRNA ها توسط روش هایی نظیر microarray و یا RNA-sequencing. این امـر داده های گسترده و جامعی از بیان محتوای مولکولی اگزوزوم سرم بیماران ایجاد می‌نماید.

۳- تعیین اهداف عملکردی microRNA های منتخب این مطالعه و بررسی نقش آن ا ر پاتوژنز سرطان پستان

۴- نشان microRNA ای معرفی شده در این مطالعه علاوه بـر ایـن کـه مـی توانـد بـه عنـوان بیومـارکری جدیـد در تشـخیص کارسینومای پستان معرفی شود، می توانـد بـه عنـوان گزینـه ای درمـانی بـرای مطالعـات آینـده قلمـداد شـود. تنظـیم افزایشـی microRNA های منتخب این مطالعه که عملکرد تومور ساپرسور دارند می‌تواند رویکردی بالقوه برای درمـان سـرطان بـه شـمار آید.

۵- تنظیم کاهشی RNA های طویل غیرکُد کننده ی تنظیمی (lncRNA) نیز می تواند در درمان سـرطان نقـش مـوثری ایفا کند.

منابع

1. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell (1993) 75:855–62. doi: 10.1016/0092-8674(93)90530-4
2. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. Mutat Res. (2011) 717:1–8.
3. Friedlander MR, Lizano E, Houben AJ, Bezdan D, Banez-Coronel M, Kudla G, et al. Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. Genome Biol. (2014) 15:R57.
4. de Rie D, Abugessaisa I, Alam T, Arner E, Arner P, Ashoor H, et al. An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. Nat Biotechnol. (2017) 35:872–8.
5. Raposo G, Stoorvogel W (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. J Cell Biol 200(4):373– 383.
6. Coleman M, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, Angelis R, Capocaccia R, et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). Lancet Oncol. 2008;9:730-56.
7. Anderson B, Yip C, Smith R, Shyyan R, Sener S, Eniu A, et al. Guideline implementation for breast healthcare in low-income and middleincome countries: overview of the breast health global initiative global summit 2007. Cancer. 2008;113:2221-43.
8. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin. 2013;63:11-30
9. Berry D, Cronin K, Plevritis S, Fryback D, Clarke L, Zelen M, et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. N Engl J Med. 2005;353:1784-92.
10. Peng J, Sengupta S, Jordan VC. Potential of selective estrogen receptor modulators as treatments and preventives of breast cancer. Anti-Cancer Agents Med Chem. 2009;9:481-99.
11. Reeder J, Vogel V. Breast cancer prevention. Cancer Treat Res. 2008141:149 64.
12. Abdull R, Noor N. Cruciferous vegetables: dietary phytochemicals for cancer prevention. Asian Pac J Cancer Prev. 2013;14:1565-70.

13. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. CA Cancer J Clin. 2017; 67:7–30. [PubMed: 28055103]
14. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to clinic. Nat Rev Clin Oncol. 2016; 13:228-41. [PubMed: 26667975)
15. Emens LA, Ascierto PA, Darcy PK, Demaria S, Eggermont AMM, Redmond RL, Seliger B, Marincola FM. Cancer immunotherapy: opportunities and challenges in the rapidly evolving clinical landscape. Eur J Cancer. 2017 in press.
16. Cimino-Mathews A, Foote JB, Emens LA. Immune targeting in breast cancer. Oncology (Williston Park). 2015; 29:375–85. [PubMed: 25979549)
17. R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer Statistics, 2017, CA Cancer J. Clin. 67 (1) (2017) 7-30.
18. Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Duttagupta R, Willingham AT, Stadler PF, Hertel J, Hackermüller J, Hofacker IL, Bell I, Cheung E, Drenkow J, Dumais E, Patel S, Helt G, Ganesh M, Ghosh S, Piccolboni A, Sementchenko V, Tammana H, Gingeras TR. RNA maps
19. Pennisi E. Genomics. ENCODE project writes eulogy for junk DNA. Science. 2012;337(6099):1159–61.
20. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature. 2001;409(6822):860-921.
21. Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, Huarte M, Zuk O, Carey BW, Cassady JP, Cabili MN, Jaenisch R, Mikkelsen TS, Jacks T, Hacohen N, Bernstein BE, Kellis M, Regev A, Rinn JL, Lander ES, Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large noncoding RNAs in mammals. Nature. 2009;458(7235):223-7.
22. Yang JH, Li JH, Jiang S, Zhou H, Qu LH. ChIPBase: a database for decoding the transcriptional regulation of long non-coding RNA and microRNA genes from ChIP-Seq data. Nucleic Acids Res. 2013;41(Database issue):D177–87.
23. Tian T, Gong Z, Wang M, Hao R, Lin S, Liu K, Guan F, Xu P, Deng Y, Song D, Li N, Wu Y, Dai Z. Identification of long non-coding RNA signatures in triple-negative breast cancer. Cancer Cell Int. 2018;17(18):103.
24. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. CA Cancer J Clin. 2016; 66:7-30. https://doi.org/10.3322/caac.21332.
25. Fernández Y, Cueva J, Palomo AG, Ramos M, de Juan A, Calvo L, García-Mata J, García-Teijido P, Peláez I, García-Estévez L. Novel therapeutic approaches to the treatment of metastatic breast cancer. Cancer Treat Rev. 2010; 36:33-42. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2009.10.001.
26. Macias H, Hinck L. Mammary gland development. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2012; 1:533-57. https://doi.org/10.1002/wdev.35.
27. Bertone P, Stolc V, Royce TE, Rozowsky JS, Urban AE, Zhu X, Rinn JL, Tongprasit W, Samanta M, Weissman S, Gerstein M, Snyder M. Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. Science. 2004; 306:2242-6. https://doi.org/10.1126/science.1103388.
28. Yuan X, Qian N, Ling S, Li Y, Sun W, Li J, Du R, Zhong G, Liu C, Yu G, Cao D. Breast cancer exosomes contribute to pre-metastatic niche formation and promote bone metastasis of tumor cells. Theranostics. 2021;11(3):1429.

29. Wu Q, Sun S, Li Z, Yang Q, Li B, Zhu S, Wang L, Wu J, Yuan J, Wang C, Li J. Breast cancer-released exosomes trigger cancer-associated cachexia to promote tumor progression. Adipocyte. 2019 Jan 2;8(1):31-45.
30. Yu, D.D.;Wu, Y.; Zhang, X.H.; Lv, M.M.; Chen,W.X.; Chen, X.; Yang, S.J.; Shen, H.; Zhong, S.L.; Tang, J.H;. et al. Exosomes from adriamycin-resistant breast cancer cells transmit drug resistance partly by delivering miR-222. Tumour Biol. 2016, 37, 3227–3235.
31. Wei, Y.; Lai, X.; Yu, S.; Chen, S.; Ma, Y.; Zhang, Y.; Li, H.; Zhu, X.; Yao, L.; Zhang, J. Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells. Breast Cancer Res. Treat. 2014, 147, 423–431.
32. Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. Cell. 1986;44: 283–92.