پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال شانزدهم، شماره ۶، پی در پی ۸۴، صفحات ۲۶۸ تا ۲۷۶
بهمن و اسفند ۱۳۹۰

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۷/۱۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۰/۱۱/۲۸

ناپایداری میکروستلایت و بروز موتاسیون در ژن پروتئین‌های عدم تطابق ژنی DNA در مبتلایان به سرطان ارثی و غیرپولیپی کولورکتال

دکتر محمدرضا زالی[1*]، دکتر مهدی یداله‌زاده[2]، دکتر مهسا مولایی[3]، دکتر سیدرضا فاطمی[4]

۱- استاد، فوق تخصص گوارش و کبد، مرکز تحقیقات بیماری‌های دستگاه گوارش و کبد، بیمارستان طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲- دستیار تخصصی بیماریهای داخلی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و محقق مرکز تحقیقات بیماری‌های دستگاه گوارش و کبد، بیمارستان طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳- استادیار، متخصص پاتولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های دستگاه گوارش و کبد، بیمارستان طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴- استادیار، فوق تخصص گوارش و کبد، مرکز تحقیقات بیماری‌های دستگاه گوارش و کبد، بیمارستان طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: سرطان ارثی غیرپولیپی کولورکتال (HNPCC) شایعترین نوع سرطانهای کولورکتال ارثی می‌باشد. موتاسیون‌های ژرم لاین در ژنهای مختلف سیستم ترمیم عدم تطابق ژنی در DNA (MMR) و بروز ناپایداری میکروستلایت (MSI) در این سرطان دخیل است. اما هنوز در این زمینه گزارشی از بیماران مبتلا به سرطان HNPCC در ایران منتشر نشده است. هدف این مطالعه بررسی شیوع MSI و موتاسیون ژنهای MMR در بیماران ایرانی مشکوک به HNPCC می‌باشد.

مواد و روشها: در این مطالعه مقطعی ۹۴ بیمار که حداقل یکی از معیارهای بتسدا را داشته‌اند، مورد بررسی قرار گرفته‌اند. وضعیت MSI در تمام بیماران تعیین گردید و بطور جداگانه برای تمام بیماران SSCP نیز انجام شد و بررسی سکانس‌های DNA در موارد دارای باند شیفت صورت پذیرفت. جهت آنالیز آماری از نرم‌افزارهای SPSS16 و آزمونهای Chi2، Fisher's exact و T-independent test استفاده است.

یافته‌ها: در ۴۱/۵٪ MSI-H و در ۱۷٪ MSI-L و در ۴۱/۵٪ MSS بودند. در ۱۸ مورد (۱۹/۱٪) Band shift در SSCP وجود داشت که در ۸ مورد موتاسیون در ژنهای فوق بعد از تعیین سکانس DNA رخ داده بود.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد توزیع موتاسیون در MMR در بیماران ایرانی مبتلا به HNPCC متفاوت از گزارشات کشورهای دیگر باشد و با توجه به این که ارزیابی ژنتیکی سرطان کولورکتال در ایران پرهزینه بوده و مطالعات چندانی در این زمینه انجام نشده است فراوانی درگیری ژن‌های دیگر MMR و مابقی ژن‌های مطرح در بروز HNPCC همچنان در پرده ابهام می‌باشد.

واژگان کلیدی: سرطان ارثی غیرپولیپی کولورکتال، سیستم ترمیم عدم تطابق ژنی، ناپایداری میکروستلایت، موتاسیون، ایران.

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:
Zali MR, Yadollahzadeh M, Molaei M, Fatemi SR. DNA microsatellite instability and mismatch repair germline mutation in Iranian patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer. Pejouhandeh 2012;16(6):268-76.

مقدمه

سرطان ارثی غیرپولیپی کولورکتال (Hereditary Non Polyposis colorectal cancer: HNPCC) شایع‌ترین نوع سرطانهای کولورکتال ارثی می‌باشد. هر چند که طیف شیوع آن را ۱ تا ۱۰٪ در سرطان‌های کولورکتال می‌دانند اما همچنان میزان بروز دقیق آن مورد اختلاف نظر است. در سال ۱۹۹۱، گروه بین‌المللی HNPCC (ICG-HNPCC) معیارهای آمستردام I و در سال ۱۹۹۹ بازنگری شده آن یعنی معیارهای آمستردام II را جهت شناسایی موارد

*نویسنده مسؤول مکاتبات: تهران، اوین، بیمارستان طالقانی، طبقه هفتم، مرکز تحقیقات بیماری‌های دستگاه گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی؛ تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۲۵۱۵؛ پست الکترونیک: nnzali@hotmail.com

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-07]

مشکوک به این بیماری مطرح کرده‌اند (۱) در سال ۱۹۹۷ نیز سازمان بین‌المللی سرطان در طی کارگاه بین‌المللی HNPCC راهنمای بتسدا (Bethesda) را بر اساس سابقه خانوادگی، هیستوپاتولوژی تومور و آزمایش ناپایداری میکروسلایت (MSI)، جهت تشخیص موارد مشکوک به HNPCC پیشنهاد دادند (۲ و ۳) که در سال ۲۰۰۴ مورد بازنگری قرار گرفته است و در حال حاضر به عنوان قابل قبول‌ترین استراتژی تشخیصی مورد اتفاق نظر می‌باشد (۴).

