Archive of SID

شناسایی حاملین ژن سرطان مدولری تیروئید موروثی در ایران با استفاده از موتاسیون‌های پروتوانکوژن *RET*

دکتر فریدون عزیزی [۱]، دکتر ایرج نبی‌پور [۲]، فرشته قاسمی [۳]، شهریار کیایی [۳]، دکتر رضا برادر جلیلی [۴]

[۱] استاد گروه غدد درون ریز و متابولیسم، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

[۲] استادیار گروه داخلی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر

[۳] کارشناس ارشد بیولوژی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

[۴] پزشک عمومی، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

طب جنوب / سال چهارم؛ شماره دوم / اسفند ۱۳۸۰

چکیده:

سرطان مدولری تیروئید *(Medullary Thyroid Carcinoma; MTC)* به دو صورت اسپورادیک و سندرم‌های نئوپلازی اندوکرین چندگانه موروثی تیپ ۲ به شکل اتوزومال غالب، روی می‌دهد. تشخیص میان *MTC* اسپورادیک و موارد موروثی برای درمان و پیگیری بالینی بیماران و خانوادهٔ آنان حائز اهمیت بسیار است. ژن مستعد کننده برای انواع موروثی سرطان مدولری تیروئید، پروتوانکوژن *RET* است. به منظور شناسایی موارد سرطان مدولری تیروئید موروثی بر اساس آنالیز *DNA* و همچنین شناسایی موتاسیون‌های پروتوانکوژن *RET* در خانوادهٔ این بیماران، تعداد ۲۴ بیمار با *MTC* (شامل ۲۰ مورد *MTC* اسپورادیک ظاهری، یک مورد *MEN 2A*، یک مورد *MEN 2B* و دو مورد *MTC* فامیلیال) از بیمارستان‌ها و کلینیک‌های دانشگاهی تهران، مورد آنالیز ژنتیکی در اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ پروتوانکوژن *RET* قرار گرفتند. *DNA* ژرم لاین از گلبول‌های سفید خون محیطی استخراج و با استفاده از پرایمرهای مربوط به اگزون ۱۰ و ۱۱ پروتوانکوژن *RET* تکثیر *(PCR)* شدند و با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر *(Restriction enzymes)* مورد آنالیز قرار گرفتند. یکی از بیماران گروه *MTC* اسپورادیک ظاهری، دارای موتاسیون در اگزون ۱۰ *($Cys620 \rightarrow Arg^{14}$)* و تنها بیمار با *MEN 2A* نیز دارای موتاسیون در اگزون ۱۱ *($Cys634 \rightarrow Trp+$)* بود، مابقی بیماران فاقد موتاسیون در اگزون‌های مورد بررسی بودند. تعداد ۳ نفر (۱۲، ۲۸ و ۳۹ ساله) از ۶ نفر از اعضاء خانوادهٔ بیمار با *MEN 2A* نیز دارای همان نوع موتاسیون *($Cys634 \rightarrow Trp^{+}$)* بودند. بنابراین، تمام بیماران با *MTC* (چه بصورت موروثی و چه بصورت اسپورادیک ظاهری) می‌بایست برای موتاسیون‌های شناخته شده ژرم لاین *RET* بررسی شوند. با این رهیافت، می‌توان نسبت به تیروئیدکتومی پروفیلاکسی حاملین موتاسیون پروتوانکوژن *RET* اقدام نمود.

واژه‌گان کلیدی: سرطان مدولری تیروئید، پروتوانکوژن، *RET* موتاسیون

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه:

سرطان مدولری تیروئید (*MTC*)، *Medullary Thyroid Carcinoma* عامل ۱۰ درصد از بدخیمی‌های تیروئید است. این بدخیمی از انواع پاپیلری و فولیکولر سرطان تیروئید تهاجمی‌تر است و همچنین، ید رادیواکتیو و شیمی درمانی در مورد آن مؤثر نیست و تنها راه درمان، جراحی است و درمان عود آن نیز موفقیت‌آمیز نیست(۱). سرطان مدولری تیروئید در ۲۵ درصد از موارد نیز بصورت موروثی دیده می‌شود(۲). سه نوع موروثی سرطان مدولری تیروئید شامل: نئوپلازی اندوکرین چندگانه (*MEN 2A*)،[1] که ترکیبی از *MTC*، فئوکروموسیتوم (۵۰ درصد موارد) و هیپرپلازی پاراتیروئید یا آدنوم (۲۵ درصد موارد) است؛ نئوپلازی اندوکرین چندگانه *2B* که شبیه *MEN 2A* است ولی درگیری پاراتیروئید در آن نادر است و گانگلیونوروماتوز دستگاه گوارش و نورمای مخاطی و ظاهر مارفانوئید در آن دیده می‌شود؛ و بالاخره نوع فامیلیال (*FMTC*)[2] *MTC* که ویژگی آن وجود *MTC* به تنهایی در اعضاء مبتلاء خانواده می‌باشد (۳).

