

## مقاله پژوهشی

### مطالعه پلی مورفیسم کدون ۷۲ اگزون ۴ ژن P53 در مبتلایان به سرطان تیروئید در شمالغرب ایران

محمدعلی حسینیپور فیضی: گروه زیست جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، نویسنده رابط:

Email: pourfeizi@eastp.ir

رقیه توفیق: گروه زیست جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران  
ناصر یولادی: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان  
ریحانه روانبخش: گروه زیست جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران  
پروین آذرفام: گروه زیست جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران  
وحید منتظری: بخش توراکس، بیمارستان امام رضا(ع)، تبریز، ایران

دریافت: ۹۱/۵/۳ پذیرش: ۹۱/۸/۲

#### چکیده

**زمینه و اهداف:** سرطان تیروئید شایع‌ترین بدخیمی سیستم اندوکراین است. میزان شیوع این سرطان با شرایط جغرافیایی، محیطی و نژادی متغیر می‌باشد. عمده دلیل ابتلا به سرطان، جهش در ژن‌های سرکوبگر نظیر ژن P53 و ژن‌های سرطان‌زا می‌باشد، ولی علاوه بر جهش، عامل دیگر بروز سرطان، پلی مورفیسم‌های ژنتیکی می‌باشد. هدف از اجرای این طرح بررسی نقش پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان تیروئید در شمالغرب ایران می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در مطالعه موردی-شاهدی، از ۶۰ بیمار مبتلا به سرطان تیروئید مراجعه کننده به بیمارستان‌های تبریز در گروه‌های سنی مختلف نمونه خون محیطی و همچنین در حین جراحی نمونه بافتی تهیه و از ۹۹ فرد سالم (به عنوان کنترل) نمونه خون محیطی تهیه شد. پس از استخراج DNA از بافت و خون محیطی به روش پروتیناز K، ژنوتیپ‌های مختلف کدون ۷۲ از ژن P53 با استفاده از سیستم تکثیر متزلزل جهش‌ها (ARMS-PCR) تعیین شدند و از روش PCR-SSCP جهت بررسی وجود تغییرات احتمالی در اگزون ۴ PCR-SSCP استفاده و برای تایید نتایج نهایی، از روش توالی یابی مستقیم استفاده شد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از آزمون مربع کای و مقدار P-Value انجام شد.

**یافته‌ها:** فراوانی ژنوتیپی Arg/Arg در گروه کنترل ۳/۳۰٪، Arg/Pro ۵/۵۰٪ و Pro/Pro ۱۹/۲٪ و در گروه سرطانی بترتیب ۳۱/۶۷ درصد، ۵۱/۶۷ درصد و ۱۶/۶۷ درصد بدست آمد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج بدست آمده نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P53 با خطر ابتلا به سرطان تیروئید وجود ندارد. که این می‌تواند ناشی از تفاوت نژادی، عوامل محیطی، وضعیت مواتاسیونی P53 در تومورها، و تفاوت در حساسیت ژنتیکی به عوامل محیطی باشد.

**کلید واژه‌ها:** پلی مورفیسم، ژن P53، کدون ۷۲، سرطان تیروئید.

#### مقدمه

هاوایی دو برابر کشورهای اروپای شمالی، کانادا و ایالات متحده می‌باشد. این سرطان میان اقوام مختلف ساکن در هاوایی، مردان چینی و زنان فیلیپینی رایج‌تر است (۲) از مهمترین تغییرات ژن‌های درگیر در سرطان تیروئید می‌توان از جهش در ژن‌های

سرطان تیروئید شایع‌ترین بدخیمی سیستم اندوکراین است که حدود یک درصد سرطان‌های بدخیم را تشکیل می‌دهد (۱). تحقیقات نشان می‌دهد میزان شیوع این سرطان با شرایط جغرافیایی، محیطی و نژادی متغیر بوده و شیوع آن در ایسلند و

