

بررسی فراوانی جهش در اگزون ۲ ژن BRCA1 در بیماران مبتلا به سرطان سینه و بستگان سالم آنان در اهواز

حمید گله داری^{*}، علی محمد فروغ مند^{*}، ایران رشیدی گلرویه^{**}، بهناز اندشتی^{***}،
علی فرخی^{***}، غلامرضا فاضلی^{***}، حسین نظاری^{***}، عبدالرحمن راسخ^{****}

چکیده

هدف: سرطان سینه یکی از رایج ترین سرطان ها در زنان می باشد و در این میان، از هر دوازده زن یک نفر قبل از رسیدن به سن ۷۰ سالگی به این سرطان مبتلا می شود. از این تعداد فقط بخش کوچکی (تقریباً ۵ تا ۱۰ درصد) در اثر جهش های اتوزومال غالب به این بیماری مبتلا می شوند. در دو ژن کشف شده BRCA1 – BRCA2 جهش هائی از نوع اتوزومی غالب در بیماران مبتلا به سرطان سینه مشاهده شده است. یهودیان اشکنازی با ریسک ابتلای بالا به این نوع سرطان، از ناقلین جهش در اگزون ۲ ژن BRCA1 (185delAG) و اگزون ۱۱ ژن BRCA1 (6174delT) می باشند. غربالگری این جهش ها در جمعیت های قومی غیر از اشکنازی ها می تواند در جهت تشخیص افراد در معرض خطر کاربرد داشته باشد. هدف مطالعه حاضر بررسی فراوانی های جهش های رایج در اگزون ۲ ژن BRCA1 در بیماران ایرانی (اهواز) می باشد.

روش بررسی: در این بررسی تعداد ۳۸ نمونه خونی از بیماران و ۳۲ نمونه از بستگان سالم آنان از بخش پاتولوژی بیمارستان شفاء اهواز جمع آوری و غربالگری جهش های احتمالی در اگزون ۲ ژن BRCA1 (منطقه داغ و مستعد به جهش) با استفاده از روش SSCP^۱ مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشانگر وجود جهش در چهار مورد (۱۰/۵ درصد) از کل ۳۸ بیمار می باشد.
نتیجه گیری: نتیجه نهایی نشانگر وجود جهش در چهار مورد (۱۰/۵ درصد) از کل تعداد ۳۸ نفر بیمار بود.

کلید واژه گان: سرطان سینه، غربالگری جهش، BRCA1، SSCP

مقدمه

سرطان سینه بر اثر این عارضه جان خود را از دست می دهند (۱). پیشرفت در روشهای درمانی به شناسایی ژن ها و مسیرهای بیوشیمیایی که در ایجاد تومور نقش دارند، نیاز دارد. بیش از ۷۰ درصد سرطانهای سینه پیچیده و هتروژن می باشند (۲).

سرطان سینه دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان کشورهای شرقی است. در آمریکا به تنهایی هر ساله بیش از ۱۸۰۰۰۰ مورد جدید تشخیص داده می شود. علیرغم پیشرفت های چشمگیری که در تشخیص و درمان سرطان ایجاد شده، تقریباً ۲۵ درصد بیماران مبتلا به

1-Single Strand Conformational Analysis (Polymorphism)

*استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز
**دانشیار، مرکز تحقیقات تالاسمی و هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
***کارشناس ژنتیک
****استاد گروه آمار، دانشگاه شهید چمران اهواز
۱- نویسنده مسؤل

دریافت مقاله: ۱۳۸۴/۱/۲۸ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۵/۱/۲ اعلام قبولی: ۱۳۸۵/۴/۲۴

Archive of SID

علی رغم این هتروژنیتی، همه موارد با هایپرپلازی در بافت اپیتلیال آغاز می شود که به کارسینومای مهاجم و نهایتاً به حالت تهاجمی و دست اندازی بدور منجر می شود (۷). تغییرات ژنتیکی زیادی در سرطان های سینه گزارش شده، ولی چالش اصلی شناسایی تغییرات ژنتیکی در آغاز تومورزایی و تغییراتی است که به صورت اتفاقی و تک مورد ایجاد می شوند (۸).