پیشرفت‌های اخیر در ژنتیک مولکولی سبب آشکار شدن و تعیین توالی برخی از ژن‌های مسئول بروز HNPCC شده‌اند (۵). از جمله مشخص شده که موتاسیون‌های ژرم لاین در ژنهای مختلف سیستم ترمیم عدم تطابق ژنی در (MMR) DNA شامل 2p16 در MSH2، 3p21 در MLH1، 2q31 در PMS1، 7p22 در PMS2 و 2p16 در MSH6 با بروز HNPCC مرتبط هستند (۶).

بر اساس مطالعات موتاسیونها و ارتباط سنجی (linkage study) ژن‌های MLH1 و MSH2 مسئول اصلی و مشترک حدود ۸۰٪ HNPCCها می‌باشند (۵، ۷ و ۹) بیشتر این موتاسیون‌ها در اثر میکروموتاسیون (موتاسیون نقطه‌ای)، حذف یا اضافه شدن قطعه‌ای کوچک در ژنوم می‌باشند (۱۰ و ۱۱). حذف قطعات بزرگ در ژنهای MLH1 و MSH2 (بخصوص MSH2) ممکن است رخ بدهد (۷). به علاوه مطالعات اخیر نشان داده‌اند که متیلاسیون مناطق CpG (سیتوزین- فسفودی استر- گوانین) منطقهٔ پروموتور ژن MLH1 یکی از مکانیسم‌های دیگر غیرفعال کننده ژن فوق و بروز سرطان می‌باشد (۷ و ۱۲).

وجود موتاسیون در ژرم لاین سیستم ترمیم عدم تطابق DNA سبب بروز ناپایداری میکروسلایت (Microsatellite instability) (MSI) می‌شود. MSI را بر حسب میزان ناپایداری به سه گروه MSI-High (MSI-H)، MSI-Low (MSI-L) و MS Stable (MSS)دسته‌بندی می‌کنند (۵ و ۱۳). در گزارشات مختلف آمده است که بیش از ۹۰٪ بافتهای تومورال در مبتلایان به HNPCC, MSI-H بوده‌اند (۱۴). اما هنوز در این زمینه گزارشی از بیماران مبتلا به HNPCC در ایران منتشر نشده است. هدف این مطالعه بررسی موضوع مطرح شده در بین گروهی از بیماران ایرانی با تشخیص بالینی HNPCC می‌باشد.

مواد و روشها

در این مطالعه توصیفی – مقطعی پس از انجام هماهنگی های لازم با مراکز بیمارستانی دانشگاهی در سراسر کشور بیمارانی که با شک به HNPCC در طی سالهای ۱۳۸۲ تا ۱۳۸۷ به مرکز تحقیقات بیماری‌های دستگاه گوارش و کبد بیمارستان طالقانی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (RCGLD) ارجاع شده بودند، ابتدا در مورد پژوهش حاضر و اهداف و مراحل انجام آن توضیح کامل به هر یک از بیماران داده شد و پس از اخذ رضایت نامه از آنها برای شرکت در پژوهش هریک از بیماران مورد مصاحبه و بررسی معیارهای بتسدا قرار گرفتند. معیارهای بتسدا که در این مطالعه مدنظر بوده‌اند شامل موارد زیر می‌باشد:

۱)تشخیص سرطان کولورکتال در بیمار با سن کمتر از ۵۰ سال ۲) وجود یک سرطان سین کرونوس یا متاکرونوس کولورکتال یا سایرتومورهای مرتبط با HNPCC (شامل سرطانهای کولورکتال، اندومتریوم، معده، تخمدان، پانکراس، حالب و لگنچه کلیه، مجاری صفراوی و مغز، آدنوم غدد سباسه و کراتوآکانتوم و کارسینومهای روده باریک) صرف نظر از سن بیمار ۳) سرطان کولورکتال با بافت شناسی خاصی که طبق مطالعات در MSI-H بیشتر دیده می شود (یعنی لنفوسیتهای ارتشاح یافته در تومور، واکنش لنفوسیت شبه کرون، تمایز موسینی و یا Signet ring و نمای رشد مدولاری) در بیماران جوانتر از ۶۰ سال ۴) وجود سرطان کولورکتال در بیماری که حداقل یک نفر از بستگان درجه اولش مبتلا به تومورهای مرتبط با HNPCC باشد و حداقل یکی از آنها در زمان تشخیص سرطان کمتر از ۵۰ سال سن داشته باشند ۵) وجود سرطان کولورکتال در بیماری که حداقل دو نفر از بستگان درجه اول یا دوم ایشان مبتلا به تومورهای مرتبط با HNPCC باشد (بدون در نظر گرفتن سن آنها) (۳).

بدین ترتیب بعد از توضیح مطالعه و اخذ رضایت از از بیمارانی که حداقل یکی از معیارهای بتسدا را داشتند، نمونه‌های خون جهت انجام آزمایشات ژنتیکی گرفته شد. ژنهای DNA با استفاده از پروتکلهای استاندارد استخراج شد (۱۵) و نمونه‌های بافتی تومور که در فرمالین ثابت و سپس پارافینیزه شده بود از مراکز پاتولوژی اولیه جمع‌آوری گردید و در بخش پاتولوژی مرکز تحقیقات بیماری‌های دستگاه گوارش و کبد بیمارستان طالقانی (RCGLD) از نظر نمای بافت شناختی و ناپایداری میکروسلایت بررسی شدند.

