

## شناسایی جهش های اگزون های ۸-۵ ژن مهار کننده سرطان (P53) به روش PCR-SSCP در بیماران مبتلا به سرطان معده در استان چهارمحال و بختیاری،

۱۳۸۵-۸۶

جواد صفاری چالشتری\*، محمد تقی مرادی\*\*، عفت فرخی\*، محمد امین طباطبایی فر\*\*\*، مریم طاهر زاده\*، فاطمه شایسته†، غلامرضا مبینی††، مهدی بنی طالبی†††، گشتاسب مردانی، مهرداد شهرانی، ندا پروین\*\*\*، نجمه شاهین فر، دکتر قربانعلی رحیمیان، دکتر حبیب اله ناظم، دکتر مرتضی هاشم زاده چالشتری ۱۰\*  
\*کارشناس ارشد بیوشیمی - مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، \*\*کارشناس ارشد حشره شناسی پزشکی - مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، \*\*\*دانشجوی PhD ژنتیک - دانشگاه علوم پزشکی تهران، †کارشناس ارشد فیزیولوژی - مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ††کارشناس ارشد ویروس شناسی - مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، †††کارشناس ارشد هماتولوژی - مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، \*کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط - دانشگاه علوم پزشکی اهواز، \*\*مربی گروه پرستاری - مرکز تحقیقات گیاهان دارویی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، و دانشجوی PhD گروه فیزیولوژی - دانشگاه علوم پزشکی اهواز، \*\*\*مربی گروه پرستاری - مرکز تحقیقات گیاهان دارویی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ○ کارشناس مامایی - مرکز تحقیقات گیاهان دارویی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ○ استادیار گروه داخلی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ○○ دانشیار گروه بیوشیمی - دانشگاه پیام نور تهران، ◆ استاد گروه ژنتیک انسانی - مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد.

تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۱ تاریخ تایید: ۸۸/۲/۲۰

### چکیده:

زمینه و هدف: سرطان معده دومین سرطان شایع در جهان است. فاکتورهای ژنتیکی مانند انکوژن ها و ژن های سرکوبگر تومور، همواره از جمله مهمترین عوامل در بروز این سرطان هستند. ژن P53 یک ژن سرکوبگر تومور است و نقش بسیار مهمی در فرآیند مرگ برنامه ریزی شده سلول ایفا می کند. جهش در ژن P53 موجب از بین رفتن عملکرد محافظتی آن شده که یکی از عوامل اصلی بروز سرطان معده در انسان است. این مطالعه با هدف بررسی جهش های ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان معده در استان چهارمحال و بختیاری انجام شده است.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی به بررسی جهش ها در اگزون های شماره ۵-۸ ژن P53 در ۳۸ نمونه پارافینه سرطان معده پرداخته ایم. ابتدا DNA به روش استاندارد فنل کلروفرم استخراج شد، سپس با استفاده از تکنیک PCR-SSCP جهش های این ژن بررسی شدند.

یافته ها: تفاوت های آشکاری در همه نمونه های کنترل مثبت مشاهده شد. با این وجود در سایر نمونه های مربوط به بیماران هیچ تفاوت و تغییری در حرکت باندها تشخیص داده نشد.

نتیجه گیری: در استان چهارمحال و بختیاری ارتباط بین سرطان معده با جهش های ژن P53 بسیار ضعیف است. البته این مطالعه فقط بر روی ۳۸ نمونه بیمار انجام شده و مطالعات بیشتری نیاز است تا ارتباط واقعی جهش بر روی ژن P53 با سرطان معده در این استان مشخص شود.

واژه های کلیدی: سرطان معده، جهش، ژن P53، SSCP-PCR.

### مقدمه:

سال به طور بالقوه در معرض ابتلا به سرطان معده هستند و تقریباً ۸۰ درصد مبتلایان به سرطان معده بیش از ۶۰

سرطان معده بعد از سرطان ریه، دومین سرطان شایع مردان در جهان و ایران است (۱). مردان بالای ۴۰

لایسنس مسئول: شهرکرد - رحمتیه - دانشکده پزشکی - مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی - تلفن: ۰۳۸۱-۳۳۴۶۶۹۲ - E-mail: mchalesh@yahoo.com

سال سن دارند (۲).

شیوع سرطان معده در برخی کشورها همچون ژاپن چین ایتالیا و کشورهای در حال توسعه در حد بالایی قرار دارد و روبه افزایش است اما در کشورهایی مانند آمریکا و انگلیس در حال کاهش است (۲).

از نظر بافت شناسی آدنوکارسینومای معده به دو نوع روده ای (Intestinal) و منتشر (Diffuse) تقسیم می شود که هر کدام الگوی مناسبی را برای درک اتیولوژی این بیماری ارایه می کند (۴،۳) در مناطق اصلی شیوع سرطان معده نوع روده ای آن نسبت به نوع منتشر شیوع بیشتری دارد (۵).