در سالهای اخیر با پیشرفت روشهای تشخیصی، امکان تشخیص زود رس سرطان سینه فراهم شده است (۶) و با شناسایی تومور در مراحل اولیه، کاهش چشمگیری در مرگ و میر حاصل از سرطان سینه به نسبت دهه های اخیر دیده می شود (۹). شناسایی تومورهای پستان در مراحل اولیه راه جدیدی را پیش روی محققین باز کرده و مسائل جدیدی را در کارهای کلینیکی ایجاد کرده است. درک ما از پاتوفیزیولوژی بعضی از این توده های سلولی بلافاصله با پیدایش آن آغاز می شود.

تکنولوژی های پیشرفته اخیر مثل SAGE¹ و DNA micro array این امکان را فراهم ساخته تا به یک نمای جامع از بیان ژنها در کارسینومای سینه در تمامی مراحل دست یابیم (۱۰). کاربرد این تکنیک های جدید در کنار شناسایی توالی ژنوم انسان، امکان شناسایی و پیش بینی ریسک خطر، پیشگیری از ابتلاء به سرطان و درمان آنرا فراهم کرده است (۶).

بطور کل سرطان نتیجه ترکیبی از فاکتورهای مختلف شامل جهش های ارثی و عوامل محیطی است. مقدار مشخصی از موارد ابتلاء به سرطان سینه یعنی حدود ۱۰ درصد را می توان به جهش های ارثی نسبت داد که این جهش ها غالباً در دو ژن BRCA1 و BRCA2 و بر اساس بررسی های شجره ای در بین فامیل های مبتلا شناسایی شده است (۱۱).

همین رابطه در بعضی از جمعیت ها رایج بودن جهش های خاص گزارش شده است. علاوه بر این، جهش های در لایه ژرمینال در ژن های Chk/MLH1²MSH, P53, ATM و BACH-1 و KB-1, PTEN نیز در موارد ابتلاء به سرطان سینه گزارش شده است (۱۱، ۱۰، ۹، ۸، ۷). اما این جهش ها نسبت به جهش ها در دو ژن BRCA1 و BRCA2 خیلی محدود می باشند (۱۱). طبق نتایج منتشر شده بیشترین جهش ها در آگزون های ۲ و ۲۰ در ژن BRCA1 در نوع وراثتی سرطان سینه مشاهده شده اند (۹ و ۳). اگر چه بخش اعظم تومورها در زنان از موارد غیر ارثی است، اما اساس مولکولی این سرطان های غیر ارثی هنوز ناشناخته است (۸ و ۷).

روش بررسی

بیماران: در این تحقیق ۷۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفت. از این تعداد ۳۸ مورد بیمار و ۳۲ مورد دیگر بستگان سالم بیمار می باشند. از ۳۸ نمونه بیمار تنها یک نمونه مربوط به مردی ۴۶ ساله و بقیه نمونه ها مربوط به زنان ۲۵ تا ۵۵ سال می باشند که حدود ۳۰ درصد کل مراجعین مبتلا به سرطان سال ۱۳۸۲ به بخش پاتولوژی بیمارستان شفاء اهواز را تشکیل می دهد. طبق بررسی های علت شناسی عواملی از قبیل سن، شغل، وضعیت تاهل و تعداد زایمان می توانند در سن بروز و پیدایش سرطان پستان در خانم ها موثر باشند. اگر چه در این بررسی حضور و یا عدم حضور جهش مورد توجه بوده ولی اطلاعات ارائه شده در جدول شماره یک می تواند برای تحقیقات تکمیلی قابل توجه باشد.

جدول ۱: اطلاعات شخصی ۳۸ بیمار که در این تحقیق بررسی شده اند. بیماران بصورت تصادفی و از بین مراجعین به بخش سرطان بیمارستان شفاء اهواز و طی یک دوره شش ماهه انتخاب شده اند.