پژوهش‌های جدید، نشانگر بروز موتاسیون‌های ژرم لاین در پروتوانکوژن *RET* که در منطقه پری سنترومریک کروموزوم ۱۰، باند *q11.2* جای دارد می‌باشند؛ این موتاسیون‌ها در اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ پروتوانکوژن *RET* در ۹۸٪ از بیماران با *MEN 2A* و بالاتر از ۷۹٪ از بیماران *FMTC* دیده می‌شوند (۴).

مولکول *RET*، همانند دیگر گیرنده‌های تیروزین کیناز، از یک ناحیه *Cadherin- like* و ناحیه‌ای دیگر که غنی از سیستئین (*Cysteine - rich*) است تشکیل یافته است، این دو ناحیه بخش‌های خارج سلولی این ملکول را شامل می‌شوند. ناحیه‌های تیروزین کیناز و دنباله انتهای - *C* این مولکول نیز درون سلول قرار دارند. واحدهای سیستئین، نقش مهمی در ساختمان ثانویه و فضایی بخش خارج سلولی ملکول دارند (۴ و ۵).

در *FMTC* و *MEN 2A*، موتاسیون‌های شناخته شده یکی از ۵ جزء سیستئینی در اگزون‌های ۱۰ (کدون‌های ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸ و ۶۲۰) و یا ۱۱ (کدون ۶۳۴)، در ناحیهٔ خارج سلولی پروتوانکوژن *RET* را دچار می‌کند. اخیراً، موتاسیون‌های ژرم لاین دیگری نیز در *FMTC* در جزء گلوتامیک اسید در اگزون ۱۳ (کدون ۷۶۸) و جزء لوسین در اگزون ۱۴ (کدون ۸۰۴)، در بخش درون سلولی پروتوانکوژن *RET* گزارش شده‌اند. در *MEN 2B* موتاسیون در جزء متیونین در اگزون ۱۶ (کدون ۹۱۸)، در ناحیهٔ درون سلولی پروتوانکوژن *RET* روی می‌دهد (۶).

انتقال *MTC* در انواع موروثی، بصورت اتوزومال غالب است. از این رو ۵۰ درصد از افراد خانواده بیماران با *MTC* موروثی، در معرض خطر ابتلاء به آن هستند. بنابراین، قبل از دورهٔ آنالیز *DNA*، تمام افراد خانوادهٔ این بیماران یا تحت تیروئیدکتومی پروفیلاکسی قرار می‌گرفتند یا اینکه سالانه (از ۵ تا ۳۵ سالگی) با تست پنتاگاسترین و اندازه‌گیری کلسی تونین، پیگیری می‌شدند (۷).

اما امروزه مشخص شده است که این تست، نسبتاً برای تشخیص زودرس *MTC*، غیر حساس بوده و در ۵ درصد موارد نیز بدلیل مثبت کاذب، منجر به تیروئیدکتومی غیرضروری می‌شود (۸). از این رو، غربالگری افراد خانواده بیماران با *MTC* موروثی با استفاده از آنالیز *DNA*، برای شناسایی موتاسیون‌های پروتوانکوژن *RET*، توصیه می‌گردد؛ زیرا این روش از پنتاگاسترین حساس‌تر و فاقد عوارض سوء تست پنتاگاسترین بوده و هزینهٔ آن نیز از انجام یک بار تست پنتاگاسترین کمتر است و با یکبار انجام آن می‌توان استرس وجود بیماری را در ۵۰ درصد از افراد خانواده بیماران از بین برد و در ۵۰ درصد از افرادی که دارای موتاسیون‌های پروتوانکوژن *RET* هستند نیز اقدام به تیروئیدکتومی بصورت پروفلاکسی نمود تا از بروز این بدخیمی مهلک و عوارض خطرناک آن جلوگیری نمائیم (۹).

---

1) *Mutiple Endocrine Neoplasia*

2) *Familial MTC*

www.SID.ir

Archive of SID

حتی بر اساس نتایج سه سری از گزارشات، بیماران با *MTC* اسپورادیک ظاهری(بدون تاریخچهٔ خانوادگی سرطان تیروئید و یا ویژگی‌هایی که نشانگر *MEN 2* باشد) نیز بین ۲/۵ تا ۷ درصد شانس داشتن موتاسیون‌های *RET* در ژرم لاین را دارند (۱۲-۱۰).

از این رو، نه تنها آنالیز *DNA* جایگزین آزمون کلسی تونین بمنظور تشخیص حاملین *MEN 2* شده است، بلکه توصیه می‌شود که غربالگری ژنتیکی نیز جهت یافت موتاسیون‌های *RET* می‌بایست در بیماران با *MTC* اسپورادیک ظاهری نیز انجام شود (۱۳).

