

ارزیابی جهش‌های از نوع حذف و اضافه ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان معده در شهر کرمان با استفاده از تکنیک MLPA

لیلا پناهنده^{۱*}، فاطمه نبی پور^۲، محمدرضا بذرافشانی^۳، فریدا حسن‌زاده^۴، صحرا صحرائیان^۵

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۲۶ تاریخ چاپ: ۹۹/۳/۱۰

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان معده توسط اختلالات ژنتیکی و اپی ژنتیکی متعدد ایجاد می‌شود؛ که ژن P53 از شایع‌ترین ژن‌های جهش‌یافته در این بیماری می‌باشد. ارتباط بین جهش P53 و خصوصیات بالینی-آسیب شناسی (Clinico Pathologic) سرطان معده در مطالعات قبلی به صورت متناقض گزارش شده است. هدف از این مطالعه تعیین جهش‌های حذفی و مضاعف شدگی ژن P53 با روش MLPA؛ و بررسی ارتباط جهش P53 با خصوصیات بالینی پاتولوژیکی سرطان معده بود.

شیوه مطالعه: ۶۰ بیمار مبتلا به سرطان معده در این مطالعه وارد شدند و تمام ۱۱ آگزون ژن P53 با روش MLPA بررسی شد. **یافته‌ها:** شایع‌ترین آگزون جهش‌یافته آگزون ۱ بود. ارتباطی معنی‌دار بین جهش P53 و برخی خصوصیات تومور مانند متاستاز به غدد لنفاوی ($P=0/032$) و تمایز یافته بودن آن ($P=0/04$) یافت شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به این که شایع‌ترین آگزون جهش‌یافته ژن P53 در این مطالعه آگزون ۱ بود، ممکن است مطرح کننده نقش مهم این آگزون در سرطان‌زایی این بیماری باشد. فراوان تر بودن جهش‌های P53 در بیماران سرطان معده با درگیری غدد لنفاوی، نشانگر نیاز به شیمی‌درمانی نئوادجوانت شدیدتر؛ و پیگیری دقیق‌تر بیماران با P53 جهش‌یافته به منظور پیشگیری از عود بیماری می‌باشد.

کلمات کلیدی: سرطان معده، جهش ژن، P53، MLPA

ارجاع: پناهنده لیلا، نبی پور فاطمه، بذرافشانی محمدرضا، حسن‌زاده فریدا، صحرائیان صحرا. ارزیابی جهش‌های از نوع حذف و اضافه ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان معده در شهر کرمان با استفاده از تکنیک MLPA. مجله مطالعات بالینی دانشکده پزشکی افضلی پور ۱۳۹۹؛ ۲(۱-۲): ۴۵-۵۵.

۱. دستیار پاتولوژی، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۲. استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۳. استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۴. محقق، آزمایشگاه ژنتیک دکتر بذرافشانی، کرمان، ایران
۵. محقق، آزمایشگاه دکتر فاطمه نبی پور، کرمان، ایران

نویسنده مسئول: لیلا پناهنده

آدرس: کرمان، بلوار ۲۲ بهمن، دانشکده پزشکی افضلی پور، گروه پاتولوژی

مقدمه

اختلالات ژنتیکی و اپی ژنتیکی متعددی در ایجاد سرطان معده دخیل هستند (۱). ژن P53 انسانی که بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۱۷ (17P13.1) واقع شده و دارای ۱۱ اگزون است، در بردارنده ۲۰ جفت باز از DNA است و ۳۹۳ اسید آمینه را کد می‌کند (۲،۳). پروتئین هسته‌ای P53 به وسیله‌ی ژن TP53 کد می‌شود. این پروتئین یک سرکوب گر تومور حائز اهمیت است و علاوه بر این، حفظ یک پارچگی ژنوم را بر عهده دارد. در زمان بروز استرس‌های سلولی از جمله آسیب DNA، استرس اکسیداتیو یا رادیاسیون‌های یونیزان، P53 فعال شده و باعث توقف چرخه سلولی و همچنین آپوپتوز می‌شود. در سرطان‌های دستگاه گوارش از جمله کارسینوم معده از بین رفتن عملکرد TP53، یک تغییر ژنتیکی - پاتوژنتیکی شایع است. جهش این ژن مهم‌ترین عامل سرطان‌های معده می‌باشد (۴). عملکرد ژن TP53 در ایجاد آپوپتوز به منظور پیشگیری از بدخیمی، آن را به یک گزینه درمانی قابل توجه تبدیل کرده و نقش آن را به تنهایی و در ترکیب با شیمی‌درمانی مورد توجه قرار داده است (۵). در سرطان‌های معده، P53 یک نشان‌گر زیستی و پیش‌بینی کننده مفید برای پاسخ به شیمی‌درمانی می‌باشد (۶).