شدند. از ژن کنترل داخلی بتاگلوبین برای اطمینان از حضور DNA در واکنش های PCR استفاده شد. همچنین جهت بررسی وجود تغییرات احتمالی در اگزون ۴ این ژن و تایید الگوی پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P53 از DNA استخراج شده از بافت های سرطانی از روش PCR-SSCP استفاده شد. سپس به منظور تایید نتایج نهایی، از هر کدام از سه الگوی ایجاد شده، ۳ نمونه برای تعیین توالی به روش توالی یابی مستقیم فرستاده شدند، در ادامه توالی های بدست آمده با استفاده از نرم افزار Chromas مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج بدست آمده با استفاده از روش آماری SPSS نسخه ۱۴ مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. برای مقایسه ی توزیع فراوانی سه ژنوتیپ مختلف کدون ۷۲ (هموزیگوت های Pro/Pro، Arg/Arg و هتروزیگوت Arg/Pro) در نمونه های سرطانی با توزیع فراوانی این سه ژنوتیپ در نمونه های شاهد از آزمون مربع کای استفاده و در هر مورد P-Value محاسبه شد. برای این مطالعه مقدار p کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار تلقی گردید.

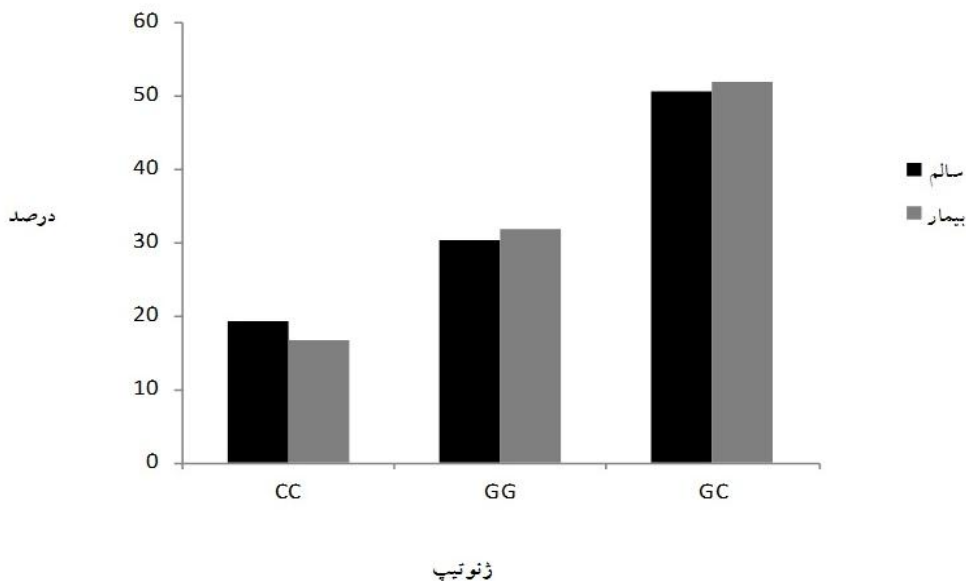
## نتایج

در این مطالعه ۶۰ بیمار با متوسط سنی  $39.76 \pm 3.37$  سال (کمترین سن ۱۵ و بیشترین سن ۷۷ سال) مبتلا به سرطان تیروئید و ۹۹ نفر فرد سالم (فاقد سرطان در بستگان درجه یک و دو آنها) با متوسط سنی  $38 \pm 3.5$  سال (کمترین سن ۱۹ و بیشترین سن ۷۶ سال) مورد بررسی قرار گرفتند. از بین ۶۰ بیمار مورد مطالعه ۳۶ نفر (۶۰٪) دارای آسیب شناسی پاپیلاری کارسینوما، ۳ نفر (۵٪) فولیکولار کارسینوما، ۱۸ نفر (۳۰٪) فولیکولار آدنوما، ۱ نفر (۱/۶۶٪) مدولاری کارسینوما و ۲ نفر (۳/۳۳٪) پاپیلاری کارسینوما بعلاوه فولیکولار آدنوما داشتند. همچنین در این بیماران ویژگی های کلینیکی پاتولوژیکی از جمله درجه توموری، درگیری غدد لنفاوی و انواع آسیب شناسی با نوع ژنوتیپ بررسی گردید. فراوانی ژنوتیپی Pro/Pro در گروه سرطانی ۱۶/۶۷٪ و در گروه کنترل ۱۹/۲٪ بود. اختلاف بین فراوانی ژنوتیپ Pro/Pro در نمونه های سرطانی و نمونه های کنترل معنی دار نمی باشد ( $OR = 0.111$  و  $CI = 0.95$ ). فراوانی ژنوتیپی Arg/Arg در نمونه های سرطانی ۳۱/۶۷٪ و در نمونه های سالم ۳۰/۳٪ بود. تفاوت معنی داری بین گروه بیمار و کنترل در این گروه ژنوتیپی وجود ندارد ( $OR = 0.069$  و  $CI = 0.95$ ). فراوانی افراد هتروزیگوت Arg/Pro در گروه سرطانی ۵۱/۶۷٪ (۳۱ نفر) در مقایسه با ۵۰/۵٪ (۵۰ نفر) در گروه شاهد دیده شد. تفاوت معنی داری بین گروه بیمار و کنترل در این گروه ژنوتیپی وجود ندارد ( $OR = 0.091$  و  $CI = 0.95$ ). شکل ۱ نمودار فراوانی ژنوتیپی را نشان می دهد.

سرطانزا و ژن های سرکوبگر تومور نام برد. از مهمترین ژن های سرکوبگر درگیر در سرطان، ژن p53 می باشد. این ژن بر روی بازوی کوتاه از کروموزوم ۱۷ قرار دارد (P13.1) و دارای ۱۱ اگزون، به طول ۲۰ کیلو باز می باشد (۳). علاوه بر جهش، عامل دیگر بروز سرطان، پلی مورفیسم های ژنتیکی می باشد. پلی مورفیسم اشاره به وجود تفاوت آلی در یک جایگاه ژنی بوده و عامل تفاوت افراد در داشتن صفات منحصر به فرد و عامل استعداد افراد به بیماری، فراوانی سرطان در یک جمعیت، سن بروز سرطان در یک فرد یا پاسخ به درمان سرطان ها و همچنین بر همکنش با جهش های شناخته شده مستعد کننده بیماری می باشند (۴ و ۵). تغییرات نژادی و جغرافیایی در عملکرد پلی مورفیسم های ژن p53 دخیل است. پلی مورفیسم های p53 در هر دو مناطق کد کننده و غیر کد کننده دیده شده است بطوریکه حداقل ۳۷ پلی مورفیسم کشف شده که تنها دو پلی مورفیسم، توالی امینو اسیدی پروتئین p53 را تغییر می دهد. یکی از آنها تغییر پرولین به سرین در کدون ۴۷ و دیگری تغییر پرولین به آرژنین (C به G) در کدون ۷۲ است. این پلی مورفیسم متداول تر بوده و کد کننده سه ژنوتیپ هموزیگوت آرژنین (Arg/Arg)، هتروزیگوت (Arg/pro) و یا هموزیگوت پرولین (pro/pro) می باشد (۶). تحقیقات نشان می دهد این پلی مورفیسم با افزایش خطر ابتلا به سرطان های زیادی از جمله ریه، نازوفارنکس، دهان، پروستات و کولورکتال ارتباط دارد و شاید بتوان آن را به عنوان مارکر مستعدکننده به سرطان تیروئید نیز در نظر گرفت. هدف از این تحقیق، بررسی پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان تیروئید در جمعیت استان آذربایجان شرقی بود.