گاهی مواقع عفونت با نوعی باکتری به نام هلیکوباکتریلوری (*Helicobacter pylori*) منجر به گاستریت (Gastritis) مزمن و در برخی موارد سرطان معده می شود. البته این امر عمومیت نداشته و بسیاری از افرادی که مبتلا به عفونت این باکتری بوده اند، هیچ گاه به سرطان معده مبتلا نشده اند (۶). در بسیاری از موارد، عواملی غیر از این باکتری از جمله عوامل ژنتیکی و جهش های اعمال شده بر روی بسیاری از ژن های مهار کننده تومور (Tumor Suppressor Genes) و پروتوانکوژن ها (Proto Oncogenes) در بروز این بیماری دخیل اند (۷).

یکی از عوامل پیش آگهی در آدنوکارسینومای معده جهش بر روی ژن P53 (ژن مهار کننده تومور) می باشد. در آدنوکارسینوم معده بیماران که تومور آن ها شواهدی از جهش این ژن را ندارند بقاء بیشتری نسبت به گروه مقابل دارند (۹،۸). ناهنجاری مولکول P53 معمول ترین ناهنجاری مولکولی است که در سرطان های انسانی مشاهده شده حدود ۵۰ درصد سرطان ها مرتبط با مهار فعالیت این ژن است (۹).

ژن P53 بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۱۷ قرار گرفته، از ۱۱ اگزون و ۱۰ اینترون تشکیل شده است (۱۲،۱۱،۱۰). اگزون شماره ۱ و قسمت اعظم اگزون شماره ۱۱ در ژن P53 غیر رمزگذار هستند و در

mRNA کد نمی شوند این در حالی است که منطقه Hotspot ژن بر روی اگزون های ۸-۵ قرار گرفته است و بیش از ۹۰ درصد جهش ها بر روی این منطقه بروز می کند این ناحیه کدون های ۳۰۷-۱۱۰ را شامل می شود (۱۴،۱۳).

جهش های این ژن اغلب به صورت حذف (Deletion)، دخول (Insertion) و یا جهش های نقطه ای (Point mutation) ظاهر می شوند (۱۵).

محصول پروتئینی این ژن (TP53) یک فسفوپروتئین با وزن مولکولی ۵۳ کیلو دالتون می باشد که از ۳۹۳ اسید آمینه تشکیل شده است (۱۶). این پروتئین در کنترل سیکل سلولی، مرگ برنامه ریزی شده سلول، فرآیند پیری و تعمیر DNA موثر است. فرآیندهای پس از ترجمه مانند مودیفیکاسیون (Modification) و همین طور فسفریلاسیون (Phosphorilation)، استیلاسیون (Acetylation) و آلکیلاسیون (Alkylation) به طور معمول بر P53 اعمال می شوند و فرآیندهای عملکردی این ژن را کنترل می کنند. در اغلب سرطان های انسانی فعالیت این پروتئین با یوبی کویتینه شدن کاهش یافته و یا اینکه حساسیت سیگنال های سلولی به این پروتئین کاهش می یابد (۱۷،۱۸،۱۹).

پروتئین P53 با ایجاد وقفه در مرحله G1 چرخه سلولی باعث مهار چرخه سلول شده و فرصت لازم را برای فاکتورهای ترمیم کننده DNA فراهم می کند.

جهش بر روی ژن P53 یکی از مهمترین عوامل ایجاد سرطان است بر این اساس مطالعات گسترده ای بر روی این ژن انجام شده با این وجود گزارشات بسیار متفاوتی از نظر میزان جهش (از صفر تا ۷۰٪) بر روی این ژن مشاهده شده است (۲۹-۲۰) که نشان دهنده تنوع بسیار بالای وقوع جهش بر روی این ژن بسته به موقعیت جغرافیایی مناطق است و لازم است مطالعات دقیق قومیتی بر روی این ژن انجام شود. این مطالعه به منظور تعیین جهش های اگزون های ۵ تا ۸ (مناطق

(به صورت شیب غلظت معکوس) در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد پارافین زدایی گردید. سپس DNA نمونه ها با استفاده از روش استاندارد فنل کرفرم استخراج (۳۰) و غلظت DNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتر (Unico ۲۱۰۰ USA) اندازه گیری شد.

توالی های آغازگر (Primer) شامل توالی های جلوبرنده F (Forward) و توالی های معکوس R (Reverse) برای آگزون های شماره ۵ تا ۸ با استفاده از توالی ژن و نرم افزار Primer۳ طراحی و توسط شرکت ژن فن آوران (ایران) خریداری شدند. در عین حال از آغازگرهایی با جهش های ساختگی نیز به عنوان کنترل مثبت جهت افزایش دقت روش PCR-SSCP استفاده شد. به این ترتیب که، یک نوکلئوتید (ترجیحاً بازهای پیریمیدین C به T و T به C) و بعضاً بازهای پورین) از انتهای ۴ تا ۶ نوکلئوتیدی در سمت ۳' آغازگر Forward تغییر داده شد (جدول شماره ۱).