سرطان معده دومین علت مرگ ناشی از سرطان و چهارمین بدخیمی شایع در سراسر جهان است؛ که ۸ درصد کل سرطان‌ها و ۱۰ درصد سرطان‌هایی که به مرگ منجر می‌شوند را تشکیل می‌دهد (۷). در ایران نیز سرطان معده، یکی از بیماری‌های کشنده و شایع است و شدت بروز آن برابر با ۷۳۰۰ مورد در سال می‌باشد (۲). دسته‌بندی سرطان‌های معده با دو روش شناخته شده صورت می‌گیرد؛ اولین مورد طبقه‌بندی لارن است که سرطان‌های معده را به دو نوع روده‌ای و منتشر تقسیم می‌کند؛ روش دوم، طبقه‌بندی سیستم سازمان بهداشت جهانی است که سرطان‌های معده را به انواع پاپیلاری، توبولار، موسینوس و کمتر تمایز یافته تقسیم می‌نماید (۷). مطالعات صورت گرفته بر روی سرطان‌های معده، چندین تغییر ژنتیکی از جمله جهش در ژن‌های مهار کننده تومور مانند ژن TP53 را به همراه جهش‌های رخ داده در انکوژن‌هایی مثل RAS و Cerb2، آشکار ساخته است (۸). در میان رویکردهای تشخیصی مختلف که در سال‌های اخیر برای شناسایی جهش‌های حذف و مضاعف شدگی ژنی مورد استفاده قرار

گرفته است، روش تکثیر پروب وابسته به الحاق چندتایی Multiplex Ligation-Dependent Probe (Amplification) توجه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده است. در تکنیک MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) این امکان وجود دارد که طی یک واکنش، توالی‌هایی با طول ۵۰ جفت باز مورد بررسی قرار گیرند؛ همچنین امکان شناسایی تعداد کپی‌های بعضی ژن‌های خاص وجود دارد. در سال‌های اخیر روش MLPA به منظور تشخیص انواع گوناگونی از بیماری‌ها، در آزمایشگاه‌های ژنتیک پزشکی مورد استفاده قرار گرفته است (۹). در ایران نیز همچون سایر کشورهای جهان، مطالعه و بررسی عوامل ایجاد کننده سرطان به ویژه بررسی ژن‌های دخیل در ایجاد و یا سرکوب سرطان بسیار حائز اهمیت است. تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه بررسی جهش‌های حذف یا مضاعف شدگی دخیل در ایجاد سرطان معده با استفاده از تکنیک MLPA صورت نگرفته است. با توجه به اهمیت این موضوع، هدف از انجام مطالعه حاضر؛ ارزیابی وضعیت جهش‌های مضاعف شدگی و حذفی ژن TP53 در بیماران مبتلا به کارسینوم معده با استفاده از تکنیک MLPA در استان کرمان بود؛ تا به رسیدن به پیش‌آگهی و یافتن روش‌های درمانی مؤثرتر کمک کند.

شیوه مطالعه

در مطالعه صورت گرفته، تعداد ۶۰ بیمار مبتلا به سرطان معده که در بازه زمانی اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۰ تا اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۶؛ در مرکز درمانی آموزشی افضل‌پور بستری شده و عمل معده برداری (Gastrectomy) بر روی آن‌ها انجام شده بود، مورد بررسی قرار گرفتند. منطقه تومورال هر بیمار از راه بررسی لام‌های بایگانی شده، علامت‌گذاری گردید. سپس بلوک‌های پارافین در بردارنده نمونه ثابت شده در فرمالین، از آرشیو بخش پاتولوژی، به دست آمده و برش‌های متعددی با ضخامت ۵ تا ۱۰ میکرومتر از بافت علامت‌گذاری شده تهیه گردیده؛ و جهت انجام مراحل استخراج DNA در اختیار آزمایشگاه ژنتیک قرار گرفت.

ویژگی‌های جمعیت (Demographic) بیماران از پرونده‌های بایگانی شده به دست آمد؛ و خصوصیات ظاهری

پایان یافتن مراحل انجام آزمایش اولیه، محصول حاصل با استفاده از روش الکتروفورز موئینه (Capillary Electrophoresis) به وسیله دستگاه آنالیزور ژنتیکی (ABI 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystem, USA)؛ و بر اساس پروتکل ارائه شده توسط شرکت ABI، مورد بررسی قرار گرفت و داده‌های خام حاصل گردید.

• آنالیزهای ژنتیکی و آماری

آنالیز داده‌های خام حاصل، با استفاده از نرم‌افزار Gene Marker, 1.6V و با استناد به روش آنالیز داده‌های مربوط به روش MLPA که توسط شرکت MRC در اختیار کاربران قرار گرفته است، انجام شد. روش آنالیز داده‌های حاصل، مبنی بر میزان جذب خوانده شده توسط دستگاه الکتروفورز موئینه، برای هر اگزون متصل به پروب و در مقایسه با جذب صورت گرفته با نمونه نرمال استفاده شد. به طوری که با برآورد نسبت میزان به دست آمده برای هر کدام از نمونه‌های بیمار و نمونه شاهد، برای هر نمونه یک عدد حاصل گردید؛ که محدوده نرمال آن بین ۰/۷۵ تا ۱/۳ بود. مقادیر کم‌تر از ۰/۷۵ به منزله جهش حذفی در اگزون مربوطه (شکل ۱)؛ و مقادیر بیش از ۱/۳ به منزله وجود جهش مضاعف شدگی در اگزون مربوطه در نظر گرفته شد (شکل ۲). لازم به ذکر است که برآوردهای مذکور توسط نرم‌افزار Gene Marker و به طور خود به خودی انجام گردید. آنالیز داده‌های کلی با استفاده از نسخه ۲۲ نرم‌افزار SPSS صورت گرفت. به منظور ارزیابی ارتباط بین متغیرها آزمون Chi-Square به کار برده شد. $P > 0.05$ به عنوان موارد با اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

(Morphologic) تومور و مرحله بندی آن بر اساس دستورالعمل (American Joint Committee on Cancer) AJCC توسط ۲ پاتولوژیست مجرب، به صورت دو سو کور (Double Blind) گزارش شد. همچنین مبنی بر دستورالعمل شرکت MRC هلند در زمینه تعداد نمونه شاهد لازم برای انجام تست MLPA، ۱۵ نمونه بافت نرمال معده به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند (۱۰).