درصد	مشخصات بیماران	
۳۱/۵	۳۰ تا ۴۰ سال	
۴۸/۵	۴۰ تا ۵۰ سال	سن
۲۰	۵۱ سال به بالا	
۵/۷۱	بدون بچه	
۴۵/۷	یک تا چهار بچه	تعداد بچه
۴۸/۵	بیش از چهار بچه	
۶۰	خانه دار	
۴۰	کارمند	شغل
۸/۵	مجرد	
۹۱/۵	متاهل	وضعیت تاهل
۶۰	با شیر مادر	
۴۰	با شیر خشک	تغذیه کودکان

حرارتی در ۳۵ سیکل و در حجم ۲۵ میکرولیتر اعمال شد. در جدول شماره ۲ شرایط واکنش و همچنین غلظت پارامترهای استفاده شده قید گردیده است. دو پرایمر استفاده شده به ترتیب دارای ترادفهای

5-TATCTGCTCTTCGGGTTG-3

TAGCTCTTCAACAAGTGAC-3 بوده

محصولی با طول ۲۵۰ جفت باز به کمک آنها تکثیر گردید. محصولات PCR جهت تأیید بر روی ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز شدند.

جمع آوری نمونه های خونی: نمونه خون وریدی از طریق مرکز رادیوتراپی و شیمی درمانی بیمارستان شفاء اهواز بصورت تصادفی و طی یک دوره شش ماهه جمع آوری گردید.

استخراج DNA از نمونه ها: استخراج DNA از خون طبق دستورالعمل کیت High pure از شرکت Roche انجام گرفت. در هر استخراج مقدار ۲۰۰ میکرولیتر خون استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلیمرازی (PCR): حدود ۵۰ نانوگرم از هر نمونه DNA استخراج شده در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. در برنامه PCR سه مرحله

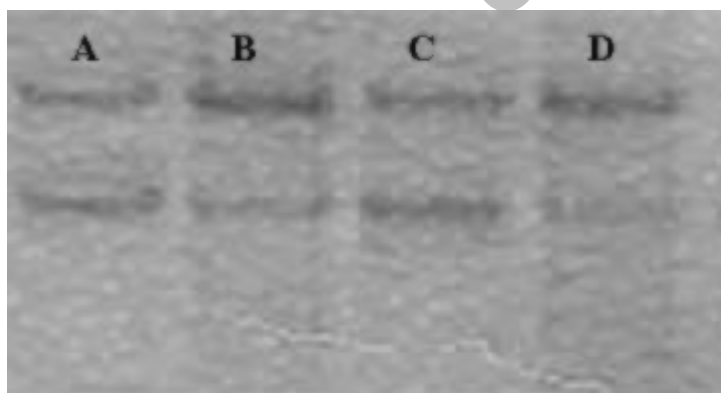
جدول ۲: ویژگی های واکنش PCR در تکثیر اگزون ۲ ژن BRCA1

پروفیل حرارتی واکنش زنجیره ای پلیمرازی	dNTP	200 uM
مرحله واسرشت الگو ۳۰ ثانیه	10x PCR Buffer	2.5 ul
مرحله اتصال پرایمر ۳۰ ثانیه	MgCl ₂	1.5 mM
مرحله تطویل زنجیر ۳۰ ثانیه	DNA Template	50 ng
	Each primer	25 pmol
	Taq. Polymerase	2 units
	Total volume	25ul

یافته ها

بطورکل از ۳۸ نمونه بیماران در چهار مورد جهش در آگزون ۲ ژن BRCA1 مشاهده شد. در هر چهار مورد تشخیص داده شده، جهش ها مربوط به خانم هایی بود که در زمان نمونه گیری تحت شیمی و پرتو درمانی بوده و پیش از آن ماستکتومی شده بودند. در شکل شماره یک نمونه ای از جهش ها بر روی ژل پلی اکریل آمید نشان داده شده است. در یکی از خانم ها سرطان دو طرفه و در بقیه فقط در یکی از سینه ها تومور تشخیص داده شده بود. در ۳۲ نمونه بستگان سالم بیمار فقط در یک خانم ۲۷ ساله جهش مشاهده شد. مادر بزرگ این شخص قبلاً در سن ۵۷ سالگی در اثر عوارض سرطان سینه فوت شده بود. در جدول شماره ۳ مشخصات افراد دارای جهش آورده شده است.