## مواد و روش ها

در مطالعه موردی - شاهدی، از ۶۰ بیمار مبتلا به سرطان تیروئید که از سال ۱۳۸۷ تا خرداد ۱۳۸۹ به بیمارستانهای امام رضا (ع) و نورنجات تبریز مراجعه کرده بودند، بعد از اخذ رضایت، نمونه بافت و خون محیطی و همچنین از ۹۹ نفر فرد سالم (که در بستگان درجه یک و دو آنان هیچگونه سرطانی مشاهده نشده بود) بعنوان گروه کنترل، نمونه خون محیطی تهیه و با روش پروتئیناز K، استخراج DNA صورت گرفت. همچنین مشخصات بیماران از نظر تشخیص آسیب شناسی، درجه ی تومور، سن، لوب درگیر، اندازه تومور، درگیری غدد لنفاوی از پرونده بیمارستانی آنها تهیه گردید. برای بررسی پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P53 در بیماران و گروه کنترل، آلل پرولین با اندازه ۱۷۷ جفت باز و آلل آرژنین با ۱۴۴ جفت باز با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) به طور اختصاصی و با استفاده از نمونه های خون محیطی، تکثیر



شکل ۱: فراوانی ژنوتیپ در بیماران سرطانی و گروه کنترل

تحقیقات نشان می دهد، میزان شیوع این سرطان با شرایط جغرافیایی، محیطی و نژادی متغیر است. علاوه بر جهش در ژن های سرطان زا و ژن های سرکوب گر تومور، پلی مورفیسم ها (عامل تفاوت افراد در داشتن صفات منحصر به فرد) نیز عامل استعداد افراد به سرطان تیروئید می باشد (۴). یکی از مهمترین ژن های سرکوبگر درگیر در سرطان، ژن p53 می باشد که در ابتلا افراد به سرطان دخیل است. حداقل ۳۷ پلی مورفیسم این ژن کشف شده است، که متداول ترین آن تغییر پرولین به آرژنین (C به G) در کدون ۷۲ است (۶). تحقیقات نشان می دهد تغییرات نژادی و جغرافیایی و محیطی در عملکرد پلی مورفیسم های این ژن دخیل هستند. مطالعات انجام یافته بر روی جمعیت هند در سال ۲۰۰۵ روی سرطان سرویکال وابسته به HPV نشان داد که ارتباط معنی داری بین هموزیگوت پرولین در موقعیت کدون ۷۲ ژن p53 با این سرطان وجود دارد (۷) و همچنین مطالعه انجام یافته در شرایط موجود زنده (Invivo) نشان داد که استعداد تغییر شکل وابسته به پاپیلوما ویروس انسانی (HPV)، در هموزیگوت های آرژنین، ۷ برابر هتروزیگوت های Arg/pro می باشد (۸). بویرا و همکاران در سال ۲۰۰۳ ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ Arg/Arg در کدون ۷۲ ژن p53 و سرطان پستان در بیماران ترک گزارش کردند (۹) در سال ۲۰۰۵ جین و همکاران در جمعیت هند ارتباط ژنوتیپ Arg/pro در کدون ۷۲ ژن p53 را با پیشرفت زودرس سرطان ریه گزارش کردند (۱۰).

کوشیگ و همکاران در سال ۲۰۰۵ ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم کدون ۷۲ (Arg/Arg) ژن p53 و خطر ابتلا به نئوپلازی اینترا اپی تلیال کشف کردند (۱۱). از طرف دیگر مطالعات نشان