• استخراج DNA

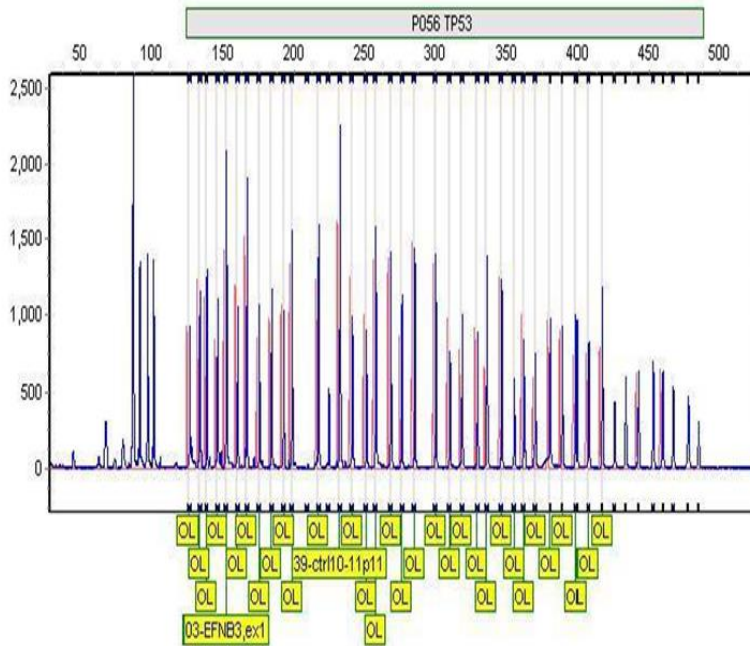
DNA بافت‌های فیکس شده در فرمالین بلوک‌های پارافینی بیماران؛ و نمونه‌های کنترل دربردارنده بافت معده نرمال با استفاده از کیت QIA amp DNA FFPE (Qiagen, Hilden, Germany) استخراج گردید. میزان جذب DNA با استفاده از دستگاه نانوفتومتر (۲۰۰۶ NanoPhotometer® Classic, Implen Cooperation, Germany) در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۳۰ و ۲۸۰ نانومتر، به منظور برآورد کیفیت DNA حاصله، اندازه‌گیری شد.

• MLPA

جهت بررسی جهش‌های حذفی و مضاعف شدگی ژن TP53، از کیت تولید شده توسط شرکت MRC استفاده شد (SALSA MLPA P056 TP53 probemix, MRC - Holland). این کیت دارای پرب‌هایی برای هر کدام از ۱۱ اگزون ژن TP53 که بر روی کروموزوم ۱۷ قرار گرفته‌اند؛ و ۳ پرب برای ژن CHEK2 واقع بر روی بازوی بلند کروموزوم ۲۲ (22q12.1) می‌باشد؛ که یکی از این پرب‌ها به طور اختصاصی به بررسی جهش CHEK2 1100delc می‌پردازد. پروسه انجام آزمایش MLPA بر اساس پروتکل ارائه شده توسط شرکت سازنده (MRC - Holland) برای هر کدام از نمونه‌ها اعمال گردید. پس از

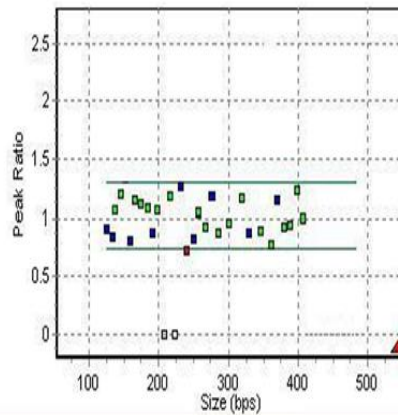
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.60	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 2/13/2018 - 13:36:56	Quantification By: Peak Height
Panel: P056_C1_TP53_971103	Classification: Loss < 0.75 <= Equivalent <= 1.30 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Peak Ratio
Synthetic Used: B04_M.fsa	

E05_43M.fsa



Sample Name: 43M
Machine: 3130geneticalyzer-20361-040
Run Time: 12/5/2017 - 12:7:25 -> 12/5/2017 - 12:50:58