Hotspot (ژن P۵۳ به روش PCR-SSCP در بیماران مبتلا به سرطان معده در استان چهارمحال و بختیاری انجام شده است.

## روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی، تعداد ۳۸ نمونه پارافینه ی بیوپسی معده بیماران مبتلا به سرطان معده از آرشیو آزمایشگاه مرکزی بیمارستان آیت اله کاشانی شهرکرد در طی سال های ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ به روش آسان جمع آوری شد.

نمونه ها پس از تایید در آزمایشگاه پاتولوژی بیمارستان آیت اله کاشانی شهرکرد و انتقال به مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، پارافین زدایی شده و به روش معمول فنل کرفرم استخراج DNA انجام گرفت. به این ترتیب حدود ۲۵ میلی گرم از هر نمونه بافت به طریقه فیزیکی کاملاً خرد شده و با استفاده از گزیلول و اتانول مطلق

جدول شماره ۱: آغازگرهای طراحی شده برای انجام واکنش های P۵۳

دمای ذوب	توالی آغازگر	شماره آگزون
۵۵,۳ °C	۵' GAC TTT CAA CTC TGT CTC CT ۳'	۵F
۶۵,۵ °C	۵' CTG GGG ACC CTG GGC AAC CA ۳'	۵R
۵۳,۲ °C	۵' GAC TTT CAA CTC TGT T*TC CT ۳'	۵m
۶۱,۰ °C	۵' GTC CCC AGG CCT CTG ATT C ۳'	۶F
۶۱,۴ °C	۵' CTT AAC CCC TCC TCC CAG AG ۳'	۶R
۵۸,۸ °C	۵' GTC CCC AGG CCT CTA * ATT C ۳'	۶m
۵۵,۳ °C	۵' TTA TCT CCT AGG TTG GCT CT ۳'	۷F
۶۱,۴ °C	۵' CAA GTG GCT CCT GAC CTG GA ۳'	۷R
۵۳,۳ °C	۵' TTA TCT CCT AGG TTA* GCT CT ۳'	۷m
۵۶,۷ °C	۵' CCT TAC TGC CTC TTG CTT C ۳'	۸F
۵۵,۳ °C	۵' TGA ATC TGA GGC ATA ACT GC ۳'	۸R
۵۸,۸ °C	۵' CCT TAC TGC CTC TC *G CTT C ۳'	۸m

F آغازگر Forward، R آغازگر Reverse، Pm آغازگر جهش یافته (Forward)، \*نوکلئوتید تغییر داده شده در توالی آغازگر Forward

نمونه بر روی ژل پلی اکریل آمید (Merk Germany) ۸ درصد، تحت جریان ۵۰mA الکتروفورز و سپس با استفاده از روش نیترا نقره رنگ آمیزی گردید. برای انجام الکتروفورز SSCP ابتدا ۵ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه را با ۴ میکرولیتر محلول Loading Buffer ۱X (حاوی ۹۰٪ Formamid، Xylen Cyanol ۱mg/ml، EDTA (pH=۸) ۱۰Mm، Bromophenol Blue ۱mg/ml) مخلوط کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۶°C حرارت داده تا دو رشته ای های DNA به صورت تک رشته تبدیل شوند. برای جلوگیری از بازگشت تک رشته های DNA و دو رشته ای شدن آنها، بلافاصله نمونه ها با استفاده از یخ سرد گردید (۳۱). سپس نمونه ها را در کنار نمونه کنترل مثبت بر روی ژل الکتروفورز SSCP (دستگاه Atto, Japon) بارگذاری نمودیم (جدول شماره ۳). پس از پایان الکتروفورز باند های DNA با استفاده از روش نیترا نقره رنگ آمیزی شدند.

واکنش های زنجیره ای پلیمرز (PCR) برای تکثیر اگزون های ۵ تا ۸ ژن P۵۳ انجام شد. هر میکروتیوب PCR شامل: ۱μl از هر یک از دو آغازگر F و R با غلظت ۵۰pmol، ۰.۱μl آنزیم DNA پلیمرز (۵unit/μl)، ۰.۵μl مخلوط دزوکسی نوکلئوتیدهای تری فسفات با غلظت ۱۰mM، ۲.۵μl بافر ۱۰X، ۲.۵μl یون MgCl<sub>۲</sub> (۵۰mM) مخصوص PCR و ۱μl DNA (حدود ۱۰۰ng) بود که حجم نهایی به ۲۵μl رسید. تنظیمات دستگاه چرخه حرارتی (PCR)، (ASTEC, PC۸۱۸ Japan) برای هر چهار اگزون ژن P۵۳ به این ترتیب انجام شد که هر نمونه، در دمای ۹۶°C برای سه دقیقه واسرشته شدن ابتدایی (Pre Denaturation) و پس از اعمال برنامه های دمای تنظیم شده و تکرار آن برای ۳۶ سیکل، هر کدام از نمونه ها در دمای ۷۲ °C برای ۸ دقیقه (دمای Final extention) حرارت دیدند (جدول شماره ۲). پس از پایان واکنش ها، محصول PCR هر