جهت استخراج DNA ژنومی از خون محیطی ابتدا ۱۰ میلی لیتر از خون وریدی بیمار با مقدار ۲۰۰ میکرولیتر EDTA

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-07]

(Ethylene Diamine Tetraacetic acid) ۰/۵ مولار به عنوان ماده ضد انعقاد مخلوط شد (از آنجایی که هپارین به عنوان ماده ضد انعقاد در مراحل بعدی مطالعه (PCR) ایجاد مشکل می‌نماید نمی توان از این ماده به عنوان ماده ضد انعقاد استفاده کرد). سپس برای جداسازی گلبول‌های سفید خون از آب مقطر سرد جهت لیز کردن گلبول‌های قرمز خون استفاده شد. پس از انجام مراحل شستشو و جداسازی گلبول‌های سفید، جهت لیز کردن گلبول‌های سفید باقیمانده و از بین بردن پروتئین‌های موجود از محلولهای STE 1X (10%) (Saline Tris-EDTA)و SDS (10%) (Sodium dodecyl sulfate) و پروتئیناز K استفاده شد و گلبولهای سفید به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شدند. پس از لیز شدن گلبولهای سفید از محلول فنل - کلرفرم جهت رسوب دادن پروتئینهای موجود استفاده شد. در مرحله بعد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با استفاده از سانتریفوژ یخچال‌دار محلول حاوی DNA از رسوب بدست آمده جدا شد. سپس ایزوپروپانول به محلول حاصل اضافه شد و بدین ترتیب کلاف DNA قابل مشاهده گردید و DNA حاصل با استفاه از پیپت پاستور به تیوب ۱/۵ میلی-لیتری منتقل شد. جهت شستشوی DNA از الکل اتانول با غلظت ۷۰٪ استفاده شد. این مرحله از اهمیت زیادی برخوردار است چراکه عدم شستشوی دقیق DNA در این مرحله در مراحل بعدی مطالعه مشکلات زیادی را ایجاد می‌کند. سپس از محلول TE (10 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA) جهت حل کردن و نگهداری DNA استفاده شد. در مرحله بعد غلظت و کیفیت DNA به دست آمده با استفاده از دستگاه بیوفتومتر ارزیابی گردید. نسبت جذب نوری در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر برای نمونه ها بطور متوسط ۱/۸ و غلظت آنها بسته به میزان گلبول های سفید خون بین ۴۰۰ الی ۲۰۰۰ میکرولیتر در میلی لیتر بود که بدین ترتیب DNA بدست آمده از این روش دارای کیفیت و کمیت بسیار خوبی بوده و در طی پژوهش مورد استفاده قرار گرفت (۱۵).

جهت بررسی وضعیت پایداری میکروستلایت از ۵ شاخص (میکروستلایت) Bat-25، Bat-26، D5S346، D2S123 و D17S250 استفاده شد. وضعیتMSI در صورت وجود موتاسیون حداقل در دو شاخص MSI-H، وجود موتاسیون در یک شاخص MSI-L و اگر هیچکدام از ۵ مارکر میکروستلایت موتاسیون نداشتند MSS در نظر گرفته شد (۱۶ و ۱۷).

پس از تهیه پرایمرهای خاص میکروستلایت‌ها تکثیر ناحیه مربوطه با استفاده از PCR در نمونه های مربوط به سلول‌های نرمال و تومورال هر بیمار صورت گرفت. سکانس پرایمرهای مورد استفاده مطابق جدول ۱ بود:

جدول ۱: سکانس پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش

Bat-25	Primer forward:	5`- gTT TCg CCT CCA AgA ATg TAA gT-3`
	Primer reverse:	5`- gTT TCT gCA TTT TAA CTA Tgg CTC-3`
Bat-26	Primer forward:	5’ -CTG CTA CTT TTG AC T TCC GCC -3’
	Primer reverse:	5’ -AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC -3’
D2S123	Primer forward:	5`-TCA ACA TTg CTg gAA gTT CT-3`
	Primer reverse:	5`-gAC TTT CCA CCT ATg ggA CT-3`
D17S250	Primer forward:	5`-ggA AgA ATC AAA TAg ACA AT- 3`
	Primer reverse:	5`-gCT ggC CAT ATA TAT ATT TAA ACC -3`
D5S346	Primer forward:	5`-ACT CAC TCT AgT gAT AAA TCg gg-3`
	Primer reverse:	5`- AgC AgA TAA gAC AgT ATT ACT AgT T-3`

جهت تعیین سکانس‌های DNA وجود موتاسیون در ژن‌های MMR، از بیماران نمونه خون وریدی گرفته شد و بعد از جداسازی بافی‌کوت، با استفاده از روش فنول – کلروفرم از WBCها، DNA استخراج گردید و با انجام PCR (Polymerase Chain Reaction)، DNA تکثیر یافته و از محصولات حاصل از PCR (PCR-product) جهت غربالگری از هر بیمار یک نمونه برای انجام SSCP (Single Stranded Conformational Polymorphism) و تعیین موارد مشکوک به وجود موتاسیون استفاده گردید. سپس مواردی که در مقایسه با نمونه کنترل تغییر در الگوی باندها و یا اصطلاحاً band shift داشتند، برای تعیین سکانس DNA و تشخیص نوع موتاسیون شناسایی شدند و بعد با استفاده از dNTPs (deoxynucleotid triphosphates –12) و ddNTPs (dideoxynucleotid triphosphates–13,12 fluorescently labeled) سکانس‌های مربوطه در DNA مشخص و تعیین شدند (۱۸ و ۱۹).