Conclusion		
	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		



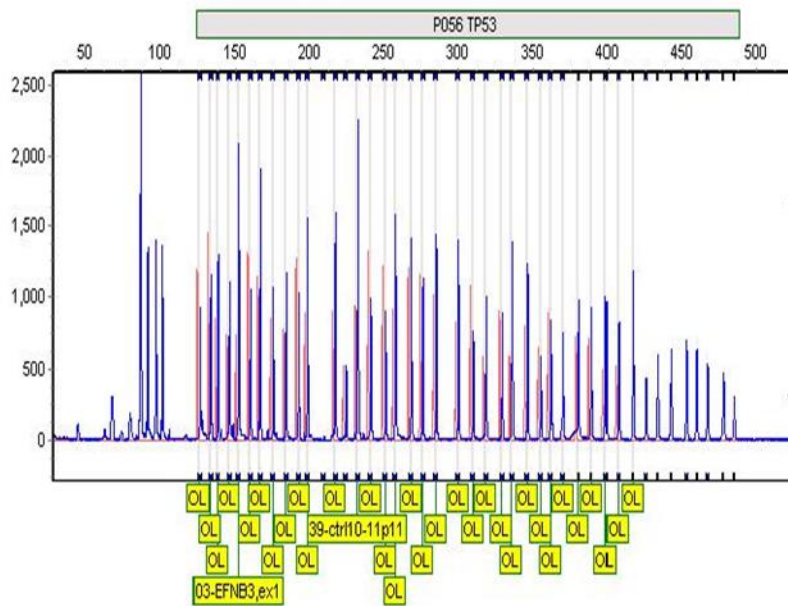
	Probe Name	Bin Size	E05_6 M
1	01-AKAP10.ex3	240.9	0.812
2	02-EFNB3.ex2	138.1	1.062
3	03-EFNB3.ex1	151.9	1.236
4	04-TP53.ex1	407.2	1.002
5	05-TP53.ex1	166.6	1.146
6	06-TP53.ex2a	198.3	1.063
7	07-TP53.ex2d	217.1	1.183
8	08-TP53.ex3	299.9	0.958
9	09-TP53.ex4b	257.5	1.055
10	10-TP53.ex4b	452.9	-1
11	11-TP53.ex5	318.5	1.160
12	11-ctrl107-11p11	309.7	0.758
13	12-TP53.ex12	398.8	1.236
14	13-TP53.ex7	284.9	0.883
15	14-TP53.ex8	389.3	0.944
16	15-TP53.ex9a	224.3	1.248
17	16-TP53.ex10	346.5	0.897
18	17-TP53.ex11	442.6	0.920
19	18-down of TP53	175.2	1.121
20	19-ATP1B2.ex7	380.8	0.927
21	20-ATP1B2.ex1	336.0	0.771
22	21-MPDU1.ex7	433.5	0.853
23	22-MPDU1.ex3a	145.7	1.200
24	23-POLR2A.ex8	459.6	1.007
25	24-POLR2A.ex3	184.0	1.087
26	25-NF2.ex4	362.2	0.778
27	26-HSCB.ex2	268.0	0.935
28	27-CHEK2.ex8	425.5	0.776
29	28-CHEK2.ex11d	209.4	1.087
30	29-CHEK2.ex13	355.4	1.254
31	30-ctrl101-1p34	370.4	1.141
32	31-ctrl102-2p13	416.7	0.770
33	32-ctrl103-2q12	477.6	0.976
34	33-ctrl104-3q21	133.2	0.851
35	34-ctrl105-4p13	125.9	0.921
36	35-ctrl106-5q31	192.4	0.882
37	36-ctrl107-6p12	329.4	0.878
38	37-ctrl108-9q21	250.8	0.823
39	38-ctrl109-10p14	467.0	-1
40	39-ctrl110-11p11	232.2	1.274
41	41-ctrl112-15q21	159.9	0.804
42	42-ctrl113-16p13	276.0	1.187
43	43-ctrl114-21q22	484.8	-1

شکل ۱. نتیجه آنالیز یک نمونه دارای حذف در اگزون ۴

حذف اگزون ۴ در ردیف ۱۰ جدول مشخص شده است (مقدار عددی کمتر از ۰/۷۵)

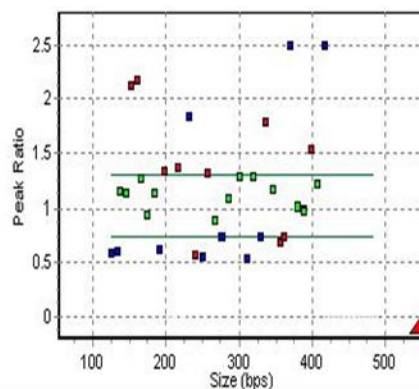
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.60	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 2/13/2018 - 14:10:28	Quantification By: Peak Height
Panel: P056_C1_TP53_971103	Classification: Loss < 0.75 <= Equivalent <= 1.30 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Peak Ratio
Synthetic Used: F05_49M.fsa	

E05_43M.fsa



Sample Name: 43M
Machine: 3130geneticanalyzer-20361-040
Run Time: 12/5/2017 - 12:7:25 -> 12/5/2017 - 12:50:58

Conclusion		
	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		



	Probe Name	Bin Size	E05_43M
1	01-AKAP10,ex3	240.9	0.569
2	02-EFNB3,ex2	138.1	1.140
3	03-EFNB3,ex1	151.9	2.130
4	04-TP53,ex1	407.2	2.215
5	05-TP53,ex1	166.6	1.272
6	06-TP53,ex2a	198.3	1.337
7	07-TP53,ex2d	217.1	1.364
8	08-TP53,ex3	299.9	1.290
9	09-TP53,ex4b	257.5	1.324
10	10-TP53,ex4b	452.9	1.319
11	11-TP53,ex5	318.5	1.289
12	11-ctrl107-14q11	309.7	0.548
13	12-TP53,ex12	398.8	1.539
14	13-TP53,ex7	284.9	1.085
15	14-TP53,ex8	389.3	0.986
16	15-TP53,ex9a	224.3	0.910
17	16-TP53,ex10	346.5	1.171
18	17-TP53,ex11	442.6	1.214
19	18-down of TP53	175.2	0.941
20	19-ATP1B2,ex7	380.8	1.011
21	20-ATP1B2,ex1	336.0	1.791
22	21-MPDU1,ex7	433.5	1.167
23	22-MPDU1,ex3a	145.7	1.131
24	23-POLR2A,ex8	459.6	0.841
25	24-POLR2A,ex3	184.0	1.138
26	25-IF2,ex4	362.2	0.750
27	26-HSCB,ex2	268.0	0.894
28	27-CHEK2,ex8	425.5	1.241
29	28-CHEK2,ex11d	209.4	0.786
30	29-CHEK2,ex13	355.4	0.891
31	30-ctrl101-1p34	370.4	1.110
32	31-ctrl102-2p13	416.7	1.226
33	32-ctrl103-2q12	477.6	1.100
34	33-ctrl104-3q21	133.2	0.806
35	34-ctrl105-4p13	125.9	0.892
36	35-ctrl106-5q31	192.4	0.819
37	36-ctrl107-6p12	329.4	0.754
38	37-ctrl108-9q21	250.8	0.964
39	38-ctrl109-10p14	467.0	0.761
40	39-ctrl110-11p11	232.2	1.036
41	41-ctrl112-15q21	159.9	0.814
42	42-ctrl113-16p13	276.0	0.776
43	43-ctrl114-21q22	484.8	-1