**جدول شماره ۲: برنامه های دمایی تنظیم شده برای واکنش های زنجیره ای PCR**

شماره اگزون	واسرشت	زمان	چسبیدن	زمان	طولیل شدن	زمان
۵	۹۶°C	۱min	۶۲ °C	۱min	۷۲ °C	۱min
	۹۶°C	۴۰sec	۵۹ °C	۳۰sec	۷۲ °C	۴۰sec
۶	۹۶°C	۳۰sec	۶۱ °C	۳۰sec	۷۲ °C	۳۰sec
۷	۹۶°C	۳۰sec	۵۷ °C	۳۰sec	۷۲ °C	۳۰sec
۸	۹۶°C	۴۵sec	۵۴ °C	۴۰sec	۷۲ °C	۵۰sec

**جدول شماره ۳: شرایط بهینه برای الکتروفورز SSCP محصولات PCR**

اگزون	دما °C	شدت جریان A	زمان ساعت	غلظت ژل
۵*	۴	۱۳	۱۴	٪۶
۶	۲۰	۳۲	۷	٪۱۲
۷	۲۰	۳۲	۶	٪۱۲
۸	۲۰	۳۲	۵/۵	٪۸

\*جهت اگزون شماره ۵ از ۱۰g اوره نیز استفاده شد.

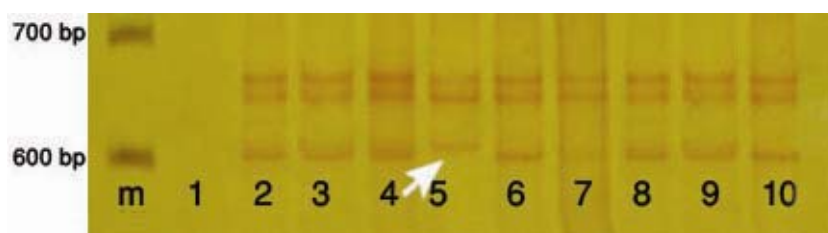
## یافته ها:

باند‌های نمونه کنترل مثبت دارای جهش های ساختگی در منطقه دنا توره شده نسبت به نمونه های مورد مطالعه بیماران بود. این تفاوت در تمام آگزون ها مشاهده شد اما در خصوص نمونه های بیماران موارد مشکوکی مشاهده نشد و حرکت باندهای واسرشته شده بدون تفاوت با یکدیگر همگی در یک راستا قرار گرفتند (تصویر شماره ۱)

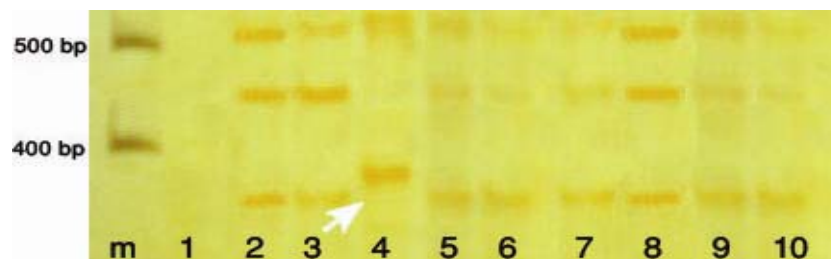
در این مطالعه تعداد ۳۰ نمونه مربوط به مردان با دامنه سنی ۵۱ تا ۷۷ سال و ۸ نمونه مربوط به زنان با دامنه سنی ۳۸ تا ۷۰ سال بود. میانگین سنی بیماران  $64/63 \pm 11/52$  سال بود. از طرفی تعداد ۹ نمونه از نوع سرطان معده منتشر و تعداد ۲۹ نمونه از نوع سرطان معده روده ای بود. نتایج حاصل از الکتروفورز SSCP محصولات PCR نشان دهنده حرکت متفاوت



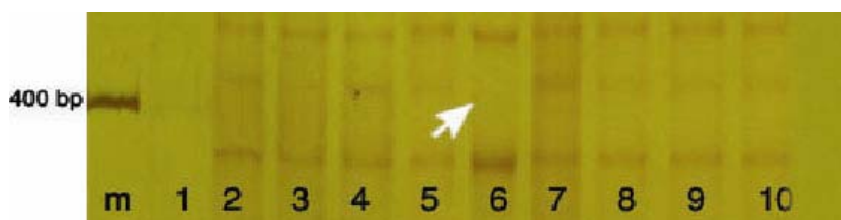
(الف)