با توجه به اینکه، تاکنون هیچکدام از بیماران با *MTC* در ایران، بررسی ژنتیکی نشده‌اند و خانوادهٔ آنان نیز، نه تنها از غربالگری با روش‌های جدید تشخیصی آنالیز *DNA* محروم بوده‌اند، بلکه به دلیل مشکلات دارویی، از تهیهٔ پنتاگاسترین و کمبود کیت‌های کلسی تونین، از انجام تست سالانه پنتاگاسترین نیز مشکل داشته‌اند؛ لذا ما در این پژوهش کاربردی، مجموعه‌ای از بیماران *MTC* که در بیمارستان‌های دانشگاهی تهران تحت مداوا و درمان و پی‌گیری از ده سال گذشته بودند را از لحاظ موتاسیون‌های شایع *RET* در اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ مورد بررسی قرار دادیم. بدون تردید آنالیز *DNA* و شناسایی انواع موتاسیون‌های *RET*، نه تنها می‌تواند در شناخت بیماران با *MTC* موروثی مؤثر باشد، بلکه می‌تواند در شناسایی زودرس سرطان مدولری تیروئید در افراد خانوادهٔ این بیماران و انجام تیروئیدکتومی پروفیلاکسی بعنوان تنها راه اقدام جلوگیری از بروز آن بدخیمی مهلک کمک کننده باشد.

مواد و روش‌ها:

با مراجعه به بایگانی بیمارستان‌های تابعه دانشگاههای علوم پزشکی تهران (شهید بهشتی، ایران و تهران)، انستیتو غدد دانشگاه علوم پزشکی ایران وبایگانی بخش‌های پاتولوژی این بیمارستان‌ها و همچنین بایگانی کلینیک‌های اساتید دانشگاهی دانشگاههای علوم پزشکی [illegible] مشخصات و آدرس دقیق بیماران شناخته شدهٔ سرطان مدولری تیروئید (بر اساس پاتولوژی) تهیه گردید. از بیماران تقاضا شد که به مرکز تحقیقات غدد درون ریز بیمارستان شریعتی، جهت نمونه‌گیری خون محیطی مراجعه کنند. از هر بیمار، ۴ میلی‌لیتر خون گرفته شد و به لوله‌های حاوی مادهٔ ضد انعقاد *EDTA* منتقل و مخلوط گردید. ۱۰۰ میکرولیتر محلول *EDTA* ۲۰ *mg/ml* به ازای هرمیلی‌لیتر خون استفاده شد. لوله‌های حاوی خون *EDTA*، به مدت ۱۰ دقیقه در یخ نگهداشته و بعد به دمای ۲۰- درجه سانتیگراد منتقل و در آن دما تا زمان آزمایش نگه داشته می‌شدند.

استخراج *DNA* :

استخراج *DNA* با لیز کردن اختصاصی گلبولهای قرمز و جداکردن گلبولهای سفید از سایر محتویات با سانتریفوژ کردن انجام شد (۱۴). سپس گلبولهای سفید با جوشاندن در محیط قلیایی لیز شدند و از عصاره سلولی حاوی *DNA* به عنوان الگو برای واکنش *PCR* استفاده شد.

بررسی مستقیم جهش:

DNA ژنومی با استفاده از پرایمرهای مربوط به اگزون ۱۰ ($10F^{5'}$ GCGCCCCAGGAGGCTGAGTC$^{3'}$) و ($10R^{5'}$ CGTGGTGGTCCCGGCCGCC$^{3'}$) و اگزون ۱۱ ($11AF^{5'}$ CCTCTGCGGTGCCAAGCCTC$^{3'}$) و ($11AR^{5'}$ CACCGGAAGAGGAGTAGCTG$^{3'}$) مربوط به پروتوانکوژن *RET* تکثیر *(PCR)* شدند (۱۵). واکنشهای *PCR* در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام گرفتند. شرایط واکنش *PCR* برای تکثیر اگزونهای ۱۰ و ۱۱ عبارت بودند از ۲/۵ میکرولیتر عصاره سلولی حاوی *DNA*، ۰/۲ میلی مولار از مخلوط *dNTP(dATP,dCTP,dGTP,dTTP)* شرکت *(Boehringer Mannhem)*، پرایمرهای اگزون ۱۰ در غلظت ۰/۵ میکرومولار و پرایمرهای اگزون ۱۱ در غلظت ۰/۲۵ میکرومولار (شرکت *TIB MOLBIOL Syntheselabor*)، ۰/۲ واحد آنزیم *Taq* پلی مراز (شرکت *Boehringer Mannhem*). واکنشها در

www.SID.ir

Archive of SID

یک ترموسایکلر اتوماتیک شرکت (OmniGene & Hybaid) با شرایط ۴۰ سیکل برای تکثیر اگزون ۱۰ و ۲۸ سیکل برای تکثیر اگزون ۱۱ با شرایط ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه مرحله دناتوره شدن، ۶۶/۵ درجه سانتیگراد مرحله بازسرشت (اتصال پرایمر) برای اگزون ۱۰ و ۶۸ درجه سانتیگراد مرحله بازسرشت برای اگزون ۱۱ و دمای ۷۲ درجه سانتیگراد مرحله سنتز انجام گرفتند. سپس محصولات *PCR* با اتانول رسوب داده شدند (۱۶). مقادیر اندکی از محصولات *PCR* از اگزون ۱۰ با یکی از ۶ آنزیم محدودکننده *[Taq I، Bst I، Mbo II، Rsa I، Nla I (MA) و (New England Biolabs, Beverly)]* و *Cfo I (Roehe Molecular Biochemicals)* بر طبق شرایطی که توسط شرکت سازنده توضیح داده شده بود، انکوبه شدند. به طور مشابه، مقادیر اندکی از محصول *PCR* اگزون ۱۱ نیز با یکی از چهار آنزیم محدودکننده *Cfo I، Rsa I، Hae III* و *Dde I* انکوبه شدند. محصولات هضم شدهٔ *PCR* بر روی ژل پلی‌آکریل آمید الکتروفورز شدند و با رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با استفاده از نور *U.V* تشخیص داده شدند.