شکل ۲. مضاعف شدگی افزون ۱ در ستون های ۳،۴ و ۲۱ نشان داده شده است. (مقدار عددی بیش از ۱/۳)

معده در بین بیماران به ترتیب در ۸/۳ درصد، ۲۸/۳ درصد، ۶۰/۰ درصد و ۳/۳ درصد وجود تومورهایی با تمایز (Differentiation) کم و متوسط به ترتیب در ۶۶/۷ درصد و ۳۳/۳ درصد از بیماران دیده شد. شیوع انواع نمونه‌های توموری شامل نوع منتشر، روده‌ای، موسینوس و نوراندوکیرین در بین گروه بیماران مورد بررسی به ترتیب ۲۶/۶ درصد، ۶۶/۷ درصد، ۵ درصد و ۱/۷ درصد بود. جهش TP53 در ۳۴ تن (۵۶/۷٪) از بیماران مشاهده شد که از

یافته‌ها

در مطالعه صورت گرفته، ۶۰ بیمار مبتلا به سرطان معده از نظر جهش‌های حذفی و مضاعف شدگی ژن TP53 مورد ارزیابی قرار گرفتند. سن بیماران در محدوده ۳۷ تا ۸۲ سال؛ و میانگین سنی آن‌ها ۶۱/۲۶ سال بود. ۷۵ درصد بیماران را مردها و ۲۵ درصد را زنها شامل می‌شدند (جدول ۱). فراوانی سطوح (Stage)، ۳، ۲، ۱ و ۴ کارسینوم

هیچ نوع جهشی در اگزون‌های ۲، ۳، ۵، ۶، ۹، ۱۰ و ۱۱ ژن TP53 مشاهده نشد. بیشتر مضاعف شدگی‌ها به ترتیب در اگزون‌های ۱، ۸، ۷ و ۴ دیده شد. اگزون ۴ فاقد هرگونه جهش مضاعف شدگی بود. بروز جهش‌های حذفی تنها در اگزون‌های ۴ و ۸ دیده شد. بیشترین تعداد جهش‌های حذفی در اگزون‌های شماره ۴ و ۷ وجود داشت. اگزون‌های ۴ و ۸ دو اگزونی بودند که با بروز هر دو نوع جهش حذفی و مضاعف شدگی مواجه شده بودند (جدول ۲).

این میان، ۲۴ مورد (۷۰/۶٪) از نوع مضاعف شدگی و ۱۰ مورد (۲۹/۴٪) از نوع حذفی بود. در ۲۶ تن (۴۳/۳٪) از افراد مورد بررسی هیچ نوع جهشی مشاهده نشد (جدول ۲). جهش‌های مشاهده شده در بین گروه بیماران، به ترتیب در تومورهای سطح‌های ۲، ۳، ۱ و ۴ فراوانی بیشتری داشت. شیوع جهش‌های حذفی به ترتیب در تومورهایی با سطوح ۲، ۳، ۱ و ۴ و شیوع جهش‌های مضاعف شدگی به ترتیب در تومورهایی با سطوح ۳، ۲، ۱ و ۴ بیشتر بود. اگزون‌های ۱، ۸، ۴ و ۷ به ترتیب با وقوع جهش بیشتری روبرو بودند.

جدول ۱. وضعیت ژن P53 و خصوصیات کلینیکی پاتولوژیکی در بیماران GC

	مورد (Cases)	ژن جهش یافته (درصد) (Mutated p53 gene)	ژن جهش یافته (درصد) (Not Mutated p53 gene)	X ²	p
جنس					
مرد	۴۵	۲۴ (۵۳/۳)	۲۱ (۴۶/۷)	۰/۸۱۴	۰/۳۰۰
زن	۱۵	۱۰ (۶۶/۷)	۵ (۳۳/۳)		
سن					
≤۴۱	۳	۱ (۳۳/۳)	۲ (۶۶/۷)		
۴۱-۵۰	۸	۵ (۶۲/۵)	۳ (۳۷/۵)	۶/۲۰۰	۰/۱۰۰
۵۱-۶۴	۲۸	۱۲ (۴۲/۹)	۱۶ (۵۷/۱)		
≥ ۶۵	۲۱	۱۶ (۷۶/۲)	۵ (۲۳/۸)		
Grade (Differentiation)					
درجه (تمایز)					
ضعیف (Poorly)	۲۲	۱۶ (۷۲/۷)	۶ (۲۷/۳)	۴/۴۶۰	۰/۰۴۶
متوسط (Moderately)	۳۸	۱۸ (۴۷/۴)	۲۰ (۵۲/۶)		
گره لنفاوی					
۰	۳۳	۱۳ (۴۹/۴)	۲۰ (۶۰/۰)		
۱	۱۳	۱۱ (۸۴/۶)	۲ (۱۵/۴)	۸/۷۰۰	۰/۰۳۲
۲	۱۰	۷ (۷۰/۰)	۳ (۳۰/۰)		
۳	۴	۳ (۷۵/۰)	۱ (۲۵/۰)		
تهاجم عروقی					
مثبت	۵۴	۳۱ (۵۷/۴)	۲۳ (۴۲/۶)	۰/۱۲۰	۰/۱۲۰
منفی	۶	۳ (۵۰/۰)	۳ (۵۰/۰)		
حاشیه جراحی					
آزاد (Free)	۴۶	۲۵ (۵۴/۳)	۲۱ (۴۵/۷)	۰/۴۳۲	۰/۵۰۰
درگیر (Involved)	۱۴	۹ (۶۴/۳)	۵ (۳۵/۷)		
مرحله (Stage)					
۱	۵	۴ (۸۰/۰)	۱ (۲۰/۰)		
۲	۱۷	۱۰ (۵۸/۸)	۷ (۴۱/۲)		
۳	۳۶	۱۹ (۵۲/۸۰)	۱۹ (۵۲/۸۰)	۱/۳۹۰	۰/۷۰۶
۴	۲	۱ (۵۰/۰)	۱ (۵۰/۰)		
نوع (Type)					
منتشر (Diffused)	۱۶	۱۰ (۶۲/۵)	۶ (۳۷/۵)		