فراوانی آلل C در بیماران و گروه شاهد به ترتیب ۴۲/۵ درصد، ۴۴/۴ درصد و فراوانی الی G در بیماران و گروه شاهد به ترتیب ۵۷/۵ درصد و ۵۶/۵ درصد بدست آمد. آزمون مربع کای، اختلاف معنی داری بین فراوانی آللی دو گروه نشان نداد (OR=۰/۱۲۵ و CI=۰/۹۵). نتایج بدست آمده نشان داد که آسیب شناسی پایلاری کارسینوما، فولیکولار کارسینوما، فولیکولار آدنوما، مدولاری کارسینوما به ترتیب ۴۰ درصد، صفر درصد، ۶۰ درصد و صفر درصد دارای ژنوتیپ نوع CC و ۵۷/۸۹ درصد، صفر درصد، ۳۱/۵۸ درصد، ۱۰/۵۳ درصد دارای ژنوتیپ نوع GG و ۶۷/۷۴ درصد، ۳/۲۳ درصد، ۱۹/۳۵ درصد، ۹/۶۸ درصد دارای ژنوتیپ نوع CG بودند. آزمون مربع کای اختلاف معنی داری را بین فراوانی نوع آسیب شناسی ها در ژنوتیپ نوع CC نشان نمی دهد (OR=۴ و P>۰/۰۵) ولی در ژنوتیپ های نوع GG و CG اختلاف معنی داری بین انواع آسیب شناسی ها وجود دارد (P<۰/۰۱ و OR=۴۶/۹ و OR=۶/۴۲). آزمون مربع کای اختلاف معنی داری را در فراوانی درجه تومور در ژنوتیپ نوع GG و GC نشان داد (OR=۷/۳۳ و OR=۵/۶۹). به منظور بررسی ارتباط پلی مورفیسم با خطر ابتلا به سرطان تیروئید و همچنین احتمال وجود تغییرات در آگزون ۴ ژن p53 که از روش SSCP (چند شکلی های فضایی تک رشته ای) و مقایسه توالی قطعه با قطعه اصلی استفاده شده بود، تغییری مشاهده نشد.

## بحث

سرطان تیروئید شایع ترین بدخیمی سیستم اندوکرینی است که حدود یک درصد سرطان های بدخیم را تشکیل می دهد (۱).

سال ۲۰۱۰ در برزیل ارتباط پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن p53 با سرطان تیروئید نشان داد که ژنوتیپ هتروزیگوت Arg/pro، حدود ۳/۶ برابر در مقایسه با دیگر ژنوتیپها ریسک بدخیمی ندول های تیروئیدی را افزایش می دهد (۱۷) و در مطالعه حاضر ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P53 با خطر ابتلا به سرطان تیروئید در بیماران مبتلا به سرطان تیروئید مراجعه کننده به بیمارستانهای امام رضا (ع) و نورنجات تبریز مشاهده نشد که می تواند ناشی از تفاوت نژادی، عوامل محیطی، وضعیت موتاسیونی P53 در تومورها، و تفاوت در حساسیت ژنتیکی به عوامل محیطی باشد.

### نتیجه گیری

پژوهش حاضر نشان می دهد که ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P53 با خطر ابتلا به سرطان تیروئید وجود ندارد که این می تواند ناشی از تفاوت نژادی، عوامل محیطی، وضعیت موتاسیونی P53 در تومورها، و تفاوت در حساسیت ژنتیکی به عوامل محیطی باشد، ولی برای تعیین نقش دقیق این پلی مورفیسم در رشد سرطان تیروئید لازم است مطالعات بیشتری صورت پذیرد.

می دهد که پلی مورفیسم های دیگر موجود در مسیر P53 می توانند بر ارتباط پلی مورفیسم کدون ۷۲ تأثیر بگذارند. مثلاً افراد حامل سندرم لی فرامنی که دارای آلل G در پروموتور ژن MDM2 309 می باشند، دارای یک شروع زودرس ۱۰ ساله در ابتلا به سرطان می باشند که پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P53 این اثر را تشدید می کند، به طوری که افراد حامل آلل G در SNP309 و واریانت Arg دار کدون ۷۲ ژن P53، یک افزایش بیست ساله زودرس در شروع سرطان را نشان می دهند. ولی مطالعات صورت گرفته در ایران روی پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن p53 با سرطان پستان در اصفهان (۱۲) و در شمال ایران (۱۳) ارتباط معنی داری را بین این پلی مورفیسم و سرطان پستان نشان نداد.