نتایج:

در بیمارستان طالقانی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، طی ۶ سال گذشته از ۴۹ مورد سرطان تیروئید، ۲ مورد *MTC*، در بیمارستان امام خمینی تهران، طی ده سال گذشته، از ۹۲ مورد سرطان تیروئید، ۶ مورد *MTC* ، در بیمارستان شریعتی تهران نیز طی ۵ سال گذشته ۱۲ مورد *MTC* و در انستیتو غدد و بیمارستان فیروزگر دانشگاه علوم پزشکی ایران، طی پنج سال گذشته، ۳ مورد *MTC* ثبت گردید و ۸ مورد *MTC* نیز توسط متخصصین غدد درون ریز دانشگاهی تحت پیگیری درمانی بودند که از مجموع ۳۱ مورد سرطان مدولری تیروئید، ۲۴ بیمار مورد بررسی و آنالیز *DNA* قرار گرفتند و مابقی ۷ نفر از بیماران، بدلیل ناقص بودن آدرس یا تغییر آدرس و یا فوت، قابل دسترسی نبودند.

الف) یافته‌های بالینی:

میانگین سن بیماران (۱۱ مورد مذکر و ۱۳ مورد مونث) ۴۲/۵ سال (حداقل ۱۰ و حداکثر ۷۵ سال) بود.

از این بیماران یک مرد ۶۵ ساله مبتلا به *2AMEN* بود که بجز *MTC*، مبتلا به فئوکروموسیتوم نیز بوده است.

یک دختر ۱۰ ساله نیز با تظاهرات مارفانوئید و نورمای مخاطی همراه با *MTC* دچار *MEN 2B* و دو نفر متعلق به یک فامیل نیز سرطان مدولری تیروئید فامیلیال داشتند و ما بقی ۲۰ نفر نیز دچار *MTC* اسپورادیک ظاهری بودند. تعداد پنج نفر از بیماران مبتلا به فشار خون بودند که تنها در مورد بیمار *MEN 2A*، فئوکروموسیتوم تشخیص داده شده بود. هیچکدام از بیماران مبتلا به هیپرپاراتیروئیدی نبودند.

میانگین زمان تشخیص بیماری در بیماران ۴/۲ سال بود. تعداد ۱۱ نفر از این گروه بیماران، در پاتولوژی، درگیری غدد لنفاوی ناحیه گردنی را داشتند و در یک مورد نیز متاستاز به ریه و یک مورد نیز به کبد مشاهده گردید.

در یک مرد ۵۵ ساله عمل لارنجکتومی نیز انجام شده بود و در یک مرد ۴۹ ساله دیگر، تومور به تراشه چسبندگی داشته است. در تمام بیماران، آغاز تشخیص بیماری باندول سرد بوده و در سه مورد نیز با گرفتگی صدا و درد توأم بوده است.

ب) آنالیز *DNA* :

از ۲۴ بیمار با *MTC* مورد بررسی، تنها دو نفر دچار موتاسیون در اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ بودند. یکی از بیماران از گروه ۲۰ نفری بیماران با *MTC* اسپورادیک ظاهری بود که موتاسیون در اگزون ۱۰ را داشت و دیگری بیمار مبتلا به *MEN 2A* بود که موتاسیون در اگزون ۱۱ را دارا بود. موتاسیون در اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ در هیچکدامیک از دو بیمار مبتلا به *MTC* فامیلیال یافت نشد.

۱- موتاسیون اگزون ۱۰:

www.SID.ir

Archive of SID

جهش $Cys620 \rightarrow Arg^{14}$ از اثر آنزیم *BstU I* بر محصول *PCR* اگزون ۱۰ در یک مرد ۷۵ ساله با *MTC* اسپورادیک ظاهری شناسایی شد. این بیمار ۴ سال قبل با تودهٔ گردنی و گرفتگی صدا تحت عمل تیروئیدکتومی قرار گرفته بود. در زمان آنالیز *DNA* وی در بیمارستان فیروزگر دانشگاه علوم پزشکی ایران با متاستاز به ریه در آی سی یو، تحت مداوا بود. متأسفانه با آماده شدن نتیجهٔ آنالیز *DNA* بیمار فوت کرده بود و بدلیل نقل و مکان خانواده، دسترسی به اعضاء دیگر فامیل امکان‌پذیر نشد.