روده ای (Intestinal)	۴۰	۲۰ (۵۰/۰)	۲۰ (۵۰/۰)	۴/۰۰۰	۲۶۱/۰
موسینوس (Mucinous)	۳	۳ (۱۰۰)	۰ (۰)		
(Neuroendocrine)	۱	۱ (۱۰۰)	۰ (۰)		
نوراندوکرین (tumor invasion)					
تهاجم تومور					
T2	۶	۵ (۸۳/۳)	۱ (۱۶/۷)	۱/۹۳۱	۱۶۵/۰
T3	۵۴	۲۹ (۵۳/۷)	۲۵ (۴۶/۳)		

جدول ۲. جهش‌های اگزونی در ۱۱ اگزون ژن p53 در مراحل مختلف GC

اگزون/جهش	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
۴ بیمار با ژن p53 جهش یافته-۱ بیمار با ژن p53 نرمال (مرحله ۱)											
حذف	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
مضاعف شدگی	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۲	۰	۰	۰	۰
۱۰ بیمار با ژن جهش یافته، ۷ بیمار با ژن نرمال (مرحله ۲)											
حذف	۰	۰	۰	۴	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰
مضاعف شدگی	۶	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۰	۰
۱۹ بیمار با ژن جهش یافته، ۱۷ بیمار با ژن نرمال (مرحله ۳)											
حذف	۰	۰	۰	۲	۰	۰	۰	۲	۰	۰	۰
مضاعف شدگی	۱۵	۰	۰	۲	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰
۱ بیمار با ژن جهش یافته ۱ بیمار با ژن نرمال (مرحله ۴)											
حذف	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
مضاعف شدگی	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

ارتباط بین جهش و تهاجم لنفاوی ($P=0/032$) و همچنین ارتباط بین جهش و سطح تمایز تومور ($P=0/046$) از لحاظ آماری معنادار بود. هیچ ارتباط معنی‌داری بین جهش با جنسیت، درگیری عروقی و سطح تومور مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری

تغییرات ژنتیکی نقش محسوسی در ایجاد تومور ایفا می‌کند و شناسایی ژن‌های درگیر در ایجاد سرطان برای شناخت اساس مولکولی آن ضروری است. جهش ژن TP53 از شایع‌ترین تغییرات مولکولی مشاهده شده در سرطان است (۱۱). از سوی دیگر سرطان معده همچنان از علل اصلی ناخوشی و مرگ و میر در سراسر جهان است. بررسی‌های اخیر نشانگر بروز ۹۵۰/۰۰۰ هزار مورد در سال بود؛ که از

این تعداد ۷۲۰ هزار مورد منجر به مرگ شده و بدین ترتیب سرطان معده پنجمین علت سرطان و سومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان را تشکیل می‌دهد (۴). لذا شناسایی زود هنگام تغییرات ژن TP53 در ضایعات پیش سرطانی مانند گاستریت، ممکن است برای شناسایی زودهنگام بیماران مستعد ابتلا به سرطان معده و پیشگیری از آن مفید باشد (۲). برای یافتن جهش ژن TP53، رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی (IHC) روشی ارزان و ساده است. در شرایط طبیعی، TP53 ناپایدار است و این ناپایداری به دلیل نیمه عمر کمتر از بیست دقیقه آن بر اثر از بین رفتن توسط Mdm2 می‌باشد.

این ناپایداری باعث عدم رنگ‌پذیری TP53 در شرایط نرمال می‌شود. در سلول‌هایی با TP53 جهش‌یافته، هسته

نشانه‌گر رفتار بیولوژیک تهاجمی‌تر تومور شامل عود بعد از جراحی می‌باشد. سرطان معده با P53 جهش یافته ممکن است به شیمی‌درمانی این نئوادیوانت شدیدتر؛ یا پیگیری دقیق‌تر جهت جلوگیری از عود نیاز داشته باشد (۱۶). یافته‌های ما نشانگر ارتباط معنی‌دار بین موتاسیون TP53 و میزان تمایز تومور بود ($P=0/04$). Ando و همکاران (۱۲)؛ همچنین Tahara و همکاران (۱۶) به شایع‌تر بودن جهش TP53 در تومورهای تمایز یافته‌تر اشاره کردند که با مطالعه حاضر همسو بود. این رخداد نشانگر آن است که جهش TP53 مسئول ایجاد سرطان در مراحل ابتدایی می‌باشد (۱۱). در این مطالعه ارتباطی بین جهش TP53 و میزان تهاجم تومور، مرحله تومور و تهاجم عروقی تومور یافت نشد که ممکن است به خاطر حجم نمونه باشد.