ارتباط آماری بین متغیرهای کیفی بوسیله آزمون Chi2 و یا Fisher's exact و جهت مقایسه میانگین داده‌های کمی از

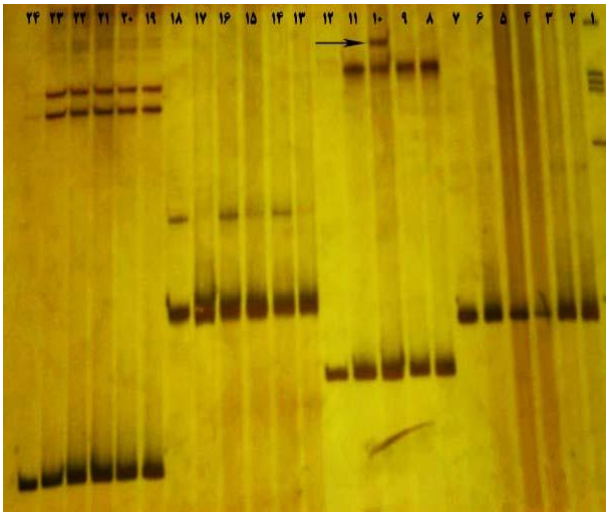
[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-07]

جدول ۱: توزیع MSI* و موتاسیون ژرم‌لاین در ژنهای MLH1 و MSH2 در بیماران مشکوک به HNPCC* که در SSCP باند شیفت داشته‌اند.

شماره	سن	جنس	سابقه خانوادگی سرطانهای با HNPCC	MSI	شاخص ناپایدار در MSI	نتیجه آزمون SSCP	موتاسیون
۱	۴۸	زن	مثبت	MSI-H	bat25, bat26	Shift in exon 15 of MLH1 gene	Allelic variant
۲	۵۳	مرد	مثبت	MSI-H	bat25, bat26	Shift in exon 9 of MLH1 and exon 2 MSH2 gene	Allelic variant
۳	۴۶	مرد	مثبت	MSI-H	bat25, bat26	Shift in exon 15 of MLH1 gene	Allelic variant
۴	۴۱	مرد	مثبت	MSI-H	bat25, bat26	Shift in exon 19 of MLH1 gene	C. 2146_2147 del GT(val→Stop)
۵	۳۷	زن	منفی	MSI-H	bat25, bat26	Shift in exon 11 of MLH1 gene	C. 326 T>C (Val→Ala)
۶	۳۲	زن	مثبت	MSI-H	bat25, bat26	Shift in exon 13 of MLH1 gene	C. 487 C>T (Arg→stop)
۷	۲۶	زن	مثبت	MSI-L	d17s250	Shift in exon 5 of MLH1and exons 3,13 MSH2 gene	C. 735 C>T (Ileu→Ileu)
۸	۵۳	مرد	مثبت	MSS	-----	Shift in exon 5 of MLH1 and exon 12 MSH2 gene	C.136 A>T (Lys→Stop)
۹	۷۵	مرد	مثبت	MSI-L	bat25	Shift in exons 6,8,9,12 of MLH1 gene	
۱۰	۶۷	مرد	مثبت	MSI-L	bat25	Shift in exon 9 of MLH1 and exon 15 MSH2 gene	
۱۱	۲۸	مرد	مثبت	MSI-H	bat25, d17s250	Shift in exon 5 of MLH1 gene	
۱۲	۲۰	مرد	منفی	MSI-H	bat25, bat26, d17s250	Shift in exon 1 of MLH1 gene	
۱۳	۴۶	مرد	منفی	MSI-H	bat25, bat26	Shift in exon 15 of MLH1 gene	
۱۴	۴۷	زن	مثبت	MSS	-----	Shift in exon 3 of MLH1 gene	
۱۵	۵۴	زن	منفی	MSS	-----	Shift in exon 5 of MLH1 gene	
۱۶	۲۶	زن	منفی	MSS	-----	Shift in exon 13 of MLH1 and exon 13 MSH2 gene	
۱۷	۴۷	زن	مثبت	MSS	-----	Shift in exon 8 MSH2 gene	
۱۸	۴۷	مرد	مثبت	MSI-L	d17s250	Shift in exon 6,12 of MLH1 gene	

*. MSI: ناپایداری میکروستلایت، HNPCC: سرطان غیرپولیپی ارثی کولورکتال.

آزمون independent T-test، توسط نرم افزار SPSS16 استفاده شد.



شکل ۱: بررسی SSCP اگزون شماره ۱۳ ژن hMLH1 ، در ردیف ۱۰ شیفت واضحی (پیکان) را مشاهده می‌کنید (مربوط به بیمار شماره ۶ جدول ۱)؛ ردیف ۱ مربوط به اندازه مارکر می باشد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۹۴ بیمار (۵۵ مرد و ۳۹ زن) با میانگین سنی ۴۳/۳۰ سال (SD=۱۱/۳۵) بررسی شدند که ۵۳ مورد (۵۶/۴٪) سابقه سرطان مرتبط با HNPCC را در خانواده داشتند. در بررسی MSI انجام شده در ۳۹ مورد (۴۱/۵٪) MSI-H و در ۱۶ مورد (۱۷٪) MSI-L و در ۳۹ مورد (۴۱/۵٪) MSS بودند. در ۱۸ مورد (۱۹/۱٪) Band shift در SSCP وجود داشت (شکل ۱) که در ۸ مورد موتاسیون در ژنهای MMR بعد از تعیین سکانس DNA رخ داده بود. در ۴ مورد موتاسیون جدید و در ۳ مورد واریانت آللی و در یک مورد نیز موتاسیون همسان Synonymous رخ داده بود. نحوه توزیع MSI و شاخصهای دیگر در جدول ۱ توضیح داده شده است.