۲- موتاسیون در اگزون ۱۱:

موتاسیون اگزون ۱۱ در بیمار *MEN 2A*، از اثر آنزیم *Cfo I* بر محصول *PCR* اگزون ۱۱ در پروتوانکوژن *RET (Cys634→Trp+)* در یک بیمار ۶۵ ساله بدست آمد. این بیمار از ۲۱ سال قبل، مورد شناخته شدهٔ فئوکروموسیتوم بوده است که ۱۳ سال قبل نیز بدلیل *MTC* تحت تیروئیدکتومی قرار گرفته بود و بدلیل عود مجدد تومور در ناحیه گردن، بصورت دو تودهٔ ۴×۳ سانتی‌متری، بستری شده بود. این بیمار دارای یک برادر سالم و یک خواهر بود که خواهر وی با *MTC* و فئوکروموسیتوم در ۵۰ سالگی فوت کرده بود. بیمار دارای دو پسر و ۷ دختر بوده که سه دختر (۳۶،۲۸ و ۴۶ساله) و یک پسر (۳۹ ساله) بیمار دارای *MTC* شناخته شده بودند که تحت عمل تیروئیدکتومی قرار گرفته بودند. از فرزندان مبتلاء وی به جز دختر ۲۸ ساله، همگی نیز دارای فئوکروموسیتوم بوده‌اند.

آنالیز *DNA* تاکنون بر روی پسر ۳۹ ساله و دو دختر ۲۸ و ۴۱ ساله وی انجام گردیده است که نشانگر وجود موتاسیون در اگزون ۱۱ *(Cys634→Trp+)* در پسر ۳۹ ساله و دختر ۲۸ سالهٔ وی بوده است.

۳- موتاسیون در اگزون ۱۱ یک خانواده با *MEN 2A*

پسر ۳۹ سالهٔ بیمار فوق‌الذکر بدلیل *MTC* در سال ۱۳۵۸ تحت عمل تیروئیدکتومی و در سن ۳۵ سالگی نیز بدلیل فئوکروموسیتوم تحت عمل آدرنال قرار گرفته بود. خانوادهٔ وی شامل سه پسر (۲، ۹ و ۱۲ ساله) و یک دختر (۴ ساله) است. این بیمار از لحاظ موتاسیون در اگزون ۱۱ که در پدر وی شناخته شده بود *(Cys634→Trp+)* مورد بررسی قرار گرفت که نشانگر وجود موتاسیون خود وی و پسر ۱۲ سالهٔ او بود (پسر دو سالهٔ وی هنوز بررسی نشده است).

تیروئیدکتومی پروفیلاکسی به فرزند ۱۲ سالهٔ او پیشنهاد شد.

بحث:

از سری بیماران مورد مطالعه ما در این پژوهش، ۲۰ نفر به سرطان مدولری تیروئید اسپورادیک ظاهری مبتلاء بودند که در بررسی آنالیز *DNA* آنان، تنها یک نفر دارای موتاسیون $Cys620 \rightarrow Arg^{14}$ بود که از اثر آنزیم *Bst I* بر محصول *PCR* اگزون ۱۰ نتیجه‌گیری شد. این یافته نشانگر آن است که این بیمار به نوع موروثی سرطان مدولری تیروئید مبتلا بوده است. فراوانی نوع موروثی *MTC* در میان بیماران با این نوع سرطان، ۲۵ درصد است (۱۷). بدون داشتن تاریخچهٔ خانوادگی آشکار و یا ویژگی‌های مربوطه به *MEN 2* موارد موروثی ممکن است از نوع اسپورادیک، خیلی قابل تشخیص نباشد (۵). در هر صورت، با بکار بردن آنالیز *DNA* می‌توان فرد با *MTC* اسپورادیک ظاهری را از نوع موروثی آن شناسایی نمود. پیش از کشف ژن مسئول *MEN 2*، غربالگری با پنتاگاسترین در افراد درجه یک خانوادهٔ بیماران با *MTC* اسپورادیک ظاهری، نشانگر وجود ۱۰ درصد نوع موروثی در میان این بیماران بود (۱۸). کشف این یافته که *RET* ژن مسئول برای *MEN 2* است، در چندین مطالعه که بیماران با *MTC* اسپورادیک ظاهری را مورد بررسی ژنتیکی قرار داده‌اند، مشخص نمود که فراوانی

www.SID.ir

Archive of SID

موتاسیون خود انگیخته *de novo* یا نهان در میان این بیماران بین ۲/۵ تا ۷ درصد است (جدول ۱؛ ۱۲-۱۰).