(ب)



(ج)



(د)

**تصویر شماره ۱:** نتایج حاصل از الکتروفورز PCR-SSCP آگزون های ۱-۵ ژن *P53* بر روی ژل اکریل آمید. *m* = مارکر  $100\text{ bp}$ ، ۱ نمونه کنترل منفی (فاقد DNA) (الف) آگزون شماره ۵:  $4:5$  = کنترل مثبت (جابجایی باندهای واسرشته شده نسبت به سایر نمونه ها). ۲:۳:۶-۱۰ = نمونه های بیماران. (ب) آگزون شماره ۶:  $5:6$  = کنترل مثبت (جابجایی باندهای واسرشته شده نسبت به سایر نمونه ها). ۲-۴:۶-۱۰ = نمونه های بیماران. (ج) آگزون شماره ۷:  $4:7$  = کنترل مثبت (جابجایی باندهای واسرشته شده نسبت به سایر نمونه ها). ۲:۳:۵-۱۰ = نمونه های بیماران. (د) آگزون شماره ۸:  $6:8$  = کنترل مثبت (حذف شدن باندهای میانی در منطقه دنا توره شده). ۲-۵:۷-۱۰ = نمونه های بیماران

**بحث:**

مانند اغلب نقاط دنیا، سرطان معده دومین سرطان شایع در ایران می باشد. در بعضی از مناطق ایران مانند اردبیل سرطان معده شایع ترین نوع سرطان است (۳۲) و در استان چهارمحال و بختیاری دومین سرطان شایع در سال ۱۳۸۵ شناخته شده است (۱).

ایجاد سرطان یک فرآیند چند مرحله ای است که شامل تغییرات ژنتیکی در ژن های بوجود آورنده سرطان و ژن های سرکوب کننده سرطان نیز می شود. شایع ترین تغییراتی که در ارتباط با سرطان مشاهده شده است به ویژه در سرطان معده مربوط به ژن P53 است (۳۳).

متداول ترین جهش هایی که تا به حال برای ژن P53 در سرطان معده گزارش شده است شامل جهش در اگزون های ۵ تا ۸ و مخصوصاً کدون های ۱۷۵، ۲۴۸، ۲۷۳ و ۲۸۲ می باشد (۹).

در این مطالعه هیچ جهشی در مناطق hotspot ژن P53 در اگزون های ۵ تا ۸ مشاهده نشد. مطالعات گسترده ای بر روی این ژن در بیشتر نقاط دنیا انجام شده است و بر اساس آنها، همواره جهش بر روی ژن P53 بسته به موقعیت جغرافیایی و قومی مناطق در مورد سایر سرطان های مرتبط با این ژن متفاوت گزارش شده است. مثلاً در مورد سرطان پستان، در مطالعه ای که بر روی بخشی از جامعه ژاپن صورت گرفت، میزان جهش ژن P53 در اگزون ۸، ۵/۲ درصد و در جامعه ای دیگر از ژاپن ۲۸ درصد گزارش شده است (۲۰). در حالی که Meng و همکارانش در سرطان اولیه پستان ۶۱ درصد جهش بر روی اگزون های ۵-۸ این ژن گزارش کردند (۲۱). در مطالعه ای که میرزایی و همکاران در تهران در سال ۱۳۸۱ بر روی این ژن انجام دادند از ۳۲ بیمار مبتلا به سرطان پستان دو جهش در اگزون شماره ۵ و چهار جهش در اگزون شماره ۸ گزارش کردند (۲۲).

در سال ۱۳۸۴ گل محمدی و همکارانش بر روی ۴۰ نمونه مبتلا به سرطان کلورکتال در بیمارستان های شهر اصفهان مطالعه کردند و ۷ مورد جهش در اگزون

شماره ۶ ژن P53 گزارش کردند (۲۳). با توجه به شیوع بالای سرطان مری در شمال ایران، در مطالعه ای که بر روی ۷۴ بیمار مبتلا به سرطان مری در این منطقه صورت گرفت، تعداد ۵۴ نمونه (۶۵٪) دارای جهش بر روی ژن P53 بودند (۲۴).