از نظر آماری اختلاف معنی‌دار بین توزیع سابقه خانوادگی، محل تومور، درجه دیسپلازی، مرحله سرطان، نوع تومور، میانگین سن بیماران و میانگین اندازه تومور بین دو گروه

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-07]

جدول ۲: مقایسه متغیرهای مورد بررسی برحسب نوع MSI در بیماران مشکوک به HNPCC*

متغیر		MSI-H	MSI-l & MSS	مجموع
جنس	مرد	۲۸ (٪۵۰/۹)	۲۷ (٪۴۹/۱)	۵۵ (٪۱۰۰)
	زن	۱۱ (٪۲۸/۲)	۲۸ (٪۷۱/۸)	۳۹ (٪۱۰۰)
سابقه خانوادگی سرطانهای مرتبط با HNPCC	مثبت	۲۳ (٪۴۳/۴)	۳۰ (٪۵۶/۶)	۵۳ (٪۱۰۰)
	منفی	۱۶ (٪۳۹)	۲۵ (٪۶۱)	۴۱ (٪۱۰۰)
نوع تومور	آدنوکارسینوم	۳۴ (٪۴۲)	۴۷ (٪۵۸)	۸۱ (٪۱۰۰)
	موسینوس آدنوکارسینوم	۵ (٪۳۸/۵)	۸ (٪۶۱/۵)	۱۳ (٪۱۰۰)
درجه دیسپلازی	تمایز زیاد	۱۷ (٪۳۸/۶)	۲۷ (٪۶۱/۴)	۴۴ (٪۱۰۰)
	تمایز متوسط	۱۴ (٪۴۶/۷)	۱۶ (٪۵۳/۳)	۳۰ (٪۱۰۰)
	تمایز کم	۵ (٪۶۲/۵)	۳ (٪۳۷/۵)	۸ (٪۱۰۰)
مرحله سرطان	Stage I	۰ (٪۰)	۴ (٪۱۰۰)	۴ (٪۱۰۰)
	Stage II	۱۴ (٪۴۰)	۲۱ (٪۶۰)	۳۵ (٪۱۰۰)
	Stage III	۱۵ (٪۴۵/۵)	۱۸ (٪۵۵/۵)	۳۳ (٪۱۰۰)
	Stage IV	۲ (٪۳۳/۳)	۴ (٪۶۶/۷)	۶ (٪۱۰۰)
محل تومور	راست کولون	۲۸ (٪۴۹/۱)	۲۹ (٪۵۰/۹)	۵۷ (٪۱۰۰)
	چپ کولون	۱۰ (٪۳۳/۳)	۲۰ (٪۶۶/۷)	۳۰ (٪۱۰۰)
محل دقیق تومور	سکوم	۱۰ (٪۴۷/۶)	۱۱ (٪۵۲/۴)	۲۱ (٪۱۰۰)
	کولون صعودی	۱۲ (٪۵۴/۵)	۱۰ (٪۴۵/۵)	۲۲ (٪۱۰۰)
	خم کبدی	۲ (٪۱۰۰)	۰ (٪۰)	۲ (٪۱۰۰)
	کولون عرضی	۴ (٪۳۳/۳)	۸ (٪۶۶/۷)	۱۲ (٪۱۰۰)
	خم طحالی	۲ (٪۴۰)	۳ (٪۶۰)	۵ (٪۱۰۰)
	کولون نزولی	۲ (٪۵۰)	۲ (٪۵۰)	۴ (٪۱۰۰)
	سیگموئید	۰ (٪۰)	۳ (٪۱۰۰)	۳ (٪۱۰۰)
	رکتوسیگموئید	۲ (٪۴۰)	۳ (٪۶۰)	۵ (٪۱۰۰)
	رکتوم	۴ (٪۳۰/۸)	۹ (٪۶۹/۲)	۱۳ (٪۱۰۰)
سن	میانگین	۴۲/۰۸	۴۴/۱۶	۴۳/۳
	انحراف استاندارد شده (SD)	۱۱/۶۵	۱۱/۱۶	۱۱/۳۵
اندازه تومور	میانگین	۷۴/۹۱	۵۳/۶۸	۶۱/۹
	انحراف استاندارد شده (SD)	۶۶/۶۳	۲۲/۱۳	۴۵/۶

*. فقط اختلاف بین دو جنس از نظر آماری معنی دار است(P <-/۰۳۵).

MSI-H و (MSSوMSI-L) وجـود نداشـت امـا از نظـر توزیـع جنسی اختلاف معنی‌دار وجود داشت (P < ۰/۰۳۵، جـدول۲). بطور مشابه بین دو گـروه دارای موتاسـیون ژرم لایـن و بـدون موتاسیون نیز اختلاف آماری بـین متغییرهـای مـورد بررسـی وجود نداشت (جدول۳).

بحث

هدف از انجام این مطالعه تعیین موتاسیون MMR و توزیع MSI در ۹۴ بیمار مشکوک به HNPCC (بر اساس وجود حداقل یک معیار بتسدا) می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ۷۵٪ تومورهای دارای موتاسیون ژرم لاین در MLH1 و یا MSH2، MSI-H هستند. همچنین بیشتر از نیمی از بیماران (٪۵۸/۵) MSI-H نبودند. با توجه به انجام SSCP در تمام بیماران و بررسی موارد دارای باند شیف به نظر می‌رسد که مواردی که MSI-L و یا MSS بوده و SSCP آنها نیز طبیعی بوده است موتاسیون MMR نداشته باشند.