شناسایی یک موتاسیون بخصوص، امکان روش مستقیم، جهت غربالگری اعضاء درجه یک فامیل را فراهم می‌آورد. بنابراین اثر سودمند آنالیز *DNA* در نوع *MTC* اسپورادیک، رد ماهیت موروثی در اعضاء درجه یک فامیل این بیماران است. از آنجا که ۹۵ درصد بیماران با انتقال ژرم لاین در *MEN 2A* یا *FMTC* دارای موتاسیون در کدون‌های ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸، ۶۲۰ یا ۶۳۴ هستند (۱۹)، و با توجه به این نکته که این کدون‌ها در بیماران ما نیز مورد بررسی قرار گرفتند، می‌توان چنین نتیجه گرفت که به احتمال ۹۵ درصد،

جدول ۱) پژوهش‌های موجود پیرامون نتایج آنالیز پروتوانکوژن RET برای موتاسیون‌های ژرم لاین در بیماران با سرطان مدولری تیروئیدی اسپورادیک ظاهری*

پژوهشگر	کدون‌ها					تعداد افراد	درصد
	۶۰۹	۶۱۱	۶۱۸	۶۲۰	۶۳۴	مورد بررسی	
زدینوس و همکاران (۱۹۹۴)					۱	۱۰	۱۰
آنگ و همکاران (۱۹۹۵)				۱		۶۷	۱/۵
دکر و همکاران (۱۹۹۵)			۱	۱	۳	۲۱	۲۴
کامینوک و همکاران (۱۹۹۵)					۲	۱۶	۱۲/۵
وهلک و همکاران (۱۹۹۶)	۲	۱	۱		۲	۱۰۱	۶
عزیزی و همکاران (۲۰۰۲)				۱		۲۰	۵

* به رفرنس شمارهٔ ۱۲ مراجعه شود.

در ۱۹ نفر از ۲۰ بیمار ما با *MTC* اسپورادیک ظاهری که فاقد موتاسیون در این کدون‌ها بوده‌اند، از نوع موروثی *MTC* نمی‌باشند.

در نوع *MTC* فامیلیال، فراوانی موتاسیون نقطه‌ای *missense* ژرم لاین در کدون‌های سیستئین بخش‌های خارج سلولی و درون غشایی ملکول *RET* کد شده توسط اگزون‌های ۱۰ (بویژه در کدون‌های ۶۲۰ و ۶۱۸) و ۱۱ (کدون ۶۳۴)، ۸۸ درصد می‌باشد (۲۰). موتاسیون‌های ژرم لاین، همچنین در بخش درون سلولی *RET* در *FMTC* نیز اتفاق می‌افتد (در اگزون ۱۳ (کدون‌های ۷۶۸، ۷۹۰ و ۷۹۱)، اگزون ۱۴ (کدون‌های ۸۰۴ و ۸۴۴) و در اگزون ۱۵ (کدون ۸۹۱)). در بانک اطلاعاتی گروه مطالعاتی تومورهای کلسی‌تونین فرانسوی *GETC*[1] توانسته‌اند، میزان موتاسیون‌های تشخیص داده شده را در نوع *FMTC* را از ۸۶ درصد در سال ۱۹۹۷ به ۹۲/۵ درصد در سال ۲۰۰۱ افزایش دهند که این افزایش عمدتاً بدلیل کاربرد رایج غربالگری موتاسیون‌های *RET* در تمام بیماران *MTC* حتی در نوع *MTC* اسپورادیک ظاهری و همچنین در روش کاربردی شناسایی موتاسیون‌ها که شامل اگزون‌های ۱۴،۱۳ و ۱۵، افزون بر ۱۱،۱۰ و ۱۶ نیز می‌شود است (۲۱).

1) *French Calcitonin Tumors Study Group*

www.SID.ir

Archive of SID

مادردو بیمارموردمطالعه‌دراین‌پژوهش‌که‌ازیک‌فامیل و مبتلا به *FMTC* بودند، موتاسیون در کدون‌های رایج اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ را پیدا نکردیم. ممکن است این بیماران، دچار موتاسیون‌های *RET* غیرسیستئینی باشند. زیرا در جدیدترین مطالعه که در میان ۱۴۸ بیمار از ۴۷ خانواده که دچار *FMTC* انجام شده است، موتاسیون‌های *RET* غیرسیستئینی (در اگزون‌های ۱۳ الی ۱۵) در ۵۹/۵ درصد افراد یافت گردید؛ از این رو، نتیجه گرفته شده است که این نوع موتاسیون غیر شایع نبوده و پیشنهاد می‌شود که در آنالیز *RET* چنانچه در اگزون‌های ۱۰،۱۱ و ۱۶ منفی بود، می‌بایست اگزون‌های ۱۴ و ۱۵ را نیز مورد مطالعه قرار داد (۲۱). این استراتژی، موجب یافت انواع موروثی *MTC* شده و شانس شناسایی بیماران با سلول سی را در مراحل اولیه و انجام تیروئیدکتومی پروفیلاکسی یا اولیه را در حاملین ژن فراهم می‌آورد (۲۲).