بولتز و همکاران در سال ۲۰۰۲ در بیماران قفقازی نشان دادند که هموزیگوت پرولین در کدون ۷۲ از ژن p53 می تواند یک عامل خطر برای پیشرفت کارسینومای تیروئیدی نامتماز یافته باشد (۱۴). در سال ۲۰۰۴ گرانجا و همکاران در برزیل ارتباط معنی داری را مابین واریانت pro/pro و حساسیت ابتلا به سرطان تیروئید را نشان دادند (۱۵). در سال ۲۰۰۷، آرال و همکاران در ترکیه ارتباط معنی داری ما بین هموزیگوت پرولین در کدون ۷۲ و پیشرفت سرطان تیروئید را در بیماران ترک نشان دادند (۱۶). در

### References

- Raymon H, Elliot J. The Evolution of Biomarkers in Thyroid cancer form mass screening to a personalized Biosignature. *Cancers* 2010; **2**: 885-912.
- Wartofsky L. Increasing world incidence of thyroid cancer: Increased detection or higher radiation exposure? *Hormones* 2010; **9**(2): 103-108.
- Varley JM. Germline TP53 Mutations and Li- fraumeni Syndrome. *Human Mutation* 2003; **21**: 313-320.
- Noma C, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki y, Noguchi S. Association of p53 genetic polymorphism (Arg 72 pro) with estrogen receptor positive breast cancer risk in Japanese women. *Cancer Letters* 2004; **210**: 192-197.
- U.S Department of Energy Human Genome Project. Human Genome Project Information. ([http:// www.Ornl.gov/sci/techresources/Human-Genome /fag/ snps.Shtml](http://www.Ornl.gov/sci/techresources/Human-Genome /fag/ snps.Shtml))- SNP fact sheet (Accessed May 2012).
- Pietsch EC, Humbey O. *Polymorphisms in the p53 pathway*, Division of Medical science, fox chase cancer center. Philadelphia, PA, USA, 2006; PP: 1602-1611.
- Bhattacharya P, Sengupta S. Lack of evidence that proline homozygosis at codon 72 of p53 and rare arginine allele at codon 31 of p21, jointly mediate cervical cancer susceptibility among Indian women. *Gynecol Oncol* 2005; **99**(1):176-82.
- Branna SMF, Zeferino LC, Pereira JS, Martines EZ, Syrjanen KJ. Prognostic value of p53 codon 72 polymorphism in invasive cervical cancer in Brazil. *Gynecologic Oncology* 2004; **93**: 374-380.
- Buyru N, Tigli H, Dalay N p53 codon 72 polymorphism in breast cancer. *Oncology Reporter* 2003; **10**: 711-714.
- Jain N, Singh V, Hedau S, Kumar S,
- Daga MK, Dewan R. Infection of human papillomavirus type 18 and p53 codon 72 polymorphism in lung cancer patients from India. *Chest* 2005; **128**: 3999-4007.
- Koushik A, Ghosh A, Duart- Franco E, Forest P, Voyer H. The p53 codon 72 polymorphism and risk- grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Detection and Prevention* 2005; **29**: 307-316.
- Faghani M, Nikbakht M, Salehi M, Robbani M, Talebi A. Study of p53 polymorphism at codon 72 in patients of breast cancer in Isfahan. *Journal of Isfahan Medical School* 2007; **25**(84): 26-33.
- Khadang B, Fattahi MJ, Talei A, Samsami Dehaghani A, Ghaderi A. Polymorphism of TP53 codon 72 showed no association with breast cancer in Iranian women. *Cancer Genetics and Cytogenetic* 2007; **173**: 38-42.
- Boltz C, Roessner A, Landt O, Szibor R. Homozygous proline at codon 72 of p53 as a potential risk factor favoring the development of undifferentiated thyroid carcinoma. *Int J Oncol* 2002; **21**: 1151-1154.

16. GranJa F, Morari J, Elaine C. Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for Thyroid cancer. *Cancer letters* 2004; **210**: 151-157.
17. Aral C, Caglayan S, Gokan S, Ozgur S. The association of p53 codon 72 polymorphism with Thyroid cancer in Turkish patients. *Marmara Medical Journal* 2007; **20**(1): 1-5.
18. Reis AA, Silva DM. Involvement of CYP 1A1, GST, 72 TP53 polymorphisms in the pathogenesis of thyroid nodules, *Genetics and molecular Research* 2010; **9**(4): 2222-2229.

Archive of SID