محدودیت‌های تحقیق

محدودیت‌های مطالعه شامل موارد زیر بود:

۱- تعداد نسبتاً کم بیماران مورد مطالعه ۲- طرح مطالعه که بهتر بود از یک مطالعه آینده‌نگر کوهورت استفاده شود.

جهش TP53 در بیماران مبتلا به سرطان معده با متاستاز لنفاوی شایع‌تر بود؛ با توجه به این مطلب بیماران سرطان معده با TP53 جهش‌یافته ممکن است به شیمی‌درمانی نئوادیوانت شدیدتر یا پیگیری بیشتر جهت جلوگیری از عود بیماری نیاز داشته باشد. MLPA روشی سریع و دقیق برای آنالیز حذف و مضاعف شدگی‌های هر ۱۱ اگزون ژن TP53 می‌باشد. در این مطالعه شایع‌ترین اگزون جهش‌یافته اگزون ۱ بود که در تضاد با مطالعات قبلی که بیانگر شیوع جهش‌ها در اگزون‌های ۸ و ۴ بودند، می‌باشد. این اگزون جهش‌یافته ممکن است نقش مهمی در کارسینوزن سرطان معده ایفا کند.

تشکر و قدردانی

صمیمانه از همکاری آزمایشگاه ژنتیک دکتر محمد رضا بذرافشانی و مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی دانشکده پزشکی افضلی‌پور سپاس‌گزاری به عمل می‌آید. لازم به توضیح است که این مطالعه توسط کمیته اخلاق پایگاه تحقیقات بالینی

سلول‌ها، رنگ شده و قابل شناسایی می‌باشند (۱۲). حدود ۷۰ درصد جهش‌ها در اگزون‌های TP53 از نوع کدون پایان (Stop codon) یا تغییر الگو (Frameshift) بود؛ بنابراین به احتمال قوی در رنگ آمیزی IHC نادیده گرفته می‌شود (۳). با توجه به این محدودیت رنگ آمیزی IHC، در مطالعه حاضر از روش MLPA برای بررسی جهش TP53 استفاده شد که مزایای دیگر آن شامل موارد زیر است:

۱- امکان بررسی توالی هدف تا ۴۰ توالی به صورت هم‌زمان در یک واکنش

۲- محصول زیاد و با کیفیت (High Throughput)

۳- روش مقرون به صرفه در مقایسه با سایر روش‌های مناسب برای شناسایی ریز حذف‌ها؛ یا مضاعف شدگی‌هایی مانند CGH Array و Whole Exome Sequencing و Next Generation Sequencing (۹).

مزیت مهم دیگر روش MLPA امکان غربالگری همه ۱۱ اگزون ژن TP53 می‌باشد.

در این مطالعه میانگین سنی بیماران ۶۱/۲۶ سال بود که بالاتر از نتایج مطالعات قبلی بود (۱۳). دلیل این اختلاف ممکن است تشخیص دیر هنگام و در مراحل پیشرفته بیماری باشد؛ که ضرورت روش‌های غربالگری مؤثرتر برای جمعیت در معرض خطر را مطرح می‌سازد. در مطالعه حاضر، شایع‌ترین اگزون جهش‌یافته اگزون ۱ بود؛ که تأیید کننده فرضیه‌ای است که اهمیت این اگزون در تنظیم بیان P53 در سطح ترجمه را مطرح می‌کند (۳). دیگر اگزون‌های جهش‌یافته به ترتیب شیوع ۸، ۴ و ۷ بودند که این نتیجه مشابه مطالعات قبلی بود (۱۱، ۱۴، ۱۵). در مطالعه حاضر جهشی در اگزون‌های ۵، ۶، ۹ گزارش نشد؛ که این مطلب متناقض با برخی از مطالعات گذشته (۱۱، ۱۴، ۱۵) بود؛ که شاید دلیل آن، اختلافات ژنتیکی و محیطی در جمعیت مورد مطالعه و یا حجم نمونه می‌باشد. نتایج متناقضی در مورد ارتباط جهش TP53 با خصوصیات کلینیکوپاتولوژیک سرطان معده وجود داشت (۱۶). در این مطالعه جهش TP53 در بیماران با درگیری غدد لنفاوی شایع‌تر بود ($P=0/032$)؛ که این نتیجه مشابه مطالعه Tahara و همکاران (۱۶) و همچنین مطالعه Ando و همکاران (۱۷) بود. از آنجا که سرطان معده با متاستاز به غدد لنفاوی، غالباً