تا زمان کمی پیش از این، افراد با تجربهٔ بالینی که به طب بر اساس شواهد *(Evidence -based Medicine)* معتقد بودند، موارد *MTC* اسپورادیک ظاهری که دارای عناصر مشکوک در تظاهرات خود داشتند (سن جوانی، چندکانونی در تومور، هیپرپلازی سلول سی، یافته‌ای دال بر سابقهٔ خانوادگی) را تحت آزمون ژنتیکی قرار می‌دادند، اما اکنون با کشف مواردی از *FMTC* که دارای قدرت نفوذ ژنتیکی *(Low penetrance)* هستند (یعنی موتاسیون در کدون‌های ۷۶۸، ۸۰۴ و ۸۹۱ در کدون‌های ۱۳، ۱۴ و ۱۵؛ به ترتیب)، ممکن است فقط تعداد کمی از افراد خانواده را دچار سازد و بعضی از آنها نیز در سنین پیری خود را نشان دهند، از این رو توصیه می‌شود که غربالگری ژنتیکی می‌بایست در تمام افراد با *MTC* اسپورادیک ظاهری در بدو تشخیص انجام شود (۱۳).

همانگونه که اشاره شد، تقریباً ۹۳ الی ۹۸ درصد خانوادهٔ *MEN 2A* دارای موتاسیون در یکی از ۵ بخش سیستئینی در اگزون ۱۰ (کدون‌های ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸ و ۶۲۰) یا اگزون ۱۱ (کدون ۶۳۴) در بخش خارج سلولی پروتوانکوژن *RET* هستند؛ موتاسیون در سیستئین ۶۳۴، قویاً با فنوتیپ *MEN 2A* همراهی دارد (۲۳).

تنها یک بیمار از سری بیماران مورد مطالعهٔ ما دچار *MEN 2A* بود که در آنالیز *DNA* دارای موتاسیون *Cys634→Trp+* در اگزون ۱۱ بود. در بررسی خانوادهٔ او، یک دختر و پسر وی و یک نوه از چهار نوهٔ پسری وی (یک پسر ۱۲ ساله) نیز حامل همین موتاسیون بودند. شناسایی حاملین موتاسیون ژن *MEN 2A*، یکی از محدود مواردی در آزمون‌های ژنتیکی است که توصیه به تداخل بالینی بسیار مؤثر را می‌نمایاند. بر اساس توصیهٔ مورد قبول در کارگاه *MEN 97*، تصمیم‌گیری به تیروئیدکتومی در *MEN 2* می‌بایست بر اساس موتاسیون *RET* و نه آزمایش کلسی تونین، استوار باشد (۲۴).

اکنون، در آزمون موتاسیون *RET* در *MEN 2*، می‌بایست بصورت رایج، اگزون‌های ۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۶ را مورد مطالعه قرار داد (۳).

بچه‌هایی که دارای هر کدام از موتاسیون‌های کدون‌های ۶۱۱،۶۱۸،۶۲۰ یا ۶۳۴ هستند، از لحاظ طبقه‌بندی خطر، در سطح دوم هستند که به معنای داشتن خطر بالا برای بروز *MTC* است و می‌بایست تا سن قبل از ۵ سالگی، تحت عمل تیروئیدکتومی قرار گیرند (۳). بنابراین برای نوهٔ پسری ۱۲ سالهٔ بیمار *MEN 2A* در این مطالعه، توصیه به تیروئیدکتومی شده است.

یکی از بیماران مورد مطالعه، دچار *MEN 2B* بود. از مشخصات این بیماری که مهاجم‌ترین نوع *MEN 2* است، وجود نئوپلاسم‌هایی شبیه *MEN 2A* شامل *MTC* و فئوکروموسیتوم، بعلاوهٔ کاهش نسبت بدنی فوقانی به تحتانی، ظاهر مارفانوئید و گانگلیونورماتوزیس روده‌ای و مخاطی، بدون وجود هیپرپاراتیروئیدی است (۲۵). بچه‌های با *MEN 2B* و یا موتاسیون درکدون ۹۱۸، از لحاظ تقسیم‌بندی در سطح سوم هستند که به معنای داشتن بالاترین خطر از *MTC* تهاجمی است و می‌بایست ظرف ۶ ماه اول و ترجیحاً در ماه اول زندگی تحت عمل تیروئیدکتومی قرارگیرند (۳).

در *MEN 2B*، موتاسیون نقطه‌ای منفرد در کدون

www.SID.ir

Archive of SID

۹۱۸ در اگزون ۱۶ در ۹۵ درصد از بیماران دیده می‌شود؛ این موتاسیون موجب تغییر متیونین به ترئونین می‌شود (۲۶). متأسفانه در مطالعهٔ کنونی ما جهش‌های کدون ۹۱۸ در اگزون ۱۶ را بررسی نکردیم.

امیدواریم با فراهم آمدن امکانات تکنیکی، تمام بیماران *MTC* ایرانی را از لحاظ موتاسیون‌های نه کدون اصلی (کدون‌های ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸، ۶۲۰، ۶۳۰، ۶۳۴، ۷۶۸، ۸۰۴ و ۹۱۸) مورد بررسی کامل قرار دهیم.

تکنیک میکروآرای الیگو نوکلئوتید *RET* یکی از جدیدترین روش‌های شناسایی تمام انواع ۵۵ موتاسیون *missense* در ۸ کدون و همچنین موتاسیون دیگر در کدون ۹۱۸ است که روشی قابل اعتماد و بسیار سریع می‌باشد که می‌تواند در شناسایی این موتاسیون‌ها تحولی اساسی ایجاد کند (۲۷).