در عین حال جهش بر روی این ژن در سرطان معده نیز بسیار متفاوت گزارش شده است در مطالعه ای که توسط Shiao و همکاران در ایتالیا صورت گرفت میزان بالایی از جهش ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان معده (۶۶٪) گزارش شد (۲۵). اما بر اساس مطالعه Yamada و همکاران در سال ۱۹۹۱ در ژاپن بر روی ۱۹ مورد سرطان اولیه معده، هیچ جهشی را در ژن P53 مشاهده نکردند (۲۶). در مطالعه جوشقانی و همکاران میزان جهش در ژن P53 در نمونه های بیوپسی تازه (پارافینه نشده) تهیه شده از بیماران مبتلا به سرطان معده در سه بیمارستان تهران که به روش PCR-SSCP انجام شد، ۲۰/۵ درصد گزارش شد. در این مطالعه، یک جهش در اگزون شماره ۵، سه جهش در اگزون شماره ۶، سه جهش در اگزون شماره ۷ و چهار جهش در اگزون شماره ۸ مشاهده شد (۲۷).

در سال ۱۹۹۷ مطالعه ای که توسط Hashemzadeh و همکاران در دانشگاه ویلز انگلستان (۲۸) بر روی اگزون های ۵-۸ ژن P53 در ۲۸ نمونه سرطان دهان و مری از شهر تهران به روش (Direct Sequencing) که یک روش Gold standard است انجام شد، فقط دو جهش در اگزون شماره ۷ این ژن بر روی کدون های شماره ۲۴۱ و ۲۴۶ مشاهده شد. این در حالی است که این کدون ها از توالی های بسیار نادر در بروز سرطان های مربوطه می باشند. اما همچنان کدون های ۲۴۸ و ۲۸۲ جزء مناطق Hot spot سرطان های دهان و مری معرفی شده اند. با این وجود در این مطالعه جهشی در این توالی ها گزارش نشده است. تعداد محدود جهش های گزارش شده در مطالعه

در مطالعه میرزایی و همکاران (۲۲) گل محمدی و همکاران (۲۳) و جوشقانی و همکاران (۲۷) تنها تفاوت حرکت در باندها را نشانه جهش گزارش کرده اند و اشاره ای به تعیین توالی مستقیم و شناسایی نوع جهش نشده است با چنین اطلاعاتی نمی توان مطالعات انجام شده را تایید کرد اما در مطالعه Hashemzadeh و همکاران (۲۸) تعیین توالی مستقیم نمونه ها نتایج قابل اطمینانی را ارائه می دهد.

### نتیجه گیری:

بر اساس این مطالعه، بیماران مبتلا به سرطان معده در استان چهارمحال و بختیاری، وقوع جهش بر روی اگزون های Hotspot ژن P۵۳ یعنی اگزون های ۵ تا ۸ مشاهده نشد. اما از آنجا که ژن P۵۳ یکی از مهمترین عوامل سرکوب کننده سرطان است و معمولاً جهش بر روی این ژن در بروز بسیاری از سرطان ها دخیل است لازم است تا مطالعات بیشتری بر روی سایر اگزون ها و پروموتور این ژن صورت گیرد و از تعداد نمونه های بیشتری استفاده شود تا جایگاه و اهمیت این ژن در بروز سرطان ها در جامعه مورد مطالعه مشخص گردد.

### تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از کارکنان بیمارستان آیت اله کاشانی شهرکرد و بخش پاتولوژی آن مخصوصاً جناب آقای نگهدار ریاحی به خاطر تهیه نمونه های بیوپسی معده، معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد جهت تامین بودجه و از کلیه کارکنان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

مزبور نشان دهنده تاثیر کم این ژن در بروز این سرطان ها در بیماران شهر تهران است (۲۸).

مطالعه ای نیز در سال ۱۳۸۷ بر روی ۳۸ نمونه از بیماران مبتلا به سرطان معده در استان چهارمحال و بختیاری به روش PCR-RFLP انجام شد. هیچ جهشی بر روی کدون های ۲۴۸ و ۲۸۲ مشاهده نشد (۲۹).

تفاوت در میزان جهش های گزارش شده بر روی ژن P۵۳ در مناطق مختلف موید این حقیقت است که بروز جهش در این ژن شدیداً تحت تاثیر عوامل محیطی، شرایط جغرافیایی و قومی است. با این وجود نوع روش آزمایش و تکنیک شناسایی جهش نیز از اهمیت بالایی برخوردار است. تکنیک PCR-SSCP یک تکنیک حساس و دقیق می باشد و نتایج حاصل شدیداً تحت تاثیر عوامل محیط و شرایط آزمایشگاه، متغیر است. اما استفاده از نمونه های کنترل در هر ژل و مقایسه آن با نمونه بیماران بر روی همان ژل تایید کننده نتایج خواهد بود و می تواند تا حدی محقق را در تنظیم شرایط الکتروفورز یاری کند. در هر صورت نتایج حاصل از این تکنیک کاملاً به مهارت و دقت آزمایش کننده بستگی دارد (۳۱). در این مطالعه در نمونه های بیماران هیچ تفاوتی در حرکت باندهای واسرشته شده مشاهده نشد اما نمونه های کنترل مثبت حرکت بسیار متفاوت تری نسبت به سایر نمونه ها داشتند. هر چند بر اساس تکنیک PCR-SSCP تنها مشاهده کردن تفاوت در حرکت باندها نمی تواند گواهی بر وجود جهش در نمونه های مورد مطالعه باشد. لازم است نمونه های مشکوک با استفاده از تکنیک استاندارد (Direct Sequencing) نیز مورد مطالعه و تایید قرار گیرند و نوع جهش نیز دقیقاً گزارش شود. در حالی که