تعارض منافع

این پژوهش هیچ‌گونه تعارض منافع را در بر نخواهد داشت

افضلی‌پور کرمان با کد IR.KMU.ah.Rec.1395.48 به

تصویب رسید

References

1. Chin NY, Tan P. Molecular classification of gastric cancer. *Ann Oncol* 2016; 27(5): 763-9.
2. Najjar Sadeghi R, Damavand B, Vahedi M, Mohebbi SR, Zojazi H, Molaei M, et al. Detection of p53 common intron polymorphism in patients with gastritis lesions from Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(1): 91-6.
3. Bazrafshani MR, Nowshadi PA, Shirian S, Daneshbod Y, Nabipour F, Mokhtari M, et al. Deletion/duplication mutation screening of p53 gene in patients with transitional cell carcinoma of urinary bladder using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Cancer Med* 2016; 5(2): 145-52.
4. Katona BW, Rustgi AK. Gastric cancer genomic: advances and future directions. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2017; 3(2): 211-17.
5. Sutter AP, Fechner H. Gene therapy for gastric cancer: is it promising? *World J Gastroenterol* 2006; 12(3): 380-7.
6. Xu HY, Xu WL, Wang LQ, Chen MB, Shen HL. Relationship between p53 status and response to chemotherapy in patients with Gastric cancer: A metaanalysis. *PLoS One* 2014; 9(4): e95371.
7. Lin X, Zhao Y, Song WM, Zhang B. Molecular classification and prediction in gastric cancer. *Comput Struct Biotechnol J* 2015; 13: 448-58.
8. Li ZX, Liu PY, Xu WX, Cong B, Ma ZX, Li Y. P53 gene mutations in primary gastric cancer. *World J Gastroenterol* 1996; 2(1): 41-3.
9. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic disease. *Int J Mol Sci* 2012; 13(3): 3245-76.
10. Ji X, Bu ZD, Yan Y, Li ZY, Wu AW, Zhang LH, et al. The 8th edition of the American Joint Committee on Cancer tumor-node-metastasis staging system for gastric cancer is superior to the 7th edition: results from a Chinese mono-institutional study of 1663 patients. *Gastric Cancer* 2018; 21(4): 643-52.
11. Chen HC, Chen HJ, Khan MA, Rao ZZ, Wan XX, Tan B, et al. Genetic mutations of p53 and k-ras in gastric carcinoma patients from Hunan, China. *Tumour Biol* 2011; 32(2): 367-73.
12. Ando K, Oki E, Saeki H, Yan Z, Tsuda Y, Hidaka G, et al. Discrimination of p53 immunohistochemistry-positive tumors by its staining pattern in gastric cancer. *Cancer Med* 2015; 4(1): 75-83.
13. Dupont JB Jr, Lee JR, Burton GR, Cohn I Jr Adenocarcinoma of the stomach: review of 1,497 cases. *Cancer* 1978; 41(3):941-7.

14. Belyavskaya VA, Vardosanidze VK, Smirnova OY, Karakin EI, Savkin IV, Gervas PA, et al. Genetic status of p53 in stomach cancer: somatic mutations and polymorphism of codon 72. *Bull Exp Biol Med* 2006; 141(1): 243-6.
15. Busuttil RA, Zapparoli GV, Haupt S, Fennell C, Wong SQ, Pang JM, et al. Role of p53 in the progression of gastric cancer. *Oncotarget* 2014; 5(23): 12016-26.
16. Tahara T, Shibata T, Okamoto Y, Yamazaki J, Kawamura T, Horiguchi N, et al. Mutation spectrum of TP53 gene predicts clinicopathological features and survival of gastric cancer. *Oncotarget* 2016; 7(27): 42252-60
17. Ando K, Oki E, Zhao Y, Ikawa-Yoshida A, Kitao H, Saeki H, et al. Mortalin is a prognostic factor of gastric cancer with normal p53 function. *Gastric Cancer* 2014; 17(2): 255-62.

Evaluation of deletion duplication mutation of p53 gene in gastric cancer patients in Kerman city by MLPA technique

Leila Panahandeh^{1*}, Fateme Nabipour², Mohammad Reza Bazrafshani³, Farida Hassanzadeh⁴, Sahra Sahraeian⁵

Received: 2018 Feb 15

Accepted: 2018 Jul 17

Published: 2020 May 30

Original Article

Abstract

Background: Gastric cancer (GC) is a heterogeneous disease driven by multiple genetic and epigenetic aberrations. Tp53 gene is commonly mutated in GC and correlation of p53 mutation with clinicopathological features is controversial. The aim of this study was firstly detection of deletion/duplication mutations in T P53 exons using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) method in GC patients and, Secondly, we investigated p53 mutation relationship with GC clinicopathologic features.

Methods: 60 GC patients were enrolled in this study and all 11 Tp53 gene exons were assessed by MLPA method.

Results: most mutation was occurred in exon 1. p53 mutation was found most frequently in GC with lymph node metastasis (p:0.032) and differentiated GC (P:0.04) .

Conclusion: Regarding most mutations were located in exon 1, this exon may play important role in GC carcinogenesis. More common p53 mutation in GC with lymph node metastasis indicates GC with p53 mutation may need intensive adjuvant chemotherapy or frequent follow up to prevent relapse.

Keywords: Gastric cancer, P53 Genes, Multiplex ligation-dependent probe amplification

Citation: Panahandeh L, Nabipour F, Bazrafshani MR, Hassanzadeh F, Sahraeian S. **Evaluation of deletion duplication mutation of p53 gene in gastric cancer patients in Kerman city by MLPA technique.** Afzalipour J Clin Res 2020; 2(2-1): 45-55.

1. Resident of Pathology, Department of Pathology, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

2. Assistant Professor, Department of Pathology, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

3. Assistant Professor, Department of Genetics, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

4. Researcher, Dr. Bazrafshani Genetics Laboratory, Kerman, Iran

5. Researcher, Dr. Fatemeh Nabipour Laboratory, Kerman, Iran

Corresponding Author: Leila Panahandeh **Email:** l.panahandeh@yahoo.com

Address: Department of Pathology, Afzalipour Medical School, 22 Bahman Blvd, Kerman