REFERENCES:

1. Gharib H, McConahey WM. Medullary thyroid carcinoma. Mayo Clin Pro 1992;67:934-940.
2. Farndon JR, Leight GS, Dilley WG, et al. Familial medullary thyroid carcinoma without associated endocrinopathies: A distinct clinical entity. Br J Surg 1986;73:278-281.
3. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:5658-71.
4. Marsh D. RET proto-oncogene mutations in multiple endocrine neoplasia type 2 and medullary thyroid carcinoma. Horm Res 1997;47:168-78.
5. Eng C. RET proto-oncogene in the development of human cancer. Clin Oncol 1999;17:380-5.
6. Heshmati HM, Gharib H, Khosla S, et al. Genetic testing in medullary thyroid carcinoma syndromes: Mutation types and clinical significance. Mayo Clin Pro 1997;72:430-5.
7. Cote G. Ret proto-oncogene mutations in multiple endocrine neoplasia type 2 and medullary thyroid carcinoma. Baillieres Clin Endocrinol Metab 1995;9:609-30.
8. Evans DB. Medullary thyroid carcinoma. In: Bardin CW. Current therapy in endocrinology and metabolism. Baltimore: Mosby, 1997,127-32.
9. Wells SA, Chi D, Toshima K, et al. Prophylactic thyroidectomy for multiple endocrine neoplasia type 2A (abstract). Proc 5th Workshop on multiple Endocrine Neoplasia, 1994, P 84.
10. Eng C, Mulligan LM, Smith DP, et al. Low frequency of germline mutations in the ret proto-oncogene in patients with apparently sporadic medullary thyroid carcinoma. Clin Endocrinol 1995;43:123-7.
11. Schuffenecker I, Ginet N, Goldgar D, et al. Prevalence and parental origin of de novo ret mutations in Men 2A and FMTC. Am J Human Genet 1997;60:233-37.
12. Wohllk N, Cote GJ, Bugalho MMJ, et al. Relevance of ret proto-oncogene mutations in sporadic medullary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 1996;81:3740-45.
13. Puxeddu E, Fagin JA. Genetic markers in thyroid neoplasia.Endocrinol Metab Clin North Am 2001;30:493-513.
14. Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH, et al. Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. Proc Natl Acad Sci USA 1977;74:1245-9.
15. Wells SA, Chi DD, Toshima K, et al. Predictive DNA

www.SID.ir

Archive of SID

testing and prophylactic thyroidectomy in patients at risk for multiple endocrine neoplasia type 2A. Ann Surg 1994;220:237-47.

16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory mannual 2nd ed. NewYork: Cold Spring Harbor Labosatory Press, 1987,9014-9021.
17. Eng C, Ponder BAJ. Multiple endocrine neoplasia type 2 and medullary thyroid carcinoma, Grossman A (ed): Clinical Endocrinology. Oxford, Blackwell Science, 1998, 635-650.
18. Ponder BAJ, Finer N, Coffey R, et al. Family screening in medullary thyroid carcinoma presenting without a family history. Q J Med 1988;67:299-308.
19. Zedenius J, Wallin G, Hamberger B. Somatic and MEN 2A de novo mutations identified in the RET proto-oncogene by screening of sporadic MTCs. Hum Mol Genet 1994;3:1259-62.
20. Mulligan LM, Marsh DJ, Robinson BG, et al. Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2: report of the international RET mutation consortium. J Intern Med 1995;238:343-6.
21. Niccoli P, Murat A, Rohmer V, et al. Familial medullary thyroid carcinoma with noncysteine RET mutations: Phenotype-genotype relationship in a large series of patients. J Clin Endocrinol Metabol 2001;86:3746-53.
22. Niccoli-Sire P, Murat A, Baudin E, et al. Early or prophylactic thyroidectomy in MEN/FMTC gene carriers. Eur J Endocrinol 1999;141:468-74.
23. Franck-Raue K, Hoppner W, Frilling A, et al. RET proto-oncogene mutations in German multiple endocrine neoplasia families: relation between genoty[e and phenotype. J Clin Endocrinol Metab 1996;81:1780-1783.
24. Lips CJM. Clinical management of multiple endocrine neoplasia syndromes: results of a computerized opinion poll at the Sixth International Workshop on Multiple Endocrine Neoplasia and von-Hippel-Lindau disease. J Intern Med 1998;243:589-94.
25. Carney JA, Go VL, Sizemore GW, Hayles AB. Alimentary-tract ganglioneuromatosis. A major component of the syndrome of multiple endocrine neoplasia, type 2b. N Engl J Med 1976;295:1287-91.
26. Hofstra RMW, Landsvater RM, Ceccherini I, et al. A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. Nature 1994;367:375-6.
27. Kim IJ, Kang HC, Park JH, et al. RET oligonucleotide microarray for the detection of RET mutations in multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes. Clin Cancer Res 2002 8:457-63.

www.SID.ir