روش SSCP جهت غربالگری جهش ها: برای این منظور ابتدا ژل پلی اکریل آمید ۱۲ درصد با ۵ درصد گلیسرول و سیصد میکرولیتر محلول ده درصدی آمونیوم پرسولفات به همراه ۳۰ میکرولیتر TEMED ساخته شد. سپس ۴ میکرولیتر محصول PCR را با ۴ میکرولیتر بافر حاوی ۹۵ درصد فرمامید⁻ ۱۰ میلی مولار سود، و ۱۰ میلی مولار برم فنول آبی و گزین سیانول مخلوط کرده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد حرارت داده سپس بر روی یخ گذاشته و سریعاً به ژل انتقال داده شد. نمونه ها بمدت ۱۵ تا ۲۰ ساعت در دمای محیط و با ولتاژ ۳۰۰ ولت الکتروفورز^۱ شدند. در خاتمه ژل با کمک روش نیترات نقره رنگ آمیزی و نهایتاً در دستگاه ژل خشک کن^۲ خشک شد.



شکل ۱: تصویر ژل ۱۲ درصدی پلی اکریل آمید به همراه ۵ درصد گلیسرول جهت تقویت ساختار های تک رشته ای. فلاشها نمایانگر DNA تک رشته ای می باشند. جایگاه دو تک رشته ای در همه نمونه ها ثابت است اما در نمونه E و F منحصرأ تک رشته های مضاعفی دیده می شود که دلالت بر موتاسیون در نمونه های قید شده می باشد. A, B, C, D محصول PCR فاقد جهش می باشند.

1- Electrophoresis Tank from Hybaid

2- Gel Dryer from Hybaid

جدول ۳: مشخصات فردی و بالینی افراد دارای جهش

بحث	ردیف	سن	نسبت	مرحله بیماری	نوع سرطان سینه
ژن BRCA1 در	۱	۵۳ ساله	بیمار	جراحی - شیمی و پرتو درمانی	دو طرفه
سال ۱۹۹۰	۲	۵۰ ساله	بیمار	جراحی - شیمی و پرتو درمانی	یکطرفه
شناسایی و نقشه	۳	۴۹ ساله	بیمار	جراحی - شیمی و پرتو درمانی	یکطرفه
برداری و در سال	۴	۴۷ ساله	بیمار	جراحی - شیمی و پرتو درمانی	یکطرفه
۱۹۹۴ کلون	۵	۲۷ ساله	نوه بیمار	سالم	-

خانمها به خود اختصاص می دهد، نوع وراثتی با الگوی آتوزوم غالب است که از شاخصه های آن بروز تومور در سنین پایین و تجمع افراد مبتلا به سرطان سینه و تخمدان در یک خانواده است (۱۶). دسته دوم نوع فامیلی است که با بروز کمتر نسبت به گروه اول و تحت تاثیر عوامل ژنتیکی و محیطی ایجاد می شود و ۲۰ درصد از تومورهای سینه را در بر می گیرد (۱۶). دسته سوم که در ۷۰ درصد سرطانهای سینه دیده می شود از نوع تک گیر^۱ می باشد. در این نوع سرطان خطر برای همه خانم ها بدون سابقه فامیلی یکسان می باشد. اینگونه تومورها احتمالاً "دراثر عوامل محیطی از قبیل هورمون درمانی و تغذیه نامناسب پدید می آیند (۷ و ۱۸). جالب توجه است که عوامل محیطی دیگری مانند تعداد بارداری و تغذیه کودک با شیر مادر خطر ابتلا به این نوع سرطان را در خانم ها کاهش می دهد (۱۸)، اما اکثر بیماران بررسی شده در این تحقیق بیش از چهار فرزند داشته و حداقل بمدت یک سال کودک خود را با شیر مادر تغذیه کرده اند (جدول شماره یک). این موضوع می تواند دلالت بر تاثیر بیشتر عوامل ژنتیکی در بروز سرطان در جمعیت بیماران این تحقیق داشته باشد.