رفتار بیولوژیکی سرطان‌های کولورکتال در انواع با نقص و بدون نقص MMR با هم متفاوت می‌باشد (۲۰ و ۲۱). برخلاف این که خطر بروز در بیماران مبتلا به موتاسیون بروز بیماری‌های متاکرونوس بیشتر است اما پیش‌آگهی آنها نسبت به گروه نقص عملکرد MMR بهتر است (۲۲). به علاوه شواهد تجربی از پاسخ بهتر و مناسب‌تر تومورهای با نقص عملکرد MMR نسبت به شیمی درمانی نیز وجود دارد (۲۳). لذا تشخیص و تعیین بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال با نقص MMR ارزشمند می‌باشد. اما مشکل بالقوه در معاینات بالینی روزانه این است که آزمایش‌های ژنتیکی MMR گران قیمت و

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-07]

جدول ۳. مقایسه متغیرهای مورد بررسی برحسب وجود موتاسیون ژرم لاین در MLH1 و یا MSH2 در بیماران مشکوک به HNPCC*

متغیر		با موتاسیون	بدون موتاسیون	مجموع
جنس	مرد	۴ (٪۷/۳)	۵۱ (٪۹۲/۷)	۵۵ (٪۱۰۰)
	زن	۴ (٪۱۰/۳)	۳۵ (٪۸۹/۷)	۳۹ (٪۱۰۰)
سابقه خانوادگی سرطان-های مرتبط با HNPCC	مثبت	۷ (٪۱۳/۲)	۴۶ (٪۸۶/۸)	۵۳ (٪۱۰۰)
	منفی	۱ (٪۲/۴)	۴۰ (٪۹۷/۶)	۴۱ (٪۱۰۰)
نوع تومور	آدنوکارسینوم	۸ (٪۹/۹)	۷۳ (٪۹۰/۱)	۸۱ (٪۱۰۰)
	موسینوس آدنوکارسینوم	۰ (٪۰)	۱۳ (٪۱۰۰)	۱۳ (٪۱۰۰)
درجه دیسپلازی	تمایز زیاد	۳ (٪۶/۸)	۴۱ (٪۹۳/۲)	۴۴ (٪۱۰۰)
	تمایز متوسط	۴ (٪۱۳/۳)	۲۶ (٪۸۶/۷)	۳۰ (٪۱۰۰)
	تمایز کم	۰ (٪۰)	۸ (٪۱۰۰)	۸ (٪۱۰۰)
مرحله سرطان	Stage I	۰ (٪۰)	۴ (٪۱۰۰)	۴ (٪۱۰۰)
	Stage II	۴ (٪۱۱/۴)	۳۱ (٪۸۸/۶)	۳۵ (٪۱۰۰)
	Stage III	۰ (٪۰)	۳۳ (٪۱۰۰)	۳۳ (٪۱۰۰)
	Stage IV	۰ (٪۰)	۶ (٪۱۰۰)	۶ (٪۱۰۰)
محل تومور	راست کولون	۵ (٪۸/۸)	۵۲ (٪۹۱/۲)	۵۷ (٪۱۰۰)
	چپ کولون	۳ (٪۱۰)	۲۷ (٪۹۰)	۳۰ (٪۱۰۰)
محل دقیق تومور	سکوم	۲ (٪۹/۵)	۱۹ (٪۹۰/۵)	۲۱ (٪۱۰۰)
	کولون صعودی	۲ (٪۹/۱)	۲۰ (٪۹۰/۹)	۲۲ (٪۱۰۰)
	خم کبدی	۰ (٪۰)	۲ (٪۱۰۰)	۲ (٪۱۰۰)
	کولون عرضی	۱ (٪۸/۳)	۱۱ (٪۹۱/۷)	۱۲ (٪۱۰۰)
	خم طحالی	۲ (٪۴۰)	۳ (٪۶۰)	۵ (٪۱۰۰)
	کولون نزولی	۰ (٪۰)	۴ (٪۱۰۰)	۴ (٪۱۰۰)
	سیگموئید	۰ (٪۰)	۳ (٪۱۰۰)	۳ (٪۱۰۰)
	رکتوسیگموئید	۰ (٪۰)	۵ (٪۱۰۰)	۵ (٪۱۰۰)
	رکتوم	۱ (٪۷/۷)	۱۲ (٪۹۲/۳)	۱۳ (٪۱۰۰)
سن	میانگین	۴۲	۴۳/۴۲	۴۳/۳
	انحراف استاندارد شده (SD)	۹/۸۲	۱۱/۵۲	۱۱/۳۵
اندازه تومور	میانگین	۸۸/۷۵	۵۷/۹۲	۶۱/۹
	انحراف استاندارد شده (SD)	۷۵/۱۰	۳۹/۰۴	۴۵/۶

*. در هیچ موردی اختلاف معنی دار آماری دیده نشد.