### منابع:

1. Taghavi M, Jafari N. [Mortality feature in ۲۳ provinces of Iran in ۲۰۰۴. Tehran: Ministry of Health and Medical Education. ۲۰۰۶; p: ۱۷۲-۲۸۳.]Persian

۲. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*. ۱۹۹۸ Mar; ۳۹۲(۶۶۷۴): ۴۰۲-۵.
۳. Katiyar S, Dash BC, Thakur V, Guptan RC, Sarin SK, Das BC. P۵۳ tumor suppressor gene mutations in hepatocellular carcinoma patients in India. *Cancer*. ۲۰۰۰ Apr; ۸۸(۷): ۱۵۶۵-۷۳.
۴. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma: an attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. ۱۹۶۵; ۶۴: ۳۱-۴۹.
۵. Ranzani GN, Luinetti O, Padovan LS, Calistri D, Renault B, Burrel M, et al. P۵۳ gene mutations and protein nuclear accumulation are early events in intestinal type gastric cancer but late events in diffuse type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. ۱۹۹۵ Apr-May; ۴(۳): ۲۲۳-۳۱.
۶. Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res*. ۱۹۸۸ Jul; ۴۸(۱۳): ۳۵۵۴-۶۰.
۷. Cho YG, Kim CJ, Park CH, Yang YM, Kim SY, Nam SW, et al. Genetic alterations of the KLF۶ gene in gastric cancer. *Oncogene*. ۲۰۰۵ Jun; ۲۴(۲۸): ۴۵۸۸-۹۰.
۸. Fondevila C, Metges JP, Fuster J, Grau JJ, Palacin A, Castells A, et al. P۵۳ and VEGF expression are independent predictors of tumor recurrence and survival following curative resection of gastric cancer. *Br J Cancer*. ۲۰۰۴ Jan; ۹۰(۱): ۲۰۶-۱۵.
۹. Okuyama T, Maehara Y, Kabashima A, Takahashi I, Kakeji Y, Sugimachi K. Combined evaluation of expressions of P۵۳ and p۲۱ proteins as prognostic factors for patients with gastric carcinoma. *Oncology*. ۲۰۰۲; ۶۳(۴): ۳۵۳-۶۱.
۱۰. Benchimol S, Lamb P, Crawford LV, Sheer D, Shows TB, Bruns GA, et al. Transformation associated P۵۳ protein is encoded by a gene on human chromosome ۱۷. *Somat Cell Mol Genet*. ۱۹۸۵ Sep; ۱۱(۵): ۵۰۵-۱۰.
۱۱. Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human P۵۳ tumor antigen to band ۱۷p۱۳. *Nature*. ۱۹۸۶ Mar; ۳۲۰(۶۰۵۷): ۸۴-۵.
۱۲. Miller C, Mohandas T, Wolf D, Prokocimer M, Rotter V, Koeffler HP. Human P۵۳ gene localized to short arm of chromosome ۱۷. *Nature*. ۱۹۸۶ Feb-Mar; ۳۱۹(۶۰۵۶): ۷۸۳-۴.
۱۳. Tommasi S, Abatangelo M, Lacalamita R, Montemurro S, Marzullo F, Paradiso A. Mutations spanning P۵۳ exons ۵-۹ detected by non-isotopic RNase cleavage assay and protein expression in human colon cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. ۲۰۰۱ Aug; ۱۲۹(۱): ۴۰-۲.
۱۴. Katiyar S, Dash BC, Thakur V, Guptan RC, Sarin SK, Das BC. P۵۳ tumor suppressor gene mutations in hepatocellular carcinoma patients in India. *Cancer*. ۲۰۰۰ Apr; ۸۸(۷): ۱۵۶۵-۷۳.
۱۵. Menke-Pluymers MB, Hop WC, Mulder AH, Tilanus HW. DNA ploidy as a prognostic factor for patients with an adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Hepatogastroenterology*. ۱۹۹۵ Nov-Dec; ۴۲(۶): ۷۸۶-۸.
۱۶. Davidoff AM, Humphrey PA, Iglehart JD, Marks JR. Genetic basis for P۵۳ overexpression in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. ۱۹۹۱ Jun; ۸۸(۱۱): ۵۰۰۶-۱۰.
۱۷. Toledo F, Wahl GM. Regulating the p۵۳ pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer*. ۲۰۰۶ Dec; ۶(۱۲): ۹۰۹-۲۳.
۱۸. Bourdon JC. P۵۳ and its isoforms in cancer. *Br J Cancer*. ۲۰۰۷ Aug; ۹۷(۳): ۲۷۷-۸۲.
۱۹. Vousden KH, Lane DP. P۵۳ in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. ۲۰۰۷ Apr; ۸(۴): ۲۷۵-۸۳.
۲۰. Kleihues P, Schavble B. Tumors associated with P۵۳ germ line mutations a synopsis of ۹۱ families. *Am J Pathology*. ۱۹۹۷; ۱۵۰: ۱-۹.
۲۱. Meng L, Lin L, Zhang H, Nassiri M, Morales AR, Nadji M. Multiple mutations of the P۵۳ gene in human mammary carcinoma. *Mutat Res*. ۱۹۹۹ Dec; ۴۳۵(۳): ۲۶۳-۹.