گردید (۱). ماهیت مهار کنندگی تومور از آن جهت به BRCA1 نسبت داده می شود که تومور زایی در افراد دارای جهش ژرمینال، نیازمند غیر فعال شدن جهش آلل دیگر است. بسیاری از مطالعات اپیدمیولوژیک ژنتیکی دلالت بر آن دارند که افراد دارای جهش BRCA1، ریسک سرطانی حدود ۹۰ درصد دارند (۱۲). علاوه بر این مشخص شده است که جهش در BRCA1، علاوه بر سرطان سینه خطر بروز سرطان تخمدان را در زنان و سرطان پروستات را در مردان بالا می برد (۱۳). تحقیقات در جهت تعیین عملکرد BRCA1 نشان داده که این ژن حداقل در دو فرایند سلولی ترمیم و تنظیم رونویسی دخیل است که البته بررسی های بیشتر در مورد ژن هایی است که به نوعی در ترمیم DNA نقش دارند (۱۴).

بررسی های بیشتر نشان داد که نقص یا از دست رفتن BRCA1 منجر به نقص در ترمیم آسیب وارد شده به DNA، تکثیر سانتروزوم، توقف سیکل سلولی، نقص در رشد، افزایش مرگ سلولی، ناپایداری ژنتیکی و تومورزایی می شود (۱۵). سرطان سینه را می توان به سه دسته تقسیم کرد. دسته اول که ۱۰ درصد از سرطان های سینه را در

1-Sporadic

در این تحقیق نتایج بدست آمده از بررسی بیماران با استفاده از روش SSCP نشان می دهد که در ۱۰/۵ درصد نمونه ها، جهش در اگزون ۲ ژن BRCA1 وجود دارد که این درصد بدست آمده با فراوانی های سرطان سینه از نوع ارثی مطابقت دارد. البته باتوجه به محدود بودن نقاط آزمایش شده فراوانی جهش در بیماران می تواند احتمالاً به کمک روش های دقیقتر مانند تعیین ترادف مستقیم^۱ با هدف غربالگری جهش در تمامی طول ژن افزایش یابد. این نتایج می تواند اهمیت مطالعات اصولی را روشن نماید زیرا در مطالعات قبلی در ایران (۲۰۱۹ و ۲۰۲۰) گزارشی در مورد وجود جهش در اگزون ۲ ژن BRCA1 منتشر نشده است و در گزارش یاسائی و همکاران (۲۱) در ۸۳ بیمار مورد بررسی، در دو مورد جهش تغییر قالب مشاهده گردید که با توجه به تنوع جمعیتی ایران احتمالاً فراوانی ها و مشاهده یا عدم مشاهده جهش خاصی نمی تواند برای مناطق مختلف کشور قابل تعمیم باشد (۲۲).

در مجموع قضاوت در مورد اینکه این افراد دارای سرطان سینه از نوع ارثی یا فامیلی هستند کار دشواریست چرا که به استثناء یک مورد شجره نامه دقیقی از بقیه بیماران وجود نداشته و دیگر اینکه نمونه گیری از همه بستگان نزدیک نیز امکان پذیر نبوده است. از طرفی در این بررسی همه نقاط ژن غربالگری نشده اند. یادآوری می شود که هر چند موتاسیون ها در تمامی ۲۴ اگزون این ژن و بصورت پراکنده مشاهده شده اما جهش غالب بر روی اگزون ۲ گزارش شده

است که در اثر حذف بازهای آدینین و گوانین در کدون ۱۸۵ بوجود می آید و به همین دلیل این منطقه از ژن را منطقه داغ و مستعد به جهش می نامند (۱۸). به همین دلیل در بررسی انجام شده بر روی بیماران مراجعه کننده به بیمارستان شفاء اهواز شناسایی جهش ها متمرکز بر اگزون ۲ شده بود. بنابراین مطالعات تکمیلی بر روی بیماران و بستگان بیمار بررسی شده امری ضروری بنظر می رسد. به هر حال نتایج در مقایسه با بررسی های قبلی انجام شده در ایران نشان دهنده وجود قابل توجه جهش ژرمینال در اگزون ۲ ژن BRCA1 در جمعیت بیمار اهواز می باشد (۲۲).