زمان‌بر هستند، در نتیجه غربالگری بیماران با سرطان کولورکتال برای تشخیص موتاسیون ژرم‌لاین در ژن‌های MMR در حال حاضر صرفاً در بیمارانی انجام می‌شود که معیارهای پایه‌ای بیماری‌های ارثی را دارند؛ مثل بروز سرطان در جوانی، وجود تومور در سمت راست و با انتقال غالب سرطان‌های کولورکتال در خانواده (۱۸). در مطالعه حاضر بین متغیرهای جنسیت، سابقه خانوادگی، محل تومور، درجه دیسپلازی، مرحله سرطان، نوع تومور، میانگین سن و اندازه تومور برحسب وجود موتاسیون اختلاف آماری معنی‌دار وجود نداشت؛ هر چند که هیچ کدام از تومورهای دارای موتاسیون، درجه دیسپلازی با تمایز کم نداشتند و از نوع موسینوس آدنوکارسینوم هم نبودند، اما در هر صورت با توجه به این یافته‌ها انجام غربالگری در بیماران جوان و تومورهای سمت راست و سابقه خانوادگی در جمعیت ایرانی کمک کننده نبوده و می‌بایست مورد تجدیدنظر قرار بگیرند؛ هر چند که انجام مطالعه‌ای با تعداد نمونه‌های دارای موتاسیون بیشتر در این زمینه لازم است. تعیین نمای بالینی بیماران ایرانی مبتلا به

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-07]

کانسر کولورکتال نیز ممکن است در تعیین معیارهای بالینی قابل توجه برای غربالگری کمک کننده باشد.

موتاسیون‌های MLH1 یا MSH2 به ترتیب در (۶۴-۴۵٪) و (۴۷-۰٪) از خانواده‌های با معیارهای آمستردام مثبت و منفی یافت شده‌اند (۱۹). این واقعیت که موتاسیون‌های ژرم‌لاین در MLH1 و MSH2 ممکن است در نسبت قابل توجهی از خانواده‌های دارای HNPCC کلاسیک یافت نشوند؛ ممکن است با درگیر بودن ژن‌های دیگری از MMR توضیح داده شود. MSH6 و PMS2 و ژن‌هایی که اخیراً توصیف شده‌اند مثل MLH3 و EXO1 کاندیداهایی برای این رابطه بین بیماری و علت ژنی در خانواده‌های با MSH2 و MLH1 طبیعی باشند. به علاوه دکتر Yan و همکارانش به وسیله پروتکل‌های تشخیصی موتاسیون بسیار حساس MAMA (Conversion technology or monoallelic mutation analysis) نشان داده اند که در تمام خانواده‌های مبتلا به «HNPCC کلاسیک»، MLH1 یا MSH2 درگیر می‌باشد (۲۴). اما در پژوهش ما تنها ۸ مورد (۸/۵٪) موتاسیون در ژن‌های MLH1 یا MSH2 یافت شد که از مطالعات فوق کمتر می‌باشد. این موضوع نشان می‌دهد که فراوانی موتاسیون در ژن‌های MMR مثل MSH6 و PMS2 در بیماران ایرانی نیازمند بررسی می‌باشد.

از سوی دیگر دکتر Pérez-Cabornero و همکارانش با بررسی ۱۵۹ خانواده مبتلا به سندرم لینچ در اسپانیا موفق به کشف یک مورد موتاسیون جدید در ژن MSH2 (c.859-1860-646- 254 del) شد (۲۵). همچنین دکتر Pérez-Cabornero و همکارانش در مطالعه‌ای دیگر بر روی ۳۰۳ بیمار مبتلا به سندرم لینچ در اسپانیا موتاسیون‌های جدیدی دیگری را گزارش کرده است که شامل دیلاتاسیون exon 7 و دیلاتاسیون exon 4 تا exon 8 از MSH2 بودند (۲۶). در چین نیز دکتر Wei و همکارانش با بررسی ۹۸ بیمار مبتلا به HNPCC سه موتاسیون جدید را معرفی نموده‌اند که شامل (c.157_160delGAGG,c.2157dupTandc.-64G>T) در ژن MLH1 بودند و یک نقطه مشکوک به hotspot در ژن MSH2 (c.1168C>T) را نشان دادند (۲۷). بدین ترتیب با مقایسه این گزارشات و نیز بررسی جدول شماره ۱ موتاسیون‌های موجود در بیماران ما مشخص می‌باشد که اختلافات قومی و نژادی بین جمعیت‌های مختلف، موتاسیون‌ها و ذخیره ژنتیکی متفاوتی را ایجاد کرده و لذا در هر جمعیت و کشوری تشکیل بانک اطلاعات ژنتیکی و تعیین شیوع موتاسیون‌ها می‌تواند راهکار مؤثری در بررسی بیماران و خانواده های مشکوک به HNPCC باشد. از سوی دیگر با توجه به پرهزینه بودن مطالعات ژنی و نیز محدودیت‌های موجود از نظر وسایل و لوازم و تجهیزات، در این مطالعه سعی شده است تا با استفاده از تست غربالگری SSCP تا حد امکان مواردی که احتمال وجود موتاسیون در آنها زیاد است، مورد آنالیز و تعیین سکانس DNA قرار گیرد که این موضوع می‌تواند سبب کاهش موارد تشخیص داده شده موتاسیون گردد که از محدودیت‌های موجود در این مطالعه می‌باشد. بدین ترتیب تعیین وضعیت MSI و نیز تعیین سکانس‌های DNA را در کلیه بیماران و حداقل برای ژن‌های MLH1، MSH2، MSH3 و PMS2 ضروری است، اما با توجه به اینکه تعیین سکانس‌های DNA بسیار پرهزینه است و برای کلیه بیماران مشکوک قابل انجام نیست، لذا با توجه به پژوهش‌های منتشر شده (۲۸ و ۲۹)، تعیین وضعیت MSI و رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی (IHC) را به عنوان تست غربالگری در کلیه بیماران مشکوک توصیه می‌کنیم.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد توزیع موتاسیون در MMR در بیماران ایرانی مبتلا به HNPCC متفاوت از گزارشات کشورهای دیگر باشد و با توجه به این که ارزیابی ژنتیکی سرطان کولورکتال در ایران پرهزینه بوده و مطالعات چندانی در این زمینه انجام نشده است فراوانی درگیری ژن‌های دیگر MMR و مابقی ژن‌های مطرح در بروز HNPCC همچنان در پرده ابهام می‌باشد.

