

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

دکتر محمدرضا زالی<sup>۱\*</sup>، دکتر مهدی یداله‌زاده<sup>۲</sup>، دکتر مهسا مولایی<sup>۳</sup>، دکتر سیدرضا فاطمی<sup>۴</sup>

- 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 غیرپولیپیی 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 independent T-test استفاده است.

**یافته‌ها:** در MSI-H ۴۱/۵٪ و در MSI-L ۱۷٪ و در MSS ۴۱/۵٪ 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 غیرپولیپیی 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

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

سرطان ارثی غیرپولیپیی کولورکتال  
(Hereditary Non Polyposis colorectal cancer: HNPCC)

\*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

## 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 سایر تومورهای 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 می‌شود (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 بیماران 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 پاراتینیزه 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 میکروستلایت بررسی شدند.

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

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 میکروستلایت (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 (به‌خصوص MSH2) ممکن است رخ بدهد (۷). به علاوه مطالعات اخیر نشان داده‌اند که متیلاسیون مناطق CpG (سیتوزین-فسفودی استر-گوانین) منطقه 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 میکروستلایت (MSI) (Microsatellite instability) 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.

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 بیوفوتومتر ارزیابی گردید. نسبت جذب نوری در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر برای نمونه‌ها بطور متوسط ۱/۸ و غلظت آنها بسته به میزان گلبول‌های 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. وضعیت MSI 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 نمونه‌های مربوط به سلول‌های نرمال و تومورال هر بیمار صورت گرفت. سکانس پرایمرهای مورد استفاده مطابق جدول ۱ بود:

(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 نمی‌توان 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 (Sodium dodecyl ) SDS (10%) (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 استفاده از پپیت 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

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`

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 ddNTPs (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

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

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

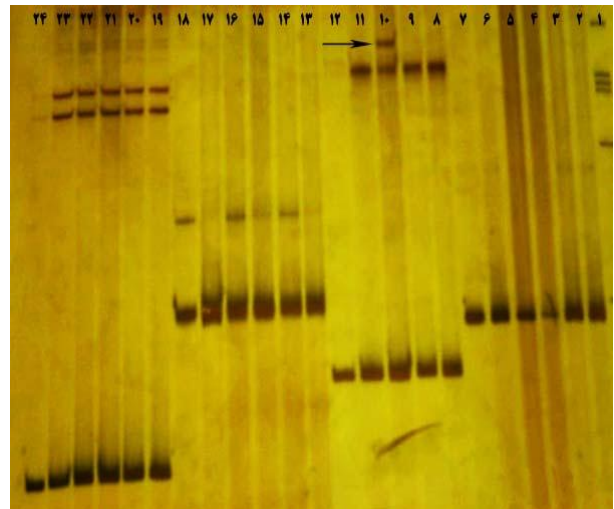
موتاسیون	نتیجه آزمون SSCP	شاخص ناپایداری MSI در	MSI	سابقه خانوادگی سرطانه‌های با HNPCC	جنس	سن	شماره
Allelic variant	Shift in exon 15 of MLH1 gene	bat25, bat26	MSI-H	مثبت	زن	۴۸	۱
Allelic variant	Shift in exon 9 of MLH1 and exon 2 MSH2 gene	bat25, bat26	MSI-H	مثبت	مرد	۵۳	۲
Allelic variant	Shift in exon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

\*. MSI: ناپایداری میکروستاتیت، HNPCC: سرطان غیرپولیپیی ارثی کولورکتال.

## یافته‌ها

در این مطالعه ۹۴ بیمار (۵۵ مرد و ۳۹ زن) با میانگین سنی ۴۳/۳۰ سال ( $SD=11/35$ ) 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 آلی 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

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.

جدول ۲: مقایسه متغیرهای مورد بررسی بر حسب نوع MSI در بیماران مشکوک به HNPCC\*

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

\* فقط اختلاف بین دو جنس از نظر آماری معنی دار است ( $P < 0.035$ ).

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

MSI-H و (MSI-L و MSS) وجود نداشت اما از نظر توزیع جنسی اختلاف معنی‌دار وجود داشت ( $P < 0.035$ ، جدول ۲). بطور مشابه بین دو گروه دارای موتاسیون ژرم لاین و بدون موتاسیون نیز اختلاف آماری بین متغیرهای مورد بررسی وجود نداشت (جدول ۳).

## 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

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

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

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

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

زمان بر هستند، در نتیجه غربالگری بیماران با سرطان کولورکتال برای تشخیص موتاسیون ژرم‌لاین در ژن‌های MMR در حال حاضر صرفاً در بیماران 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

(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 خانواده‌های 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.

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 del 254) 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

## 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.

- 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 macropasmodial senescence of the true slime mold, *Physarum polycephalum*. *Curr Genet*. 2000;37(2):125-35.
- 16- Boland C. A National cancer Institute 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.

- 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.