لازم بذکر است که بیمارانی که جهش دریکی از دو نسخه ژن BRCA1 را از طریق سلولهای ژرمینال به ارث برده، الزاماً در بافت اپیتلیال سینه دارای جهش در هر دو آلل این ژن می باشند. این نتیجه به نوبه خود دارای اهمیت زیادی است زیرا نزدیکان درجه یک بیماران بالقوه مستعد به این بیماری هستند و تشخیص های مولکولی تنها راه پیشگیری و اقدام به موقع قبل از تشکیل تومور بنظر می رسد (۹).

بعنوان مثال مطالعات تکمیلی برای فرد ردیف ۵ درجدول شماره ۲ که یکی از بستگان بیمار (مادر بزرگ پدری وی دارای سرطان بوده است) می باشد، بسته به تشخیص نوع جهش، احتمال پیش آگهی برای تشخیص زود رس، پیشگیری و یا کاهش ریسک سرطان را امکان پذیر می سازد.

1- Direct Sequencing

منابع

- 1-Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66–71.
- 2-Newman B, Millikan RC, King MC. Genetic epidemiology of breast and ovarian cancers. *Epidemiol Rev* 1997;19: 69-79.
- 3-Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richards CS. Ashkenazi Jewish Population Frequencies for Common Mutations in Brca1 and Brca2. *Nature Genetics* 1996; 14: 185-7.
- 4-Tonin P. Frequency of Recurrent BRCA1 and BRCA2 Mutations in Ashkenazi Jewish Breast-Cancer Families. *Nature Medicine* 1996; 2: 1179-83.
- 5-Parkin DM. Epidemiology of cancer: global patterns and trends. *Toxicol Lett* 1998; 102-103:227-34.
- 6-Wooster R, et al. Identification of the Breast-Cancer Susceptibility Gene BRCA2. *Nature* 1995; 378:789-92.
- 7-Ritchie MD, Hahn LW, Roodi N, Bailey LR, Dupont WD, Parl FF, Moore JH. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *Am J Hum Genet* 2001;69: 138-47.
- 8-Rebbeck TR, Couch FJ, Kant J, Calzone K, DeShano M, Peng Y, Chen K, Garber JE and Weber BL. Genetic heterogeneity in hereditary breast cancer: role of BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 1996;59:547-53.
- 9-Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med* 2002;346:1616-22.
- 10- Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:12963-8.
- 11- Petrakis, NL. Genetic factors in the etiology of breast cancer. *Cancer* 1997; 39: 2709-15.
- 12-Ford D, Easton DF, Peto J. Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. *Am J Hum Genet* 1995;57:1457-62.
- 13- Rebbeck TR, Levin AM, Eisen A. Breast cancer risk after bilateral prophylacticoophorectomy in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1475-9.
- 14-Deng CX, Scott F. Role of the tumor suppressor gene Brca1 in genetic stability and mammary gland tumor formation. *Oncogene* 2000; 19: 1059–64.
- 15-Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001; 27: 247–54.
- 16-Claus EB, Risch N, Thompson WD. Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. *Cancer* 1994;73:643-51.
- 17-Ligtenberg MJ, Hogervorst FB, Willems HW, Arts PJ, Brink G, Hageman S, et al . Characteristics of small breast and/or ovarian cancer families with germ line mutations in BRCA1 and BRCA2. *Br J Cancer* 1999;79:1475-8.
- 18-Seltzer MH, Plato CC Fox KM. Dermatoglyphics in the identification of women either with or at risk for breast cancer. *Am J Med Genet* 1990;37: 482-8.
- 19-Mehdipour P, Atri M, Pour-Farзад F. Detection of BRCA1 mutation in the Breast Cancer probands by non-radioactive PCR-SSCP method. *Human mutations online* 2000;Archives of Iranian Medicine 1999;2(2).
- 20-Ghaderi A. Germline BRCA1 mutations in Iranian women with breast cancer. *Cancer Lett Apr* 2001; 165(1):87-94.
- 21-Yassaee VR. Novel mutations in BRCA1 and BRCA2 in Iranian women with early-onset breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002; 4:R6.

22-Moslehi R. Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in an Iranian family with hereditary Breast and ovarian cancer syndrome. Am J Med Genet 2003; 117A:304-5.

Archive of SID