REFERENCES

1- Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. Gastroenterol 1999;116(6):1453-6.

2- Rodriguez-Bigas M, Boland C, Hamilton S. A national cancer institute workshop on hereditary non polyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights an Bethesda guidelines. J Nation Cancer Inst 1997;89(23):1758-62.

3- Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. J Natl Cancer Inst 2004;18;96(4):261-8.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-07]

4- Niessen R, Berends M, Wu Y, Sijmons R, Hollema H, Ligtenberg M. Identification of mismatch repair gene mutations in young patients with colorectal cancer and in patients with multiple tumours associated with hereditary non-polyposis colorectal cancer. Gut 2006;55:1781-8.

5- Peltomäki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. Hum Mol Gen 2001;10(7):735-40.

6- Wu Y, Berends M, Sijmons R. A role for MLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Nat Genet 2001;29:137.

7- Sheng J-Q, Zhang H, Ji M, Fu L, Mu H, Zhang M. Genetic diagnosis strategy of hereditary non-polyposis colorectal cancer. World J Gastroenterol 2009;15(8):983-9.

8- Nystrom-Lahti M, Wu Y, Moisio A, Hofstra R, Osinga J, Mecklin J. DNA mismatch repair gene mutations in 55 kindreds with verified or putative hereditary non-polyposis colorectal cancer. Hum Mol Genet 1996;5:763-9.

9- Peltomaki P, Gao X, Mecklin J. Genotype and phenotype in hereditary nonpolyposis colon cancer: a study of families with different vs. shared predisposing mutations. Fam Cancer 2001;1:9-15.

10- Wagner A, Barrows A, Wijnen J, Klift Hvd, Franken P, Verkuijlen P. Molecular analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the United States: high mutation detection rate among clinically selected families and characterization of an American founder genomic deletion of the MSH2 gene. Am J Hum Genet 2003;72:1088-1100.

11- Wang Y, Friedl W, Lamberti C, Jungck M, Mathiak M, Pagenstecher C. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: frequent occurrence of large genomic deletions in MSH2 and MLH1 genes. Int J Cancer 2003;103:636-41.

12-Jones P, Laird P. Cancer epigenetics comes of age. Nat Genet 1999;21:163-7.

13- Huang J, Zheng S, Jin S, Zhang S. Somatic mutations of APC gene in carcinomas from hereditary non-polyposis colorectal carcinoma patients. World J Gastroentrol 2004;10(6):834-36.

14- Clendenning M, Senter L, Hampel H. A frame-shift mutation of PMS2 is a widespread cause of Lynch syndrome. J Med Genet 2008;45:340.

15- Abe T, Takano H, Sasaki N, Mori K, Kawano S. In vitro DNA fragmentation of mitochondrial DNA caused by single-stranded breakage related to macroplasmodial senescence of the true slime mold, Physarum polycephalum. Curr Genet. 2000;37(2):125-35.

16- Boland C. A National cancer Institue workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res 1998;58(22):5248-57.

17- Dietmaier W. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. Cancer Res 1997;57(21):4749-56.

18- Stone J, Robertson D, Houlston R. Immunohistochemistry for MSH2 and MHL1: a method for identifying mismatch repair deficient colorectal cancer. J Clin Pathol 2001;54:484-7.

19- Giardiello F, Brensinger J, Petersen G. AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. Gastroenterol 2001;121:198-213.

20- Hendriks Y, Franken P, Dierssen J. Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors. American J Pathol 2003;162:469-77.

21- Jass J. Pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Ann N Y Acad Sci 2000;10:62–73.

22- Sankila R, Aaltonen L, Jarvinen H. Better survival rates in patients with MLH1-associated hereditary colorectal cancer. Gastroenterol 1996;110:682-7.

23- Claij N, Riele HT. Microsatellite instability in human cancer: a prognostic marker for chemotherapy? Exp Cell Res 1999;246:1-10.

24- Yan H, Papadopoulos N, Marra G. Conversion of diploidy to haploidy. Nature 2000;403:723-4.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-07]

25- Pérez-Cabornero L, Infante Sanz M, Velasco Sampedro E, Lastra Aras E, Acedo Becares A, Miner Pino C, et al. Frequency of rearrangements in Lynch syndrome cases associated with MSH2: characterization of a new deletion involving both EPCAM and the 5' part of MSH2. Cancer Prev Res (Phila) 2011;4(10):1556-62.

26- Pérez-Cabornero L, Borrás Flores E, Infante Sanz M, Velasco Sampedro E, Acedo Becares A, Lastra Aras E, et al. Characterization of new founder Alu-mediated rearrangements in MSH2 gene associated with a Lynch syndrome phenotype. Cancer Prev Res (Phila) 2011;4(10):1546-55.

27- Wei W, Liu F, Liu L, Li Z, Zhang X, Jiang F, et al. Distinct mutations in MLH1 and MSH2 genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) families from China. BMB Rep 2011;44(5):317-22.

28- Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. J Clin Oncol 2008;26(35):5783-8.

29- Zhang L. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part II. The utility of microsatellite instability testing. J Mol Diagn 2008;10(4):301-7.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-07]