۲۲. Mirzaei MR, Mehdipour P, Atri M, Teimouri H, Asadi GH. [Detection of P<sup>53</sup> gene mutations in exons ۵ and ۸ in patients of familial breast cancer with PCR-SSCP method. J Rafsanjan Univ Med Sci. ۲۰۰۲; ۲(۱): ۱۱۹-۲۵.]Persian
۲۳. Gol Mohamadi R, Nik Bakht M, Salehi M, Mokhtari M. [Detection of P<sup>53</sup> exon ۶ mutations in Isfahanian colorectal cancer patients by PCR-SSCP from ۱۳۸۲ to ۱۳۸۴. Feyz. ۲۰۰۶; ۱۰(۴ (Serial ۳۸): ۱-۷.]Persian
۲۴. Biramijamal F, Allameh A, Mirbod P, Groene HJ, Koomagi R, Hollstein M. Unusual profile and high prevalence of P<sup>53</sup> mutations in esophageal squamous cell carcinomas from northern Iran. Cancer Res. ۲۰۰۱ Apr; ۶۱(۷): ۳۱۱۹-۲۳.
۲۵. Shiao YH, Ruge M, Correa P, Lehmann HP, Scheer WD. P<sup>53</sup> alteration in gastric precancerous lesions. Am J Pathol. ۱۹۹۴ Mar; ۱۴۴(۳): ۵۱۱-۷.
۲۶. Yamada Y, Yoshida T, Hayashi K, Sekiya T, Yokota J, Hirohashi S, et al. P<sup>53</sup> gene mutations in gastric cancer metastases and in gastric cancer cell lines derived from metastases. Cancer Res. ۱۹۹۱ Nov; ۵۱(۲۱): ۵۸۰۰-۵.
۲۷. Joshaghani H, Koochaki ShE, Amini R, Derakhshandeh P, Ehsani ZA, Abani Sh, et al. [Study of P<sup>53</sup> mutations in gastric cancer by PCR-SSCP. J Gorgan Univ Med Sci. ۲۰۰۳; ۱۲(۵): ۳۶-۴۲.]Persian
۲۸. Hashemzadeh Chaleshtori M. Application of molecular genetics to the study of human diseases. A thesis submitted in partial full filament of the requirements for the degree of Doctor of Biology, School of Biological Sciences University of Wales Swansea, March ۱۹۹۷.
۲۹. Saffari Chaleshtori J, Moradi MT, Farrokhi E, Tabatabaiefar MA, Taherzadeh Farrokshahri M, Shayesteh F, et al. [Study of two common P<sup>53</sup> gene mutations in gastric cancer using PCR-RFLP in Chaharmahal va Bakhtiari province, Iran, ۲۰۰۳. Shahrekord Univ of Med Sci J. ۲۰۰۹; ۱۰(۴): ۴۳-۵۰.]Persian
۳۰. Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimization of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. Nucleic Acid Res. ۱۹۹۹; ۲۷(۱۶): e۱۲.
۳۱. Glavac D, Dean M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. Hum Mutat. ۱۹۹۳; ۲(۵): ۴۰۴-۱۴.
۳۲. Sadjadi A, Malekzadeh R, Derakhshan MH, Sepehr A, Nouraie M, Sotoudeh M, et al. Cancer occurrence in Ardabil: results of a population-based cancer registry from Iran. Int J Cancer. ۲۰۰۳ Oct; ۱۰۷(۱): ۱۱۳-۸.
۳۳. Joypaul BV, Hopwood D, Newman EL, Qureshi S, Grant A, Ogston SA, et al. The prognostic significance of the accumulation of P<sup>53</sup> tumor-suppressor gene protein in gastric adenocarcinoma. Br J Cancer. ۱۹۹۴ May; ۶۹(۵): ۹۴۳-۶.